

**MODULARISIERUNG VON GLYKOSYLTRANSFERASEN UND UNTERSUCHUNGEN ZUM  
AKTIVITÄTSNACHWEIS IM HOCHDURCHSATZVERFAHREN**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Malte Gumz, geb. Büttner

aus Hamburg

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>IV</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 Glykosylierung .....	1
1.2 Glykosyltransferasen .....	2
1.2.1 Aktivität, Spezifität und Lokalisation .....	2
1.2.2 Klassifizierung der Glykosyltransferasen .....	3
1.2.2.1 Strukturelle Superfamilien .....	3
1.2.2.2 Stereospezifische Einteilung.....	7
1.3 Enzym-Engineering mit Glykosyltransferasen .....	10
1.3.1 Austausch einzelner Aminosäuren .....	10
1.3.2 Erzeugung chimärer Glykosyltransferasen .....	11
1.3.3 Strategien zur Herstellung chimärer Glykosyltransferasen .....	15
1.4 Hydrochinon-Glucosyltransferase und Kämpferol-3- <i>O</i> -Galactosyltransferase .....	17
1.4.1 Hydrochinon-Glucosyltransferase .....	17
1.4.2 Kämpferol-3- <i>O</i> -Galactosyltransferase.....	18
1.5 Nachweisverfahren für Glykosyltransferasen.....	19
1.6 Zielstellung.....	21
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>22</b>
2.1 Material .....	22
2.1.1 Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme.....	22
2.1.2 Medien für die Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	22
2.1.3 Indikatorlösungen .....	23
2.1.4 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide .....	23
2.2 Standardmethoden.....	26
2.2.1 Agarosegelelektrophorese .....	26
2.2.2 DNA-Extraktion aus Agarosegelen und DNA-Reinigung.....	26
2.2.3 Extraktion von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	26
2.2.4 Quantifizierung von Plasmid-DNA.....	27
2.2.5 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	27
2.2.6 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	28

2.2.7	Herstellung von Dauerkulturen zur Langzeitlagerung von Bakterienstämmen .....	29
2.2.8	PCR .....	29
2.2.9	Restriktion von DNA-Amplifikaten .....	30
2.2.10	Restriktion und Dephosphorylierung des Vektors pET15b .....	31
2.2.11	Ligation .....	31
2.2.12	Analytischer Restriktionsverdau .....	32
2.2.13	DNA Sequenzierung .....	32
2.2.14	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	32
2.2.15	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Test .....	33
<b>2.3</b>	<b>Herstellung von Expressionskonstrukten .....</b>	<b>34</b>
2.3.1	OE-PCR .....	34
2.3.2	“One-pot fusion“-PCR zur Konstruktion synthetischer $AS_{X,Y}GalT$ Fusionsgene .....	35
2.3.3	Herstellung von Expressionskonstrukten für chimäre ASGalT-cDNAs mittels ITCHY-Technik .....	35
<b>2.4</b>	<b>Produktion rekombinanter Glykosyltransferasen in Schüttelkolben .....</b>	<b>36</b>
2.4.1	Heterologe Expression .....	36
2.4.2	Zellaufschluss .....	37
2.4.3	Affinitätschromatographische Anreicherung .....	38
<b>2.5</b>	<b>Produktion rekombinanter Glykosyltransferasen in Mikroplatten .....</b>	<b>39</b>
2.5.1	Heterologe Expression .....	39
2.5.2	Zellaufschluss .....	39
<b>2.6</b>	<b>Aktivitätsnachweis von Glykosyltransferasen .....</b>	<b>40</b>
2.6.1	Nachweis der pH-Änderung .....	40
2.6.1.1	Proteinextrakt .....	40
2.6.1.2	Koloniescreening .....	40
2.6.2	Nachweis spezifischer Glykoside .....	41
2.6.2.1	Enzymreaktion für die His <sub>6</sub> -Hydrochinon-Glucoyltransferase .....	41
2.6.2.2	Enzymreaktion für die His <sub>6</sub> -Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase .....	42
2.6.2.3	Enzymreaktion von Glykosyltransferasen in Mikroplatten .....	42
2.6.2.4	HPLC-DAD .....	42
2.6.2.5	HPLC-ESI-MS/MS .....	43
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>45</b>
3.1	Heterologe Expression und Nachweis der His <sub>6</sub> -Hydrochinon-Glucoyltransferase .....	45
3.2	Heterologe Expression und Nachweis der His <sub>6</sub> -Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase .....	48

---

<b>3.3 Kultivierung, Extraktion und Nachweis im Mikrolitermaßstab .....</b>	<b>51</b>
<b>3.4 Validierung der Nachweismethoden für Glykosyltransferasen.....</b>	<b>54</b>
3.4.1 Klonscreening mit <i>E. coli</i> -Kolonien durch Nachweis einer pH-Änderung.....	54
3.4.2 Klonscreening in Flüssigkulturen durch Nachweis einer pH-Änderung .....	58
3.4.3 Nachweis der Protonenfreisetzung als Enzymassay im Mikrolitermaßstab .....	60
3.4.4 Nachweis der Glykosylierung mittels HPLC-ESI-MS/MS.....	64
<b>3.5 Erzeugung chimärer Glykosyltransferasen .....</b>	<b>71</b>
3.5.1 Entwicklung der „ <i>One-pot fusion</i> “-PCR .....	71
3.5.2 Anwendung der „ <i>One-pot fusion</i> “-PCR .....	72
3.5.3 Zufällige Fusion mittels ITCHY-Technik .....	75
<b>3.6 Aktivität chimärer Glykosyltransferasen .....</b>	<b>80</b>
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>85</b>
<b>4.1 Herstellung und Nachweis aktiver His<sub>6</sub>-Hydrochinon-Glucosyltransferase und His<sub>6</sub>-Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase.....</b>	<b>85</b>
<b>4.2 Entwicklung von Aktivitätsnachweisen für Glykosyltransferasen.....</b>	<b>86</b>
4.2.1 Universelle Nachweismethoden .....	86
4.2.2 Glykosidnachweis mittels HPLC-DAD und HPLC-ESI-MS/MS.....	90
<b>4.3 Konstruktion chimärer Glykosyltransferasen mit Domänen der Hydrochinon-Glucosyltransferase und der Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase .....</b>	<b>92</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>97</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>99</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>101</b>
<b>ANHANG.....</b>	<b>113</b>