

Selektive Markierung von Glykokonjugaten mit modifizierten Donorzuckern als Substrate von Glykosyltransferasen und Glykosidasen

**Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen zur
Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften genehmigte Dissertation**

vorgelegt von

**Diplom-Chemiker Darius-Jean Namdjou
aus Köln**

**Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Lothar Elling
Universitätsprofessor Dr.-ing. Winfried Hartmeier**

Tag der mündlichen Prüfung: 12.04.06

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Referent: Prof. Dr. L. Elling

Korreferent: Prof. Dr.-Ing. W. Hartmeier

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2000 bis Dezember 2001 am Lehrstuhl für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf sowie von Januar 2002 bis Juni 2004 im Lehr- und Forschungsgebiet Biomaterialien, Lehrstuhl für Biotechnologie der Rheinisch-Westfälisch Technischen Hochschule Aachen angefertigt. Die Arbeit wurde mit finanziellen Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Projektnummern EL 135/6-1 und EL 135/6-2) gefördert.

Mein Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Lothar Elling für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, für die interessante Themenstellung, die Betreuung der Arbeit sowie zahlreiche Diskussionen

Herrn Prof. Dr. Winfried Hartmeier, Lehrstuhl für Biotechnologie der Universität Aachen, für die freundliche Übernahme des Korreferates

Herrn Prof. Dr. Vladimir Kren, Institut für Mikrobiologie, Labor für Biotransformation, Tschechische Akademie der Wissenschaften, Prag, für die gastfreundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, zahlreiche Diskussionen sowie die Möglichkeit, die dort vorhandenen Methoden so zu nutzen, dass wichtige Fragen der hier vorliegenden Arbeit beantwortet werden konnten

Herrn Prof. Henrik Clausen, School of Dentistry, Universität Kopenhagen, für die gastfreundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, zahlreiche Diskussionen sowie die zur Verfügung gestellten Enzyme

Herrn Dr. Thomas Bülter für die Einarbeitung in das Thema

Frau Mara Colzani, Universität Mailand, für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Aufreinigung und Charakterisierung der Mutante

Frau Pavla Fialova, Institut für Mikrobiologie, Tschechische Akademie der Wissenschaften, Prag, für ihre tatkräftige Mitarbeit bei der Synthese der *p*NP-Zucker

Herrn Dipl.-Biol. Thomas Schumacher für tatkräftige Unterstützung bei der Klonierung der Mutante

Herrn Dr. Martin Hein, Institut für Organische Chemie der Universität Rostock, für die Aufnahme von NMR-Spektren

Herrn Dr. Marco Oldiges, Institut für Biotechnologie II im Forschungszentrum Jülich, für die Aufnahme von MS-Spektren

Bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biotechnologie, insbesondere jenen des Lehr- und Forschungsgebietes Biomaterialien für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, Anregungen zur Durchführung der hier vorliegenden Arbeit sowie schöne gemeinschaftliche Unternehmungen

im Besonderen meinen Eltern, ohne die für mich das Studium und die Dissertation nie möglich gewesen wären

vor allem aber meiner Frau Anja für ihr Verständnis und ihre große Unterstützung

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Verzeichnis der Abbildungen	X
Verzeichnis der Tabellen	XIV
Liste der Abkürzungen und Symbole	XVI
Abkürzungen	XVI
Symbole	XXII
A Einleitung	1
1 Glykokonjugate	1
2 Glykanbiosynthese	4
2.1 Biosynthese der N-Glykane	4
2.2 Biosynthese der O-Glykane	8
2.3 Terminale Strukturen	9
3 Glykosyltransferasen	12
4 Störung der Glykosylierung und deren Bedeutung für Krankheiten ...	15
4.1 Störung der N-Glykanbiosynthese im Krankheitsbild des CDGS.....	15
4.2 Störung der Glykanbiosynthese im Krankheitsbild der Cystischen Fibrose ...	19
4.3 Störung der Glykanbiosynthese bei Krebs	20
4.4 Glykosylierungsdefekte der Immunglobuline	22
4.4.1 Grundlagen des Immunsystems	22
4.4.2 IgA im Krankheitsbild der IgA-Nephropathie	24
4.4.3 IgG im Krankheitsbild der Rheumatoiden Arthritis.....	30
5 Molekulare Werkzeuge zur gezielten Markierung von Glykokonjugaten	35
5.1 Molekulare Werkzeuge <i>in vivo</i> – Metabolic Engineering.....	36
5.2 Molekulare Werkzeuge <i>in vitro</i>	43
5.3 Glykosyltransferasen-vermittelte Markierung von Glykoproteinen mit Glykosylierungsdefekten.....	46
5.3.1 Synthese von modifizierten Derivaten von UDP-Gal(NAc).....	46
5.3.2 Transfererfolge mit biotinylierten Derivaten von UDP-Gal(NAc)	49

B Zielsetzung	52
C Ergebnisse und Diskussion	53
1 Synthese der zu derivatisierenden Nukleotidzucker.....	53
2 Synthese von Uridin 5'-diphospho-6-biotin-ε- amidocaproylhydrazino-α-D-galactose (UDP-6-biotinyl-Gal)	57
2.1 Präparative Synthese von UDP-6-biotinhydrazono-Gal und Reduktion zu UDP-6-biotinyl-Gal	57
2.2 Isolierung von UDP-6-biotinyl-Gal.....	61
3 Aufreinigung verschiedener Konstrukte der humanen β4Gal-T1	66
3.1 Aufreinigung der freien humanen β4Gal-T1.....	66
3.2 Aufreinigung der luminalen humanen β4Gal-T1.....	70
3.3 Aufreinigung der humanen His ₆ -TagPropeptid-β4Gal-T1	72
4 Mutagenisierung der humanen β4Gal-T1.....	76
4.1 Strategie der Mutagenisierung.....	79
4.2 Ligation des mutagenisierten Gens in den Vektor pTS05.....	84
4.3 Transformation des Vektors pTS05mut in den Stamm Nova Blue.....	85
4.4 Expression und Aufreinigung der Mutante.....	87
4.4.1 Aufreinigung über IMAC an Ni ²⁺ -NTA im analytischen Maßstab.....	87
4.4.2 Aufreinigung über IMAC an Ni ²⁺ -NTA.....	89
5 Charakterisierung der β4Gal-T1-Konstrukte sowie der Mutante His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1(Y284L).....	92
5.1 Substratspektrum.....	92
5.2 pH-Optimum.....	96
5.3 Restaktivität mit verschiedenen Metallionen	97
5.4 Kinetische Charakterisierung	99
6 Spezifische Markierung der N-Glykanketten des Immunglobulin G als Beispiel krankheitsrelevanter Glykoproteine	112
6.1 Nachweis der IgG-Untergalactosylierung durch einen Lektin-Assay.....	113
6.2 Selektiver Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal(NAc) auf IgG	117

6.2.1	Nachweis speziesspezifischer Unter-Galactosylierung von IgG durch die Technik der glykosyltransferase-vermittelten selektiven Markierung.....	123
6.2.2	Quantifizierung der Biotinylierung des IgG.....	126
6.2.3	Abschließende Diskussion zur selektiven Markierung von IgG.....	133
7	Synthese modifizierter <i>p</i>NP-aktivierter Zucker	136
7.1	Synthese von <i>p</i>NP-6-biotinhydrazono-Gal(NAc).....	136
7.1.1	Enzymatische Oxidation von 4-Nitrophenyl- β -D-galactose (<i>p</i> NP-Gal) und 4-Nitrophenyl- <i>N</i> -acetyl- β -D-galactosamin (<i>p</i> NP-GalNAc) im analytischen Maßstab	138
7.1.2	Biotinylierung von 4-Nitrophenyl-6-oxo- β -D-galactose (<i>p</i> NP-6-oxo-Gal) und 4-Nitrophenyl-6-oxo- <i>N</i> -acetyl- β -D-galactosamin (<i>p</i> NP-6-oxo-GalNAc) im analytischen Maßstab.....	141
7.1.3	Eintopf-Synthese von <i>p</i> NP-6-biotinhydrazono-Gal und <i>p</i> NP-6-biotinhydrazono-GalNAc im analytischen Maßstab	143
7.1.4	Oxidation von <i>p</i> NP-Gal(NAc) im präparativen Maßstab	143
7.1.5	Biotinylierung von <i>p</i> NP-6-oxo-Gal(NAc) im präparativen Maßstab	147
7.2	Reduktion von <i>p</i>NP-6-biotinhydrazono-Gal.....	150
7.2.1	Reduktion von <i>p</i> NP-6-biotinhydrazono-Gal mit Natriumborhydrid (NaBH ₄).....	151
7.2.2	Reduktion von <i>p</i> NP-6-biotinhydrazono-Gal mit Boran (als Tetrahydrofuran-Komplex; Boran-THF-Komplex)	151
7.2.3	Isolierung von <i>p</i> NP-6-biotinyl-Gal	152
7.3	<i>p</i>NP-6-biotinyl-Gal als Substrat von Galactosidasen.....	153

D Zusammenfassung157

E Methoden159

1	Enzymtests.....	159
1.1	Galactose Oxidase	159
1.2	Galactosyltransferasen.....	160
1.2.1	HPLC-Assay für Galactosyltransferasen	160
1.2.2	Photometrischer Assay für Glykosyltransferasen	162
1.3	Galactosidasen	164
2	Synthese der zu derivatisierenden Nukleotidzucker.....	166

2.1	Präparative Synthese von Uridin 5'-diphospho- α -D-galactose (UDP-Gal).....	166
2.2	Isolierung von UDP-Gal.....	168
3	Synthese biotinylierter Nukleotidzucker.....	170
3.1	Synthese von Uridin 5'-diphospho-6-biotin- ϵ -amidocaproyl-hydrazino- α -D-galactose (UDP-6-biotinyl-Gal).....	170
3.1.1	Präparative Synthese von UDP-6-biotinhydrazono-Gal	170
3.1.2	Reduktion von UDP-6-biotinhydrazono-Gal	171
3.2	Isolierung von UDP-6-biotinyl-Gal.....	171
3.2.1	Zwei-Schritt-Strategie der Isolierung von UDP-6-biotinyl-Gal.....	171
3.2.2	Ein-Schritt-Strategie der Isolierung von UDP-6-biotinyl-Gal	173
3.2.3	Nachweis von Hydrazid-Kontamination.....	174
4	Aufreinigung von verschiedenen Konstrukten der humanen β4Gal-T1.....	174
4.1	Kultivierung und Aufreinigung der freien humanen β4Gal-T1 (Plasmid pLGalTΔ38).	174
4.1.1	Anzucht der Vorkulturen.....	174
4.1.2	Anzucht der Hauptkulturen	175
4.1.3	Erster Schritt der Aufreinigung: Anionenaustauschchromatographie	175
4.1.4	Zweiter Schritt der Aufreinigung: Chromatographie an Zn ²⁺ -NTA	176
4.1.5	Aufreinigung durch Kationenaustauschchromatographie.....	177
4.2	Kultivierung und Aufreinigung der luminalen humanen β4Gal-T1 (Plasmid lumGalT).....	178
4.2.1	Anzucht der Vorkulturen.....	178
4.2.2	Anzucht der Hauptkulturen	178
4.2.3	Aufreinigung durch Kationenaustauschchromatographie.....	178
4.3	Kultivierung und Aufreinigung der humanen His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1 (Plasmid pTS05)	179
4.3.1	Anzucht der Vorkulturen.....	179
4.3.2	Anzucht der Hauptkulturen	180
4.3.3	Aufreinigung über Ni ²⁺ -NTA-Spin-Columns	180
4.3.4	Aufreinigung über IMAC an Ni ²⁺ -NTA.....	181
5	Mutagenisierung von rekombinanter humaner β4Gal-T1.....	183
5.1	Klonierung der Mutante.....	183
5.1.1	PCR zur Einbringung der Mutation	183
5.1.2	Ligation	184
5.1.3	Restriktionsverdau des ligierten Plasmids PTS05mut	185

5.1.4	Transformation der ligierten DNA in <i>E.coli</i> Nova Blue	186
5.1.5	Plasmid-DNA-Isolierung	186
5.1.6	Restriktionsverdau des transformierten Plasmids	187
5.1.7	Sequenzierung des mutagenisierten Gens	187
5.2	Expression der Mutante His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1(Y284L)	188
5.2.1	Transformation in <i>E.coli</i> BL21DE3	188
5.2.2	Anzucht der ersten Vorkulturen	188
5.2.3	Anlegen von Dauerkulturen	188
5.2.4	Anzucht weiterer Vorkulturen.....	188
5.2.5	Anzucht der Hauptkulturen	189
5.3	Aufreinigung der Mutante His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1(Y284L)	189
5.3.1	Aufreinigung über Ni ²⁺ -NTA-Spin-Columns	189
5.3.2	Aufreinigung über IMAC an Ni ²⁺ -NTA.....	189
5.3.3	Aufreinigung über IMAC an Ni ²⁺ -NTA mit Gradienten-Elution	189
5.3.4	Anionenaustauscherchromatographie als zweiter Schritt nach Affinitätschromatographie an Ni ²⁺ -NTA.....	190
5.3.5	Gelfiltration als zweiter Schritt nach Affinitätschromatographie an Ni ²⁺ -NTA.....	191
6	Charakterisierung der β4Gal-T1-Konstrukte sowie der Mutante His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1(Y284L).....	192
6.1	Substratspektrum.....	192
6.2	pH-Optimum.....	196
6.3	Restaktivität mit verschiedenen Metallionen	196
6.4	Kinetische Charakterisierung	196
7	Spezifische Markierung der N-Glykanketten des Immunglobulin G als Beispiel krankheitsrelevanter Glykoproteine	201
7.1	Lektin-Analytik der IgG-Untergalactosylierung.....	201
7.2	Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal auf natives IgG.....	202
7.3	Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal(NAc) auf reduziertes und blockiertes IgG	203
7.4	Sandwich-ELSA-Test zum Nachweis von biotinyliertem IgG.....	204
7.5	Quantifizierung der Biotinylierung des IgG.....	205
8	Synthese modifizierter pNP-aktivierter Zucker.....	206
8.1	Synthese von 4-Nitrophenyl-6-biotinyl-ε-amidocaproyl- hydrazono-β-D-galactose (pNP-6-biotinhydrazono-Gal) und	

	4-Nitrophenyl-6-biotinyl-ϵ-amidocaproyl-hydrazono-<i>N</i>-Acetyl-β-D-galactosamin (<i>p</i>NP-6-biotinhydrazono-GalNAc) im analytischen Maßstab.....	206
8.1.1	Zeit-Umsatz-Kurve der enzymatischen Oxidation von <i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-galactose (<i>p</i> NP-Gal) und <i>p</i> -Nitrophenyl- <i>N</i> -acetyl- α -D-galactosamin (<i>p</i> NP-GalNAc)	206
8.1.2	Biotinylierung von 4-Nitrophenyl-6-oxo- β -D-galactose (<i>p</i> NP-6-oxo-Gal) und 4-Nitrophenyl-6-oxo- <i>N</i> -acetyl- β -D-galactosamin (<i>p</i> NP-6-oxo-GalNAc) im analytischen Maßstab	207
8.1.3	Optimierung der Synthese von 4-Nitrophenyl-6-biotinyl- ϵ -amidocaproyl-hydrazono- β -D-galactose (<i>p</i> NP-6-biotinhydrazono-Gal) und 4-Nitrophenyl-6-biotinyl- ϵ -amidocaproyl-hydrazono- <i>N</i> -acetyl- β -D-galactosamin (<i>p</i> NP-6-biotinhydrazono-GalNAc) im analytischen Maßstab	208
8.1.4	Eintopf-Synthese von <i>p</i> NP-6-biotinhydrazono-Gal und <i>p</i> NP-6-biotinhydrazono-GalNAc im analytischen Maßstab	208
8.2	Synthese von <i>p</i>NP-6-biotinhydrazono-Gal und <i>p</i>NP-6-biotinhydrazono-GalNAc im präparativen Maßstab	209
8.2.1	Oxidation von <i>p</i> NP-Gal(NAc) im präparativen Maßstab	209
8.2.2	Einfluss der H ₂ O ₂ -spaltenden Enzyme Katalase und Peroxidase bei der Oxidation von <i>p</i> NP-Gal(NAc)	211
8.2.3	Einfluss von CuSO ₄ bei der Oxidation von <i>p</i> NP-Gal(NAc)	211
8.2.4	Optimierung der Enzymmenge für die Oxidation von <i>p</i> NP-Gal(NAc)	211
8.2.5	Up-Scale der Oxidation von <i>p</i> NP-GalNAc	212
8.2.6	Biotinylierung von <i>p</i> NP-6-oxo-Gal(NAc) im präparativen Maßstab	212
8.3	Reduktion von <i>p</i>NP-6-biotinhydrazono-Gal.....	213
8.3.1	Reduktion von <i>p</i> NP-Gal mit Natriumcyanoborhydrid (NaCNBH ₃)	213
8.3.2	Reduktion von <i>p</i> NP-6-biotinhydrazono-Gal mit Natriumborhydrid (NaBH ₄).....	214
8.3.3	Reduktion von <i>p</i> NP-6-biotinhydrazono-Gal mit Boran (als Tetrahydrofuran-Komplex; Boran-THF-Komplex)	214
8.3.4	Isolierung von <i>p</i> NP-6-biotinyl-Gal	216

F Analytik.....217

1 DC-Analytik.....217

1.1	Allgemeines	217
1.2	Methode zur Trennung von <i>p</i>NP-aktivierten Zuckern.....	218
1.3	Methode zur Trennung von <i>p</i>NP-aktivierten, biotinylierten Zuckern.....	218

1.4	Methode zur Trennung von <i>p</i> NP-aktivierten, biotinylierten Zuckern von ihren Borat-Komplexen	219
2	HPLC-Analytik.....	219
2.1	Allgemeines	219
2.2	Methode zur Trennung von Nukleotidzuckern	220
2.3	Methode zur Trennung von Nukleotidzuckern von ihren Derivaten.....	221
2.4	Methode zur Trennung von <i>p</i> NP-aktivierten Zuckern.....	222
2.5	Weitere Methode zur Trennung von <i>p</i> NP-aktivierten Zuckern	223
2.6	Methode zur Trennung von Mono- und Oligosacchariden.....	223
3	Bestimmung des Proteingehaltes	224
4	Agarose-Gelelektrophorese	225
5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	226
6	Western Blot.....	227
G	Material	229
1	Chemikalien und Enzyme.....	229
2	Geräte	234
2.1	Agarosegelelektrophorese.....	234
2.2	Autoklaven	234
2.3	Chromatographie	234
2.4	HPLC.....	234
2.5	Kultur-Schüttler	235
2.6	PCR.....	235
2.7	pH-Messung	235
2.8	Photometer	235
2.9	Pipetten.....	235
2.10	SDS-PAGE und Blotting.....	235
2.11	Thermostate	236
2.12	Waagen	236
2.13	Zellaufschluss.....	236
2.14	Zentrifugen	236

H Spektren und Chromatogramme	237
1 Dünnschicht-Chromatogramme	237
2 HPLC-Chromatogramme.....	238
3 LC-Chromatogramme	242
4 NMR-Spektren.....	245
5 MS-Spektren	250
I Literaturverzeichnis	253
J Anhang.....	265

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Glykosidische Bindung von N- und O-Glykanen an Proteine.....	2
Abbildung 2: Verschiedene Typen von N-Glykanen.....	3
Abbildung 3: O-Glykan vom Mucin-Typ.....	4
Abbildung 4: Schema des ER- und Golgi-Teils der N-Glykan-Biosynthese.....	7
Abbildung 5: Synthese der O-glykosidischen <i>core</i> -Strukturen.....	9
Abbildung 6: Terminale Glykosylierung.....	11
Abbildung 7: Synthese von Dolichol, Bereitstellung der N-Glykane sowie molekulare Defekte der CDGS-Typen.....	17
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Beteiligung des TF-Antigens an der Adhäsion von metastatischen Zellen am Endothelium.....	21
Abbildung 9: Struktur des humanen IgA-Moleküls, humane IgA-Subklassen sowie humanes dimeres IgA1.....	25
Abbildung 10: Molekulares Modell des IgA1.....	27
Abbildung 11: O-Glykosylierungsstellen des IgA1 in der "hinge region".....	27
Abbildung 12: O-Glykanstrukturen des IgA1.....	28
Abbildung 13: Molekulares Modell des IgG Fc.....	31
Abbildung 14: Neutrale N-Glykan-Strukturen des humanen IgG.....	33
Abbildung 15: Allgemeine Strategie der Modifizierung von Glykokonjugaten mit "molekularen Werkzeugen".....	35
Abbildung 16: Biosynthese der <i>N</i> -Acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac).....	36
Abbildung 17: Struktur einer chemisch modifizierten Vorläuferstruktur der Sialinsäure.....	37
Abbildung 18: Strategie des "Metabolic Engineering" der Reaktivität von Zellen.....	38
Abbildung 19: Modifizierte Staudinger-Ligation.....	39
Abbildung 20: Der mit einer Azido-Gruppe modifizierte Sialinsäure-Vorläufer ManNaz.	40
Abbildung 21: "Salvage Pathway" der Biosynthese von UDP-GlcNAc.....	41
Abbildung 22: Strategie der Identifikation der posttranslationalen Modifikation O-GlcNAc.....	42
Abbildung 23: Struktur des chemisch mit einem Fluoreszenzfarbstoff modifizierten Derivats von Neuraminsäure, CMP-9-fluoresceinyl-Neu5Ac.....	43
Abbildung 24: Analogon von GDP-Fucose, welches das Antigen-Trisaccharid der Blutgruppe B trägt.....	44
Abbildung 25: Strategie der <i>in vitro</i> -Identifikation der posttranslationalen Modifikation O-GlcNAc.....	45
Abbildung 26: Selektive Markierung von Glykokonjugaten mit modifizierten Gal(NAc)-Derivaten als Substraten von Glykosyltransferasen der Gal-T- und ppGalNAc-T-Familien oder von Glykosidasen der Galactosidase- und <i>N</i> -Acetylhexosaminidase-Familien.....	47

Abbildung 27: Präparative Synthese von UDP-6-biotinyl-Gal(NAc).....	49
Abbildung 28: Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal mit den rekombinanten humanen Galactosyltransferasen β 3Gal-T5, β 4Gal-T1 und β 4Gal-T4 auf Ovalbumin.....	50
Abbildung 29: Enzymatische Synthese von UDP-Gal.....	54
Abbildung 30: Strukturformel von UDP-Gal.....	55
Abbildung 31: Präparative Synthese von UDP-6-biotinyl-Gal(NAc).....	58
Abbildung 32: Schema des Reaktors mit integrierter Schlauchbegasung.....	59
Abbildung 33: Photographie des Reaktors mit integrierter Schlauchbegasung.....	59
Abbildung 34: Zeit-Umsatz-Kurve der präparativen Synthese von UDP-6-biotinyl-Gal.....	60
Abbildung 35: Ausschnitt eines Western Blots zum Biotin-Nachweis bei Transfer auf das unglykosylierte Protein Creatinase.....	62
Abbildung 36: Reaktion von Pikrylsulfonsäure mit Hydraziden.....	63
Abbildung 37: Aminosäuresequenz des aus dem Plasmid pLGalT Δ 38 exprimierten Fusionsproteins des Pre-Propetids aus <i>S. hyicus</i> und der löslichen Form der humanen β 4Gal-T1.....	67
Abbildung 38: Topographie von Leloir-Glykosyltransferasen.....	71
Abbildung 39: Aminosäuresequenz-Alignment der aus den Plasmiden pLGalT Δ 38, lum GalT und pTS05 exprimierten humanen β 4Gal-T1.....	74
Abbildung 40: Modelling von UDP-Gal in das aktive Zentrum der bovinen β 4Gal-T1.....	76
Abbildung 41: Modelling von UDP-GalNAc ins aktive Zentrum der bovinen β 4Gal-T1.....	77
Abbildung 42: Modelling von UDP-GalNAc ins aktive Zentrum der Mutante der bovinen β 4Gal-T1.....	78
Abbildung 43: Alignment der Sequenzen der bovinen und humanen β 4Gal-T1.....	80
Abbildung 44: Mutation des Gal-T-Anteils der His ₆ -TagPropeptid- β 4Gal-T1.....	81
Abbildung 45: Sequenzspezifische PCR-Mutagenese zur Erzeugung der Mutante des Gal-T- Anteils der His ₆ -TagPropeptid- β 4Gal-T1.....	82
Abbildung 46: Agarose-Gel mit den beiden durch die erste PCR-Folge entstandenen Genfragmenten.....	83
Abbildung 47: Agarose-Gel mit dem nach zweiter PCR-Folge entstandenen mutagenisierten Gesamt-Gen (Gal-T-Anteil der His ₆ -TagPropeptid- β 4Gal-T1).....	84
Abbildung 48: Agarosegel zur Kontrolle der Ligation mittels PCR.....	85
Abbildung 49: Agarosegel der isolierten und verdauten DNA nach Transformation.....	86
Abbildung 50: Western Immunoblotting der IMAC der Mutante His ₆ -TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L) sowie des Wildtyp-His ₆ -TagPropeptid- β 4Gal-T1-Proteins im analytischen Maßstab.....	88
Abbildung 51: SDS-PAGE-Gel der Mutante His ₆ -TagPropeptid- β 4Gal-T1 nach IMAC	

an Ni ²⁺ -NTA im präparativen Maßstab.....	89
Abbildung 52: pH-Optimumskurve der Gal-T-Konstrukte freie, luminale und His ₆ -TagPropeptid-β4Gal-T1 sowie der Mutante His ₆ -TagPropeptid-β4Gal-T1(Y284L).....	96
Abbildung 53: Restaktivitäten der Gal-T-Konstrukte mit verschiedenen Metallionen	98
Abbildung 54: Kinetische Verläufe bei der Variation der Akzeptorkonzentration (A) und der Donorkonzentration (B) für den Transfer von UDP-Gal (freie β4Gal-T1, luminale β4Gal-T1 und His ₆ -TagPropeptid-β4Gal-T1) bzw. UDP-GalNAc (His ₆ -TagPropeptid-β4Gal-T1(Y284L)) auf GlcNAcβ1-Bn	100
Abbildung 55: Kinetische Verläufe bei der Variation der Akzeptorkonzentration (A) und der Donorkonzentration (B) für den Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal (luminale β4Gal-T1 und His ₆ -TagPropeptid-β4Gal-T1) auf GlcNAcβ1-Bn	103
Abbildung 56: Kinetische Verläufe bei der Variation der Akzeptorkonzentration (A) und der Donorkonzentration (B) für den Transfer von UDP-Gal (freie β4Gal-T1, luminale β4Gal-T1 und His ₆ -TagPropeptid-β4Gal-T1) auf β-GlcNAc.....	105
Abbildung 57: Kinetische Verläufe bei der Variation der Akzeptorkonzentration (A) und der Donorkonzentration (B) für den Transfer von UDP-Gal (freie β4Gal-T1, luminale β4Gal-T1 und His ₆ -TagPropeptid-β4Gal-T1) auf das IgG der Ratte.....	107
Abbildung 58: Kinetische Verläufe bei der Variation der Akzeptorkonzentration (A) und der Donorkonzentration (B) für den Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal (freie β4Gal-T1 und luminale β4Gal-T1) auf das IgG der Ratte.....	109
Abbildung 59: Spezies-spezifische Variation der Untergalactosylierung von IgG.....	113
Abbildung 60: WGA-Lektin-Assay mit IgG aus Huhn, Ratte und dem Menschen.....	115
Abbildung 61: WGA-Lektin-Assay mit IgG aus Pferd, Maus und Ratte.....	116
Abbildung 62: Molekulares Modell des IgG Fc-Fragments.....	117
Abbildung 63: Reduktion und Blockierung des IgG-Moleküls.....	118
Abbildung 64: Sandwich-ELSA für den Nachweis von selektiv markiertem IgG.....	120
Abbildung 65: Ergebnisse des Sandwich-ELSA für den Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal auf natives Ratten IgG mit der freien β4Gal-T1.....	121
Abbildung 66: Ergebnisse des Sandwich-ELSA für den Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal auf natives und reduziertes IgG der Ratte mit der freien und der luminalen β4Gal-T1.....	122
Abbildung 67: Ergebnisse des Sandwich-ELSA für den Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal mit freier β4Gal-T1 auf reduziertes IgG aus Huhn, Mensch und Ratte.....	124

Abbildung 68: Ergebnisse des Sandwich-ELSA für den Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal mit freier β 4Gal-T1 auf reduziertes Ig aus Pferd, Maus und Ratte	125
Abbildung 69: Quantifizierung der maximal mit der freien β 4Gal-T1 transferierbaren Menge von UDP-Gal auf die schweren Ketten des reduzierten und blockierten Ratten IgG	128
Abbildung 70: Quantifizierung der maximal mit verschiedenen Konzentrationen der freien β 4Gal-T1 transferierbaren Menge von UDP-6-biotinyl-Gal auf die schweren Ketten des reduzierten und blockierten Ratten IgG..	130
Abbildung 71: Quantifizierung der maximal mit der freien β 4Gal-T1 transferierbaren Menge von UDP-Gal auf die schweren Ketten des reduzierten und blockierten IgG verschiedener Spezies..	131
Abbildung 72: Quantifizierung der maximal mit der freien β 4Gal-T1 transferierbaren Menge von UDP-Gal-Biotin auf die schweren Ketten des reduzierten und blockierten IgG verschiedener Spezies.	132
Abbildung 73: Synthese von <i>p</i> NP-6-biotinyl-Gal(NAc).....	137
Abbildung 74: Synthese von Gal-Biotin.	138
Abbildung 75: Oxidation von <i>p</i> NP-Gal(NAc) mit Galactose Oxidase.	139
Abbildung 76: Zeit-Umsatz Kurve der Oxidation von <i>p</i> NP-Gal (A) und <i>p</i> NP-GalNAc (B) im analytischen Maßstab.	140
Abbildung 77: Derivatisierung von <i>p</i> NP-6-biotinyl-Gal(NAc).	141
Abbildung 78: Ausbeute an <i>p</i> NP-6-biotinhydrazono-Gal in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an BACH	142
Abbildung 79: Zeit-Umsatz Kurve der präparativen Oxidation von <i>p</i> NP-Gal (A) und <i>p</i> NP-GalNAc (B).....	145
Abbildung 80: Strukturformel von <i>p</i> NP-6-biotinhydrazono-Gal.....	148
Abbildung 81: Strukturformel von <i>p</i> NP-6-biotinhydrazono-GalNAc.	149
Abbildung 82: Reduktion von <i>p</i> NP-6-biotinhydrazono-Gal mit Boran in THF.	152
Abbildung 83: Synthese der Uronsäure und des Uronsäuremethylesters von <i>p</i> NP-GalNAc.	156
Abbildung 84: Gekoppelter enzymatischer Glykosyltransferasen-Assay nach Barratt <i>et al.</i> 2001.	162
Abbildung 85: Synthesen mit der Repetitive Batch Technique (nach Kragl <i>et al.</i> 1993).....	166
Abbildung 86: DC-Chromatogramme der Methoden E 1.2, 1.3 und 1.4.	237
Abbildung 87: HPLC-Chromatogramm nach Synthese und Isolierung von UDP-Gal, Methode F 2.2.	238
Abbildung 88: HPLC-Chromatogramm der Synthese von UDP-6-biotinyl-Gal, Methode F 2.3.	238
Abbildung 89: HPLC-Chromatogramm der Oxidation von <i>p</i> NP-GalNAc, Methode F 2.4. .	239
Abbildung 90: HPLC-Chromatogramm der Oxidation von <i>p</i> NP-GalNAc, Methode F 2.5. .	240

Abbildung 91: HPLC-Chromatogramm des Gal-T-Aktivitätstests (freie β 4Gal-T1) für den Pool der Zn^{2+} -NTA.....	241
Abbildung 92: HPLC-Chromatogramm des Nachweises der Aktivität der Mutante der rekombinanten humanen β 4Gal-T1, Methode F 2.6.....	241
Abbildung 93: LC-Chromatogramm der Aufreinigung an Zn^{2+} -NTA der freien β 4Gal-T1, Methode E 4.1.4.....	242
Abbildung 94: LC-Chromatogramm der Aufreinigung an SP-Sepharose der luminalen β 4Gal-T1, Methode E 4.2.3.....	243
Abbildung 95: LC-Chromatogramm der Aufreinigung an Ni^{2+} -NTA der His ₆ -TagPropeptid β 4Gal-T1, Methode E 4.3.4.....	244
Abbildung 96: LC-Chromatogramm der Aufreinigung an Ni^{2+} -NTA der Mutante His ₆ -TagPropeptid β 4Gal-T1(Y284L), Methode E 5.3.2.....	244
Abbildung 97: ¹ H-NMR-Spektrum von UDP-Gal.....	245
Abbildung 98: ¹ H ¹³ C / DEPT-NMR-Spektrum von <i>p</i> NP-6-biotinhydrazono-Gal.....	246
Abbildung 99: ¹ H-NMR-Spektrum von <i>p</i> NP-6-biotinhydrazono-GalNAc.....	246
Abbildung 100: ¹ H- ¹ H COSY-Spektrum von <i>p</i> NP-6-biotinhydrazono-GalNAc.....	247
Abbildung 101: ¹ H- ¹³ C COR-Spektrum von <i>p</i> NP-6-biotinhydrazono-GalNAc.....	248
Abbildung 102: ¹ H- ¹³ C gs-HMBC-Spektrum von <i>p</i> NP-6-biotinhydrazono-GalNAc.....	249
Abbildung 103: ESI-MS-Spektrum von UDP-6-biotinyl-Gal.....	250
Abbildung 104: ¹ H ESI-MS-Spektrum von <i>p</i> NP-6-biotinyl-Gal.....	251
Abbildung 105: ESI-MS-Spektrum von <i>p</i> NP-6-biotinyl-GalNAc.....	252
Abbildung 106: Vektorkarte des Plasmids pLGal Δ 38.....	266
Abbildung 107: Vektorkarte des Plasmids lumGalT.....	266
Abbildung 108: Vektorkarte des Plasmids pTS05.....	267
Abbildung 109: Vektorkarte des Plasmids pTS05mut.....	267
Abbildung 110: Sequenz des Gens der freien β 4Gal-T1.....	268
Abbildung 111: Sequenz des Gens der luminalen β 4Gal-T1.....	269
Abbildung 112: Sequenz des Gens der His ₆ -TagPropeptid- β 4Gal-T1.....	270
Abbildung 113: Sequenz des Gens der His ₆ -TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L).....	270

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Eigenschaften von Mitgliedern der β 3GalT-Familie.....	13
Tabelle 2: Eigenschaften von Mitgliedern der β 4Gal-T-Familie.....	14
Tabelle 3: CDG-Varianten.....	18
Tabelle 4: Verlauf der Isolierung von UDP-Gal.....	55
Tabelle 5: Verlauf der Isolierung von UDP-6-biotinyl-Gal nach Bülter.....	61

Tabelle 6: Bilanz der neu etablierten Isolierung von UDP-6-biotinyl-Gal.....	65
Tabelle 7: Bilanz der Aufreinigung der freien β 4Gal-T1.....	70
Tabelle 8: Bilanz der Aufreinigung der luminalen β 4Gal-T1.....	72
Tabelle 9: Bilanz der Aufreinigung des Fusionsproteins His ₆ -TagPropeptid- β 4Gal-T1.....	75
Tabelle 10: Bilanz der Aufreinigung der Mutante der His ₆ -TagPropeptid- β 4Gal-T1.....	90
Tabelle 11: Substratspektrum der Gal-T-Konstrukte freie β 4Gal-T1, luminalen β 4Gal-T1 und His ₆ -TagPropeptid- β 4Gal-T1 sowie der Mutante His ₆ -TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L).....	92
Tabelle 12: Kinetische Konstanten bei der Variation der Akzeptorkonzentration (A) und der Donorkonzentration (B) für den Transfer von UDP-Gal (freie β 4Gal-T1, luminalen β 4Gal-T1 und His ₆ -TagPropeptid- β 4Gal-T1) bzw. UDP-GalNAc (His ₆ -TagPropeptid- β 4Gal-T1) auf GlcNAc β 1-Bn.....	101
Tabelle 13: Kinetische Konstanten bei der Variation der Akzeptorkonzentration (A) und der Donorkonzentration (B) für den Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal (luminalen β 4Gal-T1 und His ₆ -TagPropeptid- β 4Gal-T1) auf GlcNAc β 1-Bn..	104
Tabelle 14: Kinetische Konstanten bei der Variation der Akzeptorkonzentration (A) und der Donorkonzentration (B) für den Transfer von UDP-Gal (freie β 4Gal-T1, luminalen β 4Gal-T1 und His ₆ -TagPropeptid- β 4Gal-T1) auf β -GlcNAc.....	106
Tabelle 15: Kinetische Konstanten bei der Variation der Akzeptorkonzentration (A) und der Donorkonzentration (B) für den Transfer von UDP-Gal (freie β 4Gal-T1, luminalen β 4Gal-T1 und His ₆ -TagPropeptid- β 4Gal-T1) auf das IgG der Ratte..	108
Tabelle 16: Kinetische Konstanten bei der Variation der Akzeptorkonzentration (A) und der Donorkonzentration (B) für den Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal (freie β 4Gal-T1 und luminalen β 4Gal-T1) auf das IgG der Ratte.....	110
Tabelle 17: Vergleich der Extinktionsverhältnisse der verschiedenen Spezies bei Lektin-Assay und selektivem Transfer.	126
Tabelle 18: Reaktionsausbeute bei der Synthese von <i>p</i> NP-6-biotinhydrazono-Gal (A) und <i>p</i> NP-6-biotinhydrazono-GalNAc (B).....	147
Tabelle 19: R _F -Werte der mit der DC-Methode F 1.2 analysierten Substanzen.	218
Tabelle 20: R _F -Werte der mit der DC-Methode F 1.3 analysierten Substanzen.	218
Tabelle 21: R _F -Werte der mit der DC-Methode F 1.4 analysierten Substanzen.	219
Tabelle 22: Retentionszeiten der mit der HPLC-Methode F 2.2 analysierten Substanzen. ...	220
Tabelle 23: Retentionszeiten der mit der HPLC-Methode F 2.3 analysierten Substanzen. ...	221
Tabelle 24: Retentionszeiten der mit der HPLC-Methode F 2.4 analysierten Substanzen. ...	222
Tabelle 25: Retentionszeiten der mit der HPLC-Methode F 2.5 analysierten Substanzen. ...	223
Tabelle 26: Retentionszeiten der mit der HPLC-Methode F 2.6 analysierten Substanzen. ...	224

Liste der Abkürzungen und Symbole

Abkürzungen

Abb	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)
<i>A.oryzae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
Asn	Asparagin
BACH	Biotin- ϵ -amidocaproylhydrazid
<i>B.circulans</i>	<i>Bacillus circulans</i>
b	Nukleotid-Base
BenzylGlcNAc	Benzyl- <i>N</i> -acetyl- β -D-glucosamin
bp	Basenpaare
br	breit (NMR-Signal)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C	konstante Region der Aminosäuresequenz eines Immunoglobulins
C _H	konstante Region der Aminosäuresequenz eines Immunoglobulins im Bereich der schweren Kette
CDG	<i>Congenital Disorders of Glycosylation</i>
cDNA	<i>Complementary Desoxy nucleic acid</i>
CE	<i>Capillary Electrophoresis</i>
CE-LIF	<i>Capillary Electrophoresis-Laser Induced Fluorescence</i>
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CIC	<i>Circulating Immune Complexes</i>
CMC	<i>critical micell concentration</i>
COR	<i>Correlation</i>
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
cpm	<i>counts per minute</i>

Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-d6	deutერიertes Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESI-MS	<i>Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>
eng	englisch
Fru-6-P	D-Fructose-6-phosphat
Fuc	L-Fucose
g	Gramm
Gal	D-Galactose
Gal-Biotin	6-biotin-ε-amidocaproylhydrazino-β-D-galactose
GalNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamin
Gal-1-P	α-D-Galactose-1-phosphat
Gal-1-P-Uridyltransferase	Galactose-1-phosphat-uridyltransferase
Gal-T	Galactosyltransferase
GDP-Man	Guanosin 5'-diphospho-α-D-mannose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamin
Glc-1-P	α-D-Glucose-1-phosphat
Glc-6-P	D-Glucose-6-phosphat
Glc-6-P-Dehydrogenase	Glucose-6-phosphat-dehydrogenase
GN-T	<i>N</i> -Acetylglucosaminyltransferasen
GO	Galactose Oxidase
gs-HMBC	<i>gradient-selected Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
H	schwere Kette eines Immunoglobulins
HEPES	2-[4-(2-Hydroxymethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure
His	Histidin

HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
Hz	Hertz
Ig	Immunglobulin
IgA	Immunoglobulin A
IgG	Immunoglobulin G
IDA	Iminodiacetic Acid
Ile	Isoleucin
IMAC	Immobilisierte Metallionenchromatographie
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactosid
l	Liter
L	leichte Kette eines Immunoglobulins
α -LA	α -Lactalbumin
LacNAc	<i>N</i> -Acetylactosamin
LB	Luria-Bertani
LDH	Lactatdehydrogenase
Leu	Leucin
LPS	Lipopolysaccharide
m	Meter
M	Molar
Man-1-P	α -D-Mannose-1-phosphat
Man-6-P	D-Mannose-6-phosphat
MALDI-TOF-MS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i> <i>Time-Of-Flight Mass Spectrometry</i>
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
mIgA	monomeres Immunoglobulin A
min	Minuten
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MUC	Mucin
MW	Molekulargewicht
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>

NTA	<i>Nitrilo Triacetic Acid</i>
OD	Optische Dichte
ODS	Octadecylsilyl
OPD	<i>ortho</i> -Phenylendiamin
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEP	Phosphoenolpyruvat
pIgA	polymeres Immunoglobulin A
PK	Pyruvatkinase
<i>p</i> NP	<i>para</i> -Nitrophenyl
<i>p</i> NP-6-biotinhydrazono-Gal	<i>para</i> -Nitrophenyl-6-biotin- ϵ -amidocaproylhydrazono- β -D-galactose
<i>p</i> NP-6-biotinhydrazono-GalNAc	<i>para</i> -Nitrophenyl- <i>N</i> -acetyl-6-biotin- ϵ -amidocaproylhydrazono- β -D-galactosamin
<i>p</i> NP-6-biotinyl-Gal	<i>para</i> -Nitrophenyl-6-biotin- ϵ -amidocaproylhydrazino- β -D-galactose
<i>p</i> NP-6-biotinyl-GalNAc	<i>para</i> -Nitrophenyl- <i>N</i> -acetyl-6-biotin- ϵ -amidocaproylhydrazono- β -D-galactosamin
<i>p</i> NP-6-Oxo-Gal	<i>para</i> -Nitrophenyl-6-oxo- β -D-galactose
<i>p</i> NP-6-Oxo-GalNAc	<i>para</i> -Nitrophenyl- <i>N</i> -acetyl-6-oxo- β -D-galactosamin
<i>p</i> NP-Gal	<i>para</i> -Nitrophenyl- β -D-galactose
<i>p</i> NP-GalNAc	<i>para</i> -Nitrophenyl- <i>N</i> -acetyl- β -D-galactosamin
PPGalNAc-T	UDP-GalNAc:Polypeptid- <i>N</i> -Acetylgalactosaminyltransferase
Pro	Prolin
RA	Rheumatoide Arthritis
RER	Rauhes Endoplasmatisches Retikulum
RF	Rheuma-Faktor
RP	<i>Reversed Phase</i>
RT	Raumtemperatur
S-layer	<i>Surface layer</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>

SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
Ser	Serin
sLe ^a	Sialyl Lewis ^a
sLe ^x	Sialyl Lewis ^x
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
T _H -Zellen	Helfer-T-Zellen
Thr	Threonin
TF-Antigen	Thomsen-Friedenreich-Antigen
THF	Tetrahydrofuran
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzonsulfonsäure
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
UDP	Uridin 5'-diphosphat
UDP-6-biotinhydrazono-Gal	Uridin 5'-diphospho-6-biotin- ϵ -amidocaproylhydrazono- α -D-galactose
UDP-6-biotinhydrazono-GalNAc	Uridin 5'-diphospho- <i>N</i> -acetyl-6-biotin- ϵ -amidocaproylhydrazono- α -D-galactosamin
UDP-6-biotinyl-Gal	Uridin 5'-diphospho-6-biotin- ϵ -amidocaproylhydrazino- α -D-galactose
UDP-6-biotinyl-GalNAc	Uridin 5'-diphospho- <i>N</i> -acetyl-6-biotin- ϵ -amidocaproylhydrazino- α -D-galactosamin
UDP-Gal	Uridin-5'-diphospho- α -D-galactose
UDP-GalA	Uridin 5'-diphospho- α -D-galacturonsäure
UDP-GalNAc	Uridin-5'-diphospho- <i>N</i> -acetyl- α -D-galactosamin
UDP-Glc	Uridin-5'-diphospho- α -D-glucose
UDP-GlcNAc	Uridin-5'-diphospho- <i>N</i> -acetyl- α -D-glucosamin
UF	Ultrafiltration
UMP	Uridin 5'-monophosphat
UTP	Uridin 5'-triphosphat
UV	Ultraviolett

v	<i>volume</i>
V	variable Region der Aminosäuresequenz eines Immunoglobulins
V _H	variable Region der Aminosäuresequenz eines Immunoglobulins im Bereich der schweren Kette
V _L	variable Region der Aminosäuresequenz eines Immunoglobulins im Bereich der leichten Kette
w	<i>weight</i>
WGA	<i>Wheat Germ Agglutinin</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

Symbole

A	Aktivität
c	Konzentration
d	Dublett
δ	chemische Verschiebung
dd	Dublett von Dubletts
ddd	Dublett von Dublett von Dubletts
E	Extinktion
ϵ	Extinktionskoeffizient
J	Kopplungskonstante
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
m	Multiplet
s	Singulett
t	Triplet
t	Zeit
U	Unit
V	Volumen

A Einleitung

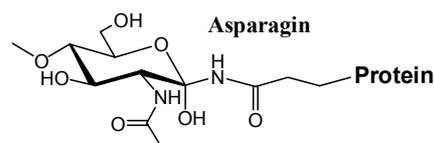
1 Glykokonjugate

Glykokonjugate lassen sich in Glykoproteine, Glykolipide, Glykophospholipide, Glykosphingolipide und Proteoglykane unterteilen. Ihre Funktionen sind vielfältig und wurden in den letzten Jahren intensiv erforscht. Allerdings sind diese Untersuchungen keineswegs abgeschlossen und es bleibt noch ein weites Feld, welches Blickpunkt der aktuellen Forschung ist (Varki 1993; Macmillan und Daines 2003). Die bekanntesten Beispiele der Glykokonjugatstrukturen der Eukaryonten sind die Blutgruppen-Antigene AB0(H) (Kobata 2000), die Sialyl-Lewis-x und Sialyl-Lewis-a-Strukturen als Liganden von E-, P- und L-Selektin bei der Entzündungsreaktion (Handa *et al.* 1991; Polley *et al.* 1991; Ley 2003) sowie das Galili-Epitop ($\text{Gal}\alpha 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc-R}$), das eine enorme immunologische Barriere bei der Xenotransplantation darstellt (Joziase und Oriol 1999; Galili 2004). Die Selektinfamilie von Rezeptorproteinen ist gleichzeitig das bestdokumentierte Beispiel für den Einfluss von Glykokonjugaten bei der Zell-Zell-Kommunikation (Varki 1993). Darüberhinaus sind Glykokonjugate wie etwa die Proteoglykane in der Aufrechterhaltung von Gewebestrukturen von Bedeutung (Ruoslahti 1988; Ruoslahti 1996). Die Ummantelung mit Oligosacchariden, das sogenannte "Coating", schützt verschiedene Glykoproteine vor Angriffen durch Proteasen oder Antikörper (Smith *et al.* 1986; O'Connell *et al.* 1991; Varki 1993; Cantor *et al.* 1999). Auch haben Glykokonjugate eine Funktion bei der korrekten Proteinfaltung (Varki 1993; Shi und Elliott 2004). Als Bestandteil hochspezifischer Rezeptoren sind Oligosaccharide beim Eindringen von Viren, Bakterien oder Parasiten in die Zelle beteiligt (Parsons *et al.* 1988; Chenkman *et al.* 1991; Schauer 2000; Buschiazzo *et al.* 2002). Ein Verhindern dieses Eindringens ist konträr dazu durch vom Wirtsorganismus modifizierte Oligosaccharide, also einer Maskierung der Glykokonjugat-Erkennungssequenzen der Rezeptoren, möglich (Reuter und Gabius 1996; Schauer 2000). Glykokonjugate haben ebenfalls eine Funktion beim Tumorwachstum und der Metastasenbildung (Brockhausen 2003).

Die Funktionen prokaryontischer Glykokonjugate sind ebenfalls in hohem Umfang studiert worden. Bekannt sind prokaryontische Glykokonjugate als Zellwandbestandteile sowohl Gram-positiver- als auch Gram-negativer Bakterien wie z.B. im Murein, dem

A Einleitung

Makromolekül an der Außenseite der cytoplasmatischen Membran (Hartmann und König 1990; van Heijenoort 2001). Auch sind Lipopolysaccharide (LPS) als Lipidbestandteil der Zellwand Gram-negativer Bakterien weithin untersucht worden (Yethon und Whitfield 2001). Der hydrophobe Membrananker, Lipid A, ist bei Enterobakterien mit Endotoxin synonym. Endotoxine lösen im Wirt den endotoxischen Schock, Fieber und eine Aktivierung von Lymphozyten und Makrophagen aus (Yethon und Whitfield 2001). In den letzten Jahren wurden aber auch Glykoproteine in prokaryontischen Organismen gefunden, zunächst als S-layer (surface layer), der kristallinen äusseren Hülle von Archae- und einigen Eubakterien (Messner und Sleytr 1991; Schaffer *et al.* 1996). In der letzten Zeit sind z.B. aber auch membranassoziierte Glykoproteine (Meyer und Schafer 1992; Messner 1997), Glykoproteine der Zelloberfläche (Flagelline) (Messner 1997) sowie sekretierte Glykoproteine identifiziert worden (Messner 1997). Bislang bekannte Funktionen liegen in der Kontrolle der Immugenozität und der Pathogenozität (Adhäsion) sowie in der Kommunikation zwischen bakteriellen und eukaryontischen Zellen (Schaffer *et al.* 2001; Upreti *et al.* 2003).



N-Acetyl-D-glucosamin



N-Acetyl-D-galactosamin

Abbildung 1: Glykosidische Bindung von N- und O-Glykanen an Proteine.

Die Glykane der Proteine sind bei Eukaryonten über eine kovalente Bindung mit der Amidgruppe des Asparagins (Asn) (N-Glykane) oder mit der Hydroxylgruppe von Serin (Ser) oder Threonin (Thr) (O-Glykane) verknüpft (Abbildung 1). Im Unterschied zu den O-Glykanen gibt es für die Anheftung von N-Glykanen an ein Protein ein Glykosylierungsmotiv Asn-X-Ser/Thr (Consensus-Sequenz) in der Aminosäuresequenz (Marshall 1974). Man unterscheidet mehrere Arten von N-Glykanen, den Oligomannose-, den komplexen und den Hybrid-Typ. Diese besitzen zwar eine gemeinsame Pentasaccharid-*core*-Struktur, sind aber

A Einleitung

sonst durch unterschiedliche Verzweigungen und eine große Diversität der Seitenarme gekennzeichnet (Abbildung 2).

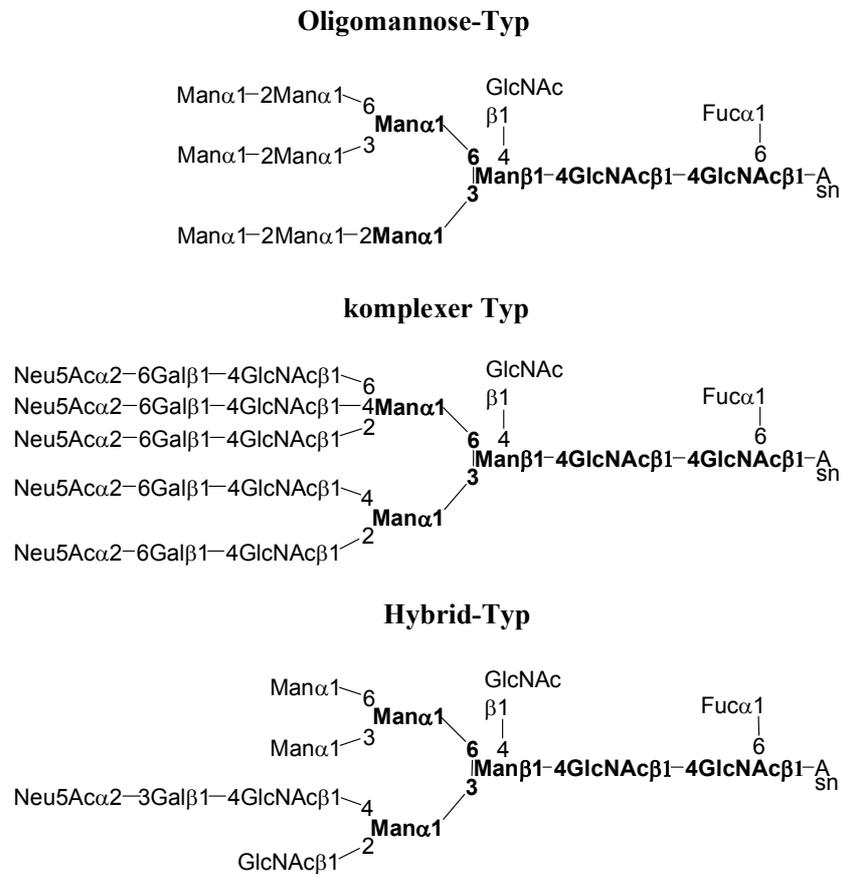


Abbildung 2: Verschiedene Typen von N-Glykanen.

Die gemeinsame *core*-Struktur ist durch Fettdruck hervorgehoben.

Die Verzweigungen und die Verschiedenheit der Seitenarme dienen zum Aufbau zellspezifischer terminaler Strukturen auf der Zelloberfläche. Als Bausteine dieser terminalen Strukturen trifft man hier, genauso wie auch in O-Glykanen und Glykolipiden, auf *N*-Acetyl-D-galactosamin (GalNAc) und D-Galactose (Gal) sowie L-Fucose (Fuc), *N*-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure, Neu5Ac) und *N*-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc). O-Glykane vom Mucin-Typ beinhalten bis auf das einheitliche Tn-Antigen (GalNAcα-Ser/Thr) keine gemeinsame *core*-Struktur (Abbildung 3).

A Einleitung

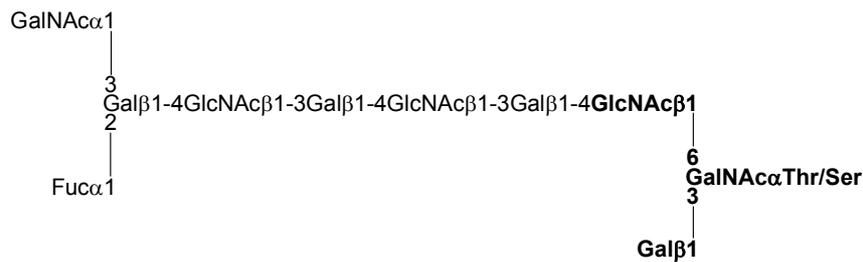


Abbildung 3: O-Glykan vom Mucin-Typ (*core 2*-Struktur mit PolyLacNAc und Blutgruppenderminante A).

Es sind vielmehr acht *core*-Strukturen bekannt (Marcaurelle und Bertozzi 2002).

Glykosphingolipide bestehen aus Ceramid, an das ein Oligosaccharid gebunden ist. Wie bei den O-Glykanen existieren verschiedene *core*-Strukturen.

2 Glykanbiosynthese

2.1 Biosynthese der N-Glykane

Der Biosyntheseweg der N-Glykane beginnt auf der cytosolischen Seite der Membran des rauhen endoplasmatischen Retikulums (RER, Abbildung 4). Hier werden nacheinander einzelne Zucker auf einen Lipidanker, das Dolicholphosphat, übertragen. Wenn zwei GlcNAc und fünf Mannose-Einheiten an dem Lipidanker vorliegen, wird die Vorläuferstruktur auf die lumenale Seite der Membran des RER transloziert (Flipping). Auf der lumenalen Seite werden vier weitere Mannose- und drei Glucoseeinheiten angeknüpft. Die resultierende dolicholgebundene $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Vorläuferstruktur wird durch eine multimere Oligosaccharyltransferase *en bloc* auf ein Asparagin einer wachsenden Polypeptidsequenz (cotranslational) übertragen (Schritt 1, Abbildung 4) (Silberstein und Gilmore 1996; Sears und Wong 1998; Grunewald *et al.* 2002). Die drei Glucoseeinheiten werden nun nacheinander durch zwei membrangebundene Glucosidasen, α 1,2-Glucosidase I und α 1,3-Glucosidase II, abgespalten (Schritte 2 und 3, Abbildung 4). Es wird angenommen, dass die drei Glucosen als ein Signal dienen, welches den Abbau des Oligosaccharides vor seiner Übertragung auf das

A Einleitung

Protein verhindert (Sears und Wong 1998). Die beiden α -Glucosidasen nehmen eine wichtige Rolle im Faltungsprozess des Glykoproteins ein. So erkennen die Chaperone Calnexin und Calreticulin nur die zwischenzeitlich vorhandene monoglycosylierte Struktur (Petrescu *et al.* 1997; Herscovics 1999). Im weiteren Gang der Biosynthese wird eine Mannose vom Man(α 1-6)-Zweig durch eine ER- α 1,2-Mannosidase hydrolysiert (Schritt 4, Abbildung 4) (Sears und Wong 1998). Das Glykoprotein mit der Man₈GlcNAc₂-Kette wird im Anschluss an diese Prozessierung vom rauhen endoplasmatischen Retikulum durch Vesikel zum *cis*-Golgi-Apparat transportiert. Bei N-Glykanen des Oligo-Mannose-Typs unterbleibt eine weitere Prozessierung. Für N-Glykane des komplexen und Hybrid-Typs folgen dagegen weitere Schritte. Die Golgi α 1,2-Mannosidase I spaltet drei Mannosen vom Man(α 1,3)-Zweig ab (Schritt 5, Abbildung 4). Das Produkt dieser Prozessierung ist Man₅GlcNAc₂-R. Dabei trägt der Man(α 1-3)-Arm keine weiteren Zucker mehr. Die weitere Prozessierung der N-Glykane erfolgt durch die sukzessive Aktivität einer Reihe von *N*-Acetylglucosaminyltransferasen (GN-T) und Mannosidasen, die über den *cis*-, *medial*- und *trans*-Golgi-Apparat verteilt sind. Während dieser Prozesse bewegt sich das Glykoprotein durch die Kompartimente des Golgi-Apparates bis hin zum *trans*-Kompartiment, von wo aus es sekretiert wird (Sears und Wong 1998; Dennis *et al.* 1999).

Viele der Modifikationen sind voneinander abhängig: die GN-T III, IV und V können nur agieren, wenn zuvor GN-T I einen GlcNAc-Rest übertragen hat. Die resultierende Struktur nach GN-T III-Katalyse hemmt hingegen die Transferasen IV, V und die Mannosidase II (Schachter 1986). Die *N*-Acetylglucosaminyltransferase I ist das Schlüsselenzym in der Biosynthese der komplexen und hybriden N-Glykane. Sie knüpft GlcNAc in α -1,2-Stellung an die terminale Mannose des Man(α 1,3)-Zweiges und bildet somit GlcNAcMan₅GlcNAc₂-R (Schritt 6, Abbildung 4). Die Anwesenheit dieses GlcNAc-Restes ist essentiell für die nun folgenden Reaktionen im Biosyntheseweg. Falls ein GlcNAc-Rest auf den Man(α 1,3)-Zweig übertragen wird, bevor die α -Mannosidase II tätig wird, kann dieses Enzym keine Mannose-Reste mehr hydrolysieren, was in der Bildung der Hybrid-Typ-Seitenketten resultiert. Ausgehend von dieser GlcNAcMan₅GlcNAc₂-Struktur kann kein weiterer Abbau des Mannose-Motivs zum Komplex-Typ erfolgen. Unterbleibt die Übertragung eines GlcNAc-Restes auf den Man(α 1,3)-Zweig, so entfernt die Golgi- α -Mannosidase II zwei Mannosen vom Man(α 1,6)-Zweig und liefert somit GlcNAcMan₃GlcNAc₂ (Schritt 7, Abbildung 4). Die *N*-Acetylglucosaminyltransferase II (Schritt 8, Abbildung 4) ist das zweite Enzym, das in der Primärphase der Biosynthese innerhalb der Elongation der N-Glykane wirksam ist und bindet

A Einleitung

GlcNAc β -1,2 an den nun freien Man(α 1,6)-Zweig und liefert die Vorläuferstruktur für den biantennären Komplex-Typ. Durch die GlcNAc-Transferasen IV und V können weitere Verzweigungen eingeführt werden. Kommt es stattdessen zu einer Bindung von GlcNAc β -1,4 an die zentrale Mannose, von der die α 1,2 und α 1,6-Zweige abgehen, entsteht das sogenannte "bisecting" GlcNAc. Dieser Transfer wird durch die GlcNAc-Transferase III katalysiert. Im trans-Golgi findet schließlich vor der Sekretion der Glykoproteine eine Elongation der Strukturen durch Galactosyl-, Sialyl- und Fucosyltransferasen statt (Schritte 8, 9 und 10, Abbildung 4). Die Termination der Glykostruktur des Proteins, die ebenfalls noch vor der Sekretion stattfindet, wird in Kapitel A 2.3 besprochen.

A Einleitung

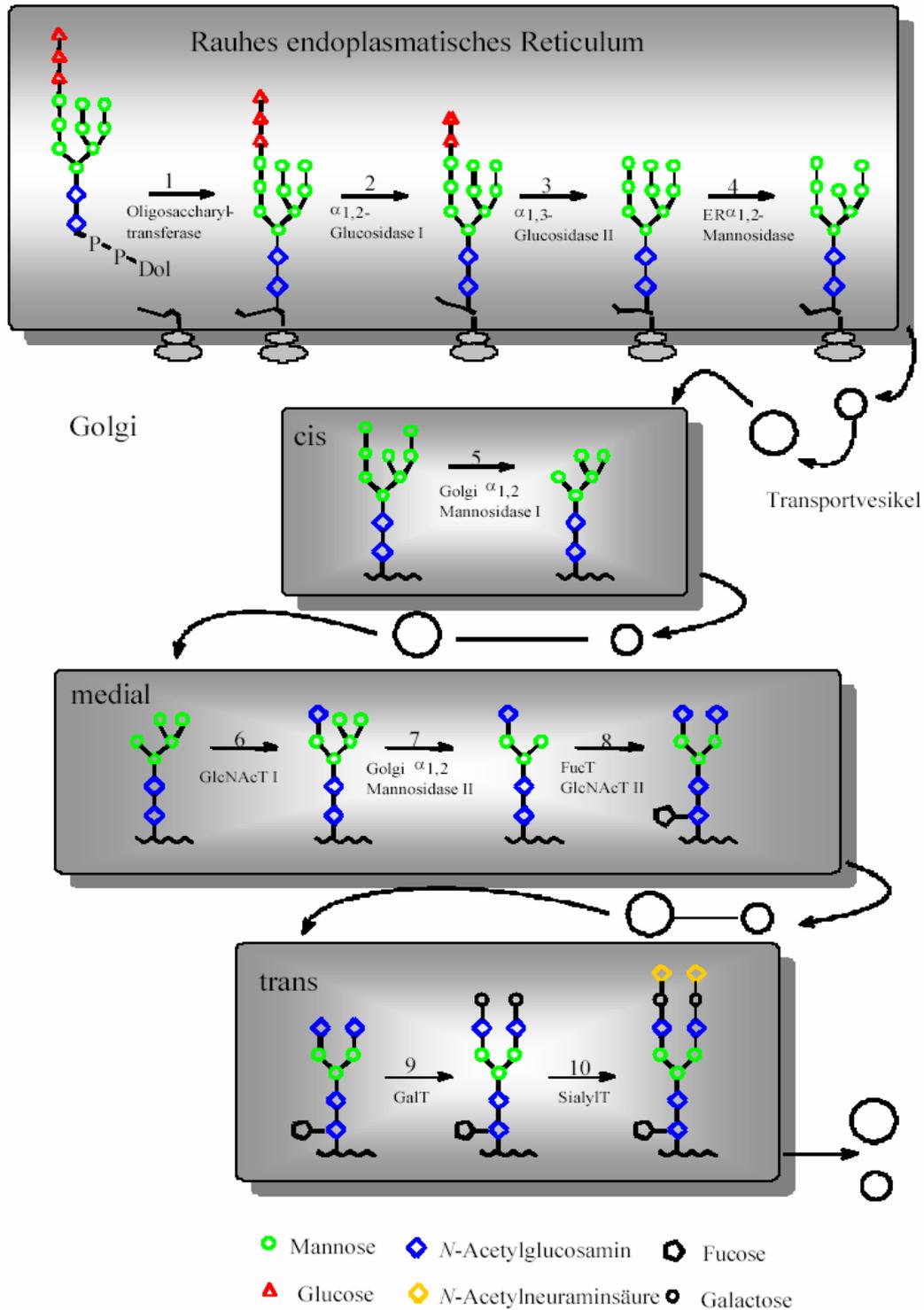


Abbildung 4: Schema des ER- und Golgi-Teils der N-Glykan-Biosynthese (komplexer Typ, nach Helenius und Aebi 2001).

A Einleitung

2.2 Biosynthese der O-Glykane

Im Gegensatz zur cotranslationalen Biosynthese der N-Glykane verläuft die der O-Glykane posttranslational. Der Aufbau der O-Glykane erfolgt sequentiell im Golgi. Eine Prozessierung durch Glykosidasen, wie es bei der Biosynthese der N-Glykane beschrieben wird, wurde nicht beobachtet. Der erste Schritt in der Biosynthese von O-Glykanen vom Mucin-Typ (Mucine = "Schleimstoffe", große Glykoproteine mit besonders vielen O-glykosidisch verbundenen Oligosaccharid-Seitenketten) ist die Anknüpfung eines GalNAc-Restes an Ser oder Thr durch eine UDP-GalNAc:Polypeptid-*N*-Acetylgalactosaminyltransferase (ppGalNAc-T) im *cis*-Golgi. Es gibt mehr als zehn verschiedene ppGalNAc-T, die ein unterschiedliches gewebespezifisches Expressionsmuster sowie überlappende, aber dennoch unterschiedliche Spezifitäten besitzen (Clausen und Bennett 1996; Hagen *et al.* 1997; Hagen und Nehrke 1998; Ten Hagen *et al.* 2003). Im Gegensatz zur N-Glykanbiosynthese, bei der eine bestimmte Aminosäuresequenz für den Initialschritt erkannt wird, konnte bisher keine einheitliche Peptidstruktur als Akzeptorsubstrat für die ppGalNAc-Ts erkannt werden. Allerdings wurde festgestellt, dass Serin-, Threonin- oder Prolin- (Pro) reiche Regionen bevorzugt werden und die schon bestehende Glykosylierung eine Rolle spielt (Van den Steen *et al.* 1998; Brockhausen 1999). Nach der Anknüpfung des ersten GalNAc-Restes im *cis*-Golgi findet die sequentielle Anheftung weiterer Zucker im medial-Golgi statt. Hierbei kommt es zur Ausbildung von acht verschiedenen *core*-Strukturen (Abbildung 5). Die Elongation und Termination findet im *trans*-Golgi statt. Terminale Strukturen von N- und O-Glykanen werden im nächsten Kapitel besprochen.

A Einleitung

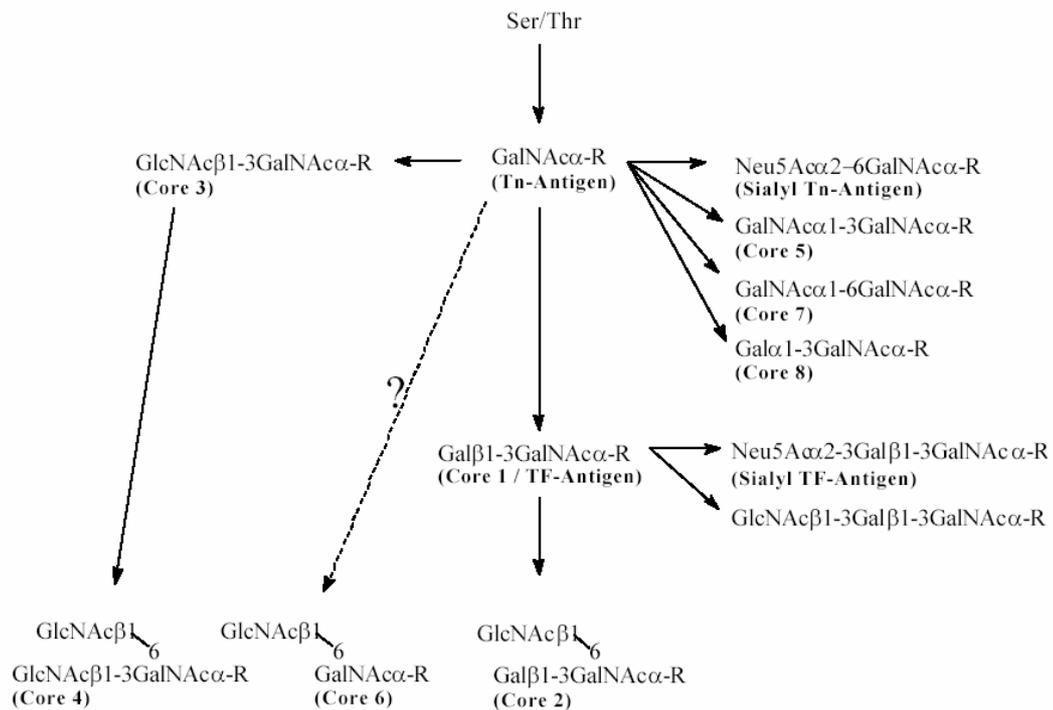


Abbildung 5: Synthese der O-glykosidischen *core*-Strukturen (R ist das Polypeptid mit Ser/Thr, nach Brockhausen 1999).

2.3 Terminale Strukturen

Die Ausbildung terminaler Strukturen schließt sowohl die N- als auch die O-Glykan-Biosynthese ab. Hierbei können eine Reihe verschiedener terminaler Strukturen vorliegen. Aufbauend auf den *core*-Strukturen von N- und O-Glykanen kann es zur Bildung von LacNAc-Einheiten kommen. Hierbei wird zwischen Typ 1: Gal(β1-3)GlcNAc oder Typ 2: Gal(β1-4)GlcNAc unterschieden. Nur beim Typ 2 kann es zur Formierung von PolyLacNAc-Strukturen $(-3)[Gal(\beta 1-4)GlcNAc(1-)_n]$ kommen. Es wird zusätzlich zwischen dem i-Antigen für lineares PolyLacNAc sowie dem I-Antigen für verzweigtes PolyLacNAc unterschieden (Abbildung 6).

Strukturen des AB0-Blutgruppensystems fallen ihrerseits in die Kategorie der terminalen Strukturen. Sie werden außer auf PolyLacNAc-Strukturen (Typ 2 der Blutgruppenvorstufen)

A Einleitung

auch auf LacNAc-Typ1 (Typ 1), *core1* von O-Glykanen (Typ 3) sowie auf Glykolipiden aus der Globo-Serie (Typ 4) ausgebildet. Die Aktivität der α 1,2-Fucosyltransferase ist essentiell für die Formierung der Blutgruppenantigene. Neben den AB0-Blutgruppen (Abbildung 6) gibt es außerdem die Lewis-Blutgruppen (Abbildung 6). Diese zeichnen sich durch eine Fucosylierung mit teilweise zusätzlicher Sialylierung und/oder Sulfatierung aus. Zugrunde liegen hier Typ1- oder Typ2-LacNAc-Strukturen. Häufig werden N- und O-Glykane auch durch Sialylierung terminiert. Hierbei wird zwischen α 2,3- und α 2,6-Terminierung unterschieden.

3 Glykosyltransferasen

Glykosyltransferasen sind essentiell für die eben vorgestellten Prozesse der N- und O-Glykanbiosynthese. Darüberhinaus haben sie auch eine wichtige Rolle bei der Glykolipidbiosynthese. Im Menschen und in der Maus wurden homologe Gene identifiziert, die für Isoformen von Glykosyltransferasen kodieren. Sie können in folgende Familien zusammengefasst werden: die Familie der Galactosyltransferasen (Gal-T) (Almeida *et al.* 1997; Amado *et al.* 1998; Hennet *et al.* 1998; Amado *et al.* 1999; Almeida *et al.* 1999; Amado *et al.* 1999; Furukawa und Sato 1999; Sato und Furukawa 1999), die Polypeptid-N-acetylgalactosaminyltransferasen-Familie (ppGalNAc-T) (Bennett *et al.* 1998; Clausen und Bennett 1996; Wandall *et al.* 1997; Bennett *et al.* 1999; Hagen *et al.* 1999), die Fucosyltransferasen-Familie (Fuc-T) (Breton *et al.* 1998; de Vries *et al.* 2001) und die Sialyltransferasen-Familie (Sia-T) (Tsuji 1996; Kono *et al.* 1997; Schauer 2000; Harduin-Lepers *et al.* 2001). Aufgrund ihrer besonderen Relevanz für die hier vorliegende Arbeit (s. Kapitel A 5.3) sollen die Charakteristika der β 3Gal-T-, β 4Gal-T- und Polypeptid GalNAc-T-Familien kurz skizziert werden.

Die Glykosyltransferasen der β 3GalT- und β 4GalT-Familien zeigen *in vitro* unterschiedliche Aktivitäten mit verschiedenen Akzeptorsubstraten (Tabelle 1 und 2), aus denen, zusammen mit den Transkriptionsmustern der entsprechenden Gene, die Beteiligung an der Biosynthese von gewebespezifischen Glykoproteinen und Glykolipiden abgeleitet wird. Diese Ergebnisse lassen jedoch noch kein klares Bild erkennen, da in den meisten Fällen noch eine direkte Korrelation zwischen den Daten zur Genexpression und der biochemischen Charakterisierung der betroffenen zellulären Glykokonjugate fehlt.

So werden der β 3Gal-T2 und β 3Gal-T5 sowohl eine Beteiligung an der N- bzw. O-Glykoprotein- als auch an der Glykolipidbiosynthese zugeschrieben, da sie *in vitro* sowohl Glykoprotein- als auch Glykolipidsubstrate umsetzen (Amado *et al.* 1999). Andererseits konnte das Auftreten des Tumormarkers Sialyl-Lewis-a bei Krebsarten des Verdauungstraktes und der Bauchspeicheldrüse mit einer erhöhten Expression der β 3Gal-T5 korreliert werden (Isshiki *et al.* 1999). Hier ist jedoch noch nicht geklärt, ob diese terminale Struktur vermehrt auf O-Glykoproteinen oder Glykolipiden vorkommt.

A Einleitung

Tabelle 1: Eigenschaften von Mitgliedern der β 3GalT-Familie. (modifiziert nach Amado *et al.* 1999).

Glykosyltransferase	Glykosidische Bindung	Biosynthese/ Glykokonjugate ¹
humane β 3Gal-T1	Gal(β 1-3)GlcNAc β 1-R	Glykolipide: Lc3Cer > nLc5Cer >> Glc-Cer Glykoproteine: -
humane β 3Gal-T2	Gal(β 1-3)GlcNAc β 1-R	Glykolipide: Lc3Cer > nLc5Cer >> Glc-Cer Glykoproteine: N
murine β 3Gal-T3	Gal(β 1-3)GlcNAc β 1-R	-
humane β 3Gal-T4	Gal(β 1-3)GalNAc β 1-R	Glykolipide: GM ₂ und Gg ₃ Glykoproteine: -
humane β 3Gal-T5	Gal(β 1-3)GlcNAc β 1-R	Glykolipide: Lc3Cer > nLc5Cer > Gb Glykoproteine: O <i>core</i> 3

¹**nLc5Cer:** GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc β 1-Cer;

Lc3Cer: GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc β 1-Cer;

Gb: GalNAc β 1-3Gal β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer;

GM₂: GalNAc(β 1-4)(Neu5Ac(α 2-3))Gal(β 1-4)Glc β 1-Cer;

core 3: GlcNAc(β 1-3)GalNAc α 1-R

Gg₃: GalNAc(β 1-4)Gal(β 1-4)Glc β 1-Cer;

N: N-geknüpfte Glykane;

O: O-geknüpfte Glykane.

Die Expressionsmuster der β 4Gal-T-Familie sind eingehend untersucht worden (Furukawa und Sato 1999). Jedoch können Glykosylierungsmuster aus *in vivo* Experimenten (z.B. knock-out Mäuse) noch nicht mit *in vitro* Experimenten, die Akzeptorsubstratspektren betreffen, korreliert werden. Eine unterschiedliche Funktion der β 4Gal-T-Enzyme in der Biosynthese von Glykokonjugaten spiegelt sich z.B. in der Sensitivität gegenüber α -Lactalbumin (α -LA) wider. Während *in vitro* in Anwesenheit von α -LA die Synthese von *N*-Acetyllactosamin (LacNAc) durch die β 4Gal-T1 und β 4Gal-T2 gehemmt und Lactose mit Glucose als Akzeptor synthetisiert wird (Almeida *et al.* 1997), kann eine β 4Gal-T1-knock-out Maus keine Lactose bilden (Furukawa und Sato 1999). In diesem Zusammenhang ist der Grund für die *in vitro* Abhängigkeit der β 4Gal-T2 Aktivität von α -LA noch nicht geklärt. Unklar erscheint auch die zelluläre Funktion der β 4Gal-T4, der sowohl eine Rolle in der Glykosphingolipidbiosynthese als auch bei der Galactosylierung von *core* 2 Strukturen vom Mucintyp (Initiation der Poly-*N*-lactosaminsynthese) zugeschrieben wird (Schwientek *et al.* 1998; Ujita *et al.* 1998). Im Zusammenhang mit der Biosynthese von Poly-*N*-lactosaminglykanen wurde für die β 4Gal-T1

A Einleitung

eine bevorzugte Galactosylierung von linearen Ketten (i-Antigen) festgestellt (Ujita *et al.* 1999). Die vorliegenden Daten zur β 4Gal-T5 lassen noch keine gesicherten Aussagen zur biochemischen Funktion zu (Furukawa und Sato 1999; Sato und Furukawa 1999).

Tabelle 2: Eigenschaften von Mitgliedern der β 4Gal-T-Familie. (modifiziert nach Amado *et al.* 1999).

Glykosyltransferase	Glykosidische Bindung	Biosynthese/ Glykokonjugate ¹
humane β 4Gal-T1 ²	Gal(β 1-4)GlcNAc β 1-R	Glykolipide: nLc5Cer > Lc3Cer Glykoproteine: N > O
humane β 4Gal-T2 ²	Gal(β 1-4)GlcNAc β 1-R	Glykolipide: Lc3Cer Glykoproteine: N > O
humane β 4Gal-T3	Gal(β 1-4)GlcNAc β 1-R	Glykolipide: Lc3Cer >> nLc5Cer Glykoproteine: N > O
humane β 4Gal-T4	Gal β (1-4)GlcNAc β 1-R	Glykolipide: Lc3Cer > nLc5Cer Glykoproteine: keine N-Glykane; <i>core 2</i> O-Glykane
humane β 4Gal-T5	Gal(β 1-4)GlcNAc β 1-R	Glykolipide: - Glykoproteine: -
humane β 4Gal-T6	Gal(β 1-4)Glc β 1-Cer	Glykolipide: Glc β 1-Cer Glykoproteine: -
humane β 4Gal-T7	Gal(β 1-4)Xyl β 1-R	Glykolipide: - Glykoproteine: Proteoglykan Core

¹**nLc5Cer:** GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc β 1-Cer;

Lc3Cer: GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc β 1-Cer;

Core 2: Gal(β 1-3)((GlcNAc β 1-6))GalNAc α 1-R;

N: N-geknüpfte Glykane;

O: O-geknüpfte Glykane.

²sind α -Lactalbumin sensitiv und synthetisieren Lactose.

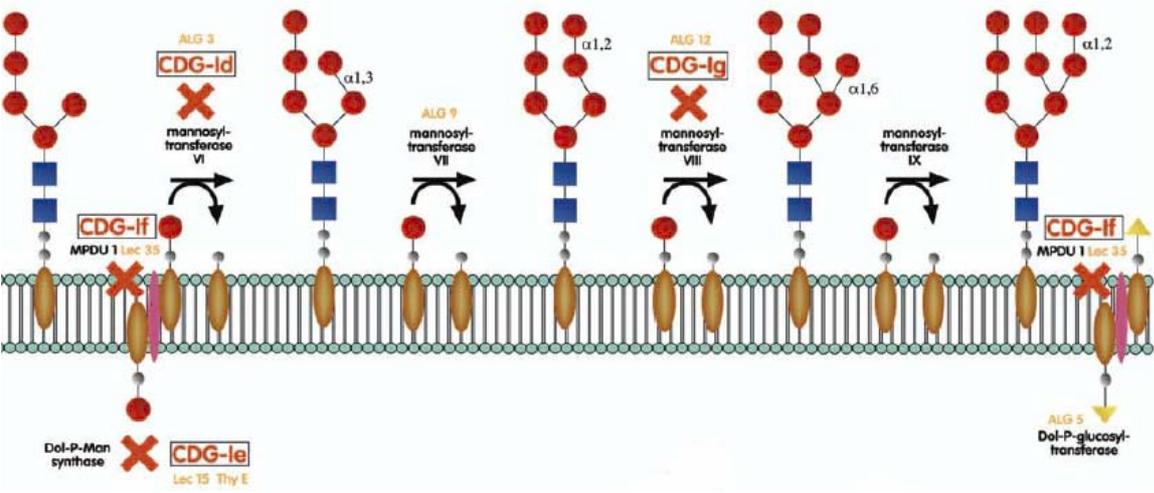
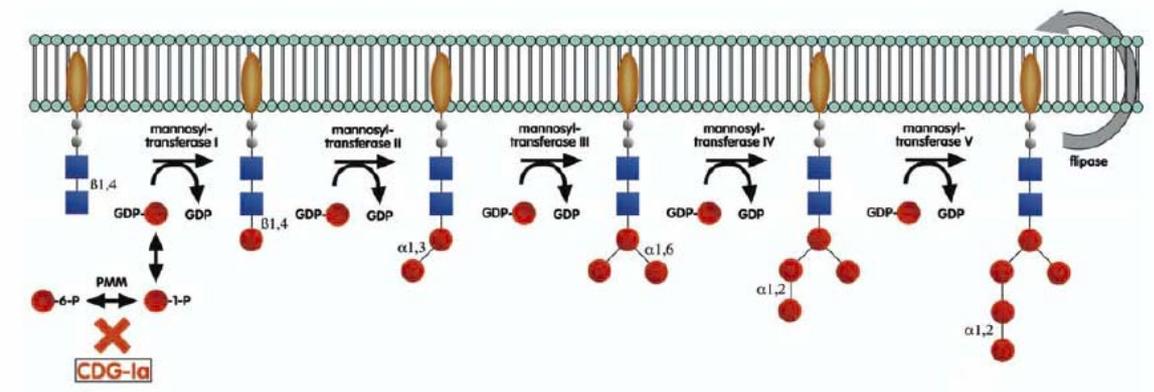
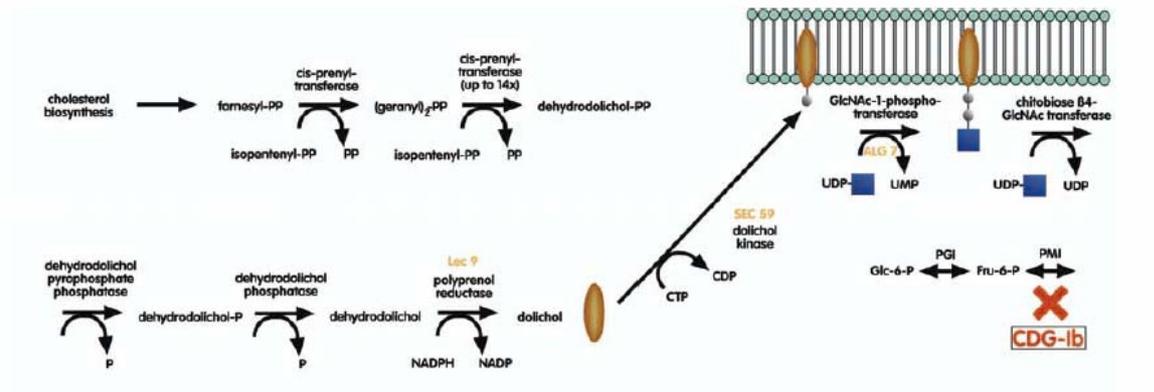
Untersuchungen zur Polypeptid-GalNAc-T-Familie zeigen, dass bestimmte Enzyme bestimmte Positionen (Thr/Ser) in Polypeptidakzeptorsubstraten, die abgeleitete Tandem-Repeat-Sequenzen aus verschiedenen Mucinen darstellen, bevorzugen und in konzertierter Weise glykosylieren (Brockhausen *et al.* 1996; Clausen und Bennett 1996; Wandall *et al.* 1997; Hagen *et al.* 1999). Tandem repeats sind Bindungsregionen für O-Glykane, die etwa beim Mucin MUC1 ca. 50% der Molekülmasse ausmachen. In den Arbeiten der Gruppe um Clausen wurde ein synthetisches Peptid (TAP 25) verwendet, welches einem repeat und fünf weiteren Aminosäuren von MUC1 entspricht. Die Sequenz des Peptids enthält sechs potentielle Glycosylierungsstellen, vier Threonin und zwei Serin (der Repeat in Fettdruck): **TAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA**.

4 Störung der Glykosylierung und deren Bedeutung für Krankheiten

4.1 Störung der N-Glykanbiosynthese im Krankheitsbild des CDGS

Unter dem CDG-Syndrom (CDG = Congenital Disorders of Glycosylation) versteht man eine rapide wachsende Familie von erblich bedingten Krankheiten, die durch mutationsbedingte Defekte in der Synthese und Prozessierung von N-Glykanen ausgelöst wird. Die Krankheiten werden in zwei Gruppen klassifiziert. CDG-I umfasst Defekte beim Aufbau des lipidgebundenen Oligosaccharids und seines Transfers zum Protein. CDG-II beschreibt Defekte bei der Prozessierung des bereits ans Protein gebundenen Glykans, entweder im ER oder Golgi-Apparat. Krankheiten, deren Defekt noch nicht charakterisiert ist, werden der Gruppe CDG-x zugeordnet (Freeze 2001; Jaeken und Matthijs 2001; Schachter 2001; Grünewald *et al.* 2002; Marquardt und Denecke 2003). Die CDG-Krankheiten betreffen alle Organe und vor allem das zentrale Nervensystem (ZNS), lediglich CDG-Ib ist eine vornehmlich die Leber und den Verdauungstrakt befallende Krankheit. Die am häufigsten auftretende Krankheit des CDG-Syndroms ist CDG-Ia, unter der nach Schätzungen weltweit 300 Menschen leiden. Sie besitzt eine Kindersterblichkeitsrate von 25%, fast alle Patienten sind an den Rollstuhl gebunden. CDG-Ia liegt ein Defekt der Phosphomanno-Mutase zugrunde (PMM, zweite Reihe in Abbildung 7) (de Zegher und Jaeken 1995; Carchon *et al.* 1999). Aus dem frühen Auftreten des Enzyms in der N-Glykan-Biosynthese ist abzuleiten, dass die Krankheit erhebliche Schädigungen des Organismus zur Folge hat. Paradoxe Weise sind die Schädigungen bei CDG-Ib geringer, obwohl dieser Krankheit ein Defekt der Mannose-6-Phosphat-Isomerase (oberste Reihe, Abbildung 7), also dem Enzym, was sogar noch einen Schritt früher in der N-Glykan-Synthese eingreift, zugrunde liegt (Niehues *et al.* 1998). Die Krankheit ist durch orale Gabe von Mannose deutlich zu lindern. Die beiden bei CDG-Ia und CDG-Ib betroffenen Enzyme spielen eine Rolle im Biosyntheseweg von GDP-Mannose im Cytoplasma. Von diesem aktivierten Zucker werden auf der cytoplasmatischen Seite des RER fünf Mannosen auf die an Dolicholphosphat gebundenen, wachsenden N-Glykane transferiert. Nach Flipping des lipidgebundenen Oligosaccharids auf die lumenale Seite des RER werden weitere vier Mannose-Einheiten übertragen (zweite und dritte Reihe, Abbildung 7). Ein Defekt einer der im RER befindlichen Mannosyltransferasen, Mannosyltransferase VI, löst CDG-Id aus.

A Einleitung



A Einleitung

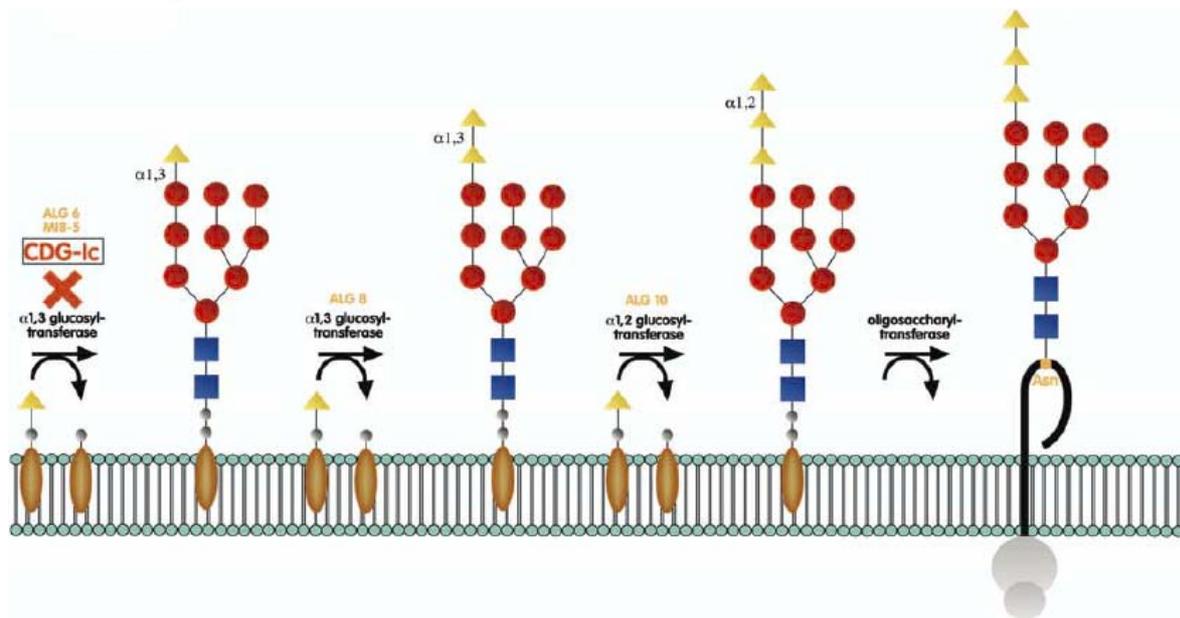


Abbildung 7: Synthese von Dolichol, Bereitstellung der N-Glykane sowie molekulare Defekte der CDGS-Typen (Marquardt und Denecke 2003).

Zunächst wird Dolicholphosphat über enzymkatalysierte Reaktionen aus Isopentenylpyrophosphat und Farnesylpyrophosphat über die Zwischenstufe des Polyprenol synthetisiert (S. 16, oberste Reihe der Abbildung). Die Bereitstellung der N-Glykane beginnt auf der cytoplasmatischen Seite der Membran des RER durch den Transfer von zwei GlcNAc-Einheiten (blaue Quadrate) auf Dolicholphosphat. Das Produkt $\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ wird durch verschiedene Mannosyltransferasen, die GDP-mannose als Donorzucker verwenden, verlängert (S. 16, zweite Reihe der Abbildung). Mannose ist durch die roten Kreise symbolisiert. Nach der Zusammensetzung einer $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -Struktur wird das Oligosaccharid auf die lumenale Seite des RER transloziert, was durch eine Flippase katalysiert wird. Für die weiteren enzymatischen Schritte müssen an Dolichol-Phosphat gebundene Mannose und Glucose in das Lumen des RER transloziert werden. Im ER lokalisierte Mannosyl- und Glucosyltransferasen verlängern die Glykan-Arme zur Struktur $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (S. 16, dritte und S. 17, vierte Reihe der Abbildung). Dieses Oligosaccharid wird daraufhin durch die Oligosaccharyl-Transferase auf das naszierende Protein übertragen. Der weitere Gang der N-Glykan-Biosynthese wurde bereits in Kapitel 2.1 geschildert. Enzym-Defekte, die zu CDGS führen, sind durch rote Kreuze symbolisiert.

Die nachfolgende Tabelle 3 gibt einen Überblick über einige der bis dato identifizierten CDG-Varianten und ihrer Symptome.

A Einleitung

Tabelle 3: CDG-Varianten.

Aufgeführt sind Enzymdefekte, ihre Lokalisierung und die zugehörigen Krankheits-symptome.

CDG-Typ	Enzymdefekt	Lokalisierung	Symptome
CDG-Ia	Phosphomanno- Mutase (PMM, s. Abb. 7, zweite Reihe)	Cytoplasma	Psychomotorische Störungen, Epileptische Anfälle, Schielen, Unterentwicklung des Kleinhirns, Deformität, Störung der Blutgerinnung, Ein- beziehung von mehreren Organen (Carchon <i>et al.</i> 1999)
CDG-Ib	Mannose-phos- phat Isomerase (PMI, s. Abb. 7, oberste Reihe)	Cytoplasma	Leberschädigung, Störung der Blutgerinnung, Darmerkrankung (Niehues <i>et al.</i> 1998)
CDG-Ic	α 1,3-Glucosyl- transferase ALG 6 (Abb. 7, unterste Reihe)	ER	ähnlich CDG-Ia (Imbach <i>et al.</i> 1999)
CDG-Id	Mannosyl- transferase VI (Abb. 7, dritte Reihe)	ER	Psychomotorische Störungen, Epilepsie, abnorme Kleinheit des Kopfes (Körner <i>et al.</i> 1999)
CDG-Ie	Dolicholphos- phat-mannose Synthase (Abb. 7, dritte Reihe)	ER	ähnlich CDG-Id (Imbach <i>et al.</i> 2000)
CDG-IIa	<i>N</i> -Acetyl-glucos- aminyl-transferase II (Abb. 4, Schritt 8)	Golgi-Apparat	ähnlich CDG-Ia (Jaeken <i>et al.</i> 1994)
CDG-IIb	Glucosidase I (Abb. 4, Schritt 2)	ER	ähnlich CDG-Ia, früher Tod (De Praeter <i>et al.</i> 2000)

A Einleitung

4.2 Störung der Glykanbiosynthese im Krankheitsbild der Cystischen Fibrose

Zystische Fibrose (Mukoviszidose) ist durch eine Fehlfunktion sämtlicher Schleimdrüsen in den Bronchien, der Bauchspeicheldrüse, des Dünndarms, der Speichel- und Schweißdrüsen sowie des Samenleiters gekennzeichnet. Es kommt zur Produktion eines Schleimes mit abnorm hoher Viskosität. Dieser zähflüssige Schleim löst nun in den einzelnen Organen Funktionsstörungen aus, die zu vielfältigen Beschwerden führen. Eine Heilung der Krankheit ist bis dato nicht möglich. Durch Therapie kann sie nur verlangsamt werden, eine Lebenserwartung von nur 30 Jahren liegt vor. Der Befall der Atemwege durch pathogene Bakterien, vor allem *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* und *Staphylococcus aureus* ist ein typisches Merkmal der Zystischen Fibrose. In den USA ist ca. 1 von 3300 Geburten bei Menschen europäischer Abstammung betroffen (Scanlin und Glick 1999; Roussel und Lamblin 2003). Die Krankheit wird durch den Defekt eines einzelnen Gens, das für einen Transmembran-Regulator (CFTR) kodiert, verursacht (Roussel und Lamblin 2003). Der Regulator ist ein transmembranes Glykoprotein, was als Kanal für Chlorid-Ionen an der Oberfläche von Epithel-Zellen fungiert. Welche Rolle die Veränderung der Funktion des CFTR in der Pathogenese der Mukoviszidose spielt, ist bislang nicht geklärt. Bekannt ist jedoch, dass ein genetisch defekter CFTR die terminalen Strukturen von Glykoproteinen verändert, wobei der Mechanismus, der dazu führt, ungeklärt ist (Scanlin und Glick 1999; Roussel und Lamblin 2003). So konnte bei Mucinen eine erhöhte Sulfatierung festgestellt werden, die mit einem Fortschreiten der Krankheit korreliert wurde (Chace *et al.* 1983; Scanlin und Glick 1999). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Serum-Glykoproteine und Oberflächenmembranproteine von Fibroblasten ein verändertes Verhältnis von Fucose zu Sialinsäure besitzen. Es kommt zu einem Rückgang terminaler Sialylierung und einer Zunahme von Fucose. Letztere ist α 1,3 bzw. α 1,6 an antennäre bzw. *core* GlcNAc-Reste gebunden. (Scanlin *et al.* 1985; Wang *et al.* 1990). Von *Pseudomonas* und *Haemophilus* weiss man, dass sie Fucose-bindende Proteine besitzen, so dass der erhöhte Anteil terminaler Fucose zu dem beobachteten vermehrten Befall der Atemwege durch diese pathogenen Bakterien beitragen sollte (Scanlin und Glick 1999).

A Einleitung

4.3 Störung der Glykanbiosynthese bei Krebs

O-Glykan-Strukturen mit GalNAc oder mit einem Gal(β 1-3)GalNAc-Disaccharid an Serin oder Threonin werden als Thomsen-Friedenreich-verwandte Antigene (TF Antigene) bezeichnet. Unter diese Bezeichnung fallen auch die mit Sialinsäure verlängerten Strukturen (Abbildung 5). Die Biosynthese dieser Strukturen hängt von einer koordinierten Expression verschiedener Glykosyltransferasen ab. Strukturen aus dieser Gruppe sind bei Krebserkrankungen als diagnostische Marker von erheblicher Bedeutung (Brockhausen 1999; Dall'Olio und Chiricolo 2001). Daneben werden auch Lewis-Antigene als Tumormarker genutzt (Brockhausen 1999). Beim Übergang des äusseren Brustgewebes (Epithelium) vom normalen in den Zustand des Krebses zeigt die Mucin-Glykosylierung eine charakteristische Änderung. Statt der im gesunden Zustand vorliegenden auf *core2* basierenden Strukturen kommt es zu einer Ansammlung von TF-Antigenen und Sialyl-TF-Strukturen (Abbildung 5) (Brockhausen *et al.* 1995; Lloyd *et al.* 1996). Gegenüber der im gesunden Organismus vorliegenden Struktur kommt es also zu einer Verkürzung bzw. dem Fehlen der Verzweigung. Die molekulare Basis für diese Veränderung ist durch eine koordinierte Verringerung der *core2* β 1,6GlcNAc-Transferase-Aktivität und einer Erhöhung der Aktivität der α 2,3-Sialyltransferase gegeben. Das letztgenannte Enzym katalysiert die Bildung von Sialyl-TF aus *core1*. Die beiden Enzyme konkurrieren um das Substrat *core1* (Abbildung 5) (Brockhausen *et al.* 1995; Dalziel *et al.* 2001). Eine Verringerung der Aktivität der *core2* GlcNAc-Transferase-Aktivität, wie sie in manchen Brustkrebs-Zellen vorkommt, ist konsistent mit einer Überexpression des TF-Antigens. Diese korreliert mit dem Fortschritt und der Metastasenbildung des Krebses. Daher ist sie mit einer schlechten Prognose verbunden (Wolf *et al.* 1988; Brockhausen 1999). Beim Prostatakrebs wurde ebenfalls eine Veränderung der Expression von TF-Antigenen gefunden (Brockhausen 1999). Als Tumormarker fungiert hier aber vor allem die Expression des Lewis-Antigens Sialyl-Lewis-x (Abbildung 6). Diese ist mit einer besonders aggressiven Krankheit und schlechter Prognose verbunden (Jorgensen *et al.* 1995; Brockhausen 1999). Bei Krebs des Magen-Darm-Trakts liegen TF-Antigene oft in Tumoren des Spätstadiums vor. Vor allem das Auftreten des Tn-Antigens sowie seiner sialylierten Form sprechen für Tumore von hoher Vermehrungsrate und somit schlechter Prognose (David *et al.* 1992; Brockhausen 1999). Auch das Vorhandensein von Sialyl-Lewis-x bei Krebs des Dickdarms ist mit einer geringen Überlebensrate verbunden (Nakamori *et al.* 1993;

A Einleitung

Brockhausen 1999). TF und Sialyl-TF-Antigene werden bei Krebs der Eierstöcke in großem Maße exprimiert. Vor allem der Marker Sialyl-Tn deutet hierbei auf einen schnell wachsenden Tumor mit hohem Metastasenpotential hin (Kobayashi *et al.* 1992; Brockhausen 1999). Die molekulare Basis für die Beziehung zwischen TF-Antigen-Expression und Metastasen-Bildung ist in Abbildung 8 dargestellt. Vom primären Tumor lösen sich metastatische Zellen, die mit TF-Antigen tragenden Glykoproteinen versehen sind. Sie gelangen in den Blutstrom und induzieren auf der Oberfläche des Endotheliums die Ausbildung eines Galectins (Galectin 3), eines β -Galactosid-spezifischen Lektins. An diesem Lektin findet daraufhin zunächst eine reversible Anlagerung von metastatischen Zellen über das TF-Antigen statt, ehe Integrine, spezifische Rezeptor-Proteine, eine irreversible Bindung über Protein-Protein-Wechselwirkungen herstellen. Aus diesen irreversibel gebundenen metastatischen Zellen erwächst dann ein neuer Tumor (Glinsky *et al.* 2001).

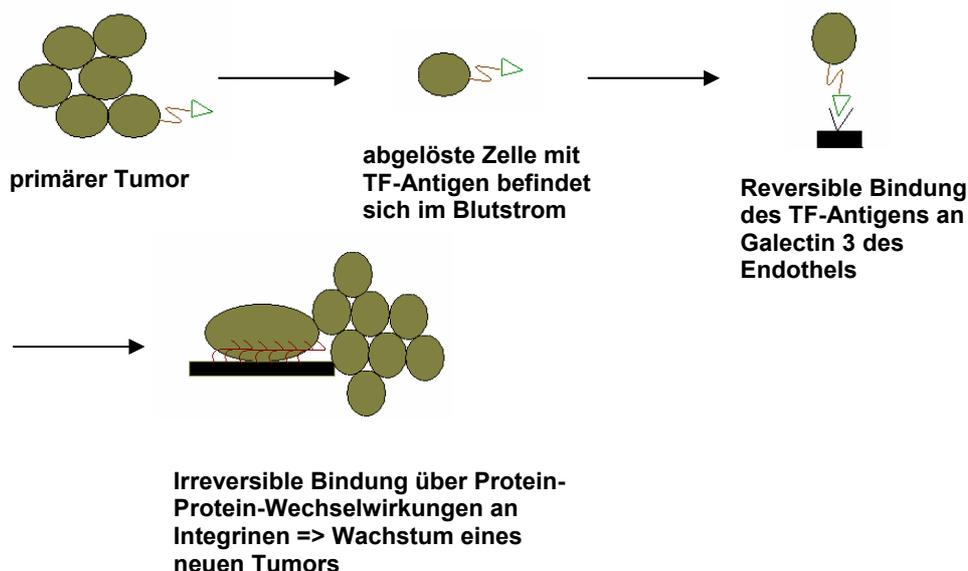


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Beteiligung des TF-Antigens an der Adhäsion von metastatischen Zellen am Endothelium.

Auch Selektine spielen durch ähnliche Prozesse, wie gerade für das Galectin dargestellt, eine Rolle bei der Ausbildung von Metastasen. Die Position des TF-Antigens im gerade beschriebenen Prozess nehmen dann Selektin-Liganden wie die Antigene Sialyl-Lewis-x oder Sialyl-Lewis-a ($\text{Neu5Ac}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-3)[\text{Fuc}(\alpha 1-4)]\text{GlcNAc}$), die als terminale Struktur auf PolyLacNAc-Ketten sitzen. Eine erhöhte Expression dieser Antigene bei der Differenzierung

A Einleitung

und malignen Transformation von Blutzellen sowie bei der Metastasenbildung ist in der Literatur sowohl bei O- als auch N-Glykanen und auch bei Glykolipiden gut dokumentiert (Brockhausen 1999; Dennis *et al.* 1999; Dall'Olio und Chiricolo 2001; Le Pendu *et al.* 2001).

4.4 Glykosylierungsdefekte der Immunglobuline

In diesem Kapitel soll auf die Glykosylierungsdefekte des Immunglobulin A im Krankheitsbild der IgA-Nephropathie sowie des Immunglobulin G im Krankheitsbild der Rheumatoiden Arthritis eingegangen werden. Dem vorangestellt ist ein Abschnitt über die Grundlagen des Immunsystems. In diesem soll die Funktion der Immunglobuline erläutert werden. Diese vertiefende Betrachtung der Immunglobuline und ihrer Glykosylierungsdefekte ist in ihrer Relevanz für die hier vorliegende Arbeit begründet.

4.4.1 Grundlagen des Immunsystems

Bei Säugetieren sind für die Immunität bestimmte Typen von weißen Blutzellen verantwortlich, die man zusammenfassend als Lymphozyten bezeichnet. Sie werden wie alle Blutzellen aus gemeinsamen Vorläuferzellen, den hämatopoetischen Stammzellen, produziert. Die weißen können im Gegensatz zu den roten Blutzellen die Blutgefäße verlassen und in den Interzellulärräumen nach Fremdstoffen suchen. Letztlich kehren sie über die Lymphgefäße ins Blut zurück, nachdem sie die Gewebe, in denen die Immunabwehr stattfindet, passiert haben. Zu diesen Geweben zählen der Thymus, die Lymphknoten und die Milz.

Es werden zwei Arten der Immunität unterschieden:

Die *zelluläre Immunität* richtet sich gegen virusinfizierte Zellen und Parasiten, sie kommt durch die T-Lymphozyten (auch T-Zellen genannt, T steht für die Entstehung im Thymus) zustande (Kronenberg *et al.* 1986).

Die *humorale Immunität*, die sich vor allem gegen Bakterieninfektionen und die extrazelluläre Phase von Virusinfektionen richtet, wird von einer großen Vielfalt strukturverwandter Proteine getragen, die man als Antikörper oder Immunglobuline (Ig) bezeichnet. Die Antikörper werden von den B-Lymphozyten produziert, die bei Säugern im Knochenmark heranreifen (Colman 1988). Biosynthetische Studien zeigen, dass ca. 60% der im menschlichen Organismus produzierten Immunglobuline vom IgA-Isotyp sind (ca. 70

A Einleitung

mg/kg und Tag), 30% entfallen auf IgG, 7% auf IgM und nur Spuren von IgD und IgE sind vorhanden (Novak *et al.* 2001). Grundsätzlich wird die Immunantwort durch das Auftreten fremder Makromoleküle ausgelöst. Bei diesen Antigenen handelt es sich gewöhnlich um Proteine, Kohlenhydrate oder Nukleinsäuren. Im Weiteren sollen die beiden Arten der Immunabwehr kurz skizziert werden:

Die *zelluläre Immunantwort* führt zur Zerstörung der angreifenden Makromoleküle. Hierbei schließt zunächst ein Makrophage (ein Typ weißer Blutzellen) das Antigen ein und baut es in seinen Lysosomen teilweise ab. Die dabei entstehenden Antigen-Fragmente präsentiert der Makrophage an seiner Oberfläche. An diese Fragmente binden Zelloberflächenproteine, die sogenannten Proteine des Histokompatibilitätskomplexes (MHC-Proteine). Makrophagen, die MHC-Proteine der Klasse I tragen, werden von T-Zell-Rezeptoren erkannt, die sich an der Oberfläche unreifer cytotoxischer T-Zellen befinden. Genauso werden Makrophagen, die MHC-Proteine der Klasse II tragen, von Rezeptoren unreifer T-Helfer-Zellen (T_H -Zellen) erkannt. Nur die T-Zellen, die an den Komplex aus Makrophagen, Antigenfragment und Oberflächenprotein gebunden haben, werden zur Proliferation angeregt. So werden nur diejenigen Zellen in großer Menge produziert, die das eingedrungene Antigen spezifisch erkennen (MacDonald und Nabholz 1986; Colman 1988). Diese sogenannte klonale Selektion wird durch Interleukine gesteuert. Interleukine sind Polypeptid-Wachstumsfaktoren, die von an T-Zellen gebundene Makrophagen ausgeschüttet werden (Ada und Nossal 1987). Wenige Tage nach dem ersten Antigenkontakt sind aus den unreifen cytotoxischen Zellen die sogenannten Killer-T-Zellen herangewachsen, welche an die das Antigen tragenden Zellen binden und diese lysieren (Young und Cohn 1988).

Die B-Zellen der *humoralen Immunantwort* tragen auf ihrer Oberfläche sowohl Immunglobuline als auch Klasse-II-MHC-Proteine. Trifft eine B-Zelle auf ein Antigen, welches an ihr spezielles Immunglobulin bindet, so schließt sie den Komplex ein. Sie verdaut ihn partiell und präsentiert die Antigen-Fragmente im Komplex mit dem Klasse-II-MHC-Protein auf der Zell-Oberfläche. Reife T_H -Zellen binden an die B-Zelle und setzen Interleukine frei, die die B-Zelle zu Vermehrung und Differenzierung anregen. Aus der Differenzierung der B-Zellen entstehen zumeist Plasmazellen. Diese sind darauf spezialisiert, den für das Antigen spezifischen Antikörper in großen Mengen freizusetzen. Die Immunglobuline binden an das Antigen und markieren es so für die Aufnahme durch spezielle Zellen, die Phagozyten, oder für die Aktivierung des Complement-Systems. Letzteres ist eine Gruppe von komplex interagierenden Proteinen, die Zellen lysieren und lokale Entzündungserscheinungen auslösen können (Mariuzza *et al.* 1987; Getzoff *et al.* 1988;

A Einleitung

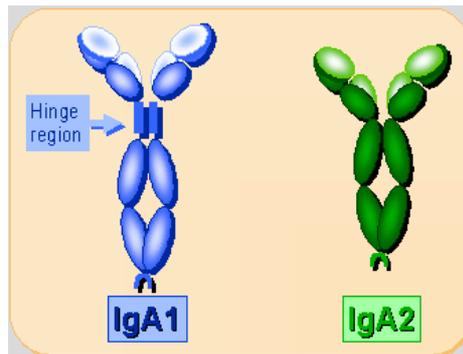
Colman 1988; Muller-Eberhard 1988). Eine herausragende Eigenschaft des Immunsystems besteht darin, dass, wenn die Infektion durch einen Krankheitserreger erfolgreich bekämpft wurde, in der Regel Immunität gegen diesen Erreger besteht. Für diese sogenannte sekundäre Immunantwort sind langlebige B- und T-Gedächtniszellen verantwortlich, welche sich bei einem erneuten Angriff des Antigens erheblich schneller vermehren als die B- und T-Zellen beim Ersteindringen des Antigens. Im Organismus herrscht eine Selbst-Toleranz gegenüber den dort vorkommenden, potentiell als Antigen wirksamen Makromolekülen vor. Geht diese Selbst-Toleranz verloren, kommt es zu den sogenannten Auto-Immun-Krankheiten, wie z.B. rheumatoider Arthritis oder IgA-Nephropathie. Diese Krankheiten und ihre Assoziierung mit fehlerhafter Glykosylierung werden in den beiden nächsten Teilkapiteln näher erläutert.

4.4.2 IgA im Krankheitsbild der IgA-Nephropathie

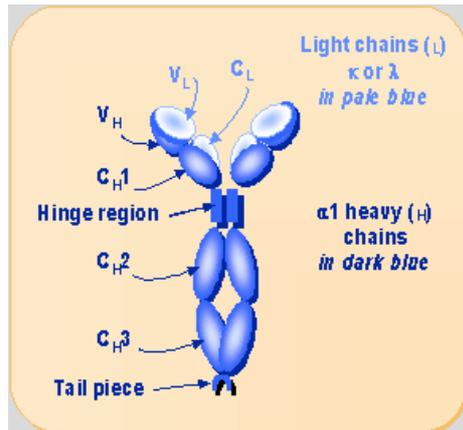
Im Gegensatz zu den meisten Tiergattungen, die nur einen Typ an IgA besitzen, ist das IgA bei höheren Primaten und dem Menschen heterogener. Es gibt zwei Subklassen (IgA1 und IgA2) sowie monomere (mIgA) und polymere Formen (pIgA). Monomeres IgA besitzt die klassische "Y-Struktur", wie sie angenähert für alle Immunglobuline gilt. Diese besteht aus zwei durch Disulfidbrücken verbundenen schweren Ketten (H) und zwei leichten Ketten (L), wobei je eine schwere Kette mit einer leichten Kette ebenfalls über Disulfidbrücken verbunden ist. Alle Immunglobuline haben auf der Ebene ihrer Aminosäuresequenz konstante (C) und variable Regionen (V) in beiden Ketten-Typen (Abbildung 9 Mitte). Die schweren Ketten besitzen jeweils eine variable (V_H) und drei konstante Regionen (C_H), die leichten Ketten je eine variable (V_L) und eine konstante Region (C_L). Zwischen den beiden konstanten Regionen der schweren Kette C_{H1} und C_{H2} liegt im Fall des IgA die sogenannte Gelenkregion, die bei den anderen Immunglobulinklassen nicht vorhanden ist (Amzel und Poljak 1979; Allen 1999). Diese auch "hinge region" genannte Gelenkregion liegt ausschließlich bei höheren Primaten und dem Menschen vor (Abbildung 9 A, Floege und Feehally 2000).

A Einleitung

A



B



C

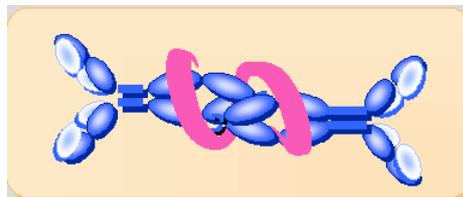


Abbildung 9: Struktur des humanen IgA-Moleküls, humane IgA-Subklassen sowie humanes dimeres IgA1 (aus Allen, 1999).

A: Aufbau des IgA1-Moleküls mit zwei schweren Ketten (H, dunkelblau), zwei leichten Ketten (L, hellblau), die jeweils variable (V) und konstante (C) Regionen besitzen, zwischen den konstanten Region C_{H1} und C_{H2} der schweren Kette liegt die Gelenk-Region (Hinge Region).

B: Die beiden IgA-Subklassen, IgA2 besitzt im Gegensatz zu IgA1 keine Gelenk-Region,

C: IgA-Dimer mit verbrückendem Protein, der J-Kette.

Unterzieht man Immunglobuline (allgemein) einer begrenzten Proteolyse durch Proteasen, so werden sie in drei Fragmente gespalten, zwei gleichartige Fab-Fragmente und ein Fc-Fragment. Die Fab-Fragmente bilden die "Arme" des Y-förmigen Antikörpers und bestehen jeweils aus einer vollständigen L-Kette und dem zugehörigen Teil der H-Kette einschließlich

A Einleitung

der Gelenkregion. Die Fab-Fragmente enthalten die Antigen-Bindungsstellen des Moleküls, ein Immunglobulinmolekül kann also zwei Antigene binden. Das Fc-Fragment, also der "Stiel" des Y-Förmigen Antikörpers, besitzt die Effektorstellen, die für die gemeinsamen Eigenschaften einer Immunglobulin-Klasse verantwortlich sind, so wie etwa die Auslösung des Complement-Systems.

Das IgA1 höherer Primaten und des Menschen unterscheidet sich vom IgA2 dadurch, dass letzteres keine Gelenkregion besitzt (Abbildung 9, B). Beide IgA-Subklassen können polymere Formen bilden, die aus zwei oder mehr IgA-Monomeren bestehen, die über ein Protein, die J-Kette, zusammengehalten werden (Abbildung 9, C) (Allen 1999).

N-Glykane sind bei allen Immunglobulin-Isotypen bekannt. Auch das IgA1 verfügt darüber, zusätzlich liegt aber im Bereich der Gelenkregion noch O-Glykosylierung vor. Bei Immunglobulinen zeigt sonst nur noch das IgD O-Glykosylierung. Auch bei anderen Serumproteinen ist O-Glykosylierung nur sehr selten anzutreffen (Allen 1999). Die O-Glykosylierungsstellen des IgA1 wurden eingehend untersucht (Abbildung 10) (Mattu *et al.* 1998; Allen *et al.* 1999). Die in Abbildung 11 dargestellten fünf potentiellen Glykosylierungsstellen an Serinen bzw. Threoninen können alle besetzt sein, es finden sich aber auch Variationen, bei denen nur drei oder vier Glykosylierungsstellen besetzt sind (Mattu *et al.* 1998; Novak *et al.* 2000). Die Position der O-Glykane in der Gelenkregion des IgA wird in Abbildung 10 am molekularen Modell des IgA1 verdeutlicht. Die O-Glykanketten befinden sich an der Oberfläche der Gelenkregion des Antikörpers.

A Einleitung

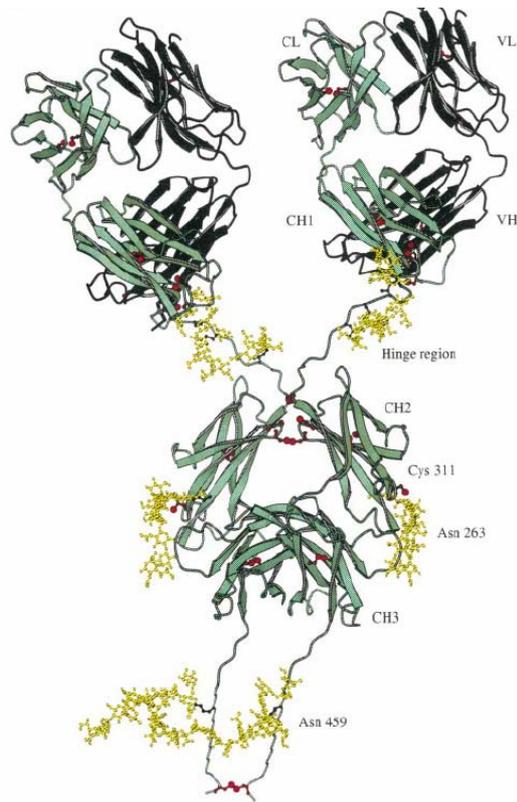


Abbildung 10: Molekulares Modell des IgA1 (aus Mattu *et al.* 1998).

Dargestellt sind die Immunglobulin-Ketten (grün), die Cysteine (rot) sowie die Glykane (gelb, in der “hinge region“ die O-Glykane).

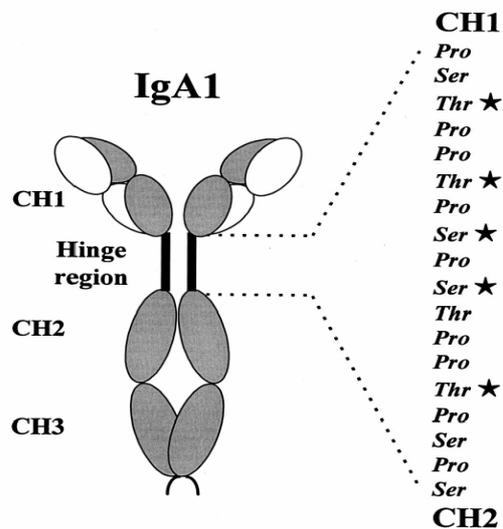


Abbildung 11: O-Glykosylierungsstellen des IgA1 in der “hinge region“ (aus Allen *et al.* 1999).

A Einleitung

An den Glykosylierungsstellen können verschiedene O-Glykanstrukturen vorliegen. Dieses Phänomen wird allgemein (also auch für N-Glykane) als Mikroheterogenität von Glykoproteinen bezeichnet. Die bei der O-Glykosylierung des IgA1 auftretenden Strukturen sind in Abbildung 12 dargestellt.

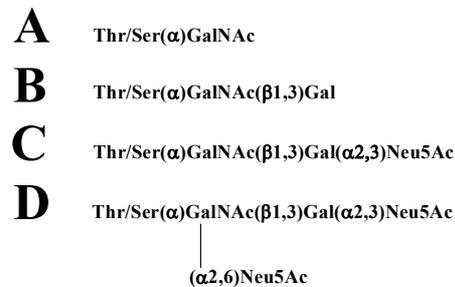


Abbildung 12: O-Glykanstrukturen des IgA1.

Es handelt sich um das Tn-Antigen (A), das TF-Antigen (B), Sialyl-TF (C) und eine Struktur, die zwar eine α 2,6-Knüpfung der Sialinsäure an GalNAc aufweist, allerdings auch galactosyliert ist, so dass beim IgA1 kein Sialyl-Tn vorliegt. Es wird vermutet, dass erst die Galactosylierung stattfinden muss, ehe es zur Sialylierung am GalNAc kommen kann (Allen 1999; Allen *et al.* 1999). Es konnte gezeigt werden, dass bei den O-Glykanen vom IgA1 des normalen Serums 64% mono- und disialylierte Strukturen vorhanden sind, und 20% der Glykane die nicht-galactosylierte Struktur A ausmachen (Allen 1999).

Eine Veränderung der O-Glykosylierung des IgA1 wird mit einer der häufigsten Nieren-Krankheiten, der IgA-Nephropathie, in Verbindung gebracht. Es handelt sich um eine chronische Entzündung der Nierenkörperchen, die in die Klasse der Autoimmunkrankheiten fällt und bis zum Nierenversagen fortschreiten kann (Allen 1999; Allen *et al.* 1999; Floege und Feehally 2000; Novak *et al.* 2001). Die Krankheit macht sich durch ein Anwachsen des Bindegewebes der Nierenkörperchen bemerkbar. Sie befällt alle Altersklassen, wird aber vorwiegend bei Kindern und Jugendlichen diagnostiziert. Männliche Patienten übertreffen die Zahl der weiblichen zwei- bis dreifach, auch ist bei Ihnen der Verlauf der Krankheit bis hin zum Nierenversagen häufiger. Insgesamt kommen bis zu 5% der Patienten in die akute Gefahr eines Nierenversagens, der Krankheitsverlauf zieht sich bis dahin etwa 20 Jahre hin. Es häufen sich Anzeichen für eine genetisch bestimmte Vorprägung für diese Krankheit (Floege und Feehally 2000; Novak *et al.* 2001). Eine verlässliche Diagnostik ist bis dato nur

A Einleitung

über eine Biopsie der Niere möglich, die Krankheit ist nicht heilbar und die Therapie kann den Krankheitsverlauf nur verlangsamen (Floege und Feehally 2000).

Mehrere Studien belegen, dass es im Serum von IgA-Nephropathie-Patienten zu einem verstärkten Auftreten von IgA1 mit Untergalactosylierung der O-Glykane kommt. Bei der untergalactosylierten Struktur liegt lediglich das an das Peptidrückgrat gebundene GalNAc vor, also Struktur A. Auch die sialylierten Strukturen zeigen einen Rückgang (Allen 1999; Allen *et al.* 1999; Odani *et al.* 2000). Die Untergalactosylierung wurde mit der Pathogenese der IgA-Nephropathie in Verbindung gebracht. Gal-defizientes IgA zeigt eine verstärkte Neigung zur Selbst-Aggregation. Dies führt zur Bildung großer Komplexe, die nicht mehr durch die für IgA1 zuständigen katabolischen Wege abgebaut werden können. Zusätzlich soll die erhöhte Menge an freien GalNAc-Stellen zur Bindung von dafür spezifischen IgGs führen. Tatsächlich wurden in krankhaften Nierenkörperchen Komplexe aus untergalactosyliertem IgA1, IgG und C3 gefunden (Allen *et al.* 2001; Hiki *et al.* 2001), was erneut klar für die wichtige Rolle der Untergalactosylierung spricht. C3 ist ein Plasmaprotein, das im Complement-System eine aktivierende Rolle spielt und gleichzeitig bei den den Antigen-Abbau begleitenden Entzündungsprozessen von Bedeutung ist. Die Bindung des IgG als Glykan-Antikörper an das untergalactosylierte Glykan des IgA1 definiert die IgA-Nephropathie eindeutig als Auto-Immun-Krankheit, da keine Selbst-Toleranz gegenüber der freien GalNAc-Struktur vorliegt. Die noch im Serum befindlichen Komplexe aus IgA1, IgG und C3 werden als zirkulierende Immuno-Komplexe (CIC) bezeichnet. Sie lagern sich im Bindegewebe der Nierenkörperchen ab und aktivieren die Zellen des Bindegewebes zu Entzündungsreaktionen und Gewebszerstörung. Die Prozesse der Bindung der CIC an die Bindegewebszellen sowie die nachfolgenden Aktivierungsprozesse sind bislang schlecht verstanden (Floege und Feehally 2000; Novak *et al.* 2001). Es konnte eine Korrelation der Aktivität der *core 1* β 1,3-Galactosyltransferase, des Enzyms, das die freie GalNAc-Struktur A (Tn-Antigen, Abb.11) galactosyliert und der Untergalactosylierung bei IgA-Nephropathie gefunden werden. Die Faktoren, die diese Aktivitätserniedrigung auslösen, sind allerdings noch unklar (Allen *et al.* 1997; Ju und Cummings 2002).

Die Tatsache, dass nur das IgA höherer Primaten und des Menschen eine hinge Region besitzt, erschwert die Forschung bei der IgA-Nephropathie, da Versuche an Mäusen nur bedingte Aussagekraft besitzen (Floege und Feehally 2000).

A Einleitung

4.4.3 IgG im Krankheitsbild der Rheumatoiden Arthritis

Rheumatoide Arthritis (RA, chronische Polyarthritits) ist eine chronische, unterschiedlich schnell verlaufende, entzündliche, die Gelenke zerstörende Autoimmunkrankheit, die alle Gelenkstrukturen befällt. Es können aber auch Komplikationen durch verschiedene Krankheitsbilder in den Arterien, Herz, Lunge und Augen auftreten (Axford 1999). Eines der Schlüsselereignisse in der Pathogenese der Krankheit ist die Umwandlung von in der Gelenkinnenhaut (Synovium) befindlichen Fibroblasten (junge Zellen, die am Aufbau des Bindegewebes beteiligt sind) in aggressiv wachsende, Matrix-abbauende Rheumatoide-Arthritis-Fibroblasten (Distler *et al.* 1999). Rheumatoide Arthritis ist die am häufigsten auftretende und am meisten die Bewegungsfähigkeit einschränkende Form der Arthritis, die bis hin zur Invalidität führen kann. 0,5 -1% der deutschen Bevölkerung sind betroffen, so dass die Krankheit sozialpolitische Relevanz besitzt (Distler *et al.* 1999). Die Krankheit befällt in großer Mehrzahl Frauen (Shikata *et al.* 1998). Die klinische Diagnostik erfolgt bislang standardmäßig über die Bestimmung des sogenannten Rheuma-Faktors (RF), eines Autoantikörpers. Ein Autoantikörper ist ein Antikörper, der auf körpereigene Epitope reagiert. Der RF bildet bei der RA Immun-Komplexe mit dem im Serum befindlichen IgG. Der RF ist nicht spezifisch für Rheumatoide Arthritis, sondern tritt auch bei einer Reihe weiterer Autoimmunkrankheiten, aber auch Infektionskrankheiten und sogar bei gesunden Menschen auf. Daher ist sein Wert zur Diagnose der RA eingeschränkt (Soltys *et al.* 1997). Spezifischere Autoantikörper sollen hier Abhilfe schaffen. Hierbei handelt sich allerdings nicht um Autoantikörper gegen IgG, sondern gegen deiminierte Strukturen des Proteins Fibrin. Diese Strukturen wurden in der Gelenkhaut von an RA Erkrankten gefunden. Validierende Tests mit rekombinanten deiminierten Fibrin-Strukturen zeigten dabei ermutigende Ergebnisse im Hinblick auf eine spezifischere Diagnostik (Vincent *et al.* 2002; Hueber *et al.* 2003). Allerdings ist die Brauchbarkeit dieser Diagnostik im Hinblick auf die frühe Phase der RA eingeschränkt, da die Zahl der Auto-Antikörper zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausreichend ist, um erkrankte von nicht von RA betroffenen Individuen zu unterscheiden (Hitchon und El-Gabalawy 2002). Die Therapie der RA zielt vor allem auf die Eindämmung der bei der Krankheit auftretenden entzündlichen Reaktionen. Dem Zytokin (Zytokin) TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor α) konnte eine pro-inflammatorische Wirkung bei der RA nachgewiesen werden. Es liegt vor allem bei Patienten mit einem schweren Verlauf der Erkrankung vor (Tetta *et al.* 1990). Bemerkenswerte Erfolge bei der

A Einleitung

Entzündungsbehandlung ließen sich durch die subkutane Verabreichung eines rekombinanten löslichen TNF- α -Rezeptors erzielen, der als “Etanercept“ (in Deutschland “Enbrel“) vermarktet wird. Der lösliche Rezeptor konkurriert mit den eigentlichen Zielzellen des TNF- α um das Zytokin (Distler *et al.* 1999). Ähnliche Erfolge konnten mit “Adalimumab“, einem monoklonalen Antikörper gegen TNF- α , erzielt werden (Keystone *et al.* 2003). Eine Heilung der RA ist jedoch noch nicht in Sicht. Rheumatoide Arthritis ist ebenso wie die im letzten Teilkapitel besprochene IgA- Nephropathie mit der Untergalactosylierung von Glykan-Strukturen assoziiert. Im Gegensatz zur IgA-Nephropathie wurde hier die mangelnde Galactosylierung allerdings in den N-Glykanen des Fc-Antikörper-Teils festgestellt. Die Oligosaccharidketten befinden sich im Zwischenraum der beiden schweren Ketten des IgG-Moleküls, und zwar an jeder schweren Kette an Asn 297 (Abbildung 13).

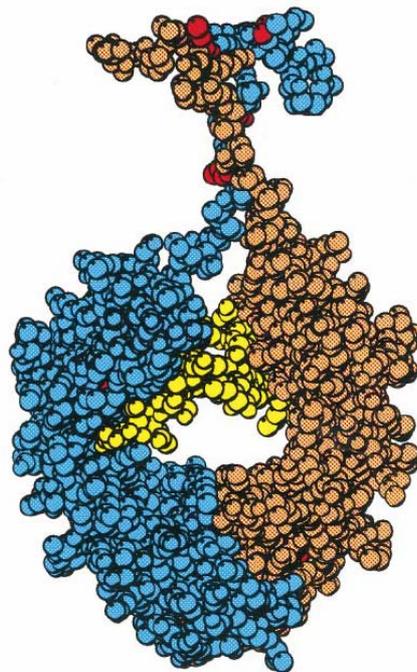


Abbildung 13: Molekulares Modell des IgG Fc (aus Mattu *et al.* 1998).

Dargestellt sind die schweren Ketten (blau und orange), die Cysteine (rot) sowie die Glykane (gelb).

A Einleitung

Durch diese Lage an der Innenseite des IgG-Moleküls und durch nicht-kovalente Wechselwirkungen mit der Proteinoberfläche ist eine nicht optimale Zugänglichkeit für die die Glykane herstellenden Glykosyltransferasen gegeben. Hieraus folgt, dass auch im nicht krankheits-assoziierten IgG bereits unvollständig glykosylierte Strukturen, darunter auch untergalactosylierte Strukturen vorliegen (Mattu *et al.* 1998; Axford 1999). Die Heterogenität der N-Glykane im IgG ist wesentlich komplexer als die der O-Glykane im IgA1. Abbildung 14 zeigt sämtliche vorliegenden neutralen Oligosaccharidstrukturen der IgG N-Glykane des Fc-Teils beim humanen IgG. Es handelt sich ausschließlich um biantennäre Strukturen des Komplex-Typs (Routier *et al.* 1998). Neutrale Strukturen machen beim humanen IgG 75% der Gesamtstrukturen der Fc-Teil N-Glykane aus. Die restlichen 25% entfallen auf Strukturen mit negativer Nettoladung, hierbei sind 20% monosialyliert und 5% disialyliert (Rudd *et al.* 1991). Die in Abbildung 14 benutzte Nomenklatur ist allgemein gebräuchlich. So werden biantennäre Strukturen der IgG-N-Glykane, die je eine Galactose an jedem Arm tragen, als G2 bezeichnet, trägt nur ein Arm eine Galactose, als G1 und fehlen beide Galactosen, als G0 (Routier *et al.* 1998).

Das IgG-Molekül enthält auch noch komplexe N-Glykane im Fab-Teil, diese wurden allerdings bislang nicht mit rheumatoider Arthritis in Verbindung gebracht und werden daher nicht weiter besprochen (Mattu *et al.* 1998).

A Einleitung

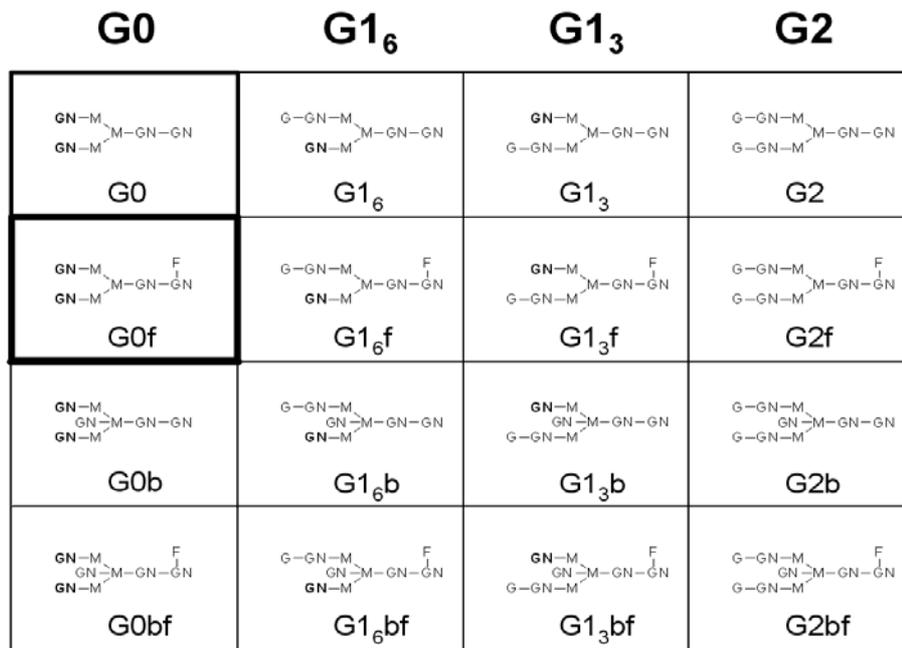


Abbildung 14: Neutrale N-Glykan-Strukturen des humanen IgG

(aus Routier *et al.* 1998).

Mit F: Fucose, G: Galactose, GN: GlcNAc, M: Mannose,

G0: doppelt untergalactosylierte biantennäre Struktur, G1: einfach untergalactosylierte biantennäre Struktur, G2: vollständig galactosylierte Struktur

G1₃: einfach untergalactosylierte biantennäre Struktur mit Galactose am Man(α1,3)-Arm, G1₆: einfach untergalactosylierte biantennäre Struktur mit Galactose am Man(α1,6)-Arm,

GXf: biantennäre Struktur mit *core*-Fucose, GXb: Struktur mit bisecting GlcNAc;

die für die Untergalactosylierung bei RA besonders wichtigen Strukturen G0 und insbesondere G0f sind hervorgehoben.

Zur Ermittlung der mit Rheumatoider Arthritis assoziierten Glykosylierungsänderungen wurden von mehreren Laboratorien umfangreiche Studien angefertigt (Routier *et al.* 1998; Axford *et al.* 2003). Auf die dabei benutzten Techniken der Glykanstrukturaufklärung soll später eingegangen werden, um sie mit der im Rahmen dieser Arbeit zu etablierenden Technik der selektiven Markierung von Glykanen an Glykoproteinen zu vergleichen (Kapitel C 6.2). Diese Studien ergaben übereinstimmend, dass im Falle der RA eine Untergalactosylierung vorliegt. Neueste Ergebnisse zeigen dabei, dass es vor allem zur

A Einleitung

Zunahme der G0f-Struktur (Abbildung 14) kommt. Die Struktur G0 nimmt laut derselben Studie sogar ab (Axford *et al.* 2003). Beide Strukturen sind jedoch als Akzeptoren für die Transferase-vermittelte selektive Markierung von großer Bedeutung. Zwar konnte bei Patienten mit RA eine reduzierte Galactosyltransferase-Aktivität der B-Lymphozyten festgestellt, allerdings konnte keine Korrelation zur Zunahme von Agalacto-Strukturen hergestellt werden (Keusch *et al.* 1998).

Man hat mittlerweile einige Vorstellungen über die Rolle der Agalacto-Strukturen in der Pathogenese der RA (Soltys *et al.* 1997). Diese hängen mit dem Rheuma-Faktor zusammen. Im nicht von RA befallenen Organismus bildet der RF Komplexe mit IgM. Unter Einwirkung von T-Zellen erfolgt im Fall der RA eine Veränderung der Spezifität des RF zugunsten des IgG. Es müssen Antigen-Peptide vorliegen, die die T-Zellen aktivieren, um die Veränderung der Spezifität des RF auszulösen. Dieser "Peptid-Trigger" wurde allerdings bislang nicht identifiziert (Soltys *et al.* 1997). Dagegen konnte festgestellt werden, dass der RF eine 10fach erhöhte Affinität zu Agalacto-IgG im Vergleich zu normalem humanen IgG zeigt (Soltys *et al.* 1994). Es ist jedoch noch nicht geklärt, ob die N-Glykane des IgG bei der Bindung des RF überhaupt eine Rolle spielen. Die Ergebnisse hierzu sind sehr widersprüchlich (Soltys *et al.* 1994; Sutton *et al.* 1998). Die RF-IgG-Immunkomplexe könnten zur Auslösung des Komplement-Wegs und damit zu einer entzündlichen Antwort der Autoimmunität führen. Die genauen Mechanismen sind jedoch bislang ungeklärt (Soltys *et al.* 1997).

Es gibt noch weitere rheumatische Erkrankungen, die ebenfalls durch eine Veränderung in der IgG-Glykosylierung charakterisiert sind. Diese treten jedoch deutlich seltener auf. Hierunter fallen u.a. die psoriatische Arthritis, die ankylosierende Spondylitis, Lupus erythematoses, juvenile idiopathische Arthritis sowie Osteoarthritis. Für die psoriatische Arthritis konnte wie bei der RA eine Korrelation zu einer Untergalactosylierung festgestellt werden (Axford *et al.* 2003).

5 Molekulare Werkzeuge zur gezielten Markierung von Glykokonjugaten

Um verschiedene Funktionen von Glykokonjugaten zu untersuchen, sind molekulare Werkzeuge in Form von modifizierten Kohlenhydraten entwickelt worden. Durch ihren glykosyltransferase-vermittelten Transfer auf ein Glykokonjugat können spezielle Glykostrukturen spezifisch markiert werden. Dieses Konzept sollte im Rahmen dieser Arbeit für die Untersuchung der Untergalactosylierung von IgG-N-Glykanen genutzt werden.

In diesem Kapitel soll die bislang auf dem Gebiet der molekularen Werkzeuge erbrachte Forschung dargestellt werden.

Grundlegende Experimente zur Modifikation von Kohlenhydraten in Glykokonjugaten wurden in der Arbeitsgruppe von Bayer und Wilchek durchgeführt (Wilchek und Bayer 1987; Bayer *et al.* 1988). So wurden beispielsweise die OH-Gruppen von Kohlenhydratstrukturen in Zellmembranen chemisch (mit Periodat) oder enzymatisch (6-Position der Galactose durch Galactose Oxidase) oxidiert und anschließend mit Hydraziden umgesetzt. Der Nachteil dieser Technik besteht in der mangelnden Selektivität, da man alle Glykane eines Glykokonjugats zufallsverteilt markiert. Eine glykosyltransferasevermittelte Markierung mit dem Donor-Nukleotidzucker als "Molekulares Werkzeug", welches bereits die Modifikation trägt, sollte jedoch zu einer selektiven Markierung spezieller Glykanketten in Glykokonjugaten führen (Abbildung 15).

Chemisch modifizierter Nukleotid-Zucker + Glykokonjugat

$\xrightarrow{\text{Transferase}}$ Selektiv modifiziertes Glykokonjugat

Abbildung 15: Allgemeine Strategie der Modifizierung von Glykokonjugaten mit "molekularen Werkzeugen".

Die von verschiedenen Arbeitsgruppen gewählten Strategien zur Einbringung chemischer Modifikationen auf Glykokonjugate lassen sich grob in *in vivo* und *in vitro*-Ansätze aufteilen. Zunächst soll hierbei auf die Arbeiten *in vivo* eingegangen werden.

A Einleitung

5.1 Molekulare Werkzeuge *in vivo* – Metabolic Engineering

Die große Toleranz des gesamten Sialinsäurebiosynthesewegs (Abbildung 16) von Säugetieren gegenüber Modifikation der natürlich vorkommenden Substrate wurde von der Arbeitsgruppe von Reutter ausgenutzt.

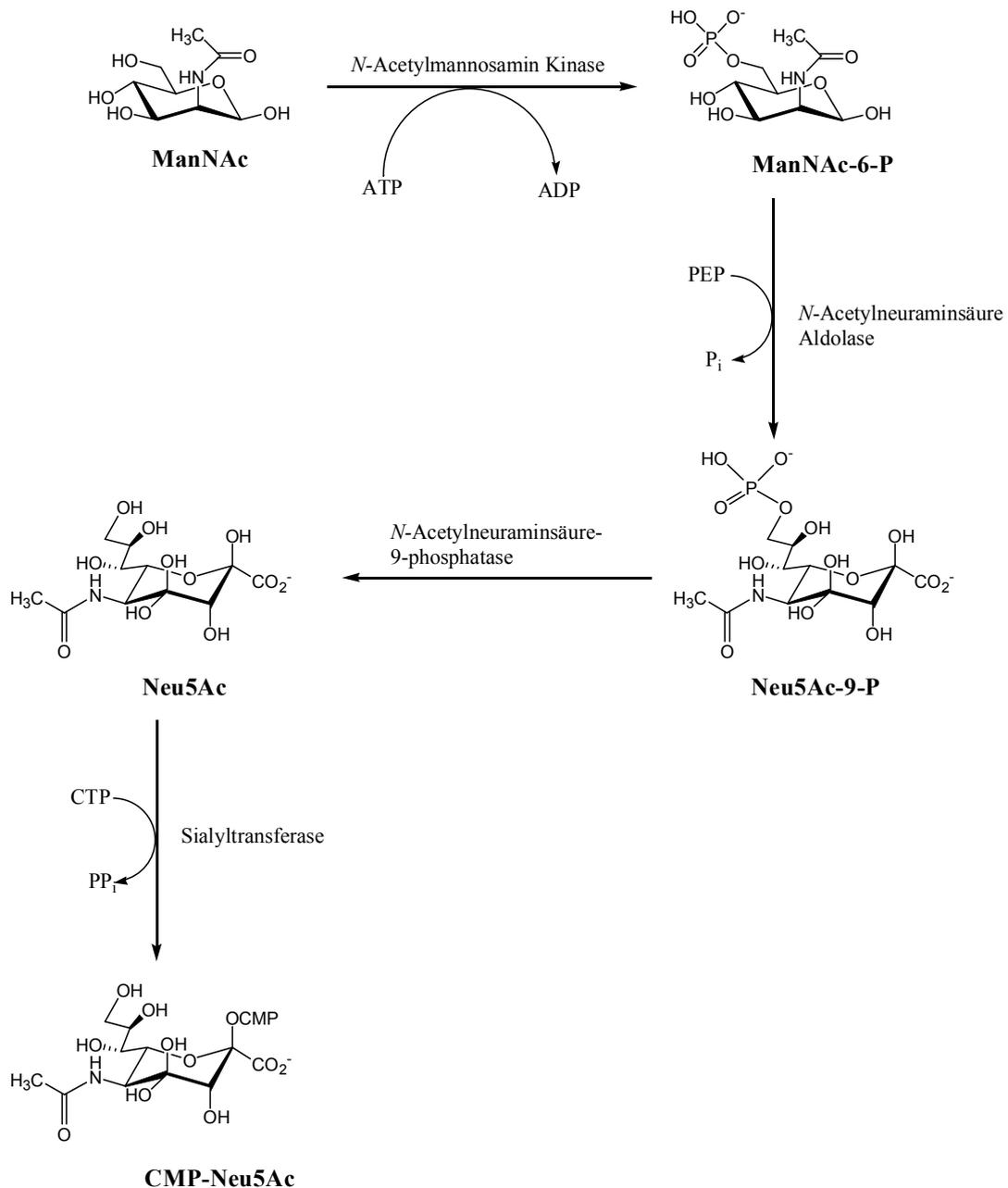


Abbildung 16: Biosynthese der N-Acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac).

A Einleitung

In Zellkultur (Keppler *et al.* 1995; Schmidt *et al.* 1998) sowie bei *in vivo*-Experimenten mit Ratten (Kayser *et al.* 1992) wurden chemisch modifizierte Neuraminsäure-Vorläuferstrukturen verwendet. Diese wurden von den Zellen aufgenommen und durchliefen den gesamten Biosyntheseweg. Letztlich kam es zum Transfer der in der Zelle CMP-aktivierten Sialinsäurederivate durch zelleigene, nicht identifizierte, Sialyltransferasen. So gelang die Ausbildung von Glykokonjugaten auf der Zelloberfläche, die modifizierte Sialinsäuren trugen. Die eben beschriebene Strategie wird auch als “Metabolic engineering“ bezeichnet. Als besonders geeignete chemisch modifizierte Sialinsäure-Vorläuferstruktur erwies sich *N*-propanoyl- β -D-mannosamin (Abbildung 17). Zielsetzung der Arbeiten war es, mehr über die biologische Funktion von Neuraminsäuren als Bestandteil von Glykokonjugaten zu erfahren (Kayser *et al.* 1992). So wurde die Bindung des Polyoma Virus an Rezeptoren der Zellen von Primaten untersucht (Keppler *et al.* 1995). Auch wurden Experimente zum Einfluss modifizierter Sialinsäuren auf die Proliferation und Migration von Nervenzellen durchgeführt (Schmidt *et al.* 1998).

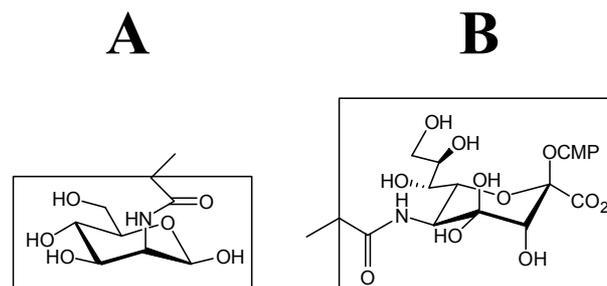


Abbildung 17: A: Struktur einer chemisch modifizierten Vorläuferstruktur der Sialinsäure, *N*-propanoyl- β -D-mannosamin; B: Struktur der CMP-aktivierten, mit einer Propanoyl-Gruppe modifizierten Sialinsäure.

Die natürlich im Biosyntheseweg auftretenden Strukturen sind jeweils durch Einrahmung hervorgehoben (nach Kayser *et al.* 1992).

Die Arbeiten der Gruppe von Bertozzi bauen auf den von Reutter erzielten Ergebnissen auf. Allerdings wurde durch die Strategie der chemoselektiven Kopplung eine Vielzahl von neuen Anwendungsmöglichkeiten geschaffen. So begnügte Bertozzi sich nicht mit der Modifikation von Glykokonjugaten der Zelloberfläche durch die Zugabe einer modifizierten Sialinvorläuferstruktur zur Zellkultur (hier die humane). Diese Vorläuferstruktur (*N*-levulinoylmannosamin (ManLev), s. Abbildung 17) enthielt eine Keto-Funktionalität, die nicht auf natürlichen Zelloberflächen vorkommt. Hierdurch war die chemoselektive Ligation

A Einleitung

mit Biomolekülen oder kleinen organischen Moleküle möglich, so dass ein direkter Einfluss auf die Funktion der Zelle genommen werden konnte. Als Beispiel hierfür wurde das Einbringen von Biotin über eine Hydrazidkopplung an der Ketofunktionalität demonstriert (Abbildung 18). Die Zellen wurden hierauf durch ein Ricin A-Zellgift, welches mit Avidin konjugiert war, abgetötet (Mahal *et al.* 1997).

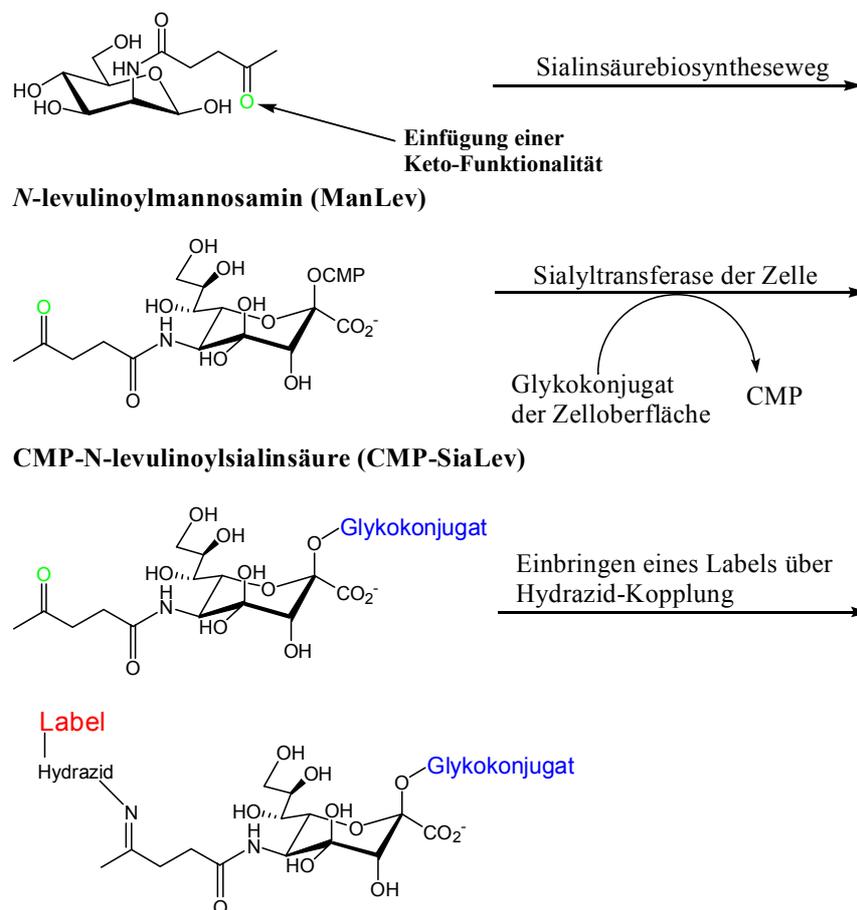


Abbildung 18: Strategie des "Metabolic Engineering" der Reaktivität von Zellen.

Zunächst wird die Keto-Gruppe als Modifikation eines Vorläufers der auf der Zelloberfläche vorhandenen Sialinsäuren eingebracht, im zweiten Schritt wird die modifizierte Sialinsäure durch nicht identifizierte Sialyltransferasen der Zelle auf Glykokonjugate der Zelloberfläche übertragen, dann erfolgt die chemoselektive Hydrazidkopplung mit einem Biotin-Reagenz (nach Mahal *et al.* 1997).

Ein weiteres Beispiel der Anwendung der gerade vorgestellten Strategie des "Metabolic Engineering" der Reaktivität von Zellen ist der Aufbau eines Virusrezeptors, der für Gen-Transfer durch einen Adenovirus genutzt werden konnte (Lee *et al.* 1999). Auch war es möglich, Mutationen im Sialinsäurebiosyntheseweg ausfindig zu machen, die sonst durch das Einbringen von Sialinsäure aus exogenen Quellen maskiert werden (Yarema *et al.* 2001).

A Einleitung

Eine Alternative zur Hydrazidkopplung stellt eine modifizierte Variante der Staudinger-Reaktion dar. Bei ihr reagiert ein Azid mit einem Arylphosphin. Diese Kopplungsstrategie wurde ebenfalls von der Arbeitsgruppe von Bertozzi vorgestellt (Abbildung 19; Saxon *et al.* 2000; Saxon und Bertozzi 2000).

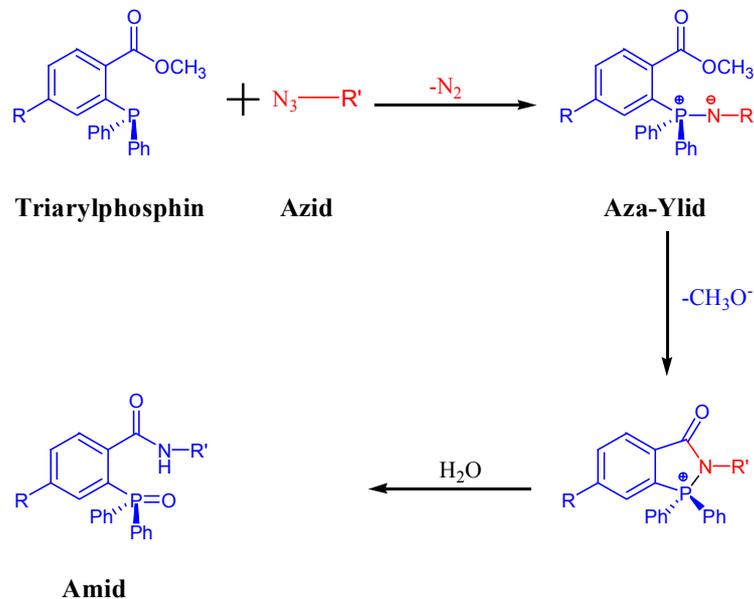


Abbildung 19: Modifizierte Staudinger-Ligation (nach Saxon und Bertozzi 2000).

Das Azid wurde analog zur Keto-Funktionalität durch eine modifizierte Sialinsäurevorläuferstruktur über den Biosyntheseweg in ein Glykokonjugat eingebracht. Die chemoselektive Kopplung mit dem Phosphin soll im Gegensatz zur Hydrazidkopplung nicht nur auf der Zelloberfläche, sondern auch innerhalb der Zelle stattfinden können (Saxon and Bertozzi 2000). Ein Anwendungsbeispiel ist die Durchführung der Staudinger-Reaktion *in vivo* auf der Zelloberfläche in Mäusen. Hierbei wurde erneut ein chemisch modifizierter Vorläufer der Sialinsäure, in diesem Fall das Azid ManNaz, verwendet (Abbildung 20, Prescher *et al.* 2004). Dieser wurde Mäusen über 7 Tage injiziert. Im Weiteren wurde er im Sialinsäurebiosyntheseweg in die korrespondierende, modifizierte Sialinsäure umgewandelt. Über nicht identifizierte Sialyltransferasen der Mäusezellen erfolgte schließlich die Übertragung auf Glykokonjugate der Zelloberfläche. Durch die Technik der Modifizierung von Glykanen der Zelloberfläche in einem lebenden Organismus soll die Diagnose und Therapie von mit fehlerhafter Glykosylierung assoziierten Krankheiten möglich werden.

A Einleitung

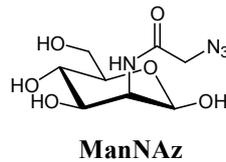


Abbildung 20: Der mit einer Azido-Gruppe modifizierte Sialinsäure-Vorläufer ManNAz (nach Prescher *et al.* 2004).

Der Zucker untergeht nach Umwandlung zur modifizierten Sialinsäure die in Abbildung 18 gezeigte modifizierte Staudinger-Ligation. Die Staudinger-Ligation dient hier zum Nachweis der modifizierten Sialinsäure auf den Glykokonjugaten der Zelloberfläche lebender Mäuse.

In der Arbeitsgruppe Bertozzi gelang es auch, das “metabolic engineering“ auf den Biosyntheseweg von UDP-GalNAc auszuweiten. Hierbei wurde der salvage pathway für dieses Substrat ausgenutzt, so dass die Aufnahme von einem chemisch synthetisierten Azidoanalogon von GalNAc zum entsprechenden UDP-GalNAc-Derivat führte. Der Transfer des letztgenannten Zuckers erfolgte über zelleigene ppGalNAc-Ts, der Zucker ist also ein “molekulares Werkzeug“ für diese Enzymfamilie. Ob andere GalNAc-Ts den Transfer ebenfalls katalysieren, ist nicht bekannt. Mithilfe der chemoselektiven Kopplung über die Staudinger-Reaktion konnte so eine Methode zur Identifizierung von Proteinen mit O-Glykosylierung vom Mucin-Typ entwickelt werden. Diese Methode nutzt aus, dass alle O-Glykane des Mucin-Typs ein *core* GalNAc besitzen, an welchem die chemoselektive Reaktion angreift (Hang *et al.* 2003).

Der “salvage pathway“ für UDP-GlcNAc wurde ebenfalls zum “metabolic engineering“ genutzt. Ein chemisch hergestelltes Azido-Analogon von GlcNAc diente nach Durchlaufen des “salvage pathways“ (Abbildung 21) in Form des aktivierten Zuckers als “molekulares Werkzeug“ für die zelleigene UDP-GlcNAc:polypeptidyltransferase. Diese katalysierte die Übertragung des modifizierten GlcNAc auf nukleare Proteine in Zellkultur sowie *in vivo*. Ob andere GlcNAc-Ts den Transfer ebenfalls katalysieren, ist nicht bekannt.

A Einleitung

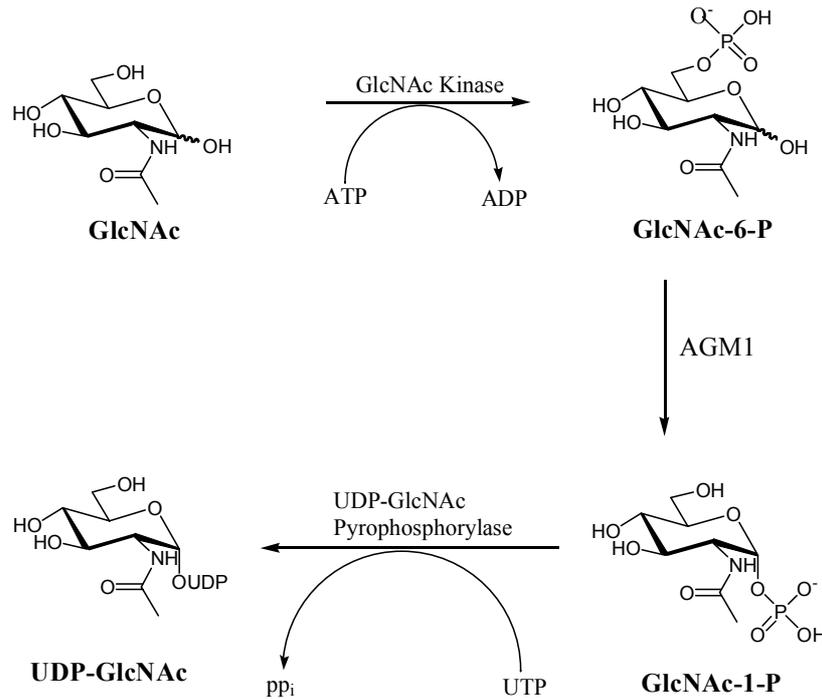


Abbildung 21: “Salvage Pathway“ der Biosynthese von UDP-GlcNAc.

Mit Hilfe des Einbringens eines Biotin-Labels durch die Staudinger-Ligation konnte eine neue Methode zur Identifikation der posttranslationalen Modifikation O-GlcNAc etabliert werden (Abbildung 22). Diese Modifikation von cytoplasmatischen und nuklearen Proteinen ist ansonsten aufgrund ihres substöchiometrischen Vorkommens schwer nachweisbar (Vocadlo *et al.* 2003).

A Einleitung

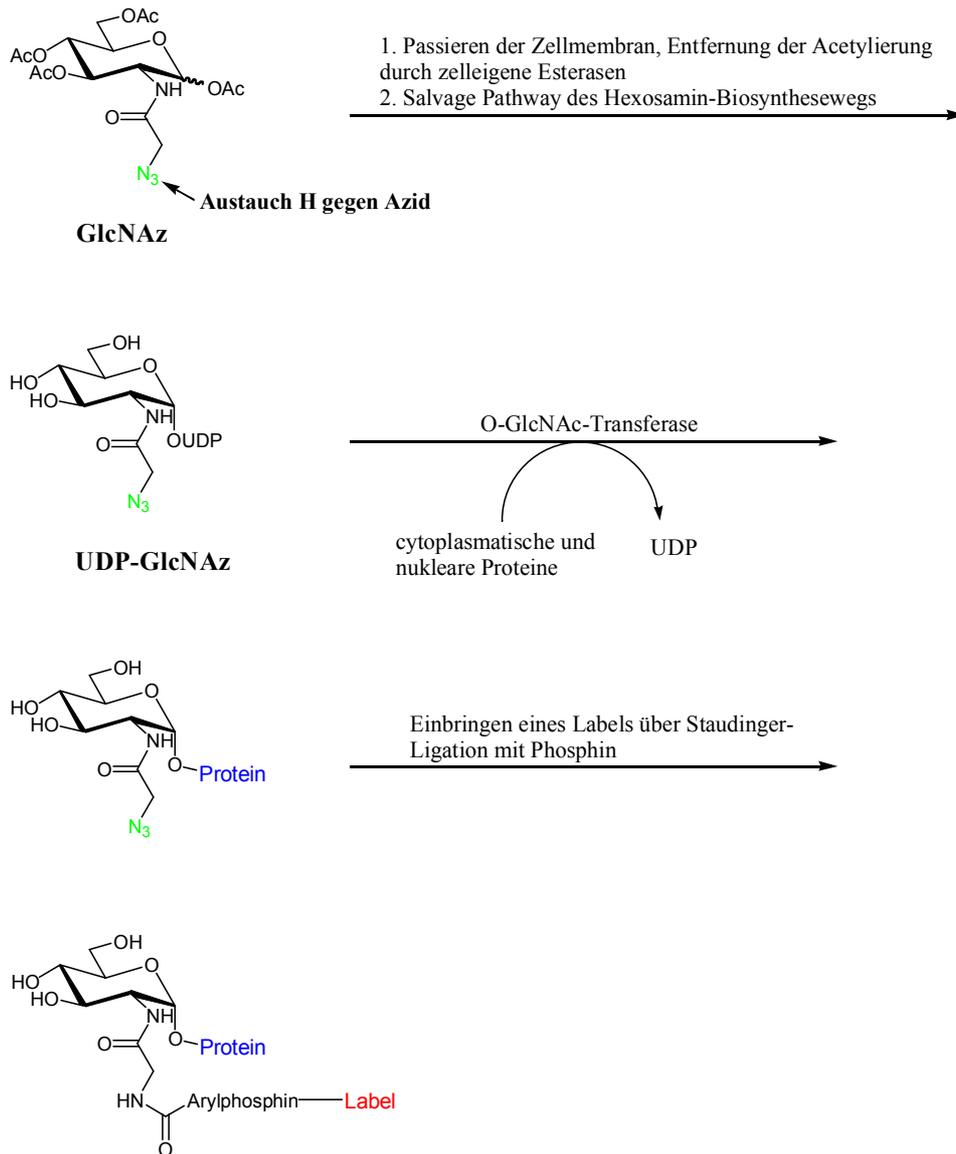


Abbildung 22: Strategie der Identifikation der posttranslationalen Modifikation O-GlcNAc.

Zunächst wird die Azido-Funktion als Modifikation des O-GlcNAc eingebracht, dann erfolgt die chemoselektive Staudinger-Ligation mit einem Biotin-Reagenz (nach Vocadlo *et al.* 2003).

A Einleitung

5.2 Molekulare Werkzeuge *in vitro*

“Molekulare Werkzeuge“ zur *in vitro*-Markierung von Glykokonjugaten wurden zunächst für Sialyl-Transferasen entwickelt. (Gross *et al.* 1987; Gross und Brossmer 1988). Die grundlegende Idee der Arbeiten von Gross und Brossmer war es, durch selektiven Transfer von modifizierten CMP-aktivierten Sialinsäurederivaten die biologische Funktion von Glykokonjugaten untersuchen zu können. Hierbei konnte die etwa bei der zu Beginn von Kapitel 5 eingangs erwähnten Periodat-Methode bestehende Gefahr vermieden werden, dass die zu untersuchenden Proteine geschädigt werden (Gross und Brossmer 1988). Beim Transfer der Sialinsäurederivate wurde die geringe Donorspezifität von Sialyltransferasen ausgenutzt. So gelang der Transfer eines einen Fluoreszenzfarbstoff tragenden Derivats (Abbildung 23) (Gross und Brossmer 1988), wodurch ein fluorometrischer Sialalytransferase-Assay entwickelt werden konnte. Die Übertragung des modifizierten Kohlenhydrats konnte hierbei für eine α 2,3- sowie eine α 2,6-Sialyltransferase aus Leber von Ratten sowie einer α 2,6-Transferase aus der Unterkieferdrüse des Schweins gezeigt werden. Zu den von Gross und Brossmer untersuchten biologischen Funktionen gehörte u.a. die Bindung von Influenza-Viren an Zell-Rezeptoren (Herrler *et al.* 1992).

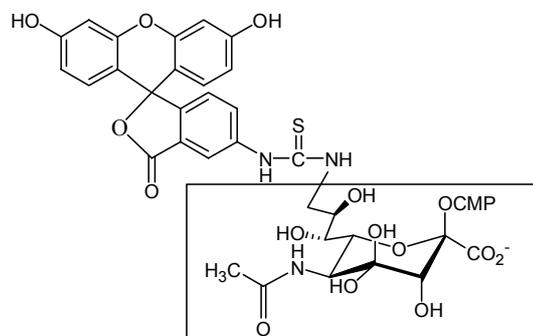


Abbildung 23: Struktur des chemisch mit einem Fluoreszenzfarbstoff modifizierten Derivats von Neuraminsäure, CMP-9-fluoresceinyl-Neu5Ac.

Die Struktur der natürlich vorkommenden CMP-Neu5Ac ist durch Einrahmung hervorgehoben (nach Gross und Brossmer 1988).

A Einleitung

Es gelang auch, auf chemischem Weg molekulare Werkzeuge in Form von Substraten für Fucosyltransferasen herzustellen (Srivastava *et al.* 1992; Hällgren und Hindsgaul 1995). So konnte die Synthese mehrerer GDP-Fucose Analoga etabliert werden, die eine Biotin-Gruppe bzw. Antigene der Blutgruppen A oder B tragen. Als Beispiel soll die das Antigen der Blutgruppe B tragende Struktur gezeigt werden (Abbildung 24). Für sämtliche Analoga konnte mit partiell aufgereinigten Fucosyltransferasen ein Transfer demonstriert werden. Hierbei wurde die Lewis (α 1-3/4) Fucosyltransferase (Le-FucT) sowie eine nicht genauer spezifizierte Fucosyltransferase aus Humanmilch benutzt. Zielsetzung dieser Arbeiten war die Einbringung komplexer Kohlenhydrat-Erkennungsmarker auf Glykokonjugate oder Zellen. So sollte das Studium der Funktion dieser Erkennungsmarker vereinfacht werden (Srivastava *et al.* 1992).

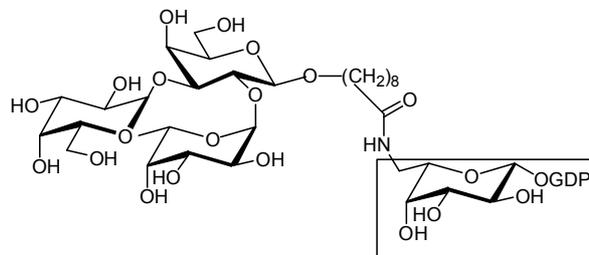


Abbildung 24: Analogon von GDP-Fucose, welches das Antigen-Trisaccharid der Blutgruppe B trägt.

Die unmodifizierte GDP-Fucose-Struktur ist durch Einrahmung hervorgehoben (nach Srivastava *et al.* 1992).

Eine *in vitro*-Strategie zur Identifikation von O-GlcNAc-tragenden Proteinen wurde von Khidekel *et al.* entwickelt. Hierbei wird der Nukleotidzucker UDP-Gal chemisch durch Einbringen einer Keto-Funktionalität modifiziert (Abbildung 25). Dieses modifizierte Substrat wird von einer Mutante der rekombinanten bovinen β 4Gal-T1 auf das O-GlcNAc tragende Protein α -Crystallin übertragen. Die posttranslationale Modifikation konnte schließlich über chemoselektive Aminooxy-Kopplung mit einem Biotin-Reagenz nachgewiesen werden (Khidekel *et al.* 2003, Abbildung 25).

In neuesten Arbeiten gelang derselben Arbeitsgruppe mit der eben vorgestellten Strategie die *in vivo*-Identifikation von O-GlcNAc-Proteinen am Beispiel des Gehirns von Ratten (Khidekel *et al.* 2004).

A Einleitung

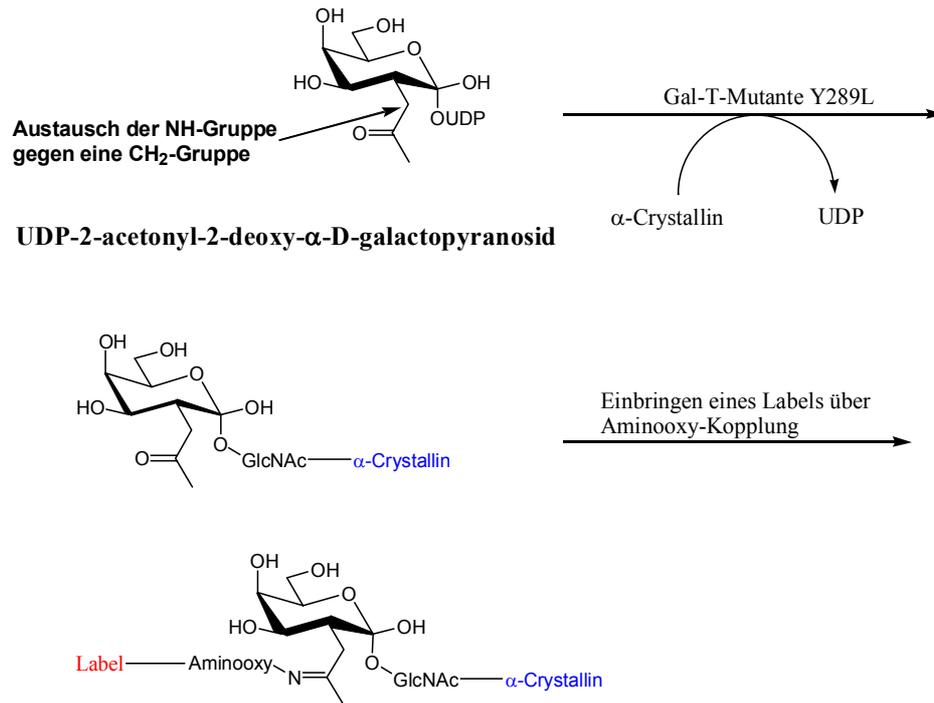


Abbildung 25: Strategie der *in vitro*-Identifikation der posttranslationalen Modifikation O-GlcNAc.

Zunächst wird die Keto-Funktion als Modifikation des Nucleotidzuckers UDP-Gal eingebracht, dann erfolgt eine chemoselektive Aminoxy-Kopplung mit einem Biotin-Reagenz (nach Khidekel *et al.* 2003).

5.3 Glykosyltransferasen-vermittelte Markierung von Glykoproteinen mit Glykosylierungsdefekten

5.3.1 Synthese von modifizierten Derivaten von UDP-Gal(NAc)

Das im Rahmen dieser Arbeit dokumentierte Projekt orientiert sich an den eben vorgestellten Arbeiten. Es baut ebenfalls auf in der Arbeitsgruppe Elling geleisteten Vorarbeiten auf, die teilweise parallel zu den im letzten Teilkapitel geschilderten Experimenten verliefen. Die Grundidee in der Arbeitsgruppe Elling war es, "molekulare Werkzeuge" zu synthetisieren, die zur selektiven Markierung von Proteinen durch Glykosyltransferasen eingesetzt werden konnten. Das Augenmerk sollte dabei auf Proteine gerichtet werden, die Glykosylierungsdefekte tragen. Spezielles Ziel war das Labelling von Agalacto-Strukturen der N- und O-Glykane aufgrund ihrer hohen Relevanz für krankheitsbedingte Defekte bei Rheumatoider Arthritis sowie IgA-Nephropathie (s. Kapitel A 4.4.2 und 4.4.3). Erstaunlicherweise war diesen Strukturen bei der Markierung mit "molekularen Werkzeugen" durch andere Arbeitsgruppen noch keinerlei Aufmerksamkeit geschenkt worden. Offenbar wurde das Risiko einer Nicht-Akzeptanz modifizierter Zucker durch die mit hoher Donorspezifität beschriebenen Galactosyltransferasen gescheut. Es mussten zunächst modifizierte Substrate für Galactosyltransferasen entworfen werden, die entweder bereits ein Label enthielten oder dieses nach Transfer durch chemoselektive Kopplung erhalten sollten. Es sollte im Gegensatz zu den vorher geschilderten Synthesen modifizierter Substrate ein Ansatz entwickelt werden, der eine chemische Synthese mit aufwendiger Schutzgruppenchemie umgehen sollte. Aus diesem Grund wurde ein chemoenzymatischer Ansatz gewählt, über den ein biotinyliertes Derivat von UDP-Gal hergestellt werden sollte. Der Transfer der modifizierten Substrate sollte mit rekombinanten Enzymen geschehen. Um die Übertragbarkeit der zu entwickelnden Synthesestrategie auf andere Enzymfamilien zu zeigen, sollten analog modifizierte Substrate von UDP-GalNAc als Substrate von rekombinanten ppGalNAc-Ts entworfen werden. Ebenfalls denkbar war eine Ausweitung der Technik des selektiven Transfers auf Glykosidasen. Die Synthese von *p*-Nitrophenyl-aktivierter Galactose oder *N*-Acetylgalactosamin sollte aber erst im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit realisiert werden. Abbildung 26 zeigt das generelle Schema der Technik des selektiven Transfers.

A Einleitung

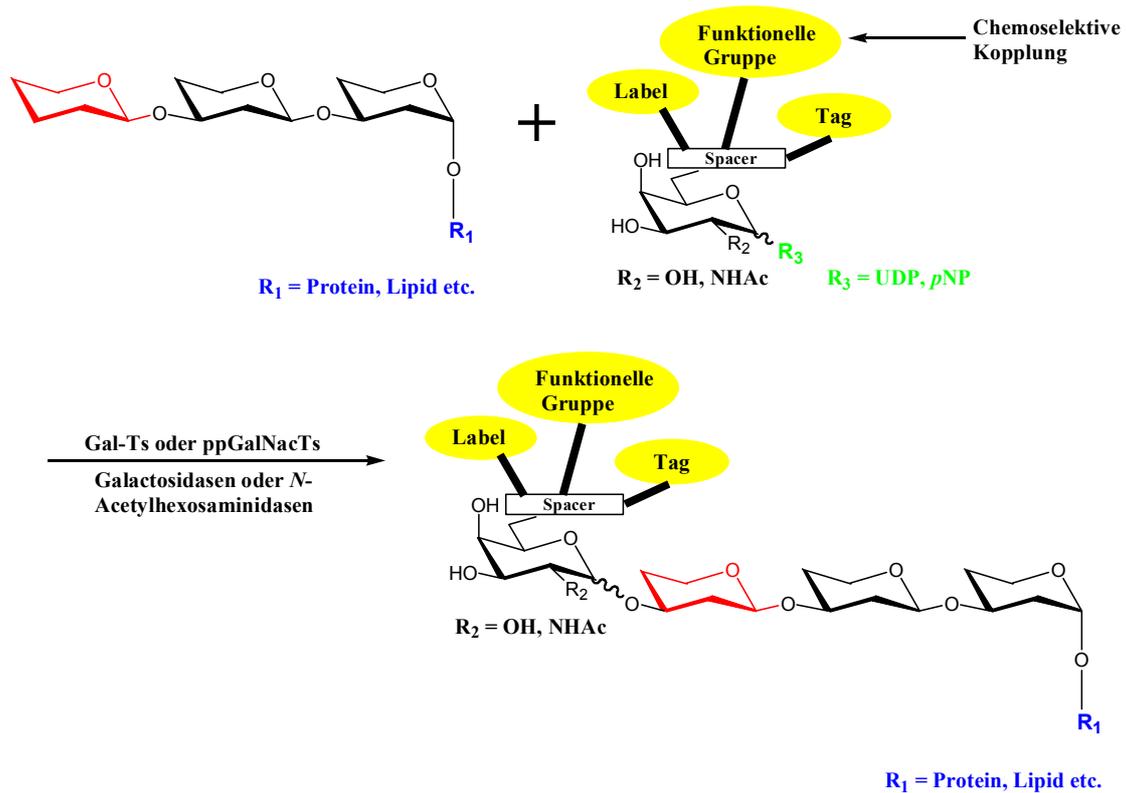


Abbildung 26: Selektive Markierung von Glykokonjugaten mit modifizierten Gal(NAc)-Derivaten als Substraten von Glykosyltransferasen der Gal-T- und ppGalNac-T-Familien oder von Glykosidasen der Galactosidase- und N-Acetylhexosaminidase-Familien.

Die Markierung kann als (Fluoreszenz)-Label oder Tag (z.B. Biotin) eingeführt werden, als Alternative kann eine funktionelle Gruppe eingebracht werden, mit der nach Transfer auf ein Glykokonjugat eine chemoselektive Kopplung erfolgt.

Die Synthese der modifizierten Nukleotidzucker erfolgte als Vorarbeit zum hier dokumentierten Projekt im Rahmen der Dissertation von Bülter (Bülter 1999; Bülter *et al.* 2001). Im Folgenden soll daher die Synthese der neuartigen modifizierten Nukleotidzucker Uridin 5'-diphospho-6-biotin- ϵ -amidocaproylhydrazino- α -D-galactose (UDP-6-biotinyl-Gal) und Uridin 5'-diphospho-N-acetyl-6-biotin- ϵ -amidocaproylhydrazino- α -D-galactosamin (UDP-6biotinyl-GalNac) dargestellt werden (Abbildung 27). Dazu wurde die selektive Oxidation der C6-Hydroxylgruppe von UDP-Gal bzw. UDP-GalNac durch Galactose Oxidase (EC 1.1.3.9) zur C6-Aldehydgruppe mit der chemischen Kopplung von Biotin- ϵ -amidocaproylhydrazid (BACH) zur Synthese von UDP-6-biotin- ϵ -amidocaproylhydrazono-Gal(NAc) (UDP-6-biotinhydrazono-Gal(NAc) *in situ* verknüpft. Es handelt sich daher um

A Einleitung

eine chemoenzymatische Eintopf-Reaktion. Durch die *in situ* Umsetzung der Aldehydderivate mit dem Hydrazidreagenz konnte die weitere enzymatische Oxidation zu den entsprechenden Uronsäuren vermieden werden. In im Vorfeld optimierten Ansätzen zum chemoenzymatischen Eintopfverfahren wurden die präparativen Synthesen von UDP-6-biotinhydrazono-Gal und UDP-6-biotinhydrazono-GalNAc in einem Reaktor mit integrierter Schlauchbegasung durchgeführt. Letzterer ermöglicht eine optimale Sauerstoffversorgung und die Vermeidung von Gasblasen, was eine optimale Aktivität und Stabilität der Galactose Oxidase während der Synthese gewährleistet. Die Ausbeuten der präparativen chemoenzymatischen Eintopfsynthesen waren 82% für UDP-6-biotinhydrazono-Gal und 78% für UDP-6-biotinhydrazono-GalNAc. Die zur Stabilisierung von UDP-6-biotin- ϵ -amidoamidocaproyl-hydrazono-Gal(NAc) notwendige Reduktion zum UDP-6-biotin- ϵ -amidocaproyl-hydrazino- α -D-Gal(NAc) (UDP-6-biotinyl-Gal(NAc)) gelang quantitativ mit NaCNBH₃ in gefrorener wässriger Lösung bei -20°C (Abbildung 27).

A Einleitung

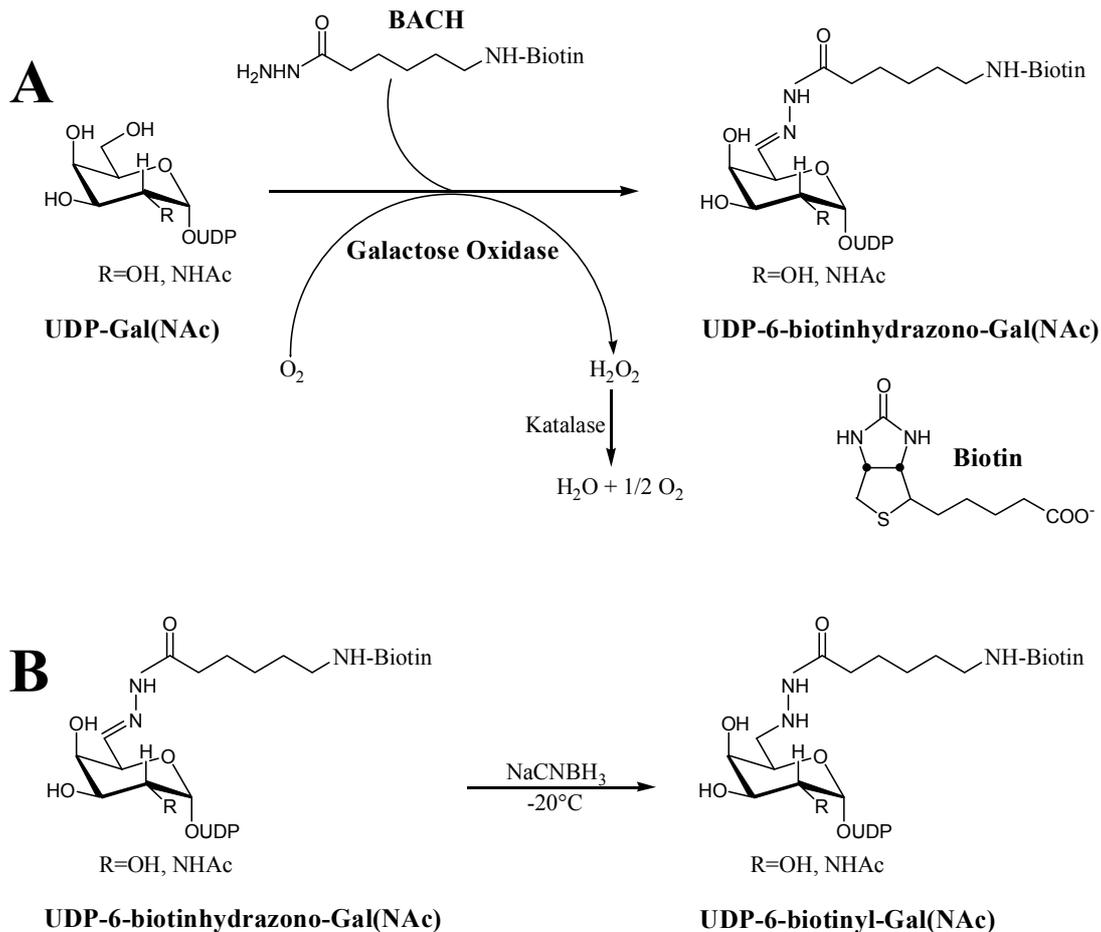


Abbildung 27: Präparative Synthese von UDP-6-biotinyl-Gal(NAc) (Bülter *et al.* 2001).

A: Chemoenzymatische Eintopfsynthese. Galactose Oxidase oxidiert die C-6 Hydroxylgruppe des UDP-Gal(NAc) zur Aldehydgruppe, die *in situ* von einem Hydrazidreagenz zum Hydrazone des Nucleotidzuckers umgesetzt wird.
B: Chemische Reduktion zum Hydrazin mit NaCNBH₃.

5.3.2 Transfererfolge mit biotinylierten Derivaten von UDP-Gal(NAc)

In der eigenen Diplomarbeit konnte der erfolgreiche Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal auf Glykokonjugate demonstriert werden (Bülter *et al.* 2001). Hierdurch konnte also der “proof of principle“ der selektiven Markierung mit Galactosyltransferasen gezeigt werden. Zum Nachweis des erfolgreichen Transfers wurde die Biotin-Analytik über Streptavidin-Konjugate ausgenutzt. Als Modell-Glykoprotein, an dem die prinzipielle Übertragbarkeit von UDP-6-biotinyl-Gal gezeigt werden sollte, wurde das kommerziell erhältliche Neo-Glykoprotein BSA-GlcNAc herangezogen. Dieses trägt 17 mol GlcNAc pro mol Protein, ist also

A Einleitung

aufgrund der hohen Anzahl des Akzeptorzuckers GlcNAc ein ideales Modellprotein für die galactosyltransferasevermittelte Markierung. An BSA-GlcNAc konnte mit Hilfe von Western Blot und ELSA (modifizierter, auf Biotin-Streptavidin-Erkennung beruhender ELISA; Enzyme Linked Streptavidin Assay) erstmals ein galactosyltransferasevermittelter Transfer eines biotinylierten UDP-Gal-Derivats gezeigt werden. Der Transfer konnte mit den von unserem Kooperationspartner Prof. Henrik Clausen (School of Dentistry, Copenhagen University) zur Verfügung gestellten rekombinanten humanen $\beta 3\text{Gal-T5}$ und $\beta 4\text{Gal-T4}$ sowie der in der Arbeitsgruppe Elling verfügbaren rekombinanten humanen $\beta 4\text{Gal-T1}$ demonstriert werden. Nachdem die Akzeptanz des UDP-Gal-Biotin durch Galactosyltransferasen gezeigt werden konnte, wurde im nächsten Schritt mit Ovalbumin ein natürliches Glykoprotein für Transfer-Experimente ausgesucht (Abbildung 28).

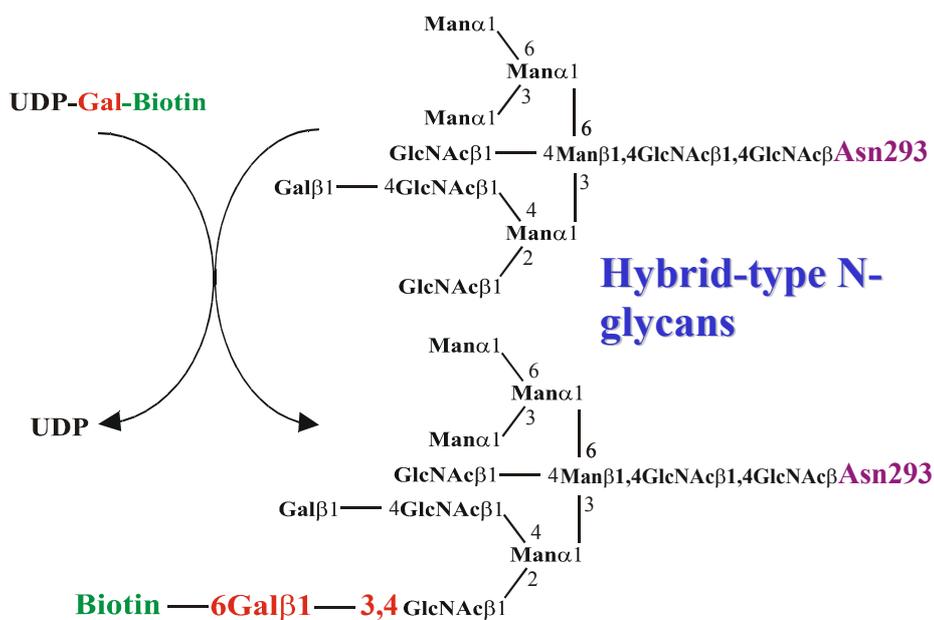


Abbildung 28: Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal mit den rekombinanten humanen Galactosyltransferasen $\beta 3\text{Gal-T5}$, $\beta 4\text{Gal-T1}$ und $\beta 4\text{Gal-T4}$ auf Ovalbumin.

Ovalbumin trägt lediglich eine Glykosylierungsstelle an der Aminosäure Asn 293 (Chen *et al.* 1988), an der N-Glykane vom Hybrid-Typ vorliegen. Diese zeigen zwar maximal zwei freie GlcNAc-Stellen (Abbildung 28), jedoch ist ein Transfer auf das mittlere, das sogenannte

A Einleitung

bisecting GlcNAc, aus sterischen Gründen sehr unwahrscheinlich. Somit kann man von maximal einem möglichen zu markierenden GlcNAc-Rest ausgehen, was Ovalbumin als deutlich anspruchsvolleren Akzeptor im Vergleich zum BSA-GlcNAc auszeichnet.

Es ist uns aber gelungen, per ELSA-Test auch den erfolgreichen Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal auf Ovalbumin nachzuweisen. War jedoch beim Transfer auf BSA-GlcNAc die Wahl des Enzyms noch beliebig, zeigten sich hier deutliche Unterschiede. β 3Gal-T5 war am besten geeignet, β 4Gal-T4 zeigte auch noch eine gute Transferleistung, während β 4Gal-T1 nur noch einen schwachen Transfer zeigte. Dies kam insofern überraschend, da gerade das letztgenannte Enzym mit Transferreaktionen auf N-Glykanen in Verbindung gebracht wird. β 4Gal-T4 wird jedoch mit Transfer auf Glykolipide assoziiert (Tabelle 2), so dass die Transferergebnisse des UDP-6-biotinyl-Gal auf Ovalbumin einen gewissen Widerspruch dazu darstellen. Jedoch ist, wie bereits früher erwähnt, die biochemische Charakterisierung der Enzyme noch keineswegs abgeschlossen. Zum anderen könnte der Einfluss der Modifizierung des Nukleotidzuckers eine Selektivität der Enzyme zusätzlich zu ihrer Akzeptorsubstratpräferenz hervorrufen.

Erfolgreiche Transferexperimente mit UDP-GalNAc-Biotin sind bislang ausgeblieben, Übertragungsversuche auf ein 25mer Peptidabkömmling des MUC1 (Mucin) mit verschiedenen ppGalNAC-Ts, die wiederum von Prof. Clausen zur Verfügung gestellt wurden, zeigten keine Markierung des Peptids.

B Zielsetzung

Kernziel dieser Arbeit war die Weiterführung der Arbeiten zum selektiven Labelling von Glykokonjugatstrukturen mit Agalactostrukturen. Nachdem im Kapitel A 5.3.2 beschrieben, erfolgreichen Labelling des Neoglykokonjugats BSA-GlcNAc sowie des Glykoproteins Ovalbumin sollte nun das Augenmerk auf krankheitsrelevante Strukturen gelenkt werden. Als Modellsystem hierzu sollte das IgG aufgrund seiner hohen Relevanz bezüglich der Rheumatoiden Arthritis verwendet werden. Zunächst sollte hierbei die Tatsache ausgenutzt werden, dass das IgG verschiedener Spezies bereits einen unterschiedlichen Grad an Untergalactosylierung aufweist. Diese Unterschiede in der Untergalactosylierung sollten mithilfe der Technik des selektiven Transfers von UDP-6-biotinyl-Gal nachvollzogen werden. Zur Analytik der IgG-Transferexperimente sollten die bereits etablierten Verfahren des Western Blots und ELSAs benutzt bzw. gegebenenfalls verfeinert werden. Um dieses Ziel zu erreichen, standen drei unterschiedliche Konstrukte der humanen β 4Gal-T1 zur Verfügung. Diese lagen in rekombinanter, löslicher Form in *E. coli* in der Arbeitsgruppe Elling vor. Ein weiteres Ziel der Arbeit war es daher, die Unterschiede dieser Konstrukte herauszuarbeiten. Dazu sollten sie eingehend kinetisch charakterisiert werden. Ein wichtiger Aspekt hierbei war die Eignung der Konstrukte für den selektiven Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal. Eine weitere Aufgabe dieser Arbeit sollte die Mutagenese der humanen β 4Gal-T1 sein. Das Hauptinteresse lag hierbei darin, ein Enzym zu erhalten, was in der Lage sein könnte, UDP-GalNAc, und so möglicherweise auch UDP-6-biotinyl-GalNAc, zu transferieren. Für letzteren Zucker lag bislang kein Enzym vor, welches einen Transfer ermöglichte.

Das vornehmliche synthetische Ziel der Arbeit sollte in der Ausweitung der Strategie der C6-Modifikation von auf Galactose oder GalNAc basierenden Zuckern auf die zugehörigen *pNP*-Zucker als Substrate von Glykosidasen liegen. Es sollte Hydrolyse und Transfer dieser modifizierten Zucker mittels Glykosidasen demonstriert werden.

C Ergebnisse und Diskussion

1 Synthese der zu derivatisierenden Nukleotidzucker

Für die Synthese der modifizierten Nukleotidzucker UDP-6-biotinyl-Gal und UDP-6-biotinyl-GalNAc sind präparative Mengen von UDP-Gal und UDP-GalNAc notwendig. Da zum Ende der eigenen Diplomarbeit und nach Fertigstellung der in Kapitel A 5.3.2 geschilderten Arbeiten (Bülter *et al.* 2001) kein weiteres UDP-Gal-Biotin mehr zur Verfügung stand, war die erneute Synthese ausgehend von UDP-Gal die Grundlage für alle weiteren hiermit zusammenhängenden Arbeiten. Zwar war UDP-Gal zu diesem Zeitpunkt kommerziell erhältlich, die Kosten für einen Kauf der benötigten Menge jedoch prohibitiv.

UDP-GalNAc-Biotin stand durch die Arbeiten von Dr. Thomas Bülter noch im 100 mg-Maßstab zur Verfügung, so dass hierauf im Weiteren zurückgegriffen werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde die in der Arbeitsgruppe Elling entwickelte Synthese von UDP-Gal verwendet (Bülter 1999; Bülter und Elling 2000, Abbildung 29). Diese basiert auf der Synthese nach Anderson (Anderson *et al.* 1959). Galactose-1-phosphat-uridylyltransferase (Gal-1-P-Uridylyltransferase) katalysiert die Übertragung von Uridin 5'-monophosphat (UMP) von Uridin 5'-diphospho- α -D-glucose (UDP-Glc) auf Galactose-1-phosphat (Gal-1-P). Die Ausbeute ist aufgrund der ungünstigen Gleichgewichtslage der Reaktion (K_{eq} : 1,1) und zusätzlich durch die Inhibition der Gal-1-P-Uridylyltransferase durch das Nebenprodukt Glucose-1-phosphat (Glc-1-P) begrenzt (Kurahashi und Sugimura 1960; Bertoli und Segal 1966). Aus diesen Gründen wurde Glc-1-P mittels der Enzyme Phosphoglucomutase und Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (Glc-6-P-Dehydrogenase) zu D-Gluconat-6-phosphat umgesetzt. Durch diese Zusatzreaktionen und einem Überschuss an Gal-1-P konnte das Gleichgewicht der Reaktion vollständig auf die Produktseite verschoben werden (Bülter und Elling 2000).

C Ergebnisse und Diskussion

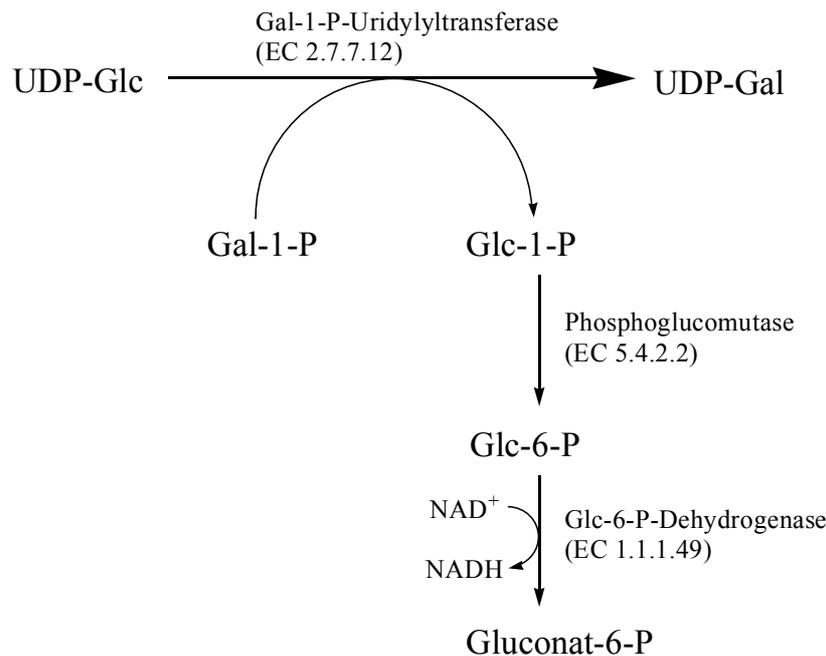


Abbildung 29: Enzymatische Synthese von UDP-Gal.

Das Schlüsselenzym dieser Synthese, Gal-1-P-Uridylyltransferase, ist ein relativ teurer Katalysator und einer der Hauptkostenfaktoren der Synthese. Um die Enzymproduktivität zu erhöhen, wurde daher die “repetitive batch technique“ angewendet (Kragl *et al.* 1993). Hiermit wurde es möglich, die Enzyme in sich wiederholenden Synthesen zu nutzen (für eine Abbildung der Technik siehe Kapitel E 2.1). Hierbei wird die Produktlösung nach Ablauf einer Reaktion in einer Ultrafiltrationszelle durch Drucküberlagerung filtriert. Die zurückgehaltene Enzymlösung kann nach Zugabe frischer Substratlösung wieder zur Synthese verwendet werden.

Mit einem Syntheseschritt (“batch“) wurden 210 μmol UDP-Glc in 2 h umgesetzt. Insgesamt wurden 20 “batches“ ausgeführt, was einem Umsatz von 4,2 mmol oder ca. 2,5 g UDP-Glc entspricht. Zur Stabilisierung der Enzyme wurde der Reaktionslösung Saccharose zugegeben (Zervosen *et al.* 1996; Zervosen und Elling 1998). Jeder “batch“ verlief quantitativ. Hierbei kam es zu keinen Verlängerungen der für vollständigen Umsatz benötigten Inkubationszeit, was zeigt, dass kein merklicher Verlust an Enzymaktivität auftrat. Für die Analytik wurde eine HPLC-Methode verwendet (s. Kapitel F 2.2), die eine Trennung des Edukts UDP-Glc und des Produkts UDP-Gal, also von Stereoisomeren, ermöglichte. Das Produkt wurde mittels Anionenaustauschchromatographie und Gelfiltration isoliert. Es wurden 1,15 g (1,9 mmol) isoliert, was einer Gesamtausbeute der Synthese von 45% entspricht (Tabelle 4).

C Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4: Verlauf der Isolierung von UDP-Gal.

	Menge (mmol)	Reinheit laut HPLC (%)	Ausbeute (%) bezo- gen auf UDP-Glc
Synthese	4,2	69	100
Anionenaustauscher- chromatographie	3,0	92	71
Gelfiltration	2,0	99	47
Lyophilisation	1,9	99	45
			1,15 g

Somit konnte die von Bültner und Elling erreichte Gesamt-Ausbeute von 49% bestätigt werden.

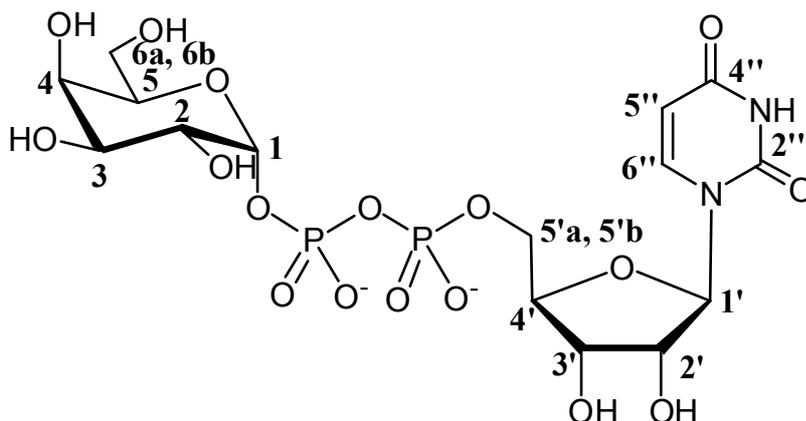


Abbildung 30: Strukturformel von UDP-Gal.

Es war nach der Synthese des UDP-Gal aufgrund identischer HPLC-Laufzeiten des Produkts im Vergleich mit einem UDP-Gal-Standard wahrscheinlich, dass es sich beim synthetisierten Zucker tatsächlich um UDP-Gal handelte. Zur Identitätssicherung wurde aber ein $^1\text{H-NMR}$ der Verbindung vermessen. Das Spektrum wurde im Institut für Biotechnologie II des Forschungszentrum Jülich aufgenommen. Es wurde ein Bruker ARX300 verwendet. Als interner Standard der ^1H -Messung diente Tetramethylsilan. Chemische Verschiebungen sind in ppm angegeben, Kopplungskonstanten in Hz.

C Ergebnisse und Diskussion

Die Zuordnung der Protonen ist in Abbildung 30 abzulesen:

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, D_2O): δ 7,92 (d, 1H, $^3\text{J}_{5'',6''}$ 8,1 Hz, H-6''), 5,95 (d, 1H, $^3\text{J}_{5'',6''}$ 8,1 Hz, H-5''), 5,92 (d, 1H, $^3\text{J}_{1',2'}$ 4,2 Hz, H-1'), 5,60 (dd, 1H, $^3\text{J}_{1,P}$ 6,8 Hz; $^3\text{J}_{1,2}$ 3,3 Hz, H-1), 4,33 (m, 2H, H-2', H-3'), 4,25 (m, 1H, H4'), 4,19 (m, 1H, H-5'a), 4,16 (m, 1H, H-5'b), 4,13 (t, 1H, H-5), 3,98 (d, 1H, $^3\text{J}_{4,5}$ 3,2 Hz, H-4), 3,86 (dd, 1H, $^3\text{J}_{2,3}$ 10,3 Hz; $^3\text{J}_{3,4}$ 3,3 Hz, H-3), 3,78 (ddd, 1H, $^3\text{J}_{1,2}$ 3,3 Hz; $^4\text{J}_{2,P}$ 3,2 Hz; $^3\text{J}_{2,3}$ 10,3 Hz, H-2), 3,72 (dd, 1H, $^3\text{J}_{5,6a}$ 6,1 Hz; $^2\text{J}_{6a,6b}$ 11,9 Hz, H-6a), 3,68 (dd, 1H, $^3\text{J}_{5,6b}$ 5,6 Hz; $^2\text{J}_{6a,6b}$ 11,8 Hz, H-6b).

Die Kopplungskonstanten $^3\text{J}_{1,2}$, $^3\text{J}_{1,P}$ und $^4\text{J}_{2,P}$ zeigen, dass der Nukleotidzucker in α -Konfiguration vorliegt. Bei einer β -Konfiguration wäre die $^4\text{J}_{2,P}$ -Kopplung nicht mehr zu sehen und die vicinale $^3\text{J}_{1,2}$ -Kopplung läge aufgrund der dann vorliegenden anti-Konfiguration (äquatorial/äquatorial) von H-1 und H-2 bei etwa 8 Hz. Die NMR-Daten stimmen mit Literaturdaten überein (Heidlas *et al.* 1992). Das NMR-Spektrum ist in Kapitel H 4 zu sehen.

Mit der hier beschriebenen Methode konnte ohne Betrachtung der Produktisolierung eine Raum-Zeit-Ausbeute von 15,3 g/d UDP-Gal erreicht werden. Koizumi *et al.* stellten zwar eine Methode mit permeabilisierten ganzen Zellen vor, bei der eine Raum-Zeit-Ausbeute von 46 g/d des Nukleotidzuckers erzielt wurde, doch wurde keine Aufreinigung geschildert (Koizumi *et al.* 1998). Allerdings wurde die Methode von Koizumi *et al.* im Zeitraum der hier vorliegenden Arbeit kommerzialisiert (Kyowa Hakko, Japan, Koizumi gehört zu der Firma). Da dort der Preis für UDP-Galactose unterhalb dessen lag, was die Edukte für die in dieser Arbeit beschriebenen UDP-Gal-Synthese kosteten, wurde im Weiteren auf kommerziell erhältliches UDP-Gal zurückgegriffen.

2 Synthese von Uridin 5'-diphospho-6-biotin- ϵ -amido-caproylhydrazino- α -D-galactose (UDP-6-biotinyl-Gal)

2.1 Präparative Synthese von UDP-6-biotinhydrazono-Gal und Reduktion zu UDP-6-biotinyl-Gal

Die erfolgreiche präparative Synthese und Isolierung von UDP-Gal sicherte die Möglichkeit zur präparativen Synthese von UDP-6-biotinyl-Gal. Abbildung 31 zeigt noch einmal das Syntheschema. Da Galactose Oxidase bei unzureichender Sauerstoff-Zufuhr zum Teil irreversibel deaktiviert wird (Mazur 1991), ist bei präparativen Synthesen mit diesem Enzym eine Begasung erforderlich. In dieser Arbeit ist der in der Arbeitsgruppe Elling etablierte Reaktor mit integrierter Schlauchbegasung zum Einsatz gekommen (Bülter 1999; Bülter *et al.* 2001). Hierbei wird die Gasdiffusion durch hydrophobe Silikonschläuche zur blasenfreien Begasung der Reaktionslösung genutzt. Dabei kommt es anders, als z.B. bei Begasung über eine Fritte, zu einer effektiven und auch schonenden Begasung. Bei Begasung über eine Fritte wird das Enzym durch die beim Gaseintrag wirkenden Scherkräfte inaktiviert. (Bülter 1999).

C Ergebnisse und Diskussion

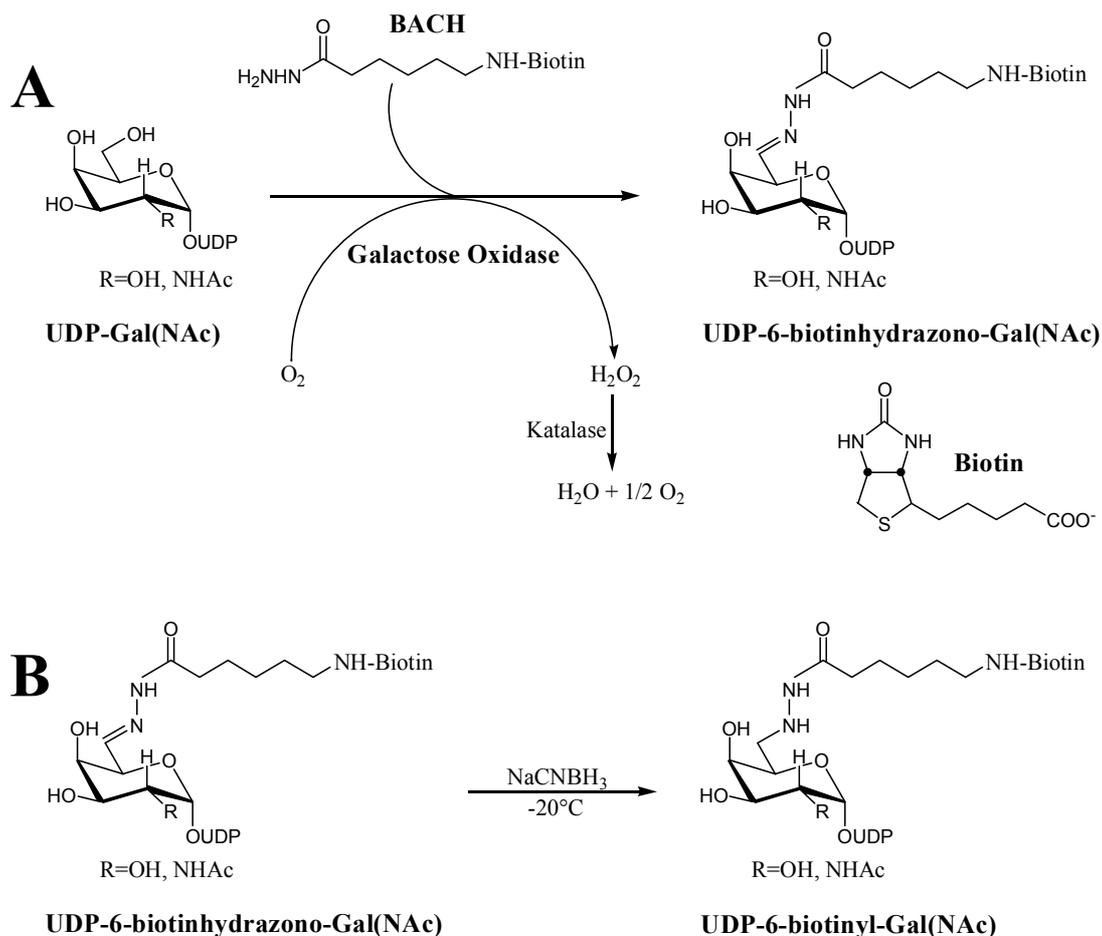


Abbildung 31: Präparative Synthese von UDP-6-biotinyl-Gal(NAc) (Bülter *et al.* 2001).

A: Chemoenzymatische Eintopfsynthese. Galactose Oxidase oxidiert die C-6 Hydroxylgruppe des UDP-Gal(NAc) zur Aldehydgruppe, die *in situ* von einem Hydrazidreagenz zum Hydrazone des Nukleotidzuckers umgesetzt wird.

B: Chemische Reduktion zum Hydrazin mit NaCNBH₃.

Der zur Derivatisierung von UDP-Gal eingesetzte Reaktor bestand aus einem gerührten Satzreaktor. Aus diesem wurde die Reaktionslösung über einen Bypass-Schlauch mit Hilfe einer Schlauchpumpe durch den Silikonschlauch zur blasenfreien Begasung geführt. Der Schlauch war in einer druckstabilen Flasche mit reinem Sauerstoff gelagert. Durch Pumpen über einen weiteren Bypass-Schlauch erreichte die Reaktionslösung wieder den Reaktor. Auf diese Weise wurde der Pumpkreislauf geschlossen. Der schematische Aufbau der Anlage ist in Abbildung 32 gezeigt, eine photographische Aufnahme in Abbildung 33.

C Ergebnisse und Diskussion

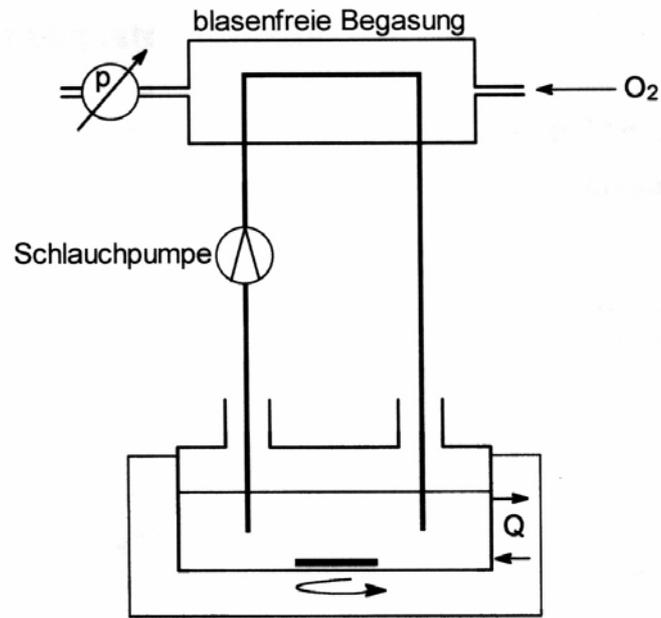


Abbildung 32: Schema des Reaktors mit integrierter Schlauchbegasung.

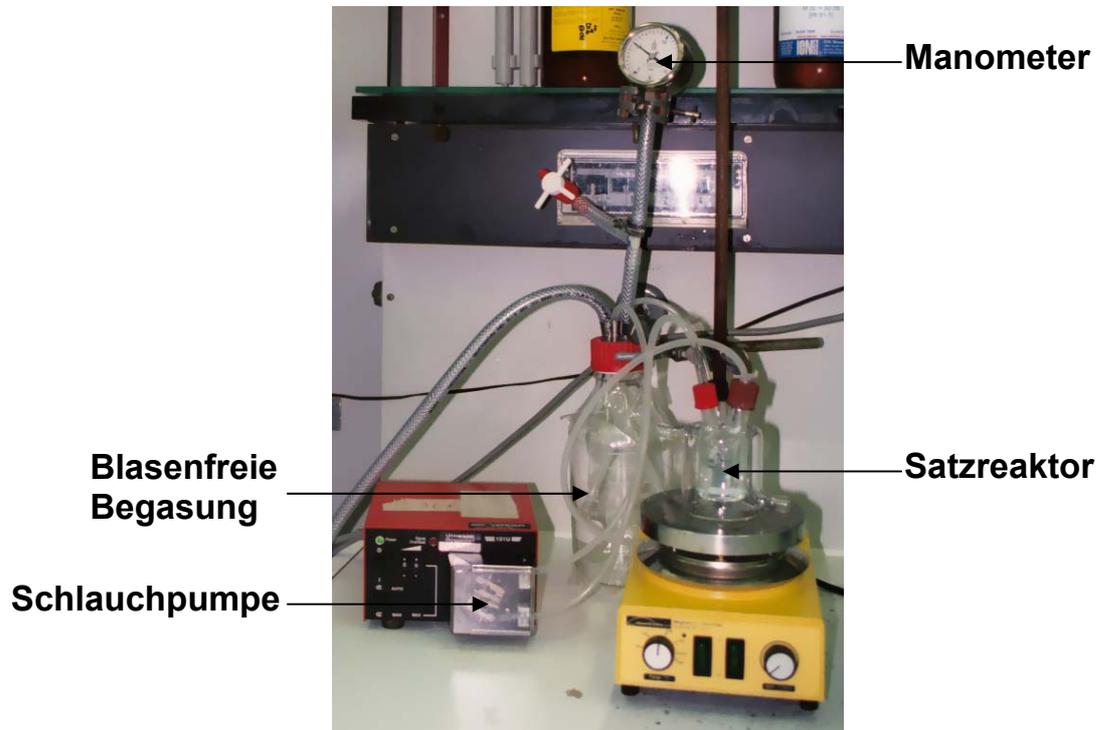


Abbildung 33: Photographie des Reaktors mit integrierter Schlauchbegasung.

C Ergebnisse und Diskussion

Die Löslichkeit von Sauerstoff in flüssigem H₂O nimmt mit sinkenden Temperaturen immer mehr zu (Maximum bei 0 °C und 14,16 mg O₂/ml H₂O); bei zu niedrigen Temperaturen verläuft allerdings die Derivatisierung von UDP-Gal zu langsam und es kommt zu verstärkter Bildung des Nebenprodukts Uridin 5'-diphospho- α -D-galacturonsäure (UDP-GalA) (Bülter 1999). Bülter führte die Reaktion bei 15°C durch, um einen Kompromiss aus einer brauchbaren Reaktionsgeschwindigkeit und Sauerstofflöslichkeit (9,76 mg O₂/ml H₂O) zu finden (Bülter 1999; Bülter *et al.* 2001). Allerdings betrug die Reaktionsdauer bis zum maximalen Umsatz von 82% 56 h. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch bei RT noch eine genügend hohe Sauerstoffsättigung (8,25 mg O₂/ml H₂O) vorliegt, um eine Enzymdeaktivierung zu vermeiden. So konnte mit 83% Syntheseausbeute der von Bülter erreichte Wert bereits in 24 h erzielt werden, ohne dass mehr Enzym verwendet werden musste. Messungen zur Enzymstabilität bei 15°C und RT erbrachten keine Unterschiede (Kapitel E 1.1). So zeigte das Enzym über einen Zeitraum von 48 h jeweils keinerlei Aktivitätsverlust.

Abbildung 34 zeigt die Zeit-Umsatzkurve der Biotinylierungsreaktion von UDP-Gal.

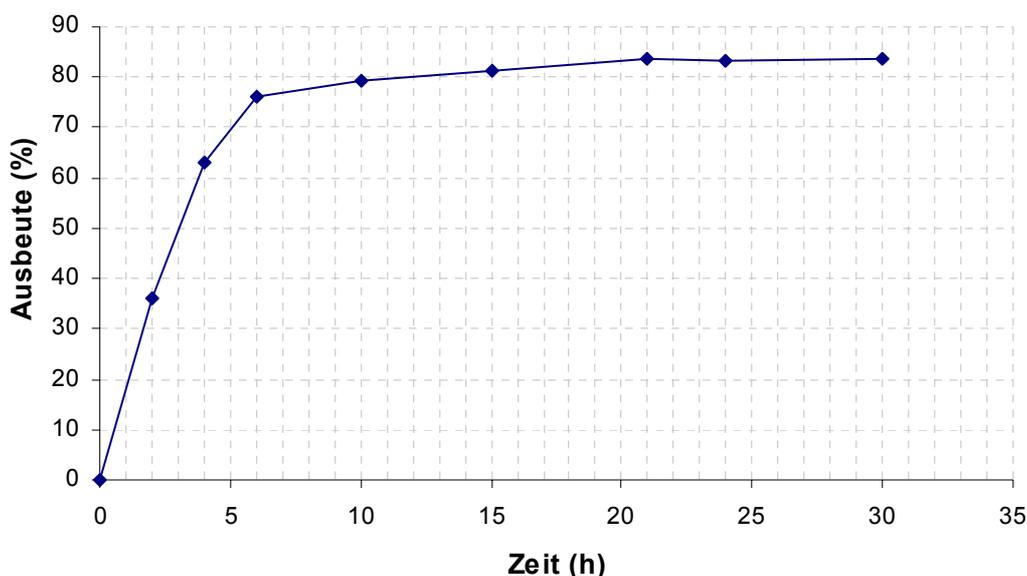


Abbildung 34: Zeit-Umsatz-Kurve der präparativen Synthese von UDP-6-biotinhydrazone-Gal.

Bedingungen: 8 mM UDP-Gal; 12 mM BACH; 25 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,0; 0,5 mM CuSO₄; 3 U/ml Galactose Oxidase; Reaktionsvolumen: 50 ml; Reaktionsdauer: 30 h.

UDP-6-biotinhydrazone-Gal wurde im Weiteren quantitativ bei -20°C durch NaCNBH₃ zu UDP-6-biotinyl-Gal reduziert. Sowohl die Synthese von UDP-6-biotinhydrazone-Gal als auch die Reduktionsreaktion wurden über HPLC verfolgt (Kapitel F 2.3).

C Ergebnisse und Diskussion

2.2 Isolierung von UDP-6-biotinyl-Gal

Die Isolierung von UDP-6-biotinyl-Gal geriet zu einem der Kernprobleme der Arbeit. Dies ist überraschend, da Bülter bereits eine effiziente Aufreinigungsstrategie beschrieb (Bülter 1999; Bülter *et al.* 2001). Hierbei wurde UDP-6-biotinyl-Gal mittels präparativer HPLC und anschließender Entsalzung per Gelfiltration aufgereinigt. Die Entsalzung war notwendig, da die mobile Phase bei der präparativen HPLC 0,1 M Kaliumacetat enthielt. Schon während der eigenen Diplomarbeit waren bei der präparativen Synthese von UDP-Gal bei den Gelfiltrations-Läufen keine so guten Trennleistungen wie bei der von Bülter beschriebenen Synthese erzielt worden. Daher waren, wie auch in Kapitel E 2.1 erwähnt, dort Synthese und Anionenaustauscherchromatographie nicht in Puffer, sondern in H₂O durchgeführt worden. Hierdurch wurde die Salzfracht minimiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Isolierung von UDP-6-biotinyl-Gal trotzdem zunächst auf die von Bülter beschriebene Methode zurückgegriffen. Diese führte allerdings erst nach zwei Gelfiltrationsläufen zum gewünschten Grad der Entsalzung, was zu deutlichen Ausbeuteverlusten führte. Die nachfolgende Tabelle 5 macht dies deutlich.

Tabelle 5: Verlauf der Isolierung von UDP-6-biotinyl-Gal nach Bülter. (Bülter *et al.* 2001).

	Menge (mmol)	Reinheit laut HPLC (%)	Ausbeute (%)
Synthese	0,33	75	83
HPLC	0,2	97	51
1. Gelfiltration	0,14	97	37
2. Gelfiltration	0,09	97	24
Lyophilisation	0,09	97	24
			88 mg

Bülter gelangte ohne einen zweiten Gelfiltrationslauf zu einer Gesamtausbeute nach Aufreinigung von 35%, während hier nur 24% Ausbeute erreicht wurden. Gründe für die schlechtere Trennleistung der Gelfiltration können in der Güte der Packung der Säule liegen, allerdings wurde sie mehrfach neu gepackt, die hierbei bestimmte Anzahl der theoretischen Böden lag mit 11.000 in einer guten Größenordnung und hätte für eine Entsalzung ausreichen

C Ergebnisse und Diskussion

sollen.

Die Beseitigung der Salze stellte jedoch nicht das Hauptproblem der Isolierung von UDP-6-biotinyl-Gal dar. Dies wurde bei Kontroll-Transferexperimenten deutlich, die mit dem entsalzten UDP-6-biotinyl-Gal auf das Neo-Glykoprotein BSA-GlcNAc unternommen wurden. Die vorher erzielten Ergebnisse zum selektiven Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal sollten nachvollzogen werden (Bülter *et al.* 2001, s. a. Kapitel A 5.3.2). Im Gegensatz zu den Erwartungen wurde eine unselektive Markierung beobachtet. Sowohl bei An- als auch Abwesenheit der Transferase bei Labelling-Experimenten wurde in Western-Blot- und auch ELSA-Analytik ein Markierungs-Ergebnis erhalten. Creatinase ist als Kontrollprotein für Transferexperimente gut geeignet, da dieses Enzym keinerlei Glykosylierung trägt. Wie Abbildung 35 zeigt, ergab sich auch hier ein Signal der unselektiven Markierung, obwohl ein Transfer auf ein Glykan gar nicht möglich war.

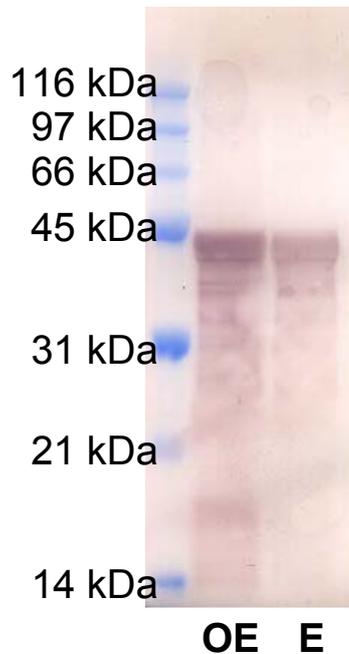


Abbildung 35: Ausschnitt eines Western Blots zum Biotin-Nachweis bei Transfer auf das unglykosylierte Protein Creatinase.

Jede Untereinheit des Creatinase-Dimers besitzt ein Molekulargewicht von 45 kDa, die Probe OE enthält Creatinase und UDP-6-biotinyl-Gal, E zusätzlich die humane Galactosyl-Transferase β 4Gal-T1.

Das für die Synthese von UDP-6-biotinyl-Gal eingesetzte Biotinylierungsreagenz BACH könnte über seine Hydrazidfunktionalität mit Carboxyl-Seitenketten von Proteinen kovalente

C Ergebnisse und Diskussion

Bindungen eingehen. Zudem könnte der stark hydrophobe Charakter des Moleküls (wegen des im Molekül vorhandenen Alkyl-Spacers) zur unspezifischen Bindung an Proteine führen. Aus diesen Gründen wurde ein Western Blot analog zum in Abbildung 35 gezeigten angefertigt. Die Proben waren Transferansätze, erneut mit und ohne Transferase, doch wurde jetzt der biotinylierte Nukleotidzucker durch das Biotinylierungsreagenz BACH ersetzt. Das Ergebnis glich dem in Abbildung 35 gezeigten, erneut ergaben sich in beiden Ansätzen Signale des Biotin-Nachweises. Damit war bewiesen, dass eine Verunreinigung von UDP-6-biotinyl-Gal mit BACH zu unselektiver Markierung von Proteinen führen musste. Es galt nun noch nachzuweisen, dass UDP-6-biotinyl-Gal auch nach der Aufreinigung noch mit BACH kontaminiert war.

Hierzu wurde die Reaktion von 2,4,6-Trinitrobenzonsulfonsäure (Pikrylsulfonsäure oder TNBS) mit Hydraziden ausgenutzt (Abbildung 36) (Shmanai *et al.* 2001, für die Methodik s. Kapitel E 3.2.3). TNBS reagiert allgemein mit primären Aminen, kann aber auch für die Detektion von Hydraziden verwendet werden.

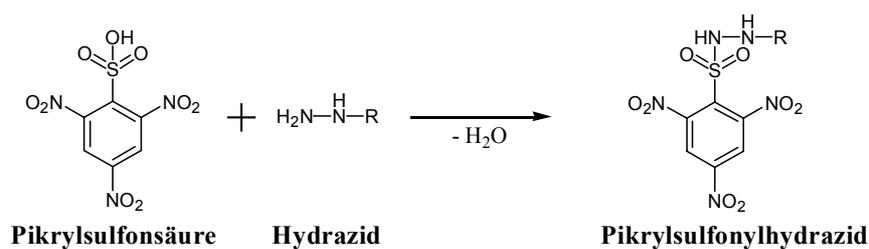


Abbildung 36: Reaktion von Pikrylsulfonsäure mit Hydraziden.

Enthält eine Probe ein Hydrazid, so erfolgt aufgrund der Bildung des Pikrylsulfonylhydrazids ein Farbumschlag der Lösung von gelb nach orange-rot (der Farbumschlag kann bei 340 nm quantitativ verfolgt werden, TNBS besitzt einen Extinktionskoeffizienten von $6,5 \cdot 10^2 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, im Rahmen dieser Arbeit kam es aber alleine auf den qualitativen Nachweis an). Es konnte mit dieser Methode gezeigt werden, dass UDP-6-biotinyl-Gal mit BACH verunreinigt war. Darüberhinaus konnte das Hydrazid auch in noch vorhandenem, noch von Bülter aufgereinigtem UDP-6-biotinyl-GalNac nachgewiesen werden. Da letzteres nach der identischen Methodik wie UDP-6-biotinyl-Gal aufgereinigt wurde, müssen Zweifel an der Sauberkeit des von Bülter aufgereinigten und in der eigenen Diplomarbeit für die Transferexperimente genutzten UDP-6-biotinyl-Gal angemeldet werden. Hiergegen spricht allerdings deutlich die Selektivität der Transferergebnisse, so dass diese Fragestellung im

C Ergebnisse und Diskussion

nachhinein nicht eindeutig geklärt werden kann. Es stand fest, dass die von Bülter etablierte Isolierungsmethodik im Fall der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Synthese von UDP-6-biotinyl-Gal nicht zum Erfolg führen konnte. BACH konnte mit einem Molekulargewicht von 371,5 g/mol nicht als eine Substanz betrachtet werden, die bei der Entsalzung eines Nukleotidzuckers über Gelfiltration quantitativ zu entfernen war. Dies wurde durch die Tatsache, dass UDP-6-biotinyl-Gal auch nach mehrmaliger Gelfiltration noch mit BACH kontaminiert war, belegt. Eine neue Aufreinigungsstrategie musste entwickelt werden, durch die idealerweise folgendes erreicht werden sollte:

1. Trennung von UDP-6-biotinyl-Gal und BACH
2. Vermeidung von zu hoher Salzfracht bei der Aufreinigung, um keine Ausbeuteverluste durch mehrfache Gelfiltration zu erleiden. Im besten Fall sollte auf den Gelfiltrationsschritt verzichtet werden.

Bei Bülter wurde UDP-6-biotinyl-Gal zunächst über HPLC isoliert, die Gelfiltration diente nur noch der Entsalzung. Hieraus folgt, dass die Trennung des UDP-6-biotinyl-Gal von BACH, die offensichtlich durch die von Bülter gewählte HPLC-Methode nicht gewährleistet war, auf anderem Weg erfolgen musste. Eine Änderung der mobilen Phase bei Beibehaltung der HPLC-Säule (*reversed phase* (RP) C₁₈) führte hier zum Erfolg. Grundlage der Trennung auf dieser Art von HPLC-Säulen sind Unterschiede der Hydrophobizität. Die von Bülter benutzte Ionenpaar-RP-Methode erlaubte zusätzlich eine Trennung aufgrund von Ladungen, dies war aber im Fall der hier zu trennenden Substanzen nicht relevant. Als neue mobile Phase wurde ein Gemisch aus 1% Methanol und 99% H₂O (pH 7,0) gewählt. Die Isolierung erfolgte nun also mit einer RP-Methode alleine auf der Grundlage von Hydrophobizitätsunterschieden. So konnte ein deutlicher Laufunterschied zwischen UDP-6-biotinyl-Gal und dem Eduktzucker UDP-Gal erzeugt werden. Über die Pikrylsulfonsäure-Reaktion konnte nachgewiesen werden, dass BACH nicht zum selben Zeitpunkt wie UDP-6-biotinyl-Gal eluiert wurde. Die für die Synthese eingesetzten Puffer- und Cofaktorsalze (Phosphatpuffer und CuSO₄) konnten bei der hier eingesetzten mobilen Phase nicht an die Säule binden. Da die mobile Phase selbst ja darüber hinaus keine Puffersalze enthielt, war eine Entsalzung des biotinylierten Nukleotidzuckers nach HPLC obsolet geworden.

Sichergestellt werden musste noch, dass die mobile Phase auf einen neutralen pH-Wert (pH = 7,0) eingestellt wurde, da das Gemisch aus Methanol und Wasser einen pH-Wert von pH = 4,5 besaß und eine Aufreinigung hierin zum Zerfall des biotinylierten Zuckers führte. Ein HPLC-Chromatogramm für die Trennung von UDP-Gal und UDP-6-biotinyl-Gal ist in Kapitel H 2 gezeigt.

C Ergebnisse und Diskussion

In der folgenden Tabelle 6 sind die Daten für die eben vorgestellte Aufreinigungsmethode zusammengefasst:

Tabelle 6: Bilanz der neu etablierten Isolierung von UDP-6-biotinyl-Gal.

	Menge (mmol)	Reinheit laut HPLC (%)	Ausbeute (%)
Synthese	0,33	75	83
HPLC	0,132	99	40
Lyophilisation	0,132	99	40
			146 mg

Mit 40% Gesamtausbeute oder 146 mg konnte nicht wesentlich mehr als Bülters 128 mg isoliert werden, obwohl ein Isolierungsschritt weniger vorlag. Ein Grund hierfür mag darin liegen, dass für die erfolgreichen Arbeiten zur Isolierung von UDP-6-biotinyl-Gal keine präparative HPLC mehr zur Verfügung stand. Es musste auf die vorhandene analytische und im Grunde für präparative Trennungen gar nicht ausgelegte HPLC zurückgegriffen werden.

Um die Sauberkeit und Identität von UDP-6-biotinyl-Gal abzusichern, wurde ein MS-Spektrum (ESI-MS, Thermo Finnigan) der Substanz vermessen. Eine Verunreinigung mit BACH hätte im Spektrum zu Tage treten müssen, da durch ein vorher gemessenes MS-Spektrum sichergestellt wurde, dass BACH in einem ESI-MS-Spektrum sichtbar ist. Das MS-Spektrum (Kapitel H 4) dokumentiert die hohe Sauberkeit des nach der neu etablierten Methodik isolierten UDP-6-biotinyl-Gal. Der Molekülpeak von $m/z = 918,3$ stimmt mit der kalkulierten Masse von $m/z = 918,23 [M+H]^+$ überein.

Zusammenfassend ist für diesen Teil der Arbeit festzustellen, dass eine neue, einfache und durchaus effiziente Aufreinigungsmethode für UDP-6-biotinyl-Gal entwickelt wurde. Es war nun Aufgabe, die Eignung des so isolierten Zuckers für selektive Transferreaktionen aufzuzeigen.

3 Aufreinigung verschiedener Konstrukte der humanen β 4Gal-T1

Es stellte sich die Frage, ob verschiedene Galactosyltransferasen in der Lage sind, UDP-6-biotinyl-Gal zu übertragen. Sollte dies der Fall sein, war es interessant zu untersuchen, ob die Fähigkeit zum Transfer des biotinylierten Substrats eine Abhängigkeit vom eingesetzten Akzeptorsubstrat zeigte. Deshalb war es wünschenswert, mehrere Galactosyltransferasen zur Verfügung zu haben. Für jede verwendete Akzeptorstruktur des selektiven Transfers eines modifizierten Nukleotidzuckers könnte man so ein "passendes Enzym" zur Hand haben. Als Akzeptorstruktur sollte jeweils β -GlcNAc fungieren, und zwar sowohl in freier Form, als Glykosid oder als Bestandteil einer Glykanstruktur. In der Arbeitsgruppe Elling lagen drei verschiedene Konstrukte der rekombinanten humanen β 4Gal-T1 vor. Die Unterschiede dieser Konstrukte sollen im Weiteren zunächst aufgezeigt und die Aufreinigung der Konstrukte beschrieben werden. Von einem der Konstrukte wurde zudem eine Mutante hergestellt, welche die Fähigkeit haben sollte, UDP-GalNAc und damit auch potentiell UDP-GalNAc-Biotin transferieren zu können. Es sollte also das Donorsubstratspektrum erweitert werden. Die eingesetzte Mutagenisierungsstrategie sowie die Aufreinigung der Mutante soll im Anschluss (Kapitel 4) erläutert werden.

3.1 Aufreinigung der freien humanen β 4Gal-T1

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Gal-T-Konstrukte beruhen auf einem neuartigen Ansatz zur Expression der humanen β 1-4-Galactosyltransferase in *E. coli* (Schumacher und Elling, unveröffentlicht). Es wurde zunächst ein Fusionsprotein geschaffen, welches aus der löslichen, humanen β 1-4-Galactosyltransferase und dem Pre-Pro-Peptid einer Lipase aus *Staphylococcus hyicus* besteht. Die Sequenz der löslichen, humanen β 1-4-Galactosyltransferase basiert auf der von Masri *et al.* (1988) klonierten humanen β 1-4-Galactosyltransferase (cDNA-Bank aus humanem Plazentagewebe; Vektor λ gt11). Das Gen wurde in Form des Plasmids pC20-T7 zur Verfügung gestellt (Arbeitsgruppe Ernst, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) und von Dr. M. Klein (Arbeitsgruppe Prod. Freudl, Institut für Biotechnologie I, Forschungszentrum Jülich) folgendermaßen umkloniert: Aus dem Plasmid pC20-T7 wurde das *StyI/EcoRI* Fragment herausgeschnitten (ca. 1300 Basenpaare; humane β 1-4-Galactosyltransferase ohne die ersten 32 N-terminalen Aminosäuren (Schnitt im Signalanker)), mit Klenow-Polymerase aufgefüllt, isoliert und in puC18**SmaI* ligiert

C Ergebnisse und Diskussion

(bluntend-Ligation, Schnittstelle *StyI* bleibt erhalten). Daraus resultierte das Plasmid pGalTΔ38. Aus pGalTΔ38 wurde im folgenden Schritt ein *StyI/HindIII* Fragment herausgeschnitten, die *StyI*-Schnittstelle mit *T4*-DNA-Polymerase für eine bluntend-Ligation vorbereitet und in pl183K23**SnaBI/HindIII* ligiert. Das daraus resultierende Plasmid pLGalTΔ38 (Vektorkarte siehe Anhang) wurde in der Arbeitsgruppe Elling zur periplasmatischen Expression des Fusionsproteins in *E. coli* JM109 eingesetzt (Schumacher 1999). Abbildung 37 zeigt die Aminosäuresequenz des Proteins. Hierbei nimmt das Pre-Propeptid 245 und der Anteil der β4Gal-T1 368 Aminosäuren ein, das theoretische Molekulargewicht der gesamten Sequenz beträgt 67,66 kDa. Die Expression stand unter der Kontrolle eines *lac z*-Promotors. Dadurch war eine Induktion mit Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG; künstlicher Induktor) möglich. Die höchsten spezifischen Aktivitäten wurden von Schumacher bei Verwendung von 0,2 mM IPTG erreicht.

1	MKETKHQHTF	SIRKSAYGAA	SVMVASCIFV	IGGGVAEAND	STTQTTPPLE	VAQTSQQETH	60
61	THQTPVTSIH	TATPEHVDDS	KEATPLPEKA	ESPKTEVTVQ	PSSHTQEVPA	LHKKTQQQA	120
121	YKDKTVPEST	IASKSVESNK	ATENEMSPVE	HHASNVEKRE	DRLETNETTP	PSVDREFSHK	180
181	IINNTHVNPK	TDQGTNVNVD	TKTIDTVSPK	DDRIDTAQPK	QVDVPKENTT	AQNKFTSQAS	240
241	DKKPYLGVTL	VYYLAGRDLS	RLPQLVGVST	PLQGGNSNSAA	AIGQSSGELR	TGGARPPPPL	300
301	GASSQPRPGG	DSSPVVDSGP	GPASNLTSVP	VPHTTALSLP	ACEESPLLV	GPMLIEFNMP	360
361	VDLELVAKQN	PNVKMGGRYA	PRDCVSPHKV	AIIIPFRNRQ	EHLKYWLYYL	HPVLQRQQLD	420
421	YGIYGIYVIN	QAGDTIFNRA	KLLNVGFQEA	LKDYDYTEFV	FSDVDLIPMN	DHNAYRCFSQ	480
481	PRHISVAMDK	FGFSLPYVQY	FGGVSALSQK	QFLTINGFPN	NYWGWGGEDD	DIFNRLVFRG	540
541	MSISRPNAVV	GRCRMRHSR	DKKNEPNPQR	FDRIAHTKET	MLSDGLNSLT	YQVLDVQRYP	600
601	LYTQITVDIG	TPS					

Signalpeptid (*S. hyicus*), 38 Aminosäuren

Propeptid (*S. hyicus*), 207 Aminosäuren

Signal-Anker der humanen β4Gal-T1, 10 Aminosäuren

Stamm-Region („stem-region“) der humanen β4Gal-T1-Galactosyltransferase,

34 Aminosäuren

lösliche Form der humanen β1-4-Galactosyltransferase, 324 Aminosäuren

C-C: Disulfidbrücke der humanen β1-4-Galactosyltransferase

Abbildung 37: Aminosäuresequenz des aus dem Plasmid pLGalTΔ38 exprimierten Fusionsproteins des Pre-Propeptids aus *S. hyicus* und der löslichen Form der humanen β4Gal-T1.

C Ergebnisse und Diskussion

Die Aufreinigung der rekombinanten humanen β 4Gal-T1 erfolgte über Anionenaustauscherchromatographie und Immobilisierte Metallionen Chromatographie (IMAC mit Zn^{2+}) (Schumacher 1999). Hierbei befand sich das Zielprotein bei der Anionenaustauscherchromatographie im Durchlauf und wurde so von den an das Chromatographiematerial bindenden Proteinen getrennt. Bei der IMAC-Chromatographie band die β 4Gal-T1 aufgrund der Häufigkeit von Histidin im Propeptid-Teil an das Material, hier erfolgte eine Stufenelution mit Imidazol. Es zeigte sich, dass das Fusionsprotein, exprimiert durch das Plasmid pLGalT Δ 38, während der IMAC-Aufreinigung gespalten wurde. Die durch Immunoblotting ermittelten Größen für die Spaltstücke des Fusionsproteins deuteten auf eine Spaltung im Bereich der Fusionsstelle zwischen dem Prepropeptid der Lipase und der Galactosyltransferase hin (Schumacher 1999). Eine genaue Aminosäuresequenz der Spaltstelle ist bislang nicht bekannt. Eine von Schumacher durchgeführte Sequenzierung schlug fehl, da die Spaltprodukte keine einheitliche Größe aufwiesen. Da die Spaltung während der Chromatographie auftrat, muss sie durch das Metallion der IMAC, also hier Zn^{2+} , katalysiert sein. In der Literatur ist das Phänomen der Spaltung von Fusionsproteinen durch Metallionen ebenfalls beschrieben worden. So wurde eine FLAG-Fusion an den Fab-Teil eines Antikörpers durch Cu^{2+} -Ionen in alkalischem Milieu gezielt gespalten (Humphreys *et al.* 1999). In diesem Paper wurde die Aminosäuresequenz DKTH als Spaltstelle beschrieben. Da beim vorliegenden Fusionsprotein im vermuteten Spaltstellenbereich das Aminosäure-Paar DK vorkommt (Position 241 und 242 der Aminosäuresequenz des Fusionsproteins, Abbildung 37), postulierte Schumacher hier die mögliche Trennungsstelle von Pre-Propeptid und löslicher β 4Gal-T1 während der IMAC-Chromatographie. Das nach Spaltung erhaltene Protein soll im Weiteren als "freie β 4Gal-T1" bezeichnet werden. Folgt man der Postulation der Spaltstelle, so umfasst das Protein also die gesamte lösliche Form der humanen β 4Gal-T1, die Stammregion sowie 10 Aminosäuren des Signalankers.

Ausgehend von Schumacher angelegten Dauerkulturen sollte im Rahmen dieser Arbeit das aus dem Plasmid pLGalT Δ 38 exprimierte Protein aufgereinigt werden. Hierbei wurde auf etablierte Kultivierungs- und Aufreinigungsmethoden zurückgegriffen (Schumacher 1999). Die Anzucht erfolgte in 5-l-Schüttelkolben. Die Aufreinigung der rekombinanten humanen β 4Gal-T1 erfolgte, wie bereits erwähnt, über Anionenaustauscherchromatographie und IMAC-Chromatographie. Der zweite Schritt wurde im Rahmen dieser Arbeit leicht variiert. Statt des bis dahin benutzten Zn^{2+} -IDA-Materials (IDA, eng.: Iminodiacetic Acid (Schumacher

C Ergebnisse und Diskussion

1999)) kam Zn^{2+} -NTA zum Einsatz. Letzteres gewährleistet eine stärkere Bindung des Metalls an das Material, so dass eine mögliche Ablösung des Metalls und Verunreinigung des Zielproteins vermieden werden konnte (Quiagen 2003). Die gebräuchlichere Beladung des NTA-Materials mit Ni^{2+} konnte nicht genutzt werden. Ni^{2+} wird durch die tertiären Amine des für die Aufreinigung genutzten HEPES-Puffers nach Angaben des Chromatographiematerial-Produzenten reduziert (Quiagen 2003). Der Hersteller gibt dabei keine Angabe über den pH-Wert an, bei dem die Reduktion stattfindet.

Folgendes spricht eindeutig dafür, dass es sich bei dem im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten Gal-T-Konstrukt um die freie $\beta 4Gal-T1$ handelte: Die Expression wurde wie bei Schumacher mit dem Plasmid pLGalT $\Delta 38$ durchgeführt. Für die Spaltung während der Chromatographie ist das Metallion und der pH-Wert entscheidend. Bei der bereits erwähnten Literatur zur Spaltung von Fusionsproteinen wurde die Spaltung durch Cu^{2+} -Ionen im alkalischen Milieu sogar in Lösung durchgeführt (Humphreys *et al.* 1999), d.h. die Rolle des Chromatographiematerials ist zweitrangig. Im Austausch des Chromatographiematerials der IMAC besteht aber der einzige Unterschied zwischen der in dieser Arbeit und der von Schumacher verwendeten Aufreinigungsmethode. Das im Rahmen dieser Arbeit erhaltene Spaltprodukt zeigte im Gegensatz zum Gesamtprotein wie jenes bei Schumacher ebenfalls die Eigenschaft, an SP-Sepharose binden zu können (s. Kapitel E 4.2.5), was eine Veränderung des pI-Wertes beweist. Das Fusionsprotein besitzt einen pI von 6,5, während die Spaltprodukte einen pI von ca. 8,7 aufweisen. Da schon Schumacher keine Sequenzdaten für das Spaltprodukt ermitteln konnte, konnte der letzte Beweis der Identität der Spaltprodukte auf genetischer Ebene von vornherein nicht erbracht werden. Die Spaltprodukte sollten ein ungefähres Molekulargewicht von 41 kDa besitzen.

Die folgende Tabelle 7 zeigt die Bilanz der Aufreinigung der freien $\beta 4Gal-T1$, die Aktivitätsbestimmung erfolgte mit HPLC-Analytik sowie Photometer-Test (Kapitel E 1.2.1 und E 1.2.2). Die in der Tabelle angegebenen Aktivitätswerte beziehen sich auf den Transfer von UDP-Gal auf GlcNAc $\beta 1$ -Bn, den beim Photometertest genutzten Akzeptor.

C Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 7: Bilanz der Aufreinigung der freien β 4Gal-T1 (aus 3,5 g Biofeuchtmasse).

	V [ml]	Gesamt- Aktivität [mU]	Protein- menge [mg]	Spezifische Aktivität [mU/mg]	Auf- reinigungs- faktor [-]	Ausbeute [%]
Rohextrakt	14	5287	198,8	27	1	100
Anionenaustauscher (Q-Sepharose)	80	4600	28,0	163	6	87
IMAC/Zn^{2+}-NTA	20	2622	5,6	468	17	50

In seiner Diplomarbeit hatte Schumacher keine vollständige Aufreinigungstabelle aufgestellt, daher kann hier keine vergleichende Diskussion stattfinden. Werte für Rohextrakt und Anionenaustauscher-Pool liegen jedoch in ähnlicher Größenordnung (Schumacher 1999).

3.2 Aufreinigung der luminalen humanen β 4Gal-T1

Das zweite im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung stehende Konstrukt basiert auf einer Modifizierung des Plasmids pLGalT Δ 38. Das Gen wurde von Schumacher in ein anderes Vektorsystem (pET-22b, Novagen) umkloniert, um eine Expression unter der Kontrolle eines T7-Promotors zu erreichen. Bei der Umklonierung mittels PCR wurde die komplette Pre-Pro-Sequenz des Fusionsproteins sowie die 10 Aminosäuren des Signalankers der β 4Gal-T1 und eine Aminosäure der Stammregion entfernt. Gleichzeitig wurde das Gen mit den Schnittstellen *NdeI* und *XhoI* versehen. Es entstand das Plasmid lumGalT. Die Expression erfolgte analog zum Fusionsprotein periplasmatisch (Signalpeptid pelB), allerdings nun in *E.coli* BL21(DE3). Das so entstandene Konstrukt soll im Weiteren "luminale Gal-T" genannt werden, da die Sequenz für den auf der Seite des Lumen befindlichen Teils der Leloir-Glykosyltransferase Gal-T kodiert (Abbildung 38). Bei der Umklonierung kam es auch zu einer ungewollten Einführung einer Mutation N214D.

C Ergebnisse und Diskussion

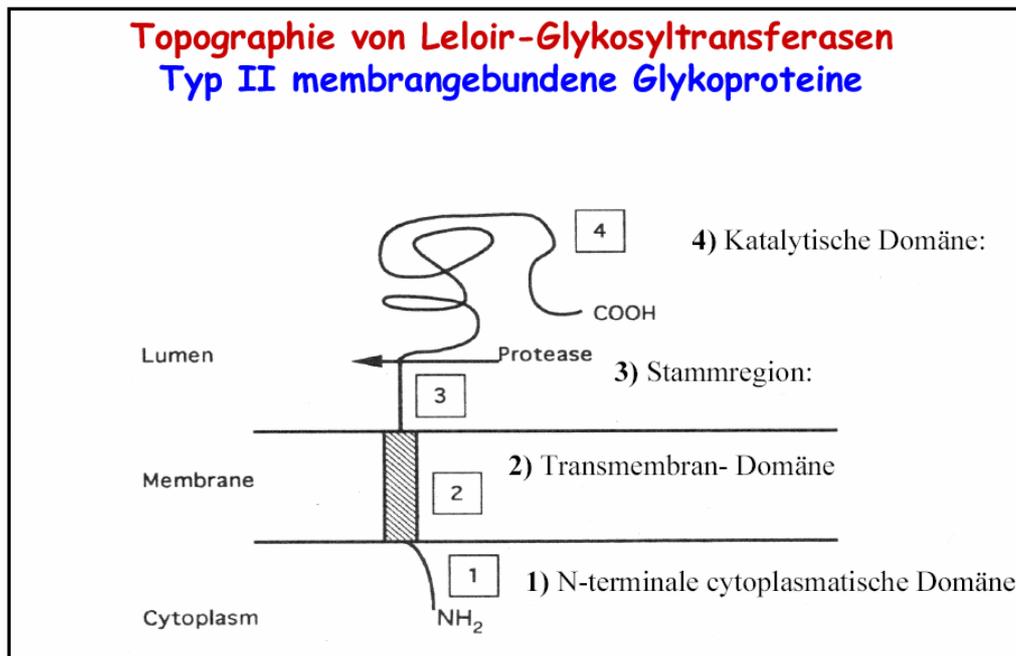


Abbildung 38: Topographie von Leloir-Glykosyltransferasen.

Die Aminosäuresequenz der luminalen β 4Gal-T1 (s. Abb. 39 in Kapitel C 3.3) umfasst 357 Aminosäuren. Das theoretische Molekulargewicht beträgt 39,63 kDa, der pI liegt bei 8,71. Aufgrund dieses hohen isoelektrischen Punktes bot sich für eine Chromatographie eine Aufreinigung an SP-Sepharose an. Das zugehörige LC-Chromatogramm ist in Kapitel H 3 zu sehen. Die Anzucht erfolgte in 5-l-Schüttelkolben.

Die folgende Tabelle 8 zeigt die Bilanz der Aufreinigung der luminalen β 4Gal-T1, die Aktivitätsbestimmung erfolgte mit HPLC-Analytik sowie Photometer-Test (Kapitel E 1.2.1 und E 1.2.2). Die in der Tabelle angegebenen Aktivitätswerte beziehen sich auf den Transfer von UDP-Gal auf GlcNAc β 1-Bn, den beim Photometer-test genutzten Akzeptor.

C Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 8: Bilanz der Aufreinigung der luminalen β 4Gal-T1 (aus 6,2 g Biofeuchtmasse).

	V [ml]	Gesamt- Aktivität [mU]	Protein- menge [mg]	Spezifische Aktivität [mU/mg]	Auf- reinigungs- faktor [-]	Ausbeute [%]
Rohextrakt	14	2300	172,9	13,3	1	100
Kationenaustauscher (SP-Sepharose)	50	1919	19,0	101	7,6	83

Es konnten 2 U luminaler β 4Gal-T1 isoliert werden. Die Reinheit des Enzyms erwies sich als ausreichend für die Charakterisierung des Enzyms. Damit wurde eine einfache und effiziente Methode zur Aufreinigung der luminalen β 4Gal-T1 etabliert.

3.3 Aufreinigung der humanen His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1

Um für das dritte vorliegende Konstrukt eine cytoplasmatische Expression in *E. coli* BL21(DE3) zu erreichen, wurde das Gen des Fusionsproteins ausgehend vom Plasmid pLGalT Δ 38 in ein anderes Vektorsystem umkloniert (Schumacher, Namdjou und Elling, Manuskript in Vorbereitung). Dazu wurde ein pET-Vektor (pET-16b, Novagen, Schwalbach) ausgewählt. Das ursprüngliche Fusionsprotein hatte folgenden Aufbau: Pre-Propeptid-Lipase-Galactosyltransferase. Das Prepeptid war eine Signalsequenz für die periplasmatische Sekretion in *E. coli*. Bei der Umklonierung des Gens durch PCR wurde die Presequenz des Fusionsproteins entfernt und ein N-terminaler His₆-Tag angefügt. Gleichzeitig wurde das Gen des Fusionsproteins mit den Schnittstellen *Nco*I und *Xho*I versehen. Es entstand der Vektor proGalTH16b. Der His₆-Tag sollte der besseren Aufreinigung des Proteins und zum Nachweis durch Immunoblotting dienen. Dabei bestand der His₆-Tag-Propeptid-Anteil der Aminosäuresequenz aus 215, der Anteil an β 4Gal-T1 aus 365 Aminosäuren. Das theoretische Molekulargewicht der gesamten Sequenz betrug 64,18 kDa. Um die für das Plasmid pLGalT Δ 38 beschriebene Spaltung zwischen Lipase und Transferase zu vermeiden, wurde das Genkonstrukt weiter verändert (Schumacher, Namdjou und Elling, Manuskript in Vorbereitung). Für die neue Konstruktion wurden über PCR sämtliche

C Ergebnisse und Diskussion

Aminosäuren des Signalankers sowie alle bis auf die letzten beiden vor der Sequenz der löslichen β 4Gal-T1 liegenden Aminosäuren der Stammregion entfernt. Zudem wurden 5 Aminosäuren des Propeptids, beginnend an dem von Schumacher für die Spaltstelle postulierten Aminosäurepaar DK, per PCR entfernt. Die so entstandenen beiden Bestandteile des neuen Fusionsproteins wurden über eine *MunI*-Schnittstelle fusioniert. Dabei bestand der His₆-TagPropeptid-Anteil der Aminosäuresequenz aus 210, der Anteil an β 4Gal-T1 aus 325 Aminosäuren. Das theoretische Molekulargewicht betrug nun 59,4 kDa. Das das neue Genkonstrukt enthaltende Plasmid pTS05 ist im Anhang dargestellt. Das aus diesem Konstrukt exprimierte Enzym wurde His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 benannt. Ein Alignment der Aminosäuresequenzen der in den Plasmiden pLGalT Δ 38, lumGalT und pTS05 enthaltenden Genkonstrukte ist in Abbildung 39 dargestellt.

C Ergebnisse und Diskussion

PLGalTd38	1	MKETKHQHTFSIRKSAYGAASVMVASCIFVIGGGVAEANDSTTQTTTTPLEVAQTSQQETH
lumGalT	1	-----
pTS05	1	-----MGHHHHHHNDSSTTQTTTTPLEVAQTSQQETH
PLGalTd38	61	THQTPVTSLHTATPEHVDDSKAATPLPEKAESPKTEVTVPSSHTQEVPAHKKKTQQQPA
lumGalT	1	-----
pTS05	31	THQTPVTSLHTATPEHVDDSKAATPLPEKAESPKTEVTVPSSHTQEVPAHKKKTQQQPA
PLGalTd38	121	YKDKTVPESTIASKSVESNKATENEMSPVEHHSNVEKREDRLETNETTTPPSVDREFSHK
lumGalT	1	-----
pTS05	91	YKDKTVPESTIASKSVESNKATENEMSPVEHHSNVEKREDRLETNETTTPPSVDREFSHK
PLGalTd38	181	IINNTHVNPKTDGQTNVNDTKTIDTVSPKDDRIDTAQPKQVDVPKENTTAQNKFTSQAS
lumGalT	1	-----
pTS05	151	IINNTHVNPKTDGQTNVNDTKTIDTVSPKDDRIDTAQPKQVDVPKENTTAQNKFTSQAS
PLGalTd38	241	DKKPYLGVTLVYYLAGRDLSRLPQLVGVSTPLQGGNSNSAAAIGQSSGELRTGGARPPPLG
lumGalT	1	-----RDLSRLPQLVGVSTPLQGGNSNSAAAIGQSSGELRTGGARPPPLG
pTS05	211	-----ELRTGGARPPPLG *****
PLGalTd38	301	ASSQPRPGDSSPVVDSGPGPASNLTSVPVPHHTALSPLACPEESPLLVGPMLEFNMPV
lumGalT	45	ASSQPRPGDSSPVVDSGPGPASNLTSVPVPHHTALSPLACPEESPLLVGPMLEFNMPV
pTS05	224	ASSQPRPGDSSPVVDSGPGPASNLTSVPVPHHTALSPLACPEESPLLVGPMLEFNMPV *****
PLGalTd38	361	DLELVAKQNPVVKMGGRYAPRDCVSPHKVAIIIPFRNRQEHLKYWLYLHPVLQRQQLDY
lumGalT	105	DLELVAKQNPVVKMGGRYAPRDCVSPHKVAIIIPFRNRQEHLKYWLYLHPVLQRQQLDY
pTS05	284	DLELVAKQNPVVKMGGRYAPRDCVSPHKVAIIIPFRNRQEHLKYWLYLHPVLQRQQLDY *****
PLGalTd38	421	GIYGIYVINQAGDTIFNRAKLLNVGFQEALKDYDYTCFVFSFVDLIPMNDHNAYRCFSQP
lumGalT	165	GIYGIYVINQAGDTIFNRAKLLNVGFQEALKDYDYTCFVFSFVDLIPMNDHNAYRCFSQP
pTS05	344	GIYGIYVINQAGDTIFNRAKLLNVGFQEALKDYDYTCFVFSFVDLIPMNDHNAYRCFSQP *****
PLGalTd38	471	RHISVAMDKFGFSLPYVQYFGGVSALSQKQFLTINGFPNNYWGWGEGEDDDIFNRLVFRGM
lumGalT	215	RHISVAMDKFGFSLPYVQYFGGVSALSQKQFLTINGFPNNYWGWGEGEDDDIFNRLVFRGM
pTS05	404	RHISVAMDKFGFSLPYVQYFGGVSALSQKQFLTINGFPNNYWGWGEGEDDDIFNRLVFRGM *****
PLGalTd38	531	SISRPNNAVVGRCRMIRHSRDKKNEPNPQRFDRIAHTKETMLSDGLNSLTYQYLDVQRYPL
lumGalT	275	SISRPNNAVVGRCRMIRHSRDKKNEPNPQRFDRIAHTKETMLSDGLNSLTYQYLDVQRYPL
pTS05	464	SISRPNNAVVGRCRMIRHSRDKKNEPNPQRFDRIAHTKETMLSDGLNSLTYQYLDVQRYPL *****
PLGalTd38	591	YTQITVDIGTPS
lumGalT	335	YTQITVDIGTPS
pTS05	524	YTQITVDIGTPS *****

Abbildung 39: Aminosäuresequenz-Alignment der aus den Plasmiden pLGalTΔ38, lumGalT und pTS05 exprimierten humanen β4Gal-T1 (die Übereinstimmung aller drei Sequenzen wird durch einen Stern gekennzeichnet).

His₆-tag

Signalpeptid (*S. hyicus*)

Propeptid (*S. hyicus*)

10 Aminosäuren des Signal-Ankers der humanen β1-4-Galactosyltransferase

Stammregion der humanen β1-4-Galactosyltransferase

Lösliche Form der β1-4-Galactosyltransferase

C Ergebnisse und Diskussion

Die Expression der His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1 geschah im Rahmen dieser Arbeit aus einer Dauerkultur in *E. coli* BL21DE3 (Kapitel E 4.3.2). Die Anzucht erfolgte im 5-l-Maßstab in Schüttelkolben. Zur Aufreinigung im größeren Maßstab (11,5 g Zellen) wurde eine IMAC an Ni²⁺-NTA-Material durchgeführt. Das zugehörige LC-Chromatogramm ist in Kapitel H 3 zu sehen. Gel und Western Blot zur Kontrolle der Aufreinigung wurden parallel zu jenen für die Mutagenese der humanen β4Gal-T1 durchgeführt. Sie sind bei den Ergebnissen zur Mutagenese abgebildet (Kapitel C 4.4.1).

Die folgende Tabelle 9 zeigt die Bilanz der Aufreinigung, die Aktivitätsbestimmung erfolgte mit HPLC-Analytik sowie Photometer-Test (Kapitel E 1.2.1 und E 1.2.2). Die in der Tabelle angegebenen Aktivitätswerte beziehen sich auf den Transfer von UDP-Gal auf GlcNAcβ1-Bn, den beim Photometerstest verwendeten Akzeptor.

Tabelle 9: Bilanz der Aufreinigung des Fusionsproteins His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1
(aus 11,5 g Biofeuchtmasse).

	V (ml)	Gesamt- Aktivität [mU]	Protein- menge (mg)	Spezifische Aktivität (mU/mg)	Auf- reinigungs- faktor [-]	Ausbeute [%]
Rohextrakt	34	1466	676,6	2	1	100
IMAC an Ni²⁺- NTA	13	1070	3,0	358	179	73

Die Aufreinigungs-Bilanz zeichnet die IMAC an Ni²⁺-NTA als eine einfache und gute Methode der Aufreinigung des Fusionsproteins der humanen β4Gal-T1 aus. Die Ausbeute betrug 73%, es lag ein Aufreinigungsfaktor von 179 vor.

4 Mutagenisierung der humanen β 4Gal-T1

Für bovine β 4Gal-T1 ist bekannt, dass sie UDP-GalNAc nur noch mit 0,1% der Aktivität überträgt, die sie mit dem natürlichen Substrat UDP-Gal aufweist (Ramakrishnan und Qasba 2002). Eine Übertragung von UDP-6-biotinyl-GalNAc mit diesem Enzym erschien daher unrealistisch. Legt man die Homologie der Galactosyltransferasen (84,1% bezogen auf die Gesamtsequenz) zugrunde, war der Transfer auch mit den vorhandenen humanen Gal-T-Konstrukten unwahrscheinlich.

Warum aber toleriert die bovine β 4Gal-T1 bereits die Einführung der *N*-Acetylgruppe an der C2-Position des Donorzuckers nicht? Die Antwort wird durch die Kristallstruktur des bovinen Enzyms geliefert (Gastinel *et al.* 1999; Ramakrishnan *et al.* 2002; Ramakrishnan und Qasba 2002). Ramakrishnan und Qasba konnten auf der Grundlage der Kristallstrukturen ein Modelling von Donor- und Akzeptorsubstrat in das aktive Zentrum des Enzyms erreichen (Abbildungen 40, 41 und 42).

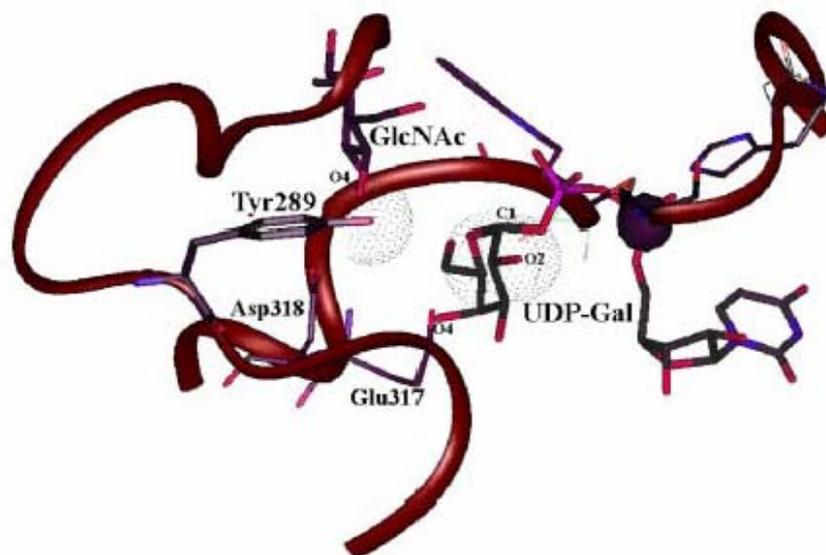


Abbildung 40: Modelling von UDP-Gal in das aktive Zentrum der bovinen β 4Gal-T1 (aus Ramakrishnan und Qasba 2002, zugrunde liegende Kristallstruktur: PDB-Nummer 100R).

C Ergebnisse und Diskussion

Das C1-Atom von UDP-Gal (Abbildung 40) liegt in einer günstigen sterischen Orientierung zum O4-Atom des GlcNAc mit einem Abstand von 4 Å. Dieser Abstand ist groß genug, um eine sterische Hinderung zu vermeiden. Der Abstand ist in der Abbildung durch die van-der-Waals-Sphären (symbolisiert durch gepunktete Kreise) deutlich gemacht. Es wird angenommen, dass sich die Galactose während des katalytischen Mechanismus zum Akzeptor hinbewegt, um die Disaccharidbindung zu tätigen.

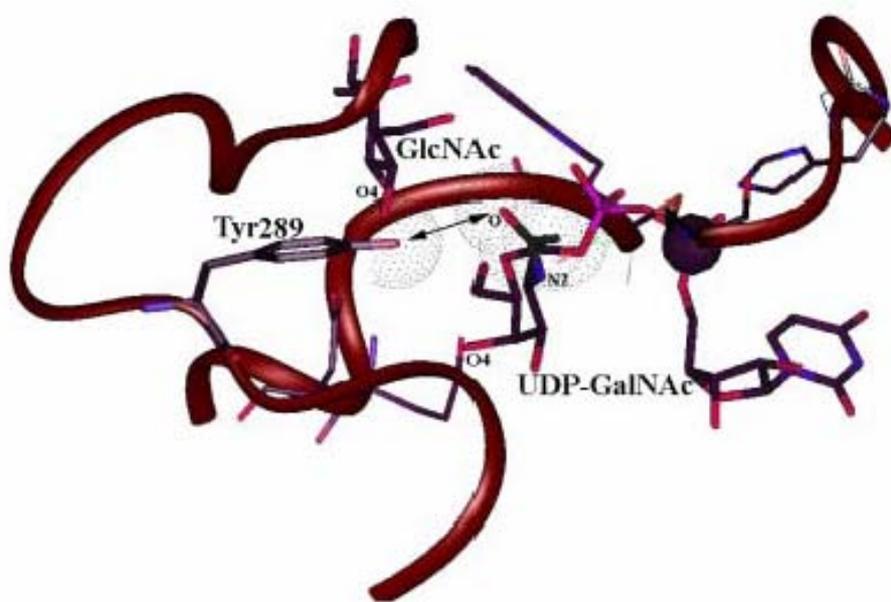


Abbildung 41: Modelling von UDP-GalNAc ins aktive Zentrum der bovinen β 4Gal-T1 (aus Ramakrishnan und Qasba 2002, zugrunde liegende Kristallstruktur: PDB-Nummer 10QM).

Das C1-Atom von UDP-GalNAc (Abbildung 41) liegt in der gleichen günstigen sterischen Orientierung zum O4-Atom des GlcNAc mit einem Abstand von 4 Å. Es kommt jedoch zur Ausbildung einer zusätzlichen Wasserstoffbrücke zwischen der Seitenketten-Hydroxyl-Gruppe von Tyr (Tyrosin) 289 und dem Carbonyl-O-Atom der *N*-Acetyl-Gruppe an der C2-Position von UDP-GalNAc. Dies wird durch den Doppelpfeil in Abbildung 41 angedeutet. Diese Wasserstoffbrücke verhindert die Wanderung des GalNAc zum Akzeptorsubstrat während des katalytischen Mechanismus. Es existiert zuwenig Platz zwischen der *N*-

C Ergebnisse und Diskussion

Acetylgruppe und der Aminosäureseitenkette, was durch die van der Waals-Sphären dargestellt ist. Es liegt also eine sterische Hinderung vor. Beim Donor UDP-Gal ist dieser Platz deutlich größer, da hier die Hydroxylgruppe an der C2-Position von der Aminosäure wegzeigt (Abbildung 40).

Durch eine gezielte Punktmutation konnten Ramakrishnan und Qasba Tyr 289 gegen eine deutlich kleinere Aminosäure austauschen (Ramakrishnan und Qasba 2002). Es wurden die drei Punktmutationen Tyr289Leu, Tyr289Ile und Tyr289Asn konstruiert, wobei die besten Ergebnisse mit Leucin erzielt wurden.

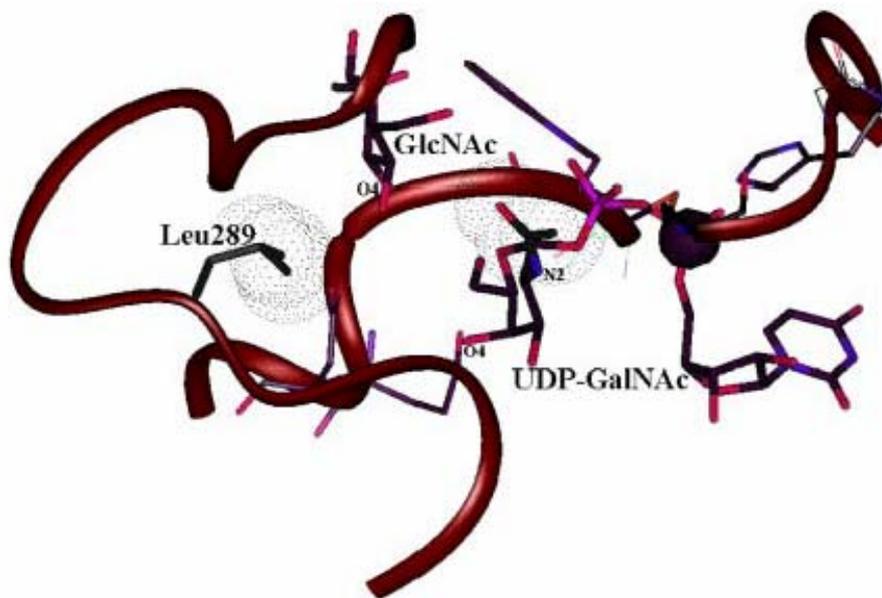


Abbildung 42: Modelling von UDP-GalNac ins aktive Zentrum der Mutante der bovinen β 4Gal-T1 (aus Ramakrishnan und Qasba 2002, zugrunde liegende Kristallstruktur: PDB-Nummer 10QM).

Durch den nun gewonnenen Raum im aktiven Zentrum sowie dem Wegfallen der Wasserstoffbrücke (Abbildung 42) zwischen Aminosäure und Zucker konnte man ein Enzym erhalten, was sowohl UDP-Gal als auch UDP-GalNac mit vergleichbarer Aktivität transferierte. Hierbei war die Aktivität der Mutante beim Transfer von UDP-Gal nicht geringer als beim Wildtyp-Enzym (Ramakrishnan und Qasba 2002).

C Ergebnisse und Diskussion

Die für das aktive Zentrum der bovinen und humanen β 4Gal-T1 kodierenden Basen zeichnen sich durch eine vollständige Übereinstimmung aus (Ramakrishnan und Qasba 2002).

So sind nicht nur die für die Donor-Bindung vorgesehenen Aminosäuren Asp 247, Tyr 284, Glu 312, Asp 313 konserviert, sondern auch die an der Akzeptorbindung beteiligten Aminosäuren 340-360 (Ramakrishnan *et al.* 2002, die Zählung der Aminosäuren geschieht jeweils nach der humanen Sequenz). Daher sollte nun die Chance ergriffen werden, die von Ramakrishnan und Qasba gezeigte, durch gezielte Mutagenisierung erreichte UDP-GalNAc-Transferase-Aktivität des bovinen Enzyms auch beim humanen Enzym zu etablieren.

Aufgrund des vergrößerten Raums im aktiven Zentrum sollte diese Mutante auch einen potentiell guten Katalysator für einen Transfer von UDP-6-biotinyl-GalNAc darstellen. Da das bovine Enzym nach Mutagenisierung die UDP-Gal-Transfer-Aktivität behielt, ließ der erhöhte Platz im aktiven Zentrum auch einen Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal durch die herzustellende Mutante des humanen Enzyms möglich erscheinen.

4.1 Strategie der Mutagenisierung

Da sich bei Ramakrishnan und Qasba der Ersatz von Tyrosin gegen Leucin am besten bewährte, sollte auch im Fall des humanen Enzyms ein Austausch gegen Leucin stattfinden.

Es handelte sich um die Aminosäure 284 der humanen Sequenz (Masri *et al.* 1988).

Abbildung 43 zeigt ein Alignment der bovinen und humanen β 4Gal-T1, die Sequenzen besitzen eine Homologie von 84,1%.

C Ergebnisse und Diskussion

```
Bov. 1 MKFREPLLGGSAAMPGASLQACRLLVAVCALHLGVTLVYYLAGRDLRRLPQLVGVHPPL
Hum. 1 MRLREPLLSG-AAMPGASLQACRLLVAVCALHLGVTLVYYLAGRDLRRLPQLVGVSTPL
* ***** * *****
Bov. 61 QGSSHGAAAIGQPSGELRLRGVAPPPPLQNSSKPRSRAPSNLDAYSHPGPGPGSGNLT
Hum. 60 QGGSNSAAAIGQSSGELRTGGARPPPLGASSQPRPGDSSPVVDS----GPGPASNLTS
** * ***** ***** * ***** ** ** * * *****
Bov. 121 APVPSTTTTRSLTACPEESPLLVGPMLEFNIIPVDLKLIEQQNPKVKLGGRYTPMDCISPH
Hum. 116 VPVPHTTALSPLACPEESPLLVGPMLEFNMPVDLELVAKQNPVKMGGRYAPRDCVSPH
*** ** ** ***** ***** * ***** ** ** ***** * * *****
Bov. 181 KVAIIILFRNRQEHLKYWLYYLHPILQRQQLDYGIYVINQAGESMFRNRAKLLNVGFKEAL
Hum. 176 KVAIIIPFRNRQEHLKYWLYYLHPVLRQQLDYGIYVINQAGDTIFNRAKLLNVGFQEAL
***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
Bov. 241 KDYDYNCFVFSDVDLIPMNDHNTYRCFSQPRHISVAMDKFGFSLPYVQYFGGVSALSQQ
Hum. 236 KDYDYTCFVFSDVDLIPMNDHNAYRCFSQPRHISVAMDKFGFSLPYVQYFGGVSALSQQ
***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
Bov. 301 FLSINGFPNNYWGGGEDDDIYNRLAFRGMSVSRPNAVIGKCRMIRHSRDKKNEPNPQRF
Hum. 296 FLTINGFPNNYWGGGEDDDIFNRLVFRGMSISRPNVAVGRCRMIRHSRDKKNEPNPQRF
** ***** ***** ***** * ***** ***** *****
Bov. 361 DRIAHTKETMLSDGLNSLTYMVLEVQRYPLYTKITVDIGTPS
Hum. 356 DRIAHTKETMLSDGLNSLTYQVLDVQRYPLYTQITVDIGTPS
***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
```

Aminosäuren des aktiven Zentrums, die an der Donorbindung beteiligt sind (beteiligt ist auch die zu mutierende Aminosäure)

Aminosäuren des aktiven Zentrums, die an der Akzeptorbindung beteiligt sind

Abbildung 43: Alignment der Sequenzen der bovinen und humanen β 4Gal-T1. Übereinstimmende Aminosäuren sind mit einem Stern gekennzeichnet, die zu mutierende Aminosäure (284 der humanen Sequenz) ist durch Fettdruck in rot hervorgehoben).

Für den gezielten Austausch der Aminosäure wurde die Strategie der sequenzspezifischen Mutagenisierung nach Higuchi *et al.* herangezogen (Higuchi *et al.* 1988). In dieser Arbeit ist eine allgemeingültige Methode zur Einführung von Punktmutationen beschrieben.

Sie wurde auch bereits erfolgreich zur Mutagenisierung der humanen β 4Gal-T1 genutzt, um deren Löslichkeit bei Expression in *E.coli* zu erhöhen (Malissard and Berger 2001).

Zur Mutagenese wurde das im Plasmid pTS05 vorhandene Gal-T-Konstrukt, also jenes der His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1, verwendet. Hierbei wurde der Gal-T-Anteil des Konstrukts zunächst mit *MunI* und *NcoI* herausgeschnitten und nur dieses Teil-Gen im Folgenden der Mutagenisierung unterzogen. Das Teil-Gen besaß eine Größe von 975 bp. Zur

Mutagenisierung mussten die Basenpaare 627-629 ausgetauscht werden. (Abbildung 44).

Dabei wurden zur Einführung der Mutation zunächst zwei Primer konstruiert, die die zu mutierende Sequenz komplementär überlappten und die Mutation trugen. In zwei PCR-Ansätzen – jeweils ein Mutagenese-Primer und der dazugehörige Endprimer des Gens – wurde das Gen zunächst partiell amplifiziert. Die Fragmente überlappten sich in der mutierten

C Ergebnisse und Diskussion

Sequenz. Somit konnte bei einer zweiten PCR mit den Endprimern und den beiden Teilstücken als Template das vollständige Gen mit Mutation vervielfacht werden (Abbildung 45).

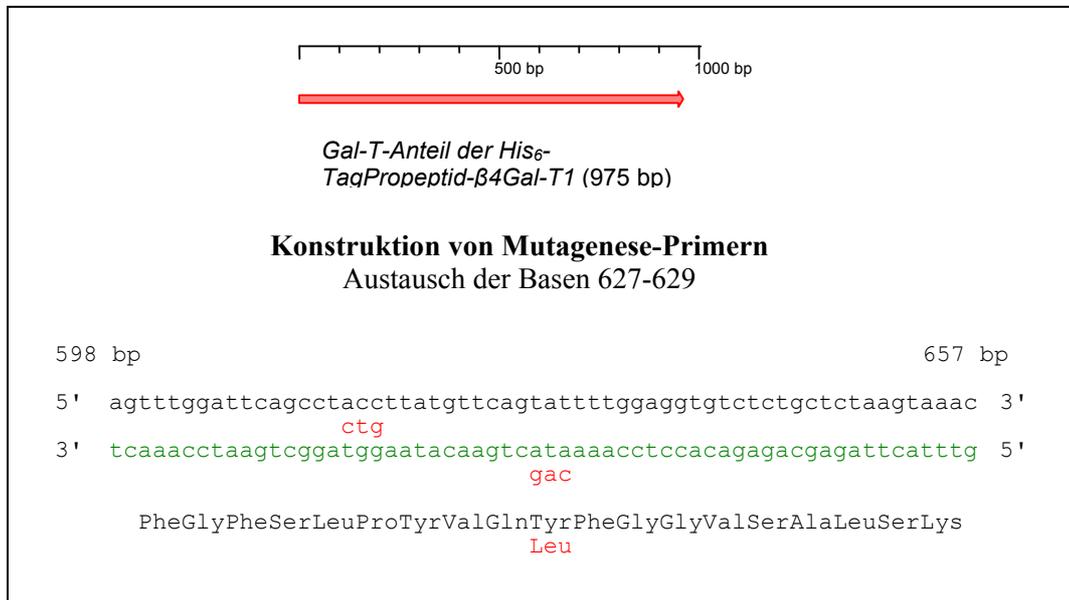


Abbildung 44: Mutation des Gal-T-Anteils der His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1.

Der Austausch von TAT gegen CTG hat den Austausch von Tyr gegen Leu auf Aminosäureebene zur Folge.

C Ergebnisse und Diskussion

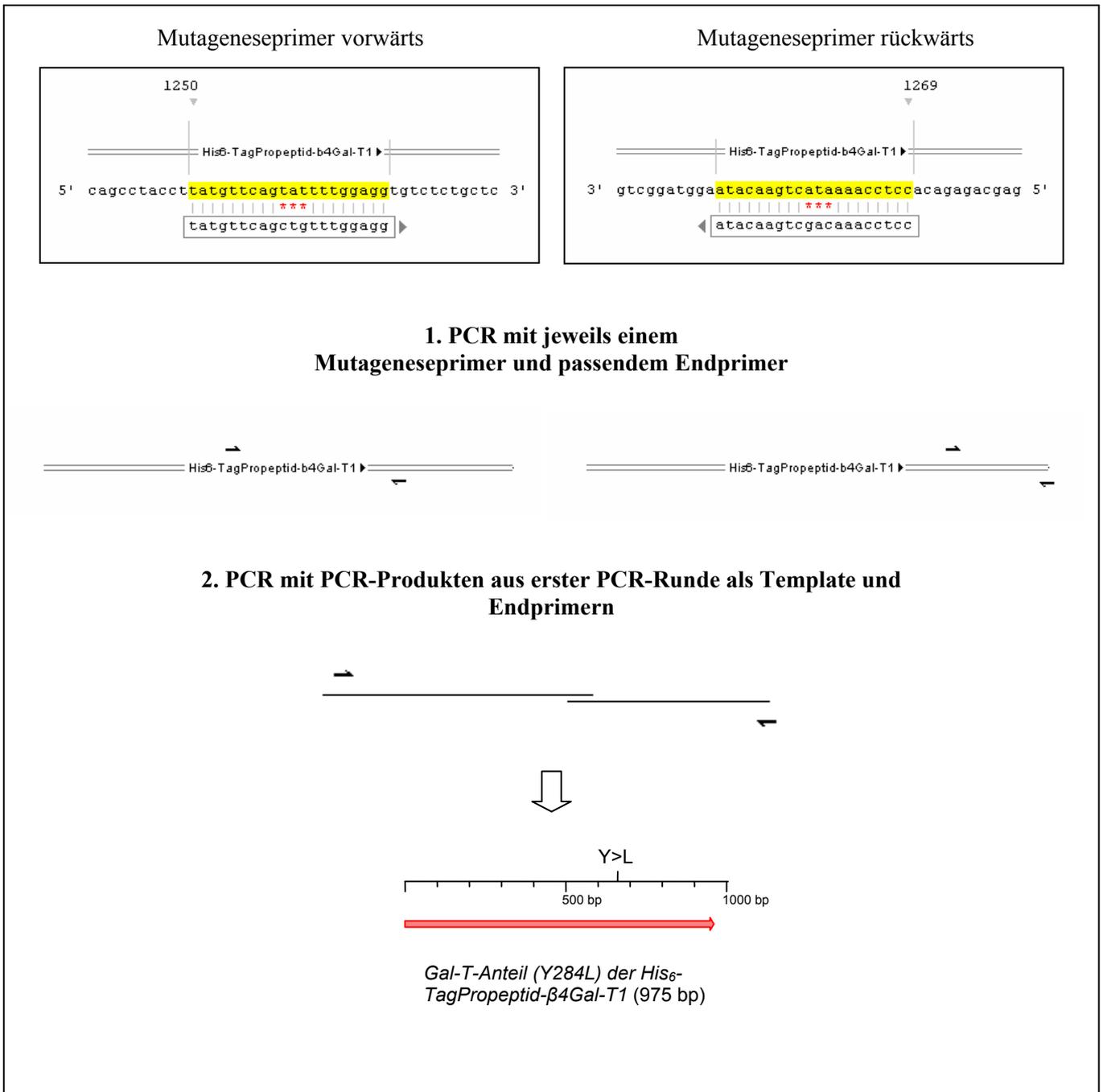


Abbildung 45: Sequenzspezifische PCR-Mutagenese zur Erzeugung der Mutante des Gal-T-Anteils der His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1.

C Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 46 zeigt ein Agarose-Gel mit den durch die erste PCR-Runde für die Mutagenisierung der humanen rekombinanten β 4Gal-T1 erhaltenen, die Mutation tragenden Gen-Fragmenten.

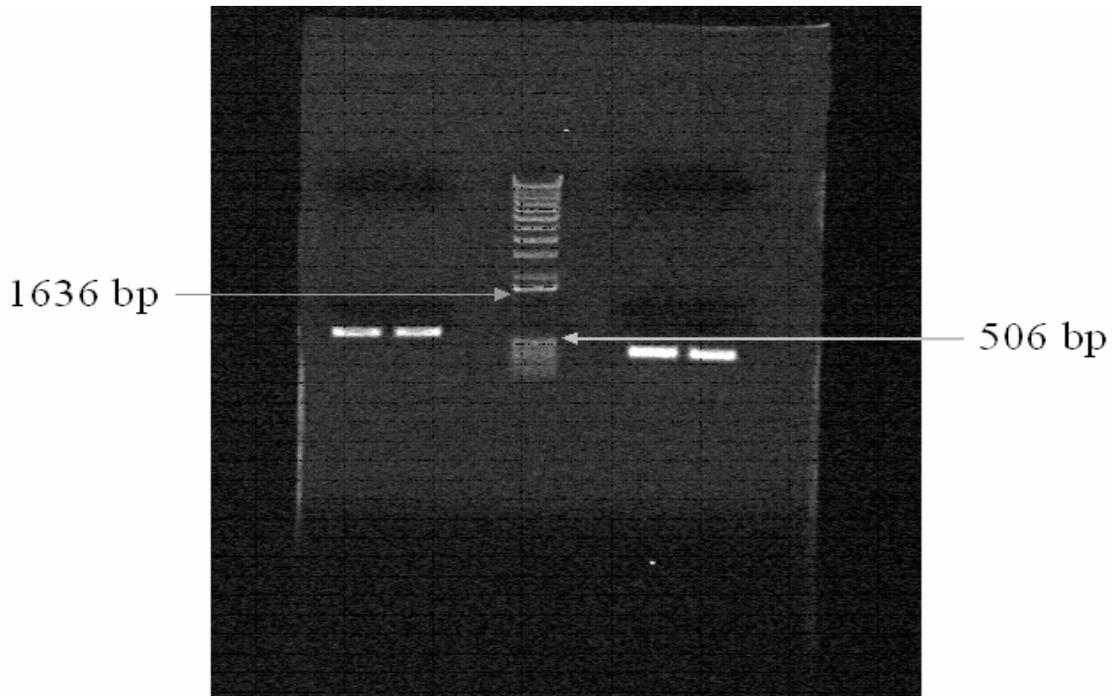


Abbildung 46: Agarose-Gel mit den beiden durch die erste PCR-Folge entstandenen Genfragmenten.

Die Länge der PCR-Produkte entsprach den theoretischen Überlegungen: ein 648 bp (Banden links vom in der Mitte des Gels befindlichen Molekulargewichts-Marker) und ein 371 bp langes Teilstück sollten entstehen (Banden rechts vom Marker).

Abbildung 47 zeigt in einem Agarose-Gel das aus den beiden Genfragmenten in der zweiten PCR-Runde zusammengesetzte, die Mutation tragende Gen. Es handelte sich um den mutagenisierten Gal-T-Anteil der His₆-Propeptid- β 4Gal-T1 (975 bp).

C Ergebnisse und Diskussion

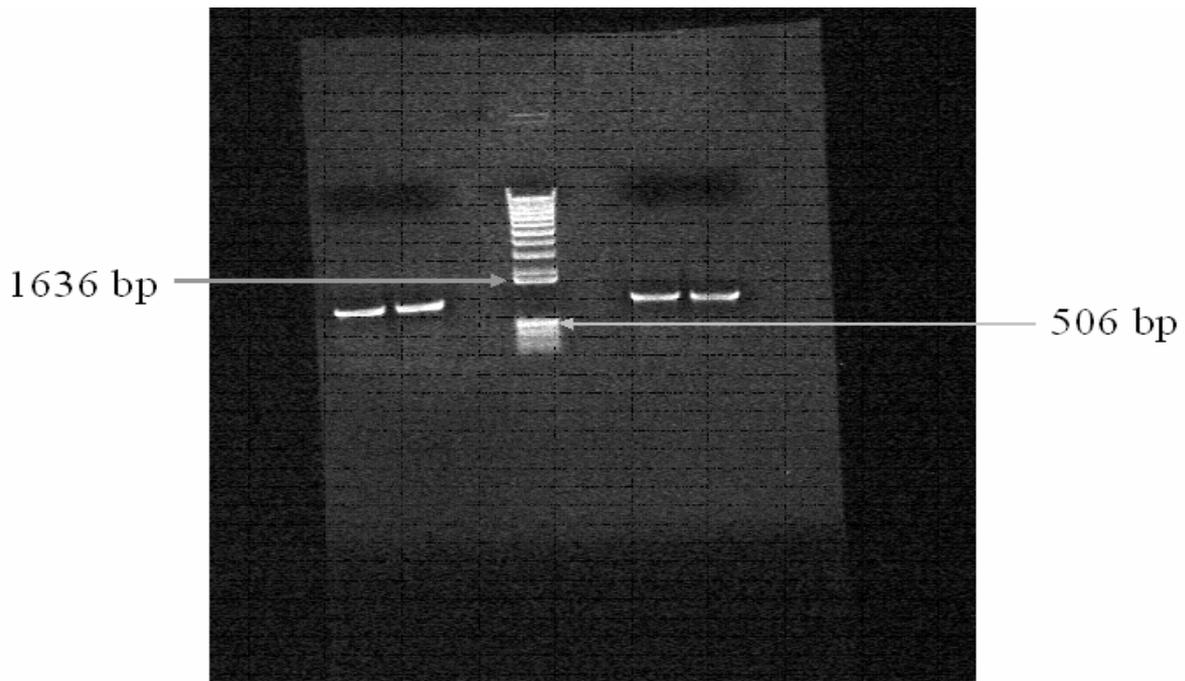


Abbildung 47: Agarose-Gel mit dem nach zweiter PCR-Folge entstandenen mutagenisierten Gesamt-Gen (Gal-T-Anteil der His₆-TagPropeptid-β4GalT-1). Das Gesamt-Gen besitzt eine Länge von 975 bp.

4.2 Ligation des mutagenisierten Gens in den Vektor pTS05

Der Vektor, der das mutagenisierte Gen aufnehmen sollte, war identisch mit dem schon in Kapitel C 3.3 beschriebenen Vektor pTS05. Hierin wurde das mutagenisierte Gen *MunI XhoI* ligiert. Der so entstandene Vektor wurde als pTS05mut bezeichnet (Vektorkarte im Anhang). Die Ligation wurde nach Wiederausschneiden des Gens aus dem Vektor und dessen Isolierung per PCR kontrolliert. Hierbei diente das mutagenisierte Gesamtgen als Templat für die beiden bei der Mutagenisierung verwendeten Endprimer. Nur ein Gen, das erfolgreich ligiert worden war, würde zum korrekten Anlagern der beiden Primer und somit zur Amplifikation führen. Das Agarose-Gel in Abbildung 48 zeigt, dass die Amplifikation erfolgreich war. Den Amplifikationsprodukten ist als Kontrolle das mutagenisierte Gen vor Ligation entgegengestellt.

C Ergebnisse und Diskussion

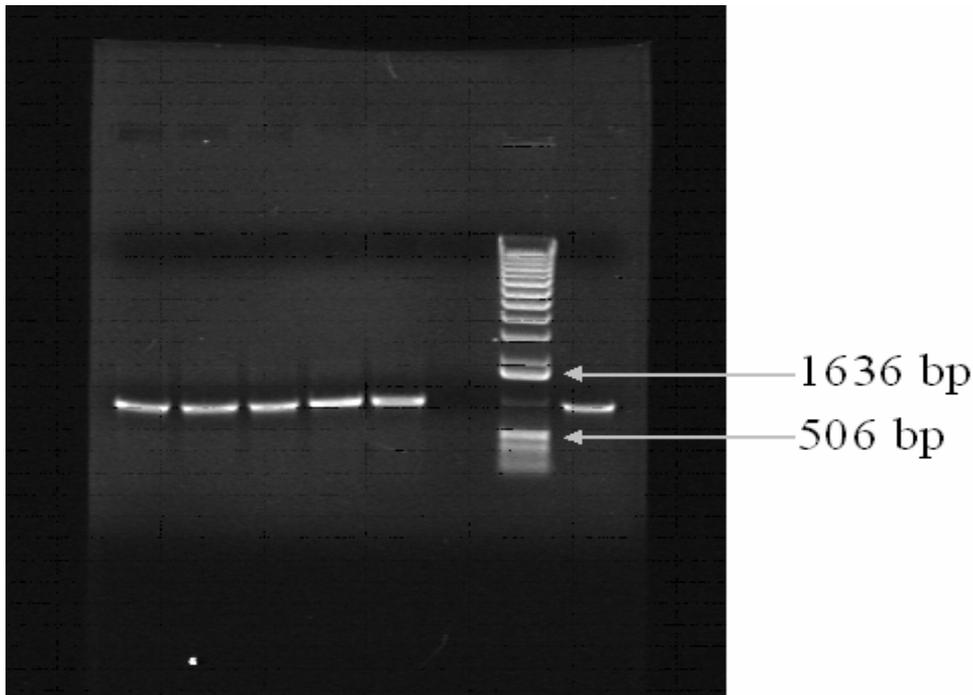


Abbildung 48: Agarosegel zur Kontrolle der Ligation mittels PCR.

Links: PCR-Produkte (Templat: Nach Ligation ausgeschnittenes mutagenisiertes Gen, Primer: Endprimer der PCR zur Mutagenisierung), rechts: das mutagenisierte Gen vor der Ligation (PCR-Produkte und Gen vor Ligation je 969 bp).

4.3 Transformation des Vektors pTS05mut in den Stamm Nova Blue

Nach erfolgreicher Ligation musste der Vektor pTS05mut im nächsten Schritt der Transformation unterzogen werden. Hierfür wurde der für Transformationen besonders gut geeignete Stamm Nova Blue (Novagen, Schwalbach) benutzt. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Platten mit Ampicillin-Selektion ausplattiert und von diesen Klone gepickt. Diese wurden einer Anzucht im 5 ml-Maßstab unterzogen, die DNA wurde isoliert. Hierauf erfolgte ein Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *XhoI*. Zur Kontrolle des Transformations-Erfolges wurde von der aufgereinigten DNA ein Agarose-Gel angefertigt, welches in Abbildung 49 gezeigt ist. Hierbei ist zu beachten, dass durch den Verdau mit *NcoI* nicht nur der Gal-T-Anteil des mutagenisierte Gens, sondern auch das Gen für das Propeptid aus dem Plasmid herausgeschnitten wurde. Daher besaß das herausgeschnittene Fragment eine Größe von 1607 bp.

C Ergebnisse und Diskussion

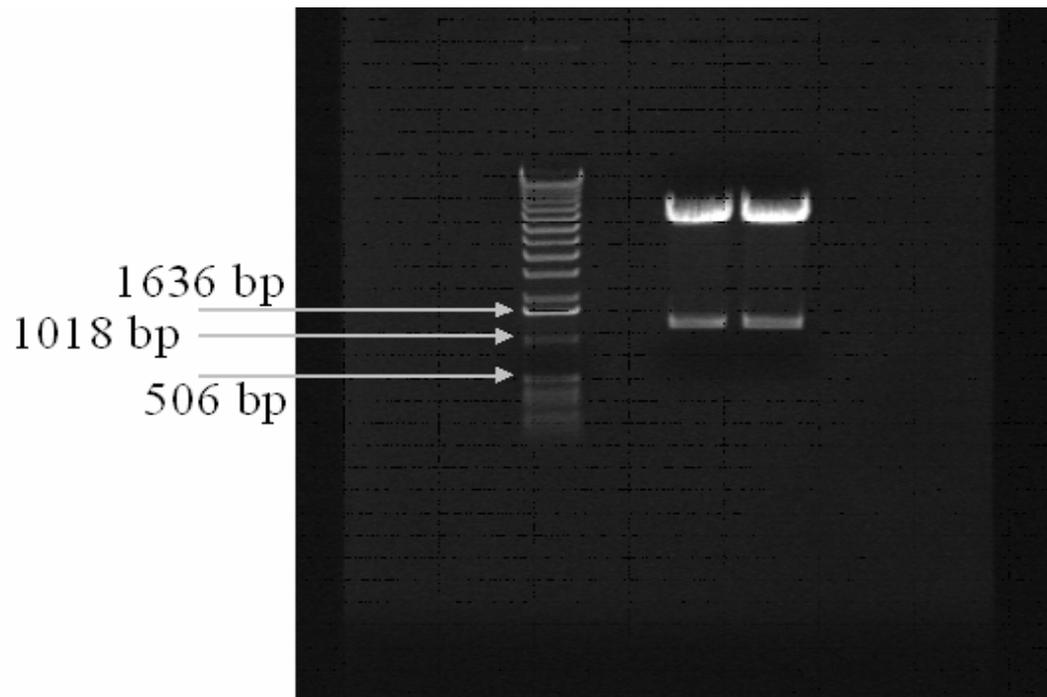


Abbildung 49: Agarosegel der isolierten und verdauten DNA nach Transformation.

Als Restriktionsendonukleasen wurden *XhoI* und *NcoI* verwendet, das aus dem Plasmid herausgeschnittene Genfragment besitzt eine Größe von 1607 bp, zusätzlich auf dem Gel sichtbar: der linearisierte Vektor.

Die aufgereinigte DNA zeigte im Agarosegel ein identisches Molekulargewicht wie das nach Mutagenese erhaltene Gesamt-Gen-Konstrukt. Dies bedeutete, dass die Transformation erfolgreich war.

Dies war aber auch gleichbedeutend damit, dass die Klonierung der Mutante der β 4Gal-T1 erfolgreich abgeschlossen wurde. Die Identität des Gens sowie die erfolgreiche Einführung der Mutation wurden durch eine DNA-Sequenzierung bestätigt.

Als nächstes musste nun das Augenmerk auf die Expression und Aufreinigung der Mutante gelegt werden. Bei Vorliegen von katalytischer Aktivität sollte sie schließlich charakterisiert werden.

C Ergebnisse und Diskussion

4.4 Expression und Aufreinigung der Mutante

Das das mutagenisierte Gen tragende Plasmid pTS05mut wurde zunächst in den Expressionsstamm *E. coli* DH5 α transformiert. Mit diesem Stamm wurde eine erste Schüttelkolben-Kultur zur Expression des Enzyms His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L) angezogen. Die Mutante besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 59,4 kDa. Da das Donor-Substrat für die Mutante, UDP-GalNAc, sehr teuer ist und nur wenige mg davon zur Verfügung standen, wurde zunächst die beste Aufreinigungsmethode gesucht. Mit Enzym aus einer optimierten Aufreinigung sollte dann dessen Charakterisierung betrieben werden. Bedingt durch den hohen Preis des Donors fanden bei den nun vorgestellten verschiedenen Experimenten mit verschiedenen Chromatographie-Materialien nur Aktivitätstests in geringer Zahl statt. Es wurde zumeist nur die die größte Proteinmenge beinhaltende Fraktion des Eluats getestet. Auf eine Aufnahme von Bilanzen der Aufreinigung in Form von Aufreinigungstabellen musste daher verzichtet werden. Die Güte der Aufreinigungen wurde an SDS-Gelen und Western Blots abgelesen.

4.4.1 Aufreinigung über IMAC an Ni²⁺-NTA im analytischen Maßstab

Der Rohextrakt der ersten Schüttelkolben-Kultur wurde zu einer ersten Aufreinigung, der IMAC im kleinen Maßstab an "Ni²⁺-NTA-Spin Columns" verwendet (Kapitel E 5.3.1). Das Ni²⁺-NTA-Material sollte eine schnelle und effiziente Aufreinigung ermöglichen. Die Aufreinigung wurde mit SDS-PAGE und Western Blot analysiert (Abbildung 50). Sie diente vor allem der Expressionskontrolle. Es sollte gezeigt werden, dass die Mutante in löslicher Form vorlag. Um für die Expressionskontrolle einen Vergleich zu gewährleisten, wurde die unter denselben Bedingungen angezogene und über "Ni²⁺-NTA-Spin Columns" gegebene His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 ebenfalls auf Gel und Blot aufgetragen.

C Ergebnisse und Diskussion

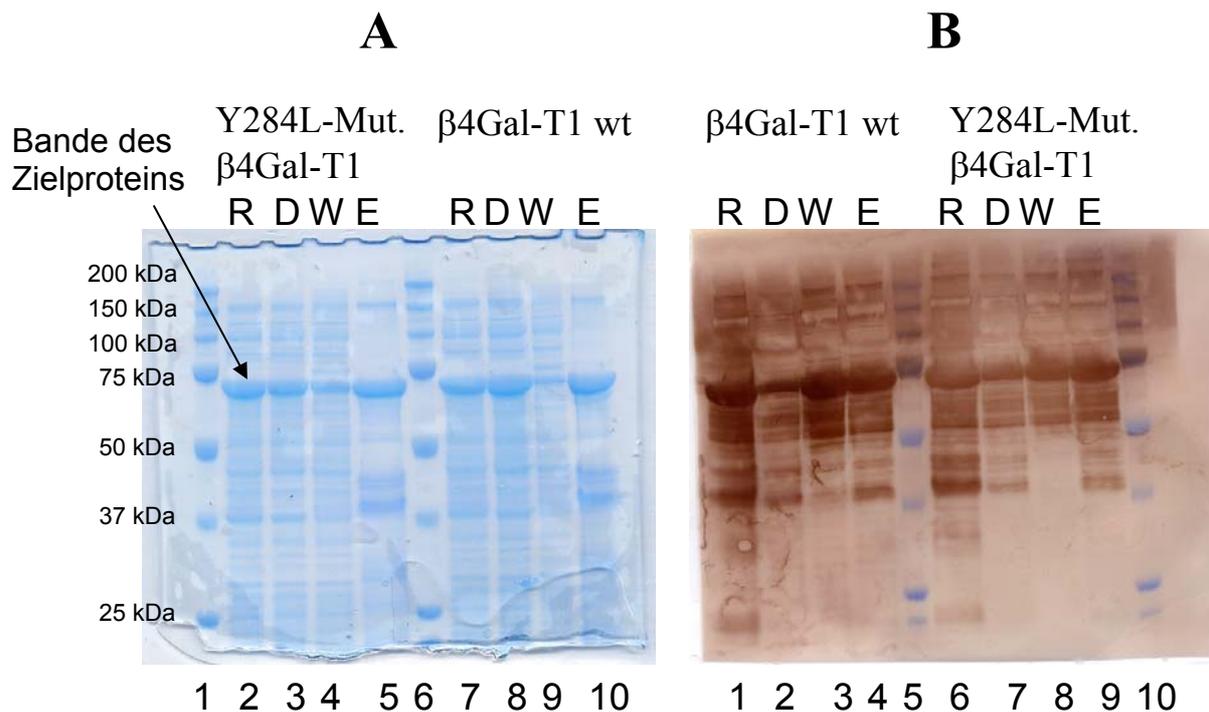


Abbildung 50: A : SDS-PAGE-Analyse Gel, B : Western Immunoblotting der IMAC der Mutante His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1(Y284L) sowie des Wildtyp-His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1-Proteins im analytischen Maßstab.

Belegung Gel: 1 Marker, *Mutante*: 2 Rohextrakt, 3 Durchlauf, 4 Waschlösung, 5 Elution, 6 Marker, *Wildtyp*: 7 Rohextrakt, 8 Durchlauf, 9 Waschlösung, 10 Elution
Belegung Blot: *Wildtyp*: 1 Rohextrakt, 2 Durchlauf, 3 Waschlösung, 4 Elution Spin-Column Wildtyp, 5 Marker, *Mutante*: 6 Rohextrakt, 7 Durchlauf, 8 Waschlösung, 9 Elution, 10 Marker.

Gel und Blot für Mutante und Wildtyp zeigten keine signifikanten Unterschiede. In beiden Fällen war eine deutliche Überexpression des Zielproteins (theoretisches Molekulargewicht jeweils 59 kDa) zu erkennen, beiden lagen als lösliche Proteine vor. Die Aufreinigung über die Spin Columns zeigte zwar, dass der größte Teil des Zielproteins jeweils im Eluat vorlag, jedoch trugen auch Durchlauf und Waschlösung eine große Menge an Zielprotein. Die Eluatfraktion war nicht sauber, die übrigen auch mit dem Anti-His₆-Antikörper auf dem Blot sichtbar gemachten Banden sind auf katalytisch inaktive, einen His₆-Tag tragende Translationsabbruchprodukte zurückzuführen. Zur Aufreinigung über Spin-Columns ist abschließend zu sagen, dass generell die Bindung des Proteins an das Ni²⁺-NTA-Material gegeben war, bei den Spin Columns aber eine Überladung vorlag. Eine chromatographische Aufreinigung in größerem Maßstab sollte daher eine sinnvolle Aufreinigungsmethode darstellen.

C Ergebnisse und Diskussion

4.4.2 Aufreinigung über IMAC an Ni²⁺-NTA

Die Aufreinigung durch IMAC an Ni²⁺-NTA-Material in größerem Maßstab brachte den gewünschten Erfolg (Abbildung 51). Es wurden hierbei 3,5 g Zellen benutzt. Der Verlauf der Aufreinigung zeigte sich im LC-Chromatogramm identisch zu dem des Wildtyp-Fusionsproteins (s. Kapitel H 3). Zwar konnte das Protein (das Molekulargewicht liegt zwar laut Marker jenseits von 81 kDa, doch ist die Marker-Bande sehr breit und lässt keine genaue Molekulargewichtsberechnung zu, es wurde der Kaleidoscope Marker (Biorad, München) verwendet) nicht zur Homogenität aufgereinigt werden, was aber aufgrund der natürlich weiterhin vorhandenen Translationsabbruchprodukte auch nicht erwartet worden war. Im Gel ist in den Eluat-Fractionen jedoch eine deutlich größere Reinheit als im Gel der Spin-Column-Aufreinigung zu erkennen. Zudem sind Durchlauf und Waschlösung fast frei vom Ziel-Protein. Die Aufreinigung führte zu einer Aufkonzentrierung des Mutanten-Proteins im Eluat.

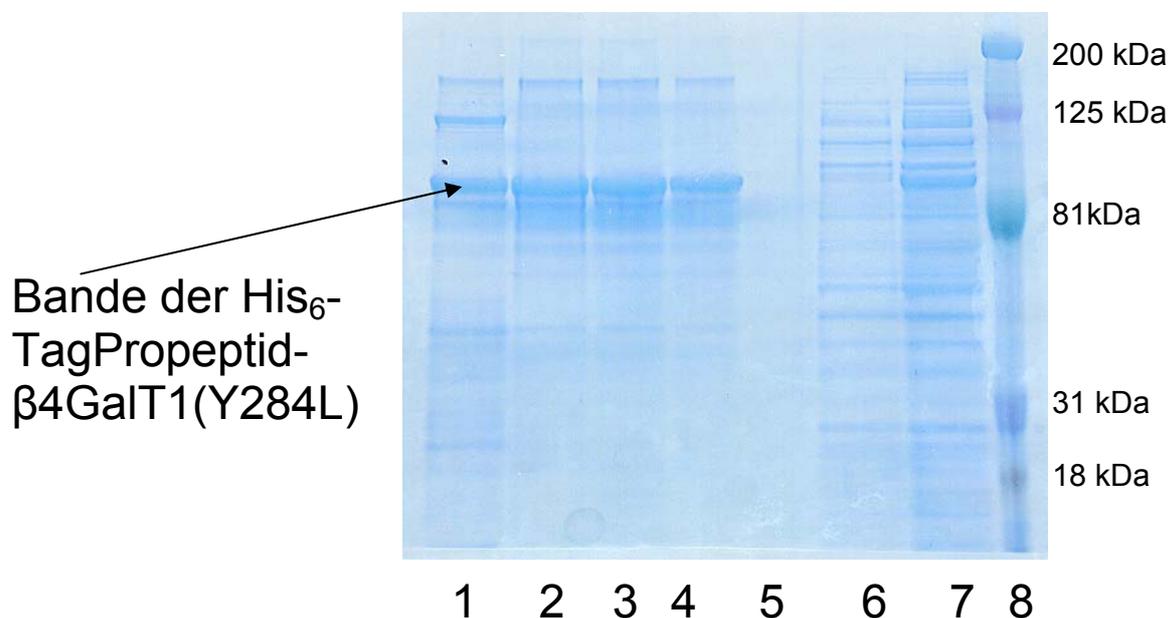


Abbildung 51: SDS-PAGE-Gel der Mutante His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1 nach IMAC an Ni²⁺-NTA im präparativen Maßstab.

Bei der Aufreinigung erfolgte eine Stufenelution mit 250 mM Imidazol. Die Belegung des Gels war wie folgt: Bahnen 1-4 : Eluat-Fractionen, Bahn 5 : Waschlösung, Bahn 6 : Durchlauf, Bahn 7 : Rohextrakt, Bahn 8 : Molekulargewichts-Marker.

C Ergebnisse und Diskussion

Um eine noch größere Reinheit des Mutanten-Proteins zu erzielen, wurden verschiedene Aufreinigungsstrategien durchgeführt. Jedoch konnte mit keiner der Methoden die mit der einstufigen Aufreinigung an Ni^{2+} -NTA mit Imidazolstufenelution erhaltene Reinheit erreicht oder übertroffen werden. Die Aufreinigungen waren eine IMAC an Ni^{2+} -NTA mit Elution über einen Imidazol-Gradienten, eine Gelfiltration nach vorheriger Aufreinigung an Ni^{2+} -NTA (Stufenelution), sowie eine Anionenaustauscherchromatographie nach vorheriger Aufreinigung an Ni^{2+} -NTA (Stufenelution).

Die Bilanz der Aufreinigung der Mutante durch IMAC an Ni^{2+} -NTA mit Imidazol-Stufenelution ist in der folgenden Tabelle gegeben. Die Aktivitätsanalytik erfolgte mit HPLC-Analytik sowie Photometer-Assay (Kapitel E 1.2.1 und E 1.2.2). Die in der Tabelle angegebenen Aktivitätswerte beziehen sich auf den Transfer von UDP-GalNAc auf GlcNAc β 1-Bn, den beim Photometertest genutzten Akzeptor.

Tabelle 10: Bilanz der Aufreinigung der Mutante der His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 (aus 3,5g Biofeuchtmasse).

	V [ml]	Gesamt- Aktivität [mU]	Protein- menge [mg]	Spezifische Aktivität [mU/mg]	Aufreinigungs- faktor [-]	Ausbeute [%]
Rohextrakt	7	118	139,3	0,85	1	100
IMAC an Ni^{2+}- NTA	15	84	0,45	200	235	71

Neben der Ausbeute von 71% fällt vor allem der Aufreinigungsfaktor von 235 auf. Dieser zeigt klar die Selektivität der IMAC an Ni^{2+} -NTA, da im Eluat tatsächlich nur noch das Zielprotein bzw. dessen Translationsabbruchprodukte vorhanden waren, was zu einem sehr niedrigen Proteingehalt und daher hohem Aufreinigungsfaktor führte. Auch liegt der Aufreinigungsfaktor in ähnlicher Größenordnung wie bei der IMAC an Ni^{2+} -NTA des Wildtyp-Fusionsproteins, dort lag er bei 179. Die spezifische Aktivität nach Aufreinigung betrug bei der

C Ergebnisse und Diskussion

Mutante 200 mU/mg, was ca. 56% der spezifischen Aktivität des Pool der Wildtyp-Aufreinigung entspricht.

Die Enzymstabilität war nicht gut, schon nach 24 h fiel die Aktivität auf etwa 60% ab, so dass für die nachfolgenden Charakterisierungen jeweils mit frisch aufgereinigtem Enzym gearbeitet werden musste. Hinsichtlich der Stabilität war es nicht von Bedeutung, ob das Enzym bei -20°C (mit oder ohne Glycerin) oder bei 4°C gelagert wurde.

5 Charakterisierung der β 4Gal-T1-Konstrukte sowie der Mutante His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L)

5.1 Substratspektrum

Das Substratspektrum der freien und luminalen Gal-T sowie der His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 und ihrer Mutante wurden untersucht. Es wurden die Donorsubstrate UDP-Gal und UDP-GalNAc sowie ihre biotinylierten Derivate verwendet. Als Akzeptor dienten β -GlcNAc als Beispiel für ein hydrophiles sowie GlcNAc β 1-Bn als Beispiel für ein hydrophobes Monosaccharid. Zudem wurde das IgG der Ratte als Beispiel für eine N-Glykan-Struktur eingesetzt. Die IgG-Struktur wurde vor dem Transfer reduziert und die dann freien SH-Gruppen blockiert. Die Prozedur und ihre Gründe werden in Kapitel 6 erläutert. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der Transferreaktionen.

Tabelle 11: Substratspektrum der Gal-T-Konstrukte freie β 4Gal-T1, luminale β 4Gal-T1 und His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 sowie der Mutante His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L).

Angegeben sind die mit dem Photometertest (Kapitel E 1.2.2) bestimmten Restaktivitäten. 100% Aktivität sowie die angegebenen Restaktivitäten entsprechen jeweils den V_{\max} -Werten der im Kapitel C 5.4 beschriebenen kinetischen Messungen (-: keine Aktivität messbar). Die Bedingungen der Messungen sind ebenfalls dort beschrieben. Ausgenommen sind die Restaktivitäten bei den Reaktionen der His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L), da für diese keine kinetischen Messungen vorgenommen wurden.

His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L): Bedingungen für den Transfer von UDP-Gal und UDP-6-biotinyl-Gal auf β -GlcNAc bzw. GlcNAc- β 1-Bn: 50 mM MES-Puffer pH 6,5; 1 mM MnCl₂ (UDP-Gal), 1 mM MgCl₂ (UDP-6-biotinyl-Gal); Akzeptorkonzentration: 6 mM; Donorkonzentration jeweils 4 mM. Bedingungen für den Transfer von UDP-Gal und UDP-GalNAc auf IgG: 50 mM MES-Puffer pH 6,5; 1 mM MnCl₂; Akzeptorkonzentration: 75 μ M; Donorkonzentration: 0,25 mM.

Für alle Enzyme wurden für die Reaktionen, die mit modifizierten Donor-Substraten durchgeführt wurden und keine messbare Aktivität aufwiesen, die Bedingungen so gewählt, dass sie bei Reaktion der natürlichen Donor-Substrate das Aktivitätsmaximum aufwiesen.

C Ergebnisse und Diskussion

	Freie β4Gal-T1	Luminale β4Gal-T1	His₆- TagPropeptid- β4Gal-T1	His₆-TagPropeptid- β4Gal-T1(Y284L)
UDP-Gal auf β-GlcNAc	9,4% 107 mU/mg	35,7% 60 mU/mg	60,8% 254 mU/mg	Nur Hydrolyseaktivität
UDP-6-biotinyl-Gal auf β-GlcNAc	-	-	-	-
UDP-GalNAc auf β-GlcNAc	-	-	-	41,6% 102,3 mU/mg
UDP-6-biotinyl-GalNAc auf β-GlcNAc	-	-	-	-
UDP-Gal auf GlcNAcβ1-Bn	100% 1138 mU/mg	97% 168 mU/mg	100% 418 mU/mg	Nur Hydrolyseaktivität
UDP-6-biotinyl-Gal auf GlcNAc-β1-Bn	-	0,7% 1,2 mU/mg	1,3% 5,7 mU/mg	0,1% 0,25 mU/mg
UDP-GalNAc auf GlcNAcβ1-Bn	-	-	-	100% 246 mU/mg
UDP-6-biotinyl-GalNAc auf GlcNAcβ1-Bn	-	-	-	-
UDP-Gal auf IgG	13,5% 154 mU/mg	100 % 174 mU/mg	42,6% 178 mU/mg	Nur Hydrolyseaktivität
UDP-6-biotinyl-Gal auf IgG	2,2% 24,2 mU/mg	14,5% 25,3 mU/mg	-	-
UDP-GalNAc auf IgG	-	-	-	36% 90 mU/mg
UDP-6-biotinyl-GalNAc auf IgG	-	-	-	-

C Ergebnisse und Diskussion

Bei den drei Wildtyp- β 4Gal-T1-Konstrukten fällt auf, dass alle Konstrukte in der Lage sind, UDP-Gal auf β -GlcNac, GlcNac β 1-Bn sowie auf das IgG der Ratte zu übertragen. Unterschiede gibt es in der Güte dieser Übertragung. Diese Unterschiede wurden durch kinetische Untersuchungen genauer charakterisiert und werden in Kapitel 5.4 erläutert und diskutiert. Bei den Reaktionen mit UDP-6-biotinyl-Gal zeigen sich neben einer Gemeinsamkeit erhebliche Unterschiede. Die Gemeinsamkeit besteht darin, dass keines der Konstrukte in der Lage ist, das biotinylierte Donorsubstrat auf das hydrophile Monosaccharid β -GlcNac zu übertragen. Die luminaire β 4Gal-T1 ist als einziges Konstrukt dazu imstande, die beiden weiteren getesteten Akzeptorsubstrate zu bedienen. Im Fall des GlcNac β 1-Bn gesellt sich ihr die His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 hinzu, während die freie β 4Gal-T1 keine Aktivität zeigt. Beim IgG ist es jedoch nur letzteres Enzym sowie die luminaire β 4Gal-T1, welche einen Transfer ermöglichen. Es zeigt sich also deutlich, dass das modifizierte Donor-Substrat sowie die Akzeptorspezifitäten der einzelnen Gal-T-Konstrukte für einen erfolgreichen Transfer kombiniert werden müssen. Auch dies wird in Kapitel 5.4 näher betrachtet.

Schaut man sich nun die Ergebnisse für die Mutante His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L) an, so zeigt dieses Enzym eine Transferaktivität mit UDP-GalNac auf alle getesteten Akzeptoren. Analog zur His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 ist die Aktivität für das Substrat GlcNac- β 1-Bn deutlich am Höchsten. Daher wurde der Transfer von UDP-GalNac auf GlcNac β 1-Bn kinetisch untersucht, dies wird in Kapitel 5.4 erläutert. Dort wird auch ein Vergleich zu den kinetischen Daten für die Mutante der bovinen β 4Gal-T1 angestellt. Für His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L) konnte desweiteren lediglich eine Hydrolyseaktivität mit dem Donorsubstrat UDP-Gal festgestellt werden. Dieses konnte eindeutig daraus geschlossen werden, dass sich bei HPLC-Aktivitätsmessungen kein Produkt, aber ein Zerfall des Donors in aktivierte Derivate beobachten ließ (Methode F 2.6). Analog zum Wildtypfusionsprotein ist dagegen die Aktivität mit UDP-6-biotinyl-Gal auf GlcNac β 1-Bn bzw. ihr Ausbleiben bei β -GlcNac und IgG. Da keine Aktivität von UDP-6-biotinyl-Gal beim Transfer auf die beiden gerade genannten Akzeptoren vorlag und somit ohnehin keine vergleichende Messung stattfinden konnte, wurde aufgrund der sehr hohen Kosten für das Donorsubstrat UDP-GalNac auf die Aufnahme einer Kinetik für den Transfer dieses Substrats auf β -GlcNac und IgG verzichtet. Der Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal auf GlcNac β 1-Bn lieferte zu geringe Aktivitäten und war daher für kinetische Messungen unbrauchbar. Mit UDP-6-biotinyl-GalNac war keinerlei Aktivität vorhanden.

Das grundlegende Ziel der Mutagenisierung wurde also erreicht. Es wurde ein Enzym erhalten, welches in der Lage ist, UDP-GalNac zu übertragen. Durch eine einfache

C Ergebnisse und Diskussion

Punktmutation im aktiven Zentrum wurde die Spezifität vom Donor-Substrat UDP-Gal zu UDP-GalNAc verändert. Das so erhaltene Enzym besitzt eine absolute Spezifität für das Donorsubstrat UDP-GalNAc.

Die von Ramakrishnan und Qasba für das bovine Enzym beobachtete duale Aktivität der Mutante für UDP-Gal und UDP-GalNAc konnte nicht festgestellt werden (Ramakrishnan und Qasba 2002). Von hohem Interesse wäre es in diesem Zusammenhang, analoge Mutanten der freien β 4Gal-T1 sowie des luminalen Konstruktes herzustellen. Es ist in der Literatur beschrieben, dass Fusionsproteine deutlich modifizierte Eigenschaften besitzen können (Humphreys *et al.* 1999). Daher wäre es durchaus möglich, dass die Mutagenisierung der beiden anderen Gal-T-Konstrukte zu Enzymen führen könnte, die sowohl UDP-Gal als auch UDP-GalNAc transferieren können.

Die im Rahmen dieser Arbeit generierte Mutante war in der Lage, UDP-6-biotinyl-Gal zu übertragen, wenn auch nur mit 10% der Aktivität, die die His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 mit diesem Substrat beim Transfer auf GlcNAc β 1-Bn erreicht. Die Fähigkeit UDP-6-biotinyl-Gal zu übertragen, darf nicht als Widerspruch zur nicht vorhandenen Transferaktivität mit UDP-Gal gesehen werden. Das modifizierte Substrat dürfte den durch die Mutagenisierung im aktiven Zentrum gewonnenen Platz deutlich besser ausfüllen als UDP-Gal und sich somit besser als Substrat eignen. Auch im Hinblick auf den Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal wäre eine Untersuchung mit Mutanten der beiden anderen Konstrukte aufschlußreich. His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L) zeigt mit dem Fehlen der Aktivität beim Transfer auf IgG eine Akzeptorspezifität. Ob eine Mutante der freien β 4Gal-T1 eine Spezifität für das IgG zeigen würde, wäre von großem Interesse.

Das Ziel, mit der Mutante letztendlich ein Enzym zur Verfügung zu haben, welches in der Lage ist, UDP-6-biotinyl-GalNAc zu übertragen, wurde nicht erreicht. Es ist möglich, dass trotz des vergrößerten Raums in der katalytischen Tasche der Mutante immer noch nicht genügend Platz für dieses Substrat vorhanden ist. Dem könnte möglicherweise durch eine veränderte Mutagenisierungsstrategie begegnet werden. So wäre der Austausch des Tyrosin gegen eine relativ kleine Aminosäure wie Gly oder Ala denkbar. Somit würde weiterer Raum zur Bindung des Donorsubstrats gewonnen. Auch wäre eine Sättigungsmutagenese denkbar.

C Ergebnisse und Diskussion

5.2 pH-Optimum

Das pH-Optimum der freien, luminalen und His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1 sowie der Mutante His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1(Y284L) wurde ermittelt. Hierzu wurde der Transfer von UDP-Gal sowie im Fall der Mutante von UDP-GalNAc auf GlcNAc betrachtet.

Die folgende Abbildung 52 zeigt den Verlauf der pH-Abhängigkeit.

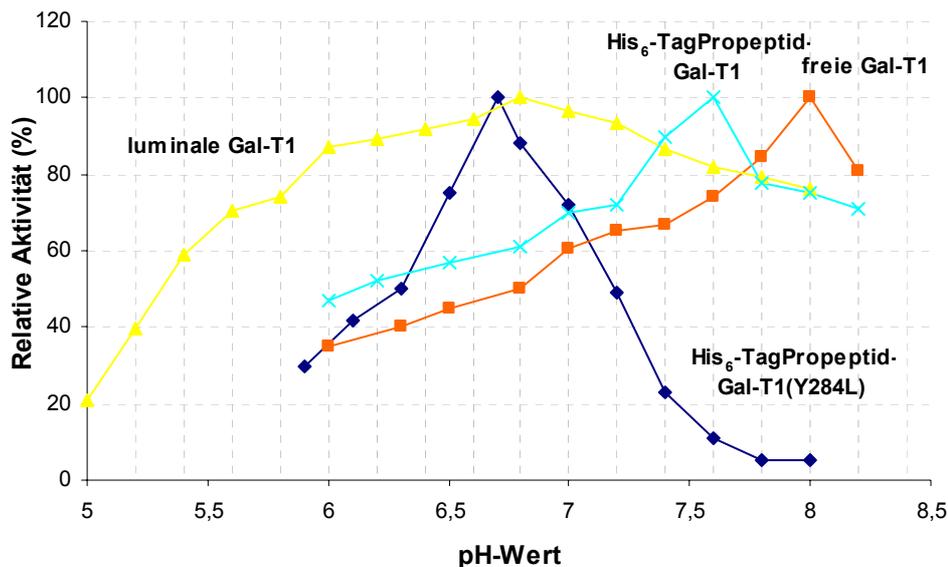


Abbildung 52: pH-Optimumskurve der Gal-T-Konstrukte freie, luminalen und His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1 sowie der Mutante His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1(Y284L). Bedingungen: Die Konzentration des Donors betrug 2,5 mM (UDP-Gal für die Gal-T-Enzyme, UDP-GalNAc für die Mutante), die Konzentration des Akzeptors GlcNAc betrug 5 mM. Als Metallion fungierte 1 mM MnCl₂. Als Puffer wurden für die Gal-T-Konstrukte 50 mM Citrat-Phosphat-Puffer (freie β4Gal-T1 und His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1 pH 6,0-6,8, luminalen β4Gal-T1 pH 5,0-6,8) sowie 50 mM HEPES-Puffer (pH 6,8-8,2) verwendet. Für His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1(Y284L) wurde 50 mM MES-Puffer (pH 5,8-6,8) sowie 50 mM HEPES-Puffer (pH 6,8-8,2) verwendet. Die Reaktionstemperatur betrug 37°C, die Reaktionszeit bei den Gal-T-Enzymen 30 min., bei der Mutante 20 h. Die Aktivitätsmessung erfolgte über HPLC-Analytik (Kapitel E 1.2.1). 100% Relative Aktivität entsprachen bei der freien β4Gal-T1 723 mU/mg, bei der luminalen β4Gal-T1 191 mU/mg, bei der His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1 202 mU/mg und bei der His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1(Y284L) 170 mU/mg.

Es handelt sich bei allen Konstrukten (inklusive der Mutante) um für pH-Abhängigkeiten von Enzymen typische Glocken-Kurven. Die Kurve für die luminalen β4Gal-T1 fällt dabei deutlich breiter aus als die der anderen Konstrukte, d.h. der Abfall der Aktivität bei pH-Werten abseits des Optimums ist geringer. Es fällt auf, dass sämtliche Gal-T-Konstrukte unterschiedliche pH-

C Ergebnisse und Diskussion

Optima besitzen. Das pH-Optimum der freien Gal-T1 war schon von Schumacher auf pH 8,0 bestimmt worden (Schumacher 1999). Die luminale β 4-Gal-T1 hat ihr Optimum bei einem pH-Wert von 6,8. Bei der Mutante His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L) hat gegenüber dem nicht-mutagenisierten Ursprungs-konstrukt ein Shift des pH-Optimums zu einem saurerem pH stattgefunden (6,8 gegenüber 7,6). Ramakrishnan und Qasba geben in ihrer Publikation keine Daten zum pH-Optimum an (Ramakrishnan und Qasba 2002). Deshalb kann nicht nachvollzogen werden, ob das Phänomen des pH-Shifts auch beim bovinen Enzym zu beobachten ist. Jedoch ist dies durchaus wahrscheinlich, da sich eine Aminosäure des aktiven Zentrums geändert hat. pH-Optimumskurven spiegeln die Ionisierungszustände bestimmter Aminosäuren wider, die zur Aktivität eines Enzyms notwendig sind. Ändert sich also wie bei der Mutagenisierung eine Aminosäure des aktiven Zentrums, ist eine Auswirkung auf das pH-Optimum zu erwarten. Dies ist natürlich nur der Fall, wenn man nicht Aminosäuren austauscht, die bei demselben pH-Wert ihren optimalen Ionisierungszustand besitzen. Da bei den Gal-T-Konstrukten freie β 4Gal-T1, luminale β 4Gal-T1 sowie His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 die aktiven Zentren identisch sind, muss hier die Ionisierung andersweitig an der katalytischen Aktivität beteiligter Aminosäuren eine Auswirkung auf den pH-Wert haben.

5.3 Restaktivität mit verschiedenen Metallionen

Für die Aktivität der humanen β 4Gal-T1 sowie der anderen Proteine dieser Enzymfamilie ist die Anwesenheit von 1-20 mM Mn²⁺ essentiell für die Aktivität (Amado *et al.* 1999). Bülter hatte jedoch festgestellt, dass UDP-6-biotinyl-Gal(NAc) schon bei Konzentrationen von Mn²⁺ im Bereich von 0,1 mM zerfällt (Bülter 1999). Hierbei kommt es zum Abbau der modifizierten Kohlenhydrate zu nicht näher definierten Nukleotidzucker-Derivaten. Bülter vermutete die Hydrazidbindung als labile Stelle für den Einsatz des Zerfalls. Bülter hatte jedoch auch feststellen können, dass die biotinylierten Nukleotidzucker in Gegenwart anderer zweiwertiger Metallionen wie Ca²⁺ oder Mg²⁺ zumindest bis zu einer Konzentration von 5 mM der Metallionen stabil blieben. Es konnte bereits 1966 gezeigt werden, dass die bovine β 4Gal-T1 durch den Zusatz anderer zweiwertiger Metallionen als Mn²⁺ eine Restaktivität von 25% aufwies (Babad and Hassid 1966).

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden die Restaktivitäten der Konstrukte freie β 4Gal-T1, luminale β 4Gal-T1, His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 sowie der Mutante His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L) bei Ersatz von Mn²⁺ durch Mg²⁺, Ca²⁺ sowie Co²⁺ untersucht. Zur Ermittlung der Restaktivitäten diente HPLC-Analytik (Kapitel E 1.2.1).

C Ergebnisse und Diskussion

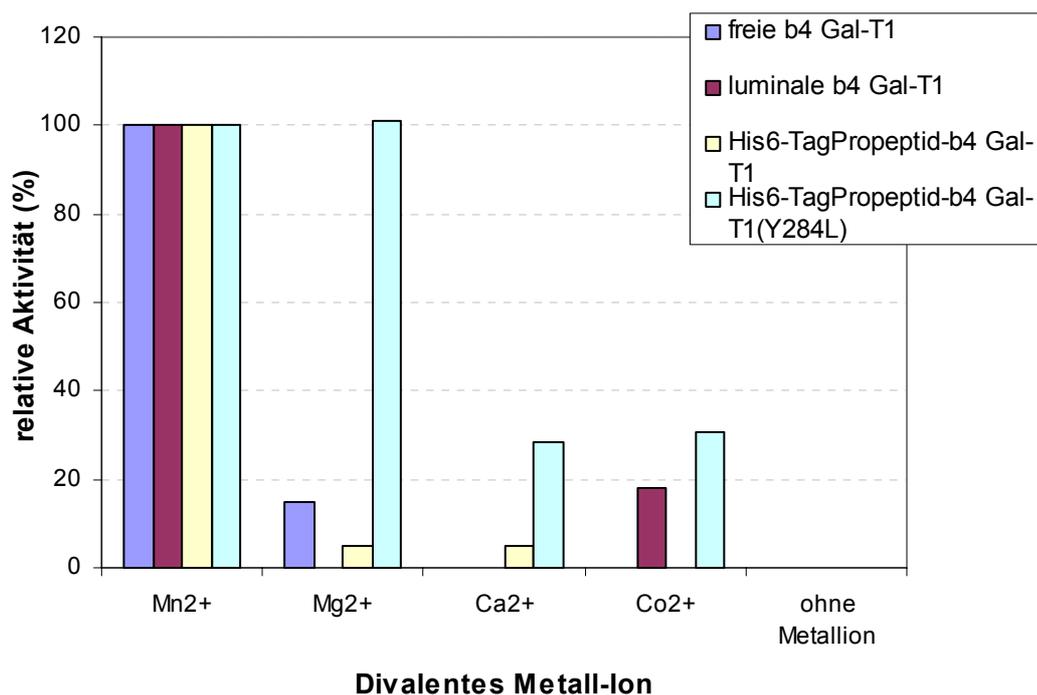


Abbildung 53: Restaktivitäten der Gal-T-Konstrukte freie β 4Gal-T1, luminale β 4Gal-T1, His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 sowie der Mutante His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 (Y284L) mit verschiedenen Metallionen.

Bedingungen: Die Konzentration des Metallions war je 1 mM, die Konzentration des Donorsubstrats (UDP-Gal für die β 4Gal-T1-Enzyme, UDP-GalNAc für die Mutante) betrug 2,5 mM sowie die Konzentration des Akzeptorsubstrats GlcNAc 5 mM. Für die freie β 4Gal-T1 wurde 50 mM HEPES-Puffer pH 8,0, für die luminale β 4Gal-T1 50 mM HEPES-Puffer pH 6,8, für die His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 50 mM HEPES-Puffer pH 7,6 sowie für die Mutante 50 mM MES-Puffer pH 6,8 verwendet. Die Reaktionstemperatur betrug 37 °C, die Reaktionszeit für die β 4Gal-T1-Enzyme 30 min. und für die Mutante 20 h. Die Aktivitätsmessung erfolgte per HPLC-Analytik (Kapitel E 1.2.1). 100% Relative Aktivität entsprachen bei der freien β 4Gal-T1 723 mU/mg, bei der luminalen β 4Gal-T1 191 mU/mg, bei der His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 202 mU/mg und bei der His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L) 170 mU/mg.

Für alle Gal-T-Konstrukte konnte eine Restaktivität mit zumindest einem der getesteten Metallionen gefunden werden. Für die Mutante lag für jedes Metallion eine Restaktivität vor, im Fall von Mg²⁺ war die Aktivität sogar genauso hoch wie mit Mn²⁺. Für die freie β 4Gal-T1 konnte mit Mg²⁺ eine Restaktivität von 15% ermittelt werden. Bei der luminalen β 4Gal-T1 wurde eine 18%ige Restaktivität mit Co²⁺ gefunden. Die geringsten Restaktivitäten wies die His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 auf, hier lagen jeweils 5% der mit Mn²⁺ zu erzielenden Aktivität bei Einsatz von Mg²⁺ oder Ca²⁺ vor. Ohne Zugabe eines Metallions wies keines der vorliegenden Gal-T-Konstrukte, auch nicht die Mutante, Aktivität auf. Ähnlich wie bei der

C Ergebnisse und Diskussion

Betrachtung des pH-Optimums war durch den Austausch einer Aminosäure des aktiven Zentrums durchaus zu erwarten, dass sich ein Einfluß auf die Koordination des für die Katalyse essentiellen Metallions ergeben könnte. Bei der Mutagenisierung der bovinen β 4Gal-T1 hatten Ramakrishnan und Qasba beobachtet, dass eine der sechs Koordinationsbindungen des Mn^{2+} gegenüber der Wildtyp-Struktur verändert war (Ramakrishnan und Qasba 2002). Eine Begründung, warum sich die drei humanen β 4Gal-T1-Konstrukte bezüglich ihrer Restaktivität mit Metallionen unterschiedlich verhalten, kann zum jetzigen Wissensstand nicht gegeben werden.

5.4 Kinetische Charakterisierung

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Konstrukte der rekombinanten humanen β 4Gal-T1 sowie die Mutante His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L) wurden kinetisch charakterisiert. Als Donorzucker diente UDP-Gal für die Gal-T-Konstrukte sowie UDP-GalNAc für die Mutante. Als Akzeptor wurde als Beispiel für einen einfachen hydrophilen Monosaccharid-Akzeptor β -GlcNAc sowie für einen einfachen hydrophoben Akzeptor GlcNAc β 1-Bn verwendet. Letzterer trägt eine definierte Konfiguration am anomeren C-Atom. Um auch den Transfer auf ein Glykoprotein kinetisch zu untersuchen, wurde das IgG der Ratte (in reduzierter und blockierter Form), welches einen hohen Prozentsatz an Agalacto-Strukturen trägt (s. Kapitel 6), ausgewählt. Zusätzlich zu diesen Experimenten wurde auch der Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal kinetisch charakterisiert. Wie bereits in Kapitel 5.1 beschrieben, war ein Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal mit His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 und luminaler β 4Gal-T1 auf GlcNAc β 1-Bn möglich. Andererseits zeigte sich eine Transferaktivität mit UDP-6-biotinyl-Gal sowie freier β 4Gal-T1 und luminaler β 4Gal-T1 auf Ratten IgG. Die beim Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal vorliegenden Aktivitäten zeigten sich als ausreichend zur Aufnahme kinetischer Daten. Dagegen war die Aktivität von UDP-6-biotinyl-Gal bei einem Transfer mit His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L) auf GlcNAc β 1-Bn für eine kinetische Charakterisierung ungenügend.

Die kinetischen Messungen erfolgten über den Photometer-Aktivitätstest (Kapitel E 6.4). Die Auswertung der in den Messungen erhaltenen Daten ist ebenfalls im Kapitel E 6.4 beschrieben. Die folgenden Abbildungen (Abbildung 54-58) zeigen die bei den Messungen erhaltenen kinetischen Verläufe. Die jeweils zugehörigen Tabellen (Tabellen 12-16) geben die kinetischen Konstanten an.

C Ergebnisse und Diskussion

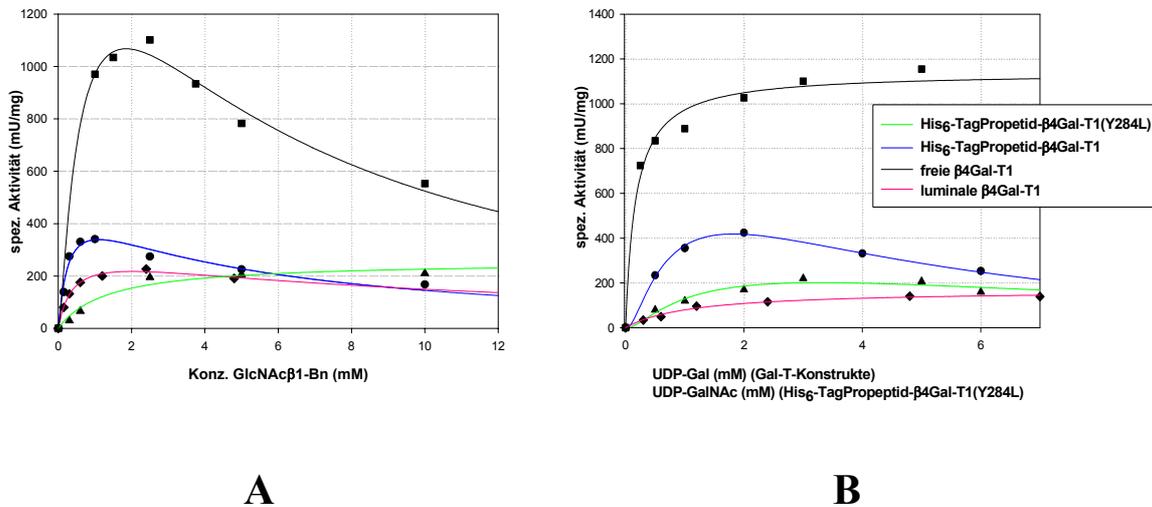


Abbildung 54: Kinetische Verläufe bei der Variation der Akzeptorkonzentration (A) und der Donorkonzentration (B) für den Transfer von UDP-Gal (freie β 4Gal-T1, luminales β 4Gal-T1 und His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1) bzw. UDP-GalNac (His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L)) auf GlcNAc β 1-Bn.

Bedingungen: freie β 4Gal-T1: 50 mM HEPES-Puffer pH 8,0; 1 mM MnCl₂; bei der Variation der Donorkonzentration betrug die konstante Akzeptorkonzentration 1,5 mM; bei der Variation der Akzeptorkonzentration betrug die konstante Donorkonzentration 2 mM;
luminales β 4Gal-T1: 50 mM HEPES-Puffer pH 6,8; 1 mM MnCl₂; bei der Variation der Donorkonzentration betrug die konstante Akzeptorkonzentration 2,5 mM; bei der Variation der Akzeptorkonzentration betrug die konstante Donorkonzentration 2,5 mM;
His₆TagPropeptid- β 4Gal-T1: 50 mM HEPES-Puffer pH 7,6; 1 mM MnCl₂; bei der Variation der Donorkonzentration betrug die konstante Akzeptorkonzentration 1 mM; bei der Variation der Akzeptorkonzentration betrug die konstante Donorkonzentration 2 mM; **His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 (Y284L):** 50 mM MES-Puffer pH 6,5; 1 mM MnCl₂; bei der Variation der Donorkonzentration betrug die konstante Akzeptorkonzentration 6 mM; bei der Variation der Akzeptorkonzentration betrug die konstante Donorkonzentration 4 mM;
Reaktionstemperatur: 37°C, die Aktivitätsmessung erfolgte über den Photometertest (Kapitel E 1.2.2).

C Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 12: Kinetische Konstanten bei der Variation der Akzeptorkonzentration (A) und der Donorkonzentration (B) für den Transfer von UDP-Gal (freie β 4Gal-T1, luminale β 4Gal-T1 und His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1) bzw. UDP-GalNAc (His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1) auf GlcNAc β 1-Bn. Die Bedingungen der zugrunde liegenden Messungen sind bei Abbildung 54 beschrieben.

	Variation der Donor-Konzentration *			Variation der Akzeptor-Konzentration (GlcNAc β 1-Bn)		
	V _{max} [mU/mg]	K _M [mM]	K _{iS} [mM]	V _{max} [mU/mg]	K _M [mM]	K _{iS} [mM]
Freie β4Gal-T1	1138,2 ± 42,3	0,2 ± 0,04	-	1067,8 ± 29,9	0,4 ± 0,2	8,1 ± 0,2
Luminale β4Gal-T1	168,3 ± 8,7	1,1 ± 0,2	-	217,3 ± 4,7	0,2 ± 0,2	17,5 ± 0,2
His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1	418,4 ± 7,9	0,5 ± 0,2	7,2 ± 0,2	339,0 ± 17,5	0,2 ± 0,2	8,1 ± 0,2
His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1(Y284L)	245,9 ± 23,5	1,4 ± 0,2	6,4 ± 0,2	258,3 ± 26,1	1,4 ± 0,4	-

* Donorsubstrat Gal-T-Konstrukte: UDP-Gal, Donorsubstrat His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L) : UDP-GalNAc.

Für die Transferreaktion von UDP-Gal auf GlcNAc β 1-Bn zeigt sich die freie β 4Gal-T1 eindeutig als das, gemessen an der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit V_{max}, bestgeeignete Enzym. Während die His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 noch ca. 40% des V_{max}-Wertes der freien β 4Gal-T1 erreicht, sind es bei der luminalen β 4Gal-T1 nur ca. 20%. Die Affinität zum Substrat, ausgedrückt durch den K_M-Wert, bestätigt die Reihenfolge der Reaktionsgeschwindigkeiten. So besitzt die freie β 4Gal-T1 mit einem K_M-Wert von 0,2 mM für UDP-Gal die höchste Affinität für dieses Substrat. Die His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 hat

C Ergebnisse und Diskussion

einen 2,5fach höheren K_M -Wert. In jedem Fall ist die freie β 4Gal-T1 das Enzym der Wahl für die gerade betrachtete Transferreaktion. Ihre hohe Affinität zum Substrat UDP-Gal lässt das völlige Fehlen der Aktivität mit UDP-6-biotinyl-Gal plausibel erscheinen. Die offenbar besonders günstige Konformation für den Transfer von UDP-Gal auf GlcNAc β 1-Bn wird durch das modifizierte Substrat wohl zu empfindlich gestört. Die Frage, warum sich die Gal-T-Konstrukte generell so unterschiedlich verhalten, ist ohne vergleichende kristallographische Untersuchungen der mit dem Substrat eingenommenen Konformationen nicht zu beantworten. Der Unterschied zwischen freier und luminaler β 4Gal-T1 auf der einen und His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 auf der anderen Seite kann im Lipase-Anteil des Fusionsproteins begründet sein. Aus der Literatur ist für das bovine Enzym bekannt, dass durch die Bindung des Donorsubstrats UDP-Gal eine Konformationsänderung des Enzyms erfolgt. Erst durch diese Änderung wird die Bindungsstelle für das Akzeptorsubstrat zugänglich (Ramakrishnan *et al.* 2002). Diese Konformationsänderung mag durch die Einschränkung der Beweglichkeitsflexibilität des Enzyms durch das Propeptid des Fusionsproteins behindert sein. Hierin mag die schlechtere Reaktionsgeschwindigkeit und geringere Donorsubstrataffinität im Vergleich zum freien Protein eine Erklärung haben. Warum aber die luminaler β 4Gal-T1 noch schwächere Werte erzielt, lässt sich so nicht beantworten. Die im Vergleich zur freien β 4Gal-T1 fehlenden Aminosäuren des Signalankers der β 4Gal-T1 können nicht als Begründung dienen.

Die Werte für V_{max} und K_M bei der His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L) zeigen, was den V_{max} betrifft, 58% des beim zugehörigen Wildtyp-Konstruktes erzielten Wertes. Der K_M -Wert zeigt sich mit 1,5 mM gegenüber 0,5 mM ebenfalls verschlechtert. Diese kinetischen Daten der Mutante His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L) stehen im Gegensatz zu den für das bovine Enzym erzielten Ergebnissen (Ramakrishnan und Qasba 2002). Wie bereits beschrieben, besaß die im zitierten Paper beschriebene Mutante des bovinen Enzyms eine duale Transferaktivität von UDP-Gal und UDP-GalNAc. Vergleicht man die V_{max} -Werte für UDP-Gal, so liegt dieser bei der Mutante des bovinen Enzyms um 40% höher als der Wert für das Wildtypenzym. Beim Transfer von UDP-GalNAc wurde ein V_{max} gemessen, der noch einmal 70% über dem V_{max} des Transfers von UDP-Gal mit der Mutante lag. Bei der Affinität ist die Mutante des bovinen Enzyms gegenüber dem Wildtyp, bezogen auf das Substrat UDP-Gal, ebenfalls leicht überlegen, der K_M -Wert der Mutante liegt um ca. 20% niedriger. Betrachtet man jedoch das Substrat UDP-GalNAc, so verschlechtert sich die Affinität gegenüber jener für UDP-Gal des Wildtypenzym um das Fünffache.

C Ergebnisse und Diskussion

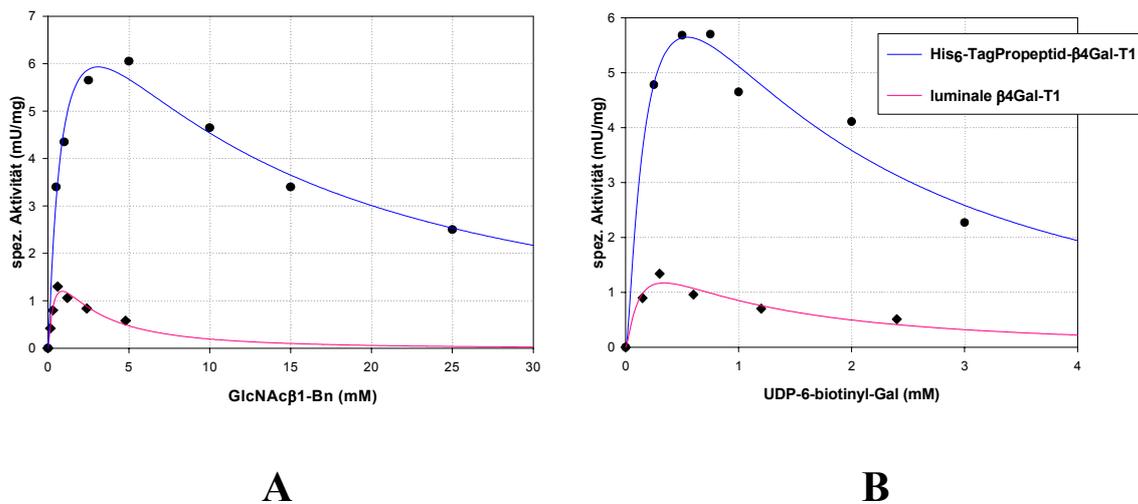


Abbildung 55: Kinetische Verläufe bei der Variation der Akzeptorkonzentration (A) und der Donorkonzentration (B) für den Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal (luminale β₄Gal-T1 und His₆-TagPropeptid-β₄Gal-T1) auf GlcNAcβ1-Bn.

Bedingungen: luminale β₄Gal-T1: 50 mM HEPES-Puffer pH 6,8; 1 mM CoCl₂; bei der Variation der Donorkonzentration betrug die konstante Akzeptorkonzentration 1 mM; bei der Variation der Akzeptorkonzentration betrug die konstante Donorkonzentration 0,6 mM; **His₆-TagPropeptid-β₄Gal-T1:** 50 mM HEPES-Puffer pH 7,6; 1 mM MgCl₂; bei der Variation der Donorkonzentration betrug die konstante Akzeptorkonzentration 2,5 mM; bei der Variation der Akzeptorkonzentration betrug die konstante Donorkonzentration 0,5 mM. **Reaktionstemperatur: 37°C, die Aktivitätsmessung erfolgte über den Photometertest (Kapitel E 1.2.2).**

C Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 13: Kinetische Konstanten bei der Variation der Akzeptorkonzentration (A) und der Donorkonzentration (B) für den Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal (luminale β 4Gal-T1 und His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1) auf GlcNAc β 1-Bn. Die Bedingungen der zugrunde liegenden Messungen sind bei Abbildung 55 beschrieben.

	Variation der Donor-Konzentration (UDP-6-biotinyl-Gal)			Variation der Akzeptor-Konzentration (GlcNAc β 1-Bn)		
	V _{max} [mU/mg]	K _M [mM]	K _{IS} [mM]	V _{max} [mU/mg]	K _M [mM]	K _{IS} [mM]
luminale β4Gal-T1	1,2 ± 0,1	0,07 ± 0,07	1,68 ± 0,07	1,2 ± 0,2	0,2 ± 0,1	3,9 ± 0,1
His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1	5,65 ± 0,3	0,1 ± 0,06	2,7 ± 0,06	5,9 ± 0,2	0,5 ± 0,2	20,5 ± 0,2

Lenken wir unser Augenmerk nun auf die Transferreaktion von UDP-6-biotinyl-Gal auf GlcNAc β 1-Bn. Wie schon beim Transfer von UDP-Gal auf dasselbe Akzeptorsubstrat zeigt sich die His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 beim V_{max}-Wert der luminalen β 4Gal-T1 überlegen. Mit einem V_{max} von 5,65 mU/mg besitzt das Fusionsprotein einen knapp fünffach höheren Wert. Dieser V_{max}-Wert beträgt dabei 1,3% des V_{max} des Transfers von UDP-Gal auf GlcNAc β 1-Bn mit der His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1. Beim luminalen Enzym beläuft sich der Wert des V_{max} für das modifizierte Donorsubstrat auf 0,7% gegenüber jenem für UDP-Gal. Es war selbstverständlich zu erwarten, dass mit dem modifizierten Substrat deutlich schwächere Aktivitäten erzielt werden als mit UDP-Gal. Bei der Affinität für UDP-6-biotinyl-Gal bewegen sich beide Gal-T-Konstrukte mit einem K_M von 0,1 mM für das Fusionsprotein bzw. 0,07 mM für die luminale β 4Gal-T1 in einer ähnlichen Größenordnung. Hierbei sind beide K_M-Werte deutlich besser als jene für das natürliche Substrat. Dieses zunächst überraschende Resultat kann durch die schon bei niedrigen Konzentrationen an UDP-6-biotinyl-Gal auftretende Substratüberschußinhibition erklärt werden. Es muss sich bei der Inhibition um den Typ der Substratüberschußinhibition handeln, da beim für die Messung benutzten gekoppelten Photometertest (Kapitel E 1.2.2) die Transferasenreaktion limitierend ist. Da kein

C Ergebnisse und Diskussion

weiteres Substrat zugegen ist, kann die Erniedrigung der Reaktionsgeschwindigkeit bei hohen Substratkonzentrationen nur durch das Donorsubstrat bedingt sein.

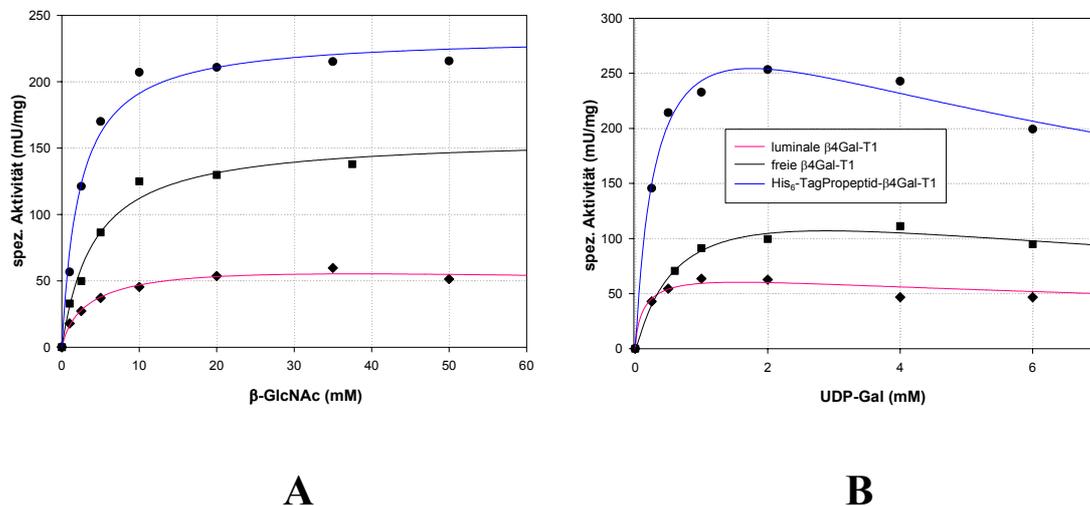


Abbildung 56: Kinetische Verläufe bei der Variation der Akzeptorkonzentration (A) und der Donorkonzentration (B) für den Transfer von UDP-Gal (freie β 4Gal-T1, luminale β 4Gal-T1 und His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1) auf β -GlcNAc.

Bedingungen: freie β 4Gal-T1: 50 mM HEPES-Puffer pH 8,0; 1 mM MnCl₂; bei der Variation der Donorkonzentration betrug die konstante Akzeptorkonzentration 37,5 mM; bei der Variation der Akzeptorkonzentration betrug die konstante Donorkonzentration 2,5 mM; **luminale β 4Gal-T1:** 50 mM HEPES-Puffer pH 6,8; 1 mM MnCl₂; bei der Variation der Donorkonzentration betrug die konstante Akzeptorkonzentration 37,5 mM; bei der Variation der Akzeptorkonzentration betrug die konstante Donorkonzentration 2,5 mM; **His₆TagPropeptid- β 4Gal-T1:** 50 mM HEPES-Puffer pH 7,6; 1 mM MnCl₂; bei der Variation der Donorkonzentration betrug die konstante Akzeptorkonzentration 37,5 mM; bei der Variation der Akzeptorkonzentration betrug die konstante Donorkonzentration 2,5 mM. **Reaktionstemperatur: 37°C, die Aktivitätsmessung erfolgte über den Photometertest (Kapitel E 1.2.2).**

C Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 14: Kinetische Konstanten bei der Variation der Akzeptorkonzentration (A) und der Donorkonzentration (B) für den Transfer von UDP-Gal (freie β 4Gal-T1, luminale β 4Gal-T1 und His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1) auf β -GlcNAc. Die Bedingungen der zugrunde liegenden Messungen sind bei Abbildung 56 beschrieben.

	Variation der Donor-Konzentration (UDP-Gal)			Variation der Akzeptor-Konzentration (β -GlcNAc)		
	V_{\max} [mU/mg]	K_M [mM]	K_{iS} [mM]	V_{\max} [mU/mg]	K_M [μ M]	K_{iS} [μ M]
freie β4Gal-T1	106,7 \pm 3,7	0,21 \pm 0,4	12,06 \pm 0,4	158,7 \pm 8,7	4,2 \pm 0,8	-
luminale β4Gal-T1	60,3 \pm 4,5	0,21 \pm 0,4	12,0 \pm 0,4	55,2 \pm 1,7	5,5 \pm 12,1	264,0 \pm 12,1
His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1	254,4 \pm 6,8	0,37 \pm 0,1	8,6 \pm 0,1	234,8 \pm 7,5	2,28 \pm 0,3	-

Vergleicht man die Transferreaktion von UDP-Gal auf freies β -GlcNAc mit jener auf das β -Benzyl-Glykosid, so erkennt man bei allen drei Enzymkonstrukten, dass die Reaktionsgeschwindigkeit absinkt, die Affinität jedoch steigt. Die freie β 4Gal-T1 fällt beim letzten Punkt heraus, ihre Affinität zum Donor bleibt bei beiden Akzeptoren unverändert. Den stärksten Abfall bei der Reaktionsgeschwindigkeit erkennt man ebenfalls bei der freien β 4Gal-T1, die mit β -GlcNAc nur noch ca. 10% der Aktivität mit dem Glykosid aufweist. Beim luminalen Konstrukt sind es noch 35% Aktivität, beim Fusionsprotein noch ca. 60%. Der vergleichsweise gute Wert für das Fusionsprotein könnte sich dahingehend erklären lassen, dass der weniger Platz einnehmende freie Zucker die Konformationsänderung bei der Akzeptorbindung weniger stört als das Glykosid. Die Affinitäten bei Betrachtung der Transfer-Reaktion von β -GlcNAc und Variation der Akzeptorkonzentration sprechen eine deutliche Sprache. Sie sind bis zu dreißigfach schlechter (luminale β 4Gal-T1) als beim Glykosid. Hierdurch ergibt sich auch eine Erklärung für die fehlende Aktivität beim Transfer von

C Ergebnisse und Diskussion

UDP-6-biotinyl-Gal auf β -GlcNAc. Die Enzyme haben schon zum Akzeptor eine schwache Affinität und können somit keine Katalyse für das modifizierte Donorsubstrat mehr leisten.

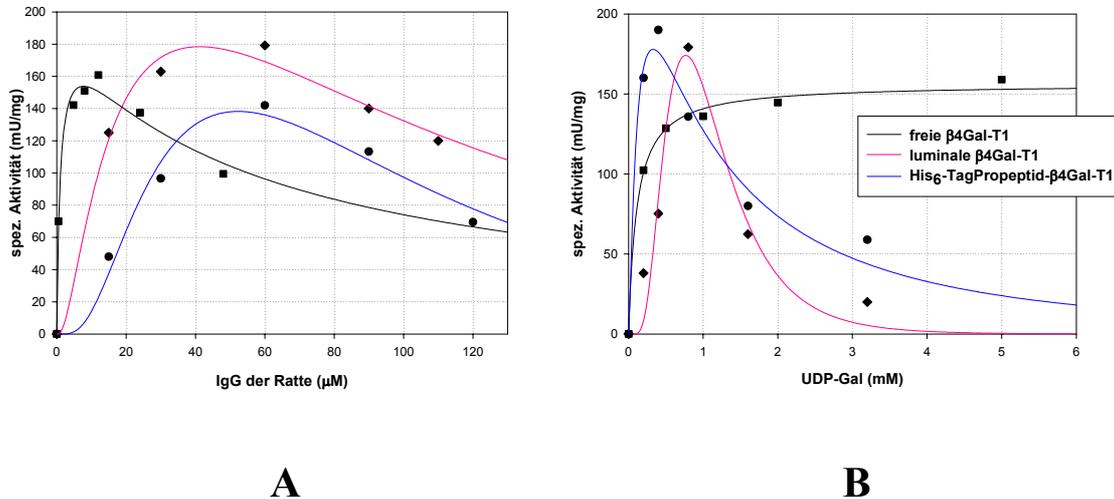


Abbildung 57: Kinetische Verläufe bei der Variation der Akzeptorkonzentration (A) und der Donorkonzentration (B) für den Transfer von UDP-Gal (freie $\beta 4\text{Gal-T1}$, lumenale $\beta 4\text{Gal-T1}$ und $\text{His}_6\text{-TagPropeptid-}\beta 4\text{Gal-T1}$) auf das IgG der Ratte (Molarität des IgG bezogen auf eine schwere Kette).

Bedingungen: freie $\beta 4\text{Gal-T1}$: 50 mM HEPES-Puffer pH 8,0; 1 mM MnCl_2 ; bei der Variation der Donorkonzentration betrug die konstante Akzeptorkonzentration 10 μM ; bei der Variation der Akzeptorkonzentration betrug die konstante Donorkonzentration 0,5 mM; **lumenale $\beta 4\text{Gal-T1}$:** 50 mM HEPES-Puffer pH 6,8; 1 mM MnCl_2 ; bei der Variation der Donorkonzentration betrug die konstante Akzeptorkonzentration 75 μM ; bei der Variation der Akzeptorkonzentration betrug die konstante Donorkonzentration 0,8 mM;

$\text{His}_6\text{TagPropeptid-}\beta 4\text{Gal-T1}$: 50 mM HEPES-Puffer pH 7,6; 1 mM MnCl_2 ; bei der Variation der Donorkonzentration betrug die konstante Akzeptorkonzentration 75 μM ; bei der Variation der Akzeptorkonzentration betrug die konstante Donorkonzentration 0,4 mM.

Reaktionstemperatur: 37°C, die Aktivitätsmessung erfolgte über den Photometertest (Kapitel E 1.2.2).

C Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 15: Kinetische Konstanten bei der Variation der Akzeptorkonzentration (A) und der Donorkonzentration (B) für den Transfer von UDP-Gal (freie β 4Gal-T1, luminale β 4Gal-T1 und His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1) auf das IgG der Ratte. Die Bedingungen der zugrunde liegenden Messungen sind bei Abbildung 57 beschrieben.

	Variation der Donorkonzentration (UDP-Gal)			Variation der Akzeptorkonzentration (IgG der Ratte)		
	V _{max} [mU/mg]	K _M [mM]	K _{iS} [mM]	V _{max} [mU/mg]	K _M [μ M]	K _{iS} [μ M]
freie β4Gal-T1	156,3 ± 3,8	0,1 ± 0,02	-	154,6 ± 3,5	1,9 ± 0,5	42,5 ± 0,5
luminale β4Gal-T1	174,1 ± 20,5	0,4 ± 0,1	1,5 ± 0,1	178,4 ± 7,1	10,7 ± 2,1	159,2 ± 2,1
His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1	177,7 ± 10,3	0,07 ± 0,07	1,6 ± 0,07	138,2 ± 9,2	21,07 ± 2,9	130,6 ± 2,9

Beim Blick auf die Transferreaktion von UDP-Gal auf reduziertes und blockiertes IgG der Ratte (für die Gründe der Reduktion und Blockierung des IgG s. Kapitel 6) fällt auf, dass das IgG vor allem für die freie β 4Gal-T1, aber auch für die His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 ein schlechteres Akzeptorsubstrat darstellt als GlcNAc β 1-Bn. So beträgt der V_{max} der freien β 4Gal-T1 beim Transfer auf IgG nur ca. 10% des V_{max} jenes auf GlcNAc β 1-Bn. Bei der His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 ist eine Abnahme des V_{max} um ca. 60% gegeben. Bei der luminalen β 4Gal-T1 hingegen ergeben sich fast identische Werte für beide Akzeptorsubstrate. Insgesamt liegen die V_{max}-Werte für die Übertragung von UDP-Gal auf IgG der Ratte für alle drei Konstrukte in einer ähnlichen Größenordnung. Dieses gilt auch für die K_M-Werte für UDP-Gal, wenn man die luminale und die His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 betrachtet. Die freie β 4Gal-T1 zeigt wie schon bei der Transferreaktion auf GlcNAc β 1-Bn die höchste Affinität, der K_M-Wert liegt für beide Reaktionen in einer ähnlichen Größenordnung. Generell ist festzustellen, dass die kinetischen Verläufe der bei luminaler und His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 inhibiert sind, für die freie β 4Gal-T1 der Verlauf aber nach Michaelis-Menten erfolgt.

C Ergebnisse und Diskussion

Der K_M -Wert für die Kinetik des Akzeptorsubstrats ist bei der freien $\beta 4\text{Gal-T1}$ vier- bis fünf-fach geringer als die Werte für die anderen beiden Konstrukte. Eine Einordnung gegenüber den K_M -Werten der Monosaccharid-Akzeptoren ist aufgrund des großen Molekulargewichtsunterschieds ohne Wert.

Ohne kristallographische Untersuchungen ist es nur schwer zu erklären, warum die His_6 -TagPropeptid- $\beta 4\text{Gal-T1}$ mit dem Substrat UDP-6-biotinyl-Gal keinerlei Aktivität zeigt. Es kann nur vermutet werden, dass eine erfolgreiche Katalyse am ohnehin nicht besonders flexiblen Enzym sowie einem wohl nicht sonderlich flexiblen Akzeptor und einem relativ sperrigen Donorsubstrat scheitert.

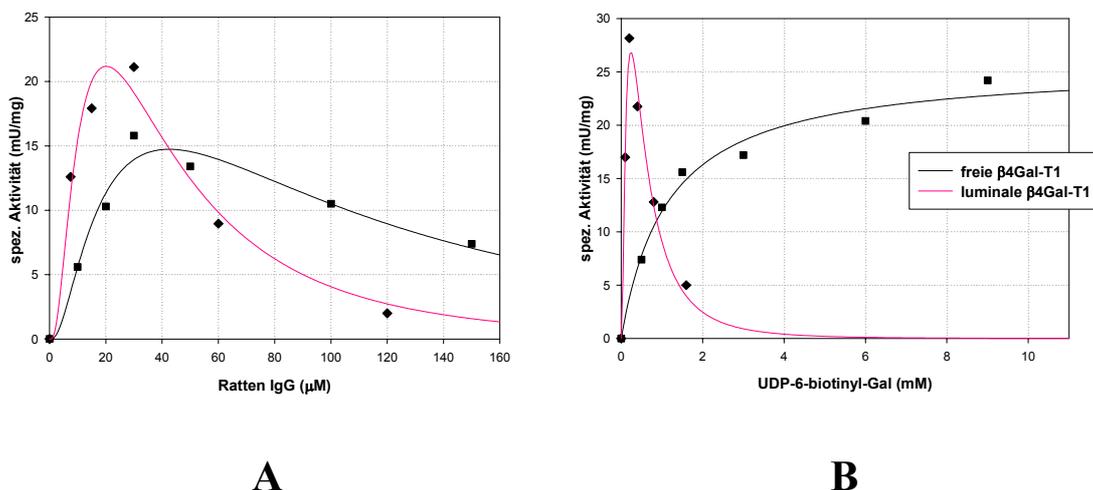


Abbildung 58: Kinetische Verläufe bei der Variation der Akzeptorkonzentration (A) und der Donorkonzentration (B) für den Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal (freie $\beta 4\text{Gal-T1}$ und luminale $\beta 4\text{Gal-T1}$) auf das IgG der Ratte (Molarität des IgG bezogen auf eine schwere Kette).

Bedingungen: freie $\beta 4\text{Gal-T1}$: 50 mM HEPES-Puffer pH 8,0; 1 mM MgCl_2 ; bei der Variation der Donorkonzentration betrug die konstante Akzeptorkonzentration 25 μM ; bei der Variation der Akzeptorkonzentration betrug die konstante Donorkonzentration 1,5 mM; **luminale $\beta 4\text{Gal-T1}$:** 50 mM HEPES-Puffer pH 6,8; 1 mM MnCl_2 ; bei der Variation der Donorkonzentration betrug die konstante Akzeptorkonzentration 37,5 μM ; bei der Variation der Akzeptorkonzentration betrug die konstante Donorkonzentration 0,4 mM; **Reaktionstemperatur: 37°C, die Aktivitätsmessung erfolgte über den Photometertest (Kapitel E 1.2.2).**

C Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 16: Kinetische Konstanten bei der Variation der Akzeptorkonzentration (A) und der Donorkonzentration (B) für den Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal (freie β 4Gal-T1 und luminale β 4Gal-T1) auf das IgG der Ratte. Die Bedingungen der zugrunde liegenden Messungen sind bei Abbildung 58 beschrieben.

	Variation der Konzentration des Donors UDP-6-biotinyl-Gal			Variation der Konzentration des Akzeptors IgG der Ratte		
	V_{\max} [mU/mg]	K_M [mM]	K_{is} [mM]	V_{\max} [mU/mg]	K_M [μ M]	K_{is} [μ M]
freie β4Gal-T1	25,7 $\pm 1,5$	1,2 $\pm 0,2$	-	14,7 $\pm 1,0$	3,4 $\pm 1,0$	143,9 $\pm 1,0$
Luminale β4Gal-T1	26,8 $\pm 1,3$	0,08 $\pm 0,01$	0,75 $\pm 0,01$	21,2 $\pm 1,6$	7,1 $\pm 1,6$	56,7 $\pm 1,6$

Schaut man sich zuletzt noch den Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal auf das IgG der Ratte an, so zeigen sich freie und luminale β 4Gal-T1 in bezug auf den V_{\max} -Wert sehr ähnlich. Der Unterschied der kinetischen Verläufe besteht allerdings darin, dass bei der freien β 4Gal-T1 für das Donorsubstrat eine Michaelis-Menten-Kinetik, bei der luminalen β 4Gal-T1 aber eine Substratüberschußinhibition vorliegt. Dies führt zu einem erheblich geringeren K_M -Wert für die luminale β 4Gal-T1. Vergleicht man die V_{\max} -Werte für die Reaktion des modifizierten Substrats mit jenen von UDP-Gal beim Transfer auf Ratten IgG, so liegen jene für UDP-6-biotinyl-Gal deutlich niedriger. Allerdings ist der Unterschied erheblich geringer als beim Transfer auf GlcNAc β 1-Bn. Wurde dort nur ca. 1% des V_{\max} -Wertes der Reaktion mit dem natürlichen Substrat erreicht, sind es hier ca. 15%. Offenbar kommt hier zum Tragen, dass die Modifizierung des Donorsubstrats die ohnehin kinetisch nicht sonderlich günstige Transfer-Reaktion auf das IgG der Ratte nicht deutlich beeinträchtigt.

Enzym der Wahl zur selektiven Markierung von IgG ist somit die freie β 4Gal-T1. Zwar erreicht das luminale Konstrukt dieselbe Reaktionsgeschwindigkeit, doch ist die freie β 4Gal-T1 aufgrund der Michaelis-Menten-Abhängigkeit des kinetischen Verlaufs im Vorteil. So kann jederzeit eine hohe Konzentration des modifizierten Donorsubstrats eingesetzt werden, um eine möglichst hohe Ausbeute bei Experimenten zur selektiven Markierung zu erhalten.

C Ergebnisse und Diskussion

Eine nach Abschluss der eigenen experimentellen Arbeiten für diese Dissertation durchgeführte Gesamt-Sequenzierung der verschiedenen Konstrukte der β 4Gal-T1 sowie der Mutante ergab, dass in einigen Konstrukten ungewollte Punktmutationen vorliegen. Dem Verfasser dieser Arbeit waren die Konstrukte der β 4Gal-T1 mit einer in der Laborpraxis üblicherweise ausreichenden N-terminalen Teil-Sequenzierung überlassen worden. Dieses Verfahren war auch bei der Mutante angewendet worden. Die Gesamtsequenz der freien β 4Gal-T1 zeigte sich als mutationsfrei. Die Sequenz des luminalen Konstrukts trägt einen nicht konservativen Austausch N214D (Aminosäurezählung siehe Abbildung 43). Die Sequenz der His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 enthält lediglich einen zu vernachlässigenden konservativen Austausch I210V. Die Sequenz der Mutante des Fusionsproteins besitzt die gewollte Mutation Y284L, den konservativen Austausch I210V sowie einen nicht konservativen Austausch T114A.

In wieweit die nicht konservativen Austausche die Ergebnisse dieser Arbeit beeinträchtigen, kann nicht abschließend beantwortet werden. Die Wahrscheinlichkeit einer Beeinträchtigung sollte jedoch relativ gering sein. Keiner der Austausche liegt in einem für die Donor- oder Akzeptorbindung wichtigen Aminosäure-Bereich. Auch die Metallionbindungsstelle ist nicht betroffen. Sie wurde beim bovinen Enzym als Met344 identifiziert (Ramakrishnan *et al.* 2004), was beim humanen Enzym Met339 entspricht. Abschließende Sicherheit über den Einfluss der ungewollt eingeführten Mutationen würde erst eine Rückmutation geben. Diese war allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

6 Spezifische Markierung der N-Glykanketten des Immunglobulin G als Beispiel krankheitsrelevanter Glykoproteine

Das Kernthema der hier vorliegenden Arbeit war die selektive Markierung von Glykokonjugaten. Als entscheidendes Ziel war dabei die selektive Markierung krankheitsrelevanter Glykoproteine anzusehen. Hierbei sollte ein selektiver Transfer sowie eine leicht zu handhabende Nachweis-Technik etabliert werden. In der Zukunft sollte mit den in dieser Arbeit gewonnenen Daten ein diagnostischer Test zu entwickeln sein.

Als Glykokonjugat der Wahl zu Verwirklichung dieser Ziele erwies sich das Immunglobulin G (IgG).

IgG besitzt folgende Eigenschaften:

- kommerziell auch in hoher Reinheit leicht verfügbar
- die Glykanstrukturen wurden bereits eingehend charakterisiert
- aufgrund seiner Assoziation mit Rheumatoider Arthritis (RA) und anderen Autoimmun-krankheiten (Kapitel A 4.4.3) von großem wissenschaftlichem Interesse
- die Unterschiede in der N-Glykan-Untergalactosylierung verschiedener Spezies (Raju *et al.* 2000) können als Modell für die RA dienen, daher keine Notwendigkeit zum Einsatz von Patienten-Serum zu Beginn der Arbeiten

Im Folgenden sollen zunächst die mit einer Analytik auf Lektin-Basis erzielten Ergebnisse zur Detektion der Untergalactosylierung von IgG vorgestellt werden. Nachfolgend wird die Vorgehensweise beim selektiven Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal für die beiden humanen β 4Gal-T1-Konstrukte freie β 4Gal-T1 und luminale β 4Gal-T1 geschildert. Auch bovine β 4Gal-T1 wurde getestet. Es folgt eine Ausführung über die zum Nachweis des selektiven Transfers entwickelte ELSA-Technik. Abschließend soll ein Verfahren zur Quantifizierung der Biotinylierung von IgG beschrieben werden.

6.1 Nachweis der IgG-Untergalactosylierung durch einen Lektin-Assay

Raju *et al.* untersuchten die Glykanstrukturen der N-Glykane der IgG verschiedener Spezies im gesunden Zustand mithilfe von Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) sowie Kapillarelektrophorese (CE-LIF) (Raju *et al.* 2000). Die Ergebnisse hinsichtlich der Galactosylierung der IgGs von gesunder Ratte, Pferd, Maus, Huhn und dem Menschen sind in Abbildung 59 dargestellt. Die in der Abbildung angegebenen Prozentzahlen entsprechen dabei jeweils dem Anteil an den gesamten neutralen (d.h. nicht sialylierten) N-Glykanstrukturen des IgG einer Spezies. Hierbei ist zwischen jenen biantennären N-Glykanen zu unterscheiden, die an beiden Antennae keine Galactose tragen (G0-Strukturen) und jenen, die an einer Antenne galactosyliert sind (G1-Strukturen). Eine Übersicht über alle bei den IgG-N-Glykanen möglichen neutralen Strukturen (s. Abb. 14) und eine Erläuterung der Begriffe von G0, G1 und G2 ist in Kapitel A 4.4.3 gegeben.

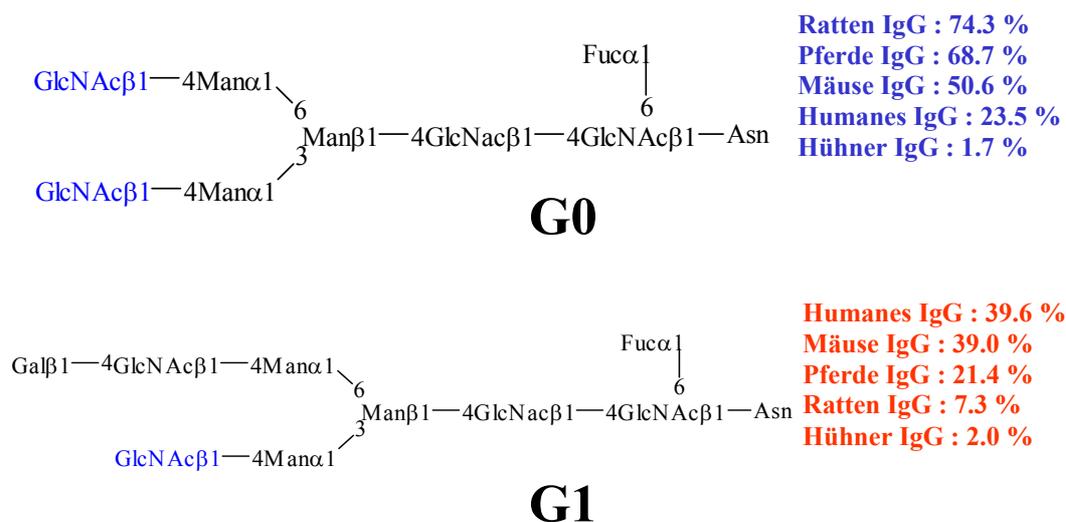


Abbildung 59: Spezies-spezifische Variation der Untergalactosylierung von IgG (neutrale N-Glykane).

Die relativen Mengen der G0- und G1-Strukturen wurden per MS und CE-LIF ermittelt (Raju *et al.* 2000).

Es fällt eine deutliche Spezies-spezifische Variation bei der Galactosylierung des nicht-krankheitsassoziierten IgG auf. Besonders niedrig ist die Quote der Galactosylierung bei der Ratte, bei der 74,3% aller IgG-N-Glykane G0-Strukturen darstellen. Am anderen Ende der Skala befindet sich das Huhn, das mit nur 1,7% G0 und 2,0% G1-Strukturen eine fast

C Ergebnisse und Diskussion

komplette Galactosylierung aufweist. Diese spezies-spezifische Variation sollte im Rahmen dieser Arbeit als Modell zur Untersuchung dienen, ob mithilfe des selektiven Transfers von UDP-6-biotinyl-Gal Unterschiede in der Galactosylierung von IgG zu erkennen sind. Es sollte zunächst jedoch eine Lektin-Analytik etabliert werden, um im eigenen Labor die Ergebnisse von Raju *et al.* nachzuvollziehen. Hiermit wurde eine zur selektiven Markierung ergänzende Methode eingeführt. So wurde ein Vergleich mit und eine Kontrolle der später dargestellten Ergebnisse des selektiven Transfers von UDP-6-biotinyl-Gal möglich.

Lektin-Analytik wurde bereits zur Charakterisierung der IgG-N-Glykane verwendet (Bond *et al.* 1997). Hierbei wurden biotinylierte Lektin-Enzymkonjugate genutzt, die über einen Blot nachgewiesen wurden. Es wurden Lektine zum Nachweis von Gal und GlcNAc benutzt.

Das in dieser Arbeit verwendete Lektin entstammt *Triticum vulgare*, dem Weizen, und ist das Agglutinin aus dem Weizen-Keim. Abgekürzt wird es WGA (eng.: **W**heat **G**erm **A**gglutinin). Es besitzt eine Spezifität für GlcNAc, vor allem in den Disacchariden GlcNAc β 1,6Gal und GlcNAc β 1,4GlcNAc, erkennt aber auch das Monosaccharid (Muraki *et al.* 2002).

Der in dieser Arbeit beschriebene Lektin-Assay wurde im Mikrotiterplatten-Format entwickelt (Kapitel E 7.1). Hierbei wurde zunächst das IgG auf der Platte immobilisiert, bevor die Inkubation mit einem Lektin-Peroxidase-Konjugat erfolgte. Die Peroxidase wurde wiederum von ortho-Phenylendiamin (OPD) durch Bildung eines nach Abstoppen mit Schwefelsäure gelb-braunen Farbstoffs detektiert.

Zur Überprüfung der prinzipiellen Funktion wurde ein Lektin-Assay mit dem IgG aus Ratte, Mensch und Huhn durchgeführt, welches mit 74,3%, 23,5% und 1,7% an G0-Strukturen sowie 7,3%, 39,6% und 2,0% an G1-Strukturen laut Raju *et al.* ein hohes, mittleres und sehr geringes Maß an Untergalactosylierung zeigt. Aufgrund der somit großen Unterschiede im Maß der Untergalactosylierung sollten sich hier deutliche Ergebnisse im Assay zeigen. Abbildung 60 zeigt das Ergebnis.

C Ergebnisse und Diskussion

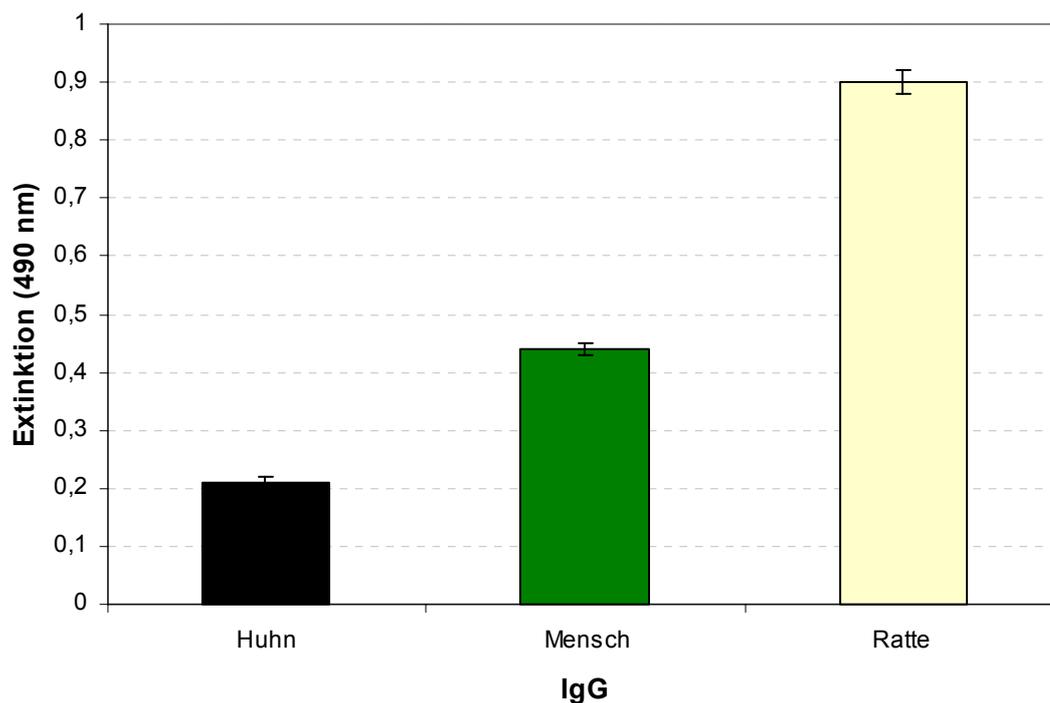


Abbildung 60: WGA-Lektin-Assay mit IgG aus Huhn, Ratte und dem Menschen. Bedingungen: der Assay erfolgte im Mikrotiterplattenformat, das IgG (0,15 mg in 200 μ l) wurde in PBS-Puffer vorgelegt, über Nacht immobilisiert und über ein Lektin-Peroxidase-Konjugat nachgewiesen.

Das Ergebnis des Lektin-Assays stimmt qualitativ mit der von Raju *et al.* gefundenen Reihenfolge der Untergalactosylierung von Ratte>Mensch>Huhn überein. Eine quantitative Übereinstimmung war von vornherein nicht zu erwarten, da die physikalischen Meßtechniken des MS und der CE nicht mit der Protein (Lektin)-Wechselwirkung mit einem Zucker vergleichbar sind.

Da die prinzipielle Funktion des Lektin-Assays erfolgreich gezeigt worden war, wurde er auch für das IgG aus Ratte, Pferd und Maus durchgeführt. Diese IgGs liegen bezogen auf ihre Untergalactosylierung deutlich enger beieinander. Laut Raju *et al.* sind es bei Ratte, Pferd und Maus 74,3%, 68,7% und 50,6% an G0 sowie 7,3%, 21,4% und 39,0% an G1-Strukturen. Die folgende Abbildung 61 zeigt das Ergebnis des Lektin-Assays.

C Ergebnisse und Diskussion

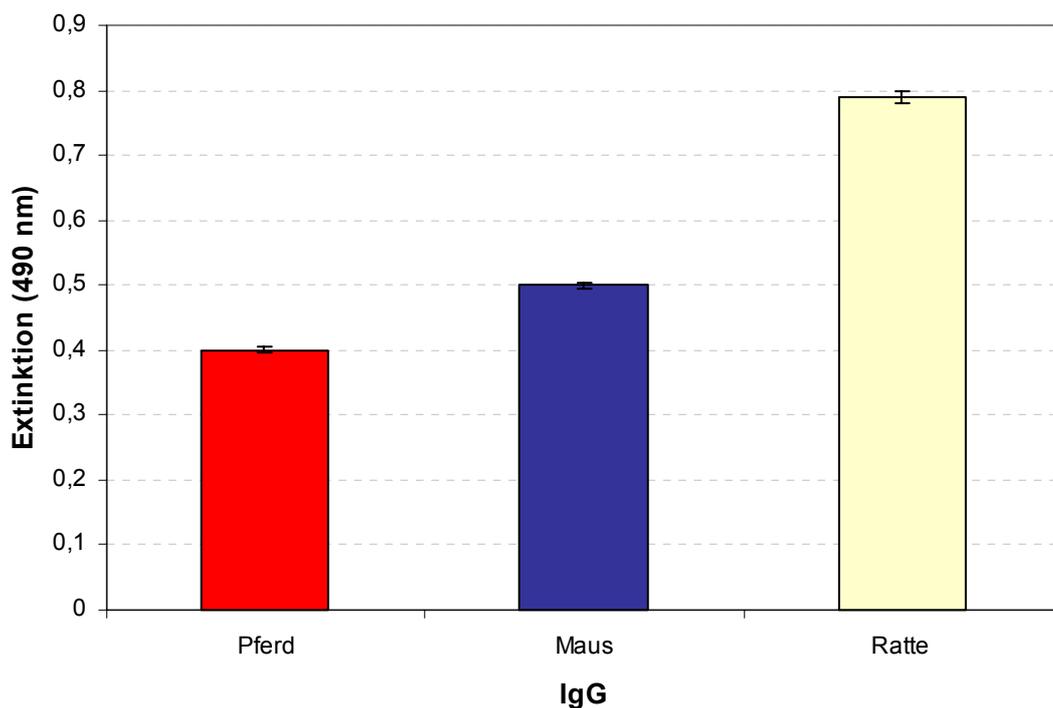


Abbildung 61: WGA-Lektin-Assay mit IgG aus Pferd, Maus und Ratte. Bedingungen: der Assay erfolgte im Mikrotiterplattenformat, das IgG (0,15 mg in 200 μ l) wurde in PBS-Puffer vorgelegt, über Nacht immobilisiert und über ein Lektin-Peroxidase-Konjugat nachgewiesen.

Für den Fall des IgG von Pferd, Maus und Ratte konnte der Lektin-Assay erneut einen Unterschied in der Untergalactosylierung feststellen. Die Reihenfolge, die Raju *et al.* feststellen konnte, konnte mit der im Lektin-Assay gesehene Abfolge Ratte>Maus> Pferd allerdings nicht in Übereinstimmung gebracht werden. Es spielte dabei keine Rolle, ob man nur die auf beiden Antennae GlcNAc tragende Struktur zugrunde legt oder auch jene, die einseitig galactosyliert ist.

Es muss allerdings gesagt werden, dass man nicht davon ausgehen kann, dass die von Raju *et al.* und in dieser Arbeit benutzten IgG-Chargen identisch sind. Die Mikroheterogenität des Glykoproteins IgG, also das unterschiedliche häufige Auftreten von Glykoformen, sollte einen entscheidenden Faktor zum Ergebnis beitragen.

In jedem Fall war eine Analytik zur Unterscheidung von agalacto-Strukturen etabliert worden, die nun einen Vergleich mit den noch zu besprechenden Ergebnissen des selektiven Transfers von UDP-6-biotinyl-Gal ermöglichte. Beide Verfahren sind dabei unabhängig voneinander zu sehen und nur einem relativen qualitativen Vergleich zu unterziehen.

6.2 Selektiver Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal(NAc) auf IgG

IgG aus der Ratte wurde, da es im Lektin-Assay die höchste Untergalactosylierung gezeigt hatte, als Modellprotein für die Entwicklung eines Assays zur selektiven Markierung mit UDP-6-biotinyl-Gal verwendet.

Betrachtet man noch einmal das molekulare Modell des IgG Fc-Teils (Abbildung 62), so wird klar, dass durch die ungünstige Lage der N-Glykanketten an der Innenseite des Moleküls die Zugänglichkeit für die Galactosyltransferase deutlich erschwert ist. Könnte man diese Zugänglichkeit erhöhen, sollte es möglich sein, bessere Transferraten mit UDP-6-biotinyl-Gal auf die IgG-N-Glykane zu erzielen.

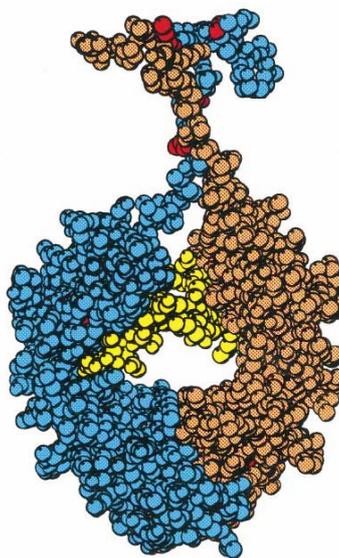


Abbildung 62: Molekulares Modell des IgG Fc-Fragments.

Dargestellt sind die schweren Ketten (blau und orange), die Cysteine (rot) sowie die Glykane (gelb; aus Mattu *et al.* 1998).

Eine Erhöhung der Zugänglichkeit für die Galactosyltransferase sollte durch Reduktion der zwei zwischen den beiden schweren Ketten sowie der je einen zwischen schwerer und leichter Ketten vorliegenden Disulfidbrücken des IgGs erreichbar sein. Das IgG-Molekül wird so in zwei einzelne schwere und leichte Ketten gespalten. Die N-Glykane sind nun nicht mehr im Raum zwischen den beiden schweren Ketten "gefangen". Sie sind für die Transferase nun in guter Erreichbarkeit. Um die Reduktion abzusichern, müssen die freien SH-Gruppen noch durch Alkylierung blockiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierzu Iodoacetamid verwendet. Abbildung 63 zeigt das Prinzip der IgG-Reduktion.

C Ergebnisse und Diskussion

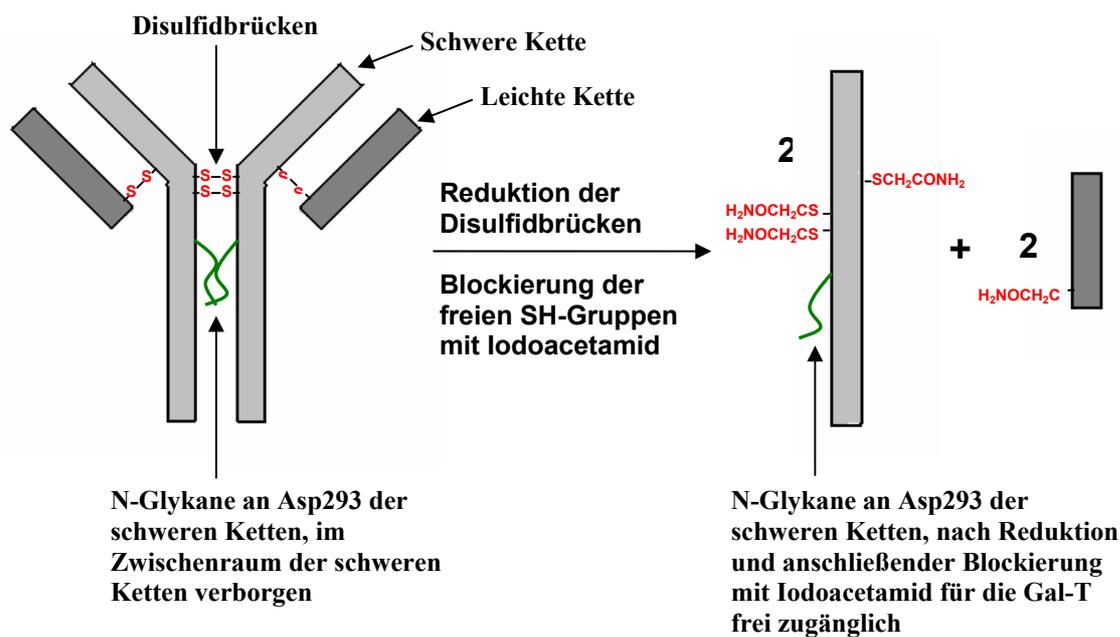


Abbildung 63: Reduktion und Blockierung des IgG-Moleküls.

Die Experimente zum selektiven Transfers von UDP-6-biotinyl-Gal wurden zunächst mit und ohne Reduktion des IgG durchgeführt, um den Einfluss der Reduktion auf das Transferergebnis zu testen. Die Reduktion warf für die Transferreaktion ein Problem auf. Das zur Reduktion benutzte Mercaptoethanol würde auch die Disulfidbrücken der Galactosyltransferase reduzieren und das Enzym inaktivieren. Aus diesem Grund wurde das Mercaptoethanol und hierbei auch das Iodoacetamid nach Reduktion und Blockierung mehrfach per Ultrafiltration entfernt, um eine quantitative Abtrennung des Reduktionsmittels zu gewährleisten. Hierauf konnte der Transfer auf die nun frei zugänglichen N-Glykane des IgG erfolgen. Der Photometer-Aktivitätstest hatte ergeben, dass von den Konstrukten der humanen β 4Gal-T1 nur die freie und luminale β 4Gal-T1 UDP-6-biotinyl-Gal auf IgG übertragen (s. Kapitel C 5.1). Eine Aktivität mit der kommerziell erhältlichen bovinen β 4Gal-T1 (rekombinant in Insektenzellen produziert) konnte nicht detektiert werden. Hierbei ist über das Molekulargewicht bekannt, dass das kommerziell erhältliche Konstrukt zum luminalen Konstrukt des humanen Enzyms korrespondieren müsste. Es kann dennoch nicht generell ausgeschlossen werden, dass nicht ein anderes Konstrukt der bovinen β 4Gal-T1 die betrachte Reaktion katalysiert. Eine Übertragung von UDP-6-biotinyl-GalNAc mit der Mutante His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L) fand nicht statt. Die ersten Experimente der Übertragung von UDP-6-biotinyl-Gal auf IgG konnten nicht

C Ergebnisse und Diskussion

erfolgreich analysiert werden. Direkte Immobilisierung des markierten IgG auf Mikrotiter-Platten sowie im Western-Blot gab auch mit jenen Kontrollen positive Resultate, bei denen kein Enzym in der Transfer-Reaktion vorlag. Die Reinheit des biotinylierten Zuckers war zweifelsfrei nachgewiesen worden und konnte nicht als Ursache herangezogen werden. Es mußte von einer unselektiven Aggregation des hydrophoben Substrats UDP-6-biotinyl-Gal an IgG ausgegangen werden. Diese unselektive Aggregation musste so stark sein, dass sie auch durch Ultrafiltration und nachfolgende Waschschriffe (mit TBS-Tween-Puffer) beim Abstoppen der Transferreaktion nicht überwunden wurde. Das Vorliegen von freiem, unumgesetztem UDP-6-biotinyl-Gal, welches aufgrund seiner Hydrophobizität an Mikrotiterplatten binden würde, konnte ausgeschlossen werden. Der modifizierte Zucker hätte nur dann noch vorliegen können, wenn die beschriebene Ultrafiltration ihn in seiner nicht an IgG aggregierten Form nicht quantitativ hätte entfernen können. Proben ohne Akzeptorsubstrat, die bei Versagen der Ultrafiltration in jedem Fall freies UDP-6-biotinyl-Gal hätten enthalten müssen, zeigten aber weder im ELSA-Test noch im Blot ein positives Signal. Betrachtet man die Vorgehensweise des ELSA-Tests, so wird zunächst das IgG immobilisiert und im Folgenden nach zwischenzeitlichem Blocking das vorhandene Biotin mit einem Streptavidin-Konjugat nachgewiesen. Zwischen Immobilisierung und Blocking liegt ein Wasch-Schritt (auch hier TBS-Tween-Puffer), bei dem die nicht immobilisierten Substanzen von der Platte entfernt werden. Dieser Wasch-Schritt war offensichtlich ebenfalls nicht ausreichend, um die unselektive Bindung des UDP-6-biotinyl-Gal an das IgG zu verhindern. Um das Problem der Aggregation des hydrophoben UDP-6-biotinyl-Gal an IgG und somit unselektiver Markierungssignale zu beheben, wurde der zum Nachweis genutzte ELSA-Test umgestellt. Es wurde ein sogenannter Sandwich-Assay durchgeführt (Kapitel E 7.4). Das Prinzip ist in Abbildung 64 erläutert.

C Ergebnisse und Diskussion

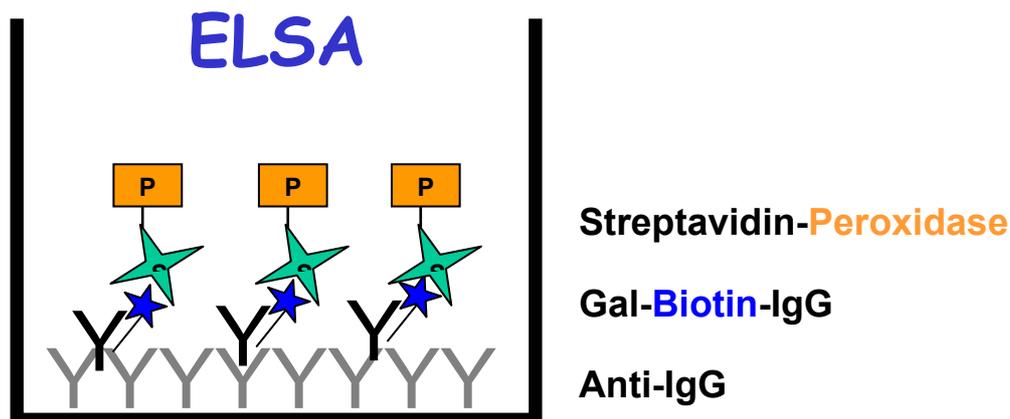


Abbildung 64: Sandwich-ELSA für den Nachweis von selektiv markiertem IgG.

Nach Vorlegen eines Anti-Antikörpers gegen IgG wird das biotinylierte IgG aufgebracht und mit Streptavidin-Peroxidase nachgewiesen. Der Anti-IgG-Antikörper tätigt eine hochspezifische Bindung an das IgG, so dass das unspezifisch am IgG haftende UDP-Gal-Biotin durch Waschen mit TBS-Tween entfernt werden kann.

Hierbei wird die Mikrotiter-Platte zunächst mit einem Anti-IgG Antikörper gegen das gesamte IgG-Molekül (im Fall des nicht reduzierten IgG) oder gegen die schwere Kette (im Fall des reduzierten IgG) belegt. Der Einsatz des Anti-IgG-Antikörpers führt dazu, dass es nach Zugabe der Transfer-Probe zu einer hochspezifischen Bindung von IgG-Molekülen durch den Anti-Antikörper kommt. Diese Bindung stellte sich hierbei als so spezifisch heraus, dass das noch am IgG-Molekül haftende UDP-Gal-Biotin mit TBS-Tween-Puffer gewegewaschen werden konnte. So konnte ein unselektiver Nachweis ausgeschlossen werden. Zugleich erhöht die Bindung des Immunglobulins an das Anti-IgG die Empfindlichkeit des Nachweises. Das am Anti-IgG immobilisierte selektiv markierte IgG wird mit einem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat inkubiert und über eine Farbreaktion mit *o*-Phenylendiamin (OPD) nachgewiesen. Der nach Abstoppen der Farbreaktion entstehende Komplex zeigt eine im Photometer messbare Extinktion bei 490 nm.

Der Sandwich-ELSA-Test erbrachte für die freie β 4Gal-T1 und die luminale β 4Gal-T1 den gewünschten Erfolg. Es konnte der prinzipielle Beweis für die selektive Markierung des Ratten IgG erbracht werden. Sämtliche Negativkontrollen, die entweder kein Enzym, keinen Akzeptor oder den Donor UDP-Gal anstelle des biotinylierten Donors enthielten, zeigten keinen bis sehr schwachen Hintergrund. Abbildung 65 zeigt zunächst einmal das Ergebnis des Sandwich-ELSA am Beispiel des Transfers auf natives IgG mit der freien β 4Gal-T1.

C Ergebnisse und Diskussion

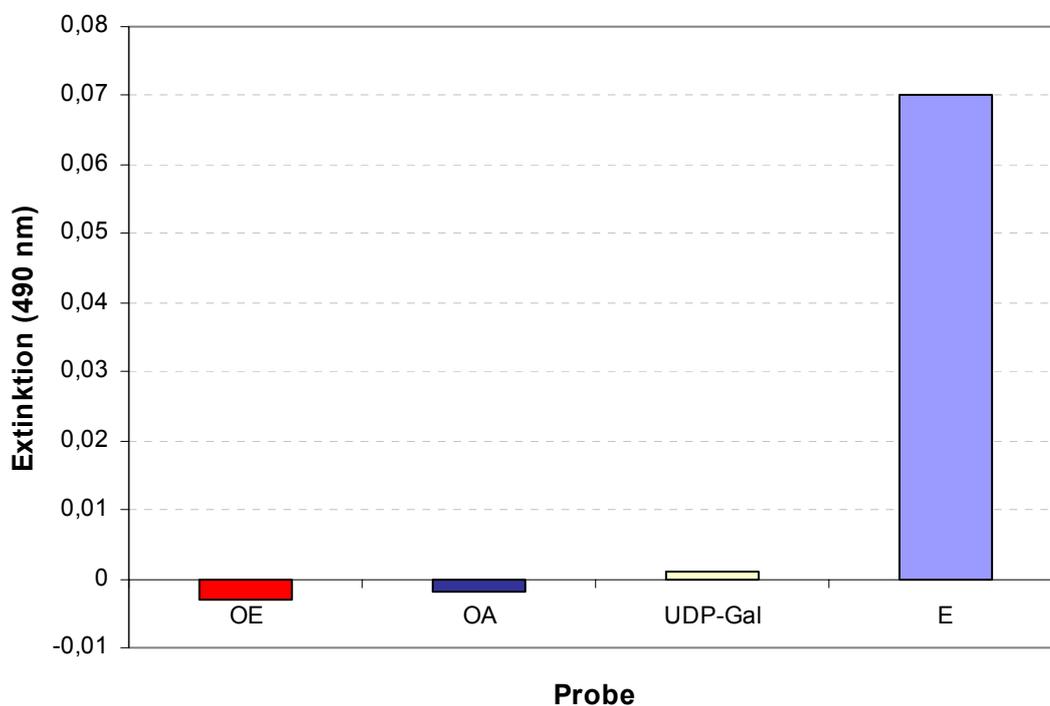


Abbildung 65: Ergebnisse des Sandwich-ELSA für den Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal auf natives Ratten IgG mit der freien β 4Gal-T1.

Es bedeutet: OE: Probe ohne Enzym, OA: Probe ohne Akzeptor, UDP-Gal: Probe mit UDP-Gal anstelle des biotinylierten Substrats, E: Transfer-Probe mit UDP-6-biotinyl-Gal, Akzeptor und Enzym; Bedingungen des Transfers: 25 mM Hepes-Puffer, pH 7,4; Konzentration des Donors: 1,5 mM UDP-6-biotinyl-Gal; Konzentration des Akzeptors: 1,5 mg/ml IgG; 50 mU/ml freie β 4Gal-T1, Reaktionsvolumen: 200 μ l, Reaktionszeit: 14 h, Reaktionstemperatur: 37°C; Bedingungen des Nachweises: Mikrotiterplattenformat, der Anti-Ratten-IgG-Antikörper gegen das Gesamtmolekül (0,15 mg in 200 μ l) wurde in TBS-Puffer vorgelegt, 8 h immobilisiert, danach erfolgte die Immobilisierung des IgG aus der Transferreaktion (in TBS-Tween, 0,03 mg IgG in 200 μ l), der Nachweis der Biotinylierung erfolgte über ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat.

Die Extinktion der Probe des selektiven Transfers war mit einer OD (490 nm) von ca. 0,07 für die freie β 4Gal-T1 sowie 0,06 für die luminale β 4Gal-T1 gering. Ratten IgG besaß laut den Ergebnissen des Lektin-Assays die höchste Rate der Untergalactosylierung der verschiedenen getesteten Spezies. Es stand zu befürchten, dass die bis dato etablierte Transfer- und Nachweis-Technik des selektiven Transfers ohne eine Reduzierung des IgG nicht in der Lage sein würde, die Untergalactosylierung des IgG weiterer Spezies

C Ergebnisse und Diskussion

nachzuweisen.

Abbildung 66 vergleicht die Ergebnisse des ELSA-Tests bei Transfer auf nicht-reduziertes und reduziertes IgG für die freie und die luminale β 4Gal-T1.

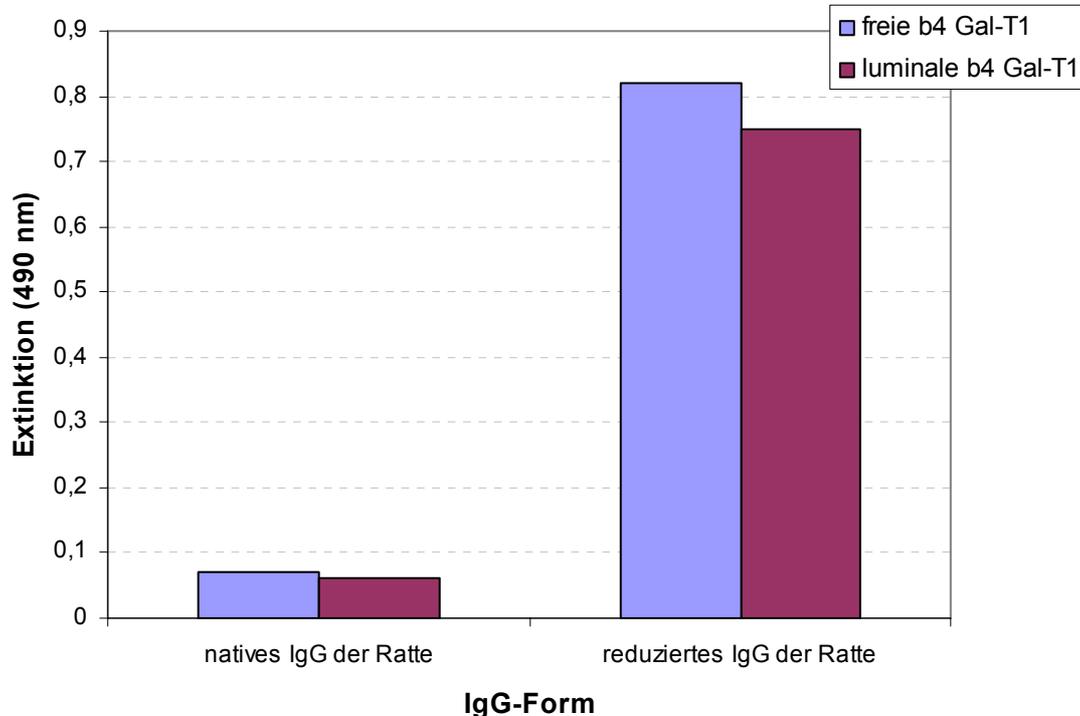


Abbildung 66: Ergebnisse des Sandwich-ELSA für den Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal auf natives und reduziertes IgG der Ratte mit der freien und der luminalen β 4Gal-T1.

Bedingungen des Transfers: 25 mM Hepes-Puffer, pH 7,4; Konzentration des Donors: 1,5 mM (freie β 4Gal-T1) und 0,5 mM (luminale β 4Gal-T1) UDP-6-biotinyl-Gal; Konzentration des Akzeptors: 1,5 mg/ml IgG; 50 mU/ml freie oder luminale β 4Gal-T1, Reaktionsvolumen: 200 μ l, Reaktionszeit: 14 h, Reaktionstemperatur: 37°C; Bedingungen des Nachweises: Mikrotiterplattenformat, der Anti-Ratten-IgG-Antikörper gegen das Gesamtmolekül oder die schwere Kette (0,15 mg in 200 μ l) wurde in TBS-Puffer vorgelegt, 8 h immobilisiert, danach erfolgte die Immobilisierung des IgG aus der Transferreaktion (in TBS-Tween, 0,03 mg IgG in 200 μ l), der Nachweis der Biotinylierung erfolgte über ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat.

Die Reduktion des IgG führte bei beiden Enzym-Konstrukten zu einer ca. zehnfachen Steigerung des Signals im Vergleich zum Nachweis des Transfers auf nicht reduziertes IgG. Der Grund hierfür muss in der besseren Zugänglichkeit der Glykane für die Galactosyltransferase zu suchen sein. Beide Enzymkonstrukte zeigten sich wie schon bei den kinetischen Messungen zum Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal auf das reduzierte und

C Ergebnisse und Diskussion

blockierte IgG der Ratte als fast gleichwertig. Aufgrund des leicht besseren Ergebnisses für die freie β 4Gal-T1 im Sandwich-ELSA sowie ihrer für IgG ohnehin günstigeren Kinetik (siehe Kapitel C 5.4) wurde dieses Enzym für die weiteren Arbeiten verwendet. Als nächstes Ziel wurde ins Auge gefasst, die Untergalactosylierung der IgG verschiedener Spezies mit der Technik des selektiven Transfers zu untersuchen.

6.2.1 Nachweis spezies-spezifischer Unter-Galactosylierung von IgG durch die Technik der glykosyltransferase-vermittelten selektiven Markierung

Die Unterschiede in der Untergalactosylierung der verschiedenen Spezies konnten mit der Strategie des selektiven Transfers aufgezeigt werden. Dabei wurde die gleiche qualitative Reihenfolge im Maß der Untergalactosylierung wie beim Lektin-Assay gesehen. Lediglich Das IgG des Pferdes und des Menschen haben bei den Ergebnissen den Platz getauscht; ihre Werte sind aber bei Lektin-Assay und Sandwich-ELSA jeweils sehr ähnlich. Es muss erwähnt werden, dass für die gerade beschriebenen Experimente der Anti-Antikörper gegen die schwere Kette des Ratten-IgG verwendet wurde. Um zu untersuchen, ob die erzielten Ergebnisse nicht durch eine geringere Bindung der neben der Ratte untersuchten Spezies an den Anti-Antikörper verfälscht wurden, wurden auch Human- und Huhn-Anti-Antikörper eingesetzt. Die Ergebnisse änderten sich gegenüber den mit dem Ratten-Anti-Antikörper erzielten in nicht signifikanter Weise. Aus diesem Grund wird auf die graphische Darstellung der mit den beiden Kontroll-Anti-Antikörpern erzielten Ergebnisse verzichtet.

Die folgenden Abbildungen 67 und 68 zeigen die Ergebnisse des Sandwich-ELSA mit dem Anti-Antikörper gegen die schwere Kette des Ratten IgG.

C Ergebnisse und Diskussion

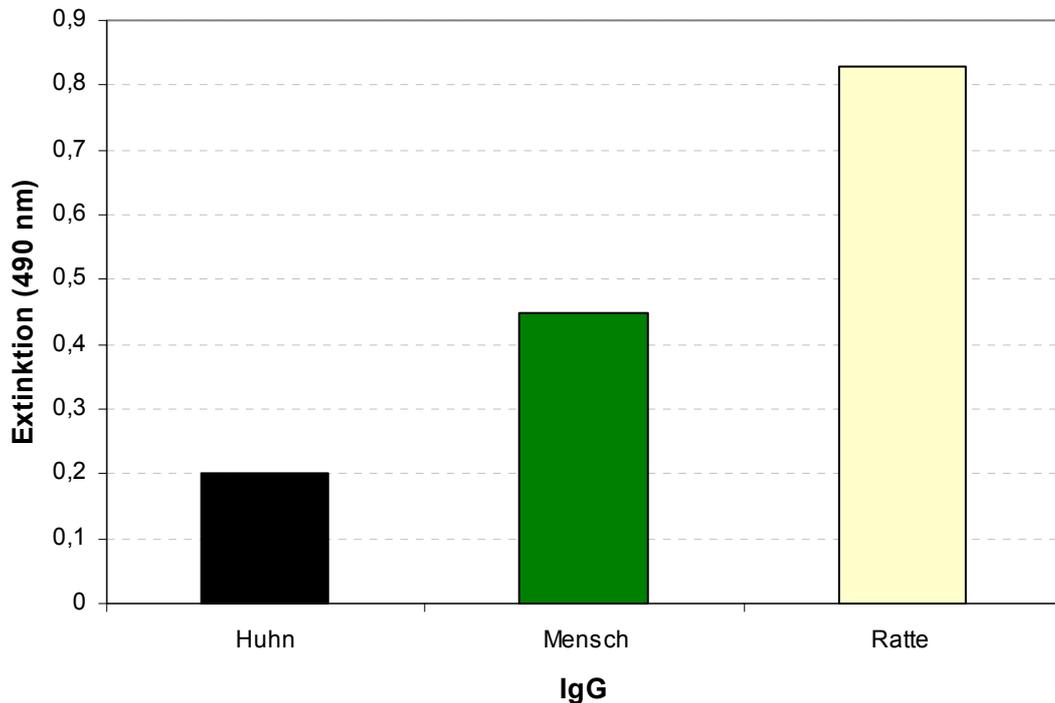


Abbildung 67: Ergebnisse des Sandwich-ELSA für den Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal mit freier β 4Gal-T1 auf reduziertes IgG aus Huhn, Mensch und Ratte.

Bedingungen des Transfers: 25 mM HEPES-Puffer, pH 7,4; Konzentration des Donors: 1,5 mM (freie β 4Gal-T1) UDP-6-biotinyl-Gal; Konzentration des Akzeptors: 1,5 mg/ml IgG; Konzentration der freien β 4Gal-T1: 50 mU/ml, Reaktionsvolumen: 200 μ l, Reaktionszeit: 14 h, Reaktionstemperatur: 37°C; Bedingungen des Nachweises: Mikrotiterplattenformat, der Anti-Ratten-IgG-Antikörper gegen die schwere Kette des IgG (jeweils 0,15 mg in 200 μ l) wurde in TBS-Puffer vorgelegt, 8 h immobilisiert, danach erfolgte die Immobilisierung des IgG aus der Transferreaktion (in TBS-Tween, 0,03 mg IgG in 200 μ l), der Nachweis der Biotinylierung erfolgte über ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat.

C Ergebnisse und Diskussion

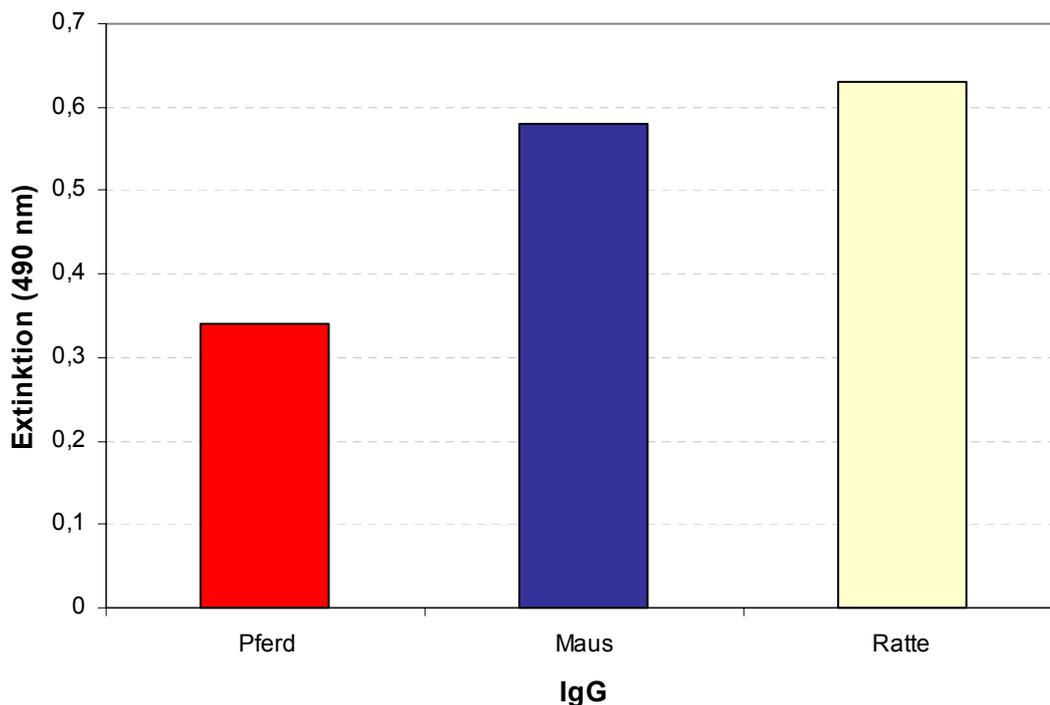


Abbildung 68: Ergebnisse des Sandwich-ELSA für den Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal mit freier β 4Gal-T1 auf reduziertes IgG aus Pferd, Maus und Ratte.

Bedingungen des Transfer und Nachweises: s. Abbildung 67.

Die Unterscheidbarkeit der Untergalactosylierung der verschiedenen Spezies durch selektiven Transfer muss als ein sehr wichtiges Ergebnis im Hinblick auf eine mögliche Untersuchung von RA-Patienten-Serum und der Etablierung eines diagnostischen Tests gewertet werden.

In der folgenden Tabelle 17 werden die Extinktionsverhältnisse der Signale der verschiedenen Spezies aus Lektin-Assay und Sandwich-ELSA verglichen. Der Wert für Ratten IgG als Spezies mit dem höchsten Signal in beiden Verfahren wird dabei auf 100% gesetzt.

Es gilt :

$$\frac{E_{(\text{IgG}_{\text{Spezies}})}}{E_{(\text{IgG}_{\text{Ratte}})}} = 1 \times 100 = 100\%$$

mit $E_{(\text{IgG}_{\text{Ratte}})}$: Extinktion (490 nm) der Probe des Ratten-IgG in Lektin-Assay oder Sandwich-ELSA.

C Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 17: Vergleich der Extinktionsverhältnisse der verschiedenen Spezies bei Lektin-Assay und selektivem Transfer.

Spezies	Verhältnis der Extinktionen (%): Lektin-Assay	Verhältnis der Extinktionen (%): Selektiver Transfer
Ratte	100	100
Maus	63	92
Pferd	51	54
Mensch	53	49
Huhn	24	22

Bis auf die Probe des IgG aus Maus kommt es angesichts der in der Tabelle aufgelisteten Ergebnisse neben der qualitativen auch zu einer guten relativen quantitativen Übereinstimmung zwischen Lektin-Assay und Sandwich-ELSA. Die relative quantitative Übereinstimmung sollte nicht überbewertet werden, da beide Nachweisarten auf unterschiedlichen biologischen Mechanismen basieren. Es ist vor allem unklar, ob von der Lektin-Analytik alle freien GlcNAc-Stellen erkannt wurden. Für den selektiven Transfer auf die IgG-Fc N-Glykane mit UDP-6-biotinyl-Gal konnte in jedem Fall gezeigt werden, dass es zu einer fast quantitativen Auffüllung kommt (siehe Kapitel C 6.2.2). Es konnte grundsätzlich demonstriert werden, dass die Technik des selektiven Transfers zumindest eine mit der Lektin-Analytik gleichwertig zu nennende Methode darstellt.

6.2.2 Quantifizierung der Biotinylierung des IgG

Die Quantifizierung der Biotinylierung mußte auf indirektem Wege geschehen. So wurde überprüft, in wie weit nach einer Markierung der Glykane mit UDP-6-biotinyl-Gal noch eine Galactosylierung mit UDP-Gal vorgenommen werden konnte. Die Quantifizierung der noch übertragbaren UDP-Gal-Menge sollte über das Nebenprodukt der Transferreaktion, UDP, durchgeführt werden. Hierzu sollte eine RP-18-HPLC-Analytik ausgenutzt werden, die die Trennung von UDP-Gal, UDP-6-biotinyl-Gal und UDP erlaubte (s. Kapitel F 2.2). Gleichzeitig sollte das Experiment der Quantifizierung zur Kontrolle dafür dienen, dass UDP-6-biotinyl-Gal tatsächlich selektiv auf die N-Glykane des IgG transferiert worden war. Denn nur in diesem Fall würde sich eine Differenz zwischen biotinyliertem und

C Ergebnisse und Diskussion

unbehandelten IgG bei einer Übertragung von UDP-Gal ergeben. Ratten IgG wurde als IgG mit der höchsten Untergalactosylierung zur Optimierung der Quantifizierungsstrategie herangezogen.

Es soll nun zunächst die detaillierte Vorgehensweise geschildert werden: Es wurde eine Transferreaktion mit UDP-6-biotinyl-Gal auf reduziertes und blockiertes Ratten IgG durchgeführt. Nach Ultrafiltration wurde das IgG einer erneuten Transferreaktion, jetzt aber mit UDP-Gal, unterzogen. Nach Ultrafiltration dieser 2. Transferreaktion wurde das UDP enthaltende Filtrat um den Faktor 24 konzentriert und die UDP-Menge per HPLC bestimmt. Die UDP-Menge korrespondiert hierbei mit der Menge an übertragenem UDP-Gal im Verhältnis 1:1.

Für die Berechnung des Grades der Biotinylierung des IgG muss zunächst der Aufbau des Antikörpers erneut betrachtet werden. Man geht davon aus, dass eine schwere Kette eines IgG-Moleküls 1 N-Glykosylierungsstelle besitzt. Das N-Glykan besitzt seinerseits eine biantennäre Struktur. Diese kann theoretisch vollständig oder auch nur an einem Arm galactosyliert sein. Zur Vereinfachung soll aber von einer vollständig agalactosylierten Struktur ausgegangen werden, wie man sie beim Ratten IgG ja auch annähernd antrifft. So dürften fast nur die Strukturen G0, G0f, G0b und G0bf vorliegen (zur Erklärung dieser Abkürzungen s. Kapitel A 4.4.3). Da dies jeweils biantennäre agalactosylierte Strukturen sind, liegen am N-Glykan der schweren Kette je 2 freie GlcNAc-Reste vor. Ein mol der schweren Kette des IgG besitzt daher 2 mol GlcNAc. Daher sind auf diese 2 mol GlcNAc theoretisch je 2 mol UDP-6-biotinyl-Gal übertragbar. Da insgesamt 2 schwere Ketten pro ursprünglichem IgG-Molekül vorlagen, konnten maximal 4 mol GlcNAc selektiv markiert werden. Diese Betrachtungen gelten natürlich auch im Falle einer nicht vorher biotinylierten Struktur für UDP-Gal.

Setzt man diese theoretischen Überlegungen nun um, so muss zunächst die maximale Konzentration (mol UDP-Gal/mol schwere Kette des IgG) des auf eine nicht biotinylierte schwere Kette des IgG transferierbaren UDP-Gal bestimmt werden. Wie sich zeigte, war diese maximale Menge von der Konzentration des eingesetzten Enzyms abhängig. Wie schon bei den Versuchen zur Unterscheidbarkeit der Untergalactosylierung des IgG verschiedener Spezies wurde auch hier die freie β 4Gal-T1 verwendet. Wie oben bereits beschrieben, wurde zunächst die Konzentration des bei der Reaktion gebildeten UDP bestimmt. Hierbei entspricht jedes gebildete mol UDP einem transferierten mol UDP-Gal, so dass das Verhältnis mol UDP-Gal/mol schwere Kette des IgG gleichzusetzen ist mit dem Verhältnis mol UDP/mol schwere Kette des IgG. Letztendlich ist noch zu betrachten, dass 2 mol UDP-Gal/mol

C Ergebnisse und Diskussion

schwere Kette einer kompletten Galactosylierung, d.h. 100% Ausbeute entsprechen. In den folgenden Diagrammen sind daher stets Ausbeuten (in %) angegeben.

Es ergab sich bei Einsatz von Enzymkonzentrationen von 10 mU/ml, 20 mU/ml und 50 mU/ml folgendes Bild (Abbildung 69):

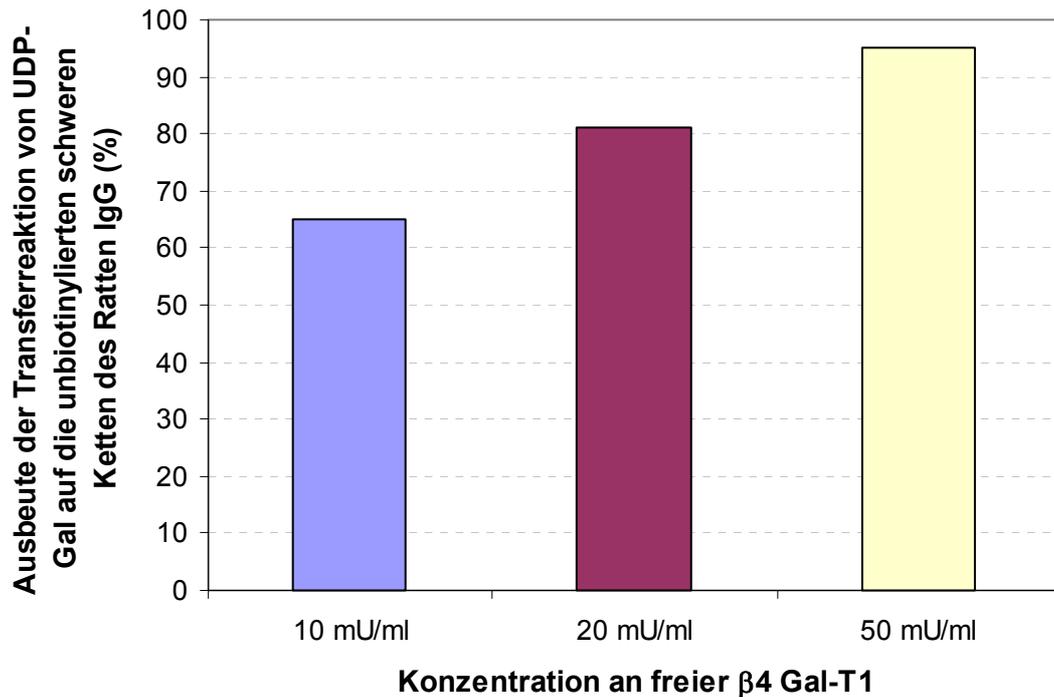


Abbildung 69: Quantifizierung der maximal mit der freien β 4Gal-T1 transferierbaren Menge von UDP-Gal auf die schweren Ketten des reduzierten und blockierten Ratten IgG. Die Ausbeuten beziehen sich auf die theoretisch zu markierende Menge an freiem GlcNAc.

Bedingungen: 25 mM Hepes-Puffer, pH 8,0; 1,5 mM UDP-6-biotinyl-Gal; 1,5 mg/ml reduziertes und blockiertes IgG; 10 mU/ml, 20 mU/ml und 50 mU/ml freie β 4Gal-T1, Reaktionsvolumen: 1,2 ml, Reaktionszeit: 14 h, Reaktionstemperatur: 37°C; nach der Ultrafiltration zum Beenden der Reaktion wurde das Filtrat auf 50 μ l einkonzentriert und die UDP-Konzentration per HPLC bestimmt (Methode F 2.2).

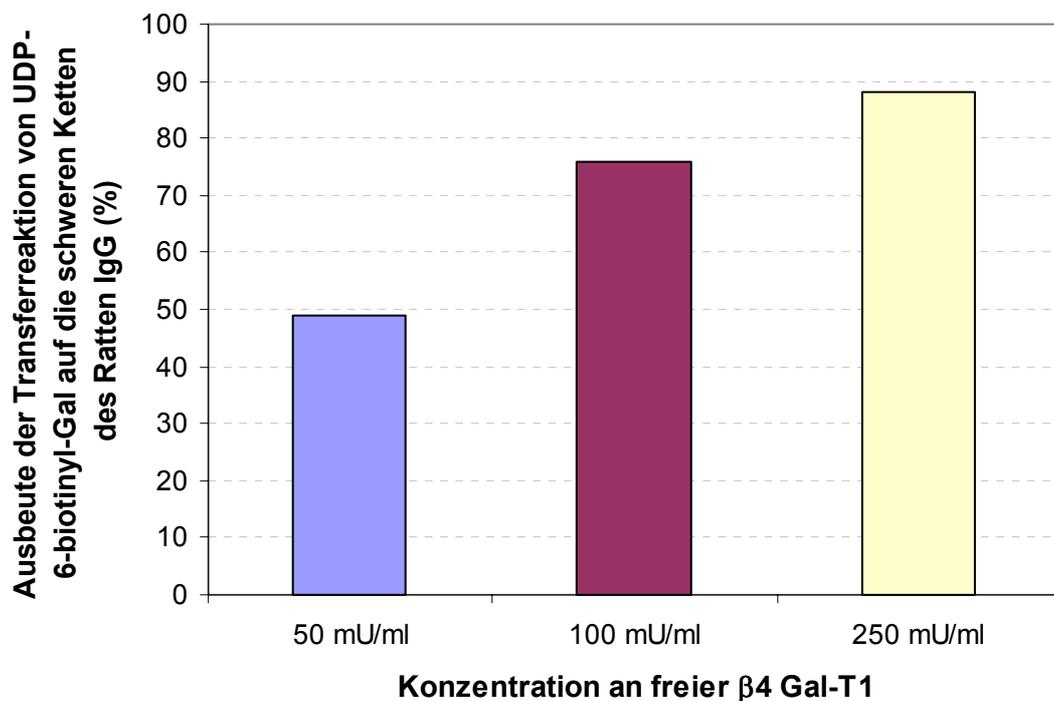
Es zeigten sich klare Unterschiede beim Einsatz verschiedener Enzymmengen. So konnte bei einer Verdopplung der Enzymkonzentration von 10 auf 20 mU/ml an freier β 4Gal-T1 immerhin ein Zuwachs von fast 20% an Ausbeute beobachtet werden. Mit der Erhöhung auf 50 mU/ml ergab sich eine Ausbeute von 95%. Das Vorliegen von vollständig

C Ergebnisse und Diskussion

agalactosylierten N-Glykane der schweren Kette des IgG war ja eine rein theoretische Überlegung. Daher sollte man davon ausgehen können, dass es sich mit 95% um die maximal zu erreichende Ausbeute beim Transfer von UDP-Gal handelte.

Mit diesen optimierten Bedingungen zum Transfer von UDP-Gal auf die schwere Kette des Ratten IgG sollte nun die Biotinylierung derselben Struktur quantifiziert werden. Die oben für UDP-Gal beschriebene Vorgehensweise zur Berechnung der Ausbeute der Transferreaktion ändert sich dabei nicht. Zunächst wird der Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal auf die schwere Kette des Ratten IgG durchgeführt. Hierauf erfolgt der Transfer von UDP-Gal auf die biotinylierte Struktur. Die darauf ausschließlich für die zweite Transferreaktion bestimmte UDP-Konzentration entspricht erneut mol UDP-Gal pro mol schwere Kette des IgG. Einer Ausbeute von 100% entsprechen dabei wieder 2 mol UDP-Gal/mol schwere Kette des IgG. Die Ausbeute der Biotinylierung selbst wird letztlich durch die Differenz der maximal ohne vorherige Biotinylierung erreichten Ausbeute, also 95% im Fall der schweren Kette des Ratten IgG, und der Ausbeute der Galactosylierungsreaktion auf biotinyliertes IgG angegeben.

Auch bei der Biotinylierungsreaktion wurden wieder verschiedene Konzentrationen der freien β 4Gal-T1 verwendet, es waren 50 mU/ml, 100 mU/ml und 250 mU/ml. Es zeigte sich folgendes Bild (Abbildung 70):



C Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 70: Quantifizierung der maximal mit verschiedenen Konzentrationen der freien β 4Gal-T1 transferierbaren Menge von UDP-6-biotinyl-Gal auf die schweren Ketten des reduzierten und blockierten Ratten IgG. Die Ausbeuten beziehen sich auf die theoretisch zu markierende Menge an freiem GlcNAc.

Bedingungen der 1. Transferreaktion: 25 mM Hepes-Puffer, pH 7,4; 1,5 mM UDP-6-biotinyl-Gal; 1,5 mg/ml reduziertes IgG; 50 mU/ml, 100 mU/ml und 250 mU/ml freie β 4Gal-T1, Reaktionsvolumen: 1,2 ml, Reaktionszeit: 14 h, Reaktionstemperatur: 37°C; nach Ultrafiltration zur Abtrennung des UDP und UDP-6-biotinyl-Gal erfolgte die 2. Transferreaktion analog zur 1., jedoch mit 1,5 mM UDP-Gal anstatt UDP-6-biotinyl-Gal und in allen 3 Ansätzen 250 mU/ml freier β 4Gal-T1; nach Ultrafiltration wurde das Filtrat auf 50 μ l einkonzentriert und die UDP-Konzentration per HPLC bestimmt (Methode F 2.2).

Die eingeschlagene Quantifizierungsstrategie war erfolgreich. Es zeigt sich deutlich, dass nach Biotinylierung keine so großen Mengen an UDP-Gal wie auf die unbiotinylierte schwere Kette des Ratten IgG mehr übertragen werden konnte. Wurde bei einem Einsatz von 50 mU/ml an freier β 4Gal-T1 für die Biotinylierungsreaktion nur knapp die Hälfte der verfügbaren GlcNAc-Reste markiert, waren es bei Verdopplung der Enzymkonzentration bereits gute 75%. Mit 250 mU/ml wurden sogar 88% an Biotinylierungsausbeute erreicht. Dies ist ein sehr wichtiges Ergebnis. Nur bei zumindest nahezu quantitativer Biotinylierung des IgG ist zu erwarten, dass auch feine Unterschiede der Untergalactosylierung bei der geplanten Diagnostik der RA erkannt werden können.

Die am Beispiel des Ratten IgG optimierte Quantifizierungsstrategie wurde auch mit den weiteren, schon bei der Lektin-Analytik und dem selektiven Transfer behandelten Spezies, durchgeführt. Die folgende Abbildung 71 zeigt zunächst die Ausbeute der Galactosylierungsreaktion.

C Ergebnisse und Diskussion

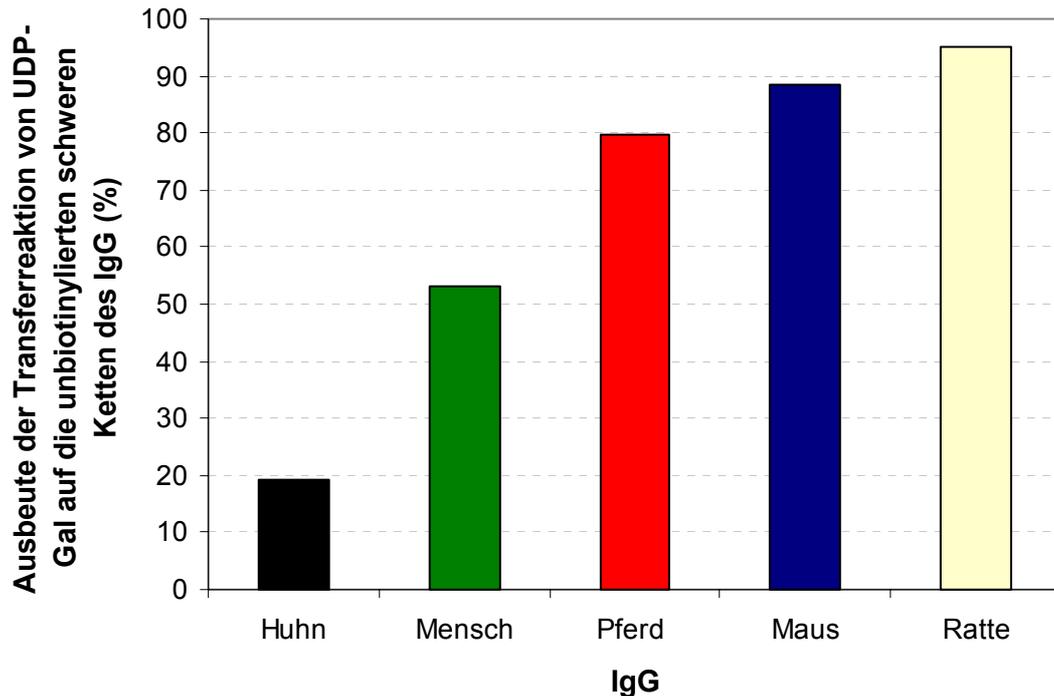


Abbildung 71: Quantifizierung der maximal mit der freien β 4Gal-T1 transferierbaren Menge von UDP-Gal auf die schweren Ketten des reduzierten und blockierten IgG verschiedener Spezies. Die Ausbeuten beziehen sich auf die theoretisch zu markierende Menge an freiem GlcNAc.

Bedingungen: 25 mM HEPES-Puffer, pH 8,0; 1,5 mM UDP-6-biotinyl-Gal; 1,5 mg/ml reduziertes und blockiertes IgG; 50 mU/ml freie β 4Gal-T1, Reaktionsvolumen: 1,2 ml, Reaktionszeit: 14 h, Reaktionstemperatur: 37°C; nach der Ultrafiltration zum Beenden der Reaktion wurde das Filtrat auf 50 μ l einkonzentriert und die UDP-Konzentration per HPLC bestimmt (Methode F 2.2).

Es kommt zu dem schon vom Lektin-Assay und dem selektiven Transfer auf das IgG der verschiedenen Spezies bekannten Bild. So sind die knapp 20% Ausbeute beim Huhn nicht etwa darauf zurückzuführen, dass hier die Galactosyltransferase schlechter arbeiten würde. Vielmehr ist es so, dass das Huhn ja im Vergleich zu den anderen Spezies eine deutlich geringere Untergalactosylierung zeigt. Daher muss auch die Ausbeute der Galactosylierungsreaktion erheblich niedriger liegen. Dasselbe Prinzip gilt auch für das IgG der anderen Spezies. So wird die durch den selektiven Transfer ermittelte Reihenfolge der Untergalactosylierung der IgGs von Huhn < Mensch < Pferd < Maus < Ratte auch durch die Messung der Galactosylierung über die UDP-Konzentration bestätigt.

Die Quantifizierung der Biotinylierung zeigte sich wie folgt (Abbildung 72):

C Ergebnisse und Diskussion

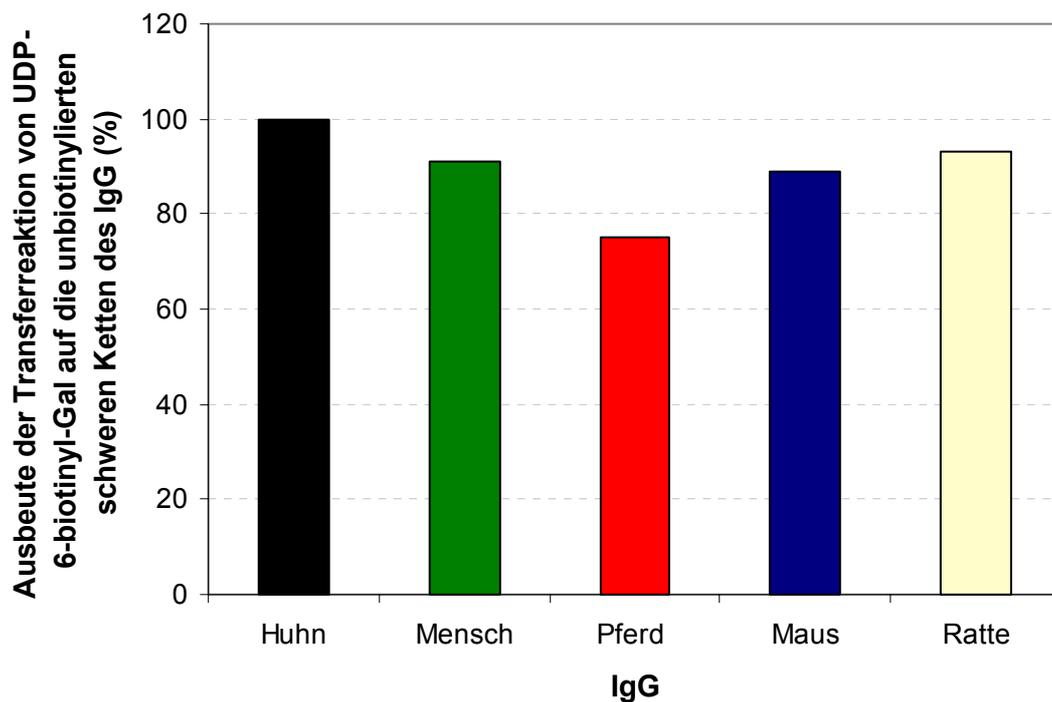


Abbildung 72: Quantifizierung der maximal mit der freien β 4Gal-T1 transferierbaren Menge von UDP-Gal-Biotin auf die schweren Ketten des reduzierten und blockierten IgG verschiedener Spezies.

Bedingungen für die Bestimmung der Ausbeute der Galactosylierung: s. Abbildung 71. Bedingungen für die Bestimmung der Ausbeute der Biotinylierung: 1. Transferreaktion: 25 mM Hepes-Puffer, pH 7,4; 1,5 mM UDP-6-biotinyl-Gal; 1,5 mg/ml reduziertes IgG; 250 mU/ml freie β 4Gal-T1, Reaktionsvolumen: 1,2 ml, Reaktionszeit: 14 h, Reaktionstemperatur: 37°C; nach Ultrafiltration zur Abtrennung des UDP und UDP-6-biotinyl-Gal erfolgte die 2. Transferreaktion analog zur 1., jedoch mit 1,5 mM UDP-Gal anstatt UDP-6-biotinyl-Gal und 250 mU/ml freier β 4Gal-T1; nach Ultrafiltration wurde das Filtrat auf 50 μ l einkonzentriert und die UDP-Konzentration per HPLC bestimmt (Methode F 2.2).

Vergleicht man die Ausbeute der Galactosylierung mit jener der Biotinylierung, so zeigen sich zumeist nur geringe Unterschiede. Beim Huhn konnte bei der der Biotinylierung folgenden Galactosylierung keinerlei UDP mehr nachgewiesen werden. Hier muss also davon ausgegangen werden, dass UDP-6-biotinyl-Gal bereits sämtliche zur Verfügung stehenden freien GlcNAc-Reste besetzt hat. Beim Menschen liegen lediglich 5% zwischen Biotinylierungs- und Galactosylierungsausbeute. Beim Pferd ist der Unterschied mit 20%

C Ergebnisse und Diskussion

deutlich größer. Bei der Maus liegt die Biotinylierungsausbeute um 10% und bei der Ratte um 7% unter der Ausbeute der Galactosylierung. Der Grund für die schwächere Biotinylierung des IgG des Pferdes kann zum jetzigen Wissensstand nicht gegeben werden. Aus MS- und CE-Lif gewonnenen Struktur-Daten können keine Besonderheiten, so z.B. kein vermehrtes Auftreten von G0b- oder G0bf-Struktur, erkannt werden (Raju *et al.* 2000). Diese hätten aufgrund sterischer Einflüsse die Biotinylierung erschweren können. Besonders günstig ist die hohe Biotinylierungsausbeute für das humane IgG zu werten, da es ja dieses sein wird, welches in einer späteren Diagnostik der RA untersucht werden wird.

6.2.3 Abschließende Diskussion zur selektiven Markierung von IgG

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, die selektive Markierung von IgG-Strukturen nachzuweisen. Die hier etablierte Technik kann möglicherweise zur Früh-Diagnostik von Rheumatoider Arthritis verwendet werden. Allerdings ist zu beachten, dass es sich bei den bislang untersuchten IgGs nur um kommerziell erhältliche aufgereinigte IgG-Präparationen handelte. Eine selektive Markierung von IgGs aus dem Serum von Patienten stellt ungleich höhere Ansprüche und erfordert zunächst eine Isolierung der Antikörper, um nicht im Serum vorhandene Fremdproteine zu markieren. Allerdings sind Protokolle zur Isolierung von IgG aus humanem Serum bereits bekannt, so etwa eine Isolierung über Protein G (Liljebland *et al.* 2000).

Entscheidend ist auch die Abgrenzung der Technik der selektiven Markierung von anderen, bereits etablierten Techniken der Glykan-Analytik und ihrer Nutzbarkeit für eine Diagnostik von RA. Eine in Krankenhäusern einzusetzende Diagnostik muss möglichst einfach und kostensparend sein. Da es sich bei der RA um eine zumeist chronische Krankheit handelt, ist der Zeitfaktor der Analytik eher zweitrangig.

Die Techniken zur Identifizierung der mit RA assoziierten IgG N-Glykan-Strukturen wurden in der Literatur bereits eingehend dargestellt (Routier *et al.* 1998). Hierbei wurden verschiedene HPLC-Methoden (u.a. beruhend auf Trennungen durch Ladung oder Hydrophobizität) mit einem Lektin-Assay verglichen. Sämtliche HPLC-Methoden benötigen nach Isolierung des IgG aus dem Serum die chemische oder enzymatische Ablösung der Glykane vom IgG sowie nachfolgendes Labelling oder Glykosidasenbehandlung. Daher

C Ergebnisse und Diskussion

müssen diese Techniken als aufwendig gelten, zudem erfordert die Auswertung von HPLC-Chromatogrammen komplexer Mischungen sowie die Bedienung des HPLC-Geräts speziell geschultes Personal und die Anschaffung teurer, wenn überhaupt kommerziell verfügbarer, Glykan-Standards.

Der Lektin-Assay muss hier als für den Klinikalltag deutlich besser geeignet gelten, da er ausser der Isolierung des IgG aus dem Patientenserum keine weiteren Vorbereitungsschritte erfordert. Allerdings ist mit Lektin-Analytik keine Strukturaufklärung möglich, und es wird nichts über das quantitative Verhältnis von Strukturen ausgesagt, an die das Lektin bindet. Die erhaltenen Werte zeigen aufgrund der Mikroheterogenität des IgG zudem eine weite Streuung, so dass auch IgG-Proben von kranken Menschen im Bereich derer von gesunden Menschen liegen können (Bond *et al.* 1997). Die Autoren beschreiben, dass das eingesetzte Lektin zu bestimmten Strukturen eine besonders hohe Affinität besitzt (vollkommen agalactosyliertes IgG). Schon ein geringer Anteil dieser Struktur führt zu einer hohen Antwort des Lektins, so dass hier das Vorliegen einer weit höheren Menge an untergalactosylierten Strukturen vorgetäuscht wird. Im Weiteren ist eine Unterscheidung der RA von anderen durch Veränderungen der N-Glykane geprägte Autoimmunkrankheiten nur bedingt möglich (Routier *et al.* 1998).

Eine Technik, die eben diese Unterscheidung ermöglicht, stellt die sogenannte FCE (Fluorophore Linked Carbohydrate Electrophoresis) dar. Allerdings sind für eine gute Auflösung Gele besonders hoher Dichte nötig, weshalb die Technik dann auch als "High Density Electrophoresis" genannt wird (Frears *et al.* 1999; Axford *et al.* 2003). Wie bei den bereits beschriebenen HPLC-Methoden ist auch hier grundsätzlich zunächst eine Abtrennung der Glykane vom Protein sowie ein nachfolgendes Labelling mit einem Fluorophor erforderlich. Hierauf erfolgt ein Lauf auf einem Gel auf Polyacrylamid-Basis, wobei gelabelte Mono- und Oligosaccharide als Standard dienen. Zur Quantifizierung der Banden und somit zur Unterscheidung der verschiedenen Autoimmunkrankheiten ist ein Gel-Scan-System erforderlich, welches eine Darstellung der optischen Dichte ermöglicht. Mit Hilfe dieser Technik gelang eine in 74% der Fälle zutreffende Diagnostizierung der RA, wobei auch eine gute Unterscheidung von RA und früher RA möglich war, da sich beide Krankheiten in der Zahl der monogalactosylierten und sialylierten Strukturen unterscheiden. Ein sogenanntes "Fingerprinting" der verschiedenen rheumatischen Erkrankungen ist mit der gerade beschriebenen Technik möglich. Aufgrund des beschriebenen Aufwands sowie der speziell benötigten Geräte und auf die FCE-Technik zu schulendem Personal ist diese Technik allerdings für eine Routine-Anwendung in der Klinik nicht besonders vorteilhaft.

C Ergebnisse und Diskussion

Was kann nun die im Rahmen dieser Arbeit etablierte selektive Markierung im Vergleich mit den eben beschriebenen Techniken leisten ?

Vorteilhaft ist in jedem Fall, dass die hier beschriebene Methodik grundsätzlich auf einem ELISA-verwandten Test beruht, deshalb sollte sie standardmässig im Krankenhaus durchführbar sein, ohne Personal neu anlernen zu müssen. Eine so einfache Analytik bietet sonst nur der Lektin-Assay mit den oben beschriebenen Nachteilen. Ob eine Unterscheidung von krankhaftem und gesundem IgG gelingt, bleibt abzuwarten. Die in dieser Arbeit aufgezeigte Unterscheidbarkeit der Galactosylierung verschiedener Spezies gibt hier allerdings zu berechtigten Hoffnungen Anlass. Der Faktor der Mikroheterogenität wird immer eine Rolle spielen, doch muss sich zeigen, in wieweit dieser Faktor bei der gezeigten sehr hohen Biotinylierungsrate des IgG eine Rolle spielen wird. Ebenfalls unklar ist noch, ob eine Abgrenzung zu anderen Autoimmunkrankheiten, bei denen eine Untergalactosylierung von IgG beschrieben ist, möglich sein wird. Ein Beispiel einer solchen Krankheit ist die Spondyloarthropathie (Leirisalo-Repo *et al.* 1999).

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der galactosyltransferase-vermittelten Markierung mit UDP-6-biotinyl-Gal liegt bei der Untersuchung der Untergalactosylierung der O-Glykane des IgA. Hiermit könnte ein Zugang zu einer Frühdiagnostik der IgA-Nephropathie gefunden werden. Ein weiteres Anwendungsfeld könnte im Labelling und der Identifikation von Proteinen liegen, die die post-translationale O-GlcNAc-Modifikation tragen (Wells und Hart 2003, Khidekel *et al.* 2004). Darüberhinaus ist eine Vielzahl weiterer Anwendungen auf Grundlage der Streptavidin-Biotin-Technologie denkbar.

7 Synthese modifizierter *p*NP-aktivierter Zucker

Wie bereits in der Zielsetzung (Kapitel B) erwähnt, sollte die Strategie der selektiven Markierung auch auf Substrate für Glykosylhydrolasen (Glykosidasen) ausgeweitet werden. Hiermit sollte die Übertragbarkeit der Strategie auf andere Enzymklassen aufgezeigt werden. Glykosidasen katalysieren zwar die Spaltung von glykosidischen Bindungen, können aber bei geeigneter Wahl der Reaktionsbedingungen auch zur Oligosaccharidsynthese (Transglykosylierung) verwendet werden. So sind hohe Substratkonzentrationen, der Zusatz von Lösungsmittel zum Reaktionsansatz sowie Donoren mit guter Abgangsgruppe am anomeren C-Atom vorteilhaft. Zu letzteren zählen z.B. Aryl-Gruppen, insbesondere *p*-Nitrophenyl (*p*NP). Es werden aber auch Disaccharide als Donoren verwendet (Nilsson 1988). Die Faktoren hohe Substratkonzentration und Zusatz von Lösungsmittel führen dazu, dass das bei der Reaktion mit dem Akzeptorsubstrat als Substrat konkurrierende Wasser zurückgedrängt wird. Die Donoren mit guter Abgangsgruppe besitzen eine höhere Hydrolyserate als die Oligosaccharidprodukte, wodurch deren Hydrolyse minimiert und die Ausbeute gesteigert wird. Vorteile der Oligosaccharidsynthese durch Glykosidasen gegenüber jener durch Glykosyltransferasen sind in den niedrigeren Kosten sowohl in Bezug auf das Enzym als auch auf den Donorzucker zu sehen. Glykosidasen benötigen keinen Nukleotidzucker als Donor. Allerdings zeigen Glykosidasen gegenüber Glykosyltransferasen in der Regel eine geringere Regioselektivität und Reaktionsausbeute. So liegen die Ausbeute selbst bei guten Oligosaccharidsynthesen mit Glykosidasen kaum höher als 30% (Fernández-Mayoralas 1997).

7.1 Synthese von *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal(NAc)

Eine selektive Markierung sollte wie im Fall der glykosyltransferase-vermittelten Markierung über den Donorzucker der Reaktion eingebracht werden. Hierzu sollte ein UDP-6-biotinyl-Gal analoger Zucker synthetisiert werden, der statt UDP eine *p*NP-Gruppe tragen sollte. Letztere sollte als gute Abgangsgruppe in Transglykosylierungsreaktionen fungieren. Die folgende Abbildung zeigt das Syntheschema (Abbildung 73).

C Ergebnisse und Diskussion

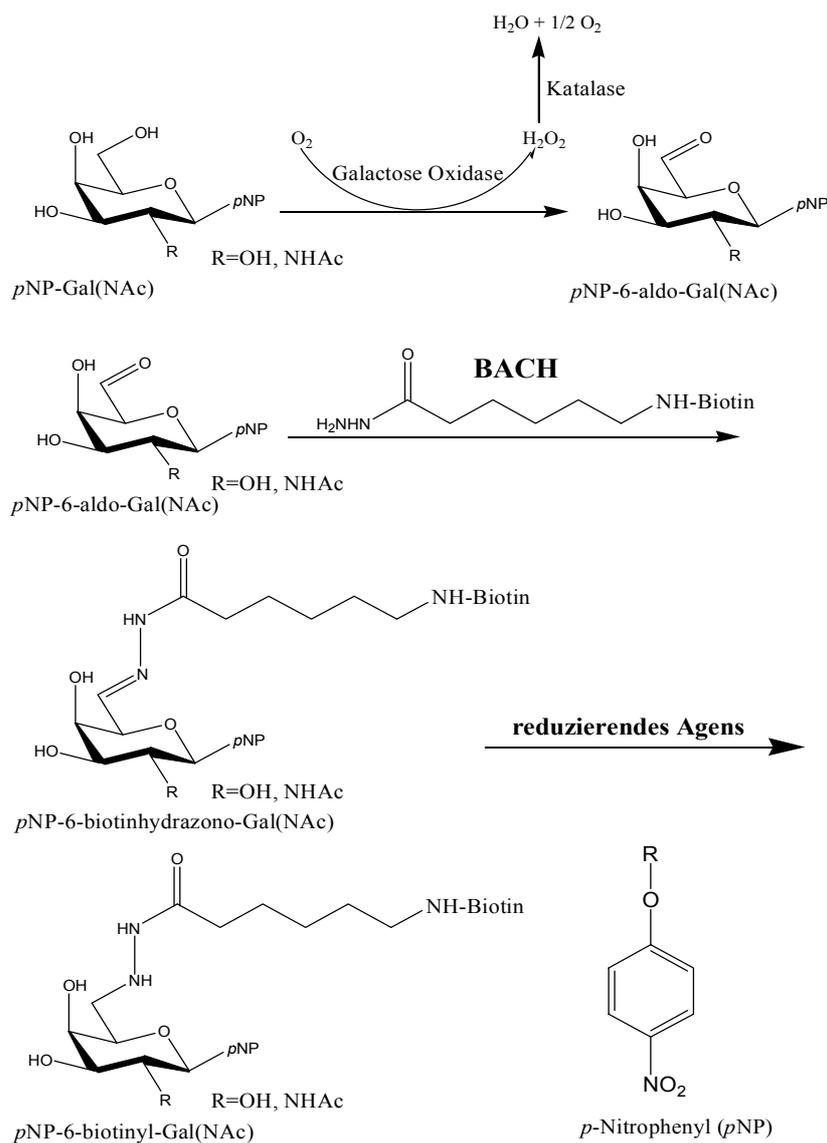


Abbildung 73: Synthese von *p*NP-6-biotinyl-Gal(NAc).

Aber nicht nur die potentielle Transglykosylierung mit dem Donorsubstrat *p*NP-6-biotinhydrazone-Gal, sondern auch das Hydrolyseprodukt dieses Zuckers ist von großem Interesse. Nach einer potentiell erfolgreichen *p*NP-Abspaltung würde man 6-Biotinyl-Gal (Gal-Biotin) erhalten, also eine an der 6-Position mit dem Biotinylierungsreagenz BACH derivatisierte Galactose (Abbildung 74). Ein einfacher Zugang zu diesem Zucker über eine Oxidation und Biotinylierung von Galactose ist nicht möglich, da bei der Oxidation von freier Galactose dimere und polymere Formen erhalten werden (Sun *et al.* 2002).

C Ergebnisse und Diskussion

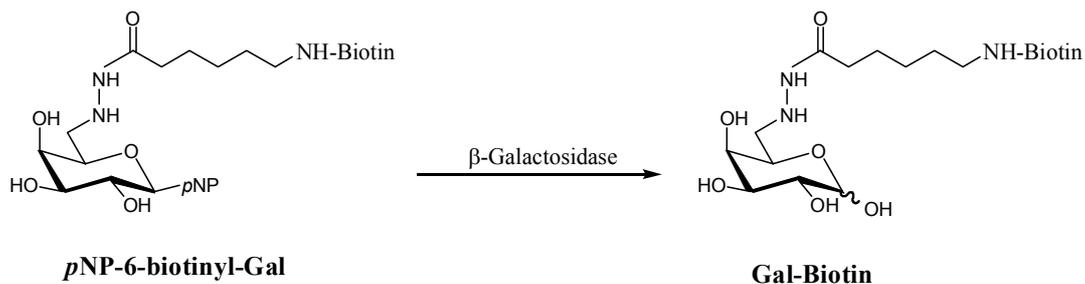


Abbildung 74: Synthese von Gal-Biotin.

Gal-Biotin wäre deswegen von besonderem Interesse, da es zum sogenannten “metabolic engineering“ (für die Erklärung des Begriffs s. Kapitel A 5.1), also den *in vivo* Einbau eines modifizierten Substrates, genutzt werden könnte. Gal-Biotin könnte durch Fütterung an eine Zellkultur den Platz von Galactose im Biosyntheseweg von UDP-Galactose, dem sogenannten “Leloir Pathway“, einnehmen. Der Biosyntheseweg baut sich wie folgt auf:



Neben dem *in vivo* Einbau könnte Gal-Biotin auch *in vitro* mit Galactokinase und Gal-1P-Uridylyltransferase umgesetzt werden, so dass sich ein alternativer Syntheseweg für UDP-6-biotinyl-Gal erschliessen würde. Aufgrund dessen, dass allerdings beim gerade beschriebenen Weg die Akzeptanz von drei Enzymen (Galactosidase, Galactokinase und Gal-1-P-Uridylyltransferase) für ein modifiziertes Substrat vorliegen müsste, ist sicherlich nicht mit ähnlich hohen Ausbeuten wie bei der UDP-6-biotinyl-Gal-Synthese ausgehend von UDP-Gal zu rechnen.

7.1.1 Enzymatische Oxidation von 4-Nitrophenyl- β -D-galactose (pNP-Gal) und 4-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-galactosamin (pNP-GalNAc) im analytischen Maßstab

Der erste Schritt bei der Synthese von pNP-6-biotinyl-Gal(NAc) sollte die enzymatische Oxidation von pNP-Gal(NAc) sein (Abbildung 75). Zunächst musste geklärt werden, ob die Restaktivitäten der Galactose Oxidase für die Oxidation von pNP-Gal und pNP-GalNAc ausreichen, damit Arbeiten im präparativen Maßstab möglich sein konnten. Die Restaktivitäten wurden mit dem Enzymtest für Galactose Oxidase im Vergleich zum natürlichen Substrat Galactose (s. Kapitel E 1.1) bestimmt. Mit 28% für pNP-Gal und 26% für

C Ergebnisse und Diskussion

*p*NP-GalNAc ergaben sich für eine präparative Reaktion ausreichende Restaktivitäten. Die Restaktivität von UDP-Gal liegt bei 32%, also in derselben Größenordnung und hier konnte die präparative Oxidation bereits erfolgreich gezeigt werden (Kapitel C 2.1).

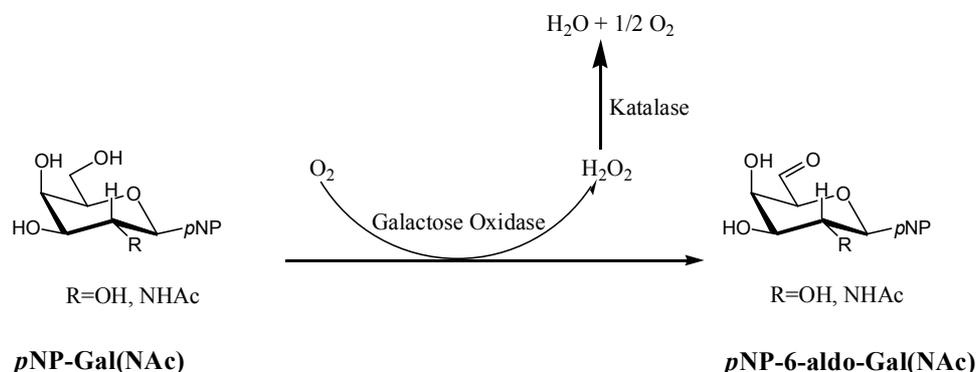
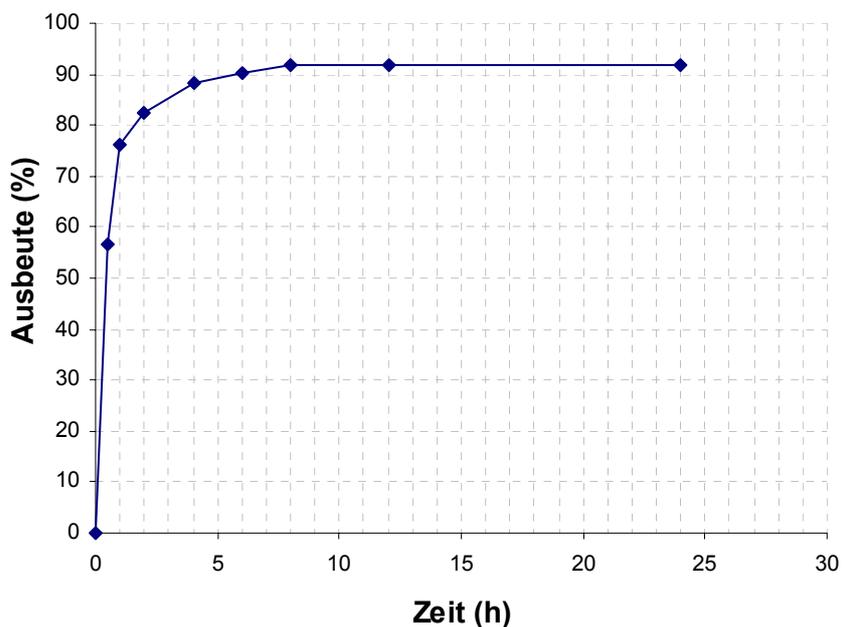


Abbildung 75: Oxidation von *p*NP-Gal(NAc) mit Galactose Oxidase.

Die Bildung einer Galacturonsäure durch vollständige Oxidation der C6-Hydroxygruppe wie sie bei der Oxidation von UDP-Gal mit Galactose Oxidase von Bülter als Nebenprodukt beobachtet wurde (Bülter *et al.* 2001), konnte nicht festgestellt werden. Die folgende Abbildung zeigt die Zeit-Umsatz-Kurve der Oxidation von *p*NP-Gal(NAc) im analytischen Maßstab (Abbildung 76, Kapitel E 8.1.1). Die Produktdetektion erfolgte über HPLC-Analytik (Methode F 2.4).

C Ergebnisse und Diskussion

A



B

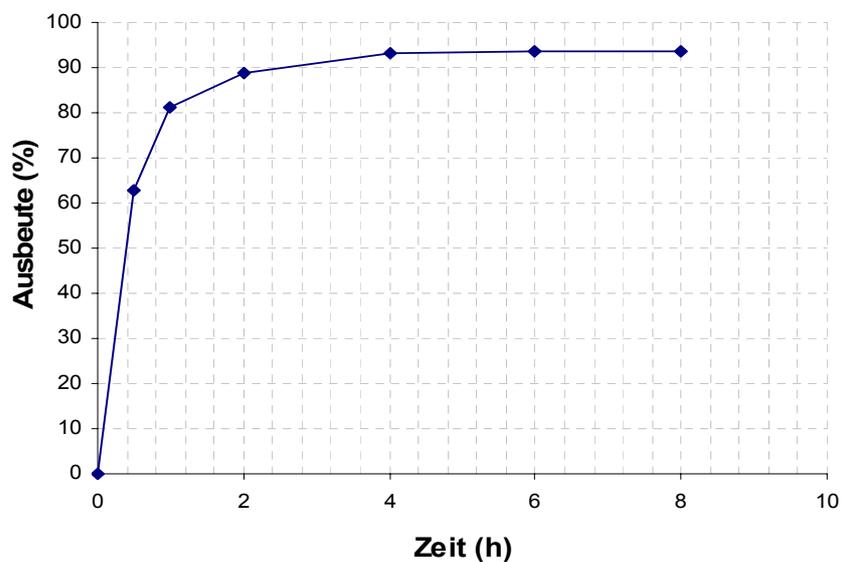


Abbildung 76: Zeit-Umsatz Kurve der Oxidation von *p*NP-Gal (A) und *p*NP-GalNac (B) im analytischen Maßstab.

Bedingungen: 8 mM *p*NP-Gal / 4 mM *p*NP-GalNac; 25 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,0; 0,5 mM CuSO₄; 8 U/ml Galactose Oxidase; 3200 U/ml Peroxidase; Reaktionsvolumen 250 µl; Reaktionstemperatur: RT; Produktdetektion über die HPLC-Analytik Methode F 2.4.

C Ergebnisse und Diskussion

Die Oxidation von *p*NP-Gal(NAc) verlief im analytischen Maßstab bis zu sehr guten Ausbeuten von 92% für *p*NP-Gal und 93% für *p*NP-GalNAc. Eine quantitative Umsetzung konnte nicht erreicht werden. Bültter hatte bei der Oxidation von UDP-Gal lediglich einen Umsatz von 60% feststellen können (Bültter 1999). Die enzymatische Oxidation von *p*NP-Gal(NAc) sollte daher auch im präparativen Maßstab möglich sein. Ein Vergleich der Reaktionsdauer bei der Oxidation der beiden *p*NP-Zucker ist nicht sinnvoll. Diese liegt darin begründet, dass im Oxidationsansatz von *p*NP-Gal die doppelte Konzentration (8 mM im Vergleich zu 4 mM) an Zucker enthalten war. Die Löslichkeit von *p*NP-GalNAc in wässriger Lösung ist auf 4 mM limitiert.

7.1.2 Biotinylierung von 4-Nitrophenyl-6-oxo- β -D-galactose (*p*NP-6-oxo-Gal) und 4-Nitrophenyl-6-oxo-*N*-acetyl- β -D-galactosamin (*p*NP-6-oxo-GalNAc) im analytischen Maßstab

Zur Derivatisierung von *p*NP-6-oxo-Gal sowie *p*NP-6-oxo-GalNAc wurde das schon bei der UDP-6-biotinyl-Gal(NAc)-Synthese genutzte Biotinylierungsreagenz Biotin- ϵ -amidocaproylhydrazid (BACH) verwendet (Kapitel E 8.1.2) Die nachfolgende Abbildung zeigt den Derivatisierungsschritt (Abbildung 77).

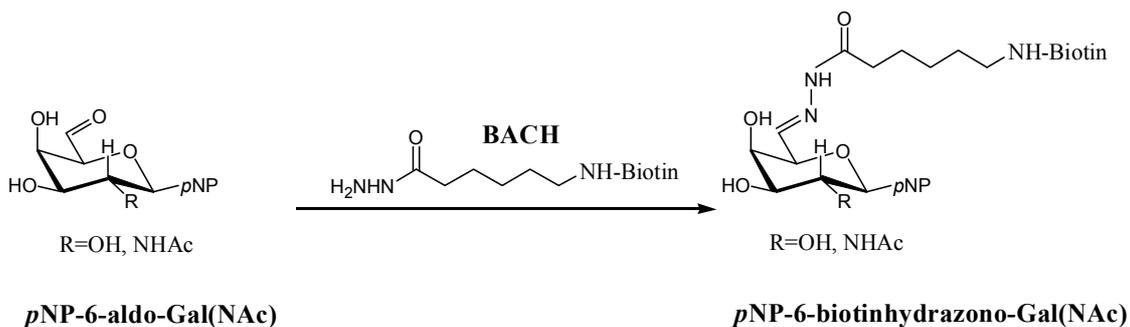


Abbildung 77: Derivatisierung von *p*NP-6-biotinyl-Gal(NAc).

Während der Reaktion fiel ein bräunlicher Feststoff aus, der später als *p*NP-6-biotinhydrazone-Gal(NAc) identifiziert werden konnte. Die Unlöslichkeit in Wasser ist durch den hydrophoben Charakter der para-Nitrophenyl-Gruppe sowie des Spacers der eingebrachten Biotin-Funktionalität bedingt. Die Gesamt-Reaktionsausbeute nach Oxidation und Derivatisierung konnte für die analytischen Experimente auf 63% für *p*NP-Gal und 65%

C Ergebnisse und Diskussion

für *p*NP-GalNAc (die Angaben zur Ausbeute jeweils bezogen auf die Konzentration des Eduktzuckers) bestimmt werden. Die Ausbeute wurde durch Auswiegen des isolierten Reaktionsproduktes bestimmt (Kapitel E 8.1.2). Die Ausbeute-Werte zeigten, dass eine präparative Synthese von *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal(NAc) prinzipiell gelingen sollte. Zur Optimierung der Synthese von *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal(NAc) wurde die Syntheseausbeute in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge des Biotinylierungsreagenzes BACH untersucht. Das Verhältnis von BACH zu *p*NP-6-oxo-Gal(NAc) betrug dabei 1:1, 1,5:1 sowie 2:1 (Kapitel E 8.1.3). Bei dem zuvor geschilderten Experiment betrug das Verhältnis 1,5:1. Abbildung 78 zeigt das Ergebnis für *p*NP-6-oxo-Gal.

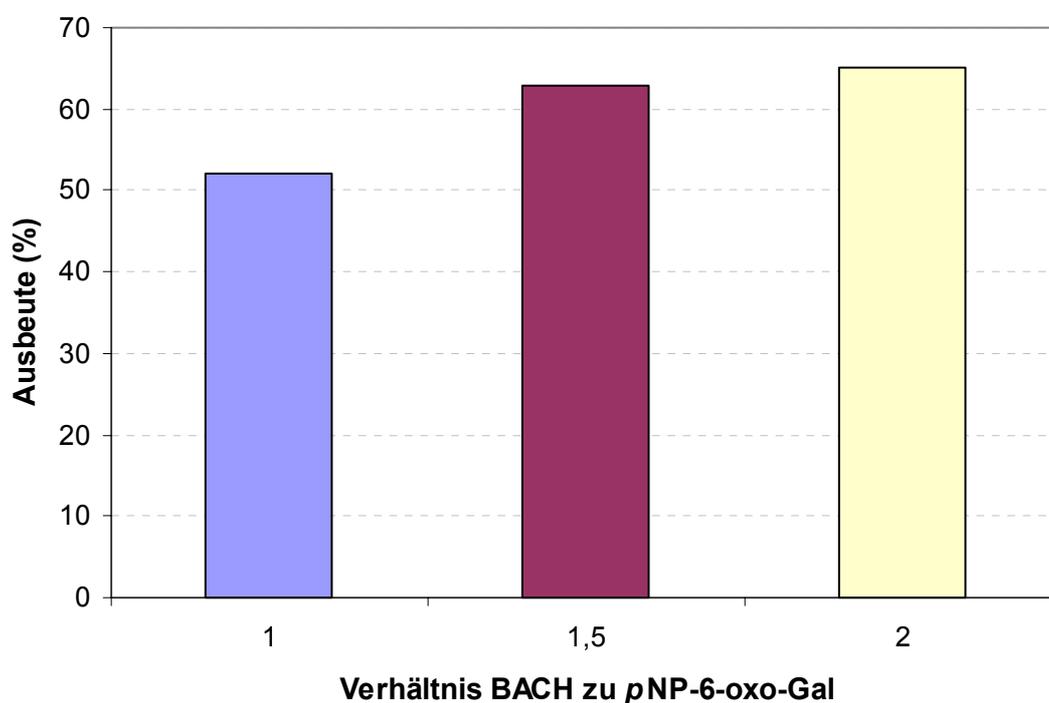


Abbildung 78: Ausbeute an *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an BACH.

Bedingungen: 8 mM *p*NP-Gal; 8 mM, 12 mM; 16 mM BACH; 25 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,0; 0,5 mM CuSO₄; 8 U/ml Galactose Oxidase; 3200 U/ml Katalase, Reaktionsvolumen 250 µl; Reaktionstemperatur: RT.

Aus der Abbildung ist deutlich zu entnehmen, dass sich die höchste Ausbeute von 65% bei einem 2:1-Verhältnis von BACH zu Zucker ergab. Allerdings lag die bei einem Verhältnis von 1,5:1 erreichte Ausbeute mit 63% nur knapp darunter, jene des Verhältnisses 1:1 lieferte mit 52% eine doch deutlich schlechtere Ausbeute. Enzym und BACH sind die

C Ergebnisse und Diskussion

Hauptkostenfaktoren der Synthese. In allen weiteren Ansätzen wurde daher ein Verhältnis BACH zu Zucker von 1,5:1 gewählt. Für *p*NP-6-biotinhydrazono-GalNAc ergab sich ein sehr ähnliches Bild, daher wurde bei allen weiteren Ansätzen analog zur Synthese von *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal verfahren.

7.1.3 Eintopf-Synthese von *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal und *p*NP-6-biotinhydrazono-GalNAc im analytischen Maßstab

Es sollte untersucht werden, ob die Gesamtreaktionsausbeute durch die Kombination der enzymatischen Oxidation und der chemischen Biotinylierung zu einer chemoenzymatischen Eintopf-Reaktion gesteigert werden könnte (Kapitel E 8.1.4). Dies war nur bedingt der Fall. Für *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal ergab sich eine Steigerung um 4 auf 67%, für *p*NP-6-biotinhydrazono-GalNAc um 3 auf 68%. Diese Ergebnisse waren allerdings zu erwarten. Die klare Ausbeutesteigerung bei der Synthese von UDP-6-biotinyl-Gal von 59% in der sequentiellen Reaktionsabfolge auf 78% bei der Eintopfreaktion (Bülter *et al.* 2001) war dadurch bedingt, dass durch die Eintopfreaktion die Nebenreaktion des UDP-6-oxo-Gal zur zugehörigen Galacturonsäure unterbunden werden konnte. Da, wie geschildert, *p*NP-6-OxoGal(NAc) bei Oxidation mit Galactose Oxidase gar keine Uronsäuren bildet, gab es also keine zu unterdrückende Nebenreaktion. Daher kam es auch zu keiner signifikanten Ausbeutesteigerung in der Gesamtsyntheseausbeute. Die prinzipielle Durchführbarkeit der Eintopf-Synthese von *p*NP-6-biotinhydrazonoGal(NAc) konnte jedoch klar gezeigt werden.

7.1.4 Oxidation von *p*NP-Gal(NAc) im präparativen Maßstab

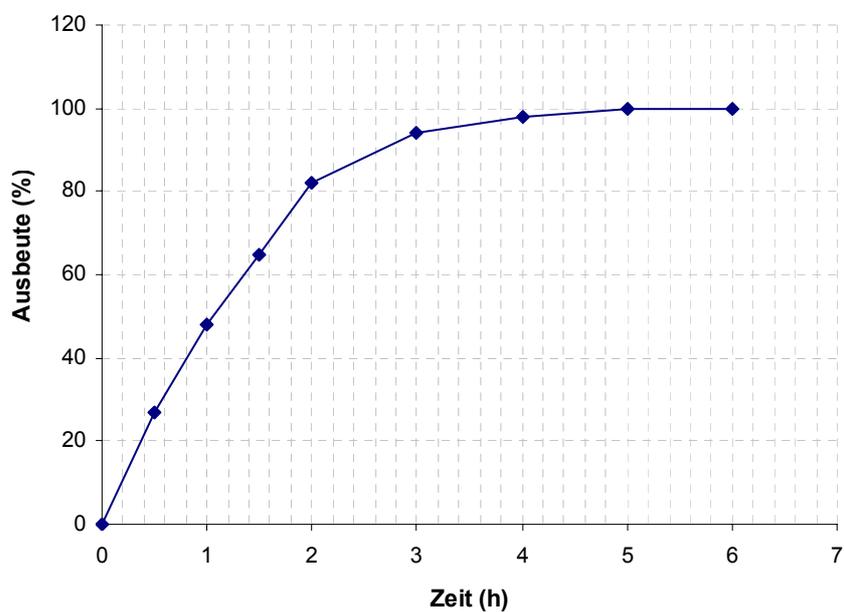
Die präparative Synthese fand wie auch schon bei UDP-6-biotinyl-Gal in einem Reaktor mit integrierter Schlauchbegasung statt. Der Aufbau des Reaktors sowie die Hintergründe zur Sauerstoff-Begasung der Reaktionslösung wurden bereits in Kapitel C 2.1 dargelegt. Anders als bei den analytischen Ansätzen zur Synthese von *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal(NAc) (Kapitel C 7.1.3) und auch bei der Synthese von UDP-6-biotinyl-Gal (Kapitel C 2.1) konnte bei der präparativen Synthese von *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal(NAc) keine Eintopfreaktion stattfinden. Dies lag daran, dass das Syntheseprodukt im Lauf der Reaktion präzipitierte und somit die Schläuche des Reaktor-Pump-Kreislaufs blockieren konnte. Also wurde die

C Ergebnisse und Diskussion

enzymatische Oxidation im Reaktor, die nachfolgende Biotinylierung aber in einem Becherglas durchgeführt (Kapitel E 8.1.2 und 8.1.6). Abbildung 79 zeigt die Zeit-Umsatzkurven für die präparative Oxidation von *p*NP-Gal(NAc). Im Vergleich zu den analytischen Ansätzen (Kapitel C 7.1.1) konnte die Oxidationsausbeute noch einmal gesteigert und die Reaktionszeit verkürzt werden. So wurden sowohl *p*NP-Gal nach 5 h als auch *p*NP-GalNAc nach 3 h quantitativ umgesetzt. Im analytischen Maßstab waren noch 24 h bzw. 8 h für Ausbeuten von 92 bzw. 93% erforderlich gewesen. Dies war zu erwarten, da im Reaktor eine zu jedem Zeitpunkt gleichmäßig hohe Versorgung mit Sauerstoff gewährleistet war. Im analytischen Maßstab (1 ml-Probengefäße) war über Rühren lediglich eine begrenzte Sauerstoffzufuhr gegeben. Analog zur analytischen bildete sich auch bei der präparativen Oxidation keine Uronsäure.

C Ergebnisse und Diskussion

A



B

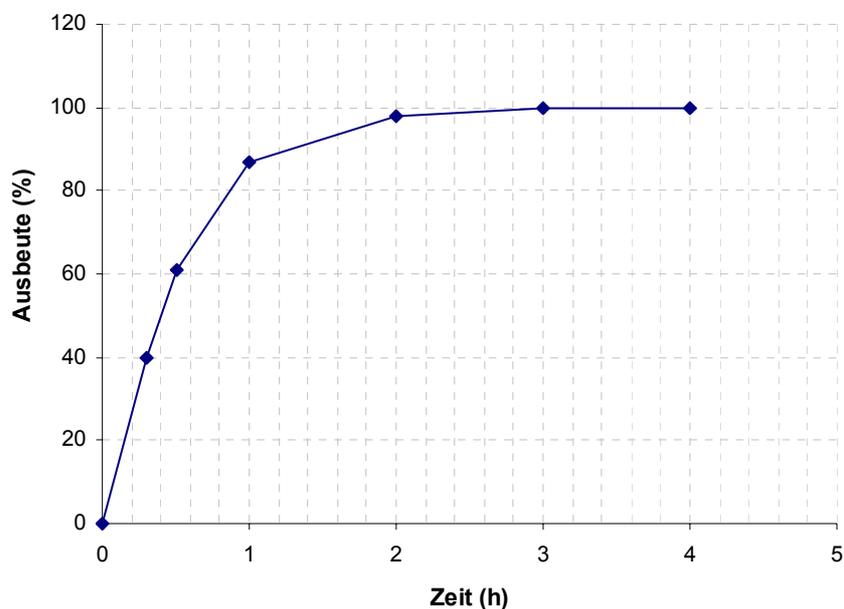


Abbildung 79: Zeit-Umsatz Kurve der präparativen Oxidation von *p*NP-Gal (A) und *p*NP-GalNAc (B).

Bedingungen: 8 mM *p*NP-Gal/4 mM *p*NP-GalNAc; 25 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,0; 0,5 mM CuSO₄; 4 U/ml Galactose Oxidase; 3200 U/ml Katalase; Reaktionsvolumen 50 ml; Reaktionstemperatur: RT; Produktdetektion über HPLC-Analytik Methode F 2.4.

C Ergebnisse und Diskussion

Eine weitere mögliche Optimierung der präparativen Oxidation sollte durch den Vergleich der Hilfsenzyme Katalase (EC 1.11.1.7) und Peroxidase (EC 1.11.1.6) geschehen (Kapitel E 8.2.2). Beide Enzyme katalysieren die Spaltung des bei der Reaktion der Galactose Oxidase anfallenden Wasserstoffperoxid. Wird dieses nicht gespalten, wird die Galactose Oxidase deaktiviert. Um den Einfluss der Hilfsenzyme auf die Reaktion zu testen, wurde die präparative Oxidation bei einem für beide Hilfsenzyme mit 400:1 gegenüber Galactose Oxidase gewählten Überschuss durchgeführt. Hierbei war die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit mit beiden Enzymen nahezu identisch. Der Unterschied bestand darin, dass mit Peroxidase zu den Zeitpunkten, bei denen mit Katalase bereits eine quantitative Oxidation eingetreten war, noch 3-5% unumgesetztes Substrat vorhanden war. Der vollständige Umsatz bei Einsatz von Peroxidase gelang nur nach Übernacht-Inkubation, da sich die Reaktionsgeschwindigkeiten der Sättigungsphase der enzymatischen Oxidation sehr stark verlangsamte. Daher wurde in allen weiteren Ansätzen der Einsatz von Katalase beibehalten.

Galactose Oxidase benötigt essentiell Cu^{2+} für ihre Aktivität, letzteres ist fest im katalytischen Zentrum verankert (Whittaker und Whittaker 2000). Es wurde per präparativer Synthese getestet, ob daher überhaupt ein Zusatz von Cu^{2+} zur Reaktionslösung notwendig ist (Kapitel 8.2.3). Es zeigte sich keinerlei Ausbeuteverringern oder Verlängerung der Reaktionszeit. Das in nicht optimierten Ansätzen zugegebene CuSO_4 wurde daher bei allen folgenden Reaktionsansätzen weggelassen.

Um mit dem Enzym Galactose Oxidase den neben BACH größten Kostenfaktor der Synthese zu minimieren, wurden präparative Oxidationen von *p*NP-Gal(NAc) mit verminderten Enzymkonzentrationen durchgeführt (Kapitel E 8.2.4). Bei Verlängerung der Reaktionszeit um je 1h gegenüber der in Abbildung 78 dargestellten präparativen Oxidation konnte die Enzymkonzentration für *p*NP-Gal halbiert (2 U/ml) und für *p*NP-GalNAc auf ein Viertel (1U/ml) reduziert werden.

Die Oxidation von *p*NP-GalNAc wurde als Modellreaktion für einen Up-Scale betrachtet (Kapitel E 8.1.2.5). Statt des bislang für die Synthese eingesetzten Satzreaktors von 50 ml Fassungsvermögen wurde ein 100 ml-Zweihalskolben verwendet, das Volumen also verdoppelt. So konnte auch die Menge an oxidiertem Produkt verdoppelt werden. Dies konnte mit gegenüber dem Ansatz im 50 ml-Reaktor ebenfalls lediglich verdoppelter Enzymmenge bei gleichgebliebener Reaktionsdauer erreicht werden. Auf diese Weise konnten nach upscale in einem batch ca. 140 mg *p*NP-6-oxo-GalNAc bei einer Reaktionszeit von 5 h synthetisiert werden. Der up-scale sollte durch Einsatz eines grösseren Kolbens leicht zu Ausbeuten im

C Ergebnisse und Diskussion

500 mg-Maßstab erweiterbar sein.

7.1.5 Biotinylierung von *p*NP-6-oxo-Gal(NAc) im präparativen Maßstab

Der zweite Reaktionsschritt zur Synthese von *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal(NAc), die chemische Kopplung des Biotinylierungsreagenzes an *p*NP-6-oxo-Gal(NAc), fand in einem Becherglas statt. Aufgrund der Präzipitation der Produkte konnte auf eine chromatographische Isolierung verzichtet werden. Die Reaktionslösung musste lediglich zentrifugiert und das Sediment mehrfach mit Millipore-H₂O gewaschen werden, um *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal(NAc) in sehr guter Reinheit zu erhalten. Die nachfolgende Tabelle 18 gibt die Ausbeute der Gesamtreaktion aus Oxidation und Derivatisierung an.

Tabelle 18: Reaktionsausbeute bei der Synthese von *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal (A) und *p*NP-6-biotinhydrazono-GalNAc (B).

A

<i>p</i> NP-biotinhydrazono-Gal	Menge (mmol)	Reinheit laut HPLC (%)	Ausbeute (%)
Oxidation	0,4	100	100
Biotinylierung	0,24	-	61
Lyophilisation	0,24	-	61 157 mg

B

<i>p</i> NP-biotinhydrazono-GalNAc	Menge (mmol)	Reinheit laut HPLC (%)	Ausbeute (%)
Oxidation	0,2	100	100
Biotinylierung	0,13	-	65
Lyophilisation	0,13	-	65 90 mg

C Ergebnisse und Diskussion

Die Synthese der derivatisierten *p*NP-Zucker im 100 mg-Maßstab konnte erfolgreich etabliert werden. Betrachtet man die Tabelle der Reaktionsausbeuten, fällt auf, dass der Biotinylierungsschritt deutlich weniger effektiv verläuft als die Oxidation. Auch kann die Gesamtausbeute der Synthese des UDP-6-biotinyl-Gal von 78% nicht erreicht werden. Sicherlich ist der Grund hierfür im Löslichkeitsprodukt der derivatisierten *p*NP-Zucker zu suchen. Ist erstmal eine gewisse Menge an Produktzucker aus der Reaktionslösung ausgefallen, kommt es zu keiner weiteren Produktbildung mehr. Dieser Umstand manifestierte sich auch in der Tatsache, dass, wenn man den Überstand der Zentrifugation nach Reaktionsende weiterrühren ließ, wieder neues Produkt präzipitierte. Zentrifugierte man erneut und ließ den Überstand weiterrühren, präzipitierte nur noch eine sehr geringe Menge an Produkt, da nun offensichtlich die Konzentration an noch gebildetem Produkt zu gering war, um auszufallen.

Von *p*NP-6-biotinhydrazone-Gal(NAc) wurden ^1H -NMR, $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR, DEPT-Spektren sowie NMR-Korrelationspektren (COSY, COR, gs-HMBC) aufgenommen. Hierbei zeigte sich, dass beide Verbindungen jeweils als cis-/trans-Isomere bezüglich der C=N-Doppelbindung vorliegen. Alle Spektren wurden von Dr. Martin Hein (Institut für Organische Chemie, Universität Rostock) aufgenommen. Als Geräte wurden Bruker AC-250, Bruker ARX-300 und AVANCE 500 verwendet. Als interner Standard der ^1H und ^{13}C -Messungen diente Tetramethylsilan. Chemische Verschiebungen sind in ppm angegeben, Kopplungskonstanten in Hz. Die Zuordnung der Protonen sowie Kohlenstoffatome ist den Abbildungen 80 und 81 zu entnehmen. Die NMR-Spektren sind im Kapitel H4 zu sehen.

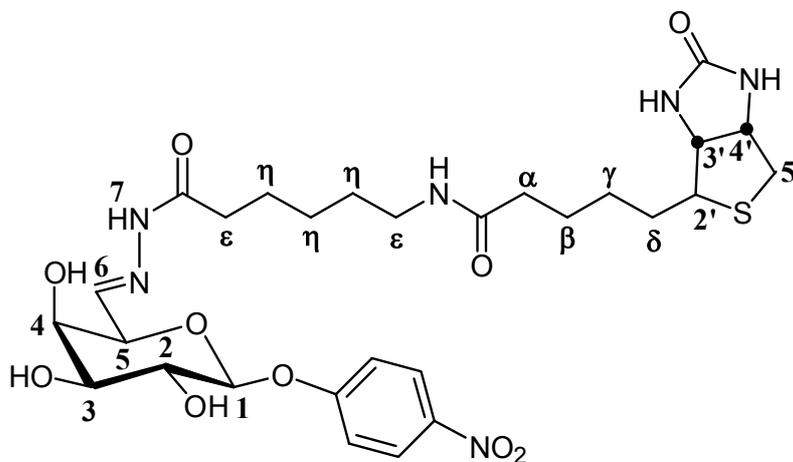


Abbildung 80: Strukturformel von *p*NP-6-biotinhydrazone-Gal.

C Ergebnisse und Diskussion

*p*NP-6-biotinhydrazone-Gal

¹H-NMR (500.1 MHz, DMSO-d₆):

δ = 11.15, 10.98 (1H, 2*s, NH-7, beide Isomere), 8.22 (2H, m, ³J_{H,H}=9.2, 2*H_{PNP}), 7.71 (1H, t(br), C(O)NH-ε), 7.45 (0.5H, d, ³J_{5,6}=6.1, H-6 (ein Isomer)), 7.29 (0.5H, d, ³J_{5,6}=5.8, H-6 (ein Isomer)), 7.21-7.25 (2H, m, ³J_{H,H}=9.3, 2*H_{PNP}), 6.38, 6.32 (2H, 2*s(br), 2 Biotin-NH), 5.21, 5.21 (1H, 2*d, ³J_{1,2}=7.6, H-1 (beide Isomere)), 4.39 (0.5H, d, ³J_{5,6}=6.1, H-5 (ein Isomer)), 4.36 (0.5H, d, ³J_{5,6}=5.8, H-5 (ein Isomer)), 4.30 (1H, dd, ³J_{4,5a}=5.2, ³J_{3,4}=7.5, H-4'), 4.13 (1H, m, ³J_{3,4}=7.5, ³J_{2,3}=4.5, H-3'), 3.75 (1H, m(br), H-4), 3.67 (1H, dd, ³J_{1,2}=7.7, ³J_{2,3}=9.4, H-2), 3.56, 3.55 (1H, 2*dd, ³J_{2,3}=9.4, ³J_{3,4}=3.2, H-3 (beide Isomere)), 3.09 (1H, m, ³J_{2,3}=4.5, H-2'), 3.01 (2H, m, ε-CH₂), 2.81 (1H, dd, ³J_{4,5a}=5.1, ²J_{5a,5b}=12.5, H-5a'), 2.58 (1H, d, ²J_{5a,5b}=12.5, H-5b'), 2.46 (1H, m, ξ-CH₂ (ein Isomer)), 2.10 (1H, m, ξ-CH₂ (ein Isomer)), 2.04 (2H, m, α-CH₂), 1.19-1.66 (12H, m, β-, γ-, δ- and 3*η-CH₂).

¹³C{¹H}-NMR (125.8 MHz):

δ = 174.1 (C(O)NH-N (ein Isomer)), 171.8 (C(O)NH-ε), 168.6 (C(O)NH-N (ein Isomer)), 162.7 (NHC(O)NH_B), 162.1 (C-O_{PNP}), 146.4 (C-6 (ein Isomer)), 143.6 (C-6 (ein Isomer)), 141.7 (C-NO₂ PNP), 125.7, 125.7, 116.4, 116.3 (4*CH_{PNP} (beide Isomere)), 99.9 (C-1_G), 74.9, 74.7 (C-5 (beide Isomere)), 72.5, 72.4 (beide Isomers), 70.8, 69.5 (C-2, C-3, C-4), 61.0 (C-3'), 59.1 (C-4'), 55.3 (C-2'), 39.8 (C-5'), 38.2 (ε-CH₂), 35.1 (α-CH₂), 33.9, 31.6 (ξ-CH₂ (beide Isomere)), 28.8 (CH₂), 28.1 (CH₂), 27.9 (CH₂), 26.1, 26.0 (CH₂ (beide Isomere)), 25.2 (CH₂), 24.5, 23.7 (CH₂ (beide Isomere)).

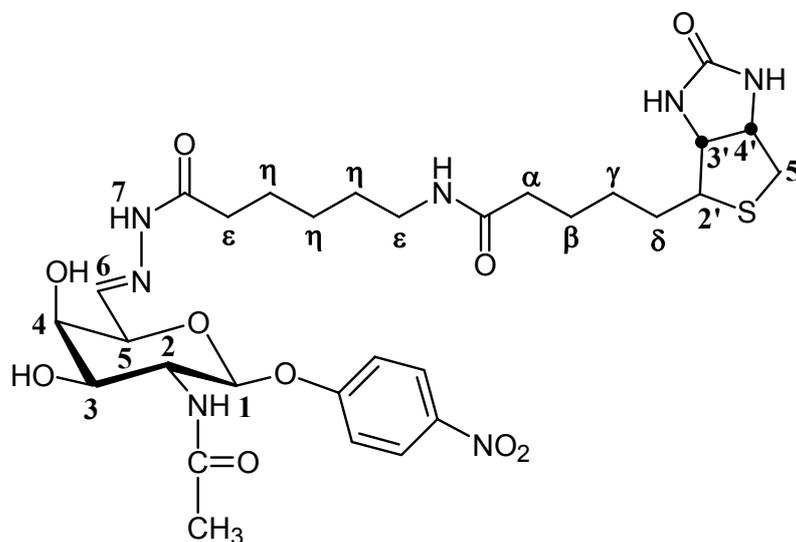


Abbildung 81: Strukturformel von *p*NP-6-biotinhydrazone-GalNAc.

*p*NP-6-biotinhydrazone-GalNAc

¹H-NMR (500.1 MHz):

δ = 11.17, 11.02 (1H, 2*s, NH-7 beide Isomere), 8.20 (2H, m, ³J_{H,H}=9.3, 2*H_{PNP}), 7.83, 7.81 (1H, 2*d("t"), ³J_{2,NH-2}=8.7, NH-2 beider Isomere), 7.73 (1H, t(br), C(O)NH-ε), 7.46 (0.5H, d, ³J_{5,6}=6.1, H-6 (ein Isomer)), 7.31 (0.5H, d, ³J_{5,6}=5.8, H-6 (ein Isomer)), 7.16-7.20 (2H, m,

C Ergebnisse und Diskussion

$^3J_{H,H}=9.3$, 2^*H_{PNP}), 6.40, 6.34 (2H, $2^*s(\text{br})$, 2 Biotin-NH), 5.29 (1H, d, $^3J_{1,2}=8.4$, H-1), 5.13, 5.10 (1H, 2^*d , $^3J_{4,OH-4}=4.5$, OH-4 beider Isomere), 5.00, 4.98 (1H, 2^*d , $^3J_{3,OH-3}=5.9$, OH-3 beider Isomere), 4.38 (0.5H, d, $^3J_{5,6}=6.1$, H-5 (ein Isomer)), 4.34 (0.5H, d, $^3J_{5,6}=5.8$, H-5 (ein Isomer)), 4.30 (1H, dd, $^3J_{4,5a}=5.1$, $^3J_{3,4}=7.8$, H-4'), 4.07-4.15 (2H, m, H-2 und H-3'), 3.78 (1H, m(br), H-4), 3.69 (1H, m(br), H-3_G), 3.09 (1H, m, H-2'), 3.01 (2H, m, $\epsilon\text{-CH}_2$), 2.81 (1H, dd, $^3J_{4,5a}=5.1$, $^2J_{5a,5b}=12.4$, H-5a'), 2.57 (1H, d, $^2J_{5a,5b}=12.4$, H-5b'), 2.47 (1H, m, $\xi\text{-CH}_2$ (ein Isomer)), 2.10 (1H, m, $\xi\text{-CH}_2$ (ein Isomer)), 2.04 (2H, m, $\alpha\text{-CH}_2$), 1.81 (3H, s, Acetyl-CH₃), 1.19-1.66 (12H, m, β -, γ -, δ - and $3^*\eta\text{-CH}_2$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (125.8 MHz):

$\delta=$ 174.1 (C(O)NH-N (ein Isomer)), 171.8 (C(O)NH- ϵ), 169.7 (Acetyl-CO), 168.6 (C(O)NH-N (ein Isomer)), 162.7 (NHC(O)NH_B), 162.0 (C-O_{PNP}), 146.3 (C-6 (ein Isomer)), 143.4 (C-6 (ein Isomer)), 141.8 (C-NO₂_{PNP}), 125.8, 125.7, 116.5, 116.4 (4^*CH_{PNP} , beide Isomere), 98.3 (C-1), 74.9, 74.8 (C-5 (beide Isomere)), 70.4, 70.4 (C-3 (beide Isomere)), 70.1, 70.1 (C-4 (beide Isomere)), 61.0 (C-3'), 59.1 (C-4'), 55.3 (C-2'), 51.1, 51.0 (C-2 (beide Isomere)), 39.8 (C-5'), 38.2 ($\epsilon\text{-CH}_2$), 35.1 ($\alpha\text{-CH}_2$), 33.9, 31.6 ($\xi\text{-CH}_2$ (beide Isomere)), 28.9, 28.9 (CH₂ (beide Isomere)), 28.1 (CH₂), 27.9 (CH₂), 26.1, 26.0 (CH₂ (beide Isomere)), 25.2 (CH₂), 24.5, 23.7 (CH₂ (beide Isomere)), 22.9 (Acetyl-CH₃).

7.2 Reduktion von pNP-6-biotinhydrazono-Gal

pNP-6-biotinhydrazono-Gal zeigte laut NMR-Messungen keine Reaktion mit NaCNBH₃, es lag also keine Reduktion vor. Dasselbe Reagenz wurde erfolgreich zur Reduktion von UDP-6-biotinhydrazono-Gal verwendet. Da in der Literatur beschrieben ist, dass Hydrazone thermodynamisch stabil sind, solange sie in leicht saurem oder neutralem Milieu verwendet werden (Lemieux and Bertozzi 1998), wurde zunächst keine weitere Arbeit in die Reduktion von pNP-6-biotinhydrazono-Gal investiert. Es gelang im Folgenden, den wasserunlöslichen Zucker durch Zusatz von 20% DMSO zu wässrigem Medium in Lösung zu bekommen. Bei einem ersten Screening mit Galactosidasen (EC 3.2.1.23, aus *B. circulans*, *A. oryzae*, Stierhoden sowie einem rekombinanten Enzym aus *E. coli*) deuteten positive Ergebnisse des Enzymtests mit dem modifizierten Substrat (Kapitel E 1.3) und DC-Analytik auf eine erfolgreiche Umsetzung mit den Enzymen bezüglich ihrer Hydrolyseaktivität. Sicherheit konnte allerdings nur eine NMR-Analytik geben. Leider zeigte sich der Zucker als instabil bei Umsetzungen mit Galactosidasen. Es lag ein enzymkatalysierter Zerfall des Substrats vor, bei dem das Substrat in eine nicht genau identifizierbare Mischung (darunter wohl die Edukte) zerlegt wurde. Das positive Signal beim Enzymtest musste von einer Hydrolyse des pNP-6-oxo-Gal oder pNP-Gal herrühren. Um zu einer sicheren Aussage zu kommen, ob pNP-6-biotinhydrazono-Gal ein Substrat von Galactosidasen ist, musste nun zunächst eine

C Ergebnisse und Diskussion

erfolgreiche Reduktionsstrategie gefunden werden.

7.2.1 Reduktion von *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal mit Natriumborhydrid (NaBH_4)

Alle weiteren in Kapitel 7 geschilderten Arbeiten zur Reduktion von *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal wurden im Laboratorium von Prof. Kren (Mikrobiologisches Institut, Akademie der Wissenschaften, Prag) durchgeführt. Da der modifizierte Zucker inert gegenüber einer Reduktion mit NaCNBH_3 geblieben war, wurde mit NaBH_4 ein stärkeres, aber auch weniger selektives Reduktionsmittel verwendet. Aus der Literatur war jedoch bekannt, dass die Nitro-Gruppe des *p*-Nitrophenol von NaBH_4 nicht zur Amino-Funktion reduziert wird (Christen und Vögtle 1992). Daher wurde ein Experiment zur Reduktion von *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal mit NaBH_4 unternommen (Kapitel E 8.3.2). Laut DC-Analytik (Kapitel F 1.3) ergaben sich dabei mehrere Produkte, was auf eine Zersetzung des Zuckers schließen ließ. In jedem Fall erwies sich diese Reduktionsmethode als ungeeignet.

7.2.2 Reduktion von *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal mit Boran (als Tetrahydrofuran-Komplex; Boran-THF-Komplex)

Als alternative Methode für die Reduktion von *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal kam die Umsetzung mit Boran als Komplex mit Tetrahydrofuran (THF) in Frage. In der Literatur ist dieses Reduktionsmittel als unreaktiv mit Nitro-Gruppen, aber reaktiv gegenüber Hydrazonen beschrieben (Mann *et al.* 1992; Kangying *et al.* 2003). Abbildung 82 zeigt die Reaktion mit dem Boran-THF-Komplex.

C Ergebnisse und Diskussion

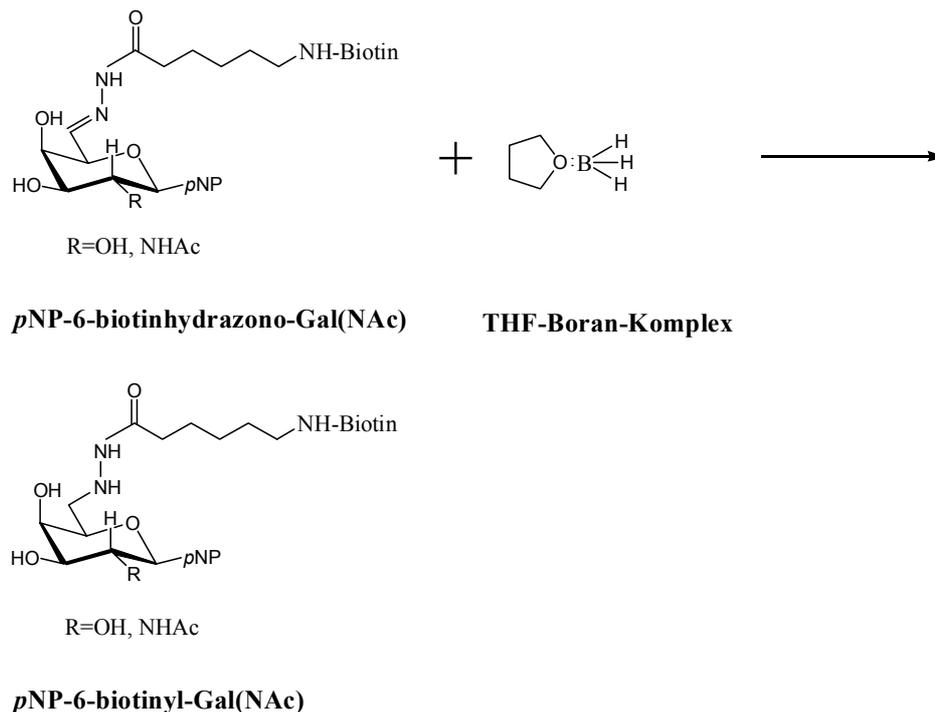


Abbildung 82: Reduktion von *p*NP-6-biotinhydrazone-Gal mit Boran in THF.

Mit dieser Methodik (Kapitel E 8.3.3) gelang es, *p*NP-6-biotinhydrazone-Gal quantitativ in *p*NP-6-biotinyl-Gal zu überführen. Das Reduktionsprodukt konnte über DC-Analytik (Kapitel F 1.3) detektiert werden.

7.2.3 Isolierung von *p*NP-6-biotinyl-Gal

*p*NP-6-biotinyl-Gal lag nach Reduktion zunächst als Boran-Komplex vor. Um das Boran vom Zucker zu trennen, wurde zur Isolierung (Kapitel E 8.3.4) zunächst eine Gelfiltration eingesetzt, um die Unterschiede im Molekulargewicht von Boran (13,8 g/mol), das durch Einengen im Vakuum von THF befreit worden war, und Produktzucker (652,3 g/mol) auszunutzen. Es stellte sich jedoch per NMR-Messung heraus, dass diese Aufreinigungsmethode nicht zum Erfolg führte. Offensichtlich waren die Bindungskräfte zwischen Boran und Zucker zu stark, um durch eine chromatographische Trennung zerstört zu werden. Daher wurde die nach der Gelfiltration erhaltene Reaktionsmischung einer Behandlung in saurem (Salzsäure, die mit Wasser solange verdünnt wurde, bis pH 3,0 erreicht wurde) und anschließend in basischem Medium (gesättigte Natriumhydrogencarbonat-

C Ergebnisse und Diskussion

Lösung) ausgesetzt. Der Zucker erwies sich als unter diesen Bedingungen stabil und per DC-Analytik (Kapitel F 1.4) konnte die Dissoziation des Komplexes beobachtet werden (Abb. der DC in Kapitel H1). Die erhaltene Reaktionsmischung wurde erneut einer Gelfiltration unterzogen, der erhaltene weiße Feststoff wurde lyophilisiert und per NMR vermessen. Da nur eine geringe Menge an Substanz (3 mg) für das NMR zur Verfügung stand, konnte nur ein ^1H -NMR vermessen werden. Zur völligen Absicherung der Struktur hätten noch Korrelationsspektren angefertigt werden müssen. Jedoch kann anhand der vorhandenen Daten die Identität der Struktur mit sehr großer Wahrscheinlichkeit bestätigt werden. Aufgrund des zunächst nicht erfolgreichen Gelfiltrationslaufes konnten aus 35 mg *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal lediglich 3 mg reduzierter Zucker isoliert werden, bei einer Wiederholung der Methode sollte jedoch eine deutlich höhere Ausbeute möglich sein. In jedem Fall konnte eine Methode zur Isolierung von *p*NP-6-biotinyl-Gal etabliert werden. Hiermit waren nun alle Synthese- und Isolierungsschritte für den modifizierten *p*NP-Zucker *p*NP-6-biotinyl-Gal gefunden worden, so dass das Augenmerk nun auf die Umsetzung mit den Galactosidasen gelegt werden konnte. Bemerkenswert war, dass *p*NP-6-biotinyl-Gal im Gegensatz zum unreduzierten Zucker wasserlöslich war.

Die Reduktion von *p*NP-6-biotinhydrazono-GalNAc ist bislang nicht durchgeführt worden. Sie wird ein Schwerpunkt in den nächsten Arbeiten im in der Zukunft weitergeführten Projekt des Deutschen Akademischen Austausch Dienstes (DAAD) mit der Arbeitsgruppe von Prof. Kren der Akademie der Wissenschaften, Prag, sein. Grundsätzlich sollte die für *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal etablierte Reduktionsmethode auch für das *N*-Acetyl-Derivat brauchbar sein.

7.3 *p*NP-6-biotinyl-Gal als Substrat von Galactosidasen

Die Experimente zur Hydrolyse von *p*NP-6-biotinyl-Gal mit Galactosidasen verliefen ernüchternd. Mit keiner der vier eingesetzten β -Galactosidasen (*B. circulans*, *A. oryzae*, aus Stierhoden, rekombinant aus *E. coli* in *E. coli*; EC 3.2.1.23) konnte über den Aktivitätstest selbst nach 24 Stunden Inkubationszeit (Kapitel E 1.3) eine Hydrolyse des modifizierten Zuckers festgestellt werden. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde auf Transglykosylierungs-Experimente mit *p*NP-6-biotinyl-Gal mangels Aussicht auf Erfolg verzichtet.

Offensichtlich ist der Platzanspruch der Biotin-Gruppe des modifizierten Substrates zu groß, um von den Enzymen toleriert werden zu können. Glykosidasen haben zwar eine breite

C Ergebnisse und Diskussion

Akzeptortoleranz (Gambert *et al.* 1997), jedoch ist die Donortoleranz sehr eingeschränkt. So wird schon *pNP*-GalNAc nicht mehr von einer der hier verwendeten Galactosidasen akzeptiert. Dies konnte mit dem Enzymtest für Galactosidasen (Kapitel E 1.3) gezeigt werden. Es reicht also schon eine geringe Modifikation des Donors an C2, um nicht mehr von den Galactosidasen als Substrat erkannt zu werden. Mit dem negativen Ergebnis ist die Strategie der selektiven Markierung über Glykosidasen jedoch noch nicht gescheitert. Galactosidase-Eigenschaften könnten mit der Technik der gerichteten Evolution (Zhang *et al.* 1997) per Zufallsmutagenese so verändert werden, dass das modifizierte Substrat akzeptiert werden könnte. So konnte beispielsweise die Regioselektivität der α -Galactosidase aus *Bacillus stearothermophilus* mit dieser Technik erfolgreich geändert werden (Dion *et al.* 2001). Auch ist eine gerichtete Mutagenese im aktiven Zentrum, wie in dieser Arbeit für die humane β 4Gal-T1 gezeigt, denkbar. Grundlage für die Anwendung der gezielten Mutagenisierung ist die Kristallstruktur eines Enzyms, da so die Bindung des Substrats im aktiven Zentrum gezielt betrachtet werden kann. So liegt etwa die Kristallstruktur der β -Galactosidase aus *E.coli* vor (Juers *et al.* 2000), wodurch dieses Enzym für selektive Mutagenisierung genutzt werden könnte. Auch sind Inhibitoren für die Forschung von großem Interesse (Asano *et al.* 2004), da Galactosidasen z.B. im lysosomalen Katabolismus von Glykokonjugaten oder dem Abbau von Glykokonjugaten im ER eine große Rolle spielen (Asano *et al.* 2004). Inhibitionskinetiken sollten darüber Aufschluss geben, ob der modifizierte Zucker als Inhibitor geeignet ist.

Die Nicht-Akzeptanz von *pNP*-6-biotinyl-Gal hat auch Konsequenzen in Bezug auf das mit 6-biotinyl-Gal markierte IgG. So wird eine Abspaltung des markierten Zuckers durch eine Galactosidase nach Transfer auf den Antikörper unwahrscheinlich. Dies bedeutet, dass eine Quantifizierung des Biotinylierungsgrades über eine Hydrolyse-Reaktion nicht möglich ist.

Eine grundlegende weitere Möglichkeit zur selektiven Markierung mit Glykosidasen liegt in der Strategie der chemoselektiven Kopplung (Kapitel A 5.3, Abbildung 26). Grundlage hierzu ist die Akzeptanz der oxidierten Zucker *pNP*-6-oxo-Gal(NAc) durch Glykosidasen. Nach einer erfolgreichen Transglycosylierung könnte dann eine chemoselektive Biotinylierung stattfinden. Es konnte während der Arbeiten in Prag bereits erfolgreich gezeigt werden, dass *pNP*-6-oxo-GalNAc ein Substrat für Hexosaminidasen ist.

Dieses und die nächsten darauf basierenden Ergebnisse wurden bereits publiziert und sollen hier nur kurz skizziert werden (Fialová, Namdjou *et al.* 2005)

C Ergebnisse und Diskussion

Bei einem Screening wurde mit jeder von 30 getesteten Hexosaminidasen der Pilzfamilien *Acremonium*, *Aspergillus*, *Penicillium* und *Talaromyces* eine Hydrolyseaktivität mit *p*NP-6-oxo-GalNAc festgestellt. Die besten Ergebnisse erbrachten dabei Enzyme der *Penicillium*- und *Talaromyces*-Familien mit bis zu 20% Restaktivität gegenüber *p*NP-GalNAc. Die Hexosaminidase aus *Talaromyces flavus* zeigte sich mit 37% Ausbeute nach Isolierung des Produktes für eine Transglycosylierungsreaktion mit GlcNAc als das bestgeeignete der getesteten Enzyme. Im Weiteren wurde eine chemische Oxidation des Aldehyds *p*NP-6-oxo-GalNAc zur Uronsäure durchgeführt. Das Oxidationsprodukt sowie ein ebenfalls hergestellter, darauf basierender Methylester (Abbildung 83) wurden von den Hexosaminidasen nicht akzeptiert. Durch Molecular Modelling konnte gezeigt werden, dass der Aldehyd im aktiven Zentrum als geminales Diol gebunden wird (Abbildung 83). Hierdurch kann er mehr Wasserstoffbrücken ausbilden als die Uronsäure bzw. der Methylester. So wird der Übergangszustand der katalytischen Reaktion stabilisiert. Das Produkt der Transglycosylierung von Aldehyd und GlcNAc wurde am Aldehyd chemisch oxidiert. Es konnte gezeigt werden, dass das finale Produkt einer der Besten bisher bekannten Hochaffinitäts-Liganden für natürliche Killerzell-Rezeptoren ist.

C Ergebnisse und Diskussion

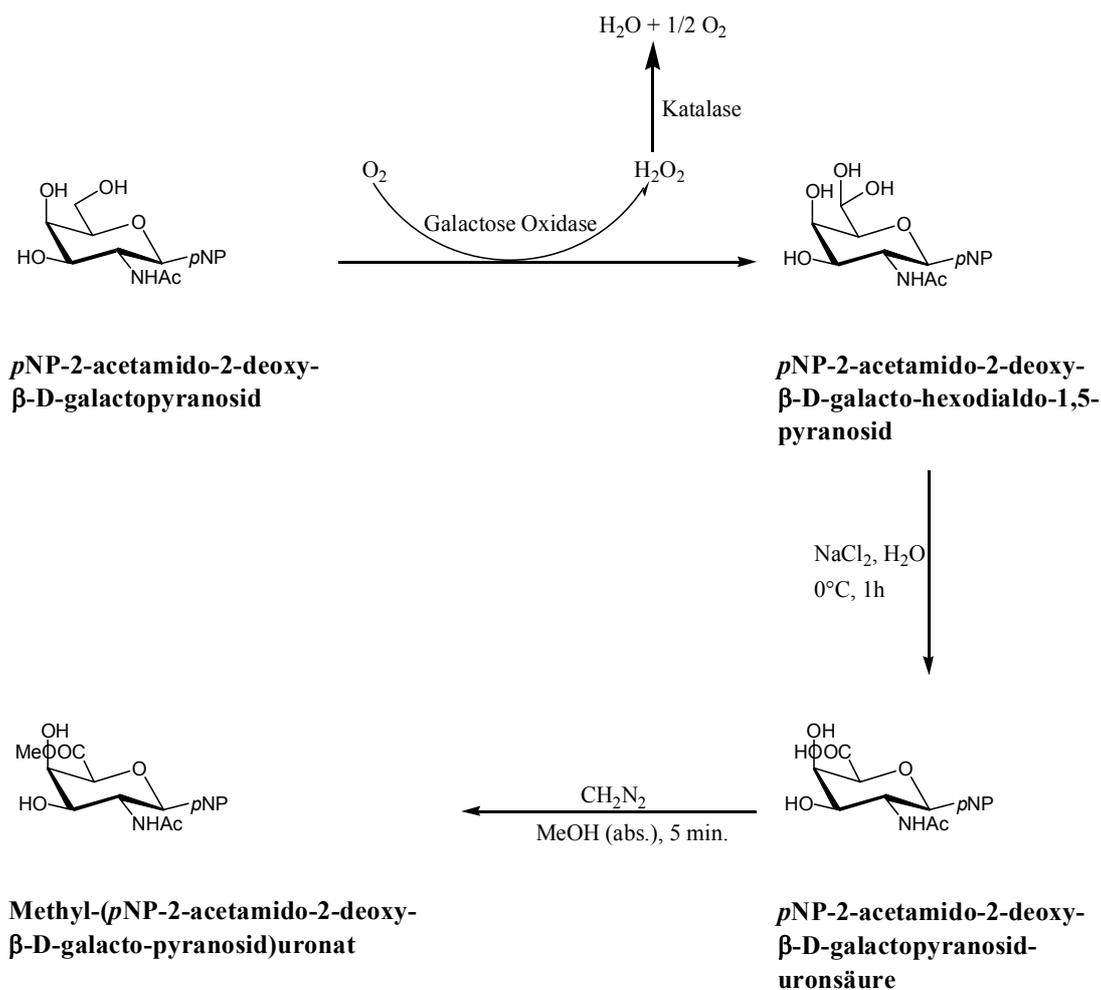


Abbildung 83: Synthese der Uronsäure und des Uronsäuremethylesters von *pNP*-GalNAc.

Weingarten und Thiem konnten die Strategie der chemoselektiven Kopplung bereits erfolgreich für *pNP*-6-oxo-Gal durchführen. Nach Transfer mit der Galactosidase aus *Bacillus circulans* wurde das Transglycosylierungsprodukt chemoselektiv reduktiv aminiert (Weingarten und Thiem 2003).

D Zusammenfassung

Kernziel dieser Arbeit war die selektive Markierung krankheitsrelevanter Glykokonjugatstrukturen durch Glykosyltransferasen. Besonderes Augenmerk sollte auf die Untergalactosylierung der N-Glykane des IgG gelegt werden. Diese Struktur wird in der Literatur mit Rheumatoider Arthritis assoziiert. Für das selektive Labelling sollte der modifizierte Nukleotidzucker UDP-6-biotinyl-Gal als Donorsubstrat verwendet werden. Die in der Arbeitsgruppe Elling für das selektive Labelling vorhandenen Konstrukte der β 4Gal-T1 sollten charakterisiert werden. Mit einem der Konstrukte sollte eine Mutagenisierung durchgeführt werden, um auch ein Labelling mit UDP-6-biotinyl-GalNAc zu ermöglichen. Dieser Nukleotidzucker konnte bis dato mit keinem Enzym erfolgreich transferiert werden. Darüberhinaus sollte gezeigt werden, ob die Technik des selektiven Transfers auch auf die Klasse der Glykosidasen auszuweiten ist.

Die grundlegende Zielsetzung der hier vorliegenden Arbeit konnte erfüllt werden. So wurde zunächst die Synthese und vor allem die nachfolgende Isolierung des für den selektiven Transfer genutzten UDP-6-biotinyl-Gal optimiert. Statt der vorher notwendigen Zwei-Schritt-Aufreinigung kann UDP-6-biotinyl-Gal nun nach einem Schritt und in größerer Reinheit erhalten werden.

Ebenfalls erfolgreich war die Mutagenisierung der humanen β 4Gal-T1. Durch eine gezielte Punktmutation konnte ein Enzym erhalten werden, welches eine UDP-GalNAc-Transferaktivität aufweist. Das Enzym wurde über Affinitätschromatographie aufgereinigt. Zusammen mit drei Konstrukten der humanen β 4Gal-T1, der freien, luminalen und His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 wurde auch die Mutante His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L) charakterisiert. Es wurde das Substratspektrum, das pH-Optimum sowie die Restaktivität mit verschiedenen Metallionen untersucht. Darüberhinaus wurden sämtliche Konstrukte kinetisch charakterisiert. Dabei konnten überraschenderweise Konstrukte gefunden werden, die, je nach Spezifität UDP-6-biotinyl-Gal auf den Monosaccharid-Akzeptor GlcNAc β 1-Bn oder auf das Glykoprotein Ratten IgG übertragen. Ein Transfer von UDP-6-biotinyl-GalNAc mit der His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L) blieb allerdings aus. Dennoch könnte das Enzym im Hinblick auf eine chemoselektive Kopplung, bei der zunächst ein eine geringe Modifikation tragendes UDP-GalNAc auf ein Glykokonjugat übertragen würde, noch sehr wertvoll sein. Mit den Konstrukten freie und luminale β 4Gal-T1 konnte ein Transfer-Assay auf untergalactosylierte Strukturen erfolgreich durchgeführt werden. Mit dem Modellprotein IgG

D Zusammenfassung

der Ratte wurden die Transfer- und Nachweisbedingungen optimiert. So konnte ein Sandwich-ELSA als Nachweis-Methode etabliert werden. Im Weiteren konnte die unterschiedliche Untergalactosylierung der N-Glykane der IgG verschiedener Spezies mit der Technik des selektiven Transfers erfolgreich nachgewiesen werden. Zum Vergleich wurde eine Lektin-Analytik etabliert. Die Ergebnisse des selektiven Transfers und des Lektin-Assays korrespondierten hierbei miteinander. Durch Nachweis des Erfolgs des selektiven Transfers und der Möglichkeit, verschieden hohe Untergalactosylierungen zu unterscheiden, war das hochrangigste Ziel dieser Arbeit realisiert. Zudem wurde eine Strategie zur Quantifizierung des Grades der Biotinylierung verschiedener IgGs etabliert. Es zeigte sich, dass die freien GlcNAc-Reste der N-Glykane des Human IgG annähernd quantitativ biotinyliert werden können. Die einfache Nachweisteknik im Mikrotiterplattenformat durch den Sandwich-ELSA sowie der hohe Biotinylierungsgrad wecken große Hoffnungen in Richtung einer Frühdiagnostik der Rheumatoiden Arthritis. Hier könnte sich also eine kommerzielle Anwendung der Ergebnisse anbahnen.

Mit *p*NP-6-biotinyl-Gal(NAc) wurden potentielle Substrate des selektiven Transfers durch Glykosidasen im 100 mg-Maßstab synthetisiert und isoliert. Eine erfolgreiche Hydrolyse oder ein Transfer dieser Derivate blieb allerdings aus. Jedoch konnten auch die Oxidationsprodukte, *p*NP-6-oxo-Gal(NAc), isoliert werden. Für beide Zucker konnte nachgewiesen werden, dass sie Substrate von Glykosidasen sind. Transglycosylierung von *p*NP-6-oxo-GalNAc mit GlcNAc und nachfolgende chemische Oxidation an der Aldehyd-Funktion erbrachte einen der besten bisher bekannten Hochaffinitäts-Liganden für natürliche Killerzell-Rezeptoren.

E Methoden

1 Enzymtests

1.1 Galactose Oxidase

Ansatz (alle Konzentrationen Endkonzentrationen)

200 µl ABTS	[10 mM]	2 mM Endkonzentration
200 µl Galactose und Derivate	[25 mM]	5 mM Endkonzentration
200 µl Natriumphosphat-Puffer pH 6,0	[500 mM]	100 mM Endkonzentration
200 µl Peroxidase aus Meerrettich	[2500 U/ml]	500 U/ml Endkonzentration
200 µl Galactose Oxidase	[25 U/ml]	5 U/ml Endkonzentration

Ansatzvolumen: 1 ml

Inkubationstemperatur: Raumtemperatur (RT)

ABTS und Galactose Oxidase (GO) wurden in Puffer, die anderen Bestandteile des Tests in Wasser gelöst. Zur Sättigung mit Sauerstoff wurde die ABTS-Lösung zunächst für ca. 30 min. mit Druckluft begast, anschließend wurden alle Reagenzlösungen mit Ausnahme der Galactose Oxidase-Lösung in eine Küvette pipettiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Galactose-Oxidase-Lösung gestartet, und der Verlauf der Reaktion wurde photometrisch anhand der Zunahme der Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm verfolgt. Die zu Beginn der Reaktion linear verlaufende Absorptionzunahme wurde der Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Oxidation dA/dt gleichgesetzt. Hierbei entspricht 1 U Aktivität der Enzymaktivität, die unter Standardbedingungen eine Extinktionsänderung von 1,0 pro Minute bei einer Wellenlänge von 405 nm bewirkt.

Zur Untersuchung der Enzymstabilität wurden Enzymlösungen (500 U/ml) in 25 mM NaPO_4 -Puffer mit 0,5 mM CuSO_4 bei 15°C und RT inkubiert. Das Volumen betrug jeweils 100 µl. Nach 0, 2, 4, 6, 8, 30 und 48 h wurden je 10 µl Probe entnommen, 1:20 mit 25 mM NaPO_4 -Puffer verdünnt und dem Aktivitätstest unterzogen.

E Methoden

Die Aktivität der Galactose Oxidase wurde über folgende Formel bestimmt:

$$A_V = \frac{\Delta E_{405 \text{ nm}} \cdot F}{\Delta t \cdot \epsilon_{\text{mol, ABTS } 405 \text{ nm}} \cdot d}$$

mit

dA/dt	= volumetrische Aktivität	[U/ml]
$\Delta E_{405 \text{ nm}}/\Delta t$	= Anfangssteigung der Extinktionsmessung	[min ⁻¹]
F	= Verdünnungsfaktor des Probevolumens, bezogen auf das Gesamtvolumen des Assays (v/v)	
d	= Schichtdicke	[cm]
$\epsilon_{\text{mol, ABTS } 405 \text{ nm}}$	= Extinktionskoeffizient von ABTS (0,037)	[ml* μmol^{-1} *cm ⁻¹]

1.2 Galactosyltransferasen

1.2.1 HPLC-Assay für Galactosyltransferasen

Dieser Enzym-Assay wurde für die freie und luminale β 4Gal-T1 sowie für die His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 und His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L) genutzt.

Grundlage war die enzymatische Übertragung von Galactose (aus UDP-Gal) oder im Fall der Mutante von GalNAc (aus UDP-GalNAc) auf GlcNAc.

E Methoden

Ansatz (alle Konzentrationen Endkonzentrationen)

25 µl UDP-Gal(NAc)	[10 mM]	2,5 mM
5 µl GlcNAc	[500 mM]	25 mM
20 µl HEPES/NaOH, pH 8,0	[500 mM]	100 mM
10 µl MnCl ₂	[10 mM]	1 mM
40 µl Enzymlösung		

Ansatzvolumen: 100 µl

Inkubationstemperatur: 37°C

Inkubationszeit: bis zu einem Umsatz von 2-5 %

Aus Ni²⁺-NTA-Aufreinigungen (Kapitel E 4.3.3, 4.3.4, 5.3.1, 5.3.2 und 5.3.3) stammende Enzymlösungen wurden zunächst in 100 mM HEPES/NaOH pH 8,0 umgepuffert. Dazu wurden sie in Microcon[®] YM 10 UF-Filtereinheiten (Millipore, Schwalbach) zweimal mit HEPES-Puffer gewaschen. Alle Assaykomponenten bis auf den Nukleotidzucker wurden in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und die Reaktion nach fünfminütiger Vorinkubation bei 37°C durch Zugabe des Nukleotidzuckers gestartet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Probe auf 95°C erhitzt und für 15 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde per HPLC analysiert (Kapitel F 2.6).

Die Aktivität der Transferasen wurde über folgende Formel bestimmt:

$$A_V = \frac{C_{\text{Produktzucker}}}{t} \cdot F$$

mit

A_V = volumetrische Aktivität [U/ml]

t = Inkubationszeit [min]

F = Verdünnungsfaktor des Probevolumens,
bezogen auf das Gesamtvolumen des Assays (V/v)

1 U Transferase-Aktivität entspricht dabei der Enzymmenge, die die Bildung von 1 µmol Produktzucker pro Minute unter Standardbedingungen katalysiert.

E Methoden

Dieser Enzymassay wurde zur Aufnahme der pH-Optima sowie der Restaktivität mit verschiedenen Metallionen (Kapitel E 6.2 und 6.3) für alle Gal-T-Konstrukte sowie die Mutante His₆-TagPropeptid-β4GalT1(Y284L) verwendet.

1.2.2 Photometrischer Assay für Glykosyltransferasen

Der nun vorgestellte Enzymassay ist prinzipiell für alle Klassen von Glykosyltransferasen verwendbar, die UDP-aktivierte Zucker als Donorsubstrate nutzen (Barratt *et al.* 2001). Für den Fall der Gal-Ts überträgt die Transferase Galactose von UDP-Galactose auf GlcNAc, wodurch sich UDP und *N*-Acetyllactosamin (LacNAc) bilden. Die Transferreaktion ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Es wird UDP in der zweiten Reaktion durch die Pyruvatkinase (PK), ein Enzym der Glykolyse, zu UTP (Uridin 5'-triphosphat) umgesetzt, während PEP (Phosphoenolpyruvat) zu Pyruvat reagiert. Pyruvat wird im letzten Schritt von der LDH (Lactatdehydrogenase) zu Lactat reduziert, während NADH zu NAD⁺ oxidiert wird. Die Abnahme der NADH-Konzentration wurde bei 340 nm im Mikrotiterplatten-Photometer verfolgt. Abbildung 84 zeigt die Reaktionen in der Übersicht.

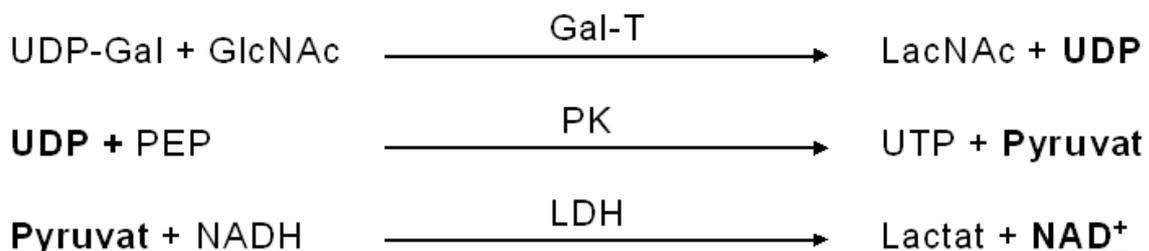


Abbildung 84: Gekoppelter enzymatischer Glykosyltransferasen-Assay nach Barratt *et al.* 2001.

Dieser Enzymassay wurde im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit für die Aufnahme des Substratspektrums sowie der Kinetiken zur Charakterisierung der Gal-T-Konstrukte und der Mutante His₆-TagPropeptidβ4Gal-T1(Y284L) verwendet (Kapitel E 6.1 und 6.4). Die Tatsache, dass mit diesem Assay im Gegensatz zum vorher vorgestellten Gal-T-HPLC-Assay (Kapitel E 1.2.1) eine kontinuierliche Verfolgung der Reaktion über das Photometer möglich ist, machte diesen für Kinetik-Messungen besonders wertvoll. Es musste so nicht mehr darauf geachtet werden, ob man mit den Messpunkten im linearen Bereich der Enzymaktivität blieb, wie es bei der vorher vorgestellten HPLC-Messung vonnöten war.

E Methoden

Ansatz

12,5 µl UDP-Gal oder Derivate	[10 mM]	1 mM Endkonzentration
2,5 µl GlcNAc / GlcNAcβ1-Bn	[500 mM]	10 mM Endkonzentration
1,25 µl PEP	[100 mM]	1 mM Endkonzentration
12,5 µl NADH	[2,5 mM]	0,25 mM Endkonzentration
12,5 µl HEPES/NaOH, pH 8,0	[500 mM]	50 mM Endkonzentration
2,5 µl PK	[1000 U/ml]	20 U/ml Endkonzentration
2,5 µl LDH	[1000 U/ml]	20 U/ml Endkonzentration
12,5 µl KCl	[200 mM]	20 mM Endkonzentration
1,25 µl K ₂ HPO ₄	[200 mM]	2 mM Endkonzentration
1,25 µl MgCl ₂	[400 mM]	4 mM Endkonzentration
1,25 µl MnCl ₂	[100 mM]	1 mM Endkonzentration

Ansatzvolumen: 125 µl

Inkubationstemperatur: 37°C

Es wurden zunächst alle Assaykomponenten zu einem Volumen von 75 µl in einem Eppendorf-Gefäß zusammenpipettiert und die Reaktion nach Überführung der Lösung in eine Mikrotiterplatte durch Zugabe von 50 µl Enzymlösung gestartet. Als Negativkontrolle fungierte jeweils ein Assayansatz ohne Enzym, der mit Millipore H₂O auf 125 µl aufgefüllt wurde. Aus Ni²⁺-NTA-Aufreinigungen (Kapitel E 4.3.3, 4.3.4, 5.3.1, 5.3.2 und 5.3.3) stammende Enzymlösungen wurden zunächst in 100 mM HEPES/NaOH pH 8,0 umgepuffert. Dazu wurden sie in Microcon[®] YM 10 (Millipore, Schwalbach) zweimal mit HEPES-Puffer gewaschen.

E Methoden

Die Aktivität der Transferasen wurde über folgende Formel bestimmt:

$$A_V = \frac{\Delta E_{340\text{ nm}} \cdot F}{\Delta t \cdot \epsilon_{\text{mol, NADH } 340\text{ nm}} \cdot d}$$

mit

A_V	= volumetrische Aktivität	[U/ml]
$\Delta E_{340\text{ nm}}/\Delta t$	= Anfangssteigung der Extinktionsmessung	[min ⁻¹]
F	= Verdünnungsfaktor des Probevolumens, bezogen auf das Gesamtvolumen des Assays (V/v)	
d	= Schichtdicke	[cm]
$\epsilon_{\text{mol, NADH } 340\text{ nm}}$	= Extinktionskoeffizient von NADH (6,2)	[ml* μmol^{-1} *cm ⁻¹]

1 U Transferase-Aktivität entspricht dabei der Enzymmenge, die den Transfer von 1 μmol Substrat (UDP-Gal oder Derivate) pro Minute unter Standardbedingungen katalysiert.

1.3 Galactosidasen

Die Aktivitäten der Galactosidasen konnten durch die Absorption (405 nm, pH 10,0) des bei der Hydrolyse von *p*NP-Gal entstehenden *p*-Nitrophenol bestimmt werden. Ersetzt man *p*NP-Gal durch andere *p*NP-aktivierte Zucker, kann so deren Restaktivität im Vergleich zu *p*NP-Gal festgestellt werden. So wurde *p*NP-6-biotinyl-Gal ebenfalls als Substrat verwendet. Zur Quantifizierung der *p*-Nitrophenol-Absorption wurde zunächst eine Eichgerade erstellt.

Hierzu wurden folgende Konzentrationen an *p*-Nitrophenol benutzt: 20 μM , 40 μM , 60 μM , 80 μM und 100 μM . Die Eichlösungen wurden jeweils in 250 mM Glycin/NaOH-Puffer, pH 10,0 angesetzt. Je 200 μl dieser Lösungen wurden in Mikrotiterplatten pipettiert und die Extinktion bei 405 nm gemessen, wobei die Eichung als Doppelbestimmung vorgenommen wurde.

E Methoden

Ansatz (alle Konzentrationen Endkonzentrationen)

Enzym	Puffer	Substrat	Enzym-konzentration
β-Galactosidase aus Stierhoden (Eigensisolat Nieder)	Natriumcitrat/Natriumphosphatpuffer pH 4,5, 50 mM	pNP-Galactosid 2 mM	5 mU/ml
β-Galactosidase aus <i>A. Oryzae</i>	Natriumcitrat/Natriumphosphatpuffer pH 4,5, 50 mM	pNP-Galactosid 2 mM	5 mU/ml
β-Galactosidase aus <i>B. Circulans</i>	Natriumphosphatpuffer, pH 6,0, 100 mM	pNP-Galactosid 2 mM	5 mU/ml
Rekombinante β-Galactosidase aus <i>E.coli</i> in <i>E.coli</i>	Natriumphosphatpuffer, pH 7,3, 50 mM	pNP-Galactosid 2 mM	5 mU/ml

Ansatzvolumen: 200 µl

Inkubationstemperatur: 37°C

Inkubationszeit: bis zu 2-5 % Reaktionsumsatz

Die Reaktion wurde durch einen pH-Shift durch Zugabe von 900 µl Glycin/NaOH-Puffer (250 mM, pH 10,0) abgestoppt. 200 µl der Probe wurden daraufhin in eine Mikrotiterplatte pipettiert (auch wieder Doppelbestimmung) und die Extinktion des entstandenen Phenolats bei 405 nm gemessen. Nach Quantifizierung anhand der Eichgeraden konnte die volumetrische Aktivität mit folgender Formel berechnet werden:

$$A_V = \frac{c_{pNP}}{t} \cdot \frac{V_{Ansatz}}{V_{Enzymlösung}}$$

A_V = volumetrische Aktivität [U/ml]

V_{Ansatz} = Gesamtvolumen des Assays [µl]

V_{Enzym} = eingesetzte Menge der Enzymlösung [µl]

c_{pNP} = Konzentration an Phenolat [mM]

t = Inkubationszeit [min]

E Methoden

1 U Galactosidase-Aktivität entspricht dabei der Enzymmenge, die die Freisetzung von 1 μmol *p*-Nitrophenol pro Minute unter Standardbedingungen katalysiert.

2 Synthese der zu derivatisierenden Nukleotidzucker

2.1 Präparative Synthese von Uridin 5'-diphospho- α -D-galactose (UDP-Gal)

Für die Synthese von UDP-Gal wurde die "repetitive batch technique" (Kragl *et al.* 1993) eingesetzt (Abbildung 85).

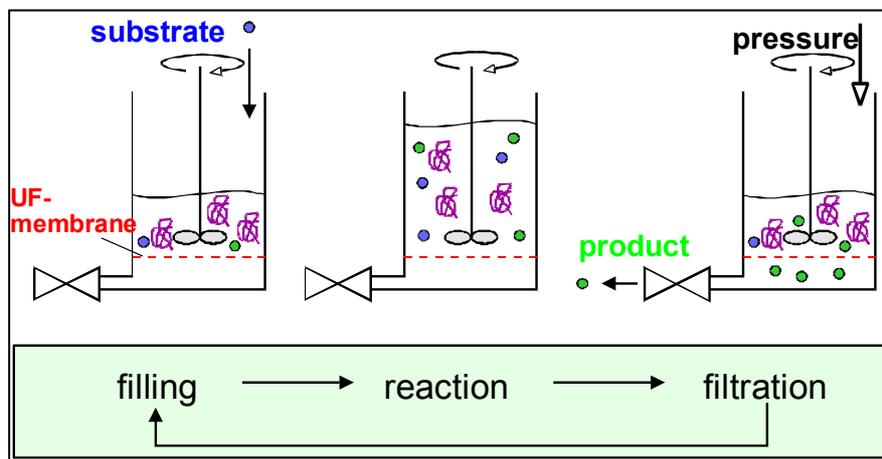


Abbildung 85: Synthesen mit der Repetitive Batch Technique (nach Kragl *et al.* 1993).

Hierbei wird die Produktlösung nach Ablauf der Reaktion in einer Ultrafiltrationszelle durch Drucküberlagerung filtriert. Die zurückgehaltene Enzymlösung kann nach Zugabe frischer Substratlösung wieder zur Synthese verwendet werden. Dem Retentat der Ultrafiltration werden die im nachfolgenden unter A aufgeführten Substanzen zugegeben, die in Wasser oder Synthesepuffer gelöst vorliegen. Die Konzentrationen der Substanzen in der Auffülllösung sind dabei so zu bemessen, dass durch Wiederherstellen des Ausgangsvolumens (50 ml im Fall der UDP-Gal-Synthese) die Ausgangskonzentrationen der Synthese erreicht wurde. Die Zusammensetzung der Ansätze ist im Folgenden wiedergegeben, alle Konzentrationen sind Endkonzentrationen. Der von Bülter und Elling (Bülter und Elling 2000) angegebene Synthesepuffer (Tris/Acetat) wurde weggelassen, stattdessen lief die Reaktion in wässriger

E Methoden

Lösung (pH = 7,0) ab. Grund für diese Änderung war die Erleichterung der Aufreinigung, da nun eine insgesamt geringere Salzkonzentration im Syntheseansatz vorlag. Eine unvollständige Entsalzung hatte bei einer früheren präparativen Synthese von UDP-Gal (während der eigenen Diplomarbeit) mehrere Gelfiltrationsläufe erfordert und zu Ausbeuteverlusten geführt. Es konnte so auch auf eine Ethanolfällung verzichtet werden. Durch das Weglassen des Synthesepuffers kam es weder zu Ausbeuteverlusten in den einzelnen "batches" noch verlängerte sich die Inkubationszeit. Alle angegebenen Konzentrationen sind Endkonzentrationen.

A

UDP-Glc	2,1 mM
Gal-1-P	2,8 mM
NAD ⁺	2,5 mM
Saccharose	500 mM
Glucose-1,6-bisphosphat	0,002 mM
DTT	2 mM
MgSO ₄	2 mM

B

BSA	1 mg/ml
Phosphoglucomutase	0,4 U/ml
Glc-6-P-Dehydrogenase	0,4 U/ml
Gal-1-P-Uridyltransferase	0,1 U/ml

Ansatzvolumen: 50 ml

Temperatur: 30°C

Reaktionsdauer pro "batch": 2 h

Anzahl der Batches: 20

Analytik: HPLC-Analytik (s. Kapitel F 2.2)

Die Produktlösung wurde bis zur Aufreinigung bei -20°C gelagert.

Die zur Reaktionsdurchführung und Ultrafiltration (UF) verwendeten Module stammten von der Firma Amicon, Witten: Ultrafiltrationszelle Modell 8050 (50 ml) mit Ultrafiltrationsmembran YM-10 (cut-off: 10 kDa, d.h. nur Moleküle mit einem

E Methoden

Molekulargewicht kleiner 10 kDa können die Membran passieren), bei der Ultrafiltration konnte ein maximaler Druck von 5 bar angewendet werden, die UF lief bei RT ab.

2.2 Isolierung von UDP-Gal

Nach Abtrennung der Enzyme durch Ultrafiltration erfolgte die Isolierung von UDP-Gal in zwei Schritten. Nach einer Anionenaustauschchromatographie und Einengen der Fraktionen im Vakuum am Rotationsverdampfer folgte eine Gelfiltration. Die aufgereinigtes UDP-Gal enthaltenen Fraktionen der Gelfiltration wurden schließlich durch Lyophilisation getrocknet.

(1) Anionenaustauscherchromatographie

Für den Anionenaustauscher galten folgende Bedingungen:

Säule	XK 50/30 (Pharmacia, Freiburg)
Material	Dowex 1*2 in Chlorid-Form (Serva, Heidelberg)
Bethöhe	21 cm
Durchmesser	5 cm
Volumen	412 ml
Äquilibration	Millipore H ₂ O, Fluss: 10 ml/min
Probenaufgabe	1 mmol aktivierter Zucker, Fluss: 5 ml/min
Waschen	Millipore H ₂ O, Fluss: 10 ml/min
Elution	Millipore H ₂ O linearer Gradient von 0 bis 1 M NaCl, V = 2 l, Fluss: 10 ml/min
Fraktionen	5 ml
Detektion	UV (260 nm)

Millipore H₂O und 1 M NaCl-Lösung wurden vor der Aufreinigung filtriert und entgast.

Die Analytik erfolgte neben der UV-Detektion bei der Chromatographie über HPLC (Kapitel F 2.2). Die UDP-Gal enthalten Fraktionen wurden vereinigt und daraufhin im Vakuum eingengt.

E Methoden

(2) Gelfiltration

Zur Entsalzung wurden die im Vakuum eingeengte Produktlösung einer Gelfiltration unterzogen. Die Einengung war notwendig, da die Trennleistung einer Gelfiltrationssäule nur im geringen Maß von der Konzentration, aber entscheidend vom Volumen der aufzutragenden Probe abhängt.

Säule	XK 26/100 (Pharmacia)
Material	Sephadex G-10 (Pharmacia)
Gelbetthöhe	93 cm
Durchmesser	2,6 cm
Volumen	493, 5 ml
Äquilibriumierung	Millipore H ₂ O, Fluss: 1 ml/min
Probenaufgabe	bis zu 20 ml Probe mit 250 µmol aktiviertem Zucker, Fluss: 1 ml/min
Elution	Millipore H ₂ O, Fluss: 1 ml/min
Detektion	UV (260 nm), Leitfähigkeit

Millipore H₂O wurde vor der Aufreinigung filtriert und entgast.

Die Analytik erfolgte neben der UV- und Leitfähigkeits-Detektion bei der Chromatographie über HPLC (Kapitel F 2.2). Die aufgereinigten Fraktionen von UDP-Gal wurden vereinigt und im Anschluss lyophilisiert, der erhaltene weiße Feststoff wurde bei -20°C gelagert.

3 Synthese biotinylierter Nukleotidzucker

3.1 Synthese von Uridin 5'-diphospho-6-biotin- ϵ -amidocaproylhydrazino- α -D-galactose (UDP-6-biotinyl-Gal)

3.1.1 Präparative Synthese von UDP-6-biotinhydrazono-Gal

Die präparative chemoenzymatische Synthese von UDP-6-biotinhydrazono-Gal fand in einem 50 ml-Reaktor mit integrierter blasenfreier Sauerstoffbegasung statt (s. Abb. 32 und 33). Das Biotinylierungsreagenz BACH wurde in Puffer vorgegeben und durch Erhitzen auf 50°C unter Rühren in Lösung gebracht. Die Lösung wurde hierauf vorsichtig auf Eis abgekühlt, bis sie wieder RT erreichte. Die übrigen Substanzen des Ansatzes bis auf Galactose Oxidase wurden hinzugefügt und der Pumpkreislauf gestartet. Hierauf wurden 0,5 mbar Überdruck an der Anlage angelegt. War der Überdruck nach 10 min. konstant geblieben, wurde die Synthese durch Zugabe von Galactose Oxidase gestartet. Nach 24 h wurde die Reaktionslösung auf 2 ml Eppendorf-Gefäße verteilt und die Synthese durch fünfminütiges Erhitzen bei 95°C abgestoppt. Hierauf wurde für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in einer 100 ml-Schott-Flasche gesammelt.

Ansatz (alle Konzentrationen Endkonzentrationen)

UDP-Gal	8 mM
BACH	12 mM
Katalase	2700 U/ml
Galactose Oxidase	3 U/ml
CuSO ₄	0,5 mM
Natriumphosphat-Puffer (NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄) pH 6,0	25 mM

Ansatzvolumen: 50 ml

Temperatur: RT

Reaktionsdauer: 24 h

Analytik: HPLC-Analytik (s. Kapitel F 2.3)

E Methoden

3.1.2 Reduktion von UDP-6-biotinhydrazono-Gal

Die Reduktion von UDP-6-biotinhydrazono-Gal erfolgte unmittelbar nach der Synthese. NaCNBH₃ wurde zur in der Schott-Flasche befindlichen Lösung gegeben, die Flasche kurz geschüttelt, um das Reduktionsmittel in Lösung zu bringen, und der Ansatz bei -20°C eingefroren.

Ansatz (alle Konzentrationen Endkonzentrationen)

UDP-6-biotinhydrazono-Gal	6,6 mM (83 % Syntheseausbeute)
NaCNBH ₃	100 mM
Natriumphosphat-Puffer (NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄) pH 6,0 (aus der Synthese)	25 mM

Ansatzvolumen: 50 ml

Temperatur: - 20°C

Reaktionsdauer: 48 h

Analytik: HPLC-Analytik (s. Kapitel F 1.3)

3.2 Isolierung von UDP-6-biotinyl-Gal

3.2.1 Zwei-Schritt-Strategie der Isolierung von UDP-6-biotinyl-Gal

Die Reaktionslösung wurde zunächst durch Einengen im Vakuum auf die Hälfte des Volumens aufkonzentriert. Hierauf erfolgte die Isolierung von UDP-6-biotinyl-Gal über präparative HPLC. Die danach erhaltene Produktlösung wurde durch Einengen im Vakuum auf wenige ml konzentriert, hierbei wurden auch die in der mobilen Phase der HPLC befindlichen Lösungsmittel weitestgehend entfernt. Die anschließende Gelfiltration wurde zur möglichst quantitativen Entsalzung wiederholt, schließlich wurde das Produkt durch Lyophilisation getrocknet.

E Methoden

(1) Präparative HPLC

Säule	HPLC-Säule 250x20 (Dionex, Idstein)
Material	ODS-Hypersil (<i>reversed phase</i>) C ₁₈ , Porengröße: 10 µm
Länge	25 cm
Durchmesser	2 cm
Volumen	78,5 ml
Äquilibration	Puffer A: 0,1 M Kaliumacetat, 20 % (v/v) Methanol, 0,013 % (v/v) n-Octylamin, pH 5,6
Probenaufgabe	5 ml der eingeeengten Reaktionslösung mit 65 µmol Produkt
Elution	Puffer A
Detektion	UV (260 nm)

Puffer A wurde vor der Aufreinigung filtriert und entgast.

Die produkthaltigen Fraktionen wurden vereinigt und im Vakuum bis auf wenige ml eingeeengt.

(2) Gelfiltration

Säule	XK 26/100 (Pharmacia)
Material	Sephadex G-10 (Pharmacia)
Gelbetthöhe	93 cm
Durchmesser	2,6 cm
Volumen	493,5 ml
Äquilibration	Millipore H ₂ O, Fluss: 1 ml/min
Probenaufgabe	bis zu 20 ml Probe mit 200 µmol aktiviertem Zucker, Fluss: 1 ml/min
Elution	Millipore H ₂ O, Fluss: 1 ml/min
Detektion	UV (260 nm), Leitfähigkeit

Millipore H₂O wurde vor der Aufreinigung filtriert und entgast.

E Methoden

Die Analytik erfolgte neben der UV- und Leitfähigkeits-Detektion bei der Chromatographie über HPLC (Kapitel F 1.2).

Die aufgereinigten Fraktionen von UDP-6-biotinyl-Gal wurden vereinigt, im Vakuum eingengt und einer nochmaligen Gelfiltration unter den oben genannten Bedingungen unterzogen.

Die aufgereinigten Fraktionen des biotinylierten Nukleotidzuckers wurden vereinigt und im Anschluss lyophilisiert, der erhaltene weiße Feststoff wurde bei -20°C gelagert.

3.2.2 Ein-Schritt-Strategie der Isolierung von UDP-6-biotinyl-Gal

Die Reaktionslösung wurde zunächst durch Einengen im Vakuum vierfach konzentriert. Die letztlich erfolgreichen Arbeiten zur Isolierung von UDP-6-biotinyl-Gal wurden im Lehr- und Forschungsgebiet Biomaterialien am Lehrstuhl für Biotechnologie der RWTH Aachen durchgeführt. Dort stand keine präparative HPLC mehr zur Verfügung, so dass die Aufreinigung über analytische HPLC geschehen musste. Die nach der Aufreinigung erhaltene Produktlösung wurde durch Einengen im Vakuum in der Speedvac getrocknet.

(1) HPLC

Säule	HPLC-Säule (Thermo Hypersil, Dreieich)
Material	ODS-Hypersil (<i>reversed phase</i>) C ₁₈ , Porengröße: 5 µm
Länge	250 mm
Durchmesser	4,6 mm
Äquilibrierung	Mobile Phase A: Methanol 1% / Millipore H ₂ O 99% (v/v), pH 7,0, Fluss: 0,3 ml/min
Probenaufgabe	pro analytischer Lauf 250 µl der eingengten Reaktionslösung mit 6,6 µmol Produkt, Fluss: 0,3 ml/min
Elution	Mobile Phase A, Fluss: 0,3 ml/min
Detektion	UV (205 nm, 260 nm)

E Methoden

Bei der Herstellung von Puffer A wurde zunächst Millipore H₂O filtriert und entgast, darauf Methanol dazugegeben.

Das isolierte UDP-6-biotinyl-Gal wurde vereinigt und im Anschluß im Vakuum in der Speedvac getrocknet, der erhaltene gelbe Feststoff wurde bei -20°C gelagert.

3.2.3 Nachweis von Hydrazid-Kontamination

Zur Überprüfung, ob UDP-6-biotinyl-Gal enthaltende Lösungen mit dem Edukt BACH kontaminiert waren, wurde der Hydrazid-Nachweis mit 2,4,6-Trinitrobenzonsulfonsäure (Pikrylsulfonsäure oder TNBS) herangezogen. Hierfür wurden 50 µl wässrige 100 mM NaH₂PO₄-Lösung vorgelegt, zu der 50 µl der Probenlösung zugegeben wurden. Hierauf erfolgte die Zugabe von 10 µl der Pikrylsulfonsäurelösung (1 M in H₂O; SIGMA, Deisenhofen). Letztlich wurden noch 50 µl wässrige 100 mM Na₂HPO₄-Lösung zugegeben. Bei Vorliegen eines Hydrazids erfolgte ein Farbumschlag von gelb nach orange-rot.

4 Aufreinigung von verschiedenen Konstrukten der humanen β4Gal-T1

4.1 Kultivierung und Aufreinigung der freien humanen β4Gal-T1 (Plasmid pLGalTΔ38).

4.1.1 Anzucht der Vorkulturen

Alle Vorkulturen wurden durch Zugabe von 5 µl einer Dauerkultur in *E. coli* JM109 zu 5 ml LB-Medium (LB-Medium für 1 l: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl) mit 50 µg/ml Ampicillin inokuliert. Das Medium befand sich in Reganzgläsern, die über Nacht bei 120 rpm und 37°C inkubiert wurden.

E Methoden

4.1.2 Anzucht der Hauptkulturen

Die Hauptkulturen wurden in 5 l-Schüttelkolben mit Schikanen angezogen, die jeweils 1 l LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin enthielten. Sie wurden mit 0,1% der Vorkulturen angeimpft und über Nacht bei 75 rpm und 37°C inkubiert. Hierauf wurden 500 µl einer sterilen 1 M Isopropyl-β-thiogalactosid-Lösung (IPTG; Endkonzentration 0,5 mM) in die Kulturen pipettiert und diese für weitere 2 Stunden bei 75 rpm und 37°C inkubiert.

Im nächsten Schritt wurde bei 4°C und 10.000 rpm für 20 min zentrifugiert und die Pellets in Plastikbeutel überführt. Die Anzucht einer Hauptkultur erbrachte 5-6 g Zellen. Diese wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.1.3 Erster Schritt der Aufreinigung: Anionenaustauschchromatographie

Aus 3,5g Zellen und 14 g HEPES-Puffer (100mM, pH 8.0) wurde eine ca. 20%ige Zellsuspension hergestellt. Der Zellaufschluss erfolgte unter Ultraschall, er wurde dreimal für 20 sec mit Pausen von 3 min zwischen den Beschallungen durchgeführt. Während des Aufschlusses wurde die Zellsuspension auf Eis gekühlt, um eine unerwünschte Denaturierung der Proteine im Zelllysate zu vermeiden. Das Lysat wurde bei 15.000 rpm für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Vom Rohextrakt wurde ein Aliquot für die Analyse per HPLC abgenommen (Kapitel F 2.6).

Für die nun folgende Anionenaustauscherchromatographie galten folgende Bedingungen:

Säule	C 26/40 (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
Material	Q-Sepharose Fastflow (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
Betthöhe	20
Durchmesser	2,6
Volumen	106 ml
Äquilibration	Puffer A: 100 mM HEPES/NaOH, pH 8,0; Fluss: 5 ml/min
Probenaufgabe	bis zu 198 mg Protein, Fluß: 5 ml/min
Waschen	Puffer A, Fluss: 5 ml/min
Elution	Puffer A,

E Methoden

	1 M KCl, Fluss: 5 ml/min
Fraktionen	5 ml
Detektion	UV (280 nm)

Durchlauf, Waschlösung und Eluat wurden nach Proteingehalt-Bestimmung (Kapitel F 3) mit den Enzymassays E 1.2.1 und E 1.2.2 auf Aktivität geprüft. Die Aktivität zeigenden Fraktionen (des Durchlaufs) wurden vereinigt und bis zum nächsten Aufreinigungsschritt bei 4°C gelagert.

4.1.4 Zweiter Schritt der Aufreinigung: Chromatographie an Zn²⁺-NTA

Als zweiter Schritt nach der Anionenaustauscherchromatographie fand eine Chromatographie an immobilisierte Metallionen, IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) statt. Hierzu wurde das im Normalfall zur Affinitätschromatographie für einen His₆-Tag tragende Proteine benutzte Ni²⁺-NTA-Material (NTA = Nitrilo triacetic acid, Nitrilotriessigsäure) verwendet. Die Ni²⁺-Ionen wurden zunächst durch Spülen des Materials mit dem Komplexbildner EDTA (Ethylen-diamin-tetraacetat) abgelöst. Es wurde daraufhin mit soviel Millipore H₂O gewaschen, bis sich durch Teststreifen (Macherey-Nagel, Düren) kein EDTA mehr nachweisen ließ. Das Chromatographie-Material wurde daraufhin mit Zn²⁺-Ionen beladen.

Für die Chromatographie an Zn²⁺-NTA galten folgende Bedingungen:

Säule	XK 26/30 (Pharmacia, Freiburg)
Material	Ni ²⁺ -NTA-Superflow (Quiagen, Hilden)
Bethöhe	9,4 cm
Durchmesser	2,6 cm
Volumen	50 ml
Ablösung der Ni-Ionen	100 mM EDTA, pH 8,0 (5 Säulenvolumina)
Entfernen des EDTA	Millipore H ₂ O
Beladung mit Zn-Ionen	0,3 M wässrige ZnSO ₄ -Lösung (2 Säulenvolumina)
Entfernen nicht gebundenen Zn ²⁺	Millipore H ₂ O (2 Säulenvolumina)
Äquilibrierung	Puffer A: 100 mM HEPES/NaOH, pH 8,0; Fluss: 5 ml/min

E Methoden

Probenaufgabe	bis zu 44 mg Protein, Fluss: 5 ml/min
Waschen	Puffer A, Fluss: 5 ml/min
Elution	Puffer A, 25 mM Imidazol, Fluss: 5 ml/min
Fraktionen	5 ml
Detektion	UV (280 nm)

Durchlauf, Waschlösung und Eluat wurden nach Proteingehalt-Bestimmung (Kapitel F 3) mit den Enzymassay E 1.2.1 und E 1.2.2 auf Aktivität geprüft. Die Aktivität zeigenden Fraktionen wurden vereinigt und bei 4°C gelagert.

4.1.5 Aufreinigung durch Kationenaustauschchromatographie

Nur der auf der IMAC vom aus dem Plasmid pLGalTΔ38 exprimierten Fusionsprotein abgespaltene Gal-T-Anteil hatte die Fähigkeit, an SP-Sepharose zu binden. Dieses sollte auch im Rahmen dieser Arbeit belegt werden.

Es galten folgende Bedingungen:

Säule	XK 26/30 (Pharmacia, Freiburg)
Material	SP-Sepharose Fastflow (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
Bethöhe	9,2
Durchmesser	2,6
Volumen	50 ml
Äquilibration	Puffer A: 50 mM HEPES/NaOH, pH 7,0; Fluss: 5 ml/min
Probenaufgabe	bis zu 100 mg Protein, Fluss: 5 ml/min
Waschen	Puffer A, Fluss: 5 ml/min
Elution	Puffer A, 1 M NaCl, Fluss: 5 ml/min
Fraktionen	5 ml
Detektion	UV (280 nm)

E Methoden

Durchlauf und Eluat wurden nach Proteingehalt-Bestimmung (Kapitel F3) mit den Enzymassays E 1.2.2 und E 1.2.3 auf Aktivität geprüft. Die aufgereinigte Proteinlösung wurde bei 4°C gelagert.

4.2 Kultivierung und Aufreinigung der luminalen humanen β 4Gal-T1 (Plasmid lumGalT)

4.2.1 Anzucht der Vorkulturen

Alle Vorkulturen wurden durch Zugabe von 20 μ l einer Dauerkultur in *E. coli* BL21DE3 zu 20 ml LB-Medium mit 50 μ g/ml Ampicillin inokuliert. Das Medium befand sich in 100 ml-Schüttelkolben, die über Nacht bei 120 rpm und 37°C inkubiert wurden.

4.2.2 Anzucht der Hauptkulturen

Die Hauptkulturen wurden in 5 l-Schüttelkolben mit Schikanen angezogen, die jeweils 1 l LB-Medium mit 50 μ g/ml Ampicillin enthielten. Sie wurden mit 1% der Vorkulturen angeimpft und über Nacht bei 75 rpm und 37°C inkubiert. Hierauf wurden 50 μ l einer sterilen 1 M Isopropyl- β -thiogalactosid-Lösung (IPTG; Endkonzentration 0,05 mM) in die Kulturen pipettiert und diese für weitere 24 h Stunden bei 75 rpm und 25°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurde bei 4°C und 10.000 rpm für 20 min zentrifugiert und die Pellets in Plastikbeutel überführt. Die Anzucht einer Hauptkultur erbrachte 5-6 g Zellen. Diese wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.2.3 Aufreinigung durch Kationenaustauschchromatographie

Aus 6,2 g Zellen und 15 g HEPES-Puffer (100mM, pH 8.0) wurde eine ca. 30%ige Zellsuspension hergestellt. Der Zellaufschluss erfolgte unter Ultraschall, er wurde dreimal für 20 sec mit Pausen von 3 min zwischen den Beschallungen durchgeführt. Während des Aufschlusses wurde die Zellsuspension auf Eis gekühlt, um eine unerwünschte Denaturierung der Proteine im Zelllysate zu vermeiden. Das Lysat wurde bei 15.000 rpm für

E Methoden

30 min bei 4°C zentrifugiert. Vom Rohextrakt wurde ein Aliquot für die Analyse per HPLC abgenommen (Kapitel F 2.6).

Für die nun folgende Kationenaustauscherchromatographie galten folgende Bedingungen:

Säule	XK 26/30 (Pharmacia, Freiburg)
Material	SP-Sepharose Fastflow (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
Betthöhe	9,2
Durchmesser	2,6
Volumen	50 ml
Äquilibration	Puffer A: 50 mM HEPES/NaOH, pH 7,0; Fluss: 5 ml/min
Probenaufgabe	bis zu 170 mg Protein, Fluss: 5 ml/min
Waschen	Puffer A, Fluss: 5 ml/min
Elution	Puffer A, 1 M NaCl, Fluss: 5 ml/min
Fraktionen	5 ml
Detektion	UV (280 nm)

Durchlauf und Eluat wurden nach Proteingehalt-Bestimmung (Kapitel F3) mit den Enzymassays E 1.2.2 und E 1.2.3 auf Aktivität geprüft. Die aufgereinigte Proteinlösung wurde bei 4°C gelagert.

4.3 Kultivierung und Aufreinigung der humanen His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1 (Plasmid pTS05)

4.3.1 Anzucht der Vorkulturen

Alle Vorkulturen wurden durch Zugabe von 20 µl einer Dauerkultur in *E.coli* BL21DE3 zu 20 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin inokuliert. Das Medium befand sich in 100 ml-Schüttelkolben, die über Nacht bei 115 rpm und 37°C inkubiert wurden.

E Methoden

4.3.2 Anzucht der Hauptkulturen

Die Hauptkulturen wurden in 5 l-Schüttelkolben mit Schikanen angezogen, die 1 l LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin enthielten. Sie wurden mit 1 % der Vorkulturen angeimpft und bei 75 rpm und 37°C inkubiert. Zur Bestimmung der optischen Dichte (OD, gemessen bei 600 nm) wurden unter sterilen Bedingungen je 1,5 ml der Kulturen entnommen und in einer Küvette im Photometer vermessen. Wenn eine OD von ca. 0,6 erreicht war, wurden 100 µl einer sterilen 1 M Isopropyl-β-thiogalactosid-Lösung (IPTG; Endkonzentration 0,1 mM) in die Kulturen pipettiert und diese über Nacht bei 75 rpm und 25°C inkubiert.

Im nächsten Schritt wurde bei 4°C und 10.000 rpm für 20 min zentrifugiert und die Pellets in Plastikbeutel überführt. Die Anzucht einer Hauptkultur erbrachte 5-6 g Zellen. Diese wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.3.3 Aufreinigung über Ni²⁺-NTA-Spin-Columns

Da das Fusionsprotein einen His₆-Tag trug, sollte die Aufreinigung über Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA erfolgen. Zunächst wurde eine Aufreinigung im kleinen Maßstab über Ni²⁺-NTA Spin Columns (Quiagen, Hilden) durchgeführt.

Es wurde zunächst eine 40%ige Zellsuspension in Lysispuffer (s.u.) hergestellt (ca. 0,4 g Zellen und 600 µl Puffer in einem Eppendorf-Gefäß). Die Zellen wurden nun einem Ultraschallaufschluss unterzogen, wobei Beschallungszeiträume von 2 x 10 s gewählt wurden, die von einer Pause von 1 Minute unterbrochen wurden. Während des Aufschlusses wurde die Zellsuspension auf Eis gekühlt, um eine unerwünschte Denaturierung der Proteine im Zelllysate zu vermeiden. Die noch die Zelltrümmer enthaltende Lösung wurde daraufhin bei 13.000 rpm für 20 min bei 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde als Rohextrakt für die Spin Column-Aufreinigung verwendet, ein Teil wurde für SDS-PAGE und Western Blotting (Kapitel F 5 und F 6) sowie den HPLC-Aktivitätstest (Kapitel E 1.2.1) eingesetzt, ausserdem wurde der Proteingehalt bestimmt (Kapitel F 3).

Für die Aufreinigung wurden folgende Puffer verwendet:

E Methoden

Lysispuffer: 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0; 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol

Waschpuffer: 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0; 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol

Elutionspuffer: 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0; 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol

Die Aufreinigung wurde nach dem Protokoll des Herstellers der Spin Columns vorgenommen (Ni²⁺-NTA Spin Handbook, Qiagen, Hilden):

Die Ni²⁺-NTA Spin Columns wurden mit 600 µl Lysispuffer äquilibriert und bei 2000 rpm für 2 Min. zentrifugiert. Daraufhin wurden die Spin Columns mit 600 µl Rohextrakt beladen, worauf wiederum bei 2000 rpm für 2 min zentrifugiert und der Säulen-Durchlauf gesammelt wurde. Die Spin Columns wurden nun zweimal mit 600 µl Waschpuffer gewaschen, damit unspezifisch gebundenes Protein von der Säule entfernt wurde. Nach jedem Wasch-Schritt wurde erneut bei 2000 rpm für 2 min zentrifugiert, die beiden Wasch-Fractionen wurden vereinigt. Zur Elution wurden die Spin Columns zweimal mit 200 µl Elutionspuffer versetzt, es wurde bei 2000 rpm für 2 min zentrifugiert und die Elutionsfraktionen wurden vereinigt.

Durchlauf, Waschlösung und Eluat wurden nach Proteingehalt-Bestimmung (Kapitel F 3) auf ihre Reinheit mittels SDS-PAGE und Western Blot (F 5 und F 6) sowie mit dem Enzymassay E 1.2.1 auf Aktivität geprüft.

4.3.4 Aufreinigung über IMAC an Ni²⁺-NTA

Zur Aufreinigung des in *E.coli* vorliegenden Fusionsproteins der humanen β4Gal-T1 in größerem Maßstab wurde eine Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Material durchgeführt.

Aus 11,5 g Zellen wurde eine ca. 30%ige Zellsuspension (w/w) mit 26,6 g Lysis-Puffer (s. u.) hergestellt. Zur Vor-Lyse der Zellen wurden 0,4 ml Lysozym (Lösung von 100 mg/ml) zur Zellsuspension gegeben und diese für 5 min auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte unter Ultraschall, er wurde dreimal für 20 sec mit Pausen von 3 min zwischen den Beschallungen durchgeführt. Während des Aufschlusses wurde die Zellsuspension auf Eis gekühlt, um eine unerwünschte Denaturierung der Proteine im Zelllysate zu vermeiden. Das Lysat wurde bei 15.000 rpm für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Vom Rohextrakt wurde ein Aliquot für die Analyse mit SDS-PAGE sowie Western Blot (Kapitel F5 und F 6) als auch den Enzymassay abgenommen (Kapitel E 1.2.1), es wurde ebenfalls der Proteingehalt bestimmt (F 3).

E Methoden

Es wurden folgende Puffer für die Aufreinigung verwendet:

Lysispuffer: 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0; 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol

Waschpuffer: 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0; 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol

Elutionspuffer: 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0; 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol

Für die Chromatographie galten folgende Bedingungen:

Säule	XK 26/30 (Pharmacia, Freiburg)
Material	Ni ²⁺ -NTA-Superflow (Quiagen, Hilden)
Bethöhe	9,4
Durchmesser	2,6
Volumen	50 ml
Äquilibration	Lysispuffer, Fluss: 2 ml/min
Probenaufgabe	bis zu 700 mg Protein, Fluss: 1 ml/min
Waschen	Waschpuffer, Fluss: 2 ml/min
Elution	Elutionspuffer, Fluss: 2 ml/min
Fraktionen	5 ml
Detektion	UV (280 nm)

Durchlauf, Waschlösung und Eluat wurden nach Proteingehalt-Bestimmung auf (Kapitel F 3) ihre Reinheit mittels SDS-PAGE und Western Blot (Kapitel F 5 und F 6) sowie mit den Enzymassays E 1.2.1 und E 1.2.2 auf Aktivität geprüft. Die aufgereinigte Proteinlösung wurde bei 4°C gelagert.

5 Mutagenisierung von rekombinanter humaner β 4Gal-T1

5.1 Klonierung der Mutante

5.1.1 PCR zur Einbringung der Mutation

Als Templat für die PCR diente das Gen für den Gal-T-Anteil aus dem Plasmid pTS05 (Abbildung 43).

Zur Einbringung der Mutation wurde das Templat in Reaktion 1 a) mit dem Primer 3-5 versetzt. Primer 3-5: 5'-CC TCC AAA CAG CTG AA CAT A-3', wobei das Kodon CAG den Aminosäureaustausch kodiert. Um während derselben PCR-Reaktion bereits doppelsträngig die Mutation enthaltende DNA zu erzeugen, enthielt die PCR-Mischung auch den Primer *MunI*, der sein 5'-Ende am 5'-Ende des Templats hat. Primer *MunI*: 5'-ACA AGC GAG CCA ATT GCG GA-3'.

Analog wurde bei Reaktion 1 b) verfahren. Die Mutation wurde mit dem zu Primer 3-5 komplementären Primer 5-3 eingebracht. Primer 5-3: 5'-TAT GTT CAG CTG TTT GGA GG-3', wobei das Kodon CTG den Aminosäureaustausch kodiert. Der PCR-Ansatz enthielt weiterhin Primer *XhoI*, der sein 3'-Ende am 3'-Ende des Templats hat. Primer *XhoI*: 5'-GCC GGA TCC TCG AGC GGC TA-3'.

Ansatz (alle Konzentrationen Endkonzentrationen)

Templat	4 μ g/ml
Deoxynucleosidtriphosphate	175 μ M
Primer (Metabion, Martinsried)	0,2 μ M
Taq DNA Polymerase (Eppendorf, Hamburg)	0,04 U/ μ l
Kaliumchlorid	50 mM
Tris/HCl pH 8,3	10 mM
MgCl ₂	2,5 mM
Gelatine	0,01 % (w/v)

Ansatzvolumen: 250 μ l

Die PCR fand in einem Thermo Cycler (Eppendorf, Hamburg) statt.

E Methoden

Jeder Zyklus bestand aus einer Denaturierung bei 95°C für 1 min und bei 94°C für 1 min, Annealing bei 50°C für 30 sec und einer Elongation bei 72°C für 30 sec. Es wurden insgesamt 20 Zyklen durchgeführt. Die Elongationszeit des letzten Zyklus lag bei 10 min, um sicherzugehen, dass keine einzelsträngige DNA mehr vorlag. Der Erfolg der PCR wurde mit einem Agarose-Gel kontrolliert (Kapitel F 4). Um die bei den PCR-Reaktionen 1 a) und 1 b) erhaltenen DNA-Fragmente zum mutierten Gesamt-Gen zu vereinigen, wurde die PCR-Reaktion (2) durchgeführt. Die Bedingungen für die Reaktion waren identisch mit den oben beschriebenen, der Erfolg der Reaktion wurde erneut über Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert (Kapitel F 4).

5.1.2 Ligation

Das durch PCR-Reaktion (2) gewonnene Fragment des Gesamt-Gens musste nun in einen Vektor eingebracht werden. Genutzt wurde hier der Vektor pTS05, welcher ein pET-16b Vektor (Novagen, Schwalbach) ist. Zur Ligation der Vektor-DNA mit der Insert-DNA wurde das Rapid Ligation Kit von Roche Diagnostics, Mannheim, benutzt. Die Ligation erfolgte *MunI XhoI*.

Zunächst wurde sowohl Vektor- als auch Insert-DNA in 10 µl DNA-Verdünnungspuffer vorgelegt. Hierauf wurde DNA-Ligationspuffer hinzugegeben und die Reaktion durch Hinzufügen von 1 µl der DNA-Ligase gestartet. Nach der fünfminütigen Inkubation bei 25°C wurde die ligierte DNA direkt zur Transformation weiterverwendet (Kapitel E 5.1.4). Das nach Ligation entstandene Plasmid wurde pTS05mut genannt. Ein Teil der ligierten DNA wurde zur Kontrolle der Ligation verwendet. Hierzu wurde durch Restriktionsverdau (Kapitel D 5.1.3) das Gal-T-Gen wieder aus dem Plasmid geschnitten und per PCR kontrolliert. Für die PCR wurde das mutagenisierte Gal-T-Gen als Templat sowie die Primer *MunI* und *XhoI* verwendet. Die Bedingungen der PCR entsprachen den in Kapitel E 5.1.1 geschilderten. Die PCR-Reaktion wurde über Agarose-Gel-Elektrophorese kontrolliert (Kapitel F 4).

E Methoden

Ansatz Ligation (alle Konzentrationen Endkonzentrationen)

Vektor-DNA	50 ng
Insert-DNA	150 ng
DNA Verdünnungspuffer (1x)	10 µl
DNA-Ligationspuffer (2x)	10 µl
T4 DNA Ligase (5 U/µl)	1 µl

Ansatzvolumen: 21 µl

Inkubationszeit: 5 min

Inkubationstemperatur : 25 °C

5.1.3 Restriktionsverdau des ligierten Plasmids PTS05mut

Es wurde ein Doppelverdau mit den Restriktions-Enzymen *Xho I* und *Mun I* unternommen, um den Gal-T-Anteil des Gens aus dem Plasmid auszuschneiden.

Ansatz (alle Konzentrationen Endkonzentrationen)

Plasmid-DNA	6 µl/Ansatz
Puffer M (10x)	2 µl/Ansatz
<i>Mun I</i> (10U/ml)	1 µl/Ansatz
<i>Xho I</i> (10 U/ml)	4 µl/Ansatz

Ansatzvolumen: 20 µl

Inkubationstemperatur: 37°C

Inkubationszeit: 2 h

E Methoden

5.1.4 Transformation der ligierten DNA in *E.coli* Nova Blue

Die ligierte DNA (Kapitel E 5.1.2) wurde nun durch Transformation in einen *E.coli*-Stamm eingebracht. Hierzu wurde der Stamm Nova Blue ausgesucht, der sich aufgrund seiner hohen Transformationseffizienz besonders gut eignen sollte. Zur Verwendung kamen "SinglesTM" kompetente Zellen (Novagen, Schwalbach) des Nova Blue-Stammes, die durch chemische Modifikation kompetent gemacht wurden, das heißt, in der Lage sind, Plasmid-DNA aus der Umgebung aufzunehmen. Zunächst wurde ein bei -80°C gelagertes 50 µl-Aliquot kompetenter Zellen aufgetaut. Hierzu wurde 1 µl ligierter DNA gegeben und der Ansatz wurde für 5 min auf Eis inkubiert. Hierauf wurde die Mischung für genau 30 sec bei 42°C im Wasserbad erhitzt und darauf weitere 2 min auf Eis inkubiert. Zum Ansatz wurden 250 µl SOC-Medium gegeben (SOC-Medium für 1 l: 20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 250 mM KCl pH 7,0, nach Autoklavieren Hinzufügen von 18 ml 20 %iger (w/v) steriler Glucose-Lösung). Die so erhaltene Lösung wurde für 30 min bei 250 rpm und 37 °C im Thermomixer geschüttelt. Die transformierten Zellen wurden auf mehrere LB-Agar-Platten verteilt, die 50 µg/ml Ampicillin enthielten und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden nach Ende der Inkubationszeit bei 4°C gelagert.

5.1.5 Plasmid-DNA-Isolierung

Um den Erfolg der Transformation (Kapitel E 5.1.4) zu verifizieren, wurden zwei Klone von den die Transformanden enthaltenden Agar-Platten gepickt. Gleichzeitig sollte aufgereinigte Plasmid-DNA für die Transformation in den Expressionsstamm *E.coli* BL21DE3 (Kapitel E 5.2.1) gewonnen werden. Das Picken der Klone geschah mit sterilen Pipettenspitzen, die sofort in mit 5 ml LB Medium gefüllte Reagenzgläser abgeworfen wurden. Das Medium enthielt 100 µg/ml Ampicillin. Die Reagenzglaskulturen wurden über Nacht bei 37°C und 120 rpm geschüttelt. Hierauf wurde für 20 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Während der Überstand verworfen wurde, wurden die Zell-Pellets zur Isolierung der Plasmid-DNA verwendet. Hierzu kam das "Plasmid Mini Kit" von Qiagen (Hilden) zum Einsatz. Zunächst wurden die Zellen in 300µl des RNase-haltigen Puffer P1 resuspendiert und in Eppendorf-Gefäße überführt. Zur Zelllyse wurden 300 µl des Puffers P2 hinzugegeben und der Ansatz für 5 min bei RT inkubiert. Zur Präzipitation der Zelltrümmer wurden 300 µl des Puffers P3

E Methoden

hinzugegeben, worauf für 5 min auf Eis inkubiert wurde. Hierauf wurde für 10 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurden “Quiagen-Tip 20“-Säulchen mit 1 ml Puffer QBT äquilibriert und hierauf mit dem Überstand der Zentrifugation beladen. Die Säulen wurden dann viermal mit je 1 ml Puffer QC gewaschen. Zur Elution der Plasmid-DNA werden 800 µl des Puffers QF verwendet.

Die Plasmid-DNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (Kapitel F 4).

5.1.6 Restriktionsverdau des transformierten Plasmids

Nach Isolierung von Plamid-DNA wurde der Erfolg der Transformation mit einem Restriktionsverdau kontrolliert. Es wurde ein Doppolverdau mit den Restriktions-Enzymen *Xho I* und *Nco I* unternommen, um das Gen in voller Größe (Propeptid- und Gal-T-Anteil) aus dem Plasmid auszuschneiden.

Ansatz (alle Konzentrationen Endkonzentrationen)

Plasmid-DNA	6 µl/Ansatz
Puffer H (10x)	2 µl/Ansatz
<i>Xho I</i> (10U/ml)	1 µl/Ansatz
<i>Nco I</i> (10 U/ml)	1 µl/Ansatz

Ansatzvolumen: 20 µl

Inkubationstemperatur: 37°C

Inkubationszeit: 2 h

5.1.7 Sequenzierung des mutagenisierten Gens

Die Sequenzierung des mutagenisierten Gens wurde von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt. Hierbei wurde der Kapillar-Sequencer ABI 3730 benutzt. Die verwendete Sequenzierungsmethode war die Sanger-Kettenabbruch-Methode (s. Lehrbücher der Biochemie), die Markierung der DNA erfolgte über Dye-Terminatoren. Die erhaltene Sequenz ist im Anhang angegeben.

E Methoden

5.2 Expression der Mutante His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1(Y284L)

5.2.1 Transformation in *E.coli* BL21DE3

Nachdem die Transformation in NovaBlue (Kapitel E 5.1.4) erfolgreich gewesen war, wurde die aus dem Nova Blue-Stamm isolierte Plasmid-DNA in kompetente Zellen des Expressionsstamms *E.coli* BL21DE3 transformiert. Zur Verwendung kamen “SinglesTM“ kompetente Zellen (Novagen, Schwalbach). Die Vorgehensweise bei der Transformation war identisch mit der bei der Transformation in Nova Blue geschilderten.

5.2.2 Anzucht der ersten Vorkulturen

Zur Anzucht der ersten beiden Vorkulturen wurde jeweils ein Klon von der die BL21DE3-Transformanden enthaltenden Platten gepickt und mit diesem je 20 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angeimpft. Das Medium befand sich in 100 ml-Schüttelkolben, die über Nacht bei 115 rpm und 37°C inkubiert wurden.

5.2.3 Anlegen von Dauerkulturen

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurde je 1 ml der unter Kapitel E 5.2.2 beschriebenen Vorkulturen mit sterilen Pipettenspitzen von diesen abgenommen und in je ein Kryoschraubkapsengefäß gefüllt. In dieses wurden hierauf 800 µl Glycerol gegeben und mit der Kulturlösung vermischt. Die Dauerkulturen wurden bei -20°C gelagert.

5.2.4 Anzucht weiterer Vorkulturen

Alle Vorkulturen außer die unter E 5.2.2 beschriebenen wurden durch Zugabe von 20 µl der Mutanten-Dauerkulturen zu 20 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (E 5.2.3) inokuliert. Im Übrigen wurde nach E 5.2.2 vorgegangen.

E Methoden

5.2.5 Anzucht der Hauptkulturen

Die Hauptkulturen wurden in 5 l-Schüttelkolben mit Schikanen angezogen, die 1 l LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin enthielten. Sie wurden mit 1 % der Vorkulturen angeimpft und bei 75 rpm und 37°C inkubiert. Zur Bestimmung der optischen Dichte (OD, gemessen bei 600 nm) wurden unter sterilen Bedingungen je 1,5 ml der Kulturen entnommen und in einer Küvette im Photometer vermessen. Wenn eine OD von ca. 0,6 erreicht war, wurden 100 µl einer sterilen 1 M Isopropyl-β-thiogalactosid-Lösung (IPTG; Endkonzentration 0,1 mM) in die Kulturen pipettiert und diese über Nacht bei 75 rpm und 25°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurde bei 4°C und 10.000 rpm für 20 min zentrifugiert und die Pellets in Plastikbeutel überführt. Die Anzucht einer Hauptkultur erbrachte 5-6 g Zellen. Diese wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

5.3 Aufreinigung der Mutante His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1(Y284L)

5.3.1 Aufreinigung über Ni²⁺-NTA-Spin-Columns

Diese Aufreinigung erfolgte analog zu der unter Kapitel E 4.3.3 geschilderten.

5.3.2 Aufreinigung über IMAC an Ni²⁺-NTA

Diese Aufreinigung erfolgte analog zu der unter Kapitel E 4.3.4 geschilderten.

5.3.3 Aufreinigung über IMAC an Ni²⁺-NTA mit Gradienten-Elution

Um eine höhere Reinheit (geringere Zahl an Translationsabbruchprodukten) des Ziel-Proteins zu erhalten, wurde eine wie in Kapitel E 4.3.4 beschriebene Chromatographie an Ni²⁺-NTA durchgeführt. Allerdings wurde bei der Elution ein Imidazol-Gradient von 20-250 mM mit einem Volumen von 100 ml verwendet.

E Methoden

5.3.4 Anionenaustauscherchromatographie als zweiter Schritt nach Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA

Um eine höhere Reinheit (geringere Zahl an Translationsabbruchprodukten) des Ziel-Proteins zu erhalten, wurde zunächst eine wie in Kapitel E 4.3.4 beschriebene Chromatographie an Ni²⁺-NTA durchgeführt. Der Pool dieser Aufreinigung wurde einer zweiten Chromatographie an einem Anionenaustauscher unterzogen. Um aufgrund der hohen Ionenstärke des Pools überhaupt eine Bindung an das Anionenaustauscher-Material zu ermöglichen, wurde der Pool in Vivaspin[®] 20-Modulen, Größenausschluss: 10 kDa (Vivascience, Hannover) von 35 auf 5 ml einkonzentriert und fünfmal mit 0,1 M HEPES/NaOH pH 8,0 gewaschen.

Es galten folgende Bedingungen:

Material	Q-Sepharose Fastflow (Pharmacia, Freiburg)
Bethöhe	5 cm
Durchmesser	1 cm
Volumen	4 cm
Äquilibrierung	Puffer A: 100 mM HEPES/NaOH, pH 8,0; Fluss: 0,4 ml/min
Probenaufgabe	5 mg Protein, Fluss: 0,4 ml/min
Waschen	Puffer A, Fluss: 0,4 ml/min
Elution	Puffer A, linearer Gradient von 0 bis 1 M NaCl, V = 20 ml, Fluss: 0,4 ml/min
Fraktionen	0,5 ml
Detektion	UV (280 nm)

Durchlauf, Waschlösung und Eluat wurden nach Proteingehalt-Bestimmung (Kapitel F 3) auf ihre Reinheit mittels SDS-PAGE und Western Blot (F 5 und F 6) sowie mit dem Enzymassay E 1.2.1 auf Aktivität geprüft.

E Methoden

5.3.5 Gelfiltration als zweiter Schritt nach Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA

Um eine höhere Reinheit (geringere Zahl an Translationsabbruchprodukten) des Ziel-Proteins zu erhalten, wurde zunächst eine wie in Kapitel E 4.3.4 beschriebene Chromatographie an Ni²⁺-NTA durchgeführt.

Der Pool dieser Aufreinigung wurde als Feinreinigungsschritt einer Gelfiltration unterzogen. Der Pool wurde in Vivaspin® 20-Modulen, Größenausschluss: 10 kDa (Vivascience, Hannover) von 35 auf 2 ml einkonzentriert.

Es galten folgende Bedingungen:

Säule	XK 26/30 (Pharmacia, Freiburg)
Material	Sephadex G-200 (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
Betthöhe	68 cm
Durchmesser	2,6 cm
Volumen	361 ml
Äquilibrierung	Puffer A: 100 mM HEPES/NaOH pH 8,0; 0,15 M NaCl
Probenaufgabe	5 mg Protein, Fluss: 1 ml/min
Waschen	Puffer A, Fluss: 1 ml/min
Elution	Puffer A, Fluss: 1 ml/min
Fraktionen	0,5 ml
Detektion	UV (280 nm)

Die Gelfiltration wurde auch mit folgendem Puffer durchgeführt:

0.1 M HEPES/NaOH pH 8,0; 150 mM NaCl, 0,5 % (v/v) Triton X-100.

Das Eluat wurde nach Proteingehalt-Bestimmung (Kapitel F 3) auf seine Reinheit mittels SDS-PAGE und Western Blot (F 5 und F 6) sowie mit dem Enzymassay E 1.2.2 auf Aktivität geprüft.

6 Charakterisierung der β 4Gal-T1-Konstrukte sowie der Mutante His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L)

6.1 Substratspektrum

Zur Untersuchung des Substratspektrums der Gal-T-Konstrukte sowie der Mutante His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 wurde der photometrische Enzymassay nach Barratt (Kapitel E 1.2.2) genutzt. Als Enzymlösung wurden Elutionsfraktionen der jeweiligen Enzymaufreinigungen (Kapitel 4.1.5, 4.2.4, 4.3.4 und 5.3.2) eingesetzt. Als Puffer wurden für die freie β 4Gal-T1 HEPES pH 8,0, für die luminale β 4Gal-T1 HEPES pH 6,8, für die His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 HEPES 7,6 und für die His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L) MES pH 6,5 benutzt. Für freie, luminale und His₆-TagPropeptid- β 4-Gal-T1 wurden als Donorsubstrate UDP-Gal sowie UDP-6-biotinyl-Gal verwendet. Für die Mutante His₆-TagPropeptid- β 4-Gal-T1(Y284L) wurden UDP-Gal, UDP-GalNAc, UDP-6-biotinyl-Gal sowie UDP-6-biotinyl-GalNAc als Donorsubstrate eingesetzt. Alle Donorsubstrate und Enzyme wurden jeweils mit GlcNAc β 1-Bn und reduziertem und blockiertem IgG der Ratte (s. Kapitel E 7.3) umgesetzt.

Es wurden folgende verschiedene Konzentrationen für die Donor- und Akzeptorsubstrate verwendet. Die Angaben zur Konzentration des Metallions verstehen sich jeweils zuzüglich der im Photometerassay ohnehin vorliegenden 4 mM Mg²⁺.

Freie β 4Gal-T1:

Reaktion: UDP-Gal + GlcNAc β 1-Bn

Konzentration des Akzeptors: 1,5 mM

Konzentration des Donors: 5 mM

Metallion: 1 mM Mn²⁺

Reaktion: UDP-6-biotinyl-Gal + GlcNAc β 1-Bn

Konzentration des Akzeptors: 1,5 mM

Konzentration des Donors: 5 mM

Metallion: 1 mM Mg²⁺

E Methoden

Reaktion: UDP-Gal + reduziertes und blockiertes IgG der Ratte

Konzentration des Akzeptors: 10 μM

Konzentration des Donors: 3 mM

Metallion: 1 mM Mn^{2+}

Reaktion UDP-6-biotinyl-Gal + reduziertes und blockiertes IgG der Ratte

Konzentration des Akzeptors: 25 μM

Konzentration des Donors: 10 mM

Metallion: 1 mM Mg^{2+}

Luminale $\beta 4\text{Gal-T1}$:

Reaktion: UDP-Gal + GlcNAc β 1-Bn

Konzentration des Akzeptors: 2,5 mM

Konzentration des Donors: 5 mM

Metallion : 1 mM Mn^{2+}

Reaktion: UDP-6-biotinyl-Gal + GlcNAc β 1-Bn

Konzentration des Akzeptors: 1 mM

Konzentration des Donors: 0,2 mM

Metallion: 1 mM Co^{2+}

Reaktion: UDP-Gal + reduziertes und blockiertes IgG der Ratte

Konzentration des Akzeptors: 37,5 μM

Konzentration des Donors: 1 mM

Metallion: 1 mM Mn^{2+}

Reaktion: UDP-6-biotinyl-Gal + reduziertes und blockiertes IgG der Ratte

Konzentration des Akzeptors: 75 μM

Variation des Donors: 0,1 mM

Metallion: 1 mM Co^{2+}

E Methoden

His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1

Reaktion: UDP-Gal + GlcNAcβ1-Bn

Konzentration des Akzeptors: 1 mM

Konzentration des Donors: 2 mM

Metallion : 1 mM Mn²⁺

Reaktion: UDP-6-biotinyl-Gal + GlcNAcβ1-Bn

Konzentration des Akzeptors: 2,5 mM

Konzentration des Donors: 0,7 mM

Metallion: 1 mM Mg²⁺

Reaktion: UDP-Gal + reduziertes und blockiertes IgG der Ratte

Konzentration des Akzeptors: 75 μM

Konzentration des Donors: 0,25 mM

Metallion: 1 mM Mn²⁺

Reaktion: UDP-6-biotinyl-Gal + reduziertes und blockiertes IgG der Ratte

Konzentration des Akzeptors: 75 μM

Konzentration des Donors: 0,25 mM

Metallion: 1 mM Mg²⁺

His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1(Y284L)

Reaktion : UDP-GalNAc + GlcNAcβ1-Bn

Konzentration des Akzeptors: 6 mM

Konzentration des Donors: 4 mM

Metallion: 1 mM Mn²⁺

Reaktion : UDP-Gal + GlcNAcβ1-Bn

Konzentration des Akzeptors: 6 mM

Konzentration des Donors: 4 mM

Metallion: 1 mM Mn²⁺

E Methoden

Reaktion : UDP-6-biotinyl-GalNAc + GlcNAc β 1-Bn

Konzentration des Akzeptors: 6 mM

Konzentration des Donors: 4 mM

Metallion: 1 mM Mg²⁺

Reaktion : UDP-6-biotinyl-Gal + GlcNAc β 1-Bn

Konzentration des Akzeptors: 6 mM

Konzentration des Donors: 4 mM

Metallion: 1 mM Mg²⁺

Reaktion: UDP-GalNAc + reduziertes und blockiertes IgG der Ratte

Konzentration des Akzeptors: 75 μ M

Konzentration des Donors: 0,25 mM

Metallion: 1 mM Mn²⁺

Reaktion: UDP-6-biotinyl-Gal + reduziertes und blockiertes IgG der Ratte

Konzentration des Akzeptors: 75 μ M

Konzentration des Donors: 0,25 mM

Metallion: 1 mM Mg²⁺

Reaktion: UDP-6-biotinyl-GalNAc + reduziertes und blockiertes IgG der Ratte

Konzentration des Akzeptors: 75 μ M

Konzentration des Donors: 0,25 mM

Metallion: 1 mM Mn²⁺

Reaktion: UDP-6-biotinyl-Gal + reduziertes und blockiertes IgG der Ratte

Konzentration des Akzeptors: 75 μ M

Konzentration des Donors: 0,25 mM

Metallion: 1 mM Mn²⁺

Zur Auswertung der Messungen wurde zunächst über die in Kapitel E 1.2.2 dargestellte Formel die jeweilige Aktivität berechnet. Über die Ermittlung des Proteingehalts nach Bradford (Kapitel F 3) wurden daraufhin die spezifischen Aktivitäten berechnet.

E Methoden

6.2 pH-Optimum

Zur Untersuchung des pH-Optimums der drei Konstrukte der β 4Gal-T1 sowie der Mutante His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L) wurde der HPLC-Assay (Kapitel E 1.2.1) genutzt. Die Inkubationszeit betrug für die Gal-T-Konstrukte 30 min., für die Mutante 20h. Die Endkonzentration des Donorsubstrats (UDP-Gal für die β 4Gal-T1-Enzyme, UDP-GalNAc für die Mutante) betrug 2,5 mM sowie die Endkonzentration des Akzeptorsubstrats GlcNAc 5 mM. Als Puffer wurden für die Gal-T-Konstrukte 50 mM Citrat-Phosphat-Puffer (freie β 4Gal-T1 und His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 pH 6,0-6,8, luminale β 4Gal-T1 pH 5,0-6-8) sowie 50 mM HEPES-Puffer (pH 6,8-8,2) verwendet. Für His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L) wurde 50 mM MES-Puffer (pH 5,8-6,8) sowie 50 mM HEPES-Puffer (pH 6,8-8,2) verwendet. Die Enzymaktivität errechnete sich wie in Kapitel E 1.2.1 beschrieben.

6.3 Restaktivität mit verschiedenen Metallionen

Zur Untersuchung der Restaktivität der Mutante der drei Konstrukte der β 4Gal-T1 sowie der Mutante His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L) mit verschiedenen Metallionen wurde der HPLC-Assay (Kapitel E 1.2.1) genutzt. Als Puffer wurden für die freie β 4Gal-T1 HEPES pH 8,0, für die luminale β 4Gal-T1 HEPES pH 6,8, für die His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 HEPES 7,6 und für die His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L) MES pH 6,5 benutzt. Die Inkubationszeit betrug für die Gal-T-Konstrukte 30 min., für die Mutante 20h. Die Endkonzentration des Donorsubstrats (UDP-Gal für die β 4Gal-T1-Enzyme, UDP-GalNAc für die Mutante) betrug 2,5 mM sowie die Konzentration des Akzeptorsubstrats GlcNAc 5 mM. Folgende Metallionen wurden eingesetzt: Mg²⁺, Ca²⁺, Co²⁺. Die Konzentration des Metallions betrug jeweils 1 mM.

Die Enzymaktivität errechnete sich wie in Kapitel E 1.2.1 beschrieben.

6.4 Kinetische Charakterisierung

Zur kinetischen Charakterisierung der Gal-T-Konstrukte der rekombinanten humanen β 4Gal-T1 sowie der Mutante His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L) wurde der photometrische

E Methoden

Enzymassay nach Barratt (Kapitel E 1.2.2) genutzt. Als Beispiel einer Kinetik mit einem einfachen Monosaccharid-Akzeptorsubstrat wurde GlcNAc eingesetzt. Um für die Kinetik ein am anomeren C-Atom sterisch definiertes Akzeptorsubstrat zu haben, wurde Benzyl-*N*-acetyl- β -D-glucosamin (GlcNAc β 1-Bn) verwendet. Als Beispiel für ein Glykoprotein wurde das reduzierte und blockierte IgG der Ratte (s. Kapitel E 7.3) ebenfalls als Akzeptor verwendet. Als Enzymlösung wurden Elutionsfraktionen der jeweiligen Enzymaufreinigungen (Kapitel 4.1.5, 4.2.4, 4.3.4 und 5.3.2) eingesetzt. Als Puffer wurden für die freie β 4Gal-T1 HEPES pH 8,0, für die luminale β 4Gal-T1 HEPES pH 6,8, für die His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1 HEPES 7,6 und für die His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L) MES pH 6,5 benutzt.

Bei den Kinetiken wurden folgende verschiedene Konzentrationen für die Donor- und Akzeptorsubstrate verwendet. Die Angaben zur Konzentration des Metallions verstehen sich jeweils zuzüglich der im Photometerassay ohnehin vorliegenden 4 mM Mg²⁺.

Freie β 4Gal-T1:

Reaktion: UDP-Gal + GlcNAc

Variation des Akzeptors: 1, 2,5, 5, 10, 20, 35 und 50 mM bei einer konstanten Donorkonzentration von 2,5 mM.

Variation des Donors: 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6 und 8 mM bei einer konstanten Akzeptorkonzentration von 37,5 mM.

Metallion: 1 mM Mn²⁺

Reaktion: UDP-Gal + GlcNAc β 1-Bn

Variation des Akzeptors: 0.1, 1, 1.5, 2.5, 3.75, 5, 10 mM bei einer konstanten Donorkonzentration von 2 mM.

Variation des Donors: 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 5 mM bei einer konstanten Akzeptorkonzentration von 1,5 mM.

Metallion: 1 mM Mn²⁺

Reaktion: UDP-Gal + reduziertes und blockiertes IgG der Ratte

Variation des Akzeptors: 0.5, 5, 8, 12, 24, 48 μ M bei einer konstanten Donorkonzentration von 0,5 mM.

Variation des Donors: 0.2, 0.5, 1, 2, 5 mM bei einer konstanten Akzeptorkonzentration von 10 μ M.

Metallion: 1 mM Mn²⁺

E Methoden

Reaktion UDP-6-biotinyl-Gal + reduziertes und blockiertes IgG der Ratte

Variation des Akzeptors: 10, 20, 30, 50, 100, 150 μM bei einer konstanten

Donorkonzentration von 1,5 mM.

Variation des Donors: 0.1, 0.5, 1, 1.5, 3, 6, 9 mM bei einer konstanten Akzeptorkonzentration von 25 μM .

Metallion: 1 mM Mg^{2+}

Luminale $\beta 4\text{Gal-T1}$

Reaktion: UDP-Gal + GlcNAc

Variation des Akzeptors: 1, 2.5, 5, 10, 20, 35 und 50 mM bei einer konstanten

Donorkonzentration von 2,5 mM.

Variation des Donors: 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6 und 8 mM bei einer konstanten

Akzeptorkonzentration von 37,5 mM.

Metallion: 1 mM Mn^{2+}

Reaktion: UDP-Gal + GlcNAc $\beta 1$ -Bn

Variation des Akzeptors: 0.15, 0.3, 0.6, 2.5, 5, 10 mM bei einer konstanten

Donorkonzentration von 2,5 mM.

Variation des Donors: 0.1, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8, 7 mM bei einer konstanten

Akzeptorkonzentration von 2,5 mM.

Metallion: 1 mM Mn^{2+}

Reaktion: UDP-6-biotinyl-Gal + GlcNAc $\beta 1$ -Bn

Variation des Akzeptors: 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8 mM bei einer konstanten

Donorkonzentration von 0,6 mM.

Variation des Donors: 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4 mM bei einer konstanten

Akzeptorkonzentration von 1 mM.

Metallion: 1 mM Co^{2+}

Reaktion: UDP-Gal + reduziertes und blockiertes IgG der Ratte

Variation des Akzeptors: 5, 15, 30, 60, 90, 110 μM bei einer konstanten Donorkonzentration von 0,4 mM.

Variation des Donors: 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 mM bei einer konstanten

E Methoden

Akzeptorkonzentration von 37,5 μM .

Metallion: 1 mM Mn^{2+}

Reaktion: UDP-6-biotinyl-Gal + reduziertes und blockiertes IgG der Ratte

Variation des Akzeptors: 2.5, 7.5, 15, 30, 60, 120 μM bei einer konstanten

Donorkonzentration von 0,8 mM.

Variation des Donors: 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mM bei einer konstanten Akzeptorkonzentration von 75 μM .

Metallion: 1 mM Co^{2+}

His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1

Reaktion: UDP-Gal + GlcNAc

Variation des Akzeptors: 1, 2.5, 5, 10, 20, 35 und 50 mM bei einer konstanten

Donorkonzentration von 2,5 mM.

Variation des Donors: 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6 und 8 mM bei einer konstanten

Akzeptorkonzentration von 37,5 mM.

Metallion: 1 mM Mn^{2+}

Reaktion: UDP-Gal + GlcNAc β 1-Bn

Variation des Akzeptors: 0.15, 0.3, 0.6, 1, 2.5, 5, 10 mM bei einer konstanten

Donorkonzentration von 2 mM.

Variation des Donors: 0.1, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 mM bei einer konstanten

Akzeptorkonzentration von 1 mM.

Metallion: 1 mM Mn^{2+}

Reaktion: UDP-6-biotinyl-Gal + GlcNAc β 1-Bn

Variation des Akzeptors: 0.15, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15, 25 mM bei einer konstanten

Donorkonzentration von 0,5 mM.

Variation des Donors: 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3 mM bei einer konstanten

Akzeptorkonzentration von 2,5 mM.

Metallion : 1 mM Mg^{2+}

E Methoden

Reaktion : UDP-Gal + reduziertes und blockiertes IgG der Ratte

Variation des Akzeptors: 5, 15, 30, 60, 90, 120 μM bei einer konstanten Donorkonzentration von 0,4 mM.

Variation des Donors: 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 mM bei einer konstanten Akzeptorkonzentration von 75 μM .

Metallion: 1 mM Mg^{2+}

His₆-TagPropeptid- β 4Gal-T1(Y284L)

Reaktion: UDP-GalNAc + GlcNAc β 1-Bn

Variation des Akzeptors: 0.1, 0.3, 0.6, 1, 2.5, 5, 10 mM bei einer konstanten Donorkonzentration von 4 mM.

Variation des Donors: 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 5, 6 mM bei einer konstanten Akzeptorkonzentration von 6 mM.

Metallion: 1 mM Mn^{2+}

Zur Auswertung der Messungen wurde zunächst für die verschiedenen Substratkonzentrationen über die in Kapitel E 1.2.2 dargestellte Formel die jeweiligen Aktivität berechnet. Über die Ermittlung des Proteingehalts nach Bradford (Kapitel F 3) wurden daraufhin die spezifischen Aktivitäten berechnet.

Die ermittelten Daten wurden mit einer Demo-Version der Software Sigma Plot[®] (SPS Science, München) ausgewertet.

Dabei wurde zur Ermittlung der kinetischen Konstanten eine nicht-lineare Regression gewählt.

Es wurden folgende Formeln verwendet:

Michaelis-Menten-Gleichung (nicht inhibierte Verläufe):

$$v_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

mit

v_0 = Anfangsgeschwindigkeit [mU/mg]

V_{\max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit [mU/mg]

K_M = Substratkonzentration bei $V_{\max}/2$ [mM/l]

[S] = Substratkonzentration [mM/l]

E Methoden

Folgende Gleichung wurde für inhibierte Verläufe genutzt:

$$y = a \cdot e^{\left\{ -0,5 \left[\frac{\ln\left(\frac{x}{x_0}\right)}{b} \right]^2 \right\}}$$

mit

a = Kurvenmaximum (V_{\max})

b, x_0 = Konstanten

Durch Setzen der Substratkonzentration $x = a/2$ konnten K_m und K_{iS} (Substratkonzentration bei zur Hälfte abgenommenem V_{\max}) ermittelt werden.

7 Spezifische Markierung der N-Glykanketten des Immunglobulin G als Beispiel krankheitsrelevanter Glykoproteine

7.1 Lektin-Analytik der IgG-Untergalactosylierung

Zur Detektion der Untergalactosylierung der IgG verschiedener Spezies wurde eine Lektin-Untersuchung im Mikrotiterplattenformat verwendet.

Je 0,15 mg IgG (jeweils Reagent Grade, Sigma, Deisenhofen) wurden in 200 μ l PBS-Puffer (6,5 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4 , 140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, pH 7,2) gelöst und auf einer Mikrotiterplatte über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur statistischen Absicherung wurden alle Proben als Doppelbestimmung durchgeführt.

Hierauf wurden die die Probe tragenden Vertiefungen der Platte dreimal mit 400 μ l Cova-Puffer (PBS-Puffer mit zusätzlich 1 M NaCl, 40 mM MgCl_2 und 0,05 % (v/v) Tween 20) für je mindestens 30 Sekunden gewaschen.

Im nächsten Schritt wurden jeweils 100 μ l Lektin-Peroxid-Lösung (WGA-Peroxidase-Konjugat, SIGMA; 0,1 mg/ml in PBS mit 0,05 % Tween (v/v)) in die Vertiefungen pipettiert und es wurde für 2 h bei RT inkubiert. WGA ist Wheat Germ Agglutinin.

E Methoden

Es wurde erneut dreimal mit Cova-Puffer gewaschen.

Hierauf erfolgte die Zugabe von jeweils 100 µl o-Phenylendiamin (OPD)-Lösung (DAKO Diagnostica, Hamburg), wobei für 2 min inkubiert wurde.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von je 100 µl 0,5 M H₂SO₄ abgestoppt.

Anschließend wurde im Mikrotiterplatten-Photometer die Extinktion der Proben bei 490 nm bestimmt.

IgG folgender Spezies wurde benutzt: Ratte, Maus, Pferd, Huhn und Mensch (SIGMA, Deisenhofen, Chargennummern: Ratten IgG: 043K9065, Mäuse IgG: 32K9100, Pferde IgG: 013K9015, Hühner IgG: 112K9085, Human IgG: 026K9052.

7.2 Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal auf natives IgG

Für den Transfer des biotinylierten Nukleotidzuckers UDP-6-biotinyl-Gal auf natives IgG galten die nachfolgend geschilderten Bedingungen. IgG wurde in Puffer vorgelegt, die übrigen Komponenten hinzugegeben und der Ansatz durch Hinzufügen des Enzyms gestartet.

Ansatz

50 µl Ratten IgG	[6 mg/ml]	1,5 mg/ml Endkonzentration
2 µl UDP-6-biotinyl-Gal	[150 mM]	1,5 mM Endkonzentration
50 µl HEPES/NaOH pH 7,4	[100 mM]	25 mM Endkonzentration
2 µl MgCl ₂	[100 mM]	1 mM Endkonzentration
2 µl Triton X-100	[10% (v/v)]	0,1% (v/v) Endkonzentration
50 µl freie oder luminale humane β4Gal-T1; bovine β4Gal-T1	[200 mU/ml]	50 mU/ml Endkonzentration

Ansatzvolumen: 200 µl

Inkubationszeit: 14 h

Inkubationstemperatur: 37 °C

Nach Beendigung der Reaktion wurde jede Probe fünfmal mit TBS-Tween-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20) in Microcon[®] YM 10 (Millipore, Schwalbach) gewaschen. Die auf das Ausgangsvolumen aufgefüllte Probe wurde hierauf bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

E Methoden

7.3 Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal(NAc) auf reduziertes und blockiertes IgG

Zur Optimierung der Transferreaktion wurde der Antikörper vor dem Transfer reduziert und blockiert (Liljebfad *et al.* 2000). Hierbei wurde das IgG zunächst mit 50 mM Tris/HCl pH 8,0 auf eine Konzentration von 70 µg/ml verdünnt. Neun Volumen dieser IgG-Lösung wurden mit einem Volumen 2-Mercaptoethanol (1 M in 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0) gemischt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Um das Reoxidieren der Disulfidbrücken zu verhindern, wurde ein Volumen 0,2 M Iodoacetamid (Endkonzentration 0,1 M) zur Lösung hinzugegeben. Die Inkubation mit Iodoacetamid erfolgte über Nacht bei RT. Die Proben wurden je nach Volumen durch Ultrafiltration und fünfmaliges Waschen in Vivaspin[®] 20 (Vivascience, Hannover) oder Microcon[®] YM 10 (Millipore, Schwalbach; jeweils cut-off 10 kDa) von Mercaptoethanol und Iodoacetamid befreit. Schließlich wurde der Antikörper zum Einsatz im Transfer-Assay über die eben genannten Membran-Module aufkonzentriert.

Ansatz (alle Konzentrationen Endkonzentrationen)

50 µl IgG von Ratte, Maus,

Pferd, Mensch oder Huhn	[6 mg/ml]	1,5 mg/ml Endkonzentration
2 µl UDP-6-biotinyl-Gal(NAc)	[150 mM]	1,5 mM Endkonzentration
50 µl HEPES/NaOH pH 7,4	[100 mM]	25 mM Endkonzentration
2 µl MgCl ₂	[100 mM]	1 mM Endkonzentration
2 µl Triton X-100	[10% (v/v)]	0,1% (v/v) Endkonzentration
50 µl freie oder luminale humane β4Gal-T1; bovine β4Gal-T1	[200 mU/ml]	50 mU/ml Endkonzentration

Ansatzvolumen: 200 µl

Inkubationszeit: 14 h

Inkubationstemperatur: 37 °C

Nach Beendigung der Reaktion wurde jede Probe fünfmal mit TBS-Tween-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1 % (v/v) Tween 20) in Microcon[®] YM 10 gewaschen. Die auf das Ausgangsvolumen aufgefüllte Probe wurde hierauf bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

E Methoden

7.4 Sandwich-ELSA-Test zum Nachweis von biotinyliertem IgG

Die selektive Markierung sowohl nativen als auch reduzierten IgGs wurde mit demselben Sandwich-ELSA-Test in einer Mikrotiterplatte (ELSA-Module Nunc-Immuno, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden) nachgewiesen. Ein allgemeines Schema findet sich in Kapitel C 6.2. Zunächst wurden je 200 µl TBS-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl) mit 0,04 mg Anti-IgG-Antikörper (Anti-IgG-Antikörper entweder gegen das Gesamt-Molekül bei nativen oder gegen den Fc-Teil bei reduzierten IgG-Proben, jeweils polyklonale Anti-Ratten-IgG-Antikörper; zur Überprüfung, ob reduziertes IgG verschiedener Spezies unterschiedlich an den Anti-Ratten-Antikörper bindet, auch Anti-IgG Antikörper aus Mensch und Huhn) plattiert und 8h bei 4°C immobilisiert. Hierauf wurden diejenigen Vertiefungen der Platte, die Probe enthielten, dreimal mit 400 µl TBS-Tween-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1 % (v/v) Tween 20) für mindestens je 30 sec gewaschen. Zum Blocking wurden je 200 µl Blocking Fertiglösung hinzugegeben (Roche Diagnostics, Mannheim) und für 1 h bei RT inkubiert. Von den Transfer-Ansätzen (Kapitel E 7.2 und E 7.3) wurden hierauf 200 µl mit 0,03 mg IgG in die wells pipettiert. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Zur Bindung des markierten IgG wurde die Platte über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Nach dieser Zeit wurde fünfmal mit 400 µl TBS-Tween-Puffer gewaschen. Zum Blocking wurden je 200 µl Blocking Fertiglösung hinzugegeben (Roche Diagnostics, Mannheim) und für 1 h bei RT inkubiert. Es wurde erneut fünfmal mit 400 µl TBS-Tween-Puffer gewaschen. Im Weiteren erfolgte die zweistündige Inkubation mit jeweils 100 µl Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (Roche; Konjugat verdünnt 1:10000 in TBS-Tween) bei RT. Auch hier folgte wiederum ein fünffacher Waschschrift. Hierauf erfolgte die Zugabe von jeweils 100 µl o-Phenylendiamin (OPD)-Lösung (DAKO Diagnostica, Hamburg), wobei solange inkubiert wurde, dass sich eine sichtbare Färbung der Proben ergab.

Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von je 100 µl 0,5 M H₂SO₄ abgestoppt.

Anschließend wurde im Mikrotiterplatten-Photometer die Extinktion der Proben bei 490 nm bestimmt.

7.5 Quantifizierung der Biotinylierung des IgG

Für dieses Experiment wurden je sechs parallele Transferansätze mit reduziertem und blockiertem Ratten IgG, wie unter Kapitel E 7.3 beschrieben, durchgeführt. Als Enzym diente die freie β 4Gal-T1. Die Ansätze wurden nach Ende der Inkubationszeit vereinigt und nach Ultrafiltration jedoch nicht mit TBS-Tween, sondern fünfmal mit je 200 μ l 25 mM HEPES/NaOH pH 7,4 gewaschen (in Microcon[®] YM 10). Die Ansätze wurden hierauf einem Transfer mit UDP-Gal unterzogen. Die Bedingungen hierbei waren identisch zum Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal. Desweiteren wurden sechs parallele Transfer-Ansätze auf reduziertes, unbiotinyliertes Ratten IgG mit UDP-Gal durchgeführt. Sämtliche UDP-Gal-Transferansätze wurden zum Beenden der Reaktion in Microcon[®] YM 10 ultrafiltriert. Hierauf wurde einmal mit 200 μ l 25 mM HEPES/NaOH pH 7,4 gewaschen. Sämtliche Filtrate aus Ultrafiltration und erstem Waschschrift je einer Ansatz-Serie wurden vereinigt. Das UDP enthaltende Filtrat (je Ansatz-Serie 2,4 ml, da je 6 Ansätze mit 200 μ l Volumen vorlagen und alle mit je 200 μ l HEPES/NaOH pH 7,4 gewaschen wurden) wurde unter Vakuum in der Speedvac auf ein Volumen von 50 μ l einkonzentriert. Hierauf wurde die UDP-Konzentration über HPLC (Methode F 2.2) bestimmt.

Für den Transfer von UDP-6-biotinyl-Gal auf das IgG wurden Enzymkonzentrationen von 50, 100 und 250 mU/ml verwendet. Der nachfolgende Transferansatz mit UDP-Gal enthielt jeweils 250 mU/ml. Beim Transfer von UDP-Gal auf nicht biotinyliertes IgG wurden Enzymkonzentrationen von 10, 20 und 50 mU/ml eingesetzt.

Die gerade beschriebene Technik wurde auch für das reduzierte und blockierte IgG von Mensch, Maus, Pferd, und Huhn durchgeführt. Die eingesetzten Mengen an freier β 4Gal-T1 waren hier 250 mU/ml bei der Biotinylierungsreaktion sowie 250 mU/ml bei der nachfolgenden Galactosylierung. Bei der Galactosylierung des unbiotinylierten IgG wurden 50 mU/ml Gal-T verwendet.

8 Synthese modifizierter *p*NP-aktivierter Zucker

8.1 Synthese von 4-Nitrophenyl-6-biotinyl- ϵ -amidocaproyl-hydrazono- β -D-galactose (*p*NP-6-biotinhydrazono-Gal) und 4-Nitrophenyl-6-biotinyl- ϵ -amidocaproyl-hydrazono-*N*-Acetyl- β -D-galactosamin (*p*NP-6-biotinhydrazono-GalNAc) im analytischen Maßstab

8.1.1 Zeit-Umsatz-Kurve der enzymatischen Oxidation von *p*-Nitrophenyl- α -D-galactose (*p*NP-Gal) und *p*-Nitrophenyl-*N*-Acetyl- α -D-galactosamin (*p*NP-GalNAc)

Die im analytischen Maßstab durchgeführte enzymatische Oxidation von *p*NP-aktivierten Zuckern mit Galactose Oxidase fand in 1 ml Glas-HPLC-Probenfläschchen statt. Es wurde zunächst der Zucker in Puffer vorgelegt, ehe CuSO₄ zugegeben wurde. Nach Zugabe der Katalasesuspension wurde die Reaktion durch Zugabe von Galactose Oxidase gestartet und der Ansatz unter Rühren bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Aufnahme einer Zeit-Umsatz-Kurve wurden im Fall von *p*NP-Galactose (*p*NP-Gal) nach 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 und 24 h Proben genommen. Bei *p*NP-*N*-Acetylgalactosamin (*p*NP-GalNAc) erfolgte die Probenentnahme nach 0, 0,5, 1, 2, 4, 6 und 8 h. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden dem Reaktionsansatz je 40 μ l Lösung entnommen und diese durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C abgestoppt. Hierauf erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 13000 rpm. Der so erhaltene Überstand wurde mittels HPLC analysiert (Kapitel F 2.4).

E Methoden

Ansatz (alle Konzentrationen Endkonzentrationen)

<i>p</i> NP-Gal / <i>p</i> NP-GalNAc	8 mM / 4 mM*
Katalase oder Peroxidase	3240 U/ml
Galactose Oxidase	8 U/ml
CuSO ₄	0,5 mM
Natriumphosphat-Puffer (NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄) pH 6,0	25 mM

**p*NP-GalNAc ist nur bis zu 4 mM in Wasser löslich, deswegen kann nicht die Konzentration des *p*NP-Gal erreicht werden.

Ansatzvolumen: 2 x 250 µl (diese Parallelansätze waren notwendig, um ausreichend Lösungsvolumen für alle Messpunkte zu haben, bei einem grösseren Volumen wird die alleine durch Rühren gewährleistete Sauerstoffversorgung kritisch)

Inkubationstemperatur: RT

Reaktionsdauer: 24 h (*p*NP-Gal), 8 h (*p*NP-GalNAc)

Analytik: HPLC-Analytik (s. Kapitel F 2.4)

8.1.2 Biotinylierung von 4-Nitrophenyl-6-oxo-β-D-galactose (*p*NP-6-oxo-Gal) und 4-Nitrophenyl-6-oxo-*N*-acetyl-β-D-galactosamin (*p*NP-6-oxo-GalNAc) im analytischen Maßstab

4-Nitrophenyl-6-oxo-β-D-galactose (*p*NP-6-oxo-Gal) und 4-Nitrophenyl-6-oxo-*N*-acetyl-β-D-galactosamin (*p*NP-6-oxo-GalNAc) wurden mit dem schon bei der Biotinylierung von UDP-Gal benutzten Reagenz BACH im analytischen Maßstab modifiziert. Hierzu wurden in die nach der in Kapitel E 8.1.1 geschilderten Methodik erhaltenen, abgestoppten Oxidationsansätze nach 24 h (*p*NP-6-oxo-Gal) und 8 h (*p*NP-6-oxo-GalNAc) soviel BACH-Feststoff gegeben, dass sich in der Reaktionslösung eine Endkonzentration von 12 mM / 6mM BACH befand. Es kam zur Bildung eines Präzipitats. Nach 4 h Reaktionsdauer wurde die Reaktionslösung für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen. Das Sediment wurde mit demselben Volumen Wasser versetzt, wie vorher Reaktionslösung vorhanden gewesen war und gewaschen. Daraufhin wurde erneut für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Waschprozedur wurde noch zweimal wiederholt, worauf das Sediment im Vakuum in der Speed Vac getrocknet wurde. Der erhaltene bräunliche Feststoff wurde bei -20°C gelagert.

E Methoden

8.1.3 Optimierung der Synthese von 4-Nitrophenyl-6-biotinyl- ϵ -amidocaproyl-hydrazono- β -D-galactose (*p*NP-6-biotinhydrazono-Gal) und 4-Nitrophenyl-6-biotinyl- ϵ -amidocaproyl-hydrazono-*N*-acetyl- β -D-galactosamin (*p*NP-6-biotinhydrazono-GalNAc) im analytischen Maßstab

Die Durchführung der enzymatischen Oxidation und der nachfolgenden Biotinylierung erfolgte, wie in Kapitel E 8.1.1 und 8.1.2 erläutert. Die Konzentration an BACH wurde variiert, angegeben ist jeweils das Verhältnis BACH zu *p*NP-aktiviertem Zucker:

1:1; 1,5:1 und 2:1.

Die Konzentration der Zucker war dabei 8 mM (*p*NP-Gal)/4 mM (*p*NP-GalNAc). Die Reaktionsausbeuten wurden durch Auswiegen der nach der in Kapitel E 8.1.2 geschilderten Prozedur gewaschenen und getrockneten Produkte festgestellt. Es wurden im Fall von *p*NP-Gal pro BACH-Konzentration 2 Parallelansätze mit je 250 μ l Volumen und bei *p*NP-GalNAc 4 Parallelansätze mit je 250 μ l Volumen durchgeführt. Nur so war gewährleistet, dass genug Produkt vorhanden war, um signifikante Unterschiede in der Reaktionsausbeute festzustellen. Ein Vergleich der Reaktionsausbeute über eine HPLC-Analytik war nicht möglich, da die Produkte unlöslich in Wasser und nur löslich bei einem Zusatz von Lösungsmittel (mindestens 20% (v/v) DMSO) ist. Dies machte eine HPLC-Analytik unmöglich, da hier das Lösungsmittel enorm stört.

8.1.4 Eintopf-Synthese von *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal und *p*NP-6-biotinhydrazono-GalNAc im analytischen Maßstab

Die chemoenzymatische Eintopfsynthese von *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal(NAc) fand in 1 ml-Glas-HPLC-Fläschchen statt. BACH wurde zunächst in einem Eppendorf-Gefäß in Puffer vorgelegt und so lange bei 95°C erhitzt, bis es vollständig in Lösung ging. Nach Abkühlen des Eppendorf-Gefäßes auf Eis wurde die Lösung in das HPLC-Gefäß pipettiert und die weiteren Komponenten des Ansatzes (der Zucker als Feststoff) bis auf Galactose Oxidase zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Galactose Oxidase gestartet. Nach 8 h Reaktionsdauer wurden die je parallel durchgeführten Reaktionsansätze vereinigt. Die Reaktionsausbeuten wurden durch Auswiegen der nach der in Kapitel E 8.1.2 geschilderten Prozedur gewaschenen und getrockneten Produkte festgestellt.

E Methoden

Ansatz (alle Konzentrationen Endkonzentrationen)

<i>p</i> NP-Gal / <i>p</i> NP-GalNAc	8 mM / 4 mM*
BACH	12 mM / 6 mM
Katalase	1620 U/ml
Galactose Oxidase	8 U/ml
CuSO ₄	0,5 mM
Natriumphosphat-Puffer (NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄) pH 6,0	25 mM

**p*NP-GalNAc ist nur bis zu 4 mM in Wasser löslich, deswegen kann nicht die Konzentration des *p*NP-Gal erreicht werden.

Ansatzvolumen: 2 x 250 µl (*p*NP-Gal), 4 x 250 µl (*p*NP-GalNAc)

Inkubationstemperatur: RT

Reaktionsdauer: 8 h

Wie in Kapitel E 8.1.3 geschildert, war durch das Präzipitieren der biotinylierten Produkte kein Verfolgen der Reaktion über HPLC-Analytik möglich.

8.2 Synthese von *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal und *p*NP-6-biotinhydrazono-GalNAc im präparativen Maßstab

8.2.1 Oxidation von *p*NP-Gal(NAc) im präparativen Maßstab

Die präparative Oxidation von *p*NP-Gal(NAc) fand in einem 50 ml-Reaktor mit integrierter blasenfreier Sauerstoffbegasung statt (Abbildung 32 und 33) statt. Die *p*NP-aktivierten Zucker wurden in Puffer vorgegeben. Die Lösung wurde wegen der schlechten Löslichkeit bei RT im Fall von *p*NP-GalNAc vorsichtig auf ca. 50°C erhitzt (eine zu schnelle und zu starke Erwärmung führt zur teilweisen Hydrolyse der *p*NP-Gruppe). Nach Abkühlen des *p*NP-GalNAc-Ansatzes auf RT und bei *p*NP-Gal direkt im Anschluss an das vollständige Lösen des Zuckers wurden die übrigen Substanzen des Ansatzes bis auf Galactose Oxidase hinzugefügt. Daraufhin wurde der Pumpkreislauf gestartet, wonach 0,5 mbar Überdruck an der Anlage

E Methoden

angelegt wurden. War der Überdruck nach 10 min. konstant geblieben, wurde die Synthese durch Zugabe von Galactose Oxidase gestartet.

Zur Aufnahme einer Zeit-Umsatz-Kurve wurden dem Ansatz der *p*NP-Gal-Oxidation nach 0, 1,5, 2, 3, 4 und 5 h, dem Ansatz der *p*NP-GalNAc-Oxidation nach 0, 1, 2 und 3h entnommen. Hierzu wurden dem Reaktor mit einer Pasteurpipette jeweils 100 µl Lösung entnommen, und diese für 5 min bei 95°C abgestoppt und 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils über die in Kapitel F 2.4 und 2.5 geschilderten HPLC-Methoden analysiert. Nach 5 h im Fall von *p*NP-Gal und nach 3 h im Fall von *p*NP-GalNAc war die Reaktion beendet.

Die Reaktionslösung wurde zur Isolierung der oxidierten *p*NP-Zucker hierauf zur Entfernung der Enzyme lyophilisiert, das Lyophilisat in möglichst wenig Millipore H₂O aufgenommen, zentrifugiert und der Überstand erneut lyophilisiert.

Die Derivatisierung mit BACH erfolgte hingegen direkt nach der Oxidationsreaktion (Kapitel E 8.2.6)

Ansatz (alle Konzentrationen Endkonzentrationen)

<i>p</i> NP-Gal / <i>p</i> NP-GalNAc	8 mM / 4 mM*
Katalase	1620 U/ml
Galactose Oxidase	4 U/ml
CuSO ₄	0,5 mM
Natriumphosphat-Puffer (NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄) pH 6,0	25 mM

**p*NP-GalNAc ist nur bis zu 4 mM in Wasser löslich, deswegen kann nicht die Konzentration des *p*NP-Gal erreicht werden.

Ansatzvolumen: 50 ml

Reaktionsdauer: 5 h (*p*NP-Gal), 3 h (*p*NP-GalNAc)

Inkubationstemperatur: RT

Analytik: HPLC-Analytik (s. Kapitel F 2.4 und 2.5)

E Methoden

8.2.2 Einfluss der H₂O₂-spaltenden Enzyme Katalase und Peroxidase bei der Oxidation von *p*NP-Gal(NAc)

Um die Effektivität der H₂O₂-spaltenden Hilfsenzyme Katalase und Peroxidase zu vergleichen, wurden die Enzyme jeweils im identischen Verhältnis gegenüber Galactose Oxidase eingesetzt, d.h. jeweils im Verhältnis von ca. 400:1.

Die präparative Oxidation von *p*NP-Gal(NAc) wurde ansonsten, wie in Kapitel E 8.2.1 dargestellt, durchgeführt.

Zur Aufnahme einer Zeit-Umsatz-Kurve wurden den Ansätzen der *p*NP-Gal und *p*NP-GalNac-Oxidation nach 1, 2, 3, 4, 8, 12, 16 und 22 h Proben entnommen. Hierzu wurden dem Reaktor mit einer Pasteurpipette jeweils 100 µl Lösung entnommen, und diese für 5 min. bei 95°C abgestoppt und 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils über die in Kapitel F 2.4 geschilderte HPLC-Methode analysiert.

8.2.3 Einfluss von CuSO₄ bei der Oxidation von *p*NP-Gal(NAc)

Um den Einfluss von Cu²⁺ auf die Reaktion der Galactose Oxidase festzustellen, wurde bei der Oxidation von *p*NP-Gal(NAc) auf das Hinzufügen von CuSO₄ zur Reaktionslösung verzichtet. Der Reaktionsansatz und die Vorgehensweise blieben ansonsten gegenüber der in Kapitel E 8.2.1 geschilderten unverändert.

8.2.4 Optimierung der Enzymmenge für die Oxidation von *p*NP-Gal(NAc)

Um die für die präparative Oxidation von *p*NP-Gal(NAc) erforderliche Menge an Galactose Oxidase zu optimieren, wurden präparative Oxidationen mit folgenden Mengen an Galactose Oxidase durchgeführt:

<i>p</i> NP-Gal	2 U/ml
<i>p</i> NP-GalNac	2 U/ml, 1U/ml

Im Übrigen wurde die Reaktion analog zu der in Kapitel E 8.2.1 durchgeführt. Katalase wurde als Hilfsenzym eingesetzt und die Menge dieses Enzymes jeweils im 400:1-Verhältnis zu Galactose Oxidase angepasst.

E Methoden

8.2.5 Up-Scale der Oxidation von *p*NP-GalNac

Es fand ein up-scale der Oxidation von *p*NP-GalNac statt. Die präparative Oxidation fand nun in einem 100 ml-Rundkolben mit integrierter blasenfreier Sauerstoffbegasung statt. Ansonsten war das Vorgehen identisch mit dem in Kapitel E 8.2.1 geschilderten.

Ansatz (alle Konzentrationen Endkonzentrationen)

<i>p</i> NP-GalNac	4 mM
Katalase	400 U/ml
Galactose Oxidase	1 U/ml
Natriumphosphat-Puffer (NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄) pH 6,0	25 mM

Reaktionsdauer: 5 h

Inkubationstemperatur: RT

Analytik: DC-Analytik (s. Kapitel F 1.2), HPLC-Analytik (s. Kapitel F 2.5)

8.2.6 Biotinylierung von *p*NP-6-oxo-Gal(NAc) im präparativen Maßstab

In den *p*NP-Oxo-Gal oder *p*NP-Oxo-GalNac enthaltenden Ansatz wurde soviel BACH-Feststoff gegeben, dass sich in der Reaktionslösung eine Endkonzentration von 12 mM/6 mM BACH befand. Um BACH in Lösung zu bringen, wurde der Reaktionsansatz zunächst vorsichtig auf ca. 50 °C erhitzt (eine zu schnelle und zu starke Erwärmung führt zur teilweisen Hydrolyse der *p*NP-Gruppe). Die Reaktionslösung wurde vorsichtig auf Eis bis zum Erreichen der RT abgekühlt. Das Produkt fiel im Lauf der Reaktion als Feststoff aus. Nach 4 h Reaktionsdauer wurde die Reaktionslösung nach Überführung in ein 50 ml-Falcon-Gefäß für 15 min bei 5000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und für weitere 12 h gerührt. Das Sediment wurde mit demselben Volumen Wasser versetzt, wie vorher Reaktionslösung vorhanden gewesen war und gewaschen. Daraufhin wurde erneut für 15 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Die Waschprozedur wurde noch zweimal wiederholt, wobei die Überstände diesmal verworfen wurden. Das Sediment wurde mit möglichst wenig Millipore H₂O versetzt und diese Suspension auf zwei 2 ml-Eppendorf-Gefäße verteilt, woraufhin der

E Methoden

Reaktionsansatz im Vakuum in der Speed Vac getrocknet wurde.

Im bei der ersten Zentrifugation zurückbehaltenen und für 12 h gerührten Überstand fiel weiteres Produkt aus, was nach der eben beschriebenen Prozedur aufgearbeitet wurde. Der erhaltene bräunliche Feststoff wurde bei -20°C gelagert.

8.3 Reduktion von *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal

8.3.1 Reduktion von *p*NP-Gal mit Natriumcyanoborhydrid (NaCNBH_3)

*p*NP-Gal wurde für diesen Vorversuch zur Reduktion von *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal in einem auf Eis befindlichen 5 ml-Kolben vorgelegt und in Natriumphosphatpuffer unter Rühren in Lösung gebracht. Zu dieser Lösung wurde NaCNBH_3 gegeben und der Kolben mit einem Glasstopfen verschlossen. Der Reaktionsansatz wurde bei 4°C gerührt. Nach 30 min, 2 h und 19 h wurden jeweils 30 μl Lösung entnommen, die mit der DC-Analytik Kapitel F 1.3 analysiert wurden. Hierauf liess man den Reaktionsansatz sich auf RT erwärmen, nach 1,5 h, 24 h sowie 72 h wurden weitere je 30 μl Lösung entnommen, die mit derselben DC-Analytik untersucht wurden.

Ansatz (alle Konzentrationen Endkonzentrationen)

<i>p</i> NP-Gal	16 mM
NaCNBH_3	50 mM
Natriumphosphat-Puffer ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) pH 6,0	25 mM

Ansatzvolumen: 2 ml

Inkubationstemperatur: 4°C , RT

Reaktionsdauer: 19 h bei 4°C , dann 72 h bei RT

Analytik: DC-Analytik (Kapitel F 1.3)

E Methoden

8.3.2 Reduktion von *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal mit Natriumborhydrid (NaBH_4)

*p*NP-6-biotinhydrazono-Gal wurde für dieses Reduktionsexperiment in einem 5 ml-Kolben vorgelegt und in DMSO unter Rühren in Lösung gebracht. Zu dieser Lösung wurde NaBH_4 gegeben und der Kolben mit einem Glasstopfen verschlossen. Der Reaktionsansatz wurde bei RT gerührt. Nach 1h, 2h, 24 h, 30 h, 48 h und 54 h wurden jeweils 30 μl Lösung entnommen, die mit der DC-Analytik Kapitel F 1.3 analysiert wurden.

Ansatz (alle Konzentrationen Endkonzentrationen)

<i>p</i> NP-6-biotinhydrazono-Gal	15 mM
NaBH_4	500 mM

in DMSO

Ansatzvolumen: 500 μl

Inkubationstemperatur: RT

Reaktionsdauer: 48 h

Analytik: DC-Analytik (s. Kapitel F 1.3)

8.3.3 Reduktion von *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal mit Boran (als Tetrahydrofuran-Komplex; Boran-THF-Komplex)

*p*NP-6-biotinhydrazono-Gal wurde für dieses Reduktionsexperiment in einem 15 ml-Glasgefäß als Feststoff vorgelegt. Es wurde trockenes DMSO (Sigma, Deisenhofen) über eine Spritze hinzugegeben und der biotinylierte Zucker unter Rühren in Lösung gebracht. Während der vorherigen Entnahme des trockenen Lösungsmittels wurde über eine Spritze Stickstoff in den Lösungsmittelvorrat eingeblasen, um diesen trocken zu halten. Mit derselben Prozedur geschah die Entnahme des Boran-THF-Komplexes, der dann als Reduktionsmittel dem Reaktionsansatz zugefügt wurde. Der Reaktionsansatz wurde bei RT gerührt. Nach ca. 1 h entstand eine gelartige, nicht mehr rührfähige Masse, die aus Boransalzen (Reaktionsnebenprodukten) bestand. Diese Masse wurde durch Hinzufügen einer ausreichenden Menge an trockenem THF (am selben Tag destilliert und über Molekularsieb getrocknet) zu einer wieder rührfähigen Suspension gemacht. Der Reaktionsansatz wurde

E Methoden

weiterhin bei RT gerührt. Nach 1h, 2h, 4 h und 22 h wurden jeweils 30 µl Lösung entnommen, die mit der DC-Analytik Kapitel F 1.3 analysiert wurden.

Nach 24 h wurde soviel DMSO hinzugefügt, dass die ausgefallenen Boransalze wieder komplett in Lösung gingen. Das im Reaktionsansatz enthaltene THF wurde im Vakuum am Rotationsdampfer entfernt und die zurückbleibende Flüssigkeit lyophilisiert. Hierbei nahm der Reaktionsansatz (trotz vollständigen Einfrierens in flüssigem Stickstoff) an der Lyophille nach wenigen Minuten wieder den flüssigen Aggregatzustand ein, was durch das DMSO bedingt ist. Als Produkt ergab sich ein gelbes Öl, welches mit einem Überschuss Wasser versetzt und erneut lyophilisiert wurde. Letztlich ergab sich ein weiss-brauner Feststoff.

Ansatz (alle Konzentrationen Endkonzentrationen)

<i>p</i> NP-6-biotinhydrazono-Gal	11 mM
Boran (1 M Lösung in trockenem THF)	714 mM

Ansatzvolumen:

zunächst 700 µl (200 µl vorgelegte Lösung in trockenem DMSO, 500 µl Boran in THF),
Zugabe von 1 ml trockenem THF, um eine rührfähige Suspension zu erzeugen,
Zugabe von 2 ml DMSO, um die Boransalze wieder in Lösung zu bringen.

Inkubationstemperatur: RT

Reaktionsdauer: 24 h

Analytik: DC-Analytik (s. Kapitel F 1.3)

Der Ansatz wurde im Weiteren bei gleich bleibenden Konzentrationen an Zucker und Reduktionsmittel wiederholt. Allerdings wurde das Reaktionsanfangsvolumen (nach Zugabe des Reduktionsmittels) auf 4,9 ml erhöht, so dass sich 35 mg (vorher 5 mg) *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal in der Lösung befanden. Diese grössere Menge war erforderlich, um ausreichende Substanz für die ausstehende Isolierung von *p*NP-6-biotinyl-Gal zu haben. Im Übrigen wurde mit dem Ansatz wie oben beschrieben verfahren, die Volumina an trockenem THF für das zur Rührfähigkeit Zurückführen der Suspension waren 10 ml, ebenfalls 10 ml DMSO wurden zugesetzt, um nach 24h, also am Ende der Reaktion, die Boransalze wieder komplett in Lösung zu bringen.

E Methoden

8.3.4 Isolierung von *p*NP-6-biotinyl-Gal

Zur Isolierung von *p*NP-6-biotinyl-Gal wurde der nach zweimaliger Lyophilisation erhaltene, im Gegensatz zu *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal wasserlösliche, Feststoff zunächst einer Gelfiltration unterzogen.

Nach NMR-Untersuchungen des lyophilisierten Produkts nach Gelfiltration stellte sich jedoch heraus, dass der so isolierte Stoff nicht sauber war. Zur Auflösung der Bindung des Boran an den Produktzucker wurden 20 mg des nach Gelfiltration erhaltenen Feststoffgemisches zunächst mit 2 ml durch Millipore H₂O auf pH 3,0 verdünnte Salzsäure versetzt und 30 min bei RT inkubiert. Zu diesem Ansatz wurde hierauf soviel gesättigte NaHCO₃-Lösung gegeben, dass ein pH von 9,0 erreicht wurde. Diese Lösung wurde für 45 min bei RT stengelassen. Säure- und Base-Inkubation wurden mit DC-Analytik kontrolliert (Kapitel F 1.4).

Es folgte eine zweite Gelfiltration, der isolierte Stoff wurde lyophilisiert.

(1) Gelfiltration

Säule	XK 16/100 (Pharmacia, Freiburg)
Material	P2 (Bio-Rad, München)
Gelbetthöhe	90 cm
Durchmesser	1,6 cm
Volumen	180,86 ml
Äquilibration	Millipore H ₂ O, Fluss: 0,3 ml/min
Probenaufgabe	bis zu 3 ml Probe mit 55 µmol <i>p</i> NP-Zucker, Fluss: 0,3 ml/min
Elution	Millipore H ₂ O, Fluss: 0,3 ml/min

Die Analytik erfolgte über DC (Kapitel F 1.4).

Die aufgereinigten Fraktionen von *p*NP-6-biotinyl-Gal wurden vereinigt und im Anschluss lyophilisiert, der erhaltene weiße Feststoff wurde bei -20°C gelagert.

F Analytik

1 DC-Analytik

1.1 Allgemeines

Die hier beschriebene Dünnschicht-Chromatographie (DC)-Analytik wurde bei einem zweimonatigen Forschungsaufenthalt im Labor von Prof. Kren (Mikrobiologisches Institut, Akademie der Wissenschaften, Prag) durchgeführt.

Benutzt wurden Kieselgelplatten (Merck, Darmstadt) mit einer 60₂₅₄-Beschichtung. Diese wurden auf ca. 7 cm Höhe und ca. 3 cm Breite zurechtgeschnitten. Die Probe wurde durch Tropfen mit einer Kapillare aufgetragen, nach dem Auftragen eines Tropfens wurde jeweils mit einem Fön getrocknet. Die Anzahl der aufzutragenden Tropfen richtete sich nach der Konzentration der zu untersuchenden Substanzen. Eine fertig vorbereitete Platte wurde mit einer Pinzette so in ein mit einem Deckel verschliessbares Gefäß gestellt, dass sich beim Eintauchen in das im Gefäß befindliche Lösungsmittelgemisch (Füllhöhe ca. 1,5 cm) eine möglichst gerade Laufmittelfront ergab. Sobald sich die mobile Phase ca. 1 cm unterhalb des oberen Endes der DC-Platte befand, wurde die Platte mit einer Pinzette aus dem Gefäß geholt und dieses sofort wieder verschlossen, um ein Verdampfen des Lösungsmittels zu vermeiden. Auf diese Weise konnte ein DC-Laufmittel einen Tag lang benutzt werden. Die Platte wurde mit dem Fön getrocknet und unter einer UV-Lampe bei 254 nm betrachtet. Um auch nicht UV-aktive Substanzen zu detektieren, wurde die Platte dann in ein Gemisch aus Ethanol (5 %) und Schwefelsäure (95%) getaucht und mit einer Heißluftpistole so lange behandelt, bis deutliche Flecken zu erkennen waren. Zur Archivierung wurden die Platten im Labor-Journal mit transparentem Klebeband überklebt.

Beispielchromatogramme zu den einzelnen Methoden sind im Kapitel H 1 dargestellt.

1.2 Methode zur Trennung von *p*NP-aktivierten Zuckern

Für diese DC-Methode wurde ein Laufmittelgemisch von 7 Teilen Ethylacetat und 2 Teilen Methanol (v/v) verwendet. Die Methode wurde vor allem zur schnellen Analytik der Oxidationsreaktion von *p*NP-Gal(NAc) verwendet (Kapitel E 8.1.2), da im Labor in Prag die HPLC-Messungen nicht parallel zur Reaktion, sondern immer erst einen Tag später stattfinden konnten. Die Methode kam aber auch zur Untersuchung der Reduktionsreaktion von *p*NP-Gal mit NaCNBH₃ (Kapitel E 8.3.1) zum Einsatz. Die folgende Tabelle 18 zeigt die R_F-Werte der mit der gerade vorgestellten Methode analysierten Substanzen.

Tabelle 19: R_F-Werte der mit der DC-Methode F 1.2 analysierten Substanzen.

Substanz	R _F -Wert
<i>p</i> NP-6-Oxo-Gal	0,60
<i>p</i> NP-Gal	0,41
<i>p</i> NP-6-Oxo-GalNAc	0,40
<i>p</i> NP-GalNAc	0,24

1.3 Methode zur Trennung von *p*NP-aktivierten, biotinylierten Zuckern

Die im Folgenden beschriebene Methode wurde für die Analytik der Reduktionsexperimente von *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal verwendet (Kapitel E 8.3). Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus 14 Teilen Ethylacetat, 6 Teilen Methanol und 1 Teil Millipore H₂O (v/v) benutzt. Die nachfolgende Tabelle 19 zeigt die R_F-Werte der auf dem beschriebenen Weg analysierten Substanzen.

Tabelle 20: R_F-Werte der mit der DC-Methode F 1.3 analysierten Substanzen.

Substanz	R _F -Wert
<i>p</i> NP-6-biotinhydrazono-Gal	0,34
<i>p</i> NP-6-biotinyl-Gal	0,15

1.4 Methode zur Trennung von *p*NP-aktivierten, biotinylierten Zuckern von ihren Borat-Komplexen

Die nun zu beschreibende DC-Methode wurde zur Analytik der Isolierung von *p*NP-6-biotinyl-Gal eingesetzt (Kapitel 8.3.4). Als Laufmittel wurde eine Mischung aus 7 Teilen Isopropanol, 2 Teilen Millipore H₂O und 1 Teil Ammoniak (v/v) verwendet. Die nachfolgende Tabelle 20 zeigt die R_F-Werte der auf dem beschriebenen Weg analysierten Substanzen.

Tabelle 21: R_F-Werte der mit der DC-Methode F 1.4 analysierten Substanzen.

Substanz	R _F -Wert
<i>p</i> NP-6-biotinhydrazono-Gal	0,48
<i>p</i> NP-6-biotinyl-Gal in Komplex mit Borat	0,43
<i>p</i> NP-6-biotinyl-Gal	0,38
Borat nach Dissoziation des Komplexes mit <i>p</i> NP-6-biotinyl-Gal	roter, schmierender Fleck oberhalb des Substanzflecks von <i>p</i> NP-6-biotinyl-Gal

2 HPLC-Analytik

2.1 Allgemeines

Proben von Enzymreaktionen wurden für 5 min auf 95 °C erhitzt und 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde für die HPLC-Messungen verwendet. Nukleotidzucker und ihre Derivate können mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 260 nm erkannt werden. Dieses ist ebenfalls für *p*NP-haltige Zucker der Fall. Kohlenhydrate, die eine *N*-Acetyl-Gruppe enthalten, sind bei 205 nm detektierbar. Die Quantifizierung erfolgte jeweils anhand von Kalibriergeraden.

Sämtliche mobile Phasen für die HPLC-Läufe wurden vor Gebrauch filtriert und entgast. Beispielchromatogramme zu den einzelnen Methoden sind im Kapitel H 2 dargestellt.

2.2 Methode zur Trennung von Nukleotidzuckern

Die hier zur Verwendung gekommene Ionenpaar-RP18-Methode (Elling and Kula 1993) ermöglichte die Trennung von Nukleosiden, Nukleosidmonophosphaten, Nukleosiddiphosphaten und Nukleotidzuckern. Die Methode wurde in dieser Arbeit insbesondere für die Analytik der UDP-Gal-Synthese (Kapitel E 2.1) sowie jener der Isolierung von UDP-Gal (Kapitel E 2.2) verwendet. Die HPLC-Läufe erfolgten unter isokratischer Elution, im Folgenden ist die Zusammensetzung des HPLC-Laufpuffers dargestellt, alle Konzentrationen sind Endkonzentrationen:

Kaliumacetat	0,1 M, pH 5,6
Methanol	5 % (v/v)
n-Octylamin	0,013 % (v/v)
Fluss:	1 ml/min

Es wurde eine ODS-Hypersil (*reversed phase C₁₈*)-Säule (CS, Langerwehe, Porengröße: 5 µm, Durchmesser: 4,6 mm, Länge: 250 mm) verwendet.

Die folgende Tabelle 21 zeigt die Retentionszeiten der mit der HPLC-Methode 2.2 analysierten Substanzen:

Tabelle 22: Retentionszeiten der mit der HPLC-Methode F 2.2 analysierten Substanzen.

Substanz	Retentionszeit (min)
Uridin	5,2
UMP	6,7
UDP-Gal	10,4
UDP-Glc	11,0
UDP	22,9

2.3 Methode zur Trennung von Nukleotidzuckern von ihren Derivaten

Diese RP18-Methode ermöglichte die Trennung von UDP-Gal und UDP-6-biotinyl-Gal, sollte allgemein aber zur Trennung von Nukleotidzuckern und hydrophoberen Derivaten einsetzbar sein. Die Methode wurde in dieser Arbeit insbesondere für die Analytik der Synthese und Isolierung von UDP-6-biotinyl-Gal (Kapitel E 3.1 und 3.2) verwendet. Die HPLC-Läufe erfolgten unter isokratischer Elution, im Folgenden ist die Zusammensetzung der mobilen Phase der HPLC-Methode dargestellt, alle Konzentrationen sind Endkonzentrationen:

Millipore H₂O / Methanol 99 % / 1 % (v/v), pH 7,0
 Fluss: 0,3 ml/min

Es wurde eine ODS-Hypersil (*reversed phase* C₁₈)-Säule (Thermo Hypersil, Dreieich, Porengröße: 5 µm, Durchmesser: 4,6 mm, Länge: 250 mm) verwendet.

Die folgende Tabelle 22 zeigt die Retentionszeiten der mit der HPLC-Methode F 2.3 analysierten Substanzen:

Tabelle 23: Retentionszeiten der mit der HPLC-Methode F 2.3 analysierten Substanzen.

Substanz	Retentionszeit (min)
UDP-Gal	6,8
NaCNBH ₃ und Borate (Nebenprodukte der Reduktion)	10, 4
UDP-6-biotinyl-Gal	15,9 (breit)
UDP-6-biotinyhydrazono-Gal	13,3; verschiebt sich bei der Reduktion durch den breiten Peak von UDP-6-biotinyl-Gal auf 16,8

2.4 Methode zur Trennung von *p*NP-aktivierten Zuckern

Die in diesem Unterkapitel beschriebene HPLC-Analytik erlaubte die Trennung der *p*NP-aktivierten Zucker *p*NP-Gal und *p*NP-GalNAc von ihren jeweiligen durch Oxidation an der 6-Position entstandenen 6-Oxo-derivaten. Die Methode beruht auf Ionen-bestimmter Verteilungs-Chromatographie. Die Analytik wurde für die Oxidationsreaktionen an der 6-Position bei der Synthese von *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal(NAc) verwendet (Kapitel E 8.2.1). Allgemein sollten auch Trennungen anderer *p*NP-aktivierter Monosaccharide voneinander möglich sein. Die HPLC-Läufe erfolgten unter isokratischer Elution, als mobile Phase wurde filtriertes und entgastes Millipore H₂O verwendet. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min, die Detektion erfolgte bei 205 und 260 nm. Mittels eines Säulenofens wurde die Säule bei einer Temperatur von 85°C gehalten. Es wurde eine RCM Monosaccharide Säule (Phenomenex, Aschaffenburg, Porengröße: 8 µm, Durchmesser: 7,8 mm, Länge: 300 mm) verwendet.

Die folgende Tabelle 23 zeigt die Retentionszeiten der mit der HPLC-Methode F 2.4 analysierten Substanzen:

Tabelle 24: Retentionszeiten der mit der HPLC-Methode F 2.4 analysierten Substanzen.

Substanz	Retentionszeit (min)
<i>p</i> NP-6-oxo-Gal	32,1
<i>p</i> NP-Gal	41,3
<i>p</i> NP-6-oxo-GalNAc	48,4
<i>p</i> NP-GalNAc	63,0

2.5 Weitere Methode zur Trennung von *p*NP-aktivierten Zuckern

Die nun zu beschreibende HPLC-Methode kam ebenfalls während des Forschungsaufenthaltes im Labor von Prof. Kren (Institut für Mikrobiologie, Akademie der Wissenschaften, Prag) zum Einsatz. Sie erlaubte die Trennung der *p*NP-aktivierten Zucker *p*NP-Gal und *p*NP-GalNAc von ihren jeweiligen durch Oxidation an der 6-Position entstandenen 6-Oxo-derivaten (Kapitel E 8.2.1). Die HPLC-Läufe erfolgten unter isokratischer Elution, als mobile Phase wurde ein Gemisch aus Acetonitril (20 %) und Millipore H₂O (80 %) (v/v) verwendet. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min, die Detektion erfolgte bei 260 nm. Es wurde eine Luna C₈(2)-Säule (Phenomenex, Aschaffenburg, Porengröße: 5 µm, Durchmesser: 4,6 mm, Länge: 250 mm) verwendet. Es lag also eine *reversed phase* Methode vor.

Die folgende Tabelle 24 zeigt die Retentionszeiten der mit der HPLC-Methode F 2.5 analysierten Substanzen:

Tabelle 25: Retentionszeiten der mit der HPLC-Methode F 2.5 analysierten Substanzen.

Substanz	Retentionszeit (min)
<i>p</i> NP-6-oxo-GalGal	9,9
<i>p</i> NP-6-oxo-GalNAc	10,7
<i>p</i> NP-Gal	12,1
<i>p</i> NP-GalNAc	13,0

2.6 Methode zur Trennung von Mono- und Oligosacchariden

Diese HPLC-Methode wurde vor allem zur Analytik der Aktivität der Konstrukte der rekombinanten humanen β4-GalT1 sowie der Mutante His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1 benutzt.

Die HPLC-Läufe erfolgten unter isokratischer Elution, als mobile Phase wurde 5 mM H₂SO₄ verwendet. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min, die Detektion erfolgte bei 205 und 260 nm.

Es wurde eine Aminex[®] Ion Exclusion HPX87H-Säule (Bio-Rad, München, Durchmesser: 7,8 mm, Länge: 300 mm) verwendet.

F Analytik

Die folgende Tabelle 25 zeigt die Retentionszeiten der mit der HPLC-Methode F 2.6 analysierten Substanzen:

Tabelle 26: Retentionszeiten der mit der HPLC-Methode F 2.6 analysierten Substanzen.

Substanz	Retentionszeit (min)
UDP-Gal(NAc)	7,2
GalNAc(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)GlcNAc	9,3
GlcNAc(β 1-4)GlcNAc	10,1
GalNAc(β 1-4)GlcNAc	11,1
GlcNAc	12,8
LacNAc	9,5

3 Bestimmung des Proteingehaltes

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde die Methode nach Bradford (Bradford 1976) verwendet. Zur Herstellung des Bradford-Reagenzes wurden 100 mg Coomassie Blue G 250 in 50 ml 95% (v/v) Ethanol und 100 ml 85% (w/v) H_3PO_4 gelöst, worauf mit Millipore H_2O auf 1000 ml aufgefüllt und die Lösung anschließend filtriert wurde. Die das Bradford-Reagenz beinhaltende Flasche wurde mittels Umwicklung durch Aluminium-Folie vor Lichteinfall geschützt.

Für die Protein-Bestimmung wurde eine Eichgerade von BSA über einen Konzentrationsbereich von 0–0,1 $\mu\text{g/ml}$ erstellt und über lineare Regression ausgewertet. Die Schritte bei der Erstellung der Eichgeraden betragen 0, 20, 40, 60, 80 und 100 $\mu\text{g/ml}$. Alle Messungen wurden zur statistischen Absicherung als Dreifachbestimmung ausgeführt. Für die Messung wurden in eine Mikrotiter-Platte je 10 μl Probe pipettiert, zu denen 90 μl Bradfordlösung gegeben wurden. Diese Mischung wurde für 7 Min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurde die Absorption im Mikrotiterplatten-Photometer bei 595 nm gemessen.

4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese erlaubt die Bestimmung des Molekulargewichts von DNA. Sie kam in dieser Arbeit bei der Kontrolle der PCR-Reaktionen für die Mutagenisierung der humanen His₆-TagPropeptid-β4Gal-T1 zum Einsatz (Kapitel E 5.1).

Zunächst wurde eine 0.8%ige Agarose-Lösung in TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat, pH 8,3; 1 mM EDTA) hergestellt und aufgeköcht. In der Zwischenzeit wurde die Agarose-Gelkammer (Bio-Rad, München) in die zugehörige Vorrichtung eingespannt. In die Gelkammer wurde ein Kamm eingesetzt, der zur Ausformung der Probenaschen diente. Nach dem Abkühlen der Agarose auf 50°C wurde diese bis zur Oberkante der Zähne des Kamms in die Gelkammer gegossen. Hierbei war strikt darauf zu achten, dass im Gel keine Luftblasen entstanden. In das noch flüssige Gel wurden 5 µl Ethidiumbromid pipettiert und durch leichtes Schwenken der Kammer möglichst gleichmäßig im Gel verteilt. Nach 30 min wurde das mittlerweile erstarrte Gel in der Gelkammer in die Apparatur zur Gelelektrophorese (Bio-Rad, München) überführt. Das Gel wurde in der Apparatur mit Elektrophoresepuffer (TAE-Puffer) überschichtet und mit Proben beladen. Auftragsvolumen der Proben war 20 µl, wovon 3,3 µl auf ein Formamid-Blaumarker-Beschwerungsgemisch (Loading Dye Solution, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) entfielen. Dieses Gemisch beschwert die Proben so, dass sie nicht ungewollt aus den Taschen laufen. Außer den Proben wurden noch 10 µl eines Molekulargewichtsstandards (1 kb Standard, Gibco BRL, Gaithersburg, USA) auf das Gel aufgetragen.

Zur Elektrophorese wurden 90 V Spannung angelegt, der Lauf dauerte ca. 50 min.

Die Auswertung und Dokumentation erfolgte mit dem Gel-Doc (Bio-Rad, München) durch Photographie unter UV-Licht.

5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-PAGE wurde im Rahmen dieser Arbeit das NuPAGE[®]-System (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Hierbei wurde sowohl die Gelelektrophoresekammer dieses Systems als auch zugehörige Novex[®]-Fertiggele benutzt. Die Gele waren 12%ige Bis-Tris-Gele mit 12 Gelbahnen.

Für einen Elektrophoreselauf wurde aus dem Gel zunächst der Kamm entfernt und dieses mit destilliertem Wasser gewaschen. Das Gel wurde in die Kammer eingesetzt und dort befestigt. Die innere Puffer-Kammer wurde daraufhin mit soviel Elektrophoresepuffer (NuPAGE[®] MOPS-Puffer (20X, mit Millipore H₂O auf 1x verdünnt) aufgefüllt, dass die Gel-Taschen vollständig bedeckt waren. Die äußere Puffer-Kammer wurde ebenso hoch mit Laufpuffer befüllt.

Probenvorbereitung

NuPAGE [®] SDS-Probenpuffer (4x)	6,25 µl
NuPAGE [®] Sample Reducing Agent (10x)	2,5 µl
Protein (1,25 µg/µl)	16,25 µl

Ansatzvolumen: 25 µl

Die Proben wurden für 10 min bei 70 °C inkubiert und daraufhin für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert.

Auf das Gel wurden je 20 µl Probe sowie 10 µl Marker (SDS Broad Range Prestained, Precision Plus All Blue oder Kaleidoscope Prestained Standard, alle Bio-Rad, München) aufgetragen. Der Marker war eine Fertiglösung und musste nicht der Probenvorbereitung unterzogen werden.

Direkt vor dem Elektrophoreselauf wurden dem Laufpuffer der inneren Pufferkammer 200 µl NuPAGE[®] Antioxidant hinzugefügt, um das Reoxidieren der Gelproben zu verhindern.

Der Gellauf wurde für 1h bei 200 V betrieben.

Das Gel wurde daraufhin entweder für das Western Blotting weiterverwendet (Kapitel F 6) oder mit Coomassie-Blau-Fertiglösung (Bio-Rad, München) angefärbt. Hierzu wurden die Gele zunächst 3 x 5 min mit Millipore H₂O gewaschen und dann 1 h unter schwachem

F Analytik

Schütteln in Färbelösung inkubiert. Daraufhin wurde mit Millipore H₂O solange entfärbt, bis gut sichtbare Banden erhalten wurden. Das Gel wurde zur Dokumentation eingescannt sowie zur Archivierung eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

6 Western Blot

Zum Western Blotting wurde zunächst SDS-PAGE, wie in Kapitel F 5 beschrieben, durchgeführt.

Vom zu blottenden Gel wurden zunächst mit einem Skalpell die Probestaschen entfernt, das Gel wurde daraufhin für mehrere min in der Transferpufferlösung äquilibriert.

Transferpuffer

NuPAGE [®] Transferpuffer (20x)	50 ml
Millipore H ₂ O	849 ml
NuPAGE [®] Antioxidant	1 ml
Methanol	100 ml

Zum Blotting wurde eine PVDF-Membran verwendet, die auf Gelgröße zurechtgeschnitten wurde. Diese wurde zunächst für 30 sec in Methanol eingelegt, für 30 sec mit Millipore H₂O gewaschen und dann in Transferpuffer eingelegt. Es wurden ebenfalls 4 Blotting Pads (rechteckige Stoffballen) in Transferpuffer eingelegt.

Zwei Filterpapiere wurden auf Gelgröße zurechtgeschnitten.

Eins der Filterpapiere wurde mit Transferpuffer angefeuchtet und luftblasenfrei auf das aus der Äquilibrierungslösung genommene Gel gelegt. Das Gel-Filterpapier-Sandwich wurde umgedreht und die PVDF-Membran luftblasenfrei auf das Gel gelegt. Auf die Membran wurde nun das zweite mit Transferpuffer angefeuchtete Filterpapier luftblasenfrei aufgegeben. In die Blotting-Kammer des NuPAGE[®]-Systems (Invitrogen, Karlsruhe) wurden an der Kathode zwei der Blotting Pads eingebracht. Das Gel-Membran-Sandwich wurde auf die Pads gelegt, und zwar so, dass das Gel der Kathode am nächsten war. Das Anbringen der beiden noch übrigen Blotting Pads sowie der Anode darauf schloss die Anordnung ab. Sie wurde in die Gelektrophoresekammer eingesetzt. Die innere Pufferkammer wurde mit Transferpuffer

F Analytik

soweit gefüllt, dass die Blotting-Anordnung komplett mit Puffer bedeckt war. Die äussere Puffer-Kammer wurde zur Vermeidung der Überhitzung der Kammer bis etwa $\frac{3}{4}$ der Höhe mit destilliertem Wasser gefüllt.

Das Blotting wurde für 1h bei einer Stromstärke von 30 A durchgeführt.

Alle nachfolgenden Schritte bis auf den Nachweis mit DAB-Substrat erfolgten unter schwachem Schütteln.

Zur Detektion der einen His₆-Tag tragenden Proteine wurde der Blot zunächst mit 3% BSA (w/v) in TBS-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl) für 1 h blockiert.

Daraufhin wurde zum Blot 50 ml Lösung mit 1% BSA (w/v) und 100 µl Anti-His₆-Peroxidase gegeben und für 1 h inkubiert.

Der Blot wurde noch 3 x 5 Minuten mit TBS-Puffer, der 0,1% Tween 20 (v/v) enthielt, gewaschen.

Der Nachweis des Anti-His₆-Antikörpers erfolgte mit 3,3'-Diaminobenzidine (DAB), welches mit der Peroxidase des Anti-Antikörpers ein rötlich-braunes Präzipitat bildete. Sobald das Präzipitat deutlich sichtbar war, wurde die DAB-Lösung abgeschüttet und die Nachweis-Reaktion durch Millipore H₂O gestoppt. Der Blot wurde zur Dokumentation eingescannt sowie zur Archivierung eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

G Material

1 Chemikalien und Enzyme

ABTS	Sigma, Deisenhofen
Acetonitril	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Agarose-Gel Loading Dye	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Agarose-Gel MW-Standard	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
Amberlite IRA-95	Sigma, Deisenhofen
Ammoniak-Lösung	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Gerbu, Heidelberg
Anti-His ₆ -Peroxidase	Roche Diagnostics, Mannheim
Anti-Ratten-IgG (ganzes Molekül)	Sigma, Deisenhofen
Anti-Ratten-IgG (Fc-Teil)	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching
Antioxidans für SDS-PAGE und Western Blot	Invitrogen, Karlsruhe
BACH	Sigma, Deisenhofen
BenzylGlcNAc	Sigma, Deisenhofen
BisTris	Sigma, Deisenhofen
BisTris-Protein-Gele	Invitrogen, Karlsruhe
Blocking Fertiglösung für ELISA	Roche Diagnostics, Mannheim
Boran in THF	Sigma, Deisenhofen
BSA	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Cobaltchlorid	Merck, Darmstadt
Coomassie Blau	Invitrogen, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G-250	Roth, Karlsruhe

G Material

Creatinase	Sigma, Deisenhofen
DAB-Substrat	Roche Diagnostics, Mannheim
Dikaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
DMSO	Roth, Karlsruhe
DNTPs	Eppendorf, Hamburg
DTT	Fluka, Basel, Schweiz
<i>E. coli</i> BL21DE3	Novagen, Darmstadt
<i>E. coli</i> Nova Blue	Novagen, Darmstadt
EDTA	Roth, Karlsruhe
EDTA-Teststreifen	Macherey-Nagel, Düren
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylacetat	Sigma, Deisenhofen
Galactose Oxidase	Cell Systems, St. Katharinen
D-Galactose	Sigma, Deisenhofen
Galactose-1-phosphat	Sigma, Deisenhofen
Galactose-1-phosphat-Uridyltransferase	Roche Diagnostics, Mannheim
β -Galactosidase aus <i>A. oryzae</i>	Sigma, Deisenhofen
β -Galactosidase aus <i>B. circulans</i>	Daiwa Kasei K.K., Osaka, Japan
β -Galactosidase aus <i>E. coli</i> (rekombinant)	Sigma, Deisenhofen
β -Galactosidase aus Stierhoden	persönliche Gabe von Dr. Nieder
β 4Gal-T1, bovin (rekombinant)	Calbiochem, Schwalbach
β 4Gal-T1, human (rekombinant)	persönliche Gabe von Dipl.-Biol. Schumacher
D-Glucose	Sigma, Deisenhofen
Glucose-1,6-bisphosphat	Roche Diagnostics, Mannheim

G Material

Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	Roche Diagnostics, Mannheim
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Größenstandard SDS-PAGE	Bio-Rad, München
Hefeextrakt	BD Biosciences, Heidelberg
HEPES	Roth, Karlsruhe
sämtliche IgGs	Sigma, Deisenhofen
Imidazol	Fluka, Buchs, Schweiz
ELSA-Module Nunc-Immuno	Nunc GmbH & Co. kG, Wiesbaden
Iodoacetamid	Sigma, Deisenhofen
IPTG	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Katalase	Sigma, Deisenhofen
Kupfersulfat	Roth, Karlsruhe
Lactatdehydrogenase	Roche Diagnostics, Mannheim
Ligationskit	Roche Diagnostics, Mannheim
Lysozym	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Manganchlorid	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
MES	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
MOPS	Roth, Karlsruhe
MOPS-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
N-acetyl-glucosamin	Sigma, Deisenhofen

G Material

N,N'-Diacetylchitobiose	Isosep, Tullinge, Schweden
NAD ⁺	Biomol, Hamburg
NADH	Roche Diagnostics, Mannheim
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumborhydrid	Sigma, Deisenhofen
Natriumcacodylat	Sigma, Deisenhofen
Natriumcyanoborhydrid	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
NH ₃ -Lösung	Roth, Karlsruhe
Nickelchlorid	Merck, Darmstadt
Ni-NTA-Material	Quiagen, Hilden
Ni-NTA Spin Columns	Quiagen, Hilden
n-Octylamin	Sigma, Deisenhofen
OPD-Tabletten	Dako Diagnostica, Hamburg
para-Nitrophenol	Sigma, Deisenhofen
P2-Material	Bio-Rad, München
Peroxidase	Merck, Darmstadt
PVDF-Membran	Bio-Rad, München
pET [®] -Vektoren	Novagen, Darmstadt
PEP	Roche Diagnostics, Mannheim
Phosphoglucomutase	Roche Diagnostics, Mannheim
Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe
Plasmidpräparationskit	Quiagen, Hilden
pNP-Gal	Sigma, Deisenhofen
pNP-GalNAc	Sigma, Deisenhofen
Primer	Metabion, Martinsried
Pyruvatkinase	Roche Diagnostics, Mannheim
Q-Sepharose FF	Pharmacia, Freiburg

G Material

Reducing Agent für SDS-PAGE	Invitrogen, Karlsruhe
Restriktionsenzyme	Roche Diagnostics, Mannheim
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure	Roth, Karlsruhe
SDS-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
SP-Sepharose FF	Sigma, Deisenhofen
Streptavidin-Peroxidase	Roche Diagnostics, Mannheim
Superdex 200	Amersham Biosciences, Freiburg
Taq-Polymerase	Eppendorf AG, Hamburg
THF	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypton	BD Biosciences, Heidelberg
Tween-20	Roth, Karlsruhe
UMP	Sigma, Deisenhofen
UDP	Sigma, Deisenhofen
UDP-Gal	Kyowa Hakko, Düsseldorf
UDP-GalNAc	Sigma, Deisenhofen
UDP-Glc	Sigma, Deisenhofen
UDP-GlcNAc	Sigma, Deisenhofen
Uridin	Sigma, Deisenhofen
WGA-Peroxidase	Sigma, Deisenhofen
Zinksulfat	Merck, Darmstadt

2 Geräte

2.1 Agarosegelelektrophorese

Gelkammer Mini-Sub Cell[®] GT, Netzteil PowerPac[®] 300, UV-Photographie-Dokumentation GelDoc[®] mit Software Quantity One[®] (Bio-Rad, München)

2.2 Autoklaven

Horizontaler Tischautoklav 2450 EL (Systec, Wetzlar)

Dampfsterilisator Varioklav[®] 135 S (H+P Labortechnik, Oberschleißheim)

2.3 Chromatographie

Chromatographieranlage Äkta Prime[®] mit integrierter Pumpe, UV-Einheit und Fraktions-sammler, Software PrimeView[®] und PrimeView Evaluation[®] (Amersham Biosciences, Freiburg)

Chromatographieranlage Gradi Frac[®] mit Pumpe P-50, UV-Einheit UV-1 und Schreiber REC 102 (Pharmacia, Freiburg)

Peristaltikpumpe P-1 (Pharmacia, Freiburg)

Chromatographiesäulen XK 50/100, XK 50/60, XK 50/100 und XK 26/100 (Pharmacia, Freiburg)

2.4 HPLC

Probengeber Gina 160[®], Pumpe M480G, Detektor UVD 160 S mit Software Chromeleon Client[®] Version 4.2 (Gynkotek, Idstein)

Säulenofen Croco-Cil[®] (Cluzeau Info Labo, Sainte-Foy-La-Grande, Frankreich)

G Material

2.5 Kultur-Schüttler

Inkubationsschüttler Multitron II (Infors GmbH, Einsbach)

2.6 PCR

PCR-Cycler Mastercycler[®] gradient (Eppendorf, Hamburg)

2.7 pH-Messung

Labor pH-Meter CG 842 (Schott, Mainz)

2.8 Photometer

Spektralphotometer für Küvetten- und Mikrotiterplattenformat SpectraMax[®] Plus384 mit Software SoftMaxPro[®] Version 4.0 (Molecular Devices, Ismaning)

2.9 Pipetten

Satz Pipetten Eppendorf Research (0,5-10 µl, 10-100 µl und 100-1000 µl, Eppendorf, Hamburg)

Multikanal-Pipette Eppendorf Research Pro (5- 100 µl und 20-300 µl, Eppendorf, Hamburg)

2.10 SDS-PAGE und Blotting

Gelkammer XCell SureLock[™] Mini-Cell (Invitrogen, Karlsruhe)

Blotting-Vorrichtung XCell II[™] Blot Module (Invitrogen, Karlsruhe)

Netzteil PowerPac[®] 300 (Bio-Rad, München)

2D-Schüttler IKA[®] KS 130 basic (IKA, Staufen)

3D-Schüttler Polymax 1040 (Heidolph, Schwabach)

G Material

2.11 Thermostate

Heizblock HBT 130 für Volumina von 1,5 ml und 2 ml (HLC BioTech, Bovenden)

Heizthermomixer HTML 133 für Volumina von 1,5 ml und 2 ml (HLC BioTech, Bovenden)

Wasserbad WB 7 (Mettler, Schwabach)

2.12 Waagen

Laborwaage Lab Style 5001 (max. 5001 g, Mettler Toledo, Giessen)

Feinwaage Lab Style 54 (max. 51 g, Mettler Toledo, Giessen)

2.13 Zellaufschluss

Ultraschall-Homogenisator Sonopuls HD 200 (Bandelin electronic, Berlin)

2.14 Zentrifugen

Tischzentrifuge Rotina 35 R mit Winkelrotor 30fach und Ausschwingrotor 10fach (Hettich, Tuttlingen)

Standzentrifuge Sorvall[®] RC5B mit Rotoren SS-34, SLA-3000 und GSA (Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold)

H Spektren und Chromatogramme

1 Dünnschicht-Chromatogramme

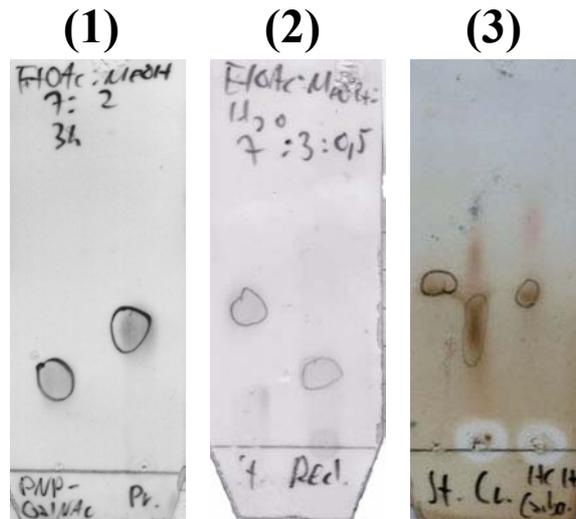


Abbildung 86: DC-Chromatogramme der Methoden E 1.2, 1.3 und 1.4.

(1) Oxidation von *p*NP-GalNAc (links *p*NP-GalNAc, rechts *p*NP-6-oxo-GalNAc), (2) Reduktion von *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal (links *p*NP-6-biotinhydrazono-Gal, rechts *p*NP-6-biotinyl-Gal als Boran-THF-Verbindung), (3) Isolierung von *p*NP-6-biotinyl-Gal (links *p*NP-6-biotinyl-Gal als Boran-THF-Verbindung, rechts freies *p*NP-6-biotinyl-Gal mit darüber laufendem roten Fleck des Borans, mitte Mischung aus links und rechts).

2 HPLC-Chromatogramme

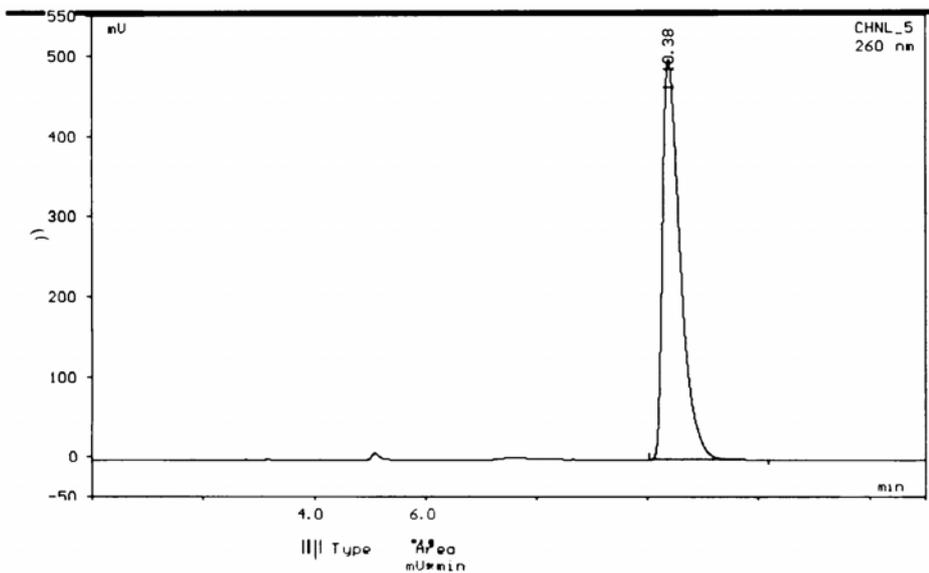


Abbildung 87: HPLC-Chromatogramm nach Synthese und Isolierung von UDP-Gal, Methode F 2.2.

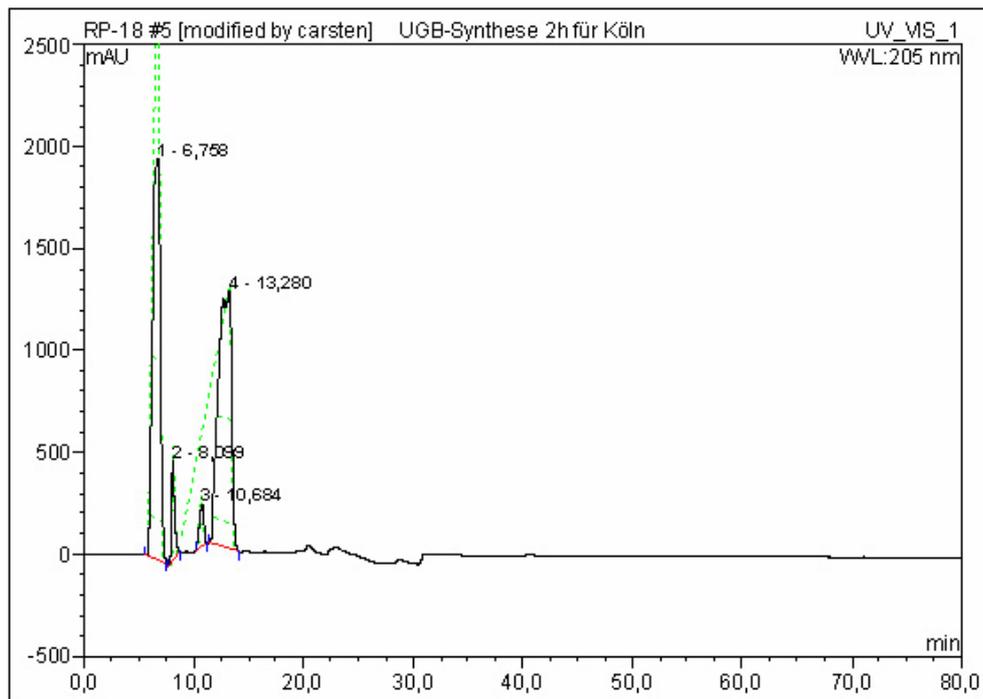


Abbildung 88: HPLC-Chromatogramm der Synthese von UDP-6-biotinyl-Gal, Methode F 2.3.

H Spektren und Chromatogramme

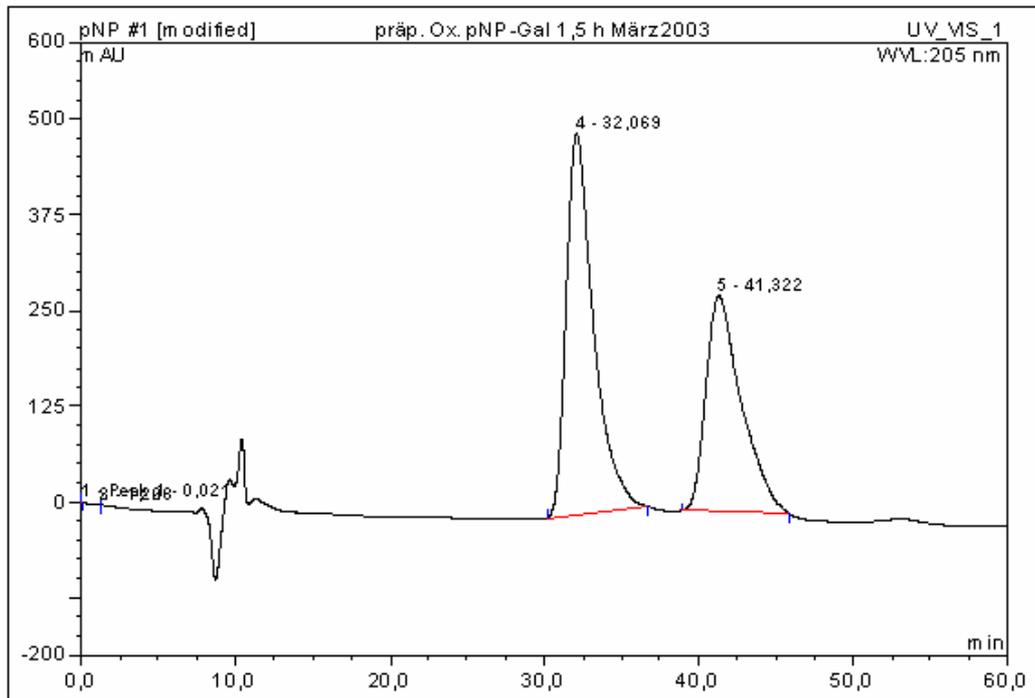


Abbildung 89: HPLC-Chromatogramm der Oxidation von *p*NP-GalNAc, Methode F 2.4.

H Spektren und Chromatogramme

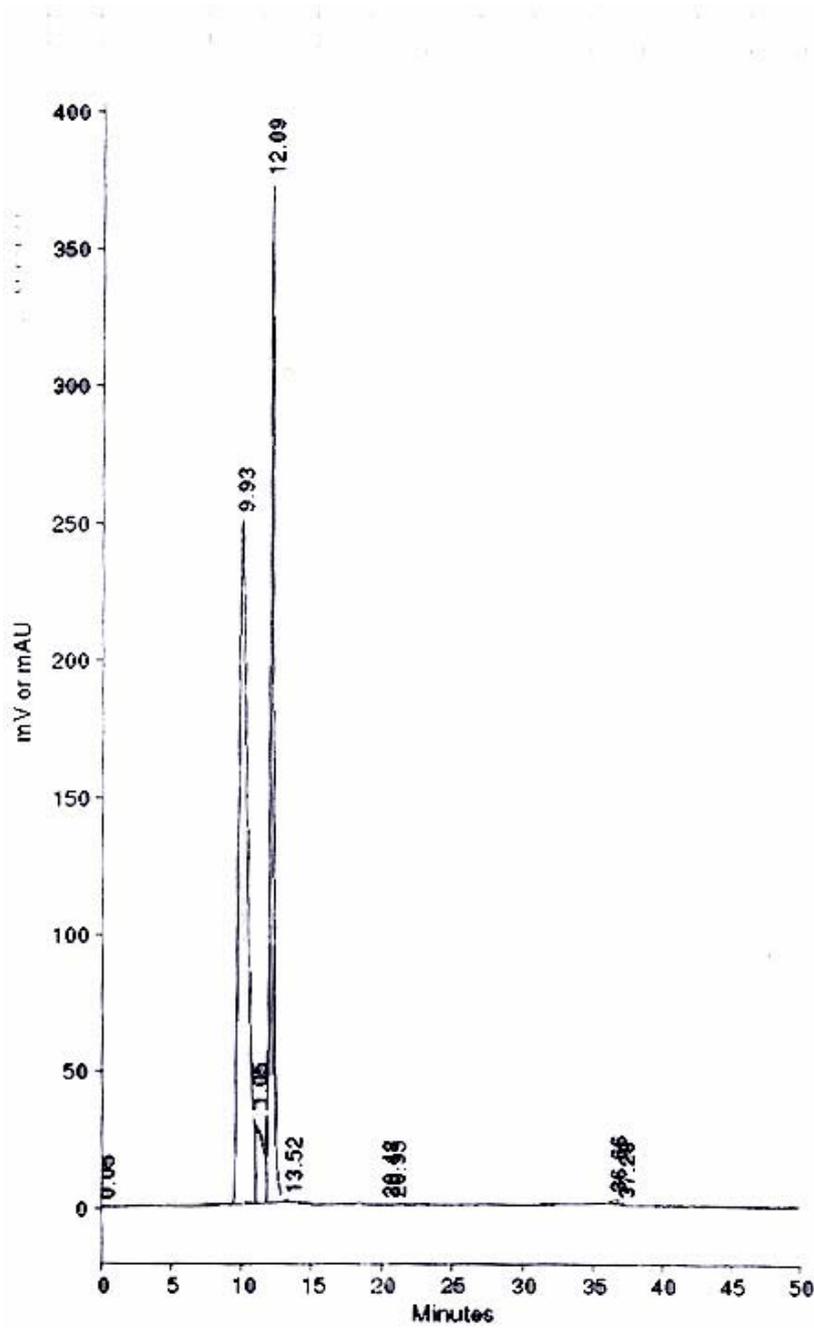


Abbildung 90: HPLC-Chromatogramm der Oxidation von pNP-GalNAc, Methode F 2.5.

H Spektren und Chromatogramme

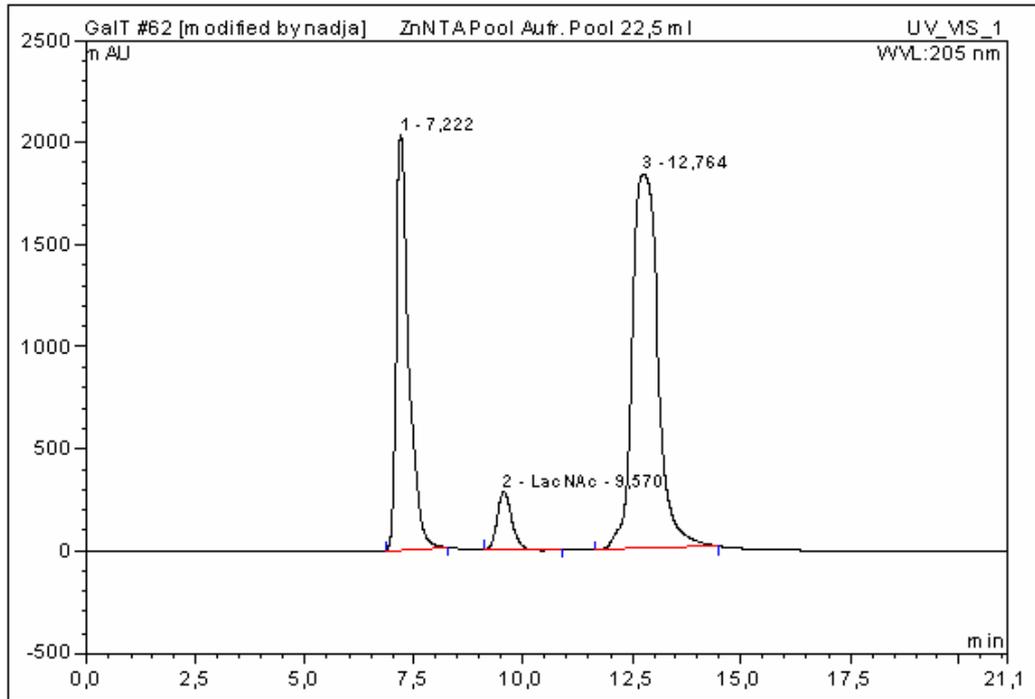


Abbildung 91: HPLC-Chromatogramm des Gal-T-Aktivitätstests (freie β 4Gal-T1) für den Pool der Zn²⁺-NTA, Methode F 2.6.

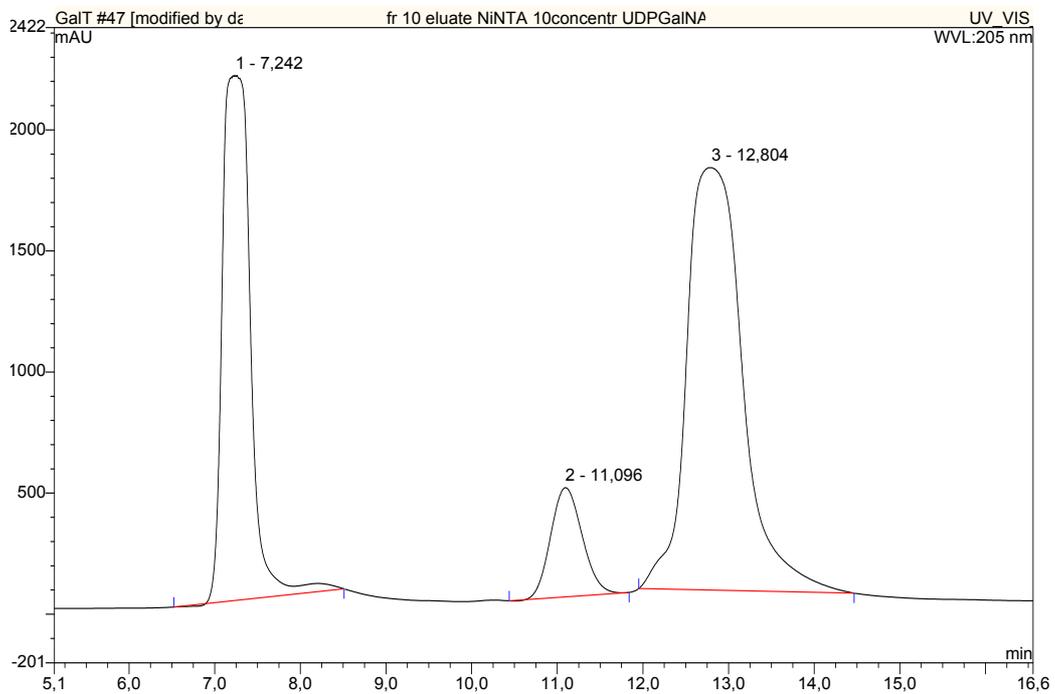


Abbildung 92: HPLC-Chromatogramm des Nachweises der Aktivität der Mutante der rekombinanten humanen β 4Gal-T1, Methode F 2.6.

3 LC-Chromatogramme

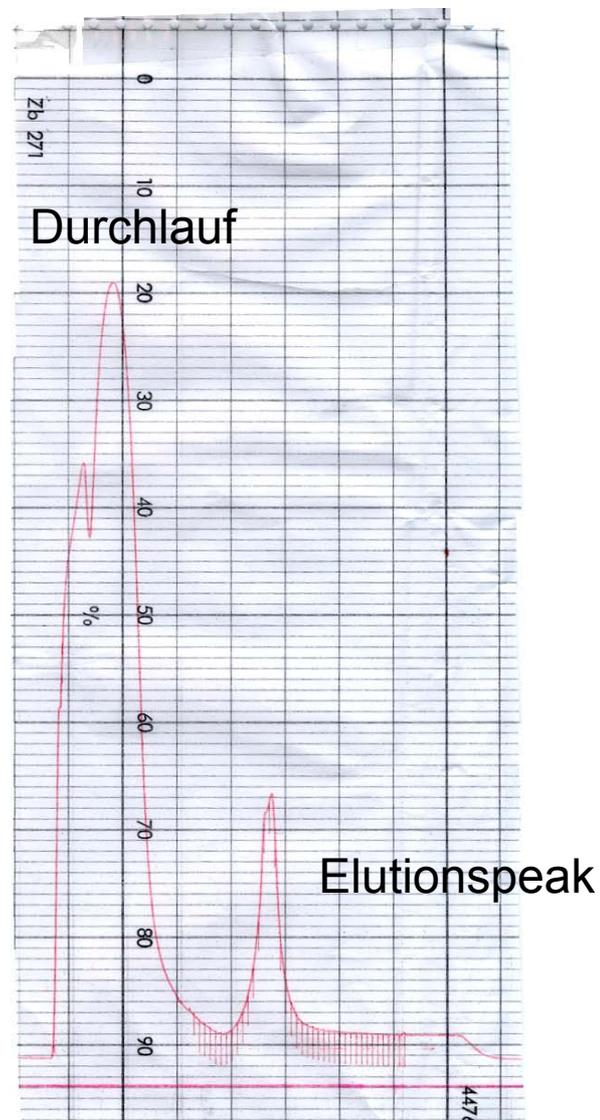


Abbildung 93: LC-Chromatogramm der Aufreinigung an Zn^{2+} -NTA der freien rekombinanten humanen β 4Gal-T1, Methode E 4.1.4.

H Spektren und Chromatogramme

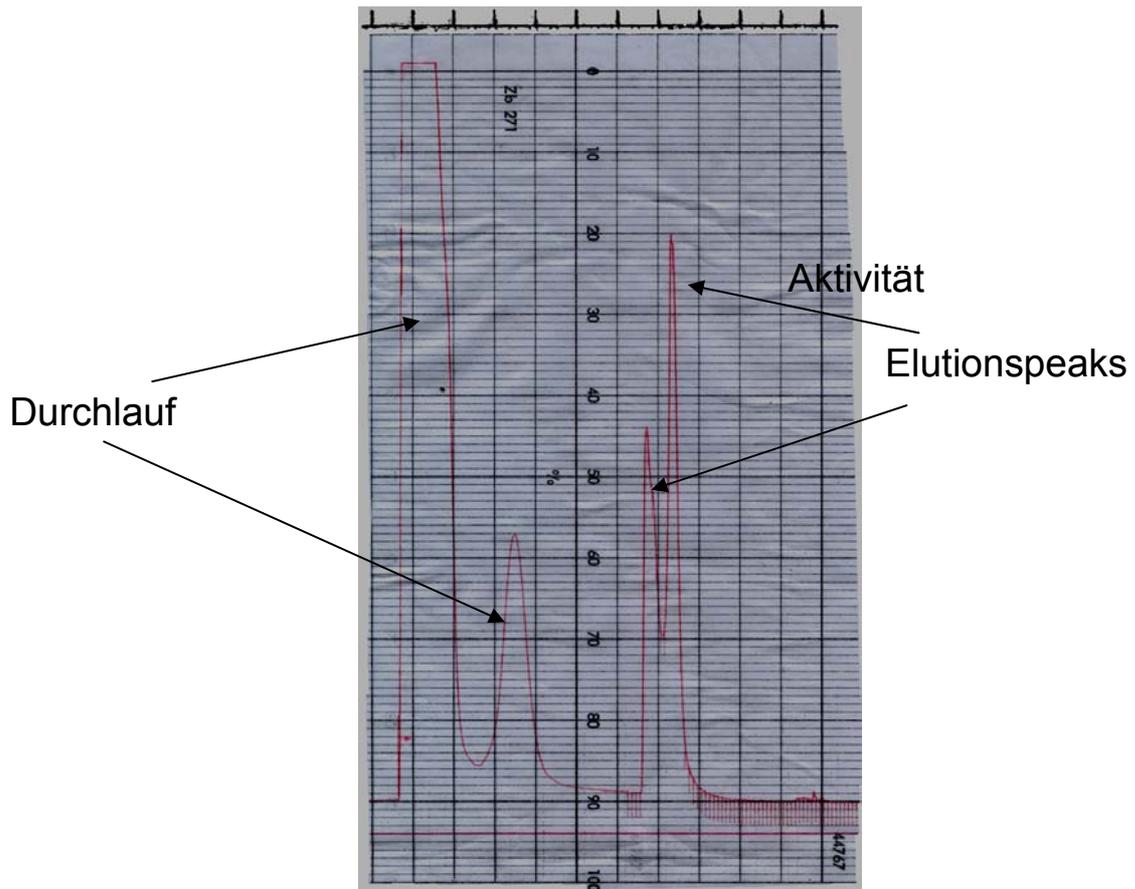


Abbildung 94: LC-Chromatogramm der Aufreinigung an SP-Sepharose der luminalen rekombinanten humanen β 4Gal-T1, Methode E 4.2.3.

H Spektren und Chromatogramme

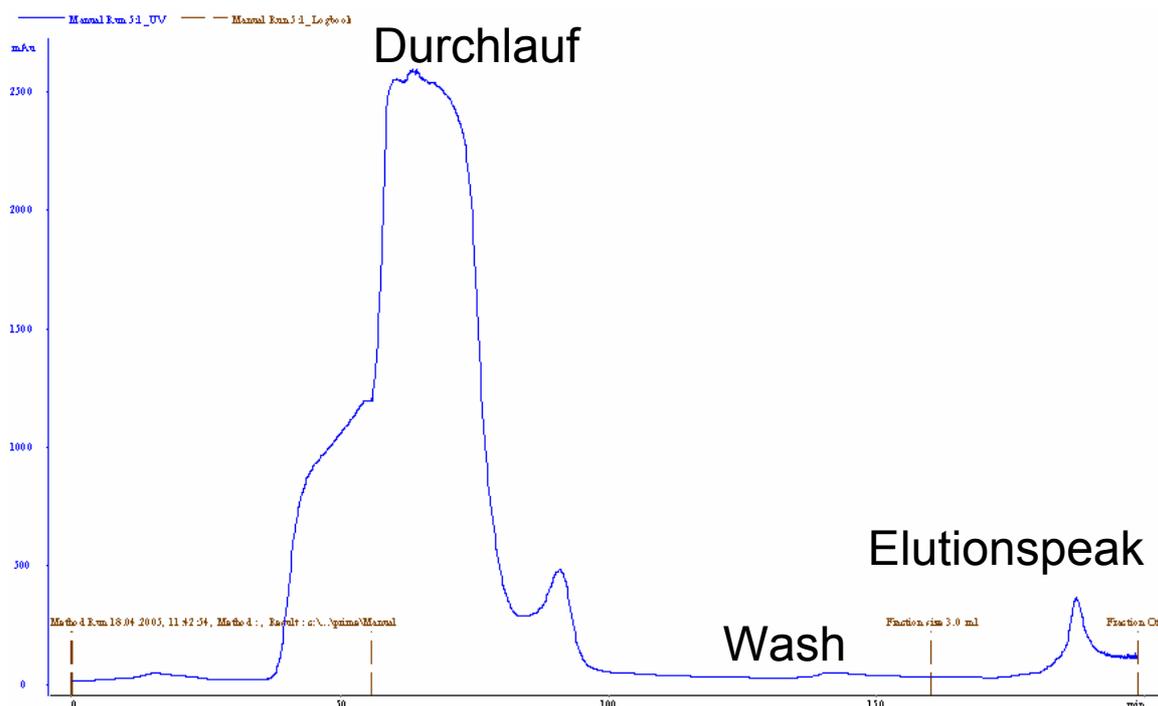


Abbildung 95: LC-Chromatogramm der Aufreinigung an Ni²⁺-NTA der His₆-TagPropeptidβ4Gal-T1, Methode E 4.3.4

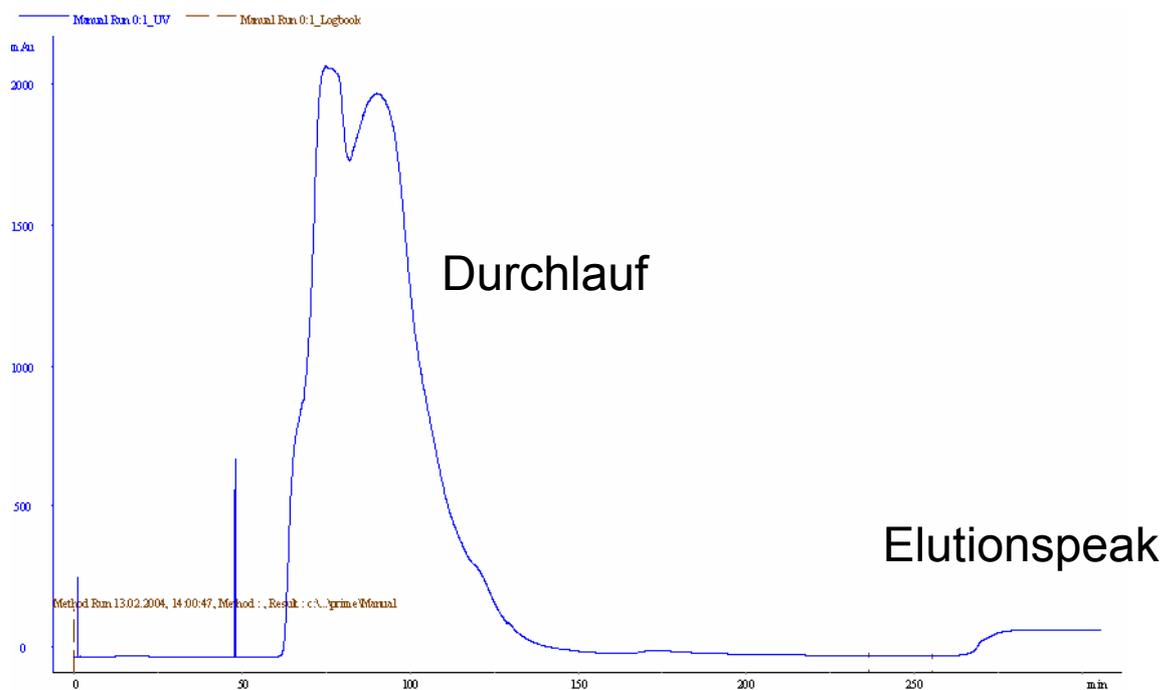


Abbildung 96: LC-Chromatogramm der Aufreinigung an Ni²⁺-NTA der Mutante His₆-TagPropeptidβ4Gal-T1(Y284L), Methode E 5.3.2.

4 NMR-Spektren

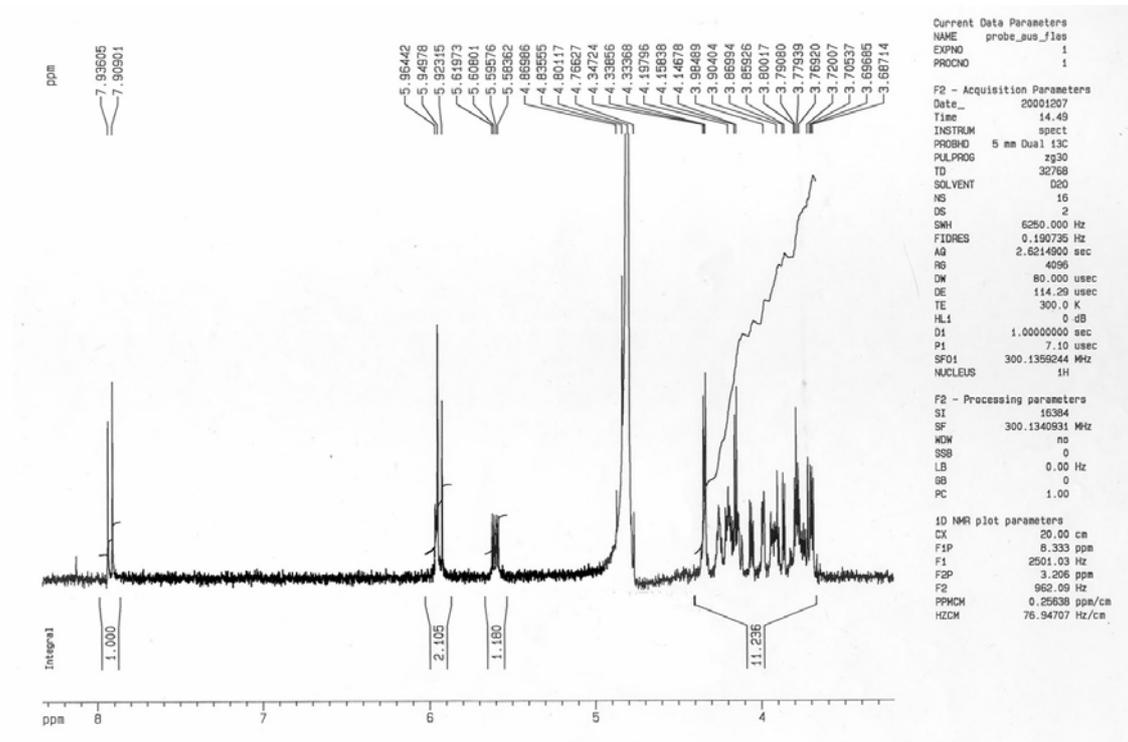


Abbildung 97 : ¹H-NMR-Spektrum von UDP-Gal.

H Spektren und Chromatogramme

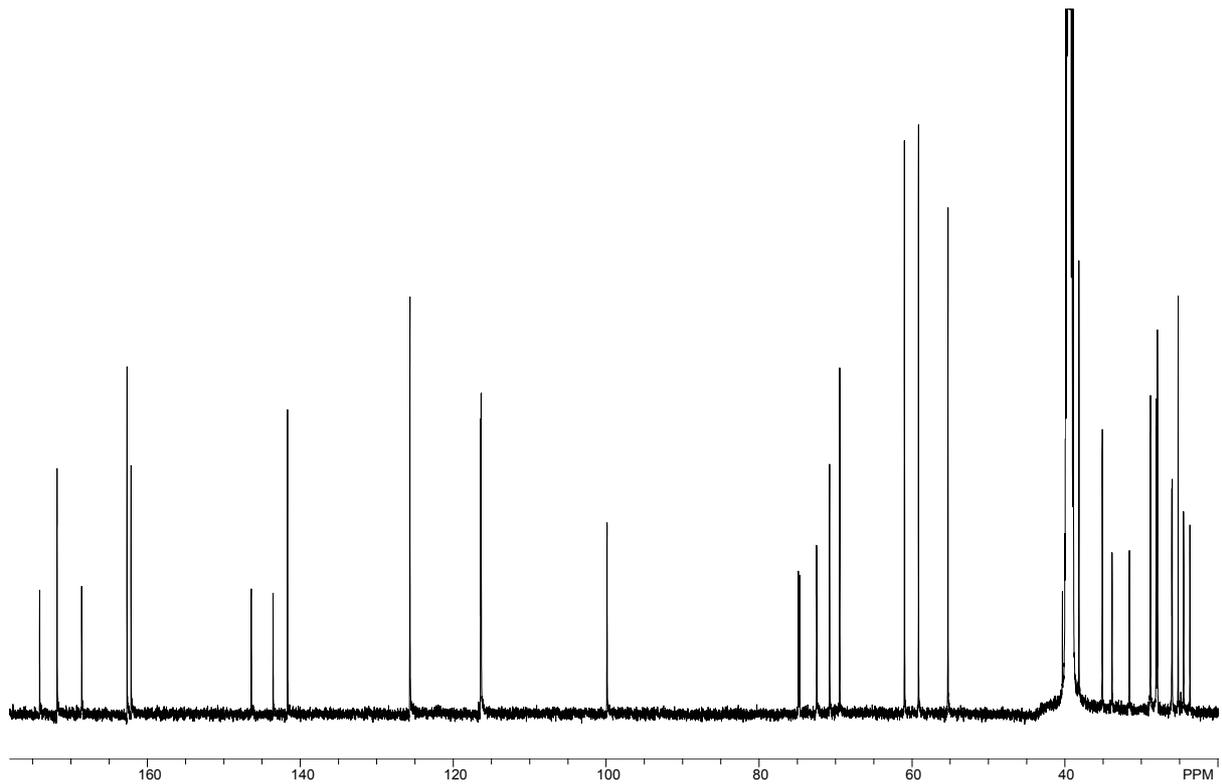


Abbildung 98: ^1H ^{13}C / DEPT-NMR-Spektrum von *p*NP-6-biotinhydrazone-Gal.

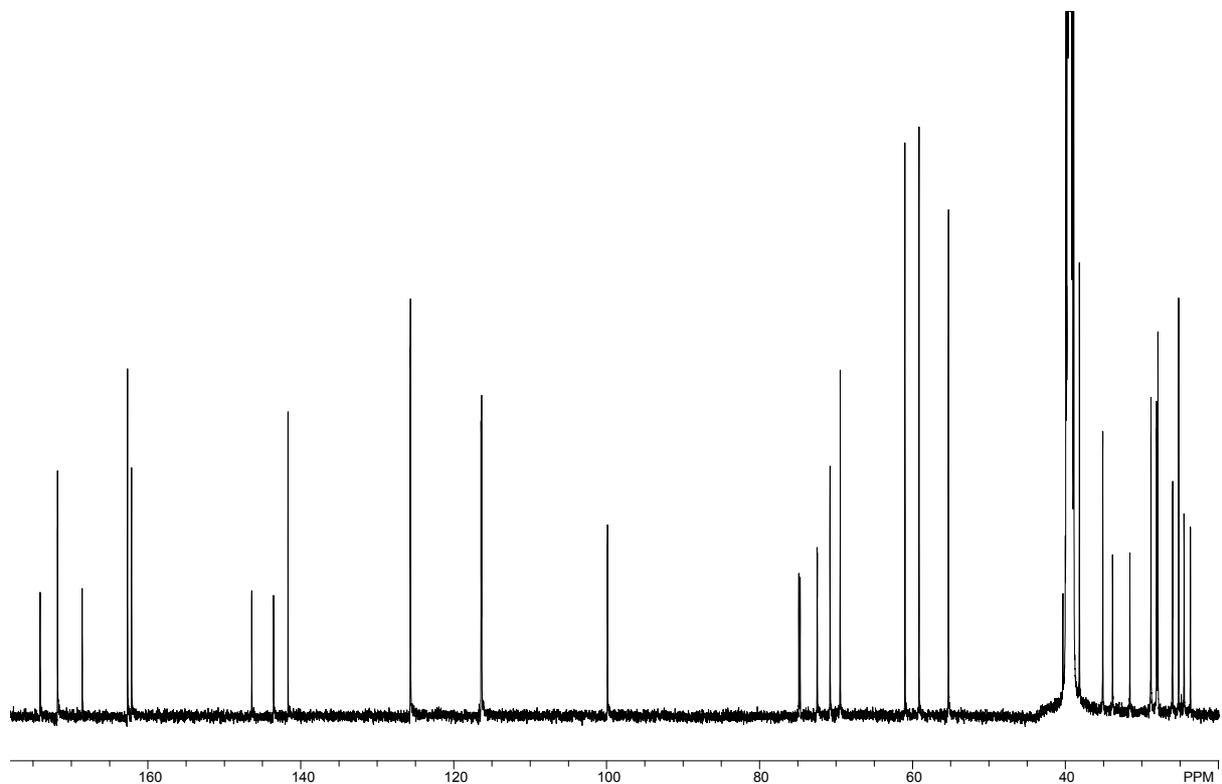


Abbildung 99: ^1H -NMR-Spektrum von *p*NP-6-biotinhydrazone-GalNAc.

H Spektren und Chromatogramme

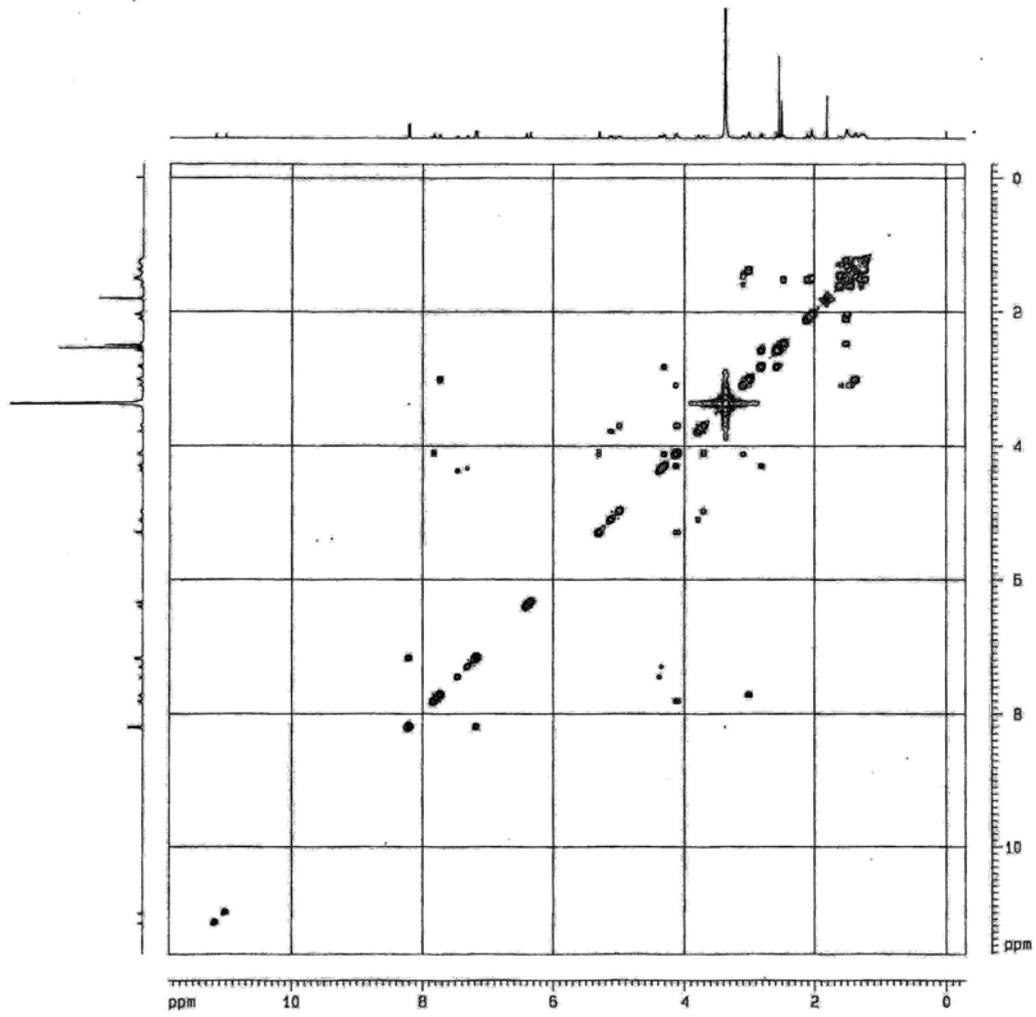


Abbildung 100: ^1H - ^1H COSY-Spektrum von *p*NP-6-biotinhydrazono-GalNAc.

H Spektren und Chromatogramme

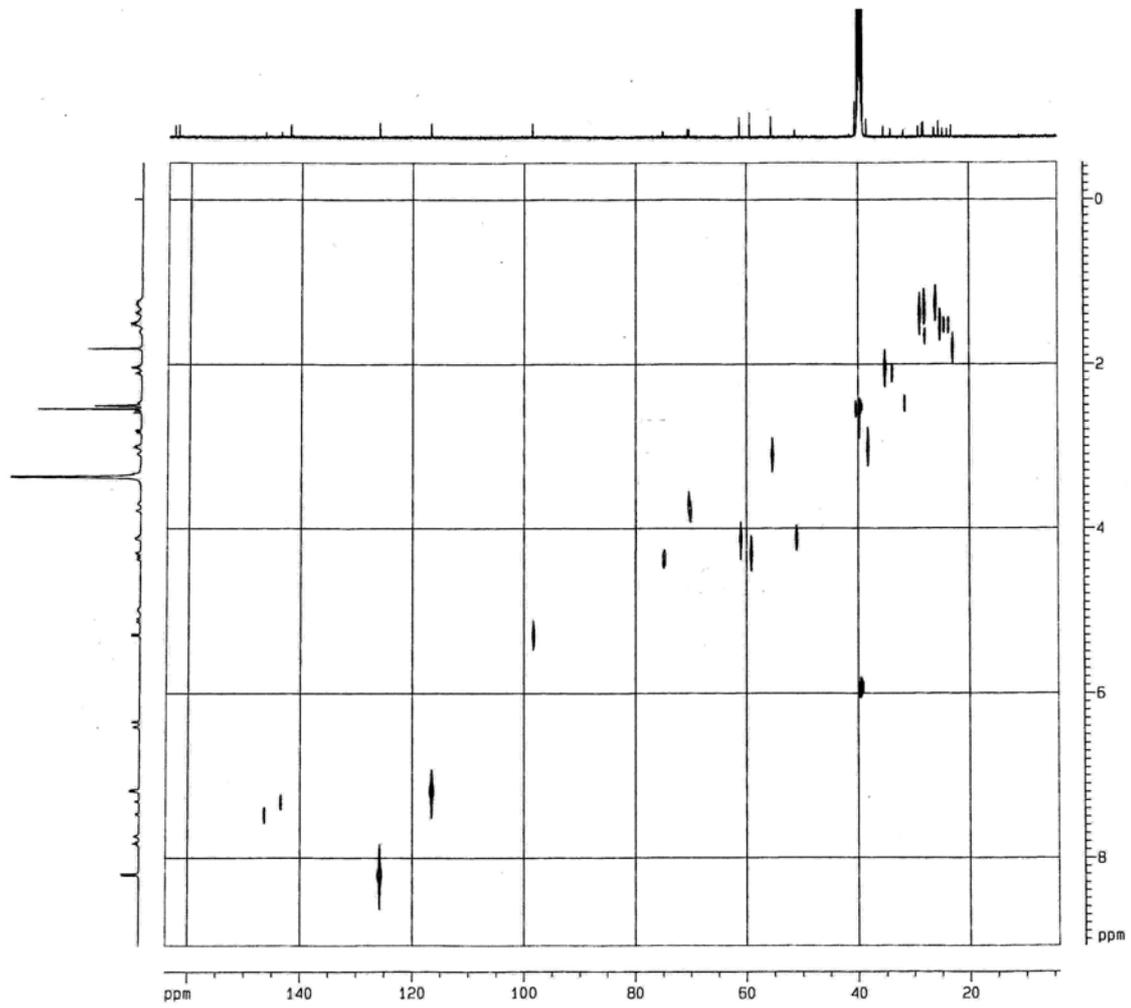


Abbildung 101: ^1H - ^{13}C COR-Spektrum von *p*NP-6-biotinhydrazone-GalNAc.

H Spektren und Chromatogramme

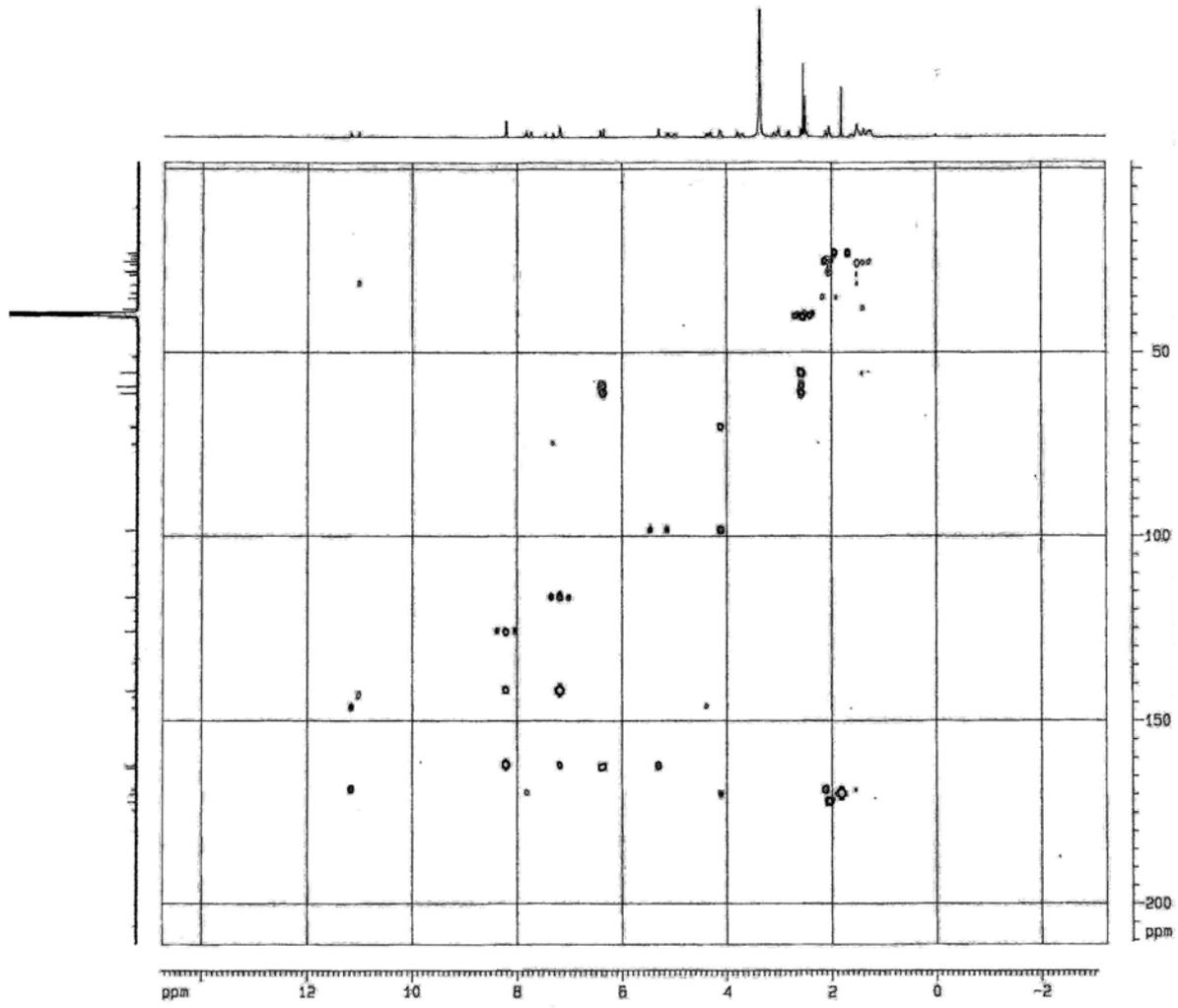


Abbildung 102: ^1H - ^{13}C gs-HMBC-Spektrum von *p*NP-6-biotinhydrazone-GalNAc.

5 MS-Spektren

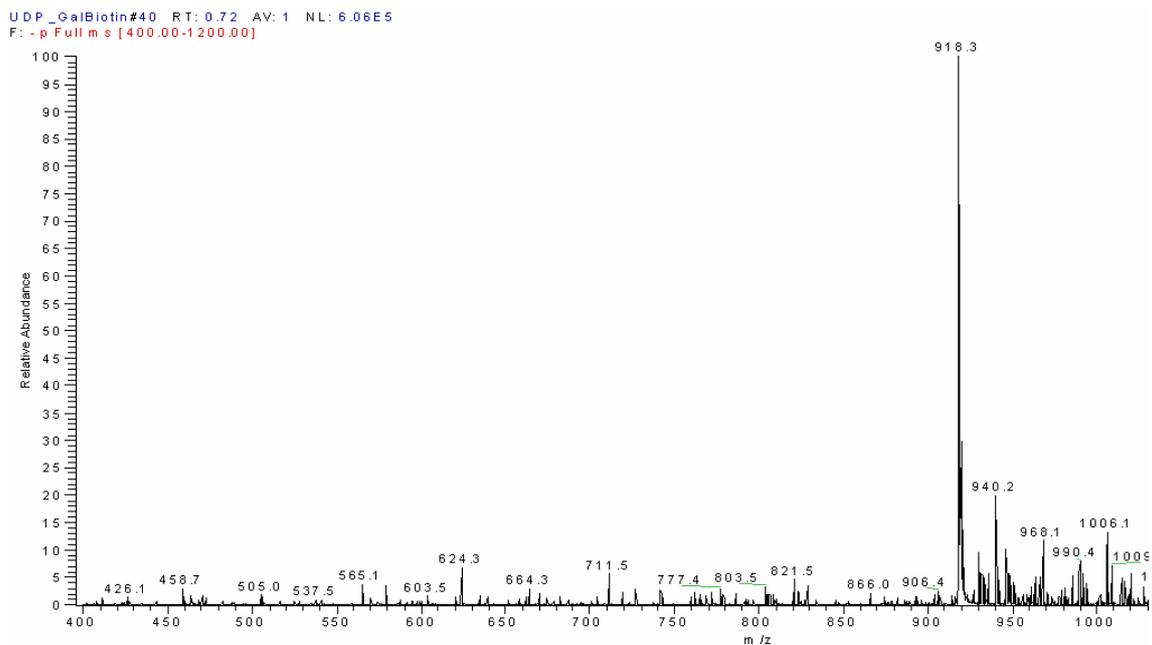


Abbildung 103: ESI-MS-Spektrum von UDP-6-biotinyl-Gal.

Die kalkulierte Masse für das Molekölion betragt $m/z = 917,23$; im Spektrum liegt $[M+H^+] = 918,3$ vor.

H Spektren und Chromatogramme

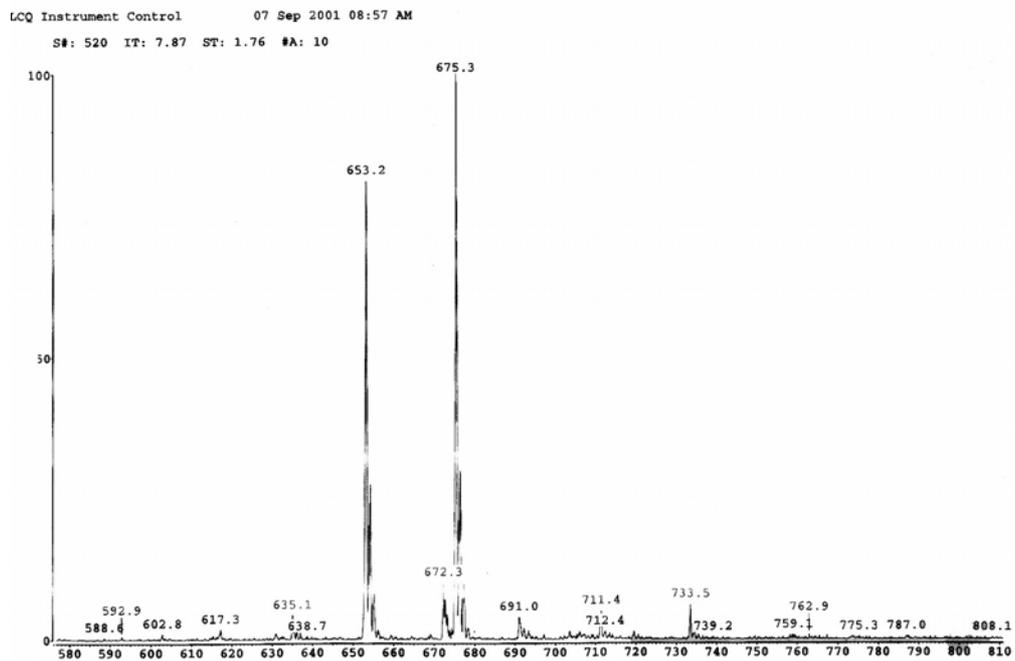


Abbildung 104: ^1H ESI-MS-Spektrum von *p*NP-6-biotinyl-Gal.

Die kalkulierte Masse für das Molekölion beträgt $m/z = 652,25$; im Spektrum liegt $[\text{M}+\text{H}^+] = 653,2$ vor.

H Spektren und Chromatogramme

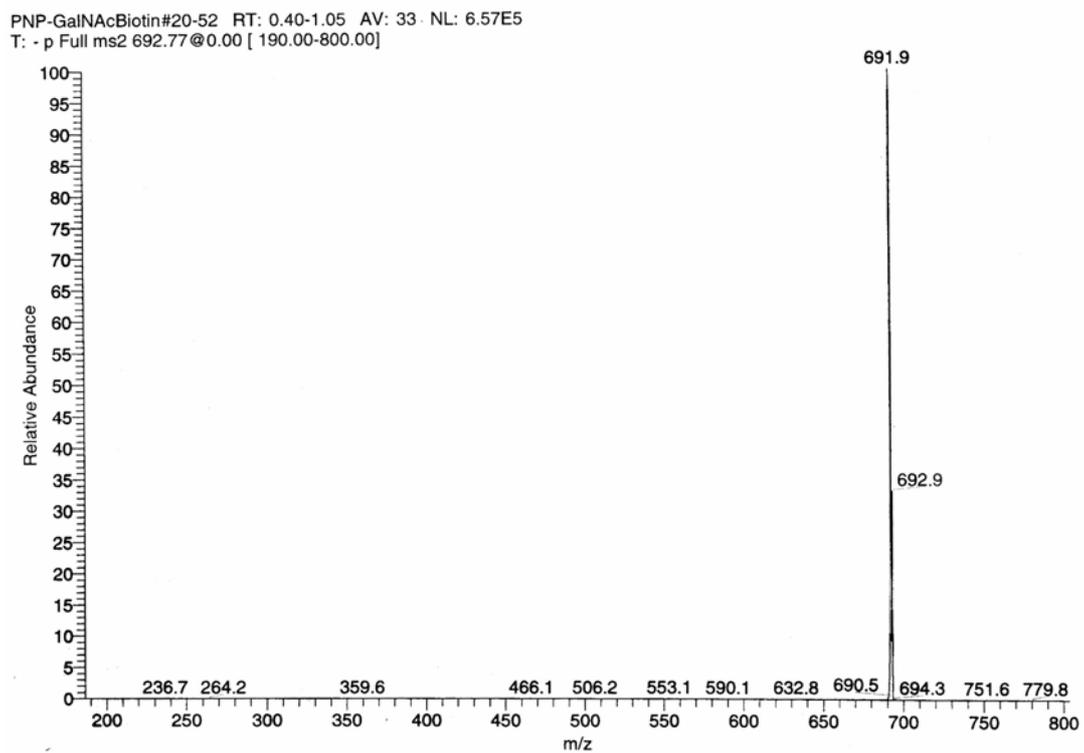


Abbildung 105: ESI-MS-Spektrum von *p*NP-6-biotinyl-GalNAc.

Die kalkulierte Masse für das Molekölion beträgt $m/z = 693,28$; im Spektrum liegt $[M-H^+] = 691,9$ vor.

I Literaturverzeichnis

- Ada, G. L. and Nossal, G. "The clonal-selection theory." *Sci Am*, **1987**, 257 (2), 62-9.
- Allen, A. C. "Methodological approaches to the analysis of IgA1 O-glycosylation in IgA nephropathy." *J Nephrol*, **1999**, 12 (2), 76-84.
- Allen, A. C., Bailey, E. M., Barratt, J., Buck, K. S. and Feehally, J. "Analysis of IgA1 O-glycans in IgA nephropathy by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis." *J Am Soc Nephrol*, **1999**, 10 (8), 1763-71.
- Allen, A. C., Bailey, E. M., Brenchley, P. E., Buck, K. S., Barratt, J. and Feehally, J. "Mesangial IgA1 in IgA nephropathy exhibits aberrant O-glycosylation: observations in three patients." *Kidney Int*, **2001**, 60 (3), 969-73.
- Allen, A. C., Topham, P. S., Harper, S. J. and Feehally, J. "Leucocyte beta 1,3 galactosyltransferase activity in IgA nephropathy." *Nephrol Dial Transplant*, **1997**, 12 (4), 701-6.
- Almeida, R., Amado, M., David, L., Lavery, S. B., Holmes, E. H., Merckx, G., van Kessel, A. G., Rygaard, E., Hassan, H., Bennett, E. and Clausen, H. "A family of human beta4-galactosyltransferases. Cloning and expression of two novel UDP-galactose:beta-n-acetylglucosamine beta1, 4-galactosyltransferases, beta4Gal-T2 and beta4Gal-T3." *J Biol Chem*, **1997**, 272 (51), 31979-91.
- Almeida, R., Lavery, S. B., Mandel, U., Kresse, H., Schwientek, T., Bennett, E. P. and Clausen, H. "Cloning and expression of a proteoglycan UDP-galactose:beta-xylose beta1,4-galactosyltransferase I. A seventh member of the human beta4-galactosyltransferase gene family." *J Biol Chem*, **1999**, 274 (37), 26165-71.
- Amado, M., Almeida, R., Carneiro, F., Lavery, S. B., Holmes, E. H., Nomoto, M., Hollingsworth, M. A., Hassan, H., Schwientek, T., Nielsen, P. A., Bennett, E. P. and Clausen, H. "A family of human beta3-galactosyltransferases. Characterization of four members of a UDP-galactose:beta-N-acetyl-glucosamine/beta-nacetyl-galactosamine beta-1,3-galactosyltransferase family." *J Biol Chem*, **1998**, 273 (21), 12770-8.
- Amado, M., Almeida, R., Schwientek, T. and Clausen, H. "Identification and characterization of large galactosyltransferase gene families: galactosyltransferases for all functions." *Biochim Biophys Acta*, **1999**, 1473 (1), 35-53.
- Amzel, L. M. and Poljak, R. J. "Three-dimensional structure of immunoglobulins." *Annu Rev Biochem*, **1979**, 48, 961-97.
- Anderson, E. P., Maxwell, E. S. and Main Burton, R. "Enzymatic synthesis of ¹⁴C-labeled uridine diphosphoglucose, galactose 1-phosphate, and uridine diphosphogalactose." *J Am Chem Soc*, **1959**, 81, 6514-6517.
- Asano, N., Ikeda, K., Kasahara, M., Arai, Y. and Kizu, H. "Glycosidase-inhibiting pyrrolidines and pyrrolizidines with a long side chain in *Scilla peruviana*." *J Nat Prod*, **2004**, 67 (5), 846-50.
- Avigad, G. "An NADH coupled assay system for galactose oxidase." *Anal Biochem*, **1978**, 86 (2), 470-6.
- Axford, J. S. "Glycosylation and rheumatic disease." *Biochim Biophys Acta*, **1999**, 1455 (2-3), 219-29.

I Literaturverzeichnis

- Axford, J. S., Cunnane, G., Fitzgerald, O., Bland, J. M., Bresnihan, B. and Frears, E. R. "Rheumatic disease differentiation using immunoglobulin G sugar printing by high density electrophoresis." *J Rheumatol*, **2003**, *30* (12), 2540-6.
- Babad, H. and Hassid, W. Z. "Soluble uridine diphosphate D-galactose: D-glucose beta-4- D-galactosyltransferase from bovine milk." *J Biol Chem*, **1966**, *241* (11), 2672-8.
- Barratt, D. H., Barber, L., Kruger, N. J., Smith, A. M., Wang, T. L. and Martin, C. "Multiple, distinct isoforms of sucrose synthase in pea." *Plant Physiol*, **2001**, *127* (2), 655-64.
- Bayer, E. A., Ben-Hur, H. and Wilchek, M. "Biocytin hydrazide--a selective label for sialic acids, galactose, and other sugars in glycoconjugates using avidin-biotin technology." *Anal Biochem*, **1988**, *170* (2), 271-81.
- Bennett, E. P., Hassan, H., Mandel, U., Hollingsworth, M. A., Akisawa, N., Ikematsu, Y., Merckx, G., van Kessel, A. G., Olofsson, S. and Clausen, H. "Cloning and characterization of a close homologue of human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-T3, designated GalNAc-T6. Evidence for genetic but not functional redundancy." *J Biol Chem*, **1999**, *274* (36), 25362-70.
- Bennett, E. P., Hassan, H., Mandel, U., Mirgorodskaya, E., Roepstorff, P., Burchell, J., Taylor-Papadimitriou, J., Hollingsworth, M. A., Merckx, G., van Kessel, A. G., Eiberg, H., Steffensen, R. and Clausen, H. "Cloning of a human UDP-N-acetyl-alpha-D-Galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase that complements other GalNAc-transferases in complete O-glycosylation of the MUC1 tandem repeat." *J Biol Chem*, **1998**, *273* (46), 30472-81.
- Bertoli, D. and Segal, S. "Developmental aspects and some characteristics of mammalian galactose 1-phosphate uridylyltransferase." *J Biol Chem*, **1966**, *241* (17), 4023-9.
- Blanken, W. M., van Vliet, A. and van den Eijnden, D. H. "Branch specificity of bovine colostrum and calf thymus UDP-Gal: N-acetylglucosaminide beta-1,4-galactosyltransferase." *J Biol Chem*, **1984**, *259* (24), 15131-5.
- Bond, A., Alavi, A., Axford, J. S., Bourke, B. E., Bruckner, F. E., Kerr, M. A., Maxwell, J. D., Tweed, K. J., Weldon, M. J., Youinou, P. and Hay, F. C. "A detailed lectin analysis of IgG glycosylation, demonstrating disease specific changes in terminal galactose and N-acetylglucosamine." *J Autoimmun*, **1997**, *10* (1), 77-85.
- Bradford, M. M. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem*, **1976**, *72*, 248-54.
- Breton, C., Oriol, R. and Imberty, A. "Conserved structural features in eukaryotic and prokaryotic fucosyltransferases." *Glycobiology*, **1998**, *8* (1), 87-94.
- Brockhausen, I. "Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells." *Biochim Biophys Acta*, **1999**, *1473* (1), 67-95.
- Brockhausen, I. "Glycodynamics of mucin biosynthesis in gastrointestinal tumor cells." *Adv Exp Med Biol*, **2003**, *535*, 163-88.
- Brockhausen, I., Toki, D., Brockhausen, J., Peters, S., Bielfeldt, T., Kleen, A., Paulsen, H., Meldal, M., Hagen, F. and Tabak, L. A. "Specificity of O-glycosylation by bovine colostrum UDP-GalNAc: polypeptide alpha-N-acetylgalactosaminyltransferase using synthetic glycopeptide substrates." *Glycoconj J*, **1996**, *13* (5), 849-56.
- Brockhausen, I., Yang, J. M., Burchell, J., Whitehouse, C. and Taylor-Papadimitriou, J. "Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells." *Eur J Biochem*, **1995**, *233* (2), 607-17.
- Bülter, T. "Chemoenzymatische Synthese und Anwendung biotinylierter Nukleotidzucker, Dissertation, HHU Düsseldorf." **1999**,

I Literaturverzeichnis

- Bülter, T. and Elling, L. "Enzymatic Synthesis of UDP-Galactose on a gram scale." *J Mol Catal, B Enzym*, **2000**, 8 (4), 281-284.
- Bülter, T., Schumacher, T., Namdjou, D. J., Gutierrez Gallego, R., Clausen, H. and Elling, L. "Chemoenzymatic synthesis of biotinylated nucleotide sugars as substrates for glycosyltransferases." *Chembiochem*, **2001**, 2 (12), 884-94.
- Buschiazzo, A., Amaya, M. F., Cremona, M. L., Frasch, A. C. and Alzari, P. M. "The crystal structure and mode of action of trans-sialidase, a key enzyme in *Trypanosoma cruzi* pathogenesis." *Mol Cell*, **2002**, 10 (4), 757-68.
- Cantor, J. O., Cerreta, J. M., Armand, G., Osman, M. and Turino, G. M. "The pulmonary matrix, glycosaminoglycans and pulmonary emphysema." *Connect Tissue Res*, **1999**, 40 (2), 97-104.
- Carchon, H., Van Schaftingen, E., Matthijs, G. and Jaeken, J. "Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type IA (phosphomannomutase-deficiency)." *Biochim Biophys Acta*, **1999**, 1455 (2-3), 155-65.
- Chace, K. V., Leahy, D. S., Martin, R., Carubelli, R., Flux, M. and Sachdev, G. P. "Respiratory mucous secretions in patients with cystic fibrosis: relationship between levels of highly sulfated mucin component and severity of the disease." *Clin Chim Acta*, **1983**, 132 (2), 143-55.
- Chen, L. M., Yet, M. G. and Shao, M. C. "New methods for rapid separation and detection of oligosaccharides from glycoproteins." *FASEB J*, **1988**, 2 (12), 2819-24.
- Christen, H. R. and Vögtle, F. "Organische Chemie." **1992**, 1, 821.
- Clausen, H. and Bennett, E. P. "A family of UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferases control the initiation of mucin-type O-linked glycosylation." *Glycobiology*, **1996**, 6 (6), 635-46.
- Colman, P. M. "Structure of antibody-antigen complexes: implications for immune recognition." *Adv Immunol*, **1988**, 43, 99-132.
- Dall'Olio, F. and Chiricolo, M. "Sialyltransferases in cancer." *Glycoconj J*, **2001**, 18 (11-12), 841-50.
- Dalziel, M., Huang, R. Y., Dall'Olio, F., Morris, J. R., Taylor-Papadimitriou, J. and Lau, J. T. "Mouse ST6Gal sialyltransferase gene expression during mammary gland lactation." *Glycobiology*, **2001**, 11 (5), 407-12.
- David, L., Nesland, J. M., Clausen, H., Carneiro, F. and Sobrinho-Simoes, M. "Simple mucin-type carbohydrate antigens (Tn, sialosyl-Tn and T) in gastric mucosa, carcinomas and metastases." *APMIS Suppl*, **1992**, 27, 162-72.
- De Praeter, C. M., Gerwig, G. J., Bause, E., Nuytinck, L. K., Vliegthart, J. F., Breuer, W., Kamerling, J. P., Espeel, M. F., Martin, J. J., De Paepe, A. M., Chan, N. W., Dacremont, G. A. and Van Coster, R. N. "A novel disorder caused by defective biosynthesis of N-linked oligosaccharides due to glucosidase I deficiency." *Am J Hum Genet*, **2000**, 66 (6), 1744-56.
- de Vries, T., Knegt, R. M., Holmes, E. H. and Macher, B. A. "Fucosyltransferases: structure/function studies." *Glycobiology*, **2001**, 11 (10), 119R-128R.
- de Zegher, F. and Jaeken, J. "Endocrinology of the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1 from birth through adolescence." *Pediatr Res*, **1995**, 37 (4 Pt 1), 395-401.
- Dennis, J. W., Granovsky, M. and Warren, C. E. "Protein glycosylation in development and disease." *Bioessays*, **1999**, 21 (5), 412-21.
- Dion, M., Osanjo, G., Andre, C., Spangenberg, P., Rabiller, C. and Tellier, C. "Identification by saturation mutagenesis of a single residue involved in the alpha-galactosidase AgaB regioselectivity." *Glycoconj J*, **2001**, 18 (6), 457-64.

I Literaturverzeichnis

- Distler, O., Muller-Ladner, U., Scholmerich, J., Gay, R. E. and Gay, S. "[Rheumatoid arthritis: new molecular and cellular aspects]." *Med Klin (Munich)*, **1999**, *94* (12), 673-80.
- Elling, L. and Kula, M. R. "Purification of sucrose synthase from rice and its protein-chemical characterization." *J Biotechnol*, **1993**, *29*, 277-286.
- Fernández-Mayoralas, A. "Synthesis and Modification of Carbohydrates Using Glycosidases and Lipases." *Top Curr Chem*, **1997**, *186*.
- Fialova, P., Namdjou, D.-J., Ettrich, R., Prikrylová, V., Raufolfová, J., Krenek, K., Kuzma, M., Elling, L., Bezouska, K., Kren, V., "Combined application of Galactose Oxidase and β -N-Acetylhexosaminidase in the Synthesis of Complex Immunoactive N-Acetyl-D-galactosaminides." *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347* (7-8), 997-1006.
- Floege, J. and Feehally, J. "IgA nephropathy: recent developments." *J Am Soc Nephrol*, **2000**, *11* (12), 2395-403.
- Frears, E. R., Merry, A. H. and Axford, J. S. "Screening neutral and acidic IgG N-glycans by high density electrophoresis." *Glycoconj J*, **1999**, *16* (6), 283-90.
- Freeze, H. H. "Update and perspectives on congenital disorders of glycosylation." *Glycobiology*, **2001**, *11* (12), 129R-143R.
- Fujii, S., Nishiura, T., Nishikawa, A., Miura, R. and Taniguchi, N. "Structural heterogeneity of sugar chains in immunoglobulin G. Conformation of immunoglobulin G molecule and substrate specificities of glycosyltransferases." *J Biol Chem*, **1990**, *265* (11), 6009-18.
- Furukawa, K. and Sato, T. "Beta-1,4-galactosylation of N-glycans is a complex process." *Biochim Biophys Acta*, **1999**, *1473* (1), 54-66.
- Galili, U. "Autologous tumor vaccines processed to express alpha-gal epitopes: a practical approach to immunotherapy in cancer." *Cancer Immunol Immunother*, **2004**.
- Gambert, U., Gonzalez Lio, R., Farkas, E., Thiem, J., Verez Bencomo, V. and Liptak, A. "Galactosylation with beta-galactosidase from bovine testes employing modified acceptor substrates." *Bioorg Med Chem*, **1997**, *5* (7), 1285-91.
- Gastinel, L. N., Cambillau, C. and Bourne, Y. "Crystal structures of the bovine beta4galactosyltransferase catalytic domain and its complex with uridine diphosphogalactose." *EMBO J*, **1999**, *18* (13), 3546-57.
- Getzoff, E. D., Tainer, J. A., Lerner, R. A. and Geysen, H. M. "The chemistry and mechanism of antibody binding to protein antigens." *Adv Immunol*, **1988**, *43*, 1-98.
- Glinsky, V. V., Glinsky, G. V., Rittenhouse-Olson, K., Huflejt, M. E., Glinskii, O. V., Deutscher, S. L. and Quinn, T. P. "The role of Thomsen-Friedenreich antigen in adhesion of human breast and prostate cancer cells to the endothelium." *Cancer Res*, **2001**, *61* (12), 4851-7.
- Gross, H. J. "Fluorescent CMP-sialic acids as a tool to study the specificity of the CMP-sialic acid carrier and the glycoconjugate sialylation in permeabilized cells." *Eur J Biochem*, **1992**, *203* (1-2), 269-75.
- Gross, H. J. and Brossmer, R. "Enzymatic introduction of a fluorescent sialic acid into oligosaccharide chains of glycoproteins." *Eur J Biochem*, **1988**, *177* (3), 583-9.
- Gross, H. J., Bunsch, A., Paulson, J. C. and Brossmer, R. "Activation and transfer of novel synthetic 9-substituted sialic acids." *Eur J Biochem*, **1987**, *168* (3), 595-602.
- Grünewald, S., Matthijs, G. and Jaeken, J. "Congenital disorders of glycosylation: a review." *Pediatr Res*, **2002**, *52* (5), 618-24.
- Hagen, F. K., Hazes, B., Raffo, R., deSa, D. and Tabak, L. A. "Structure-function analysis of the UDP-N-acetyl-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. Essential residues lie in a predicted active site cleft resembling a lactose repressor fold." *J Biol Chem*, **1999**, *274* (10), 6797-803.

I Literaturverzeichnis

- Hagen, F. K. and Nehrke, K. "cDNA cloning and expression of a family of UDP-*N*-acetyl-D-galactosamine:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase sequence homologs from *Caenorhabditis elegans*." *J Biol Chem*, **1998**, 273 (14), 8268-77.
- Hagen, F. K., Ten Hagen, K. G., Beres, T. M., Balys, M. M., VanWuyckhuysse, B. C. and Tabak, L. A. "cDNA cloning and expression of a novel UDP-*N*-acetyl-D-galactosamine:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase." *J Biol Chem*, **1997**, 272 (21), 13843-8.
- Hällgren, C. and Hindsgaul, O. "An Aminated GDP-Fucose Analog Useful in the Fucosyl-Transferase Catalyzed Addition of Biological Probes Onto Oligosaccharide Chains." *J. Carbohydr. Chem.*, **1995**, 14, 453-464.
- Hamako, J., Matsui, T., Ozeki, Y., Mizuochi, T. and Titani, K. "Comparative studies of asparagine-linked sugar chains of immunoglobulin G from eleven mammalian species." *Comp Biochem Physiol B*, **1993**, 106 (4), 949-54.
- Handa, K., Nudelman, E. D., Stroud, M. R., Shiozawa, T. and Hakomori, S. "Selectin GMP-140 (CD62; PADGEM) binds to sialosyl-Le(a) and sialosyl-Le(x), and sulfated glycans modulate this binding." *Biochem Biophys Res Commun*, **1991**, 181 (3), 1223-30.
- Hang, H. C., Yu, C., Kato, D. L. and Bertozzi, C. R. "A metabolic labeling approach toward proteomic analysis of mucin-type O-linked glycosylation." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2003**, 100 (25), 14846-51.
- Harduin-Lepers, A., Vallejo-Ruiz, V., Krzewinski-Recchi, M. A., Samyn-Petit, B., Julien, S. and Delannoy, P. "The human sialyltransferase family." *Biochimie*, **2001**, 83 (8), 727-37.
- Hartmann, E. and König, H. "Nucleotide-activated oligosaccharides are intermediates of the cell wall polysaccharide of *Methanosarcina barkeri*." *Biol Chem Hoppe Seyler*, **1991**, 372 (11), 971-4.
- Hartmann, E. and König, H. "Comparison of the biosynthesis of the methanobacterial pseudomurein and the eubacterial murein." *Naturwissenschaften*, **1990**, 77 (10), 472-5.
- Heidlas, J. E., Lees, W. J. and Whitesides, G. M. "Practical enzyme-based synthesis of uridine 5'-diphosphogalactose and uridine 5'-diphospho-*N*-acetylgalactosamine on a gram scale." *J Org Chem*, **1992**, 57, 152-157.
- Helenius, A., Aebi, M. "Intracellular Functions of N-linked glycans." *Science*, **2001**, 291 (5512), 2364-9.
- Hennet, T., Dinter, A., Kuhnert, P., Mattu, T. S., Rudd, P. M. and Berger, E. G. "Genomic cloning and expression of three murine UDP-galactose: beta-*N*-acetylglucosamine beta1,3-galactosyltransferase genes." *J Biol Chem*, **1998**, 273 (1), 58-65.
- Heptner, R. "Expression, Charakterisierung und Immobilisierung eines rekombinanten beta-1-4-Galactosyltransferase-Fusionsproteins", Diplomarbeit, FH Jülich, **2003**.
- Herscovics, A. "Importance of glycosidases in mammalian glycoprotein biosynthesis." *Biochim Biophys Acta*, **1999**, 1473 (1), 96-107.
- Higuchi, R., Krummel, B. and Saiki, R. K. "A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions." *Nucleic Acids Res*, **1988**, 16 (15), 7351-67.
- Hiki, Y., Odani, H., Takahashi, M., Yasuda, Y., Nishimoto, A., Iwase, H., Shinzato, T., Kobayashi, Y. and Maeda, K. "Mass spectrometry proves under-O-glycosylation of glomerular IgA1 in IgA nephropathy." *Kidney Int*, **2001**, 59 (3), 1077-85.
- Hitchon, C. A. and El-Gabalawy, H. S. "Immune features of seronegative and seropositive arthritis in early synovitis studies." *Curr Opin Rheumatol*, **2002**, 14 (4), 348-53.
- Hueber, W., Utz, P. J. and Robinson, W. H. "Autoantibodies in early arthritis: advances in diagnosis and prognostication." *Clin Exp Rheumatol*, **2003**, 21 (5 Suppl 31), S59-64.

I Literaturverzeichnis

- Humphreys, D.P., Smith, B.J., King, L.M., West, S.M., Reeks, D.G., Stephens, P.E. "Efficient site specific removal of a C-terminal FLAG fusion from a Fab' using copper(II) ion catalysed protein cleavage." *Protein Eng*, **1999**, *12* (2), 179-84.
- Imbach, T., Burda, P., Kuhnert, P., Wevers, R. A., Aebi, M., Berger, E. G. and Hennet, T. "A mutation in the human ortholog of the *Saccharomyces cerevisiae* ALG6 gene causes carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type-Ic." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1999**, *96* (12), 6982-7.
- Imbach, T., Schenk, B., Schollen, E., Burda, P., Stutz, A., Grunewald, S., Bailie, N. M., King, M. D., Jaeken, J., Matthijs, G., Berger, E. G., Aebi, M. and Hennet, T. "Deficiency of dolichol-phosphate-mannose synthase-1 causes congenital disorder of glycosylation type Ie." *J Clin Invest*, **2000**, *105* (2), 233-9.
- Isshiki, S., Togayachi, A., Kudo, T., Nishihara, S., Watanabe, M., Kubota, T., Kitajima, M., Shiraishi, N., Sasaki, K., Andoh, T. and Narimatsu, H. "Cloning, expression, and characterization of a novel UDP-galactose:beta-*N*-acetylglucosamine beta 1,3-galactosyltransferase (beta3Gal-T5) responsible for synthesis of type 1 chain in colorectal and pancreatic epithelia and tumor cells derived therefrom." *J Biol Chem*, **1999**, *274* (18), 12499-507.
- Jaeken, J. and Matthijs, G. "Congenital disorders of glycosylation." *Annu Rev Genomics Hum Genet*, **2001**, *2*, 129-51.
- Jaeken, J., Schachter, H., Carchon, H., De Cock, P., Coddeville, B. and Spik, G. "Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type II: a deficiency in Golgi localised *N*-acetyl-glucosaminyltransferase II." *Arch Dis Child*, **1994**, *71* (2), 123-7.
- Jorgensen, T., Berner, A., Kaalhus, O., Tveter, K. J., Danielsen, H. E. and Bryne, M. "Up-regulation of the oligosaccharide sialyl LewisX: a new prognostic parameter in metastatic prostate cancer." *Cancer Res*, **1995**, *55* (9), 1817-9.
- Joziassse, D. H. and Oriol, R. "Xenotransplantation: the importance of the Galalpha1,3Gal epitope in hyperacute vascular rejection." *Biochim Biophys Acta*, **1999**, *1455* (2-3), 403-18.
- Ju, T. and Cummings, R. D. "A unique molecular chaperone Cosmc required for activity of the mammalian core 1 beta 3-galactosyltransferase." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2002**, *99* (26), 16613-8.
- Juers, D. H., Jacobson, R. H., Wigley, D., Zhang, X. J., Huber, R. E., Tronrud, D. E. and Matthews, B. W. "High resolution refinement of beta-galactosidase in a new crystal form reveals multiple metal-binding sites and provides a structural basis for alpha-complementation." *Protein Sci*, **2000**, *9* (9), 1685-99.
- Kangying, L., Zhenghong, Z., Guofeng, Z. and Chuchi, T. "Synthesis of chiral phosphorus reagents and their catalytic activity in asymmetric borane reduction of *N*-phenyl imine of acetophenone." *Heteroatom Chemistry*, **2003**, *14* (6), 546-550.
- Kayser, H., Zeitler, R., Kannicht, C., Grunow, D., Nuck, R. and Reutter, W. "Biosynthesis of a nonphysiological sialic acid in different rat organs, using *N*-propanoyl-D-hexosamines as precursors." *J Biol Chem*, **1992**, *267* (24), 16934-8.
- Kepler, O. T., Stehling, P., Herrmann, M., Kayser, H., Grunow, D., Reutter, W. and Pawlita, M. "Biosynthetic modulation of sialic acid-dependent virus-receptor interactions of two primate polyoma viruses." *J Biol Chem*, **1995**, *270* (3), 1308-14.
- Keusch, J., Lydyard, P. M., Berger, E. G. and Delves, P. J. "B lymphocyte galactosyltransferase protein levels in normal individuals and in patients with rheumatoid arthritis." *Glycoconj J*, **1998**, *15* (11), 1093-7.
- Keystone, E. C., Haraoui, B. and Bykerk, V. P. "Role of adalimumab in the treatment of early rheumatoid arthritis." *Clin Exp Rheumatol*, **2003**, *21* (5 Suppl 31), S198-9.

I Literaturverzeichnis

- Khidekel, N., Arndt, S., Lamarre-Vincent, N., Lippert, A., Poulin-Kerstien, K. G., Ramakrishnan, B., Qasba, P. K. and Hsieh-Wilson, L. C. "A chemoenzymatic approach toward the rapid and sensitive detection of O-GlcNAc posttranslational modifications." *J Am Chem Soc*, **2003**, *125* (52), 16162-3.
- Khidekel, N., Ficarro, S. B., Peters, E. C. and Hsieh-Wilson, L. C. "Exploring the O-GlcNAc proteome: direct identification of O-GlcNAc-modified proteins from the brain." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2004**, *101* (36), 13132-7.
- Kobata, A. "Isolation and identification of two novel uridine nucleotide oligosaccharide conjugates from human milk." *Biochem Biophys Res Commun*, **1962**, *7*, 346-50.
- Kobata, A. "A journey to the world of glycobiology." *Glycoconj J*, **2000**, *17* (7-9), 443-64.
- Kobata, A. and Ziro, S. "The acid-soluble nucleotides of milk. 3. Occurrence of UDP-*N*-acetylglucosamine and UDP-*D*-xylose in pig's milk and colostrum." *Biochim Biophys Acta*, **1965**, *107* (3), 405-13.
- Kobayashi, H., Terao, T. and Kawashima, Y. "Sialyl Tn as a prognostic marker in epithelial ovarian cancer." *Br J Cancer*, **1992**, *66* (5), 984-5.
- Koizumi, S., Endo, T., Tabata, K. and Ozaki, A. "Large-scale production of UDP-galactose and globotriose by coupling metabolically engineered bacteria." *Nat Biotechnol*, **1998**, *16* (9), 847-50.
- Kono, M., Ohyama, Y., Lee, Y. C., Hamamoto, T., Kojima, N. and Tsuji, S. "Mouse beta-galactoside alpha 2,3-sialyltransferases: comparison of in vitro substrate specificities and tissue specific expression." *Glycobiology*, **1997**, *7* (4), 469-79.
- Körner, C., Knauer, R., Stephani, U., Marquardt, T., Lehle, L. and von Figura, K. "Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type IV: deficiency of dolichyl-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-dolichyl mannosyltransferase." *EMBO J*, **1999**, *18* (23), 6816-22.
- Kragl, U., Gödde, A., Wandrey, C., Kinzy, W., Cappon, J. J. and Lugtenburg, J. "Repetitive batch as an efficient method for preparative scale enzymatic synthesis of 5-acido-neuraminic acid and 15N-L-glutamic acid." *Tetrahedron Asymm*, **1993**, *4*, 1193-1202.
- Kronenberg, M., Siu, G., Hood, L. E. and Shastri, N. "The molecular genetics of the T-cell antigen receptor and T-cell antigen recognition." *Annu Rev Immunol*, **1986**, *4*, 529-91.
- Kurahashi, K. and Sugimura, A. "Purification and properties of galactose 1-phosphate uridyl transferase from *Escherichia coli*." *J Biol Chem*, **1960**, *235*, 940-6.
- Le Pendu, J., Marionneau, S., Cailleau-Thomas, A., Rocher, J., Le Moullac-Vaidye, B. and Clement, M. "ABH and Lewis histo-blood group antigens in cancer." *Apmis*, **2001**, *109* (1), 9-31.
- Lee, J. H., Baker, T. J., Mahal, L. K., Zabner, J., Bertozzi, C. R., Wiemer, D. F. and Welsh, M. J. "Engineering novel cell surface receptors for virus-mediated gene transfer." *J Biol Chem*, **1999**, *274* (31), 21878-84.
- Lemieux, G. A. and Bertozzi, C. R. "Chemoselective ligation reactions with proteins, oligosaccharides and cells." *Trends Biotechnol*, **1998**, *16* (12), 506-13.
- Ley, K. "The role of selectins in inflammation and disease." *Trends Mol Med*, **2003**, *9* (6), 263-8.
- Liljebblad, M., Lundblad, A. and Pahlsson, P. "Analysis of agalacto-IgG in rheumatoid arthritis using surface plasmon resonance." *Glycoconj J*, **2000**, *17* (5), 323-9.
- Lloyd, K. O., Burchell, J., Kudryashov, V., Yin, B. W. and Taylor-Papadimitriou, J. "Comparison of O-linked carbohydrate chains in MUC-1 mucin from normal breast epithelial cell lines and breast carcinoma cell lines. Demonstration of simpler and fewer glycan chains in tumor cells." *J Biol Chem*, **1996**, *271* (52), 33325-34.
- MacDonald, H. R. and Nabholz, M. "T-cell activation." *Annu Rev Cell Biol*, **1986**, *2*, 231-53.

I Literaturverzeichnis

- Macmillan, D. and Daines, A. M. "Recent developments in the synthesis and discovery of oligosaccharides and glycoconjugates for the treatment of disease." *Curr Med Chem*, **2003**, *10* (24), 2733-73.
- Mahal, L. K., Yarema, K. J. and Bertozzi, C. R. "Engineering chemical reactivity on cell surfaces through oligosaccharide biosynthesis." *Science*, **1997**, *276* (5315), 1125-8.
- Malissard, M. and Berger, E. G. "Improving solubility of catalytic domain of human beta-1,4-galactosyltransferase 1 through rationally designed amino acid replacements." *Eur J Biochem*, **2001**, *268* (15), 4352-8.
- Mann, J. S., Huang, J. C. and Keana, J. F. "Molecular amplifiers: synthesis and functionalization of a poly(aminopropyl)dextran bearing a uniquely reactive terminus for univalent attachment to biomolecules." *Bioconjug Chem*, **1992**, *3* (2), 154-9.
- Marcaurelle, L. A. and Bertozzi, C. R. "Recent advances in the chemical synthesis of mucin-like glycoproteins." *Glycobiology*, **2002**, *12* (6), 69R-77R.
- Mariuzza, R. A., Phillips, S. E. and Poljak, R. J. "The structural basis of antigen-antibody recognition." *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, **1987**, *16*, 139-59.
- Marquardt, T. and Denecke, J. "Congenital disorders of glycosylation: review of their molecular bases, clinical presentations and specific therapies." *Eur J Pediatr*, **2003**, *162* (6), 359-79.
- Marshall, R. D. "The nature and metabolism of the carbohydrate-peptide linkages of glycoproteins." *Biochem Soc Symp*, **1974**, (40), 17-26.
- Masri, K. A., Appert, H. E. and Fukuda, M. N. "Identification of the full-length coding sequence for human galactosyltransferase (beta-N-acetylglucosaminide: beta 1,4-galactosyltransferase)." *Biochem Biophys Res Commun*, **1988**, *157* (2), 657-63.
- Mattu, T. S., Pleass, R. J., Willis, A. C., Kilian, M., Wormald, M. R., Lellouch, A. C., Rudd, P. M., Woof, J. M. and Dwek, R. A. "The glycosylation and structure of human serum IgA1, Fab, and Fc regions and the role of N-glycosylation on Fc alpha receptor interactions." *J Biol Chem*, **1998**, *273* (4), 2260-72.
- Mazur, A. W. "Galactose oxidase In "Enzymes in carbohydrate synthesis"; Bednarski, M.D.; Simon, E.S.; Eds." American Chemical Society, **1991**, *446*, 99-110.
- Messner, P. "Bacterial glycoproteins." *Glycoconj J*, **1997**, *14* (1), 3-11.
- Messner, P. and Sleytr, U. B. "Bacterial surface layer glycoproteins." *Glycobiology*, **1991**, *1* (6), 545-51.
- Meyer, W. and Schafer, G. "Characterization and purification of a membrane-bound archaeobacterial pyrophosphatase from *Sulfolobus acidocaldarius*." *Eur J Biochem*, **1992**, *207* (2), 741-6.
- Muller-Eberhard, H. J. "Molecular organization and function of the complement system." *Annu Rev Biochem*, **1988**, *57*, 321-47.
- Muraki, M., Ishimura, M. and Harata, K. "Interactions of wheat-germ agglutinin with GlcNAc beta 1,6Gal sequence." *Biochim Biophys Acta*, **2002**, *1569* (1-3), 10-20.
- Nakamori, S., Kameyama, M., Imaoka, S., Furukawa, H., Ishikawa, O., Sasaki, Y., Kabuto, T., Iwanaga, T., Matsushita, Y. and Irimura, T. "Increased expression of sialyl Lewisx antigen correlates with poor survival in patients with colorectal carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical study." *Cancer Res*, **1993**, *53* (15), 3632-7.
- Narasimhan, S., Freed, J. C. and Schachter, H. "Control of glycoprotein synthesis. Bovine milk UDPgalactose:N-acetylglucosamine beta-4-galactosyltransferase catalyzes the preferential transfer of galactose to the GlcNAc beta 1,2Man alpha 1,3- branch of both bisected and nonbisected complex biantennary asparagine-linked oligosaccharides." *Biochemistry*, **1985**, *24* (7), 1694-700.

I Literaturverzeichnis

- Nieder, V., Kutzer, M., Kren, V., Gutierrez Gallego, R., Kamerling, J. P. and Elling, L. "Screening and Characterization of β -N-Acetylhexosaminidases for the Synthesis of Nucleotide-Activated Disaccharides." *Enzyme Microb Technol*, **2004**, *34*, 407-414.
- Nieder, V., Marx, S. P., Gutierrez Gallego, R., Kamerling, J. P., Vliegenhart, J. F. G. and Elling, L. "Synthesis of nucleotide-activated disaccharides with β -Galactosidase from *Bacillus circulans* and α -Galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis*." *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **2003**, *21*, 157-166.
- Niehues, R., Hasilik, M., Alton, G., Korner, C., Schiebe-Sukumar, M., Koch, H. G., Zimmer, K. P., Wu, R., Harms, E., Reiter, K., von Figura, K., Freeze, H. H., Harms, H. K. and Marquardt, T. "Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ib. Phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy." *J Clin Invest*, **1998**, *101* (7), 1414-20.
- Nilsson, K. G. I. "Enzymatic Synthesis of oligosaccharides." *Trends in Biotechnol*, **1988**, *6*, 256-264.
- Novak, J., Julian, B. A., Tomana, M. and Mesteck, J. "Progress in molecular and genetic studies of IgA nephropathy." *J Clin Immunol*, **2001**, *21* (5), 310-27.
- Novak, J., Tomana, M., Kilian, M., Coward, L., Kulhavy, R., Barnes, S. and Mestecky, J. "Heterogeneity of O-glycosylation in the hinge region of human IgA1." *Mol Immunol*, **2000**, *37* (17), 1047-56.
- O'Connell, P. J., Gerkis, V. and d'Apice, A. J. "Variable O-glycosylation of CD13 (aminopeptidase N)." *J Biol Chem*, **1991**, *266* (7), 4593-7.
- Odani, H., Hiki, Y., Takahashi, M., Nishimoto, A., Yasuda, Y., Iwase, H., Shinzato, T. and Maeda, K. "Direct evidence for decreased sialylation and galactosylation of human serum IgA1 Fc O-glycosylated hinge peptides in IgA nephropathy by mass spectrometry." *Biochem Biophys Res Commun*, **2000**, *271* (1), 268-74.
- Paquet, M. R., Narasimhan, S., Schachter, H. and Moscarello, M. A. "Branch specificity of purified rat liver Golgi UDP-galactose: *N*-acetylglucosamine beta-1,4-galactosyltransferase. Preferential transfer of galactose on the GlcNAc beta 1,2-Man alpha 1,3-branch of a complex biantennary Asn-linked oligosaccharide." *J Biol Chem*, **1984**, *259* (8), 4716-21.
- Parekh, R. B., Dwek, R. A., Sutton, B. J., Fernandes, D. L., Leung, A., Stanworth, D., Rademacher, T. W., Mizuochi, T., Taniguchi, T. and Matsuta, K. "Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG." *Nature*, **1985**, *316* (6027), 452-7.
- Parsons, N. J., Patel, P. V., Tan, E. L., Andrade, J. R., Nairn, C. A., Goldner, M., Cole, J. A. and Smith, H. "Cytidine 5'-monophospho-*N*-acetyl neuraminic acid and a low molecular weight factor from human blood cells induce lipopolysaccharide alteration in gonococci when conferring resistance to killing by human serum." *Microb Pathog*, **1988**, *5* (4), 303-9.
- Petrescu, A. J., Butters, T. D., Reinkensmeier, G., Petrescu, S., Platt, F. M., Dwek, R. A. and Wormald, M. R. "The solution NMR structure of glucosylated N-glycans involved in the early stages of glycoprotein biosynthesis and folding." *EMBO J*, **1997**, *16* (14), 4302-10.
- Polley, M. J., Phillips, M. L., Wayner, E., Nudelman, E., Singhal, A. K., Hakomori, S. and Paulson, J. C. "CD62 and endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) recognize the same carbohydrate ligand, sialyl-Lewis x." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1991**, *88* (14), 6224-8.
- Prescher, J. A., Dube, D. H. and Bertozzi, C. R. "Chemical remodelling of cell surfaces in living animals." *Nature*, **2004**, *430* (7002), 873-7.
- Quiagen "The QIAexpressionist." **2003**.

I Literaturverzeichnis

- Raju, T. S., Briggs, J. B., Borge, S. M. and Jones, A. J. "Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics." *Glycobiology*, **2000**, *10* (5), 477-86.
- Ramakrishnan, B., Balaji, P. V. and Qasba, P. K. "Crystal structure of beta1,4-galactosyltransferase complex with UDP-Gal reveals an oligosaccharide acceptor binding site." *J Mol Biol*, **2002**, *318* (2), 491-502.
- Ramakrishnan, B. and Qasba, P. K. "Structure-based design of beta 1,4-galactosyltransferase I (beta 4Gal-T1) with equally efficient *N*-acetylgalactosaminyltransferase activity: point mutation broadens beta 4Gal-T1 donor specificity." *J Biol Chem*, **2002**, *277* (23), 20833-9.
- Ramakrishnan, B., Boeggeman, E., Qasba, P.K. "Effect of the Met344His mutation on the conformational dynamics of bovine beta-1,4-galactosyltransferase: crystal structure of the Met344His mutant in complex with chitobiose." *Biochemistry*, **2004**, *43* (39), 12513-12522.
- Reuter, G. and Gabius, H. J. "Sialic acids structure-analysis-metabolism-occurrence-recognition." *Biol Chem Hoppe Seyler*, **1996**, *377* (6), 325-42.
- Roussel, P. and Lamblin, G. "The glycosylation of airway mucins in cystic fibrosis and its relationship with lung infection by *Pseudomonas aeruginosa*." *Adv Exp Med Biol*, **2003**, *535*, 17-32.
- Routier, F. H., Hounsell, E. F., Rudd, P. M., Takahashi, N., Bond, A., Hay, F. C., Alavi, A., Axford, J. S. and Jefferis, R. "Quantitation of the oligosaccharides of human serum IgG from patients with rheumatoid arthritis: a critical evaluation of different methods." *J Immunol Methods*, **1998**, *213* (2), 113-30.
- Rudd, P. M., Leatherbarrow, R. J., Rademacher, T. W. and Dwek, R. A. "Diversification of the IgG molecule by oligosaccharides." *Mol Immunol*, **1991**, *28* (12), 1369-78.
- Ruoslahti, E. "Structure and biology of proteoglycans." *Annu Rev Cell Biol*, **1988**, *4*, 229-55.
- Ruoslahti, E. "Brain extracellular matrix." *Glycobiology*, **1996**, *6* (5), 489-92.
- Sato, T. and Furukawa, K. "Differences in *N*-acetylglucosamine synthesis between beta-1,4-galactosyltransferases I and V." *Glycoconj J*, **1999**, *16* (1), 73-6.
- Saxon, E., Armstrong, J. I. and Bertozzi, C. R. "A "traceless" Staudinger ligation for the chemoselective synthesis of amide bonds." *Org Lett*, **2000**, *2* (14), 2141-3.
- Saxon, E. and Bertozzi, C. R. "Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction." *Science*, **2000**, *287* (5460), 2007-10.
- Scanlin, T. F. and Glick, M. C. "Terminal glycosylation in cystic fibrosis." *Biochim Biophys Acta*, **1999**, *1455* (2-3), 241-53.
- Scanlin, T. F., Wang, Y. M. and Glick, M. C. "Altered fucosylation of membrane glycoproteins from cystic fibrosis fibroblasts." *Pediatr Res*, **1985**, *19* (4), 368-74.
- Schachter, H. "Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides." *Biochem Cell Biol*, **1986**, *64* (3), 163-81.
- Schachter, H. "Congenital disorders involving defective N-glycosylation of proteins." *Cell Mol Life Sci*, **2001**, *58* (8), 1085-104.
- Schaffer, C., Graninger, M. and Messner, P. "Prokaryotic glycosylation." *Proteomics*, **2001**, *1* (2), 248-61.
- Schaffer, C., Wugeditsch, T., Neuninger, C. and Messner, P. "Are S-layer glycoproteins and lipopolysaccharides related?" *Microb Drug Resist*, **1996**, *2* (1), 17-23.
- Schauer, R. "Achievements and challenges of sialic acid research." *Glycoconj J*, **2000**, *17* (7-9), 485-99.

I Literaturverzeichnis

- Schenkman, S., Jiang, M. S., Hart, G. W. and Nussenzweig, V. "A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells." *Cell*, **1991**, 65 (7), 1117-25.
- Schmidt, C., Stehling, P., Schnitzer, J., Reutter, W. and Horstkorte, R. "Biochemical engineering of neural cell surfaces by the synthetic *N*-propanoyl-substituted neuraminic acid precursor." *J Biol Chem*, **1998**, 273 (30), 19146-52.
- Schumacher, T. "Expression, Isolierung und Charakterisierung eines rekombinanten, humanen b1-4-Galactosyltransferase-Fusionsproteins aus *Escherichia coli*", Diplomarbeit, HHU Düsseldorf., **1999**.
- Schwientek, T., Almeida, R., Levery, S. B., Holmes, E. H., Bennett, E. and Clausen, H. "Cloning of a novel member of the UDP-galactose:beta-*N*-acetylglucosamine beta1,4-galactosyltransferase family, beta4Gal-T4, involved in glycosphingolipid biosynthesis." *J Biol Chem*, **1998**, 273 (45), 29331-40.
- Sears, P. and Wong, C. H. "Enzyme action in glycoprotein synthesis." *Cell Mol Life Sci*, **1998**, 54 (3), 223-52.
- Shi, X. and Elliott, R. M. "Analysis of *N*-linked glycosylation of hantaan virus glycoproteins and the role of oligosaccharide side chains in protein folding and intracellular trafficking." *J Virol*, **2004**, 78 (10), 5414-22.
- Shikata, K., Yasuda, T., Takeuchi, F., Konishi, T., Nakata, M. and Mizuochi, T. "Structural changes in the oligosaccharide moiety of human IgG with aging." *Glycoconj J*, **1998**, 15 (7), 683-9.
- Shmanai, V. V., Nikolayeva, T. A., Vinokurova, L. G. and Litoshka, A. A. "Oriented antibody immobilization to polystyrene macrocarriers for immunoassay modified with hydrazide derivatives of poly(meth)acrylic acid." *BMC Biotechnol*, **2001**, 1 (1), 4.
- Silberstein, S. and Gilmore, R. "Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase." *FASEB J*, **1996**, 10 (8), 849-58.
- Smith, M. M., Schlesinger, S., Lindstrom, J. and Merlie, J. P. "The effects of inhibiting oligosaccharide trimming by 1-deoxynojirimycin on the nicotinic acetylcholine receptor." *J Biol Chem*, **1986**, 261 (31), 14825-32.
- Soltys, A. I., Axford, J. S. and Sutton, B. J. "Rheumatoid factors: where are we now?" *Ann Rheum Dis*, **1997**, 56 (5), 285-6.
- Soltys, A. J., Hay, F. C., Bond, A., Axford, J. S., Jones, M. G., Randen, I., Thompson, K. M. and Natvig, J. B. "The binding of synovial tissue-derived human monoclonal immunoglobulin M rheumatoid factor to immunoglobulin G preparations of differing galactose content." *Scand J Immunol*, **1994**, 40 (2), 135-43.
- Sprenger, S. and König, H. "Evidence for the occurrence of nucleotide-activated oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae*." *Can J Microbiol*, **2000**, 46 (5), 490-3.
- Srivastava, G., Kaur, K. J., Hindsgaul, O. and Palcic, M. M. "Enzymatic transfer of a preassembled trisaccharide antigen to cell surfaces using a fucosyltransferase." *J Biol Chem*, **1992**, 267 (31), 22356-61.
- Sun, L., Bulter, T., Alcalde, M., Petrounia, I. P. and Arnold, F. H. "Modification of galactose oxidase to introduce glucose 6-oxidase activity." *Chembiochem*, **2002**, 3 (8), 781-3.
- Sutton, B. J., Corper, A. L., Sohi, M. K., Jefferis, R., Beale, D. and Taussig, M. J. "The structure of a human rheumatoid factor bound to IgG Fc." *Adv Exp Med Biol*, **1998**, 435, 41-50.
- Ten Hagen, K. G., Fritz, T. A. and Tabak, L. A. "All in the family: the UDP-GalNAc:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferases." *Glycobiology*, **2003**, 13 (1), 1R-16R.

I Literaturverzeichnis

- Tetta, C., Camussi, G., Modena, V., Di Vittorio, C. and Baglioni, C. "Tumour necrosis factor in serum and synovial fluid of patients with active and severe rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis*, **1990**, *49* (9), 665-7.
- Tsuji, S. "Molecular cloning and functional analysis of sialyltransferases." *J Biochem (Tokyo)*, **1996**, *120* (1), 1-13.
- Ujita, M., McAuliffe, J., Schwientek, T., Almeida, R., Hindsgaul, O., Clausen, H. and Fukuda, M. "Synthesis of poly-*N*-acetylglucosamine in core 2 branched O-glycans. The requirement of novel beta-1,4-galactosyltransferase IV and beta-1,3-n-acetylglucosaminyltransferase." *J Biol Chem*, **1998**, *273* (52), 34843-9.
- Ujita, M., McAuliffe, J., Suzuki, M., Hindsgaul, O., Clausen, H., Fukuda, M. N. and Fukuda, M. "Regulation of I-branched poly-*N*-acetylglucosamine synthesis. Concerted actions by I-extension enzyme, I-branching enzyme, and beta1,4-galactosyltransferase I." *J Biol Chem*, **1999**, *274* (14), 9296-304.
- Upreti, R. K., Kumar, M. and Shankar, V. "Bacterial glycoproteins: functions, biosynthesis and applications." *Proteomics*, **2003**, *3* (4), 363-79.
- van den Eijnden, D. H., Joziase, D. H., Dorland, L., van Halbeek, H., Vliegthart, J. F. and Schmid, K. "Specificity in the enzymic transfer of sialic acid to the oligosaccharide branches of b1- and triantennary glycopeptides of alpha 1-acid glycoprotein." *Biochem Biophys Res Commun*, **1980**, *92* (3), 839-45.
- Van den Steen, P., Rudd, P. M., Dwek, R. A. and Opdenakker, G. "Concepts and principles of O-linked glycosylation." *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **1998**, *33* (3), 151-208.
- van Heijenoort, J. "Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan." *Glycobiology*, **2001**, *11* (3), 25R-36R.
- Varki, A. "Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct." *Glycobiology*, **1993**, *3* (2), 97-130.
- Vincent, C., Nogueira, L., Sebbag, M., Chapuy-Regaud, S., Arnaud, M., Letourneur, O., Rolland, D., Fournie, B., Cantagrel, A., Jolivet, M. and Serre, G. "Detection of antibodies to deiminated recombinant rat filaggrin by enzyme-linked immunosorbent assay: a highly effective test for the diagnosis of rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum*, **2002**, *46* (8), 2051-8.
- Vocadlo, D. J., Hang, H. C., Kim, E. J., Hanover, J. A. and Bertozzi, C. R. "A chemical approach for identifying O-GlcNAc-modified proteins in cells." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2003**, *100* (16), 9116-21.
- Wandall, H. H., Hassan, H., Mirgorodskaya, E., Kristensen, A. K., Roepstorff, P., Bennett, E. P., Nielsen, P. A., Hollingsworth, M. A., Burchell, J., Taylor-Papadimitriou, J. and Clausen, H. "Substrate specificities of three members of the human UDP-*N*-acetyl-alpha-D-galactosamine:Polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase family, GalNAc-T1, -T2, and -T3." *J Biol Chem*, **1997**, *272* (38), 23503-14.
- Wang, Y. M., Hare, T. R., Won, B., Stowell, C. P., Scanlin, T. F., Glick, M. C., Hard, K., van Kuik, J. A. and Vliegthart, J. F. "Additional fucosyl residues on membrane glycoproteins but not a secreted glycoprotein from cystic fibrosis fibroblasts." *Clin Chim Acta*, **1990**, *188* (3), 193-210.
- Weingarten, S., Thiem J. "Facile Formation of Novel Carbohydrate-Amino Acid conjugates by Reductive Amination." *Synlett*, **2003**, *15* (7), 1052-1054.
- Whittaker, M. M. and Whittaker, J. W. "Expression of recombinant galactose oxidase by *Pichia pastoris*." *Protein Expr Purif*, **2000**, *20* (1), 105-11.
- Wilchek, M. and Bayer, E. A. "Labeling glycoconjugates with hydrazide reagents." *Meth Enzymol*, **1987**, *138*, 429-42.

I Literaturverzeichnis

- Wolf, M. F., Ludwig, A., Fritz, P. and Schumacher, K. "Increased expression of Thomsen-Friedenreich antigens during tumor progression in breast cancer patients." *Tumour Biol*, **1988**, 9 (4), 190-4.
- Yarema, K. J., Goon, S. and Bertozzi, C. R. "Metabolic selection of glycosylation defects in human cells." *Nat Biotechnol*, **2001**, 19 (6), 553-8.
- Yethon, J. A. and Whitfield, C. "Lipopolysaccharide as a target for the development of novel therapeutics in gram-negative bacteria." *Curr Drug Targets Infect Disord*, **2001**, 1 (2), 91-106.
- Young, J. D. and Cohn, Z. A. "How killer cells kill." *Sci Am*, **1988**, 258 (1), 38-44.
- Zervosen, A. and Elling, L. "A novel three-enzyme reaction cycle for the synthesis of *N*-acetylglucosamine with in situ regeneration of uridine 5'-diphosphate glucose and uridine 5'-diphosphate galactose." *J Am Chem Soc*, **1998**, 118, 1836-1840.
- Zervosen, A., Nieder, V., Gallego, R. G., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F. and Elling, L. "Synthesis of nucleotide-activated oligosaccharides by beta-galactosidase from *Bacillus circulans*." *Biol Chem*, **2001**, 382 (2), 299-311.
- Zervosen, A., Stein, A., Adrian, H. and Elling, L. "Combined enzymatic synthesis of nucleotide (desoxy) sugars from sucrose and nucleotide monophosphates." *Tetrahedron Asymm*, **1996**, 52, 2395-2404.
- Zhang, J. H., Dawes, G. and Stemmer, W. P. "Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1997**, 94 (9), 4504.

J Anhang

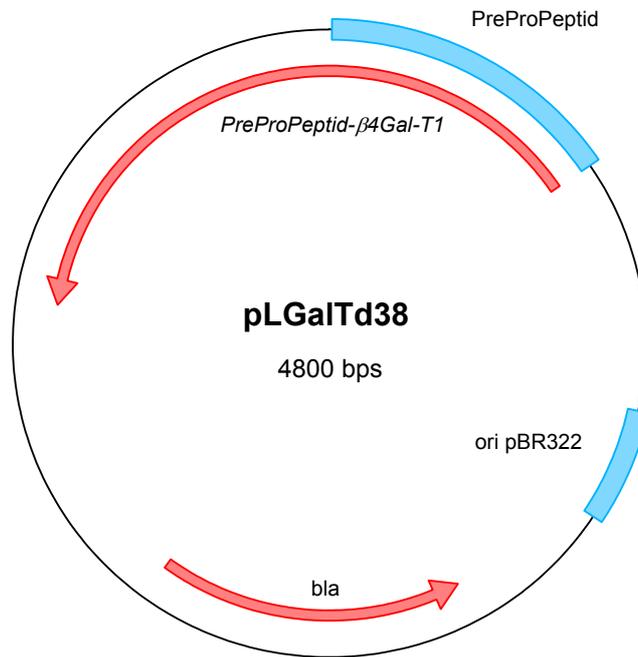


Abbildung 106: Vektorkarte des Plasmids pLGalTΔ38.

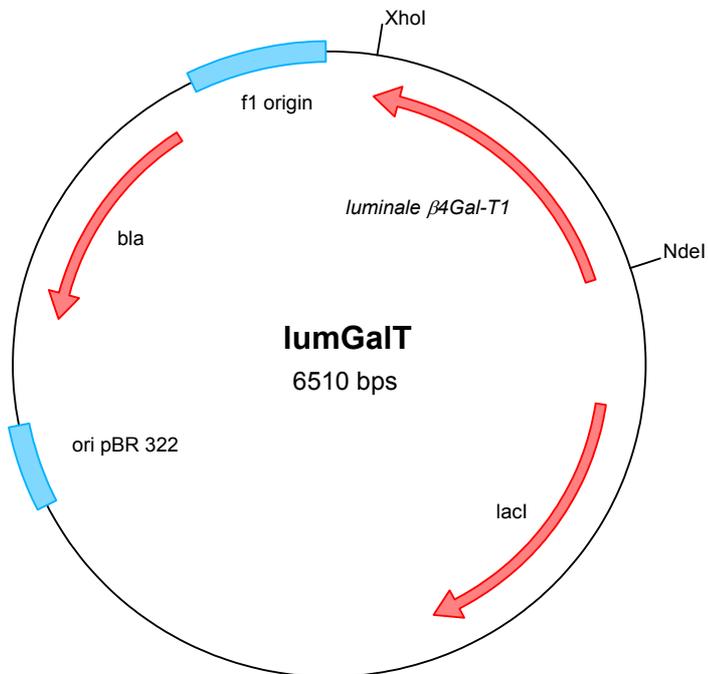


Abbildung 107: Vektorkarte des Plasmids lumGalT.

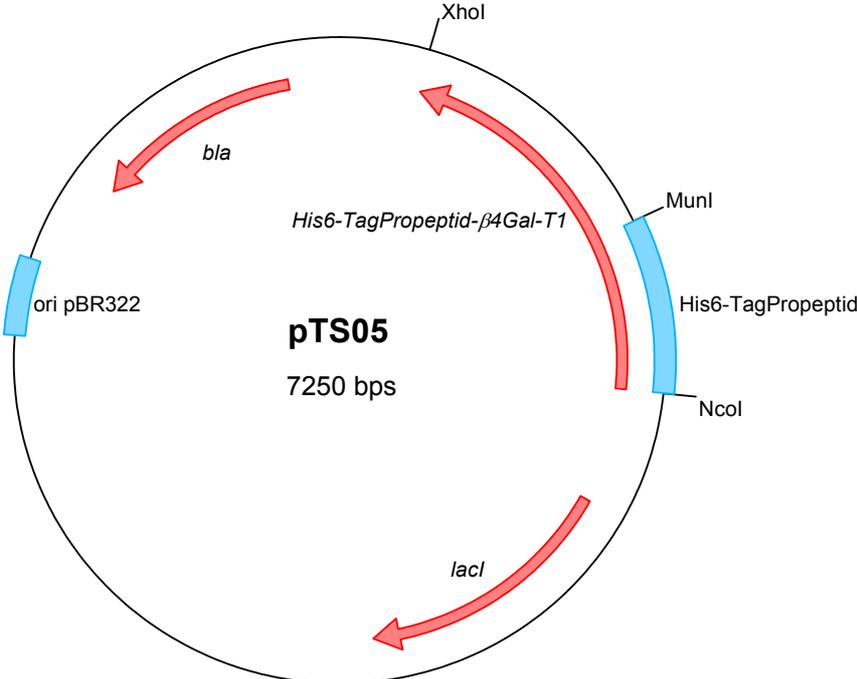


Abbildung 108: Vektorkarte des Plasmids pTS05.

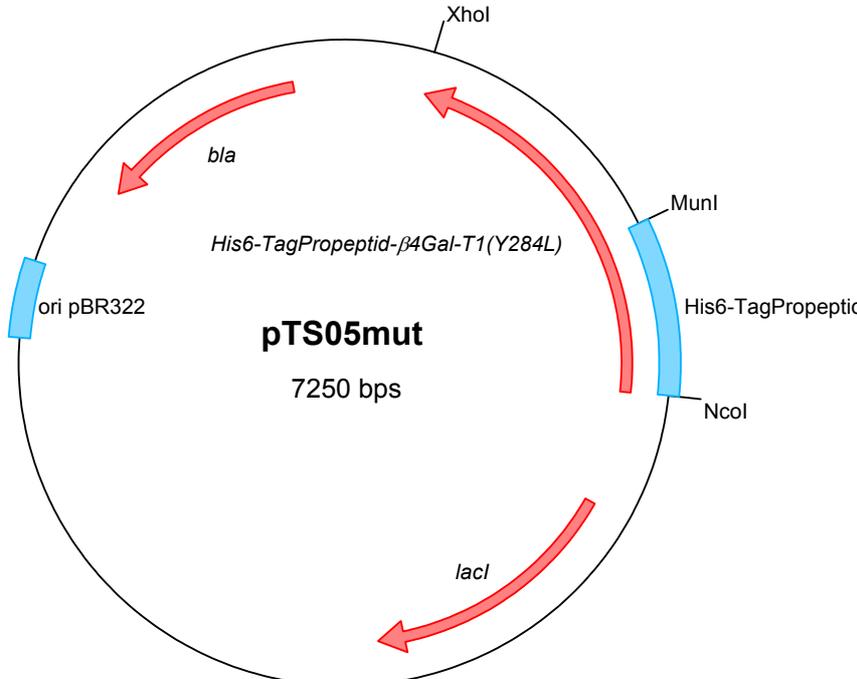


Abbildung 109: Vektorkarte des Plasmids pTS05mut.

J Anhang

ATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGATCGACCTGC
AGCAGACTACTTTTAAACTCGCCGTGGCGGGAATCTACTTTTACTTTTGAAGGGA
CTGGTTTAATGAAAGAAACAAAACATCAACACACATTTTCTATCCGTAAGTCGGC
TTATGGTGCCGCGTCGGTTATGGTCGCATCATGTATATTTGTCATCGGTGGGGGCG
TGGCAGAGGCAAATGATTTCGACAACACAAACAACGACACCACTAGAAAGTCGCTC
AAACGTCGCAGCAAGAAACACATACACATCAAACACCTGTTACATCATTACATAC
TGCAACACCTGAACATGTTGATGACTCTAAAGAAGCAACACCTTTACCTGAAAAA
GCAGAGTCACCAAAAACCGAAGTGACAGTTCAACCTTCATCGCATAACAGGAA
GTACCTGCGTTACATAAAAAAACACAGCAACAACCGGCGTATAAGGATAAAACG
GTACCAGAGTCAACGATAGCATCAAAGTCGGTTGAATCAAATAAAGCAACAGAA
AATGAGATGTCACCTGTTGAACATCATGCTTCAAATGTGGAAAAACGTGAAGATA
GATTGGAGACTAATGAGACAACACCGCCATCAGTGGACCGTGAATTTAGCCATA
AAATCATCAATAATGCGCACGTAAATCCAAAAACGGATGGACAAACAAACGTTA
ATGTTGATACGAAAACGATAGACACCGTTTCACCGAAAGATGACAGAATAGATA
CGGCGCAACCGAAACAAGTCGACGCTCCTAAAGAAAATACAACGGCACAAAATA
AATTTACATCACAAGCGAGCGACAAAAAACCATACCTTGGCGTCACCCTCGTTTA
CTACCTGGCTGGCCGCGACCTGAGCCGCCTGCCCAACTGGTCGGAGTCTCCACA
CCGCTGCAGGGCGGCTCGAACAGTGCCGCCGCCATCGGGCAGTCCTCCGGGGAG
CTCCGGACCGGAGGGGGCCCGGCCGCCCTCCTCTAGGGCGCCTCCTCCCAGCCGC
GCCCGGGTGGCGACTCCAGCCCAGTCGTGGATTCTGGCCCTGGCCCCGCTAGCAA
CTTGACCTCGGTCCCAGTGCCCCACACCACCGCACTGTCGCTGCCCGCCTGCCCTG
AGGAGTCCCCGCTGCTTGTGGGCCCCATGCTGATTGAGTTTAAACATGCCTGTGGA
CCTGGAGCTCGTGGCAAAGCAGAACCCAAATGTGAAGATGGGCGGCGCCTATGC
CCCCAGGGACTGCGTCTCTCCTCACAAGGTGGCCATCATCATTCCATTCCGCAAC
CGGCAGGAGCACCTCAAGTACTGGCTATATTATTTGCACCCAGTCCTGCAGCGCC
AGCAGCTGGACTATGGCATCTATGTTATCAACCAGGCGGGAGACACTATATTCAA
TCGTGCTAAGCTCCTCAATGTTGGCTTTCAAGAAGCCTTGAAGGACTATGACTAC
ACCTGCTTTGTGTTTAGTGACGTGGACCTCATTCCAATGAATGACCATAATGCGTA
CAGGTGTTTTTACAGCCACGGCACATTTCCGTTGCAATGGATAAGTTTGGATTCA
GCCTACCTTATGTTTCAAGTATTTTGGAGGTGTCTCTGCTCTAAGTAAACAACAGTTT
CTAACCATCAATGGATTTCTAATAATTATTGGGGCTGGGGAGGAGAAGATGATG
ACATTTTTAACAGATTAGTTTTTAGAGGCATGTCTATATCTCGCCAAATGCTGTG
GTCGGGAGGTGTCGCATGATCCGCCACTCAAGAGACAAGAAAAATGAACCCAAT
CCTCAGAGGTTTGACCGAATTGCACACACAAAGGAGACAATGCTCTCTGATGGTT
TGAACACTACTCACCTACCAGGTGCTGGATGTACAGAGATAACCCATTGTATACCA
AATCACAGTGGACATCGGGACACCGAGCTAGCGTTTTCCCGAATTCGATATCAAG
CTTGCA

Abbildung 110: Sequenz des Gens der freien β 4Gal-T1.

J Anhang

GAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGA
AGGAGATATACATATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTC
CTCGCTGCCAGCCGGCGATGGCCATGGACCTGAGCCGCCTGCCCCAACTGGTCCG
GAGTCTCCACACCGCTGCAGGGCGGCTCGAACAGTGCCGCCGCCATCGGGCAGTC
CTCCGGGGAGCTCCGGACCGGAGGGGCCCGGCCGCCCTCCTCTAGGGCGCCTCC
TCCCAGCCGCGCCCCGGGTGGCGACTCCAGCCCAGTCGTGGATTCTGGCCCTGGCC
CCGCTAGCAACTTGACCTCGGTCCAGTGCCCCACACCACCGCACTGTCGCTGCC
CGCCTGCCCTGAGGAGTCCCCGCTGCTTGTGGGGCCCCATGCTGATTGAGTTTAAAC
ATGCCTGTGGACCTGGAGCTCGTGGCAAAGCAGAACCCAAATGTGAAGATGGGC
GGCCGCTATGCCCCCAGGGACTGCGTCTCTCCTCACAAGGTGGCCATCATCATT
CATTCCGCAACCGGCAGGAGCACCTCAAGTACTGGCTATATTATTTGCACCCAGT
CCTGCAGCGCCAGCAGCTGGACTATGGCATCTATGTTATCGACCAGGCGGGAGAC
ACTATATTCAATCGTGCTAAGCTCCTCAATGTTGGCTTTCAAGAAGCCTTGAAGG
ACTATGACTACACCTGCTTTGTGTTTAGTGACGTGGACCTCATTCCAATGAATGAC
CATAATGCGTACAGGTGTTTTTACAGCCACGGCACATTTCCGTTGCAATGGATA
AGTTTGGATTACAGCTACCTTATGTTTCAAGTATTTTGGAGGTGTCTCTGCTCTAAGT
AAACAACAGTTTCTAACCATCAATGGATTTCTAATAATTATTGGGGCTGGGGAG
GAGAAGATGATGACATTTTTAACAGATTAGTTTTTAGAGGCATGTCTATATCTCG
CCCAAATGCTGTGGTTCGGGAGGTGTCGCATGATCCGCCACTCAAGAGACAAGAA
AAATGAACCCAATCCTCAGAGGTTTGACCGAATTGCACACACAAAGGAGACAAT
GCTCTCTGATGGTTTGAACCTCACTCACCTACCAGGTGCTGGATGTACAGAGATAC
CCATTGTATACCCAAATCACAGTGGACATCGGGACACCGAGCTAGCCGCTCGAGC
ACCACCACCACCACCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCCGAAAGGAAGCTG
AGTTGGCTGCTGCCAC

Abbildung 111: Sequenz des Gens der luminalen β 4Gal-T1.

GAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGA
AGGAGATATACCATGGGCCATCATCATCATCATAATGATTTCGACAACACAAA
CAACGACACCACTGGAAGTCGCTCAAACGTCGCAGCAAGAAACACATACACATC
AAACACCTGTTACATCATTACATACTGCAACACCTGAACATGTTGATGACTCTAA
AGAAGCAACACCTTTACCTGAAAAAGCAGAGTCACCAAAAACCGAAGTGACAGT
TCAACCTTCATCGCATAACAGGAAGTACCTGCGTTACATAAAAAAACACAGCAA
CAACCGGCGTATAAGGATAAAACGGTACCAGAGTCAACGATAGCATCAAAGTCG
GTTGAATCAAATAAAGCAACAGAAAATGAGATGTCACCTGTTGAACATCATGCTT
CAAATGTGGAAAAACGTGAAGATAGATTGGAGACTAATGAGACAACACCGCCAT
CAGTGGACCGTGAATTTAGCCATAAAATCATCAATAATGCGCACGTAAATCCAAA
AACGGATGGACAAACAAACGTTAATGTTGATACGAAAACGATAGACACCGTTTC
ACCGAAAGATGACAGAATAGATACGGCGCAACCGAAACAAGTCGACGCTCCTAA
AGAAAATACAACGGCACAAAATAAATTTACATCACAAGCGAGCCAATTGCGGAC
CGGAGGGGGCCCGGCCGCCCTCCTCTAGGGCGCCTCCTCCCAGCCGCGCCCGGGT
GGCGACTCCAGCCCAGTCGTGGATTCTGGCCCTGGCCCCGCTAGCAACTTGACCT
CGGTCCCAGTGCCCCACACCACCGCACTGTCGCTGCCCGCCTGCCCTGAGGAGTC
CCCCTGCTTGTGGGGCCCCATGCTGATTGAGTTTAAACATGCCTGTGGACCTGGAG
CTCGTGGCAAAGCAGAACCCAAATGTGAAGATGGGCGGCCGCTATGCCCCCAGG
GACTGCGTCTCTCCTCACAAGGTGGCCATCATCATTCCATTCCGCAACCGGCAGG
AGCACCTCAAGTACTGGCTATATTATTTGCACCCAGTCCTGCAGCGCCAGCAGCT
GGACTATGGCGTCTATGTTATCAACCAGGCGGGAGACACTATATTCAATCGTGCT

J Anhang

AAGCTCCTCAATGTTGGCTTTCAAGAAGCCTTGAAGGACTATGACTACACCTGCT
TTGTGTTTAGTGACGTGGACCTCATTCCAATGAATGACCATAATGCGTACAGGTG
TTTTTCACAGCCACGGCACATTTCCGTTGCAATGGATAAGTTTGGATTACAGCCTAC
CTTATGTTTCAGTATTTTGGAGGTGTCTCTGCTCTAAGTAAACAACAGTTTCTAACC
ATCAATGGATTTCCCTAATAATTATTGGGGCTGGGGAGGAGAAGATGATGACATTT
TTAACAGATTAGTTTTTAGAGGCATGTCTATATCTCGCCCAAATGCTGTGGTTCGGG
AGGTGTCGCATGATCCGCCACTCAAGAGACAAGAAAAATGAACCCAATCCTCAG
AGGTTTGACCGAATTGCACACACAAAGGAGACAATGCTCTCTGATGGTTTGAAC
CACTCACCTACCAGGTGCTGGATGTACAGAGATAACCCATTGTATAACCCAAATCAC
AGTGGACATCGGGACACCGAGCTAGCCGCTCGAGGATCCGGCTGCTAACAAAGC
CCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCC

Abbildung 112: Sequenz des Gens der His₆-TagPropetid-β4Gal-T1.

GAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGA
AGGAGATATACCATGGGCCATCATCATCATCATAATGATTTCGACAACACAAA
CAACGACACCACTGGAAGTCGCTCAAACGTCGCAGCAAGAAACACATACACATC
AAACACCTGTTACATCATTACATACTGCAACACCTGAACATGTTGATGACTCTAA
AGAAGCAACACCTTTACCTGAAAAAGCAGAGTCACCAAAAACCGAAGTGACAGT
TCAACCTTCATCGCATACACAGGAAGTACCTGCGTTACATAAAAAAACACAGCAA
CAACCGGCGTATAAGGATAAAACGGTACCAGAGTCAACGATAGCATCAAAGTCG
GTTGAATCAAATAAAGCAACAGAAAATGAGATGTCACCTGTTGAACATCATGCTT
CAAATGTGGAAAAACGTGAAGATAGATTGGAGACTAATGAGACAACACCGCCAT
CAGTGGACCGTGAATTTAGCCATAAAATCATCAATAATGCGCACGTAAATCCAAA
AACGGATGGACAAACAAACGTTAATGTTGATACGAAAACGATAGACACCGTTTC
ACCGAAAGATGACAGAATAGATACGGCGCAACCGAAACAAGTCGACGCTCCTAA
AGAAAATACAACGGCACAAAATAAATTTACATCACAAGCGAGCCAATTGCGGAC
CGGAGGGGGCCCGGCCGCGCCTCCTCTAGGCGCCTCCTCCCAGCCGCGCCCGGGT
GGCGACTCCAGCCCAGTCGTGGATTCTGGCCCTGGCCCCGCTAGCAACTTGGCCT
CGGTCCCAGTGCCCCACACCACCGCACTGTCGCTGCCCCGCTGCCCTGAGGAGTC
CCCCTGCTTGTGGGCCCCATGCTGATTGAGTTTAAACATGCCTGTGGACCTGGAG
CTCGTGGCAAAGCAGAACCCAAACGTGAAGATGGGCGGCCGCTATGCCCCCAGG
GACTGCGTCTCTCCTCACAAGGTGGCCATCATCATTCCATTCCGCAACCGGCAGG
AACACCTCAAGTACTGGCTATATTATTTGCACCCAGTCCTGCAGCGCCAGCAGCT
GGACTATGGCGTCTATGTTATCAACCAGGCGGGAGACACTATATTCAATCGTGCT
AAGCTCCTCAATGTTGGCTTTCAAGAAGCCTTGAAGGACTATGACTACACCTGCT
TTGTGTTTAGTGACGTGGACCTCATTCCAATGAATGACCATAATGCGTACAGGTG
TTTTTCACAGCCACGGCACATTTCCGTTGCAATGGATAAGTTTGGATTACAGCCTAC
CTTATGTTTCAGCTGTTTGGAGGTGTCTCTGCTCTAAGTAAACAACAGTTTCTAACC
ATCAATGGATTTCCCTAATAATTATTGGGGCTGGGGAGGAGAAGATGATGACATTT
TTAACAGATTAGTTTTTAGAGGCATGTCTATATCTCGCCCAAATGCTGTGGTTCGGG
AGGTGTCGCATGATCCGCCACTCAAGAGACAAGAAAAATGAACCCAATCCTCAG
AGGTTTGACCGAATTGCACACACAAAGGAGACAATGCTCTCTGATGGTTTGAAC
CACTCACCTACCAGGTGCTGGATGTACAGAGATAACCCATTGTATAACCCAAATCAC
AGTGGACATCGGGACACCGAGCTAGCCGCTCGAGGATCCGGCTGCTAACAAAGC
CCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCAC

Abbildung 113: Sequenz des Gens der His₆-TagPropetid-β4Gal-T1(Y284L).

Darius-Jean Namdjou
Korneliusmarkt 30
52076 Aachen
Tel.: (02408) 95 78 54
e-mail: d.j.namdjou@biotec.rwth-aachen.de

Lebenslauf

Persönliche Daten

geb. am 11.02.1975 in Köln
Familienstand: verheiratet

13.06.1994 Abitur, Gymnasium Sedanstraße, Wuppertal

Studium/Promotion

10/1994 - 04/2000 Diplomstudiengang Chemie an der Friedrich-Wilhelm-
Universität Bonn
Diplomarbeit: Thema „Chemoenzymatische Synthese von
UDP- α -D-galactosederivaten als Substrate für
Galactosyltransferasen“

13.04.2000 Diplom-Chemiker
seit 09/2000 Doktorarbeit: Thema „Selektive Markierung von
Glykokonjugaten mit modifizierten Nukleotidzuckern als
Donorsubstrate von rekombinanten Glykosyltransferasen“
(DFG-Stipendium), begonnen im Institut für
Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf,
seit Februar 2002 fortgesetzt am Lehrstuhl für Biotechnologie
der RWTH Aachen, Leitung: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Lothar
Elling

12.04.06 Erfolgreich bestandene Promotionsprüfung