

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	IX
Symbole und Abkürzungen	XI
1 Einleitung	1
1.1 Stellung und Vielfalt der Kohlenhydrate in der Natur	2
1.2 Oligosaccharide in Erkennungsprozessen	4
1.3 Die Bedeutung fucosylierter Strukturen	6
1.3.1 Das AB0 Blutgruppensystem	7
1.3.2 <i>Helicobacter pylori</i> und <i>Lewis</i> -Strukturen	8
1.3.3 Modifizierte Fucosylierung und Krankheiten	9
1.3.4 Humanmilch-Oligosaccharide	11
1.4 Enzymatischer Zugang zu fucosylierten Oligosacchariden	13
1.4.1 Die Bedeutung der Nucleotidzucker: der <i>Leloir pathway</i>	13
1.4.2 GDP- β -L-Fucose: der Donor	14
1.4.3 Fucosyltransferasen: die Katalysatoren	19
2 Motivation und Zielsetzung	21
2.1 Bioreaktionstechnik der GDP-Fuc-Synthese	21
2.2 Fucosylierung durch <i>in situ</i> Generierung von GDP-Fuc	22
3 Analytische Methoden	25
3.1 Das Reaktionssystem aus analytischer Sicht	25
3.2 Genetische Algorithmen zur Methodenentwicklung	28
3.2.1 Die Kapillarelektrophorese (CE)	28
3.2.2 Anwendung des genetischen Algorithmus	29
3.2.3 Ergebnisse der Optimierung	34
3.2.4 Einsatz von Ionenpaar-Reagenzien	38
3.3 Einsatz der HPLC	40
3.3.1 Analytik der Nucleotidzucker	40
3.3.2 Analytik von Oligosacchariden	41
3.4 Zusammenfassung	41
4 Bereitstellung der Enzyme GMD und GFS und einer α1,2-Fucosyltransferase	43
4.1 Gewinnung der GDP- α -D-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD)	43
4.1.1 Fermentation von <i>E. coli</i> BL21(DE3) pET17b/gmd	44
4.1.2 Partielle Aufreinigung der GMD	44

4.2	Gewinnung der GDP- β -L-Fucose-Synthetase (GFS)	48
4.2.1	Fermentation von <i>E. coli</i> BL21(DE3) pET16b/wcaG	49
4.2.2	Partielle Aufreinigung der GFS	50
4.3	Gewinnung der α 1,2-Fucosyltransferase (α 1,2FucT)	52
4.3.1	Fermentation von <i>E. coli</i> DH5 α PHPFT80	53
4.3.2	Partielle Aufreinigung der α 1,2FucT	54
4.4	Zusammenfassung	56
5	Kinetische Untersuchungen der enzymatischen GDP-Fuc-Synthese	57
5.1	Kinetische Modelle enzymatischer Reaktionen	58
5.2	Die GMD-Reaktion	60
5.2.1	Kinetische Untersuchungen zur GMD	62
5.2.1.1	Einfluss von Temperatur und pH-Wert	62
5.2.1.2	Einfluss der Nicotinamidcofaktoren NADP und NADPH	65
5.2.1.3	Einfluss von Substrat- und Produktkonzentration	79
5.2.1.4	Einfluss von GDP-Fuc	80
5.2.2	Kinetisches Modell der Cofaktor-abhängigen GMD-Aktivierung	81
5.3	Die GFS-Reaktion	95
5.3.1	Bereitstellung von GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose (GKDM)	97
5.3.2	Kinetische Untersuchungen zur GFS	101
5.3.2.1	Einfluss von Temperatur und pH-Wert	102
5.3.2.2	Einfluss von Substrat- und Produktkonzentration	103
5.3.2.3	Verifizierung des Modells - <i>batch</i> -Versuche	106
5.3.3	Integrierte Cofaktorregenerierung	107
5.4	Zusammenfassung	109
6	Syntheseverfahren zur Gewinnung von GDP-Fuc	111
6.1	Stabilitätsmessungen	111
6.1.1	Enzymstabilitäten	111
6.1.2	Substrat- und Produktstabilitäten	114
6.2	Konsequenzen aus der Enzymkinetik	115
6.3	Anforderungen an Synthese- und Reaktorkonzepte	116
6.4	Diskontinuierliche Synthese von GDP-Fuc	118
6.5	Kontinuierliche Synthese von GDP-Fuc	120
6.6	Produktsolierung	129
6.7	Zusammenfassung	133
7	Synthese fucosylierter Oligosaccharide durch <i>in situ</i> Generierung von GDP-Fuc	135
7.1	Substratspezifität der α 1,2FucT aus <i>H. pylori</i>	136
7.2	Kopplung von GDP-Fuc-Synthese und Fucosyltransfer im Satzreaktor	139
7.3	Zusammenfassung	142
8	Diskussion und Ausblick	145
8.1	Entwicklung analytischer Methoden	145
8.1.1	CE-Methodenentwicklung mit genetischen Algorithmen	145
8.1.2	GMD Aktivitätsassay	145
8.2	Enzymgewinnung	146

8.2.1	Fermentation der rekombinanten <i>E. coli</i> -Stämme	146
8.2.2	Enzymaufreinigung	147
8.3	Enzymkinetik	149
8.3.1	Kinetik der GDP- α -D-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD)	149
8.3.2	NMR-Untersuchungen zum GMD-Reaktionsmechanismus	151
8.3.3	Kinetik der GDP- β -L-Fucose-Synthetase (GFS)	154
8.4	Syntheseverfahren zur Gewinnung von GDP-Fuc	157
8.4.1	Evaluierung der Verfahren	157
8.4.2	Die NADPH-verbrauchende GMD-Nebenreaktion	159
8.4.3	Optimierungspotentiale	161
8.5	Enzymatische Synthese fucosylierter Oligosaccharide	166
9	Zusammenfassung	169
10	Material und Methoden	171
10.1	Analytik	171
10.1.1	Kapillarelektrophorese (CE)	171
10.1.2	HPLC-Systeme	173
10.1.3	Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS)	177
10.1.4	NMR-Spektroskopie	178
10.2	Bereitstellung der Enzyme	178
10.2.1	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	178
10.2.2	Fermentation rekombinanter <i>Escherichia coli</i> -Stämme	178
10.2.3	Zellernte und Zellaufschluss	179
10.2.4	Chromatographische Aufreinigung und Ultrafiltration (UF)	179
10.2.5	Protein-Analytik	183
10.3	Enzymatische Assays	183
10.3.1	GMD-Assay	183
10.3.2	GFS-Assay	184
10.3.3	FucT-Assay	184
10.4	Synthesevorschriften	185
10.4.1	Produktion von GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose	185
10.4.2	Produktion von GDP- β -L-Fucose	185
10.5	Massenspektrometrische Daten	186
10.5.1	GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose	186
10.6	NMR-spektroskopische Daten	187
10.6.1	GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose	187
10.6.2	GDP- β -L-Fucose	190
10.7	Verwendete Enzyme, Chemikalien und Geräte	192
10.8	SCIENTIST Software	192
	Literaturverzeichnis	195