

# **Entwicklung eines neuartigen enzymatischen Verfahrens zur Herstellung von Oligosacchariden sowie zur Glykosylierung von Naturstoffen**

**Az 13103**

Klaus Buchholz, Prof. Dr., Technische Universität Braunschweig, Technische Chemie  
Abteilung für Technologie der Kohlenhydrate


Jürgen Seibel, Dr., Technische Universität Braunschweig, Technische Chemie- Abteilung  
für Technologie der Kohlenhydrate

Andreas Vente, Dr, Katrin Welzel, Dipl.-Ing., Combinature Biopharm AG

Shukrallah Na'amnieh, Dr., X-Zyme GmbH

**Projektlaufzeit: 1. Juli 2003- 31. Juni 2005**

**Braunschweig, 2006**

|   |                   |  |                 |   |                  |
|---|-------------------|--|-----------------|---|------------------|
| 10/01<br><b>1. Projektkennblatt</b>   |                   | der<br><b>Deutschen Bundesstiftung Umwelt</b>  |                 | <br>Deutsche Bundesstiftung Umwelt |                  |
| Az  | <b>13103</b>      | Referat  | <b>32</b>       | Fördersumme   | <b>250.000 €</b> |
| <b>Antragstitel</b>   |                   | <b>Förderschwerpunkt Biotechnologie: ICBio: Entwicklung eines neuartigen enzymatischen Verfahrens zur Herstellung von Oligosacchariden sowie zur Glykosylierung von Naturstoffen</b> |                 |   |                  |
| <b>Stichworte</b>   |                   | Schwerpunkt-Biotechnologie, Mikrobiologie, Umweltchemikalien, Verfahren  |                 |   |                  |
| Laufzeit  | Projektbeginn     | Projektende  | Projektphase(n) |   |                  |
| <b>2 Jahre</b>  | <b>01.07.2003</b> | <b>31.06.2005</b>  | <b>2</b>        |   |                  |
| Zwischenberichte  | Nach 18 Monaten   |  |                 |   |                  |
| <b>Bewilligungsempfänger</b>  |                   | Technische Universität Braunschweig<br>Technische Chemie<br>Abt. Technologie der Kohlenhydrate<br>Hans-Sommer Str. 10<br><br>380106 Braunschweig                                     |                 | Tel 0531-3917263<br>Fax 0531-3915357<br>Projektleitung<br>Herr Prof. Dr. Buchholz<br>Bearbeiter                       |                  |
| <b>Kooperationspartner</b>  |                   | - X-Zyme GmbH, Düsseldorf<br>- Combinature Biopharm AG, Berlin   |                 |   |                  |
| <p><b><i>Zielsetzung und Anlaß des Vorhabens</i></b></p> <p>Das vorrangige Forschungsziel besteht in der enzymatischen Synthese von Oligosacchariden und glycosilierten Naturstoffen. Das Chemotherapeutikum Taxol hat einen Marktanteil von 2 Milliarden US \$, ist allerdings sehr schlecht wasserlöslich, deshalb wurde in diesem Projekt mit Hilfe von Glycosyl- und Fructosyltransferasen eine Glykosylierung dieses Naturstoffes angestrebt, um die Bioverfügbarkeit wesentlich zu erhöhen und somit die notwendige tägliche Dosis drastisch zu reduzieren. In weiteren Projekten wurde die enzymatische Synthese von Oligosacchariden und Glycopeptiden bzw. -lipiden verfolgt. Oligosaccharide und Oligopeptide sind in größeren Mengen i.A. bisher nur durch aufwendige chemische Synthese mit meist toxischen Lösungsmitteln zugänglich. Dabei werden für den Schlüsselschritt Schwermetalle, wie Quecksilber und Silber eingesetzt sowie chlorierte Kohlenwasserstoffe. Die klassischen Synthesen erfordern ebenfalls eine Vielzahl von Einzelschritten und Schutzgruppenoperationen. Vor allem Glycosyl- und Fructosyltransferasen sollen dazu dienen, völlig neue Produktionsstrategien durch Nutzung nachwachsender Rohstoffe zu entwickeln und chemische Methoden und Agenzien durch biologische bzw. biologisch verträgliche Verfahren und Stoffe zu ersetzen.</p> <p><b><i>Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden</i></b></p> <p>In dem Verbundprojekt sind zwei Firmen integriert. Die Firma X-Zyme (Düsseldorf) hat das Gen der Fructosyltransferase kloniert und einer Zufallsmutagenese unterzogen. Die neuen Muteine wurden in <i>E. coli</i> exprimiert und die Bakterienkolonien auf Agarplatten detektiert. Diese Systeme wurden der TU-Braunschweig zum Screening von verbesserten Varianten zur Verfügung gestellt. Dort wurden die Agarplatten einer gewünschten Glycosylierungsreaktion unterworfen. Positive Klone wurden kultiviert. Die mutierten Gene können erneut der Mutagenese unterworfen werden. Dadurch wurden leistungsfähige Biokatalysatoren gewonnen, die in einem reaktionstechnisch optimierten Reaktor für hohe Wirtschaftlichkeit sorgen. Die Firma Combinature (Berlin) baute ergänzend eine Glycosyltransferasegenbibliothek auf. Hierzu wurden PCR-basierte Verfahren eingesetzt. Zusätzlich griff Combinature auf seine umfangreiche Stammsammlung zurück um Glycosyltransferasen aus proprietären und veröffentlichten Clustern zu klonieren. Die funktionelle Analyse dieser Enzyme erfolgt im Ganzzellverfahren nach heterologer Expression in Aktinomyceten. Hierzu wurde eine Glycosylierung von Taxol und weiteren Naturstoffen getestet. Zusätzlich wurde für eine ausgewählte Glycosyltransferase die Substratflexibilität bestimmt. Hierzu wurden durch heterologe Expression eines nicht kompletten Biosyntheseclusters in Aktinomyceten Varianten des natürlichen Substrats hergestellt, die dann durch die Glycosyltransferase dekoriert werden. Die Analyse dieser Substanzen erfolgte durch Dünnschichtchromatographie, LC-MS und NMR-Strukturaufklärung.</p> |                   |  |                 |   |                  |
| <small>Deutsche Bundesstiftung Umwelt • An der Bornau 2 • 49090 Osnabrück • Tel 0541/9633-0 • Fax 0541/9633-190 • <a href="http://www.dbu.de">http://www.dbu.de</a></small>   |                   |  |                 |   |                  |

## ***Ergebnisse und Diskussion***

Eine Vielzahl neuer Produkte und nachhaltiger, umweltschonender Verfahren sind im Rahmen dieses DBU-Projektes durch die drei Teilprojektteilnehmer erarbeitet worden. Diese umfassen ein breites Spektrum an Oligosacchariden und Glycokonjugaten. Die Produkte sind potentiell im präparativen Maßstab zugänglich. Sowohl hohe Ausbeuten, als auch hohe Produkt-Konzentrationen sowie know how zur Aufarbeitung sind dafür erarbeitet worden. Hier ist hervorzuheben, dass diese Produkte chemisch kaum bzw. nur mit sehr großem Aufwand unter Verwendung toxischer Hilfsstoffe herstellbar sind. Ebenso sei auf den zweiten Teil der Arbeiten verwiesen. Hier wurden neue Synthesestrategien entwickelt, die die vereinfachte, umweltfreundliche Glykosylierung von Wirkstoffen ermöglichen. Dabei war das Ziel, sowohl die Bioverfügbarkeit als auch die Selektivität von etablierten Wirkstoffen wie Taxol wesentlich zu verbessern. Enzymatische und chemische Derivatisierungen von Taxol sind in der Literatur wenig beschrieben, obgleich viele Arbeitsgruppen an dieser Thematik in Industrie und Hochschule arbeiten. Dennoch wurde ein chemoenzymatisches Verfahren entwickelt, das ein flexibles Drug-Design ermöglicht. Gegenüber einer reinen chemischen Synthese, die möglicherweise nicht mit den zur Zeit entwickelten Methoden zu diesen Produkten führen wird, erlaubt dieser Ansatz unter Vermeidung einer Vielzahl von Schutzgruppenoperationen das Implementieren von Modulen und somit das gezielte Eingehen auf die jeweilige Indikation. Im Rahmen dieses Projektes wurden fokussiert zwei funktionierende Strategien entwickelt, die erstens durch ein im Projekt entwickeltes Verfahren die präparative Synthese und Aufarbeitung potentieller Oligosaccharide ermöglicht. Darüber hinaus wurde zweitens, ein chemoenzymatisches Verfahren zur Glykosylierung von Wirkstoffen (Peptide, Taxol) entwickelt.

So wurden 6 neuartige Oligosaccharide in erforderlicher Reinheit und Menge innerhalb des Projektes nachproduziert, da als interessant eingestuft wurden. Erste biologische Untersuchungen sind durchgeführt. Von den sechs Oligosacchariden sind fünf geeignet für weitere Tests, die Gegenstand durch zur Zeit durchgeführten Arbeiten sind.

Die Firma X-Zyme fokussiert sich auf die Entwicklung und den Einsatz von Enzymen. Nach der erfolgreichen Klonierung und Optimierung der Fructosyltransferase, wurde die Technologie Plattform und Herstellung von Oligosacchariden in ihr Angebot aufgenommen. Die Firma X-Zyme plant, die Oligosaccharide als Feinchemikalien mit einem Kooperationspartner anzubieten. Sie besitzen seit kurzem die Lizenz, unter GMP-Richtlinien Fermenter bis zu 1000 l zu betreiben.

## ***Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation***

Die Arbeiten wurden einer breiten Öffentlichkeit auf Kongressen und in wissenschaftlichen Journalen präsentiert.

## ***Fazit***

Durch das Verbundprojekt wurde die Entwicklung nachhaltiger, umweltschonender Verfahren zur Produktion von glykosylierten Naturstoffen, sowie Oligosacchariden ermöglicht. Die neuartigen Produkte sowie Verfahren legen eine industrielle Implementierung nahe.

## Inhaltsverzeichnis

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1.    | Projektkennblatt  | 2  |
| 2.    | Zusammenfassung   | 7  |
| 3.    | Anlass und Zielsetzung des Projekts   | 8  |
| 4.    | Verwendete Methoden   | 9  |
| 5.    | Ergebnisse  | 10 |
| 5.1   | Aufbau und Nutzung einer Glycosyltransferasebibliothek (Combinature Biopharm AG)  | 10 |
| 5.1.1 | Aufbau einer Glycosyltransferasebibliothek  | 10 |
| 5.1.2 | Assay zur Glycosylierung schlecht löslicher Wirkstoffe (Combinature Biopharm AG)  | 12 |
| 5.1.3 | Biotransformation- Wahl geeigneter Wirtsstämme  | 13 |
| 5.1.4 | Biotransformation- Wahl Expressionsvektor   | 13 |
| 5.1.5 | Biotransformation- Transkonjuganten im CB 2671  | 14 |
| 5.1.6 | Testung der Aranciamycinglycosyltransferase mit aromatischen Polyketiden  | 14 |
| 5.2   | Klonierung und Mutagenese der Fructosyltransferase (TU, X-Zyme)   | 17 |
| 5.2.1 | Entwicklung der Bausteine für die Oligosaccharid und Oligopeptid-Synthese (TU) (Donoren: Man-Fru, Gal-Fru, Fuc-Fru, Allosaccharose ; Akzeptoren: verschiedene Di-, Triptide und Derivate) | 17 |
| 5.2.2 | Optimierung des Produktionsprozesses für die Gewinnung der Fructosyltransferase aus <i>B. subtilis</i> NCIMB 11871  | 18 |
| 5.2.3 | Identifizierung und heterologe Produktion der Fructosyltransferase aus <i>B. subtilis</i> NCIMB 11871   | 18 |
| 5.2.4 | Expression in <i>E. coli</i> (X-Zyme)   | 21 |
| 5.3   | Funktionelles Screening   | 23 |
| 5.3.1 | Untersuchungen zur Kinetik und Akzeptorspezifität der FTF aus <i>B. subtilis</i> 11871 für die Produktion von Saccharose-Analoga (TU BS)  | 23 |
| 5.4   | Glycosylierungsreaktionen mit den Bausteinen  | 25 |
| 5.4.1 | FTF aus <i>Leuconostoc mesenteroides</i>  | 25 |
| 5.4.2 | FTF aus <i>Bacillus subtilis</i> und <i>Bacillus subtilis</i> NCIB 11871  | 26 |
| 5.4.3 | Gezielte enzymatische Synthese strukturell unterschiedlicher Trisaccharide  | 27 |
| 5.5   | Downstream- Processing  | 28 |
| 5.6   | Optimierung der Fructosyltransferasen durch Mutagenese  | 29 |
| 5.7   | Entwicklung von potentiellen Akzeptoren für Glycosyltransferreaktionen  | 33 |
| 5.7.1 | Glycosylierung von Aminosäuren  | 33 |
| 5.7.2 | Enzymatische Akzeptorreaktionen von Saccharose-Analoga mit Alkoholen und Aminosäuren zur Synthese von Glycopeptiden und Glycolipiden  | 34 |
| 5.8   | Entwicklung von Oligopeptid-Naturstoff-Hybriden   | 35 |
| 6.    | Öffentlichkeitsarbeit   | 36 |
| 7.    | Diskussion  | 36 |
| 8.    | Fazit   | 39 |
| 9.    | Literatur   | 41 |

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

**Abb. 1:** Bei einer Vielzahl tumorassoziiertes Antigene handelt es sich um Glycoproteine.

**Abb. 2:** Phylogenetischer Stammbaum PKS-spezifischer Glycosyltransferasen.

**Abb. 3:** Alignment der Aminosäuresequenzen der Primergruppe A.

**Abb. 4:** Verteilung von Vollängen-Glycosyltransferasen im phylogenetischen Stammbaum.

**Abb. 5:** Experimenteller Ansatz der Biotransformation.

**Abb. 6:** Karten der verwendeten Expressionsvektoren pUWLoriT und pSET152ermE\*p.

**Abb. 7** Strukturformeln von Aranciamycin(1), Doxorubicin (2) und Daunorubicin (3).

**Abb. 8:** Dünnschichtchromatographische Analyse der Extrakte von rekombinanten Streptomyceten.

**Abb. 9:** Strukturformeln von generierten Aranciamycingrundgerüstvarianten.

**Abb. 10:** Strukturformeln von glycosylierten, neuen Aranciamycingrundgerüstvarianten.

**Abb. 11:** Schema des Konzepts: enzymatische Synthese eines Saccharose-Analogon und Transfer des gewünschten Zuckers mittels einer Glycosyltransferase auf ein Akzeptormolekül.

**Abb.12:** Restriktionsanalyse der recFTF-Expressionsplasmide p22FTF und p24FTF.

**Abb.13:** Darstellung der recFTF-Expressionsplasmide p22FTF und p24FTF.

**Abb.14:** SDS-PAGE Analyse der recFTF Expression in *E. coli* BL21(DE3).

**Abb.15:** Expression der recFTF11871.

**Abb.16:** FTF-Akzeptorreaktion mit Galactose.

**Abb 17:** Saccharose Analoga aus der FTF-Reaktion.

**Abb. 18:** Synthese eines Galactooligofructosids aus Gal-Fru mit einer FTF aus *L. mesenteroides*.

**Abb. 19:** Synthese eines Xylosyl-oligofructosids aus Xyl-Fru mit einer FTF aus *B. subtilis*.

**Abb. 20:** Enzym-Optimierung mittels gerichteter Evolution.

**Abb. 21:** error prone PCR der 1,4 kb FTF aus *B. subtilis* mit verschiedenen  $MnCl_2$ -Konzentrationen.

**Abb. 22:** Literaturbekannte Synthese von glycosylierten Serin.

**Abb. 23:** Neuentwickelte, direkte Glycosilierungsmethode.

**Abb. 24:** Enzymatische Synthese von Glycoethern bzw. Glycolipiden.

**Abb. 25:** Chemo-enzymatisches Verfahren zur Generierung von Glyco-Hybrid-Naturstoffen.

**Abb. 26:** Saccharose Analoga aus der FTF-Reaktion.

**Tab. 1:** Beschleunigung der Reaktionszeit für Galactose-Akzeptorreaktionen.

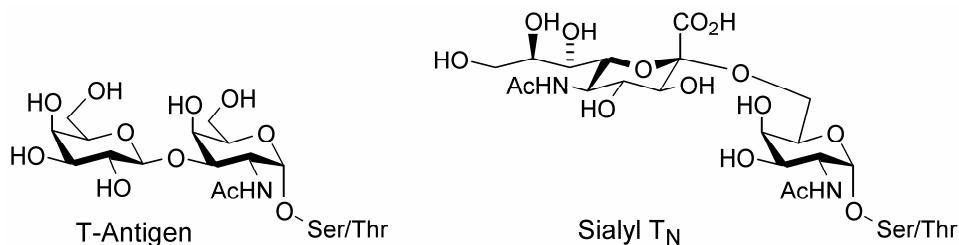
**Tab. 2:** Trisaccharide aus der FTF-Reaktion.

**Tab. 3.:** Anzahl der durch Mutagenese erzeugte Varianten.

**Tab. 4:** Produkte aus der FTF-Reaktion.

## 2. Zusammenfassung

Gemäß der Gesundheitsorganisation (WHO) sterben jährlich 6 Millionen Menschen an Krebs. Die Krebsforschung stellt somit eines der wichtigsten Gebiete der Pharmaindustrie dar. Die Bedeutung von Oligosacchariden sowie Glycopeptiden bzw. -lipiden als Vaccine und Immunostimulantien bei der Krebstherapie und -prävention nimmt stetig zu. In den letzten Jahren hat man mehr Einblicke in die zellulären Prozesse sowie die Funktionen dieser Substanzklassen erhalten. Ihnen wird eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Immunsystems zugewiesen. Dennoch werden wenige Oligosaccharide therapeutisch eingesetzt.



**Abb. 1** Bei einer Vielzahl tumorassoziiert Antigenen handelt es sich um Glycoproteine.

Dies gründet oft in der Tatsache, dass der Zugang zur Produktion dieser wichtigen Substanzklasse meist nur durch chemische Totalsynthese realisiert werden kann. Aufgrund einer Vielzahl von Schutzgruppenstrategien ist ein schneller, kostengünstiger Weg meist versperrt. Eine Alternative stellt die Biokatalyse durch den Einsatz von Glycosyltransferasen (GTF) dar. Für diesen Ansatz geeignete Glycosyltransferasen sind Dextransucrasen und Fructosyltransferasen (FTF). Diese Enzyme setzen als Substrat Saccharose, eines der kostengünstigsten Naturprodukte, zu Oligosacchariden um. Ziel des angestrebten Projektes war die enzymdirigierte Herstellung von Oligosacchariden und Glycopeptiden mit diesen Enzymen sowie gentechnisch erzeugten Mutanten. Der Prozess wurde so gestaltet, dass er zukünftig scale-up fähig ist. Darüber hinaus wurde der enzymatische Zugang zu Glycopeptiden mit antitumoralen und antibakteriellen Eigenschaften geschaffen.

### 3. Anlass und Zielsetzung des Projekts

Die klassischen Synthesen erfolgen mit großem Aufwand an Hilfschemikalien (Schutzgruppenchemie) und in organischen Lösungsmitteln, enzymatisch dagegen umweltfreundlich im wässrigen Milieu. Daraus ergibt sich eine drastische Umweltentlastung sowie Ressourcenschonung, da mit Zuckern überwiegend nachwachsende Rohstoffe eingesetzt werden. Der Einsatz von Kohlenhydraten und enzymatischen Synthesewegen zur Vermeidung organischer Lösungsmittel und Reduktion chemischer Hilfsstoffe bedeutet einen präventiven Charakter der Umweltentlastung. Beim Einsatz von Glycosyltransferasen werden sowohl Rohstoffe (Edukte) als auch Energie eingespart, gleichzeitig wird die anfallende Schadstoffmenge (Schwermetalle, Lösungsmittel) komplett eliminiert. In der Regel sorgt ein leistungsfähiger Biokatalysator, meist ein genetisch veränderter Bakterienstamm, in einem reaktionstechnisch optimierten Reaktor für hohe Wirtschaftlichkeit. Die Prozessausbeuten liegen oft über 80% bei Produktkonzentrationen im unteren Prozentbereich. Zur Zeit entwickeln führende Firmen (Fluka, Schering) eine große Zahl an Biokatalysatoren für die organische Synthese. Doch nicht nur der zu erwartende Produktions- oder Verkaufswert der neu entwickelten Glycosyl- und Fructosyltransferasen, sondern die um mehrere Größenordnungen darüber hinausgehende Wertschöpfung der mit Katalysatoren erzeugten Oligosaccharide bestimmt die hohe ökonomische Bedeutung des durchgeführten Projektes. Die Fructo- und Glycosyltransferasen sowie deren Mutanten dienen der Synthese von strukturell neuartigen Oligosacchariden, Glycopeptiden und glycosylierten Naturstoffen durch Nutzung nachwachsender Rohstoffe (Kohlenhydrate). Durch den Einsatz der entwickelten Verfahren können chemische Methoden und Agenzien durch biologische bzw. biologisch verträgliche Verfahren und Stoffe ersetzt werden. Da insbesondere Glycosyltransferasen in der Regel eine ausgeprägte Substratspezifität aufweisen ist es nötig, eine hinreichende Anzahl und Diversität dieser Enzyme bereitzustellen, um ausgewählte Grundkörper zu glycosylieren. Die Etablierung einer diversen Glycosyltransferase-Enzymbibliothek sollte in Teilprojekt 1 dieses Vorhabens erreicht werden. Die Enzyme sollten dann in einer Umsetzung mit Beispielsubstanzen *in vivo* auf Aktivität getestet werden. Diese ebenfalls in Teilprojekt 1 eingeplanten Experimente sollten (1) der Etablierung entsprechender Assayverfahren, (2) der Austestung der Substratspezifität von



Glycosyltransferasen und (3) gegebenenfalls der Herstellung neuer Derivate bekannter Substanzen dienen.

#### **4. Verwendete Methoden**

In dem Verbundprojekt waren zwei Firmen integriert. Die Firma X-Zyme (Düsseldorf) hat das Gen der Fructosyltransferase kloniert und einer Zufallsmutagenese unterzogen. Die neuen Muteine wurden in *E. coli* exprimiert und die Bakterienkolonien auf Agarplatten detektiert. Diese Systeme wurden der TU-Braunschweig zum Screening von verbesserten Varianten zur Verfügung gestellt. Dort wurden die Agarplatten einer gewünschten Glycosylierungsreaktion unterworfen und hinsichtlich Oligosaccharidsynthese gescreent.

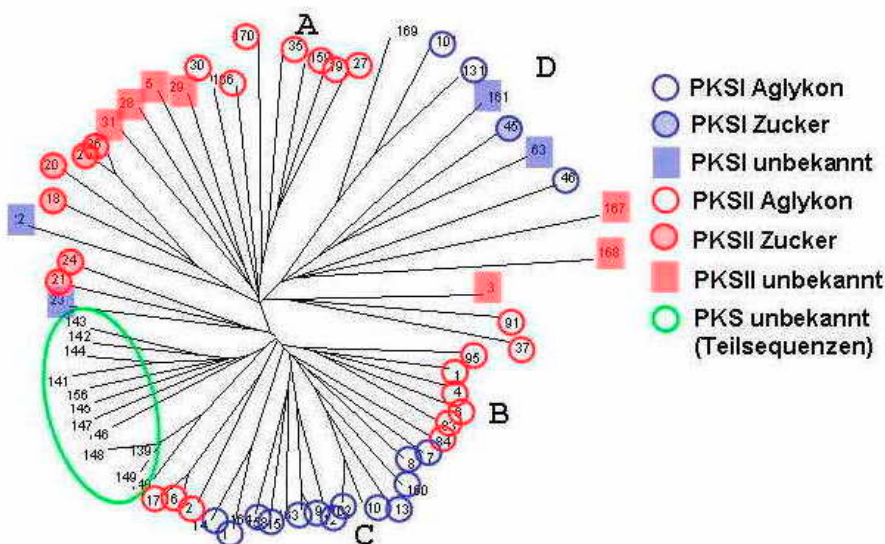
Die Firma Combinature (Berlin) baute ergänzend eine Glycosyltransferasegenbibliothek auf. Hierzu wurden PCR-basierte Verfahren eingesetzt. Zusätzlich greift Combinature auf seine umfangreiche Stammsammlung zurück, um Glycosyltransferasen aus proprietären und veröffentlichten Clustern zu klonieren. Die funktionelle Analyse dieser Enzyme erfolgte im Ganzzellverfahren nach heterologer Expression in Aktinomyceten. Die erzeugten Enzyme nutzen dabei nukleotidaktivierte Zucker als Substrat. Hierzu wurde eine Glycosylierung von Taxol und weiteren Modellsubstanzen mit der gesamten Enzymbibliothek getestet. Zusätzlich wurde für ausgewählte Glycosyltransferasen die Substratflexibilität bestimmt. Hierzu wurden durch heterologe Expression eines nicht kompletten Biosynthesegenclusters in Aktinomyceten Varianten des natürlichen Substrats hergestellt, die dann durch die Glycosyltransferase dekoriert werden. Die Analyse dieser Substanzen erfolgte durch Dünnschichtchromatographie, LC-MS und NMR-Strukturaufklärung.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Aufbau und Nutzung einer Glycosyltransferasebibliothek (Combinature Biopharm AG)

#### 5.1.1 Aufbau einer Glycosyltransferasebibliothek

Grundlage für die Etablierung eines Screeningverfahrens zum Aufbau einer Glycosyltransferase-Toolbox war die Analyse bereits bekannter Enzyme. Aminosäuresequenzen (Einträge in der *EMBL*-Datenbank sowie proprietäre Sequenzen aus weiteren Projekten) wurden hierzu über das Programm *Blast* verglichen und mit dem Programm *ClustalW* einander gegenübergestellt. Zur anschließenden Erstellung des phylogenetischen Stammbaumes wurde das Programm *Treeview* genutzt.



**Abb. 2:**  
Phylogenetischer Stammbaum PKS-spezifischer Glycosyltransferasen (Stand 07/03). A-D bezeichnen unterschiedliche Enzymklassen, die weiter unten im Text erläutert werden.

Durch die Analyse PKS-spezifischer Glycosyltransferasen (Abb. 2) konnten Familien mit hohem Verwandtschaftsgrad (A,B,C,D) und Substratspezifität gebildet werden. Infolge des Alignments dieser gruppenspezifischen Sequenzen war es möglich, in konservierten Bereichen Primer, die gegen diese Sequenzmotive gerichtet sind, abzuleiten. Die PCR-Bedingungen der von konservierten Regionen der jeweiligen Glycosyltransferaseklassen abgeleiteten Primer (A-D) wurden auf korrelierenden homologen genomischen DNAs anhand eines Temperaturgradientes etabliert und optimiert. Die Combinature Biopharm AG besitzt eine eigene Sammlung von über 12.000 proprietären Streptomyceten und seltenen Actinomyceten und hat seit Ihrem Bestehen von ca. 400 dieser Stämme Cosmidbanken angelegt. Jede dieser

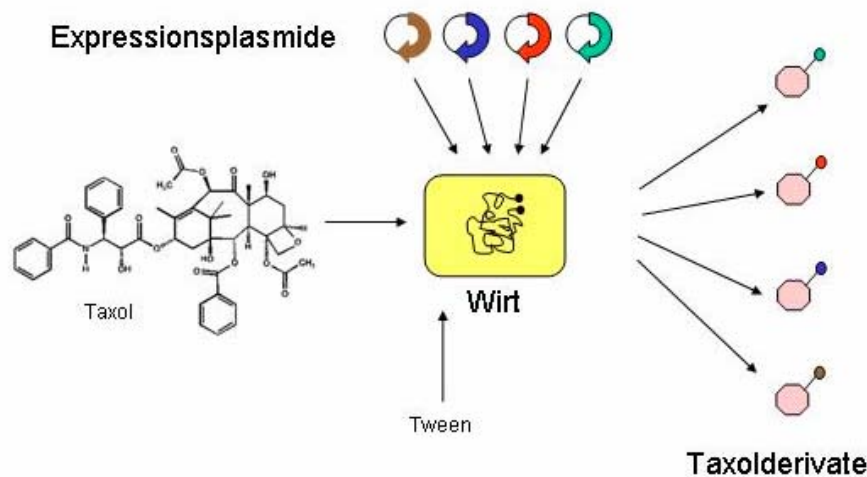
Genbanken umfasst ca. 2300 individuelle Klone mit einem durchschnittlichen Insert von 30-35kb, was einer etwa 7fachen Abdeckung des Genoms entspricht. Die Klone dieser Banken liegen stammspezifisch vereinzelt in 384er Mikrotiterplatten, für Hochdurchsatz-Screeningmethoden auf sog. Hochdichtefilter gespottet und als Cosmidpools vor.



**Abb. 3:** Alignment der Aminosäuresequenzen der Primergruppe A.

Für die Identifizierung neuer Glycosyltransferasen wurden ca. 100 Cosmidpools ausgewählt. In 5-10% der Stämme war die Amplifikation eines Produktes in zu erwartender Größe möglich. Diese Fragmente wurden subkloniert und sequenziert. Die Sequenzen wurden mit den Daten in der EMBL-Datenbank über das Programm *Blast* verglichen. Mit den Primergruppen A,B,D konnten in heterologen Stämmen keine Übereinstimmungen mit den Sequenzen bekannter Glycosyltransferasen erzielt werden. Die Glycosyltransferase-Teilsequenzen der Primergruppe C(II) wurden nicht-radioaktiv markiert und in Hybridisierungsexperimenten auf Hochdichteklonfiltern eingesetzt. Positive Cosmide dieses heterologen Screeningverfahrens wurden mittels PCR bestätigt und amplifizierte Fragmente ebenfalls kloniert und sequenziert. Vorteil dieser Methode ist die eindeutige Zuordnung einer Teilsequenz zu einem Cosmid und somit eine schnelle Vollängengensequenzierung mittels *Primer Walking*. Da





**Abb. 5:**  
Experimenteller  
Ansatz der  
Biotransformation.

### 5.1.3 Biotransformation- Wahl geeigneter Wirtsstämmen

Die Stämme, die im Rahmen dieser Methode als Wirt eingesetzt werden konnten, mussten folgende wichtige Eigenschaften aufweisen:

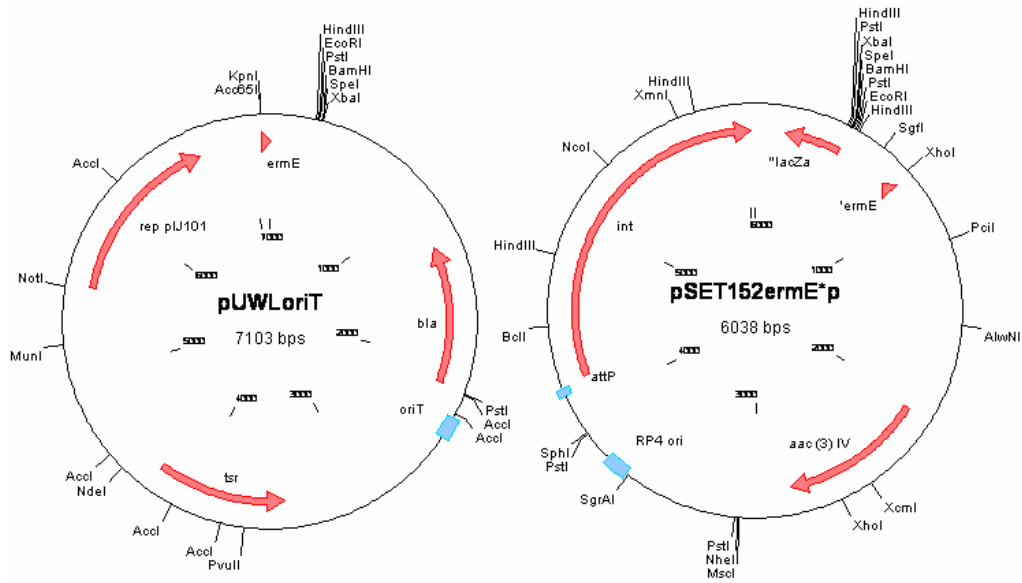
- Sie mussten konjugierbar sein
- Ihr Wachstum durfte durch Taxol nicht beeinträchtigt werden
- Sie mussten ein Potential zur Synthese aktivierter Zucker aufweisen

Anhand dieser Kriterien und entsprechender Versuche und Test fiel die Wahl auf folgende 3 Stämme:

- CB 30- *S. spec. Tü6028* – Polyketomycinproduzent
- CB 41- *S. echinatus Tü303* – Aranciamycinproduzent
- CB 2671- *S. fradiae Tü 2717* Mutante XKS – produziert kein Urdamycin mehr

### 5.1.4 Biotransformation- Wahl Expressionsvektor

Im Verlauf der ersten Konjugationen der ausgewählten 30 Glycosyltransferasen im Rahmen der Biotransformation stellte sich heraus, daß der bis dahin in anderen Projekten dieser Art erfolgreich eingesetzte Expressionsvektor pUWLoriT in den Streptomycetenstämmen *S. spec. Tü6028* (CB 30), *S. echinatus Tü303* (CB 41), *S. fradiae Tü 2717* Mutante XKS (CB 2671) nicht in erwarteter Form in der Lage zu sein scheint, zu replizieren. Als Konsequenz aus dieser Problematik wurden die 30 Glycosyltransferasen in pSET152ermE\*p umkloniert und erneut in die 3 Wirte konjugiert.



**Abb. 6:** Karten der verwendeten Expressionsvektoren pUWLoriT und pSET152ermE\*p

### 5.1.5 Biotransformation- Transkonjuganten im CB 2671

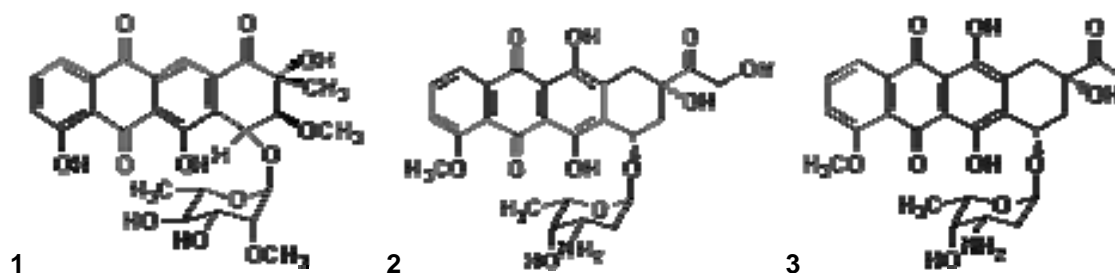
Die ersten Umsetzungsexperimente erfolgten am Beispiel der Urdamycinmutante des *S. fradiae* Tü 2717 mit Taxol. Hierzu wurden je zwei Transkonjuganten in E1 Medium, welches in Vorversuchen im Vergleich zu anderen kein verändertes Laufverhalten von Taxol in der Dünnschichtchromatographie verursachte, angezogen. Es erfolgte ein Zugabe von Taxol (Endkonzentration 20µg/ml) und Tween (Endkonzentration 1%), durch welches die Penetration des Taxols ins Zellinnere sichergestellt wurde. Die Extraktion erfolgte mittels Essigester. Durch eine Dünnschichtchromatographie der Proben inklusive Anfärbung mit Anisaldehyd konnte keine Glycosylierung von Taxol nachgewiesen werden.

### 5.1.6 Testung der Aranciamynglycosyltransferase mit aromatischen

#### Polyketiden

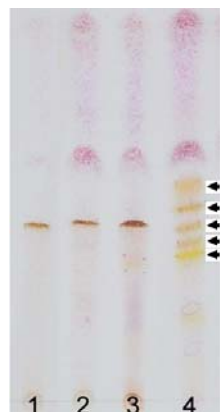
Parallel zur Testung der subklonierten Glycosyltransferasen mit Taxol im Ganzzellsystem sollte auch die Umsetzung von Substanzgrundgerüsten untersucht werden, die größere Ähnlichkeiten zum natürlichen Substrat aufweisen. Zu diesem Zwecke wurde eine genomische Bibliothek von *Streptomyces echinatus* Tü303, dem Produzenten des aromatischen Polyketids Aranciamycin hergestellt. Dieses Molekül gehört der gleichen Substanzklasse wie die Krebsmedikamente Doxorubicin

(Adriamycin) und Daunorubicin (Abb 7) an und weist ebenfalls antibakterielle und antitumor-Eigenschaften auf.

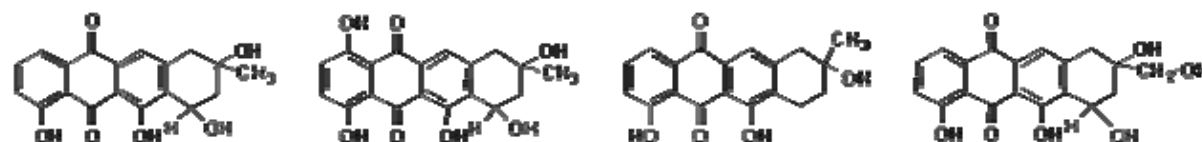


**Abb. 7** Strukturformeln von Aranciamycin(1), Doxorubicin (2) und Daunorubicin (3).

Durch das Screening dieser Genbibliothek mit geeigneten Sonden konnten Cosmide identifiziert werden, die die Biosynthesegene von Aranciamycin kodieren. Neben Cosmiden, die für das komplette Biosynthesegencluster kodieren, konnten auch Konstrukte identifiziert werden, in denen bei der Klonierung in den Cosmidvektor Randbereiche des Clusters deletiert wurden. Durch die heterologe Expression dieser Cosmide in verschiedenen Streptomyeten konnte gezeigt werden, dass die Rekombinanten nach Einbringen des Genmaterials des *Streptomyces echinatus* Tü303 in der Lage sind, Varianten des Grundgerüsts von Aranciamycin herzustellen (Abb 8; Abb 9), wie durch Aufreinigung und Strukturaufklärung der gebildeten Produkte festgestellt werden konnte.



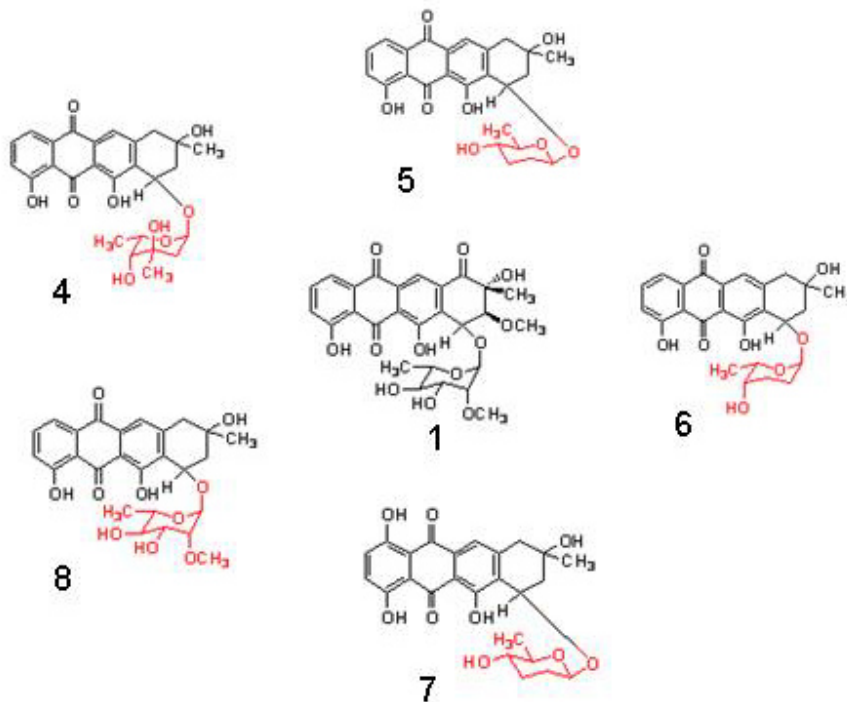
**Abb. 8:** Dünnschichtchromatographische Analyse der Extrakte von rekombinanten Streptomyeten. Rezipient *S. diastatochromogenes* Cb30 (1), verschiedene Rekombinante (2-4). Pfeile markieren neu identifizierte Produkte im Extrakt von Rekombinant 4.



**Abb. 9** Strukturformeln von generierten Aranciamycingrundgerüstvarianten.

Zusätzlich zu den Enzymen, die an der Biosynthese des Grundgerüsts beteiligt sind fehlen auf den Cosmiden auch Enzyme, die für die Bildung der aktivierten Zucker

verantwortlich sind. Somit kann durch das Einbringen dieser Cosmide in Stämme, die eigene Pathways für die Synthese aktivierter Zucker aufweisen, ein zusätzlicher Grad der Variation in die gebildeten Substanzen erzielt werden. In diesem Falle wird nämlich der „fremde“ aktivierte Zucker durch die Glycosyltransferase der Aranciamycinbiosynthese akzeptiert und an das Grundgerüst gekoppelt. Auch die neu gebildeten Produkte konnten aus Extrakten der rekombinanten Streptomycceten aufgereinigt werden und ihre Struktur durch NMR-Analyse aufgeklärt werden (Abb. 10). Diese Ergebnisse zeigen, dass die identifizierten Glycosyltransferasen (1) in Streptomycceten heterolog aktiv exprimiert werden können, (2) Veränderungen auch in unmittelbarer Nachbarschaft der zu glycosylierenden Hydroxylgruppe akzeptieren und (3) eine besonders ausgeprägte Substratflexibilität bezüglich der anzuhängenden aktivierten Zucker aufweisen.



**Abb. 10:** Strukturformeln von glycosylierten, neuen Aranciamycin-grundgerüstvarianten. Dargestellt sind Aranciamycin (1) sowie unterschiedlich glykosylierte Varianten des Aranciamycin-grundgerüsts (4-8).



## 5.2 Klonierung und Mutagenese der Fructosyltransferase (TU, X-Zyme)

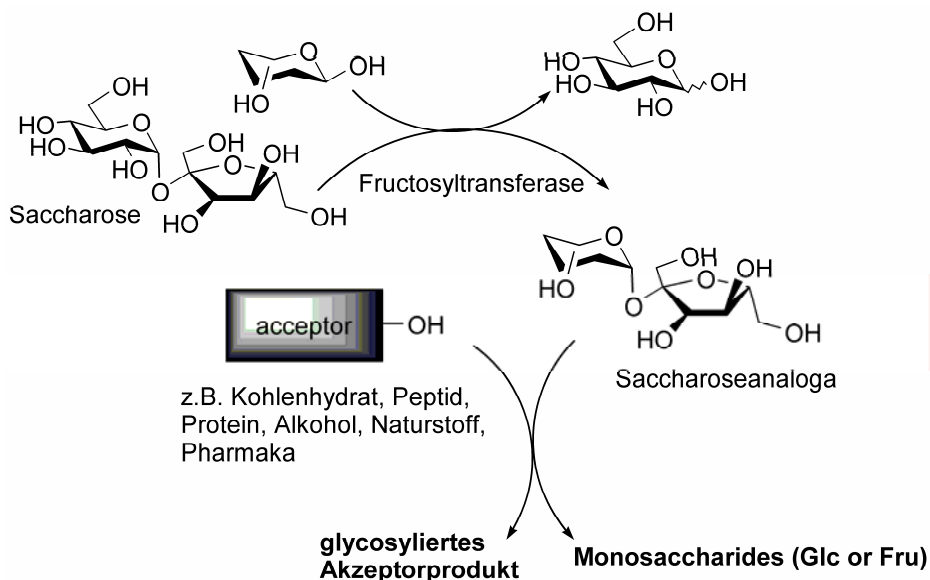
### 5.2.1 Entwicklung der Bausteine für die Oligosaccharid und Oligopeptid-

**Synthese (TU) (Donoren: Man-Fru, Gal-Fru, Fuc-Fru, Allosaccharose ;**

**Akzeptoren: verschiedene Di-,Triptide und Derivate)**

Ein Schwerpunkt und die Basis des Projektes ist die enzymatische Synthese von Saccharose-Analoga mit geeigneten Fructosyltransferasen (FTF). FTF katalysieren die Spaltung der glycosidischen  $\beta(2\rightarrow1)$ -Bindung des Substrates Saccharose, um unter Freisetzung von Glucose die Fructosyleinheit  $\beta(2\rightarrow6)$ -glycosidisch mit weiteren Fructoseeinheiten zu verknüpfen. Dabei entsteht vornehmlich das Homopolymer Fructan. Die untersuchte FTF aus *B. subtilis* NCIMB 11871 weist jedoch sehr geringe Polymerbildungseigenschaften auf, wobei gegenüber der Saccharose zur Levanbildung ein äußerst niedriger  $K_m$ -Wert von 0,2 mol/l vorliegt.

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die aus *B. subtilis* NCIMB 11871 gewonnene FTF einen Fructosyltransfer auf Galactose (Gal) als Akzeptor ermöglicht. Dabei entstand ausschließlich das gewünschte Galactosylfructosid, Polymerbildung wurde nicht detektiert.



**Abb. 11:** Schema des Konzepts: enzymatische Synthese eines Saccharose-Analogs und Transfer des gewünschten Zuckers mittels einer Glycosyltransferase auf ein Akzeptormolekül.

### **5.2.2 Optimierung des Produktionsprozesses für die Gewinnung der Fructosyltransferase aus *B. subtilis* NCIMB 11871**

C- und N-Quelle sowie entsprechende Medienzusätze, wie Spurenelemente und Komplexe Nährquellen (z.B. Hefextrakt) wurden auf ein bereits bestehendes Minimalmedium als Basis (Jayasuriya, J. gen. Microbiol., 1995) auf die Aktivität der nativen extrazellulären Fructosyltransferase im Kulturüberstand optimiert. Dabei wurden auch besonders die Bedingungen hinsichtlich des volumetrischen Biomassenzuwachses und einer damit verbundenen Kopplung zur FTF-Sekretion berücksichtigt. Die Expression der FTF ist ausschließlich durch Saccharose induzierbar und ausgesprochen langsam. Es hat sich ergeben, dass durch die Optimierung der genannten Faktoren die Aktivität des Kulturüberstandes von durchschnittlich 2.0 auf 5.6 mU/ml um den Faktor 2.8 gesteigert werden konnte.

Hinsichtlich der Untersuchung vom Sauerstoff- und pH-statisierten Ansätzen wurden Versuche im Batchverfahren mit Kleinfermentern (Biostat Q System; Firma B. Braun Biotech International) durchgeführt. Das Einbringen eines pH-Shifts ausgehend von optimalen Wachstumsbedingungen bis zum pH-Optimum der FTF gegen Ende der Kultivierung, eine erhöhte Kultivierungstemperatur sowie die Regelung des  $pO_2$  führten zu einer weiteren Steigerung der FTF-Aktivität auf 6.5 mU/ml (Faktor 3.25). Die FTF-Aktivität erreicht gegen Ende der Kultivierung ein Maximum und fällt danach stark ab. Im Überstand lassen sich Glucose, Fructose, Essigsäure, Butandiol und andere organische Säuren nachweisen.

### **5.2.3 Identifizierung und heterologe Produktion der Fructosyltransferase aus *B. subtilis* NCIMB 11871**

Für die Entwicklung eines rekombinanten Expressionssystems war die Identifizierung der Fructosyltransferase aus den Kulturüberständen ein wesentliches Element. Mittels Querstromfiltration mit einer Ausschlussgröße von 50 kDa konnte die aufgrund der geringen Proteinkonzentration erforderliche Anreicherung der Proteine erzielt werden. Akzeptorreaktionen konnten durch diese Aufkonzentrierung um das 9.5-fache beschleunigt werden. Zudem gelang es, durch N-terminale Sequenzierung die FTF-Aktivität des *Bacillus subtilis* Stammes NCIMB 11871 einem 50.7 kDa großen Protein zuzuordnen. Dies entspricht der erwarteten Molekulargröße, welche nach Petit-Glatron *et al.* (1987) bzw. Meng, G. und Fütterer, K. (2003) mit einer

Levansucrase ( $M_R$ : 50 kDa) aus *Bacillus subtilis* korreliert. Über die ermittelte Aminosäuresequenz (KETNQKP) konnten Primer synthetisiert werden, die zur Isolierung und Identifikation der Nukleotidsequenz geführt haben (X-Zyme).

### 5.2.3.1 Klonierungsstrategie

Homologierecherchen mit FTF-Sequenzen verschiedener Organismen ergaben für *B. subtilis* zwei Treffer für Glycosyltransferasen vom Typ Levansucrase:

1422 bp *sacB*-Gen aus *B. subtilis* Stamm 168, Genomsequenzierung (Kunst et al., 1997, Nature 390, 249-256)

1422 bp *sacN*-Gen aus *B. subtilis* natto, (RealBioTech Co., South Korea, 2002)

Beide Sequenzen sind sowohl auf DNA-, als auch auf Proteinebene zu 98,9% identisch. Im 5'-Bereich gibt es keine Unterschiede zwischen *sacB* und *sacN*, im 3' Bereich sind die letzten drei Basen vor dem Stopcodon im Fall von *sacB* AAA (kodiert für Lysin), im Fall von *sacN* CAA (kodiert für Glutamin).

Das Genom von *B. subtilis* 168 ist vollständig sequenziert. Eine weitere FTF-Sequenz neben *sacB* existiert in diesem Stamm nicht. Möglicherweise sind in anderen *B. subtilis* Stämmen weitere FTF-Sequenzen vorhanden. Wahrscheinlicher ist, dass verschiedene genetische Varianten von *sacB* existieren wie *sacN* aus *B. subtilis* natto.

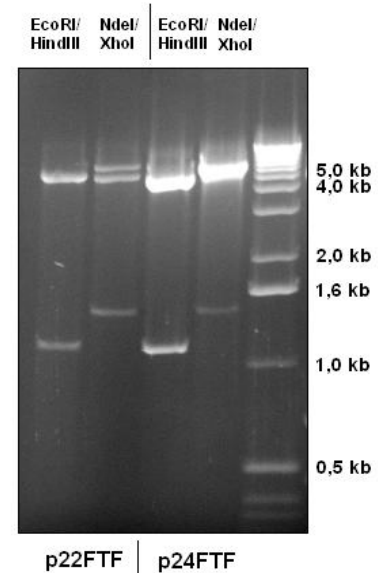
### 5.2.3.2 FTF aus *B. subtilis* Wildtyp (X-Zyme)

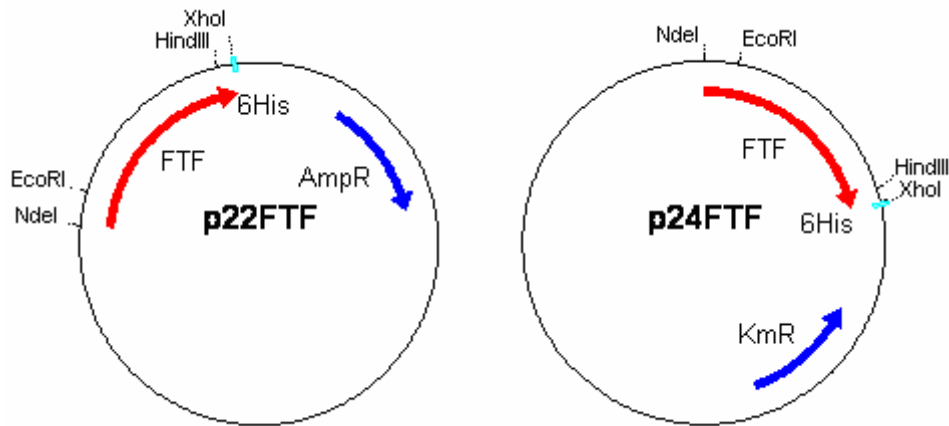
Für die Klonierung der FTF-Gensequenz in einen *E. coli* kompatiblen Expressionsvektor wurde das Gen aus dem Genom von *B. subtilis* mittels PCR amplifiziert. Hierfür wurde die genomische DNA aus einem *B. subtilis* Stamm der Firma X-Zyme isoliert. Die von X-Zyme ausgewählten Primer tragen am 5'-Ende eine *NdeI* Schnittstelle, am 3' Ende eine *XhoI*-Schnittstelle. Dies erlaubt die direkte Klonierung des PCR-Produkts in die modifizierten Expressionsvektoren p22 und p24, insofern das amplifizierte Fragment keine internen Schnittstellen für *NdeI* oder *XhoI* aufweist. Das Startcodon für die Translation ist in der *NdeI*-Schnittstelle enthalten, das Stopcodon wurde durch die *XhoI*-Schnittstelle ersetzt. Dadurch wurde in beiden Fällen eine C-terminale 6His-Fusion erhalten. Durch den His-tag ist eine Aufreinigung des Proteins über Ni-Affinitätschromatographie möglich. Die *NdeI*-Schnittstelle liegt in optimaler Entfernung zur ribosomalen Bindestelle (RBS). Damit wurde eine maximale Effizienz der Translation gewährleistet. Das 1,4 kb FTF-Fragment wurde per PCR

amplifiziert. Als Polymerase wurde TITANIUM *taq*-Polymerase (Clontech) verwendet. Das PCR-Produkt wurde gereinigt und wie die Vektoren p22 und p24 mit *NdeI* und *XhoI* restringiert. Alle Restriktionsansätze wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und die DNA-Fragmente nach Elektrophorese aus dem Gel eluiert. Das PCR-Fragment wurde mit den Vektoren in einem molaren Verhältnis von 8:1 ligiert. Die Ligation erfolgte bei RT für 10 min (rapid DNA ligation kit, Roche). Die Ligationsansätze wurden in kompetente *E. coli* RRI $\Delta$ M15 transformiert und auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (p22 x FTF) oder Kanamycin (p24 x FTF) ausplattiert. Transformanten wurden erneut ÜN kultiviert und die DNA isoliert. Die rekombinante DNA wurde einer Restriktionsanalyse mit *NdeI-XhoI* (Kontrolle der durch die Primer am 5' und 3' Terminus eingefügten Schnittstellen) und *EcoRI-HindIII* (*sacB* interne Schnittstellen) unterzogen. Jede zweite Probe enthielt das gewünschte Insert. Die Transformationseffizienz betrug somit 50%. Das Restriktionsmuster der rekombinanten FTF in p22 und p24 zeigte die anhand der *sacB*-Sequenz zu erwartenden Fragmente (Abb.12). Die Plasmide wurden als p22FTF und p24FTF bezeichnet (Abb.13). Eine Sequenzierung der FTF-Sequenz ergab, dass die Sequenz zu 100% mit der veröffentlichten *sacB*-Sequenz übereinstimmt.

**Abb.12:** Restriktionsanalyse der recFTF-Expressionsplasmide p22FTF und p24FTF

|        | <i>EcoRI-HindIII</i> | <i>NdeI-XhoI</i> |
|--------|----------------------|------------------|
| p22FTF | 1,1 kb<br>5,6 kb     | 1,4 kb<br>5,3 kb |
| p24FTF | 1,1 kb<br>5,5 kb     | 1,4 kb<br>5,2 kb |

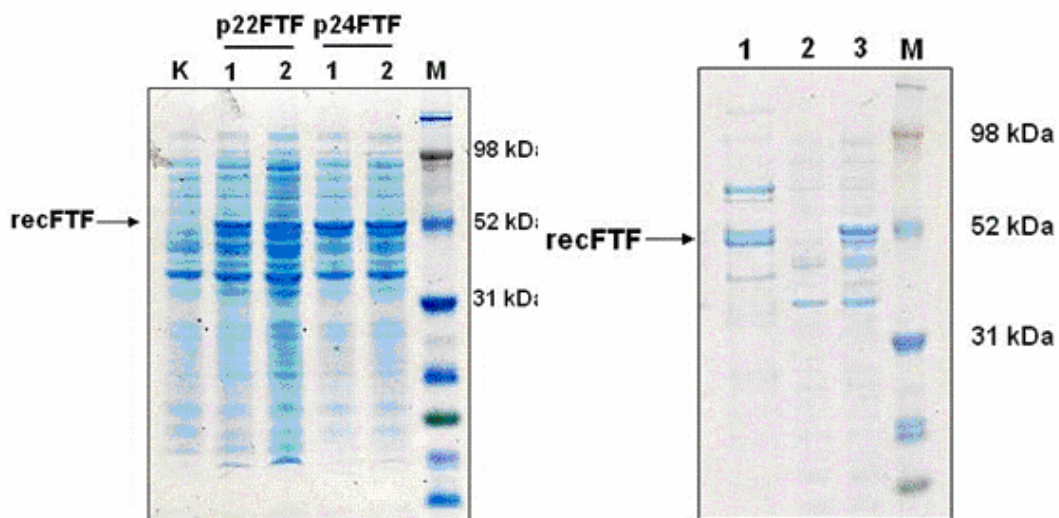




**Abb.13:** Darstellung der recFTF-Expressionsplasmide p22FTF und p24FTF

#### 5.2.4 Expression in *E. coli* (X-Zyme)

Für die Expression wurden jeweils zwei, aus unabhängigen Klonierungen hervorgegangene Plasmide p22FTF und p24FTF in den *E. coli* Stamm BL21(DE3) transformiert. Das Molekulargewicht der rekombinanten FTF beträgt 54 kDa (Volllängenprotein + His6-tag). In diesem Bereich ist im Proteingel bei allen Teststämmen eine deutliche Bande zu erkennen, die bei der Kontrolle fehlt. Anhand der Gesamtproteinextrakte war kein Unterschied zwischen den einzelnen Stämmen zu erkennen.



**Abb.14:** links, SDS-PAGE Analyse der recFTF Expression in *E. coli* BL21(DE3) aufgetragen wurden Gesamt-Proteinextrakte nach 8 h Induktion mit 0,5 mM IPTG K = Kontrollstamm BL21(DE3) + p24; rechts, Analyse der Löslichkeit des recFTF-Proteins, 1: gereinigtes Protein aus recFTF Expressionsstamm BL21(DE3) +

p24FTF, 2: Gesamtprotein aus Kontrollstamm BL21(DE3) + p24, 3: Gesamtprotein aus recFTF Expressionsstamm BL21(DE3) + p24FTF

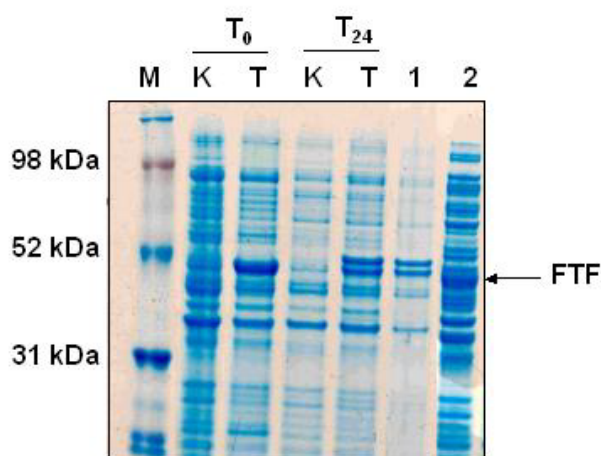
In weiteren Versuchen wurde die Expression durch Variation der Anzucht (Zeitdauer, Temperatur, IPTG-Konzentration) optimiert. Die beste Expression erzielte man mit 24stündiger Anzucht bei 28°C mit 0,5 mM IPTG.

#### 5.2.4.1 FTF aus *B. subtilis* 11871 (X-Zyme)

Eine Ansequenzierung des N-Terminus mit einem Protein aus dem Kulturüberstand von *B. subtilis* 11871 lieferte die Aminosäuresequenz KETNQKP, die identisch ist mit den AS 30-36 von SacB. Dies entspricht dem N-Terminus der reifen SacB-Sequenz nach Abspaltung der 29 AS langen Signalsequenz. Die FTF aus dem Kulturüberstand von *B. subtilis* 11871 zeigte eine Bande im Proteingel bei ca. 48 kDa. Ein um 29 AS verkürztes SacB hat eine Größe von 49,9 kDa (gegenüber 52,9 full length). Mit anderen Levansucrasen und Inulosucrasen gibt es keine Identität. Das bisherige Ergebnis der Sequenzierung wies darauf hin, dass es sich bei der FTF aus Stamm 11871 um ein SacB ähnliches Protein handelt. Daher wurde mit den bereits vorhandenen Primern das FTF-Gen aus *B. subtilis* 11871 genomischer DNA erneut amplifiziert. Mit der DNA aus *B. subtilis* 11871 konnte ein homogenes PCR-Fragment von 1,4 kb Größe erzeugt werden. Das Fragment konnte nach Restriktion mit *NdeI* und *XhoI* in p22 und p24 kloniert werden. Die rekombinanten Plasmide wurden durch Restriktion *NdeI-XhoI* und *EcoRI-HindIII* überprüft. Während die *XhoI-NdeI* Restriktion das erwartete Muster zeigte (1,4 kb), erhielt man mit der *EcoRI-HindIII* Restriktion an Stelle eines 1,1 kb Fragments zwei Fragmente von ca. 400 bp und 700 bp, d.h. es existiert eine zusätzliche *EcoRI* oder *HindIII* Schnittstelle. Einzelrestriktionen mit *HindIII* oder *EcoRI* ergaben, dass die FTF-Sequenz aus *B. subtilis* 11871 eine zweite *HindIII*-Schnittstelle ca. 900 bp stromabwärts vom 5'-Ende besitzt. Diese Schnittstelle fand sich in mehreren rekombinanten Plasmiden, die mit unabhängig voneinander gewonnenen PCR-Produkten hergestellt worden waren, so dass Fehler bei der PCR-Amplifikation auszuschließen sind. Die Restriktionsanalyse lieferte somit einen ersten Hinweis darauf, dass die FTF-Sequenz aus Stamm 11871 von der *sacB*-Sequenz aus Stamm 168 abweicht. Die rekombinanten Plasmide wurden als p22FTF11871 und p2411871FTF bezeichnet.

### 5.2.4.2 Expression des Muteins in *E. coli* (X-Zyme)

Um zu zeigen, dass auch die FTF aus Stamm 11871 in *E. coli* exprimiert wird, wurde das Plasmid p24FTF11871 in *E. coli* BL21(DE3) transformiert.



**Abb.15:** Expression der recFTF11871  
Aufgetragen wurden Gesamtproteinextrakte zum Zeitpunkt der Induktion mit 0,5 mM IPTG (T=0) und nach 24 h (T=24) sowie lösliche (2) und unlösliche (1) Proteinfraction des Teststamms  
K: Kontrollstamm BL21(DE3) + p24  
T: Teststamm BL21(DE3) + p24FTF11871

Das Protein wird so stark exprimiert, dass auch ohne Zugabe von IPTG eine deutliche Proteinbande im Bereich 52 kDa zu erkennen ist (T=0). Nach 24 h Induktion erkennt man eine Doppelbande. Zum Zeitpunkt T=0 sieht man nur eine Bande, die der unteren Bande entspricht. Möglicherweise verläuft die Expression ohne IPTG so langsam, dass bei allen Molekülen die Signalsequenz abgespalten wird. Durch die IPTG-induzierte Überexpression können nicht alle Moleküle modifiziert werden, so dass auch die Precursorform mit Signalsequenz vorliegt.

Ein Großteil des Proteins liegt in unlöslicher Form vor (1). In der löslichen Fraktion (2) ist aber ebenfalls eine Proteinbande zu erkennen. Expressionsanalysen mit Plasmid p22FTF11871 zeigten ein vergleichbares Bild. Der recFTF-Expressionsstamm mit Plasmid p24FTF11871 wurde in Braunschweig auf Enzymaktivität untersucht.

## 5.3 Funktionelles Screening

### 5.3.1 Untersuchungen zur Kinetik und Akzeptorspezifität der FTF aus *B.*

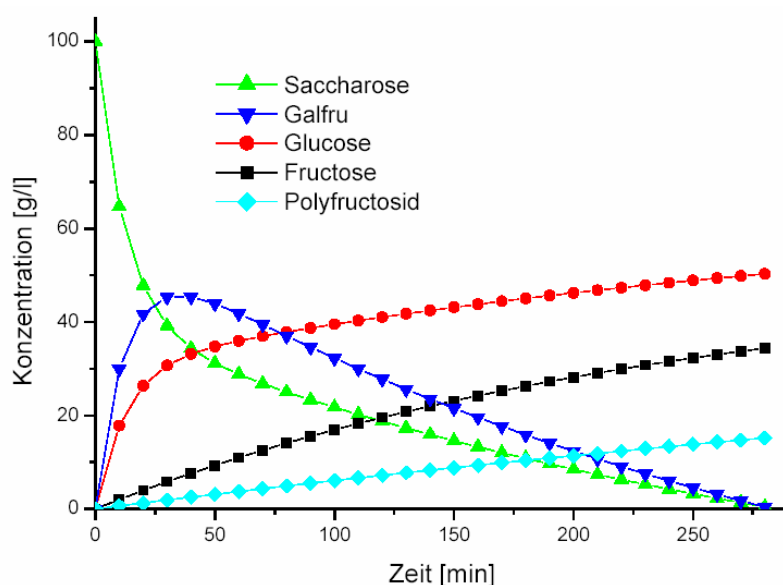
#### *subtilis* 11871 für die Produktion von Saccharose-Analoga (TU BS)

Die Synthese von  $\alpha$ -D-Fructofuranosyl  $\beta$ -D glycopyranosiden (X-Fru) mit der FTF aus *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 wurde erfolgreich auf eine weites Repertoire an Akzeptoren ausgeweitet. Eine große Zahl von Akzeptoren wurden fructosyliert und

einige Produkte in höheren Konzentrationen in Lösung gebildet (Tab. 3). Die einzelnen Reaktionen konnten durch den Einsatz von rekombinantem Enzym immens beschleunigt werden (Tab. 1). So wurde die Synthese von 72h Reaktionszeit auf 12 min reduziert, dies entspricht einer Produktivitätssteigerung um den Faktor 360.

| 200 g/l Galactose/Saccharose, Phosphat-puffer, pH 7,0, 37°C – Einstellung des GG | Reaktionszeit [h] | Raum-Zeit Ausbeute [gL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] | Beschleunigungsfaktor |
|--|-------------------|--|-----------------------|
| • Kulturüberstand aus <i>B. subtilis</i> NCIMB 11871                             | 72,0              | 1,5  | 1 fach                |
| • 50 fach aufkonzentrierter Kulturüberstand aus <i>B. subtilis</i> NCIMB 11871   | 7,5               | 14,4   | 9,5 fach              |
| • 10 fach aufkonzentrierter Proteinüberstand aus <i>E. coli</i>                  | 0,20              | 540,0  | 360 fach              |

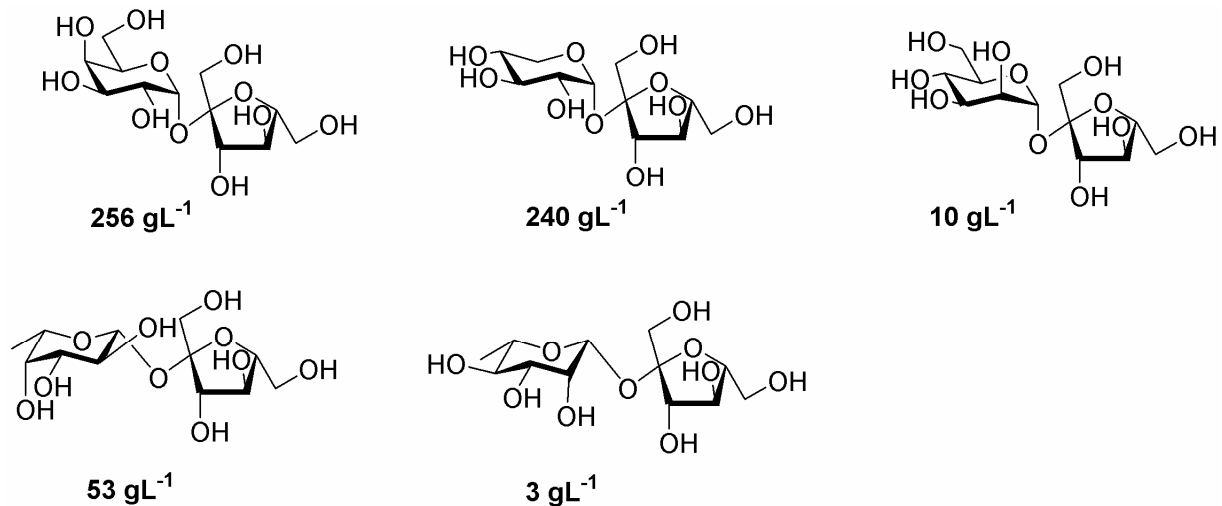
**Tabelle 1:** Beschleunigung der Reaktionszeit für Galactose-Akzeptorreaktionen



**Abb.16:** FTF-Akzeptorreaktion mit Galactose (100g/l) bzw. Saccharose (100g/l) bei 37 °C in Phosphatpuffer (pH 7,0) für den recFTF-Expressionsstamm mit Plasmid p24FTF11871.

Mit einer Reihe von Monosacchariden konnten mittels FTF Disaccharide des Saccharose-Typs (Fructoside, Sac-Analoga) synthetisiert werden. Diese dienten in Folgereaktionen der Gewinnung weiterer neuer Oligosaccharide, insbesondere Fructoside.





**Abb. 17:** Saccharose Analoga aus der FTF-Reaktion.

### 5.3.1.1 Strukturaufklärung

Die absolute Stereochemie sämtlicher Akzeptorprodukte wurde durch die Kombination von <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR eindeutig aufgeklärt. So erscheinen die Signale der Protonen der Saccharose Analoga Gal- ( $J_{1,2}$  3.90 Hz), Xyl- ( $J_{1,2}$  3.60 Hz) und Man-Fru ( $J_{1,2}$  1.87 Hz) bei  $\delta$  5.40 ppm als Dubletts, welche charakteristisch für das anomere Proton einer  $\alpha$ -(1-2)- glycosidischen Bindung sind. Die (1,2)- $\beta$ -D-Fructofuranosid-Bindung wurde durch NOESY Spektroskopie bestätigt. Die Zuordnung der restlichen Kohlen- und Wasserstoffatome erfolgte über 2D-COSY, 2D-NOESY bzw. 2D-HMBC und 2D-HMQC-Spektroskopie. Diese Befunde sind essentiell, da der Bindungstyp X- $\alpha$ (1,2)- $\beta$ -Fructosid für die hohe Bindungsenergie verantwortlich sein dürfte und somit Folgesynthesen mittels GTF und FTF in Wasser ermöglicht.

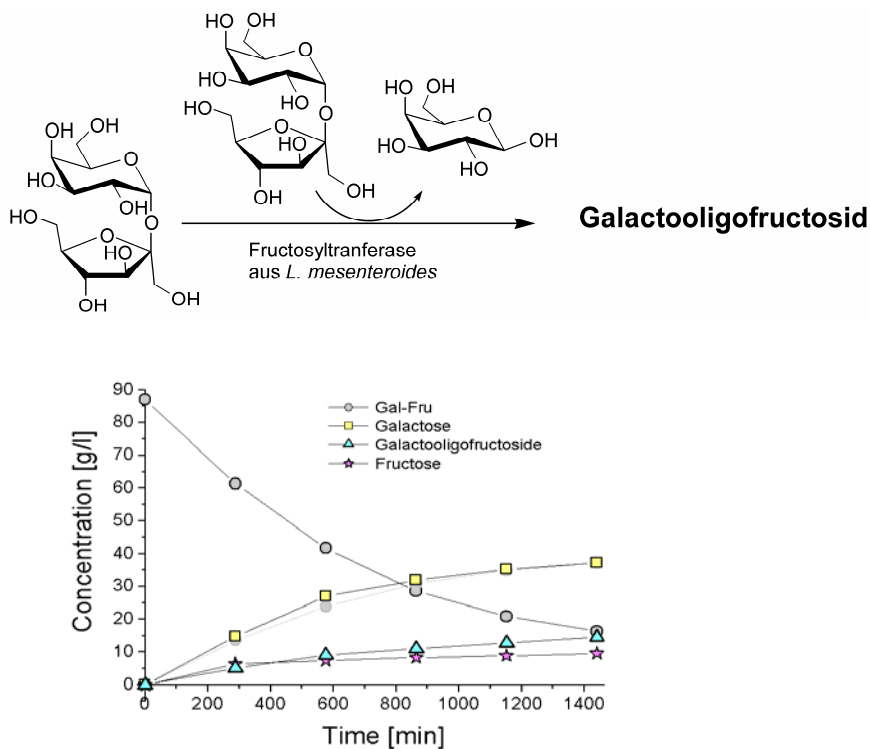
## 5.4 Glycosylierungsreaktionen mit den Bausteinen

Die Saccharose-Analoga Gal-Fru und Xyl-Fru dienen als Substrate für die Umsetzung mit weiteren Glycosyltransferasen. Dazu wurden verschiedene Fructosyltransferasen in ersten Untersuchungen genutzt.

### 5.4.1 FTF aus *Leuconostoc mesenteroides*

Die Wildtyp-Fructosyltransferase aus *Leuconostoc mesenteroides* katalysiert die gewünschte Umsetzung des Saccharose-Analogs Gal-Fru zum Fructosyloligosaccharid. Bei der Reaktion wird Galactose freigesetzt. Die Fructose wird zur Synthese eines Fructooligomers genutzt. Kinetiken dieser Reaktion sind in

Abbildung 18 präsentiert. Das Protein konnte ebenfalls isoliert und ansequenziert werden. Die X-Zyme konnte das Gen isolieren.



**Abb. 18:**

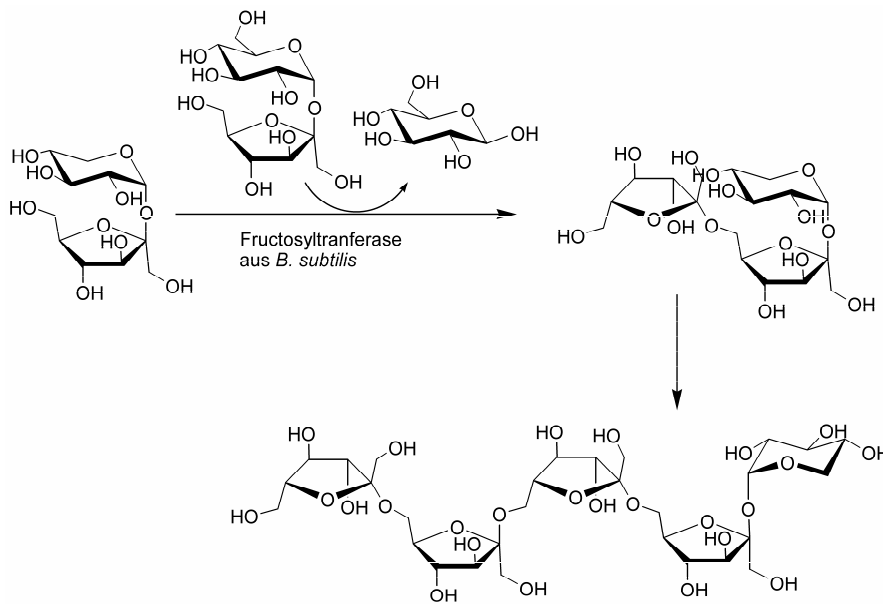
Oben, Synthese eines Galactooligofructosids aus Gal-Fru mit einer FTF aus *L. mesenteroides*.

Unten: Kinetik der Reaktion.

#### 5.4.2 FTF aus *Bacillus subtilis* und *Bacillus subtilis* NCIB 11871

Die Fructosyltransferase aus *Bacillus subtilis* NCIB 11871 wurde erfolgreich in *E. coli* kloniert und exprimiert. Diese Fructosyltransferase setzt Gal-Fru zum Fructooligomer, bevorzugt jedoch zu dem Polyfructosid Levan um.

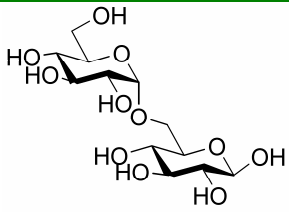
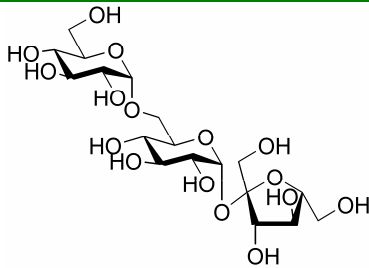
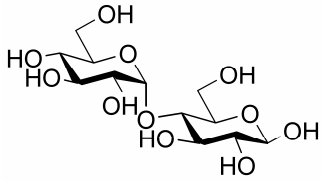
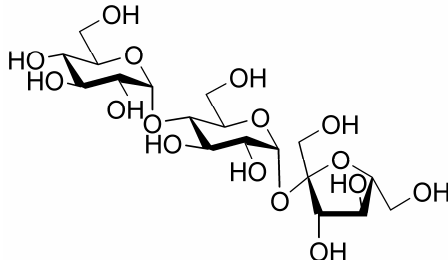
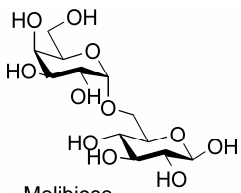
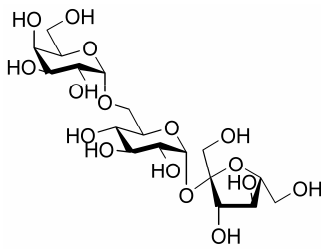
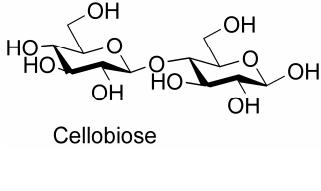
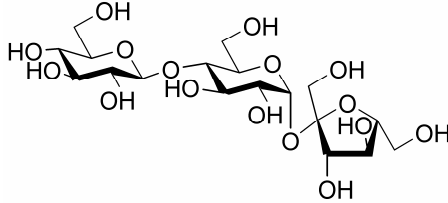
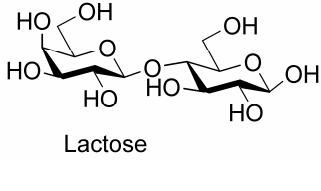
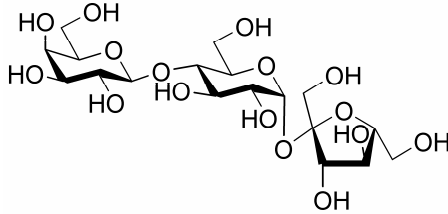
Als weiteres Substrat wird Xyl-Fru akzeptiert. Bei dieser Reaktion entstehen mehrfach fructosylierte Xylose. Laut Massenspektroskopie handelt es sich bei dem Hauptprodukt um ein Pentasaccharid (Xyl(Fru)<sub>4</sub>).



**Abb. 19:**  
Synthese eines  
Xylosyl-  
oligofructosids  
aus Xyl-Fru mit  
einer FTF aus *B.*  
*subtilis*.

#### 5.4.3 Gezielte enzymatische Synthese strukturell unterschiedlicher Trisaccharide

Eine Vielzahl an strukturell sehr diversen Trisacchariden konnte ebenfalls durch die Fructosylierung von Disacchariden mit Hilfe der FTF aus *Bacillus subtilis* NCIB 11871 in hohen Konzentrationen gebildet werden (s. Tabelle 2). Auch hierzu wurde eine komplette strukturelle Charakterisierung mit Hilfe der NMR-Spektroskopie erfolgreich durchgeführt.

| Acceptor  | Product   | Produktausbeuten<br>gL <sup>-1</sup> |
|---|---|--------------------------------------|
| <br>Isomaltose   |    | 218                                  |
| <br>Maltose      |    | 261                                  |
| <br>Melibiose   |   | 157                                  |
| <br>Cellobiose |  | 223                                  |
| <br>Lactose    |  | 72                                   |

**Tab. 2:** Trisaccharide aus der FTF-Reaktion.

## 5.5 Downstream- Processing

Ogleich die Akzeptorprodukte unterschiedliche Eigenschaften bezüglich ihrer Polarität und Konformation aufweisen, konnte ein Trennverfahren etabliert werden, das die Isolierung der unterschiedlichen Akzeptorprodukte ermöglicht. Die Rest-Saccharose wird mit einer rekombinanten Dextranucrase aus *Streptococcus oralis* ( $K_M = 0.9 \text{ mmol}$ ) zu Dextran aufgebaut. Die Abtrennung der verbleibenden

Saccharide erfolgt im zweiten Schritt präparativ chromatographisch an Polystyrol/Divinylbenzolharz PCR 6, einem stark sauren Kationentauscher mit einem Vernetzungsgrad von 6% in der Natriumform.

Dieses auch industriell genutzte Trennmedium wurde hinsichtlich Harzbettlänge, Säulendurchmesser, Durchfluss des Eluents (dest. Wasser) und Temperatur getestet. Als geeignet erwiesen sich eine Harzbettlänge 180 cm, Säulendurchmesser  $\varnothing = 3.9$  cm, Eluent dest. Wasser, 70°C, max. 4.5 mL/ min., max. 400 g/L Gesamtzuckerkonzentration. Ebenso wurde ein Up-Scale auf 25L Säulenvolumen durchgeführt.

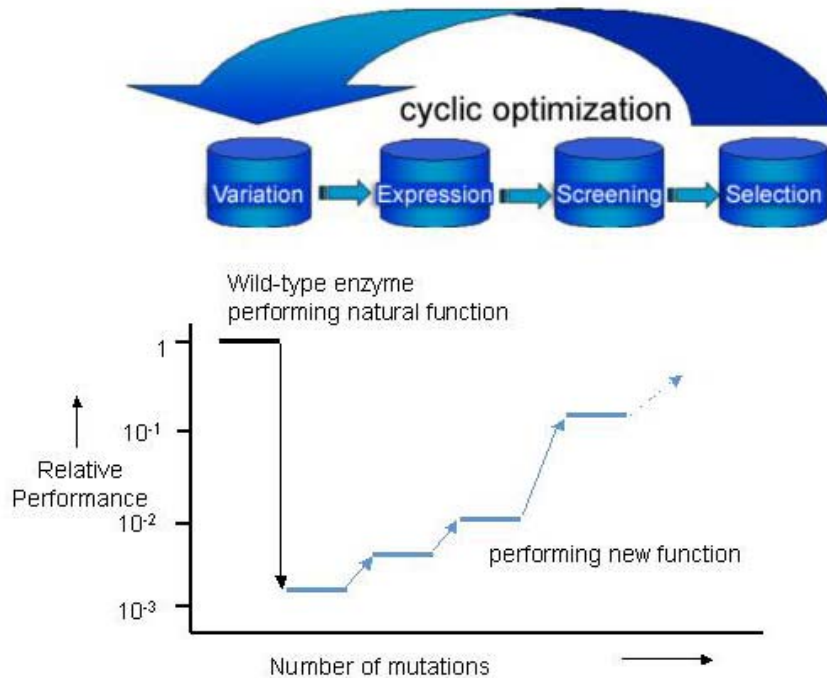
Durch Mutagenese der Fructosyltransferase aus *B. subtilis* wird eine Ausbeutesteigerung für Fuc-Fru, Man-Fru, und Rha-Fru und eine Reduzierung der Akzeptorspezifität angestrebt.

## 5.6 Optimierung der Fructosyltransferasen durch Mutagenese

Durch die Methode der „gerichteten Evolution“ ist eine Enzym-Optimierung möglich, ohne dass intensive Kenntnisse über Struktur und Funktionsmechanismus des zu optimierenden Enzyms erforderlich sind. Die gerichtete Evolution nutzt hierbei die natürliche Kraft der Darwinistischen Evolution: durch Zyklen von zufälliger Mutation, Selektion bzw. „Screening“ und Identifikation des verbesserten Klons können im Labormaßstab optimierte Enzymvarianten erzeugt werden. Natürliche Evolution, über Jahrmillionen optimiert, kann somit innerhalb kurzer Zeit im Reagenzglas zum Erfolg führen.

Ausgangspunkt für die gerichtete Evolution ist ein Wildtyp-Enzym, das eine gewisse Grundeigenschaft aufweist, die durch den *in vitro*-Evolutionprozess schrittweise verbessert wird. In einem ersten Schritt wird das Enzym-kodierende Gen mutiert und somit eine DNA-Bibliothek erstellt (Variation, Abb. 20). Die Mutantenbibliothek wird anschließend in einen Expressionsvektor kloniert und dieser nach Ligation in kompetente Zellen eines Wirtsorganismus (z.B. *E. coli*) transformiert. Die jeweilige Enzymvariante wird durch den Wirt überexprimiert (Expression) und kann auf die gewünschte Eigenschaft hin untersucht werden (Screening). Positive Klone werden identifiziert (Selektion). Die DNA der verbesserten Variante kann erneut einem Mutagenesezyklus unterworfen werden und dadurch ein evolutionärer Druck auf die

gewünschte Eigenschaft ausgeübt werden. Dies führt zu einer weiteren Verbesserung der gewünschten Enzymfunktion.



**Abb. 20:** Enzym-Optimierung mittels gerichteter Evolution.

Für die Optimierung der FTF aus *B. subtilis* wurde die Methode der fehlerhaften PCR („error prone“ PCR) gewählt. Hierbei wird durch Variation der  $MnCl_2$ -Konzentration und der Zusammensetzung der Nukleotidtriphosphate die natürliche Fehlerrate der *taq*-Polymerase von  $0,1-2 \times 10^4$  auf den gewünschten Wert angehoben, der in der Regel zwischen 1-10 Basensubstitutionen pro Kilobase liegt. Je nach Grad der Diversifizierung entstehen unterschiedlich große DNA-Bibliotheken. Die Anzahl der möglichen Varianten **N** bei einem Enzym bestehend aus **X** Aminosäuren mit **M** Aminosäure-Substitutionen kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$N = \frac{19^M X!}{(X - M)! M!}$$

Die folgende Tabelle 3 gibt die theoretische Anzahl von Varianten eines Modell-Enzyms von 300 AS bei Einführung von M Substitutionen wieder:

| Anzahl der AS-Substitutionen (M) | Anzahl der Enzymvarianten (N) |
|----------------------------------|-------------------------------|
| 1                                | 5 700                         |
| 2                                | 16 190 850                    |
| 3                                | 30 557 530 900                |

**Tabelle 3.:** Anzahl der durch Mutagenese erzeugte Varianten.

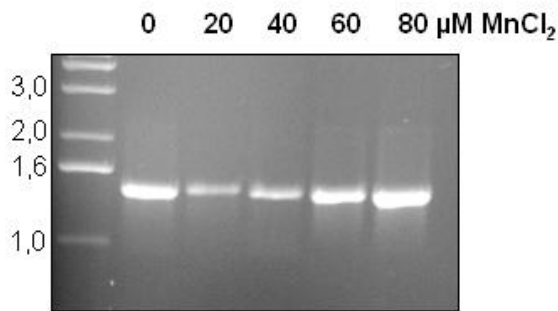
Bereits bei drei AS-Substitutionen übersteigt die Mutantenbank eine Größe von 30,5 Mrd. Varianten und ist mit herkömmlichen Screening-Methoden nicht mehr komplett zu durchmustern.

Die Sequenz der FTF besteht aus 473 AS. Für einen theoretischen Austausch von einer AS müssten 8987 Kone untersucht werden. Aufgrund der Degenerierung des genetischen Codes ist die experimentell erreichbare Größe der Bibliothek ca. um den Faktor 2 kleiner.

Die Gensequenz der FTF liegt auf dem Plasmid p24FTF vor. Das Plasmid wurde als Template für die error prone PCR eingesetzt. Als Reaktionspuffer wurde zunächst ein Standardmutagenesepuffer (7 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris, pH8,3) eingesetzt. Durch Zugabe verschiedener Konzentrationen MnCl<sub>2</sub> (0,1 – 0,4 mM) sowie eines Missverhältnisses zwischen den paarenden Purin- und Pyrimidin-Nukleotidtriphosphaten (0,2 mM dGTP/dATP, 0,1 mM dCTP/dTTP) wurde die Fehlerrate der *taq*-Polymerase erhöht.

Mit KCl im Reaktionspuffer konnte kein Fragment amplifiziert werden. Für die verwendete Polymerase stellte sich Ammoniumsulfat-Puffer mit 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> als optimal für die Amplifizierung des 1,4 kb FTF-Fragments heraus.

Auch die MnCl<sub>2</sub> Konzentration im Ansatz musste weiter optimiert werden, da mit Konzentrationen >0,1 mM im Ansatz kein PCR-Produkt erhalten werden konnte. Gute Ergebnisse erzielte man mit Konzentrationen von 20 – 80 µM MnCl<sub>2</sub> (s. Abb. 21).



**Abb. 11:** error prone PCR der 1,4 kb FTF aus *B. subtilis* mit verschiedenen  $\text{MnCl}_2$ -Konzentrationen.

Für die Expression der mutierten FTF-Gene wurden die PCR-Fragmente mit dem Expressionsvektor p24 ligiert. Hierfür wurden die Amplifikate der PCR-Ansätze mit 20 und 40  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  verwendet, da in diesem Konzentrationsbereich die Randomisierung bei 1-2 AS-Substitutionen liegen sollte. Durch die PCR wurden Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *EcoRI* am 5' und 3' Terminus der Gensequenz eingefügt, die eine forcierte Klonierung in den Vektor p24 erlauben. Alle geschnittenen Fragmente wurden aus Agarosegelen eluiert, um die Wahrscheinlichkeit von Fehlligationen sowie den Anteil an ungeschnittenem Vektor ohne FTF-Insert im Ligationsansatz zu minimieren. Die Ligationsansätze wurden für die Expression in den *E. coli* Wirtstamm BL21(DE3) transformiert, dessen Transformationseffizienz im Vergleich zu herkömmlichen Stämmen wie DH5 $\alpha$  und HB101 gering ist. Um eine ausreichend hohe Anzahl an Klonen für das Screening zu erhalten, wurden Ligation, Transformation und Kompetenz der *E. coli* Zellen weiter optimiert.

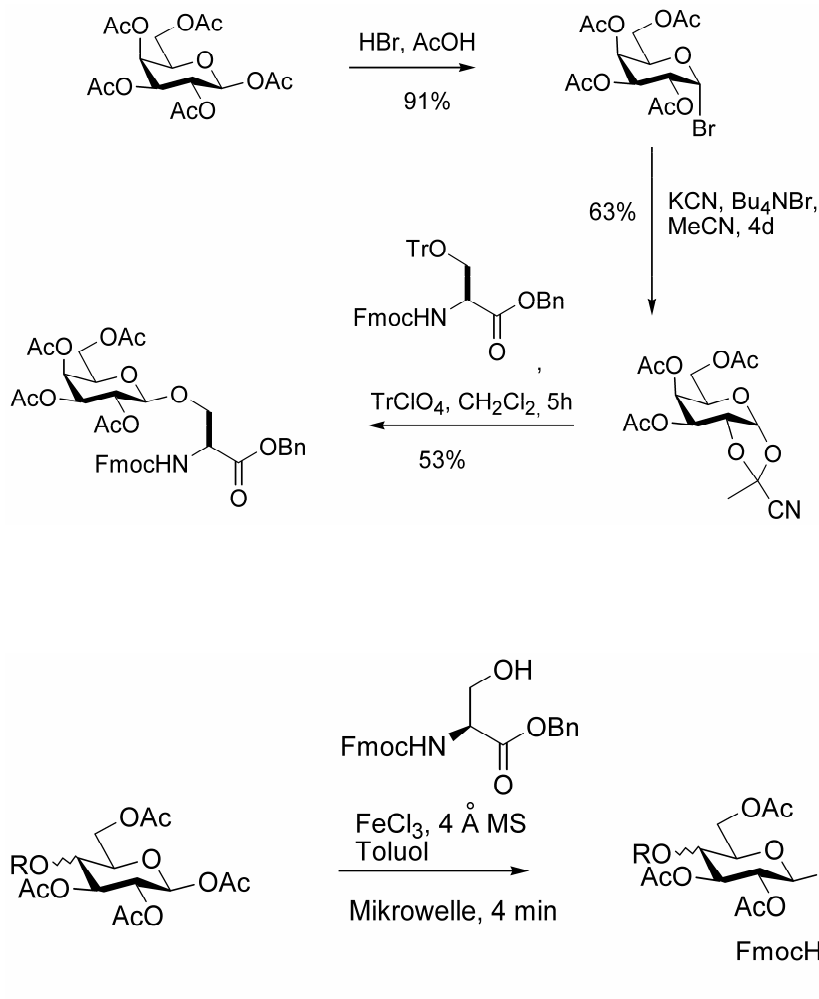
So konnten aus dem ersten Mutagenese-Zyklus insgesamt ca. 12000 Klone mit 90% FTF-Insert gewonnen werden. Diese wurden der TU Braunschweig zur Verfügung gestellt und einem Screening unterzogen. In einem ersten Screening lag das Augenmerk auf Varianten, die aus dem Substrat Saccharose kein Levan (Polymer) bilden. Diese Varianten sind geeignet insbesondere für die Produktion von Oligofructosiden. Es wurden erfolgreich Varianten selektiert, die diese Eigenschaften besitzen. So können aussichtsreich Akzeptorstärke, Akzeptorspektrum und Stabilität optimiert bzw. erweitert werden.



## **5.7 Entwicklung von potentiellen Akzeptoren für Glycosyltransferreaktionen**

### **5.7.1 Glycosylierung von Aminosäuren**

Im Hinblick auf Pharmaprodukte sind potentielle Akzeptoren wie Peptide und Glycopeptide von besonderem Interesse. Sowohl der enzymatische als auch der chemische Zugang zu Glycopeptiden gestaltet sich nach wie vor schwierig. Zwar wurden eine Vielzahl wertvoller, effizienter und auch selektiver Methoden in der Vergangenheit von anderen Arbeitsgruppen zur chemischen Glycosylierung entwickelt, dabei wurden allerdings selten Atomeffizienz, Raum-Zeit-Ausbeute sowie Toxizität der Reagenzien und Lösungsmittel und insbesondere Chromatographie berücksichtigt. Da im Rahmen dieses Projektes glycosylierte Aminosäuren sowie Peptide synthetisiert werden mußten und die literaturbekannten Synthesen unserer Zielprodukte nicht umweltverträglich durchführbar sind, entschieden wir uns für die Entwicklung einer neuen Glycosylierungsmethode. Die Acetylgruppe kommerziell erhältlicher peracetylierter Mono- und Disaccharide am anomeren Zentrum wurde mit umweltverträglichem Eisen(III)chlorid in der Mikrowelle aktiviert und mit dem Serinderivat zur Reaktion gebracht. Dabei entstanden ausschließlich beta-glycosidisch gebundene Aminosäuren. Sowohl Energie, als auch Schadstoffe, wie Lösungsmittel, Säulenmaterial konnten mit der neu entwickelten Methode gegenüber traditionellen um ca. 90% reduziert werden. Ebenfalls wurden die Reaktionszeiten der klassischen Synthesen von oft Tagen mit der neuen Methode auf wenige Minuten reduziert. Die Methode wurde an einer Vielzahl von Sacchariden getestet. Die Produkte werden nach Entschützen zukünftig als Akzeptoren enzymatischen Glycosylierungsversuchen unterzogen. Ebenfalls können derartige Verbindungen mit Peptidsynthetisern in Peptidsequenzen leicht eingebaut werden. Glycosylierte Aminosäuren sind aufgrund des schwierigen synthetischen Zugangs in dieser Form nur sehr begrenzt auf dem Markt kommerziell erhältlich.



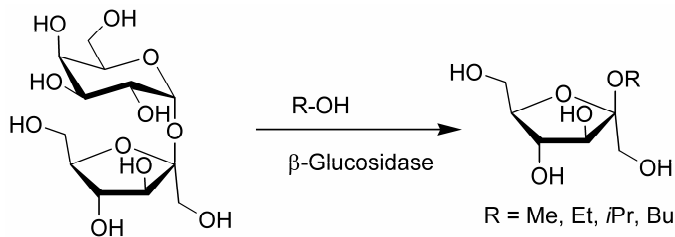
**Abb. 22:**  
Literaturbekannte  
Synthese von  
glycosylierten Serin.

**Abb. 23:** Neu entwickelte, direkte Glycosilierungsmethode.

### 5.7.2 Enzymatische Akzeptorreaktionen von Saccharose-Analoga mit Alkoholen und Aminosäuren zur Synthese von Glycopeptiden und Glycolipiden

Der angestrebten enzymatischen direkten Glycosylierung von Serin und Threonin sollten systematische Untersuchungen zur Glykosylierung von einfachen Alkoholen vorangehen. In ersten Untersuchungen wurden die Saccharose Analoga Gal-Fru und Allosylfructosid als Substrate mit den in der Arbeitsgruppe vorliegenden Wildtyp-Enzymen getestet, die Untersuchungen der Mutanten stehen noch aus. Einige Enzyme haben Gal-Fru hydrolysiert. Die Reaktionsgemische wurden in einem zweiten Test mit den Alkoholen Methanol, Ethanol, Isopropanol und Butanol als mögliche Akzeptoren angereichert. Die  $\beta$ -Glucosidase von Novo hat mit Saccharose Analoga wie Galactosylfructosid sowie Allosylfructosid sämtliche Alkohole

fructosyliert (Abb. 15). Untersuchung zur direkten Glycosylierung der Aminosäuren und Peptide ist Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.



**Abb. 24:** Enzymatische Synthese von Glycoethern bzw. Glycolipiden.

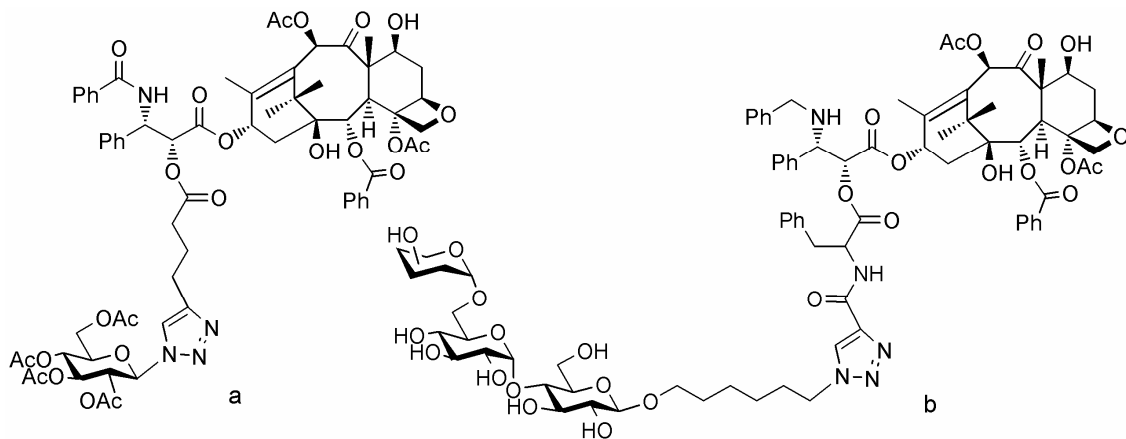
Erste dünn-schichtchromatographische Untersuchungen deuten auf eine geringfügige Fructosylierung der Serinderivate N-Boc-D-Serin-methylester, N-Boc-L-Serin-methylester durch die  $\beta$ -Glucosidase. Allerdings stehen im Fokus der zukünftigen Untersuchungen die Glycosylierung der synthetisierten Aminosäuren und Peptide sowie geeigneter Derivate durch die erzeugten Varianten.

## 5.8 Entwicklung von Oligopeptid-Naturstoff-Hybriden

Kürzlich konnte Aventis mit dem Medikament Taxotere eine Weiterentwicklung von Taxol mit Blockbuster-Charakter zur Behandlung von fortgeschrittenem Brustkrebs auf den Markt bringen. Allerdings ist Taxol<sup>®</sup> sehr schlecht wasserlöslich, so daß es in einem Lösungsvermittler, Cremaphor, verabreicht werden muß, der wiederum durch die Freisetzung von Histaminen Herzarrhythmien und schwere Überempfindlichkeitsreaktionen hervorrufen kann.

Es konnte ein chemoenzymatisches Verfahren zur Synthese eines Glycopeptid-Drug-Hybrids entwickelt werden. Als Wirkstoff wurde Taxol gewählt. Über Taxol selbst sind nur sehr wenige Derivatisierungsmethoden beschrieben. Dies liegt an der geringfügigen Stabilität des Moleküls gegen Säuren und Basen. Deshalb wurden bei der Gestaltung des Glyco-Drug-Hybrids sehr schonende chemische Transformationen durchgeführt. Dabei wurde die Hexinsäure selektiv mit einer Hydroxylgruppe des Taxols verestert. Das endständige Alkin der Hexinseitenkette wurde mit einem Glycosylazid in einer 3+2 Cycloaddition verknüpft. Somit konnte mit diesem Konzept ein Glyco-Drug-Hybrid gewonnen werden. Durch eine mögliche abspaltbare Peptid-Sequenz mit einem endständigen Alkin kann Taxol ebenso gebunden werden. Somit konnte ein neuartiges Wirkstoffsystem entwickelt werden, welches auf dem Konzept der Kopplung von Tumorthapeutika an Glycopeptide basiert, um den Transport zum Tumor und die Aufnahme in die Tumorzellen zu

erleichtern. Eine Abspaltung der Glycosyleinheit durch Glycosidasen und weitere Hydrolyse des Peptids durch Serinproteasen im Körper könnten die Drugs wieder aktivieren. Insgesamt muss noch das Modell präparativ erarbeitet werden, um erste Zytotoxizitätstests durchführen zu können.



**Abb. 25:** Chemo-enzymatisches Verfahren zur Generierung von Glyco-Hybrid-Naturstoffen a) Glyco-Hybrid-Naturstoff, b) in Entwicklung befindliches Glycohybrid.

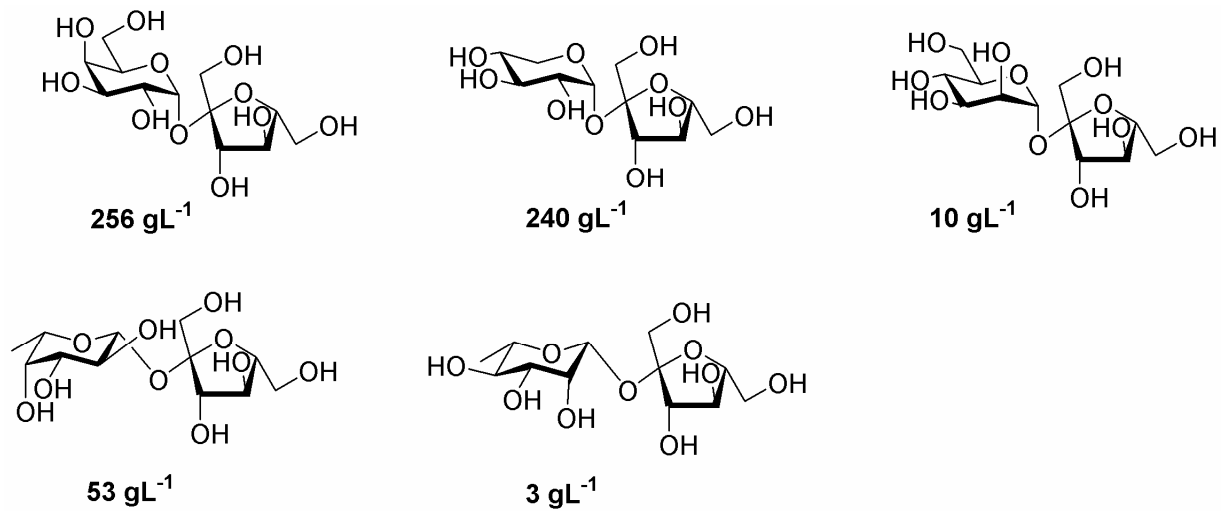
## 6. Öffentlichkeitsarbeit

Ergebnisse wurden in zahlreichen Fachtagungen präsentiert und vorgestellt. Die Kongresse für Präsentationen waren unter anderem die Biocat in Hamburg, die Bioperspectives (Dechema) in Wiesbaden, Systembiotechnologietagung industrieller Prozesse (Dechema) in Braunschweig. Die Ergebnisse wurden ebenfalls in international hochrangigen Fachzeitschriften publiziert. Dies sind unter anderem Carbohydrate Research und Tetrahedron. Einer vollständigen Auflistung im Literaturverzeichnis ist zu entnehmen, dass insgesamt 14 wissenschaftliche Präsentationen erschienen sind.

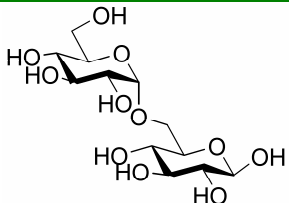
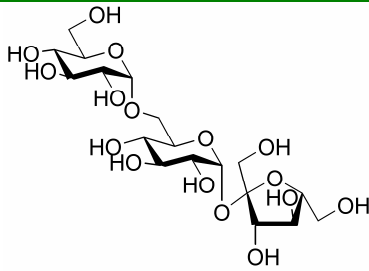
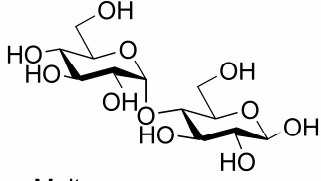
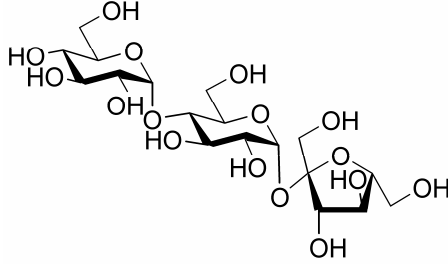
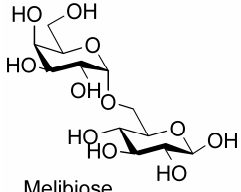
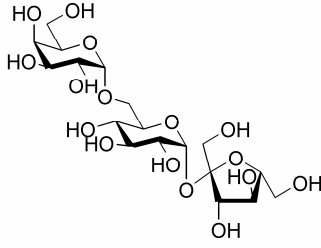
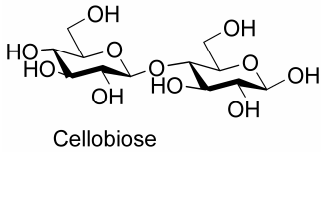
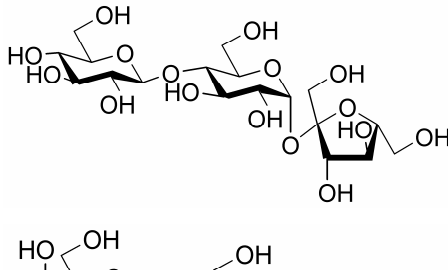
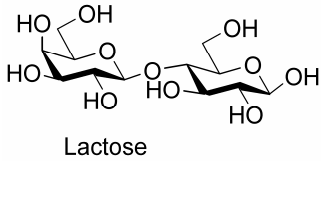
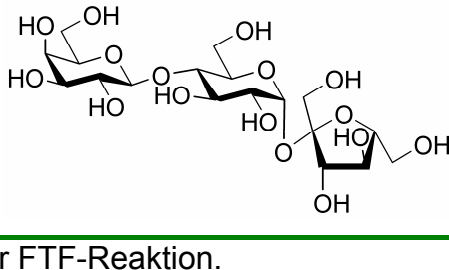
## 7. Diskussion

Eine Vielzahl neuer Produkte und Verfahren sind im Rahmen dieses DBU-Projektes durch die drei Teilprojektteilnehmer erarbeitet worden. Diese umfassen ein breites Spektrum, wie aus Abb. 26 und der angefügten Tabelle 4 hervorgeht. Die Produkte sind potentiell im präparativen Maßstab zugänglich. Sowohl hohe Ausbeuten, als

auch hohe Produkt-Konzentrationen sowie know how zur Aufarbeitung sind dafür erarbeitet worden. Hier ist hervorzuheben, dass diese Produkte chemisch kaum bzw. nur mit sehr großem Aufwand unter Verwendung toxischer Hilfsstoffe herstellbar sind.



**Abb. 26:** Saccharose Analoga aus der FTF-Reaktion.

| Acceptor  | Product   | Produktausbeuten<br>gL <sup>-1</sup> |
|---|---|--------------------------------------|
| <br>Isomaltose   |    | 218                                  |
| <br>Maltose      |    | 261                                  |
| <br>Melibiose   |   | 157                                  |
| <br>Cellobiose |  | 223                                  |
| <br>Lactose    |  | 72                                   |

**Tab. 4:** Produkte aus der FTF-Reaktion.

Ebenso sei auf den zweiten Teil der Arbeiten verwiesen. Hier wurden neue Synthesestrategien entwickelt, die die vereinfachte, umweltfreundliche Glykosylierung von Wirkstoffen ermöglichen. Dabei war das Ziel, sowohl die Bioverfügbarkeit als auch die Selektivität von etablierten Wirkstoffen wie Taxol wesentlich zu verbessern. Enzymatische und chemische Derivatisierungen von Taxol sind in der Literatur wenig beschrieben, obgleich viele Arbeitsgruppen an dieser

Thematik in Industrie und Hochschule arbeiten. Dennoch wurde ein chemoenzymatisches Verfahren entwickelt, das ein flexibles Drug-Design ermöglicht. Erste Produkte dieses Verfahrens sind abgebildet (Abb. 25). Gegenüber einer reinen chemischen Synthese, die möglicherweise nicht mit den zur Zeit entwickelten Methoden zu diesen Produkten führen wird, erlaubt dieser Ansatz unter Vermeidung einer Vielzahl von Schutzgruppenoperationen das Implementieren von Modulen und somit das gezielte Eingehen auf die jeweilige Indikation.

## **8. Fazit**

Im Rahmen dieses Projektes wurden fokussiert zwei funktionierende Strategien entwickelt, die erstens durch ein im Projekt entwickeltes Verfahren die präparative Synthese und Aufarbeitung potentieller Oligosaccharide ermöglicht. Darüber hinaus wurde zweitens, wie beantragt ein chemoenzymatisches Verfahren zur Glykosylierung von Wirkstoffen (Peptide, Taxol) entwickelt.

Die im Zwischenbericht dargestellte überaus erfolgreiche Produktion der Oligosaccharide haben wir zum Anlass genommen, mit Industrievertretern über das Marktpotential und eine mögliche industrielle Implementierung zu diskutieren. Aus ersten Gesprächen hat sich ergeben, dass konkret Lactosucrose, Maltosucrose, Xylosucrose und Rhamnosylsucrose als Produkte interessant sind. Ebenfalls wurde Interesse gezeigt an den Fructosyltransferasen, die teilweise von der X-Zyme mittlerweile vermarktet werden. Die Grundlage für ein mögliches potentielles Interesse an Verfahren ist eine mögliche neuartige Wirkung bzw. bessere Eigenschaften der hier beschriebenen Produkte im Vergleich zu auf dem Markt befindlichen, z.B. Kestosen. Nach Angaben der Industrie wurden Studien in Auftrag gegeben. Die Firma Nestle will zukünftig functional food auf den Markt bringen, das gesundheitsfördernd, präventiv wirkt. Diese Produkte werden zwischen functional food und Pharmaka (Nutraceuticals) eingestuft, entsprechend wird sich der Preis gestalten. Unsere Produkte könnten diese Eigenschaften besitzen. Diesbezüglich wurden wir von Industrievertretern bei der Präsentation unserer Ergebnisse auf der Bioperspective in Wiesbaden angesprochen. Als entscheidend wird die breite Anwendungsmöglichkeit unseres Saccharose-Analoga Verfahrens gesehen. Von Seiten der Industrie ist somit ein großes Interesse bekundet, unsere Produkte und Verfahren zu nutzen. So wurden 6 neuartige Oligosaccharide in erforderlicher Reinheit und Menge innerhalb des Projektes nachproduziert, da sie von

Industrievertretern als interessant eingestuft wurden. Erste biologische Untersuchungen sind durchgeführt. Von den sechs Oligosacchariden sind fünf geeignet für weitere Tests, die Gegenstand durch zur Zeit durchgeführten Arbeiten sind.

Die Firma X-Zyme fokussiert sich auf die Entwicklung und den Einsatz von Enzymen. Nach der erfolgreichen Klonierung und Optimierung der Fructosyltransferase, wird die Technologie Plattform und Herstellung von Oligosacchariden in das Programm aufgenommen. Zur Zeit steht die X-Zyme mit interessierten Unternehmen in Verhandlungsgesprächen. Es besteht die Möglichkeit, diese Technologie Plattform auszulizenzieren oder durch die enge Kooperation zwischen der X-Zyme GmbH und dem Unternehmen Unavera aus Mittenwald die Produkte selbst anzubieten. Die Synthesekapazität zur enzymatischen Herstellung von Oligosacchariden liegt zwischen 100 und 1000 Liter Reaktoren, die bei Bedarf auch nach GMP-Qualität produziert werden können. Die Firma X-Zyme plant, die zu erzeugenden Oligosaccharide als Feinchemikalien mit einem Kooperationspartner anzubieten. Sie besitzen seit kurzem die Lizenz, unter GMP-Richtlinien Fermenter bis zu 1000 l zu betreiben.



## 9. Literatur

- 1) J. Seibel, R. Moraru, S. Götze, S. Na'amnieh, A. Pawlowski, K. Buchholz, Sucrose analogues synthesis with the fructosyltransferase of *B. subtilis* NCIMB 11871 provides mechanistic insights, eingereicht 2006.
- 2) J. Seibel, R. Moraru, S. Götze, Biocatalytic and chemical investigations in the synthesis of sucrose analogues, *Tetrahedron* **2005**, 61, 7081-7086.
- 3) Jürgen Seibel, Lars Hillringhaus, Roxana Moraru, Microwave-assisted Glycosylation for the Synthesis of Glycopeptides, *Carbohydrate Research* **2005**, 340 (3), 507-511.
- 4) J. Seibel, H. Hellmuth, L. Hillringhaus, R. Morarou, S. Götze, Chemoenzymatic Tools for the Synthesis of Oligosaccharides, Glycopeptides and Glycoconjugates, 6<sup>th</sup> CARBOHYDRATE BIOENGINEERING MEETING (CBM6), Barcelona **2005**, Poster presentation, 2005
- 5) J. Seibel, I. - E. Baciú, R. Beine, H.-D. Jördening, K. Buchholz, A Pathway for the Synthesis of Oligosaccharides by the use of non-Leloir glycosyltransferases, 6<sup>th</sup> CARBOHYDRATE BIOENGINEERING MEETING (CBM6), Barcelona **2005**, Lecture presentation
- 6) J. Seibel, R. Moraru, S. Götze, H.-D. Jördening, S. Na'amnieh, L. Hillringhaus, Enzymatic, Chemoenzymatic and Chemical Synthesis of Sucrose Analogues, *BioPerspectives* **2005**, Wiesbaden, Poster presentation
- 7) J. Seibel, H. Hellmuth, H.-D. Jördening, I. - E. Baciú, R. Morarou, R. Beine, K. Buchholz, Sweet Drugs: Synthesis of Oligosaccharides, Glycopeptides and Glycoconjugates by non-Leloir glycosyltransferases, *BioPerspectives* **2005**, Wiesbaden, Lecture presentation
- 8) J. Seibel, S. Götze, R. Moraru, H.-D. Jördening, S. Na'amnieh, K. Buchholz, Synthesis and Isolation of novel Fructooligomers, *Systembiotechnologie für industrielle Prozesse* **2005**, Braunschweig, Poster presentation.
- 9) Jürgen Seibel, Sven Götze, Roxana Moraru, The Power of Enzymes in Oligosaccharide Synthesis, *biocat2004*, Hamburg-Harburg, Poster presentation
- 10) J. Seibel, Sweet Drugs - New Perspectives in the Design of Oligosaccharides, Copenhagen (Måløv), NovoNordisk, November **2003**, invited Lecture presentation
- 11) J. Seibel, K. Buchholz, Chemoenzymatische Synthese von Oligosacchariden und glykosylierten Naturstoffen, *Transkript (Sonderheft Nachhaltige Biokatalyse* **2003**, 9, 40-41.
- 12) S. Pelzer, S.E. Wohlert, A. Vente, Tool-box: tailoring enzymes for bio-combinatorial lead development and as markers for genome-based natural product lead discovery, *Ernst Schering Res Found Workshop.*, **2005**, 51, 233-59.
- 13) A. Bechthold, G. Weitnauer, A. Luzhetskyy, M. Berner, C. Bihlmeier, R. Boll, C. Durr, A. Frerich, C. Hofmann, A. Mayer, I. Treede, A. Vente, M. Luzhetskyy, Glycosyltransferases and other tailoring enzymes as tools for the generation of novel compounds, *Ernst Schering Res Found Workshop.*, **2005**, 51, 147-63.
- 14) T. Weber, K. Welzel, S. Pelzer, A. Vente, W. Wohlleben, Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes, *J Biotechnol.*, **2003**, 106, 221-32.