

Biotechnologische Darstellung und strukturelle Charakterisierung fucosylierter Oligosaccharide

Von der Fakultät für Energie-, Verfahrens- und Biotechnik (Fakultät 4)
der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Florian Baumgärtner

aus Freudenstadt, Deutschland

Hauptberichter: Prof. Dr. Georg A. Sprenger

Mitberichter: Prof. Dr. Bernhard Hauer

Tag der mündlichen Prüfung: 09.12.2016

Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart

2016

Meiner Familie

Die experimentellen Arbeiten zu dieser schriftlichen Abhandlung wurden unter Leitung von Prof. Dr. Georg A. Sprenger am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart in den Jahren 2011 bis 2015 durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Baumgärtner F, Seitz L, Sprenger GA, Albermann C (2013) Construction of *Escherichia coli* strains with chromosomally integrated expression cassettes for the synthesis of 2'-fucosyllactose. *Microb. Cell Fact.* 12:40.

Baumgärtner F, Conrad J, Sprenger GA, Albermann C (2014) Synthesis of the human milk oligosaccharide lacto-N-tetraose in metabolically engineered, plasmid-free *E. coli*. *ChemBioChem* 15:1896–1900.

Baumgärtner F, Sprenger GA, Albermann C (2015) Galactose-limited fed-batch cultivation of *Escherichia coli* for the production of lacto-N-tetraose. *Enzyme Microb. Technol.* 75–76:37–43.

Baumgärtner F, Jurzitza L, Conrad J, Beifuss U, Sprenger GA, Albermann C (2015) Synthesis of fucosylated lacto-N-tetraose using whole-cell biotransformation. *Bioorg. Med. Chem.* 23:6799–6806.

Baumgärtner F, Sprenger GA, Albermann C (2015) Biotechnological production of LNT, LNnT and the fucosylated derivatives thereof. Patentanmeldung. WO2016/008602.

Erklärung:

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die in der Arbeit angegebenen Hilfsmittel und Quellen genutzt zu haben. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches gekennzeichnet.

Stuttgart, den 08.07.2016

Florian Baumgärtner

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Georg A. Sprenger bedanken für die hervorragende Betreuung, die Überlassung dieses spannenden Themas, das mir entgegengebrachte Vertrauen, die vielen konstruktiven Besprechungen und Denkanstöße, die tatkräftige Unterstützung in der Durchführung dieser Arbeit und die stete Bereitschaft für Gespräche, Diskussionen und Hilfestellungen.

Bei Prof. Dr. Bernhard Hauer bedanke ich mich herzlich für die freundliche Bereitschaft, die Funktion des Mitberichters zu übernehmen und für die Ermöglichung der Durchführung von LC-MS Analysen an seinem Institut.

Prof. Dr.-Ing. Ralf Takors danke ich herzlichst für die Bereitschaft, den Prüfungsvorsitz zu übernehmen sowie für die Möglichkeit, Zulaufkultivierungen am Zentrum für Bioverfahrenstechnik durchführen zu können.

Ein besonders großes Dankeschön gilt Dr. Christoph Albermann für die Initiation und Leitung des Projekts „BacGlycoTech“, die ansteckende Begeisterung für die Wissenschaft, die ständige Hilfsbereitschaft, die vielen Tipps, Ideen und Hinweise, den Antrieb und die Unterstützung in der Veröffentlichung der Ergebnisse und die sehr gute Freundschaft. Ohne die zahlreichen von ihm zur Verfügung gestellten Informationen und Materialien sowie seine Vorarbeiten und Mitarbeit hätte das Projekt nicht in dieser Weise durchgeführt und die Ergebnisse nicht in wissenschaftlichen Publikationen veröffentlicht werden können.

Für die stets effiziente und freundliche Korrespondenz und die finanzielle Förderung dieser Arbeit in Rahmen des Forschungsprojektes „BacGlycoTech“ des Forschungsprogramms „Glycobiologie/Glykomik“ möchte ich mich bei der Baden-Württemberg Stiftung bedanken.

Bei Prof. Dr. Uwe Beifuß und Dr. Jürgen Conrad des Instituts für Bioorganische Chemie der Universität Hohenheim und bei Dr. Birgit Classen des Instituts für Organische Chemie der Universität Stuttgart bedanke ich mich für die stets sehr gute Zusammenarbeit in der Aufnahme und Auswertung von NMR-Spektren. Für die Aufnahme von Massenspektren gilt mein Dank Katrin Wohlbold und Joachim Trinkner am Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart, während ich Dr. Bernd

Nebel des Instituts für Technische Biochemie sehr dankbar bin für schnelle und unkomplizierte Ermöglichung der Produktanalyse mittels LC-MS. Bei Prof. Dr. Arnd G. Heyer möchte ich mich für die Unterstützung in Fragen zur Kohlenhydrat-Analytik bedanken.

Vielen Dank an Andreas Freund, Alexander Dietrich und Salaheddine Laghrami für die Unterstützung in der Planung und Durchführung der Zulaufkultivierungen am Zentrum für Bioverfahrenstechnik.

Prof. Dr. Stephan C. Bischoff, Dr. Antje Damms Machado und Verena Heidler des Instituts für Ernährungsmedizin der Universität Hohenheim danke ich herzlich für die Untersuchungen der isolierten 2'-Fucosyllactose auf Endotoxin-Vorkommen.

Für die tatkräftige Mitarbeit an dieser Arbeit im Rahmen von studentischen Arbeiten oder als wissenschaftliche Hilfskräfte gilt mein Dank Michaela Eberlein, Yusuf Aden-Farah, Tina Strobel, Iris Zerweck, Sven Beyes und ganz besonders meinem guten Freund Lukas Jurzitza, der in diesem Projekt sowohl an der Synthese von 3-Fucosyllactose als auch an der präparativen Synthese von LNnT und den Produkt-Isolierungen von fucosylierten Derivaten von LNT beteiligt war.

Dr. Hilde Watzlawick und Dr. Josef Altenbuchner des Instituts für Industrielle Genetik der Universität Stuttgart möchte ich für die Ermöglichung der Arbeiten im Isotopenlabor und für die Bereitstellung verschiedener Vektoren danken.

Für die Konstruktion des Stammes *E. coli* JM109 gwBC-F2-cat vor Beginn dieses Projekts danke ich Lyudmila Seitz und für die Erlaubnis der Mitbenutzung ihrer umfassenden Primer-Sammlung gilt mein Dank Dr. Natalie Trachtmann. Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Dr. Lothar Elling dafür, dass er das Plasmid pET16b-His6Propep-cat β 4GalT-1 diesem Projekt zur Verfügung gestellt hat.

Bei all meinen Kollegen des Instituts für Mikrobiologie bedanke ich mich herzlich für die tolle Zusammenarbeit, die spannende Zeit, die gute Arbeitsatmosphäre und die vielen kleinen Hilfestellungen. Besonderer Dank gilt insbesondere Shiromi Baier, Lena Stellmacher, Marcel Wolfer, Behrouz Mohammadi Nargesi, Matthias Schapfl, Sibylle Bürger und Dr. Jung-Won Youn für die vielen angenehmen Diskussionen und die gute Zusammenarbeit im Laboralltag, vor allem aber auch für die tolle Zeit und die vielen

humorvollen Stunden. Dr. Jung-Won Youn möchte ich außerdem für die Ermöglichung der HPLC-Analysen zur Bestimmung von Acetat-Konzentrationen danken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Freunden, insbesondere Dr.-Ing. Jens Buchholz und Florian Ziegler, für den starken Rückhalt, die Unterstützung und die großartigen Zeiten außerhalb des Instituts.

Mein größter Dank gilt meiner Frau Lena, meiner Schwester Bettina und meinen Eltern, die mich in allen Entscheidungen mit viel Geduld unterstützt und mir immer starken Rückhalt gegeben haben! Eure Hilfestellungen und offenen Ohren haben die Fertigstellung dieser Arbeit möglich gemacht.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|--------------|
| Abbildungsverzeichnis | XV |
| Tabellenverzeichnis | XVIII |
| Symbol- und Abkürzungsverzeichnis | XX |
| Zusammenfassung..... | 1 |
| Abstract..... | 3 |
| 1. Theoretischer Hintergrund und Zielsetzung..... | 5 |
| 1.1. Humane Milcholigosaccharide (HMOs)..... | 5 |
| 1.1.1. Entdeckung und erste Charakterisierung humaner Milcholigosaccharide..... | 5 |
| 1.1.2. Struktur | 6 |
| 1.1.3. Vorkommen | 11 |
| 1.1.4. Physiologische Effekte | 16 |
| 1.2. Extraktion und Synthese humaner Milcholigosaccharide..... | 21 |
| 1.2.1. Extraktion aus Milch | 22 |
| 1.2.2. Chemische Synthese..... | 23 |
| 1.2.3. Chemo-enzymatische und enzymatische Synthese | 25 |
| 1.2.4. Ganzzellsynthese von HMOs..... | 33 |
| 1.3. Analytik humaner Milcholigosaccharide..... | 40 |
| 1.4. <i>Escherichia coli</i> als Syntheseorganismus..... | 42 |
| 1.4.1. Gentechnische Modifikationen und Proteinexpression | 44 |
| 1.4.2. Aufnahme und Metabolismus verschiedener Kohlenstoffquellen..... | 45 |
| 1.5. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit..... | 49 |
| 2. Material und Methoden..... | 53 |
| 2.1. Material | 53 |
| 2.1.1. Eingesetzte Bakterienstämme, Plasmide und Gene..... | 53 |
| 2.1.2. Eingesetzte Substanzen und Reagenzien | 58 |
| 2.1.3. Medien | 60 |
| 2.2. Molekularbiologische Arbeiten | 63 |
| 2.2.1. Plasmid-Isolierung..... | 63 |
| 2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 63 |
| 2.2.3. DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen | 66 |
| 2.2.4. Analyse von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese..... | 66 |

| | |
|---|-----------|
| 2.2.5. DNA-Sequenzierung..... | 67 |
| 2.2.6. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen..... | 67 |
| 2.2.7. Entfernen endständiger Phosphatreste von DNA-Fragmenten..... | 67 |
| 2.2.8. Entfernen der Einzelstrangüberhänge von DNA-Fragmenten..... | 67 |
| 2.2.9. Ligation linearer DNA-Fragmente..... | 68 |
| 2.2.10. Transformation von DNA mittels chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen..... | 68 |
| 2.2.11. Transformation von DNA mittels Elektroporation..... | 69 |
| 2.2.12. Chromosomale Integration mittels homologer Rekombination..... | 70 |
| 2.3. Proteinanalysen, enzymatische Umsätze und Aktivitätsnachweise..... | 73 |
| 2.3.1. Kultivierung und Zellaufschluss..... | 73 |
| 2.3.2. Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford..... | 73 |
| 2.3.3. Expressionsanalyse mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese..... | 74 |
| 2.3.4. Analyse von Enzymaktivitäten..... | 75 |
| 2.3.5. Analyse der Lactose-Aufnahme..... | 77 |
| 2.3.6. Spaltung von 2',3-Difucosyllactose mit AfcA zur Erzeugung von 3-Fucosyllactose...79 | |
| 2.3.7. Spaltung von Lacto-N-neotetraose mit β -Galactosidase zur Erzeugung von Lacto-N-triose II..... | 80 |
| 2.4. Plasmid- und Stammkonstruktion..... | 80 |
| 2.4.1. Plasmid-Konstruktion..... | 80 |
| 2.4.2. Konstruktion Plasmid-freier Synthesestämme..... | 82 |
| 2.5. Kultivierung von <i>E. coli</i>..... | 84 |
| 2.5.1. Synthese von Fucosyllactosen in Schüttelkolben..... | 84 |
| 2.5.2. Synthese von LNT II, LNT und LNnT in Schüttelkolben..... | 84 |
| 2.5.3. Synthese fucosylierter Derivate von LNT und LNnT in Schüttelkolben..... | 86 |
| 2.5.4. Zulaufkultivierung im Rührkesselreaktor..... | 87 |
| 2.5.5. Dauerkultur zur Analyse der genetischen Stabilität eingebrachter Gene..... | 89 |
| 2.6. Isolierung von Oligosacchariden..... | 90 |
| 2.6.1. Probenvorbereitung..... | 90 |
| 2.6.2. Aktivkohle/Celite-Chromatographie..... | 90 |
| 2.6.3. Größenausschlusschromatographie..... | 91 |
| 2.6.4. Reduktion der Endotoxin-Belastung mittels C18-SPE..... | 91 |
| 2.7. Analytische Methoden..... | 92 |
| 2.7.1. Bestimmung der Zelldichte in Kulturen..... | 92 |
| 2.7.2. Oligosaccharid-Analytik mittels Dünnschichtchromatographie..... | 92 |
| 2.7.3. Oligosaccharid-Analytik mittels HPLC..... | 93 |
| 2.7.4. Analytik Nukleotid-aktivierter Zucker mittels HPLC..... | 95 |
| 2.7.5. Konzentrationsbestimmung von Acetat und Glycerin..... | 97 |
| 2.7.6. Strukturverifikation der synthetisierten Oligosaccharide..... | 97 |
| 2.7.7. Statistische Relevanz der Ergebnisse und Berechnung von Abweichungen..... | 99 |

| | |
|--|------------|
| 3. Ergebnisse | 101 |
| Teil I Synthese von Fucosyllactosen | 101 |
| 3.1. 2'-Fucosyllactose (2'-FL)..... | 101 |
| 3.1.1. Stammkonstruktion | 102 |
| 3.1.2. Produktbildung in Abhängigkeit der Kopienzahl des <i>futC</i> -Gens | 105 |
| 3.1.3. Erhöhung der intrazellulären GDP-L-Fucose-Syntheseleistung | 108 |
| 3.1.4. Bildung von 2'-FL in Abhängigkeit der GDP-L-Fucose-Syntheseleistung | 109 |
| 3.1.5. Genetische Stabilität von <i>E. coli</i> JM109 gwBC-F2-cat..... | 114 |
| 3.1.6. Zulaufkultivierung von JM109 gwBC-F2-cat zur Synthese von 2'-FL..... | 115 |
| 3.1.7. Produktisolierung und Produktcharakterisierung | 118 |
| 3.2. 3-Fucosyllactose | 122 |
| 3.2.1. Ganzzell-Synthese von 3-FL..... | 122 |
| 3.2.2. Enzymatische Synthese von 3-FL aus 3,2'-Difucosyllactose | 124 |
| Teil II Synthese weiterer HMO-Kernstrukturen | 127 |
| 3.3. Lacto-N-tetraose (LNT) | 127 |
| 3.3.1. Anpassung der Oligosaccharid-Analytik | 128 |
| 3.3.2. Stammkonstruktion zur Synthese von Lacto-N-triose II (LNT II) | 129 |
| 3.3.3. Lactose-Aufnahme | 133 |
| 3.3.4. Stammkonstruktion zur Synthese von Lacto-N-tetraose (LNT)..... | 135 |
| 3.3.5. Synthese von LNT II und LNT in Schüttelkolben-Kulturen | 136 |
| 3.3.6. Intrazelluläre UDP-Galactose-Konzentrationen in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle | 138 |
| 3.3.7. Synthese von LNT in Schüttelkolben-Kulturen mit Galactose..... | 139 |
| 3.3.8. Synthese in der Zulaufkultivierung | 143 |
| 3.3.9. Produktisolierung und Produktcharakterisierung | 147 |
| 3.4. Lacto-N-neotetraose (LNnT) | 149 |
| 3.4.1. Stammkonstruktion | 149 |
| 3.4.2. Synthese in Schüttelkolben-Kulturen | 151 |
| 3.4.3. Produktisolierung und Produktcharakterisierung | 153 |
| Teil III Synthese fucosylierter Derivate von LNT und LNnT | 155 |
| 3.5. Fucosylierte Derivate von LNT | 156 |
| 3.5.1. Stammkonstruktion | 157 |
| 3.5.2. Synthese von Lacto-N-fucopentaose I (LNFP I)..... | 159 |
| 3.5.3. Synthese von Lacto-N-difucohexaose II (LNDFH II)..... | 162 |
| 3.5.4. Produktisolierung und Produktcharakterisierung | 163 |

| | |
|--|------------|
| 3.6. Fucosylierte Derivate von LNnT | 166 |
| 3.6.1. Stammkonstruktion | 167 |
| 3.6.2. Schüttelkolben-Kulturen zur Synthese fucosylierter Typ II-Oligosaccharide | 169 |
| 4. Diskussion | 173 |
| 4.1. Stammkonstruktion | 174 |
| 4.1.1. Wahl der Ausgangsstämme..... | 174 |
| 4.1.2. Methode der chromosomalen Integration..... | 175 |
| 4.1.3. Stämme zur Synthese von 2'-FL..... | 176 |
| 4.1.4. Genetische Stabilität des 2'-FL-Produzenten JM109 gwBC-F2-cat..... | 180 |
| 4.1.5. Stämme zur Synthese von LNT und LNnT | 181 |
| 4.1.6. Stämme zur Synthese fucosylierter Derivate von LNT und LNnT | 185 |
| 4.2. Ganzellsynthese von HMOs..... | 186 |
| 4.2.1. Synthese von Fucosyllactose..... | 187 |
| 4.2.2. Kernstrukturen | 193 |
| 4.2.3. Fucosylierte größere Strukturen..... | 200 |
| 4.2.4. Extrazelluläre Vorkommen von HMOs..... | 203 |
| 4.3. Produktisolierung und Analytik von HMOs..... | 207 |
| 5. Ausblick..... | 209 |
| A. Anhang..... | 213 |
| A.1 Strukturverifikation der Produkte..... | 213 |
| A.1.1. 2'-Fucosyllactose (2'-FL)..... | 213 |
| A.1.2. 3-Fucosyllactose (3-FL)..... | 215 |
| A.1.3. Lacto-N-triose II (LNT II) | 216 |
| A.1.4. Lacto-N-tetraose..... | 218 |
| A.1.5. Lacto-N-neotetraose | 220 |
| A.1.6. Lacto-N-fucopentaose I (LNFP I) | 223 |
| A.1.7. Lacto-N-difucohexaose II (LNDFH II) | 225 |
| A.1.8. Fucosylierte Lacto-N-triose II | 228 |
| A.1.9. Lacto-N-difucoheptaose (LNDFHep)..... | 231 |
| A.2 Produkte der Synthesen fucosylierter Typ II-Oligosaccharide | 234 |
| A.3 Weiterer Anhang | 237 |
| Literatur..... | 243 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des allgemeinen Aufbaus humaner Milcholigosaccharide (Bode, 2012; Boehm & Stahl, 2003). | 8 |
| Abbildung 1.2: Struktureller Aufbau ausgewählter humaner Milcholigosaccharide (Kobata, 2010). | 9 |
| Abbildung 1.3: Durch Glycosyltransferasen katalysierte Reaktionen. | 26 |
| Abbildung 1.4: Natürliche bakterielle Synthesewege von GDP-L-Fucose..... | 31 |
| Abbildung 1.5: Oligosaccharid-Synthesen in Biotransformationen mittels Kopplung mikrobieller Stämme..... | 34 |
| Abbildung 1.6: Ganzzell-Synthese von 3'-Sialyllactose (3'-SL) in <i>E. coli</i> , modifiziert von Han <i>et al.</i> (2012). | 35 |
| Abbildung 1.7: Ganzzellsynthesen von LNnT und fucosylierten Derivaten von LNnT in <i>E. coli</i> | 38 |
| Abbildung 1.8: Reaktionsmechanismus der reduktiven Aminierung von Oligosacchariden zur Fluoreszenzmarkierung. | 42 |
| Abbildung 1.9: Katabolitrepression am <i>lac</i> -Operon durch Induktor-Ausschluss. | 49 |
| Abbildung 2.1: Prinzip der chromosomalen Integration von Expressionskassetten, modifiziert von Albermann <i>et al.</i> (2010). | 72 |
| Abbildung 3.1: Stoffwechselwege zur Ganzzell-Synthese von 2'-Fucosyllactose in <i>E. coli</i> | 103 |
| Abbildung 3.2: Genotypen einer Auswahl der zur Synthese von 2'-Fucosyllactose erstellten, Plasmid-freien <i>E. coli</i> Stämme. | 104 |
| Abbildung 3.3: Synthese von 2'-FL in <i>E. coli</i> Stämmen mit unterschiedlicher Kopienzahl des Fucosyltransferase-Gens <i>futC</i> | 106 |
| Abbildung 3.4: Analyse intrazellulärer GDP-L-Fucose-Konzentrationen von <i>E. coli</i> Stämmen mit bzw. ohne Salvage Pathway..... | 109 |
| Abbildung 3.5: Synthese von 2'-FL mit <i>E. coli</i> Stämmen mit bzw. ohne Salvage Pathway für GDP-L-Fucose. | 110 |
| Abbildung 3.6: Vergleich der Produktausbeuten und intrazellulären 2'-FL-Konzentrationen verschiedener Plasmid-freier Stämme mit und ohne <i>fkp</i> Expression..... | 112 |
| Abbildung 3.7: Anteil der 2'-FL im Kulturüberstand 4 h bzw. 24 h nach Induktion..... | 113 |
| Abbildung 3.8: Produktivität eines über 100 Generationen kultivierten Stammes JM109 gwBC-F2-cat. | 114 |
| Abbildung 3.9: Zulaufprofile und Produktbildung der Glycerin-limitierten Zulaufkultivierung von <i>E. coli</i> JM109 gwBC-F2-cat im 10 Liter-Maßstab zur Synthese von 2'-Fucosyllactose. | 117 |
| Abbildung 3.10: Entwicklung des Sauerstoffpartialdrucks und der Produktausbeuten der Zulaufkultivierung von <i>E. coli</i> JM109 gwBC-F2-cat zur Synthese von 2'-Fucosyllactose. | 118 |
| Abbildung 3.11: Isolierung von im Zulaufverfahren synthetisierter 2'-Fucosyllactose. | 120 |
| Abbildung 3.12: Strukturen des α - und β -Anomers von 2'-Fucosyllactose..... | 121 |
| Abbildung 3.13: Strukturen des α - und β -Anomers von 3-Fucosyllactose..... | 125 |
| Abbildung 3.14: Stoffwechselwege zur Ganzzell-Synthese von Lacto-N-tetraose in <i>E. coli</i> unter Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen. | 130 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 3.15: Expressionsanalyse der Plasmid-kodierten, rekombinant in <i>E. coli</i> LJ110 genutzten Gene. | 131 |
| Abbildung 3.16: Genotypen einer Auswahl der zur Synthese von Lacto-N-triose II, Lacto-N-tetraose und Lacto-N-neotetraose erstellten, Plasmid-freien Stämme. | 132 |
| Abbildung 3.17: Lactose-Aufnahme verschiedener Stämme mit und ohne Lactose-Permease-Gen. | 134 |
| Abbildung 3.18: Intrazelluläre Konzentrationen Nukleotid-aktivierter Hexosen bzw. Hexosaminen im Stamm <i>E. coli</i> LJ-AYO-cat. | 139 |
| Abbildung 3.19: Wachstum von <i>E. coli</i> LJ-AYO-cat in Minimalmedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen. | 140 |
| Abbildung 3.20: Synthese von LNT II und LNT mit <i>E. coli</i> LJ-AYO-cat unter Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen und Kohlenstoffquellen-Kombinationen. | 142 |
| Abbildung 3.21: Zulaufprofile, Wachstum und Produktbildung der Galactose-limitierten Zulaufkultivierung von <i>E. coli</i> LJ-AYO-cat im 10 Liter-Maßstab zur Synthese von LNT. | 144 |
| Abbildung 3.22: Entwicklung des Sauerstoffpartialdrucks und der Produktausbeuten der Zulaufkultivierung von <i>E. coli</i> LJ-AYO-cat zur Synthese von LNT II und LNT. | 145 |
| Abbildung 3.23: Strukturen von Lacto-N-triose II und Lacto-N-tetraose. | 148 |
| Abbildung 3.24: Struktur von Lacto-N-neotetraose. | 153 |
| Abbildung 3.25: Stoffwechselwege zur Ganzzell-Synthese fucosylierter Derivate von LNT in <i>E. coli</i> | 156 |
| Abbildung 3.26: Genotypen einer Auswahl der zur Synthese fucosylierter Lacto-N-tetraose-Derivate erstellter, Plasmid-freier Stämme. | 158 |
| Abbildung 3.27: Strukturen von HMOs Lacto-N-fucopentaose I (LNFP I) und Lacto-N-difucohexaose II (LNDFH II) sowie von fucosylierter Lacto-N-triose II und Lacto-N-difucoheptaose (LNDFHep). | 165 |
| Abbildung 3.28: Genotypen einer Auswahl der zur Synthese fucosylierter Derivate von Lacto-N-neotetraose erstellter, Plasmid-freien Stämme. | 168 |
| Abbildung 4.1: Schema der Klonierung und chromosomalen Integration rekombinanter Gene. | 176 |
| Abbildung 4.2: Vergleich der Methoden zur Erhöhung der GDP-Fuc-Syntheseleistung in <i>E. coli</i> für die Synthese von 2'-FL. | 178 |
| Abbildung 4.3: Entfernungen zwischen den Integrationen im Chromosom von 2'-FL-synthetisierenden <i>E. coli</i> Stämmen. | 180 |
| Abbildung 4.4: Entfernungen zwischen den Expressionskassetten im Chromosom von <i>E. coli</i> Stämmen zur Synthese von LNT und fucosylierten LNT-Derivaten. | 184 |
| Abbildung 4.5: Vergleich verschiedener Ganzzellsynthesen von GDP- β -L-Fucose und 2'-Fucosyllactose. | 190 |
| Abbildung A.1: ESI-Massenspektrum der synthetisierten und isolierten 2'-Fucosyllactose. | 213 |
| Abbildung A.2: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) der synthetisierten 2'-Fucosyllactose. | 213 |
| Abbildung A.3: ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) der synthetisierten 2'-Fucosyllactose. | 214 |
| Abbildung A.4: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) der synthetisierten 3-Fucosyllactose. | 215 |
| Abbildung A.5: ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) der synthetisierten 3-Fucosyllactose. | 215 |
| Abbildung A.6: ESI-Massenspektrum der synthetisierten und isolierten Lacto-N-triose II. | 216 |
| Abbildung A.7: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) der synthetisierten Lacto-N-triose II. | 217 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung A.8: ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) der synthetisierten Lacto-N-triose II..... | 217 |
| Abbildung A.9: ESI-Massenspektrum der synthetisierten und isolierten Lacto-N-tetraose..... | 218 |
| Abbildung A.10: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) der synthetisierten Lacto-N-tetraose..... | 219 |
| Abbildung A.11: ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) der synthetisierten Lacto-N-tetraose..... | 219 |
| Abbildung A.12: ESI-Massenspektrum der synthetisierten und isolierten Lacto-N-neotetraose. | 220 |
| Abbildung A.13: ESI-Massenspektrum der bei der LNnT-Reinigung aufgefangenen Nebenprodukt-Fraktion..... | 220 |
| Abbildung A.14: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) der synthetisierten Lacto-N-neotetraose..... | 221 |
| Abbildung A.15: ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) der synthetisierten Lacto-N-neotetraose..... | 222 |
| Abbildung A.16: ESI-Massenspektrum der synthetisierten und isolierten Lacto-N-fucopentaose I. | 223 |
| Abbildung A.17: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) der synthetisierten Lacto-N-fucopentaose I. ... | 224 |
| Abbildung A.18: ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) der synthetisierten Lacto-N-fucopentaose I. ... | 224 |
| Abbildung A.19: ESI-Massenspektrum der synthetisierten und isolierten Lacto-N-difucohexaose II..... | 225 |
| Abbildung A.20: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) der synthetisierten Lacto-N-difucohexaose II. | 227 |
| Abbildung A.21: ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) der synthetisierten Lacto-N-difucohexaose II. | 227 |
| Abbildung A.22: ESI-Massenspektrum der synthetisierten und isolierten fucosylierten Lacto-N- triose II..... | 228 |
| Abbildung A.23: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) der synthetisierten fucosylierten LNT II..... | 229 |
| Abbildung A.24: ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) der synthetisierten fucosylierten LNT II..... | 230 |
| Abbildung A.25: ESI-Massenspektrum der synthetisierten Lacto-N-difucoheptaose..... | 231 |
| Abbildung A.26: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) der synthetisierten Lacto-N-difucoheptaose... | 233 |
| Abbildung A.27: ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) der synthetisierten Lacto-N-difucoheptaose.. | 233 |
| Abbildung A.28: ESI-Massenspektrum des zellfreien Extrakts von LJ-AYBF-cat zum Endpunkt der Kultur zur Synthese von Typ II-Oligosacchariden. | 234 |
| Abbildung A.29: ESI-Massenspektrum des zellfreien Extrakts von LJ-AYBFC-cat zum Endpunkt der Kultur zur Synthese von α 1,2-fucosylierten Typ II-Oligosacchariden..... | 235 |
| Abbildung A.30: ESI-Massenspektrum des zellfreien Extrakts von LJ-AYBFA-cat zum Endpunkt der Kultur zur Synthese von α 1,3-fucosylierten Typ II-Oligosacchariden..... | 236 |
| Abbildung A. 31: HPLC-Chromatogramme kommerzieller bzw. selbst synthetisierter HMO- Standards..... | 240 |
| Abbildung A.32: Wachstum von Kulturen des Stammes <i>E. coli</i> LJ-AYO-cat in Minimalmedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen..... | 240 |
| Abbildung A.33: Wachstum des Stammes <i>E. coli</i> LJ-AYB-cat in Minimalmedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen..... | 241 |
| Abbildung A.34: Wachstum verschiedener Typ II-HMO synthetisierender <i>E. coli</i> Stämme in Minimalmedium mit Glucose und Casaminosäuren..... | 241 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tabelle 1.1: Monosaccharid-Einheiten humaner Milcholigosaccharide..... | 7 |
| Tabelle 1.2: Vergleich der Zusammensetzung von humaner und boviner Milch..... | 12 |
| Tabelle 1.3: Antigen-Strukturen in HMOs, Vorkommen in humanen Milch-Gruppen und in Säugetiermilch..... | 14 |
| Tabelle 1.4: Kernstruktur-Typen und Konzentrationen ausgewählter humaner Milcholigosaccharide..... | 15 |
| Tabelle 2.1: Verwendete und konstruierte <i>E. coli</i> Stämme..... | 53 |
| Tabelle 2.2: Verwendete und konstruierte Plasmide..... | 55 |
| Tabelle 2.3: Zusammenstellung der in den Synthesen von Oligosacchariden rekombinant exprimierten Gene und Konstrukte..... | 57 |
| Tabelle 2.4: Eingesetzte Substanzen und Reagenzien..... | 58 |
| Tabelle 2.5: Zusammensetzung des Lysogeny-Broth Mediums..... | 60 |
| Tabelle 2.6: Zusammensetzung des Minimalmediums zur Synthese von Fucosyllactosen..... | 61 |
| Tabelle 2.7: Komponenten des Mediums für HMO-Synthesen mit <i>E. coli</i> LJ110-basierten Stämmen und der Medien für Zulaufkultivierungen zur Synthese von 2'-FL bzw. LNT..... | 62 |
| Tabelle 2.8: Zusammensetzung der in den Zulaufkulturen eingesetzten Zuläufe..... | 63 |
| Tabelle 2.9: Zusammensetzung und Durchführung von PCRs zur Kontrolle von Klonierungen... | 64 |
| Tabelle 2.10: Sequenzen der verwendeten Primer..... | 65 |
| Tabelle 2.11: Zusammensetzung des TAE-Puffer-Konzentrats (50X)..... | 67 |
| Tabelle 2.12: Zusammensetzung des TSS-Mediums (Chung <i>et al.</i> , 1989)..... | 69 |
| Tabelle 2.13: Zusammensetzung des Bradford-Reagenz (Bradford, 1976)..... | 74 |
| Tabelle 2.14: Zusammensetzungen des 3X-Ladepuffers und des 10X-Konzentrats des Laufpuffers..... | 75 |
| Tabelle 2.15: Zusammensetzung der SDS-Trenn- und Sammelgele..... | 75 |
| Tabelle 2.16: Zusammensetzung der <i>in vitro</i> Aktivitätstests von LgtB..... | 76 |
| Tabelle 2.17: Zusammensetzung der <i>in vitro</i> Aktivitätstests von FucT14..... | 77 |
| Tabelle 2.18: In diesem Projekt konstruierte Stämme mit Ausgangsstamm, Matrize für die Amplifikation der Expressionskassette und dabei genutzte Primer..... | 83 |
| Tabelle 2.19: Zusammensetzung der Anthranilsäure-Lösung mit Natriumcyanoborhydrid (Anumula, 1994)..... | 94 |
| Tabelle 2.20: Zusammensetzung der Laufmittel A(1) bzw. A(2), verwendet für die Probenanalyse der Synthesen von Fucosyllactosen bzw. anderen reduzierenden Oligosacchariden..... | 95 |
| Tabelle 3.1: ¹³ C-NMR Daten der synthetisierten 2'-Fucosyllactose. ^[a] | 121 |
| Tabelle 3.2: ¹³ C-NMR Daten der synthetisierten 3-Fucosyllactose. ^[a] | 126 |
| Tabelle 3.3: Produktausbeuten der Schüttelkolbenkulturen von <i>E. coli</i> LJ-AY-cat-kan und <i>E. coli</i> LJ-AYO-cat. ^[a] | 137 |
| Tabelle 3.4: ¹³ C-NMR Daten der synthetisierten Lacto-N-triose II. ^[a] | 149 |
| Tabelle 3.5: ¹³ C-NMR Daten der synthetisierten Lacto-N-tetraose. ^[a] | 149 |

| | |
|---|-----|
| Tabelle 3.6: ^{13}C -NMR Daten der synthetisierten Lacto-N-neotetraose. ^[a] | 154 |
| Tabelle 3.7: Spezifische Wachstumsraten der LJ-AYO-basierten Stämme in Schüttelkolbenkulturen zur Synthese fucosylierter LNT-Derivate. ^[a] | 161 |
| Tabelle 3.8: Produktausbeuten der Schüttelkolbenkulturen von LJ-AYFOC-cat. ^[a] | 161 |
| Tabelle 3.9: Produktausbeuten der Schüttelkolbenkulturen von LJ-AYFO14-cat. ^[a] | 163 |
| Tabelle 3.10: ^{13}C -NMR Daten der synthetisierten Lacto-N-fucopentaose I (LNFP I). ^[a] | 165 |
| Tabelle 3.11: ^{13}C -NMR Daten der synthetisierten Lacto-N-difucohexaose II (LNDFH II). ^[a] | 166 |
| Tabelle 3.12: Spezifische Wachstumsraten und optische Dichten der LJ-AYB-basierten Stämme in Schüttelkolbenkulturen zur Synthese fucosylierter LNnT-Derivate. ^[a] | 170 |
| Tabelle 3.13: Intrazellulär vorkommende LNnT, LNT II und Lactose in Typ II-Oligosaccharid synthetisierenden Stämmen 26 h nach Induktion. | 170 |
| Tabelle 4.1: In Ganzzellsynthesen mit Plasmid-freien Stämmen synthetisierte Oligosaccharide, deren Vorkommen im Kulturüberstand und die daraus isolierten Mengen. ^[a] .. | 204 |
| Tabelle A.1: ^1H -NMR Daten der synthetisierten Lacto-N-triose II. ^[a] | 216 |
| Tabelle A.2: ^1H -NMR Daten der synthetisierten Lacto-N-tetraose. ^[a] | 218 |
| Tabelle A.3: ^1H -NMR Daten der synthetisierten Lacto-N-neotetraose. ^[a] | 221 |
| Tabelle A.4: ^1H -NMR Daten der synthetisierten Lacto-N-fucopentaose I. ^[a] | 223 |
| Tabelle A.5: ^1H -NMR Daten der synthetisierten Lacto-N-difucohexaose II. ^[a] | 226 |
| Tabelle A.6: ^{13}C -NMR Daten der synthetisierten fucosylierten Lacto-N-triose II. ^[a] | 228 |
| Tabelle A.7: ^1H -NMR Daten der synthetisierten fucosylierten Lacto-N-triose II. ^[a] | 229 |
| Tabelle A.8: ^{13}C -NMR Daten der synthetisierten Lacto-N-difucoheptaose. ^[a] | 231 |
| Tabelle A.9: ^1H -NMR Daten der synthetisierten Lacto-N-difucoheptaose. ^[a] | 232 |
| Tabelle A.10: Zuordnungen identifizierter Masse-zu-Ladung-Verhältnisse im ESI-Massenspektrum von LJ-AYBF-cat (Abbildung A.28). | 234 |
| Tabelle A.11: Zuordnungen identifizierter Masse-zu-Ladung-Verhältnisse im ESI-Massenspektrum von LJ-AYBFC-cat (Abbildung A.29). | 235 |
| Tabelle A.12: Zuordnungen identifizierter Masse-zu-Ladung-Verhältnisse im ESI-Massenspektrum von LJ-AYBFA-cat (Abbildung A.30). | 236 |
| Tabelle A.13: In diesem Projekt verwendete Geräte. | 237 |
| Tabelle A. 14: Sequenzen der Codon-optimieren Gene. | 239 |
| Tabelle A.15: Retentionsfaktoren (R_f) verschiedener Oligosaccharide in der Dünnschichtchromatographie bei Verwendung verschiedener mobiler Phasen. | 240 |

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung / Symbol | Definition / Beschreibung |
|--------------------|---|
| δ | Chemische Verschiebung [ppm] |
| μ | Spezifische Wachstumsrate [h^{-1}] |
| μ_{max} | Maximale spezifische Wachstumsrate [h^{-1}] |
| μ_{set} | Eingestellte Wachstumsrate [h^{-1}] |
| 2'-FL | 2'-Fucosyllactose |
| 3-FL | 3-Fucosyllactose |
| 3'-SL | 3'-Sialyllactose |
| AfcA | α 1,2-Fucosidase aus <i>B. bifidum</i> |
| Amp ^R | Ampicillin Resistenz |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| AS | Aminosäure(n) |
| ATP | Adenosin-5'-triphosphat |
| bd | Breites Duplett |
| bdd | Breites Duplett eines Dupletts |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin) |
| BTM | Biotrockenmasse |
| bzw. | Beziehungsweise |
| cAMP | cyclisches Adenosin-monophosphat |
| cAMP-CRP | Komplex aus cAMP Response Protein und cAMP |
| ca. | circa (etwa) |
| Cm ^R | Chloramphenicol Resistenz |
| CMP | Cytidin-5'-monophosphat |
| CRP | cyclisches AMP Response Protein |
| CTP | Cytidin-5'-triphosphat |
| CMP-Neu5Ac | Cytidin-5'-monophospho-N-acetyl-D-neuraminsäure |
| C-Quelle | Kohlenstoffquelle |
| c_{S0} | Konzentration der Kohlenstoffquelle im Zulauf [g l^{-1}] |
| cv | Säulenvolumen (column volumes) |
| c_{X0} | Biomassekonzentration zu Beginn der Zulaufphase [g l^{-1}] |
| d | Duplett |
| dd | Duplett eines Dupletts |
| ddd | Duplett eines Dupletts eines Dupletts |
| DHAP | Dihydroxyacetonphosphat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| eCOSY | NMR-Spektroskopie Methode (Exclusive Correlation Spectroscopy) |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ESI | Elektronensprayionisation |
| <i>et al.</i> | und andere (<i>et alii</i>) |

| Abkürzung / Symbol | Definition / Beschreibung |
|---------------------------|---|
| EU | Endotoxin Units |
| F(t) | Zulauftrate [$l\ h^{-1}$] |
| Fkp | L-Fucose Kinase/L-Fucose-1-phosphat Guanylyltransferase |
| FLNT II | α 1,3-fucosyliertes LNT II |
| FLP | Flippase-Rekombinase |
| FPLC | Fast Protein Liquid Chromatography |
| FRT | Flippase-Erkennungssequenz (Flippase recognition target) |
| Fru-6P | D-Fructose-6-phosphat |
| Fuc / L-Fuc | L-Fucose |
| FucI | L-Fucose-Isomerase |
| FucK | L-Fuculose-Kinase |
| FucP | L-Fucose-Permease |
| FucT | Fucosyltransferase |
| FucT14 | α 1,4-Fucosyltransferase |
| FutA | α 1,3-Fucosyltransferase |
| FutC | α 1,2-Fucosyltransferase |
| Gal | D-Galactose |
| Gal-1P | α -D-Galactose-1-phosphat |
| GalE | UDP-glucose 4-epimerase |
| GalK | Galactokinase |
| GalP | Galactose-Permease |
| GalT | Galactose-1-phosphat-Uridyltransferase |
| GalU | Glucose-1-phosphat-Uridyltransferase |
| gC2H2BC | NMR-Spektroskopie Methode (CRISIS 2 Heteronuclear 2-bond J-Correlation with gradient coherence selection with adiabatic pulses) |
| GDP | Guanosin-5'-diphosphat |
| GDP-4-keto-6-desoxy-Man | Guanosin-5'-diphospho-4-keto-6-desoxy-mannose |
| GDP-Fuc | Guanosin-5'-diphospho- β -L-fucose |
| GDP-Man | Guanosin-5'-diphospho- α -D-mannose |
| gHMBC | NMR-Spektroskopie Methode (Heteronuclear Multiple Bond Correlation with gradient coherence selection) |
| gHSQC | NMR-Spektroskopie Methode (Heteronuclear Single Quantum Correlation with gradient coherence selection) |
| Glc | D-Glucose |
| Glc-1P | α -D-Glucose-1-phosphat |
| Glc-6P | D-Glucose-6-phosphat |
| GlcN-1P | α -D-Glucosamin-1-phosphat |
| GlcN-6P | D-Glucosamin-6-phosphat |
| GlcNAc | N-Acetyl-D-glucosamin |
| Glk | Glucokinase |
| GlmM | Phosphoglucosamin-Mutase |
| GlmS | Glucosamin:Fructose-6-phosphat-Aminotransferase |

| Abkürzung / Symbol | Definition / Beschreibung |
|--------------------------------|---|
| GlmU | Glucosamin-1-phosphat-Acetyltransferase-N-Acetylglucosamin-1-phosphat-Uridyltransferase |
| GlpF | Glycerin-Facilitator |
| Glyc | Glycerin |
| Gmd | GDP-Mannose 4,6-Dehydratase |
| GMP | Guanosin-5'-monophosphat |
| GOS | Galactooligosaccharide |
| GT | Glycosyltransferase |
| GTP | Guanosin-5'-triphosphat |
| HEPES | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure |
| His6Propep-cat β 4GalT-1 | β 1,4-Galactosyltransferase-Propeptid-Komplex |
| HMO(s) | Humane Milcholigosaccharid(e) |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid |
| <i>J</i> | Kopplungskonstante [Hz] |
| <i>k'</i> | Retentionsfaktor (HPLC) |
| Kan ^R / <i>kan</i> | Kanamycin Resistenz |
| <i>K_m</i> | enzymatische Sättigungskonstante |
| Lac | D-Lactose |
| LacNAc | N-Acetyl-D-lactosamin |
| LacY | Lactose-Permease |
| LacZ | β -Galactosidase aus <i>E. coli</i> |
| LB | Lysogeny Broth |
| LC-MS | Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung |
| LDFT | 3,2'-Difucosyllactose (Lactodifucotetraose) |
| LgtA | β 1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase |
| LgtB | β 1,4-Galactosyltransferase |
| LNDFH II | Lacto-N-difucohexaose II |
| LNDFHep | Lacto-N-difucoheptaose |
| LNFP I | Lacto-N-fucopentaose I |
| LNFP II | Lacto-N-fucopentaose II |
| LNFP III | Lacto-N-fucopentaose III |
| LNFP V | Lacto-N-fucopentaose V |
| LNFX | Fucosylierte Lacto-N-tetraose |
| LNnFX | Fucosylierte Lacto-N-neotetraose |
| p-LNnH | Para-Lacto-N-neohexaose |
| p-LNnO | Para-Lacto-N-neooctaose |
| LNnT | Lacto-N-neotetraose |
| LNT | Lacto-N-tetraose |
| LNT II | Lacto-N-triose II |
| lt. | Laut |
| M | Koeffizient des Erhaltungsstoffwechsels [$\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$] |
| m (in NMR) | Multiplett |
| m/z | Masse-zu-Ladung-Verhältnis |

| Abkürzung / Symbol | Definition / Beschreibung |
|---------------------------|---|
| Man | D-Mannose |
| Man-1P | α -D-Mannose-1-phosphat |
| Man-6P | D-Mannose-6-phosphat |
| ManB | Phosphomannomutase |
| ManC | Mannose-1-phosphat Guanylyltransferase |
| ManNAc | N-Acetyl-D-mannosamin |
| Max | Maximal |
| MS | Massenspektrometrie |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat |
| NagA | N-Acetylglucosamin-6-phosphat Deacetylase |
| NagB | Glucosamin-6-phosphat Deaminase |
| NanA | N-Acetylneuraminat Lyase |
| NanE | N-Acetylmannosamin-6-phosphat-Epimerase |
| NanK | N-Acetylmannosaminkinase |
| NanT | N-Acetylneuraminat:H ⁺ Symporter |
| Neu5Ac | Sialinsäure (N-Acetyl-D-neuraminsäure) |
| NeuA | CMP-Sialinsäure Synthase |
| NeuB | Sialinsäure Synthase |
| NeuC | N-Acetylglucosamin-6-phosphat-Epimerase |
| NMR | Kernspinresonanz (Nuclear magnetic resonance) |
| Nst | α 2,3-Sialyltransferase |
| OD ₆₀₀ | Optische Dichte bei 600 nm [dimensionslos] |
| Ov | Signal überlagert (overlapped) |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion (Polymerase chain reaction) |
| PEP | Phosphoenolpyruvat |
| PfkB | 6-Phosphofruktokinase II |
| Pgm | Phosphoglucomutase |
| P _i | Phosphat |
| PP _i | Diphosphat |
| pO ₂ | Sauerstoffpartialdruck |
| ppm | Parts per million |
| PTS | Phosphotransferasesystem |
| PyrG | CTP-Synthase |
| Q | Quadruplett |
| Rekomb. | Rekombinant |
| R _f | Retentionsfaktor (Dünnschichtchromatographie) |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute) |
| RT | Raumtemperatur |
| s. | Siehe |
| SDS | Natriumlaurylsulfat (Sodium dodecyl sulfate) |
| SiaT | Sialyltransferase |
| SPE | Festphasenextraktion (solid phase extraction) |

| Abkürzung / Symbol | Definition / Beschreibung |
|---------------------------|--|
| T | Zeit [h] |
| TAE-Puffer | Tris, Acetat, EDTA Puffer |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| TMS | Tetramethylsilan |
| TOCSY | NMR-Spektroskopie Methode (Total Correlation Spectroscopy) |
| TOF-Q | Quadrupol-Flugzeitmassenanalysator |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| UDP | Uridin-5'-diphosphat |
| UDP-Gal | Uridin-5'-diphospho- α -D-galactose |
| UDP-Glc | Uridin-5'-diphospho- α -D-glucose |
| UDP-GlcNAc | Uridin-5'-diphospho-N-acetyl- α -D-glucosamin |
| UMP | Uridin-5'-monophosphat |
| UTP | Uridin-5'-triphosphat |
| UV | Ultraviolett |
| v/v | Volumenanteil (volume per volume) |
| V_0 | Kulturvolumen zu Beginn der Zulaufphase [l] |
| Vis | sichtbar (visible) |
| w/v | Gewicht je Volumen (weight per volume) |
| WbgO | β 1,3-Galactosyltransferase |
| WcaG | GDP-Fucose Synthase aus <i>E. coli</i> |
| $Y_{x/s}$ | Biotrockenmasseausbeute-Koeffizient je Substrat [g g ⁻¹] |
| z. B. | zum Beispiel |

Zusammenfassung

Die in Muttermilch mit bis zu 15 g l⁻¹ enthaltenen humanen Milcholigosaccharide (HMOs) stellen eine bedeutende Gruppe bioaktiver Naturstoffe dar und zeigten in verschiedenen wissenschaftlichen Arbeiten zahlreiche positive Effekte für die Entwicklung von Säuglingen. Mit über 200 beschriebenen und über 100 strukturell charakterisierten Oligosacchariden weisen HMOs dabei eine große Strukturvielfalt auf. Untersuchungen der physiologischen Effekte von HMOs wurden in der Vergangenheit neben wenigen isolierten oder synthetisierten Reinstoffen häufig mit HMO-Gemischen durchgeführt, welche aus humaner Milch isoliert wurden. Der Grund hierfür ist, dass chemische Synthesen wegen der benötigten Schutzgruppenchemie aufwändig sind und enzymatische Synthesen mit Leloir-Glycosyltransferasen bzw. Glycosidasen kostspielige Nukleotid-aktivierte Zucker als Substrate benötigen bzw. geringe Produktausbeuten zeigen. Durch die Kombination hoher Regio- und Stereoselektivitäten von Leloir-Glycosyltransferasen mit einer kostengünstigen Bereitstellung von Nukleotid-aktivierten Zuckern waren in der Vergangenheit Ganzzellsynthesen einiger HMOs unter Verwendung von Plasmid-basierten Expressionen rekombinanter Gene beschrieben worden.

Um die Synthese weiterer HMOs mittels Ganzzellsynthesen zu ermöglichen und dabei auf die Verwendung von Selektions-Systemen für Plasmid-tragende Zellen verzichten zu können, wurden in dieser Arbeit Plasmid-freie Stämme zur Synthese verschiedener HMOs konstruiert und die damit synthetisierten Oligosaccharide isoliert sowie analysiert. Die Stammkonstruktion erfolgte dabei durch chromosomale Integration von Expressionskassetten in Zuckerdegradations-Loci mittels homologer Rekombination und Selektion auf die Ortsspezifität der Integration mittels pH-Indikator Agarplatten. Unter Verwendung verschiedener Glycosyltransferase-Gene aus *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* und *Neisseria meningitidis* in *Escherichia coli*-Zellen, welche Nukleotid-aktivierte Zucker bereitstellen und Lactose aufnehmen, konnten so unter anderem die HMOs 2'-Fucosyllactose (2'-FL), 3-Fucosyllactose (3-FL), Lacto-N-tetraose (LNT), Lacto-N-neotetraose (LNnT), Lacto-N-fucopentaose I (LNFP I) und Lacto-N-difucohexaose II (LNDFH II) synthetisiert, isoliert und charakterisiert werden.

Basierend auf den bereits vor dieser Arbeit am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart konstruierten *E. coli* Stämmen JM109 gwBC-F1 und JM109 gwBC-F2-cat konnte eine Erhöhung der Produktivität von 2'-FL durch die Erhöhung der chromosomal integrierten Kopien des Fucosyltransferase-Gens *futC* aufgezeigt werden. Außerdem konnte durch die zusätzliche Nutzung des Salvage Pathway für die Synthese von GDP-L-Fucose die Produktbildung weiter erhöht werden. Dabei wurden in Schüttelkolben-Kulturen mit Plasmid-freien Stämmen 2'-FL-Titer von $1,06 \pm 0,21 \text{ g l}^{-1}$ bzw. $2,00 \pm 0,04 \text{ g l}^{-1}$ ohne bzw. mit Nutzung des Salvage Pathway erreicht. In einer darauffolgenden, Antibiotika-freien Zulaufkultivierung mit einem Endvolumen von 13,5 l und den Kohlenstoffquellen Glycerin und Lactose wurde ein 2'-FL-Titer von $20,28 \pm 0,83 \text{ g l}^{-1}$ und somit etwa 270 g 2'-FL mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von $0,57 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ produziert.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit konnte durch die Konstruktion des Stammes *E. coli* LJ-AYO-cat mit integrierten Genen einer Lactose-Permease, β 1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase und β 1,3-Galactosyltransferase erstmals die Synthese des HMO LNT in rekombinanten Mikroorganismen beschrieben werden. Dabei wurde unter Verwendung von Galactose als Kohlenstoffquelle im Vergleich zu Glycerin bzw. Glucose eine höhere intrazelluläre Konzentration des Donor-Substrats UDP-Galactose bestimmt, in Schüttelkolben $0,81 \pm 0,01 \text{ g l}^{-1}$ LNT synthetisiert und in einer Galactose-limitierten Zulaufkultivierung ein LNT-Titer von $12,72 \pm 0,21 \text{ g l}^{-1}$ erreicht. Bei einer Raum-Zeit-Ausbeute von $0,37 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ wurden so 173 g des Tetrasaccharids LNT produziert.

Durch die Ausstattung dieses LNT-synthetisierenden Stammes mit den Genen einer α 1,2- bzw. α 1,4-Fucosyltransferase und dem Salvage Pathway zur Synthese von GDP-L-Fucose wurden anschließend erstmalig rekombinante Ganzzellsynthesen fucosylierter Derivate von LNT beschrieben und dabei in Schüttelkolben-Kulturen $0,272 \pm 0,006 \text{ g l}^{-1}$ LNFP I bzw. $0,547 \pm 0,004 \text{ g l}^{-1}$ LNDFH II gebildet. Die Strukturen der gebildeten HMOs konnten nach der Isolierung jeweils mittels Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden.

Somit konnten in dieser Arbeit die Ganzzellsynthesen verschiedener HMOs mit Plasmid-freien Stämmen dargestellt, die Titer und Raum-Zeit-Ausbeuten in der Synthese von 2'-FL erhöht und die Auswahl der mittels Ganzzellsynthesen herstellbaren HMOs um Typ I-HMO-Strukturen erweitert werden.

Abstract

With up to 15 g l⁻¹, human milk oligosaccharides (HMOs) represent an abundant and bioactive component of breastmilk whose positive effects on the well-being of infants were demonstrated in several scientific analyses. With more than 200 mentioned and over 100 structurally characterized oligosaccharides, HMOs show a great structural diversity. Due to the necessity of protection groups in chemical synthesis, low product yields in enzymatic synthesis with glycosidases and the need for costly nucleotide-activated sugars in the use of Leloir-glycosyltransferases, most HMOs are not available at reasonable prices. Besides few isolated or synthetic HMOs in pure form, previous analyses of the physiological effects of HMOs were therefore often conducted with mixtures of different HMOs that were isolated from human milk.

By combining the regio- and stereoselectivity of Leloir-glycosyltransferases with the cost-efficient intracellular generation of nucleotide-activated sugars, previous publications could demonstrate whole-cell syntheses of some HMOs via plasmid-based expression of recombinant genes.

To enable the synthesis of further HMOs using whole-cell systems and to avoid the need of selection-systems for plasmids, this work demonstrates the construction of plasmid-free strains for the synthesis of different HMOs, followed by product isolation and analysis. To do so, expression cassettes were chromosomally integrated into sugar-degradation loci by homologous recombination and selection for site-specificity of the integration on pH-indicator agar. By combining different glycosyltransferase-genes of *Helicobacter pylori* and *Neisseria meningitidis* in *Escherichia coli* cells, which provide nucleotide-activated sugars and incorporate, but do not cleave lactose, the HMOs 2'-fucosyllactose (2'-FL), 3-fucosyllactose (3-FL), lacto-N-tetraose (LNT), lacto-N-neotetraose (LNnT), lacto-N-fucopentaose I (LNFP I) and lacto-N-difucohexaose II could be synthesized.

Based on the strains *E. coli* JM109 gwBC-F1 and JM109 gwBC-F2-cat, previously constructed at the Institute of Microbiology, an increase in 2'-FL-productivity with an increased number of chromosomally integrated copies of the fucosyltransferase gene *futC* could be demonstrated. Furthermore, the additional usage of the salvage pathway for the generation GDP-L-fucose demonstrated an increase in product formation. In

simple shake-flask cultivations, the plasmid-free strains produced 2'-FL-titers of $2,00 \pm 0,04 \text{ g l}^{-1}$ and $1,06 \pm 0,21 \text{ g l}^{-1}$ with or without the usage of the salvage pathway, respectively. In a subsequent antibiotic-free fed-batch cultivation with a final volume of 13,5 l and the carbon sources glycerol and lactose, a final 2'-FL-titer of $20,28 \pm 0,83 \text{ g l}^{-1}$ was reached. Thus, a total of about 270 g of 2'-FL could be synthesized with a space-time-yield of $0,57 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Furthermore, the first whole-cell synthesis of the HMO LNT using recombinant microorganisms could be demonstrated by chromosomally integrating the genes of a lactose-permease, a $\beta 1,3$ -N-acetylglucosaminyltransferase and a $\beta 1,3$ -galactosyltransferase. By using galactose instead of glucose or glycerol as carbon source in shake-flask experiments, the intracellular concentrations of the donor-substrate UDP-galactose could be increased and a final LNT-titer of $0,81 \pm 0,01 \text{ g l}^{-1}$ could be reached with the strain *E. coli* LJ-AYO-cat. In a subsequent galactose-limited fed-batch cultivation a final LNT-titer of $12,72 \pm 0,21 \text{ g l}^{-1}$ could be reached with a space-time-yield of $0,37 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$, corresponding to a total amount of 173 g LNT.

By equipping this LNT-producing strain with the genes of an $\alpha 1,2$ - or $\alpha 1,4$ -fucosyltransferase and the salvage pathway for the synthesis of GDP-L-fucose, the first whole cell synthesis of fucosylated derivatives of LNT in recombinant microorganisms could be described with final titers in shake-flasks of $0,272 \pm 0,006 \text{ g l}^{-1}$ LNFP I or $0,547 \pm 0,004 \text{ g l}^{-1}$ LNDFH II, respectively.

Thus, in this work, several HMOs were successfully synthesized in whole-cell systems using plasmid-free *E. coli* strains. Furthermore, the previously described titers and space-time-yields in the synthesis of 2'-FL were significantly increased and the variety of HMOs available by whole-cell synthesis was expanded by Type I-HMO-structures.

1. Theoretischer Hintergrund und Zielsetzung

Humaner Milch (Muttermilch) konnten in diversen Studien positive Effekte für die Entwicklung von Säuglingen nachgewiesen werden, weshalb sie nach wie vor als der „Gold Standard“ in der Säuglingsernährung gilt (Bode, 2009). Dabei enthält humane Milch abgesehen von Wasser neben Lactose, Fett, Proteinen, Glycoproteinen und Glycolipiden eine weitere biologisch aktive Substanzklasse – die humanen Milcholigosaccharide (HMOs, Peterson *et al.*, 2013). Diese stellen mit bis zu 23 g l⁻¹ in Vormilch und bis zu 15 g l⁻¹ in Muttermilch eine bedeutende Gruppe bioaktiver Naturstoffe dar (Coppa *et al.*, 1999; Zivkovic *et al.*, 2011), deren Struktur, Zusammensetzung, physiologische Effekte, Analytik und Synthesen im Folgenden näher beschrieben werden.

1.1. Humane Milcholigosaccharide (HMOs)

1.1.1. Entdeckung und erste Charakterisierung humaner Milcholigosaccharide

Obwohl humane Milcholigosaccharide nach Lactose und Fetten die Feststoffklasse mit der dritthöchsten Konzentration in humaner Milch darstellen (Abschnitt 1.1.3, Tabelle 1.2), wurden sie erst deutlich später isoliert, identifiziert und strukturell charakterisiert als Lactose. So konnte Lactose bereits im 17. Jahrhundert isoliert werden (Newburg *et al.*, 2005), während die Identifikation und Isolierung von HMOs erst im 19. und 20. Jahrhundert erfolgte. So beschrieb Eschbach im Jahr 1888 als Erster, dass humane Milch eine andere Art von Lactose enthalte als Kuhmilch (beschrieben in Bode, 2012; Kunz, 2012). Um das Jahr 1930 wurde diese Kohlenhydrat-Fraktion von Polonovski und Lespagnol als „Gynolactose“ bezeichnet und näher beschrieben als Mischung verschiedenen Verbindungen, welche Hexosamine enthielten und andere optische Drehwerte aufwiesen als Lactose (Polonovski, 1932; Polonovski & Lespagnol, 1930; Polonovski & Lespagnol, 1931; Polonovsky & Lespagnol, 1929; Polonovsky & Lespagnol, 1933). Aufgrund der komplexen Zusammensetzung der Kohlenhydrat-Fraktion und der physikochemischen Ähnlichkeiten verschiedener HMOs gelang die Isolierung einzelner HMOs und deren Strukturaufklärungen erst ab den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts,

vorangetrieben vor allem durch Arbeiten von Richard Kuhn, Paul György und Jean Montreuil (Bode, 2012; Kunz, 2012). So wurden 1956 die Strukturen von Lacto-N-tetraose, 2'-Fucosyllactose, 3-fucosyllactose und Lacto-N-fucopentaose I beschrieben (Kuhn *et al.*, 1956a; Kuhn *et al.*, 1956b; Kuhn & Baer, 1956; Montreuil, 1956) und bis 1965 weitere 10 Strukturen von HMOs veröffentlicht, gefolgt von weiteren Strukturbeschreibungen in den darauffolgenden Jahren, zusammengefasst von Kobata (2010).

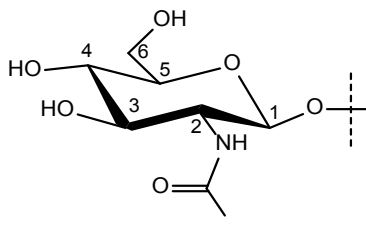
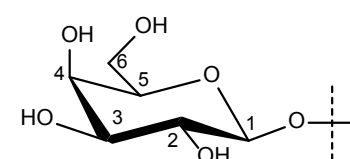
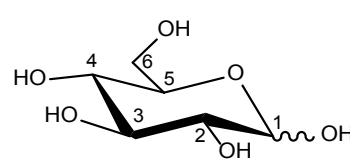
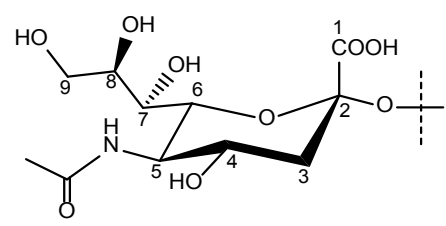
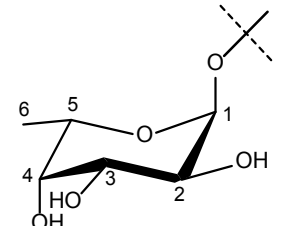
Neben der strukturellen Charakterisierung humaner Milcholigosaccharide begannen im 19. Jahrhundert auch die Untersuchungen der physiologischen Effekte von humaner Milch und deren Kohlenhydrat-Fraktion (Bode, 2012; Kunz, 2012). Wichtige frühe Meilensteine waren dabei unter anderem die Beschreibung der Beziehung der Säuglingsphysiologie und der Darmflora durch Theodor Escherich (1886), die Beobachtung einer Veränderung der Darmflora von Säuglingen durch Muttermilch (Moro, 1900; Tissier, 1900), die Erkenntnis, dass die Eiweiß-freie Molke humaner Milch eine thermoresistente Komponente („Bifidus-Faktor“) enthält, welche die Entstehung der Bifidoflora fördert (Schönfeld, 1926), sowie die Erkenntnis, dass dieser Bifidus-Faktor aus Oligosacchariden besteht (Gauhe *et al.*, 1954; Rose *et al.*, 1954). Die später für Mischungen verschiedener HMOs und isolierten HMOs beschriebenen physiologischen Effekte sind in Abschnitt 1.1.4 beschrieben.

1.1.2. Struktur

In bisherigen Studien konnten über 200 verschiedene Oligosaccharide beschrieben (Niñonuevo *et al.*, 2006) und über 100 verschiedene Oligosaccharide strukturell charakterisiert werden (Kobata, 2010). Diese strukturelle Vielfalt in Verbindung mit den vorkommenden Konzentrationen der Oligosaccharide konnte in der Milch anderer Säugetiere bisher nicht identifiziert werden und scheint daher einzigartig zu sein in humaner Milch (Boehm & Stahl, 2007; Kunz *et al.*, 1999; Tao *et al.*, 2011; Urashima *et al.*, 2012b). Dabei folgen die bisher strukturell aufgeklärten HMOs mit wenigen Ausnahmen allgemeinen Regeln zum Aufbau der Oligosaccharide. So bestehen HMOs aus 5 Monosacchariden, welche in Tabelle 1.1 dargestellt sind (Chen, 2015). Die Kernstrukturen von HMOs sind aufgebaut aus den Monosacchariden D-Glucose (Glc), D-Galactose (Gla) und N-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc), wobei das reduzierende Ende der Oligosaccharide mit wenigen Ausnahmen immer aus einer Lactose-Einheit besteht.

Glc tritt dabei lediglich am reduzierenden Ende von HMOs auf und kann daher sowohl offenkettig als auch als α - oder β -Anomer vorliegen, während Gal und GlcNAc stets in Pyranose-Form vorliegen und eine β -glycosidische Bindung aufweisen. Neben der freien Form können diese Kernstrukturen auch in fucosylierter oder sialylierter Form in humaner Milch vorkommen (Kobata, 2010). Dabei binden N-Acetyl-D-neuraminsäure-Einheiten (Neu5Ac, Sialinsäure) bzw. L-Fucose-Einheiten (Fuc, 6-Desoxy-L-galactose) α -glycosidisch an die Kernstrukturen (Tabelle 1.1). Basierend auf dem Vorkommen von Neu5Ac werden HMOs unterteilt in neutrale HMOs (ohne Neu5Ac) und saure HMOs (mit Neu5Ac).

Tabelle 1.1: Monosaccharid-Einheiten humaner Milcholigosaccharide.

| Monosaccharid-Einheiten der HMO- Kernstruktur | | |
|---|--|--|
| N-Acetyl-D-glucosamin | D-Galactose | D-Glucose |
| GlcNAc | Gal | Glc |
|  |  |  |
| β -glycosidische Bindung | β -glycosidische Bindung | Keine glycosidische Bindung an Position 1; Lediglich am reduzierenden Ende vorkommend |
| Monosaccharid-Einheiten außerhalb der HMO-Kernstruktur | | |
| N-Acetyl-D-neuraminsäure (Sialinsäure) | L-Fucose (6-Desoxy-L-galactose) | |
| Neu5Ac | Fuc | |
|  |  | |
| α -glycosidische Bindung | α -glycosidische Bindung | |

Die möglichen Verknüpfungen in HMOs sind in Abbildung 1.1 dargestellt, während Abbildung 1.2 die Strukturen ausgewählter Milcholigosaccharide schematisch darstellt.

Die strukturell kleinsten HMOs bestehen dabei aus Trisacchariden, welche die Kernstruktur Lactose enthalten und am Galactosyl- bzw. Glucosyl-Rest α 1,2- bzw. α 1,3-glycosidisch fucosyliert sind. Die Elongation der Kernstrukturen erfolgt durch β 1,3- bzw. β 1,3- und β 1,6-glycosidische Bindungen von GlcNAc am Galactosyl-Rest der Lactose. Dabei erscheint eine β 1,6-glycosidische Bindung nicht alleinstehend, sondern lediglich als Verzweigung in Kombination mit einer β 1,3-glycosidischen Bindung (Bode, 2012). Die weitere Elongation erfolgt durch eine β 1,3- bzw. β 1,4-glycosidisch gebundenen Galactosyl-Rest am GlcNAc-Rest. Die Position der Bindung am GlcNAc-Rest ist dabei ausschlaggebend für die Klassifizierung als Typ I-bzw. Typ II-Kernstruktur und die verbleibende, freie Hydroxylgruppe für die Bindung eines L-Fucosyl-Rests (Abbildung 1.1, Abschnitt 1.1.3; Kobata, 2010). Während die β 1,4-gebundenen Einheiten aus Gal und GlcNAc (Typ II, N-Acetyllactosamin-Einheit) auch intramolekular vorkommen und somit als Substrat für weitere Elongationen der Kernstrukturen dienen können, kommen β 1,3-gebundene Einheiten (Typ I, Lacto-N-biose-Einheit) lediglich am nicht-reduzierenden Ende der HMOs vor und scheinen daher nicht als Substrate für weitere Kernstruktur-Elongationen zu dienen (Abbildung 1.2; Kobata, 2010). Die Verzweigung über eine β 1,6-glycosidische Bindung von GlcNAc an Galactose ermöglicht des Weiteren das gleichzeitige Vorkommen von Oligosacchariden mit Typ I- und Typ II-Struktur an nicht-reduzierenden Enden des gleichen Moleküls, wie an den Beispielen Lacto-N-hexaose und iso-Lacto-N-neoactose in Abbildung 1.2 demonstriert.

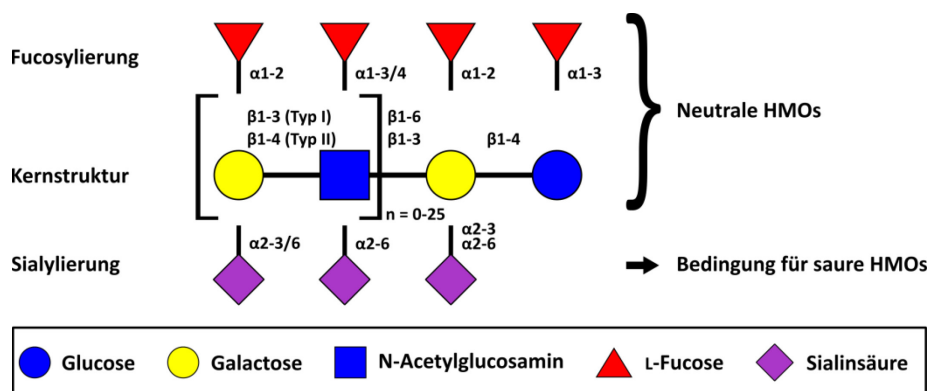


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des allgemeinen Aufbaus humaner Milcholigosaccharide (Bode, 2012; Boehm & Stahl, 2003).

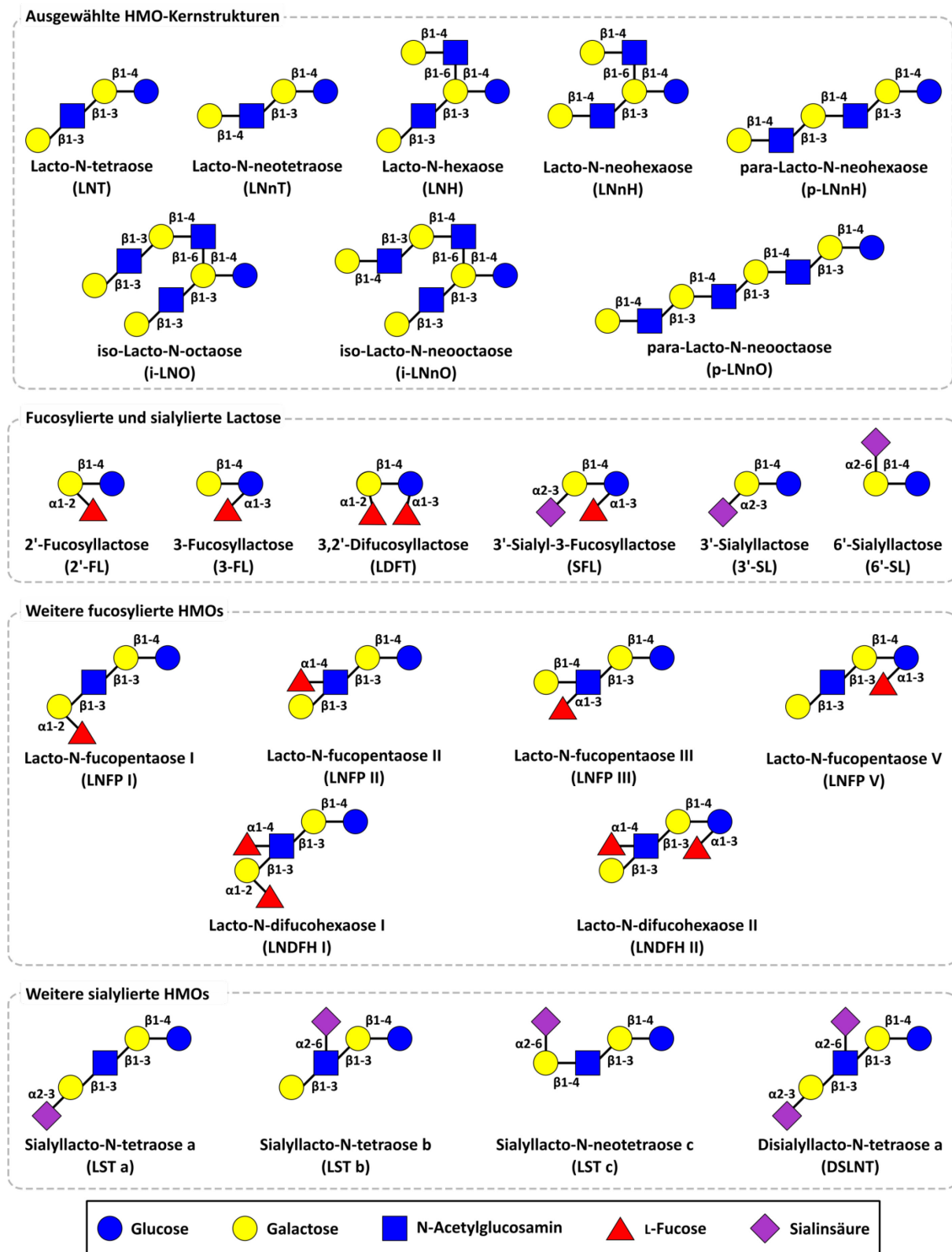


Abbildung 1.2: Struktureller Aufbau ausgewählter humaner Milcholigosaccharide (Kobata, 2010).

Ausnahmen zu dem in Abbildung 1.1 demonstrierten Aufbau von HMOs bilden z. B. in Säuglingsstuhl identifizierte, Fucosyl-Gruppen-tragende Tetra-, Penta-, Hexa- und Heptasaccharide mit GlcNac am nicht-reduzierenden Ende der Kernstrukturen (Sabharwal *et al.*, 1984). Dabei ist jedoch nicht auszuschließen, dass diese Strukturen

Produkte des mikrobiellen Abbaus größerer HMOs durch die Darmflora darstellen (Abschnitt 1.1.4), da sie lediglich in Exkrementen von Säuglingen und nicht in humaner Milch identifiziert wurden. Die in humaner Milch identifizierten Kernstrukturen wiesen immer eine Galactosyl-Rest am nicht-reduzierenden Ende auf (Kobata, 2010). Zwei weitere Ausnahmen zu dem allgemeinen Aufbau von HMOs bilden die Neu5Ac-enthaltenden Tetra- und Pentasaccharide, welche von Kitagawa *et al.* (Kitagawa *et al.*, 1990) isoliert wurden und keine Glucose am reduzierenden Ende aufweisen. Dieses Vorkommen steht jedoch in Widerspruch mit dem vorgeschlagenen Modell der Biosynthese von HMOs in der Milchdrüse (Blank *et al.*, 2012; Urashima *et al.*, 2011).

Da alle bisher identifizierten HMOs, mit Ausnahme der Arbeiten von Kitagawa *et al.* (1990), eine Lactose-Gruppe am reduzierenden Ende tragen und Lactose der Haupt-Makronährstoff in humaner Milch ist (Tabelle 1.2), wird vermutet, dass die HMO-Biosynthese auf Lactose aufbaut und durch Elongation, Verzweigung, Fucosylierung sowie Sialylierung mittels verschiedener Glycosyltransferasen erfolgt (Blank *et al.*, 2012; Urashima *et al.*, 2011). Umfassende experimentelle Daten, welche dieses Modell und vor allem die Synthese der Kernstrukturen bestätigen, konnten bisher jedoch noch nicht erhoben werden. Bekannt ist, dass das potentielle Substrat Lactose im Golgi-Apparat aus den Substraten UDP- α -D-Galactose (UDP-Gal) und α -D-Glucose-1-phosphat (Glc-1P) mittels des Lactose Synthase-Komplexes, bestehend aus β 1,4-Galactosyltransferase und α -Lactalbumin, gebildet wird (Fitzgerald *et al.*, 1970). Das in der Milchdrüse exprimierte α -Lactalbumin führt dabei zu mehreren Konformationsänderungen der β 1,4-Galactosyltransferase und somit zu einer Änderung der Substratspezifität von GlcNAc zu Glc, woraufhin Lactose gebildet wird (Ramakrishnan *et al.*, 2002).

Während die Biosynthese von HMO-Kernstrukturen bisher noch nicht gänzlich aufgeklärt ist, konnte die Fucosylierung der Kernstrukturen bereits näher beschrieben werden, wie in verschiedenen Arbeiten zusammengefasst (Blank *et al.*, 2012; Bode, 2015; van Leeuwen *et al.*, 2014; Newburg *et al.*, 2004). So gleichen die Fucosylierungsmuster von HMOs den Protein-Glycosylierungen des Lewis-Blutgruppensystems und enthalten am nicht-reduzierenden Ende Lewis a-, Lewis b-, Lewis x-, Lewis y- oder H-Antigen-Strukturen (Tabelle 1.3; Ma *et al.*, 2006), welche auf die kombinierten Aktivitäten von α 1,2- und α 1,3/4-Fucosyltransferasen zurückzuführen sind (Abschnitt 1.1.3; van Leeuwen *et al.*, 2014; Newburg *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2010).

Der in Abbildung 1.1 dargestellte Aufbau der Kernstrukturen kommt in dieser Form in geringeren Konzentrationen auch in der Milch einiger Nutztiere (Ziegenmilch und Pferdemilch) vor. Schafsmilch und Kuhmilch weisen jedoch auch Kernstrukturen mit einer β 1,3/6-glycosidisch gebundenen Galactose an der Lactose ohne GlcNAc auf (Boehm & Stahl, 2007).

1.1.3. Vorkommen

Oligosaccharide in nicht-humaner Säugetiermilch

Wie bereits in Abschnitt 1.1.2 erwähnt, konnte die in humaner Milch identifizierte Strukturvielfalt in Verbindung mit den quantitativen Vorkommen von HMOs bisher nicht in der Milch anderer Säugetiere identifiziert werden. Ein Vergleich der in humaner und in boviner Milch enthaltenen Makronährstoffe, der identifizierten Oligosaccharid-Strukturen und der Anteile fucosylierter und saurer Oligosaccharide ist in Tabelle 1.2 dargestellt. Dabei zeigen neben der strukturellen Vielfalt und der absoluten Konzentration auch die Zusammensetzungen deutliche Unterschiede. So tragen in boviner Milch etwa 70 % der Oligosaccharide Sialyl-Gruppen, aber nur etwa 1 % der Verbindungen Fucosyl-Gruppen, während in humaner Milch nur max. 20 % der HMOs sialyliert, aber bis zu 80 % der Oligosaccharide fucosyliert vorliegen. Neben boviner Milch weist die Milch weiterer Nutztiere (z. B. Schwein, Schaf, Ziege) ebenfalls nur etwa 0,1 – 1 % des Oligosaccharid-Gehalts von humaner Milch auf, wobei sialylierte Verbindungen in höheren und fucosylierte Verbindungen in geringeren Mengen in Nutztiermilch enthalten sind (zusammengefasst in Bode, 2012). Untersuchungen der Saccharid-Anteile in der Milch weiterer Säugetiere aller drei Säugetier-Unterklassen erlauben dabei einige generelle Aussagen, welche von Urashima *et al.* (2012a) zusammengefasst wurden. So unterscheidet sich die Milch von Monotremata, eierlegenden Säugetieren mit den Familien Tachyglossidae (Ameisenigel) und Ornithorhynchidae (Schnabeltier), deutlich von der Milch von Marsupialia (Beutelsäugern) und Eutheria (höheren Säugetieren) durch einen hohen Fucose-Anteil in den Oligosaccharid-Strukturen (Messer & Kerry, 1973). Die dominanten neutralen Kohlenhydrate in Schnabeltier-Milch stellen dabei die ebenfalls in humaner Milch vorkommenden HMOs 2'-Fucosyllactose (2'-FL) und Lactodifucotetraose (LDFT) dar, während in geringeren Konzentrationen auch die Typ II-Kernstrukturen Lacto-N-neotetraose, Lacto-N-neohexaose und fucosylierte Derivate davon identifiziert wurden

(Amano *et al.*, 1985; Messer *et al.*, 1983; Messer & Kerry, 1973). Obwohl neben dieser und humaner Milch auch die Milch anderer höherer Säugetiere fucosylierte Oligosaccharide enthält, konnten diese Verbindungen bisher nicht in der Milch von Marsupialia identifiziert werden (Urashima *et al.*, 2001; Urashima *et al.*, 2012a).

Tabelle 1.2: Vergleich der Zusammensetzung von humaner und boviner Milch.

| Merkmal | Humane Milch | Bovine Milch |
|---|---------------------------|---------------------------|
| Proteingehalt ^[a] | 8 g l ⁻¹ | 32 g l ⁻¹ |
| Fettgehalt ^[a] | 41 g l ⁻¹ | 37 g l ⁻¹ |
| Lactosegehalt ^[b] | 55 – 70 g l ⁻¹ | 40 – 50 g l ⁻¹ |
| Oligosaccharidgehalt ^[c,d] | ≤ 23 g l ⁻¹ | 0,05 g l ⁻¹ |
| Identifizierte Oligosaccharid-Strukturen ^[d,e] | > 200 | ca. 40 |
| Anteil fucosylierter Oligosaccharide ^[e,f] | 50 – 80 % | ca. 1 % |
| Anteil sialylierter Oligosaccharide ^[e,f] | 10 – 20 % | ca. 70 % |

^[a] (Hale & Hartmann, 2007); ^[b] (Kunz *et al.*, 2000); ^[c] (Coppa *et al.*, 1999); ^[d] (Niñonuevo *et al.*, 2006); ^[e] (Bode, 2012); ^[f] Zu 100 % fehlende Teile nicht fucosyliert oder sialyliert.

In der bisher untersuchten Milch von Monotremata und Marsupialia überstieg die Konzentration von Oligosacchariden die der Lactose, während bei den meisten bisher untersuchten höheren Säugetieren Lactose die Kohlenhydrat-Fraktion dominiert. Ausnahmen hierzu bilden einige Spezies der Canoidea (z. B. Seehunde, Bären, Riesenpandas und andere), in deren Milch der Oligosaccharid-Anteil ebenfalls den Anteil von Lactose übersteigt (Urashima *et al.*, 2012a). Beispiele für die in der Milch höherer Säugetiere enthaltenen Fucosylierungen sind anhand Ihrer Antigen-Strukturen in Tabelle 1.3 dargestellt. Ähnlich zu den Beobachtungen der Zusammensetzung humaner Milch konnte mittels der Milch zweier Eisbär-Weibchen (*Ursus maritimus*) demonstriert werden, dass die Vorkommen verschiedener Strukturen zwischen Individuen einer Spezies auch im Tierreich variieren können (Urashima *et al.*, 2000; Urashima *et al.*, 2001).

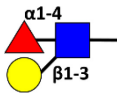
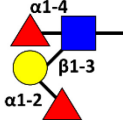
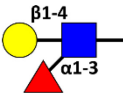
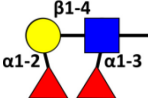

Eine weitere Auffälligkeit in den Strukturen von Milcholigosacchariden im Tierreich ist das seltene Vorkommen von Typ I-Kernstrukturen. So konnten Typ I-Strukturen mit der Ausnahme der Milch von Fingertieren (*Daubentonia madagascariensis*) lediglich in der Milch einiger Menschenaffen-Spezies (Schimpanse, Bonobo, Orang-Utan), jedoch nicht in der Milch von Altweltaffen oder Neuweltaffen identifiziert werden, während Typ I-

Strukturen in 75 % der HMOs in humaner Milch am nicht-reduzierenden Ende vorkommen und deren Konzentration die Konzentration von Typ II-Strukturen um Faktor drei bis vier übersteigt (Urashima *et al.*, 2011; Urashima *et al.*, 2012b).

Oligosaccharide in humaner Milch

Im Vergleich zu den Oligosaccharid-Vorkommen in Milch anderer Säugetiere (siehe vorheriger Abschnitt) wurden die Strukturen und Vorkommen humaner Milcholigosaccharide bereits deutlich ausführlicher untersucht (Urashima *et al.*, 2001) und festgestellt, dass die Zusammensetzung der Kohlenhydrat-Fraktion humaner Milch sowohl zwischen verschiedenen Individuen als auch mit fortschreitender Laktationszeit variiert (Chaturvedi *et al.*, 2001; Coppa *et al.*, 1999; Thurl *et al.*, 2010). So enthalten die Vormilch und die Milch bei vorzeitiger Geburt mit bis zu 23 g l⁻¹ den höchsten HMO-Gehalt, während die spätere humane Milch mit maximal 15 g l⁻¹ niedrigere Konzentrationen an HMOs aufweist (Coppa *et al.*, 1999; Gabrielli *et al.*, 2011; Zivkovic *et al.*, 2011). Neben der Laktationszeit spielt jedoch vor allem die Aktivität verschiedener Fucosyltransferasen eine entscheidende Rolle für das Vorkommen einzelner Verbindungen und somit die Zusammensetzung der HMO-Fraktion. Dabei ist das Vorkommen aktiver Allele des für die α 1,3/4-Fucosyltransferase FucTIII kodierenden Lewis-Gens und des für die α 1,2-Fucosyltransferase FucTII kodierenden Secretor-Gens ausschlaggebend für das Vorkommen verschiedener HMO-Strukturen (zusammengefasst von Bode, 2012). Basierend auf der Aktivität bzw. Inaktivität von FucTIII bzw. FucTII kann humane Milch verschiedener Spenderinnen somit in eine von vier verschiedenen Milch-Gruppen eingeteilt werden, wobei innerhalb einer Gruppe gleiche Verknüpfungen der Fucosyl-Gruppen und die gleichen Lewis- bzw. H-Antigen-Strukturen vorkommen, wie in Tabelle 1.3 dargestellt (Thurl *et al.*, 1997). Die HMO-Strukturen der in Europa mit 69 % am stärksten vertretenen Gruppe Le⁺Se⁺ (Lewis-positiver Secretor) beinhalten α 1,2-, α 1,3- und α 1,4-fucosylierte Verbindungen, während Le⁺Se⁻ (Lewis-positiver Non-Secretor, 20 % der Europäerinnen) keine α 1,2-fucosylierten Verbindungen, Le⁻Se⁺ (Lewis-negativer Secretor, 9 % der Europäerinnen) keine α 1,4-fucosylierten Verbindungen und Le⁻Se⁻ (Lewis-negativer Non-Secretor, 1 % der Europäerinnen) weder α 1,2-, noch α 1,4-fucosylierte Verbindungen enthalten (van Leeuwen *et al.*, 2014; Thurl *et al.*, 1997).

Tabelle 1.3: Antigen-Strukturen in HMOs, Vorkommen in humanen Milch-Gruppen und in Säugetiermilch.

| Antigen | Lewis a | Lewis b | Lewis x | Lewis y | H |
|--|---|---|---|---|---|
| Struktur ^[a] |  |  |  |  |  |
| HMO-Beispiel ^[b] | LNFP II | LNDFH I | LNFP III | LDFT (Glc-Analog) | LNFP I |
| Vorkommen in humaner Milch-Gruppe^[c] | | | | | |
| Le ⁺ Se ⁺ | + | + | + | + | + |
| Le ⁺ Se ⁻ | + | - | + | - | - |
| Le ⁻ Se ⁺ | - | - | + | + | + |
| Le ⁻ Se ⁻ | - | - | + | - | - |
| Identifikation in Säugetiermilch ^[d] | Rhesusaffe | - | Bär, Elefant, Schimpanse, Gorilla, Rhesusaffe | Schnabeltier | Seehund, Nerz, Nasenbär ^[e] , Bonobo |

^[a] Symbole: ●, Gal; ■, GlcNAc; ▲, Fuc

^[b] Die Strukturen der Beispiele sind in Abbildung 1.2 dargestellt.

^[c] (van Leeuwen *et al.*, 2014), Abkürzungen: Le⁺, Lewis-positiv; Le⁻, Lewis-negativ; Se⁺, Secretor; Se⁻, Non-Secretor. Ein Plus-Zeichen zeigt das Vorkommen des Antigens in dieser Milch-Gruppe an, ein Minus-Zeichen bezeichnet die Abwesenheit des Antigens in der Milch-Gruppe.

^[d] Angaben stellen Beispiele der Vorkommen dieser Strukturen dar (Tao *et al.*, 2011; Urashima *et al.*, 2001; Urashima *et al.*, 2012a).

^[e] Auslegung der H-Struktur in der Tierwelt als Verbindung mit α 1,2-fucosylierter Gal am nicht-reduzierenden Ende. In der Tierwelt vor allem in Form einer α 1,2-fucosylierten Typ II-Struktur anstelle einer α 1,2-fucosylierten Typ I-Struktur vorkommend.

Diese Klassifizierung in vier verschiedene Milch-Gruppen stellt jedoch eine Vereinfachung dar, welche die Konkurrenz von FucTII und FucTIII um einige Kernstrukturen und die Vorkommen weiterer Fucosyltransferasen, welche unter Verdacht stehen, ebenfalls in der Fucosylierung beteiligt zu sein, nicht berücksichtigt (Bode, 2006; Newburg *et al.*, 2005). Da die Fucosyltransferasen der Lewis- und Sekretor-Gene auch in der Protein-Glycosylierung des Lewis-Blutgruppensystems Einsatz finden, scheint eine serologische Bestimmung der Spender zur Vorhersage der Milch-Gruppe sehr naheliegend und lässt auch eine grobe Vorhersage des vorhandenen HMO-Profiles zu (Thurl *et al.*, 1997). Blank *et al.* (2012) konnten jedoch mittels massenspektrometrischer Untersuchung demonstrieren, dass auch Variationen zwischen den serologisch bestimmten Lewis-Gruppen und den in humaner Milch identifizierten Strukturen bestehen.

Tabelle 1.4: Kernstruktur-Typen und Konzentrationen ausgewählter humaner Milcholigosaccharide.

| Verbindung | Abkürz. | Kern- struktur | Konz. [g l ⁻¹] ^[a] | Laktations- zeit [d] ^[b] | Referenz |
|-----------------------------|----------|-------------------|---|--|---|
| 2'-Fucosyllactose | 2'-FL | - | 8,4 ± 2,6 | 3 | (Musumeci <i>et al.</i> , 2006) |
| 3-Fucosyllactose | 3-FL | - | 2,35 ± 1,39 | > 10 | (Leo <i>et al.</i> , 2009) |
| Lactodifucotetraose | LDFT | - | 0,43 ± 0,04 | (ca. 1 – 365) | (Chaturvedi <i>et al.</i> , 2001; Erney <i>et al.</i> , 2000) |
| | | | (0,77) ^[c] | (0 – 2) | |
| Lacto-N-tetraose | LNT | Typ I | 3,90 ± 1,86 | 5 – 10 | (Leo <i>et al.</i> , 2009) |
| Lacto-N-neotetraose | LNnT | Typ II | 2,04 ± 0,55 | 4 | (Coppa <i>et al.</i> , 1999) |
| Lacto-N-fucopentaose I | LNFP I | Typ I | 5,0 ± 1,0 | 3 | (Musumeci <i>et al.</i> , 2006) |
| Lacto-N-fucopentaose II | LNFP II | Typ I | 0,48 ± 0,46 | 10 | (Coppa <i>et al.</i> , 1999; |
| | | | (1,25) ^[c] | (-) | Thurl <i>et al.</i> , 2010) |
| Lacto-N-fucopentaose III | LNFP III | Typ II | 0,17 ± 0,08 | 3 | (Bao <i>et al.</i> , 2013; Erney |
| | | | (0,77) ^[c] | (≥ 31) | <i>et al.</i> , 2000) |
| Lacto-N-difucohexaose I | LNDFH I | Typ I | 1,87 ± 1,55 | 2 | (Asakuma <i>et al.</i> , 2008) |
| Lacto-N-difucohexaose II | LNDFH II | Typ I | 0,96 ± 0,44 | 5 – 10 | (Leo <i>et al.</i> , 2009) |
| Lacto-N-hexaose | LNH | Typ I & II | 0,17 ± 0,01 | 90 | (Coppa <i>et al.</i> , 1999) |
| Lacto-N-neohexaose | LNnH | Typ II | 0,28 ± 0,03 | 90 | (Coppa <i>et al.</i> , 1999) |
| 3'-Sialyllactose | 3'-SL | - | 0,36 ± 0,10 | 1 | (Asakuma <i>et al.</i> , 2007) |
| 6'-Sialyllactose | 6'-SL | - | 0,59 ± 0,15 | 4 | (Coppa <i>et al.</i> , 1999; |
| | | | (1,77) ^[c] | (8) | Thurl <i>et al.</i> , 2010) |
| Sialyllacto-N-tetraose a | LST a | Typ I | 0,16 ± 0,11 | 3 | (Asakuma <i>et al.</i> , 2007) |
| Sialyllacto-N-tetraose b | LST b | Typ I | 0,25 ± 0,13 | 30 | (Coppa <i>et al.</i> , 1999) |
| Sialyllacto-N-neotetraose c | LST c | Typ II | 1,05 ± 0,30 | 4 | (Coppa <i>et al.</i> , 1999) |

^[a] Dargestellt ist jeweils der höchste ermittelte Wert mit Standardabweichung aus Untersuchungen von Proben verschiedener Spenderinnen. Berücksichtigt wurden hierzu die Angaben verschiedener Publikationen mit Proben von Spenderinnen mit verschiedenem Lewis- und Secretor-Status (Asakuma *et al.*, 2007; Asakuma *et al.*, 2008; Bao *et al.*, 2013; Chaturvedi *et al.*, 2001; Coppa *et al.*, 1999; Erney *et al.*, 2000; Kunz *et al.*, 1999; Kunz *et al.*, 2000; Leo *et al.*, 2009; Musumeci *et al.*, 2006; Sumiyoshi *et al.*, 2003; Thurl *et al.*, 1996; Thurl *et al.*, 2010). Höhere Mittelwerte ohne Angaben der Standardabweichung sind in Klammern aufgeführt.

^[b] Dauer der vorherrschenden Laktation bei der Spenderin in Tagen bis zur Spende und Bestimmung der aufgeführten Konzentration.

^[c] Mittelwert aus Quantifizierungen von verschiedenen Proben ohne Angabe der Standardabweichung.

Aufgrund der verschiedenen Milch-Gruppen und da die Vorkommen der vier Milch-Gruppen global in verschiedenen Populationen variieren (Erney *et al.*, 2000), sind allgemeine Angaben zu durchschnittlichen Konzentrationen einzelner Verbindungen in humaner Milch wenig aussagekräftig. Durch die Analyse von Milch-Proben von 435 Spenderinnen aus 10 verschiedenen Ländern konnten Erney *et al.* (2000) die Variabilität der Vorkommen neutraler Milcholigosaccharide in verschiedenen Populationen und somit die globale Verteilung der Milch-Gruppen demonstrieren. Während die Kernstrukturen LNT und LNnT dabei in allen Proben enthalten waren, konnte keine der sieben betrachteten fucosylierten HMOs (2'-FL, 3-FL, LDFT, LNFP I, LNFP II, LNFP III und LNFP V) in allen Proben identifiziert werden. Dabei enthielten z. B. 100 % der Proben aus Mexiko 2'-FL, während nur in 46 % der Proben von den

Philippinen 2'-FL identifiziert wurde. Die globale Häufigkeit des Sekretor-Status, welcher für die Synthese von 2'-FL entscheidend ist, wurde auch von Castanys-Muñoz *et al.* (2013) zusammengefasst, wobei der Anteil an Sekretoren in der Bevölkerung von unter 30 % bis über 70 % variierte. Um für die Konzentrationen ausgewählter HMOs dennoch eine Größenordnung angeben zu können, wurden die aus verschiedenen Arbeiten ermittelten, maximalen Konzentrationswerte zusammen mit der Laktationszeit der jeweiligen Probe und dem Kernstruktur-Typ in Tabelle 1.4 dargestellt.

1.1.4. Physiologische Effekte

Wie in Abschnitt 1.1.1 beschrieben, erfolgte die Beschreibung der ersten Effekte humaner Milch auf die mikrobielle Zusammensetzung des Säuglingsdarms bereits im 19. Jahrhundert und somit vor der Identifikation von HMOs (Escherich, 1886). Dieser später als Bifidus-Faktor bzw. als präbiotischer Effekt bezeichnete und auf HMOs zurückgeführte Effekt (Gauhe *et al.*, 1954; Rose *et al.*, 1954; Schönfeld, 1926), sowie weitere gesundheitsfördernde Effekte von HMOs werden im Folgenden näher beschrieben. Viele bisherige Studien zu physiologischen Effekten von HMOs wurden mit Mischungen verschiedener HMOs durchgeführt, welche bei der Isolierung aus humaner Milch gemeinsam gewonnen wurden (Chen, 2015). Dies ist vermutlich auf die noch immer relativ hohen Preise isolierter Verbindungen zurückzuführen.

Präbiotischer Effekt

Präbiotika sind definiert als „nicht vom Wirt verdaubare Nahrungsmittelbestandteile, welche den Wirt positiv beeinflussen, indem sie das Wachstum und/oder die Aktivität einer oder mehrerer bereits im Dickdarm enthaltener Bakterienarten gezielt anregen und somit versuchen, die Gesundheit des Wirts zu verbessern“ (Gibson & Roberfroid, 1995). Während die in humaner Milch enthaltene Lactose durch die β -Galactosidase in den Mikrovilli von Darmepithelzellen gespalten und anschließend als Kohlenstoffquelle genutzt wird und somit kein Präbiotikum darstellt, passieren HMOs den Dünndarm weitestgehend unverdaut und erreichen somit den Dickdarm (Engfer *et al.*, 2000; Gnoth *et al.*, 2000). Dort können sie als Nährstoffe kommensaler Darmbakterien dienen, wie in verschiedenen Arbeiten zusammengefasst (Bode, 2012; Bode, 2015; Katayama, 2016; Pacheco *et al.*, 2015; Smilowitz *et al.*, 2014). So können vor allem einige Spezies der Gattung *Bifidobacterium* HMOs als Nährstoffe nutzen und erhalten dadurch einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Bakterien, welche diese Oligosaccharide nicht

nutzen können (Bode, 2015). Dieser bereits in den 1950er Jahren postulierte präbiotische Effekt von HMOs konnte 2006 *in vitro* mit dem Nachweis von Wachstum des Stammes *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 auf einer HMO-Mischung als einziger Kohlenstoffquelle verifiziert werden (Ward *et al.*, 2006). In späteren Studien zeigte *B. longum* subsp. *infantis* verlässliches Wachstum mit HMOs als einzige Kohlenstoffquelle. Dieser Stamm konnte HMOs dabei komplett verwerten, wobei aber auch *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bacteroides fragilis* und *Bacteroides vulgatus* HMOs als Kohlenstoffquelle nutzten, während z. B. *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Clostridium* und *Escherichia coli* kein oder nur langsames Wachstum mit HMOs als einziger Kohlenstoffquelle demonstrierten (Asakuma *et al.*, 2011; Marcobal *et al.*, 2010). Verschiedene Spezies der *Bifidobacteria* und *Bacteroides* nutzen dabei verschiedene Oligosaccharide als Kohlenstoffquellen. So können *B. longum* subsp. *longum* und *B. breve* im Gegensatz zu *B. longum* subsp. *infantis* lediglich LNT und nicht LNnT abbauen (Asakuma *et al.*, 2011), während im Vergleich verschiedener sialylierter und fucosylierter Lactosen die fucosylierten Verbindungen *in vitro* zu stärkerem Wachstum verschiedener Spezies führten als die sialylierten Verbindungen (Yu *et al.*, 2013a). Das Typ I-HMO LNT, welches in Muttermilch in höheren Konzentrationen vorkommt als das Typ II-HMO LNnT, scheint dabei *in vivo* in größeren relativen Mengen bakteriell abgebaut zu werden als LNnT (Albrecht *et al.*, 2010; Albrecht *et al.*, 2011). Der Abbau der Oligosaccharide kann sowohl extrazellulär durch sekretierte Glycosidasen als auch intrazellulär nach der Aufnahme von HMOs erfolgen, wobei verschiedene *Bifidobacteria* verschiedene Glycosidasen und Transportmechanismen aufwiesen (Asakuma *et al.*, 2011; Katayama, 2016; Pacheco *et al.*, 2015). So scheint z. B. *B. bifidum* HMOs extrazellulär zu spalten und Mono- und Disaccharide aufzunehmen, während *B. bifidum* subsp. *infantis* auch Transporter für größere HMO-Strukturen zu besitzen scheint und diese Oligosaccharide intrazellulär spaltet (Katayama, 2016).

Um das Konzept des kompetitiven Vorteils kommensaler Bakterien durch Nutzung von HMOs auch *in vivo* zu untersuchen, wurden die Därme gnotobiotischer Mäuse mit *B. infantis* und *Bacteroides thetaiotaomicron* inokuliert und die Tiere anschließend mit bzw. ohne Lacto-N-neotetraose gefüttert (Marcobal *et al.*, 2011). Dabei erhielt *B. infantis* einen kompetitiven Vorteil durch die Zugabe von LNnT und zeigte eine relative

Häufigkeit von 40 % der im Darm identifizierten Bakterien, während die Häufigkeit ohne Zugabe von LNnT nur etwa 2 % betrug.

Antiadhäsiver Effekt

Neben dem präbiotischen Effekt weisen HMOs aufgrund ihrer Strukturen auch einen antiadhäsiven Effekt auf. Kolonisierung und Infektion des Darmtraktes geschehen häufig über Pathogen-Darmepithel-Interaktionen, wobei die Pathogene über Adhäsine, Fimbrien oder Pili an die vom Darmepithel exponierten Glycoprotein- und Glycolipid-Strukturen binden oder humane Lektine an die Glycoproteine von Pathogenen binden (Bode, 2012; Peterson *et al.*, 2013). Da HMOs Strukturen aufweisen, welche den Strukturen der Darmepitheloberfläche ähnlich sind, können diese ebenfalls als Epitope für die Bindung von Pathogenen oder humanen Lektinen dienen und die Bindemoleküle blockieren, wodurch eine Adhäsion der Pathogene ans Darmepithel verhindert wird (Newburg *et al.*, 2005). So konnte eine Studie bereits die Inhibition der Bindung von Noroviren, einem der Haupterreger von Magen-Darm-Entzündungen, an Blutgruppen-Antigene in Speichel nachweisen (Jiang *et al.*, 2004). In einer anderen Studie, in welcher die Vorkommen von Durchfallerkrankungen von 93 Säuglingen in Verbindung gebracht wurden mit den Vorkommen von α 1,2-fucosylierten HMOs in der Milch der stillenden Mütter, konnte die Häufigkeit von Durchfallerkrankungen in reziproken Zusammenhang gebracht werden mit hohen Konzentrationen von α 1,2-fucosylierten HMOs in Muttermilch (Morrow *et al.*, 2004). Dabei korrelierten hohe Vorkommen der Oligosaccharide 2'-FL bzw. Lacto-N-difucohexaose I in Muttermilch mit geringeren Fallzahlen von Campylobacter- bzw. Calicivirus-bedingten Durchfällen. HMOs mit Lewis Antigenen werden außerdem von Dendritischen Zellen gebunden, stehen in Konkurrenz mit dem Glycoprotein gp120 der HIV-Hülle und senken somit die Bindungsanzahl von gp120 an das Bindeprotein der dendritischen Zellen (Hong *et al.*, 2009). Ein Zusammenhang höherer Konzentrationen von HMOs mit gesenkten Übertragungsraten des HI-Virus von der Mutter zum Säugling durch Stillen bekräftigt dabei die antiadhäsive Wirkung von HMOs auf HIV (Bode *et al.*, 2012). Dieser Sachverhalt erklärt vermutlich auch die relativ geringen Übertragungsraten von HIV durch Muttermilch, wobei etwa 80 – 90 % der Säuglinge HIV-positiver Mütter trotz des über Monate hinweg anhaltenden Kontakts mit dem Virus nicht infiziert werden (Bode, 2012).

Eine Studie mit Mischungen verschiedener HMOs demonstrierte des Weiteren einen Effekt auf die Bindung von enteropathogenen *E. coli* (EPEC), einem bei Säuglingen vorkommenden Durchfallerreger, an Epithelzellen (Manthey *et al.*, 2014). Dabei wiesen EPEC, welche zuvor mit einer Mischung aus HMOs inkubiert wurden, *in vitro* eine geringere Bindeaktivität an verschiedene humane Zelllinien auf und zeigten *in vivo* im Mausmodell geringere intestinale Koloniebildung. Die in diesen Experimenten als Kontrolle eingesetzten Galactooligosaccharide (GOS) hatten deutlich schwächere Effekte auf die Bindung von EPEC als HMOs.

In einer weiteren *in vitro* Untersuchung konnten außerdem die Reduktionen der Bindungshäufigkeiten von *Campylobacter jejuni*, *Pseudomonas aeruginosa*, EPEC und *Salmonella enterica* an zwei verschiedene humane Epithelzelllinien (Caco-2 und A549) durch den Einsatz biotechnologisch hergestellter 2'-FL bzw. 3-FL aufgezeigt werden (Weichert *et al.*, 2013). Das Maß der Reduktion der Bindungshäufigkeiten betrug dabei 12 bis 30 %. Die Inhibition der Bindung von *P. aeruginosa* ist dabei vor allem von Interesse, da Muttermilch durch Verschlucken und Aufstoßen auch den Nase-Rachen-Raum sowie den oberen respiratorischen Trakt des Säuglings benetzt und somit vermutlich auch dort einen antiadhäsiven Effekt haben kann (Bode, 2012).

Eine kürzlich durchgeführte Untersuchung des rekombinant in *E. coli* exprimierten Pathogenitätsfaktors TcdA-f2, welcher die Bindedomäne des Toxins A des Durchfallerregers *Clostridium difficile* darstellt, zeigte ebenfalls eine starke Bindung an einzelne HMOs bzw. eine Mischung verschiedener HMOs (Nguyen *et al.*, 2016). Daher liegt auch hier eine Inhibition der Bindung des Pathogens an das Darmepithel durch Konkurrenz nahe. Als Einzelverbindungen zeigten die HMOs Lacto-N-fucopentaose V und Lacto-N-neohexaose in dieser Studie die stärksten Bindungen, wobei eine Mischung verschiedener HMOs eine noch stärkere Bindung aufwies; ein Sachverhalt, der auf synergistische Effekte zurückgeführt wurde (Nguyen *et al.*, 2016).

Neben den antiadhäsiven Effekten an Viren und Bakterien scheinen HMOs jedoch auch einen Einfluss auf die Epithelbindung und Koloniebildung des einzelligen Parasiten *Entamoeba histolytica* zu haben, welcher Amöbenruhr und Leberabszesse verursachen kann. So senkten einige HMOs *in vitro* die Bindung von *E. histolytica* an Darmepithelzellen um mehr als 80 %, einhergehend mit reduzierter Zelltoxizität von *E. histolytica* bei steigenden Konzentrationen von HMOs (Jantscher-Krenn *et al.*, 2012).

Anders als für die zuvor beschriebenen Studien zu Durchfallerkrankungen konnten diese Effekte jedoch nicht auf 2-fucosylierte HMOs, sondern auf die nicht-fucosylierte Kernstruktur LNT zurückgeführt werden, wobei die Toxizität um bis zu 80 % reduziert wurde.

Einfluss auf Darmepithelzellen

Verschiedene *in vitro* Studien mit den Darmepithelzelllinien Caco-2, HIEC bzw. HT-29 zeigten Effekte von HMOs auf die Oberflächen-Glycosylierung, die Zellproliferation und die Zelldifferenzierung. So konnten Angeloni *et al.* (2005) nachweisen, dass eine Inkubation von Caco-2 Epithelzellen mit 3'-Sialyllactose zu verminderten Expressionen von Sialyltransferasen und somit zu weniger sialylierten Zelloberflächenstrukturen führt, was eine verminderte Bindung von enteropathogenen *E. coli* an diese Zellen zur Folge hatte. In späteren Studien durch Kuntz *et al.* (2008, 2009) wurde beschrieben, dass von 16 getesteten HMOs verschiedene Verbindungen verschiedene Effekte auf die Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Darmepithelzelllinien ausüben und dass dieser Einfluss durch die modifizierte Expression von Zellzyklus-Regulatoren geschieht.

Ein weiterer, indirekter Effekt von HMOs auf das Darmepithel wurde beschrieben von Wickramasinghe *et al.* (2015). So wurde *in vitro* gezeigt, dass *B. infantis* durch das Wachstum mit HMOs als Kohlenstoffquelle besser an eine Caco-2-Zellschicht bindet als bei Wachstum auf Glucose oder Lactose. Außerdem beeinflussen mit HMOs gewachsene *B. infantis* und *B. breve* das Caco-2-Transkriptom, indem Gene mit chemokiner Aktivität herunterreguliert wurden und somit Inflammationsmarker reduziert wurden. Diesen antiinflammatorischen Effekt zeigten beide Stämme bei Wachstum mit Glucose oder Lactose als Nährstoffquelle nicht.

Weitere Effekte und systemisches Vorkommen von HMOs

Neben den bereits beschriebenen Effekten wurden in verschiedenen Arbeiten weitere positive Effekte von HMOs genannt bzw. vorgeschlagen, wie der immunmodulierende Effekt, der Einfluss auf die Adhäsion von Leukozyten, der Schutz vor nekrotisierender Enterokolitis oder der Einfluss auf die Gehirnentwicklung des Säuglings. Auf diese Effekte soll hier jedoch nicht im Detail eingegangen werden. Einen Überblick zu diesen Effekten geben die Arbeiten von Bode (2012) und Smilowitz *et al.* (2014).

Diese Effekte bedürfen jedoch noch weiterer Untersuchungen, da es sich dabei zum Teil um Einflüsse handelt, welche nicht im Verdauungstrakt, sondern systemisch erfolgten. Diese Phänomene setzten das Passieren der HMOs durch die Darmbarriere voraus, um zum Wirkungsort zu gelangen. Die Möglichkeit einer solchen Passage der Darmbarriere konnte mittels des Nachweises des Durchdringens von HMOs durch eine Caco-2-Zellschicht angedeutet werden (Gnoth *et al.*, 2001) und wurde später durch die Wiederfindung ¹³C-markierter Oligosaccharide im Urin von Säuglingen sowie durch den direkten Nachweis von HMOs im Blutplasma und Urin von Säuglingen bestätigt (Goehring *et al.*, 2014; Rudloff *et al.*, 2012). Dem Nachweis ¹³C-markierter HMOs im Urin von Säuglingen gingen dabei Versuche voraus, welche den Einbau ¹³C-markierter Galactose in die Lactose und HMOs der humanen Milch zeigten, nachdem die Spenderinnen diese ¹³C-Galactose zu sich nahmen (Rudloff *et al.*, 2006). Der spätere Nachweis nicht-markierter HMOs in Urin und Blutplasma der Säuglinge erfolgte mittels GC-MS, LC-MS-MS und HPLC, wies sieben verschiedene HMO-Konstitutionsisomer-Fractionen im Urin und drei davon (2'-FL, 3-FL und LNnT/LNT) auch in Blutplasma nach. Dabei konnten etwa 4 % der über humane Milch verabreichten HMOs im Urin und 0,1 % im Blutplasma detektiert werden (Goehring *et al.*, 2014).

Die beschriebenen Effekte von HMOs wurden zwar bereits in zahlreichen Studien untersucht, jedoch wurden hierzu häufig aus humaner Milch isolierte Mischungen verschiedener HMOs verwendet bzw. nur wenige einzelne Verbindungen eingesetzt, sodass weitere Studien benötigt werden, um die Effekte ausgiebiger zu charakterisieren und Strukturabhängigkeiten der Effekte weiter zu untersuchen. Umfangreiche Studien sind aufgrund der nach wie vor limitierten Verfügbarkeit reiner HMOs in größeren Mengen nur unter hohem Kostenaufwand möglich, sodass Methoden zur günstigeren Bereitstellung von HMOs notwendig sind (Bode, 2012).

1.2. Extraktion und Synthese humaner Milcholigosaccharide

Studien zur Untersuchung der Effekte von HMOs wurden in der Vergangenheit mit wenigen Ausnahmen anhand von Oligosacchariden durchgeführt, welche aus humaner Milch isoliert wurden, da Methoden zu deren Synthese aufwändig bzw. noch nicht vorhanden waren. Erst in den vergangenen Jahren erschienen erste wissenschaftliche Publikationen, welche physiologische Effekte von HMOs unter Verwendung synthetisch

hergestellter Verbindungen untersuchten (Coulet *et al.*, 2014; Garrido *et al.*, 2015; Marcobal *et al.*, 2011; Newburg *et al.*, 2016; Ruiz-Moyano *et al.*, 2013; Weichert *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2013a) und somit unabhängig waren von der Extraktion aus humaner Milch und den damit einhergehenden chromatographischen Problemen und ethischen Schwierigkeiten. In den folgenden Abschnitten wird ein Überblick über die zur Extraktion und Synthese von HMOs eingesetzten Methoden gegeben.

1.2.1. Extraktion aus Milch

Präparative und analytische Extraktionen von HMOs aus Milch wurden in diversen Arbeiten sowohl für die Isolierung der Gesamtheit der HMOs als auch für die Isolierung einzelner Verbindungen oder die Gewinnung der Fraktionen neutraler bzw. saurer HMOs beschreiben (Anderson & Donald, 1981; Kuntz *et al.*, 2008; Totten *et al.*, 2014). Standard-Extraktionsmethoden beginnen mit der Abtrennung von Lipiden und unlöslichen Bestandteilen durch Zentrifugation, gefolgt von der Präzipitation von Proteinen und Anteilen der Lactose mittels Zugabe von Ethanol und erneuter Zentrifugation (Bao *et al.*, 2013; Chaturvedi *et al.*, 1997). Zum Entfernen der Proteinfraktion wurden alternativ auch eine Ultrafiltrationsmethode (Thurl *et al.*, 1996) bzw. die Protein- und Lactose-Fällung mit Aceton anstelle von Ethanol durchgeführt (Kunz *et al.*, 1996). Verbleibende Proteine, Salze und weitere Bestandteile können aus der resultierenden Lösung häufig mittels Größenausschlusschromatographie entfernt werden, wobei auch weitere Lactose abgetrennt wird und somit eine komplexe Mischung verschiedener HMOs erhalten werden kann. Diese wurde in verschiedenen Arbeiten anschließend mittels Anionen-Austauschchromatographie in neutrale und saure HMOs unterteilt (Kuntz *et al.*, 2009; Kunz *et al.*, 1996). Das erneute Entfernen von Salzen und die Isolierung einzelner Verbindungen erfolgten danach mittels weiterer Größenausschlusschromatographie. In Arbeiten, in denen die Oligosaccharide nicht in nativer Form gewonnen, sondern lediglich analysiert werden sollten, wurde alternativ zur Größenausschluss- und Ionenaustauschchromatographie die Reduktion der Oligosaccharide mittels Natriumborhydrid gefolgt von der Analyse mittels LC-MS oder weiteren chromatographischen Schritten (Ionenaustauschchromatographie oder Festphasenextraktion (SPE) mit graphitiertem Kohlenstoff) beschrieben (Bao *et al.*, 2013; Chaturvedi *et al.*, 1997; Totten *et al.*, 2014).

Alternativ zu diesen Methoden wurde jedoch eine Vielzahl weiterer Methoden zur Isolierung einzelner HMOs in verschiedenen Maßstäben beschrieben, welche neben anderen Methoden auch Papierchromatographie, Chromatographie mit Aktivkohle-Celite-Säulen und Recycling-Chromatographie mit Ionentauschern verwendeten (Anderson & Donald, 1981; Donald & Feeney, 1988; Kobata *et al.*, 1969).

Da die beschriebenen Extraktionsmethoden jedoch auf der Verwendung der nur in limitierten Mengen und unter ethischen Konflikten verfügbaren humanen Milch basieren, erfolgte vor allem für saure HMOs auch die Extraktion aus tierischer Milch.

Dazu analysierten Martinez-Ferez *et al.* (2006) Kuh-, Schafs- und Ziegenmilch auf vorkommende Oligosaccharide und demonstrierten einen zweistufigen Prozess unter Verwendung von Keramik-Röhrenmembranen zur Tangential-Nanofiltration mit den Ausschlussgrößen von 50 kDa und 1 kDa. Mit dieser Methode konnten 80 % der vorkommenden Oligosaccharide lactose- und salzfrei isoliert werden. Dabei wurden jedoch keine einzelnen Verbindungen isoliert oder die in humaner Milch vorkommenden Oligosaccharide von anderen abgetrennt. In einem 2004 veröffentlichten Patent zur Herstellung sialylierter Oligosaccharide aus Milchprodukten beschreiben Pelletier *et al.* (2004) die Verwendung einer α 2,3-Transsialidase aus *Trypanosoma cruzi*. Hierbei wurde die Verwendung vorhandener Lactose und sialylierter Oligosaccharide in Milchprodukten oder Abfall-Fraktionen der Käseherstellung zur Synthese von 3'-SL durch Übertragung des Sialinsäure-Rests demonstriert. Die entstehenden 3'-SL-Konzentrationen von unter 1 g l^{-1} sind ebenfalls noch nicht von anderen Oligosacchariden isoliert, was eine wirtschaftliche Gewinnung dieser 3'-SL erschwert.

Als Alternativen zu Extraktionen aus humaner und tierischer Milch werden im Folgenden die chemischen und biotechnologischen Synthesen von HMOs näher beschrieben, welche in den vergangenen vier Jahrzehnten entwickelt wurden.

1.2.2. Chemische Synthese

Erste Publikationen zu chemischen Synthesen von HMOs erschienen bereits in den frühen 80er Jahren des 20. Jahrhunderts und somit etwa 20 Jahre vor den ersten Beschreibungen biotechnologischer Synthesen (Takamura *et al.*, 1980; Takamura *et al.*, 1981). Aufgrund der zahlreichen Hydroxylgruppen in Oligosacchariden sind regio- und

stereoselektive Glycosylierungen nicht trivial. Daher bedienten sich diese und zahlreiche weitere chemische Synthesen von HMOs der Schutzgruppenchemie, wobei die reaktiven Hydroxylgruppen, welche nicht glycosyliert werden sollten, unter definierten Bedingungen und häufig unter Verwendung von Katalysatoren selektiv durch die Bindung von Schutzgruppen maskiert wurden. Das dabei weitreichend mit Schutzgruppen versehene Oligosaccharid diente anschließend als Substrat für die Glycosylierung an einer nicht geschützten Hydroxyl-Gruppe (Levy & Fügedi, 2005). So beschreiben zahlreiche Arbeiten die Synthesen diverser HMOs. Dazu zählen unter anderen die Fucosyllactosen 2'-FL, 3-FL und LDFH (Dékány *et al.*, 2010; Fernandez-Mayoralas & Martin-Lomas, 1986), die Kernstrukturen LNT (Aly *et al.*, 1999; Hsu *et al.*, 2012; Takamura *et al.*, 1980), LNnT (Aly *et al.*, 1999), LNnH (Takamura *et al.*, 1981), p-LNnH und p-LNnO (Aly *et al.*, 2000), i-LNO (Knuhr *et al.*, 2001), sowie fucosylierte HMOs mit größeren Kernstrukturen wie LNFP I (Hsu *et al.*, 2012; Manzoni *et al.*, 1998), LNFP III (Lay *et al.*, 1998; Manzoni *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999), LNDFH I (Chernyak *et al.*, 2000) und saure HMOs wie LST a (Sherman *et al.*, 2001).

Da bei den klassischen Methoden zur Synthese von Oligosacchariden in Lösung mit Schutzgruppenchemie jedoch mehrere Reaktionsschritte unter verschiedenen Bedingungen benötigt werden, welche die Isolierung der Zwischenprodukte erfordern, sind diese Methoden relativ aufwändig. So nimmt die Komplexität der Synthesen mit der Größe der synthetisierten Oligosaccharide stark zu. Um die Isolierungen von Zwischenprodukten zu umgehen und die Synthese weniger arbeitsintensiv zu gestalten, wurden weitere Methoden entwickelt, welche die Reaktionen in einem Ansatz erlaubten (Jennum *et al.*, 2014), die Oligosaccharide immobilisierten (Shimizu *et al.*, 1996) oder die Synthesen automatisierten oder sowohl immobilisiert als auch automatisiert durchführten (Love & Seeberger, 2005; Plante *et al.*, 2001; Routenberg Love & Seeberger, 2004). Dabei konnten in der Festphasensynthese überschüssige Reagenzien, Nebenprodukte und Lösungen einfacher abgetrennt werden von den Produkten, was einen schnelleren Wechsel der Reaktionsbedingungen erlaubte.

Aufgrund der dennoch bestehenden, im Vergleich zu Biokatalysen niedrigen Regio- und Stereospezifitäten, den damit einhergehenden niedrigen Produktausbeuten, den häufig eingesetzten toxischen Reagenzien, sowie der nach wie vor aufwändigen Schutzgruppenchemie, sind diese Synthesen für die Herstellung von HMOs im

industriellen Maßstab momentan noch nicht ausreichend entwickelt (Han *et al.*, 2012; Meyer & Werbitzky, 2011; Petschacher & Nidetzky, 2016).

1.2.3. Chemo-enzymatische und enzymatische Synthese

Sowohl saure als auch neutrale HMOs, welche die Kernstrukturen und fucosylierte Verbindungen einschließen (s. Abschnitt 1.1.2) wurden bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen chemo-enzymatisch bzw. enzymatisch synthetisiert, wie von Chen (2015) zusammengefasst. Bei den dabei eingesetzten Enzymen handelt es sich um Glycosyltransferasen bzw. Glycosidasen. Dabei nutzen Glycosyltransferasen wie die Fucosyl-, Sialyl-, N-Acetylglucosaminyl- oder Galactosyltransferasen Nukleotid-aktivierte Zucker als Donorsubstrate, weisen hohe Regio- sowie Stereospezifitäten auf und erlauben meist hohen Produktausbeuten. Glycosynthasen bzw. Transglycosidasen, welche in ihren physiologischen Aktivitäten die Spaltungen glycosidischer Bindungen katalysieren, weisen in der Regel geringere Selektivitäten und Produktausbeuten auf, benötigen dafür jedoch keine Nukleotid-aktivierten Zucker als Donorsubstrate (Petschacher & Nidetzky, 2016; Zeuner *et al.*, 2014), wie im Folgenden näher beschrieben.

Glycosyltransferasen

Glycosyltransferasen (GTs) katalysieren Synthesen von Di-, Oligo- und Polysacchariden sowie von weiteren Glycanen durch die Übertragung von Zucker-Gruppen von aktivierten Donor-Substraten auf Akzeptor-Substrate und zeigen dabei generell sehr hohe Substratspezifitäten (Breton *et al.*, 2006), wobei Leloir-Glycosyltransferasen Nukleotid-aktivierte Zucker als Donor-Substrate nutzen. Die Vielzahl verschiedener GTs kann nach verschiedenen Kriterien klassifiziert werden. So erfolgt die Einteilung nach der International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) in verschiedene Klassen je nach Substrat- und Produktspezifitäten (EC 2.4.X.Y), während die Datenbank Kohlenhydrat-aktiver Enzyme (CAZY, Carbohydrate-Active Enzymes) eine differenzierte Klassifizierung - basierend auf den Aminosäuresequenzen - durchführt und GTs damit aktuell in 99 Familien eingeteilt (<http://cazy.org>, Zugriff am 12.05.2016, Lombard *et al.*, 2014). Eine weitere Klassifizierung kann nach der Stereochemie des katalytischen Mechanismus in invertierende und retentierende GTs erfolgen (Sinnott, 1990).

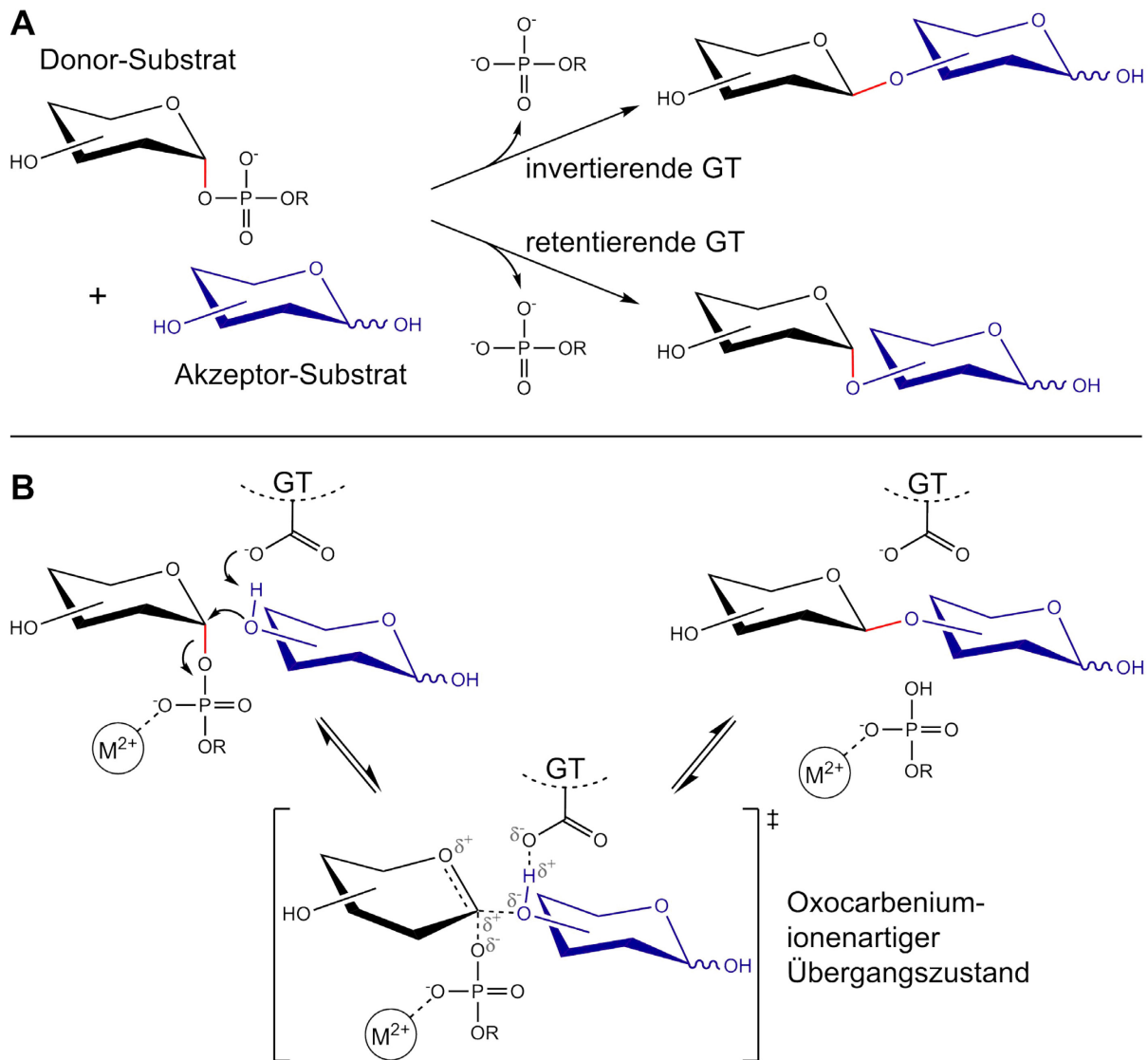


Abbildung 1.3: Durch Glycosyltransferasen katalysierte Reaktionen. A) Unterschieden wird zwischen invertierenden und retentierenden Glycosyltransferasen, welche die Stereokonfiguration des anomeren Zentrums des Donor-Substrats bei der Bindung an das Akzeptor-Substrat (blau) verändert bzw. beibehalten (Bindung in rot). **B)** Reaktionsmechanismus invertierender Glycosyltransferasen. Die Glycosylierung erfolgt über eine S_N2 -artige Reaktion mit einem Oxocarbeniumion-artigen Übergangszustand, bei dem die anomere Konfiguration des Donor-Substrats durch die Bindung des Akzeptor-Substrats (blau) invertiert wird (entsprechende Bindung in rot; Lairson *et al.*, 2008). **Abkürzungen:** GT, Glycosyltransferase; M^{2+} , zweiwertiges Kation oder positiv geladene Aminosäure-Reste; R, Nukleosid oder Nukleosid-monophosphat.

Invertierende GTs verändern die Stereokonfiguration des anomeren Zentrums des Donor-Zuckers bei der Übertragung, während retentierende GTs die Stereokonfiguration des Donor-Zuckers beibehalten, wie in Abbildung 1.3 A dargestellt. Die relativ konservierten Strukturen von GTs lassen eine Einteilung der meisten GTs, welche Nukleotid-aktivierte Zucker nutzen, in einen GT-A Fold bzw. einen GT-B Fold zu (Lairson *et al.*, 2008). GTs mit GT-A Fold zeigen dabei zwei aneinandergrenzende β - α - β Domänen (Rossmann-artige Domänen), welche typisch für Nukleotid-Bindedomänen sind und weisen außerdem meist ein Asparaginsäure-X-Asparaginsäure (DXD) Motiv auf, dessen Carboxyl-Gruppen ein divalentes Kation und/oder eine Ribose koordinieren.

GTs mit GT-B Fold zeigen ebenfalls zwei Rossmann-artige Domänen, die jedoch weiter voneinander entfernt sind, und verfügen nicht über ein Kation-koordinierendes DXD Motiv. Die für die Reaktion benötigten positiven Ladungen werden in GT-B Transferasen jedoch durch Aminosäurereste bereitgestellt. Ein Zusammenhang zwischen der Faltungsart und einer invertierenden oder retentierenden Katalyse besteht nicht, da in beiden Faltungsklassen bereits zahlreiche GTs mit retentierender und invertierender Glycosylierung identifiziert werden konnten (Lairson *et al.*, 2008). Während der Reaktionsmechanismus retentierender Glycosyltransferasen bisher lediglich postuliert ist, konnte der Mechanismus invertierender Glycosyltransferasen bereits aufgeklärt werden, wie in Abbildung 1.3 B dargestellt. So erfolgt die Katalyse über eine doppelte nukleophile Substitution der zweiten Ordnung (S_N2 -artige Reaktion), wodurch ein Oxocarbeniumion-artiger Übergangszustand erreicht wird und die anomere Konfiguration der Donor-Zuckers invertiert (Lairson *et al.*, 2008).

Künstliche Glycosynthasen

Um bei der *in vitro* Synthese von HMOs auf den Einsatz von Nukleotid-aktivierten Zuckern verzichten zu können, werden auch Transglycosidasen bzw. künstliche Glycosynthasen in enzymatischen Synthesen genutzt. So konnten z. B. für die Synthesen von fucosylierten Oligosacchariden Transfucosidasen bzw. Fucosynthasen anstelle von Fucosyltransferasen eingesetzt werden (Sakurama *et al.*, 2012; Saumonneau *et al.*, 2015; Wada *et al.*, 2008) und zur Übertragung von Sialylgruppen die in Abschnitt 1.1.2 beschriebene $\alpha2,3$ -Transsialidase verwendet werden. Transglycosidasen bzw. Glycosynthasen basieren auf Enzymen, welche glycosidische Bindungen spalten. Um anstelle der Hydrolyse des erwünschten Produkts und des Donor-Substrats jedoch eine Synthese mittels Transglycosylierung zu erreichen, werden hierbei Donorsubstrat-Überschüsse eingesetzt, die Reaktionen unter definierten Bedingungen durchgeführt bzw. die katalytischen Zentren der Enzyme modifiziert, um die Hydrolyse-Aktivitäten am Donor-Substrat und am Produkt zu vermindern, wie zusammengefasst von Zeuner *et al.* (2014). Wie von Petschacher und Nidetzky (2016) beschrieben, geht der mit diesen Enzymen ermöglichte Verzicht auf kostspielige Nukleotid-aktivierte Zucker jedoch meist einher mit geringeren Regio- bzw. Stereoselektivitäten, Produktausbeuten von max. 30 – 70 % und mit der Verwendung von Glycosiden wie Nitrophenyl- α -L-Fucopyranosid oder α -L-Fucosylfluorid, welche zum Teil instabil oder aufgrund ihrer Toxizität in der Lebensmittelindustrie unerwünscht sind.

Synthese von HMO-Kernstrukturen

Die neben Lactose am häufigsten vorkommenden Kernstrukturen LNT und LNnT (s. Abschnitte 1.1.2 und 1.1.3), konnten bereits im Jahr 1999 enzymatisch synthetisiert werden über einen zweistufigen Syntheseweg (Murata *et al.*, 1999). So wurde zuerst eine aus bovinem Serum isolierte β 1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase für den Transfer der GlcNAc-Einheit von UDP-GlcNAc auf Lactose verwendet um das Trisaccharid Lacto-N-triose II (LNT II; GlcNAc(β 1,3)Gal(β 1,4)Glc) zu synthetisieren. Dieses wurde anschließend als Substrat für eine von zwei unterschiedlichen β -Galactosidasen aus *Bacillus circulans* unter Verwendung von Lactose bzw. ortho-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid genutzt, um den jeweiligen Galactosyl-Rest mit einer β 1,4- bzw. β 1,3-glycosidischen Bindung an LNT II zu erzeugen und somit LNnT bzw. LNT in Ausbeuten von 19 – 26 % zu erhalten.

In einer weiteren Arbeit aus dem Jahr 1999 beschreibt Johnson die Nutzung bakterieller Glycosyltransferasen zur Synthese von Oligosacchariden unter der Beobachtung, dass diese Enzyme im Gegensatz zu den Säuger-Enzymen keine Glycosylierungen aufweisen und daher einfacher in bakteriellen Systemen hergestellt werden können. So konnten die Substratspezifitäten der aus *Neisseria gonorrhoeae* stammenden GTs LgtA, LgtB, LgtC und LgtD bestimmt werden (Gotschlich, 1994). Diese wiesen dabei breitere Substratspektren auf als die entsprechenden Säuger-Glycosyltransferasen. Unter Verwendung der in *E. coli* rekombinant exprimierten *Neisseria meningitidis* Gene *lgtA* und *lgtB*, welche für eine β 1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase und eine β 1,4-Galactosyltransferase kodieren (Blixt *et al.*, 1999; Jennings *et al.*, 1995; Wakarchuk *et al.*, 1998), konnte in einem *in vitro* Ansatz mit einem Volumen von 100 l zuerst 250 g des Trisaccharids LNT II und daraus über 300 g LNnT synthetisiert werden, wobei die Produktausbeuten der einzelnen Syntheseschritte über 85 % lagen (Johnson, 1999). Ein Teil des dabei synthetisierten LNnT wurde in der gleichen Arbeit erneut als Substrat genutzt, um mittels einer rekombinant exprimierten α 2,3-Transsialidase 50 g des am nicht-reduzierenden Ende α 2,3-sialylierten LST d zu synthetisieren.

Als alternative, rekombinant und funktionell in *E. coli* exprimierte β 1,4-Galactosyltransferase konnte das katalytische Zentrum der humanen β 1,4-Galactosyltransferase I in einem Fusionsprotein mit einer His₆-Markierung und einem Lipase Propeptid aus *Staphylococcus hyicus* beschrieben und mit verschiedenen

auf GlcNAc basierenden Akzeptor-Substraten analysiert werden (Sauerzapfe *et al.*, 2008). Dabei wurde die Nutzung des Fusionsproteins zur Synthese von HMOs jedoch nicht beschrieben.

Synthese fucosylierter HMOs

Neben den Transfucosidasen bzw. Fucosynthasen (Sakurama *et al.*, 2012; Saumonneau *et al.*, 2015; Wada *et al.*, 2008) konnten in verschiedenen Arbeiten bereits zahlreiche bakterielle α 1,2-, α 1,3- und α 1,3/4-Fucosyltransferasen identifiziert und charakterisiert werden, wie von Petschacher und Nidetzky (2016) zusammengefasst. So werden dort jeweils acht α 1,2- und α 1,3- bzw. α 1,3/4-Fucosyltransferasen aufgeführt, die größtenteils aus *Helicobacter pylori* und *E. coli* stammen und in verschiedenen Arbeiten rekombinant exprimiert und für enzymatische Synthesen von HMOs verwendet werden konnten. In ihrer physiologischen Funktion katalysieren die gut charakterisierten Fucosyltransferasen FutA, FutB und FutC von *H. pylori* die Fucosylierung von Lipopolysacchariden, welche aus wiederholenden LacNAc-Einheiten bestehen. Damit erlauben sie fucosylierte Zelloberflächenstrukturen, deren Funktion bisher noch nicht vollständig aufgeklärt ist (Ma *et al.*, 2006). Da die dabei gebildeten Kohlenhydratstrukturen jedoch den von der Magenschleimhaut sekretierten Kohlenhydraten strukturell ähnlich sind, wurde ein Mechanismus der molekularen Mimikry vorgeschlagen, welcher es den Pathogenen erlauben soll, der Erkennung durch das Immunsystem zu entweichen (Appelmelk *et al.*, 1997). Die von *H. pylori* ausgebildeten Oberflächenstrukturen variieren dabei durch den als Phasenvariation bezeichneten Mechanismus, welcher durch homopolymere Bereiche am 5'-Ende der Fucosyltransferase-Gene verursacht werden (Ma *et al.*, 2006). So können während der DNA-Replikation Leserahmen-verschiebende Mutationen durch die Addition oder Deletion eines Basenpaars im homopolymeren Bereich auftreten, welche eine Inaktivierung bzw. Aktivierung der Fucosyltransferase-Gene zur Folge haben. Diese Variation der Leserahmenintegrität wurde auch für weitere Glycosyltransferase-Gene, zum Beispiel das β 1,3-GlcNAc-Transferase-Gen *lgtA*, aus *N. meningitidis* beschrieben und dort als „Slipped-Strand“-Mechanismus bezeichnet (Jennings *et al.*, 1995).

Ein Beispiel von vielen beschriebenen *in vitro* Synthesen fucosylierter HMOs ist die enzymatische Synthese von Lacto-N-difucohexaose I (Miyazaki *et al.*, 2010). Dabei wurde in mehreren aufeinanderfolgenden Ansätzen zuerst ähnlich zu der von Murata *et*

al. (1999) beschriebenen Methode aus Lactose unter Verwendung von UDP-GlcNAc und einer aus Rinderblut isolierten β 1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase LNT II und anschließend durch Transglycosylierung LNT synthetisiert. Dieses wurde danach mittels einer rekombinanten humanen α 1,2-Fucosyltransferase und GDP-Fuc zu Lacto-N-fucopentaose I umgesetzt und daraus mit einer kommerziellen, humanen α 1,3/4-Fucosyltransferase und GDP-Fuc Lacto-N-difucohexaose I synthetisiert.

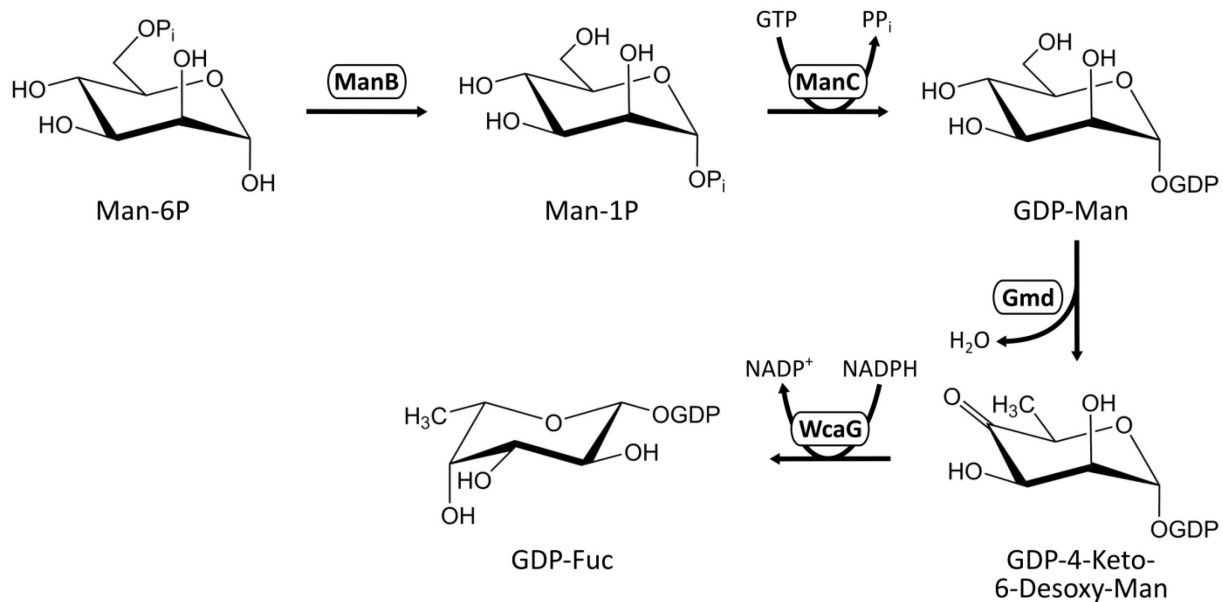
Die zur Nutzung von Fucosyltransferasen benötigte GDP- β -L-Fucose kommt sowohl in vielen Prokaryonten als auch in vielen Eukaryonten natürlicherweise von und kann mittels des *de novo* Synthesewegs oder des Salvage Pathway gebildet werden (Andrianopoulos *et al.*, 1998; Becker & Lowe, 2003; Coyne *et al.*, 2005; Stevenson *et al.*, 1996).

Der *de novo* Syntheseweg erfolgt in *E. coli* dabei ausgehend vom Mannose-6-phosphat über vier enzymatische Schritte via Mannose-1-phosphat, GDP-D-mannose und GDP-4-keto-6-desoxy-mannose mittels der Gene *manB*, *manC*, *gmd* und *wcaG* (= *fcl*), welche die Phosphomannomutase, die Mannose-1-phosphat Guanylyltransferase, die GDP-Mannose 4,6-Dehydratase und die GDP-Fucose Synthase kodieren (Abbildung 1.4 A; Andrianopoulos *et al.*, 1998; Stevenson *et al.*, 1996). Dieser Weg wurde bereits *in vitro* und *in vivo* für die Synthese von GDP-Fuc eingesetzt. So konnten Albermann *et al.* (2000) die *E. coli*-Gene für Gmd und WcaG rekombinant mit bzw. ohne His-Tag in *E. coli* exprimieren, mittels des His-Tag isolieren und sowohl mit His-Tag als auch in nativer Form Aktivitäten beider Enzyme nachweisen. Durch die präparative Nutzung beider Enzyme konnte so GDP-L-Fucose synthetisiert und 78 mg des Produkts isoliert werden. Zudem konnte die Feedback-Inhibition von Gmd durch GDP-L-Fucose bestätigt werden, welche schon zuvor durch Sturla *et al.* (1997) beschrieben worden war. Die Feedback-Inhibition an Gmd konnte demnach beobachtet werden durch die von WcaG gebildete GDP- β -L-Fucose, jedoch nicht durch dessen Stereoisomer GDP- α -L-Fucose, weshalb auf einen spezifischen Mechanismus der Inhibition geschlossen wurde.

In einer kurze Zeit später veröffentlichten Arbeit konnten Albermann *et al.* (2001) das zuvor beschriebene System zur Synthese von GDP-Fuc mit einem rekombinant exprimierten Gen einer α 1,2-Fucosyltransferase aus *H. pylori* kombinieren und so *in vitro* das HMO 2'-FL aus dem Substrat GDP-D-Mannose generieren. Die darauffolgende

Produktisolierung mittels Ionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie ergab mit 18 mg 2'-FL eine Gesamtausbeute von 65 %.

A) De novo Synthese von GDP-L-Fucose



B) Salvage Synthese von GDP-L-Fucose

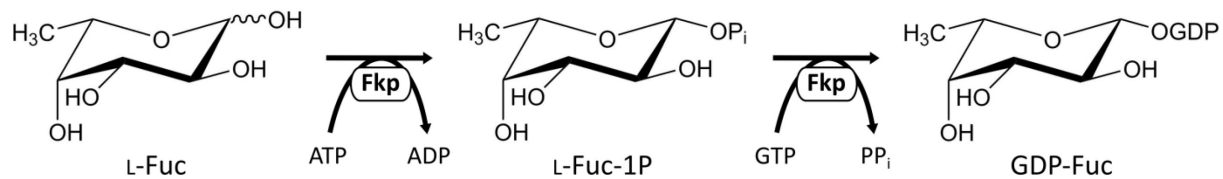


Abbildung 1.4: Natürliche bakterielle Synthesewege von GDP-L-Fucose. A) De novo Synthese von GDP-L-Fucose in *E. coli* ausgehend von Mannose-6-phosphat mittels 4 enzymatischen Umsetzungen unter Verwendung von GTP und NADPH (Andrianopoulos *et al.*, 1998; Stevenson *et al.*, 1996). B) Synthese von GDP-L-Fucose mittels der bifunktionalen L-Fucose Kinase/ L-Fucose-1-phosphat Guanylyltransferase Fkp in *Bacteroides fragilis* (Salvage Pathway; Coyne *et al.*, 2005).

Um GDP-Fuc für die Nutzung als Substrat von Fucosyltransferasen bereitzustellen, wurde der *de novo* Syntheseweg trotz der beschriebenen Feedback-Inhibition bereits in mehreren Arbeiten in Ganzzellsynthesen mit rekombinanten Mikroorganismen genutzt. Dazu wurden die *E. coli* Gene *gmd* und *wcaG* z. B. in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert, welche natürlicherweise einen hohen intrazellulären Spiegel des Substrats GDP-Mannose aufweist (Mattila *et al.*, 2000). In einer anderen Arbeit wurden diese Gene in *E. coli* überexprimiert und mit der Zugabe von Mannose kombiniert, um höhere intrazelluläre GDP-Mannose-Syntheseraten zu erreichen (Lee *et al.*, 2009b) oder die verstärkte Expression der Gene *gmd* und *wcaG* mit der verstärkten Expression von *manB* und *manC* kombiniert (Lee *et al.*, 2009b). Basierend auf dem letzteren System wurden in einer weiteren Arbeit zusätzlich zu dieser verstärkten Expression der Gene des *de novo* Synthesewegs von GDP-Fuc außerdem die Glucose-6-phosphat

Dehydrogenase, die Isocitrat Dehydrogenase bzw. die Malat Dehydrogenase überexprimiert, um das im *de novo* Syntheseweg benötigte Reduktionsäquivalent in Form von NADPH (Abbildung 1.4 A) zu regenerieren (Lee *et al.*, 2011). Dabei konnte in einer Zulaufkultivierung eine maximale GDP-Fuc-Konzentration von etwa 235 mg l⁻¹ erreicht werden. In einer weiteren Arbeit dieser Arbeitsgruppe konnte eine noch höhere GDP-Fuc-Konzentration erreicht werden durch die rekombinante Expression des Gens *gsk*, dessen Protein, die Guanosin-Inosin-Kinase in der Synthese von GMP aus Guanin beteiligt ist (Lee *et al.*, 2012b). Dabei wurde in einer Zulaufkultivierung eine maximale GDP-Fuc-Konzentration von etwa 305 mg l⁻¹ erreicht.

Neben der *de novo* Synthese von GDP-Fuc konnte im Jahr 2005 auch die Entdeckung einer mikrobiellen Variante der in Eukaryonten bereits früher identifizierten Synthese von GDP-Fuc mittels des Salvage Pathway beschrieben werden (Coyne *et al.*, 2005; Kaufman & Ginsburg, 1968). So besitzt *Bacteroides fragilis* eine bifunktionale L-Fucose Kinase/ L-Fucose-1-phosphat Guanylyltransferase, welche durch das Gen *fkp* kodiert ist und in funktioneller Form rekombinant in *E. coli* exprimiert werden konnte (Coyne *et al.*, 2005). Das Protein Fkp besitzt demnach sowohl einen N-terminalen Bereich mit Sequenzhomologie zum Säugerenzym L-Fucose-1-phosphat Guanylyltransferase als auch einen C-terminalen Bereich mit Sequenzhomologie zu dem Säugerenzym L-Fucose Kinase und kann somit, wie auch die eukaryotischen Enzyme, beide Reaktionsschritte der Synthese von GDP-Fuc aus L-Fucose mittels Salvage Pathway mit dem Intermediat L-Fucose-1-phosphat katalysieren (Coyne *et al.*, 2005, Abbildung 1.4). Die Kristallstruktur des Proteins Fkp, welches bisher das einzige identifizierte mikrobielle Enzym ist, welches die Synthese von GDP-Fuc mittels Salvage Pathway katalysiert, wurde veröffentlicht von Cheng *et al.* (2014). Die enzymatische Aktivität vom Fkp konnte *in vitro* bereits für chemo-enzymatische Synthesen von Lewis x Strukturen und Lewis x Derivaten genutzt werden (Wang *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2012) und wurde auch für die Bereitstellung von GDP-Fuc für *in vitro* Untersuchungen der α 1,2-Fucosyltransferase WbgL (Engels & Elling, 2014), bzw. für die *in vivo* Synthese fucosylierter HMOs genutzt (Chin *et al.*, 2016; Hübner *et al.*, 2011).

Synthese sialylierter HMOs

Mittels chemo-enzymatischer Synthesen konnten zwei kürzlich veröffentlichte Arbeiten mit der Herstellung sialylierter Derivate der Kernstrukturen LNT und LNnT (Schmidt &

Thiem, 2010), bzw. eines 3-Azidopropyl-LSTa die Erzeugung saurer Pentasaccharide aufzeigen (Yao *et al.*, 2015). Dabei nutzen beide Ansätze sowohl Glycosyltransferase-katalysierte als chemische Reaktionen in den Synthesen. Da jedoch beide Ansätze auf Schutzgruppenchemie zurückgreifen und Prozesse mit zahlreichen Reaktionsschritten verwenden und entweder Sialidasen mit relativ geringen Ausbeuten oder Sialyltransferasen und die Nukleotide ATP und CTP einsetzen, scheinen diese Synthesen nicht kostengünstig skalierbar zu sein.

Um auf die Verwendung kostspieliger Nukleotide oder Nukleotid-aktivierter Zucker verzichten zu können, sind die Regeneration der Nukleotide oder die Ganzzell-Synthese mit Bereitstellung der Nukleotid-aktivierten Zucker durch den Organismus möglich. So demonstrierten Gilbert *et al.* (1998) mit 3'-SL die erste biotechnologische Synthese eines sialylierten HMOs aus Lactose, Sialinsäure, Phosphoenolpyruvat (PEP) und katalytischen Mengen von ATP und CTP. Dabei wurde ein Fusionsprotein, bestehend aus einer CMP-Neu5Ac Synthetase und einer α 2,3-Sialyltransferase rekombinant in *E. coli* exprimiert und anschließend in einem *in vitro* Ansatz verwendet, um 77 g 3'-SL mit einer Reinheit von 88 % zu synthetisieren. Das zur Erstellung des Donorsubstrats CMP-Neu5Ac benötigte CTP konnte hierzu durch ein bereits zuvor für die *in vitro* Sialylierung beschriebenes System aus dem entstehenden CMP regeneriert werden (Ichikawa & Wong, 1991). Dabei dienten eine Myokinase zur Erstellung von CDP aus CMP und ATP und eine Pyruvatkinase zur Erstellung von CTP aus CDP und PEP sowie zur Regeneration des ATPs aus PEP.

1.2.4. Ganzzellsynthese von HMOs

Ganzzell-Synthese saurer HMOs

Wie im letzten Absatz des Abschnitts 1.2.3 beschrieben, konnte die Regeneration des zur *in vitro* Synthese sialylierter HMOs benötigten ATP und CTP durch die Verwendung von PEP regeneriert werden. Um jedoch auch auf die Verwendung von PEP verzichten zu können, demonstrierten Endo *et al.* (2000) zwei Jahre nach der *in vitro* Synthese von 3'-SL unter Verwendung der Regeneration von CMP ein Biotransformationssystem permeabilisierter Zellen zur Synthese von 3'-SL. Dabei wurden drei verschiedene rekombinante *E. coli* Stämme zusammen mit einem *Corynebacterium ammoniagenes* Stamm simultan in einer Biotransformation eingesetzt, um aus den Substraten Orotsäure, Sialinsäure und Lactose das HMO 3'-SL zu erzeugen (Abbildung 1.5).

C. ammoniagenes diente dabei zur Erzeugung und Regenerierung von UTP, während die *E. coli* Stämme jeweils ein Gen, kodierend für eine CTP Synthase, eine CTP-Neu5Ac Synthase bzw. eine Sialyltransferase, exprimierten und somit UTP zu CTP, CTP und Neu5Ac zu CMP-Neu5Ac bzw. Lac und CMP-Neu5Ac zu 3'-SL umsetzten. Um den Stoffaustausch zwischen den verschiedenen Zellen zu gewährleisten, wurden diese mit Polyoxyethylen Octadecylamin (Nymeen S-215) permeabilisiert. Der Prozess erreichte dabei einen finalen Titer von 33 g l⁻¹ 3'-SL in lediglich 11 Stunden.

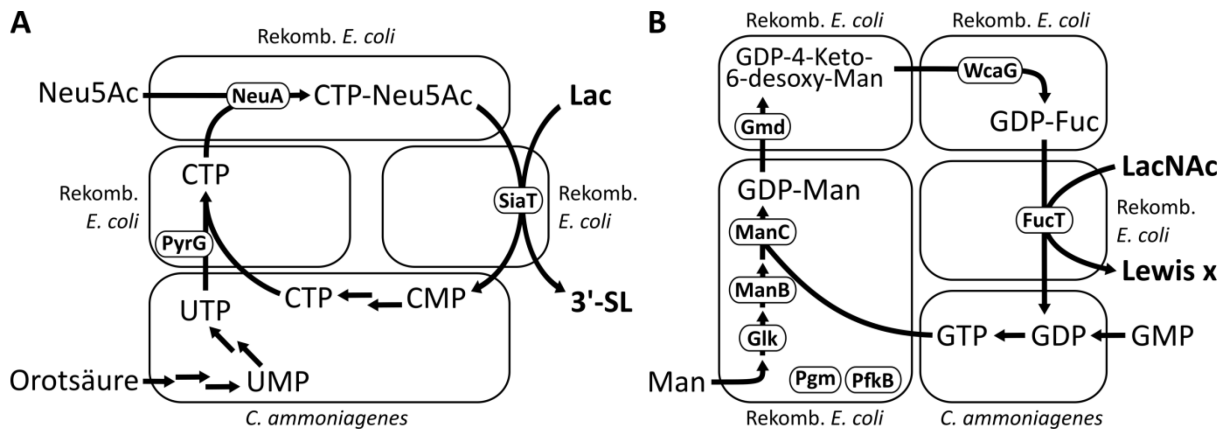


Abbildung 1.5: Oligosaccharid-Synthesen in Biotransformationen mittels Kopplung mikrobieller Stämme. Die zur Synthese Nukleotid-aktivierter Zucker benötigten Nukleotide wurden in *Corynebacterium ammoniagenes* generiert bzw. regeneriert, während die weiteren Syntheseschritte in verschiedenen rekombinanten *E. coli* Stämmen erfolgten (Endo *et al.*, 2000; Koizumi *et al.*, 2000). Der Stoffaustausch zwischen den Zellen wurde durch Permeabilisierung der Zellen mittels Polyoxyethylen Octadecylamin gewährleistet. Die Enzyme der Plasmid-ständigen, rekombinant genutzten Gene sind im jeweiligen Stamm fett und umrandet dargestellt. **A)** Synthese von 3'-Sialyllactose (3'-SL) aus Lactose und Sialinsäure unter Verwendung von Orotsäure als Substrat für die UMP-Synthese (Endo *et al.*, 2000). **B)** Synthese von Lewis x (Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc) aus Mannose und N-Acetyllactosamin unter Zugabe von GMP als GTP Vorstufe (Koizumi *et al.*, 2000).

Durch gentechnische Modifikationen zur Synthese von sialylierten Oligosacchariden in einem einzigen Stamm konnte die Arbeitsgruppe um Eric Samain auf die Verwendung verschiedener Stämme in einer Biotransformation verzichten (Drouillard *et al.*, 2010; Fierfort & Samain, 2008; Priem *et al.*, 2002). So demonstriert die Arbeitsgruppe erstmals die *in vivo* Synthese von 3'-SL in einen *E. coli* Stamm ohne β -Galactosidase-, aber mit Lactose-Permease-Aktivität durch Inaktivierung des Sialinsäure Aldolase-Gens und durch Einbringen von Plasmid-ständigen Genen, kodierend für eine CMP-Neu5Ac Synthase und eine α 2,3-Sialyltransferase (Nst), beide ursprünglich aus *Neisseria meningitidis*. Dabei wurde in der Hochzell-dichte-Kultivierung neben Glycerin und Lactose auch Sialinsäure für deren Aktivierung und anschließenden Transfer auf die Lactose bereitgestellt und eine finale 3'-SL-Konzentration von 2,6 g l⁻¹ erreicht (Abbildung 1.6; Priem *et al.*, 2002).

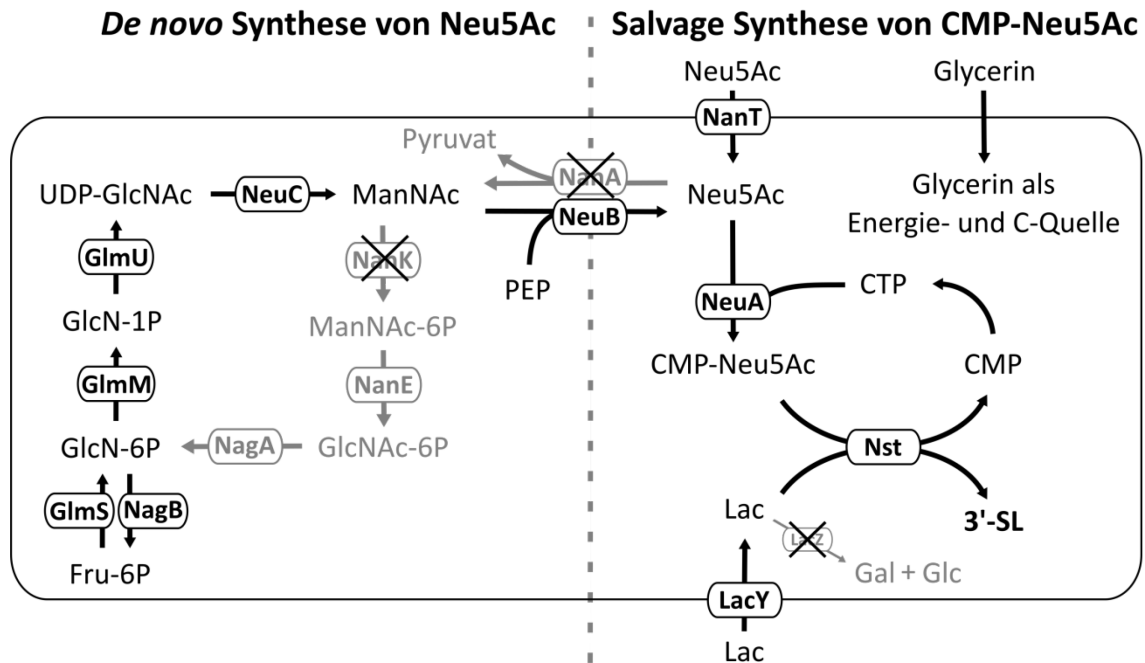


Abbildung 1.6: Ganzzell-Synthese von 3'-Sialyllactose (3'-SL) in *E. coli*, modifiziert von Han *et al.* (2012). Die zur Synthese benötigte Sialinsäure kann durch Expression mittel der Sialinsäure Synthase (NeuB) und Inaktivierung der Aktivitäten der N-Acetylmannosamin Kinase (NanK) und Sialinsäure Aldolase (NanA) intrazellulär synthetisiert (Fierfort & Samain, 2008, links) oder dem Prozess als Substrat zugegeben werden (Priem *et al.*, 2002).

Um auch auf die Zugabe von Sialinsäure verzichten zu können, beschrieb die Arbeitsgruppe die Synthese von 3'-SL mit einem *E. coli* K-12 Stamm, welcher Sialinsäure intrazellulär mittels einer UDP-N-Acetylglucosamine 2-Epimerase und einer Sialylsäuresynthase aus UDP-N-Acetylglucosamin über N-Acetylmannosamin synthetisierte (Abbildung 1.6; Fierfort & Samain, 2008). Neben dem Gen für die Sialinsäure Kinase (*nanA*) wurde dazu auch das Gen für die N-Acetylmannosamin Kinase (*nanK*) eliminiert, um unerwünschte Substratzyklen zu verhindern. Außerdem wurden die Gene *neuABC*, kodierend für eine CMP-Neu5Ac Synthetase, eine Sialinsäure Synthase und eine GlcNAc-6P 2-Epimerase aus *Campylobacter jejuni* rekombinant in dem produzierenden *E. coli* Stamm exprimiert. In einer Langzeit-Zulaufkultivierung von etwa 70 Stunden konnte so $25,5 \text{ g l}^{-1}$ 3'-SL erzeugt werden, wovon sich zum Prozessende etwa 60 % im Kulturüberstand befanden. Dabei ist die Steigerung der finalen Produktkonzentration im Vergleich zu der Synthese mit Sialinsäure-Zugabe vermutlich sowohl auf die verbesserte Syntheseleistung des Stammes als auch auf die längere Prozesszeit und die kontinuierliche Zugabe von Lactose in der Zulaufphase zurück zu führen.

Durch die Verwendung des gleichen Synthesewegs mit einem α 2,6-Sialyltransferase-kodierenden Gen aus *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 anstelle des α 2,3-Sialyltransferase-Gens konnten in einer späteren Arbeit sowohl 6'-SL als auch 6,6'-Disialyllactose und

2-Keto-3-desoxy-manno-octanyllactose (KDP-Lactose) synthetisiert werden (Drouillard *et al.*, 2010). Damit wurde nachgewiesen, dass die verwendete Sialyltransferase neben CMP-Neu5Ac auch CMP-KDO als Donorsubstrat und neben Lactose auch 6'-SL als Akzeptorsubstrat akzeptiert. Um der Bildung dieser Nebenprodukte entgegenzuwirken, wurden die Gene *neuABC* (Abbildung 1.6) auf einem high-copy Plasmid und das Sialyltransferase-Gen auf einem low-copy Plasmid kodiert. So wurde in einer Hochzelldichtkultivierung eine finale 6'-SL-Konzentration von 34 g l⁻¹ erreicht, wobei ca. 68 % des Produkts im Kulturüberstand vorlagen.

Ganzzell-Synthese neutraler HMOs

Analog zu der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Synthese von 3'-SL durch die Kopplung mikrobieller Stämme (Abbildung 1.5 A) konnten Koizumi *et al.* (2000) auch die Synthese von GDP-Fuc und die Fucosylierung von LacNAc durch die Kopplung von *C. ammoniagenes* mit verschiedenen rekombinanten *E. coli* Stämmen erreichen (Abbildung 1.5 B). Dabei diente *C. ammoniagenes* der Bildung von GTP aus zugegebenem GMP, während die *E. coli* Stämme Plasmide mit den Genen von Teilen des *de novo* Synthesewegs von GDP-Fuc (Abbildung 1.4) bzw. einer α 1,3-Fucosyltransferase aus *H. pylori* enthielten und diese exprimierten. So enthielt ein *E. coli* Stamm die Gene einer Glucokinase (*glk*), einer Phosphomannomutase (*manB*), einer Mannose-1-phosphat Guanylyltransferase (*manC*) und konnte somit aus der zugegebenen Mannose und dem generierten GTP GDP-Man synthetisieren. Die ebenfalls in diesem Stamm rekombinant exprimierten Gene einer Phosphoglucomutase (*pgm*) und der 6-Phosphofruktokinase II (*pfkB*) sollten die intrazelluläre Bereitstellung von Glucose-1,6-bisphosphat ermöglichen, welches zur Aktivierung der Phosphomannomutase diente. Die weiteren Stämme, welche die Plasmid-ständigen Gene einer GDP-Mannose 4,6-Dehydratase (*gmd*) bzw. einer GDP-Fucose Synthase (*wcaG*) exprimierten, komplettierten die Synthese von GDP-Fuc aus GDP-Man, während der vierte *E. coli* Stamm mit einem rekombinant exprimierten Gen einer α 1,3-Fucosyltransferase aus *H. pylori* die Fucosyl-Gruppe von GDP-Fuc auf das zugegebene LacNAc übertrug (Abbildung 1.5 B). Mit diesem System konnten ohne den *E. coli* Stamm mit Fucosyltransferase-Gen in 22 h 18,4 g l⁻¹ GDP-Fuc bzw. mit Fucosyltransferase-Gen in 30 h 21 g l⁻¹ Lewis x (Gal(β 1,4)[Fuc(α 1,4)]GlcNAc) generiert werden (Koizumi *et al.*, 2000). Wie auch bei der zuvor beschriebenen Synthese von 3'-SL wurde der Stoffaustausch zwischen den Zellen auch in diesem Prozess durch die Permeabilisierung der Zellen mittels Polyoxyethylen Octadecylamin ermöglicht.

Da diese Biotransformation mit Kopplung verschiedener Stämme jedoch z. B. aufgrund der zuvor benötigten Anzucht der Stämme einiger Vorbereitung bedarf und die Produktisolierung bei den angewandten hohen Zellkonzentrationen schwierig sein kann, ist dieses System aufwändiger als andere Ganzzellsynthesen, die mit nur einem Synthesestamm arbeiten. Ein solches System konnte für die Synthese von p-LNnT, p-LNnH und p-LNnO aus Lactose und Glycerin in *E. coli* beschrieben werden durch die rekombinante Expression der *N. meningitidis* Glycosyltransferase-Gene *lgtA* und *lgtB* (Abbildung 1.7 A; Priem *et al.*, 2002). Der dabei genutzte Ausgangsstamm *E. coli* JM109 zeigt keine β -Galactosidase-Aktivität, besitzt aber ein funktionelles, Lactose-Permease kodierendes Gen *lacY* auf dem F'-Plasmid, sodass das Substrat Lactose aufgenommen, von den Zellen aber nicht hydrolysiert und als Kohlenstoffquelle genutzt werden kann (Yanisch-Perron *et al.*, 1985). Die bereits in Abschnitt 1.2.3 in der *in vitro* Synthese von LNnT beschriebenen Gene *lgtA* und *lgtB*, welche UDP-aktivierte Zucker als Donorsubstrate nutzen, wurden dabei Plasmid-ständig exprimiert und erhielten die UDP-aktivierte Zucker aus dem Stoffwechsel der Zellen. Mit diesem System konnte in Hochzelldichte-Kultivierungen eine Gesamtmenge an LNnT, p-LNnH und p-LNnO von über 5 g l⁻¹ gebildet werden. Die Synthese der größeren Kernstrukturen p-LNnH und p-LNnO wurde dabei auf eine kettenreaktionsartige Elongation der Oligosaccharide zurückgeführt, bei der LgtA jeweils eine weitere GlcNAc-Gruppe an die β 1,4-gebundene Galactose des nicht-reduzierenden Endes anhängt, woraufhin das entstandene Oligosaccharid erneut als Substrat für LgtB dient. Das quantitative Verhältnis der Produkte mit verschiedenen Kettenlängen konnte so über die Menge der zugegebenen Lactose variiert werden, da diese mit den länger-kettigen Oligosacchariden als Akzeptor-Substrat von LgtA konkurriert (Priem *et al.*, 2002).

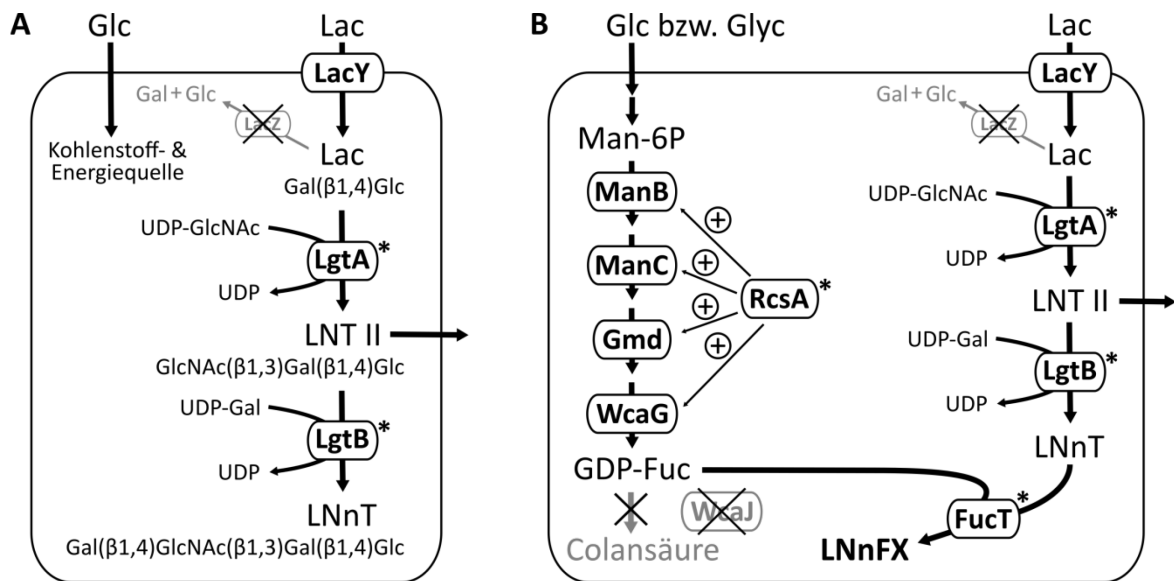


Abbildung 1.7: Ganzzellsynthesen von LNnT und fucosylierten Derivaten von LNnT in *E. coli*. Durch gentechnische Modifikationen des Stammes *E. coli* JM109, welcher Lactose aufnehmen kann, aber nicht spaltet, konnten verschiedene HMOs im Ganzzellsystem synthetisiert werden. **A)** Um Lacto-N-neotetraose zu synthetisieren, wurden die Gene *lgtA* und *lgtB*, welche eine β 1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase und eine β 1,4-Galactosyltransferase kodieren, Plasmid-basiert in *E. coli* JM109 eingebracht und exprimiert (Priem *et al.*, 2002). **B)** Aufbauend auf diesem System konnte durch die Plasmid-basierte Expression eines Fucosyltransferase-Gens und des Transkriptionsregulator-Gens *rcaA* in Kombination mit der Disruption des Gens *wcaJ* die Synthese von fucosylierten Derivaten von LNnT (LNnFX) demonstriert werden (Drouillard *et al.*, 2006; Dumon *et al.*, 2001; Dumon *et al.*, 2006). Der Transkriptionsregulator *RcsA* diente dabei der Aktivierung der Expression des nativen Colansäuresynthese-Operons, welches die Gene des *de novo* Synthesewegs von GDP-Fuc beinhaltet. Dabei wurde durch das Entfernen der Undecaprenyl-phosphat Glucose-1-phosphat Transferase Gens (*wcaJ*) der Abfluss von GDP-Fuc in die Colansäure-Synthese verhindert. Symbole: *, Rekombinante Gene, welche Plasmid-ständig eingebracht und exprimiert wurden; Eingekreistes +, positive Regulation der Transkription der zu den Enzymen gehörenden Gene.

In einer weiteren, von dieser Gruppe publizierten Arbeit konnte das Ganzzellsystem zur Synthese von LNnT um die *de novo* Synthese von GDP-Fuc und um ein α 1,3-Fucosyltransferase-Gen aus *H. pylori* erweitert werden und ermöglichte somit die Synthese fucosylierter Derivate von LNnT (Abbildung 1.7 B; Dumon *et al.*, 2001). Zur Ermöglichung der intrazellulären Bildung von GDP-Fuc wurde das Transkriptionsregulator-Gen *rcaA* Plasmid-ständig eingebracht und exprimiert. *RcsA* aktiviert unter anderem die Transkription der nativen Colansäuresynthese-Gene, zu denen auch *manB*, *manC*, *gmd* und *wcaG* gehören (Ebel & Trempey, 1999; Gottesman & Stout, 1991), und bewirkt somit eine Erhöhung der GDP-Fuc-Synthese (Abbildung 1.7 B). Um zusätzlich den Abfluss von GDP-Fuc in die Colansäure-Synthese zu unterbinden, wurde das chromosomale *wcaJ*-Gen disruptiert, welches eine Undecaprenyl-phosphat Glucose-1-phosphat Transferase kodiert und somit den ersten Glycosylierungs-Schritt der Colansäure-Biosynthese katalysiert (Dumon *et al.*, 2001). Bei der Kultivierung dieses Stammes mit den Substraten Glucose und Lactose konnten so etwa 3 g l⁻¹ Lacto-N-neofopopentaose V, ein an der reduzierenden Glucose-Einheit α 1,3-fucosyliertes LNnT, sowie die Nebenprodukte Lacto-N-neodifucohexaose II und eine zweifach fucosylierte

Lacto-N-hexaose synthetisiert werden. Die vorwiegende Fucosylierung der reduzierenden Glucose-Einheit stimmte überein mit der bereits zuvor beschriebenen Substratspezifität der α 1,3-Fucosyltransferase (Martin *et al.*, 1997).

Um neben diesen zweifach fucosylierten und am reduzierenden Ende fucosylierten Verbindungen auch Lewis x-Strukturen zu synthetisieren, welche eine Fucosyl-Gruppe an der GlcNAc-Einheit neben den Gal-Einheit des nicht-reduzierenden Endes tragen, wurden in einer darauffolgenden Arbeit verschiedene Fucosyltransferasen in diesem Ganzzellsystem verglichen (Dumon *et al.*, 2004). Die dabei verwendeten *H. pylori* α 1,3-Fucosyltransferasen FutA und FutB, welche verschiedene Anzahlen von Leucin-Zipper-artigen Wiederholungen aufwiesen, führten in der Ganzzellsynthese tatsächlich zu verschiedenen Produkten. So wurden mit FutA mit finalen Titern von etwa 1,7 g l⁻¹ und etwa 0,5 g l⁻¹ hauptsächlich das Hexasaccharid Lacto-N-neodifucohexaose II und das Trisaccharid 3-Fucosyllactose synthetisiert, während mit FutB etwa gleiche Anteile von Lacto-N-neofucopentaose II (260 mg l⁻¹; Lewis X-Struktur) und Lacto-N-neofucopentaose V (280 mg l⁻¹) synthetisiert wurden.

Durch die Verwendung des in Abbildung 1.7 B dargestellten Synthese-Systems mit einer *H. pylori* α 1,2- anstelle einer α 1,3-Fucosyltransferase, konnten außerdem Oligosaccharide mit H-Antigen-artigen Strukturen synthetisiert werden (Drouillard *et al.*, 2006). Dabei wurde eine Oligosaccharid-Konzentration von etwa 3 g l⁻¹ erreicht, welche zu etwa 57 % aus 2'-Fucosyllactose und zu 23 % aus LNnF I bestand. Das Pentasaccharid LNnF I trägt eine α 1,2-Fucosyl-Gruppe am terminalen Galactosyl-Rest von LNnT. Dies zeigt, dass die verwendete Fucosyltransferase FutC Lactose als Substrat nutzen kann, woraufhin eine Hochzell-dichte-Kultivierung mit einem Stamm ohne die Gene zur LNnT-Synthese (*lgtA* und *lgtB*) durchgeführt wurde und so eine 2'-FL-Konzentration von 14 g l⁻¹ erreicht werden konnte, wovon sich 11 g l⁻¹ im Kulturüberstand befanden (Drouillard *et al.*, 2006).

Aufbauend auf die in Abschnitt 1.2.3 beschriebenen Ganzzellsynthesen von GDP-L-Fucose in *E. coli* mittels des *de novo* Synthesewegs, konnten Lee *et al.* (2012a) ebenfalls die Ganzzellsynthese von 2'-FL beschreiben. Dazu wurden die in der *de novo* Synthese von GDP-Fuc aus Man-6P involvierten Gene *manB*, *manC*, *gmd* und *wcaG* neben einem Gen einer α 1,2-Fucosyltransferase aus *H. pylori* von zwei Plasmiden exprimiert in *E. coli*. Der verwendete Stamm *E. coli* JM109 (DE3) verfügt dabei aufgrund der

α -Komplementierung der β -Galactosidase LacZ durch das chromosomal integrierte Phagen-Konstrukt (DE3) über eine geringe β -Galactosidase-Aktivität und spaltet somit Lactose (Drouillard *et al.*, 2006; Dumon *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2012a). Dies ermöglichte Kultivierungen mit Lactose als einziger Kohlenstoffquelle, welche sowohl gespalten und metabolisch verwertet, als auch in der Synthese von 2'-FL als Akzeptor-Substrat eingesetzt wurde. So konnten in einer Zulauf-Kultivierung mit einer Ausgangskonzentration von 14,5 g l⁻¹ Lactose 1,23 g l⁻¹ 2'-FL synthetisiert werden.

1.3. Analytik humaner Milcholigosaccharide

Kohlenhydrate stellen die Bioanalytik aufgrund ihrer strukturellen Komplexität noch immer vor eine große Herausforderung, da verschiedene Faktoren die Komplexität der Strukturen von Oligosacchariden bestimmen. So können sich einige der verschiedenen Monosaccharid-Einheiten als Isomere trotz gleicher Massen in der Konfiguration unterscheiden, in Kohlenhydraten über verschiedene Positionen und über verschiedene Anomerien verbunden sein, Verzweigungen in den Kohlenhydratketten bedingen und die Zuckerketten neben der freien Form in Glycanen an Proteine, Fette oder Peptide gebunden sein (Smilowitz *et al.*, 2014). Da viele HMOs in reiner Form zur Verwendung als analytische Standards nur schwer zugänglich sind und aufgrund des Vorkommens zahlreicher Strukturisomere von HMOs, welche ähnliche physikochemische Eigenschaften aufweisen können, sind die vollständige chromatographische Trennung und die zuverlässige Quantifizierung einzelner Strukturen in HMO-Mischungen nur schwer mit einem hohen Probendurchsatz und niedrigen Detektionsgrenzen zu vereinen (Hong *et al.*, 2014; Smilowitz *et al.*, 2014).

Während 2'-FL und 3-FL als erste HMOs im Jahr 1954 durch Polonowski und Montreuil mittels zweidimensionaler Papierchromatographie detektiert und isoliert werden konnten (Kunz, 2012) und die klassische Strukturaufklärung von HMOs nach der Separation (Abschnitt 1.2.1) nativ oder in reduzierter und peracetylierter Form mittels Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie erfolgte (Bruntz *et al.*, 1988; Bush *et al.*, 1985; Kitagawa *et al.*, 1990; Strecker *et al.*, 1989), existiert heute ein breites Spektrum verschiedener Methoden zur Identifikation und Quantifizierung von HMOs. Dabei wurde und wird vor allem zur Etablierung neuer Methoden und zur Quantifizierung einzelner

Verbindungen häufig auf kommerzielle oder aus humaner Milch isolierte Standards zurückgegriffen.

So konnten viele HMOs z. B. durch Anionenaustausch-Chromatographie (HPAEC) aufgetrennt und mittels gepulster amperometrischer Detektion (PAD) im Vergleich zu kommerziellen Standards quantifiziert werden (Coppa *et al.*, 1999; Coppa *et al.*, 2006; Kunz *et al.*, 1996). Alternativ hierzu wurden auch Methoden beschrieben zur Auftrennung von sauren HMOs mittels Kapillarelektrophorese und UV-Detektion (Bao *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2000), zur Auftrennung neutraler und saurer HMOs mittels porös graphitiertem Kohlenstoff und massenspektrometrischer Detektion (Wu *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011) bzw. mittels Dünnschichtchromatographie und massenspektrometrischer Detektion (Dreisewerd *et al.*, 2006), zur Auftrennung boviner Milcholigosaccharide eine Hydrophile-Interaktions-Chromatographie (HILIC) mit massenspektrometrischer Detektion (Fong *et al.*, 2011).

Anhand der Fraktionierungsmuster von HMOs kann eine Strukturaufklärung zum Teil auch ohne die Verwendung chromatographischer Methoden mittels Tandem-Massenspektrometrie erfolgen (Ashline *et al.*, 2005; Tseng *et al.*, 1999). Dabei lassen die Masse-zu-Ladung-Verhältnisse (m/z) der kollisionsbedingten Fraktionierung Rückschlüsse auf die Positionen der Verknüpfungen zu, während eine Unterscheidung stereoisomerer Monosaccharid-Einheiten nicht möglich ist.

Zur NMR-spektroskopisch-unabhängigen, vorständigen Strukturaufklärung von HMOs konnte eine kombinierte Methode aus Chromatographie mittels porös graphitiertem Kohlenstoff, Massenspektrometrie, Tandem-Massenspektrometrie und enzymatischem Verdau durch Exoglycosidasen beschrieben werden und mit dieser Methode durch systematisches Vorgehen 75 verschiedene HMOs annotiert und zu einer Datenbank zusammengestellt werden (Niñonuevo *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011).

Um HMOs mittels reversed-phase HPLC in Verbindung mit optischen Detektoren trennen und quantifizieren zu können, wurden die natürlicherweise hydrophilen Oligosaccharide mit hydrophoben Gruppen derivatisiert. So konnten die Oligosaccharide perbenzyliert (Chaturvedi *et al.*, 2001) oder die reduzierenden Enden von Oligosacchariden mit hydrophoben Fluorophoren, z. B. 2-Aminobenzamid oder 2-Aminobenzoessäure (Anthranilsäure), versehen werden (Bigge *et al.*, 1995). Eine solche Derivatisierung des reduzierenden Endes von Mono- bzw. Oligosacchariden über

eine reduktive Aminierung mit Anthranilsäure ist in Abbildung 1.8 dargestellt. Das dabei im Gleichgewicht mit den freien Molekülen stehende Schiff'sche Base-Intermediat kann mittels eines schwachen Reduktionsmittels reduziert werden, um eine permanente Fluoreszenzmarkierung des Zuckers zu erreichen (Anumula, 1994; Ruhaak *et al.*, 2010). Die mit dieser Methode unabhängig der Länge von Oligosacchariden zuverlässige und stöchiometrisch erfolgende Markierung der reduzierenden Enden erlaubt dabei die Quantifizierung der Oligosaccharide im Vergleich zu kommerziellen Standards (Ruhaak *et al.*, 2010). Die für die analytische Trennung erschwerende α - und β -Konfiguration des reduzierenden Zuckers wird durch die Derivatisierung aufgehoben.

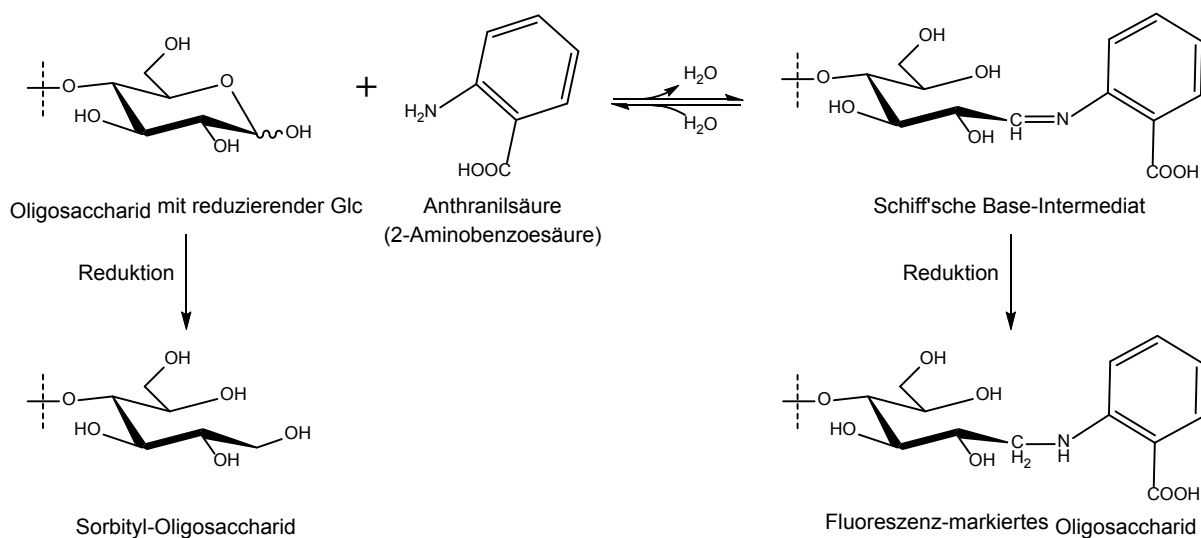


Abbildung 1.8: Reaktionsmechanismus der reduktiven Aminierung von Oligosacchariden zur Fluoreszenzmarkierung. Dargestellt am Beispiel einer reduzierenden D-Glucose-Einheit mit dem Fluorophor Anthranilsäure. Das Schiff'sche Base-Intermediat wird der Gleichgewichtsreaktion durch Reduktion entzogen. Unter Verwendung eines starken Reduktionsmittels kann als Nebenreaktion die Reduktion der D-Glucose zum Zuckeralkohol (Sorbitol) beobachtet werden (Anumula, 1994; Ruhaak *et al.*, 2010).

1.4. *Escherichia coli* als Syntheseorganismus

Das stäbchenförmige und Gram-negative Enterobakterium *Escherichia coli*, welches keine Sporen bildet, ein pH-Optimum von 6 bis 7 und ein Temperaturoptimum von 37 °C aufweist und sowohl auf komplexen als auch auf definierten Medien wachsen kann, wurde in den vergangenen 70 Jahren in vielen grundlegenden Studien untersucht und entwickelte sich zu dem am häufigsten in der Biologie verwendeten Mikroorganismus (Chen *et al.*, 2013; Marisch *et al.*, 2013; Neidhardt *et al.*, 1996). Sowohl aufgrund der Vielzahl molekularbiologischer Methoden, welche einfache rekombinante Expressionen erlauben (Abschnitt 1.4.1), als auch der vollständigen Sequenzierungen der Genome

verschiedener *E. coli* Modellstämme (Blattner *et al.*, 1997; Hayashi *et al.*, 2006; Jeong *et al.*, 2009) und der hohen Wachstumsraten ist *E. coli* ein attraktiven Organismus für die Synthese von rekombinanten Proteinen und niedermolekularen Verbindungen (Chen *et al.*, 2013). So werden fast 30 % der rekombinant exprimierten therapeutischen Proteine mit dem Wirtsorganismus *E. coli* hergestellt (Huang *et al.*, 2012). Die Transkriptome und Proteome von dabei häufig eingesetzten *E. coli* K-12 und B Stämmen wurden hierzu in einem Vergleich untersucht (Marisch *et al.*, 2013). Durch Metabolic Engineering von *E. coli* konnten neben den bereits in Abschnitt 1.2.4 beschriebenen Ganzzellsynthesen von HMOs auch die Synthesen zahlreicher Verbindungen in den Stoffklassen Biokraftstoffe, organische Säuren, Aminosäuren, Zuckeralkohole, Biopolymere und komplexe Naturstoffe demonstriert werden, wie von Chen *et al.* (2013) zusammengefasst. Dabei weisen Ganzzellsynthesen mit *E. coli* neben den im Vergleich zu chemischen Synthesen milden Reaktionsbedingungen in wässrigen Phasen abhängig von den genutzten Enzymen auch häufig hohe Substrat-, Regio- und Stereoselektivitäten auf und erlauben außerdem die Regeneration von Cofaktoren durch den Metabolismus der Zelle oder durch eingebrachte Regenerationssysteme (Itoh *et al.*, 2002; Ruffing & Chen, 2006; Schmid *et al.*, 2001). *E. coli* ist somit ein Produktionsorganismus, welcher sowohl gut charakterisiert als auch in der industriellen Biotechnologie angewandt wird.

Für die Synthese humaner Milcholigosaccharide besitzt *E. coli* im Vergleich zu anderen in der weißen Biotechnologie genutzten Mikroorganismen weitere begünstigende Eigenschaften. So existieren für *E. coli* einfache Methoden zur chromosomalen Modifikation (Abschnitt 1.4.1) und mit den beschriebenen Prozessen zur Synthese einiger HMOs auch schon Beispiele für die Durchführbarkeit solcher Synthesen (Abschnitt 1.2.4). Außerdem verfügt *E. coli* mit der Lactose-Permease über ein aktives Aufnahmesystem für das Akzeptor-Substrat Lactose (Abschnitt 1.4.2) und mit den Synthesewegen für Colansäure, Peptidoglycan und Lipopolysaccharide sowie dem Leloir-Weg auch über endogene Stoffwechselwege, welche die Synthesen der Nukleotid-aktivierten Zucker UDP-GlcNAc, UDP-Gal und GDP-Fuc enthalten (Barreteau *et al.*, 2008; Frey, 1996; Neidhardt *et al.*, 1996; Stevenson *et al.*, 1996). Diese können den bisher in den Synthesen von HMOs genutzten Glycosyltransferasen als Donorsubstrate dienen, wie in Abschnitt 1.2.3 beschrieben.

1.4.1. Gentechnische Modifikationen und Proteinexpression

Zur rekombinanten Expression in *E. coli* können Gene sowohl Plasmid-basiert eingebracht als auch chromosomal integriert werden. Dabei bieten die Plasmid-basierten Systeme die Möglichkeit der schnellen Erstellung von Expressionssystemen mit klassischen, Restriktions- und Ligations-basierten molekularbiologischen Methoden (Sambrook & Russell, 2001) oder mit neuartig entwickelten Klonierungsmethoden. Beispiele hierfür sind das unter Verwendung von Typ II-Restriktionsenzymen durchgeführte Golden Gate Cloning (Engler *et al.*, 2008), die PCR-basierten USER Fusion (Geu-Flores *et al.*, 2007), die Ligations-unabhängigen Methoden LIC-PCR und SLIC (Aslanidis & de Jong, 1990; Li & Elledge, 2007), die isotherm durchgeführte Gibson Assembly (Gibson *et al.*, 2009) oder das auf PCR-Amplifikation und homologen Bereichen basierende AQUA Cloning (Beyer *et al.*, 2015).

Um die Proteinexpression der rekombinanten Gene zu beeinflussen, können Promotor-Systeme verschiedener Stärke eingesetzt werden, die Gensequenz an die Codon-Nutzung des Zielorganismus angepasst werden oder die Kopienzahl der Gene verändert werden, wie von Terpe (2006) zusammengefasst. Die Variation der Kopienzahl kann z. B. durch chromosomale Integration oder Plasmid-basierte Klonierung mehrerer Gen-Kopien erfolgen. Bei Plasmid-basierten Systemen ist außerdem die Verwendung von Vektoren mit unterschiedlichen Replikationsursprüngen möglich, wodurch die Anzahl der Plasmid-Kopien in der Zelle und somit auch die Kopienzahl der rekombinanten Gene variiert. Dabei liegen low-copy, medium-copy bzw. high-copy Plasmide, z. B. mit pSC101-, ColE1- bzw. pMB1-Replikationsursprung, mit meist einstelligen Kopienzahlen, mit 15 – 20 Kopien bzw. mit mehreren hundert Kopien je Zelle vor (Sambrook & Russell, 2001). Die durch hohe Plasmid-Kopienzahlen verursachte, starke Expression von Genen ist in der Produktion rekombinanter Proteine häufig erwünscht. Aufgrund der metabolischen Belastung, die mit dem Erhalt von vielen Plasmid-Kopien und den starken Genexpressionen von high-copy Plasmiden einhergeht und, da im Metabolic Engineering aufeinander abgestimmte Enzymaktivitäten in den Synthesewegen notwendig sind, können hier Plasmid-Systeme mit niedrigeren Kopienzahlen oder chromosomale Integrationen vorteilhaft sein (Jones *et al.*, 2000). Da Plasmide außerdem zu struktureller und Segregationsinstabilität neigen und daher Systeme zur Selektion auf Plasmid-tragende Zellen benötigen (Friehs, 2004), stellt vor allem die chromosomale

Integration rekombinanter Gene eine potente Methode zur Erstellung von Synthesestämmen im Metabolic Engineering dar.

Eine Methode zur Stammentwicklung mittels chromosomaler Integration wurde von Albermann *et al.* (2010) beschrieben. Diese Methode beruht auf der homologen Rekombination mittels des λ -Red Systems (Datsenko & Wanner, 2000), nutzt jedoch bei der Integration von Expressionskassetten die gleichzeitige Deletion von Zuckerdegradations-Loci, um eine schnelle Überprüfung der ortsspezifischen Integration auf differenziellem Agar zu erlauben. Diese Überprüfung wird möglich, da Zellen, welche die Integration in dem gewünschten Zuckerdegradations-Lokus tragen, den entsprechenden Zucker nicht mehr verwerten können und somit keine Bildung von organischen Säuren auf MacConkey-Agar mit dem entsprechenden Zucker zeigen. So erfolgt die Integration der mittels Elektroporation eingebrachten Expressionskassette im jeweiligen Zielstamm über die Red-Rekombinase-Gene *gam*, *bet* und *exo* des λ -Bakteriophagen, welche von einem Plasmid mit temperatursensitiver Replikation exprimiert werden (Datsenko & Wanner, 2000). Die temperatursensitive Replikation erlaubt das einfache Entfernen des Plasmids nach erfolgter Integration. Die eingebrachte Expressionskassette besteht jeweils aus einem Promotor, dem Gen, einer durch FLP-Rekombinase-Erkennungssequenzen (FRT) flankierten Antibiotikaresistenz und den Transkriptionsterminatoren. Die Antibiotikaresistenz dient der Selektion auf erfolgte Integration des linearen DNA-Fragments und kann durch die vorübergehende Transformation mit dem ebenfalls temperatursensitiv replizierten Plasmid pCP20, welches die FLP-Rekombinase exprimiert, über die FRT-Erkennungssequenzen wieder entfernt werden (Cherepanov & Wackernagel, 1995). Der konstruierte Stamm kann nach dem Entfernen der Resistenzkassette für weitere chromosomale Integrationen eingesetzt werden. Ein Transfer von bereits in einen *E. coli* Stamm integrierten Expressionskassetten in weitere *E. coli* Stämme kann auch mittels Phagen-vermittelter Transduktion durchgeführt werden (Albermann *et al.*, 2010; Thierauf *et al.*, 2009).

1.4.2. Aufnahme und Metabolismus verschiedener Kohlenstoffquellen

E. coli kann zahlreiche verschiedene organische Substanzen aufnehmen und als Kohlenstoffquellen verwerten, wie z. B. in der interaktiven Karte der Ecocyc-Datenbank zusammengetragen (Keseler *et al.*, 2013; www.ecocyc.org/overviewsWeb/celOv.shtml; letzter Zugriff 23.06.2016). Im Folgenden wird jedoch lediglich ein Überblick über die

Aufnahme und den Metabolismus der in dieser Arbeit zur Synthese von HMOs gebrauchten Zucker Glucose, Glycerin, Galactose, L-Fucose und Lactose gegeben.

Glucose

Glucose wird von *E. coli* hauptsächlich über das gut charakterisierte, Glucose-spezifische Phosphotransferase-System (Glc-PTS) aufgenommen, wobei die Phosphat-Gruppe von Phosphoenolpyruvat über eine Proteinkaskade auf das C-6-Atom der Glucose übertragen wird (Postma *et al.*, 1993; Steinsiek & Bettenbrock, 2012). Neben diesem Aufnahmesystem kann Glucose bei entsprechender Genexpression aber auch über die Glucose-Permease, unter aeroben Bedingungen über das Mannose Phosphotransferase-System (Man-PTS) und bei geringen Glucose-Konzentrationen über den Galactose- oder den Maltose-ABC-Transporter aufgenommen werden, wie von Steinsiek & Bettenbrock (2012) zusammengefasst. Bei der Aufnahme von Glucose über die ABC-Transporter oder über die Galactose-Permease erfolgt jedoch keine Phosphorylierung, sodass Glucose zur weiteren Verwertung intrazellulär über die Glucokinase Glk phosphoryliert werden muss (Hernández-Montalvo *et al.*, 2003). Glucose-6-phosphat wird in *E. coli* über den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (Glykolyse) und den Pentosephosphatweg umgesetzt, wobei der Hauptanteil von Glucose in *E. coli* über die Glykolyse umgesetzt wird und der Entner-Doudoroff-Weg, welcher für das Wachstum auf verschiedenen Zuckersäuren benötigt wird, bei der Verwertung von Glucose nicht aktiv ist (Murray & Conway, 2005; Wang *et al.*, 1958).

Glycerin

Im Gegensatz zur Aufnahme von Glucose kann Glycerin auch ohne aktives Aufnahmesystem von *E. coli* genutzt werden, wobei der Transfer durch die innere Membran über Aquaporine erfolgt und durch den Aquaporin-artigen Glycerin-Facilitator GlpF verstärkt wird, welcher sowohl die Aufnahme als auch den Export von Glycerin erlaubt (Heller *et al.*, 1980; Lu *et al.*, 2003). Dabei wird GlpF vor allem bei geringen Glycerin-Konzentrationen für die effektive Aufnahme von Glycerin benötigt, während bei Glycerin-Konzentrationen ab 5 mM bereits nur noch geringe Beeinträchtigungen des Wachstums von *E. coli* Zellen ohne GlpF beobachtet werden konnten (Richey & Lin, 1972). Intrazellulär wird Glycerin zur Verwertung über den zentralen Metabolismus durch die Glycerinkinase GlpK unter Verwendung von ATP phosphoryliert und das entstehende Glycerin-3-phosphat mittels der aeroben bzw. anaeroben

Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase GlpD bzw. GlpABC zu Dihydroxyacetonphosphat umgesetzt, woraufhin Dihydroxyacetonphosphat über die Glykolyse oder die Gluconeogenese weiter verwertet werden kann (Cole *et al.*, 1988; Gottlieb *et al.*, 2014; Schryvers *et al.*, 1978; Zwaig *et al.*, 1970). Ein weiterer Weg der Verwertung von Glycerin, welcher die Oxidation mittels der Glycerin-Dehydrogenase GldA und die Phosphorylierung des entstehenden Dihydroxyacetons mittels der Dihydroxyacetonkinase DhaKLM nutzt, um Dihydroxyacetonphosphat zu generieren (Jin & Lin, 1984), kommt vor allem bei der Verwertung von Glycerin unter fermentativen Bedingungen zum Einsatz (Cintolesi *et al.*, 2012; Gonzalez *et al.*, 2008).

Galactose

Für die in der mikrobiologischen Forschung und Synthese als Kohlenstoffquelle eher ungebräuchliche Galactose konnte in *E. coli* bisher kein Phosphotransferase-System identifiziert werden. Stattdessen wird Galactose in *E. coli* über die Galactose-Permease GalP (Ward *et al.*, 1999), welche ein Galactose-Protonen Symporter der Major Facilitator Family ist (Pao *et al.*, 1998), über den Galactose-ABC-Transporter MglABC (Henderson *et al.*, 1977), dessen Gene unter Glucose-Limitierung exprimiert werden (Death & Ferenci, 1994) sowie mit niedriger Affinität über die Lactose-Permease LacY (Abramson *et al.*, 2003) aufgenommen. Galactose kann intrazellulär ausschließlich über den Leloir-Stoffwechselweg zum zentralen Stoffwechsel gelangen. Hierzu wird sie über die Galactokinase GalK phosphoryliert und anschließend mittels der Enzyme Galactose-1-phosphat-Uridyltransferase GalT und der UDP-glucose 4-Epimerase GalE zu Glucose-1-phosphat umgesetzt (Frey, 1996).

L-Fucose

Wie von Baldomà und Aguilar (1988) zusammengefasst, erfolgen Aufnahme und Verwertung von L-Fucose in *E. coli* analog zu L-Rhamnose über eine Permease, eine Isomerase, eine Kinase und eine Aldolase, um Dihydroxyacetonphosphat und L-Lactaldehyd zu erzeugen. Die Gene dieser Enzyme sind dabei im Fucose-Operon *fucPIKUR* kodiert, in dem *fucP* den Protonen-Symporter Fucose-Permease kodiert, welcher neben L-Fucose auch D-Arabinose und L-Galactose aufnehmen kann (Bradley *et al.*, 1987). Die L-Fucose-Isomerase (FucI) dient der Umwandlung von L-Fucose zur Ketose L-Fuculose (Green & Cohen, 1956; Seemann & Schulz, 1997), welche anschließend mittels der L-Fuculose-Kinase (FucK; Heath & Ghalambor, 1962) unter

Verwendung von ATP zu L-Fucose-1-phosphat und anschließend mittels der L-Fucose-1-phosphat-Aldolase (FucA; Ghalambor & Heath, 1962) zu Dihydroxyacetonphosphat und L-Lactaldehyd umgesetzt wird. Die Regulation der Transkription des Fucose-Operons erfolgt in *E. coli* über L-Fucose-1-phosphat und über den Komplex aus cAMP Response Protein und cAMP (cAMP-CRP), wobei L-Fucose-1-phosphat als wichtiger Effektor für die Expression benötigt wird (Podolny *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2004).

Lactose

Die Aufnahme von Lactose, welche als Akzeptor-Substrat für Glycosyltransferasen in der Ganzzellsynthese von HMOs eingesetzt werden kann (Abschnitt 1.2.4), wird über die Lactose-Permease LacY mittels Protonen-Symport gewährleistet (Kaback, 1983). Die Verwertung geschieht anschließend über die Hydrolyse von Lactose zu D-Galactose und D-Glucose mittels der β -D-Galactosidase LacZ (Lederberg, 1950), woraufhin die Monosaccharide genutzt werden können wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben.

Katabolitrepression

Stehen *E. coli* mehrere Kohlenstoffquellen zur Verfügung, so wird die priorisierte Aufnahme und Verwertung der bevorzugten Kohlenstoffquelle, z. B. Glucose, über die Katabolitrepression geregelt (Deutscher, 2008). Diese Regulation kann sowohl auf transkriptioneller Ebene über Transkriptionsregulatoren als auch auf Enzym- bzw. Transporterebene durch Inhibition erfolgen und wird sowohl durch die Konzentrationen bestimmter Metabolite, als auch durch den Phosphorylierungszustand von Proteinen geregelt (Deutscher, 2008; Eppler *et al.*, 2002).

Ein Beispiel der Katabolitrepression ist die Verhinderung der Lactose-Aufnahme und -Verwertung mittels des Induktor-Ausschlusses, ausgelöst durch die Aufnahme von Glucose über das Glucose-PTS (Nelson *et al.*, 1983). Wie in Abbildung 1.9 dargestellt, wird bei der Aufnahme von Glucose über das Phosphotransferase-System das Protein EIIA^{Glc} dephosphoryliert, wodurch die Konzentration der dephosphorylierten EIIA^{Glc}-Moleküle erhöht wird. Diese Form kann direkt mit der Lactose-Permease interagieren und dadurch die Aufnahme von Lactose inhibieren (Deutscher, 2008). Die fehlende intrazelluläre Lactose hat wiederum einen negativen Einfluss auf die

Expression der Gene des *lac*-Operons (*lacZ*, *lacY* und *lacA*), da der konstitutiv exprimierte *lac*-Repressor (Lewis, 2005), welcher als Tetramer in freier, nicht durch Allolactose gebundener Form den *lac*-Operator bindet und somit die Transkription verhindert (Lewis, 2005).

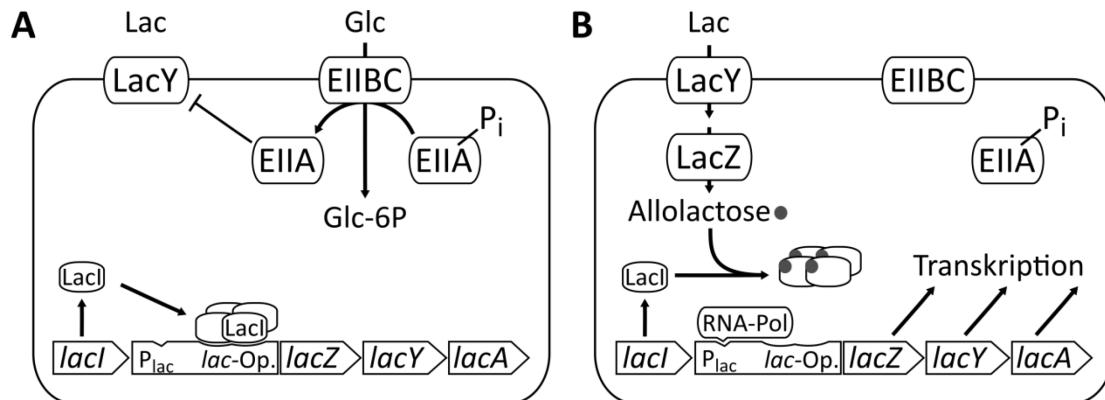


Abbildung 1.9: Katabolitrepression am *lac*-Operon durch Induktor-Ausschluss. A) Glucose wird über das Glucose-Phosphotransferase-System, bestehend aus den Komponenten EIIBC und EIIA^{Glc} aufgenommen, wobei EIIA^{Glc} dephosphoryliert wird und so die Lactose-Permease (LacY) inhibiert. Dadurch kann keine Lactose aufgenommen werden. Der konstitutiv synthetisierte *lac*-Inhibitor LacI bindet als Tetramer den *lac*-Operator (*lac*-Op.) und verhindert so die Transkription des *lac*-Operons. **B)** Unter Abwesenheit von Glucose kann Lactose über LacY aufgenommen, von LacZ zu D-Galactose und D-Glucose gespalten, bzw. in einer Nebenaktivität zu Allolactose umgesetzt werden. Durch die Bindung von Allolactose an LacI wird dessen Bindung an den *lac*-Operator verhindert und die *lac*-Strukturgene können transkribiert werden (Lewis, 2005; Nelson *et al.*, 1983).

Für eine effiziente Transkription des *lac*-Operons wird zudem der Komplex aus dem cAMP Response Protein und cAMP (cAMP-CRP) benötigt, welcher die Affinität der RNA-Polymerase zum *lac*-Promotor erhöht (Eschenlauer & Reznikoff, 1991; Hudson & Fried, 1990). Die Bildung von cAMP erfolgt dabei durch die Adenylatcyclase, welche durch die phosphorylierte Form der Glucose-PTS-Komponente EIIA^{Glc} aktiviert wird (Crasnier-Mednansky *et al.*, 1997; Reddy & Kamireddi, 1998). Der auf geringe Vorkommen von phosphoryliertem EIIA^{Glc} während der Glucose-Aufnahme zurückgeführte Einfluss auf die Expression des *lac*-Operons wurde jedoch relativiert durch die Erkenntnisse, dass die Konzentration von cAMP in Anwesenheit von Glucose gleich hoch ist wie in Anwesenheit von Lactose oder einer Kombination aus Glucose und Lactose (Inada *et al.*, 1996).

1.5. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Trotz der Entwicklungen in der Zusammensetzung von Ersatzmilchpräparaten gilt humane Milch nach wie vor als der „Gold Standard“ in der Säuglingsernährung (Bode, 2009). Humane Milcholigosaccharide (HMOs) bilden die Feststoffklasse mit der

dritthöchsten Konzentration in humaner Milch und werden als eine Ursache der positiven Effekte von Milch auf die Gesundheit der Säuglinge angesehen (Bode, 2012). Die Strukturen zahlreicher HMOs konnten in den vergangenen 70 Jahren in einer Vielzahl verschiedener Publikationen charakterisiert (Abschnitt 1.1.1) und aufgrund ihrer Konstitution und den vorkommenden Monomer-Einheiten in Typ I- und Typ II-Strukturen bzw. saure und neutrale Strukturen unterteilt werden (Abschnitt 1.1.2). Durch endständige Fucosyl- und Sialyl-Gruppen enthalten viele HMOs Strukturen, die den humanen Antigenen des Lewis- und Blutgruppen-Systems gleichen oder ähneln (Abbildung 1.2, Tabelle 1.3).

Da HMOs jedoch nur in geringen Konzentrationen in der Milch von Nutztieren vorkommen (Abschnitt 1.1.3), chemische bzw. enzymatische Synthesen aufgrund der benötigten Schutzgruppenchemie bzw. der geringen Produktausbeuten oder hohen Substratkosten nicht kostengünstig durchführbar sind (Abschnitte 1.2.2 & 1.2.3) und die bestehenden mikrobiellen Ganzzellsynthesen bisher nur eine begrenzte Anzahl der HMOs darstellen konnten (Abschnitt 1.2.4), sind viele HMOs momentan nicht kostengünstig verfügbar.

So konnten Untersuchungen zu den Effekten einzelner HMOs bisher nur für wenige Verbindungen oder im kleinen Maßstäben durchgeführt werden, während andere Untersuchungen unter Verwendung von Mischungen verschiedener HMOs erfolgten, welche aus humaner Milch isoliert wurden (Abschnitt 1.1.4). Um die dabei beschriebenen Effekte systematisch mit verschiedenen isolierten Verbindungen untersuchen und spezifischen Struktur- oder Epitop-Klassen zuordnen zu können, werden effiziente Synthesen dieser Verbindungen benötigt.

Die bisher beschriebenen Methoden zu Ganzzellsynthesen von HMOs zeigen aufgrund der Kombination hoher Regio- und Stereoselektivitäten der verwendeten Glycosyltransferasen mit der Verwendung günstiger Substrate großes Potential für ein effizientes Herstellungsverfahren (Abschnitt 1.2.4). Dabei wurden jedoch Stämme mit Plasmid-basierter Expression der Glycosyltransferase-Gene genutzt, was die Verwendung von Antibiotika als Selektionsmarker für den Erhalt der Plasmide bedingte.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von Systemen zur Ganzzellsynthese neutraler HMOs, welche zuvor noch nicht durch Ganzzellsynthesen dargestellt wurden, sowie die Entwicklung verbesserter Verfahren zur Synthese von HMOs, welche bereits zuvor

biotechnologisch hergestellt werden konnten. Die am Institut etablierte Methode der chromosomalen Integration mittels homologer Rekombination nach Albermann *et al.* (2010) sollte dabei zur Erstellung Plasmid-freier Stämme dienen, welche nicht auf die Verwendung von Antibiotika oder anderen Selektionsmechanismen angewiesen sind.

Im ersten Teil des Projekts sollten dabei die Analyse bereits zuvor konstruierter Stämme und die Konstruktion weiterer Stämme zur Synthese von Fucosyllactosen erfolgen und die Synthese vom Schüttelkolben in den Rührkesselreaktor übertragen werden.

Im zweiten Teil sollten weitere Glycosyltransferase-Gene kloniert und chromosomal integriert werden, um Stämme für die Synthesen größerer HMO-Kernstrukturen zu entwickeln.

Durch eine Kombination der in Teil eins genutzten Fucosylierung mit den in Teil zwei erstellten Kernstruktur-Produzenten sollten in einem dritten Projektteil Stämme für die Synthese fucosylierter HMOs mit Kernstrukturen neben Lactose konstruiert werden.

Die Isolierung und strukturelle Verifikation der synthetisierten Oligosaccharide war dabei zentraler Bestandteil der Teile zwei und drei, da dabei HMOs synthetisiert werden sollten, deren Synthesen zuvor noch nicht in Ganzzellsystemen demonstriert wurden.

2. Material und Methoden

Die im Rahmen des Projektes genutzten Geräte sind in den jeweiligen Beschreibungen der Methoden und als Zusammenfassung im Anhang in Tabelle A.13 angegeben.

2.1. Material

2.1.1. Eingesetzte Bakterienstämme, Plasmide und Gene

Die in dieser Arbeit konstruierten Stämme zur Synthese von Fucosyllactosen bzw. anderen Oligosacchariden basieren auf den *E. coli* K-12 Laborstämmen *E. coli* JM109 bzw. *E. coli* LJ110. Zur Konstruktion Plasmid-freier Stämme wurden die rekombinanten Gene mittels homologer Rekombination in Zuckerdegradations-Loci eingebracht und die in diesen Loci enthaltenen Gene zeitgleich deletiert nach einer bereits zuvor am Institut für Mikrobiologie entwickelten Methode (Albermann *et al.*, 2010, Abschnitt 2.2.12). Die dabei eingesetzten Ausgangsstämme und die konstruierten Synthesestämme sind in Tabelle 2.1 dargestellt, während die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide in Tabelle 2.2 aufgeführt sind. Die für die biologischen Synthesen von HMOs rekombinant exprimierten und zum Teil chromosomal eingebrachten Gene und Gen-Konstrukte sind zusammen mit deren Ursprung, Funktion und Größe in Tabelle 2.3 dargestellt.

Tabelle 2.1: Verwendete und konstruierte *E. coli* Stämme.

| <i>E. coli</i> Stamm | Relevanter Genotyp | Referenz |
|-----------------------|---|---------------------------------------|
| DH5 α | F ⁻ , ϕ 80d, <i>lacZ</i> Δ M15, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K m _K), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>lacZA-argF</i>)U169 | (Hanahan, 1983) |
| JM109 | F', <i>traD36</i> , <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q , Δ (<i>lacZ</i>)M15/ Δ (<i>lac-proAB</i>), <i>glnV44</i> , <i>e14</i> ⁺ , <i>gyrA96</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>endA1</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> | (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985) |
| LJ110 | F ⁻ , λ , <i>rph-1</i> , INV(<i>rrnD</i> , <i>rrnE</i>), <i>fnr</i> ⁺ ; (Entspricht <i>E. coli</i> W3110 <i>fnr</i> ⁺) | (Zeppenfeld <i>et al.</i> , 2000) |
| JM109 gwBC | <i>E. coli</i> JM109, <i>rbsDK::manC-FRT</i> , <i>melAB::manB-FRT</i> , <i>xylAB::gmd-wcaG-FRT</i> | (Baumgärtner <i>et al.</i> , 2013) |
| JM109 gwBC-F1 | <i>E. coli</i> JM109, <i>rbsDK::manC-FRT</i> , <i>melAB::manB-FRT</i> , <i>xylAB::gmd-wcaG-FRT</i> , <i>malEG::futC-FRT</i> | (Baumgärtner <i>et al.</i> , 2013) |
| JM109 gwBC-F1-fkp-cat | <i>E. coli</i> JM109, <i>rbsDK::manC-FRT</i> , <i>melAB::manB-FRT</i> , <i>xylAB::gmd-wcaG-FRT</i> , <i>malEG::futC-FRT</i> , <i>fuclK::fkp-FRT-cat-FRT</i> | (Baumgärtner <i>et al.</i> , 2013) |

| <i>E. coli</i> Stamm | Relevanter Genotyp | Referenz |
|-----------------------------|---|------------------------------------|
| JM109 gwBC-F2-cat | <i>E. coli</i> JM109, <i>rbsDK::manC-FRT</i> , <i>melAB::manB-FRT</i> , <i>xylAB::gmd-wcaG-FRT</i> , <i>malEG::futC-FRT</i> , <i>fucIK::futC-FRT-cat-FRT</i> | (Baumgärtner <i>et al.</i> , 2013) |
| JM109 gwBC-F2 | <i>E. coli</i> JM109, <i>rbsDK::manC-FRT</i> , <i>melAB::manB-FRT</i> , <i>xylAB::gmd-wcaG-FRT</i> , <i>malEG::futC-FRT</i> , <i>fucIK::futC-FRT</i> | (Baumgärtner <i>et al.</i> , 2013) |
| JM109 gwBC-F2-fkp-cat | <i>E. coli</i> JM109, <i>rbsDK::manC-FRT</i> , <i>melAB::manB-FRT</i> , <i>xylAB::gmd-wcaG-FRT</i> , <i>malEG::futC-FRT</i> , <i>fucIK::futC-FRT</i> , <i>araBD::fkp-FRT-cat-FRT</i> | (Baumgärtner <i>et al.</i> , 2013) |
| JM109 gwBC-F3-cat | <i>E. coli</i> JM109, <i>rbsDK::manC-FRT</i> , <i>melAB::manB-FRT</i> , <i>xylAB::gmd-wcaG-FRT</i> , <i>malEG::futC-FRT</i> , <i>fucIK::futC-FRT</i> , <i>galEK::futC-FRT-cat-FRT</i> | Diese Arbeit |
| LJ-A-cat | <i>E. coli</i> LJ110, <i>lacZA::lgtA-FRT-cat-FRT</i> | Diese Arbeit |
| LJ-AY-cat-kan | <i>E. coli</i> LJ110, <i>lacZA::lgtA-FRT-cat-FRT</i> , <i>fucIK::lacY-FRT-kan-FRT</i> | Diese Arbeit |
| LJ-AY | <i>E. coli</i> LJ110, <i>lacZA::lgtA-FRT</i> , <i>fucIK::lacY-FRT</i> | Diese Arbeit |
| LJ-AY2-kan | <i>E. coli</i> LJ110, <i>lacZA::lgtA-FRT</i> , <i>fucIK::lacY-FRT</i> , <i>mtlAD::lacY-FRT-kan-FRT</i> | Diese Arbeit |
| LJ-AYB-cat | <i>E. coli</i> LJ110, <i>lacZA::lgtA-FRT</i> , <i>fucIK::lacY-FRT</i> , <i>xylAB::lgtB-FRT-cat-FRT</i> | Diese Arbeit |
| LJ-AYB | <i>E. coli</i> LJ110, <i>lacZA::lgtA-FRT</i> , <i>fucIK::lacY-FRT</i> , <i>xylAB::lgtB-FRT</i> | Diese Arbeit |
| LJ-AYBF-cat | <i>E. coli</i> LJ110, <i>lacZA::lgtA-FRT</i> , <i>fucIK::lacY-FRT</i> , <i>xylAB::lgtB-FRT</i> , <i>araBD::fkp-FRT-cat-FRT</i> | Diese Arbeit |
| LJ-AYBF | <i>E. coli</i> LJ110, <i>lacZA::lgtA-FRT</i> , <i>fucIK::lacY-FRT</i> , <i>xylAB::lgtB-FRT</i> , <i>araBD::fkp-FRT</i> | Diese Arbeit |
| LJ-AYBFA-cat | <i>E. coli</i> LJ110, <i>lacZA::lgtA-FRT</i> , <i>fucIK::lacY-FRT</i> , <i>xylAB::lgtB-FRT</i> , <i>araBD::fkp-FRT</i> , <i>rhaBD::futA-FRT-cat-FRT</i> | Diese Arbeit |
| LJ-AYBFC-cat | <i>E. coli</i> LJ110, <i>lacZA::lgtA-FRT</i> , <i>fucIK::lacY-FRT</i> , <i>xylAB::lgtB-FRT</i> , <i>araBD::fkp-FRT</i> , <i>rhaBD::futC-FRT-cat-FRT</i> | Diese Arbeit |
| LJ-AYF-cat | <i>E. coli</i> LJ110, <i>lacZA::lgtA-FRT</i> , <i>fucIK::lacY-FRT</i> , <i>araBD::fkp-FRT-cat-FRT</i> | Diese Arbeit |
| LJ-AYF | <i>E. coli</i> LJ110, <i>lacZA::lgtA-FRT</i> , <i>fucIK::lacY-FRT</i> , <i>araBD::fkp-FRT</i> | Diese Arbeit |
| LJ-AYFO-cat | <i>E. coli</i> LJ110, <i>lacZA::lgtA-FRT</i> , <i>fucIK::lacY-FRT</i> , <i>araBD::fkp-FRT</i> , <i>xylAB::wbgO-FRT-cat-FRT</i> | Diese Arbeit |
| LJ-AYFO | <i>E. coli</i> LJ110, <i>lacZA::lgtA-FRT</i> , <i>fucIK::lacY-FRT</i> , <i>araBD::fkp-FRT</i> , <i>xylAB::wbgO-FRT</i> | Diese Arbeit |
| LJ-AYFO14-cat | <i>E. coli</i> LJ110, <i>lacZA::lgtA-FRT</i> , <i>fucIK::lacY-FRT</i> , <i>araBD::fkp-FRT</i> , <i>xylAB::wbgO-FRT</i> , <i>rhaBD::fucT14-FRT-cat-FRT</i> | Diese Arbeit |
| LJ-AYFOC-cat | <i>E. coli</i> LJ110, <i>lacZA::lgtA-FRT</i> , <i>fucIK::lacY-FRT</i> , <i>araBD::fkp-FRT</i> , <i>xylAB::wbgO-FRT</i> , <i>rhaBD::futC-FRT-cat-FRT</i> | Diese Arbeit |

| <i>E. coli</i> Stamm | Relevanter Genotyp | Referenz |
|----------------------|---|--------------|
| LJ-AYO-cat | <i>E. coli</i> LJ110, <i>lacZA::lgtA-FRT</i> , <i>fucIK::lacY-FRT</i> , <i>xylAB::wbgO-FRT-cat-FRT</i> | Diese Arbeit |
| LJ-AYO | <i>E. coli</i> LJ110, <i>lacZA::lgtA-FRT</i> , <i>fucIK::lacY-FRT</i> , <i>xylAB::wbgO-FRT</i> | Diese Arbeit |

Tabelle 2.2: Verwendete und konstruierte Plasmide.

| Name | Beschreibung | Referenz |
|---------------------------------------|---|--|
| pAW229 | Klonierungsvector, RBS, <i>rhaBD</i> -Promotor, <i>hyuC</i> -Gen, Cm ^R | (Wilms <i>et al.</i> , 2001b) |
| pCAS30-FRT-cat-FRT | pJF119ΔN, <i>P. ananatis</i> -Gen <i>crtE</i> , FRT-Kassette mit Cm ^R , Amp ^R | (Vallon <i>et al.</i> , 2008) |
| pCASF4 | pJF119ΔN, <i>B. bifidum</i> -Gen <i>afcA</i> , Amp ^R | (Albermann, pers. Referenz) |
| pCAW55 | pJOE2775, <i>H. pylori</i> -Gen <i>futC</i> , Amp ^R | (Albermann <i>et al.</i> , 2001) |
| pCP20 | FLP ⁺ , λ cI857 ⁺ , λ p _R Rep ^{ts} , Amp ^R , Cm ^R | (Cherepanov & Wackernagel, 1995) |
| pET16b- His6Propep- catβ4GalT-1 | pET16b, His6-Propeptid-Konstrukt mit katalytischer Domäne des humanen Gens <i>galT</i> , Amp ^R | (Sauerzapfe <i>et al.</i> , 2008) |
| pF81 _{kan} | pJF119EH, <i>pheA(fbr)</i> , <i>aroF</i> , <i>aroB</i> , <i>aroL</i> , Kan ^R | (Weiner <i>et al.</i> , 2014) |
| pJOE2702 | Klonierungsvector, RBS, <i>rhaBD</i> -Promotor, Amp ^R | (Volf <i>et al.</i> , 1996) |
| pKD46 | P _{araB} γ β exo (Red-Rekombinase), Amp ^R | (Datsenko & Wanner, 2000) |
| pMJC54 | pET16b, <i>B. fragilis</i> -Gen <i>fkp</i> , Amp ^R | (Coyne <i>et al.</i> , 2005) |
| pQE31-FRT-cat-FRT | pQE31, FRT, Amp ^R , Cm ^R | (Lemuth <i>et al.</i> , 2011) |
| pJF-crtY-FRT-kan- FRT | pJF119ΔN, <i>P. ananatis</i> -Gen <i>crtY</i> , FRT-Kassette mit Kan ^R , Amp ^R | (Albermann <i>et al.</i> , 2010) |
| pJF119EH | Expressionsplasmid, P _{tac} , Amp ^R | (Fürste <i>et al.</i> , 1986) |
| pJF119ΔN | Expressionsplasmid, RBS, P _{tac} , Amp ^R | (Albermann <i>et al.</i> , 2008) |
| pJF-fkp | pJF119ΔN, <i>B. fragilis</i> -Gen <i>fkp</i> , Amp ^R | (Baumgärtner <i>et al.</i> , 2013) |
| pJF-futA | pJF119ΔN, Codon-optimiertes <i>H. pylori</i> -Gen <i>futA</i> , Amp ^R | (Albermann, pers. Referenz; Genbank WP_000487428.1) |
| pJF-futC | pJF119ΔN, <i>H. pylori</i> -Gen <i>futC</i> , Amp ^R | (Baumgärtner <i>et al.</i> , 2013) |
| pJF-futC-FRT-cat-FRT | pJF119ΔN, <i>H. pylori</i> -Gen <i>futC</i> , FRT-Kassette mit Cm ^R , Amp ^R | (Baumgärtner <i>et al.</i> , 2013) |
| pJF-lacY | pJF119EH, <i>E. coli</i> -Gen <i>lacY</i> , Amp ^R | (Baumgärtner <i>et al.</i> , 2014) |
| pJF-wbgO | pJF119ΔN, Codon-optimiertes <i>E. coli</i> O55:H7- Gen <i>wbgO</i> , Amp ^R | (Baumgärtner <i>et al.</i> , 2014) |
| pAW-fucT14 | pAW229, Austausch von <i>hyuC</i> durch Codon- optimiertes <i>H. pylori</i> -Gen <i>fucT14</i> , Cm ^R | Diese Arbeit |
| pAW-lgtA | pAW229, Austausch von <i>hyuC</i> mit Codon- optimierten <i>N. meningitidis</i> -Gen <i>lgtA</i> , Cm ^R | Diese Arbeit |

| Name | Beschreibung | Referenz |
|-------------------------|--|-----------------|
| pAW-wbgO | pAW229, Austausch von <i>hyuC</i> mit Codon-optimiertem <i>E. coli</i> O55:H7-Gen <i>wbgO</i> , Cm ^R | Diese Arbeit |
| pAWΔI | pAW229, Kontrollvektor, Religation nach Restriktion mit NdeI und BamHI und Entfernen der Einzelstrangüberhänge, Cm ^R | Diese Arbeit |
| pJF119EH-kan | pJF119EH, Austausch von Amp ^R mit Kan ^R | Diese Arbeit |
| pJF-fkp-FRT-cat-FRT | pJF-fkp, FRT-Kassette mit Cm ^R , Amp ^R | Diese Arbeit |
| pJF-lacY-FRT-kan-FRT | pJF-lacY, FRT-Kassette mit Kan ^R , Amp ^R | Diese Arbeit |
| pJF-lgtB | pJF119ΔN, <i>N. meningitidis</i> -Gen <i>lgtB</i> , Amp ^R | Diese Arbeit |
| pJFK-fucT14 | pJFK-fucC, Austausch von <i>fucC</i> mit Codon-optimiertem <i>H. pylori</i> -Gen <i>fucT14</i> , Kan ^R | Diese Arbeit |
| pJFK-fucT14-FRT-cat-FRT | pJFK-fucT14, FRT-Kassette mit Cm ^R , Kan ^R | Diese Arbeit |
| pJFK-futA | pJFK-futC, Austausch von <i>futC</i> mit Codon-optimiertem <i>H. pylori</i> -Gen <i>futA</i> , Kan ^R | Diese Arbeit |
| pJFK-futC | pJF-futC, Austausch von Amp ^R mit Kan ^R | Diese Arbeit |
| pJFK-galT-1 | pJFK-futC, Austausch von <i>futC</i> mit Propeptid-Konstrukt aus humanen Gen <i>galT</i> aus pET16b-His6Propep-catβ4GalT-1, Kan ^R | Diese Arbeit |
| pJFK-lgtA | pJFK-futC, Austausch von <i>futC</i> mit Codon-optimiertem <i>N. meningitidis</i> -Gen <i>lgtA</i> , Kan ^R | Diese Arbeit |
| pJFK-lgtA-FRT-cat-FRT | pJFK-lgtA, FRT-Kassette mit Cm ^R , Amp ^R | Diese Arbeit |
| pJFK-lgtB | pJFK-futC, Austausch von <i>futC</i> mit <i>N. meningitidis</i> -Gen <i>lgtB</i> , Kan ^R | Diese Arbeit |
| pJFK-lgtB-FRT-cat-FRT | pJFK-lgtB, FRT-Kassette mit Cm ^R , Amp ^R | Diese Arbeit |
| pJFK-wbgO | pJFK-futC, Austausch von <i>futC</i> mit Codon-optimiertem <i>E. coli</i> O55:H7-Gen <i>wbgO</i> , Kan ^R | Diese Arbeit |
| pJFK-wbgO-FRT-cat-FRT | pJFK-wbgO, FRT-Kassette mit Cm ^R , Amp ^R | Diese Arbeit |

Tabelle 2.3: Zusammenstellung der in den Synthesen von Oligosacchariden rekombinant exprimierten Gene und Konstrukte.

| Gen / Konstrukt | Ursprung | Kodiertes Enzym | Größe [bp] | Referenz |
|--|--|--|--------------------|--|
| <i>afcA</i> | <i>B. bifidum</i> JCM1254 | α 1,2-Fucosidase | 2733 | (Katayama <i>et al.</i> , 2004) |
| <i>fkp</i> | <i>B. fragilis</i> | L-Fucose Kinase/L- Fucose-1-phosphat Guanylyltransferase | 2850 | (Coyne <i>et al.</i> , 2005) |
| <i>fucT14</i> (= <i>fucT III</i>) | <i>H. pylori</i> DSM 6709 ^[a, b] | α 1,4-Fucosyltransferase | 1299 | (Rabbani <i>et al.</i> , 2005) ^[a, b] |
| <i>futA</i> | <i>H. pylori</i> ^[a] | α 1,3-Fucosyltransferase | 1278 | (Ge <i>et al.</i> , 1997; Genbank WP_000487428.1) ^[a] |
| <i>futC</i> | <i>H. pylori</i> NCTC346 | α 1,2-Fucosyltransferase | 921 ^[c] | (Wang <i>et al.</i> , 1999) |
| <i>gmd</i> | <i>E. coli</i> K-12 | GDP-Mannose 4,6- Dehydratase | 1122 | (Stevenson <i>et al.</i> , 1996; Sturla <i>et al.</i> , 1997) |
| His6Propep- cat β 4GalT-1 | <i>H. sapiens</i> | β 1,4-Galactosyl- transferase-Propeptid- Komplex | 1602 | (Sauerzapfe <i>et al.</i> , 2008) |
| <i>lacY</i> | <i>E. coli</i> K-12 | Galactosid:Protonen- Symporter | 1254 | (Kaback, 1983) |
| <i>lgtA</i> | <i>N. meningitidis</i> H44/76 ^[a, b] | β 1,3-N-Acetyl- glucosaminyltransferase | 1002 | (Wakarchuk <i>et al.</i> , 1996) ^[a, b] |
| <i>lgtB</i> | <i>N. meningitidis</i> DSM10036 ^[b] | β 1,4-Galactosyl- transferase | 828 | (Wakarchuk <i>et al.</i> , 1996) ^[b, d] |
| <i>manB</i> | <i>S. enterica</i> | Phosphomannomutase | 1434 | (Stevenson <i>et al.</i> , 1991) |
| <i>manC</i> | <i>S. enterica</i> | Mannose-1-phosphat Guanylyltransferase | 1440 | (Stevenson <i>et al.</i> , 1991) |
| <i>wbgO</i> | <i>E. coli</i> O55:H7 ^[a, b] | β 1,3-Galactosyl- transferase | 798 | (Liu <i>et al.</i> , 2009) ^[a, b] |
| <i>wcaG</i> | <i>E. coli</i> | GDP-Fucose Synthase | 966 | (Albermann <i>et al.</i> , 2000; Aoyama <i>et al.</i> , 1994) |

^[a] Gen wurde in diesem Projekt in einer synthetischen, Codon-optimierten Version eingesetzt

^[b] Gensequenz siehe Anhang A.3, Tabelle A. 14.

^[c] Genkonstrukt enthält ein C-Terminales His₆-Tag.

^[d] Referenz beschreibt Identifikation des Gens in einem anderen *N. meningitidis* Stamm.

2.1.2. Eingesetzte Substanzen und Reagenzien

Tabelle 2.4: Eingesetzte Substanzen und Reagenzien.

| Substanz | Firma (Sitz) | Reinheit [a] |
|------------------------------------|--|--------------|
| Agar-Agar | Carl Roth (Karlsruhe) | |
| Agarose | Bio-Rad (München) | |
| N-Acetylglucosamin | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) | ≥ 99 % |
| Aktivkohle Pulver | Carl Roth (Karlsruhe) | |
| Ampicillin Natriumsalz | Carl Roth (Karlsruhe) | > 97 % |
| Ammoniumchlorid | Fluka (Taufkirchen) | |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | Carl Roth (Karlsruhe) | ≥ 98 % |
| Ammoniumsulfat | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) | > 99,5 % |
| Anthranilsäure | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) | > 98 % |
| L-Arabinose | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) | ≥ 99 % |
| BlueStar Prestained Protein Marker | Nippon Genetics (Düren) | |
| Borsäure | Carl Roth (Karlsruhe) | > 99 % |
| Bradford-Reagenz (5X) | Carl Roth (Karlsruhe) | |
| Bromphenolblau | Carl Roth (Karlsruhe) | |
| 1-Butylamin | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) | 99,5 % |
| Calciumchlorid Dihydrat | Carl Roth (Karlsruhe) | |
| Chloramphenicol | Carl Roth (Karlsruhe) | > 98,5 % |
| Chloroform | Carl Roth (Karlsruhe) | |
| Celite 545 | Fluka (Taufkirchen) | |
| Coomassie Brilliant Blau G-250 | Carl Roth (Karlsruhe) | |
| Coomassie Brilliant Blau R-250 | Carl Roth (Karlsruhe) | |
| Diammoniumhydrogenphosphat | Carl Roth (Karlsruhe) | |
| Diammoniumhydrogencitrat | Merck (Darmstadt) | |
| 2',3-Difucosyllactose | IsoSep (Schweden) | > 95 % |
| Dikaliumhydrogenphosphat | Carl Roth (Karlsruhe) | |
| Dinatriumsulfat | Fluka (Taufkirchen) | |
| EDTA Dinatriumsalz | Carl Roth (Karlsruhe) | |
| Eisen(II)-sulfat Heptahydrat | Carl Roth (Karlsruhe) | ≥ 99 % |
| Eisen(III)-chlorid Hexahydrat | Fluka (Taufkirchen) | |
| Essigsäure | Carl Roth (Karlsruhe) | |
| Ethanol (technisch) | Carl Roth (Karlsruhe) | 95 % |
| Ethidiumbromid | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) | |
| L-Fucose | Carbosynth (Großbritannien) | ≥ 99 % |
| 2'-Fucosyllactose | IsoSep (Schweden) | > 95 % |
| 3-Fucosyllactose | IsoSep (Schweden) | > 95 % |
| D-Galactose | Carl Roth (Karlsruhe) | > 98 % |
| GDP-L-Fucose | Jennewein Biotechnologie (Rheinbreitbach) | 95 % |
| GeneRuler DNA Ladder-Mix | Thermo Fisher Scientific (Braunschweig) | |
| D-Glucose Monohydrat | Carl Roth (Karlsruhe) | > 99,5 % |
| Glycerin | Carl Roth (Karlsruhe) | ≥ 98 % |
| Glycin | Carl Roth (Karlsruhe) | > 99 % |

| Substanz | Firma (Sitz) | Reinheit [a] |
|--|----------------------------------|------------------------------|
| Hefeextrakt | Carl Roth (Karlsruhe) | |
| HEPES | Carl Roth (Karlsruhe) | ≥ 99,5 % |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Carl Roth (Karlsruhe) | |
| Kanamycin | Carl Roth (Karlsruhe) | ≥ 750 I. U. mg ⁻¹ |
| Kobalt(II)-chlorid Hexahydrat | Carl Roth (Karlsruhe) | |
| Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat | Carl Roth (Karlsruhe) | ≥ 98 % |
| Lacto-N-difucohexaose I | IsoSep (Schweden) | > 95 % |
| Lacto-N-fucopentaose I | IsoSep (Schweden) | > 95 % |
| Lacto-N-fucopentaose III | IsoSep (Schweden) | > 95 % |
| Lacto-N-neotetraose | IsoSep (Schweden) | > 95 % |
| Lacto-N-tetraose | IsoSep (Schweden) | > 95 % |
| Lactose Monohydrat | Carl Roth (Karlsruhe) | Ph. Eur. |
| Lactose [D-Glucose-1- ¹⁴ C], 55,7 Ci mol ⁻¹ | Perkin Elmer (USA) | |
| Magnesiumsulfat Heptahydrat | Carl Roth (Karlsruhe) | |
| Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat | Fluka (Taufkirchen) | |
| Mangan(II)-sulfat Monohydrat | Merck (Darmstadt) | |
| MacConkey-Agar Base (Difco) | Otto Nordwald (Hamburg) | |
| 2-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) | |
| Methanol | VWR (Bruchsal) | ≥ 99,9 % |
| Molybdatophosphorsäure | Merck (Darmstadt) | |
| Natriumacetat | Carl Roth (Karlsruhe) | ≥ 98,5 % |
| Natriumchlorid | Carl Roth (Karlsruhe) | > 99,8 % |
| Natriumcyanoborhydrid | Fluka (Taufkirchen) | 99 % |
| Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat | Carl Roth (Karlsruhe) | > 98 % |
| Natriumdodecylsulfat | Serva (Heidelberg) | |
| Phosphorsäure (85 %) | Carl Roth (Karlsruhe) | Reinst |
| 2-Picolinboran | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) | 95 % |
| Polyethylenglycol 6000 | Carl Roth (Karlsruhe) | |
| L-Rhamnose Monohydrat | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) | ≥ 99 % |
| Rinderserumalbumin | Serva (Heidelberg) | |
| Rotiphorese Gel 30 (37,5:1) | Carl Roth (Karlsruhe) | |
| Salzsäure (37 %) | Carl Roth (Karlsruhe) | |
| Struktol J647 | Schill Seilacher (Hamburg) | |
| TEMED | Fluka (Taufkirchen) | |
| Tetrabutylammoniumhydrogensulfat | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) | 97 % |
| Tetrahydrofuran | Carl Roth (Karlsruhe) | > 99,5 % |
| Thiamin Hydrochlorid | Fluka (Taufkirchen) | ≥ 99 % |
| Trinatriumcitrat | Carl Roth (Karlsruhe) | ≥ 99 % |
| TRIS | Carl Roth (Karlsruhe) | > 99 % |
| Trypton | Carl Roth (Karlsruhe) | |
| UDP-Galactose-Dinatriumsalz | Calbiochem (Merck, Darmstadt) | ≥ 95 % |
| UDP-Glucose-Dinatriumsalz Monohydrat | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) | ≥ 98 % |

| Substanz | Firma (Sitz) | Reinheit ^[a] |
|--|-----------------------------|-------------------------|
| UDP-N-Acetylglucosamin Natriumsalz | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) | ≥ 98 % |
| Ultima Gold MV Szintillations- Cocktail | Perkin Elmer, USA | |
| Zinksulfat Heptahydrat | Fluka (Taufkirchen) | |

2.1.3. Medien

Die Anzucht von Kulturen im Rahmen molekularbiologischer Arbeiten erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in Lysogeny-Broth (LB) Flüssigmedium (Bertani, 1951) oder auf Lysogeny-Broth-Agarplatten, während Kultivierungen zur Produktsynthese mit der Ausnahme der präparativen Synthese von LNnT in verschiedenen Minimalmedien durchgeführt wurden. Die dabei verwendeten Medien sind im Folgenden aufgeführt und enthielten bei Kultivierungen von Stämmen mit Antibiotikaresistenz das entsprechende Antibiotikum mit Endkonzentrationen von 100 µg ml⁻¹ (Ampicillin) bzw. 50 µg ml⁻¹ (Chloramphenicol bzw. Kanamycin), wenn nicht anders angegeben.

Lysogeny-Broth Medium

Für molekularbiologische Arbeiten wurde das Lysogeny-Broth Medium (LB Medium) verwendet (Bertani, 1951). Dazu wurden die in Tabelle 2.5 aufgelisteten Komponenten in H₂O gelöst, das Volumen auf 1 l eingestellt und die Lösung durch Autoklavieren sterilisiert. Zur Erzeugung von LB-Agarplatten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren zusätzlich Agar-Agar (18 g l⁻¹, Endkonz.) zugegeben.

Tabelle 2.5: Zusammensetzung des Lysogeny-Broth Mediums.

| Komponente | Konzentration [g l ⁻¹] |
|-------------|------------------------------------|
| Trypton | 10 |
| Hefeextrakt | 5 |
| NaCl | 5 |

Minimalmedium zur Synthese von Fucosyllactosen in Schüttelkolben

Für die Synthese von fucosylierten Lactosen wurde ein von Albermann *et al.* (2008) beschriebenes Medium durch den Austausch der Kohlenstoffquelle modifiziert, um das in Tabelle 2.6 aufgeführte Medium zu erhalten.

Tabelle 2.6: Zusammensetzung des Minimalmediums zur Synthese von Fucosyllactosen.

| Komponente | Konzentration [g l ⁻¹] |
|---|------------------------------------|
| KH ₂ PO ₄ | 3 |
| K ₂ HPO ₄ | 12 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 5 |
| MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 0,3 |
| CaCl ₂ · 2 H ₂ O | 0,015 |
| NaCl | 0,1 |
| FeSO ₄ · 7 H ₂ O ^[a] | 0,1125 |
| Na ₃ -Citrat ^[a] | 1,5 |
| Thiamin · HCl | 0,0075 |
| Spurenelementlösung ^[b] | - |
| Glycerin | 10 |

^[a] FeSO₄ · 7 H₂O und Na₃-Citrat zugegeben in Form von 15 ml l⁻¹ einer Lösung mit 7,5 g l⁻¹ FeSO₄ · 7 H₂O und 100 g l⁻¹ Na₃-Citrat.
^[b] Spurenelemente zugegeben in Form von 33 ml l⁻¹ der Spurenelementlösung nach Pan *et al.* (1987).

Medien zur Synthese anderer Oligosaccharide und in Zulaufkultivierungen

Das Minimalmedium zur Synthese von Oligosacchariden mit *E. coli* LJ110-basierten Stämmen wurde so gewählt, dass es dem in Zulaufkultivierungen eingesetzten Medium sehr nahe kommt, um bessere Vergleichbarkeit der Prozesse zu erlauben. Dazu wurden das Satz-Medium der Zulaufkultivierungen (Wilms *et al.*, 2001a) und das für die Synthese von Fucosyllactosen verwendete Medium (Baumgärtner *et al.*, 2013) als Grundlagen verwendet. Um zuverlässiges Wachstum zu ermöglichen, wurden dem Medium in Synthesen fucosylierter Kernstrukturen von LNT und LNnT Bacto Casaminosäuren (1 g l⁻¹, Endkonz.) zugesetzt. Die Zusammensetzung des Mediums ist in Tabelle 2.7 dargestellt.

In den beschriebenen Zulaufkultivierungen für die Synthese von 2'-FL bzw. LNT wurden jeweils verschiedene Kohlenstoffquellen verwendet und weitere Modifikationen durchgeführt (Tabelle 2.7). Die Zulauf-Lösungen enthielten ebenfalls diese unterschiedlichen Kohlenstoffquellen. Aufgrund der sich daraus ergebenden Konzentrationsunterschiede der Kohlenstoffquellen, bedingt durch die maximale

Löslichkeit von Galactose, wurden auch die Konzentrationen der anderen Komponenten und des Diammoniumhydrogenphosphat-Zulaufs angepasst (Tabelle 2.8).

Tabelle 2.7: Komponenten des Mediums für HMO-Synthesen mit *E. coli* LJ110-basierten Stämmen und der Medien für Zulaufkultivierungen zur Synthese von 2'-FL bzw. LNT.

| Komponente | Medium in | Satzmedium in der | Satzmedium in der |
|---|----------------|--------------------|-------------------|
| | Schüttelkolben | Synthese von 2'-FL | Synthese von LNT |
| Konzentration [g l ⁻¹] | | | |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 2,68 | 2,68 | 2,68 |
| (NH ₄) ₂ -H-Citrat | 1 | 1 | 1 |
| (NH ₄) ₂ HPO ₄ | 3,9 | - | 3,9 |
| K ₂ HPO ₄ | 14,6 | 14,6 | 14,6 |
| MgSO ₄ | 0,241 | 0,241 | 0,241 |
| MnSO ₄ · H ₂ O | 0,01 | - | 0,01 |
| Na ₂ SO ₄ | 2 | 2 | 2 |
| NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O | 4 | 4 | 4 |
| NH ₄ Cl | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Thiamin · HCl | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| Spurenelementlösung | [a] | [a] | [a] |
| Kohlenstoffquelle ^[b] | 10 | 26,42 | 25 |

[a] Den Medien wurden 3 ml l⁻¹ einer Spurenelementlösung (CaCl₂ · 2 H₂O (0,5 g l⁻¹), FeCl₃ · 6 H₂O (16,7 g l⁻¹), Na₂-EDTA (20,1 g l⁻¹), ZnSO₄ · 7 H₂O (0,18 g l⁻¹), MnSO₄ · H₂O (0,1 g l⁻¹), CuSO₄ · 5 H₂O (0,16 g l⁻¹), CoCl₂ · 6 H₂O (0,18 g l⁻¹)) zugegeben.

[b] Als Kohlenstoffquellen in Schüttelkolben dienen Glycerin, Glucose oder Galactose. In den Satzmedien der Zulaufkultivierungen wurden Glycerin für die Synthese von 2'-FL bzw. Galactose für die Synthese von LNT eingesetzt.

Tabelle 2.8: Zusammensetzung der in den Zulaufkulturen eingesetzten Zulaufe.

| Komponente | Synthese von 2'-FL Konzentration [g l ⁻¹] | Synthese von LNT Konzentration [g l ⁻¹] |
|--|--|--|
| Zulauf mit Kohlenstoffquelle | | |
| Glycerin | 629,08 | - |
| Galactose | - | 514,76 |
| MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 23,5 | 15,21 |
| Thiamin · HCl | 0,6 | 0,65 |
| Spurenelementlösung | [a] | [a] |
| Zulauf mit Ammonium- und Phosphatquelle | | |
| (NH ₄) ₂ HPO ₄ | 396 | 335,59 |
| Lactose-Zulauf | | |
| Lactose | 150 | 150 |

[a] Den Zulaufen wurden 119 ml l⁻¹ (Synthese von 2'-FL) bzw. 100,89 ml l⁻¹ (Synthese von LNT) der in Tabelle 2.7 beschriebenen Spurenelementlösung zugegeben.

2.2. Molekularbiologische Arbeiten

Wenn nicht anders beschrieben, wurden molekularbiologische Arbeiten nach Sambrook & Russell (2001) durchgeführt. Bei der Verwendung der in den folgenden Abschnitten beschriebenen, kommerziellen Produkte wurde jeweils die von Hersteller beschriebene Methode befolgt, wenn nicht anders aufgeführt.

2.2.1. Plasmid-Isolierung

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mit dem NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach dem Protokoll „Isolation of high-copy plasmid DNA from *E. coli*“ unter Durchführung des optionalen Waschschruttes und mit Elution mit H₂O. Das Elutionsvolumen wurde je nach Anwendung des Isolats angepasst und betrug 30 µl - 100 µl.

2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation linearer DNA-Fragmente wurden Polymerase-Kettenreaktionen durchgeführt (Mullis & Faloona, 1987). Die dabei eingesetzten Oligonukleotid-Primer

waren bereits am Institut vorrätig, da sie bereits zuvor durch Dr. Natalie Trachtmann oder Dr. Christoph Albermann genutzt wurden, oder wurden bezogen von Biomers.net (Ulm). Die verwendeten Primer sowie deren Sequenzen sind in Tabelle 2.10 dargestellt. Durchgeführt wurden die PCRs in Thermocycler TGradient von Biometra (Göttingen). PCRs zur Kontrolle von Klonierungen oder chromosomalen Integrationen mit anschließenden Untersuchungen der Amplifikat-Größen wurden mit Taq-Polymerase (Genaxxon, Ulm) in je 50 μl durchgeführt nach dem in Tabelle 2.9 dargestellten Vorgehen. Als Kontrollen dienten Ansätze mit jeweils nur einem Primer und, wenn vorhanden, mit Stämmen mit bereits erfolgter chromosomaler Integration.

Tabelle 2.9: Zusammensetzung und Durchführung von PCRs zur Kontrolle von Klonierungen.

| Zusammensetzung | | | Durchführung | | | |
|----------------------|------------------------|-------------------------------|--|------------------------------|------------------------|--------|
| Komponente | Vol. [μl] | Finale Konzentration | Schritt | Temp. [$^{\circ}\text{C}$] | Dauer [sec] | Zyklen |
| Taq-Polymerase | 5 | 1X | Denaturierung | 95 | 300 | 1 |
| Puffer (10X) | | | | | | |
| dNTP-Mix (je 2,5 mM) | 4 | 0,2 mM | Denaturierung | 95 | 30 | 30 |
| Primer 1 | 1,5 | 0,3 μM | Anlagerung | ^[b] | 30 | |
| Primer 2 | 1,5 | 0,3 μM | Elongation | 72 | 60 kb ^{-1[c]} | |
| Matrizen-DNA | 0,5 ^[a] | 0,2 – 2 ng μl^{-1} | Finale Elong. | 72 | | 1 |
| H ₂ O | 37 | - | ^[b] Anlagerungs-Temperatur entsprechend der Herstellerangaben der Primer. | | | |
| Taq-Polymerase | 0,5 | 50 mU μl^{-1} | ^[c] Elongationszeit von 60 sec. je 1000 bp des erwarteten Produkts. | | | |

^[a] Bei Kolonie-PCRs wurde dieses Volumen mit H₂O ersetzt und eine kleinstmögliche sichtbare Menge an Zellmasse zugegeben.

Zur Amplifizierung linearer DNA, welche für weitere Klonierungsarbeiten eingesetzt werden sollten, wurde das PrimeStar HS Polymerase-System mit Korrekturlesefunktion (Takara Bio, Japan) genutzt, um Mutationen in den Amplifikationen zu minimieren. Für die Amplifikation von *lgtB* aus chromosomaler DNA von *N. meningitidis* wurden die Primer hierbei so gewählt, dass Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme außerhalb des Leserahmens eingebracht wurden, um die spätere Verwendung für die Konstruktion von Expressionsvektoren zu erleichtern (Tabelle 2.10). Für die Amplifikationen von Nukleinsäuren, welche anschließend chromosomal integriert werden sollten, enthielten die Primer neben dem zur Matrize homologen

Bereich auch einen etwa 50 Basen langen, zum Integrationsort homologen Bereich, der die homologe Rekombination ermöglichte. Das Programm der Amplifikation wurde nach der 3-Schritt-PCR Methode der Herstellerangaben des PrimeStar HS Polymerase-Systems durchgeführt, wobei für die Berechnung der Schmelztemperatur der Primer nur der zum Template homologe Bereich berücksichtigt wurde.

Tabelle 2.10: Sequenzen der verwendeten Primer.

| Primer-Name | Sequenz (je 5'→3') |
|---|---|
| Primer zur Klonierung von Genen aus chromosomaler DNA oder Plasmid-DNA | |
| Eingefügte Restriktionsschnittstelle unterstrichen und korrespondierende Restriktionsenzyme in Klammern hinter der Sequenz, fehlpaarende Basen fett markiert. | |
| Nmen-igtB-for | TAAC <u>CATATG</u> CAAAACCACGTTATCAGCTTAGCTTCC (NdeI) |
| Nmen-igtB-rev | TAAACAGCCGCGGATCCTGCCGTCTGC (BamHI) |
| GalT-1-for (= CAS154) | GATAT <u>CATATG</u> GGCCATCATCATCATC (NdeI) |
| GalT-1-rev (= CAS155) | TAGCAGCCGATCCTCGAGC (BamHI) |
| Primer für die chromosomale Integration von Genen | |
| Zum Integrationsort homologe Sequenzen unterstrichen. | |
| AraBAD-for | <u>TCTATAATCACGGCAGAAAAGTCCACATTGATTATTTGCACGG</u> <u>CGTCGTCGCTCAAGGCGCACTCCCGTTCTGG</u> |
| AraBAD-rev | <u>ATATAAGCGACCTCTTCCAGCACGATGGCGTTATGCACCGCAT</u> <u>CTTCCGTCAGGATGGCCTTCTGCTTAATTTGATGCC</u> |
| FucIK-for | <u>CCGAATAAAGTGAGGAATCTGTAATGAAAAAATCAGCTTAC</u> <u>CGAAAATTGGTCAAGGCGCACTCCCGTTCTGG</u> |
| FucIK-rev | <u>GTTAACCCTTCCAGCGCCGCGGATAGAAATGCCCCGCGTGG</u> <u>TATTAAGCAGGGTTATTGTCTCATGAGCG</u> |
| GalETKM-for | <u>TGCAGGCATGAAACCGCTCTTTTTTCAGATAAAAAGCGCAA</u> <u>TCAGTCGCTCAAGGCGCACTCCCGTT</u> |
| GalETKM-rev | <u>TAACATTACTCAGCAATAAACTGATATTCCGTCAGGCTGGAA</u> <u>TAAGGATGGCCTTCTGCTTAATTTGATGCCTG</u> |
| LacZYA-for | <u>CCCCGCGGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCAGCACAGG</u> <u>TTTCCGCGCCGACATCATAACGGTTC</u> |
| LacZYA-rev | <u>AATTGCGGCTATATGGATGTTGGAACCGTAAGAGAAATAGA</u> <u>CAGGCGGTCAGACCGCTTCTGCGTTCTG</u> |
| MtlAD-for | <u>GATCAAAGTGCAAAGCTTTGGTCGTTTCCTCAGCAACATGGTG</u> <u>ATGCCAATCAAGGCGCACTCCCGTTCTGG</u> |
| MtlAD-rev | <u>ACCGCTCGGATACAACCTCGCTGTTGGCATCAAGACCGGAAA</u> <u>TCTGTGCCAGGGTTATTGTCTCATGAGCG</u> |
| RhaBAD-for | <u>GCCATTCGCCTTGGAATAAACAAGGTGTGCGAGGAAGGGATT</u> <u>CGTATCGATCAAGGCGCACTCCCGTTCTGG</u> |
| RhaBAD-rev | <u>TGGTGCGATATCGGCGTCATCCAGGCGTAGCGTCAGGTTGCCG</u> <u>CCGTTGCCAGGGTTATTGTCTCATGAGCG</u> |

| Primer-Name | Sequenz (je 5'→3') |
|--|--|
| XylAB-for | <u>GACGAACTGGTGTGGGTAAGCGTATGGAAGAGCACTTGCCT</u> <u>TTTGCCGCCTGCTCAAGGCCACTCCCGTTCTGG</u> |
| XylAB-rev | <u>ATTAAGCTGGGACATTGCTCAGGCCGGTTAATTTTCGGGCC</u> <u>AATCCAGACACCAGGGTTATTGTCTCATGAGCG</u> |
| Kontrollprimer für chromosomale Integrationen | |
| CAT-Primer FP | GACGGTGAGCTGGTGATATGGG |
| CAT-Primer RP | CCCATATCACCAGCTCACCGTC |
| Fuc-Control 1 (= CAS143) | CGATTCAGTACCCAACAATCTTC |
| Gal-Control | GTGCTGACCTTGCCGGAGGCGGCC |
| Lac-Control 2 | GAAGGCCACTGGAGTGCCATGTCC |
| LacY-Control | CGCCAGGGTTTTGTGAGTGGTGGTAG |
| LacY-Control 2 | GCAGCCCACCAGCAGGAACGGTAC |
| Mtl-Control 1 | TGCGCGACAGCAAACATAAG |
| Mtl-Control 2 | CCTGCATATCTGACAATCTG |
| Rha-Control 1 | CGCAATTGTGTCGCCGTCGATC |
| Rha-Control 2 | TTCGCTGCACATCGTCTCAGG |
| Xyl-Control | GAGGTGCAAAGGGTGAGTAGAATG |
| Ara-Control | GGCCAGTTAAGCCATTCATG |

2.2.3. DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen

Hydrolysen von DNA mit Endonukleasen wurden gemäß den Angaben des jeweiligen Herstellers (New England Biolabs, Frankfurt a. M. oder Roche Diagnostics, Mannheim) in dem jeweils empfohlenen Puffer durchgeführt. Dazu wurden analytische DNA-Spaltungen mit etwa 200 ng DNA in Reaktionsvolumina von 15-20 µl verwendet, während präparative Spaltungen etwa 2 – 5 µg DNA enthielten und in einem Volumen von 50 – 150 µl durchgeführt wurden. Die Inkubation der Ansätze erfolgte bei der durch den jeweiligen Hersteller empfohlenen Temperatur für 1,5 – 5 h.

2.2.4. Analyse von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese

Zur Größenuntersuchung und Isolierung wurden DNA-Fragmente mittels Elektrophorese in Agarosegelen aufgetrennt. Dazu wurden die Proben nach Vermengung mit DNA-Ladepuffer (6X, Thermo Fisher Scientific, Braunschweig) auf Agarosegele (10 mg ml⁻¹ Agarose und 1 µg ml⁻¹ Ethidiumbromid in 1X TAE-Puffer, Konzentrat s. Tabelle 2.11) aufgetragen und mittels Elektrophorese bei 100 V in 1X TAE-Puffer aufgetrennt. Als Laufkammer wurde hierbei das Mini-Sub Cell GT System mit dem Netzteil PowerPAC 300 (jeweils Bio-Rad, München) eingesetzt. Als Größen- und Intensitätsstandard diente GeneRuler DNA Ladder Mix 100 bp – 10 kb (Thermo Fisher

Scientific, Braunschweig), wovon jeweils 5 µl verwendet wurden. Die Visualisierung der Gele erfolgte durch Fluoreszenzanregung des in die DNA eingelagerten Ethidiumbromids mit einer Wellenlänge von 365 nm und anschließender Dokumentierung mit einem Geldokumentationssystem (Tabelle A.13).

Tabelle 2.11: Zusammensetzung des TAE-Puffer-Konzentrats (50X).

| Komponente | Konzentration |
|-------------------|--------------------------|
| TRIS | 242,2 g l ⁻¹ |
| EDTA | 50 mM |
| Essigsäure | 57,12 ml l ⁻¹ |

2.2.5. DNA-Sequenzierung

Die Verifikation von Nukleinsäure-Sequenzen erfolgte mittels Sequenzanalyse in Clone Manager 7 (Sci-Ed Software, USA) nach der Sequenzierung durch GATC Biotech (Konstanz).

2.2.6. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur präparativen Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Elution erfolgte jedoch mit variablen Volumina von 30 µl bis 60 µl H₂O in Abhängigkeit der erwarteten DNA-Ausbeuten.

2.2.7. Entfernen endständiger Phosphatreste von DNA-Fragmenten

Die intramolekulare Religation von gespaltenen Vektoren wurde verhindert durch das Entfernen endständiger Phosphatreste. Dies erfolgte durch die Behandlung mit Shrimp Alkaline Phosphatase (Roche Diagnostics, Mannheim) für 30 min bei 37 °C in dem dazugehörigen Puffer. Anschließend wurde die Phosphatase nach Herstellerprotokoll durch eine Inkubation für 10 Minuten bei 65 °C inaktiviert, um das Vektorfragment für Ligationen einsetzen zu können.

2.2.8. Entfernen der Einzelstrangüberhänge von DNA-Fragmenten

Um Einzelstrangüberhänge nach der Spaltung von DNA-Fragmenten zu entfernen und somit „blunt-end“ DNA-Fragmente zu erhalten, wurden die DNA-Fragmente nach Herstellerprotokoll in 50 µl Reaktionsvolumen für 30 min mit Mung Bean Nuclease

(New England Biolabs, Frankfurt a. M.) in dem dazugehörigen Mung Bean Nuclease Reaction Buffer behandelt. Um die Nuklease anschließend zu entfernen, wurde eine DNA-Reinigung mit dem in Abschnitt 2.2.6 beschriebenen Kit nach dem im Kit enthaltenen QIAquick PCR Purification Protocol durchgeführt.

2.2.9. Ligation linearer DNA-Fragmente

Ligationen von DNA-Fragmenten wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit T4 DNA Ligase (20 U µl⁻¹, Endkonz., New England Biolabs, Frankfurt a. M.) und dem dazugehörigen Reaktionspuffer nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die T4 DNA Ligase katalysierte dabei die Ausbildung kovalenter Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen der DNA-Fragmente. Die eingesetzten Mengen an DNA-Fragmenten wurden so gewählt, dass das kleinere Fragment im Vergleich zum größeren Fragment in einem 3- bis 5-fachen molaren Überschuss vorlag, wobei die Abschätzung der Ausgangskonzentrationen in Agarosegelen im Vergleich zum DNA-Standard erfolgte (Abschnitt 2.2.4). Als Negativkontrollen der Ligationen wurden Ansätze nur mit Gen bzw. nur mit Vektor bzw. mit sterilem H₂O anstelle des anderen DNA-Fragments durchgeführt.

Ligationen von linearen DNA-Fragmenten mit Einzelstrangüberhängen wurden für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie für die Transformation mittels chemisch kompetenter Zellen eingesetzt wurden. Ligationen von DNA-Fragmenten ohne Einzelstrangüberhänge wurden über Nacht bei 16 °C inkubiert, bevor sie transformiert wurden.

2.2.10. Transformation von DNA mittels chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Transformation von isolierten bzw. ligierten Plasmiden wurden chemisch kompetente *E. coli* mit dem Magnesiumsulfat und Polyethylenglycol enthaltenden TSS-Medium (Tabelle 2.12, Chung *et al.*, 1989) hergestellt. Dazu wurde eine Kultur des erwünschten Stammes in 20 ml LB-Medium 1:100 aus einer Übernachtskultur angeimpft, bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von etwa 0,6 bei 37 °C und 160 rpm inkubiert und durch Zentrifugation (4500 · g, 4 °C, 10 min) geerntet. Das Sediment wurde anschließend in 2 ml des eisgekühlten TSS-Mediums resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert, in 200 µl-Portionen aufgeteilt und entweder direkt für Transformationen eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert.

Zur anschließenden Transformation wurden je 200 µl der Zellsuspension mit etwa 20 ng Plasmid-DNA oder 10 µl eines Ligationsansatzes vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Um die DNA-Aufnahme anzuregen, folgte ein Hitzeschock für 90 sec bei 42 °C, gefolgt von einer Inkubation auf Eis für mind. 2 min. Danach wurden je Ansatz 800 µl LB-Medium zugegeben und die Transformationen in sterilen 1,5 ml Reagenzgefäßen für 1-1,5 h bei 37 °C bzw. 30 °C und 160 rpm inkubiert, um die Ausprägung der auf dem Plasmid eingebrachten Resistenz zu erlauben, bevor die Ansätze mit Volumina von 200 µl und 800 µl auf einer LB-Agarplatte einem Antibiotikum entsprechend der neu eingebrachten Resistenz ausplattiert wurden. Als Negativ-Kontrolle der Transformationen wurde je Charge chemisch-kompetenter Zellen ein Ansatz ohne Plasmid-DNA oder Ligationsansatz, sondern mit dem gleichen Volumen an sterilem H₂O nach dem identischen Vorgehen behandelt.

Tabelle 2.12: Zusammensetzung des TSS-Mediums (Chung *et al.*, 1989).

| Komponente | Eingesetzte Menge |
|---|--------------------------|
| Polyethylenglycol 6000 | 10 g |
| DMSO | 4,7 ml |
| MgCl ₂ -Lösung in H ₂ O [2 M] | 2,5 ml |
| LB-Medium (Tabelle 2.5) | 89 ml |
| Lösung nach Zusammengabe sterilfiltriert und gelagert bei 4 °C. | |

2.2.11. Transformation von DNA mittels Elektroporation

Zur Transformation linearer DNA-Fragmente für chromosomale Integrationen wurde die Elektroporation als Transformationsmethode gewählt (Chassy *et al.*, 1988). Hierzu wurde LB-Medium mit Ampicillin zum Erhalt des Plasmids pKD46 und mit L-Arabinose (1 – 20 mM, Endkonz.) zur Induktion der Expression der Plasmid-kodierten λ-Red-Gene als Kulturmedium genutzt (Datsenko & Wanner, 2000). 20 ml dieses Mediums in einem 250 ml Schüttelkolben wurden 1:50 mit einer Übernachtskultur des gewünschten Stammes angeimpft und bei 30 °C und 90 rpm inkubiert bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von etwa 0,6. Nach der Zellernte durch Zentrifugation (4500 · g, 4 °C, 10 min) wurde das Sediment zweimal in Folge in je 1 ml einer eiskalten, sterilen Glycerin-Lösung (100 g l⁻¹, Endkonz.) resuspendiert, jeweils gefolgt von einer Zentrifugation (5200 · g, RT, 45 sec.). Nach dem anschließenden Resuspendieren in 100 µl eiskalter Glycerin-Lösung (100 g l⁻¹, Endkonz.) wurden jeweils 40 µl der Suspension mit 100 – 200 ng linearer DNA vermischt und anschließend in eine Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand von

1 mm, Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf) überführt. Die Elektroporation erfolgte anschließend im GenePulser II (Bio-Rad, München) bei 1,9 kV, 200 Ω und 25 μ F für 4 - 5,5 msec, gefolgt von unmittelbarer Vermengung des Ansatzes mit 1 ml LB-Medium und Inkubation in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß über Nacht bei 30 °C und 90 rpm. Am Folgetag wurden die Ansätze in 250 μ l-Portionen ausgestrichen auf LB-Agarplatten mit dem Antibiotikum, welches der eingebrachten Resistenz entsprach.

2.2.12. Chromosomale Integration mittels homologer Rekombination

Die chromosomale Integration von Genen zur Konstruktion von Plasmid-freien Stämmen wurde mit dem λ -Red System zur homologen Rekombination durchgeführt (Datsenko & Wanner, 2000). Die Integrationen von Expressionskassetten mit rekombinanten Genen erfolgten dabei jeweils unter Disruption von Zucker-Degradationsgenen, um mittels pH-Indikator Agarplatten eine erste Analyse auf ortsspezifische Integration durchführen zu können (Albermann *et al.*, 2010).

Die Schritte der Stammkonstruktion mittels homologer Rekombination sind in Abbildung 2.1 dargestellt. Dabei wurden die pJF- bzw. pJFK-Plasmide mit dem zu integrierenden Gen (Tabelle 2.2) downstream des Leserahmens, vor der *rrnB*-Terminator-Sequenz mit dem Restriktionsenzym HindIII oder SphI geschnitten und mit einer Resistenzkassette mit Chloramphenicol-Resistenz (FRT-cat-FRT aus pQE31-FRT-cat-FRT) oder Kanamycin-Resistenz (FRT-kan-FRT aus pJF-crtY-FRT-kan-FRT) ligiert, welche zuvor mit dem gleichen Restriktionsenzym ausgeschnitten wurde. Das konstruierte Plasmid diente anschließend als Matrize für die PCR-Amplifikation der zu integrierenden Expressionskassette. Dazu wurden die Primer so gewählt, dass sie eine Homologie von etwa 20 Basen zum Matrizen-Plasmid enthielten und zusätzlich etwa 50 Basen besaßen, welche homolog zum gewünschten Integrationsort waren (Abschnitt 2.2.2). Nach einer Spaltung der im Ansatz enthaltenen, methylierten Matrizen-DNA mit dem Restriktionsenzym DpnI (Abschnitt 2.2.3) und der Extraktion des Amplifikats aus einem Agarosegel (Abschnitt 2.2.6) folgte die Transformation mittels Elektroporation in den Zielstamm, wie in Abschnitt 2.2.11 beschrieben. Um die λ -Red-Gene exprimieren zu können, wurde der Zielstamm zuvor mit dem Plasmid pKD46 (Datsenko & Wanner, 2000) nach der in Abschnitt 2.2.10 beschriebenen Methode transformiert. Aufgrund der temperatursensitiven Replikation von pKD46 erfolgte die Inkubation zur Ausbildung der Ampicillin-Resistenz nach der Transformation, sowie alle

Kultivierungen von pKD46-tragenden Stämmen bei 30 °C anstelle von 37 °C, solange der Erhalt des Plasmids erwünscht war.

Um die Ortsspezifität der Integration zu überprüfen, wurden die Kolonien nach der der Selektion auf die eingebrachte Antibiotikaresistenz durch auf MacConkey pH-Indikator-Agarplatten ausgestrichen. Diese Platten enthielten 10 g l⁻¹ des Zuckers oder Zuckeralkohols, in dessen Degradations-Gen-Lokus die Integration erfolgte. Klone mit ortsspezifischer Integration konnten diese Verbindungen nicht mehr verwerten und bildeten, im Vergleich zu Klonen mit unspezifischer Integration, deutlich weniger organische Säuren. Dies erlaubte die Detektion von Klonen mit unspezifisch integrierten DNA-Fragmenten anhand des Farbumschlags des pH-Indikators. Bestätigt wurde die ortsspezifische Integration anschließend mittels PCR und Gelelektrophorese (Abschnitte 2.2.2 und 2.2.4), gefolgt von Ganzzellsynthesen zur Untersuchung der funktionellen Expression.

Um aufeinanderfolgende Integrationen von Genen in verschiedene Loci zu erlauben, wurde die eingebrachte Resistenzkassette (FRT-cat-FRT oder FRT-kan-FRT) nach der Integration entfernt. Hierzu wurde das Plasmid pKD46 durch Inkubation bei 42 °C über Nacht entfernt und anschließend der konstruierte Stamm mit dem Plasmid pCP20 transformiert, welches ebenfalls über ein Temperatur-abhängig replizierendes Origin of Replication verfügt und ein konstitutiv exprimiertes FLP-Rekombinase-Gen enthält. In Kombination mit den FRT-Sequenzen, welche das Resistenzgen flankierten und als Erkennungssequenzen für die FLP-Rekombinase dienten, konnte die Resistenz somit entfernt werden. Nach einer weiteren Inkubation des Stammes bei 42 °C, um das Plasmid pCP20 zu entfernen, konnte der Resistenz-freie Stamm erneut auf die *in vivo* Aktivität des eingebrachten Gens untersucht und anschließend für weitere Integrationen eingesetzt werden.

Um zwei Expressionskassetten nacheinander integrieren zu können, ohne die Resistenzkassette der ersten Integration entfernen zu müssen, konnte die zweite Integration unter Verwendung der noch nicht in den jeweiligen Stamm integrierten Resistenzkassette erfolgen. Dabei wurde die bereits vorhandene Resistenzkassette im zweiten Integrationsprozess nicht berücksichtigt und lediglich auf die als zweites eingebrachte Resistenz selektioniert, woraufhin später beide Resistenz-Gene in einem

Schritt durch die Transformation von pCP20 entfernt werden konnten, wie mit der Konstruktion von LJ-AY-cat-kan und LJ-AY demonstriert (Tabelle 2.1).

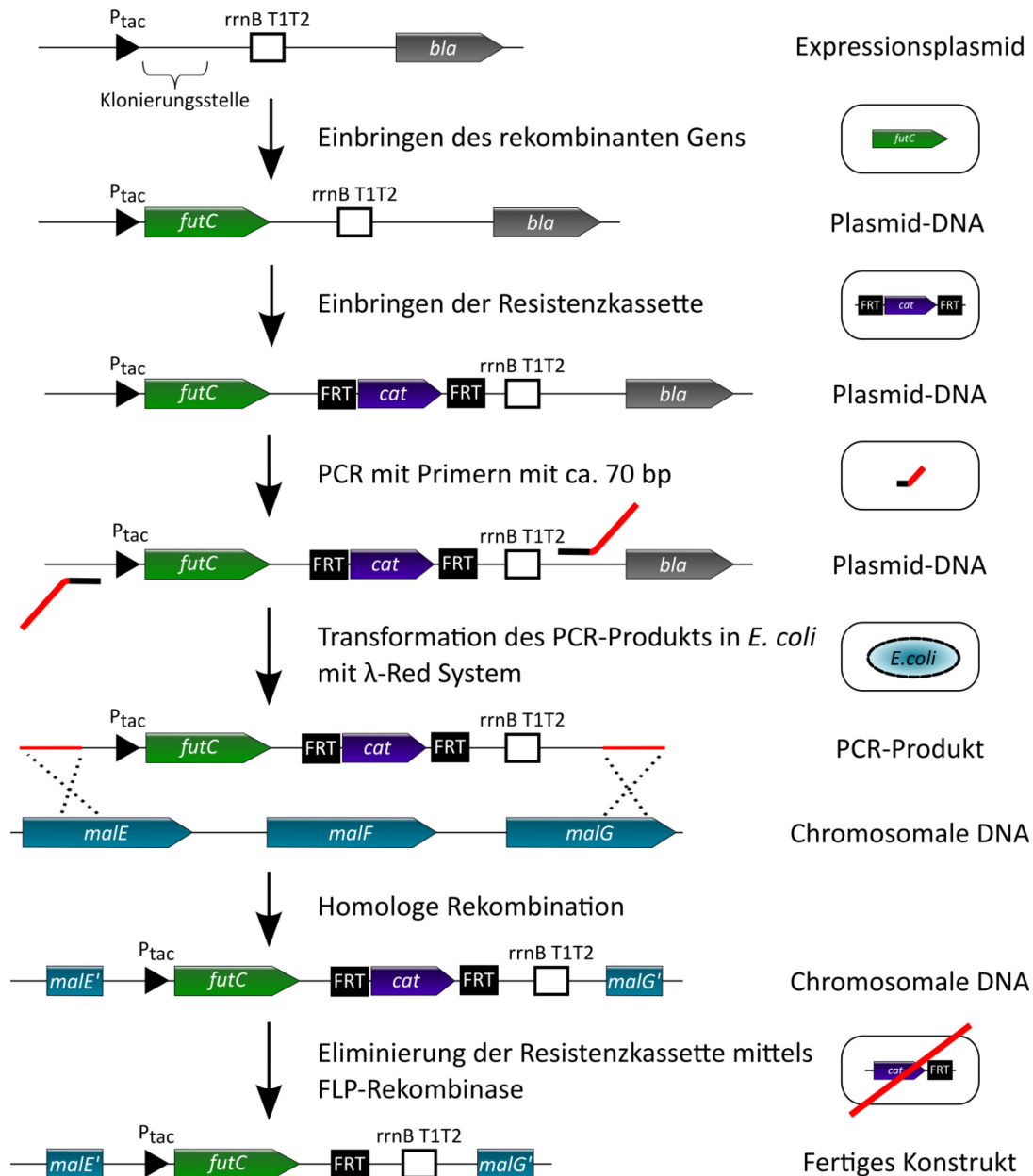


Abbildung 2.1: Prinzip der chromosomalen Integration von Expressionskassetten, modifiziert von Albermann *et al.* (2010). Exemplarische Darstellung der chromosomalen Integration von $futC$ in $malEFG$ durch Klonieren des Gens in den Expressionsvektor (z. B. pJF119 Δ N), gefolgt von der Klonierung der Resistenzkassette FRT-cat-FRT, der Amplifikation der Expressionskassette mit Primern mit Homologie-Bereichen zur Integrationsstelle, der λ -Red vermittelten homologen Rekombination und dem Entfernen der Resistenzkassette (Albermann *et al.*, 2010).

2.3. Proteinanalysen, enzymatische Umsätze und Aktivitätsnachweise

2.3.1. Kultivierung und Zellaufschluss

Zur Expressionsanalyse und Detektion von Enzymaktivitäten in zellfreien Extrakten wurden Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Hierzu wurden je 50 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion auf das Expressionsplasmid versehen, mit einer Übernachtskultur des zu untersuchenden Stammes 1:100 angeimpft und bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. Die Induktion der Expression rekombinanter Gene erfolgte bei einer OD_{600} von 0,6 durch Zugabe von IPTG (0,5 – 1 mM, Endkonz.), woraufhin die Kulturen für weitere vier Stunden bei 37 °C und 160 rpm inkubiert wurden, gefolgt von der Zellernte durch Zentrifugation ($3756 \cdot g$, 4 °C, 10 min). Zum Aufschluss wurden die Zellen in 2 ml eiskaltem Lysepuffer (HEPES-Puffer, 100 mM, pH 7,6) resuspendiert und unter Eiskühlung in 4 Zyklen mit je 20 Ultraschallpulsen mit 200 W und 20 kHz (Bandelin Sonopuls HD 200, BANDELIN electronic, Berlin) aufgeschlossen. Um die Zellsuspension abzukühlen erfolgte zwischen den 4 Zyklen je eine Inkubation auf Eis für 20 sec. Die dabei erhaltenen Suspensionen, fortan als Zelllysate bezeichnet, wurden zentrifugiert ($22410 \cdot g$, 4 °C, 30 min) und anschließend die löslichen Fraktionen (fortan als zellfreie Extrakte bezeichnet), weiterverwendet oder bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert.

2.3.2. Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration von zellfreien Extrakten erfolgte kolorimetrisch nach Bradford (1976). Dazu wurden 900 µl Bradford-Reagenz (Tabelle 2.13) mit 100 µl der Probe vermischt, bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert und anschließend die Extinktion bei 595 nm photometrisch bestimmt mit einem Varian Cary 50 Bio UV/Vis-Spektrophotometer (Agilent Technologies, Waldbronn). Als Leerwert diente dabei ein Ansatz mit H₂O anstelle einer Probe. Als Standard wurde Rinderserumalbumin (BSA, Serva, Heidelberg) in Konzentrationen von 0,005; 0,025; 0,05; 0,1 und 0,2 mg ml⁻¹ eingesetzt und zur Erstellung einer Standardgerade nach gleichem Vorgehen wie mit den Proben behandelt.

Tabelle 2.13: Zusammensetzung des Bradford-Reagenz (Bradford, 1976).

| Komponente | Eingesetzte Menge |
|---------------------------------------|--------------------------|
| Coomassie Brilliant Blau G-250 | 100 mg |
| Ethanol (96 %) | 50 ml |
| H ₃ PO ₄ (85 %) | 100 ml |
| H ₂ O | 850 ml |

Reagenz nach Zusammengabe und Inkubation bei RT und Rühren über Nacht von Präzipitat getrennt durch Filtration. Anschließend vor Licht geschützt bei 4 °C gelagert.

2.3.3. Expressionsanalyse mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Größenauftrennung von Proteinen rekombinant exprimierter Gene wurde SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt nach Laemmli (1970). Dazu wurden die Proteinkonzentrationen der zellfreien Extrakte bestimmt (Abschnitt 2.3.2) und Volumina eingesetzt, welche 15 µg Protein im zellfreien Extrakt entsprachen. Die verwendeten Volumina der Zelllysate wurden den Volumina der zellfreien Extrakte dabei ohne Proteinbestimmung gleichgesetzt, um eine gute Vergleichbarkeit von zellfreiem Extrakt und Zelllysat zu erlauben und somit unlösliche Proteine anhand unterschiedlicher Bandenintensitäten identifizieren zu können. Zur Denaturierung und Vorbereitung der Auftragung wurden die Probenvolumina mit 0,5 Probenvolumen des 3X-Ladepuffers (Tabelle 2.14) vermengt und für 5 min bei 100 °C denaturiert. Die anschließende Elektrophorese erfolgte in 12 %igen SDS-Polyacrylamid-Gelen (Tabelle 2.15) mit 1 mm Schichtdicke in der Mini-PROTEAN Tetra Cell Laufzelle mit dem Netzteil PowerPAC 300 (jeweils Bio-Rad, München) bei 25 mA pro Gel mit einfach konzentriertem Laufpuffer (Konzentrat s. Tabelle 2.14). Zum Größenvergleich wurden je Standard-Spur 5 µl des Proteinstandards BlueStar Prestained Protein Marker (Nippon Genetics, Düren) eingesetzt. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte mittels Proteinfärbung mit Coomassie Brillant Blau. Die Gele wurden zur Färbung 30 min bei Raumtemperatur in der Färbelösung, bestehend aus Isopropanol (40 %_{v/v}, Endkonz.), Essigsäure (10 %_{v/v}, Endkonz.) und Coomassie Brillant Blau R-250 (0,1 %_{w/v}, Endkonz.), unter leichtem Schwenken inkubiert unter leichtem Schwenken und anschließend mehrfach hintereinander für 30 min in 20 %_{v/v} Essigsäure entfärbt, bis der Hintergrund entfernt war.

Tabelle 2.14: Zusammensetzungen des 3X-Ladepuffers und des 10X-Konzentrats des Laufpuffers.

| 3X-Ladepuffer ^[a] | | 10X-Laufpuffer ^[b] | |
|------------------------------|------------------------|--|-------------------------|
| Komponente | Konzentration | Komponente | Konzentration |
| SDS | 30 g l ⁻¹ | Glycin | 144,1 g l ⁻¹ |
| Glycerin | 129 g l ⁻¹ | TRIS | 30,3 g l ⁻¹ |
| 2-Mercaptoethanol | 5 g l ⁻¹ | SDS | 10 g l ⁻¹ |
| Bromphenolblau | 0,75 g l ⁻¹ | ^[b] Puffer wurde in der Elektrophorese in einfacher Konzentration eingesetzt. | |

^[a] Ladepuffer wurde den Probenvolumen mit je 0,5 Volumen zugegeben.

Tabelle 2.15: Zusammensetzung der SDS-Trenn- und Sammelgele.

| Komponente | Trenngel (12 %) | Sammelgel |
|------------------------------------|-----------------------------|-----------|
| | Volumen [ml] ^[a] | |
| Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid-Mix) | 3,4 | 0,65 |
| TRIS-HCl 1,5 M pH 8,8 | 2,5 | - |
| TRIS-HCl 0,5 M pH 6,8 | - | 1,25 |
| H ₂ O | 4 | 3,05 |
| SDS-Lösung (10 % _{w/v}) | 0,1 | 0,05 |
| APS-Lösung (40 % _{w/v}) | 0,025 | 0,0125 |
| TEMED | 0,005 | 0,005 |

^[a] Volumenangaben für etwa 2 Gele.

2.3.4. Analyse von Enzymaktivitäten

Die *in vitro* Analysen von Enzymaktivitäten in diesem Projekt wurden ausschließlich mit bereits zuvor literaturbeschriebenen Glycosyltransferasen durchgeführt und dienen daher nur der qualitativen Detektion von Enzymaktivität zur Sicherstellung der funktionellen Expression rekombinanter Gene. Daher wurden die zu untersuchenden Enzyme nicht in isolierter Form, sondern in Form von zellfreien Extrakten im Vergleich zu Negativkontrollen mit zellfreiem Extrakt ohne das jeweilige Enzym, ohne zellfreies Extrakt und jeweils ohne ein Substrat eingesetzt. Die Analyse der enzymatischen Saccharidsynthese erfolgte dabei jeweils nach Inkubation und Derivatisierung der Ansätze mit Anthranilsäure im Vergleich zu kommerziellen Standards mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion (Abschnitt 2.7.3).

***In vitro* Aktivität von LgtB**

Zur Untersuchung der *in vitro* Aktivität von LgtB wurden die Stämme DH5 α pJFK-lgtB und DH5 α pJF119EH-kan je in 50 ml LB-Medium mit Kanamycin angezogen, die Genexpression induziert, die Zellen aufgeschlossen und die Zellysate zentrifugiert, wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben. Der enzymatische Umsatz wurde ähnlich zu einem bereits zuvor beschriebenen Ansatz (Wakarchuk *et al.*, 1998) durchgeführt in HEPES-Puffer mit dem Cofaktor Mn²⁺ und den in Tabelle 2.16 dargestellten, weiteren Komponenten.

Die Enzymsätze mit LgtB wurden für 8 Stunden bei 37 °C inkubiert und die darin enthaltenen reduzierenden Zucker anschließend mit Anthranilsäure derivatisiert (Abschnitt 2.7.3), bevor die Proben mittels HPLC aufgetrennt und fluorometrisch im Vergleich zu kommerziellen Standards analysiert wurden. Als Negativkontrollen dienten dabei neben den Ansätzen mit zellfreiem Extrakt des jeweiligen Kontrollstammes auch Ansätze ohne UDP-Galactose, ohne Lacto-N-triose II oder mit H₂O anstelle des zellfreien Extrakts.

Tabelle 2.16: Zusammensetzung der *in vitro* Aktivitätstests von LgtB.

| Komponente^[a] | Konzentration [mM] |
|--|---------------------------|
| HEPES-Puffer (pH 7,6) | 100 |
| MnCl ₂ | 10 |
| Lacto-N-triose II | 10 |
| UDP-Galactose | 5 |
| ^[a] Durchgeführt jeweils in 20 μ l Ansatzvolumen mit 10 μ l zellfreiem Extrakt. | |

***In vitro* Aktivität von FucT14**

Die α 1,4-Fucosyltransferase FucT14 wurde bereits in Arbeiten von Rabbani *et al.* (2005, 2009) auf ihre Eigenschaften untersucht. Um die *in vitro* Aktivität des in diesem Projekt verwendeten, Codon-optimierten Gens *fucT14* sicherzustellen, wurden die Stämme *E. coli* JM109 pJFK-fucT14 und JM109 pJF119EH-kan kultiviert und Zellextrakte erzeugt, wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben. Die dabei entstandenen zellfreien Extrakte wurden genutzt für *in vitro* Ansätze mit dem Donor-Substrat GDP-L-Fucose und den Akzeptor-Substraten Lactose, Lacto-N-triose II bzw. Lacto-N-tetraose, wie in Tabelle 2.17

dargestellt. Die Inkubation der Enzymansätze erfolgte bei 37 °C über Nacht (17 h) und die gebildeten Produkte wurden wie zuvor nach der Derivatisierung mit Anthranilsäure per HPLC analysiert (Abschnitt 2.7.3).

Tabelle 2.17: Zusammensetzung der *in vitro* Aktivitätstests von FucT14.

| Komponente^[a] | Konzentration [mM] |
|---|---------------------------|
| HEPES-Puffer (pH 7,6) | 100 |
| MnCl ₂ | 20 |
| Akzeptor-Substrat (Lac / LNT II / LNT) ^[b] | 5 |
| GDP-L-Fucose | 5 |

^[a] Durchgeführt jeweils in 20 µl Ansatzvolumen mit 10 µl zellfreiem Extrakt. Negativkontrollen neben dem Ansatz mit zellfreiem Extrakt des Kontrollstammes wurden ohne Akzeptor-Substrat, ohne Donor-Substrat und mit H₂O anstelle von zellfreiem Extrakt durchgeführt.

^[b] Als Akzeptor-Substrate wurden in verschiedenen Ansätzen Lactose, Lacto-N-triose II und Lacto-N-tetraose untersucht.

2.3.5. Analyse der Lactose-Aufnahme

Um die funktionelle chromosomale Integration und Expression des Lactose-Permease-Gens *lacY* in den Stämmen LJ-AY-cat-kan und LJ-AY2-kan (Tabelle 2.1) sicherzustellen und somit eine aktive Aufnahme des Substrats Lactose zu ermöglichen, wurden neben dem indirekten Nachweis der Lactose-Aufnahme durch LNT II-Bildung auch Lactose-Aufnahme-Untersuchungen mit radioaktiv markierter Lactose und Quantifizierung mittels Szintillationsmessung durchgeführt. Hierzu wurden in zwei Ansätzen verschiedene Methoden eingesetzt, um verschiedene zeitliche Fenster abzudecken und einige systematische Fehler ausschließen zu können. Die durchgeführten Experimente unterschieden sich dabei im Ansatzvolumen, dem Anteil radioaktiv markierter Lactose (Lactose [D-Glucose-1-¹⁴C], 55,7 Ci mol⁻¹, Perkin Elmer, USA) und der Methode zur Beendigung der Lactose-Aufnahme. Sie weisen aber die gleichen Kulturbedingungen der Zellen auf.

So wurden Kulturen mit je 20 ml Minimalmedium mit Glycerin (10 g l⁻¹, Endkonz.; Tabelle 2.7) in Schüttelkolben mit 250 ml Nennvolumen aus Übernachtskulturen angeimpft mit einer OD₆₀₀ von 0,2 und inkubiert bei 30 °C und 90 rpm. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Expression induziert durch Zugabe von IPTG (0,5 mM, Endkonz.) und die Kulturen für weitere 4 h inkubiert, bevor die Zellen durch Zentrifugation (3756 · g, 4 °C, 15 min) geerntet wurden. Nach dem Waschen der Zellen

mit je 5 ml Minimalmedium mit Glycerin (10 g l⁻¹, Endkonz) und erneuter Zentrifugation wie zuvor, wurden die Zellen in dem gleichen Medium so resuspendiert, dass jeweils eine OD₆₀₀ von 10 erreicht wurde. Für die Kultivierung und die Aufnahmeuntersuchungen wurde Minimalmedium mit Glycerin gewählt, um die Aufnahme unter möglichen HMO-Synthesebedingungen zu untersuchen und eine Beeinträchtigung der Aufnahme durch den von Glucose verursachten Induktor-Ausschluss zu vermeiden (Nelson *et al.*, 1983).

In einer ersten Durchführung wurde der Stamm LJ-AY2-cat mit Kontrollstamm LJ-A-cat ohne LacY und dem Stamm JM109, welcher über eine funktionelle Lactose-Permease verfügt, verglichen. Dazu wurden bei Raumtemperatur 25 µl Lactose-Lösung (100 mM, 0,2 µCi µl⁻¹) mit 475 µl Zellsuspension (vortemperiert auf Raumtemperatur) vermischt, um eine Lactose-Konzentration von 4 mM (2 µCi ml⁻¹) zu erhalten. Direkt nach der Zusammengabe und im Abstand von einer Minute wurde den Ansätzen für fünf Minuten jeweils 50 µl entnommen, auf einen Nitrocellulosefilter mit 0,22 µm Porengröße gegeben und mit Unterdruck durch ein 6-fach Filtergerät (H. Hölzel, Wörth/Hörlkofen) filtriert. Direkt im Anschluss wurden die Filter mit Hilfe der gleichen Apparatur mit 10 ml eisgekühltem Minimalmedium mit Glycerin (10 g l⁻¹, Endkonz.) und Lactose (unmarkiert, 40 mM, Endkonz.) gewaschen, um verbleibende extrazelluläre, radioaktiv markierte Lactose zu entfernen und deren Aufnahme durch die Konkurrenz mit der im Minimalmedium enthaltenen, nicht markierten Lactose zu verringern. Die ebenso mit Zellen beladenen Filter wurden anschließend in Szintillationsgefäße mit je 4 ml Ultima Gold MV Szintillations-Cocktail (Perkin Elmer, USA) gegeben und der β-Zerfall der ¹⁴C-markierten Lactose indirekt über die Szintillation, mindestens in analytischer Zweifachbestimmung, ermittelt mit Hilfe des Tri-Carb Liquid Scintillation Counter 1900 TR (Packard Instruments, USA). Die Quantifizierung der Lactose-Aufnahme erfolgte anschließend nach Abzug der Leerwerte aus Ansätzen ohne Zellen im Vergleich zu Standards, welche ebenfalls mit Filter in Szintillationsgefäßen mit je 4 ml Szintillations-Cocktail analysiert wurden.

Die zweite Durchführung erfolgte mit den Stämmen LJ-A-cat, LJ-AY-cat-kan und LJ-AY2-cat. Dabei wurden die Proben des zeitlichen Verlaufs bei Raumtemperatur nicht einem Ansatz entnommen, sondern jeweils in eigenen Gefäßen angesetzt mit 20 µl Lactose-Lösung (20 mM, 5 µCi ml⁻¹, Ausgangskonz.) und 80 µl Zellsuspension. Die Lactose-Aufnahme wurde im Abstand von jeweils 20 sec unterbunden durch die Zugabe

von 900 µl Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 5,5) mit LiCl (0,1 M), die unverzügliche Filtration des Ansatzes wie zuvor und die Applikation von weiteren 9 ml des Puffers auf den Filter (Smirnova & Kaback, 2003). Für eine Probe ohne Inkubationszeit wurde der Puffer bereits vor der Zugabe der Zellen mit der Lactose-Lösung vermischt. Die Analyse der Radioaktivität der Filter erfolgte anschließend nach der für die erste Durchführung beschriebenen Methode.

2.3.6. Spaltung von 2',3-Difucosyllactose mit AfcA zur Erzeugung von 3-Fucosyllactose

Um 3-Fucosyllactose aus dem Tetrasaccharid 2',3-Difucosyllactose (LDFT) herzustellen, wurde die katalytische Aktivität der α 1,2-L-Fucosidase AfcA aus *Bifidobacterium bifidum* JCM1254 genutzt. Dazu wurde das Gen *afcA* durch Christoph Albermann kloniert und diesem Projekt in Form des Vektors pCASF4 unter der Kontrolle eines P_{tac}-Promotors zur Verfügung gestellt. Um die zuvor nicht beschriebene Aktivität von AfcA mit dem Substrat LDFT zu überprüfen, wurde ein zellfreies Extrakt des Stammes DH5 α pCASF4 erstellt, wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben. Davon wurden anschließend jeweils 5 µl in 50 µl Gesamtvolumen verwendet für *in vitro* Analysen in Phosphatpuffer (100 mM, Endkonz., pH 6,5, Katayama *et al.*, 2004). Als Substrat diente neben LDFT (10 mM, Endkonz.) in weiteren Ansätzen das bereits zuvor beschriebene Substrat 2'-FL (10 mM, Endkonz.) als Positivkontrolle, während als Negativkontrolle zellfreies Extrakt des Kontrollstammes ohne *afcA* eingesetzt wurde. Die Analyse der Produkte erfolgte nach einer Inkubation bei 37 °C für 60 min mittels Dünnschichtchromatographie (Abschnitt 2.7.2, Laufmittel 1).

In den zwei darauffolgenden, präparativen Ansätzen erfolgte die Herstellung des zellfreien Extrakts wie zuvor, gefolgt von Umsätzen in dem gleichen Puffer, jedoch in Gesamtvolumina von je 1 ml mit je 200 µl bzw. 300 µl zellfreies Extrakt und 20 mg bzw. 25,7 mg LDFT. Nach Inkubationen von 1 h bzw. 2 h wurden Ansatz 1 bzw. Ansatz 2 weitere 200 µl bzw. 300 µl zellfreies Extrakt zugegeben und die Ansätze erneut für 1 h bzw. 2 h inkubiert. Nach diesen Inkubationen von insgesamt 2 h bzw. 4 h wurden die Umsätze mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Nach Gefriertrocknung erfolgte die Produktisolierung mittels Größenausschlusschromatographie (Abschnitt 2.6.3), gefolgt von der Produktanalyse mittels HPLC und NMR-Spektroskopie.

2.3.7. Spaltung von Lacto-N-neotetraose mit β -Galactosidase zur Erzeugung von Lacto-N-triose II

Um einen qualitativen Standard von LNT II für die Oligosaccharid-Analytik mittels HPLC zu generieren, wurden 141 nmol des kommerziellen LNnT Standards (Isosep, Schweden) mit einer *E. coli* β -Galactosidase (Roche Diagnostics, Mannheim, 1500 U ml⁻¹) gespalten. Dazu wurde LNnT in einem Gesamtvolumen von 25 μ l in TRIS-HCl-Puffer (100 mM, Endkonz., pH 7,5) mit 1,5 U β -Galactosidase über Nacht bei 37 °C inkubiert und der Umsatz anschließend nach Derivatisierung mit Anthranilsäure mittels HPLC analysiert.

2.4. Plasmid- und Stammkonstruktion

2.4.1. Plasmid-Konstruktion

Die Beschreibungen der in diesem Projekt eingesetzten und konstruierten Plasmide sind in Tabelle 2.2 sowie die verwendeten Gene in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Neben den bereits am Institut vorliegenden rekombinanten Genen wurden in diesem Projekt auch die Glycosyltransferase-Gene bzw. Konstrukte *lgtA*, *lgtB*, His6Propep-cat β 4GalT-1 und *fucT14* eingesetzt. Das β 1,3-N-Acetyltransferase-Gen *lgtA* wurde als synthetisches, Codon-optimiertes Gen mit flankierenden Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme NdeI und BamHI bestellt (GeneArt, Life Technologies, Regensburg) und basierte auf der Aminosäure-Sequenz des Gens von *N. meningitidis* (Genbank U25839, Jennings *et al.*, 1995). Das β 1,4-Galactosyltransferase-Gen *lgtB* wurde amplifiziert aus genomischer DNA von *N. meningitidis* DSM10036 (DSMZ, Braunschweig) mit den Primern Nmen-lgtB-for und Nmen-lgtB-rev (Tabelle 2.10), welche ebenfalls Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme NdeI und BamHI enthielten. Das His₆-markierte Propeptid-Fusionskonstrukt mit dem katalytischen Zentrum der humanen β 1,4-Galactosyltransferase 1, welches bereits zuvor in aktiver Form rekombinant in *E. coli* exprimiert werden konnte (Sauerzapfe *et al.*, 2008), wurde diesem Projekt freundlicherweise von Prof. Dr. Lothar Elling (RWTH Aachen) in Form des Plasmids pET16b-His6Propep-cat β 4GalT-1 zur Verfügung gestellt. Zur späteren Verwendung in einem Expressionsvektor unter P_{tac}-Kontrolle, wurde das Expressionskonstrukt mit den Primern GalT-1-for und GalT-1-rev (Tabelle 2.10) aus

diesem Plasmid amplifiziert und dabei flankierende Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme NdeI und BamHI eingefügt. Das für die Fucosylierung von LNT genutzte α 1,4-Fucosyltransferase-Gen *fucT14* basierte auf der Aminosäure-Sequenz eines bereits zuvor beschriebenen *H. pylori*-Gens (Genbank AY450598, Rabbani *et al.*, 2005) und wurde ebenfalls in einer synthetischen, Codon-optimierten Version mit flankierenden Restriktionsschnittstellen für NdeI und BamHI bestellt (GeneArt, Life Technologies, Regensburg).

Die verwendeten Expressionsvektoren mit IPTG-induzierbarem P_{tac}-Promotor basierten auf den bereits zu Projektbeginn am Institut vorhandenen Expressionsplasmiden pJF119EH und pJF-futC (Baumgärtner *et al.*, 2013; Fürste *et al.*, 1986). Um daraus Expressionsplasmide mit Kanamycin-Resistenz zu erzeugen, wurden die Plasmide pJF119EH-kan und pJFK-futC erstellt durch Austausch des β -Lactamase-Gens mit einer Kanamycin-Resistenz aus pF81_{kan} mittels RcaI Restriktionsschnittstellen. Während die Plasmide pJF119EH und pJF119EH-kan als Kontrollplasmide genutzt wurden, dienten die Plasmide pJF-futC und pJFK-futC fortan als Grundlage für den Austausch des unter P_{tac}-Kontrolle exprimierten Gens mittels NdeI- und BamHI-Restriktionsschnittstelle. So konnten nach Entfernung des *futC*-Fragments die NdeI/BamHI hydrolysierten Gene *lgtA*, *lgtB*, *wbgO*, *fucT14*, *futA* und das Expressionskonstrukt His6Propep-cat β 4GalT-1 jeweils in den NdeI/BamHI hydrolysierten Vektor pJFK-futC eingebracht werden, um die Plasmide pJFK-lgtA, pJFK-lgtB, pJFK-wbgO, pJFK-fucT14, pJFK-futA und pJFK-galT-1 zu erzeugen. In den NdeI/BamHI hydrolysierten Vektor pJF-futC wurde nach Entfernen des *futC*-Fragments das Gen *lgtB* eingebracht, um den Vektor pJF-lgtB zu erzeugen.

Die Integration der Kanamycin- und Chloramphenicol-Resistenzkassetten in pJF- bzw. pJFK-Vektoren zur anschließenden Amplifikation der chromosomal zu integrierenden Expressionskassetten erfolgte wie in Abschnitt 2.2.12 beschrieben und resultierte in den Vektoren pJF-fkp-FRT-cat-FRT, pJF-lacY-FRT-kan-FRT, pJFK-fucT14-FRT-cat-FRT, pJFK-lgtA-FRT-cat-FRT, pJFK-lgtB-FRT-cat-FRT und pJFK-wbgO-FRT-cat-FRT.

Die Konstruktion von Plasmiden mit L-Rhamnose induzierbarem Promotor basierte auf dem Vektor pAW229 (Wilms *et al.*, 2001b). Dieses Plasmid wurde mit NdeI und BamHI hydrolysiert und der verbleibende Vektor mit NdeI/BamHI hydrolysierten DNA-Fragmenten mit *fucT14*, *lgtA* bzw. *wbgO* ligiert, um die Plasmide pAW-fucT14, pAW-lgtA bzw. pAW-wbgO zu erzeugen. Um auch über ein korrespondierendes

Kontrollplasmid zu verfügen, wurden die Einzelstrangüberhänge des NdeI/BamHI hydrolysierten Fragments von pAW229, wie in Abschnitt 2.2.8 beschrieben, entfernt und das Fragment anschließend ohne Zugabe eines weiteren DNA-Fragment intramolekular ligiert, wodurch das Plasmid pAW Δ I generiert wurde.

2.4.2. Konstruktion Plasmid-freier Synthesestämme

Die Konstruktion Plasmid-freier Stämme erfolgte nach dem in Abschnitt 2.2.12 beschriebenen Vorgehen. Alle integrierten, rekombinanten Gene standen dabei unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren P_{tac} -Promotors. Die in diesem Projekt konstruierten, Resistenzkassetten-tragenden Stämme sowie die zur Konstruktion eingesetzten Ausgangsstämme, verwendeten Plasmide und Primer sind in Tabelle 2.18 dargestellt. Die dazugehörigen Stämme ohne Resistenzkassetten wurden erstellt wie in Abschnitt 2.2.12 beschrieben.

Tabelle 2.18: In diesem Projekt konstruierte Stämme mit Ausgangsstamm, Matrize für die Amplifikation der Expressionskassette und dabei genutzte Primer.

| Stamm^[a] | Ausgangsstamm^[a] | Matrizen-Plasmid^[b] | Primer^[c] |
|----------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| JM109 gwBC-F3-cat | JM109 gwBC-F2 | pJF-futC-FRT-cat-FRT | GaETKM-for GaETKM-rev |
| LJ-A-cat | LJ110 | pJF-lacY-FRT-kan-FRT | LacZYA-for LacZYA-rev |
| LJ-AY-cat-kan | LJ-A-cat | pJFK-lgtA-FRT-cat-FRT | FucIK-for FucIK-rev |
| LJ-AY2-kan | LJ-AY | pJF-lacY-FRT-kan-FRT | MtlAD-for MtlAD-rev |
| LJ-AYB-cat | LJ-AY | pJFK-lgtB-FRT-cat-FRT | XylAB-for XylAB-rev |
| LJ-AYBF-cat | LJ-AYB | pJF-fkp-FRT-cat-FRT | AraBAD-for AraBAD-rev |
| LJ-AYBFA-cat | LJ-AYBF | pJFK-lgtA-FRT-cat-FRT | RhaBAD-for RhaBAD-rev |
| LJ-AYBFC-cat | LJ-AYBF | pJF-futC-FRT-cat-FRT | RhaBAD-for RhaBAD-rev |
| LJ-AYF-cat | LJ-AY | pJF-fkp-FRT-cat-FRT | AraBAD-for AraBAD-rev |
| LJ-AYFO-cat | LJ-AYF | pJFK-wbgO-FRT-cat-FRT | XylAB-for XylAB-rev |
| LJ-AYFO14-cat | LJ-AYFO | pJFK-fucT14-FRT-cat-FRT | RhaBAD-for RhaBAD-rev |
| LJ-AYFOC-cat | LJ-AYFO | pJF-futC-FRT-cat-FRT | RhaBAD-for RhaBAD-rev |
| LJ-AYO-cat | LJ-AY | pJFK-wbgO-FRT-cat-FRT | XylAB-for XylAB-rev |

^[a] Die Entfernung der Resistenzkassette erfolgte jeweils vor der Integration weiterer Gene nach dem in Abschnitt 2.2.12 beschriebenen Vorgehen. Die Genotypen der Stämme sind dargestellt in Tabelle 2.1.

^[b] Die Beschreibungen der verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2.2 dargestellt.

^[c] Der bei der chromosomalen Integration disruptierte Zuckerdegradations-Lokus ist in den Primer-Namen enthalten. Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 2.10 dargestellt.

2.5. Kultivierung von *E. coli*

2.5.1. Synthese von Fucosyllactosen in Schüttelkolben

Zur Vorbereitung der Synthese von Fucosyllactosen wurden die produzierenden Stämme von LB-Agarplatten auf Agarplatten mit Minimalmedium (Absatz 2.1.3) überimpft und bei 37 °C inkubiert. Nach erfolgreichem Wachstum wurden einzelne Kolonien in je 5 ml Minimalmedium mit 10 g l⁻¹ Glycerin (Absatz 2.1.3) in Kulturröhrchen überführt und über Nacht bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. Mit diesen Vorkulturen wurden am Folgetag Hauptkulturen mit 25 ml bzw. 50 ml Minimalmedium mit 10 g l⁻¹ Glycerin in Schüttelkolben ohne Schikanen mit Nennvolumen von 250 ml bzw. 500 ml so beimpft, dass eine OD₆₀₀ von 0,1 erreicht wurde. Die Kulturen wurden inkubiert bei 37 °C und 160 rpm. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 – 0,6 wurde die Expression der rekombinanten Gene durch Zugabe von IPTG (0,5 mM, Endkonz.) induziert. Zeitgleich mit der Induktion wurde das Substrat Lactose (2 g l⁻¹, Endkonz.) zugegeben. Kulturen mit Stämmen, welche das Gen *fkp* für die Synthese von GDP-Fuc via Salvage Pathway enthielten, wurde zu diesem Zeitpunkt außerdem L-Fucose (2 g l⁻¹, Endkonz.) zugegeben. 24 h bzw. auch 48 h (für 3-FL) nach Induktion erfolgte die Probenahme zur Produktanalyse durch Entnahme von 10 ml, gefolgt von einer Zentrifugation (2876 · g, 4 °C, 15 min). Die Kulturüberstände und Zellsedimente wurden separiert und bei -20 °C gelagert bis zur weiteren Analyse. Alternativ wurden die Zellsedimente direkt in 1 ml H₂O resuspendiert, zum Zellaufschluss für 5 min bei 100 °C inkubiert, zentrifugiert (5869 · g, 4 °C, 25 min) und die resultierenden Überstände bei -20 °C gelagert bis zur weiteren Analyse.

2.5.2. Synthese von LNT II, LNT und LNnT in Schüttelkolben

Zur Synthese von LNT II, LNT und LNnT wurden die Produktionsstämme ebenfalls zuerst von LB-Agarplatten auf Minimalmedium-Agarplatten (Absatz 2.1.3) überimpft und bei 37 °C inkubiert, bis deutliches Wachstum einzelner Kolonien zu erkennen war. Diese Kolonien wurden anschließend genutzt, um je eine Vorkultur mit 10 ml Minimalmedium mit 10 g l⁻¹ Kohlenstoffquelle (Glucose, Glycerin oder Galactose) in 100 ml Schüttelkolben ohne Schikanen zu beimpfen, welche über Nacht bei 30 °C und 90 rpm inkubiert wurden. Das für die Synthese von LNT und LNnT verwendete Minimalmedium unterschied sich dabei von dem für die Synthesen von Fucosyllactosen

verwendeten Minimalmedium, wie in Abschnitt 2.1.3 beschrieben. Die Vorkulturen wurden am Folgetag analog zu dem in Abschnitt 2.5.1 beschriebenen Vorgehen genutzt, um Hauptkulturen mit 25 ml bzw. 50 ml Minimalmedium zu beimpfen. Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei 30 °C und 90 rpm und die Induktion der Genexpression erfolgte durch Zugabe von IPTG (0,5 mM, Endkonz.) bei einer OD₆₀₀ von 0,4 – 0,6 einhergehend mit der Zugabe des Substrats Lactose (2 g l⁻¹, Endkonz.) und ggf. der weiteren Kohlenstoffquelle Galactose (2 g l⁻¹, Endkonz., Absatz 3.3.7). Die Probenahme (2 ml) zur Produktanalyse erfolgte 24 h und ggf. 48 h (Synthese von LNnT) nach Induktion durch Entnahme, Zentrifugation (15300 · g, 2 min), Waschen der Zellsedimente mit eiskalter Saline, erneute Zentrifugation wie zuvor und Lagerung des Kulturüberstands und der Sediment-Fraktion bei -20 °C bis zur weiteren Analyse.

Die präparativen Synthesen von LNT II und LNT zur Produktisolierung und Strukturverifikation erfolgten in Schikanekolben mit 3 l Nennvolumen und 750 ml Minimalmedium mit Glycerin (10 g l⁻¹, für die Synthese von LNT II) bzw. Glucose (10 g l⁻¹, für die Synthese von LNT). Die Medien wurden mit Vorkulturen der Stämme LJ-AY-cat-kan (für die Synthese von LNT II) bzw. LJ-AYO-cat (für die Synthese von LNT) angeimpft auf eine OD₆₀₀ von 0,05 und bei 30 °C und 90 rpm inkubiert. Die Induktion mit IPTG (0,5 mM, Endkonz.) erfolgte zeitgleich mit der Zugabe von Lactose (2 g l⁻¹, Endkonz.) bei OD₆₀₀ von 0,4 – 0,5 und die Zellernte mittels Zentrifugation (2831 · g, 4 °C, 15 min) erfolgte 48 h nach Induktion. LNT II wurde anschließend aus Kulturüberstand isoliert, während LNT aus dem Sediment isoliert wurde, indem die Zellen in H₂O resuspendiert, durch Inkubation bei 100 °C für 20 min aufgeschlossen und die Zellfragmente durch Zentrifugation (6371 · g, 4 °C, 15 min) entfernt wurden.

Die präparative Synthese von LNnT wurde in LB-Medium bei 30 °C und 90 rpm mit dem Stamm LJ-AY pJFK-igtB in Schüttelkolben verschiedener Größen mit einem gesamten Kulturvolumen von 2,8 l durchgeführt. Die Induktion der Kulturen erfolgte zeitgleich mit der Zugabe von Lactose (2 g l⁻¹, Endkonz.) durch IPTG (0,5 mM, Endkonz.) und die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (2831 · g, 4 °C, 15 min) 24 h nach Induktion. Der Zellaufschluss erfolgte durch Resuspendieren der Zellen in H₂O und anschließende Inkubation bei 100 °C für 20 min, gefolgt von einer weiteren Zentrifugation (6371 · g, 4 °C, 15 min).

2.5.3. Synthese fucosylierter Derivate von LNT und LNnT in Schüttelkolben

Kultivierungen zur Synthese fucosylierter Derivate von LNT und LNnT wurden durchgeführt mit Plasmid-freien Stämmen mit allen rekombinanten Genen unter der Kontrolle von P_{tac} -Promotoren oder mit Plasmid-tragenden Stämmen mit Fucosyltransferase-Genen unter L-Rhamnose-induzierbaren Promotoren oder unter IPTG-induzierbaren P_{tac} -Promotoren. Die Kulturbedingungen unterschieden sich dabei lediglich in der Zugabe von L-Rhamnose und im Kulturvolumen, wie im Folgenden beschrieben. Zur Erstellung von Vorkulturen wurden alle Stämme in 10 ml Minimalmedium mit Glucose (10 g l⁻¹, Endkonz.) und Casaminsäuren (1 g l⁻¹, Endkonz.) in 100 ml Schüttelkoben ohne Schikanen bei 30 °C und 90 rpm über Nacht inkubiert. Diese Vorkulturen wurden anschließend genutzt um Hauptkulturen mit 25 ml (Plasmid-tragende Stämme) bzw. 50 ml (Plasmid-freie Stämme) des gleichen Mediums in Schüttelkolben (ohne Schikanen) mit einem Nennvolumen von 250 ml bzw. 500 ml zu beimpfen mit einer OD₆₀₀ von 0,1. Die Inkubation der Hauptkulturen erfolgte ebenfalls bei 30 °C und 90 rpm und die Induktion der Expression von Genen unter P_{tac} -Promotor Kontrolle erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,4 – 0,6 mit IPTG (0,5 mM, Endkonz.) mit gleichzeitiger Zugabe von Lactose (2 g l⁻¹, Endkonz.). Nach weiterer Inkubation für 26 h erfolgte die erste Probenahme mit 2 ml Probenvolumen, welches zentrifugiert (15300 · g, 2 min) und die Überstände bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert wurden. Die Zellsedimente wurden resuspendiert in 1 ml eiskalter Saline, erneut zentrifugiert wie zuvor und nach Entnahme des Überstands ebenfalls gelagert bei -20 °C bis zur Analyse. Direkt im Anschluss an die Probenahme wurde das Kulturvolumen je um 50 % erhöht mit frischem Minimalmedium mit Glucose (10 g l⁻¹, Endkonz.) und dem jeweiligen bereits zuvor eingesetzten Antibiotikum, jedoch ohne Casaminsäuren. Zeitgleich wurde das zweite Substrat L-Fucose (2 g l⁻¹, Endkonz.) zugegeben und die Expression der Fucosyltransferase-Gene induziert durch Zugabe von IPTG (0,5 mM, Endkonz.) bzw. L-Rhamnose (2 g l⁻¹, Endkonz.). Nach einer weiteren Inkubation der Kulturen bei 30 °C und 90 rpm erfolgte die finale Probenahme 65 h nach der ersten Induktion mit IPTG nach dem bereits für die 26 h-Proben beschriebenen Vorgehen.

Zur präparativen Synthese der fucosylierten Derivate von LNT erfolgten Kultivierungen der Stämme LJ-AYFO pCAW55 und LJ-AYFO pAW-fucT14 wie zuvor in diesem Abschnitt beschrieben, jedoch in 3 l Schikanekolben mit einem anfänglichen Kulturvolumen von 500 ml. Die Zellernte erfolgte 65 h nach der ersten Induktion durch Zentrifugation

(6371 · g, 4 °C, 30 min) und der Zellaufschluss erfolgte mittels Inkubation bei 100 °C für 30 min mit starkem Durchmischen der Proben in Intervallen von 3 min, gefolgt von einer weiteren Zentrifugation (30966 · g, 4 °C, 15 min).

2.5.4. Zulaufkultivierung im Rührkesselreaktor

Synthese von 2'-Fucosyllactose

Zur Skalierung der Synthese von 2'-FL erfolgte eine Zulaufkultivierung am Institut für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart mit einem Satz-Volumen von 8,4 l und einem gesamten Zulauf-Volumen von 5,1 l. Dazu wurde der Stamm JM109 gwBC-F2-cat ohne Verwendung von Antibiotika in einem 3 l Schikanekolben mit 400 ml Minimalmedium und Glycerin (10 g l⁻¹, Tabelle 2.7) als Vorkultur über Nacht angezogen bei 37 °C und 90 rpm. Die Zulaufkultivierung wurde durchgeführt ohne Antibiotika in einem *in-situ* sterilisierbaren 30 l Rührkesselreaktor (Bioengineering, Schweiz) mit 8 l Minimalmedium mit Glycerin (26,42 g l⁻¹, Tabelle 2.7, modifiziert von Wilms *et al.*, 2001a) als Satzmedium und einem Inokulations-Volumen von 400 ml, welches zu einer BTM von 0,081 g l⁻¹ zu Prozessbeginn führte. Während der Kultivierung wurde die Temperatur auf 37 °C geregelt und es bestand ein Druck von 500 hPa über dem Umgebungsdruck. Der pH wurde durch Zugabe von Ammoniakwasser (25 %_{v/v}) auf 7,0 reguliert und die Sauerstoffsättigung (pO₂) wurde durch die Begasungsrate und die Rührerdrehzahl bei über 50 % gehalten. Als Antischaum-Mittel wurde Struktol J647 von Schill Seilacher (Hamburg) eingesetzt. Nach Verbrauch des zu Beginn vorgelegten Glycerins, angedeutet durch eine auf den Ausgangswert ansteigende Sauerstoffsättigung, wurde die Expression der rekombinanten Gene durch Zugabe von IPTG (0,5 mM, Endkonz.) induziert und die Zulaufe gestartet. Die Zulaufe bestanden aus einem Glycerin-Zulauf, einem Zulauf mit Ammoniumquelle und einem Lactose-Zulauf, mit den in Tabelle 2.8 dargestellten Zusammensetzungen. Der Glycerin-Zulauf und der Zulauf mit Ammonium- und Phosphatquelle wurden in einem Volumenverhältnis von 81:19 zugegeben, mit einer durch Formel 1 definierte Zulauftrate:

Formel 1:
$$F(t) = \left[\frac{\mu_{set}}{Y_{X/S}} + m \right] \times \frac{c_{X0} \times V_0}{c_{S0}} \times e^{\mu_{set} \times t}$$

Dabei ist F [l h⁻¹] die Zulauftrate, μ_{set} [h⁻¹] die gewünschte Wachstumsrate (in diesem Prozess 0,1 h⁻¹), m [g g⁻¹ h⁻¹] die Koeffizienten des Erhaltungsstoffwechsels (in diesem Prozess 0,04 g g⁻¹ h⁻¹), Y_{X/S} [g g⁻¹] der Biomasseausbeute-Koeffizient je Substrat (aus

Schüttelkolbenversuchen berechnet als $0,29 \text{ g g}^{-1}$), $c_{x0} [\text{g l}^{-1}]$ die Biomassekonzentration zu Beginn der Zulaufphase (in diesem Prozess $7,9 \text{ g l}^{-1}$), $V_0 [\text{l}]$ das Kulturvolumen zu Beginn der Zulaufphase, $c_{s0} [\text{g l}^{-1}]$ die Konzentration der Kohlenstoffquelle im Zulauf ($629,1 \text{ g l}^{-1}$) und $t [\text{h}]$ die Zulaufzeit in Stunden (Wenzel *et al.*, 2011). Die Lactose-Zulauftrate wurde an den Glycerin-Zulauf gekoppelt, der Kopplungsfaktor jedoch manuell variiert, um eine starke Akkumulation oder eine Limitierung von Lactose zu verhindern. Für die ersten 10 h der Zulaufphase betrug die Lactose-Zulauftrate 40,5 % der Rate des Glycerin-Zulaufs und für die darauffolgenden 6,5 h wurde die Lactose-Zulauftrate auf 50,6 % der Glycerin-Zulauftrate eingestellt, bevor sie für die finalen 6 h auf eine fixe, entkoppelte Rate von $9,25 \text{ l h}^{-1}$ eingestellt wurde (Abbildung 3.9). Zu Prozessende wurde die Zugabe von Lactose kurz vor der Zugabe von Glycerin beendet, um die Konzentration verbleibender Lactose zu minimieren. Die Biomassekonzentration während des Prozesses wurde zu vier Zeitpunkten bestimmt und ansonsten aus der OD_{600} mit einem Korrelationsfaktor von Biotrockenmasse zu OD_{600} von $0,366 \text{ g l}^{-1}$ berechnet. Dieser Faktor wurde während der Fermentation zu den 4 Zeitpunkten der BTM Bestimmung mitbestimmt wie in Abschnitt 2.7.1 beschrieben.

Synthese von Lacto-N-tetraose

Die Zulaufkultivierung zur Antibiotika-freien Synthese von Lacto-N-tetraose mit dem Stamm LJ-AYO-cat erfolgte im gleichen System wie die Zulaufkultivierung von 2'-FL (siehe oben), jedoch mit Galactose als Kohlenstoffquelle, mit anderen Zusammensetzungen der Zuläufe und bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Das Satzvolumen von $8,45 \text{ l}$ mit einer initialen BTM von $0,096 \text{ g l}^{-1}$ enthielt 8 l Minimalmedium mit Galactose (25 g l^{-1} , Tabelle 2.7) und 450 ml einer Vorkultur mit dem in Tabelle 2.7 dargestellten Medium, welche über Nacht in einem 3 l Schikanekolben bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ und 90 rpm inkubiert wurde. Der pH-Wert in diesem bei 500 hPa über Umgebungsdruck betriebenen Prozess wurde durch Zugabe von Ammoniakwasser ($25 \text{ }_{\text{v/v}}\%$) auf $7,0$ reguliert. Die Sauerstoffsättigung wurde durch Änderung der Begasungsrate und der Rührerdrehzahl über einem Partialdruck von $40 \text{ }%$ gehalten. Als Antischaum-Mittel wurde auch in diesem Prozess Struktol J647 von Schill Seilacher (Hamburg) eingesetzt. Nach einer Prozesszeit von $12,6 \text{ h}$ bei einer BTM von $2,4 \text{ g l}^{-1}$ wurde während der Satzphase die Genexpression durch Zugabe von IPTG ($0,5 \text{ mM}$, Endkonz.) induziert und zeitgleich ein Lactose-Puls ($16,9 \text{ g Lactose}$) zugegeben, um die Produktbildung zu starten. Nachdem die im Satzmedium enthaltene Galactose verbraucht war, wurden der Galactose-Zulauf, der Zulauf mit Ammonium- und

Phosphatquelle und der Lactose-Zulauf mit den in Tabelle 2.8 dargestellten Zusammensetzungen gestartet. Der Galactose-Zulauf und der Zulauf mit Ammoniumquelle wurden in einem Volumenverhältnis von 81:19 mit einer nach Formel 1 (S. 87) berechneten Zulauftrate zugegeben. Dabei wurde μ_{set} festgelegt auf $0,1 \text{ h}^{-1}$, m angenommen als $0,04 \text{ g}^{-1} \text{ g h}^{-1}$, $Y_{X/S}$ ermittelt als $0,36 \text{ g g}^{-1}$, c_{X0} bestimmt als $12,0 \text{ g l}^{-1}$, V_0 festgelegt auf $8,25 \text{ l}$ und c_{S0} angegeben mit $514,76 \text{ g l}^{-1}$. Die Lactose-Zulauftrate wurde während der Zulaufphase manuell gesteuert (Abbildung 3.21) und ergab eine gesamt zugelaufene Lactose-Menge von $200,4 \text{ g}$. Die Biomassekonzentration wurde bis zu einer OD_{600} von 40 über die Berechnung aus der OD_{600} mit einem während des Prozesses bestimmten Korrelationsfaktor von $0,47 \text{ g l}^{-1}$ bestimmt. Bei $OD_{600} \geq 40$ erfolgte die Bestimmung der Biotrockenmasse direkt, wie in Abschnitt 2.7.1 beschrieben.

2.5.5. Dauerkultur zur Analyse der genetischen Stabilität eingebrachter Gene

Um die Stabilität der chromosomal integrierten Gene mit dem Stamm *E. coli* JM109 gwBC-F2-cat zu demonstrieren und somit die Produktionsstabilität für größere Kulturvolumina sicherzustellen, wurde die zuvor beobachtete Abhängigkeit der Produktbildung von den eingebrachten Genen genutzt. So konnte in vorherigen Schüttelkolbenkulturen beobachtet werden, dass das Fehlen einer Kopie des Fucosyltransferase-Gens oder eines Gens des *de novo* Synthesewegs von GDP-Fuc zu einer signifikanten Abnahme oder zur gänzlichen Unterbrechung der Synthese von 2'-FL führt. Mit einem Vergleich der Produktbildung einer bereits über 100 Generationen kultivierten Kultur mit einer frisch beimpften Kultur sollte so der Nachweis der funktionellen Expression der rekombinanten Gene erbracht werden. Dazu wurde der Stamm JM109 gwBC-F2-cat in 10 ml des ebenfalls für die Synthese von 2'-FL verwendeten Minimalmediums mit Glycerin (10 g l^{-1} , Tabelle 2.6) bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. Nach jeweils 24 h Inkubation erfolgte die Zelldichtebestimmung anhand der OD_{600} , gefolgt von der Überimpfung der Kultur in einen neuen Schüttelkolben mit frischem Medium. Diese mit einer OD_{600} von $0,01$ beimpfte Kultur wurde erneut für 24 h inkubiert und anschließend als Basis für die Beimpfung der folgenden Kultur eingesetzt. Dieses Vorgehen wurde fortgeführt bis eine anhand der optischen Dichte bestimmte Generationszahl von über 100 Generationen erreicht wurde. Anschließend wurde die Synthese von 2'-FL im Vergleich zu einer aus Gefrierkultur stammenden Kultur in Schüttelkolben untersucht, wie in Abschnitt 2.5.1 beschrieben.

2.6. Isolierung von Oligosacchariden

2.6.1. Probenvorbereitung

Die Produktisolierung aus Kulturen oder enzymatischen Umsetzungen erfolgte über Adsorptionschromatographie und Größenausschlusschromatographie. Dazu wurden die Kulturüberstände ohne vorherige Modifikationen eingesetzt, während Enzymsätze für 3 min bei 100 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert (20800 · g, RT, 5 min) wurden, um die enthaltenen Proteine zu entfernen. Bei der Verwendung der Sedimentfraktion von Kulturen wurde diese in H₂O resuspendiert und für 15 – 30 min bei 100 °C inkubiert mit regelmäßigem starkem Durchmischen zum Aufschluss der Zellen, gefolgt von einer Zentrifugation (30966 · g, 4 °C, 15 min), um Zelltrümmer und denaturierte Proteine zu entfernen.

2.6.2. Aktivkohle/Celite-Chromatographie

Zur Produktisolierung mittels Aktivkohle/Celite-Chromatographie (Whistler & Durso, 1950) wurden je nach Probenvolumen und enthaltener Produktmenge entweder die Leersäule XK26 (2,6 cm · 30 cm, Amersham Biosciences, Schweden) oder die Leersäule K 50/60 (5,0 cm · 60 cm, Pharmacia Fine Chemicals, Schweden) verwendet und vor jeder Isolierung neu mit einer Mischung aus Aktivkohle Pulver und Celite 545 in gleichen Gewichtsverhältnissen befüllt. Die chromatographischen Läufe erfolgten dabei an einem FPLC System (Pharmacia Biotech, Schweden) mit LCC-501 Plus Controller, LKB Pump P-500 und FRAC-500 Fraktionssammler mit Flussgeschwindigkeiten von 1,5 ml min⁻¹ (Säule XK26) bzw. 5,5 ml min⁻¹ (Säule K50/60) bei Raumtemperatur. Vor der Applikation der Proben wurden die Säulen mit mind. 1 Säulenvolumen (cv = column volume) H₂O gewaschen, gefolgt von der Auftragung der Probe, einem Waschschrift mit mind. 1,5 cv H₂O und einem linearen Gradienten von 100 % H₂O / 0 % Ethanol zu 0 % H₂O / 100 % Ethanol mit 2 – 4 cv. Die während dieses Gradienten eluierten Oligosaccharide wurden in Fraktionsgrößen von 4 – 12 ml aufgefangen. Die gesammelten Fraktionen wurden auf das Vorkommen von reduzierenden Sacchariden mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC untersucht, um die Fraktionen mit gleichen Oligosacchariden zu vereinigen. Vereinigte Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer VV2000 mit WB2000 Wasserbad (Heidolph Instruments, Schwabach), RK20 Thermostat (Lauda, Lauda-Königshofen) und M2-C2 Vakuumpumpe (Vacuubrand, Wertheim) bei

45 °C und 250 – 100 mbar eingeengt, bei unter 5 mbar gefriergetrocknet mit der Alpha I-5 Gefriertrocknungsanlage (Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode am Harz) mit DUO 5 M Pumpe (Pfeiffer Vacuum, Aßlar) und für die Produktanalytik oder weitere Produktreinigung mittels Größenausschlusschromatographie eingesetzt.

2.6.3. Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie wurde durchgeführt am ÄKTApurifier (Amersham Bioscience/GE Healthcare, München) mit P-900 Pumpe, Frac-950 Fraktionssammler, pH/C-900 Analytik-Einheit, UV-900 Spektrophotometer und Unicorn 5.11 Software. Die dabei eingesetzten Säulen XK26 (2,6 cm · 100 cm, Amersham Biosciences, Schweden) bzw. XK50 (50 cm · 100 cm, Amersham Biosciences, Schweden; für die Isolierung von 2'-Fucosyllactose) wurden mit Biogel P2 oder Biogel P4 (Bio-Rad, München) befüllt und ausschließlich mit H₂O bei Raumtemperatur betrieben mit Flussgeschwindigkeiten von 0,4 ml min⁻¹ (XK26) bzw. 1,4 ml min⁻¹ (XK50). Das eingesetzte Probenvolumen betrug 2,5 – 7 ml und wurde manuell appliziert, während das Volumen der aufgefangenen Fraktionen 2 – 7 ml betrug. Wie bereits in Abschnitt 2.6.2 erwähnt, erfolgte die Analyse der Fraktionen ebenfalls mittels Dünnschichtchromatographie bzw. HPLC, gefolgt von der Vereinigung von Fraktionen und der Einengung mit Rotationsverdampfer und Gefriertrocknungsanlage.

2.6.4. Reduktion der Endotoxin-Belastung mittels C18-SPE

Zur Senkung der Endotoxin-Belastung der isolierten 2'-Fucosyllactose wurden 35,75 mg der gefriergetrockneten Verbindung in 1,5 ml H₂O gelöst und über eine C18-Festphasenextraktionssäule (SPE-Säule; Supelco DSC-18 1 mL, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gereinigt. Dazu wurde die SPE-Säule zunächst mit 2 ml Methanol aktiviert, mit 4 ml H₂O gewaschen und anschließend die 2'-FL-Lösung appliziert. Der Durchlauf dieser Applikation wurde anschließend gefriergetrocknet und am Institut für Ernährungsmedizin der Universität Hohenheim durch Verena Heidler mittels EndoLISA Endotoxin Test (Hyglos, Bernried am Starnberger See) untersucht.

2.7. Analytische Methoden

2.7.1. Bestimmung der Zelldichte in Kulturen

Die Biomassekonzentration von Flüssigkulturen wurde bestimmt über die optische Dichte oder die Biotrockenmassekonzentration (BTM). Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte jeweils in Duplikaten an einem Varian Cary 50 Bio UV/Vis-Spektrophotometer (Agilent Technologies, Waldbronn) bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}). Als Leerwert wurde die Extinktion des für die Kulturen eingesetzten Mediums ohne Zellen definiert und bei Überschreiten einer optischen Dichte von 0,5 wurden die Proben im gleichen Medium verdünnt, um einen Extinktionswert zwischen 0,1 und 0,5 zu erhalten. Eine Ausnahme zu diesem Vorgehen stellten Kultivierungen im Rührkesselreaktor dar. Hierbei wurde der Extinktionsunterschied des Minimalmediums zu Saline bei einer Wellenlänge von 600 nm vernachlässigt, die Proben in Saline verdünnt und die Extinktion von Saline auch als Leerwert definiert.

Die Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration von Flüssigkulturen erfolgte jeweils mindestens in Duplikaten von 10 ml Kultur durch Zentrifugation ($5869 \cdot g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 20 min), Entfernen des Überstands und Trocknung der Zellsedimente bei $120 \text{ }^\circ\text{C}$ in Reagenzgläsern bis zur Gewichtskonstanz. Die Differenz des Reagenzglases mit getrockneter Biomasse im Vergleich zum selben Reagenzglas vor der Kulturzugabe abzüglich des Leerwertes bildete die Grundlage für die Berechnung. Als Leerwert wurden Reagenzgläser mit dem verwendeten Medium gespült und anschließend analog zu den Biotrockenmasseproben behandelt. Für die Berechnung von Biotrockenmassen anhand der OD_{600} wurden Korrelationen von BTM zu OD_{600} erstellt unter der Annahme, dass sich diese Korrelation über den Verlauf der Kultur nicht ändert. Dazu wurden mindestens in biologischen Duplikaten oder zu 3 verschiedenen Kulturzeiten sowohl BTM als auch OD_{600} zeitgleich bestimmt.

2.7.2. Oligosaccharid-Analytik mittels Dünnschichtchromatographie

Die qualitative Substrat- und Produktanalyse von Kulturproben und *in vitro* Ansätzen mittels Dünnschichtchromatographie erfolgte mit DC Kieselgel 60 F₂₅₄ Alufolien (Merck Millipore, Darmstadt). Die Entwicklung erfolgte anschließend entweder in Laufmittel 1 (Chloroform:Essigsäure:H₂O im Verhältnis 6:7:1, Albermann *et al.*, 2001) oder in

Laufmittel 2 (n-Butanol:Essigsäure:H₂O mit dem Verhältnis 4:8:1), bis die Laufmittelfront die Plattenhöhe von 10 cm erreichte. Die dabei beobachteten Retentionsfaktoren verschiedener Oligosaccharide sind im Anhang in Tabelle A.15 dargestellt. Um die Auftrennung größerer Oligosaccharide zu verbessern, wurden die DC-Platten mehrfach entwickelt und zwischen den Entwicklungen bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Detektion der Saccharide erfolgte nach der Trocknung der Platten durch Färbung. Dazu wurden die Platten in die Färbelösung (2,5 %_{w/v} Molybdätophosphorsäure, 1 %_{w/v} Cer-IV-Sulfat, 6 %_{v/v} Essigsäure in H₂O, Albermann *et al.*, 2001) getaucht und anschließend mit einem Heißluft-Gebläse (200 °C, Bosch) gleichmäßig erhitzt bis zur gewünschten Farbintensität.

2.7.3. Oligosaccharid-Analytik mittels HPLC

Die Oligosaccharid-Analytik mittels HPLC erfolgte jeweils nach Derivatisierung der Proben und Standards mit dem Fluorophor Anthranilsäure (2-Aminobenzoessäure) mittels reversed-phase Chromatographie und Fluoreszenz-Detektion. Dabei wurden sowohl für die Derivatisierung als auch für die chromatographische Trennung der Oligosaccharide zwei verschiedene Methoden für die Synthese von Fucosyllactosen bzw. für die Synthesen aller anderen Oligosaccharide verwendet. Die Derivatisierung der Oligosaccharide erfolgte mittels reduktiver Aminierung unter Verwendung des Fluorophors Anthranilsäure (Anumula, 1994). Während Kulturüberstände und Standards direkt für die Derivatisierung eingesetzt werden konnten, wurden *in vitro* Ansätze für 3 min bei 100 °C inkubiert und zentrifugiert (20800 · g, RT, 5 min) und die Überstände weiterverwendet. Zellsedimente wurden in einem definierten Volumen (5 bis 10 % des ursprünglichen Probenvolumens) resuspendiert, für 5 min bei 100 °C inkubiert und ebenfalls zentrifugiert (20800 · g, RT, 5 min), um die resultierenden Überstände für die Derivatisierung zu verwenden.

Zu Beginn des Projekts und für die Arbeiten zur Synthese von Fucosyllactosen (Abschnitte 3.1 und 3.2) erfolgte die Derivatisierung nach Anumula (1994). Dazu wurden Proben und Standards mit Natriumacetat (6 g l⁻¹, Endkonz.) versetzt, mit dem gleichen Volumen Anthranilsäure-Lösung (Tabelle 2.19) vermengt, für 1 h bei 80 °C inkubiert, mit 4 Volumen HPLC-Laufmittel A(1) vermengt, zentrifugiert (20800 · g, RT, 5 min) und bis zur Analyse lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

Tabelle 2.19: Zusammensetzung der Anthranilsäure-Lösung mit Natriumcyanoborhydrid (Anumula, 1994).

| Komponente | Konzentration [g l ⁻¹] ^[a] |
|-----------------------|---|
| Anthranilsäure | 30 |
| Natriumcyanoborhydrid | 20 |

^[a] Gelöst in Methanol-Acetat-Borsäure-Lösung, bestehend aus Natriumacetat (24 g l⁻¹, Endkonz.) und Borsäure (20 g l⁻¹, Endkonz.) gelöst in Methanol.

Die Analyse erfolgte mit einer Luna C18 (2) reversed-phase HPLC-Säule (250 mm · 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex, Aschaffenburg) auf einer Dionex HPLC-Anlage (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig) mit Chromeleon 6.80 Software, Gina 50 Autosampler, P580 Pumpe und RF2000 Fluoreszenzdetektor. Die Auftrennung der Proben erfolgte mittels eines linearen Gradienten mit 97,5 % Laufmittel A(1)/2,5 % Laufmittel B zu Startzeitpunkt, 80,5 % Laufmittel A(1)/19,5 % Laufmittel B nach 25 min, gefolgt von 4 min mit konstantem Mischverhältnis von 80,5 % Laufmittel A(1)/19,5 % Laufmittel B und einer Äquilibrierung unter Startbedingungen für 5 min (Flussgeschwindigkeit von 5 ml min⁻¹). Die Zusammensetzung von Laufmittel A(1) ist in Tabelle 2.20 dargestellt, während Acetonitril als Laufmittel B eingesetzt wurde. Die Fluoreszenz wurde angeregt bei $\lambda_{ex} = 230$ nm und detektiert bei $\lambda_{em} = 425$ nm.

Um auf die Verwendung von toxischem Natriumcyanoborhydrid verzichten zu können, wurde eine veränderte Derivatisierungsmethode für die Synthesen aller Oligosaccharide neben Fucosyllactosen eingesetzt. Hierbei wurde als Reduktionsmittel 2-Picolinboran (2-Methylpyridinboran) eingesetzt und die Proben und Standards nach Ruhaak *et al.* (2010) derivatisiert. Dazu wurden die Proben oder Standards mit 0,5 Probenvolumen Anthranilsäure-Lösung (350 mM, Endkonz., gelöst in 80 %_{v/v} DMSO und 20 %_{v/v} Essigsäure) und 0,5 Probenvolumen 2-Picolinboran-Lösung (1 M, Endkonz., gelöst in DMSO) vermischt und für 2 h bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben 1:5 in Laufmittel A(2) (Tabelle 2.20) verdünnt, zentrifugiert (20800 · g, RT, 5 min) und die Überstände bei 4 °C gelagert bis zur Analyse.

Die nach dieser Methode derivatisierten Proben wurden chromatographisch (Luna C18 (2) reversed-phase HPLC-Säule) aufgetrennt mit einem isokratischen Lauf für 20 min mit 100 % Laufmittel A(2)/0 % Laufmittel B, gefolgt von einem linearen Gradienten über 4 min zu 0 % Laufmittel A(2)/100 % Laufmittel B, gefolgt von einem

linearen Gradienten über 1 min zu 100 % Laufmittel A(2)/0 % Laufmittel B und einer Äquilibration bei diesen Bedingungen für 5 min. Dabei konnten mit dieser Methode im Gegensatz zu der zuvor beschriebenen auch eine Auftrennung von Lactose und Lacto-N-triose II erreicht werden.

Tabelle 2.20: Zusammensetzung der Laufmittel A(1) bzw. A(2), verwendet für die Probenanalyse der Synthesen von Fucosyllactosen bzw. anderen reduzierenden Oligosacchariden.

| Komponente | Laufmittel A(1) ^[a] | Laufmittel A(2) ^[a] |
|----------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| | Konzentration [% _{v/v}] | |
| Tetrahydrofuran | 1,00 | 0,89 |
| Phosphorsäure (85 %) | 0,43 | 0,38 |
| 1-Butylamin | 0,30 | 0,27 |
| Acetonitril | - | 10,71 |

^[a] Als Laufmittel B wurde jeweils 100 % Acetonitril verwendet.

Die Quantifizierung von Oligosacchariden erfolgte im Vergleich zu Standardreihen mit jeweils mindestens 4 Konzentrationen der kommerziellen Standards von Lactose, 2'-FL, 3-FL, LDFT, LNT, LNnT, LNFP I, LNFP III und LNDFH I (Reinheit jeweils mind. 95 %). Um neben diesen Substanzen jedoch auch LNT II, fucosyliertes LNT II, LNDFHep und weitere reduzierende Zucker quantifizieren zu können, wurden die Signalstärken dieser Zucker mit den Signalen von Lactose-Standards verglichen. Unter der Annahme gleichen Fluoreszenz-Verhaltens der gebundenen Anthranilyl-Gruppe, unabhängig von der Oligosaccharid-Länge, ist dies legitim, da die verwendete Derivatisierung unabhängig von der Oligosaccharid-Länge einmal je reduzierendem Zucker erfolgt und die Umsätze in der Derivatisierung dank des mindestens achtfachen molaren Überschusses an Anthranilsäure und Reduktionsmittel dabei nahezu 100 % erreichen (Ruhaak *et al.*, 2010). Diese Annahme wurde im Vergleich der Standardreihen von Lactose und Lacto-N-tetraose bestätigt, welche Abweichungen in den Konzentrations-zu-Signal-Verhältnissen von weniger als 2 % zeigten.

2.7.4. Analytik Nukleotid-aktivierter Zucker mittels HPLC

GDP-L-Fucose

Zur Analyse intrazellulärer GDP-L-Fucose wurden die zu untersuchenden *E. coli* Stämme in Schüttelkolben mit Minimalmedium und 10 g l⁻¹ Glycerin angezogen (37 °C, 160 rpm).

Bei einer OD_{600} von 0,4 erfolgte die Induktion der Genexpression durch Zugabe von IPTG (0,5 mM, Endkonz.) und bei Kulturen von Stämmen mit Salvage Pathway für die GDP-Fuc-Synthese erfolgte zeitgleich die Zugabe von L-Fucose (2 g l⁻¹, Endkonz.). Nach weiterer Inkubation bei 37 °C und 160 rpm erfolgte die Probenahme 4 h bzw. 12 h nach Induktion durch Zentrifugation von 25 ml Kultur (2876 · g, 4 °C, 15 min), gefolgt von einem Waschschrift mit 5 ml eiskaltem H₂O und erneuter Zentrifugation wie zuvor. Anschließend wurden die Zellen in je 1 ml H₂O resuspendiert, zum Zellaufschluss für 2 min bei 100 °C inkubiert, die Proben erneut zentrifugiert (22410 · g, 4 °C, 30 min) und die resultierenden Überstände auf der in Abschnitt 2.7.3 beschriebenen HPLC-Anlage mit einem UVD340 Diodenarray-Detektor (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig) mittels UV-Spektrophotometrie analysiert. Die Auftrennung erfolgte dabei mit einer Gemini-NX C18 reversed-phase Säule (250 · 4 mm, 5 µm, Phenomenex, Aschaffenburg) mit einem Kaliumphosphat-Puffer (30 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 6,0 mit 5 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat und 2 %_{v/v} Acetonitril) als Laufmittel A und Acetonitril als Laufmittel B. Das Programm zur Auftrennung mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml min⁻¹ bestand aus einem linearen Gradienten von 100 % Laufmittel A zu 98 % Laufmittel A für die ersten 10 min, gefolgt von einem linearen Gradienten zu 60 % A in den darauffolgenden 20 min und einer Äquilibration der Säule mit 100 % Laufmittel A für 5 min. Die Identifikation und Quantifizierung von GDP-Fuc und GDP erfolgte im Vergleich zu kommerziellen Standards anhand der Retention, der UV/Vis-Spektren und der Signalflächen bei einer Wellenlänge von 254 nm.

UDP-D-Galactose, UDP-D-Glucose und UDP-N-Acetyl-D-Glucosamin

Zur Quantifizierung intrazellulärer UDP-Zucker (UDP-D-galactose, UDP-D-glucose und UDP-N-acetyl-D-glucosamin) wurde der *E. coli* Stamm LJ-AYO-cat kultiviert bei 30 °C und 90 rpm in je 100 ml Minimalmedien mit 10 g l⁻¹ Glucose, 10 g l⁻¹ Glycerin bzw. 10 g l⁻¹ Galactose. Die Expression wurde induziert durch Zugabe von IPTG (0,5 mM, Endkonz.) bei $OD_{600} = 0,4 - 0,6$, gefolgt von einer weiteren Inkubation bei 30 °C und 90 rpm für 12 h, bevor Proben mit je 25 ml Volumen entnommen und zentrifugiert (2876 · g, 4 °C, 15 min) wurden. Die Zellsedimente dieser Proben wurden resuspendiert in je 1 ml eiskaltem Quenching Lösung (Acetonitril:Methanol:H₂O im Verhältnis 4:4:2 mit 0,1 M Essigsäure (Endkonz.), Bennett *et al.*, 2009) und während einer 10-minütigen Inkubation auf Eis alle 3 min stark durchmischt, gefolgt von der Neutralisation der Ansätze mit Ammoniakwasser (1M). Nach einer Zentrifugation der Proben (22410 · g,

4 °C, 10 min) wurden die Überstände mittels Vakuumpkonzentrator getrocknet (Speedvac CON-1000, Fröbel, Lindau) und in H₂O in einem Volumen von 5 % des Extraktionsvolumens gelöst, um sie für die Analyse mittels HPLC zu verwenden. Die Analyse erfolgte auf dem bereits in diesem Abschnitt für die Analyse von GDP-Fuc beschriebenen System, jedoch mit einer Luna C18 (2) reversed-phase Säule (250 mm · 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex, Aschaffenburg). Die von einer Methode nach Payne & Ames (1982) modifizierte Trennung wurde mit dem gleichen Laufmittel A wie die Analyse von GDP-Fuc durchgeführt. Als Laufmittel B wurde jedoch Methanol genutzt. Dabei erfolgte ein linearer Gradient von 100 % Laufmittel A zu 80 % Laufmittel A/20 % Laufmittel B über die ersten 30 min, gefolgt von einem linearen Gradienten zu 100 % Laufmittel A über 0,5 min und einer Äquilibration der Säule mit 100 % Laufmittel A für 4,5 min. Die Identifikation und Quantifizierung von UDP-Gal, UDP-Glc und UDP-GlcNAc erfolgte anhand der Retention, der UV/Vis-Spektren und der Signalflächen bei 262 nm im Vergleich zu kommerziellen Standards.

2.7.5. Konzentrationsbestimmung von Acetat und Glycerin

Die Quantifizierung von Acetat im Kulturüberstand erfolgte nach Inkubation der Überstände bei 100 °C für 5 min und Zentrifugation (20800 · g, RT, 15 min) mit einer Agilent HPLC-Anlage der Serie 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn) mit Chemstation for LC 3D Systems Software, Säulenofen, QuatPump, RI-71 Brechungsindex-Detektor (Showa Denko, Japan) und Organic Acid Säule (300 mm · 8 mm, CS-Chromatographie, Germany). Die Anlage wurde dazu mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml min⁻¹ mit 5 mM Schwefelsäure als mobile Phase betrieben und der relative Brechungsindex der Proben in Duplikaten im Vergleich zu Natriumacetat-Standard mit 5 verschiedenen Konzentrationen bestimmt.

Zur Quantifizierung von Glycerin im Kulturüberstand wurde ein enzymatisches Glycerin Test-Kit (Enzym. BioAnalysis Glycerin, R-Biopharm, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers eingesetzt und die Absorption mittels Spektrophotometer (Varian Cary 50 Bio UV/Vis, Agilent Technologies, Waldbronn) bestimmt.

2.7.6. Strukturverifikation der synthetisierten Oligosaccharide

Neben dem Vergleich der synthetisierten Oligosaccharide mit kommerziellen Standards mittels HPLC und Dünnschichtchromatographie erfolgte die Strukturverifikation auch

mittels LC-MS, MS und NMR-Spektroskopie in Zusammenarbeit mit anderen Instituten, wie im Folgenden beschrieben.

LC-MS

Zur Analyse von Nebenprodukten bei der Herstellung von LNT im Zulaufverfahren (Abschnitt 3.3.8) wurden die Proben mit Anthranilsäure derivatisiert (Abschnitt 2.7.3) und mithilfe von Dr. Bernd Nebel am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart an der Agilent 1260 LC-MS HPLC-Anlage (Agilent Technologies, Waldbronn) mit LC/MSD Chemstation Software und der bereits in Abschnitt 2.7.3 verwendeten Luna C18 (2) reversed-phase Säule untersucht. Dabei erfolgten die Läufe mit $0,7 \text{ ml min}^{-1}$, beginnend mit einem isokratischen Lauf mit 100 % Laufmittel A (10,7 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure) für 30 min, gefolgt von einem linearen Gradienten zu 100 % Laufmittel B (Acetonitril) für 4 min, einem 1-minütigen linearen Gradienten zu 100 % Laufmittel A und einer Äquilibration mit 100 % Laufmittel A für 10 min. Die optische Analyse erfolgte bei einer Wellenlänge von 230 nm und die Masse-zu-Ladungsverhältnisse wurden mit einem Agilent 6130 Quadrupol Massenspektrometer (Agilent Technologies, Waldbronn) aufgenommen im positiven und negativen Scan-Modus (m/z 50 – 1000) bei einem Trockengas-Fluss von 10 l min^{-1} mit einer Temperatur von $330 \text{ }^\circ\text{C}$, einer Kapillarspannung von 3000 V, einem Vernebelungsdruck von 2,76 bar und einer Fragmentorspannung von 7 V.

MS

Produktanalysen mittels Massenspektrometrie wurden durchgeführt von Katrin Wohlbold und Joachim Trinkner am Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart. Dazu wurden die lyophilisierten Proben in H_2O resuspendiert und analysiert auf einem microTOF-Q Massenspektrometer (Bruker, Reinstetten) mit Elektronenspray-Ionisation im positiven Messfeld. Die Massenspektren der isolierten Zucker sind im Anhang in Abschnitt A.1 dargestellt.

NMR

Die Aufnahme von NMR-Spektren der Produkte erfolgte für Fucosyllactosen am Institut für Organischen Chemie der Universität Stuttgart durch Dr. Birgit Claasen und Sasha Wegner an einem Bruker Avance 500 Spektrometer (Bruker, Reinstetten) in D_2O bei

296 K (125 MHz bzw. 500 MHz). Referenziert wurden die ^1H - und ^{13}C -Spektren auf internes TMS ($\delta = 0$ ppm).

Dabei wurden für 2'-FL und 3-FL folgende Verschiebungen zugeordnet durch den Vergleich zu bereits zuvor publizierten Daten (Albermann *et al.*, 2001; Ishizuka *et al.*, 1999; Jenkins & Bradbury, 1984):

^1H -NMR-Spektroskopie von 2'-FL (500 MHz, D_2O), chemische Verschiebung [ppm]: δ 5,32 (d, $J = 1,3$ Hz, Fuc H-1); δ 5,24 (d, $J = 3,8$ Hz, Glc H-1 α); δ 4,65 (d, $J = 8,2$ Hz, Glc H-1 β); δ 4,53 (d, $J = 7,6$ Hz, Gal H-1); δ 4,25 (m, Fuc H-5); δ 3,59 (dd, $J = 9,4; 4,7$ Hz, Glc H-2 α); δ 3,49 (m, Glc H-5 β); δ 3,30 (dd, $J = 9,5; 8,2$ Hz, Glc H-2 β); δ 1,23 (d, $J = 6,9$ Hz, Fuc H-6)

^1H -NMR-Spektroskopie von 3-FL (500 MHz, D_2O), chemische Verschiebung [ppm]: δ 5,45 (d, $J = 4,4$ Hz, Fuc H-1 β); δ 5,40 (d, $J = 3,8$ Hz, Fuc H-1 α); δ 5,21 (d, $J = 3,8$ Hz, Glc H-1 α); 4,68 (d, $J = 8,2$, Glc H-1 β); 4,45 (d, $J = 7,6$ Hz, Gal H-1); 1,20 (d, $J = 6,8$ Hz, Fuc H-6 α); 1,19 (d, $J = 6,6$ Hz, Fuc H-6 β)

Die NMR-Spektren aller anderen Oligosaccharide wurden aufgenommen durch Dr. Jürgen Conrad am Institut für Bioorganische Chemie der Universität Hohenheim auf einem Unity Inova 500 MHz Spektrometer (Varian, USA) in D_2O bei 296 K (125 MHz bzw. 500 MHz). Die Spektren (^1H , ^{13}C , eCOSY, TOCSY1D, Band-selektives gHSQC mit und ohne Entkopplung, gHSQC-TOCSY, gHMBC und gC2H2BC) wurden unter Verwendung der CHEMPACK 4.0 Pulssequenzen (Varian Vnmrj 2.1 B Software, Varian, USA) aufgenommen und auf verbleibendes Wasser oder zugegebenes Methanol- d_4 ($\delta = 4,7$ ppm bzw. 49,0 ppm) referenziert.

^1H - und ^{13}C -Spektren der in diesem Projekt hergestellten Oligosaccharide sind im Anhang in Abschnitt A.1 dargestellt, während 2D-Spektren von LNT II, LNT, LNFP I, LNDFH II, LNFHep und fucosylierter Lacto-N-triose II in den Zusatzinformationen der bereits publizierten Ergebnisse enthalten sind (Baumgärtner *et al.*, 2014; Baumgärtner *et al.*, 2015a).

2.7.7. Statistische Relevanz der Ergebnisse und Berechnung von Abweichungen

Wenn nicht bei den jeweiligen Ergebnissen in anderer Form beschrieben, repräsentieren Werte ohne Beschreibung von Unsicherheiten die Messergebnisse von einfach durchgeführten Experimenten. Ergebnisse mit angegebener Abweichung stellen

das arithmetische Mittel mit der zugehörigen empirischen Standardabweichung (der Quadratwurzel der korrigierten Stichprobenvarianz) dar und wurden auf mindestens zwei biologischen Replikaten basierend berechnet. Ausnahmen hierzu sind Ergebnisse aus Zulaufkultivierungen (Abschnitte 3.1.6 und 3.3.8), die Bestimmungen der Ausbeuten bei der Isolation von 2'-FL und des Endotoxingehalts (Abschnitt 3.1.7) sowie die Analysen zur Aufnahme von Lactose (Abschnitt 3.3.3), wobei sich die angegebenen Abweichungen auf die empirischen Standardabweichungen von analytischen Duplikaten beziehen. Bei der Verrechnung verschiedener Werte mit Standardabweichungen, z. B. bei der Berechnung von Produktanteilen im Kulturüberstand (z. B. Abbildung 3.7) oder bei relativen Vergleichen von Produktivitäten (z. B. Abbildung 3.8 B), erfolgte die Berechnung der Fehler mittels Gauß'scher Fehlerfortpflanzung.

3. Ergebnisse

Dieses Kapitel enthält die Ergebnisse zur Ganzzell-Synthese, Isolierung und strukturellen Charakterisierung verschiedener Oligosaccharide. Dabei wurden die Ergebnisse gegliedert nach den Synthesen von fucosylierten Lactosen, auf Lactose aufbauenden, größeren aber unfucosylierten Oligosacchariden (größeren Kernstrukturen) und fucosylierten Verbindungen dieser Oligosaccharide. Teile dieser Ergebnisse wurden bereits in wissenschaftlichen Zeitschriften und einer Patentanmeldung veröffentlicht (Baumgärtner *et al.*, 2013; Baumgärtner *et al.*, 2014; Baumgärtner *et al.*, 2015a; Baumgärtner *et al.*, 2015b; Baumgärtner *et al.*, 2015c).

Teil I Synthese von Fucosyllactosen

3.1. 2'-Fucosyllactose (2'-FL)

Als eine der kleinsten und dennoch mit bis zu 8,4 g l⁻¹ (Musumeci *et al.*, 2006) am stärksten in Muttermilch vertretenen Milcholigosaccharide wurde 2'-FL bereits früh aus Muttermilch isoliert, strukturell bestimmt (Kuhn *et al.*, 1955), kristallisiert (Kuhn *et al.*, 1956a) und chemisch sowie biotechnologisch synthetisiert (Albermann *et al.*, 2001; Dékany *et al.*, 2010; Drouillard *et al.*, 2006; Fernandez-Mayoralas & Martin-Lomas, 1986; Wada *et al.*, 2008); s. Abschnitt 1.2). Dabei weisen die bisherigen Synthesemethoden jedoch gewisse Limitationen auf. So sind chemische Synthesen aufgrund der benötigten Schutzgruppenchemie relativ aufwändig und in enzymatischen *in-vitro* Synthesen benötigen Prozesse mit Fucosyltransferasen kostspielige GDP-L-Fucose, während der mit einer α 1,2-Fucosynthase beschriebene Prozess das in wässriger Lösung instabile β -L-Fucosylfluorid als Substrat verwendet (Wada *et al.*, 2008; s. Abschnitt 1.2). Die bisherigen Ganzzell-Synthesen, welche die GDP-L-Fucose intrazellulär synthetisieren, basieren auf Plasmid-tragenden Stämmen und der Verwendung von im Lebensmittelbereich unerwünschten Antibiotika zur Selektion auf Plasmid-tragende Zellen.

Ziel der Stammkonstruktion dieser Arbeit war folglich die antibiotikafreie Ganzzell-Synthese mittels chromosomal integrierter, rekombinanter Gene und der intrazellulären Bereitstellung von GDP-L-Fucose für die Fucosyltransferase-katalysierte Bildung von

2'-FL aus Lactose und Glycerin. Dazu sollten rekombinante *E. coli* Stämme konstruiert werden, welche neben einer α 1,2-Fucosyltransferase-Aktivität auch über einen verstärkten *de novo* Syntheseweg bzw. einen verstärkten *de novo* Syntheseweg und zusätzlich einen Salvage Pathway für die Synthese von GDP-L-Fucose verfügen und somit GDP-L-Fucose *in situ* als Substrat bereitstellen können. Das dabei für die *de novo* Synthese benötigte Mannose-6-phosphat stammt aus dem Zentralstoffwechsel, während die L-Fucose für den Salvage Pathway als exogenes Substrat zur Verfügung gestellt werden muss (Abbildung 3.1).

3.1.1. Stammkonstruktion

Die Klonierungen der Gene und Konstruktionen der *E. coli* Stämme zur Synthese von 2'-FL wurden zum Teil von Lyudmila Seitz (ehemals Kahn) und Christoph Albermann durchgeführt (Khan, 2012; Albermann, 2015). Somit standen dem Projekt sowohl die verwendeten Plasmide als auch fast alle der in Tabelle 2.1 und Abbildung 3.2 dargestellten Plasmid-freien *E. coli* Stämme für die Analysen der intrazellulären GDP-L-Fucose-Konzentrationen und der 2'-FL Produktivitäten bereit. Dabei beruhen die Stämme zur Synthese von 2'-FL auf dem gut charakterisierten *E. coli* K-12 Stamm JM109, welcher keine β -Galactosidase-Aktivität zeigt, aber dennoch über ein funktionelles, für eine Lactose-Permease kodierendes Gen *lacY* auf dem F'-Plasmid verfügt (Yanisch-Perron *et al.*, 1985). Somit kann der Stamm die für die Synthese benötigte Lactose aufnehmen, jedoch nicht spalten und daher auch nicht für die Energie- oder Kohlenstoffgewinnung nutzen (Abbildung 3.1). GDP-L-Fucose, das zweite für die Leloir-Fucosyltransferase-katalysierte Reaktion benötigte Substrat, wird in Wildtyp *E. coli* K-12 als Teil der Colansäure-Biosynthese mittels der Enzyme ManB, ManC, Gmd und WcaG aus Mannose-6-phosphat synthetisiert (Andrianopoulos *et al.*, 1998; Piepersberg *et al.*, 1997; Stevenson *et al.*, 1996). Um eine Verstärkung dieser Synthese zu erreichen, wurden die Gene dieser Enzyme aus den Stämmen *Salmonella enterica* (*manB* und *manC*) und *E. coli* (*gmd* und *wcaG*), welche bereits zuvor in der *in vitro* Synthese von GDP-L-Fucose verwendet wurden (Albermann *et al.*, 2000; Elling *et al.*, 1996), chromosomal eingebracht unter der Kontrolle von P_{tac} -Promotoren. Dazu wurden sie nacheinander separat in das Plasmid pJF119 Δ N kloniert und anschließend jeweils unter der Kontrolle eines P_{tac} -Promotors chromosomal integriert, um den Stamm JM109 gwBC zu erstellen (s. Abbildung 3.2). Der Stamm JM109 gwBC zeigte nach der Transformation mit dem Plasmid pJF-futC, welches das Gen der α 1,2-Fucosyltransferase aus *Helicobacter*

pylori (Wang *et al.*, 1999) kodiert, in von C. Albermann durchgeführten Kulturen mit Minimalmedium bereits die Bildung von 2'-FL. Dies ist ein Indiz für die funktionelle rekombinante Expression des *de novo* Syntheseweges für GDP-L-Fucose, da bei einem Kontrollversuch mit dem Stamm JM109 pJF-futC, welcher keinen rekombinant eingebrachten *de novo* Syntheseweg von GDP-L-Fucose besitzt, keine Bildung von 2'-FL beobachtet wurde. Im nicht-modifizierten Stamm JM109 ist dabei die Expression der Gene des *de novo* Synthesewegs, welcher der Colansäure-Synthese dient nicht verstärkt.

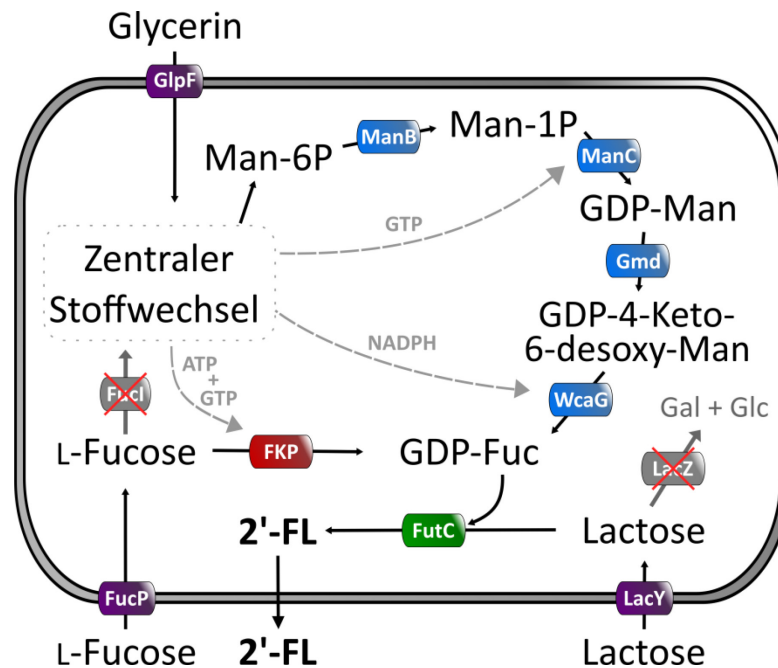


Abbildung 3.1: Stoffwechselwege zur Ganzzell-Synthese von 2'-Fucosyllactose in *E. coli*. Das Donorsubstrat der Fucosyltransferase-katalysierten Reaktion, GDP-L-Fucose, kann sowohl über den Salvage Pathway aus L-Fucose (Enzym Fkp rot hinterlegt), als auch durch den *de novo* Stoffwechselweg (Enzyme blau hinterlegt) generiert werden. Die über die Lactose-Permease aufgenommene Lactose wird mit der generierten GDP-L-Fucose durch die Fucosyltransferase (grün hinterlegt) zu 2'-Fucosyllactose umgesetzt. In anderer Form bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2013).

Ausgehend von dem Stamm JM109 gwBC wurden anschließend zur Plasmid-freien 2'-FL Synthese sukzessive bis zu drei Expressionskassetten des α 1,2-Fucosyltransferase-Gens *futC* chromosomal in die Zuckerdegradations-Loci *maleFG*, *fucIK* bzw. *galETK* integriert und somit die Stämme JM109 gwBC-F1, JM109 gwBC-F2-cat bzw. JM109 gwBC-F3-cat (Abbildung 3.2) erstellt. Diese Stämme, zusammen mit dem Stamm JM109 gwBC-F1 mit pJF-futC bzw. pJF119 Δ N Plasmid wurden anschließend in Schüttelkolbenversuchen auf ihre Produktbildung untersucht, um die Abhängigkeit der 2'-FL-Bildung von der intrazellulären Kopienzahl des Gens *futC* zu verstehen und somit eine höhere Syntheseleistung erreichen zu können (Abschnitt 3.1.2).

Da jedoch neben der Umsatzrate der Fucosyltransferase auch die intrazelluläre Verfügbarkeit von GDP-L-Fucose als eventuell geschwindigkeitslimitierend angenommen wurde und diese beiden Größen in direkter Abhängigkeit zueinander stehen, sollte auch die Syntheseleistung von GDP-L-Fucose erhöht werden. Diese Erhöhung erfolgte durch die heterologe Expression des *Bacteroides fragilis*-Gens *fkp*, welches für eine bifunktionale L-Fucose Kinase/L-Fucose-1-phosphat Guanylyltransferase (Fkp) kodiert und via Salvage Pathway die Synthese von GDP-L-Fucose aus GTP, ATP und L-Fucose erlaubt (Abbildung 3.1, Coyne *et al.*, 2005). Durch die chromosomale Integration der Expressionskassette mit dem Gen *fkp* unter der Kontrolle eines P_{tac} -Promotors in die Stämme JM109 gwBC-F1 und JM109 gwBC-F2 entstanden die Stämme JM109 gwBC-F1-*fkp*-cat und JM109 gwBC-F2-*fkp*-cat (Tabelle 2.1). Um dabei die anderweitige intrazelluläre Verwertung von L-Fucose zu verhindern, wurden die Gene für die L-Fucose-Isomerase (*fucI*) und die L-Fuculose-Kinase (*fucK*) während der Integration von *fkp* bzw. der zweiten Kopie von *futC* disruptiert, um den Abbau von L-Fucose zu verhindern (Abbildung 3.1), während das Gen *fucP* des L-Fucose-Transporters (L-Fucose-Permease) nicht deletiert wurde (Abbildung 3.2, Baumgärtner *et al.*, 2013).

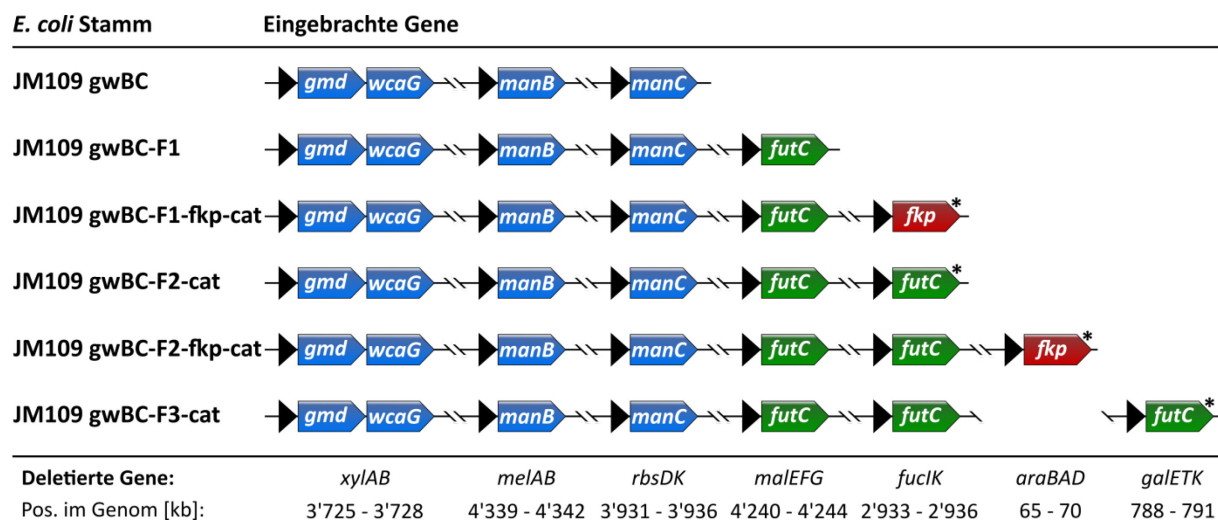


Abbildung 3.2: Genotypen einer Auswahl der zur Synthese von 2'-Fucosyllactose erstellten, Plasmid-freien *E. coli* Stämme. Stammbeszeichnungen links, chromosomal integrierte Gene in Pfeilen, ersetzte Zuckerdegradations-Gene und deren Positionen im Chromosom [kb] unter den integrierten Genen gemäß der Angaben für *E. coli* MG1655 (Hayashi *et al.*, 2006; Keseler *et al.*, 2013). Gene des *de novo* Synthesewegs für GDP-L-Fucose sind blau, des Salvage Pathway sind rot und der Fucosyltransferase sind grün hinterlegt. Alle rekombinant eingebrachten Gene stehen unter Kontrolle jeweils eines P_{tac} -Promotors. Sterne markieren die Gene, deren jeweilige Expressionskassetten noch ein Antibiotikaresistenz-Gen enthalten (s. Tabelle 2.1). Teile der Abbildung wurden in anderer Form bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2013).

3.1.2. Produktbildung in Abhängigkeit der Kopienzahl des *futC*-Gens

Um ein Plasmid-freies und somit Selektionsmarker-unabhängiges Expressionssystem zu generieren, sollten in dieser Arbeit rekombinante Gene ins Chromosom von *E. coli* integriert werden. Die dabei entstehenden Stämme enthalten mit nur einer oder wenigen Kopien der rekombinant eingebrachten Gene deutlich weniger Kopien als Systeme mit medium- oder high-copy Plasmiden. Dies kann eine geringere intrazelluläre Expression der rekombinanten Gene bedeuten, für Anwendungen im Metabolic Engineering jedoch aufgrund der geringeren metabolischen Belastung durch unausgeglichene Enzymaktivitäten auch vorteilhaft sein (Jones *et al.*, 2000).

Nachdem C. Albermann und L. Seitz bereits die Bildung von 2'-FL für die Stämme JM109 gwBC pJF-*futC*, JM109 gwBC-F1 und JM109 gwBC-F2-cat in ersten Versuchen demonstrieren konnten (Khan, 2012), wurden weitere Schüttelkolbenversuche mit Minimalmedium und Glycerin (10 g l⁻¹, Endkonz.) durchgeführt und die Produktbildung mittels HPLC quantifiziert, um den Einfluss der *futC* Kopienzahl auf die Produktbildung zu untersuchen. Dabei wurden die Kulturen sowohl 4 h als auch 24 h nach Induktion beprobt, um die Produktbildung im frühen Prozess und die gebildeten Produktmengen nach Beendigung des Zellwachstums zu untersuchen. Zuerst wurden der Plasmid-freie Stamm JM109 gwBC-F1 und die Plasmid-tragenden Stämme JM109 gwBC-F1 pJF-*futC* und JM109 gwBC-F1 pJF119ΔN bei 37 °C angezogen und mit IPTG induziert (0,5 mM, Endkonz.). Zeitgleich zur Induktion wurde das Substrat Lactose (2 g l⁻¹, Endkonz.) zugegeben. Die Proben 4 h bzw. 24 h nach Induktion zeigten bei vergleichbarem Wachstum eine um den Faktor 3,9 bzw. 1,5 höhere 2'-FL-Konzentration bei zusätzlicher Verwendung des pJF-*futC* Plasmids (Abbildung 3.3 A, B), was auf einen positiven Effekt weiterer Genkopien schließen ließ. Besonders deutlich wird die dabei höhere Syntheseleistung des Stammes JM109 gwBC-F1 pJF-*futC* in der Produktausbeute je Biomasse (Abbildung 3.3 C). Hier demonstriert der Stamm mit pJF-*futC* bereits 4 h nach Induktion mit $248,7 \pm 5,9 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ eine um etwa Faktor 3,7 höhere Produktausbeute als der Plasmid-freie Stamm, welche auch 24 h nach Induktion mit $329,5 \pm 8,9 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ weiter erhöht ist. Der Kontrollstamm mit pJF119ΔN zeigte eine deutlich niedrigere Produktbildung als die beiden Stämme ohne Plasmid bzw. mit pJF-*futC*. Dass dies in einer deutlich höheren metabolischen Belastung zum Erhalt des Plasmids begründet liegt, ist unwahrscheinlich, da der Stamm mit dem Plasmid pJF-*futC* vergleichbare Biomassebildungen wie die Plasmid-freien Stämme aufweist. Somit ist dies vermutlich

auf die erhöhte Basalexpression *lac*-Repressor-Gens *lacI*, welches auch Plasmid-ständig exprimiert wird, zurückzuführen. Die vergleichbare Biomassebildung der Stämme ohne Plasmid und mit pJF-*futC* demonstriert, dass sowohl die Expression mehrerer Kopien von *futC* als auch der Erhalt des Plasmids und die stärkere Syntheseleistung keine deutliche Beeinträchtigung des Wachstums verursachen. Dennoch fokussierten sich die Arbeiten in diesem Projekt auf die Konstruktion Plasmid-freier Stämme, um auf Selektionsmechanismen zum Erhalt von Plasmiden verzichten zu können.

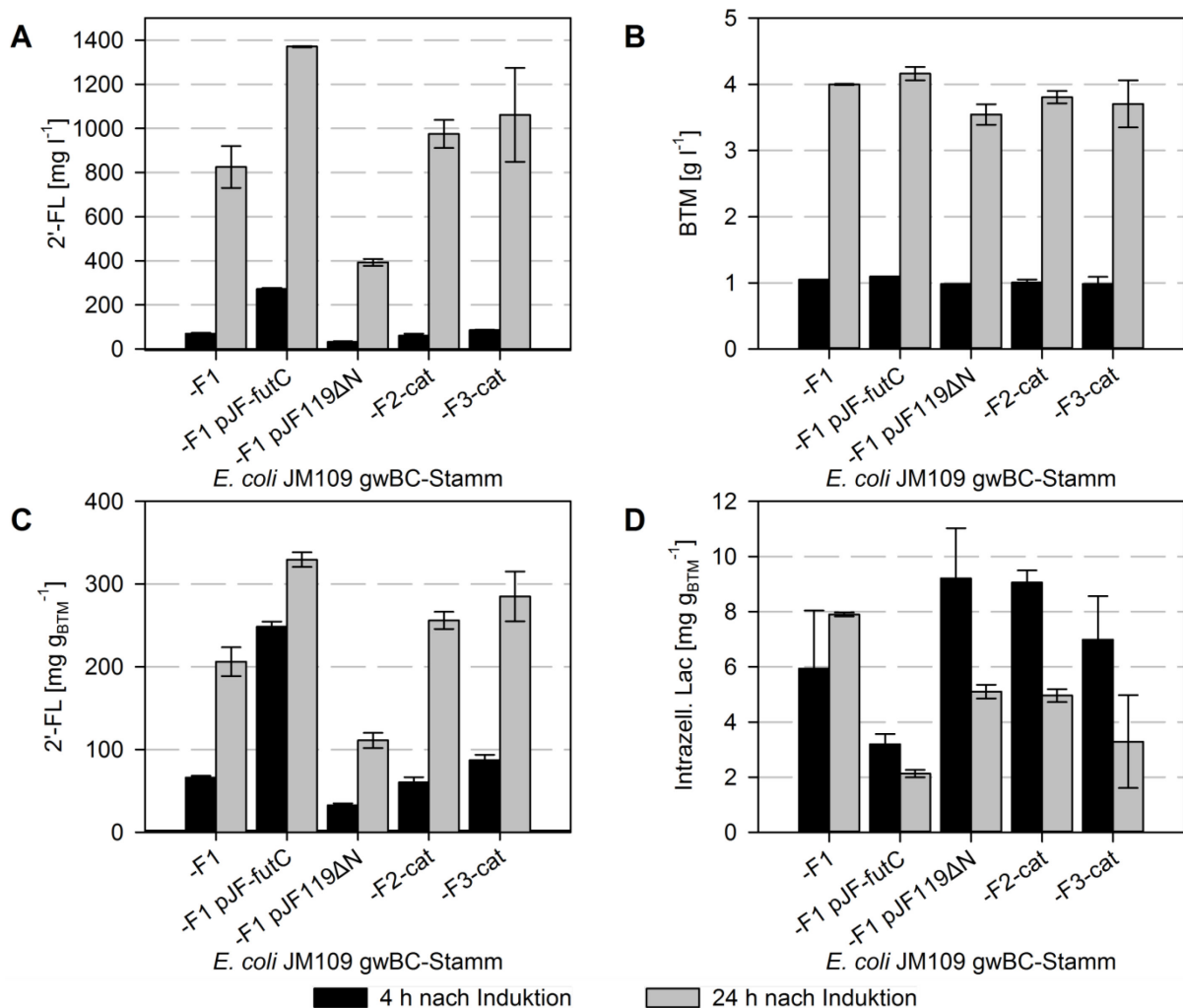


Abbildung 3.3: Synthese von 2'-FL in *E. coli* Stämmen mit unterschiedlicher Kopienzahl des Fucosyltransferase-Gens *futC*. Dargestellt sind sowohl Stämme mit einer chromosomal integrierten *futC*-Kopie mit und ohne *futC*-Kopie auf einem Expressionsplasmid (pJF-*futC* bzw. pJF119ΔN), als auch Stämme mit einer, zwei oder drei chromosomal integrierten *futC*-Kopien (-F1, -F2-cat bzw. -F3-cat) ohne Plasmid. **A)** Gebildete 2'-FL-Konzentration, **B)** Biotrockenmasse, **C)** Ausbeute von 2'-FL je Biotrockenmasse, **D)** Lactose-Konzentration im Zellsediment. Kultivierung der Stämme in Schüttelkolben mit Minimalmedium mit Glycerin (10 g l⁻¹, Endkonz.) bzw. Glycerin (10 g l⁻¹, Endkonz.) und L-Fucose (2 g l⁻¹, Endkonz.) bei 37 °C. Induktion bei OD₆₀₀ 0,4-0,6 durch IPTG (0,5 mM, Endkonz.) unter gleichzeitiger Zugabe von Lactose (2 g l⁻¹, Endkonz.). Teile dieser Ergebnisse wurde bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2013).

Da die höhere Produktbildung mit pJF-*futC* auf eine limitierende Fucosyltransferase-Aktivität hinweist, sollten weitere chromosomal integrierte Kopien von *futC* zu einer stärkeren Expression und somit zu einer höheren Produktbildung führen. Die Stämme

JM109 gwBC-F2-cat und JM109 gwBC-F3-cat mit zwei bzw. drei chromosomal integrierten Kopien von *futC* wurden daher auf die gleiche Weise in Schüttelkolben kultiviert und untersucht. Im Vergleich zum Stamm JM109 gwBC-F1 zeigte der Stamm JM109 gwBC-F2-cat 24 h nach Induktion mit $974,98 \pm 63,64 \text{ mg l}^{-1}$ und $256,08 \pm 10,45 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ eine um 18,2 % erhöhte 2'-FL-Konzentration und aufgrund der etwas geringeren Biomasse eine um etwa 24,2 % höhere Produktausbeute je Biotrockenmasse (Abbildung 3.3 A-C; Baumgärtner *et al.*, 2013). Die Kulturen des Stamms JM109 gwBC-F3-cat mit drei chromosomal integrierten Kopien des Gens *futC* wiesen 24 h nach Induktion im Vergleich zu JM109 gwBC-F2-cat nominal eine weitere Steigerung der 2'-FL-Konzentration um etwa 11,3 % auf.

Zur Abschätzung einer möglichen Limitierung der Syntheseleistung durch die vorhandene und aufgenommene Lactose wurden auch die in den Proben enthaltenen Lactose-Mengen quantifiziert. Dabei zeigte sich 24 h nach Induktion, dass in allen Kulturen weniger als 50 % der vorgelegten Lactose umgesetzt wurde, was als Indiz für eine ausreichende Lactose-Menge in den Kulturen erachtet wurde. Um jedoch auch eine Abschätzung über die intrazelluläre Verfügbarkeit der Lactose treffen zu können, wurden die Proben der Zellsedimente, welche bei den Probenahmen nach der Zentrifugation gewaschen wurden um anheftende Substrate und Produkte zu minimieren, ebenfalls quantifiziert und als ‚intrazelluläre Lactose‘ betitelt. Dabei konnte jedoch nicht zwischen intrazellulär verfügbarer und Zell-anheftender Lactose differenziert werden. Dennoch verdeutlicht das in Abbildung 3.3 D dargestellte Diagramm, dass mit Ausnahme des Stammes JM109 gwBC-F1 jeweils 4 h nach Induktion mehr intrazelluläre Lactose je Biomasse vorkommt als 24 h nach Induktion. Der Stamm mit pJF-*futC*, welcher die höchste Syntheseleistung ausweist, zeigt dabei die geringste Lactose-Konzentration im Zellsediment sowohl 4 h als auch 24 h nach Induktion. Dies ist evtl. auf den schnelleren Umsatz der Lactose aufgrund der hohen *futC* Kopienzahl oder auf die geringere Expression des Lactose-Permease-Gens *lacY* zurückzuführen. Aufgrund der noch relativ geringen Biomassen zeigen die 4 h-Proben dabei zum Teil relativ hohe Standardabweichungen, während die 24 h-Proben die klare Tendenz einer sinkenden intrazellulären Lactose-Konzentration mit steigenden Kopien von *futC* demonstrieren. Dies kann als Indiz für eine mögliche Limitierung gewertet werden.

3.1.3. Erhöhung der intrazellulären GDP-L-Fucose-Syntheseleistung

Zur Erhöhung der 2'-FL-Synthese sollte neben der verstärkten Expression von *futC* auch die intrazelluläre Bereitstellung von GDP-L-Fucose erhöht werden, um dessen Einfluss auf die Produktbildungsraten bestimmen zu können. Hierzu wurden die Stämme JM109 gwBC-F1-fkp-cat und JM109 gwBC-F2-fkp-cat erstellt, welche neben dem *de novo* Syntheseweg auch den Salvage Pathway zur Bildung von GDP-Fuc nutzen. Um dabei die funktionelle Expression des Gens *fkp* nachzuweisen und die damit einhergehende Veränderung der intrazelluläre GDP-Fuc-Konzentration zu bestimmen, wurden die Stämme in Schüttelkolbenkulturen mit Minimalmedium mit Glycerin angezogen. Den Kulturen mit *fkp* wurde zeitgleich mit der Induktion durch IPTG (0,5mM, Endkonz.) L-Fucose (2 g l⁻¹, Endkonz.) zugegeben, um deren Nukleotid-Aktivierung über den Salvage Pathway zu erlauben. Die HPLC Analyse der Zellextrakte zeigte dabei deutliche Unterschiede der intrazellulären GDP-Fuc-Konzentration zwischen den Stämmen mit und ohne Salvage Pathway, während der Vergleich von 4 h-Proben und 12 h-Proben nur eine Abweichung von unter 5 % aufwies. Während bei dem unveränderten Kontrollstamm JM109 keine GDP-Fuc detektiert wurde und die Stämme mit rekombinantem *de novo* Syntheseweg aber ohne *fkp* GDP-Fuc-Konzentrationen von bis zu $0,54 \pm 0,02$ mg g_{BTM}⁻¹ aufwiesen, konnten die *fkp*-Stämme mit $5,14 \pm 0,16$ mg g_{BTM}⁻¹ und $4,51 \pm 0,26$ mg g_{BTM}⁻¹ etwa die zehnfachen intrazelluläre GDP-Fuc-Konzentrationen generieren (Abbildung 3.4; Baumgärtner *et al.*, 2013). Auffallend ist dabei, dass sowohl mit als auch ohne Kopie von *fkp* die Stämme mit zwei integrierten *futC* Kopien niedrigere GDP-Fuc-Konzentrationen zeigten als die Stämme mit nur einer *futC* Kopie, obwohl den Kulturen keine Lactose als Substrat zugegeben wurde. Ein Umsatz von GDP-Fuc durch die Fucosyltransferase sollte daher unterbunden sein, aufgrund des intakten Colansäure-Biosynthese-Operons, kann GDP-Fuc aber in der Synthese von Colansäure verbraucht werden (Stevenson *et al.*, 1996).

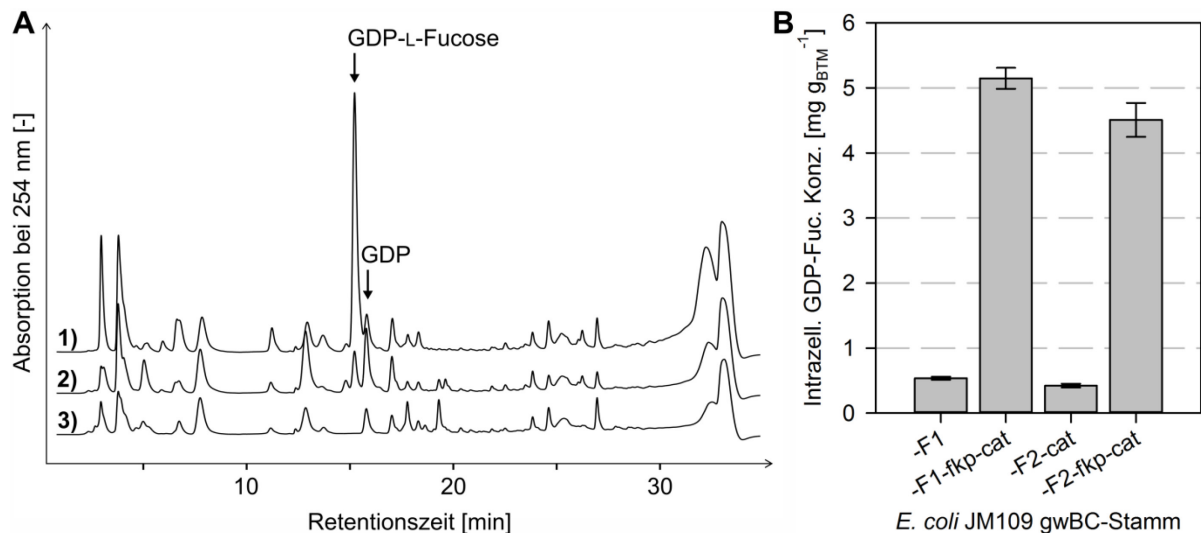


Abbildung 3.4: Analyse intrazellulärer GDP-L-Fucose-Konzentrationen von *E. coli* Stämmen mit bzw. ohne Salvage Pathway. **A)** HPLC-Chromatogramme der Zellextrakte 12 h nach Induktion von 1) *E. coli* JM109 gwBC-F1-fkp-cat, 2) *E. coli* JM109 gwBC-F1 und 3) *E. coli* JM109. Die Pfeile markierten die Retentionszeiten von GDP-L-Fucose und GDP. **B)** Vergleich der 12 Stunden nach Induktion vorliegenden, intrazellulären GDP-L-Fucose-Konzentrationen von Schüttelkolbenkulturen in Minimalmedium mit Glycerin. Teile dieser Ergebnisse wurden bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2013).

3.1.4. Bildung von 2'-FL in Abhängigkeit der GDP-L-Fucose-Syntheseleistung

Mit dem erbrachten Nachweis, dass das Gen *fkp* funktionell chromosomal integriert wurde, sollten die erstellten Stämme nun auf die Syntheseleistung von 2'-FL untersucht werden. Hierzu wurden neben den Plasmid-freien Stämmen erneut die Plasmide pJF-futC und pJF119ΔN verwendet und separat in den Stamm JM109 gwBC-F1-fkp-cat eingebracht, um auch hier den Effekt weiterer Kopien des Fucosyltransferase-Gens *futC* auf die 2'-FL-Bildung zu untersuchen. Zur Analyse des Effekts des eingebrachten Salvage Pathway auf die Synthese von 2'-FL wurden ebenfalls Schüttelkolbenkulturen mit Minimalmedium und Glycerin analog zu den in Abschnitt 3.1.2 beschriebenen Versuchen durchgeführt mit der Modifikation, dass neben der Lactose auch L-Fucose (2 g l⁻¹, Endkonz.) während der Induktion zugegeben wurde, um die Synthese von GDP-Fuc mittels Salvage Pathway (Fkp) zu ermöglichen. Im Vergleich mit den Kulturen ohne *fkp* zeigten die Kulturen mit *fkp* vor allem 24 h nach Induktion deutlich höhere 2'-FL-Konzentrationen und Biomassen (Abbildung 3.5).

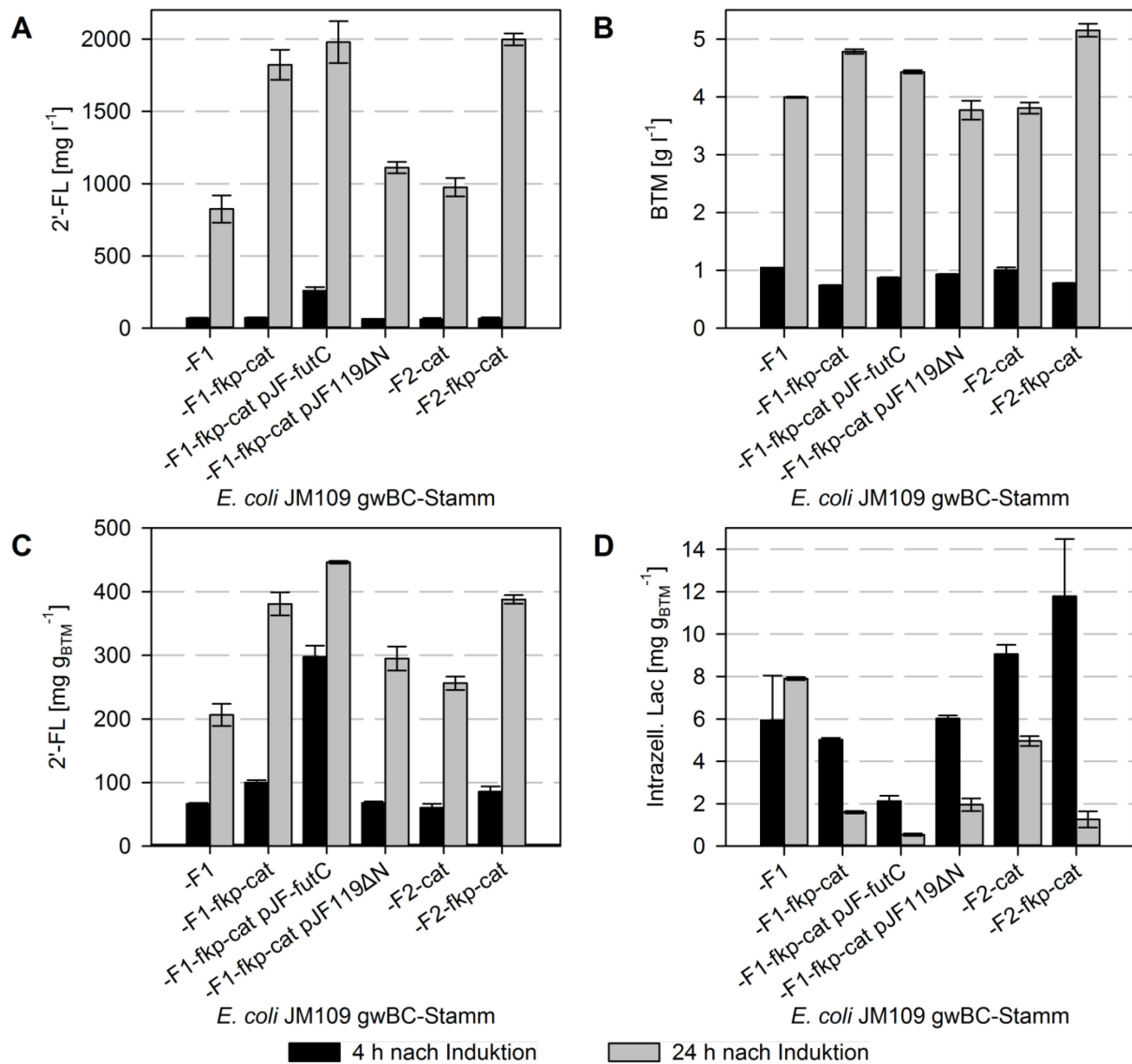


Abbildung 3.5: Synthese von 2'-FL mit *E. coli* Stämmen mit bzw. ohne Salvage Pathway für GDP-L-Fucose. Dargestellt sind sowohl die Stämme mit einer integrierten *futC*-Kopie mit bzw. ohne einer chromosomal integrierten *fkp*-Kopie als auch mit bzw. ohne *futC*-Kopie auf einem Expressionsplasmid (pJF-*futC* bzw. pJF119ΔN). Außerdem dargestellt sind die Stämme mit 2 integrierten *futC*-Kopien mit bzw. ohne integrierter *fkp*-Kopie. **A)** Gebildete 2'-FL-Konzentration, **B)** Biotrockenmasse, **C)** Ausbeute von 2'-FL je Biotrockenmasse, **D)** Intrazelluläre Lactose. Die Kultivierung der Stämme in Schüttelkolben mit Minimalmedium mit Glycerin (10 g l⁻¹, Endkonz.) bzw. Glycerin (10 g l⁻¹, Endkonz.) und L-Fucose (2 g l⁻¹, Endkonz.) bei 37 °C. Induktion bei OD₆₀₀ 0,4-0,6 durch IPTG (0,5 mM, Endkonz.) unter gleichzeitiger Zugabe von Lactose (2 g l⁻¹, Endkonz.). Teile dieser Ergebnisse wurde bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2013).

So konnten die 2'-FL-Konzentrationen 24 h nach Induktion durch Einbringen des Salvage Pathway in die Plasmid-freien Stämme mit ein bzw. zwei Kopien von *futC* um die Faktoren 2,21 bzw. 2,05 gesteigert und somit mehr als verdoppelt werden. Dabei erreichte der Stamm JM109 gwBC-F2-fkp-cat mit 1997,45 ± 41,77 mg l⁻¹ die höchste 2'-FL-Konzentration und mit 5,15 ± 0,11 g l⁻¹ auch die höchste Biotrockenmassekonzentration (Baumgärtner *et al.*, 2013). Das eingebrachte Plasmid pJF-*futC* führte zwar erneut zu einer Steigerung der 2'-FL-Synthese, diese fiel jedoch im Vergleich zur Steigerung ohne *fkp* (Abschnitt 3.1.2) geringer aus und belief sich mit einer finalen

2'-FL-Konzentration von $1978,26 \pm 145,74 \text{ mg l}^{-1}$ auf etwa 8,5 % im Vergleich zum Plasmid-freien Stamm JM109 gwBC-F1-cat. Somit akkumulierte der Plasmid-tragende Stamm etwa gleich viel 2'-FL in der Kultur wie der Stamm mit zwei chromosomal integrierten Kopien von *futC*, während er aufgrund des geringeren Wachstums mit $446,28 \pm 2,20 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ eine um 15 % höhere Produktausbeute je Biotrockenmasse aufwies. Der Stamm mit dem Leerplasmid pJF119ΔN zeigte, wie auch schon in Abschnitt 3.1.2, sowohl eine deutlich niedrigere Produktbildung, als auch ein deutlich niedrigeres Wachstum als der Stamm ohne Plasmid.

Bei der intrazellulären Lactose (Abbildung 3.5 D) zeigt sich außer bei den Kulturen mit Leerplasmid, wie bereits in Abschnitt 3.1.2 beschrieben, die Tendenz, dass Stämme mit höherer Produktausbeute je Biomasse vor allem 24 h nach Induktion deutlich weniger Lactose in der Zell-Fraktion aufweisen. Dies bekräftigt die Vermutung, dass die Lactose-Aufnahme bei höheren Syntheseraten limitierend sein kann.

Die in Abbildung 3.5 B dargestellten Biotrockenmassekonzentrationen zeigen 24 h nach Induktion bei den Plasmid-freien Stämmen mit *fkp* Gen um etwa 20 % bzw. 35 % gesteigerte Werte im Vergleich zu den Stämmen ohne *fkp*. Dies kann als Indiz für die Wachstumsbeeinträchtigung durch den Verbrauch von Fructose-6-phosphat und NADPH über den *de novo* Syntheseweg gewertet werden. Die Stämme mit Salvage Pathway wachsen demnach vermutlich besser, da sie die benötigte GDP-L-Fucose aus der bereitgestellten L-Fucose synthetisieren können. Die erhöhte GDP-Fuc-Synthese über den Salvage Pathway und die daraus resultierende vermehrte 2'-FL-Synthese wird verdeutlicht durch den Vergleich der Substrat-Produkt-Ausbeuten. Da die Kohlenstoffatome im Fucosyl-Rest von 2'-FL aus Glycerin bzw. Glycerin und L-Fucose stammen und die Lactose unverändert von den Zellen für die Fucosylierung verwendet werden kann, stellt Abbildung 3.6 A die Kohlenstoffausbeuten im Fucosyl-Rest von 2'-FL aus Glycerin und L-Fucose dar. Dabei zeigen die Stämme ohne *fkp* Kohlenstoffausbeuten im Fucosyl-Rest von 2'-FL aus Glycerin von $3,11 \pm 0,36 \%$ (JM109 gwBC-F1) und $3,68 \pm 0,24 \%$ (JM109 gwBC-F2-cat). Die Stämme mit Salvage Pathway zeigen 24 h nach Induktion mit C-Ausbeuten von $5,61 \pm 0,32 \%$ bzw. $6,15 \pm 0,13 \%$ für JM109 gwBC-F1-*fkp*-cat bzw. -F2-*fkp*-cat deutlich höhere Werte als die Stämme ohne *fkp* (Baumgärtner *et al.*, 2013), obwohl der bei den Stämmen mit *fkp* zusätzlich in Form von L-Fucose vorgelegte Kohlenstoff ebenfalls in die Kohlenstoffbilanz mit eingeht und sich schmälern auf die Berechnung der C-Ausbeuten auswirkt.

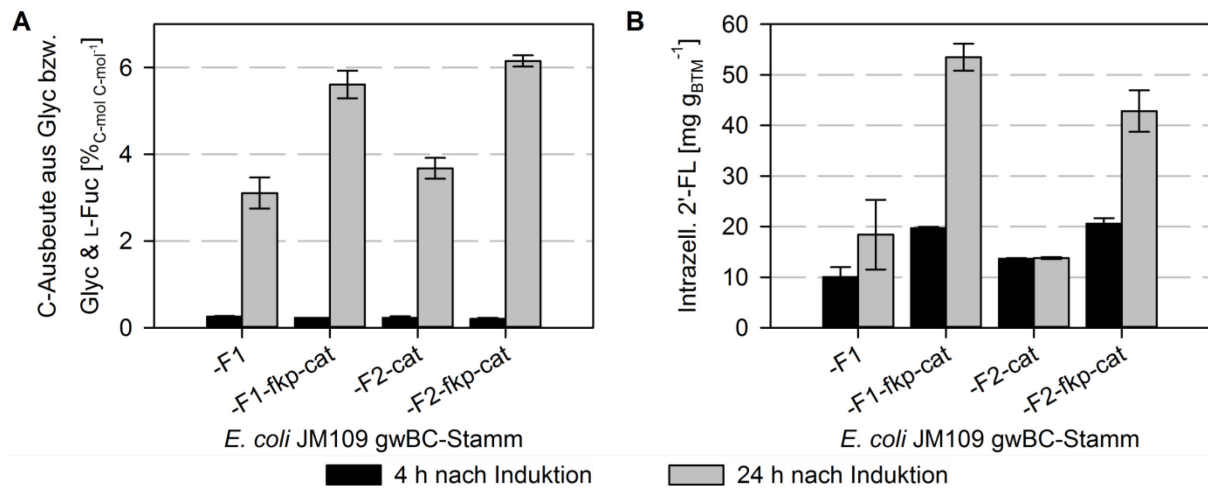


Abbildung 3.6: Vergleich der Produktausbeuten und intrazellulären 2'-FL-Konzentrationen verschiedener Plasmid-freier Stämme mit und ohne *fkp* Expression. A) Vergleich der zum Fucosyl-Rest von 2'-FL umgesetzten Kohlenstoffatome aus Glycerin bzw. Glycerin und L-Fucose bei Stämmen mit bzw. ohne chromosomal integriertem *fkp* Gen. B) Vergleich der nach 4 bzw. 24 h intrazellulären 2'-FL je Biotrockenmasse.

Die Wirtschaftlichkeit der biotechnologischen Synthese von HMOs wird neben den Kosten im Syntheseprozess vorwiegend von den Kosten in der Produktisolierung bestimmt (Syldatk & Chmiel, 2011). Dabei kann das Vorkommen der Produkte im Kulturüberstand die Isolierung erleichtern, da weder ein Zellaufschluss noch das Entfernen von Zelltrümmern und Zellbestandteilen erforderlich ist (Syldatk & Chmiel, 2011). Zur Berücksichtigung der Verteilung der produzierten 2'-FL im Gesamtsystem wurden die Produktmengen im Zellsediment und im Kulturüberstand jeweils separat bestimmt und für die Werte in Abbildung 3.3 und Abbildung 3.5 addiert. Die im Zellsediment gemessenen 2'-FL-Konzentrationen (Abbildung 3.6 B) zeigen im Besonderen 24 h nach Induktion einen etwa um Faktor 3 erhöhten Wert für die Stämme mit Salvage Pathway im Vergleich zu den Stämmen ohne *fkp* Gen. Dieser Faktor ist deutlich höher als die Faktoren der 2'-FL-Konzentration je Kulturvolumen bzw. je BTM, welche max. etwa 1,85 bzw. 2,21 betragen. Dieser Sachverhalt deutet an, dass die Verteilung von 2'-FL auf den Kulturüberstand und das Zellsediment nicht auf einem Gleichgewicht basiert, welches unter verschiedenen Bedingungen zu gleichen Stoffverteilungen führt, und dass die intrazelluläre 2'-FL nicht direkt mit der 2'-FL-Konzentration im Gesamtsystem je Volumen bzw. je Biomasse korreliert. Ein rein von der intrazellulären Konzentration abhängiger Export scheint auch nicht vorzuliegen, da die im Zellsediment vorliegende 2'-FL Menge 24 h nach Induktion jeweils deutlich höher ist als die Menge 4 h nach Induktion und da zu beiden Zeitpunkten der Großteil der 2'-FL im Kulturüberstand vorkommt. Daher haben die Mengenunterschiede in den Zell-Fractionen nur einen geringen Effekt auf den prozentualen Anteil von 2'-FL im

Kulturüberstand (Abbildung 3.7). So enthalten 24 h nach Induktion alle Kulturen von Plasmid-freien Stämmen über 85 % der 2'-FL im Kulturüberstand, mit einem Maximum von etwa 96 % bei den Kulturen mit dem Stamm JM109 gwBC-F3-cat und einem Anteil etwa 95 % bei den Kulturen mit dem Stamm JM109 gwBC-F2-cat. Aufgrund dieser hohen Werte wurden keine Verbesserungsversuche oder Untersuchungen zum 2-FL Transfer vom intrazellulären in den extrazellulären Bereich mittels eines Effluxsystems durchgeführt.

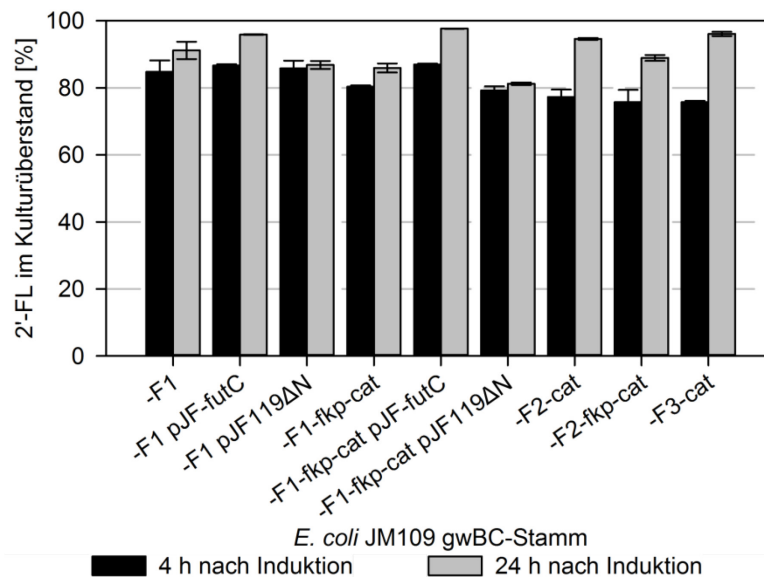


Abbildung 3.7: Anteil der 2'-FL im Kulturüberstand 4 h bzw. 24 h nach Induktion. Kultivierung der Stämme in Schüttelkolben mit Minimalmedium mit Glycerin (10 g l⁻¹, Endkonz.) bzw. Glycerin (10 g l⁻¹, Endkonz.) und L-Fucose (2 g l⁻¹, Endkonz.) bei 37 °C. Induktion bei OD₆₀₀ 0,4-0,6 durch IPTG (0,5 mM, Endkonz.) unter gleichzeitiger Zugabe von Lactose (2 g l⁻¹, Endkonz.).

Vor der Konstruktion des Stammes JM109 gwBC-F3-cat erwies sich der Stamm JM109 gwBC-F2-cat mit 2 chromosomal integrierten *futC* Kopien unter den analysierten 2'-FL-Synthesestämmen als der ertragreichste Stamm ohne Salvage Pathway und Verwendung von L-Fucose. Daher sollte die Skalierung der Produktion mit dem Stamm JM109 gwBC-F2-cat erfolgen. Für diesen Stamm wurden daher, in Vorbereitung einer Bioreaktor-Kultivierung, neben den in diesem Abschnitt aufgeführten Produkt- und Biomassebildungseigenschaften weitere Charakteristika gemessen bzw. berechnet. So demonstrierten die Versuche im Schüttelkolben eine maximale spezifische Wachstumsrate μ_{\max} von 0,495 h⁻¹ und eine Biotrockenmasseausbeute $Y_{X/S}$ von 0,38 g g⁻¹. Bezogen auf die 2'-FL-Bildung konnten 4 h bzw. 24 h nach Induktion Raum-Zeit-Ausbeuten ab Induktion und Lactose-Zugabe von 15,22 ± 2,28 mg l⁻¹ h⁻¹ bzw. 40,62 ± 2,65 mg l⁻¹ h⁻¹ demonstriert werden. Neben diesen Prozessgrößen sollte der Stamm jedoch auch auf die Stabilität der eingebrachten Gene über mehrere

Generationen getestet werden, um sicher zu stellen, dass dieser Stamm auch für eine großtechnische Synthese von 2'-FL angezogen werden kann, ohne die Produktionseigenschaften zu verlieren.

3.1.5. Genetische Stabilität von *E. coli* JM109 gwBC-F2-cat

Um die Stabilität der eingebrachten rekombinanten Gene und somit die Produktionsstabilität des Stammes JM109 gwBC-F2-cat zu untersuchen, wurde dieser in Schüttelkolben mit dem bereits in Abschnitten 3.1.2 und 3.1.3 verwendeten Minimalmedium, jedoch ohne Induktion oder Zugabe von Lactose angezogen. Nach jeweils 24 Stunden wurde die Kultur so lange in neue Schüttelkolben überimpft bis eine anhand der optischen Dichte bestimmte gesamte Generationszahl von über 100 Generationen erreicht wurde. Basierend auf der vorherigen Beobachtung, dass das Fehlen oder die Inaktivität eines der rekombinant eingebrachten Gene zum Ausbleiben der 2'-FL-Bildung bzw. zu einer deutlich niedrigeren 2'-FL-Ausbeute führt, wurde die Syntheseleistung dieses Stamms, nach der Langzeitkultur, mit der einer frisch aus Gefrierkultur angezogenen Kultur des Stammes in Schüttelkolbenkulturen verglichen nach der in Abschnitt 3.1.2 beschriebenen Methode. Dabei erreichte der über 100 Generationen kultivierte Stamm im Vergleich zu dem frisch aus Gefrierkultur verwendeten Stammes 24 Stunden nach Induktion und Zugabe von Lactose eine 2'-FL-Ausbeute je BTM von $95,01 \pm 1,88 \%$ und eine finale 2'-FL-Konzentration von $113,76 \pm 3,15 \%$ (Abbildung 3.8).

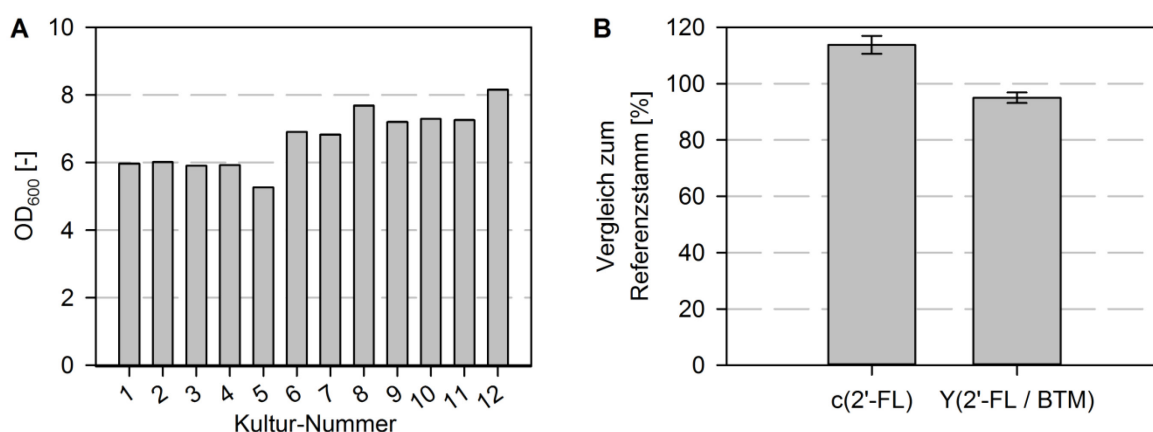


Abbildung 3.8: Produktivität eines über 100 Generationen kultivierten Stammes JM109 gwBC-F2-cat. **A)** Optische Dichten der jeweiligen Schüttelkolbenkultur vor der Überimpfung in den nächsten Kolben. **B)** 2'-FL-Bildung je BTM und finale 2'-FL-Konzentration in Prozent im Vergleich zum Referenzstamm, der nicht über 100 Generationen in Flüssigkultur gehalten wurde. Finale 2'-FL-Konzentration (c(2'-FL)) und 2'-FL-Ausbeute je BTM (Y(2'-FL BTM⁻¹)) des Referenzstammes wurden jeweils als 100 % definiert.

Demnach weist der Stamm auch nach über 100 Generationen eine vergleichbare Produktivität auf (Baumgärtner *et al.*, 2013). Die im Vergleich zum Kontrollstamm erhöhte 2'-FL-Konzentration 24 Stunden nach Induktion ist eventuell auf eine bessere Anpassung an das Kulturmedium zurückzuführen.

3.1.6. Zulaufkultivierung von JM109 gwBC-F2-cat zur Synthese von 2'-FL

Um die Skalierbarkeit der Synthese von 2'-FL ohne Antibiotika oder andere Selektionssysteme zu demonstrieren, wurde eine Bioreaktor-Kultivierung des *E. coli* Stamms JM109 gwBC-F2-cat im Zulaufverfahren in Minimalmedium mit einem Start-Volumen von 8,4 l und einem End-Volumen von 13,5 l durchgeführt. Dabei diente Glycerin wie in den Schüttelkolben-Versuchen als Kohlenstoffquelle für das Zellwachstum und die intrazelluläre Synthese von GDP-L-Fucose, während Lactose in einem separat angesteuerten Zulauf als exogenes Substrat für die Synthese von 2'-FL zugegeben wurde. Wie in Abbildung 3.9 A dargestellt, wurde die Zulauftrate der Lactose dabei zu Beginn der Zulaufphase an die Rate des Glycerin-Zulaufs gekoppelt, die Kopplungsfaktor jedoch manuell variiert und später eine konstante Zulauftrate gewählt, um eine Akkumulation oder eine Limitierung der Lactose im System zu verhindern. Die zum Prozessende verbleibende Lactose-Konzentration sollte dabei geringgehalten werden, um die Produktisolierung zu vereinfachen. Zur Anpassung des Lactose-Zulaufs wurden die Konzentrationen von Lactose und 2'-FL während der Kultivierung im Kulturüberstand qualitativ mittels Dünnschichtchromatographie bestimmt. Zum Erhalt kontrollierter aerober Kulturbedingungen unterlag der Prozess einem geregelten Sauerstoffpartialdruck von über 50 % Sättigung durch die Anpassung der Rührgeschwindigkeit und der Begasungsrate (Abbildung 3.10).

Während die Satz-Phase der Biomassebildung diente, wurde nach Verbrauch des vorgelegten Glycerins die Expression der rekombinanten Gene durch Zugabe von IPTG induziert und mit dem Zulauf der Kohlenstoff- und der Stickstoff- und Phosphatquelle sowie der Lactose begonnen. Für die Glycerin-limitierte Zulaufphase wurde der Glycerin-Zulauf dabei auf eine Wachstumsrate von $\mu_{\text{set}} = 0,1$ eingestellt. Abbildung 3.9 A zeigt die Zulauf-Profile und die Biomasse-Entwicklung. Die scheinbare Abnahme des Lactose-Zulaufs ab einer Prozesszeit von 30 h ist auf die Volumenzunahme der Kultur zurückzuführen. In der Satz-Phase wurde eine maximale Wachstumsrate von $\mu_{\text{max}} = 0,512 \text{ h}^{-1}$ mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9970$ ermittelt, welche die für

Schüttelkolbenkultivierung bestimmte Wachstumsrate von $0,495 \text{ h}^{-1}$ geringfügig übersteigt. In der Zulaufphase zeigte die Kultur jedoch nur eine Wachstumsrate von $\mu = 0,066 \text{ h}^{-1}$ und somit eine Diskrepanz zum festgelegten Wert $\mu_{\text{set}} = 0,1 \text{ h}^{-1}$. Diese ist vermutlich zum einen auf den Abzug von Kohlenstoff aus dem Zentralstoffwechsel für die Produktbildung, zum anderen aber auch auf ungenaue, von den Schüttelkolbenversuchen abgeleitete Annahmen für die Koeffizienten des Erhaltungstoffwechsels und der Biomasse-Ausbeute in der Berechnung der Zulaufraten zurückzuführen.

Nach einer gesamten Prozesszeit von 35,5 h mit einer Zulaufphase von 22,5 h und einer Biotrockenmassekonzentration von $65,61 \text{ g l}^{-1}$ konnte durch die Bioreaktor-Kultivierung ein 2'-FL-Titer von $20,28 \pm 0,83 \text{ g l}^{-1}$ erreicht und insgesamt etwa 270 g 2'-FL synthetisiert werden (Abbildung 3.9; Baumgärtner *et al.*, 2013). Die daraus resultierende Produktausbeute je Biomasse von $Y_{P/X} = 309,16 \pm 12,61 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ liegt etwa in der gleichen Größenordnung wie der für Schüttelkolbenkulturen ermittelte Wert des Stammes JM109 gwBC-F2-cat ($256,08 \pm 10,45 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$). Mit $571,27 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ übertrifft die Raum-Zeit-Ausbeute den in Schüttelkolben ab Induktionszeitpunkt ermittelten Wert ($40,62 \pm 2,65 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) deutlich aufgrund der höheren Biomassekonzentration in der Bioreaktor-Kultivierung.

Bei der Verteilung der 2'-FL auf das Kulturfiltrat und die Zell-Fraktion zeigt sich, dass im Vergleich zu den Schüttelkolben-Kulturen bei der Zulaufkultivierung ein weitaus geringerer Anteil von 2'-FL im Kulturüberstand vorkommt. So betrug der im Kulturfiltrat vorkommende Anteil der quantifizierten 2'-FL während des Prozesses maximal $65,8 \pm 3,9 \%$ und zum Prozessende $50,4 \pm 2,8 \%$ wie in Abbildung 3.10 B dargestellt. Von der zum Prozessende verbliebenen Lactose wurden nur $12,5 \pm 0,7 \%$ im Kulturfiltrat und der Rest in der Zell-Fraktion nachgewiesen.

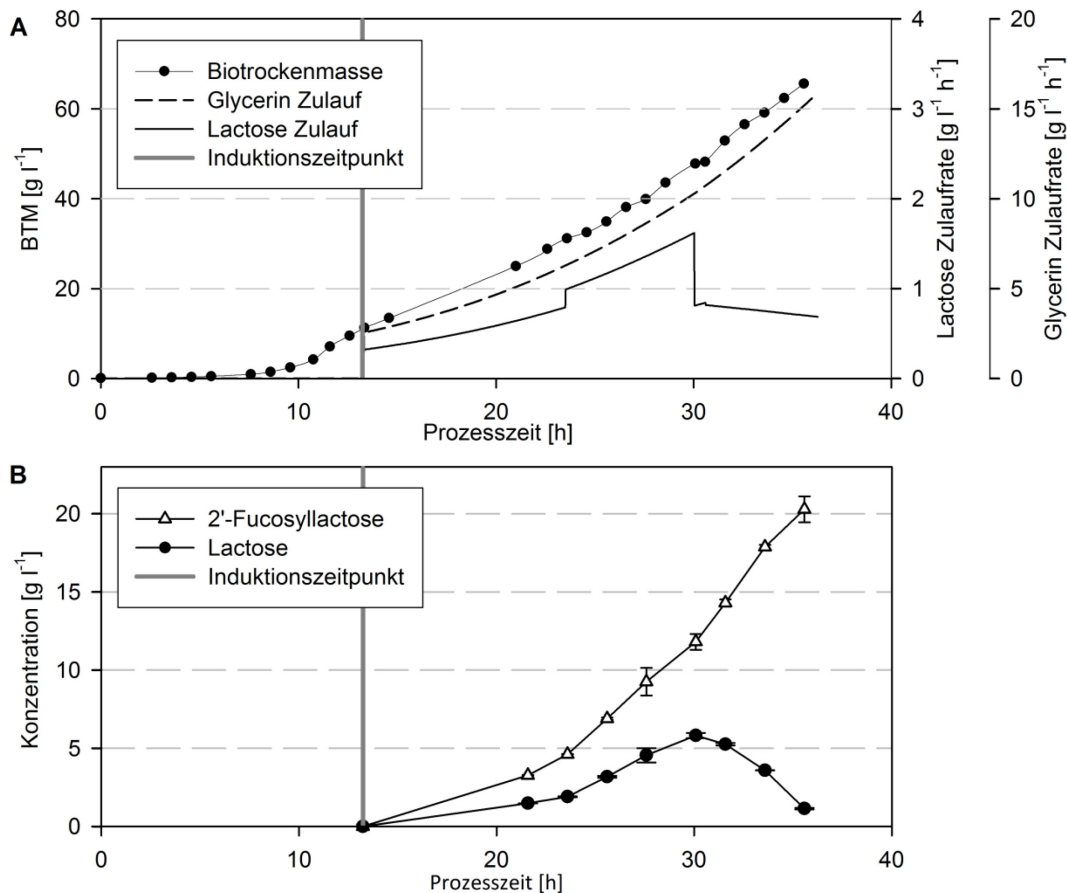


Abbildung 3.9: Zulaufprofile und Produktbildung der Glycerin-limitierten Zulaufkultivierung von *E. coli* JM109 gwBC-F2-cat im 10 Liter-Maßstab zur Synthese von 2'-Fucosyllactose. **A)** Entwicklung der Biotrockenmassekonzentration und Zulaufprofile des Glycerin- und Lactose-Zulaufs. Glycerin-, NH₄- und Lactose-Zulauf beginnen mit der Induktion nach dem Verbrauch des im Satzmedium vorgelegten Glycerin, markiert durch die senkrechte, graue Linie. Die Glycerin- und Nährstoff-Zuläufe wurden auf ein maximales Wachstum von $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$ eingestellt, während die Zulauftrate der Lactose manuell variiert wurde, um einem Engpass oder einer Akkumulation von Lactose entgegenzuwirken. **B)** Lactose- und 2'-FL-Konzentrationen in der Kultur. In anderer Form bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2013).

Die Produktausbeute je Substrat, welche ebenfalls einen Einfluss auf die Wirtschaftlichkeit des Prozesses nimmt, kann sowohl für die zugegebene Lactose als auch für das Glycerin bestimmt werden. Dabei verblieben zum Prozessende von der vorgelegten Lactose nur $1,15 \pm 0,05 \text{ g l}^{-1}$, was einem Umsatz von $92,5 \text{ \%}_{\text{mol/mol}}$ zu 2'-FL entspricht. Die Kohlenstoffausbeute aus Glycerin, welches für die Synthese von GDP-L-Fucose verwendet wurde, wurde auf den in 2'-FL enthaltenen Kohlenstoffanteil im Fucosyl-Rest berechnet und ist in Abbildung 3.10 C als C_{mol} -Ausbeute dargestellt. Dabei zeigten sich zum Prozessende Ausbeuten von $5,04 \pm 0,21 \text{ \%}_{\text{Cmol/Cmol}}$, bezogen auf das gesamte eingesetzte Glycerin und von $5,63 \pm 0,23 \text{ \%}_{\text{Cmol/Cmol}}$ für das ab der Zulaufphase eingesetzte Glycerin. Damit konnte auch die Produktausbeute je Glycerin im Vergleich zu den Schüttelkolbenkulturen mit *E. coli* JM109gwBC-F2-cat gesteigert werden (vgl. Abbildung 3.6 A), wobei die Steigerung bezogen auf das gesamte Glycerin etwa 37 % beträgt.

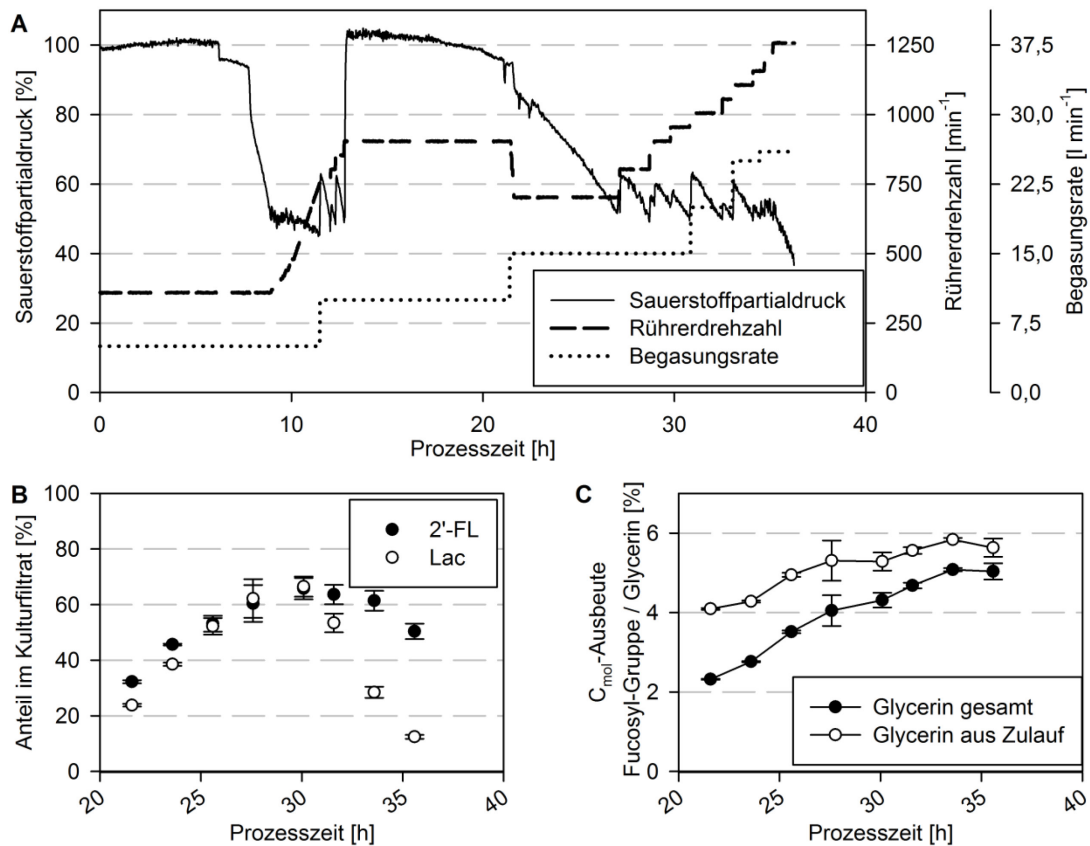


Abbildung 3.10: Entwicklung des Sauerstoffpartialdrucks und der Produktausbeuten der Zulaufkultivierung von *E. coli* JM109 gwBC-F2-cat zur Synthese von 2'-Fucosyllactose. A) Entwicklung des Sauerstoffpartialdrucks in Abhängigkeit der Rührergeschwindigkeit und der Begasungsrate ($p = \text{konstant}$). **B)** Anteile der im System vorhandenen Lactose und der gebildeten 2'-Fucosyllactose im Kulturfiltrat. **C)** Kohlenstoffausbeute des gesamten bzw. zugegebenen Glycerins in der Fucosyl-Gruppe der 2'-FL.

Da die Zulaufphase Glycerin-limitiert durchgeführt wurde, konnte zum Prozessende wie erwartet kein Glycerin mehr im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Acetat, welches während der Satzphase bei Glycerin-Überfluss als Produkt des Überschussmetabolismus gebildet wurde, konnte zum Prozessende im Kulturfiltrat auf eine Konzentration von $0,262 \pm 0,002 \text{ g l}^{-1}$ quantifiziert werden (Baumgärtner *et al.*, 2013).

3.1.7. Produktisolierung und Produktcharakterisierung

Teile der in Abschnitt 3.1.6 beschriebenen Zulaufkultur wurden für die Isolierung von 2'-FL verwendet, um die strukturelle Integrität von 2'-FL nachzuweisen, die Möglichkeit der einfachen Produktisolierung im Labormaßstab zu demonstrieren und die 2'-FL für weitere Untersuchungen bereitstellen zu können. Dabei erfolgte die Isolierung in verschiedenen Durchgängen sowohl direkt aus dem Kulturüberstand als auch aus der Gesamtkultur nach vorherigem thermisch-mechanischem Zellaufschluss und Zentrifugation. Durchgeführt wurde die Produktreinigung jeweils zuerst mittels Adhäsionschromatographie mit einer Aktivkohle/Celite545-Säule und einem Wasser-

Ethanol Gradienten, gefolgt von einer Größenausschlusschromatographie mit Wasser als mobiler Phase (s. Abschnitt 2.6). Dabei zeigte, wie literaturbeschrieben (Anderson & Donald, 1981; Whistler & Durso, 1950), bereits die Aktivkohle/Celite-Chromatographie eine Trennung der Oligosaccharide verschiedener Größen, sodass der zu Beginn der Isolierungen geringe Anteil an Lactose bereits in diesem Schritt deutlich reduziert werden konnte.

Die Isolierung aus der Kulturprobe mit Zellen wurde dabei mit einer 50 ml Kulturprobe durchgeführt und die in beiden chromatographischen Schritten erhaltenen Fraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Die dabei nach Trocknung erhaltenen Einwaagen der 2'-FL Fraktionen sind in Abbildung 3.11 A dargestellt. Hierbei konnte im ersten chromatographischen Schritt nur eine relativ niedrige Ausbeute erreicht werden, welche auf einen nicht ausreichenden Zellaufschluss zurückgeführt wurde. Insgesamt konnten in dieser und den folgenden Isolierungen 2,01 g 2'-FL gewonnen werden, welche für die Analyse des Endotoxin-Gehalts an das Institut für Ernährungsmedizin der Universität Hohenheim gegeben wurden.

Auch wenn das avisierte langfristige Einsatzgebiet der synthetisierten 2'-FL die orale Anwendung ist, können Endotoxine bei intravenöser Injektion oder in *in vitro* Experimenten bereits in Mengen von wenigen ng ml⁻¹ zu pyrogenen Effekten führen oder die Versuchsergebnisse beeinflussen (Morrison & Ulevitch, 1978; Talmadge & Siebert, 1989). Aufgrund der deutlich größeren Strukturen von Endotoxinen im Vergleich zu 2'-FL, wurde vermutet, dass eine Senkung des Endotoxin-Gehalts bereits bei der Produktisolierung mittels Gelfiltration erfolgte. Da am Institut für Ernährungswissenschaften durch Verena Heidler aber dennoch etwa 1 Endotoxin-Unit (EU) je mg 2'-FL bestimmt werden konnten, sollte der Endotoxin-Gehalt der 2'-FL gesenkt werden. Hierzu wurde der immunogene und hydrophobe Lipid-A Teil der Lipopolysaccharide mittels Festphasenextraktion (SPE) an lipophiles Material gebunden. Die dabei erreichte Senkung des Endotoxin-Gehalts ist in Abbildung 3.11 B dargestellt. So konnte die Endotoxin-Belastung der 2'-FL mittels SPE in der ersten Charge etwa um den Faktor 14 reduziert werden. Da die Reduzierung des Endotoxin-Gehalts jedoch nicht im Fokus dieser Arbeit stand, wurden keine weiterführenden Experimente hierzu durchgeführt.

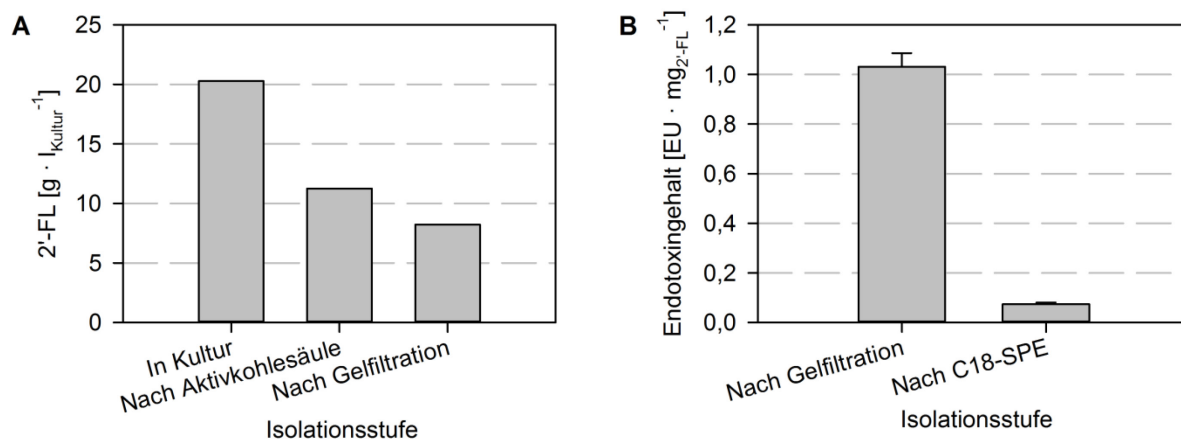


Abbildung 3.11: Isolierung von im Zulaufverfahren synthetisierter 2'-Fucosyllactose. Nach Zellaufschluss und Zentrifugation wurde der Überstand zuerst mittels einer Aktivkohle-Celite545-Säule und anschließend mittels Gelfiltrationschromatographie isoliert. Zur Senkung des Endotoxin-Gehalts wurde das Isolat danach durch C18-SPE Säulen gegeben. **A)** Verbleibende 2'-Fucosyllactose bezogen auf das anfänglich für die Isolierung eingesetzte Kulturvolumen, quantifiziert mittels HPLC im Duplikat für die Kulturprobe bzw. Einwaage für die zwei Isolate in einfacher Bestimmung unter der Annahme, dass der Gewichtsanteil der Verunreinigungen zu vernachlässigen ist. **B)** Bestimmte Endotoxin-Werte der isolierten 2'-FL. Die Bestimmung erfolgte durch Verena Heidler am Institut für Ernährungsmedizin der Universität Hohenheim mittels EndoLISA Test mindestens in Duplikaten.

Neben dem Vergleich mit einem kommerziellen Standard via HPLC und Dünnschichtchromatografie wurden auch weitere Methoden angewandt zum Nachweis der strukturellen Integrität der biotechnologisch synthetisierten und anschließend isolierten 2'-FL. So konnte die Masse der isolierten 2'-FL mittels ESI-TOF-MS bestätigt werden. Das dabei erhaltene Signal im positiven Messfeld mit einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) von 511,16 entspricht dem erwarteten Natrium-Addukt von 2'-FL (Abbildung A.1). Die mit deutlich niedrigeren Intensitäten vorkommenden Signale mit m/z -Verhältnissen von 189,07; 281,24 und 301,14 wurden nicht näher untersucht, scheinen jedoch auf keine der erwarteten Mono- oder Oligosaccharide zurückzuführen zu sein. Das Massenspektrum ist im Anhang in Abbildung A.1 dargestellt. Zur weiteren Strukturanalyse der isolierten 2'-FL wurden anschließend NMR-Spektren in D_2O am Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart aufgenommen. Die Spektren wurden dabei aufgrund starker Überlagerungen der Signale und der daher für eine vollständige Annotation benötigten aber nicht durchgeführten selektiven TOCSY und 2D-NMR Aufnahmen nicht vollständig annotiert, sondern mit den bereits zuvor publizierten chemischen ^1H - und ^{13}C -Verschiebungen von 2'-FL verglichen (Albermann *et al.*, 2001; Ishizuka *et al.*, 1999; Jenkins & Bradbury, 1984). Dieser Vergleich schien ausreichend, da die von Albermann *et al.* mittels NMR charakterisierte 2'-FL enzymatisch ebenfalls mit einer α 1,2-Fucosyltransferase aus *H. pylori* synthetisiert wurde. Die erhaltenen Werte des ^1H - und ^{13}C -Spektrums stehen dabei in guter Übereinstimmung mit den bereits publizierten Werten. Die auf internes

Tetramethylsilan (TMS) ($\delta = 0$ ppm) referenzierten ^1H - und ^{13}C -Spektren sind im Anhang in Abbildung A.2 und Abbildung A.3 dargestellt. Die anhand der bereits publizierten Literatur zugeordneten chemischen Verschiebungen der ^1H - und ^{13}C -Signale sind in Abschnitt 2.7.6 und in Tabelle 3.1 aufgeführt (Albermann *et al.*, 2001; Hermansson *et al.*, 1992; Ishizuka *et al.*, 1999; Jenkins & Bradbury, 1984). Während die ^{13}C -NMR-Signale vollständig zugeordnet werden konnten und in der Zuordnung nur bei einem Signalpaar (δ 74,16 ppm und δ 74,13 ppm) eine Unsicherheit bestand, erlaubte die starke Überlagerung der Signale im Bereich von 3,65 ppm bis 4,00 ppm des ^1H -NMR-Spektrums keine eindeutige Zuordnung. Daher wurden nur die eindeutig bestimmbaren ^1H -Signale zugeordnet und aufgeführt. Den Signalintensitäten der zugeordneten ^1H -Signale zufolge liegt 2'-FL dabei zu etwa 41,7 % als α -Anomer und 58,3 % als β -Anomer der Glucose-Einheit vor. Die Strukturen der anomeren Formen von 2'-FL sind in Abbildung 3.1 dargestellt.

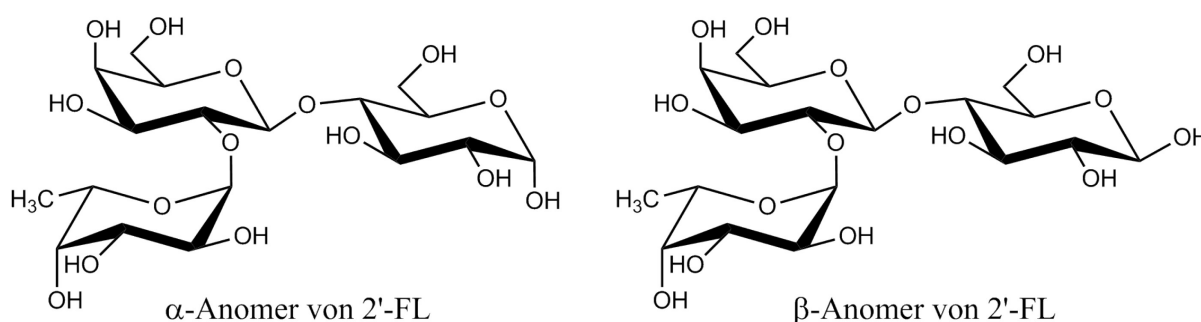


Abbildung 3.12: Strukturen des α - und β -Anomers von 2'-Fucosyllactose.

Tabelle 3.1: ^{13}C -NMR Daten der synthetisierten 2'-Fucosyllactose. ^[a]

| Glycosyl-Gruppe | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 |
|------------------------------|--------|----------------------|----------------------|-------|-------|-------|
| Glc (α) | 94,67 | 74,16 ^[b] | 74,13 ^[b] | 78,75 | 73,23 | 62,89 |
| Glc (β) | 98,75 | 76,78 | 77,16 | 78,63 | 78,17 | 63,02 |
| β 1,4Gal (α) | 103,07 | 79,14 | 76,45 | 72,02 | 78,07 | 63,99 |
| β 1,4Gal (β) | 103,11 | | | 72,00 | | 63,97 |
| α 1,2Fuc (α) | | | 72,50 | | 69,79 | 18,10 |
| α 1,2Fuc (β) | 102,19 | 71,02 | 72,47 | 74,52 | 69,76 | 18,13 |

^[a] ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz), aufgenommen in D_2O . Chemische Verschiebungen in ppm. TMS ($\delta = 0$ ppm) wurde als interner Standard verwendet.

^[b] Chemische Verschiebungen nicht eindeutig zugeordnet. Chem. Verschiebungen evtl. paarweise ausgetauscht.

3.2. 3-Fucosyllactose

Während für 2'-Fucosyllactose sowohl die Synthese als auch einige Effekte auf Säuglinge in verschiedenen Studien beschrieben wurden, sind die Effekte für dessen Konstitutionsisomer 3-FL bisher in deutlich weniger Studien dargestellt. Quantifiziert wurde 3-FL auf etwa $0,1 \text{ g l}^{-1}$ bis $2,4 \text{ g l}^{-1}$ in Muttermilch (Chaturvedi *et al.*, 2001; Kunz *et al.*, 1999; Leo *et al.*, 2009). Dabei scheint für die vorkommende Menge, ähnlich wie bei 2'-FL, vor allem der Genotyp der Mutter ausschlaggebend zu sein, sodass die Milch von Müttern mit Non-Secretor Status aufgrund der fehlenden $\alpha 1,2$ -Fucosyltransferase deutlich mehr 3-FL enthält als die Milch von Müttern mit Secretor Status (Urashima *et al.*, 2012b). Die bisher beschriebenen positiven Effekte von 3-FL beziehen sich vor allem auf den präbiotischen Effekt von 3-FL, sowie auf die Verhinderung der Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* und enteropathogenen *E. coli*, an humane Zelllinien (Perret *et al.*, 2005; Weichert *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2013b). Neben der Extraktion aus Muttermilch wurde die Synthese von 3-FL bereits auf chemischem und enzymatischem Wege sowie durch Ganzzell-Synthese in *E. coli* beschrieben (Dumon *et al.*, 2004; Fernandez-Mayoralas & Martin-Lomas, 1986; Sakurama *et al.*, 2012; Weston *et al.*, 1992).

Ziel dieses Teilprojekts war die Kombination der bereits zur Herstellung von 2'-FL generierten, GDP-L-Fucose synthetisierenden Stämmen mit einem chromosomal integrierten Gen, welches für eine $\alpha 1,3$ -Fucosyltransferase kodiert, um so 3-FL in einer Plasmid-freien Ganzzell-Synthese zu synthetisieren. Außerdem sollte 3-FL durch die enzymatische Spaltung von 3,2'-Difucosyllactose (LDFT) mittels einer spezifischen 1,2- α -L-Fucosidase synthetisiert werden, um auch diesen Syntheseweg zu erschließen.

3.2.1. Ganzzell-Synthese von 3-FL

Um die *in vivo* Synthese von 3-FL zu realisieren, sollte ein Stamm analog zu dem in Kapitel 3.1 beschriebenen Stamm *E. coli* JM109 gwBC-F1 erstellt werden. Anstelle des für 2'-FL verwendeten $\alpha 1,2$ -Fucosyltransferase-Gens diente jedoch ein $\alpha 1,3$ -Fucosyltransferase-Gen (*futA*) für die regio- und stereospezifische glycosidische Bindung der Fucosyl-Gruppe an die C3-Position der Glucose-Gruppe. Das dafür verwendete *H. pylori*-Gen *futA* lag bereits in einer für *E. coli* W3110 nach der Häufigkeit der Codon-Vorkommen in stark exprimierten Genen Codon-optimierten (<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/>; letzter Zugriff am 23.06.2016), synthetischen

Version in den pJF119ΔN kloniert vor (Albermann, persönliche Mitteilung, Genbank WP_000487428.1, Tabelle 2.2).

Eine erste Ganzzell-Synthese wurde mit dem Stamm JM109 gwBC pJF-futC in Minimalmedium mit Glycerin (10 g l⁻¹, Endkonz.) als Kohlenstoffquelle und Lactose (2 g l⁻¹, Endkonz.) als Substrat für die Produktbildung durchgeführt. Dabei konnten 3-FL-Konzentrationen von 18,70 mg l⁻¹ bzw. 22,07 mg l⁻¹ 24 h bzw. 48 h nach Induktion erreicht werden. Die Retentionszeit von der mit Anthranilsäure derivatisierten gebildeten 3-FL und des derivatisierten 3-FL Standards bei der Analyse mittels reversed-phase HPLC unterschied sich von der Retentionszeit des derivatisierten 2'-FL Standards um 3,9 min. Dies entspricht unter der Annahme einer Durchflusszeit (Totzeit) t_0 von 2,8 min den Retentionsfaktoren k' von 4,85 (3-FL) bzw. 6,24 (2'-FL), was eine deutliche Unterscheidung beider Produkte mit deutlicher Basislinientrennung der Signale erlaubte. Die Retentionszeit des Signals der gebildeten 3-FL entsprach dabei der des kommerziellen Standards.

Die weiteren Stammkonstruktionen und Untersuchungen der Ganzzell-Synthese von 3-FL wurden im Rahmen einer Diplomarbeit von Lukas Jurzitza durchgeführt. Dabei konnte der Plasmid-freie Synthesestamm JM109 gwBC-futA-cat durch chromosomale Integration erstellt werden. Dieser zeigte in Schüttelkolbenversuchen 24 h nach Induktion mit $5,2 \pm 1,0$ mg l⁻¹ jedoch nur 18 % des 3-FL-Titers des Plasmid-tragenden Stamms JM109 gwBC pJF-futA, welcher in zwei unabhängigen Kulturen einen 3-FL-Titer von $28,3 \pm 0,03$ mg l⁻¹ aufwies (Jurzitza, 2013). Das Wachstum dieser Stämme war dabei mit maximalen Wachstumsraten von $0,47 + 0,02$ h⁻¹ (chromosomal integriert) bzw. $0,50 \pm 0,01$ h⁻¹ (mit Plasmid) vergleichbar mit den Wachstumsraten der 2'-FL produzierenden Stämmen und führte, in Kombination mit den Produkttitern zu Produktausbeuten je Biomasse von $Y_{P/X} = 1,6 \pm 0,02$ mg g_{BTM}⁻¹ bzw. $11,1 \pm 1,11$ mg g_{BTM}⁻¹ ohne bzw. mit Plasmid (Jurzitza, 2013). Zurückzuführen sind diese geringeren Synthesen vermutlich auf eine geringere Enzymaktivität, höhere K_m -Werte für Lactose von FutA im Vergleich zu FutC oder den fehlenden Export des Produkts, da der Stamm bis auf diese Faktoren dem 2'-FL synthetisierenden Stamm sehr ähnlich ist. Im Gegensatz zur Synthese von 2'-FL konnte die gebildete 3-FL dabei lediglich in den Zellfraktionen der Kulturen nachgewiesen werden.

Zur Bestimmung der Syntheseleistung des Stammes JM109 gwBC-futA-cat unter enger definierten Bedingungen wurde analog zu dem Vorgehen in der 2'-FL-Synthese eine Zulaufkultivierung in 10 Liter-Maßstab mit den Substraten Glycerin und Lactose durchgeführt. Dabei konnte ein 3-FL-Titer von 440 mg l⁻¹ erreicht werden und die 3-FL Ausbeute je Biotrockenmasse im Vergleich zu den Schüttelkolben-Versuchen etwa um Faktor 4 auf 6,5 mg g_{BTM}⁻¹ gesteigert werden. Der Produktanteil im Kulturüberstand betrug zu Prozessende, anders als in den Schüttelkolbenversuchen, 25 % (Jurzitza, 2013). Eine Produktisolierung und strukturelle Verifikation via NMR-Spektroskopie wurde nicht durchgeführt, da die für die Synthese von 3-FL eingesetzte α 1,3-Fucosyltransferase bereits *in vitro* und *in vivo* als regio- und stereospezifisch beschrieben wurde (Dumon *et al.*, 2004; Ge *et al.*, 1997).

3.2.2. Enzymatische Synthese von 3-FL aus 3,2'-Difucosyllactose

Die in Abschnitt 3.2.1 beschriebene Ganzzell-Synthese von 3-FL, war in den Produkttitern und Ausbeuten deutlich geringer als die Ganzzell-Synthese von 2'-FL. Daher wurde neben der Ganzzell-Synthese ein weiterer neuer Weg der 3-FL Darstellung aufgezeigt, welche auf der Spaltung von 3,2'-Difucosyllactose (auch: Lactodifucotetraose, LDFT) basiert. LDFT ist ebenfalls ein humanes Milcholigosaccharid, welches in verschiedenen Studien mit etwa 0,17 mg l⁻¹ bis 0,43 mg l⁻¹ in Muttermilch quantifiziert wurde und somit in geringeren Konzentrationen in Muttermilch vorkommt als die Trisaccharide 2'-FL und 3-FL (Chaturvedi *et al.*, 2001; Thurl *et al.*, 1996). Dabei sollte vor allem die Machbarkeit der selektiven enzymatischen Spaltung von LDFT zu 3-FL und L-Fucose demonstriert werden, noch keine effiziente Synthese von LDFT beschrieben ist und LDFT in Ganzzellsynthesen bisher nur in einer Patentanmeldung als Nebenprodukt der 2'-FL-Synthese beschrieben ist (Matwiejuk *et al.*, 2015). Zur Spaltung von LDFT wurde das literaturbeschriebene und durch Christoph Albermann unter die Kontrolle eines P_{tac}-Promotors in einem pJF119EH Derivat klonierte Gen *afcA* aus *Bifidobacterium bifidum* JCM1254 (GenBank AY303700.1) verwendet. Das mit dem Gen kodierte Protein AfcA wurde bereits als spezifische 1,2- α -L-Fucosidase beschrieben und auf dessen Aktivitätsspektrum ausführlich untersucht (Ashida *et al.*, 2009; Katayama *et al.*, 2004). Die Beschreibung einer Fucosidase-Aktivität mit dem Substrat LDFT konnte jedoch in der bestehenden Literatur nicht gefunden werden und sollte in diesem Projekt untersucht werden. Hierzu wurde der Stamm DH5 α mit dem *afcA*-tragenden Plasmid pCAS4 versehen, in LB Medium angezogen, durch IPTG (1 mM, Endkonz.) induziert, 4 h

nach Induktion geerntet und die zellfreien Extrakte der Zellen für qualitative *in vitro* Umsetzungen eingesetzt. Dabei zeigten erste Analysen mittels Dünnschichtchromatographie bei Ansätzen mit den Substraten 2'-FL bzw. LDFT vollständige Umsetzungen zu Lactose und L-Fucose bzw. 3-FL und L-Fucose. Somit konnte demonstriert werden, dass AfcA auch LDFT als Substrat akzeptiert. Die Negativkontrollen mit zellfreien Extrakten des Stammes ohne *afcA* wiesen keine Umsetzungen auf und die gebildete Lactose wurde ebenfalls nicht weiter umgesetzt. Um die gebildete 3-Fucosyllactose genauer untersuchen zu können, wurden in zwei aufeinanderfolgenden Ansätzen 20 mg bzw. 25,7 mg LDFT in 2 h bzw. 4 h vollständig umgesetzt und anschließend via BioGel P2 Gelfiltrationschromatographie isoliert. Die dabei nach Lyophilisation entstandenen 28,8 mg 3-FL wiesen keine weiteren Produkte auf nach HPLC-Analyse der Anthranilsäure-Derivate. Unter der Annahme, dass die gewonnene 3-FL rein vorliegt, entspricht diese Produktmenge 81,9 % der maximalen theoretischen Ausbeute (35,18 mg). Zur strukturellen Untersuchung der 3-FL wurden anschließend ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren aufgenommen, welche auf internes TMS ($\delta = 0$ ppm) referenziert wurden und mit bereits veröffentlichten Daten von 3-FL übereinstimmten (Ishizuka *et al.*, 1999). Die mittels dieser Referenzen annotierten chemischen Verschiebungen und Kopplungen sind in Abschnitt 2.7.6 und in Tabelle 3.2 aufgeführt und die aufgenommenen Spektren sind im Anhang in Abbildung A.4 und Abbildung A.5 dargestellt. Dabei wurden nur die chemischen Verschiebungen der Signale aufgeführt, die nicht überlagert sind und daher in den ^1H -NMR-Spektren eindeutig bestimmbar waren.

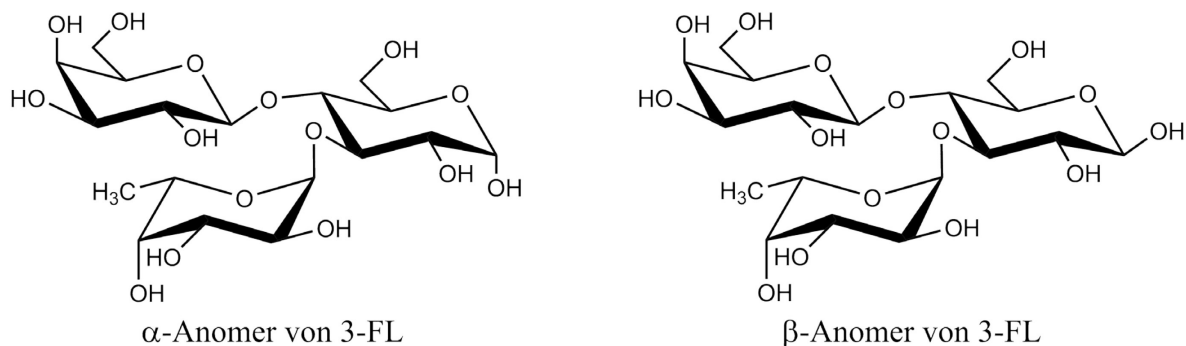


Abbildung 3.13: Strukturen des α - und β -Anomers von 3-Fucosyllactose.

Tabelle 3.2: ^{13}C -NMR Daten der synthetisierten 3-Fucosyllactose. ^[a]

| Glycosyl-Gruppe | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 |
|------------------------------|-----------------------|----------------------|-------|----------------------|-------|----------------------|
| Glc (α) | 94,90 | 75,58 | 77,56 | 74,81 | 73,76 | 62,64 |
| Glc (β) | 98,64 | 78,37 | 79,88 | 75,50 | 78,20 | |
| α 1,3Fuc (α) | 101,20 | 70,91 ^[c] | 72,11 | 70,87 ^[c] | 69,33 | 18,12 |
| α 1,3Fuc (β) | 101,33 | | 72,06 | | 69,30 | |
| β 1,4Gal (α) | 104,63 ^[b] | 74,00 | 75,24 | 71,17 | 77,77 | 64,38 ^[d] |
| β 1,4Gal (β) | 104,61 ^[b] | | | | | 64,34 ^[d] |

^[a] ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) aufgenommen in D_2O . Chemische Verschiebungen in ppm. TMS ($\delta = 0$ ppm) wurde als interner Standard verwendet.

^[b] - ^[d] Chemische Verschiebungen nicht eindeutig zugeordnet. Chem. Verschiebungen evtl. paarweise ausgetauscht.

Teil II Synthese weiterer HMO-Kernstrukturen

Neben Fucosyllactosen enthält Muttermilch, wie in Abschnitt 1.1.3 beschrieben, eine Vielzahl weiterer Oligosaccharide. Um einige dieser Verbindungen erschließen zu können, ist neben der Fucosylierung auch die Bereitstellung von weiteren Kernstrukturen notwendig. Diese kommen sowohl unverändert als auch in fucosylierten und sialylierten Formen in Muttermilch vor und bestehen aus mehr Zuckereinheiten als mono-fucosylierte Lactose. Aus diesem Grund waren diese Verbindungen sowohl chemisch als auch enzymatisch bisher nur unter größerem Aufwand herzustellen (Han *et al.*, 2012) und sind bisher als Reinsubstanzen nur in wenigen Studien auf ihre physiologischen Eigenschaften untersucht. Die zwei neben Lactose in Muttermilch am stärksten vertretenen HMO-Kernstrukturen Lacto-N-tetraose (LNT) und Lacto-N-neotetraose (LNnT), welche sich als Konstitutionsisomere in der Bindungsposition der Galactose am nicht-reduzierenden Ende unterscheiden, sollten daher ebenfalls in Plasmid-freier Ganzzell-Synthese in *E. coli* synthetisiert werden. Das Hauptaugenmerk wurde dabei auf die Synthese von LNT gerichtet, da eine bakterielle Ganzzell-Synthese dieses Oligosaccharids in der wissenschaftlichen Literatur nicht identifiziert werden konnte.

3.3. Lacto-N-tetraose (LNT)

Als dominanteste HMO-Kernstruktur neben Lactose liegt Lacto-N-tetraose in freier Form mit etwa 0,5 bis 3,9 g l⁻¹ und in verschiedenen fucosylierten Formen in Summe mit deutlich über einem g l⁻¹ in Muttermilch vor (Chaturvedi *et al.*, 2001; Leo *et al.*, 2009). Dies stellt eine Besonderheit humaner Milch dar, da in bisherigen Studien keine Milch anderer Säugetiere identifiziert werden konnte, in der LNT ebenfalls als dominante Kernstruktur vorkommt (Urashima *et al.*, 2012b). In Studien, die mit aus Muttermilch isolierter LNT durchgeführt wurden, konnte ein präbiotischer Effekt durch das Wachstum verschiedener *Bifidobacterium* Stämme demonstriert werden, wobei die enzymatische Spaltung von LNT bei einigen Stämmen intrazellulär und bei anderen Stämmen extrazellulär vor der Aufnahme erfolgt (Asakuma *et al.*, 2011; Yoshida *et al.*, 2012). Analog zu anderen HMOs ist die Isolierung von LNT aus Muttermilch möglich, aber aufwändig (Bao *et al.*, 2013; Kuntz *et al.*, 2008). Daher wurde LNT bereits in verschiedenen Studien chemisch, chemo-enzymatisch oder enzymatisch synthetisiert (Aly *et al.*, 1999; Murata *et al.*, 1999; Yao *et al.*, 2015). Die dabei benötigten

Schutzgruppen und zahlreichen Prozessschritte in der chemischen und chemoenzymatischen Synthese, sowie die unvorteilhaften Reaktionsgleichgewichte und Selektivitäten in der enzymatischen Synthese via Transglycosylierung limitieren diese Prozesse in ihrer Effizienz. Ähnlich der 2'-FL-Synthese wurden daher in der Ganzzell-Synthese von LNT auch Leloir-Glycosyltransferasen eingesetzt, welche die von der Zelle bereitgestellten Nukleotid-aktivierten Zucker für die spezifische Glycosylierung nutzen. Dabei wurden Lactose und UDP-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) zuerst mittels β 1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase zum Trisaccharid Lacto-N-triose II umgesetzt. Dieses diente anschließend als Substrat für eine β 1,3-Galactosyltransferase für die Umsetzung mit UDP-Galactose (UDP-Gal) zum Tetrasaccharid LNT (Abbildung 3.14).

3.3.1. Anpassung der Oligosaccharid-Analytik

Um die gewünschten Produktbildungen analysieren zu können, sollte vor den Syntheseversuchen neben den kommerziellen Standards für Lactose und LNT auch LNT II mittels HPLC identifiziert und analysiert werden. Da hierfür jedoch kein Standard vorlag, wurde ein LNT II Standard durch die Spaltung von LNnT (141 nmol) mittels kommerzieller β -Galactosidase (LacZ aus *E. coli*) erstellt, wobei ein via HPLC verfolgter, vollständiger Umsatz des LNnT erreicht wurde. Bei der eingesetzten reversed-phase (RP) HPLC Methode, die bereits zuvor für die Analyse von Fucosyllactosen verwendetet wurde, zeigte das gebildete LNT II jedoch die gleiche Retentionszeit wie Lactose. Daher wäre die später erwünschte Analyse der LNT II-Bildung aus Lactose nicht möglich gewesen, was die Anpassung der Methode notwendig machte.

Unter Verwendung des hergestellten LNT II Standards und der kommerziell erworbenen Standards von Lactose und LNT konnte eine isokratische reversed-phase HPLC Methode entwickelt werden, die eine Trennung der Anthranilsäure-Derivate von Lactose, LNT II und LNT erlaubte. Unter der Annahme einer Durchflusszeit (Totzeit) t_0 von 2,8 min ergaben sich die Retentionsfaktoren k' von 3,83 (Lac), 3,64 (LNT II), 3,49 (LNT) und 3,40 (LNnT). Somit konnten ausreichende Trennungen von Di-, Tri- und Tetrasaccharid sowie deren fucosylierter Derivate erreicht werden (s. Anhang A.3, Abbildung A. 31)

Die zeitgleiche Modifikation der Derivatisierungsmethode erlaubte den Verzicht auf Natriumcyanoborhydrid, da fortan 2-Picolinboran als schwaches Reduktionsmittel verwendet wurde (Ruhaak *et al.*, 2010). Dabei zeigte ein Vergleich beider Derivatisierungsmethoden, dass die Methode mit 2-Picolinboran etwa den gleichen

linearen Messbereich aufwies wie die bisherige Methode (Abschnitt 2.7.3.). Das Bestimmtheitsmaß einer 4-Punkt-Standardgerade mit Lactose lag bei $R^2 = 0,9951$. Selbst eine Lactose-Konzentration, welche um Faktor 10 über der höchsten Konzentration der Standardgerade lag, zeigte im Vergleich zu der vorverdünnten Kontrolle einen Fehler von lediglich 13,65 %. Da für LNT II lediglich der selbst aus LNnT hergestellte Standard mit undefiniertem Reinheitsgrad vorlag und Oligosaccharide verschiedener Längen zu vergleichbaren Fluoreszenzsignalen führen (Ruhaak *et al.*, 2010; Abschnitt 2.7.3) erfolgte die Quantifizierung im Vergleich zum Lactose-Standard. Analog zu LNT II und Lactose erwiesen sich auch die Signale der kommerziellen Standards von LNT und Lactose als fast identisch (Abschnitt 2.7.3).

Anpassungsversuche des für die Fucosyllactosen verwendeten Dünnschichtchromatographie-Laufmittels zielten ebenfalls auf eine Verbesserung der Trennung von Lac, LNT II und LNT ab, sollten aber auch eine schnellere Auftrennung der Oligosaccharide ermöglichen, um die Geschwindigkeit der Produktanalytik, im Besonderen bei Bioreaktorkultivierung, zu erhöhen. Dabei wurde mit einer an zwei bereits beschriebenen Laufmittelzusammensetzungen angelehnten Methode (Stein *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2007) im Vergleich zur bisherigen Methode keine deutliche Verbesserung der Retentionsfaktor-Verteilung, jedoch eine um etwa 20 % schnellere Auftrennung und schärfere Signale erreicht. Die Retentionsfaktoren der für die Analyse von Fucosyllactosen und größeren Kernstrukturen verwendeten Laufmittel sind im Anhang in Tabelle A.15 dargestellt.

3.3.2. Stammkonstruktion zur Synthese von Lacto-N-triose II (LNT II)

Als Ausgangsstamm für die Konstruktion des Plasmid-freien LNT-Produzenten wurde *E. coli* LJ110 gewählt (Zeppenfeld *et al.*, 2000). Dieser bietet die Vorteile, dass er im Gegensatz zum Stamm JM109 nicht über ein Fertilitätsplasmid verfügt und daher gänzlich Plasmid-frei ist, und dass er über ein intaktes *recA-Gen* verfügt. Das Gen *recA* kodiert für die RecA-Rekombinase, welche ein Bestandteil des SOS-Reparatursystems von *E. coli* ist und in Versuchen zur homologen Rekombination mittels λ -Red System die im Projekt erwünschte chromosomale Integration von Genen vereinfachte (Yu *et al.*, 2000). Da *E. coli* LJ110 im Gegensatz zu JM109 jedoch über ein intaktes *lac*-Operon verfügt und die in *lacZ* kodierte β -Galactosidase das Substrat Lactose spaltet, war eine Deletion zumindest dieses Gens nötig. Um auch eine mögliche Acetylierung der Lactose

durch das Protein des im *lac*-Operon vorkommenden Gens *lacA* auszuschließen (Lewendon *et al.*, 1995), sollte dieses ebenfalls deletiert werden, wodurch in Operon mit *lacZYA* lediglich das Lactose-Permease-Gen *lacY* als benötigtes Gen verbleiben würde. Da das Lactose-Permease-Gen *lacY*, welches bereits zuvor rekombinant in *E. coli* exprimiert werden konnte (Teather *et al.*, 1978), vor Projektbeginn durch Christoph Albermann aus *E. coli* K-12 isoliert und funktionell in den pJF119EH Expressionsvektor kloniert wurde und obige Deletionen das chromosomal vorliegende *lacY* flankieren würden, wurde das gesamte *lac*-Operon durch Integration eines β 1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase-Gens *lgtA* disruptiert und *lacY* an anderer Stelle chromosomal integriert. Der dabei entstandene Produzent von LNT II wurde anschließend als Ausgangsstamm für die Synthese von LNT bzw. LNnT eingesetzt und mit dem Gen einer β 1,3- bzw. β 1,4-Galactosyltransferase ausgestattet (Tabelle 2.1., Abbildung 3.16).

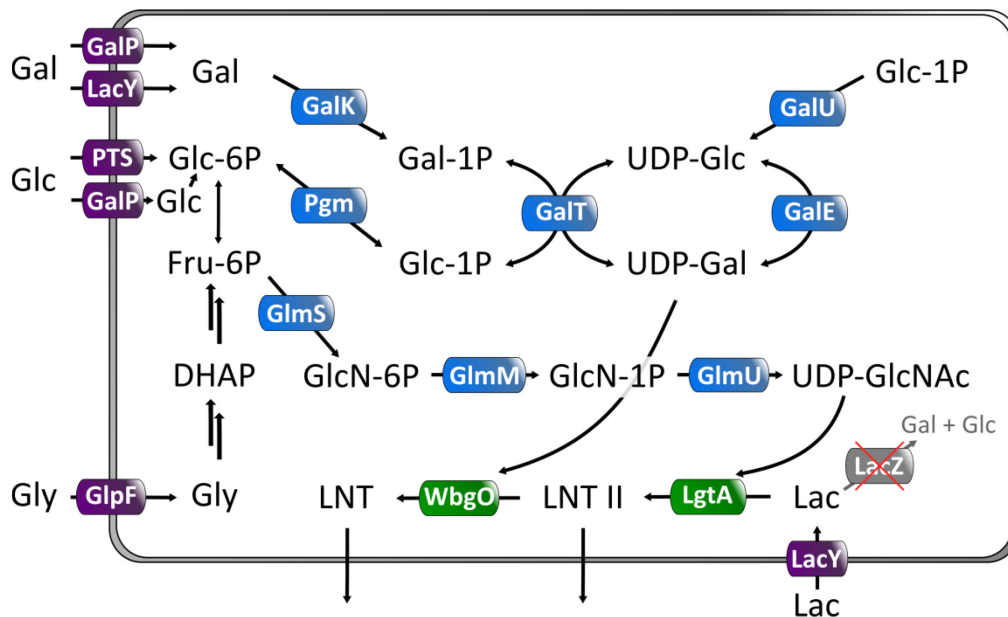


Abbildung 3.14: Stoffwechselwege zur Ganzzell-Synthese von Lacto-N-tetraose in *E. coli* unter Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen. Die zur Synthese von LNT aus Lactose benötigten UDP-aktivierten Zucker können von *E. coli* aus verschiedenen Kohlenstoffquellen synthetisiert werden (Aufnahmesysteme in violett). Genutzt werden diese durch rekombinante Glycosyltransferasen (Enzyme grün hinterlegt) zur Synthese von LNT. In anderer Form bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2015b).

Für die Synthese von LNT II wurde das bereits literaturbeschriebene Gen *lgtA* aus *Neisseria meningitidis* verwendet, welches die gewünschte β 1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase LgtA kodiert und bereits für die Ganzzell-Synthese von LNnT eingesetzt wurde (Blixt *et al.*, 1999; Priem *et al.*, 2002; Wakarchuk *et al.*, 1996). Das Gen wurde in einer synthetischen, Codon-optimierten Variante ohne homopolymeren Bereich bestellt, um einer genetischen Instabilität entgegenzuwirken. Bei dem homopolymeren Bereich mit 14 aufeinanderfolgenden Guanosin-Nukleotiden kann

demnach eine im Synthesestamm unerwünschte Phasen-variablen Expression des Gens erfolgten, welche auf Leserahmen-verändernden Mutationen durch einen „Slipped-Strand“ Fehlpaarungs-Mechanismus erfolgt (Jennings *et al.*, 1995). Nach der erfolgreichen Klonierung von *lgtA* in den Expressionsvektor pJFK-*lgtA* konnte dessen Expression in LJ110 demonstriert werden, wobei sich eine schwache lösliche Expression, jedoch auch die Akkumulation von unlöslichem Protein zeigte, wie in Abbildung 3.15 dargestellt.

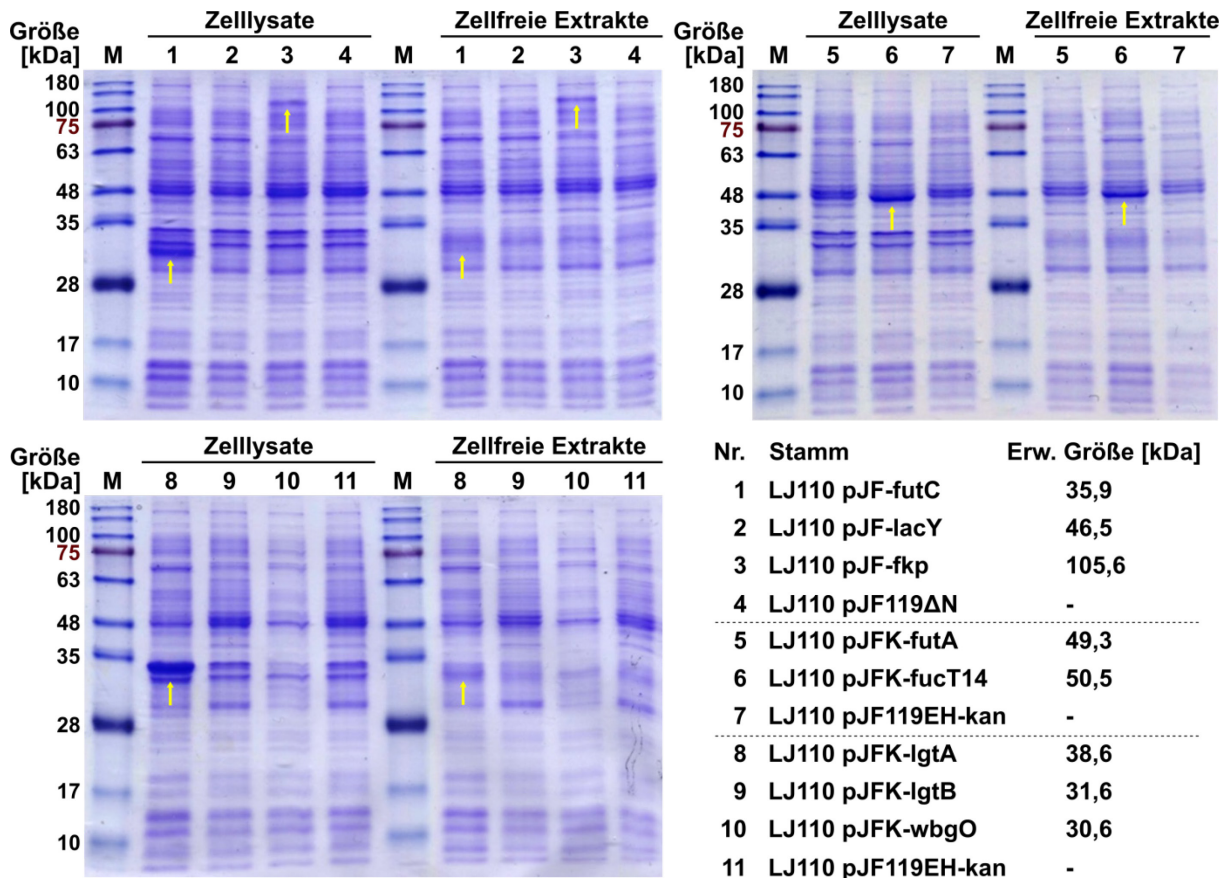


Abbildung 3.15: Expressionsanalyse der Plasmid-kodierten, rekombinant in *E. coli* LJ110 genutzten Gene. Analyse der Expressionen in LB-Medium jeweils 4 h nach Induktion durch IPTG (1 mM, Endkonz.) mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. Dargestellt sind jeweils das Zelllysate nach dem Zellaufschluss sowie das zellfreie Extrakt (lösliche Fraktion) nach Zentrifugation des Zelllysats. Zur Größenindikation wurde der Proteinstandard (M) BlueStar Prestained Protein Marker (Nippon Genetics) verwendet. Banden erkennbarer, rekombinanter Expressionsprodukte mit gelben Pfeilen markiert.

Da die Aktivität von *LgtA* bei Expression in *E. coli* sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bereits wissenschaftlich beschrieben wurde (Blixt *et al.*, 1999; Priem *et al.*, 2002) und im Vergleich zu dem dort eingesetzten Gen in diesem Projekt lediglich die Codon-Optimierung des Gens erfolgte, sollte der Nachweis der Aktivität direkt in einem *in vivo* Versuch durchgeführt werden. Dieser wurde mit dem Plasmid pJFK-*lgtA* im β -Galactosidase-negativen, aber Lactose-Permease-positiven Stamm *E. coli* JM109 in Schüttelkolben bei 37 °C durchgeführt. Dabei konnte in Minimalmedium mit Glycerin

(10 g l⁻¹, Endkonz.) und Lactose (2 g l⁻¹, Endkonz.) nach 24 h bereits eine Produktbildung von etwa 673,5 mg l⁻¹ LNT II nachgewiesen werden, wovon sich etwa 93,4 % im Kulturüberstand befanden. In einer späteren Kultur im 200 ml Maßstab konnten diese Größenordnungen bestätigt werden, indem etwa 688,8 mg l⁻¹ LNT II synthetisiert wurde und sich dabei 97,3 % des Produkts im Kulturüberstand befanden. In beiden Versuchen zeigte der Stamm mit Leerplasmid pJF119EH-kan keine Bildung von LNT II. Da somit die Funktionalität des Codon-optimierten Gens *lgtA* bestätigt war, wurde mit der Stammkonstruktion basierend auf *E. coli* LJ110 begonnen.

Nach der Erstellung des Plasmids pJFK-*lgtA*-FRT-cat-FRT durch Ligation der Resistenzkassette FRT-cat-FRT in das Plasmid pJFK-*lgtA* konnte die Expressionskassette P_{tac}-*lgtA*-FRT-cat-FRT chromosomal in den Stamm LJ110 integriert werden bei gleichzeitiger Deletion des *lac*-Operons. Dabei entstand der Stamm LJ-A-cat (Abbildung 3.16, Tabelle 2.1). In Kombination mit dem durch Christoph Albermann erstellten Lactose-Permease kodierenden Plasmids pJF-*lacY* zeigte dieser Stamm in ersten Schüttelkolben-Versuchen nach 24 h die Bildung von etwa 125,4 ± 24,9 mg l⁻¹ LNT II, während in der Kontrolle ohne Lactose-Permease keine LNT II detektiert wurde. Eine verstärkte Expression von *lacY* durch das zusätzliche Einbringen von pJF-*lacY* in den Stamm LJ110 konnte mittels SDS-PAGE nicht nachgewiesen werden, wie in Abbildung 3.15 dargestellt. Dank des indirekten Aktivitätsnachweises des Plasmid-kodierten Gens *lacY* durch die Bildung von LNT II in LJ-A-cat wurde dies jedoch auch nicht für nötig erachtet.

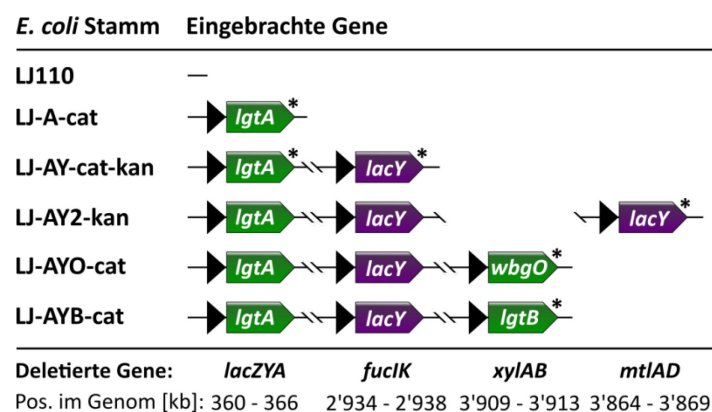


Abbildung 3.16: Genotypen einer Auswahl der zur Synthese von Lacto-N-triose II, Lacto-N-tetraose und Lacto-N-neotetraose erstellten, Plasmid-freien Stämme. Eingebrachte Gene in farbigen Pfeilen mit den dabei deletierten Zuckerdegradations-Genen und deren Positionen auf dem LJ110 Chromosom darunter (Hayashi *et al.*, 2006; Tatusova *et al.*, 2014). Die Positionsangaben sind jeweils so auf- bzw. abgerundet, dass die Gene von dem angegebenen Bereich komplett eingeschlossen sind. Glycosyltransferasen kodierende Gene sind grün dargestellt. Alle rekombinant eingebrachten Gene stehen unter Kontrolle jeweils eines P_{tac}-Promotors. Sterne markieren die Gene, deren jeweilige Expressionskassetten noch ein Antibiotikaresistenz-Gen enthalten (s. Tabelle 2.1).

Nach diesem indirekten Aktivitätsnachweis wurde das Plasmid pJF-lacY ebenfalls mit einer Resistenzkassette versehen und somit das Plasmid pJF-lacY-FRT-kan-FRT erstellt. Die somit erstellte Expressionskassette wurde zur chromosomalen Integration von ein bzw. zwei Kopien von *lacY* in den Stamm LJ-A-cat eingesetzt, um die Stämme LJ-AY-cat-kan bzw. LJ-AY2-kan zu konstruieren. Da dabei in der integrierten Expressionskassette anstelle der für die Integration von *lgtA* verwendeten Chloramphenicol-Resistenz eine Kanamycin-Resistenz verwendet wurde, konnte die Integration ohne vorheriges Entfernen der Chloramphenicol-Resistenz durchgeführt werden. Vor der Integration der zweiten Kopie von *lacY* wurden jedoch beide Resistenzgene entfernt, um den Integrationsvorgang mit Selektion auf Kanamycin-Resistenz wiederholen zu können.

3.3.3. Lactose-Aufnahme

Um anschließend die Lactose-Permease-Aktivität direkter nachzuweisen und den Effekt einer zweiten Kopie des Gens *lacY* abschätzen zu können, wurden Lactose-Aufnahme-Untersuchungen mit ¹⁴C-markierter Lactose durchgeführt, wie in Abschnitt 2.3.5 beschrieben. Hierbei wurden die konstruierten Stämme im Vergleich zu *E. coli* JM109 in Minimalmedium auf ihre Lactose-Aufnahme untersucht (Abbildung 3.17). Dabei zeigte sich in den zwei separaten Untersuchungen mit verschiedenen Zeitspannen einerseits, dass der Stamm LJ-AY2-kan über eine etwas höhere Lactose-Aufnahmerate verfügt als der Stamm JM109, andererseits jedoch auch, dass die Stämme LJ-AY-cat-kan und LJ-AY2-kan über sehr ähnliche Aufnahmeraten verfügen und die zweite Kopie des *lacY*-Gens nur einen geringen Zuwachs der Aufnahmerate verursacht (Abbildung 3.17 B).

Die ermittelten Werte für Lactose des Kontrollstamms LJ-A-cat in beiden Analysen sind dabei vermutlich auf das Anheften von Lactose an die Zellen und den verwendeten Filter zurückzuführen und sind über den in Abbildung 3.17 A dargestellten, längeren Analysezeitraum nach den ersten 60 Sekunden relativ stationär. Da bei den Lactose-Aufnahmetests der Stämme mit Lactose-Permease maximal 15,3 % der vorgelegten Lactose aufgenommen wurden, ist die Verringerung der Aufnahmerate beim Stamm LJ-AY2-kan nach etwa 120 Sekunden wohl auf die Sättigung der Zellen mit Lactose und nicht auf eine Limitierung durch die verfügbare Lactose zurückzuführen.

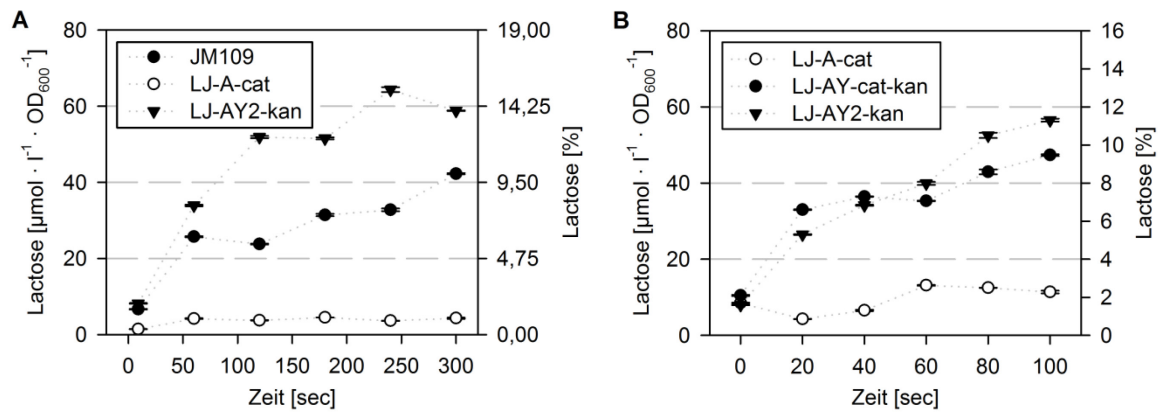


Abbildung 3.17: Lactose-Aufnahme verschiedener Stämme mit und ohne Lactose-Permease-Gen. Lactose-Aufnahme je Volumen und Zellmenge bzw. je gesamter im Ansatz vorhandener Lactose. Analyse mittels ¹⁴C-markierter Lactose und Szintillationsmessung mit in Minimalmedium mit Glycerin und IPTG (0,5 mM, Endkonz.) angewachsenen Zellen (s. Abschnitt 2.3.5.). Durchführung jeweils im einfachen Ansatz. Fehlerbalken geben den analytischen Fehler der Szintillationsmessung aus mindestens 2 aufeinanderfolgenden Messungen der gleichen Proben an. **A)** Vergleich der *E. coli* Stämme JM109, LJ-A-cat und LJ-AY2-kan über den Zeitraum von 5 Minuten. Beendigung der Aufnahme jeweils durch Filtration des Ansatzes und Waschen des Filters. **B)** Vergleich der auf *E. coli* LJ110 basierenden Stämme ohne (LJ-A-cat) mit einer (LJ-AY-cat-kan) bzw. mit zwei (LJ-AY2-kan) Kopien des Gens *lacY*. Bestimmung über den Zeitraum von 100 Sekunden und Beendigung der Aufnahme jeweils durch Zugabe einer LiCl-Lösung und anschließende Filtration, modifiziert nach Smirnova & Kaback, 2003.

In einem einfach durchgeführten Ansatz zum Vergleich der Synthese von LNT II in Minimalmedium zeigte der Stamm LJ-AY2-kan 15 h bzw. 24 h nach Induktion nur etwa 60,2 % bzw. 58,8 % der LNT II-Titer des Stammes LJ-AY-cat-kan. Aufgrund des in diesen einfach durchgeführten Versuchen angedeuteten geringen Unterschieds in der Lactose-Aufnahmerate zwischen LJ-AY-cat-kan und LJ-AY2-kan und der stärkeren Produktbildung von LJ-AY-cat-kan wurde der Stamm LJ-AY-cat-kan für weitere Klonierungen verwendet. Dabei sollte mit nur einer *lacY* Kopie eine potentiell stärkere Expression der ebenfalls unter der Kontrolle von P_{tac}-Promotoren stehenden Glycosyltransferase-Gene ermöglicht werden. Eine weitere Verstärkung der Lactose-Aufnahme und LNT II-Synthese stand dabei nicht im Fokus der Arbeit, da bei den ersten Schüttelkolben-Versuch mit dem Stamm LJ-AY-cat-kan über 1 g l⁻¹ LNT II produziert wurde, etwa 87 % des LNT II im Kulturüberstand vorlag und keine Aussage darüber getroffen werden konnte, ob das extrazelluläre LNT II von den Zellen wieder aufgenommen werden kann. Wenn dieses nicht mehr aufgenommen werden kann, so steht es den Zellen nicht für die weitere intrazelluläre Umsetzung zum HMO LNT zur Verfügung. In diesem Fall wären ausgeglichene enzymatische Aktivitäten in der Synthese von LNT II und der Verwertung von LNT II zur Bildung von LNT einer besonders hohen LNT II-Syntheserate und der extrazellulären Akkumulation von LNT II vorzuziehen.

3.3.4. Stammkonstruktion zur Synthese von Lacto-N-tetraose (LNT)

Die auf den Stamm LJ-AY aufbauende Synthese von LNT aus LNT II erfolgte durch den Einsatz des Gens *wbgO*. Dieses literaturbeschriebene Gen (Liu *et al.*, 2009) wurde im enteropathogenen Stamm *E. coli* O55:H7 identifiziert und dessen rekombinant in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiertes und isoliertes Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein wies die gewünschte β 1,3-Galactosyltransferase-Aktivität an einem Benzylglycosid von Lacto-N-tetraose II auf, welches als Akzeptor-Substrat eingesetzt wurde.

Zur Verwendung in der Ganzzell-Synthese wurde das Gen *wbgO* in einer Codon-optimierten, synthetischen Version durch Christoph Albermann in den Vektor pJF119 Δ N eingebracht, um den Vektor pJF-*wbgO* zu erzeugen. Um das Gen auch auf dem Vektor mit Kanamycin-Resistenz vorliegen zu haben, wurde es anschließend auch in den pJFK-Vektor eingebracht und dessen Expression in *E. coli* LJ110 untersucht (Abbildung 3.15). Dabei konnte allerdings weder in der löslichen noch in der unlöslichen Fraktion eine Expression ausgemacht werden, sodass die *in vivo* Aktivität des Enzyms überprüft werden sollte, um die funktionelle Expression sicherzustellen. Hierzu wurden die Gene *lgtA* und *wbgO* jeweils in den Vektor pAW229 mit p15a-Replikationsursprung und Chloramphenicol-Resistenzgen kloniert (Wilms *et al.*, 2001b), um die Vektoren pAW-*lgtA* und pAW-*wbgO* zu erhalten. Diese mit den pJFK-Vektoren kompatiblen Vektoren wurde mit pJFK-*wbgO* bzw. pJFK-*lgtA* im Stamm JM109 kombiniert, um die funktionelle Expression von *wbgO* bereits während der Erstellung des Stammes LJ-AY zu überprüfen. Dabei zeigten die Stämme JM109 pAW-*lgtA* pJFK-*wbgO* und JM109 pJFK-*lgtA* pAW-*wbgO* in der HPLC Analyse im ersten Schüttelkolben-Versuch neben der Bildung von LNT II auch schwache Signale für LNT, während die Kontrollen mit dem jeweiligen Leerplasmid (pJF119EH-kan bzw. pAW229) keine solchen Signale aufwiesen. Somit wurde die Expression als funktionell gewertet und das Plasmid pJFK-*wbgO* mit der Chloramphenicol-Resistenzkassette versehen, um pJFK-*wbgO*-FRT-cat-FRT zu erzeugen. Dieses Plasmid war dann die Grundlage zur chromosomalen Integration der Expressionskassette mit *wbgO* in den Stamm LJ-AY, um somit den Plasmid-freien Synthesestamm LJ-AYO-cat (Abbildung 3.16) zu konstruieren.

3.3.5. Synthese von LNT II und LNT in Schüttelkolben-Kulturen

Zur Untersuchung der Syntheseleistung von LJ-AY-cat-kan und LJ-AYO-cat wurden die Stämme in Schüttelkolben in Minimalmedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen kultiviert. 24 h nach Induktion wurden die gebildeten Produkte mittels HPLC untersucht. Um den Transfer der dabei erhaltenen Ergebnisse in eine Zulaufkultur im Rührkesselreaktor zu erleichtern, wurde hierzu das Minimalmedium an das Satz-Medium der in Abschnitt 3.1.6 beschriebenen Kultivierung zur Synthese von 2'-FL angepasst (s. Abschnitt 2.1.3). Des Weiteren wurden die Kultivierungen bei einer Temperatur von 30 °C anstelle von 37 °C durchgeführt, da für LgtA *in vitro* ein Temperaturoptimum zwischen 20 °C und 30 °C ermittelt wurde (Blixt *et al.*, 1999) und für WbgO kein Temperaturoptimum literaturbeschrieben war. Übereinstimmend mit diesen Daten zeigte der Stamm LJ-AY-cat-kan in einfachen Kultivierungen in Schüttelkolben bei 37 °C mit Glycerin lediglich 1284,5 mg l⁻¹ LNT II 24 h nach Induktion und somit nur etwa 52 % der Produktmenge, die bei sonst gleichen Bedingungen bei 30 °C synthetisiert wurde.

Zur näheren Untersuchung der Produktbildung bei 30 °C wurden die Stämme LJ-AY-cat-kan und LJ-AYO-cat zuerst in Schüttelkolben mit Lactose als Substrat für die Produktbildung und Glycerin bzw. Glucose als Kohlenstoffquelle kultiviert. Der Vergleich dieser Kohlenstoffquellen sollte Aufschluss darüber geben, welche der Kohlenstoffquellen besser für die Synthese von LNT geeignet ist, da beide gewöhnlichen Kohlenstoffquellen gewisse nachteilige Eigenschaften besitzen. So besteht bei der Verwendung von Glucose der Effekt des Induktor-Ausschlusses (Abschnitt 1.4.2), welcher die gleichzeitige Aufnahme von Lactose durch LacY stark verringert (Nelson *et al.*, 1983), während bei der Verwendung von Glycerin intrazellulär Teile der Gluconeogenese durchlaufen werden müssen, um die Donorsubstrate UDP-GlcNAc und UDP-Gal zu generieren. Die in diesen Schüttelkolben zum Vergleich der Kohlenstoffquellen erhaltenen Produktkonzentrationen, Produktausbeuten je Biotrockenmasse und Produktausbeuten je Lactose sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

Dabei zeigte der Stamm LJ-AY-cat-kan mit Glucose als Kohlenstoffquelle eine maximale Wachstumsrate $\mu_{\max} = 0,33 \text{ h}^{-1}$ und synthetisierte $1,91 \pm 0,20 \text{ g l}^{-1}$ LNT II, wovon sich etwa 87 % im Kulturüberstand befanden. Mit Glycerin als Kohlenstoffquelle zeigte der Stamm zwar mit $\mu_{\max} = 0,28 \text{ h}^{-1}$ eine geringere Wachstumsrate, jedoch eine deutlich

stärkere Syntheseleistung mit $2,47 \pm 0,06 \text{ g l}^{-1}$ LNT II und auch deutlich höhere LNT II-Ausbeuten mit etwa $1 \text{ g LNT II je g Biotrockenmasse}$ (Baumgärtner *et al.*, 2014). Mit $953,2 \pm 100,4$ bzw. $1232,6 \pm 28,3 \text{ mg LNT II je g eingesetzter Lactose}$ für Glucose bzw. Glycerin wurden dabei $59,82 \pm 6,30 \%$ bzw. $77,34 \pm 1,78 \%$ der vorgelegten Lactose zu LNT II umgesetzt.

Tabelle 3.3: Produktausbeuten der Schüttelkolbenkulturen von *E. coli* LJ-AY-cat-kan und *E. coli* LJ-AYO-cat.^[a]

| <i>E. coli</i> Stamm | C-Quelle | Lacto-N-triose II | | | Lacto-N-tetraose | | |
|-------------------------|----------|-------------------------------|---|---|--------------------------------|--|---|
| | | Konz. [g l ⁻¹] | Ausbeute [mg g _{BTM} ⁻¹] ^[b] | Ausbeute [mg g _{Lac} ⁻¹] ^[c] | Konz. [mg l ⁻¹] | Ausbeute [mg g _{BTM} ⁻¹] | Ausbeute [mg g _{Lac} ⁻¹] ^[c] |
| LJ-AY- cat-kan | 1 % Glc | 1,91 ± 0,20 | 641,1 ± 11,3 | 953,2 ± 100,4 | - | - | - |
| | 1 % Glyc | 2,47 ± 0,06 | 997,7 ± 1,7 | 1232,6 ± 28,3 | - | - | - |
| LJ-AYO- cat | 1 % Glc | 1,89 ± 0,07 | 570,6 ± 15,2 | 944,8 ± 33,5 | 219,1 ± 3,5 | 66,2 ± 1,6 | 109,6 ± 1,7 |
| | 1 % Glyc | 2,09 ± 0,02 | 753,7 ± 17,6 | 1045,2 ± 11,1 | 162,1 ± 6,2 | 58,5 ± 3,0 | 81,1 ± 3,1 |

^[a] Kultivierung bei 30 °C und 90 rpm in Minimalmedium mit Glucose (Glc) oder Glycerin (Glyc, je 10 g l⁻¹, Endkonz.) als Kohlenstoffquelle und 2 g l⁻¹ Lactose als Substrat für die Produktbildung, durchgeführt jeweils in unabhängigen Duplikaten. Die angegebenen Werte wurden 24 h nach Induktion durch IPTG (0,5 mM, Endkonz.) bestimmt. Ergebnisse bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2014).

^[b] Die Produktausbeute je Biotrockenmasse von LJ-AY-cat-kan wurde bestimmt unter Verwendung der BTM/OD₆₀₀-Korrelationsfaktoren des Stammes LJ-AYO-cat, welche bestimmt wurden als 0,37 g l⁻¹ bzw. 0,30 g l⁻¹ für Medium mit Glucose bzw. mit Glycerin.

^[c] Substrat-Produkt-Ausbeuten von Lactose wurden berechnet für die gesamte vorgelegte Lactosemenge von 2 g l⁻¹.

Der Stamm LJ-AYO-cat wies mit $\mu_{\max} = 0,33 \text{ h}^{-1}$ bzw. $\mu_{\max} = 0,28 \text{ h}^{-1}$ für Glucose bzw. Glycerin in beiden Medien spezifische Wachstumsraten auf, die mit denen des Stammes LJ-AY-cat-kan vergleichbar waren. Dabei synthetisierte er mit $2,09 \pm 0,02 \text{ g l}^{-1}$ (90 % im Kulturüberstand) erneut mehr LNT II in Medium mit Glycerin als in Medium mit Glucose ($1,87 \pm 0,07 \text{ g l}^{-1}$, 87 % im Kulturüberstand). Die LNT II-Ausbeuten von $753,7 \pm 17,6 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ bzw. $570,6 \pm 15,2 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ für Glycerin bzw. Glucose sind somit etwas niedriger als die des Stammes LJ-AY-cat-kan, was vorwiegend auf den weiteren Umsatz von LNT II zu LNT zurückzuführen ist. So konnte in den Kulturen mit Glucose eine höhere LNT-Konzentration ($219,1 \pm 3,5 \text{ mg l}^{-1}$, 53 % im Kulturüberstand) erreicht werden als in den Kulturen mit Glycerin ($162,1 \pm 6,2 \text{ mg l}^{-1}$, 75 % im Kulturüberstand). Demnach schien die Verwendung von Glucose als Kohlenstoffquelle vorteilhafter für die Synthese von LNT, während Glycerin höhere LNT II-Syntheseleistungen bedingte. Unter Betracht des in LNT vorkommenden LNT II konnte die molare LNT II-Syntheseleistung mit dem Stamm LJ-AYO-cat im Vergleich zu dem Stamm LJ-AY-cat-kan mit Glucose um etwa 8 % gesteigert werden, während sie mit Glycerin um etwa 10 % gesunken ist. Der gesamte Umsatz von Lactose betrug dabei etwa 64 % für Glucose und etwa 69 % für Glycerin. Eine weitere Elongation von LNT zum Pentasaccharid durch LgtA, wie für die *in vivo*

Synthese von LNT beschrieben (Priem *et al.*, 2002), konnte bei der Synthese von LNT nicht beobachtet werden.

3.3.6. Intrazelluläre UDP-Galactose-Konzentrationen in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle

Die in Abschnitt 3.3.5 beschriebene Synthese von LNT zeigte die grundsätzliche Möglichkeit der Plasmid-freien Synthese von LNT in *E. coli* auf. Da dabei jedoch große Mengen LNT II synthetisiert und nicht zu LNT umgesetzt wurden, scheinen die Aktivität von WbgO oder die Bereitstellung von UDP-Gal oder diese beiden Faktoren limitierend für die LNT-Synthese zu sein. Um eine eventuelle Limitierung der UDP-Gal-Verfügbarkeit zu untersuchen, sollte der Leloir-Pathway zur Verwertung von Galactose verstärkt werden, um höhere UDP-Gal-Verfügbarkeit zu erreichen (Abbildung 3.14). Hierzu wurde jedoch nicht der genetische Hintergrund des Stammes LJ-AYO-cat modifiziert, sondern Galactose als Kohlenstoffquelle eingesetzt, da die Verwertung von Galactose durch *E. coli* über den Leloir-Pathway erfolgt und somit temporär das Intermediat UDP-Gal gebildet wird (Frey, 1996). Um den Effekt dieser Bildung von UDP-Gal zu untersuchen, wurden zuerst Schüttelkolbenversuche in Minimalmedien mit verschiedenen Kohlenstoffquellen durchgeführt und die intrazellulären Konzentrationen von UDP-aktivierten Zuckern in der späten exponentiellen Wachstumsphase mittels HPLC untersucht (s. Abschnitt 2.7.4). Dabei zeigten Kulturen, welche Galactose als Kohlenstoffquelle enthielten, mit $145,63 \pm 20,52 \text{ nmol l}^{-1} \text{ OD}^{-1}$ deutlich gesteigerte intrazelluläre Konzentrationen von UDP-Gal im Vergleich zu den Kulturen mit Glycerin ($45,87 \pm 17,42 \text{ nmol l}^{-1} \text{ OD}^{-1}$) bzw. Glucose ($65,73 \pm 5,63 \text{ nmol l}^{-1} \text{ OD}^{-1}$) als Kohlenstoffquelle (Abbildung 3.18; Baumgärtner *et al.*, 2015b). Die intrazellulären Konzentrationen von UDP-GlcNAc, welches als Donor-Substrat für die Synthese von LNT II benötigt wird, zeigten in den Kulturen mit Glucose ($334,03 \pm 3,41 \text{ nmol l}^{-1} \text{ OD}^{-1}$) eine um die Faktoren 2,4 und 3,6 höhere intrazelluläre Konzentration als die Kulturen mit Galactose ($140,31 \pm 20,73 \text{ nmol l}^{-1} \text{ OD}^{-1}$) und Glycerin ($91,84 \pm 1,12 \text{ nmol l}^{-1} \text{ OD}^{-1}$). Die dennoch stärkere Synthese von LNT II mit Glycerin als mit Glucose (s. Abschnitt 3.3.5) ist vermutlich auf die bessere Lactose-Aufnahme mit Glycerin in den in Abschnitt 3.3.5 beschriebenen Kulturen zurückzuführen. UDP-Glc, kann über die endogene UDP-glucose 4-epimerase zu UDP-Gal epimerisiert werden (Frey, 1996). Die intrazellulären Konzentrationen von UDP-Glc sind in den Kulturen mit Glucose bzw. Galactose mit $217,06 \pm 30,06 \text{ nmol l}^{-1} \text{ OD}^{-1}$ bzw. $240,85 \pm 1,81 \text{ nmol l}^{-1} \text{ OD}^{-1}$

in etwa gleich, während die Kulturen mit Glycerin mit $99,64 \pm 4,18 \text{ nmol l}^{-1} \text{ OD}^{-1}$ eine nur etwa halb so hohe Konzentration aufwiesen. Die niedrigeren Konzentrationen der UDP-aktivierten Zucker in Kulturen mit Glycerin sind vermutlich auf die zur Synthese benötigte Gluconeogenese zurückzuführen (Abbildung 3.14).

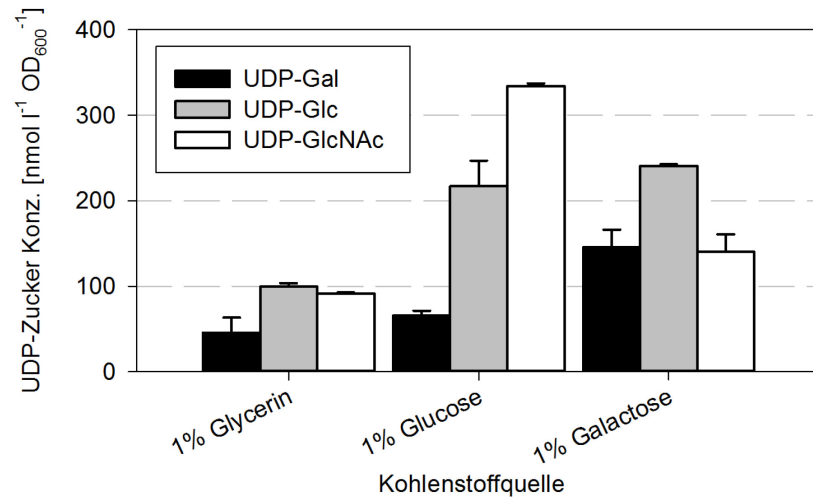


Abbildung 3.18: Intrazelluläre Konzentrationen Nukleotid-aktivierter Hexosen bzw. Hexosaminen im Stamm *E. coli* LJ-AYO-cat. Vergleich der intrazellulären UDP-Zucker-Konzentrationen im exponentiellen Wachstum in Minimalmedien mit den angegebenen Kohlenstoffquellen durchgeführt in unabhängigen Duplikaten. In anderer Form bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2015b).

3.3.7. Synthese von LNT in Schüttelkolben-Kulturen mit Galactose

Zur Untersuchung der Bildung von LNT unter Zugabe von Galactose wurde der Stamm *E. coli* LJ-AYO-cat analog zu dem Vorgehen in Abschnitt 3.3.5 in Schüttelkolben kultiviert. Dabei wurden jedoch das Kulturvolumen und die Größe der Schüttelkolben verdoppelt, neben Glycerin und Glucose auch Galactose als Hauptkohlenstoffquelle eingesetzt und in weiteren Kulturen mit Glycerin bzw. Glucose zum Zeitpunkt der Induktion mit IPTG (0,5 mM, Endkonz.) neben Lactose auch 2 g l^{-1} Galactose zugegeben. Dies geschah unabhängig von dem literaturbeschriebenen Effekt des Induktor-Ausschlusses (Nelson *et al.*, 1983), um auch die Kombinationen aus einer gängigen, kostengünstigen Kohlenstoffquelle und Galactose zu untersuchen.

Dabei zeigten die Kulturen mit Glycerin im Vergleich zu den Kulturen mit anderen Kohlenstoffquellen 24 h nach Induktion die höchste optische Dichte, gefolgt von den Kulturen mit Glucose und den Kulturen mit Glycerin und Galactose (Abbildung 3.19 A).

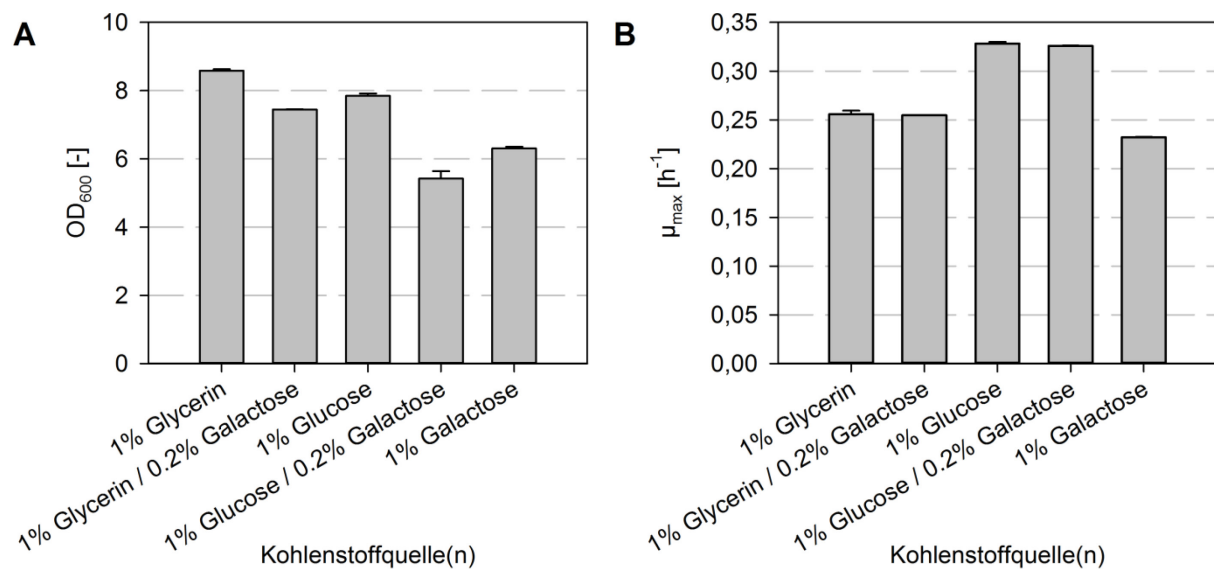


Abbildung 3.19: Wachstum von *E. coli* LJ-AYO-cat in Minimalmedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen. Schüttelkolben-Kulturen durchgeführt mind. in Duplikaten in Minimalmedium mit den angegebenen Kohlenstoffquellen und 0,2 g l⁻¹ Lactose. Lactose und, falls zutreffend, zusätzlich 0,2 g l⁻¹ Galactose wurden zugegeben zum Zeitpunkt der Induktion durch IPTG (0,5 mM, Endkonz.) bei einer optischen Dichte von 0,4 bis 0,6. **A)** Optische Dichte der Kulturen 24 h nach Induktion. **B)** Spezifische Wachstumsrate der Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase.

Mit einer optischen Dichte von $6,31 \pm 0,05$ zeigten die Kulturen, welche ausschließlich aus Galactose wuchsen, die geringste Biomasse 24 h nach Induktion. Die Kulturen mit Glucose bzw. Glucose und Galactose wiesen dabei das stärkste Wachstum in der exponentiellen Wachstumsphase auf (jeweils $\mu_{\max} = 0,33 \text{ h}^{-1}$) und übertrafen damit das für kleinere Kulturvolumina bestimmte Wachstum in Abschnitt 3.3.5 ($\mu_{\max} = 0,32 \text{ h}^{-1}$) marginal (Abbildung 3.19 B). Die Kulturen mit Glycerin bzw. Glycerin und Galactose (jeweils $\mu_{\max} = 0,26 \text{ h}^{-1}$), sowie die Kulturen ausschließlich mit Galactose ($\mu_{\max} = 0,23 \text{ h}^{-1}$) zeigten deutlich geringere Wachstumsraten. Die bei $OD_{600} = 0,4 - 0,6$ durchgeführte Induktion und Zugabe von Lactose sowie ggf. Galactose schien dabei keinen signifikanten Einfluss auf die Wachstumsraten zu haben. Die Wachstumsverläufe der Kulturen mit verschiedenen Kohlenstoffquellen sind im Anhang in Abbildung A.32 dargestellt. Der Biomasseausbeute-Koeffizient je Substrat für Galactose konnte anhand von Kulturen mit verschiedenen Galactose-Konzentrationen auf $Y_{X/S} = 0,36 \text{ g g}^{-1}$ bestimmt werden. Der Korrelationsfaktor von Biotrockenmasse zu optischer Dichte für LJ-AYO-cat in Minimalmedium mit Galactose beträgt $0,39 \text{ g l}^{-1}$ und liegt damit etwas höher als der Wert für Minimalmedium mit Glucose von $0,37 \text{ g l}^{-1}$.

Über die Reihenfolge des Verbrauchs der Kohlenstoffquellen in den Kulturen, denen zusätzliche Galactose zugegeben wurde, kann keine Aussage getroffen werden. Da die Kulturen mit Glycerin + Galactose jedoch 24 h nach Induktion lediglich $1,2 \pm 0,2 \%$ der

bei der Induktion zugegebenen Galactose enthielten, scheint diese im Gegensatz zu den Kulturen mit Glucose + Galactose stärker verbraucht worden zu sein. In den Kulturen mit Glucose + Galactose war 24 h nach Induktion noch $89,2 \pm 0,7$ % der zugegebenen Galactose verfügbar. Die Kulturen mit 10 g l^{-1} Galactose und ohne weitere Kohlenstoffquelle außer Lactose zeigten, wie erwartet, den stärksten Galactose-Verbrauch mit $11,4 \pm 1,4$ % der Ausgangsmenge verfügbar 24 h nach Induktion.

Die Bestimmung der Produktbildung 24 h nach Induktion erfolgte wie bereits zuvor mittels HPLC. Dabei zeigten die Kulturen mit Glycerin bzw. Glycerin + Galactose sehr ähnliche und auch die höchsten LNT II-Konzentrationen mit $1875,3 \pm 70,4 \text{ mg l}^{-1}$ bzw. $1873,0 \pm 3,4 \text{ mg l}^{-1}$ (Abbildung 3.20 A; Baumgärtner *et al.*, 2015b). Betrachtet man jedoch die Konzentrationen von LNT, so bewirkte die Zugabe von Galactose zur Kultur mit Glycerin eine Steigerung der Syntheseleistung um den Faktor 2,9 von $152,0 \pm 1,7 \text{ mg l}^{-1}$ auf $434,3 \pm 2,5 \text{ mg l}^{-1}$. Wie aufgrund des Induktor-Ausschlusses erwartet, hatte die Zugabe von Galactose zu Kulturen mit Glucose keinen positiven Effekt auf die Ausbeute von LNT. Die dadurch verursachte niedrigere optische Dichte (Abbildung 3.19) und die um Faktor 2 niedrigere Konzentration an LNT II sind jedoch nicht ausschließlich hierdurch zu erklären und beruhen neben der Inhibition der Lactose-Aufnahme durch Glucose vermutlich auf weiteren durch die Galactose verursachten Effekten.

Die Kulturen, welche neben Lactose ausschließlich Galactose als Kohlenstoffquelle verwendeten und das langsamste Wachstum zeigten, akkumulierten mit $1569,8 \pm 8,6 \text{ mg l}^{-1}$ die praktisch gleiche Menge an LNT II wie die Kulturen mit Glucose, zeigten aber mit $810,8 \pm 13,0 \text{ mg l}^{-1}$ eine um Faktor 3,6 höhere Menge des Tetrasaccharids LNT als die Kulturen mit Glucose. Unter Berücksichtigung der geringeren optischen Dichte der Kulturen mit Galactose ergibt sich dabei eine noch deutlichere Steigerung der Produktausbeute je Biomasse. So konnte die LNT-Ausbeute je Biomasse durch die Verwendung von Galactose im Vergleich zur Verwendung von Glucose um Faktor 4,5 auf $128,5 \pm 2,3 \text{ mg l}^{-1} \text{ OD}_{600}^{-1}$ gesteigert werden (Abbildung 3.20 B, Baumgärtner *et al.*, 2015b). Dies entspricht einer LNT-Ausbeute je Biotrockenmasse von $329,5 \pm 5,9 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$.

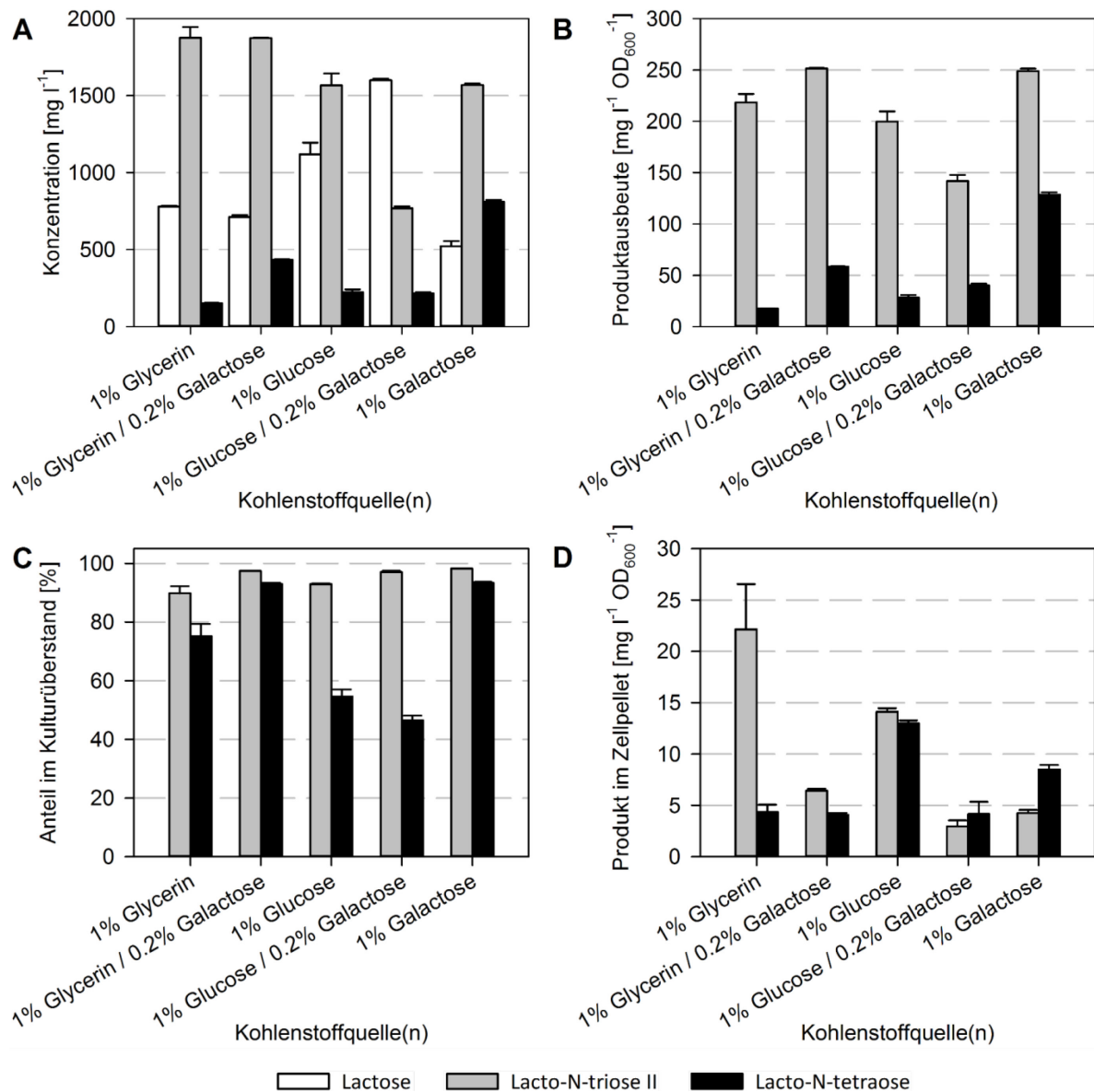


Abbildung 3.20: Synthese von LNT II und LNT mit *E. coli* LJ-AYO-cat unter Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen und Kohlenstoffquellen-Kombinationen. Schüttelkolben-Kulturen durchgeführt mind. in Duplikaten in Minimalmedium mit den angegebenen Kohlenstoffquellen und 0,2 g l⁻¹ Lactose. Lactose und, falls zutreffend, zusätzlich 0,2 g l⁻¹ Galactose wurden zugegeben zum Zeitpunkt der Induktion durch IPTG (0,5 mM, Endkonz.) bei einer optischen Dichte von 0,4 bis 0,6. Die Probenahme erfolgte dabei 24 h nach Induktion. **A)** Gesamtkonzentration von Lactose, LNT II und LNT in den Kulturen. **B)** Produktausbeuten von LNT II und LNT je Biomasse. **C)** Anteil des jeweiligen Produkts im Kulturüberstand, bezogen auf die Gesamtmenge des jeweiligen Produkts in der Kultur. **D)** Produktmengen im Zellsediment je Kulturvolumen und optischer Dichte bei λ = 600 nm. Teile in anderer Form bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2015b).

Ebenfalls aufgrund des geringeren Wachstums zeigten die Kulturen mit Glycerin und Galactose bzw. mit Galactose auch die höchsten Ausbeuten von LNT II mit $251,5 \pm 0,6 \text{ mg l}^{-1} \text{ OD}_{600}^{-1}$ und $248,8 \pm 2,4 \text{ mg l}^{-1} \text{ OD}_{600}^{-1}$. Dies entspricht einer Ausbeute je Biotrockenmasse von $638,02 \pm 6,22 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ in der Kultur mit Galactose und $838,4 \pm 1,9 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ bzw. $644,9 \pm 1,5 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ unter Verwendung der Biomasse zu OD₆₀₀ Korrelationsfaktoren von Glycerin (0,3 g l⁻¹) bzw. Galactose (0,39 g l⁻¹). Die Bestimmung der Korrelationen von Biomasse und OD₆₀₀ für Kulturen mit zwei

Kohlenstoffquellen wurde aufgrund der sich ändernden Substrat-Zusammensetzung bei unterschiedlichen Verbrauchsgeschwindigkeiten der einzelnen Kohlenstoffquellen nicht durchgeführt.

Weil neben hohen Produktausbeuten, wie bereits für die Synthese von 2'-FL in Abschnitt 3.1.4 beschrieben, auch das Vorkommen der Produkte im Kulturüberstand für eine einfachere Produktisolierung erwünscht ist, wurden die verschiedenen Kohlenstoffquellen auch auf die Vorkommen von LNT II und LNT im Kulturüberstand untersucht (Abbildung 3.20 C). Dabei enthielten die Kulturen mit Glycerin bzw. Glucose $89,8 \pm 2,4$ % bzw. $92,9 \pm 0,2$ % LNT II im Kulturüberstand, während die Kulturen mit Galactose oder mit Galactose-Zugabe über 97 % des gesamten LNT II im Kulturüberstand vorwies. Die Verteilung von LNT in den Kulturen zeigte dabei mehr Abhängigkeit von den Kohlenstoffquellen. So befanden sich in den Kulturen mit Glucose lediglich $54,6 \pm 2,5$ % und in den Kulturen mit Glycerin $75,2 \pm 4,2$ % des LNT im Überstand, während die Kulturen mit Galactose $93,4 \pm 0,2$ % des LNT im Kulturüberstand aufwies. Somit zeigten die Kulturen mit Galactose neben der höchsten Produktkonzentration und -ausbeute auch den größten Produktanteil im Kulturüberstand.

Bei Betrachtung der in den Zellsedimenten vorkommenden Produktkonzentrationen je Biomasse ist vor allem die hohe Konzentration von LNT II in den Kulturen mit Glycerin ($22,1 \pm 4,4$ mg l⁻¹ OD₆₀₀⁻¹) und die hohen Konzentrationen von LNT II und LNT in den Kulturen mit Glucose ($14,1 \pm 0,3$ mg l⁻¹ OD₆₀₀⁻¹ und $13,0 \pm 0,3$ mg l⁻¹ OD₆₀₀⁻¹) auffällig. Die Kulturen, welche ausschließlich Galactose enthalten, sind dabei die einzigen, welche deutlich mehr LNT als LNT II im Zellsediment vorweisen. Die relativ starken Unterschiede der intrazellulär vorkommenden Produktkonzentrationen lassen vermuten, dass die jeweilige Kohlenstoffquelle die Sekretion der Produkte aus der Zelle beeinflusst.

3.3.8. Synthese in der Zulaufkultivierung

Um die Skalierbarkeit der Ganzzell-Synthese von LNT zu demonstrieren, wurde der Stamm *E. coli* LJ-AYO-cat, ähnlich zum Stamm JM109 gwBC-F2-cat in der Synthese von 2'-FL (Abschnitt 3.1.6), in einer Zulaufkultivierung angezogen. Da in den Schüttelkolbenkulturen (Abschnitt 3.3.7) die höchsten Titer und Produktausbeuten mit der Kohlenstoffquelle Galactose erreicht wurden, wurde die Zulaufkultivierung ebenfalls

mit Galactose als einziger Kohlenstoffquelle durchgeführt. Dabei erfolgte eine Satzphase mit einem Volumen von 8,45 l, in der die Kultur nach 12,6 h mit IPTG induziert und ein erster Lactose-Puls zugegeben wurde, gefolgt von einer Zulaufphase mit einem Endvolumen von 13.63 l (Abbildung 3.21 A).

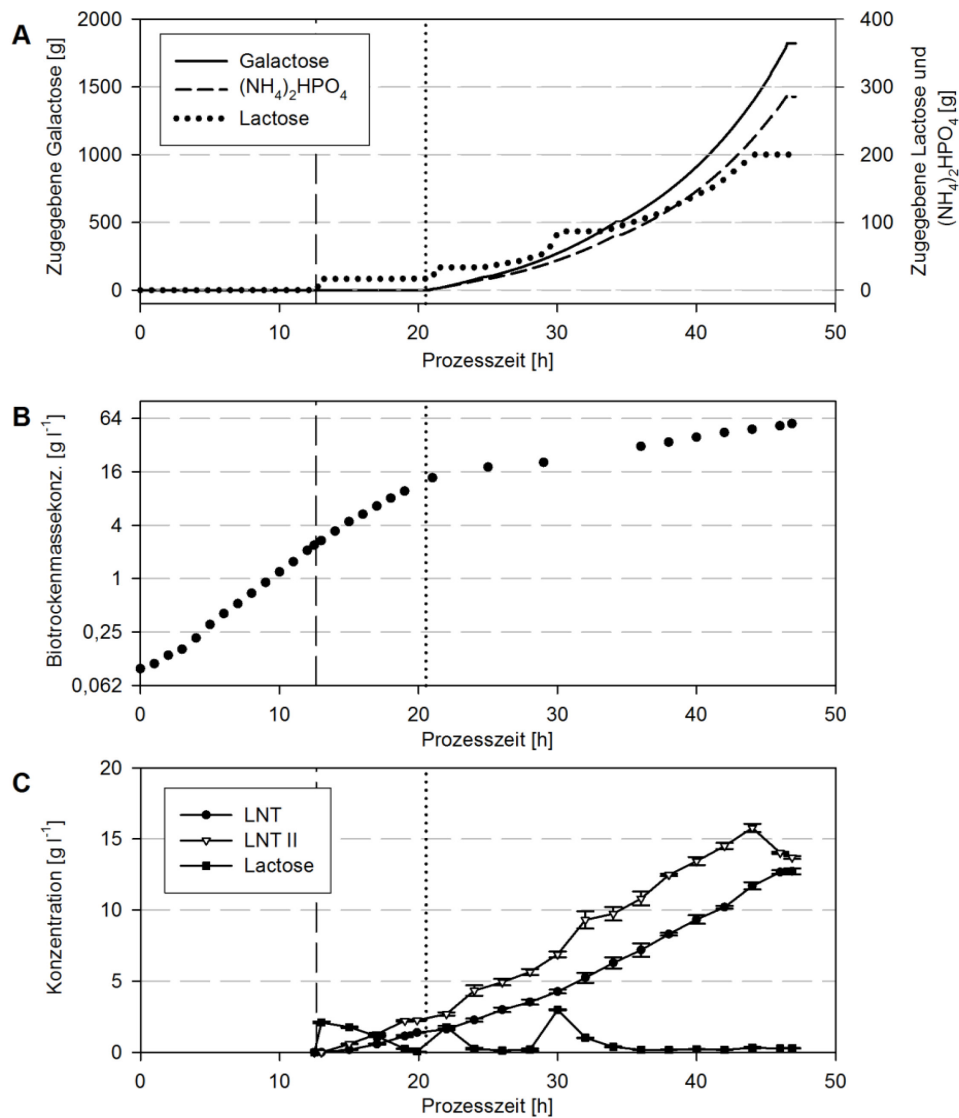


Abbildung 3.21: Zulaufprofile, Wachstum und Produktbildung der Galactose-limitierten Zulaufkultivierung von *E. coli* LJ-AYO-cat im 10 Liter-Maßstab zur Synthese von LNT. Verwendung von Galactose als Kohlenstoffquelle für Zellwachstum und Synthese von UDP-Zuckern sowie Lactose als Substrat für die LNT II- und LNT-Synthese. Die vertikalen Linien zeigen den Zeitpunkt der Induktion durch IPTG und des ersten Lactose-Pulses (gestrichelte Linie), sowie den Start der Zulauf-Phase (gepunktete Linie) an. **A**) Profile der während des Prozesses zugegebenen Mengen an Galactose, Lactose und Diammoniumhydrogenphosphat. **B**) Biotrockenmasseentwicklung. **C**) LNT II und LNT-Konzentrationen in der Kultur. Abbildung in ähnlicher Form bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2015b).

Das Wachstum in der Zulaufphase wurde über die Rate des Galactose-Zulaufs auf $\mu = 0,0541 \text{ h}^{-1}$ ($R^2 = 0,9972$, bestimmt über 25,9h) eingestellt, während die Zulauftrate der Stickstoff- und Phosphatquelle an den Galactose-Zulauf gekoppelt und der Lactose-Zulauf manuell geregelt wurde. Die dabei in dem 47 h-Prozess zugegebene Lactose

betrug insgesamt $14,7 \text{ g l}^{-1}$. In der Satzphase wurde mit einer maximalen spezifischen Wachstumsrate von $\mu_{\max} = 0,273 \text{ h}^{-1}$ ($R^2 = 0,9999$, bestimmt über 8 h mit 11 Messpunkten) eine Biotrockenmassekonzentration von etwa 13 g l^{-1} erreicht, welche bis zum Prozessende auf $55,7 \text{ g l}^{-1}$ anwuchs. Um eine Sauerstofflimitierung ausschließen zu können wurde der Sauerstoffpartialdruck während des gesamten Prozessen durch Anpassung der Begasungsrate und der Rührgeschwindigkeit reguliert und konnte über die gesamte Prozesszeit über einer relativen Sättigung von 40 % gehalten werden (Abbildung 3.22 A).

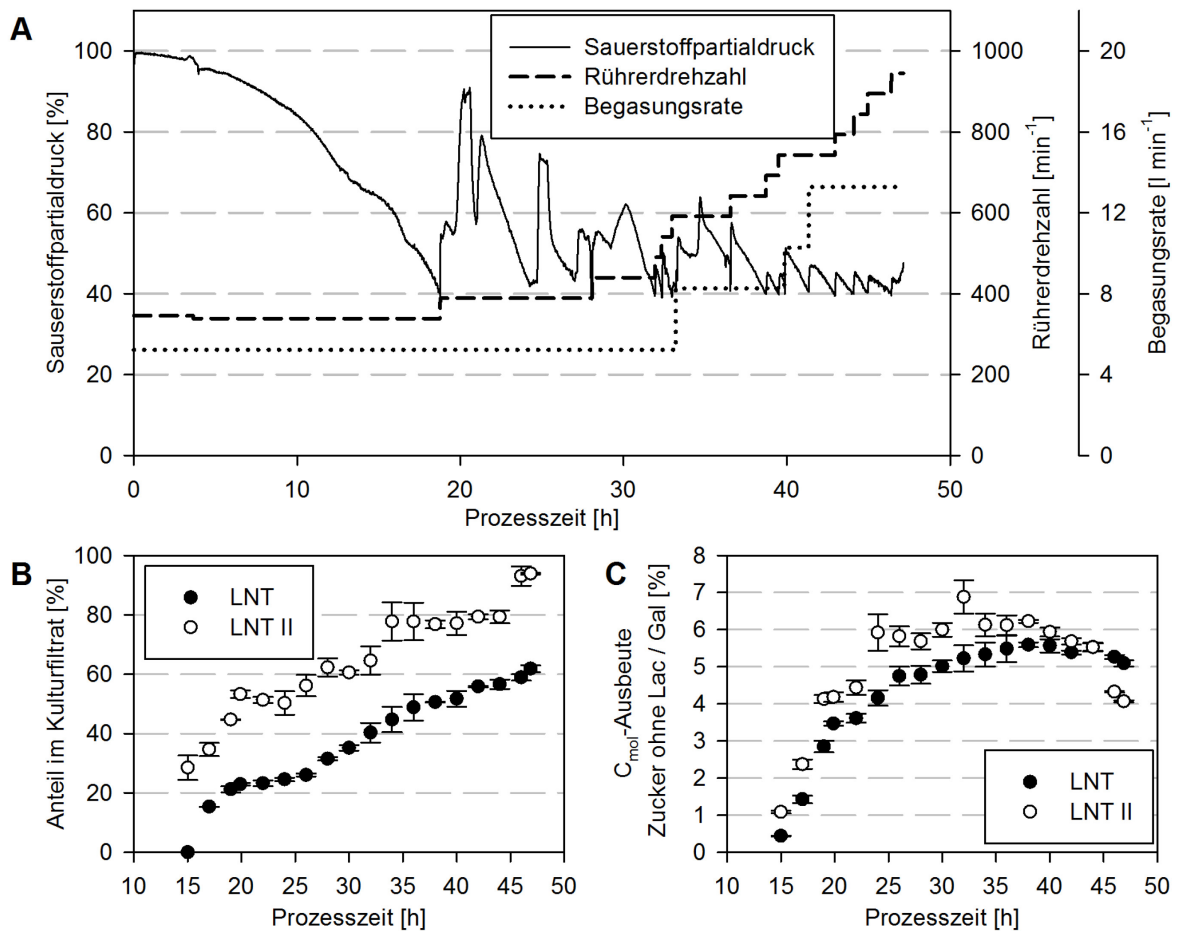


Abbildung 3.22: Entwicklung des Sauerstoffpartialdrucks und der Produktausbeuten der Zulaufkultivierung von *E. coli* LJ-AYO-cat zur Synthese von LNT II und LNT. A) Entwicklung des Sauerstoffpartialdrucks in Abhängigkeit der Rührgeschwindigkeit und der Begasungsrate ($p = \text{konstant}$). **B)** Anteile der gesamt synthetisierten Produkte im Kulturfiltrat. **C)** Kohlenstoffausbeute der eingesetzten Galactose in den N-Acetylglucosaminyl- und terminalen Galactosyl-Reste in LNT II und LNT.

In den 34,4 h ab Induktion und initialer Lactose-Zugabe konnten $13,70 \pm 0,10 \text{ g l}^{-1}$ des Trisaccharids LNT II und $12,72 \pm 0,21 \text{ g l}^{-1}$ des Tetrasaccharids generiert werden (Abbildung 3.21 C; Baumgärtner *et al.*, 2015b). Dies entspricht einer LNT Produktion von insgesamt $173,37 \pm 2,86 \text{ g}$ und Raum-Zeit-Ausbeuten über die gesamte Prozesszeit von $291,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (LNT II) bzw. $270,6 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (LNT). Die Raum-Zeit-Ausbeuten ab dem Zeitpunkt der Induktion und initialen Lactosezugabe betragen

398,3 mg l⁻¹ h⁻¹ (LNT II) bzw. 369,8 mg l⁻¹ h⁻¹ (LNT) und die Ausbeuten pro Biotrockenmasse betragen $Y_{LNT II/X} = 246,0 \pm 1,8 \text{ mg g}_{BTM}^{-1}$ für LNT II und $Y_{LNT/X} = 228,4 \pm 3,8 \text{ mg g}_{BTM}^{-1}$ für LNT. Für LNT konnte aufgrund der deutlich höheren Biomasse die Raum-Zeit-Ausbeute im Vergleich zu den Schüttelkolbenkulturen mit Galactose ($33,8 \pm 0,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) stark gesteigert werden. Die Ausbeute je Biotrockenmasse der Schüttelkolbenkulturen ($329,5 \pm 5,9 \text{ mg g}_{BTM}^{-1}$, Abschnitt 3.3.7) wurde in der Zulaufkultivierung jedoch nicht erreicht. Dies ist auf die limitierende Bereitstellung von Galactose zurückzuführen, welche im Schüttelkolben nicht limitierend vorlag. So wurde die anfangs in Pulsen zugegebene Lactose jeweils relativ schnell verbraucht unter erhöhten LNT II Produktbildungsraten, gefolgt von Phasen mit sehr niedrigen Lactose-Konzentrationen und etwas geringeren Produktbildungsraten (Abbildung 3.21 C). Der maximale Titer von LNT II mit $15,78 \pm 0,29 \text{ g l}^{-1}$ wurde erreicht nach einer Prozesszeit von 44 h. Die darauffolgende Abnahme der LNT II-Konzentration um etwa 13 % ist auf das Ende des Lactose-Zulaufs zurückzuführen. So wurde die Lactose-Zugabe nach 44 h beendet, um potentiell verbleibende Lactose vollständig umzusetzen, was bis auf die geringe, verbleibende Menge von $0,29 \pm 0,01 \text{ g l}^{-1}$ gelang. Dabei konnte in den letzten 3 Stunden des Prozesses aufgrund der niedrigen Lactose-Konzentration kaum noch LNT II gebildet werden, während das bereits gebildete LNT II weiter zu LNT umgesetzt wurde und die Konzentration durch den Verdünnungseffekt durch die hohen Zulaufraten weiter gesenkt wurde. Unter Betracht der gesamt im System vorliegenden Stoffmengen einzelner Verbindungen zeigt sich nach Ende der Lactose-Zugabe, ab einer Prozesszeit von 44 h, eine Zunahme der gesamten Stoffmenge von LNT um 17,44 % einhergehend mit Abnahmen von LNT II um 6,2 % und von Lactose um 2,86 %. Die Summe der gesamt im System ermittelten Stoffmengen dieser drei Verbindungen blieb dabei, wie erwartet, ab dem Ende der Lactose-Zugabe konstant.

Die Verteilung von LNT II und LNT auf den Kulturüberstand und die Zellsediment-Fraktion ist nicht nur interessant aufgrund der vereinfachten Isolierung aus dem Überstand, aber auch für eine Abschätzung, ob das im Kulturüberstand vorliegende LNT II wieder von den Zellen aufgenommen werden kann und somit für die weitere Galactosylierung zu LNT zur Verfügung steht. Wie in Abbildung 3.22 B dargestellt, sind die im Kulturüberstand vorliegenden Anteile der Produkte während der Kultivierung kontinuierlich angestiegen, sodass zum Prozessende eine deutliche Mehrheit der Produkte im Kulturüberstand vorlag. Von dem Tetrasaccharid LNT lagen dabei

61,8 ± 1,2 % im Kulturüberstand vor, während sich 93,9 ± 0,3 % des Trisaccharids LNT II im Kulturüberstand befanden. Der dabei beobachtete, starke Anstieg des Anteils von LNT II im Kulturüberstand in den letzten Prozessstunden ist vermutlich auf das Fehlen von Lactose als Substrat zurückzuführen, sodass intrazelluläres LNT II zur Synthese von LNT genutzt, aber kein weiteres LNT II intrazellulär synthetisiert wurde.

Die Kohlenstoffausbeuten in den Produkten je Galactose ist dargestellt in Abbildung 3.22 C. Dazu wurden die in den an Lactose angehängten Zuckern vorkommenden Kohlenstoffe in Relation gesetzt zu den via Galactose zugegebenen Kohlenstoffen. Lactose wurde in die Berechnung nicht mit einbezogen, da sie als zweites Substrat zugegeben und mit 98,08 % Umsatz fast vollständig zu Produkten umgesetzt wurde. Dabei wurden maximale Kohlenstoffausbeuten von 6,88 ± 0,45 %_{Cmol/Cmol} für LNT II (nach 32 h Prozesszeit) und 5,59 ± 0,06 %_{Cmol/Cmol} für LNT (nach 38 h Prozesszeit) erreicht, während die finalen Ausbeuten 4,07 ± 0,03 %_{Cmol/Cmol} (LNT II) und 5,09 ± 0,08 %_{Cmol/Cmol} (LNT) betrugen.

Während der Prozessphase mit Lactose-Mangel ab einer Prozesszeit von 44 h wurde die Bildung eines weiteren Produktes beobachtet. Dieses Produkt zeigte in der anschließenden Analyse mittels LC-MS (s. Abschnitt 2.7.6) ein Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von $m/z = 505,2$, was dem Protonen-Addukt $[M+H]^+$ eines Disaccharids, bestehend aus einer Hexose und einem N-Acetylhexosamin, entspricht. Dieses Disaccharid zeigte zum Prozessende eine Konzentration von 1,91 ± 0,03 g l⁻¹ und ist vermutlich auf eine durch LgtA katalysierte N-Glycosylierung von freier intrazellulärer Galactose zurückzuführen (Baumgärtner *et al.*, 2015b). Das daraus entstehende Produkt hätte demzufolge die Struktur GlcNAc(β1,3)Gal. Eine solche durch LgtA katalysierte Glycosylierung konnte *in vivo* in *E. coli* bereits zuvor demonstriert werden (Dumon *et al.*, 2006).

3.3.9. Produktisolierung und Produktcharakterisierung

Die Produktisolierung von LNT II und LNT wurde zur strukturellen Charakterisierung bereits im Anschluss an die in Abschnitt 3.3.5 beschriebenen Schüttelkolbenversuche durchgeführt. Diese Charakterisierung war von Bedeutung, da LNT II ein intrazelluläres Intermediat in den Synthesen von weiteren HMOs darstellen sollte und die Ganzzell-Synthese von LNT mit den verwendeten Glycosyltransferasen zuvor noch nicht beschrieben war.

Für die Isolierung von LNT II wurde der Stamm LJ-AY-cat-kan in einem 3 l Schikanekolben mit 750 ml Minimalmedium mit Glycerin angezogen, wie zuvor mit IPTG inkubiert und die Zellen wurden 48 h nach Induktion durch Zentrifugation abgetrennt. Die darauffolgende Isolierung von LNT II erfolgte analog zur in Abschnitt 3.1.7 beschriebenen Isolierung von 2'-FL mittels zweier chromatographischer Schritte über eine Aktivkohle/Celite545-Säule und eine Größenausschlusschromatographie. Dabei konnten 323,9 mg LNT II in gefriergetrockneter Form isoliert werden. Zur Isolierung von LNT wurde der Stamm *E. coli* LJ-AYO-cat im gleichen Kulturvolumen und nach dem gleichen Vorgehen, jedoch mit Minimalmedium mit Glucose angezogen. In der darauffolgenden Isolierung, welche nach dem gleichen Muster wie für LNT II verlief, konnten so 102,1 mg LNT in gefriergetrockneter Form erlangt werden. Wie erwartet zeigte LNT in der Analyse mittels HPLC nach Derivatisierung das gleiche Retentionsverhalten wie der kommerziell erworbene Standard aus Muttermilch.

In der ersten Produktcharakterisierung von LNT II und LNT mittels MS zeigten die Produkte vor allem die erwarteten Masse-zu-Ladung-Verhältnisse der Natrium-Addukte $[M+Na]^+$ mit $m/z = 568,2$ (LNT II, Abbildung A.6) und $m/z = 730,2$ (LNT, Abbildung A.9). Die darauffolgenden, am Institut für Bioorganische Chemie der Universität Hohenheim aufgenommenen NMR-Spektren von LNT II und LNT bestätigten dabei die erwarteten Strukturen (Abbildung 3.23).

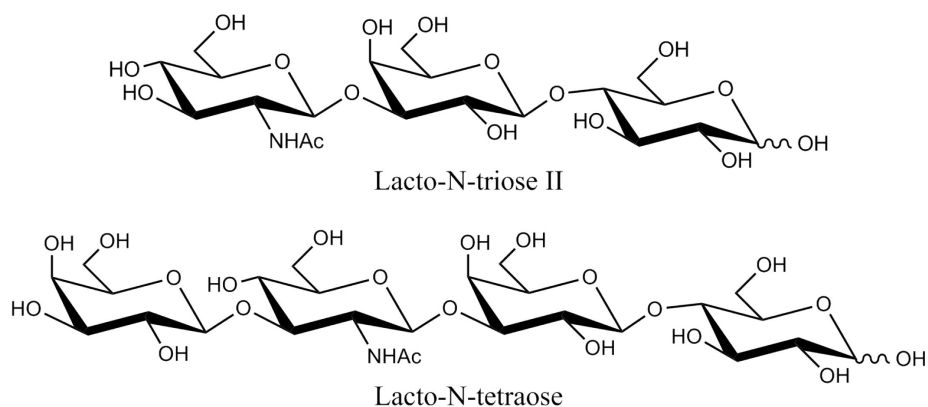


Abbildung 3.23: Strukturen von Lacto-N-triose II und Lacto-N-tetraose.

Des Weiteren erlaubten die ^1H -, ^{13}C -, TOCSY1D-, eCOSY-, gekoppelten und entkoppelten band-selektiven gHSQC- sowie gHMBC-, gC2H2BC- und gHSQC-TOCSY-NMR-Spektren neben dem Vergleich mit bereits veröffentlichten chemischen Verschiebungen (Bush *et al.*, 1985; Platzer & Davoust, 1989; Strecker *et al.*, 1989) auch die vollständige eigenständige Bestimmung der Strukturen. Für LNT konnten die bereits veröffentlichten

NMR-Daten um weitere chemische Verschiebungen ergänzt werden. Die chemischen Verschiebungen von LNT II bzw. LNT sind tabellarisch dargestellt in Tabelle 3.4 und Tabelle A.1 bzw. Tabelle 3.5 und Tabelle A.2 Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren sind in Anhang in den Abschnitten A.1.3 und A.1.4 dargestellt.

Tabelle 3.4: ^{13}C -NMR Daten der synthetisierten Lacto-N-triose II.^[a]

| Glycosyl-Gruppe | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 | CO des NAc | CH ₃ des NAc |
|-----------------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|------------|-------------------------|
| Glc (α) | 92,83 | 72,15 | 72,43 | 79,41 | 71,14 | 60,98 | | |
| Glc (β) | 96,76 | 74,82 | 75,37 | 79,32 | 75,82 | 61,11 | | |
| β 1,4Gal (α) | 103,91 | 71,05 | 82,95 | 69,39 | | | | |
| β 1,4Gal (β) | 103,95 | 71,03 | 82,97 | 69,37 | 75,91 | 61,98 | | |
| β 1,3GlcNAc | 103,85 | 56,69 | 74,59 | 70,72 | 76,68 | 61,52 | 175,97 | 23,20 |

^[a] ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) aufgenommen in D_2O . Chemische Verschiebungen in ppm. Methanol- d_4 ($\delta = 49$ ppm) wurde als interner Standard verwendet. Ergebnisse bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2014).

Tabelle 3.5: ^{13}C -NMR Daten der synthetisierten Lacto-N-tetraose.^[a]

| Glycosyl-Gruppe | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 | CO des NAc | CH ₃ des NAc |
|-----------------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|------------|-------------------------|
| Glc (α) | 92,86 | 72,18 | 72,45 | 79,45 | 71,16 | 61,01 | | |
| Glc (β) | 96,81 | 74,85 | 75,40 | 79,35 | 75,83 | 61,14 | | |
| β 1,4Gal (α) | 103,93 | 71,08 | 82,99 | 69,39 | | | | |
| β 1,4Gal (β) | 103,96 | 71,05 | 83,02 | 69,36 | 75,94 | 62,01 | | |
| β 1,3GlcNAc | 103,59 | 55,75 | 83,11 | 69,50 | 76,23 | 61,55 | 176,00 | 23,27 |
| β 1,3Gal | 104,53 | 71,72 | 73,51 | 69,57 | 76,32 | 62,07 | | |

^[a] ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) aufgenommen in D_2O . Chemische Verschiebungen in ppm. Methanol- d_4 ($\delta = 49$ ppm) wurde als interner Standard verwendet. Ergebnisse bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2014).

3.4. Lacto-N-neotetraose (LNnT)

3.4.1. Stammkonstruktion

Das Tetrasaccharid Lacto-N-neotetraose (LNnT), welches als Konstitutionsisomer von LNT einen β 1,4-gebundenen Galactosyl-Rest am nicht-reduzierenden Ende von LNT II aufweist und somit zu den Kernstrukturen des Typs II der HMOs gehört, ist eine der dominierenden HMO-Kernstrukturen in humaner Milch (Thurl *et al.*, 2010). Der LNT II produzierende Stamm *E. coli* LJ-AY-cat-kan (Abschnitt 3.3.2) diente dabei als Ausgangsstamm für die Stammkonstruktion und sollte mit dem Gen einer β 1,4-Galactosyltransferase ausgestattet werden, um LNnT intrazellulär aus dem

Akzeptor-Substrat LNT II und dem Donor-Substrat UDP-Gal zu synthetisieren. Der Unterschied zum LNT-produzierenden Stamm LJ-AYO-cat bestand dabei in der spezifischen β 1,4-Galactosylierung anstelle einer β 1,3-Verknüpfung an LNT II.

Für die Katalyse dieser β 1,4-Galactosylierung wurde sowohl ein Fusionsprotein mit katalytischer Domäne der humanen β 4GalT-1-Galactosyltransferase sowie die Galactosyltransferase LgtB aus *Neisseria meningitidis* untersucht. Das Fusionskonstrukt His6Propep-cat β 4GalT-1 wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lothar Elling (RWTH Aachen) konstruiert und bereits funktionell in *E. coli* exprimiert und charakterisiert (Sauerzapfe *et al.*, 2008). Es besteht aus einem Hexahistidin-Tag, dem verkürzten Propeptid einer Lipase aus *Staphylococcus hyicus* und der katalytischen Domäne der humanen β 4GalT-1 und wurde von Prof. Elling auf einem pET16b-Vektor unter der Kontrolle eines T7-Promotors zur Verfügung gestellt.

Das Gen *lgtB* der Galactosyltransferase LgtB aus *N. meningitidis* wurde bereits in anderen Arbeiten rekombinant in *E. coli* exprimiert (Park *et al.*, 2002) und auch schon zur Plasmid-basierten *in vivo* Synthese von LNnT in *E. coli* eingesetzt (Priem *et al.*, 2002). In diesem Projekt wurde das Gen *lgtB* aus der genomischen DNA von *N. meningitidis* DSM10036 amplifiziert und in den Vektor pJFK eingebracht. Dabei befindet sich *lgtB* in dem resultierenden Vektor (pJFK-lgtB) unter der Kontrolle eines P_{tac}-Promotors. Die Sequenzierung des amplifizierten und klonierten Gens *lgtB* zeigte eine vollständige Übereinstimmung mit der Sequenz von *lgtB* des Stammes *N. meningitidis* NZ-05/33 (Genbank CP002424.1).

In ersten Versuchen zur *in vitro* Aktivität von LgtB konnte mit dem zellfreien Extrakt von DH5 α pJFK-lgtB durch die Synthese von LNnT aus LNT II die funktionellen Expressionen des Gens bestätigt werden. In einem einfachen Ansatz wurden dabei nach 8 Stunden die Substrate LNT II (10 mM) und UDP-Gal (5 mM) zu LNnT umgesetzt. Mittels HPLC konnte dabei eine LNnT-Konzentration von etwa 2,3 mM detektiert werden, während die Kontrollen ohne Donor- bzw. Akzeptor-Substrat oder mit zellfreiem Extrakt des Leerplasmid-Stämms keine Bildung von LNnT zeigten. Dies entspricht etwa 46 % des maximal möglichen Umsatzes. Da durch die Bildung von LNnT *in vitro* bereits eine Enzymaktivität von LgtB demonstriert werden konnte und die *in vivo* Synthese im Fokus stand, wurden erste Schüttelkolbenversuche mit LgtB und dem Expressionskonstrukt His6Propep-cat β 4GalT-1 durchgeführt. Hierzu wurde *lgtB* bzw. His6Propep-cat β 4GalT-1

jeweils unter der Kontrolle eines P_{tac} -Promotors in pJFK-Vektoren exprimiert und anschließend in den LNT II-produzierenden Stamm *E. coli* LJ-AY transformiert, um die Syntheseleistung beider Enzyme im gleichen Stamm *in vivo* untersuchen zu können. In den darauffolgenden Schüttelkolbenversuchen im Minimalmedium mit Glycerin wurde in den Kulturen mit den Stämmen LJ-AY pJFK-*lgtB* bzw. LJ-AY pJFK-*galT-1* 24 h nach Induktion und Lactose-Zugabe kein LNnT detektiert. Dabei wiesen die Stämme jedoch Wachstumsraten von lediglich $0,05 \text{ h}^{-1}$ (mit pJFK-*lgtB*) bzw. $0,08 \text{ h}^{-1}$ (mit pJFK-*galT-1*) auf und wurden, bereits bei $OD_{600} = 0,08$ bzw. $OD_{600} = 0,24$ induziert. Um dieses langsame Wachstum zu berücksichtigen und die Produktbildung auch bei höheren Zellkonzentrationen zu untersuchen, wurden daher zusätzlich 48 h nach Induktion Proben der Kulturen genommen. Mittels HPLC konnten in diesen Proben LNnT Konzentrationen von $28,7 \text{ mg l}^{-1}$ bzw. $2,2 \text{ mg l}^{-1}$ mit LJ-AY pJFK-*lgtB* bzw. LJ-AY pJFK-*galT-1* nachgewiesen werden, während der Kontrollstamm LJ-AY pJF119EH-kan keine Bildung von LNnT zeigte. LNnT wurde dabei ausschließlich in den Sediment-Fractionen der Kulturen nachgewiesen, was mit den Beobachtungen in einer bereits beschriebenen Ganzzell-Synthese übereinstimmt (Priem *et al.*, 2002).

Zur weiteren Stammentwicklung wurde der Fokus auf das *N. meningitidis*-Gen *lgtB* gelegt, da dieses in den ersten *in vivo* Untersuchungen zu höheren Produkttitern führte. Die Untersuchung der Plasmid-basierten Expression von *lgtB* im Stamm LJ110 ließ dabei im Vergleich zu dem Stamm mit Leerplasmid keine zusätzliche Proteinbande bei der erwarteten Masse von 31,6 kDa erkennen (Abbildung 3.15). Dennoch wurde das Gen aufgrund seiner Aktivität mittels homologer Rekombination analog zu *wbgO* bei gleichzeitiger Deletion der Gene *xylA* und *xylB* chromosomal in den Stamm LJ-AY integriert, um den Stamm LJ-AYB-cat zu generieren (Abbildung 3.16).

3.4.2. Synthese in Schüttelkolben-Kulturen

Zur Untersuchung der Syntheseleistung des Stammes *E. coli* LJ-AYB-cat wurde dieser analog zu den in Abschnitt 3.3.5 beschriebenen Kulturen von LJ-AYO-cat in Minimalmedium mit Glycerin oder Glucose angezogen, bei einer optischen Dichte von 0,4 bis 0,6 mit IPTG (0,5 mM, Endkonz.) induziert und zeitgleich 2 g l^{-1} Lactose zugegeben. Auffällig war bei diesen Kulturen, dass nach dem Erreichen von regulärem exponentiellem Wachstum ein Einbruch der optischen Dichte nach Induktion und Zugabe von Lactose beobachtet werden konnte (Abbildung A.33). Die nur einfach

durchgeführten Versuche mit Glucose als Kohlenstoffquelle bzw. mit Glycerin, aber ohne die Zugabe von Lactose, zeigten diesen Effekt ebenso. In den in Duplikaten durchgeführten Versuchen mit Minimalmedium mit Glycerin konnte eine spezifische Wachstumsrate vor Induktion von $\mu_{\max} = 0,224 \text{ h}^{-1}$ ($R^2=0,9995$, bestimmt über 4,33 h) ermittelt werden. Dabei wurde 24 h nach Induktion lediglich ein LNnT-Titer von $1,08 \pm 0,09 \text{ mg l}^{-1}$ erreicht mit einer optischen Dichte von 0,87, während 48 h nach Induktion $18,96 \pm 1,79 \text{ mg l}^{-1}$ LNnT vorlagen mit $OD_{600} = 3,82 \pm 0,18$. Die Titer des Trisaccharid-Zwischenprodukts LNT II betragen $23,99 \pm 9,48 \text{ mg l}^{-1}$ (24 h) bzw. $34,98 \pm 0,02 \text{ mg l}^{-1}$ (48 h) und waren somit um ein Vielfaches geringer als in den Synthesen von LNT bzw. LNT II mit LJ-AYO-cat bzw. LJ-AY-cat-kan (Abschnitt 3.3.5), was vermutlich im Zusammenhang mit dem eingeschränkten Wachstum steht. Der Anteil von LNnT im Kulturüberstand 48 h nach Induktion betrug dabei 11,25 %, während 24 h nach Induktion kein LNnT im Kulturüberstand detektiert werden konnte und zu beiden Zeitpunkten über 98 % des vorkommenden LNT II im Kulturüberstand vorlag.

In der Schüttelkolbenkultur mit Glucose anstelle von Glycerin zeigte sich eine Bildung von etwa $1,21 \text{ mg l}^{-1}$ bzw. $18,27 \text{ mg l}^{-1}$ LNnT 24 h bzw. 48 h nach Induktion, mit $109,09 \text{ mg l}^{-1}$ bzw. $179,63 \text{ mg l}^{-1}$ LNT II, während in der Kultur mit Glycerin, aber ohne Lactose-Zugabe, keine Produkte nachgewiesen werden konnte.

Da die LacNAc-Einheit von LNnT dem Akzeptor-Substrat Lactose strukturell sehr ähnlich ist (Abschnitt 1.1.2), kann bei der Ganzzell-Synthese von LNnT mit LgtA und LgtB auch die weitere Elongation von LNnT zu größeren Kernstrukturen vorkommen, indem LNnT als Akzeptor-Substrat von LgtA Verwendung findet und das resultierende Pentasaccharid anschließend durch LgtB galactosyliert wird (Abschnitt 1.2.4; Priem *et al.*, 2002). Das entstehende Hexasaccharid kann daraufhin wieder als Substrat für die weitere Elongation dienen. Eine solche weitere Elongation stand nicht im Fokus dieser Arbeit und wurde daher nicht näher untersucht, jedoch in den durchgeführten Kulturen ebenfalls beobachtet. Dabei wiesen die Signale der weiter elongierten Nebenprodukte in den in Duplikaten durchgeführten Kulturen mit Glycerin 48 h nach Induktion in Summe einen höheren Wert auf als das Signal für LNnT, was auf eine höhere molare Konzentration dieser Oligosaccharide hinweist und somit auf den weiteren Umsatz von mehr als 50 % des gebildeten LNnT schließen lässt.

3.4.3. Produktisolierung und Produktcharakterisierung

Da weder durch die Verwendung von Minimalmedium mit Glycerin noch durch die Verwendung von Minimalmedium mit Glucose ein zuverlässiges Wachstum und eine reproduzierbare Produktbildung der Stämme LJ-AYB-cat und LJ-AY pJFK-igtB erreicht werden konnten, sollte die präparative Synthese in Vollmedium durchgeführt werden. Hierzu wurde der Stamm LJ-AY mit dem Plasmid pJFK-igtB durch Lukas Jurzitza bei 30 °C in LB-Medium angezogen. Dabei zeigte sich verlässliches Wachstum, sodass die Kulturen bei $OD_{600} = 0,65$ mit IPTG (0,5 mM, Endkonz.) induziert werden und mit 2 g l⁻¹ Lactose versehen werden konnten. Die 24 h nach Induktion geernteten Kulturen zeigten eine LNnT-Konzentration von 39 mg l⁻¹ bzw. 34,7 mg g_{BTM}⁻¹. In der darauffolgenden Isolierung von LNnT aus der Sediment-Fraktion der Kulturen mit einem Gesamtvolumen von 2,8 l konnten so insgesamt 81,7 mg von LNnT und etwa 15 mg einer Nebenprodukt-Fraktion isoliert werden.

Die Analyse dieser Isolate mittels MS zeigte dabei die erwartete Masse des Natrium-Addukts von Lacto-N-neotetraose in der LNnT Fraktion bzw. die Massen der Dinatrium-Addukte und Natrium-Addukte von LNnT, einer Lacto-N-pentaose und einer Lacto-N-hexaose (Abbildung A.12 und Abbildung A.13).

In der darauffolgenden strukturellen Verifikation des synthetisierten LNnT mittels 1D- und 2D-NMR analog zu dem in Abschnitt 3.3.9 für LNT beschriebenen Vorgehen konnte die Struktur von LNnT (Abbildung 3.24) eindeutig bestimmt und die chemischen Verschiebungen zugeordnet werden wie in Tabelle 3.6 und im Anhang in Tabelle A.3 dargestellt. Die bestimmten chemischen Verschiebungen sind dabei in Übereinstimmung mit den bereits zuvor publizierten Werten (Strecker *et al.*, 1989).

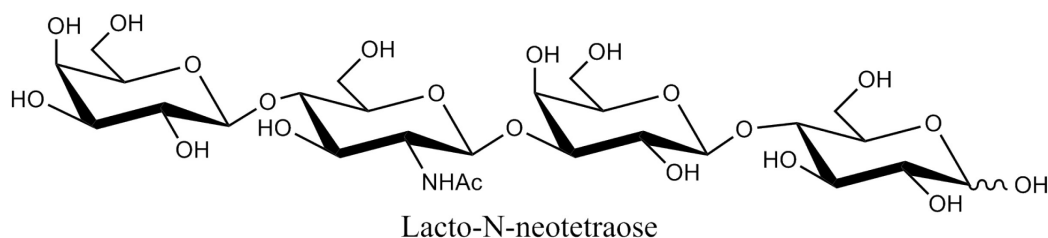


Abbildung 3.24: Struktur von Lacto-N-neotetraose.

Tabelle 3.6: ^{13}C -NMR Daten der synthetisierten Lacto-N-neotetraose.^[a]

| Glycosyl-Gruppe | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 | CO des NAc | CH ₃ des NAc |
|---|--------|-------|-------|-------|-------|-------|------------|-------------------------|
| Glc (α) | 92,80 | 72,13 | 72,39 | 79,39 | 71,11 | 60,95 | | |
| Glc (β) | 96,73 | 74,79 | 75,34 | 79,29 | 75,79 | 61,08 | | |
| β1,4Gal (α) | 103,89 | 70,99 | 83,01 | 69,35 | | | | |
| β1,4Gal (β) | 103,92 | 70,96 | 83,02 | 69,33 | 75,87 | 61,95 | | |
| β1,3GlcNAc | 103,72 | 56,19 | 73,17 | 79,19 | 75,55 | 60,87 | 175,89 | 23,19 |
| β1,4Gal (terminal) | 103,86 | 71,96 | 73,5 | 69,55 | 76,33 | 62,02 | | |

^[a] ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) aufgenommen in D₂O. Chemische Verschiebungen in ppm. Methanol-d₄ ($\delta = 49$ ppm) wurde als interner Standard verwendet.

Teil III Synthese fucosylierter Derivate von LNT und LNnT

In Teil I und Teil II der Ergebnisse konnten bereits die Ganzzell-Synthesen von fucosylierten Lactosen und von den HMO-Kernstrukturen LNT und LNnT in *E. coli* demonstriert werden. Wie in Abschnitt 1.1.2 und Tabelle 1.4 dargestellt, existieren neben diesen Verbindungen jedoch üblicherweise auch die fucosylierten Derivate dieser Kernstrukturen in Muttermilch. Diese Oligosaccharide sind mit 5 oder mehr Zuckereinheiten aufgrund ihrer Größe sowohl chemisch als auch enzymatisch nur unter großem Aufwand oder mit geringen Ausbeuten zugänglich und daher über diese Synthesewege momentan nicht ökonomisch darzustellen (Chen, 2015; Han *et al.*, 2012). Daher stellt die Ganzzell-Synthese mit Leloir-Glycosyltransferasen und intrazellulärer Regeneration von Nukleotid-aktivierten Zuckern auch für die Bereitstellung dieser Verbindungen eine potentielle Alternative dar. Für die Plasmid-basierte Ganzzell-Synthese fucosylierter Derivate von LNnT wurden bereits Kombinationen eines LNnT-Synthesestamms mit einer verstärkten intrazellulären Bildung von GDP-Fuc und verschiedenen Fucosyltransferasen beschrieben (Drouillard *et al.*, 2006; Dumon *et al.*, 2001; Dumon *et al.*, 2004). Um jedoch auch Plasmid-freie Synthesen fucosylierter Derivate von LNnT zu ermöglichen und um die Ganzzell-Synthesen fucosylierter Derivate von LNT zu erschließen, sollten in diesem Teilprojekt die Plasmid-freien Synthesestämme von LNnT und LNT mit dem Salvage Pathway für die Generierung von GDP-Fuc und verschiedenen Fucosyltransferase-Genen aus *H. pylori* kombiniert werden. Die dadurch ermöglichte Synthese fucosylierter Derivate von LNT oder LNnT ist in Abbildung 3.25 am Beispiel von LNT dargestellt.

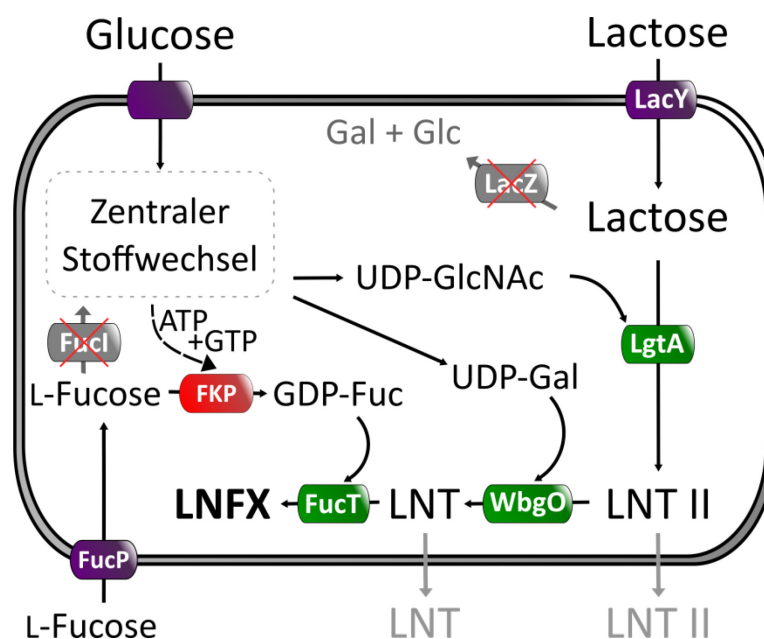


Abbildung 3.25: Stoffwechselwege zur Ganzzell-Synthese fucosylierter Derivate von LNT in *E. coli*. Der Synthese von Lacto-N-tetraose (LNT) aus Glucose und Lactose folgt in einem zweiten Schritt die Fucosylierung mittels Fucosyltransferasen mit verschiedenen Regiospezifitäten, verallgemeinert als FucT (Glycosyltransferasen grün hinterlegt). Die dazu benötigte GDP-L-Fucose (GDP-Fuc) wird aus L-Fucose via Salvage Pathway generiert (Enzym rot hinterlegt). Die resultierenden fucosylierten Derivate von LNT (verallgemeinert als LNTX) weisen dabei verschiedene Fucosylierungen auf, abhängig von den eingesetzten Fucosyltransferasen. Abbildung in anderer Form bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2015a).

3.5. Fucosylierte Derivate von LNT

In bisherigen Studien zu den physiologischen Effekten von HMOs zeigten fucosylierte Derivate von LNT – ähnlich wie Fucosyllactosen – präbiotische Effekte durch die Ermöglichung des spezifischen Wachstums von *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* und *Bifidobacterium bifidum* (Asakuma *et al.*, 2011), eine Korrelation zu verringerten Fallzahlen von Durchfallerkrankungen (Morrow *et al.*, 2004) und antimikrobielle Effekte durch das Blockieren der Bindung von Pathogenen (Miyazaki *et al.*, 2010). Doch während fucosylierte Derivate von LNT, wie im vorherigen Abschnitt erwähnt, bereits durch die Arbeitsgruppe um Eric Samain in Ganzzell-Synthesen dargestellt wurden, konnten fucosylierte Derivate des Konstitutionsisomers LNT bisher ausschließlich chemisch (Jennum *et al.*, 2014; Hsu *et al.*, 2012; Manzoni *et al.*, 1998) und *in vitro* mittels enzymatischer Umsätze (Miyazaki *et al.*, 2010; Sakurama *et al.*, 2012) synthetisiert werden. Anders als in diesen enzymatischen Umsätzen, welche humane Fucosyltransferasen bzw. Fucosynthasen nutzen, sollten in diesem Teilprojekt erneut Fucosyltransferasen aus *H. pylori* eingesetzt werden, da diese bereits in Teil I erfolgreich für *in vivo* Synthesen genutzt wurden. Für die intrazelluläre Bereitstellung von GDP-L-Fucose in *E. coli* konnten in Abschnitt 3.1.3 bereits sowohl der *de novo* Syntheseweg, als auch der Salvage Pathway rekombinant eingebracht und funktionell

ausgeprägt werden. Für die Synthese fucosylierter Derivate von LNT wurde der Salvage Pathway gewählt, da dieser verschiedene Vorteile mit sich brachte. So konnte die Fucosylierung der Kernstrukturen über die Zugabe von L-Fucose unabhängig von der Expression des Fucosyltransferase-Gens gesteuert werden. Außerdem scheint der in Abschnitt 3.1.3 in Kombination mit dem *de novo* Syntheseweg getestete Salvage Pathway effizient GDP-Fuc zu synthetisieren, wobei in der Stammkonstruktion – anders als bei der Verwendung des *de novo* Syntheseweges – für den Salvage Pathway lediglich die Einbringung eines Genes (*fkp*) notwendig ist.

3.5.1. Stammkonstruktion

Da in den vorherigen Abschnitten bereits sowohl die funktionelle Expression von Fucosyltransferasen als auch die Konstruktion des Plasmid-freien LNT-Produzenten LJ-AYO-cat durchgeführt wurden, konnte in der Stammkonstruktion auf diese bereits etablierten Systeme aufgebaut werden. Dazu wurde der LNT II-Produzent *E. coli* LJ-AY bereits vor der Entwicklung des LNT-Produzenten LJ-AYO als Ausgangsstamm für die Stammkonstruktion verwendet und das *B. fragilis*-Gens *fkp* unter der Kontrolle eines P_{tac} -Promotors chromosomal integriert in den L-Arabinose-Degradations-Lokus. Der resultierende Stamm LJ-AYF-cat (Abbildung 3.26) zeigte in ersten Versuchen, welche analog zu den in Abschnitt 3.1.3 beschriebenen GDP-Fuc Messungen durchgeführt wurden, intrazelluläre GDP-Fuc-Konzentrationen von etwa 5 mg g_{BTM}^{-1} , sodass die funktionelle Expression des Gens *fkp* bestätigt wurde. Nach der erfolgreichen Synthese von LNT mit dem parallel entstandenen Stamm LJ-AYO-cat wurde das Gen *wbgO* analog zur Konstruktion von LJ-AYO-cat (Abschnitt 3.3.4) auch in den Stamm LJ-AYF integriert, um den Stamm LJ-AYFO-cat zu generieren. Dieser konnte aus Lactose und Glucose LNT synthetisieren und, unter Zugabe von L-Fucose, via Salvage Pathway GDP-Fuc generieren und sollte als Basis für erste Plasmid-basierte Fucosylierungen des intrazellulär gebildeten LNT dienen.

Die dazu eingesetzten Fucosyltransferasen sollten LNT spezifisch in $\alpha 1,2$ - bzw. $\alpha 1,3/1,4$ -Position fucosylieren, um die HMOs Lacto-N-fucopentaose I (LNFP I), Lacto-N-fucopentaose II (LNFP II) und Lacto-N-difucohexaose II (LNDFH II) zu erzeugen (s. Abbildung 1.2). Für die $\alpha 1,2$ -Fucosylierung konnte hierzu das Gen *futC* aus *H. pylori* verwendet werden, welches bereits zur Synthese von 2'-FL eingesetzt wurde (Abschnitt 3.1). Die von *futC* kodierte $\alpha 1,2$ -Fucosyltransferase FutC zeigte *in vitro* bereits höhere

Aktivität für Typ I-Akzeptor-Substrate (z. B. LNT) als für Typ II-Akzeptor-Substrate (Stein *et al.*, 2008), wurde zuvor jedoch noch nicht *in vivo* für die Fucosylierung von LNT beschrieben. Die Plasmid-basierte Expression von *fucC* in *E. coli* LJ110 ist in Abbildung 3.15 dargestellt und zeigt ein Expressionsprodukt, was deutlich kleiner zu sein scheint als die erwarteten 35 kDa und nur in geringen Mengen in der löslichen Fraktion vorkommt, aber dennoch zu erkennen ist.

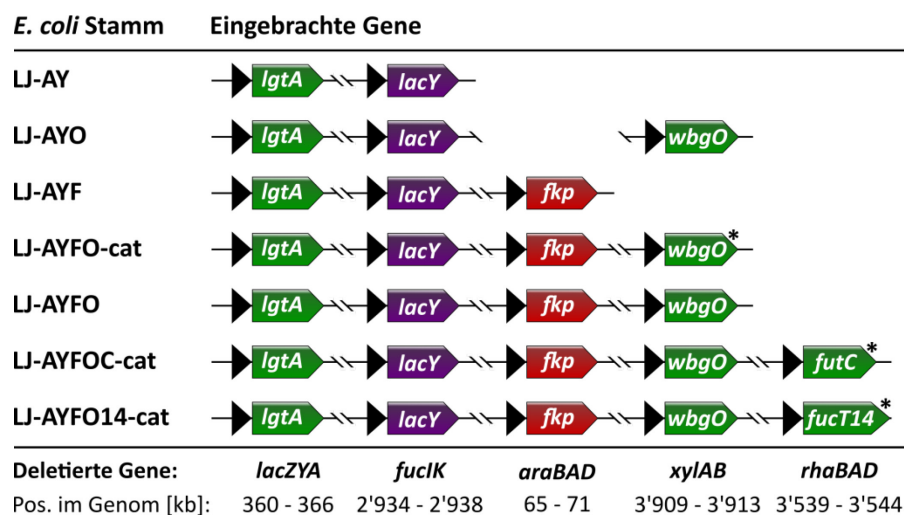


Abbildung 3.26: Genotypen einer Auswahl der zur Synthese fucosylierter Lacto-N-tetraose-Derivate erstellter, Plasmid-freier Stämme. Eingebrachte Gene in farbigen Pfeilen mit den dabei deletierten Zuckerdegradations-Genen und deren Positionen auf dem LJ110 Chromosom darunter (Hayashi *et al.*, 2006; Tatusova *et al.*, 2014). Die Positionsangaben wurden jeweils so auf- bzw. abgerundet, dass die deletierten Gene von dem angegebenen Bereich komplett eingeschlossen sind. Glycosyltransferasen kodierende Gene in grün dargestellt. Alle rekombinant eingebrachten Gene stehen jeweils unter Kontrolle eines IPTG-induzierbaren P_{tac} -Promotors (Baumgärtner *et al.*, 2015a). Sterne markieren die Gene, deren jeweilige Expressionskassetten noch ein Antibiotikaresistenz-Gen enthalten (s. Tabelle 2.1).

Die bereits zuvor in anderen Arbeiten für die *in vivo* Fucosylierung von LNnT eingesetzte α 1,3-Fucosyltransferase (FutA), welche in Abschnitt 3.2 auch für die Synthese von 3-FL verwendet wurde, zeigt eine deutlich höhere Aktivität mit dem Typ II-Akzeptor-Substrat LNnT als mit LNT, da bei dem Typ I-Akzeptor die Position 3 des N-Acetylglucosamins bereits durch die Galactose gebunden ist. Daher findet die Fucosylierung in Verbindung mit LNT nicht am N-Acetylglucosamin, sondern an der Glucose am reduzierenden Ende statt, wodurch Lacto-N-fucopentaose V entsteht (Martin *et al.*, 1997). Um dennoch eine Fucosylierung am N-Acetylglucosamin zu erreichen, konnte das *H. pylori*-Gen einer α 1,4-Fucosyltransferase identifiziert werden, welches bereits zuvor heterolog in *E. coli* exprimiert und die Aktivitäten und Spezifitäten des entstandenen Enzyms untersucht wurden (Rabbani *et al.*, 2005; Rabbani *et al.*, 2009). Demnach zeigte diese Fucosyltransferase, im Folgenden FucT14 bzw. das Gen *fucT14* genannt, in diesen

in vitro Untersuchungen deutlich höhere Aktivitäten mit Typ I-Akzeptoren als mit Typ II-Akzeptoren und nutzte ebenfalls GDP-L-Fucose als Donor-Substrat.

Zur Verwendung von FucT14 *in vivo* wurde eine synthetische, für *E. coli* Codon-optimierte Variante des Gens *fucT14* bestellt, in den pJFK-Vektor kloniert und auf dessen Expression und *in vitro* Aktivität untersucht. Dabei zeigte sich ein deutlich sichtbares Expressionsprodukt von *fucT14* in der löslichen Fraktion des Zellaufschlusses von *E. coli* LJ110 pJFK-fucT14 mit der erwarteten Größe von etwa 51 kDa (Abbildung 3.15). In den Untersuchungen zur *in vitro* Aktivität im zellfreien Extrakt des β -Galactosidase-negativen Stammes JM109 pJFK-fucT14 konnte daraufhin eine Fucosyltransferase-Aktivität unter Zugabe von GDP-Fuc festgestellt werden, während der Kontrollstamm ohne *fucT14*-Gen oder die Kontrollansätze ohne GDP-Fuc, ohne Akzeptor-Substrate oder ohne zellfreies Extrakt keine Aktivitäten zeigten. Nach einer Inkubation von 17 h konnten dabei Abnahmen der Akzeptor-Substrate von etwa 2,2 % (Lactose), 83,7 % (LNT II) und 95,8 % (LNT) sowie jeweils die Entstehung eines neuen Produkts beobachtet werden (Baumgärtner *et al.*, 2015a). Damit konnte die zuvor beschriebene geringe Aktivität mit Lactose bestätigt werden. Eine Abhängigkeit von Typ I-Strukturen wurde jedoch nicht beobachtet, da auch das Trisaccharid LNT II weitgehend umgesetzt wurde. Dennoch wurde neben *futC* auch das Gen *fucT14* mit dem Stamm LJ-AYFO für Plasmid-basierte und Plasmid-freie *in vivo* Synthesen eingesetzt, wie in den folgenden Abschnitten beschrieben.

3.5.2. Synthese von Lacto-N-fucopentaose I (LNFP I)

Für die Synthese des Pentasaccharids LNFP I (Struktur s. Abbildung 1.2) sollte der Stamm LJ-AYFO mit dem α 1,2-Fucosyltransferase-Gen *futC* kombiniert werden. Dabei zeigten sich in ersten Schüttelkolbenversuchen in Minimalmedium mit Glucose (10 g l⁻¹, Endkonz.) und Casaminsäuren (1 g l⁻¹, Endkonz.) mit LJ-AYFO pJFK-futC im Vergleich zu den Kulturen des Kontrollstamms mit Leerplasmid 26 h nach Induktion jedoch deutlich geringere Konzentrationen der Kernstrukturen LNT II und LNT. Da den Kulturen zu diesem Zeitpunkt noch keine L-Fucose für die Fucosylierung der Kernstrukturen zugegeben war, wurde vermutet, dass die gesenkten Produktausbeuten auf eine starke Expression der Plasmid-kodierten Kopien von *futC* zurückzuführen waren und somit die Synthese der Kernstrukturen beeinträchtigt wurde. Um diesen Sachverhalt ohne weitere Untersuchungen zu umgehen, wurde der Vektor pCAW55 von

Christoph Albermann genutzt, welcher das Gen *futC* unter der Kontrolle eines L-Rhamnose induzierbaren Promotors trägt (Tabelle 2.2). Dies erlaubte die separate Induktion der Expression von *futC* zu einem späteren Zeitpunkt.

In den Kulturen mit LJ-AYFO pCAW55 und dem Kontrollstamm LJ-AYFO pJOE2702 wurden L-Fucose und L-Rhamnose (je 2 g l⁻¹) 26 h nach Induktion mit IPTG und Zugabe von Lactose zugegeben, um so eine ausreichende Zeit für die Synthese von LNT und LNT II vor der Fucosylierung zu ermöglichen. Gleichzeitig sollte damit die starke Bildung von 2'-FL verhindert werden, welche auftreten kann, da Lactose ebenfalls ein Akzeptor-Substrat von FutC ist und somit als Akzeptor-Substrat in Konkurrenz zu LNT steht (Stein *et al.*, 2008). Eine solche vermehrte Bildung von 2'-FL wurde bereits bei der Ganzzell-Synthese fucosylierter Derivate von LNnT beschrieben (Drouillard *et al.*, 2006). Nach einer weiteren Prozesszeit von 39 h konnte LNFP I in der Kultur mit LJ-AYFO pCAW55 als intrazelluläres Hauptprodukt nachgewiesen werden, wohingegen in der Kultur des Kontrollstammes und in einer Kultur ohne die Zugabe von L-Fucose keine fucosylierten Verbindungen detektiert wurden.

Um neben dieser Plasmid-basierten, zweistufigen Synthese, aber auch die Synthese in einem Plasmid-freien System zu ermöglichen, wurde das Gen *futC* anschließend chromosomal in den Stamm LJ-AYFO integriert und somit der Stamm LJ-AYFOC-cat generiert (Abbildung 3.26). In dem dabei entstandenen Stamm wurde das Gen *futC* bewusst wieder unter die Kontrolle eines IPTG-induzierbaren P_{tac}-Promotors gestellt, um die Induktion gleichzeitig mit der Induktion der anderen rekombinanten Gene durchführen und auf die Zugabe von L-Rhamnose verzichten zu können. Die zuvor beobachteten verringerten Synthesen von LNT und LNT II bei der Verwendung des Plasmids pJFK-futC konnten in diesem Plasmid-freien Stamm nicht beobachtet werden, was mit der deutlich geringeren Kopienzahl des chromosomal integrierten Gens *futC* im Vergleich zum Plasmid-kodierten Gen begründet werden kann.

Die darauffolgenden Schüttelkolben-Kulturen mit LJ-AYFOC-cat wurden in biologischen Replikaten analog zu den Kulturen mit dem Plasmid-tragenden Stamm LJ-AYFO pCAW55 in Minimalmedium mit Glucose und Casaminosäuren, jedoch ohne die Zugabe von Ampicillin und L-Rhamnose, durchgeführt. Die dabei erreichten spezifischen Wachstumsraten sind in Tabelle 3.7 aufgeführt und zeigen, im Vergleich zu den

Kontrollstämmen ohne Fucosyltransferase-Gen, geringfügig schnelleres Wachstum des Stamms LJ-AYFOC.

Tabelle 3.7: Spezifische Wachstumsraten der LJ-AYO-basierten Stämme in Schüttelkolbenkulturen zur Synthese fucosylierter LNT-Derivate.^[a]

| Stamm | μ_{\max} [h ⁻¹] | R ² | Bestimmungszeitraum [h] |
|---------------|---------------------------------|----------------|-------------------------|
| LJ-AYO-cat | 0,429 | 0,9905 | 5,42 (5 Messwerte) |
| LJ-AYFO-cat | 0,400 | 0,9968 | 5,42 (5 Messwerte) |
| LJ-AYFOC-cat | 0,441 | 0,9999 | 4,66 (4 Messwerte) |
| LJ-AYFO14-cat | 0,437 | 0,9999 | 4,66 (4 Messwerte) |

^[a] Bestimmung der spezifischen Wachstumsraten (μ_{\max}) anhand der OD₆₀₀ in der exponentiellen Wachstumsphase der Kulturen. Durchgeführt bei 30 °C in Minimalmedium mit Glucose (10 g l⁻¹, Endkonz.) und Casaminosäuren (1 g l⁻¹, Endkonz.) unter Zugabe von Lactose (2 g l⁻¹, Endkonz.) und IPTG (0,5 mM, Endkonz.) bei OD₆₀₀ = 0,4 – 0,6.

26 h nach Induktion mit IPTG konnten bei einer optischen Dichte von $9,78 \pm 0,24$ LNT II bzw. LNT-Konzentrationen von $1407,4 \pm 23,4$ mg l⁻¹ bzw. $265,8 \pm 2,0$ mg l⁻¹ mit dem Stamm LJ-AYFOC-cat ermittelt werden. Nach der Zugabe von L-Fucose, der Erhöhung des Kulturvolumens um 50 % mit frischem Medium (s. Abschnitt 2.5.3) und einer weiteren Inkubationszeit von 39 h konnte 65 h nach der Induktion LNFP I als intrazelluläres Hauptprodukt nachgewiesen werden. Im Vergleich zu einem kommerziellen Standard zeigten die Kulturen mit OD₆₀₀ = $10,67 \pm 0,04$ einen LNFP I-Titer von $271,6 \pm 6,1$ mg l⁻¹, wie in Tabelle 3.8 aufgeführt (Baumgärtner *et al.*, 2015a). Die Raum-Zeit-Ausbeute für die Synthese von LNFP I ab dem Zeitpunkt der Induktion betrug $4,2$ mg l⁻¹ h⁻¹. Somit konnte die erste rekombinante *in vivo* Synthese LNFP I beschrieben werden.

Tabelle 3.8: Produktausbeuten der Schüttelkolbenkulturen von LJ-AYFOC-cat.^[a]

| Verbindung | Konzentration [mg l ⁻¹] | Anteil im Kulturüberstand [%] |
|------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| 2'-FL | $265,3 \pm 5,5$ | $95,0 \pm 0,1$ |
| LNT II | $1577,7 \pm 6,1$ | $97,9 \pm 0,1$ |
| LNT | $62,7 \pm 11,8$ | 100 ^[b] |
| LNFP I | $271,6 \pm 6,1$ | $17,9 \pm 0,4$ |

^[a] Kultivierung durchgeführt bei 30 °C in Minimalmedium mit Glucose (10 g l⁻¹, Endkonz.) und Casaminosäuren (1 g l⁻¹, Endkonz.). Der Zugabe von Lactose (2 g l⁻¹, Endkonz.) und IPTG (0,5 mM, Endkonz.) bei OD₆₀₀ = 0,4 – 0,6 folgte nach 26 h die Zugabe von 0,5 Kulturvolumen Minimalmedium und L-Fucose (2 g l⁻¹, Endkonz.). Produktanalyse mittels HPLC 65 h nach Induktion mit IPTG. Teile der Ergebnisse bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2015a).

^[b] Produkt lediglich im Kulturüberstand detektiert.

3.5.3. Synthese von Lacto-N-difucohexaose II (LNDFH II)

Ähnlich zur Synthese von LNFP I wurde auch für die Synthese von LNDFH II der Stamm LJ-AYFO zuerst mit einem Fucosyltransferase-kodierenden Plasmid versehen, um die Synthese zu untersuchen. Dazu wurde *fucT14* in dem Plasmid pWA229 (Wilms *et al.*, 2001b) unter die Kontrolle eines L-Rhamnose induzierbaren Promotors gestellt, um das Plasmid pAW-fucT14 zu erzeugen (Tabelle 2.2). Nach der Transformation von pAW-fucT14 bzw. dem Leerplasmid pAWΔI in den Stamm LJ-AYFO, wurden Schüttelkolben-Versuche analog zu den in Abschnitt 3.5.2 beschriebenen Versuchen durchgeführt. Dabei zeigte sich 26 h nach Induktion mit IPTG und Zugabe von Lactose in beiden Stämmen nur die Bildung von LNT II und LNT, während 39 h nach Zugabe von L-Rhamnose und L-Fucose in der Kultur mit dem Stamm LJ-AYFO pAW-fucT14 fucosylierte Lacto-N-triose II und LNDFH II identifiziert werden konnten. Während der Kontrollstamm keine fucosylierten Produkte synthetisierte, erschienen die beiden im Stamm LJ-AYFO pAW-fucT14 detektierten Produkte als intrazelluläre Hauptprodukte. Dabei konnten weder Lactose oder LNT II noch LNT intrazellulär nachgewiesen werden.

Um auch diese Synthese Plasmid-frei durchführen zu können, wurde daraufhin *fucT14* unter der Kontrolle eines P_{tac} -Promotors chromosomal in den *rhaBD*-Lokus des Stammes LJ-AYFO integriert und so der Stamm LJ-AYFO14-cat generiert (Tabelle 2.1). In den damit, wie zuvor für den Stamm LJ-AYFO14-cat, durchgeführten Kulturen zeigte LJ-AYFO14-cat eine maximale spezifische Wachstumsrate von $\mu_{max} = 0,437 \text{ h}^{-1}$ (Tabelle 3.7) und 26 h nach Induktion eine optische Dichte von $10,19 \pm 0,48$. Dabei wurden LNT II- und LNT-Titer von $1404,6 \pm 59,1 \text{ mg l}^{-1}$ und $307,8 \pm 14,5 \text{ mg l}^{-1}$ erreicht, bevor den Kulturen weiteres Medium und L-Fucose zugegeben wurden. Nach der darauffolgenden Inkubation wurden die Kulturen 65 h nach Induktion mit IPTG auf die Produktbildung untersucht. Mittels HPLC konnten in den Kulturen mit $OD_{600} = 13,27 \pm 0,01$ α 1,3-fucosylierter Lacto-N-triose II und LNDFH II, LNT und LNT II detektiert werden. In den Sediment-Fractionen wurden fucosyliertes LNT II und LNDFH II als einzige Produkte nachgewiesen, während im Kulturüberstand auch die Zwischenprodukte LNT II und LNT detektiert wurden (Tabelle 3.9). Das Substrat Lactose wurde 65 h nach Zugabe weder in der Sediment-Fraktion noch im Kulturüberstand nachgewiesen. Die Kontrollkulturen ohne Zugabe von L-Fucose oder ohne Fucosyltransferase zeigten keine Bildung fucosylierter Verbindungen.

Tabelle 3.9: Produktausbeuten der Schüttelkolbenkulturen von LJ-AYFO14-cat.^[a]

| Verbindung | Konzentration [mg l ⁻¹] | Anteil im Kulturüberstand [%] |
|-------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| LNT II | 1045,8 ± 10,6 | 100 ^[b] |
| LNT | 59,8 ± 7,0 | 100 ^[b] |
| Fuc. LNT II | 816,9 ± 22,0 | 37,6 ± 1,2 |
| LNDFH II | 547,2 ± 3,8 | 23,8 ± 0,3 |

^[a] Kultivierung durchgeführt bei 30 °C in Minimalmedium mit Glucose (10 g l⁻¹, Endkonz.) und Casaminosäuren (1 g l⁻¹, Endkonz.). Der Zugabe von Lactose (2 g l⁻¹, Endkonz.) und IPTG (0,5 mM, Endkonz.) bei OD₆₀₀ = 0,4 – 0,6 folgte nach 26 h die Zugabe von 0,5 Kulturvolumen Minimalmedium und L-Fucose (2 g l⁻¹, Endkonz.). Produktanalyse mittels HPLC 65 h nach Induktion mit IPTG. Teile der Ergebnisse bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2015a).

^[b] Produkt lediglich im Kulturüberstand detektiert.

3.5.4. Produktisolierung und Produktcharakterisierung

Zur strukturellen Verifikation der in den Abschnitten 3.5.2 und 3.5.3 synthetisierten, fucosylierten Oligosaccharide erfolgten die Biosynthesen mit den Stämmen LJ-AYFO pCAW55 und LJ-AYFO pAW-fucT14 bereits vor der Konstruktion der Plasmid-freien Stämme. Die Kultivierungen wurden dazu analog zu den in Abschnitten 3.5.2 und 3.5.3 beschriebenen Schüttelkolben-Kultivierungen, jedoch im größeren Maßstab mit einem anfänglichen Kulturvolumen von je 500 ml, durchgeführt. Die neu generierten Produkte wurden im Anschluss an die Kultivierungen aus den Zellextrakten durch Adsorptionschromatographien mit Aktivkohle/Celite 545-Säulen und anschließenden Größenausschlusschromatographien isoliert. Um die entstandenen Produkte dabei bestmöglich nach ihrer Größe auftrennen zu können, wurden für die Proben mit LNFP I bzw. LNDFH II Gelfiltrationsmaterialien mit unterschiedlichen Größenbereichen gewählt (siehe Abschnitt 2.6.3).

Aus dem Zellysats von LJ-AYFO pCAW55 konnten auf diese Weise 59,4 mg LNFP I isoliert werden, welche für die Strukturverifikation mittels MS und NMR verwendet wurden. Dabei wurde LNFP I (Abbildung A.16) im Massenspektrum mit den Massen $m/z = 449,64$, $m/z = 854,31$ und $m/z = 876,29$ identifiziert, welche dem Dinatrium-Addukt (erwartet: $m/z = 449,65$), dem Protonen-Addukt (erwartet: $m/z = 854,32$) und dem Natrium-Addukt (erwartet: $m/z = 876,30$) von LNFP I entsprechen. Die dabei beobachteten Abweichungen zu den erwarteten Werten von jeweils $m/z = 0,01$ sind vermutlich auf die Kalibrierung des Massenspektrometers zurückzuführen. Nachdem somit neben dem Vergleich der Retentionszeiten mit einem kommerziellen Standard auch die Massen den Erwartungen entsprachen, konnte die Konstitution des Moleküls

anhand von 1D- und 2D-NMR-Spektren aufgeklärt werden, welche durch Jürgen Conrad am Institut für Bioorganische Chemie der Universität Hohenheim aufgenommen wurden (Abbildung A.17 und Abbildung A.18). Dabei erlaubten die Spektren die autonome Zuordnung der chemischen Verschiebungen (Tabelle 3.10 und Tabelle A.4) und bestätigten die in Abbildung 3.27 dargestellte Struktur des Produkts LNFP I. Neben dieser Auswertung zeigten die ermittelten chemischen Verschiebungen auch eine gute Übereinstimmung mit den bereits publizierten chemischen Verschiebungen von LNFP I (Hermansson *et al.*, 1992; Hounsell *et al.*, 1988; Säwén *et al.*, 2011).

Bei der Isolierung fucosylierter Oligosaccharide aus dem Zellysate von LJ-AYFO pAW-fucT14 konnte neben 133,7 mg LNDFH II und 71,5 mg der α 1,3-fucosylierten Lacto-N-triose II auch noch ein weiteres Oligosaccharid mit einer Ausbeute von 5,5 mg isoliert werden. Dabei handelt es sich um ein Derivat von LNDFH II, welches eine zusätzliche α 1,3-gebundene N-Acetylglucosaminyl-Gruppe enthält und daher im Folgenden als Lacto-N-difucoheptaose (LNDFHep) bezeichnet wird (Abbildung 3.27). Die Massenspektren der isolierten LNDFH II (Abbildung A.19), fucosylierten LNT II (Abbildung A.22) und LNDFHep (Abbildung A.25) zeigten die erwarteten Masse-zu-Ladung-Verhältnisse der Dinatrium-, Natrium- und Natrium-Protonen-Addukte.

In den darauffolgenden Strukturaufklärungen mittels NMR-Spektroskopie konnten die Strukturen der drei Verbindungen bestätigt werden, wie sie in Abbildung 3.27 dargestellt sind. Die umfassende NMR Analyse erlaubte außerdem, die zuvor nicht beschriebene eindeutige Annotation aller ^{13}C -Signale sowie der meisten Protonensignale von LNDFH II (Tabelle 3.11). Die chemischen Verschiebungen der ^1H -Signale, die bereits literaturbeschrieben waren (Bruntz *et al.*, 1988; Hounsell *et al.*, 1988; Sabharwal *et al.*, 1988), zeigten dabei vergleichbare Werte mit den in dieser Arbeit annotierten Verschiebungen (Tabelle A.5). Da sowohl fucosylierte Lacto-N-triose II als auch LNDFHep bisher nicht in humaner Milch identifiziert wurden, konnten keine publizierten NMR-Daten zu diesen Molekülen identifiziert werden. Außerdem konnten keinerlei wissenschaftliche Beschreibungen zu LNDFHep in der Literatur ausgemacht werden, während die α 1,3-fucosylierte Lacto-N-triose II als Substrat einer enzymatischen Umsetzung in einer Publikation erwähnt wurde (Kataoka *et al.*, 2006). Die mittels verschiedener 1D- und 2D-NMR-Spektren annotierten chemischen Verschiebungen und die dazugehörigen ^1H - sowie ^{13}C -Spektren sind im Anhang in den Abschnitten A.1.8 (fucosyliertes LNT II) und A.1.9 (LNDFHep) dargestellt.

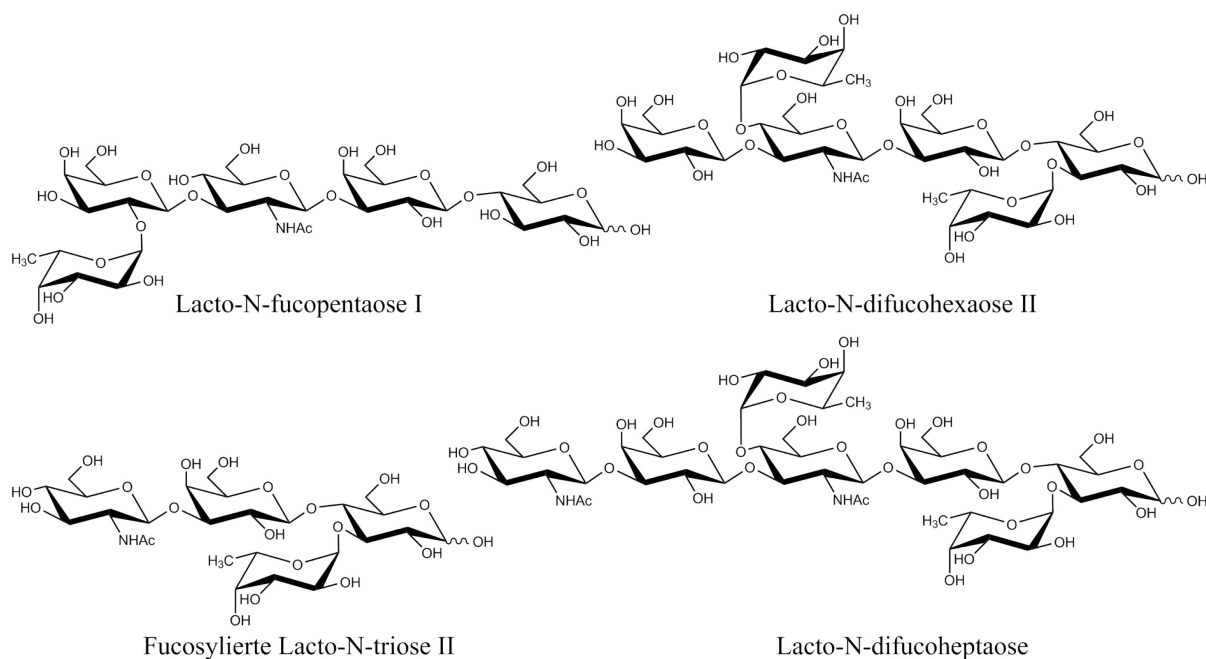


Abbildung 3.27: Strukturen von HMOs Lacto-N-fucopentaose I (LNFP I) und Lacto-N-difucohexaose II (LNDFH II) sowie von fucosylierter Lacto-N-triose II und Lacto-N-difucoheptaose (LNDFHep). Abbildung in anderer Form bereits veröffentlicht (Baumgärtner *et al.*, 2015a).

Tabelle 3.10: ^{13}C -NMR Daten der synthetisierten Lacto-N-fucopentaose I (LNFP I).^[a]

| Glycosyl-Gruppe | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 | CO des NAc | CH ₃ des NAc |
|---|--------|-------|-------|-------|-------|-------|------------|-------------------------|
| Glc (α) | 92,77 | 72,09 | 72,33 | 79,21 | 71,11 | 60,91 | | |
| Glc (β) | 96,69 | 74,76 | 75,29 | 79,12 | 75,78 | 61,04 | | |
| β1,4Gal (α) | 103,87 | 71,24 | 82,51 | 69,57 | 75,78 | 61,93 | | |
| β1,4Gal (β) | 103,91 | 71,21 | 82,53 | 69,55 | | 61,92 | | |
| β1,3GlcNAc | 104,19 | 55,93 | 78,13 | 69,43 | 76,21 | 61,37 | 175,20 | 23,11 |
| β1,3Gal | 101,21 | 77,63 | 74,45 | 70,09 | 76,03 | 62,11 | | |
| α1,2Fuc | 100,48 | 69,01 | 70,39 | 72,82 | 67,45 | 16,23 | | |

^[a] ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) aufgenommen in D_2O . Chemische Verschiebungen in ppm. Methanol- d_4 ($\delta = 49$ ppm) wurde als interner Standard verwendet. Ergebnisse bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2015a).

Tabelle 3.11: ^{13}C -NMR Daten der synthetisierten Lacto-N-difucohexaose II (LNDFH II).^[a]

| Glycosyl-Gruppe | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 | CO des NAc | CH ₃ des NAc |
|------------------------------|--------|-------|-------|----------------------|-------|-------|------------|-------------------------|
| Glc (α) | 93,09 | 73,67 | 75,67 | 73,28 | 71,90 | 60,69 | | |
| Glc (β) | 96,82 | 76,53 | 77,98 | 73,36 | 76,34 | 60,77 | | |
| α 1,3Fuc (α) | 99,51 | 69,02 | 70,24 | 72,90 ^[b] | 67,39 | | | |
| α 1,3Fuc (β) | 99,41 | 68,99 | 70,19 | 72,88 ^[b] | 67,43 | 16,18 | | |
| β 1,4Gal (α) | | 71,63 | 82,49 | 69,18 | | 62,44 | | |
| β 1,4Gal (β) | 102,70 | 71,58 | 82,57 | 69,22 | 75,46 | 62,41 | | |
| β 1,3GlcNAc | 103,51 | 56,83 | 76,90 | 73,08 | 76,15 | 60,57 | 175,64 | 23,23 |
| β 1,3Gal | 103,80 | 71,48 | 73,30 | 69,32 | 75,77 | 62,60 | | |
| α 1,4Fuc | 98,96 | 68,78 | 70,11 | 72,92 | 67,78 | 16,33 | | |

^[a] ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) aufgenommen in D₂O. Chemische Verschiebungen in ppm. Methanol-d₄ ($\delta = 49$ ppm) wurde als interner Standard verwendet. Ergebnisse bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2015a).

^[b] Chemische Verschiebungen nicht eindeutig zugeordnet. Chemische Verschiebungen evtl. ausgetauscht.

3.6. Fucosylierte Derivate von LNnT

Neben fucosylierten Derivaten der Typ I-Kernstruktur LNT enthält Muttermilch auch signifikante Anteile fucosylierter Derivate der Typ II-Kernstruktur LNnT (Thurl *et al.*, 1996; Thurl *et al.*, 2010; Urashima *et al.*, 2012b). In chemischen Synthesen konnte schon früh das in Muttermilch am prominentesten vertretene Typ II-Pentasaccharid Lacto-N-fucopentaose III (LNFP III) mit einem α 1,3-gebundenen Fucosyl-Rest am N-Acetylglucosamin synthetisiert werden (Love & Seeberger, 2005; Manzoni *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999). Um neben den chemischen Synthesen auch die Ganzzellsynthesen fucosylierter Derivate von LNnT zu realisieren, konnte ein *E. coli* Stamm durch rekombinante Expression des positiv auf die Colansäure-Biosynthese wirkenden Regulators RcsA einhergehend mit einer inaktivierten WcaJ-Aktivität konstruiert werden (Dumon *et al.*, 2001). Durch diese Modifikationen wurde die intrazelluläre Synthese von GDP-L-Fucose verstärkt, aber eine übermäßige Colansäure-Biosynthese unterdrückt. In Kombination dieses Stammes mit verschiedenen Fucosyltransferasen und der Synthese von LNnT via LgtA und LgtB konnten somit sowohl ein α 1,2-fucosyliertes LNnT als auch die HMOs LNnDFH, LNFP III und LNnFP V in Plasmid-basierten Ganzzellsynthesen dargestellt werden (Drouillard *et al.*, 2006; Dumon *et al.*, 2001; Dumon *et al.*, 2004). Dabei zeigte sich jedoch die Schwierigkeit, dass das gebildete LNnT durch wiederholte Glycosylierungen durch LgtA und LgtB zu größeren Strukturen elongiert wurde und dadurch ein Gemisch verschiedener Oligosaccharide entstand.

Um die Möglichkeit der Antibiotika-freien Synthese fucosylierter Derivate von LNnT mit Plasmid-freien *E. coli* zu untersuchen und das Ausmaß dieser weiteren Elongation von LNnT in Plasmid-freien Systemen abzuschätzen, sollten in diesem Teilprojekt ebenfalls verschiedene Fucosyltransferasen mit einem LNnT- und GDP-Fuc-Produzenten kombiniert werden.

3.6.1. Stammkonstruktion

Zu Konstruktion von Stämmen, welche fucosylierte Derivate von LNnT synthetisieren, wurde der in Abschnitt 3.4 beschriebene, Plasmid-freie Stamm LJ-AYB als Ausgangsstamm verwendet. Ähnlich wie in Abschnitt 3.5.1 für die Konstruktion von LJ-AYF-cat beschrieben, wurde das *B. fragilis*-Gen *fkp*, welches für eine bifunktionale L-Fucose Kinase/L-Fucose-1-phosphat Guanylyltransferase (Fkp) kodiert und somit die Synthese von GDP-Fuc aus L-Fucose erlaubt, chromosomal in den L-Arabinose-Degradations-Lokus integriert, um den Stamm LJ-AYBF-cat zu generieren (Abbildung 3.28). Nach dem erfolgreichen Nachweis der intrazellulären Bildung von GDP-Fuc (s. Abschnitt 2.7.4), sollte dieser Stamm zuerst in Kombination mit Plasmid-basierter Expression von Fucosyltransferase-Genen untersucht werden, bevor die chromosomale Integration dieser Gene erfolgte. Dazu wurden die in den Abschnitten 3.1 und 3.2 beschriebenen *H. pylori*-Gene *futC* und *futA*, welche eine α 1,2- und eine α 1,3-Fucosyltransferase kodieren, unter Kontrolle von P_{tac} -Promotoren auf den Plasmiden pJFK-*futC* und pJFK-*futA* in den Stamm LJ-AYBF eingebracht. Die resultierenden Stämme LJ-AYBF pJFK-*futC* und LJ-AYBF pJFK-*futA* wurden zusammen mit dem Kontrollstamm LJ-AYBF pJF119EH-kan in Schüttelkolben-Kulturen in Minimalmedium mit Glucose und Casaminosäuren analog zu den in Abschnitt 3.4.2 beschriebenen Versuchen kultiviert und die Produktbildung 26 h nach Induktion direkt vor der Zugabe von L-Fucose mittels HPLC untersucht (s. Abschnitt 2.7.3). Nach der Zugabe von L-Fucose und einer weiteren Inkubation für 39 h erfolgte eine erneute Untersuchung mittels HPLC. Dabei zeigten alle drei Kulturen vor der Zugabe von L-Fucose in den Zellsediment-Fractionen neben dem Substrat Lactose und dem Trisaccharid LNT II hauptsächlich drei Produkte mit geringerer Retention als LNnT. Dass es sich bei diesen Produkten um größere Kernstrukturen handelt, welche aus LNnT entstanden sind, lag nahe, da eine weitere Reaktion von LNnT zu größeren Oligosacchariden mittels LgtA und LgtB sowohl bereits in Abschnitt 3.4 beobachtet wurde und auch literaturbeschrieben ist (Priem *et al.*, 2002; Abschnitt 1.2.4). Dass es

sich bei diesen Produkten jedoch um fucosylierte Oligosaccharide handelt, konnte ausgeschlossen werden, da diese Nebenprodukte bereits vor der Zugabe von L-Fucose und auch in den Kulturen mit Stämmen ohne Fucosyltransferase-Gene beobachtet werden konnten. Mit dieser Beobachtung zeichnete sich bereits ab, dass die Synthese fucosylierter Derivate von LNnT auch mit der Bildung und möglichen Fucosylierung weiterer Kernstrukturen einhergehen würde. Die Analyse der Sediment-Fractionen nach Zugabe von L-Fucose zeigte für die Kulturen mit LJ-AYBF pJFK-futC und LJ-AYBF pJFK-futA weitere Fluoreszenzsignale, welche in der Kontrolle ohne Fucosyltransferase-Gen nicht enthalten waren und somit auf fucosylierte Verbindungen zurückgeführt wurden.

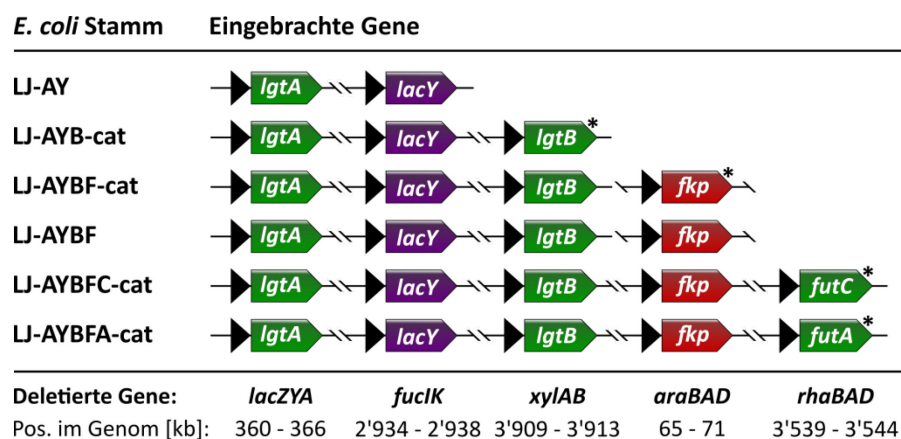


Abbildung 3.28: Genotypen einer Auswahl der zur Synthese fucosylierter Derivate von Lacto-N-neotetraose erstellter, Plasmid-freier Stämme. Eingebrachte Gene in farbigen Pfeilen mit den dabei deletierten Zuckerdegradations-Genen und deren Positionen auf dem LJ110 Chromosom darunter (Hayashi *et al.*, 2006; Tatusova *et al.*, 2014). Die Positionsangaben wurden dabei jeweils so auf- bzw. abgerundet, dass die deletierten Gene von dem angegebenen Bereich komplett eingeschlossen sind. Glycosyltransferasen-kodierende Gene sind in grün dargestellt. Alle rekombinant eingebrachten Gene stehen unter Kontrolle jeweils eines IPTG-induzierbaren P_{tac} -Promotors. Sterne markieren die Gene, deren jeweilige Expressionskassetten noch ein Antibiotikaresistenz-Gen enthalten (s. Tabelle 2.1).

Da dabei jedoch je Kultursediment mehr als vier verschiedene neue Fluoreszenzsignale erkennbar waren und eine Zuordnung der Signale aufgrund fehlender Standards und unzureichender chromatographischer Trennung nicht ohne weiteres möglich war, wurde der Fokus auf die Konstruktion Plasmid-freier Stämme gelegt, bevor die in den Zellaufschlüssen dieser Plasmid-freier Zellen vorkommenden Massen von Oligosacchariden mittels MS untersucht wurden. Hierzu wurden die Gene *futC* und *futA* jeweils unter Kontrolle eines P_{tac} -Promotors chromosomal in den L-Rhamnose-Degradations-Lokus *rhaBD* von LJ-AYB integriert, um die Stämme LJ-AYBFC-cat und LJ-AYBFA-cat zu generieren.

3.6.2. Schüttelkolben-Kulturen zur Synthese fucosylierter Typ II-Oligosaccharide

Die große strukturelle Vielfalt verschiedener fucosylierter und nicht-fucosylierter Produkte in den Plasmid-basierten Schüttelkolbenversuchen in Abschnitt 3.6.1 erlaubte es nicht, Signalüberlagerungen in der Analytik mittels HPLC auszuschließen. Daher, aufgrund der großen Vielfalt plausibler Produkte und wegen der limitierten Verfügbarkeit kommerzieller Standards dieser Produkte, ist die Identifizierung und Quantifizierung der gebildeten Produkte nur unter großem Aufwand möglich. Daher sollten in den Schüttelkolbenversuchen mit Plasmid-freien Stämmen vor allem qualitative Unterschiede in der Zusammensetzung der gebildeten Produkte ohne bzw. mit einer der beiden bereits in Plasmid-basierten Systemen getesteten Fucosyltransferasen betrachtet werden. Als Kontrollen für Wachstum und Produktbildung ohne Fucosyltransferase-Aktivität wurden dazu die Stämme LJ-AYB-cat und LJ-AYBF-cat eingesetzt. Zusätzlich wurden weitere Kontrollen mit Stämmen mit Fucosyltransferase-Genen, aber ohne Zugabe von L-Fucose untersucht. Kultiviert wurden die Stämme dabei analog zu den bereits in Abschnitten 3.5.2 und 3.5.3 eingesetzten Bedingung in Minimalmedium mit Glucose und Casaminosäuren. Dabei zeigten die vier Stämme LJ-AYB-basierten Stämme zwar langsameres Wachstum (Tabelle 3.12) als die LJ-AYFO-basierten Stämme (Tabelle 3.7), aber dennoch deutlich zuverlässigeres Wachstum als der Stamm LJ-AYB-cat in Minimalmedium ohne Casaminosäuren (Abschnitt 3.4.2). Die bestimmten optischen Dichten 26 h bzw. 65 h nach Induktion und somit 35 h nach der Zugabe von L-Fucose und der Erhöhung des Kulturvolumens um 50 % mit frischem Minimalmedium mit Glucose, sind in Tabelle 3.12 aufgeführt. Dabei zeigen die Kulturen nach der Zugabe von L-Fucose und weiterem Medium erneutes Wachstum und erreichen optische Dichten, welche über den Werten der Proben 26 h nach Induktion liegen. Ein Einbruch der optischen Dichten mit der Induktion und Lactose-Zugabe, wie beobachtet für die Kulturen in Abschnitt 3.4.2, konnte dabei nicht beobachtet werden, wie in den Wachstumskurven im Anhang in Abbildung A.34 dargestellt.

Tabelle 3.12: Spezifische Wachstumsraten und optische Dichten der LJ-AYB-basierten Stämme in Schüttelkolbenkulturen zur Synthese fucosylierter LNnT-Derivate.^[a]

| Stamm | μ_{\max} [h ⁻¹] ^[b] | OD ₆₀₀ (26 h) [-] ^[c] | OD ₆₀₀ (65 h) [-] ^[c] |
|--------------|--|---|---|
| LJ-AYB-cat | 0,253 | 8,97 ± 0,07 | 9,50 ± 0,05 |
| LJ-AYBF-cat | 0,243 | 9,52 ± 0,10 | 9,81 ± 0,15 |
| LJ-AYBFC-cat | 0,365 | 9,55 ± 0,16 | 9,77 ± 0,27 |
| LJ-AYBFA-cat | 0,377 | 9,90 ± 0,08 | 11,03 ± 0,38 |

^[a] Bestimmung der spezifischen Wachstumsraten (μ_{\max}) anhand der OD₆₀₀ in der exponentiellen Wachstumsphase der Kulturen. Durchgeführt bei 30 °C in Minimalmedium mit Glucose (10 g l⁻¹, Endkonz.) und Casaminsäuren (1 g l⁻¹, Endkonz.) unter Zugabe von Lactose (2 g l⁻¹, Endkonz.) und IPTG (0,5 mM, Endkonz.) bei OD₆₀₀ = 0,4 – 0,6.

^[b] R² jeweils > 0,997; Bestimmung jeweils über mind. 4 h mit mind. 4 Messpunkten in Duplikaten.

^[c] Optische Dichte 26 h bzw. 65 h nach Zugabe von IPTG und Lactose.

26 h nach Induktion zeigten die via HPLC analysierten Sediment-Fractionen aller Kulturen Produkte mit den gleichen Retentionszeiten. Diese unterschieden sich nur in den Signalintensitäten. Dabei enthielten die Sediment-Fractionen bereits vor der Zugabe von L-Fucose neben Lactose, LNT II und LNnT auch mindestens drei Nebenprodukte, die in Summe ein stärkeres Fluoreszenzsignal zeigten als LNnT. Unter der in Abschnitt 2.7.3 beschriebenen Annahme von gleichem Fluoreszenzverhalten aller derivatisierten Oligosaccharide konnten die Konzentrationen der Oligosaccharide vor der Zugabe von L-Fucose bestimmt werden. Die in biologischen Duplikaten ermittelten Konzentrationen von LNT II, LNnT und Lactose je Kulturvolumen in der Sediment-Fraktion sind in Tabelle 3.13 dargestellt und konnten mit Minimalmedium mit Glucose und Casaminsäuren deutlich gesteigert werden im Vergleich zu den in Abschnitt 3.4.2 beschriebenen Synthesen mit LJ-AYB-cat aber ohne Verwendung von Casaminsäuren.

Tabelle 3.13: Intrazellulär vorkommende LNnT, LNT II und Lactose in Typ II-Oligosaccharid synthetisierenden Stämmen 26 h nach Induktion.

| <i>E. coli</i> Stamm | Konzentrationen in der Zellsediment-Fraktion [mg l _{Kultur} ⁻¹] | | |
|----------------------|--|---------------|--------------|
| | LNnT | LNT II | Lactose |
| LJ-AYB-cat | 93,98 ± 3,50 | 103,05 ± 8,45 | 26,55 ± 3,45 |
| LJ-AYBF-cat | 44,79 ± 1,83 | 73,65 ± 3,39 | 10,03 ± 0,18 |
| LJ-AYBFC-cat | 47,00 ± 1,24 | 52,09 ± 1,63 | 7,81 ± 0,58 |
| LJ-AYBFA-cat | 63,56 ± 2,57 | 57,35 ± 0,59 | 11,64 ± 0,35 |

^[a] Kultivierung bei 30 °C und 90 rpm in Minimalmedium mit Glucose (10 g l⁻¹, Endkonz.) und Casaminsäuren (1 g l⁻¹, Endkonz.) als Kohlenstoffquellen und 2 g l⁻¹ Lactose als Substrat für die Produktbildung, durchgeführt jeweils mit einem anfänglichen Kulturvolumen von 50 ml in Duplikaten. Bestimmung der intrazellulären Vorkommen jeweils 26 h nach Induktion mit IPTG (0,5 mM, Endkonz.) via Produkt-Derivatisierung mit Anthranilsäure und Auftrennung mittels HPLC sowie Fluoreszenz-Detektion.

Die Nebenprodukte, bei welchen es sich vermutlich um größere Oligosaccharid-Kernstrukturen als LNnT handelt, konnten aufgrund überlagerter Signale und unbekannter Molekularmassen nicht einzeln quantifiziert werden. Die Summe dieser Signalintensitäten [mV min] betrug $152,9 \pm 1,0$ %, $335,6 \pm 16,6$ %, $235,4 \pm 5,4$ % und $178,9 \pm 1,6$ % des jeweiligen Signals von LNnT in den Kulturen mit den Stämmen LJ-AYB-cat, LJ-AYBF-cat, LJ-AYBFC-cat und LJ-AYBFA-cat. Da diese Verhältnisse unter der Annahme gleichen Fluoreszenzverhaltens aller derivatisierten Oligosaccharide etwa den molaren Verhältnissen der Substanzen entsprechen, scheinen die größeren Oligosaccharide jedoch bereits in höheren Konzentrationen vorzuliegen als LNnT.

Die HPLC-Analyse der Sediment-Fraktionen 39 h nach der Zugabe von L-Fucose zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Stämmen mit und ohne Fucosylierung. So konnten in der Kultur mit dem Stamm LJ-AYBFC-cat mit L-Fucose im Vergleich zu den Kontrollen mindestens 4 Signale identifiziert werden, welche in den Kulturen ohne Fucosylierung nicht zu erkennen waren. Eines dieser Signale zeigte dabei die gleiche Retentionszeit wie der kommerzielle Standard von 2'-Fucosyllactose, während die anderen Signale nicht anhand ihrer Retentionszeiten identifiziert werden konnten. Die Kultur mit dem Stamm LJ-AYBFA-cat zeigte im Vergleich zu den Kulturen ohne Fucosylierung mindestens 6 neue Signale, welche mit der verwendeten Methode jedoch nicht ausreichend voneinander getrennt werden konnten. Alle Kontrollen dieser Kulturen zeigten dabei sehr ähnliche Oligosaccharid-Muster und unterschieden sich nur geringfügig in den Signalintensitäten der jeweiligen Produkte. Dabei konnte in allen Proben ein schwaches Signal von LNT II, jedoch kein Lactose-Signal beobachtet werden. Die Überlagerungen fucosylierter Produkte und die Ungewissheit, ob mehrere Produkte in den Signalen enthalten sind, können bei einem Vergleich verschiedener Kulturen zu Fehlschlüssen führen. Daher wurden Massenspektren der Zellextrakte von Kulturen mit bzw. ohne Fucosyltransferase aufgenommen, um über die in den Extrakten enthaltenen Masse-zu-Landung-Verhältnisse zumindest qualitative Aussagen treffen zu können (siehe Anhang A.2). Die Überstände der Kulturen mit LJ-AYBFC-cat bzw. LJ-AYBFA-cat zeigten 39 h nach Zugabe von L-Fucose bei der Analyse mittels HPLC hauptsächlich das Trisaccharid LNT II mit $1695,49 \pm 12,65$ mg l⁻¹ bzw. $1447,23 \pm 91,50$ mg l⁻¹, was einem Umsatz der zugegeben Lactose zum Trisaccharid LNT II von $79,8 \pm 0,6$ % bzw. $68,1 \pm 4,3$ % entspricht. In den Kulturen beider Stämme konnte dabei keine Lactose-Signale identifiziert werden, während die Kulturen mit LJ-AYBFC-cat 2'-FL

($134,27 \pm 2,86 \text{ mg l}^{-1}$) und die Kulturen mit LJ-AYBFA-cat ein anderes Nebenprodukt (Signalintensität: 255 mmol l^{-1}) demonstrierten.

Unter der Annahme, dass die gebildeten Oligosaccharide in den Aufnahmen von Massenspektren mit ESI-TOF nicht fragmentieren und in den zellfreien Extrakten der 65 h Sediment-Fraktionen keine anderweitigen Substanzen mit den gleichen Massen vorkommen, konnten den erhaltenen Masse-zu-Ladung-Verhältnissen potentiellen Oligosaccharide zugeordnet werden. Diese Zuordnungen sind im Anhang in Tabelle A.10 (LJ-AYBF-cat), Tabelle A.11 (LJ-AYBFC-cat) und Tabelle A.12 (LJ-AYBFA-cat) dargestellt. Dabei zeigte die Probe des Stamms LJ-AYBF-cat ohne Fucosyltransferase-Gen nur Massen ohne Fucosyl-Rest mit Oligosaccharid-Größen vom Trisaccharid bis zum Nonasaccharid, während in den Proben der Stämme mit Fucosyltransferase-Gen neben LNT II hauptsächlich die Massen von mono-, di- und trifucosylierten Kernstrukturen identifiziert wurden. Auffällig war bei der Analyse der Massen, dass in der Probe von LJ-AYBFC-cat neben LNT II nur die Massen von Oligosacchariden mit gerader Anzahl an Kernstruktur-Hexosen identifiziert wurden, während bei Proben von LJ-AYBFA-cat vor allem fucosylierte Derivate von Tri- und Pentasaccharid-Kernstrukturen erkannt wurden. Aufgrund unterschiedlicher Effizienz in der Ionisierung verschiedener Verbindungen sind anhand dieser Daten jedoch keine quantitativen Aussagen möglich.

4. Diskussion

Die Stoffgruppe der HMOs enthält über 100 verschiedene, strukturell charakterisierte Oligosaccharide und kann verschiedene positive Effekte auf die Gesundheit von Säuglingen haben, wie in den Abschnitten 1.1.2 und 1.1.4 dargestellt. Einige dieser positiven Effekten scheinen dabei auf den in vielen HMOs enthaltenen Antigen-Epitopen zu beruhen, welche durch spezifische Fucosylierung- oder Sialylierung der HMO-Kernstrukturen entstehen (s. Abschnitt 1.1.4). Aufgrund der Vielzahl verschiedener Strukturen, der Abhängigkeit des Vorkommens dieser Strukturen in humaner Milch vom Genotyp der Spenderin, der aufwändigen Isolierung einzelner HMOs aus humaner Milch und den fehlenden Methoden zur kostengünstigen Bereitstellung von HMOs, sind umfangreiche und systematische Studien zu den Struktur-Funktions-Beziehungen jedoch nur unter hohem Kostenaufwand möglich (Bode, 2012).

Aufgrund der hohen Regio- und Stereoselektivität von Glycosyltransferasen und der intrazellulären Bereitstellung der für diese Enzyme benötigten, Nukleotid-aktivierten Zucker, ist die Ganzzellsynthese von HMOs eine vielversprechende Alternative zur chemischen oder enzymatischen Synthese, welche ihr Potential bereits in verschiedenen Synthesen zeigen konnte (s. Abschnitt 1.2.4). Da dabei die rekombinant genutzten Gene jedoch jeweils Plasmid-ständig exprimiert wurden, war die Verwendung von Selektionssystemen zur Sicherstellung des Erhalts der Plasmide notwendig. Die dazu häufig eingesetzten Systeme, bestehend aus Antibiotikaresistenzen und Antibiotika, sind in großtechnischen Prozessen und der Lebensmittelindustrie unerwünscht bzw. verboten.

Das Ziel dieser Arbeit war daher die Konstruktion von Plasmid-freien *E. coli* Stämmen zur Ganzzellsynthese verschiedener HMOs durch die chromosomale Integration der rekombinanten Expressionskassetten in Zuckerdegradations-Loci, gefolgt von der Kultivierung der erstellten Stämme und der Isolierung und Untersuchung der synthetisierten Produkte. Dabei wurde der Fokus auf die Synthesen neutraler HMOs, also Kernstrukturen und fucosylierte Verbindungen, gelegt. Im Folgenden werden die zum Erreichen dieser Ziele durchgeführten Arbeiten und die dabei erhaltenen

Ergebnisse, aufgeteilt in die Stammkonstruktionen, die Synthesen von HMOs und die Produktcharakterisierung, diskutiert.

4.1. Stammkonstruktion

Die Stammkonstruktion erfolgte unter Verwendung bereits beschriebener bzw. charakterisierter Gene, welche entweder schon am Institut für Mikrobiologie vorhanden waren, aus chromosomaler DNA isoliert werden konnten oder als Codon-optimierte Varianten in synthetischer Form bestellt wurden. Da selbst die Plasmid-basierte Expression dieser Gene nur zu schwach erkennbaren Proteinbanden in SDS-PAGE-Gelen führte (s. Abbildung 3.15), wurden die Integrität erfolgter Klonierungen und Stammkonstruktionen auf DNA-Ebene und durch die eingebrachte, enzymatische Aktivität überprüft.

4.1.1. Wahl der Ausgangsstämme

Ähnlich zu den bereits beschriebenen Ganzzellsynthesen von HMOs (Abschnitt 1.2.4) sollte in dieser Arbeit Lactose als Akzeptor-Substrat für die verwendeten Glycosyltransferasen eingesetzt werden. Daher bestand die Anforderung an die Synthesestämme, Lactose aufnehmen, jedoch nicht anderweitig verwerten zu können. Die bereits in vorherigen Arbeiten zur Ganzzellsynthese neutraler HMOs genutzten Stämme *E. coli* JM107 und JM109 (Drouillard *et al.*, 2006; Dumon *et al.*, 2006) zeigten keine β -Galactosidase-Aktivität, verfügten aber über ein intaktes Lactose-Permease-Gen auf dem F'-Plasmid (Yanisch-Perron *et al.*, 1985), sodass dieser Stamm genutzt wurde für die am Institut für Mikrobiologie bereits vor dieser Arbeit durchgeführten Konstruktionen von 2'-FL-produzierenden Stämmen (Khan, 2012). Die vorhandene Lactose-Permease kann dabei nicht nur der Aufnahme von Lactose, sondern auch der Aufnahme von IPTG dienen (Fernández-Castané *et al.*, 2012), da alle in dieser Arbeit rekombinant eingebrachten Gene unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren P_{tac} -Promotors stehen. Neben der Aufnahme durch die Lactose-Permease kann IPTG auch durch Diffusion in die Zelle gelangen, wobei es jedoch nicht in gleichem Maße akkumuliert (Fernández-Castané *et al.*, 2012).

Die weiteren für die Synthese von Fucosyllactosen konstruierten Stämme basierten folglich ebenfalls auf diesem Stamm (Abschnitte 3.1.1 und 3.2.1), während für die Synthese weiterer Oligosaccharide der Stamm *E. coli* LJ110 (Zeppenfeld *et al.*, 2000)

gewählt wurde. Die Wahl fiel auf diesen Stamm, obwohl er über ein intaktes *lac*-Operon und somit auch über ein intaktes β -Galactosidase-Gen (*lacZ*) verfügt, welche entfernt werden musste, da dieser im Gegensatz zu *E. coli* JM109 gänzlich Plasmid-frei ist und über eine intakte Kopie des Rekombinase-Gens *recA* verfügt. Die RecA-Rekombinase unterstützt die in dieser Arbeit genutzte chromosomale Integration durch homologe Rekombination mittels λ -Red Systems (Yu *et al.*, 2000).

4.1.2. Methode der chromosomalen Integration

Die in den Abschnitten 1.4.1 und 2.2.12 beschriebene, für die Konstruktion Plasmid-freier Stämme genutzte Methode der homologen Rekombination mit Analyse der Ortsspezifität mittels pH-Indikator-Agarplatten (Albermann *et al.*, 2010) bot mehrere Vorteile in der Stammkonstruktion. So bestand am Institut für Mikrobiologie zu Beginn dieser Arbeit neben dem Know-how zu dieser etablierten Methode bereits eine breite, auf dem Expressionsvektor pJF119EH basierende und mit den Restriktionsschnittstellen NdeI, BamHI und HindIII funktionierende Auswahl verschiedener Resistenzkassetten und Primern zur chromosomalen Integration. Zu integrierende Gene konnten dabei jeweils mit NdeI und BamHI in den Expressionsvektor kloniert werden, wobei die Erkennungssequenz CATATG des Restriktionsenzym NdeI jeweils so positioniert wurde, dass die darin enthaltene Sequenz ATG dem Start-Codon des Gens entsprach, um jeweils gleiche Abstände der Gene zu den auf dem Expressionsplasmid liegenden, regulatorischen Sequenzen zu gewährleisten. Die Gene konnten dabei im selben Expressionsvektor auf Aktivität untersucht werden, der nach Einfügen der Resistenzkassette als Matrize für die PCR der zu integrierenden Expressionskassette diente (Abbildung 4.1 A). Unter Verwendung verschiedener Antibiotikaresistenz-kassetten zur Selektion der Integration konnten dabei auch zwei aufeinanderfolgende Integrationen zweier Expressionskassetten durchgeführt werden, ohne dazwischen die Resistenzkassette der ersten Integration entfernen zu müssen (Abbildung 4.1 B).

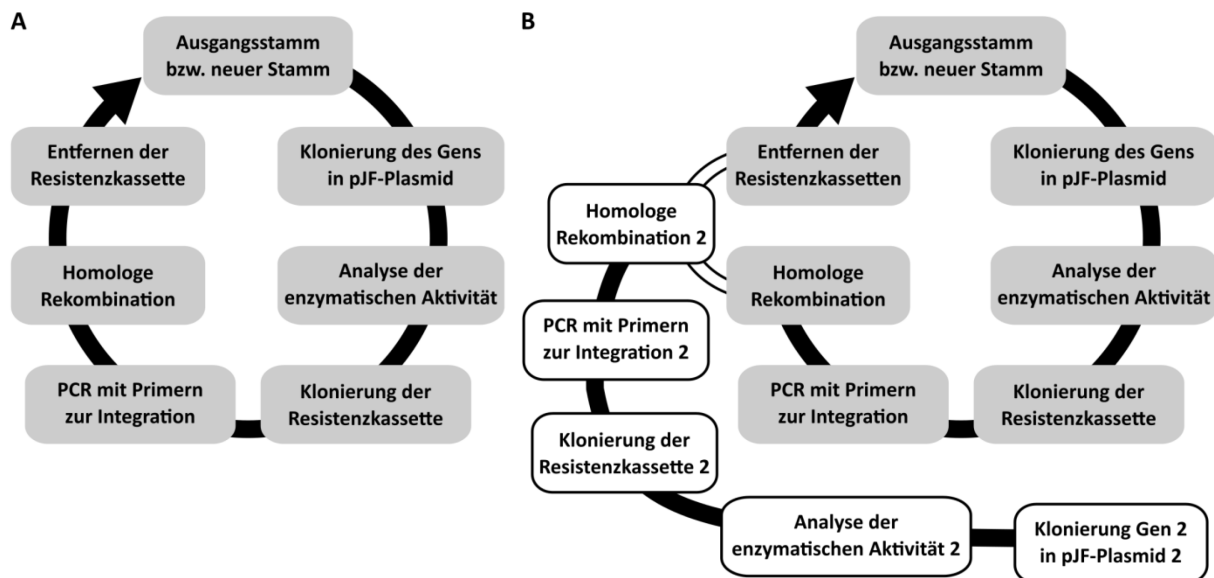


Abbildung 4.1: Schema der Klonierung und chromosomalen Integration rekombinanter Gene. **A)** Zyklus der Integration nach Albermann *et al.* (2010), welcher mehrfach durchlaufen werden kann in der iterativen Stammentwicklung. **B)** Unter Verwendung verschiedener Resistenzkassetten kann die Klonierung von zwei Expressionskassetten parallel erfolgen und die Integration der zweiten Kassette bereits vor dem Entfernen der ersten Resistenzkassette stattfinden.

Ein weiterer Vorteil ist die Verwendung temperatursensitiv replizierender Plasmide, wodurch die Rekombinase-Gene durch Inkubation der Kultur bei 42 °C entfernt werden können, während andere Systeme die Rekombinase-Gene z. B. auf einem defekten Prophagen kodieren, welcher später mittels einer weiteren homologen Rekombination entfernt werden muss (Yu *et al.*, 2000). Im Vergleich zu einer kürzlich beschriebenen, eleganten Methode zur chromosomalen Integration multipler Kopien ganzer Plasmide mittels FRT-Sequenzen und FLP-Rekombinase (Gu *et al.*, 2015) ermöglicht die in dieser Arbeit verwendete Methode die Integration von Expressionskassetten, ohne die auf dem Plasmid zusätzlich kodierten Gene mit zu integrieren und erlaubt außerdem das Entfernen der Antibiotikaresistenz nach erfolgter Integration. Weitere Methoden, welche mit Selektion und Gegenselektion oder mit dem CRISPR-Cas System arbeiten, sind in Abschnitt 5 beschrieben und stellen aufgrund der Möglichkeit zur chromosomalen Integration ohne Verbleib von FRT-Sequenzen attraktive Alternativen zu der hier verwendeten Methode dar.

4.1.3. Stämme zur Synthese von 2'-FL

Wie in den Abschnitten 1.2.4 und 3.1 beschrieben, war die *in vivo* Synthese von 2'-Fucosyllactose mit Plasmid-tragenden *E. coli* bereits vor Projektbeginn mit einer finalen 2'-FL Konzentration von etwa 14 g l⁻¹ aufgezeigt worden (Drouillard *et al.*, 2006). Das dabei verwendete System arbeitete mit zwei medium-copy Plasmiden und somit mit

mehreren Kopien der rekombinanten Gene je Zelle. Aufgrund der Segregationsinstabilität von Plasmiden sind derartige Produktionssysteme jedoch auf Selektionsmechanismen für Plasmid-tragende Zellen, z. B. Antibiotika, angewiesen (Friehs, 2004). Aus diesem Grund und da im Metabolic Engineering, wie in Abschnitt 1.4.1 beschrieben, geringere Expressionen einzelner Gene zu höheren Produkttitern führen können, sollten in dieser Arbeit hauptsächlich Synthesen mit Expressionsplasmid-freien Stämmen erfolgen.

Die zur Synthese von 2'-FL durch Christoph Albermann und Lyudmila Seitz (geb. Khan) konstruierten Stämme *E. coli* JM109 gwBC-F1-cat und JM109 gwBC-F2-cat standen bereits zu Beginn dieser Arbeit für Synthesen und weitere Stammkonstruktionen zur Verfügung (Baumgärtner *et al.*, 2013; Khan, 2012; Albermann, 2015). Ähnlich wie das von der Arbeitsgruppe um Eric Samain beschriebenen Ganzzell-System (Drouillard *et al.*, 2006), wurde dabei ebenfalls das Gen einer α 1,2-Fucosyltransferase aus *H. pylori* genutzt. Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme unterscheiden sich jedoch neben dem Verzicht auf Expressionsplasmide auch in der Art der GDP-Fuc-Synthese (Abbildung 4.2). So wurde in dieser Arbeit ebenfalls der *de novo* Syntheseweg zur Bildung von GDP-Fuc genutzt. Dieser wurde jedoch durch rekombinante Expression der Gene *manB*, *manC*, *gmd* und *wcaG* unter P_{tac} -Promotoren erreicht, während in vielen Arbeiten der Arbeitsgruppe um Eric Samain zur Ganzzellsynthese fucosylierter HMOs das Transkriptionsregulator-Gen *rcsA* rekombinant exprimiert wurde, um eine erhöhte Transkription des Colansäuresynthese-Operons zu erreichen und gleichzeitig das Gen *wcaJ* deletiert wurde, um die Bildung von Colansäure zu unterbinden (Abbildung 4.2; Drouillard *et al.*, 2006; Dumon *et al.*, 2001; Dumon *et al.*, 2004). In einer weiteren Arbeit der Arbeitsgruppe um Eric Samain wurde die Kombination eines β -Galactosidase-defizienten *E. coli* DH1 Stammes mit rekombinant exprimierten *de novo* Pathway- und Glycosyltransferase-Genen beschrieben zur Synthese von Lewis x Strukturen, welche jedoch keine Lactose-Einheit am reduzierenden Ende tragen (Dumon *et al.*, 2006). Zur Synthese von 2'-FL nutzte die Arbeitsgruppe um Jin-Ho Seo Stämme, welche die Gene des *de novo* Pathway ebenfalls rekombinant exprimierten (Lee *et al.*, 2009b; Lee *et al.*, 2012a). Sie verwendeten dazu jedoch ein Expressionsplasmid mit T7-Promotor. Zur Expression der Gene wird dort daher der *E. coli* Stamm JM109(DE3) genutzt. Dieser zeigt jedoch eine α -Komplementierung der β -Galactosidase durch das Phagen-Konstrukt (DE3), wodurch Lactose zum Teil auch gespalten und zur Zellwachstum genutzt werden

kann (Dumon *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2012a; Abschnitt 1.2.4). Während dieser Effekt in der Arbeitsgruppe um Jin-Ho Seo genutzt wurde, um Lactose als einzige Kohlenstoffquelle einsetzen zu können (Lee *et al.*, 2012a), sollte die Lactose in dieser Arbeit lediglich als Akzeptor-Substrat für die Synthese von HMOs dienen.

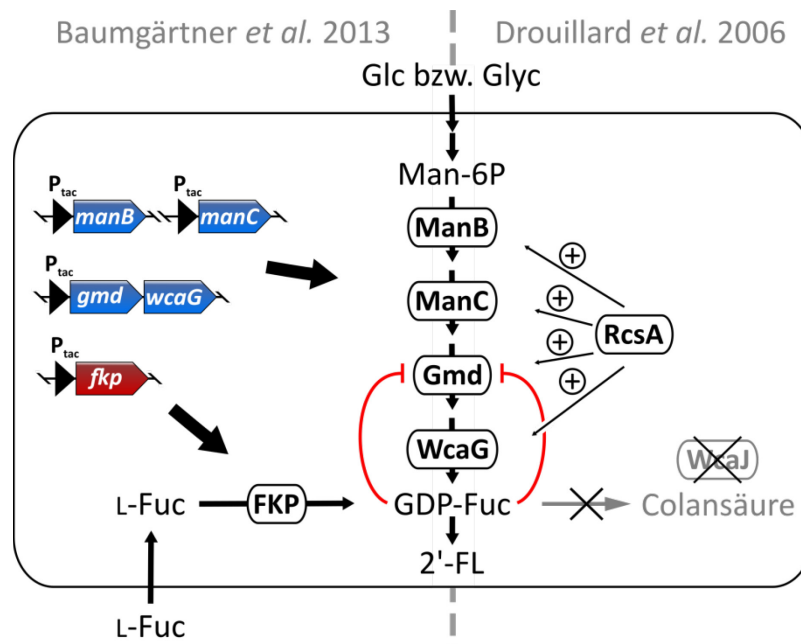


Abbildung 4.2: Vergleich der Methoden zur Erhöhung der GDP-Fuc-Syntheseleistung in *E. coli* für die Synthese von 2'-FL. Während in dieser Arbeit die Gene der Enzyme zur *de novo* Synthese unter Kontrolle von P_{tac} -Promotoren chromosomal integriert und mittels Fkp mit dem Salvage Pathway kombiniert wurden (Baumgärtner *et al.*, 2013), erfolgte in den Arbeiten der Arbeitsgruppe um Eric Samain die verstärkte Expression der Gene zur *de novo* Synthese durch rekombinante Expression des Transkriptionsregulator-Gens *rcaA* (Drouillard *et al.*, 2006; Dumon *et al.*, 2001). Da dabei eine erhöhte Expression des gesamten Colansäure-Operons erfolgte, wurde die Colansäure-Synthese durch Disruption des Gens *wcaJ* unterbunden, welches eine Undecaprenyl-phosphat Glucose-1-phosphat Transferase kodiert. Im *de novo* Syntheseweg besteht eine Feedback-Inhibition von GDP-Fuc auf die GDP-Mannose 4,6-Dehydratase Gmd (Sturla *et al.*, 1997).

Wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben, wurden die Stämme JM109 gwBC-F1 und -F2 zur weiteren Stammentwicklung mit dem Gen *fkp* für den Salvage Pathway der GDP-Fuc-Synthese ausgestattet, um mögliche Limitierungen in der Synthese von 2'-FL erkennen zu können (Baumgärtner *et al.*, 2013). Während zur Erstellung des Stamms JM109 gwBC-F2 bereits die zweite Kopie des Gens *futC* in die L-Fucose-Degradationsgene *fucIK* integriert vorlag, wurde dieser Locus auch für die Integration von *fkp* in JM109 gwBC-F1, gewählt, um eine direkte Verwertung der zugegebenen L-Fucose von der Zelle durch die L-Fucose-Isomerase und die L-Fuculose-Kinase zu verhindern (Abbildung 3.1; Chakrabarti *et al.*, 1984). Das erste Gen des Fucose-Operons *fucPIKUR*, welches die Fucose-Permease FucP kodiert, wurde dabei absichtlich nicht deletiert, um eine Aufnahme der zugegebenen L-Fucose zu erlauben. Die Transkriptionsregulation des Fucose-Operons erfolgt in *E. coli* sowohl über L-Fuculose-1-phosphat als auch über den Komplex aus cAMP Response Protein und

cAMP (cAMP-CRP), wobei das alleinige Vorkommen von cAMP-CRP keine deutliche Expression der Gene des Fucose-Operons bewirken kann und daher L-Fucose-1-phosphat als wichtiger Effektor benötigt wird (Podolny *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2004). Da zur Bildung von L-Fucose-1-phosphat aus L-Fucose jedoch sowohl die L-Fucose-Isomerase als auch die L-Fucose-Kinase notwendig sind, deren Gene in den Stämmen mit Fkp jedoch disruptiert sind, war die Möglichkeit der Aufnahme von L-Fucose durch diese Stämme im Vorfeld nicht sicher. Die in Abschnitt 3.1.3 dargestellten, durch den Salvage Pathway erhöhten GDP-Fuc-Konzentrationen suggerieren jedoch die Möglichkeit der Bildung von GDP-Fuc aus L-Fucose mit diesen Stämmen, weshalb eine Aufnahme sehr wahrscheinlich ist. Dies ist vermutlich auf eine basale Expression der L-Fucose-Permease zurückzuführen, welche auch benötigt wird, um überhaupt eine initiale Induktion durch L-Fucose-1-phosphat zu ermöglichen.

Die Zugabe von L-Fucose, welche für den Salvage Pathway als Substrat benötigt wird, erlaubte zum Zeitpunkt der Durchführung keine kosteneffiziente Synthese von 2'-FL und sollte daher lediglich der erhöhten GDP-Fuc-Bildung dienen, um analysieren zu können, ob die GDP-Fuc-Bildungsrate eine Limitierung in der Synthese von 2'-FL darstellt. Dabei stellt die Verwendung einer Kombination aus rekombinant exprimiertem *de novo* Pathway und Salvage Pathway ein zuvor noch nicht beschriebenes Vorgehen der mikrobiellen Ganzzellsynthese von 2'-FL dar.

Die mikrobielle Ganzzellsynthese von 2-FL, basierend auf dem Salvage Pathway ohne Verstärkung des *de novo* Pathway, wurde kürzlich in einer wissenschaftlichen Publikation beschrieben (Chin *et al.*, 2016), während die Synthese von 3-FL mittels des Salvage Pathway bereits in einer 2012 veröffentlichten Patentanmeldung erwähnt wurde (Parkot *et al.*, 2012).

Für den Salvage Pathway mittels Fkp sind bisher keine Mechanismen der Produkt-Inhibition bekannt, weshalb dieser Syntheseweg auch höhere intrazelluläre Konzentrationen erlauben sollte, während im *de novo* Syntheseweg die GDP-Mannose 4,6-Dehydratase Gmd spezifisch durch GDP- β -L-Fucose gehemmt wird (s. Abschnitt 1.2.3), wobei bereits bei einer Konzentration von 250 μ M eine etwa 73 %ige Reduktion der Aktivität beobachtet werden konnte (Sturla *et al.*, 1997).

Da die zweite chromosomale Kopie von *futC* im Stamm JM109 gwBC-F2-cat eine Verbesserung der Syntheseleistung im Vergleich zum Stamm JM109 gwBC-F1 bewirkte

und die Verwendung des Plasmids pJF-futC im Stamm JM109 gwBC-F1-cat ebenfalls zu höheren 2'-FL-Konzentrationen führte (Abbildung 3.3), lag die Konstruktion eines Stammes mit einer dritten chromosomalen Kopie von *futC* nahe. Mit JM109 gwBC-F3-cat wurde ein solcher Stamm erstellt, wobei die Integration in den Locus *galETK* erfolgte, da die dabei deletierten Gene des Galactose-Abbaus im Prozess nicht gebraucht wurden und der Locus im Genom einen relativ großen Abstand zu den anderen Integrationsstellen aufweist (Abbildung 4.3). Große Abstände zwischen den Integrationsorten wurden gewählt, um die Deletion ganzer Genom-Bereiche beim Entfernen von Antibiotikaresistenzen durch die FLP-Rekombinase unwahrscheinlicher zu machen. Nach jedem Integrationszyklus verbleibt eine FLP-Rekombinase-Erkennungssequenz (FRT) im Genom bestehen, welche zusammen mit der FLP-Rekombinase potentiell mit einer anderen Erkennungssequenz interagieren kann und somit zur Deletion bzw. zur Inversion des zwischen den Erkennungssequenzen liegenden DNA-Abschnitts führen kann. Durch die Wahl von weit auseinander liegenden Integrationsorten steigt die Wahrscheinlichkeit, dass bei einer solchen Deletion auch Gene deletiert werden, welche für das Wachstum der Stämme auch auf komplexem Medium essentiell sind (Gerdes *et al.*, 2003), sodass die entsprechenden Klone nicht anwachsen.

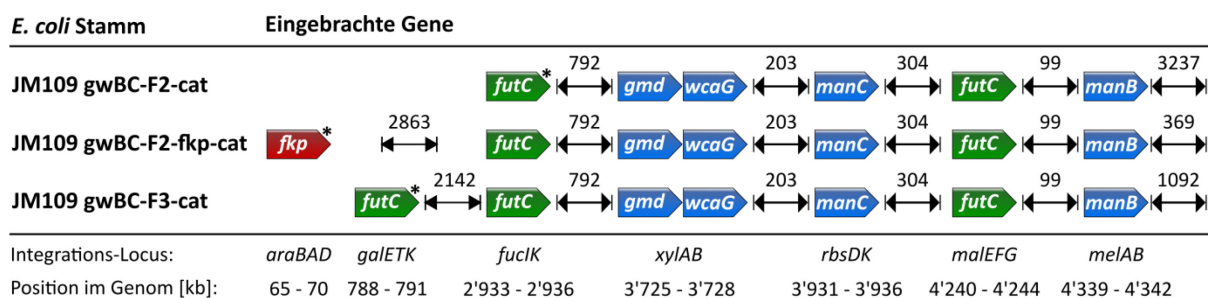


Abbildung 4.3: Entfernungen zwischen den Integrationen im Chromosom von 2'-FL-synthetisierenden *E. coli* Stämmen. Entfernung zur jeweils nächsten, integrierten Expressionskassette angegeben in Kilobasen über den Pfeilen zwischen den Genen. Senkrecht unter den Genen dargestellt sind die Integrations-Loci und deren Positionen im Genom [kb] gemäß der Angaben für *E. coli* MG1655 (Hayashi *et al.*, 2006; Keseler *et al.*, 2013). Mit Stern markierte Gene bestehen in dem jeweiligen Stamm noch zusammen mit der entsprechenden Resistenzkassette in der Expressionskassette (s. Tabelle 2.1).

4.1.4. Genetische Stabilität des 2'-FL-Produzenten JM109 gwBC-F2-cat

Da die molekularbiologischen Analysen zu genetischer Stabilität durch die Notwendigkeit der Betrachtung des gesamten Genoms relativ arbeitsintensiv und teuer sein können und dennoch nur bedingte Aussagen über den Erhalt der Syntheseleistung erlauben, wurde in dieser Arbeit unter verschiedenen Annahmen lediglich die Produktionsstabilität des 2'-FL-Produzenten JM109 gwBC-F2-cat untersucht.

Voraussetzung für diese Untersuchung war die Feststellung, dass jede der Integrationen zu einer signifikanten Zunahme der Produktbildung führt und dass die Deletion, Mutation oder Inaktivierung eines der rekombinanten Gene bereits zu einer messbaren Änderung der Produktivität führt (Abschnitt 3.1.5). So wurde die 2'-FL-Syntheseleistung eines über 100 Generationen kultivierten Stamms mit der Synthese einer über 100 Generationen jüngeren Kultur verglichen (Abbildung 3.8). Die dabei im Vergleich zum Referenzstamm erreichten $95,01 \pm 1,88$ % an 2'-FL-Ausbeute je Biotrockenmasse und $113,76 \pm 3,15$ % an 2'-FL-Titer zeigen, dass die rekombinant eingebrachten Synthesegen auch nach über 100 Generationen noch intakt waren und funktionell exprimiert wurden (Baumgärtner *et al.*, 2013). Während die 100 Generationen bei Weitem ausreichend sind, um selbst industrielle 500 m³ Rührkesselreaktoren zu betreiben, kann für die Produktionsstabilität in kontinuierlichen Kulturen keine Aussage getroffen werden, da die 100 Generationen nicht unter Produktionsstress, sondern ohne Zugabe des Substrats Lactose und des Induktors IPTG erreicht wurden (Abschnitt 3.1.5).

Ähnliche Vergleiche der Produktionsstabilität chromosomal integrierter Gene wurden für die weiteren Synthesestämme nicht erstellt, da angenommen wurde, dass diese ebenfalls eine ähnliche Stabilität aufweisen, bzw. nach der Deletion des Gens *recA* aufweisen würden.

Sollte eine noch höhere Produktionsstabilität erreicht werden, so bieten andere Methoden wie die von der Arbeitsgruppe um Gregory Stephanopoulos (Tyo *et al.*, 2009) beschriebene Integration multipler, aufeinanderfolgender Kopien der Synthese-Gene eine Alternative zu der in dieser Arbeit verwendeten Methode. Dabei werden Expressionskassetten mittels *RecA* integriert und die Stämme auf die Integrationen weiterer Kopien durch die Erhöhung der Antibiotika-Konzentrationen selektiert. Alternativ ermöglichen die in Abschnitt 5 beschriebenen, Vernarbungs-freien Methoden mittels Selektion und Gegenselektion oder mittels CRISPR-Cas die Möglichkeit, den Verbleib von FRT-Sequenzen zu verhindern.

4.1.5. Stämme zur Synthese von LNT und LNnT

Wie bereits in Abschnitt 4.1.1 beschrieben, wurde der Stamm *E. coli* LJ110 als Ausgangsstamm für die Konstruktion von Produzenten von Oligosacchariden mit den Kernstrukturen LNT und LNnT genutzt. *E. coli* LJ110 stammt von dem Wildtyp-Stamm *E. coli* W3110 (ATCC 39936) ab (Zeppenfeld *et al.*, 2000) und wurde gewählt, da er im

Gegensatz zu *E. coli* JM109 kein F'-Plasmid enthält, aber ein intaktes *recA*-Gen besitzt (s. Abschnitte 3.3.2 und 4.1.1.).

Da sich LNT und LNnT nur in der β 1,3- bzw. β 1,4-Bindung des Galactosyl-Rests am nicht-reduzierenden Ende unterscheiden (Abbildung 1.1), sollte zuerst ein Stamm konstruiert werden, der Lactose aufnimmt, nicht hydrolysieren kann und für die Synthese von LNT II nutzt, welches als Trisaccharid-Einheit sowohl in LNT als auch in LNnT enthalten ist (Abschnitte 1.1.2 und 3.3.2).

In einem ersten Schritt erfolgte dazu die Disruption der Gene *lacZYA* bei gleichzeitiger Integration des synthetischen Gens *lgtA*, welches eine β 1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase kodiert. Da der Stamm nun aufgrund des fehlenden Gens *lacY* jedoch nicht mehr in der Lage war, Lactose aufzunehmen, erfolgte anschließend die Integration eines *lacY*-Gens unter Kontrolle eines P_{tac} -Promotors.

Eine gezielte Deletion von *lacZ* durch homologe Rekombination wurde nicht durchgeführt, da der Stamm zum einen mit einem stärkeren Promotor für die Expression von *lacY* ausgestattet werden sollte und zum anderen auch das Galactosid-Acetyltransferase-Gen *lacA* (Lewendon *et al.*, 1995) deletiert werden sollte, welches sich im *lac*-Operon downstream von *lacY* befindet, um damit auch eine mögliche Acetylierung von Lactose zu verhindern. Dabei steht die Galactosid-Acetyltransferase unter Verdacht, bei hohen Lactose-Konzentrationen eine Acetylierung von Lactose vorzunehmen, um einen Export des Moleküls zu erlauben und gleichzeitig die Wiederaufnahme zu verhindern, damit bei Lactose-bedingtem, osmotischem Stress kein sinnloser Kreislauf aus Aufnahme und Export entsteht (Danchin, 2009).

Das eingebrachte Gen *lgtA* wurde in einer Codon-optimierten, synthetischen Ausführung eingesetzt, um ohne den homopolymeren Bereich mit 14 aufeinanderfolgenden Guanosin-Nukleotiden (Jennings *et al.*, 1995) arbeiten zu können, da dieser Bereich die genetische Stabilität des Stammes senkt und in der Synthese somit unerwünscht ist. Wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben, kann es in diesem Bereich zu Leserahmen-verändernden Fehlpaarungen in der Replikation kommen, wodurch das Gen nicht mehr funktionell exprimiert wird. Bei den pathogenen Bakterien *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae*, welche beide über das Gen *lgtA* verfügen, wird vermutet, dass dieser Mechanismus ähnlich der homopolymeren Bereiche in *H. pylori* (Abschnitt 1.2.3) dem Entkommen des

Immunsystems des Wirtes durch Phasenvariation dient (Jennings *et al.*, 1995; Shafer *et al.*, 2002).

Nach erfolgter Integration der Expressionskassette mit *lgtA* in das Lac-Operon wurde *lacY* unter gleichzeitiger Disruption von *fucIK* integriert, da die Bereitstellung von GDP-Fuc zur Fucosylierung von LNT und LNnT später mittels Salvage Pathway erfolgen sollte und somit bereits in dem LNT II-synthetisierenden Stamm die Verwertung von L-Fucose unterbunden wurde. Eine Integration von *lacY* unter gleichzeitiger Disruption des *lac*-Operons, gefolgt von einer Integration von *lgtA* an anderer Stelle, hätte zwar vermutlich eine *in vivo* Analyse der funktionellen Expression nach jeder Integration erlaubt, von diesem Vorgehen wurde jedoch abgesehen aufgrund der großen Homologie-Bereiche zwischen der *lacY*-Expressionskassette und dem *lac*-Operon. Da *lacY* im *lac*-Operon enthalten ist, hätte die homologe Rekombination auch in *lacY* und somit nicht in den beiden die Expressionskassette flankierenden Homologie-Bereichen stattfinden können, was die Selektion auf komplett integrierte Expressionskassetten erschweren würde.

Um die aktive Lactose-Aufnahme nachzuweisen und den Einfluss einer weiteren Kopie von *lacY* zu untersuchen, wurde die Lactose-Aufnahmerate der Stämme LJ-A-cat, LJ-AY-cat-kan bzw. LJ-AY2-kan, welche keine, eine bzw. zwei chromosomal integrierten Kopien des Gens *lacY* enthalten, im Vergleich zum Stamm JM109 analysiert mit ¹⁴C-markierter Lactose (Abschnitt 3.3.3). Ein Vergleich mit dem Ausgangsstamm *E. coli* LJ110 wurde nicht durchgeführt, da dieser Lactose verwerten und somit radioaktiv-markiertes CO₂ freisetzen kann. In der qualitativen Untersuchung zeigten alle Stämme mit Lac-Permease-Gen eine Aufnahme von Lactose, während mit dem Stamm LJ-A-cat, wie erwartet, keine signifikante Akkumulation der Lactose detektiert wurde (Abbildung 3.17). Der Stamm LJ-AY2-kan schien dabei keine signifikant gesteigerte Aufnahmerate im Vergleich zu dem Stamm LJ-AY-cat-kan zu besitzen, welcher nur über eine Kopie von *lacY* verfügt. Es weist aber eine tendenziell höhere Aufnahmerate auf als JM109, was auf die Expression von *lacY* unter dem im Vergleich zum *lac*-Promotor stärkeren P_{tac}-Promotor zurückzuführen sein kann (de Boer *et al.*, 1983). Für die weitere Stammkonstruktion sollte der Stamm LJ-AY-cat-kan dienen, da dieser keine wesentlich geringere Lactoseaufnahmerate demonstriert als der Stamm mit zwei Kopien von *lacY*. Aufgrund der nicht wiederholten Experimente, können diese Ergebnisse jedoch lediglich als grobe Tendenzen betrachtet werden.

Nachdem die Lactose-Aufnahme und die Synthese von LNT II mit dem Stamm LJ-AY nachgewiesen werden konnten, wurden die Gene *wbgO* bzw. *lgtB* separat voneinander chromosomal integriert, um Stämme für die Synthese von LNT bzw. LNnT zu konstruieren. Dabei erfolgten die Integrationen jeweils unter gleichzeitiger Disruption der Gene *xylAB*. Dieser Locus wurde gewählt, um ähnlich zu dem in Abschnitt 4.1.3 beschriebenen Vorgehen möglichst große Abstände zwischen den integrierten Expressionskassetten zu erhalten (beispielhaft dargestellt für die LNT-produzierenden Stämme in Abbildung 4.4).

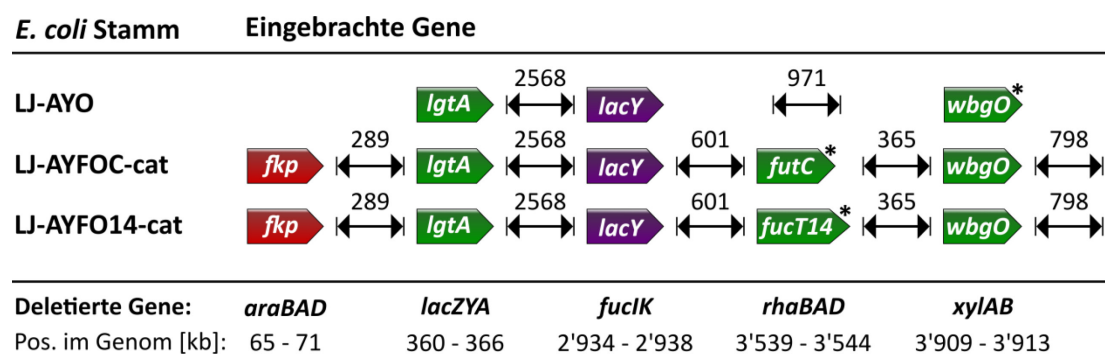


Abbildung 4.4: Entfernungen zwischen den Expressionskassetten im Chromosom von *E. coli* Stämmen zur Synthese von LNT und fucosylierten LNT-Derivaten. Entfernung zur jeweils nächsten, integrierten Expressionskassette angegeben in Kilobasen über den Pfeilen zwischen den Genen. Senkrecht unter den Genen dargestellt sind die Integrations-Loci und deren Positionen im Genom [kb] (Hayashi *et al.*, 2006; Keseler *et al.*, 2013). Mit Stern markierte Gene bestehen in dem jeweiligen Stamm noch zusammen mit der entsprechenden Resistenzkassette in der Expressionskassette (s. Tabelle 2.1).

Während das zur Synthese von LNT genutzte Gen *wbgO* aus dem pathogenen *E. coli* O55:H7 in einer Codon-optimierten Version eingesetzt wurde, konnte das für die Synthese von LNnT genutzte Gen *lgtB* aus genomischer DNA von *N. meningitidis* DSM10036 isoliert werden. Es zeigte dabei eine vollständige Sequenzübereinstimmung mit dem veröffentlichten *lgtB*-Gen des Stammes *N. meningitidis* NZ-05/33 (Genbank CP002424.1) und enthielt keine homopolymeren Bereiche (Abschnitte 2.4.1 und 3.4.1, Tabelle A. 14). Während *lgtB* bereits zuvor in Ganzellsynthesen von HMOs genutzt wurde (s. Abschnitt 1.2.4), war das Protein WbgO zuvor nur für *in vitro* Umsetzungen beschrieben (Liu *et al.*, 2009). Ein Sequenzvergleich des isolierten *lgtB*-Gens mit dem von der Arbeitsgruppe um Eric Samain genutzten *lgtB*-Gen ist jedoch leider nicht möglich, da der in der Publikation von 2002 zitierte Genbank-Eintrag zurückgezogen wurde (Priem *et al.*, 2002; Genbank 25839). Ein Vergleich der Aminosäure-Sequenzen des in dieser Arbeit genutzten LgtB und des ebenfalls von der Arbeitsgruppe um Eric Samain für die Synthese von N^I,N^{II}-Diacetylchitobiose publizierte LgtB (Cottaz & Samain, 2005; Genbank AAC44085.1), welches seinen Ursprung ebenfalls in *N. meningitidis* hat,

zeigt bei gleicher Länge (275 Aminosäuren) eine Sequenzidentität von 92 % und enthält somit Sequenzunterschiede an 22 Positionen.

4.1.6. Stämme zur Synthese fucosylierter Derivate von LNT und LNnT

Durch eine Kombination der im vorherigen Abschnitt beschriebenen LNT- bzw. LNnT-Synthesestämme mit dem für die Synthese von 2'-FL verwendeten Salvage Pathway der GDP-Fuc-Bildung und verschiedenen Fucosyltransferase-Genen, konnten in dieser Arbeit erstmalig auch fucosylierte Oligosaccharide mit verschiedenen Kernstruktur-Typen synthetisiert werden (Abschnitte 3.5 und 3.6; Abbildung 3.25). Trotz der höheren Kosten durch die benötigte Zugabe von L-Fucose (s. Abschnitt 4.1.3) wurde in diesem Fall die Verwendung des Salvage Pathway zur Synthese von GDP-Fuc der Verwendung des *de novo* Pathway vorgezogen, da sich dadurch einige Vorteile für die Stammkonstruktion und Kultivierung boten.

So konnte mit *fkp* eine erhöhte GDP-Fuc-Syntheseleistung durch die Integration eines einzigen Genes gewährleistet und die Fucosylierung der Kernstrukturen über den Zeitpunkt der Zugabe von L-Fucose gewählt werden, während für die Nutzung des *de novo* Pathway die Gene *manB*, *manC*, *gmd* und *wcaG* benötigt würden und eine zeitliche Steuerung der Bildung von GDP-Fuc nur über die Induktion der Expression erfolgen könnte. Die erst später im Prozess begonnene Synthese von GDP-Fuc war von Interesse, um zu Beginn die Synthese der Kernstrukturen aus Lactose zu erlauben, da in früheren Arbeiten zu Synthesen von α 1,2- bzw. α 1,3-fucosylierter Derivate von LNnT beschrieben wurde, dass neben der geplanten Fucosylierung von LNnT auch die zugegebene Lactose fucosyliert wurde und somit 2'-FL bzw. 3-FL entstanden (Drouillard *et al.*, 2006; Dumon *et al.*, 2004).

Wie am Beispiel der Stämme LJ-AYFOC-cat und LJ-AYF014-cat in Abbildung 4.4 dargestellt, erfolgten die Integrationen von *fkp* und den Fucosyltransferase-Genen aus *H. pylori* erneut in Zuckerdegradations-Loci, welche mindestens 289 Kilobasen von anderen Integrations-Loci entfernt lagen, um unerwünschten Deletionen von chromosomalen Abschnitten in der Stammkonstruktion entgegenzuwirken (s. Abschnitt 4.1.3).

Die α 1,2-Fucosylierung von LNT und LNnT, sowie die α 1,3-Fucosylierung von LNnT wurden dabei durch die Expressionen der bereits für die Synthesen von 2'-FL und 3-FL

genutzten Gene *futC* und *futA* erreicht (Abschnitte 3.5 und 3.6). Um jedoch Verbindungen mit Lewis a-Antigenstruktur synthetisieren zu können, welche einen α 1,4-verknüpften Fucosyl-Rest am GlcNAc nahe des reduzierenden Endes tragen (s. Tabelle 1.3), wurde das Codon-optimierte Gen einer als α 1,4-spezifisch beschriebenen Fucosyltransferase-Variante aus *H. pylori* genutzt (Abschnitt 3.5.1; Rabbani *et al.*, 2005; Rabbani *et al.*, 2009). Mit der α 1,4-Spezifität sollten extensive Fucosylierungen des Glucose-Rests am reduzierenden Ende unterbunden werden, welche für verschiedene α 1,3-Fucosyltransferasen in Ganzzellsynthesen von LNnT beschrieben wurden (Dumon *et al.*, 2001; Dumon *et al.*, 2004). Die strikte α 1,4-Spezifität könnte solch eine Fucosylierung bei LNT ausschließen, da die Position 4 des Glucosyl-Rests am reduzierenden Ende bereits durch den Galactosyl-Rest gebunden ist (Abbildung 1.2) und somit eine Fucosylierung des GlcNAc-Rests an Position 4 stattfinden könnte. Diese Position ist bei LNT frei, bei LNnT jedoch durch den endständigen Galactosyl-Rest gebunden. Wie in Abschnitt 3.5.3 beschrieben, wurde in diesem Projekt aber trotz Verwendung der α 1,4-Fucosyltransferase die Fucosylierungen der Glucosyl-Reste sowohl von LNT II als auch von LNT beobachtet. Diese Beobachtung lässt in Verbindung mit den von Rabbani *et al.* (2005; 2009) publizierten und den in Abschnitt 3.5.1 demonstrierten *in vitro* untersuchten Substratspezifitäten α 1,4-Fucosyltransferase (Rabbani *et al.*, 2005; Rabbani *et al.*, 2009) darauf schließen, dass eine Spezifität für größere Akzeptor-Substrate als Lactose besteht und eine α 1,3/4-Spezifität anstelle einer α 1,4-Spezifität vorliegt.

4.2. Ganzzellsynthese von HMOs

Die Ganzzellsynthese von HMOs erfolgte zum Vergleich der Produktivitäten verschiedener Plasmid-tragender und Plasmid-freier Stämme und zur Produktanalyse jeweils in Schüttelkolben-Kulturen. Um jedoch auch die Synthese im größeren Maßstab und unter kontrollierten Bedingungen betrachten zu können, wurden die Produktivitäten der Stämme *E. coli* JM109 gwBC-F2-cat bzw. *E. coli* LJAYO-cat, welche die HMOs 2'-FL bzw. LNT synthetisieren, zusätzlich auch in Zulauf-Kultivierungen in Rührkesselreaktoren im 10 Liter-Maßstab analysiert. Im Folgenden werden die bei den Ganzzellsynthesen erhaltenen Ergebnisse besprochen und in Relation zu bereits veröffentlichten Ergebnissen gestellt.

4.2.1. Synthese von Fucosyllactose

2'-Fucosyllactose

In den Kulturen zur Synthese von Fucosyllactose wurde ausschließlich Minimalmedium mit Glycerin als Kohlenstoffquelle und Lactose als Akzeptor-Substrat für die Fucosylierung eingesetzt. Glycerin zeigt als Kohlenstoffquelle im Vergleich zu Glucose dabei zwei Vorteile. Zum einen bewirkt Glycerin anders als Glucose keinen Induktor-Ausschluss auf die Lactose-Permease, sodass Lactose auch unter nicht-kohlenstofflimitierten Bedingungen ungehemmt durch LacY aufgenommen werden kann (s. Abschnitt 1.4.2). Zum anderen werden bei der Verwertung von Glycerin mehr Reduktionsäquivalente je aufgenommenem Kohlenstoff gebildet als bei der Verwertung von Glucose (Yazdani & Gonzalez, 2007), welche in der *de novo* Synthese von GDP-Fuc in Form von NADPH oder NADH genutzt werden können (s. Abbildung 3.1; Albermann *et al.*, 2000).

In der Synthese von 2'-FL zeigten erste Schüttelkolbenversuche eine Limitierung der α 1,2-Fucosyltransferase-Aktivität in dem Plasmid-freien Stamm *E. coli* JM109 gwBC-F1, da die zusätzliche Verwendung des Expressionsvektors pJF-futC zu einer Steigerung der Produktbildung um Faktor 3,9 bzw. 1,5 nach 4 bzw. 24 h führte (Abschnitt 3.1.2; Abbildung 3.3). Auch die zweite und dritte chromosomal integrierte Kopie von *futC* führten nach 24 h zu Steigerungen der 2'-FL-Ausbeuten je Biomasse um 18 % bzw. um weitere 11 % (Abschnitt 3.1.2). Die dabei vor allem 4 h nach Induktion deutlich höheren Produktausbeuten des Plasmid-tragenden Stammes lassen vermuten, dass die Plasmid-basierte Expression aufgrund der höheren Kopienzahl eine deutlich höhere Enzymaktivität kurz nach der Induktion zulässt, da das Plasmid mit einem pBR322 Replikationsursprung mit etwa 15-20 Kopien je Zelle vorliegt (Sambrook & Russell, 2001). Dabei spiegelt sich die erhöhte Syntheseleistung auch in den Lactose-Konzentrationen der Sedimentfraktion wieder (Abbildung 3.3 D). So zeigt der Plasmid-tragende Stamm mit Abstand die geringsten Lactose-Konzentrationen je Biotrockenmasse, was vermutlich hauptsächlich im schnelleren Umsatz der Lactose und nicht in einer stärkeren Repression der *lacY*-Expression durch die Plasmid-ständigen *lacI*-Kopie begründet ist, da der Stamm mit Kontrollplasmid, welches ebenfalls eine Kopie von *lacI* enthält, hohe intrazelluläre Konzentrationen von Lactose aufweist. Diese Vermutung wird bekräftigt durch die später in diesem Abschnitt beschriebenen

Kultivierungen der Stämme mit Salvage Pathway für die GDP-Fuc Synthese, welche ebenfalls höhere Syntheseleistungen und gleichzeitig meist geringere intrazelluläre Lactose-Konzentrationen aufweisen (Abbildung 3.15).

Unter den Annahmen, dass die in den Zellsedimenten bestimmten Lactose-Mengen intrazellulär vorliegen und die untersuchten Kulturen der von Volkmer und Heinemann (2011) für *E. coli* MG1655 und *E. coli* BW25113 beschriebenen Korrelation von intrazellulärem Volumen zur OD₆₀₀ unterliegen, konnten die intrazellulären GDP-Fuc-Konzentrationen berechnet werden. Für *E. coli* Kulturen beschreiben Volkmer und Heinemann dabei ein unter verschiedenen Bedingungen relativ konstantes intrazelluläres Volumen von 3,6 µl je ml Kultur bei einer optischen Dichte von 1. Unter Verwendung dieser Korrelation ergeben sich für die Stämme JM109 gwBC-F1 pJF-futC und JM109 gwBC-F1-fkp-cat pJF-futC 4 h nach Induktion und Lactose-Zugabe intrazelluläre Lactose-Konzentrationen von $1,08 \pm 0,12$ mM bzw. $0,72 \pm 0,08$ mM. Dies entspricht etwa dem 6-fachen bzw. 4-fachen des von Albermann *et al.* (2001) bestimmten K_m -Wertes von FutC für Lactose (168 µM), sodass die intrazellulären Konzentrationen der Kulturen mit pJF-futC vermutlich nur noch etwa 80 % der maximalen Umsatzrate von FutC erlauben (Bisswanger, 2008). Für die Plasmid-freien Kulturen ist die berechnete Lactose-Konzentration jedoch mindestens 10-fach über dem beschriebenen K_m -Wert, sodass die Lactose-Aufnahme und -Verfügbarkeit in den Plasmid-freien Stämmen 4 h nach Induktion offensichtlich keine Limitierung in der 2'-FL-Synthese darstellt.

Ein Engpass in der Synthese von 2'-FL mit dem *de novo* Syntheseweg für GDP-Fuc und ein bis zwei integrierten Kopien von *futC* wurde durch die zusätzliche Verwendung des Salvage Pathway zur Synthese von GDP-Fuc identifiziert. Die in Abschnitt 3.1.3 beschriebene, zusätzliche Integration des Salvage Pathway in die Stämme JM109 gwBC-F1-cat und JM109 gwBC-F2-cat führte unter Zugabe von L-Fucose zu Erhöhungen der intrazellulären GDP-Fuc-Konzentrationen je Biomasse um die Faktoren 9,6 bzw. 10,7 (Abbildung 3.4). Dass in der Kultur des Kontrollstammes *E. coli* JM109 gar keine GDP-Fuc nachgewiesen werden konnte, korreliert mit der Beobachtung, dass dieser Stamm mit einem Plasmid-ständig exprimierten Gen einer α 1,2-Fucosyltransferase auch keine Bildung von 2'-FL zeigt und ist vermutlich auf eine geringe oder eine nicht vorhandene Expression der Gene des Colansäure-Synthese-Operons, bzw. den Verbrauch von GDP-Fuc durch die Colansäure-Synthese zurückzuführen. Die in den

Kulturen mit *de novo* oder Salvage Pathway bestimmten Konzentrationen von GDP-Fucose je Biotrockenmasse (Abbildung 3.4) können unter den bereits zuvor in diesem Abschnitt getroffenen Annahmen der intrazellulären Volumina (Volkmer & Heinemann, 2011) ebenfalls als Grundlage für die Berechnung absoluter intrazellulärer Konzentrationen. So errechnen sich für die Proben 12 h nach Induktion intrazellulär akkumulierte GDP-Fuc-Konzentrationen von $0,105 \pm 0,002$ mM bzw. $0,083 \pm 0,002$ mM für die Stämme JM109 gwBC-F1 bzw. -F2-cat und $1,009 \pm 0,162$ mM bzw. $0,884 \pm 0,231$ mM für die Stämme JM109 gwBC-F1-fkp-cat bzw. -F2-fkp-cat (Baumgärtner *et al.*, 2013). Die geringeren Konzentrationen in den Kulturen ohne Fkp sind dabei nicht ausschließlich auf die in Abschnitt 1.2.3 beschriebene Feedback-Inhibition von Gmd durch GDP-Fuc zurückzuführen, da bei den errechneten absoluten Konzentrationen von GDP-Fuc keine vollständige Inhibition, sondern lediglich eine Inhibition von etwa 50 % bestehen sollte (Sturla *et al.*, 1997). Die errechneten Werte der Kulturen ohne Fkp liegen 2,6- bis 3,3-fach über dem von Albermann *et al.* (2001) bestimmten K_m -Wert für die hier verwendete Fucosyltransferase, während die Werte der Kulturen mit Fkp 27,6- bis 31,5-fach über diesem K_m -Wert liegen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass den zugrundeliegenden Kulturen keine Lactose zugegeben wurde und die gebildete GDP- β -L-Fucose daher durch die Bildung von 2'-FL abgezogen wurde, sondern höchstens in den Colansäure-Biosynthese Verwendung finden konnte. Somit sind die intrazellulären Konzentrationen für GDP-Fuc in 2'-FL-synthetisierenden Kulturen vermutlich deutlich geringer. Unter der Annahme, dass die in Abbildung 3.5 C dargestellten 2'-FL-Ausbeuten je Biomasse in den ersten 4 h nach Induktion unter konstanten Biomassekonzentrationen und Produktbildungsraten entstanden sind, lässt sich errechnen, dass die intrazellulären Konzentrationen von GDP-Fuc bereits nach max. ca. 1,6 min (ohne Fkp) bzw. ca. 10,2 min (mit Fkp) verbraucht wären, wenn kein neues GDP-Fuc gebildet würde.

Die mit dem Stamm JM109 gwBC-F1-fkp-cat erreichte GDP-Fuc-Konzentration von etwa $5 \text{ g g}_{\text{BTM}}^{-1}$ stellt im Vergleich zu anderen Synthesystemen einen kompetitiven Wert für die Synthese mit *E. coli* dar, wie von Petschacher und Nidetzky (2016) zusammengefasst. So konnten Zhai *et al.* (2015) durch eine Zulaufkultivierung mit einem *E. coli* Stamm, welcher ebenfalls den Salvage Pathway nutzte und zusätzlich eine verstärkte Expression der Gene zur Synthese von GTP vorweist, eine maximale Ausbeute von $3,9 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ erreichen, während die Verwendung des *de novo* Pathway in Verbindung mit einer

verstärkten Synthese von Guanosin-phosphaten zu einer Ausbeute von $3,5 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ führte (Lee *et al.*, 2012b) und der *de novo* Pathway in Verbindung mit einer verstärkten NADPH-Regeneration zu $3,1 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ erbrachte (Lee *et al.*, 2013; Abbildung 4.5 A).

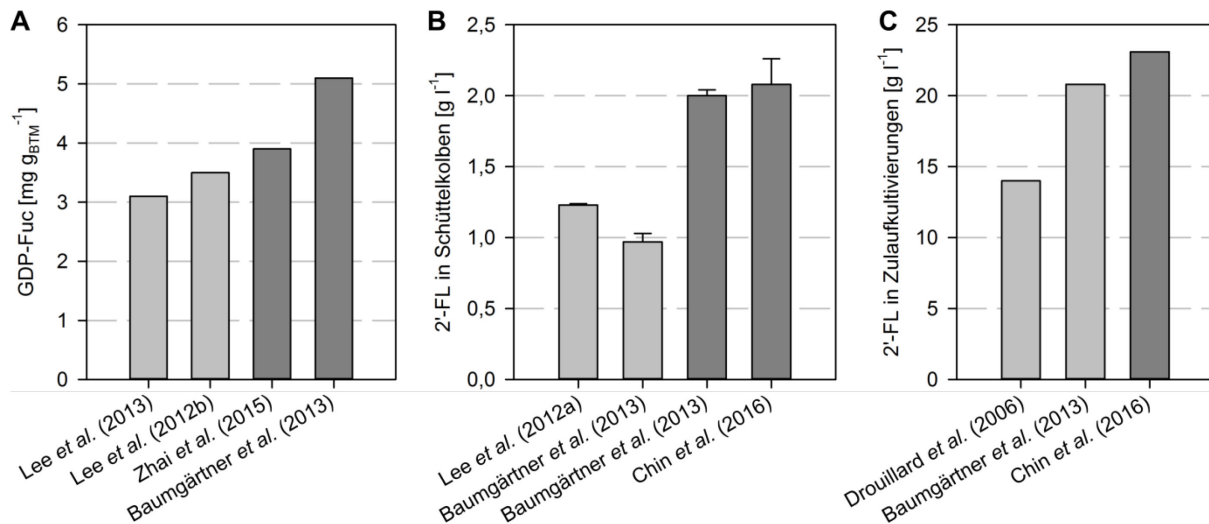


Abbildung 4.5: Vergleich verschiedener Ganzzellsynthesen von GDP-β-L-Fucose und 2'-Fucosyllactose. A) In verschiedenen *E. coli*-Stämmen unter Verwendung des *de novo* Synthesewegs (hellgrau) oder des Salvage Pathway (dunkelgrau; ggf. mit rekombinantem *de novo* Pathway) gebildete GDP-Fuc-Konzentrationen je gebildeter Biotrockenmasse. B) In Schüttelkolbenkulturen erreichte 2'-FL-Titer verschiedener *E. coli* Stämmen. Verwendung des Salvage Pathway durch dunkelgraue Balken markiert. C) In Zulaufkulturen erreichte 2'-FL-Titer unter Verwendung des *de novo* Synthesewegs (hellgrau) bzw. des Salvage Pathway (dunkelgrau; 2'-FL in diesem Fall lediglich im Überstand bestimmt).

Neben erhöhten Konzentrationen von GDP-β-L-Fucose in Kulturen ohne Lactose synthetisierten die Stämme mit Salvage Pathway auch deutlich mehr 2'-FL als Stämme ohne Salvage Pathway in Kulturen mit Lactose und L-Fucose (Abbildung 3.5). Die Verwendung des Salvage Pathway unter Zugabe von L-Fucose war dabei zwar für die Demonstration einer intrazellulären Limitierung der bereitgestellten GDP-Fuc dienlich, wäre jedoch zu den während dieser Arbeit herrschenden Preisen von L-Fucose für großtechnische Synthesen aus wirtschaftlichen Gründen nicht sinnvoll. Eine Limitierung der 2'-FL-Synthese durch die über den *de novo* Pathway bereitgestellte GDP-Fuc wurde mit diesem System jedoch gezeigt, da die Verwendung des Salvage-Pathway zu Steigerungen der 2'-FL-Konzentrationen um die Faktoren 2,21 bzw. 2,05 führten und somit fast 2 g l^{-1} betragen (Abschnitt 3.1.4). Dabei weisen neben der stark erhöhten Syntheseleistung auch die gebildeten Biomassen (Abbildung 3.5 B) auf eine effiziente Nutzung des Salvage Pathway hin. Diese zeigen 24 h nach Induktion bei den Plasmid-freien Stämmen mit *fkp*-Gen um etwa 20 % bzw. 35 % gesteigerte Werte im Vergleich zu den Stämmen ohne *fkp*-Gen. Dies kann als Indiz für die Wachstumsbeeinträchtigung durch den Verbrauch von Fructose-6-phosphat und NADPH über den *de novo*

Syntheseweg und den damit einhergehenden Energieverlust der Zellen gewertet werden.

Während die in den Abschnitten 1.2.4 und 4.1.3 dargestellte Ganzzellsynthese von Drouillard *et al.* (2006) lediglich 2'-FL-Konzentrationen aus Bioreaktor-Kultivierungen beschreibt, sind in den Arbeiten der Arbeitsgruppe um Jin-Ho Seo auch Ganzzellsynthesen in Schüttelkolben beschrieben (Chin *et al.*, 2015; Chin *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2012a). Dabei konnten $1,23 \pm 0,01 \text{ g l}^{-1}$ 2'-FL synthetisiert werden mit einem Stamm, welcher Lactose über die α -Komplementierung spalten konnte, auf dem Stamm *E. coli* JM109 (DE3) basierte und die Gene des *de novo* Synthesewegs und der α 1,2-Fucosyltransferase aus *H. pylori* rekombinant unter Kontrolle von T7-Promotoren exprimierte (Lee *et al.*, 2012a). In späteren Arbeiten der gleichen Arbeitsgruppe konnte ein auf dem Stamm BL21(DE3) basierender Stamm erstellt werden, welcher nur etwa 3 % der ursprünglichen β -Galactosidase-Aktivität enthält (Chin *et al.*, 2015), L-Fucose nicht verwertet und über Plasmid-ständige Kopien der Gene einer α 1,2-Fucosyltransferase und des *fkp*-Gens verfügt (Chin *et al.*, 2016). Dabei konnten in Schüttelkolben unter Verwendung des Salvage Pathway und Zugabe von 10 g l^{-1} L-Fucose $2,08 \pm 0,18 \text{ g l}^{-1}$ 2'-FL synthetisiert werden und der in dieser Arbeit unter Verwendung des *de novo* und Salvage Pathway mit lediglich 2 g l^{-1} L-Fucose beschriebene Wert von $1,997 \pm 0,042 \text{ g l}^{-1}$ nur geringfügig überschreiten (Chin *et al.*, 2016; Abbildung 4.5 B).

Somit sind die in Schüttelkolben erreichten Produkttiter sowohl des Stammes JM109 gwBC-F2-cat ohne Salvage Pathway als auch des Stammes JM109 gwBC-F2-fkp-cat mit Salvage Pathway zu den von anderen Arbeitsgruppen beschriebenen, Plasmid-tragenden Systemen vergleichbar, verzichteten jedoch auf den Gebrauch von Expressionsplasmiden und komplexem Medium (vgl. Lee *et al.*, 2012a) oder verwenden lediglich 50 % des Glycerins und 20 % der kostspieligen L-Fucose (vgl. Chin *et al.*, 2016).

Um die Skalierbarkeit der Synthese von 2'-FL zu analysieren, wurde eine Zulauf-Kultur ohne die Verwendung von Antibiotika oder anderen Selektionssystemen mit 8,4 ml Satzvolumen und 13,5 l Endvolumen im Rührkesselreaktor durchgeführt, wie in den Abschnitten 2.5.4 und 3.1.6 beschrieben. Um dabei auf die Zugabe kostspieliger L-Fucose verzichten zu können, wurde der Stamm *E. coli* JM109 gwBC-F2-cat ohne Salvage Pathway für die Synthese gewählt, da der Stamm mit drei chromosomal integrierten

Kopien des *futC*-Gens noch nicht konstruiert war und der verwendete Stamm in Schüttelkolben somit die höchste 2'-FL Syntheseleistung mittels *de novo* Pathway zeigte. Mit dem dabei erreichten 2'-FL-Titer von 20,28 g l⁻¹ bei einer Biotrockenmassekonzentration von 65,61 g l⁻¹ konnte die im Schüttelkolben beobachtete Ausbeute je Biotrockenmasse um etwa 20,7 % und die Kohlenstoffausbeute in der Fucosyl-Gruppe je zugegebenem Glycerin um etwa 37 % übertroffen werden, was vermutlich auf die Glycerin-Limitierung, den besseren Sauerstoffeintrag und die strikter kontrollierten Bedingungen zurückzuführen ist. Im Vergleich zu dem auf Glucose und Expressionsplasmiden basierten und den *de novo* Pathway mittels RcsA aktivierenden System von Drouillard *et al.* (2006; Abbildung 4.2) konnte somit ein um etwa 45 % höherer finaler Titer und mit etwa 571 mg l⁻¹ h⁻¹ eine um etwa 84 % höhere Raum-Zeit-Ausbeute erreicht werden (Baumgärtner *et al.*, 2013). Übertroffen wurde dieser Titer durch die kürzlich publizierte Synthese von 2'-FL unter Verwendung des Salvage Pathway (Chin *et al.*, 2016), welche eine finale 2'-FL-Konzentration von 23,1 g l⁻¹ im Kulturüberstand erreichte (Abbildung 4.5 C). Aufgrund der Prozesszeit von über 70 h wird dabei jedoch lediglich eine Raum-Zeit-Ausbeute von 0,39 g l⁻¹ h⁻¹ erreicht. Somit stellt die in dieser Arbeit und in (Baumgärtner *et al.*, 2013) beschriebene Synthese von 2'-FL eine effiziente und nicht auf die Zugabe von L-Fucose angewiesene Methode dar, welche die Bereitstellung von 2'-FL sowohl im Schüttelkolben als auch im Zulaufreaktor in einfachen Prozessen und ohne die Verwendung von Antibiotika ermöglicht.

Weiteres Optimierungspotential besteht dabei vor allem in der weiteren Stammentwicklung zur verstärkten intrazellulären Bereitstellung von GDP-Fuc und der verstärkten Fucosyltransferase-Aktivität sowie in einer schnelleren Analytik von Lactose und 2'-FL in Zulauf-Prozessen, um die Lactose-Zugabe im besten Fall online regeln zu können, um den kompletten Verbrauch oder starke Akkumulationen verhindern zu können.

3-Fucosyllactose

Während die Ganzzellsynthese von 2'-FL bereits vor Beginn dieser Arbeit mit einem Titer von über 10 g l⁻¹ veröffentlicht war (Drouillard *et al.*, 2006), wurde die Synthese des Konstitutionsisomers 3-FL in der gleichen Arbeitsgruppe mit lediglich 0,5 g l⁻¹ (Dumon *et al.*, 2004) beschrieben und kurz nach Beginn dieser Arbeit in einer Patentanmeldung unter Verwendung des Salvage Pathway zur Bereitstellung von

GDP-Fuc mit $1,31 \text{ g l}^{-1}$ bei Nutzung einer Fucosyltransferase aus *H. pylori* bzw. $3,36 \text{ g l}^{-1}$ bei Nutzung einer Fucosyltransferase aus *B. fragilis* erwähnt (Parkot *et al.*, 2012). Diese im Vergleich zur 2'-FL-Synthese deutlich niedrigeren Titer sind, im Falle der Fucosyltransferasen aus *H. pylori*, vermutlich auf niedrige Expressionslevel und schlechte Löslichkeit in *E. coli* sowie auf niedrige Aktivitäten mit Lactose als Akzeptor-Substrat zurückzuführen, wie von Choi *et al.* (2016) beschrieben. Um diese Limitierungen zu reduzieren, wurde versucht, die *in vitro* Synthesen von 3-FL mittels Protein Engineering zu verbessern (Choi *et al.*, 2016). Alternativ zu den Synthesen mit Fucosyltransferasen erfolgte in dieser Arbeit die spezifische Spaltung von LDFT mittels der aus *B. bifidum* JCM1254 stammenden, in *E. coli* rekombinant synthetisierten α 1,2-Fucosidase AfcA. Dabei konnten nach der Isolation etwa 82 % der maximalen theoretischen Ausbeute erreicht werden (Abschnitt 3.2.2). LDFT wurde in den vorherigen Arbeiten zu AfcA nicht als Substrat beschrieben (Ashida *et al.*, 2009; Katayama *et al.*, 2004), wurde in dieser Arbeit jedoch neben 2'-FL ebenfalls spezifisch hydrolysiert (Abschnitt 3.2.2). Da zum Zeitpunkt der Durchführung der Hydrolyse noch kein kostengünstiges Verfahren zur großtechnischen Bereitstellung von LDFT beschrieben war und in Ganzzellsynthesen bisher nur in einer Patentanmeldung als Nebenprodukt der 2'-FL-Synthese beschrieben ist (Matwiejuk *et al.*, 2015), sollte damit lediglich die grundsätzliche Möglichkeit der Synthese von 3-FL über diesen Weg demonstriert werden. Die Nutzung dieses Synthesewegs bedingt dabei jedoch die Entwicklung einer Synthese von LDFT, welche eine anschließende Hydrolyse wirtschaftlich rechtfertigt. Zur zeitnahen Synthese von 3-FL scheint daher eine Kombination aus der Suche nach aktiven und gut rekombinant exprimierten Enzymen (vgl. Parkot *et al.*, 2012), Enzyme-Engineering (vgl. Choi *et al.*, 2016) und darauffolgenden Ganzzellsynthesen als sinnvolle Vorgehensweise.

4.2.2. Kernstrukturen

Neben den im vorherigen Abschnitt diskutierten Synthesen von Fucosyllactosen erfolgten im Rahmen dieser Arbeit auch die Ganzzellsynthesen der Kernstrukturen LNT und LNnT mit den in den Abschnitten 3.3 und 3.4 beschriebenen Ergebnissen. Dabei wurde der Fokus auf die Synthese der Typ I-Kernstruktur LNT gelegt, da diese neben Lactose die quantitativ dominante Kernstruktur in humaner Milch ist (Abschnitt 1.1.3). Außerdem wurde die Ganzzellsynthese von LNT in rekombinanten Bakterien bisher

noch nicht beschrieben, während die Typ II-Kernstruktur LNnT bereits rekombinant in *E. coli* synthetisiert werden konnte (Priem *et al.*, 2002).

LNT

Als gemeinsame Vorstufe von LNT und LNnT wurde mit dem Plasmid-freien Stamm *E. coli* LJ-AY-cat-kan zuerst die Synthese von LNT II ermöglicht, wobei mit Glycerin als Kohlenstoffquelle in einfachen Schüttelkolbenkulturen innerhalb von 24 h $2,47 \text{ g l}^{-1}$ synthetisiert werden konnten (Tabelle 3.3; Baumgärtner *et al.*, 2014). Die dabei um etwa 30 % höhere Konzentration von LNT II und um etwa 56 % höhere Ausbeute je Biotrockenmasse mit Glycerin im Vergleich zu Glucose ist vermutlich auf den durch die Glucose-Aufnahme verursachten Induktor-Ausschluss zurückzuführen, der in Abschnitt 1.4.2 und Abbildung 1.9 näher beschrieben ist. Da das Augenmerk aber nicht auf besonders hohen Titern von LNT II, sondern auf der Synthese des Tetrasaccharids LNT lag und in diesen Schüttelkolbenkulturen bereits 40 % des in einer Hochzell-dichte-Kultivierung von Priem *et al.* (2002) erreichten LNT II-Titer von 6 g l^{-1} war, wurde dieses System nicht weiter verbessert.

Stattdessen wurde der zusätzlich mit dem β 1,3-Galactosyltransferase-Gen *wbgO* aus *E. coli* O55:H7 ausgestattete Stamm LJ-AYO-cat ebenfalls in Minimalmedium mit Glycerin bzw. Glucose angezogen, um die LNT-Synthese zu analysieren (Tabelle 3.3). Mit etwa 220 mg l^{-1} LNT in Medium mit Glucose bzw. etwa 160 mg l^{-1} LNT in Medium mit Glycerin konnte dabei die erste Ganzzellsynthese von LNT in rekombinanten Bakterien beschrieben werden (Baumgärtner *et al.*, 2014). Da das Zwischenprodukt LNT II dabei jedoch mit Titern gebildet wurde, welche um die Faktoren 8,6 bzw. 12,9 höher waren als die Titer von LNT, liegt in diesem System vermutlich eine Limitierung in der Galactosylierung von LNT II durch *WbgO* vor. Der geringere LNT-Titer bei Wachstum in Medium mit Glycerin, sowie die Tatsache, dass die Syntheseleistung von LNT II unter Betracht des gesamten gebildeten LNT II durch die zusätzliche Expression von *wbgO* in Medium mit Glucose um 8 % steigt und in Medium mit Glycerin um 10 % fällt, sind Anzeichen für eine limitierende Geschwindigkeit der Gluconeogenese bei Verwendung von Glycerin als Kohlenstoffquelle (s. Abschnitt 3.3.5). So scheint der zusätzliche Bedarf an UDP-Gal in Medium mit Glucose keinen negativen Effekt auf die Synthese von LNT II zu haben, während in Medium mit Glycerin das sowohl für UDP-GlcNAc als auch für UDP-Gal benötigte Fructose-6-phosphat über die Gluconeogenese gebildet werden muss

(Abbildung 3.14) und evtl. eine Limitierung darstellt. Diese Vermutung wird bekräftigt durch die in Abschnitt 3.3.6 (und Baumgärtner *et al.*, 2015b) beschriebenen Analysen der intrazellulären UDP-Hexose-Konzentrationen in LJ-AYO-cat unter Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen. Dort weisen die Kulturen mit Glycerin deutlich niedrigere intrazelluläre Konzentrationen an UDP-Gal, UDP-Glc und UDP-GlcNAc auf als die Kulturen mit Glucose oder Galactose (Abbildung 3.18).

Somit scheint im direkten Vergleich der gängigen Kohlenstoffquellen Glucose und Glycerin für die Synthese von LNT unter diesen Bedingungen Glucose die bessere Wahl zu sein, obwohl in der Synthese von LNT II höhere Titer mit Glycerin erreicht wurden. Aufgrund des deutlichen Überschusses von LNT II scheint die Lactose-Aufnahme in der Synthese von LNT nicht limitierend zu sein, sodass der durch Glucose evtl. verursachte Induktor-Ausschluss einen geringeren Einfluss auf die Bildung von LNT zu haben scheint als die Aktivität von WbgO und die intrazellulären Konzentrationen der Donor-Substrate UDP-GlcNAc und UDP-Gal (Baumgärtner *et al.*, 2014).

Um eine Limitierung der durch WbgO katalysierten Reaktion näher zu untersuchen, ohne den Stamm *E. coli* LJ-AYO-cat zu verändern, wurde Galactose als Kohlenstoffquelle für die Synthese von LNT eingesetzt, wie in Abschnitt 3.3.7 beschrieben. Da *E. coli* Galactose lediglich über den Leloir-Pathway verwerten kann und dabei das Intermediat UDP-Gal bildet (s. Abschnitt 1.4.2 und Abbildung 3.14), sollte so der intrazelluläre Fluss zu bzw. über UDP-Gal erhöht werden. Wie in Abbildung 3.18 dargestellt, gelang die Erhöhung der UDP-Gal-Konzentration in Kulturen mit Galactose um Faktor 2,2 im Vergleich zu Kulturen mit Glucose und um Faktor 3,2 im Vergleich zu Kulturen mit Glycerin (Baumgärtner *et al.*, 2015b). Dieser Effekt spiegelte sich in den darauffolgenden Versuchen unter Zugabe von Lactose auch in den LNT-Titern wider, wobei mit Galactose zwar eine geringere Wachstumsrate und 24 h nach Induktion auch eine geringere Biomassekonzentration (Abbildung 3.19), dafür aber ein um Faktor 3,6 höherer Titer an LNT erreicht wurde als mit Glucose (Abbildung 3.20). Der Zusammenhang aus erhöhten intrazellulären UDP-Gal Konzentrationen und stärkerer LNT-Bildung wird verdeutlicht durch die Berechnung der absoluten, intrazellulären Konzentrationen von UDP-Gal unter Verwendung der bereits in Abschnitt 4.2.1 beschriebenen Annahme einer konstanten Korrelation von OD und intrazellulärem Volumen (Volkmer & Heinemann, 2011). So kann unter dieser Annahme aus der gemessenen UDP-Gal-Konzentration je optischer Dichte und Kulturvolumen für die Kulturen mit Galactose eine absolute

intrazelluläre Konzentration von $40,5 \pm 5,7 \mu\text{M}$ berechnet werden. Dieser Wert, welcher bereits deutlich über den Werten von Kulturen mit Glucose oder Glycerin liegt, entspricht dabei nur etwa 1,2 % des *in vitro* für WbgO ermittelten K_m -Wertes von 3,4 mM (Liu *et al.*, 2009), was eine Limitierung in der Substratverfügbarkeit klar verdeutlicht.

Während die zusätzliche Verwendung von Galactose in Minimalmedium mit Glucose wie erwartet keine Verbesserung der Syntheseleistung erbrachte, da die Expression der Gene des Leloir-Pathway bei Wachstum mit Glucose unterdrückt ist (Weickert & Adhya, 1993), führte die zusätzliche Verwendung von Galactose in Kulturen mit Glycerin ebenfalls zu einer gesteigerten LNT-Synthese (Abbildung 3.20). Dabei wurde in Anwesenheit von Glucose, wie erwartet, nur sehr wenig Galactose verbraucht. Die Kulturen mit Galactose und Glucose zeigten dabei die gleichen spezifischen Wachstumsraten wie die Kulturen mit Glucose aber ohne Galactose. Sie erreichten 24 h nach Induktion jedoch nur 69 % des Zellwachstums der Kultur mit Glucose (Abbildung 3.19) und wiesen auch einen deutlich geringeren Verbrauch von Lactose und geringere Titer von LNT II und LNT auf (Abbildung 3.20 A). Die geringere Produktbildung, auch je gebildeter Biomasse, ist dabei evtl. zurückzuführen auf die Kombination des durch Glucose verursachten Induktor-Ausschlusses (Nelson *et al.*, 1983) zusammen mit der Konkurrenz von Lactose und Galactose um den Transport durch LacY (Jiang *et al.*, 2014), wodurch die Lactose-Aufnahme gehemmt ist. Die verringerte finale Biomasse bei gleicher anfänglicher Wachstumsrate ist aufgrund der gleichen Glucose-Konzentration jedoch unerwartet und könnte einen Effekt in der Aufnahme der Galactose über GalP oder LacY ohne dessen Verwertung haben, bei dem Galactose intrazellulär akkumuliert und nicht über den durch den Glucose-Stoffwechsel reprimierten Leloir-Pathway verwertet werden kann. So kann spekuliert werden, dass die akkumulierte Galactose über ein Exporter-Protein, wie z. B. über die Sugar Efflux Transporter (Liu *et al.*, 1999), ausgeschleust wird, wobei ein Energie-verbrauchender Zyklus aus Im- und Export entstehen könnte. Zur Bestätigung dieser Vermutungen sind jedoch weitere Versuche notwendig.

Um ähnlich zu dem Vorgehen in der Synthese von 2'-FL auch für die Synthese von LNT die Skalierbarkeit des Prozesses und die Syntheseleistung unter Kohlenstofflimitierung zu analysieren, wurde auch mit dem Stamm LJ-AYO-cat eine Zulaufkultivierung ohne Verwendung von Antibiotika durchgeführt (s. Abschnitte 2.5.4 und 3.3.8). Um dabei eine

möglichst hohe Konzentration an LNT zu erreichen, wurde in dieser Kultivierung trotz des im Vergleich zu Glucose oder Glycerin zum Zeitpunkt der Durchführung etwa um Faktor 6 höheren Preises ebenfalls mit Galactose als Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt. Die zugegebene Lactose konnte in dem Prozess zu 98,08 % umgesetzt werden, wobei etwa 13,7 g l⁻¹ LNT II und 12,7 g l⁻¹ LNT synthetisiert wurden. Die auf diesem Weg mit einem Endvolumen von 13,63 l synthetisierten 173,37 g LNT demonstrieren die Skalierbarkeit der LNT-Synthese, wobei aufgrund der hohen Zelldichte von 55,7 g_{BTM} l⁻¹ eine um Faktor 10,9 höhere Raum-Zeit-Ausbeute als im Schüttelkolben erreicht wurde (Baumgärtner *et al.*, 2015b). Im Vergleich zu der von Priem *et al.* (2002) beschriebenen Zulauf-Kultivierung zur Synthese des Typ II-HMO LNnT, welche mit „über 5 g l⁻¹“ (Priem *et al.*, 2002) synthetisiert wurde, konnte somit eine deutlich höhere Konzentration des Typ I-HMO erreicht und dabei auch keine weitere Elongation des Produkts beobachtet werden. Eine solche Elongation erfolgt durch die wiederholte Glycosylierung der Typ II-Oligosaccharide von den Glycosyltransferasen LgtA und LgtB, wobei die Entstehung von Hexa-, Octa- und, unter Verwendung geringer Lactose-Mengen, Decaosen beschrieben wurde (Priem *et al.*, 2002). Dass eine solche Elongation in der Synthese von LNT nicht beobachtet wurde, steht in Einklang mit der geringen *in vitro* Aktivität von LgtA am Akzeptor-Substrat LNT im Vergleich zu LNnT (Blixt *et al.*, 1999). Die ausbleibende Umsetzung von LNT zu größeren Kernstrukturen sowie die in dieser Arbeit beobachteten Vorkommen von LNT im Kulturmedium (Abbildung 3.20 C und Abbildung 3.22 B), welche in der Synthese von LNnT nur in geringen Mengen beobachtet wurden (Priem *et al.*, 2002), stellen dabei Vorteile für die Ganzzellsynthese von LNT mit hohen Titern dar.

Anders als in der Synthese von LNnT (Priem *et al.*, 2002) scheint in den in dieser Arbeit durchgeführten Synthesen von LNT jedoch nicht die N-Acetylglucosaminyltransferase-katalysierte Reaktion, sondern die Galactosyltransferase-katalysierte Reaktion limitierend zu sein, da LNT II anders als in der Synthese von LNnT in höheren Konzentrationen gebildet wird als das daraus synthetisierte Tetrasaccharid. Während diese Diskrepanz in den Schüttelkolben-Versuchen noch sehr deutlich war (Abbildung 3.20 A), führte die Galactose-Limitierung in der Zulaufkultivierung zu fast gleichen Gewichtsanteilen von LNT II und LNT und somit zu einem deutlich besseren Konzentrationsverhältnis von LNT zu LNT II. Dennoch sind höhere Umsätze des Zwischenprodukts LNT II zu dem HMO LNT wünschenswert, wobei zu Prozessende der

Zulaufkultivierung etwa 94 % des LNT II im Kulturüberstand vorlagen und aufgrund fehlender Beschreibungen von Aufnahmesystemen von LNT II in *E. coli* nicht ausgeschlossen werden kann, dass dieses LNT II nicht mehr zur weiteren intrazellulären Umsetzung als Akzeptor-Substrat zur Verfügung steht. Daher kann vermutet werden, dass die WbgO-katalysierte Reaktion, welche für LNT II einen K_m -Wert von 55 μM aufweist, evtl. in Konkurrenz zu dem Export von LNT II steht und eine höhere Aktivität von WbgO somit zu einem verbesserten Konzentrationsverhältnis von LNT zu LNT II führen kann. In weiteren Arbeiten könnte dieser Sachverhalt analog zu dem Vorgehen in der Synthese von 2'-FL durch die chromosomale Integration weiterer Kopien von *wbgO* oder aber auch durch die Verwendung anderer Expressionssysteme untersucht werden.

Wie bereits in Abschnitt 4.2.1 für die Zulaufkultivierung in der Synthese von 2'-FL beschrieben, stellte die Totzeit in der Analytik von Lactose und der gebildeten Produkte auch in der Synthese von LNT eine Limitierung dar, die eine zeitnahe Regelung der Lactose-Zugabe nicht erlaubte. Dadurch kam es in diesem Prozess zu Phasen, in denen den Zellen nur sehr geringe Mengen an Lactose zur Verfügung standen (Abbildung 3.21 C). Eine schnelle online Analytik, z. B. mittels Massenspektrometrie (Abschnitt 1.3), würde die Regelung der Lactose-Zugabe dabei erleichtern und die Zugabe bis zum Prozessende ermöglichen, wodurch evtl. die Bildung des in Abschnitt 3.3.8 beschriebenen Nebenprodukts minimiert werden könnte. Dieses Nebenprodukt ist vermutlich auf einen durch LgtA katalysierten GlcNAc-Transfer auf Galactose aufgrund der Abwesenheit des Akzeptor-Substrats Lactose zurückzuführen (Baumgärtner *et al.*, 2015b).

LNnT

Um neben der Typ I-Kernstruktur LNT auch die Typ II-Struktur LNnT *in vitro* synthetisieren zu können, sollte der LNT II-synthetisierende Stamm LJ-AY-cat-kan, ähnlich zu den Beschreibungen von Priem *et al.* (2002), ebenfalls mit der Aktivität einer β 1,4-Galactosyltransferase ausgestattet werden. Die dazu in Abschnitt 3.4.1 verglichenen Syntheseleistungen mit einem aus *N. meningitidis* isolierten *lgtB*-Gen und einem von Prof. Elling (RWTH Aachen) zur Verfügung gestellten Konstrukt mit dem katalytischen Zentrum der humanen GalT-1 (Sauerzapfe *et al.*, 2008) führten in ersten Schüttelkolben-Kulturen in Kombination mit dem Stamm LJ-AY jeweils zur Synthese von LNnT (Abschnitt 3.4.1). Da der Stamm mit dem Gen *lgtB* 48 h nach Induktion jedoch eine

etwa um Faktor 13 höhere LNnT-Konzentration erreichte als der Stamm mit dem GalT-1-Konstrukt, wurden die darauffolgenden Arbeiten zur Stammkonstruktion und Synthese lediglich mit *lgtB* durchgeführt (Abschnitte 3.4.1 und 3.4.2). Dabei zeigten sich jedoch die bereits von Priem *et al.* (2002) beschriebenen Schwierigkeiten des Zellwachstums, der weiteren Elongation von LNnT und der hauptsächlich intrazellulär vorkommenden Produkte. Während in der Arbeit des Jahres 2002 das geringe Wachstum durch Verwendung der Kohlenstoffquelle Glucose anstelle von Glycerin behoben werden konnte, zeigte der Plasmid-freie Stamm LJ-AYB-cat in dieser Arbeit unter Verwendung beider Kohlenstoffquellen geringe Wachstumsraten von etwa 0,224 h⁻¹ sowie einen Einbruch des Wachstums bei Induktion der Genexpression. Da bei Plasmid-basierter Expression von *lgtB* jedoch weder im Gesamtextrakt noch im zellfreien Extrakt starke Banden des Proteins LgtB zu erkennen sind (Abbildung 3.15), scheint dieser Effekt nicht ausschließlich auf eine zu starke, evtl. zu unlöslichen Proteinen führende Expression von *lgtB* zurückzuführen zu sein. Die Ursache dieser Wachstumsinhibition wurde wegen des Fokus dieser Arbeit auf die Synthese von Typ I-Oligosacchariden nicht weiter untersucht und von Priem *et al.* (2002) ebenfalls lediglich als vermutlich toxischen Effekt beschrieben. Die in den Schüttelkolben mit Minimalmedium maximal beobachteten LNnT-Konzentrationen von 18,96 mg l⁻¹ in Medium mit Glycerin bzw. 18,27 mg l⁻¹ in Medium mit Glucose gingen einher mit ebenfalls geringen LNT II-Konzentrationen von 34,98 mg l⁻¹ (Glyc) bzw. 179,63 mg l⁻¹ (Glc) und sind daher weder mit den zuvor Beschriebenen in einer Hochzelldichte-Kultivierung erreichten Mengen im Bereich mehrerer g l⁻¹ (Priem *et al.*, 2002), noch mit den Synthesen von LNT dieser Arbeit vergleichbar. Der in dieser Arbeit maximal erreichte Anteil von LNnT im Kulturüberstand von 11,25 % wurde lediglich 48 h nach Induktion erreicht und ging einher mit der intrazellulär erfolgten Elongation von mind. 50 % des gebildeten LNnT. 24 h nach Induktion konnte kein Produkt im Kulturüberstand identifiziert werden (Abschnitt 3.4.2). Für eine effiziente Synthese von LNnT wäre daher neben zuverlässigerem Wachstum vor allem auch eine β 1,4-Galactosyltransferase mit hoher Spezifität für Lactose notwendig, um die weitere Elongation des gebildeten LNnT zu verhindern.

4.2.3. Fucosylierte größere Strukturen

Fucosylierte Derivate von LNT

Während die Ganzzellsynthese verschiedener fucosylierter Derivate von LNnT bereits in verschiedenen Publikationen beschrieben wurden (Drouillard *et al.*, 2006; Dumon *et al.*, 2001; Dumon *et al.*, 2004), konnte im Rahmen dieser Arbeit neben der ersten Ganzzellsynthese von LNT in rekombinanten Bakterien (Baumgärtner *et al.*, 2014) auch die erste Ganzzellsynthese von fucosylierten Derivaten von LNT mit rekombinanten Bakterien beschrieben werden (Baumgärtner *et al.*, 2015a). Wie in den Abschnitten 3.5.1 und 4.1.6 beschrieben und diskutiert, wurden dabei der Syntheseweg von LNT mit dem Salvage Pathway für GDP-Fuc und verschiedenen Fucosyltransferasen kombiniert und nach anfänglichen Analysen der Produktbildung mit Plasmid-ständigen Fucosyltransferase-Genen auch Plasmid-freie Stämme erstellt.

Unter Verwendung eines medium-copy Plasmids mit P_{tac}-Promotor zur Expression des Fucosyltransferase-Gens *futC* wurde dabei deutlich niedrigere Syntheseleistungen von LNT II und LNT (s. Abschnitt 3.5.2) beobachtet als mit dem Kontrollplasmid, was vermutlich auf eine zu starke und zum Teil unlösliche Expression von *futC* zurückzuführen ist, da bei der Expression von *futC* unter Verwendung des gleichen Plasmids eine deutliche Proteinbande ausgemacht werden konnte, welche sich nicht in der löslichen Fraktion befand (Abbildung 3.15).

In den darauffolgenden Kulturen konnte dieser Effekt durch die spätere Induktion der Expression von *futC* unter der Kontrolle eines L-Rhamnose-induzierbaren Promotors bzw. durch die chromosomale Integration von *futC* verhindert werden (Abschnitt 3.5.2). Dass die dabei ebenfalls unter Kontrolle eines P_{tac}-Promotors chromosomal integrierte Kopie von *futC* ohne den negativen Effekt exprimiert werden konnte, ist vermutlich auf die geringere Expression bei Vorliegen einer einzigen Kopie von *futC* zurückzuführen (Abschnitt 1.4.1).

Mit diesem Plasmid-freien System konnten in dem zweistufigen Prozess, bestehend aus Kernstruktur-Synthese und anschließender Zugabe von L-Fucose zur Fucosylierung der Kernstrukturen, $271,6 \pm 6,1 \text{ mg l}^{-1}$ LNFP I synthetisiert werden. Dieses Pentasaccharid stellte dabei Hauptprodukt in der Zellsediment-Fraktion dar und kam, vermutlich aufgrund seiner Größe, nur zu etwa 17,9 % im Kulturüberstand vor (Tabelle 3.8). Die deutlich stärkere Akkumulation von LNT II (Tabelle 3.8; Baumgärtner *et al.*, 2015a) zeigt

jedoch erneut, dass eine Geschwindigkeitslimitierung in der Umsetzung von LNT II zu LNT besteht und externes LNT II evtl. nicht für weitere Umsätze zur Verfügung steht. Das Nebenprodukt 2'-FL wurde trotz der Verwendung eines zweistufigen Prozesses und dem *in vitro* von FutC im Vergleich zu Lactose bevorzugten Substrat LNT (Stein *et al.*, 2008) mit etwa 265 mg l⁻¹ gebildet, da zum Zeitpunkt der L-Fucose-Zugabe noch Lactose in den Kulturen enthalten war. Ein späterer Zeitpunkt der Lactose-Zugabe könnte dieses Vorkommen vermutlich verringern.

Durch die in Abschnitt 3.5.3 beschriebene Verwendung des α 1,4-Fucosyltransferase-Gens *fucT14* anstelle von *futC* konnten bei ansonsten gleichem Vorgehen wie in der Synthese von LNFP I mit dem Plasmid-freien Stamm LJ-AYFO14 etwa 820 mg l⁻¹ des fucosylierten LNT II und etwa 547 mg l⁻¹ des HMOs LNDFH II synthetisiert (Tabelle 3.9; Baumgärtner *et al.*, 2015a) und somit auch die erste Ganzzellsynthese von LNDFH II beschrieben werden. So wurde in diesen Kulturen ebenfalls die gesamte vorgelegte Lactose verbraucht und mit etwa 1,05 g l⁻¹ erneut LNT II als Hauptprodukt im Kulturüberstand akkumuliert, während intrazellulär kein LNT II oder LNT detektiert wurde und fucosyliertes LNT II und LNDFH II die intrazellulär dominanten Oligosaccharide darstellten. Neben dem bereits aus humaner Milch isolierten LNDFH II (Kuhn & Gauhe, 1960) stellen dabei vor allem das am Glucose-Rest α 1,3-fucosylierte LNT II, sowie das bei der Isolierung von LNDFH II und fuc. LNT II mit etwa 5,5 mg ebenfalls isolierte LNDFHep interessante Verbindungen dar (Abbildung 3.27). Diese Verbindungen wurden zwar nicht in humaner Milch identifiziert und gehören daher auch nicht der Klasse der HMOs an, konnten jedoch auch nach ausgiebiger Literaturrecherche nicht in anderer wissenschaftlicher Literatur identifiziert werden, sodass die in dieser Arbeit beschriebenen NMR-spektroskopischen Daten vorher lediglich durch die im Rahmen dieser Arbeit entstandene Publikation (Baumgärtner *et al.*, 2015a) veröffentlicht wurden. Gleichzeitig widerspricht die Isolierung von LNDFHep der bisherigen Annahme, dass keine weitere Elongation von LNT stattfindet. Da die dabei isolierte Menge jedoch im Vergleich zu den isolierten 133,7 mg LNDFH II relativ gering ist (Abschnitt 3.5.3), scheint diese Elongation im Vergleich zu der Verlängerung von Typ II-Kernstrukturen (Abschnitt 3.4.2) nur mit sehr geringen Aktivitäten stattzufinden.

Insgesamt konnte mit diesen Systemen somit die einfache Ganzzellsynthese von den HMOs LNFP I bzw. LNDFH II in Schüttelkolben demonstriert werden, welche die Verfügbarkeit dieser Substanzen für Forschungszwecke erhöhen kann.

Fucosylierte Derivate von LNnT

Aufgrund der bereits in Abschnitt 4.2.2 beschriebenen Elongation von LNnT, dem geringeren Wachstum der LNnT-synthetisierenden Stämme und der deutlich geringeren Produktbildung dieser Stämme im Vergleich zu den LNT-synthetisierenden Stämmen, stellte die Synthese fucosylierter Derivate von LNnT eine deutlich größere Herausforderung dar. Da die Synthesen fucosylierter Typ II-Oligosaccharide außerdem bereits in verschiedenen Publikationen der Arbeitsgruppe um Eric Samain beschrieben wurden (Drouillard *et al.*, 2006; Dumon *et al.*, 2001; Dumon *et al.*, 2004), standen diese nicht im Fokus dieser Arbeit. So konnten Plasmid-freie Stämme zur Synthese fucosylierter Kernstrukturen unter Verwendung der Glycosyltransferasen LgtA, LgtB, sowie der Fucosyltransferasen FutA bzw. FutC konstruiert werden (Abschnitt 3.6.1), die mit diesen Stämmen synthetisierten Mischungen zahlreicher verschiedener Oligosaccharide jedoch weder chromatographisch getrennt noch quantifiziert oder isoliert werden konnten (Abschnitt 3.6.2), sodass lediglich qualitative Aussagen zu diesen Synthesen möglich sind.

Dabei wurde sowohl das Zellwachstum als auch die Syntheseleistungen von LNT II und LNT in den Kulturen im Vergleich zu den in Abschnitt 3.4.2 beschriebenen Werten durch die Verwendung von Casaminosäuren deutlich gesteigert. Mit dem als Kontrolle verwendeten und auch schon in Abschnitt 3.4.2 beschriebenen Stamm LJ-AYB-cat konnten dabei in 26 h etwa 94 mg l⁻¹ LNnT synthetisiert werden (Tabelle 3.13), was einer Steigerung etwa um Faktor 5 im Vergleich zu den nach 48 h erreichten LNnT-Konzentrationen in Kulturen ohne Casaminosäuren bedeutet. Dies ging jedoch auch in diesen Versuchen mit den Synthesen größerer Kernstrukturen einher, wobei mittels HPLC detektierte Signale der zusätzlichen Strukturen in der Summe ihrer Intensitäten in allen Kulturen die Signalintensitäten von LNnT übertrafen (Absatz 3.6.2). Diese zusätzlichen Strukturen erhöhen die Komplexität der Produktanalyse nach der Fucosylierung ungemein, weshalb mit der in dieser Arbeit eingesetzten HPLC-Methode keine eindeutige Trennung der Produkte und somit auch keine Identifizierung und Quantifizierung möglich war. Die daraufhin mittels MS analysierten Produktspektren

der Zellextrakte (Anhang A.2) demonstrieren erneut, dass ohne ein Fucosyltransferase-Gen, anders als von Priem *et al.* (2002) beschrieben, vor allem Oligosaccharide mit GlcNAc-Einheit am nichtreduzierenden Ende auftreten. Die Tatsache, dass mit der Expression des Gens *futC* vor allem Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse fucosylierter Oligosaccharide mit geraden Anzahlen an Kernstruktur-Hexosen beobachtet werden konnten, während bei der Expression des Gens *futA* vor allem Massen von fucosylierten Oligosacchariden mit ungeraden Anzahlen an Kernstruktur-Hexosen auftraten (Anhang A.2), liegt vermutlich begründet in den Substratspezifitäten der Fucosyl- und Glycosyltransferasen, wobei z. B. für LgtA *in vitro* nur sehr geringe Enzymaktivitäten mit endständig α 1,2- bzw. α 1,3-fucosylierten Typ II-Oligosacchariden beschrieben wurden (Blixt *et al.*, 1999). Die neben LNT II und LNnT gebildeten Kernstrukturen liegen vermutlich in linearer Form, also als para-Strukturen (Abbildung 1.2), vor, da die Synthese dieser Oligosaccharide auch von der Arbeitsgruppe um Eric Samain bei Ganzzellsynthesen von HMOs in *E. coli* mit LgtA und LgtB beobachtet wurde (Drouillard *et al.*, 2006; Dumon *et al.*, 2001; Dumon *et al.*, 2004). Weitere Aussagen zu den Strukturen können aufgrund fehlender Informationen zu den Konstitutionen jedoch nicht getroffen werden.

4.2.4. Extrazelluläre Vorkommen von HMOs

Neben den erreichten Titern, Produktivitäten und Produktausbeuten in Ganzzellsynthesen von HMOs, welche in den vorherigen Abschnitten diskutiert wurden, ist auch die Verteilung der gebildeten Produkte auf die Zellfraktion und den Zellüberstand ein entscheidender Faktor in der Synthese und Isolierung. So wird die Wirtschaftlichkeit von Produktionsprozessen in der weißen Biotechnologie vorwiegend durch die Produktisolierung bestimmt, wobei das Vorkommen der Produkte im Kulturmedium häufig eine vereinfachte Isolierung erlaubt (Syldatk & Chmiel, 2011). Außerdem kann der Export von Produkten in das in den meisten Prozessen größere extrazelluläre Volumen auch höhere Produkttiter ermöglichen.

Während diese Vorteile extrazellulärer Produkte einen Export HMOs in Ganzzellsynthesen erstrebenswert machen, ist jedoch der Export von Zwischenprodukten, wie z. B. LNT II (s. Abschnitt 4.2.2), nicht erwünscht, solange nicht sichergestellt ist, dass die einmal exportierten Zwischenprodukte auch wieder von der Zelle aufgenommen und somit weiter umgesetzt werden können.

Über den Transfer der in dieser Arbeit gebildeten Oligosaccharide in den extrazellulären Raum ist bisher nur wenig bekannt und neben der in einer Patentanmeldung erwähnten zusätzlichen Expression von Sugar Efflux Transporter-Genen (wie *setA* aus *E. coli* K-12) in der Synthese von HMOs (Jennewein *et al.*, 2010) sind keine allgemeinen Exportmechanismen oder Oligosaccharid-Transferasen für HMOs beschrieben. Auch in dieser Arbeit wurden keine Versuche unternommen, den Export der Endprodukte zu verstärken. Die in dieser Arbeit gebildeten HMOs und deren Vorkommen in den Überständen der jeweiligen Kulturen sind in Tabelle 4.1 angegeben.

Tabelle 4.1: In Ganzzellsynthesen mit Plasmid-freien Stämmen synthetisierte Oligosaccharide, deren Vorkommen im Kulturüberstand und die daraus isolierten Mengen. ^[a]

| Verbindung ^[a] | Kultur-Typ | <i>E. coli</i> -Stamm | Titer [g l ⁻¹] ^[b] | Anteil im Überstand [%] ^[b] | Isolierte Menge [mg] |
|----------------------------|---------------------|-----------------------|---|--|----------------------|
| 2'-FL | Schüttelkolben | JM109 gwBC-F3-cat | 1,06 ± 0,21 | 96,1 ± 0,6 | |
| | Schüttelkolben | JM109 gwBC-F2-fkp-cat | 2,00 ± 0,04 | 89,0 ± 0,9 | 2010 |
| | Zulauf-Kultivierung | JM109 gwBC-F2-cat | 20,28 ± 0,83 | 50,4 ± 2,8 ^[c] | |
| 3-FL ^[d] | Schüttelkolben | JM109 gwBC-futA-cat | 0,005 ± 0,001 | - ^[e] | |
| | Zulauf-Kultivierung | JM109 gwBC-futA-cat | 0,44 | 25 | - |
| LNT II ^[f] | Schüttelkolben | LJ-AY-cat-kan | 2,47 ± 0,06 | 89,4 ± 0,8 | 323,9 |
| | Zulauf-Kultivierung | LJ-AYO-cat | 13,70 ± 0,10 | 93,9 ± 0,3 | |
| LNT | Schüttelkolben | LJ-AYO-cat | 0,81 ± 0,01 | 93,4 ± 0,2 | 102,1 |
| | Zulauf-Kultivierung | LJ-AYO-cat | 12,72 ± 0,21 | 61,8 ± 1,2 | |
| LNnT | Schüttelkolben | LJ-AYB-cat | 0,093 ± 0,004 ^[g] | - ^[g] | 81,7 |
| LNFP I | Schüttelkolben | LJ-AYFOC-cat | 0,272 ± 0,006 | 17,9 ± 0,4 | 59,4 |
| LNDFH II | Schüttelkolben | LJ-AYFO14-cat | 0,547 ± 0,004 | 23,8 ± 0,3 | 133,7 |
| Fuc. LNT II ^[f] | Schüttelkolben | LJ-AYFO14-cat | 0,817 ± 0,022 | 37,6 ± 1,2 | 71,5 |

^[a] Verbindungen, die in den Kulturen nicht quantifiziert wurden, sind nicht in der Liste enthalten.

^[b] Werte 24 h bzw. 26 h nach Induktion in Schüttelkolben bzw. Endwerte der Zulauf-Kultivierung.

^[c] Während der Kultur wurde ein maximaler Wert von 65,8 ± 3,9 % erreicht.

^[d] Durchgeführt von Lukas Jurzitza im Rahmen einer Diplomarbeit (Jurzitza, 2013)

^[e] Kein Produkt im Kulturüberstand detektiert.

^[f] Struktur bisher nicht in humaner Milch identifiziert.

^[g] Vorkommen in der Sediment-Fraktion der Kulturen mit Casaminosäuren (s. Abschnitt 3.6.2). Vorkommen in Überständen nicht bestimmt.

Dabei zeigt sich die Tendenz, dass kleinere Strukturen mit größeren prozentualen Anteilen im Kulturüberstand vorkamen und dass hohe Produkttiter auch mit hohen extrazellulären Vorkommen einhergehen. Die Ursache und die Folge dieser Korrelation sind dabei jedoch nicht ohne weiteres auszumachen, da Produkttiter mit mehreren

Gramm pro Liter in dem geringen intrazellulären Volumen von Schüttelkolben nicht realisierbar sind. Höhere intrazelluläre Konzentrationen könnten jedoch auch einen stärkeren Export der Produkte bedingen.

Dass Struktur und Konzentration des Zuckers dabei jedoch nicht die einzigen Kriterien für einen effizienten Export sind, ist am Beispiel der 2'-FL-Synthesen in Schüttelkolben mit bzw. ohne Salvage Syntheseweg von GDP-Fuc zu erkennen. Während sich in der Kultur des Stammes JM109 gwBC-F3-cat bei einem 2'-FL-Titer von etwa 1 g l⁻¹ etwa 96 % der gesamten 2'-FL im Kulturüberstand befanden, zeigte die Kultur mit dem Stamm JM109 gwBC-F2-fkp-cat bei vergleichbarer Biomasse den doppelten Titer, jedoch lediglich 89 % des Produkts im Kulturüberstand, was auf deutlich höhere intrazelluläre Konzentrationen schießen lässt und somit gegen einen rein von der intrazellulären Produktkonzentration abhängigen Export spricht (Tabelle 4.1). Mit nur 50,4 % der gebildeten 2'-FL im Kulturüberstand zeigte die Zulaufkultivierung zum Prozessende ein deutlich unvorteilhafteres Verhältnis als die Schüttelkolben. Dabei ist bemerkenswert, dass zu einer Prozesszeit von 30 h 65 % der gebildeten 2'-FL im Kulturüberstand vorlagen und der Anteil der im Kulturübersand enthaltene Lactose, sowie die Gesamtmenge der im System verfügbaren Lactose mit dem Anteil der 2'-FL im Kulturüberstand zu korrelieren scheinen (Abbildung 3.9 B und Abbildung 3.10 B). Somit kann ein Effekt der Lactose-Verfügbarkeit auf den Export von 2'-FL nicht ausgeschlossen werden.

Im Vergleich der Synthesen von LNT II und LNT in Schüttelkolben und in einer Zulaufkultivierung zeigt sich dabei ebenfalls, dass in der Galactose- und zeitweise Lactose-limitierten Zulaufkultivierung niedrigere Produktanteile im Kulturüberstand vorkommen, wobei der Anteil des Zwischenprodukts LNT II zum Prozessende deutlich anstieg (Abbildung 3.22 B). Dieser sprunghafte Anstieg von etwa 79 % auf über 93 % ist vermutlich auf den intrazellulären Verbrauch von LNT II durch die Umsetzung zu LNT bei gleichzeitigem Ausbleiben der Neubildung aufgrund der Lactose-Limitierung zurückzuführen. Der Export von LNT in dem Zulaufverfahren ist dabei vor allem interessant, da Priem *et al.* (2002) für die Synthese von LNnT beschrieben hat, dass dieses Tetrasaccharid aufgrund seiner Größe nicht in den Kulturüberstand freigesetzt wurde. Auch in dieser Arbeit in Schüttelkolben wurden lediglich 11,25 % von LNnT im Kulturüberstand identifiziert (Abschnitt 3.4.2). Im Gegensatz zu LNT kamen die in Schüttelkolbenkulturen gebildeten, fucosylierten Derivate von LNT jedoch hauptsächlich

in den Zellsediment-Fractionen vor, sodass die Größe der Strukturen in diesem Fall evtl. einen negativen Effekt auf die Freisetzung haben könnte.

Eine weitere Barriere, vor allem für den Export größerer HMOs, könnte die äußere Membran von *E. coli* darstellen. So ist bisher wenig über die Freisetzung von HMOs in Ganzzellsynthesen mit *E. coli* durch die äußere Membran bekannt. In einer Patentanmeldung erwähnen Jennewein *et al.* (2010) die Nutzung von Porinen für den Transfer von 3-FL durch die äußere Membran. Wie von Koebnik *et al.* (2000) und Nikaido (2003) zusammengefasst, fungieren Porine als kanalbildende Membranproteine. Dabei erlauben die als klassische Porine bezeichneten Proteine OmpF und OmpC den relativ unspezifischen Durchfluss von wasserlöslichen Substanzen mit einer Molekülgröße von bis zu 500 Da und können daher Tetrasaccharide und größere Oligosaccharide vermutlich nur bedingt transportieren, während z. B. LamB bzw. OmpG größere Kanäle bilden und den Transport von Maltodextrinen bzw. anderen Oligosacchariden erleichtern (Fajardo *et al.*, 1998; Nikaido, 2003; Wandersman *et al.*, 1979; Yildiz *et al.*, 2006). Die von *E. coli* gebildeten extrazellulären Polysaccharide (EPS) weisen deutlich größere Molekulargewichte auf als die in dieser Arbeit gebildeten HMOs und passieren die äußere Membran vermutlich nicht durch die klassischen Porine. Sie passieren die äußere Membran durch die OMA (outer membrane auxiliary) Proteinfamilie (Nikaido, 2003). Das Membranprotein Wza, dessen Gen im Colansäure-Biosynthese-Operon enthalten ist, stellt dabei das am besten untersuchte Mitglied dieser Familie dar (Dong *et al.*, 2006). Ob und in welcher Form die erwähnten Proteine der inneren und äußeren Membran am Export verschiedener HMOs beteiligt sind, ist aktuell jedoch nicht klar. Für fundierte Aussagen zu der Freisetzung von HMOs in Ganzzellsynthesen sind daher weitere Untersuchungen unabdingbar. Sollte eine Limitierung im Transfer durch die äußere Membran vorliegen, könnten Methoden zur Erhöhung der Durchlässigkeit der äußeren Membran den Transfer ermöglichen. So konnte z. B. die Deletion des Gens *lpp*, welches ein Lipoprotein der äußeren Membran kodiert, die Durchlässigkeit der äußeren Membran von *E. coli* sowohl für verschiedene kleine Moleküle als auch für Proteine deutlich erhöhen (Ni *et al.*, 2007; Ni & Chen, 2009).

4.3. Produktisolierung und Analytik von HMOs

Wie bereits in Abschnitt 1.3 beschrieben, ist die Analytik humaner Milcholigosaccharide unter anderem aufgrund der großen Anzahl möglicher Strukturen und der in freier Form vorliegenden α - und β -Anomere relativ komplex. In dieser Arbeit wurden die quantitativen Analysen der gebildeten HMOs nach Derivatisierung mit Anthranilsäure mittels reversed-phase HPLC und Fluoreszenzdetektion im Vergleich zu kommerziellen Standards durchgeführt (Abschnitt 2.7.3). Dabei zeigte die Fluoreszenzbestimmung der durch reduktive Aminierung gebundenen Anthranilyl-Gruppe eine relativ hohe Sensitivität (Anumula, 1994), während die dabei eingesetzte Trennung verschiedener HMOs über reversed-phase Chromatographie bei der Synthese von LNT II angepasst werden musste, um diese Verbindung von Lactose trennen zu können (Abschnitt 3.3.1). Diese Beobachtung und die deutlich unterschiedlichen Retentionszeiten von 2'-FL und 3-FL (Anhang A.3, Abbildung A. 31) zeigen auf, dass die Oligosaccharide bei dieser Methode nicht nach ihrer Kettenlänge oder dem Molekulargewicht aufgetrennt werden, weshalb der Vergleich mit kommerziellen Standards unabdingbar ist und aufgrund möglicherweise gleichzeitig eluierender Verbindungen weitere analytische Methoden notwendig sein können. Da die Derivatisierung und der chromatographische Schritt bei dieser Methode jedoch zusammen mindestens 2 h dauerten, ist diese Methode für die Kontrolle verbrauchter und gebildeter Zucker in Zulauf-Kultivierungen ungeeignet, weil dadurch z. B. große Verzögerungen in der manuellen Regelung der Lactosezulauftrate entstehen, wie bereits in den Abschnitten 4.2.1 und 4.2.2 diskutiert. Um diesen Zeitverzug zu verringern wurde in den Zulaufkulturen Dünnschichtchromatographie genutzt, welche qualitative Aussagen zu den Konzentrationen erlaubte (Abschnitt 3.1.6). Eine deutliche Verringerung der Totzeit könnte dabei evtl. eine auf zeitnahe Massenspektrometrie beruhende Methode (Abschnitt 1.3) erlauben.

Um die Strukturen der gebildeten Oligosaccharide näher untersuchen zu können, wurden diese mittels Adsorptionschromatographie und Größenausschlusschromatographie isoliert (Abschnitte 3.1.7, 3.3.9, 3.4.3 und 3.5.4). Die dabei nach Gefriertrocknung erhaltenen Stoffmengen sind in Tabelle 4.1 aufgeführt, wobei über 2 g 2'-FL aus den finalen Proben der in Abschnitt 3.1.6 beschriebenen Zulaufkultivierung erhalten werden konnten. Die damit am Institut für Ernährungsmedizin der Universität Hohenheim durchgeführten Bestimmungen des Endotoxin-Gehalts (Abschnitt 3.1.7) demonstrierten jedoch, dass weitere Schritte im Downstream-Processing notwendig

waren, woraufhin die Endotoxin-Belastung mittels C18-SPE reduziert werden konnte (Abbildung 3.11 B). Da die Produktisolierungen jedoch hauptsächlich den strukturellen Untersuchungen dienen sollten, wurden keine weiteren Untersuchungen zu den Endotoxin-Gehalten oder zu verbesserten Methoden der HMO-Isolierung durchgeführt.

Um sicher zu stellen, dass die rekombinant in Ganzzellsynthesen gebildeten Oligosaccharide auch den erwarteten Strukturen entsprachen, wurden die isolierten Verbindungen mittels MS und NMR näher untersucht. Die Massenspektren konnten dabei die in den Produkten vorkommende Anzahl an Hexosen, Desoxyhexosen und N-Acetylhexosaminen bestätigen, während die NMR-Spektren Aussagen über die Konstitutionen der Zucker zuließen. So zeigten die NMR-Spektren von 2'-FL und 3-FL Übereinstimmung mit den bereits zuvor publizierten Annotationen chemischer Verschiebungen und wurden nicht weiter untersucht, da diese Substanzen bereits zuvor in Ganzzellsynthesen hergestellt werden konnten (Abschnitte 3.1.7 und 3.2.2). Die Strukturen von LNT II, LNT, LNnT, LNFP I, LNDFH II und LNDFHep konnten aufgrund der am Institut für Bioorganische Chemie der Universität Hohenheim durchgeführten, sehr umfangreichen NMR-Analysen als native Oligosaccharide auch ohne Vergleich zu Standards vollständig aufgeklärt werden. Vor allem für die fucosylierten Derivate von LNT konnten dabei zusätzlich zu den bereits zuvor beschriebenen chemischen Verschiebungen und Kopplungen weitere Annotationen erfolgen. Da auch nach ausgiebiger Literaturrecherche keine Beschreibungen von fucosyliertem LNT II und LNDFHep identifiziert werden konnten, stellen die in dieser Arbeit und in (Baumgärtner *et al.*, 2015a) aufgeführten NMR-Annotationen vermutlich auch die ersten Beschreibungen von NMR-Daten für diese Verbindungen dar.

Da die NMR-Analysen größerer HMOs jedoch nicht nur aufgrund der in den Spektren enthaltenen Signale des jeweiligen α - und β -Anomers relativ aufwändig sind, wäre die in Abschnitt 1.3 beschriebene und auf Kombinationen von Chromatographie, LC-MS-MS und enzymatischen Verdaus basierende Methode zur schnelleren Strukturbestimmung eventuell eine attraktive Alternative (Niñonuevo *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011).

5. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zahlreiche Plasmid-freie *E. coli* Stämme konstruiert und in Ganzzellsynthesen zur Darstellung verschiedener humaner Milcholigosaccharide genutzt werden, wie in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Dabei konnte z. B. die Raum-Zeit-Ausbeute im Vergleich zu dem zuvor beschriebenen Prozess der Ganzzellsynthese von 2'-FL um 84 % erhöht werden oder erstmalig die Ganzzellsynthesen der Typ I-HMOs LNT, LNFP I und LNDFH II in rekombinanten Bakterien beschrieben und somit das Spektrum der im Labormaßstab mittels Ganzzellsynthesen verfügbarer HMOs erweitert werden. Für die Synthesen von 2'-FL und LNT konnten in Zulauf-Kultivierungen außerdem erste Skalierungen der Systeme aufzeigen und dabei etwa 270 g 2'-FL bzw. etwa 173 g LNT synthetisiert werden. Um die beschriebenen Ganzzellsynthesen jedoch noch effizienter und in höheren Ausbeuten zu gestalten, um die gebildeten HMOs zu möglichst niedrigen Kosten bereitstellen zu können, sind weitere Untersuchungen und Entwicklungen notwendig, von denen einige im Folgenden beschrieben werden.

Eine Möglichkeit zur Verbesserung der Produktbildungsraten kann durch die weitere Stammkonstruktion gegeben sein. Für die Synthese von 2'-FL könnten so z. B. die Limitierung in der intrazellulären Bereitstellung von GDP-Fuc adressiert werden, welche durch die zusätzliche Verwendung des Salvage Pathway identifiziert wurde (Abschnitt 3.1.3). Um dabei auf den Salvage Pathway verzichten zu können, könnte möglicherweise analog zu den Integrationen weiterer Kopien von *futC* (Abschnitt 3.1.2) eine stärkere Expression der Gene des *de novo* Pathway durch weitere chromosomal integrierte Kopien der Pathway-Gene erreicht und somit evtl. mehr Kohlenstoff aus dem zentralen Metabolismus zur Synthese von GDP-Fuc geleitet werden. Wie in Abschnitt 4.2.1 diskutiert, könnte die Lactose-Aufnahme bei einer höheren 2'-FL-Synthese eine gewisse Limitierung darstellen, sodass die Expression von *lacY* unter Kontrolle eines stärkeren Promotors bzw. mit mehreren chromosomal integrierten *lacY*-Kopien eine Möglichkeit der Erhöhung der Lactose-Aufnahmerate darstellen könnte (vgl. Abschnitt 3.3.2).

Da in dieser Arbeit die höchsten Produkt-Titer von LNT auf der Verwendung von Galactose als Kohlenstoffquelle beruhten (Abschnitt 3.3.7), aber Galactose aufgrund der geringeren Löslichkeit und des höheren Preises im Vergleich zu Glucose oder Glycerin für großtechnische Synthesen als einzige Kohlenstoffquelle unvorteilhaft ist, könnte versucht werden, die intrazelluläre Bereitstellung von UDP-Gal durch Pathway-Engineering zu erhöhen. Denkbar wäre dafür auch die simultane Verwendung von Glucose und Galactose durch die rekombinante Expression des Leloir-Pathway, wie bereits von Lim *et al.* (2013) beschrieben. Eine schwächere Expression des UDP-glucose 4-Epimerase-Gens *galE* könnte dabei eine Verwertung der Galactose für Zellwachstum einschränken, da die gebildete UDP-Galactose nur verlangsamt zu UDP-Glucose umgesetzt werden könnte (s. Abbildung 3.14). Eine vollständige Disruption des Gens ist jedoch vermutlich nicht möglich, da die starke Akkumulation von UDP-Gal in Anwesenheit von Galactose Zellstress verursacht und zu einem Wachstumsarrest und zur Zellyse führt (Lee *et al.*, 2009a).

In den Synthesen fucosylierter Derivate von LNT und LNnT würden einstufige Prozesse die Prozessführung erleichtern und evtl. auch kontinuierliche Kulturen erlauben. Dazu wäre jedoch die Nutzung spezifischer Fucosyltransferasen notwendig, welche Lactose nicht oder nur mit geringer Affinität als Substrat nutzen, sodass die intrazelluläre Bereitstellung von GDP-Fuc in der Anwesenheit von Lactose nicht zur hauptsächlichen Bildung von Fucosyllactose führt. Analog dazu wäre auch die Identifikation oder das Engineering einer β 1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase mit hoher Spezifität für Lactose in der Synthese von LNnT vorteilhaft, um die Bildung längerer Typ II-Strukturen durch den wiederholten Transfer GlcNAc und Gal zu unterbinden, die für die LNnT-Synthese mit LgtA und LgtB beschrieben wurde (Priem *et al.*, 2002). Eine Steuerung der Freisetzung von Zwischen- und Endprodukten ist dabei vor allem in den Synthesen mit mehreren Glycosyltransferasen wünschenswert, da die Zwischenprodukte im Kulturüberstand evtl. nicht wieder von den Zellen aufgenommen werden können und daher nicht sicher ist, ob sie als Substrate für weitere Synthesen im gleichen Ansatz verwendet werden können.

Die in dieser Arbeit genutzte Methode zur Konstruktion Plasmid-freier Stämme bietet eine schnelle und einfache Möglichkeit zur chromosomalen Integration mehrerer Expressionskassetten (Albermann *et al.*, 2010). Die dabei nach jedem Integrationszyklus verbleibende FLP-Rekombinase-Erkennungssequenz (FRT-Sequenz; Cherepanov &

Wackernagel, 1995) wird jedoch auch als Vernarbung des Chromosoms bezeichnet und kann das Chromosom destabilisieren (Reisch & Prather, 2015). Um eine solche Vernarbung durch FRT-Sequenzen in der Stammkonstruktion zu verhindern und neben den eingebrachten Expressionskassetten bzw. Genen keine weitere Fremd-DNA im Chromosom zu hinterlassen, könnte die Stammkonstruktion in Zukunft auch unter Verwendung einer vernarbfreien Methode zur chromosomalen Integration durchgeführt werden. So wurden in den vergangenen Jahren verschiedene Methoden beschrieben, die ebenfalls auf der bereits in Abschnitt 1.4.1 beschriebenen homologen Rekombination mittels des λ -Red-Systems basieren und Genen oder Promotor-Sequenzen ohne Rückstände der Integrationsmechanismus integrieren. Die dabei auf verschiedene Weisen erreichten Methoden der Selektion und Gegenselektion basieren auf der Verwendung einer Kasette mit einem oder mehreren Genen, welche eine Resistenz, z. B. gegen ein Antibiotikum, in Verbindung mit einer Sensitivität gegen einen anderen externen Einfluss verursachen. Diese Kasette kann mittels homologer Rekombination integriert werden und anschließend durch das zu integrierende Gen ausgetauscht werden, wobei die Selektion im ersten Schritt auf die vorhandene Resistenz und im zweiten Schritt auf die entfernte Sensitivität erfolgt (Li *et al.*, 2013; Stringer *et al.*, 2012). Basierend auf der Möglichkeit, ortsspezifische chromosomale Doppelstrangbrüche mittels CRISPR-Cas-System zu verursachen (Doudna & Charpentier, 2014), konnten außerdem kürzlich verschiedene zeitsparende Methoden zur chromosomalen Integration ohne den Verbleib weiterer Sequenzen entwickelt werden (Jiang *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Pyne *et al.*, 2015; Reisch & Prather, 2015). Diese Methoden stellen attraktive Alternativen zu den in dieser Arbeit genutzten Methode dar, waren während der in dieser Arbeit durchgeführten Stammkonstruktionen jedoch noch nicht beschrieben.

Escherichia coli bietet mit den in Abschnitt 1.4 beschriebenen Eigenschaften des sehr gut charakterisierten Stoffwechsels, der zahlreichen Methoden zur genetischen Manipulation sowie der Etablierung in einigen großtechnischen Prozessen verschiedene Vorteile für die Nutzung in der Synthese von HMOs. Als Gram-negatives Bakterium bildet *E. coli* jedoch Endotoxine, welche im Rahmen dieser Arbeit in der isolierten 2'-FL mit erhöhten Gehalten nachgewiesen werden konnten (Abschnitt 3.1.7). Diese Endotoxine können bei Injektion oder bei *in vitro* Versuchen in der Zellkultur bereits in geringen Mengen pyrogene Effekte auslösen und die Versuchsergebnisse beeinflussen

(Morrison & Ulevitch, 1978; Talmadge & Siebert, 1989). Den in dieser Arbeit beschriebenen ersten Versuchen zur Reduktion des Endotoxin-Gehalts (Abschnitt 3.1.7) sollten in Zukunft weitere Entwicklungen zur Reduktion der Endotoxin-Belastung in den isolierten HMOs folgen. Dazu könnten bestehende Methoden zur Endotoxin-Entfernung für das Downstream-Processing in der HMO-Synthese angepasst (Magalhães *et al.*, 2007) oder auf alternative Stämme zur Ganzzellsynthese ausgewichen werden (Taguchi *et al.*, 2015). Eine Alternative zu den verwendeten *E. coli* Stämmen könnte die kommerzielle, auf *E. coli* BL21(DE3) basierende Clearcoli-Technologie sein (Mamat *et al.*, 2013), welche aufgrund veränderter Synthesewege andere Lipid-Strukturen enthält und somit keine Lipopolysaccharid-bedingte Immunantwort von humanen Zellen auslöst. Alternativ dazu könnte auch auf Gram-positive Mikroorganismen wie *Bacillus* oder *Corynebacterium* ausgewichen oder Hefen genutzt werden, welche den GRAS-Status (generally recognized as safe) tragen, ebenfalls gentechnisch zugänglich sind und bereits in der weißen Biotechnologie genutzt werden (Mamat *et al.*, 2013). *Corynebacterium glutamicum* ist dabei interessant, da in vorherigen Arbeiten bereits eine funktionelle rekombinante Expression des Lactose-Permease Gens *lacY* aus *E. coli* in *C. glutamicum* zur Aufnahme von Lactose beschrieben (Brabetz *et al.*, 1991; Brabetz *et al.*, 1993) und in späteren Arbeiten die Synthese von GDP-Fuc in *C. glutamicum* aus Glucose und Mannose erreicht wurde (Chin *et al.*, 2013). Somit wäre theoretisch lediglich die funktionelle Expression einer Fucosyltransferase in der Aufnahme und der Bildung von GDP-Fuc notwendig, um intrazellulär Fucosyllactose zu synthetisieren. Um in *Saccharomyces cerevisiae* GDP-Fuc zu synthetisieren, nutzten Mattila *et al.* (2000) die hohen intrazellulären Vorkommen von GDP-Mannose in Kombination mit den auch in dieser Arbeit rekombinant exprimierten *E. coli* Genen *gmd* und *wcaG*. Ob diese Stämme jedoch die gebildeten Produkte auch in den Kulturüberstand freisetzen würden und auch effizient in der Synthese weiterer Kernstrukturen genutzt werden könnten, müsste näher untersucht werden.

A. Anhang

A.1 Strukturverifikation der Produkte

A.1.1. 2'-Fucosyllactose (2'-FL)

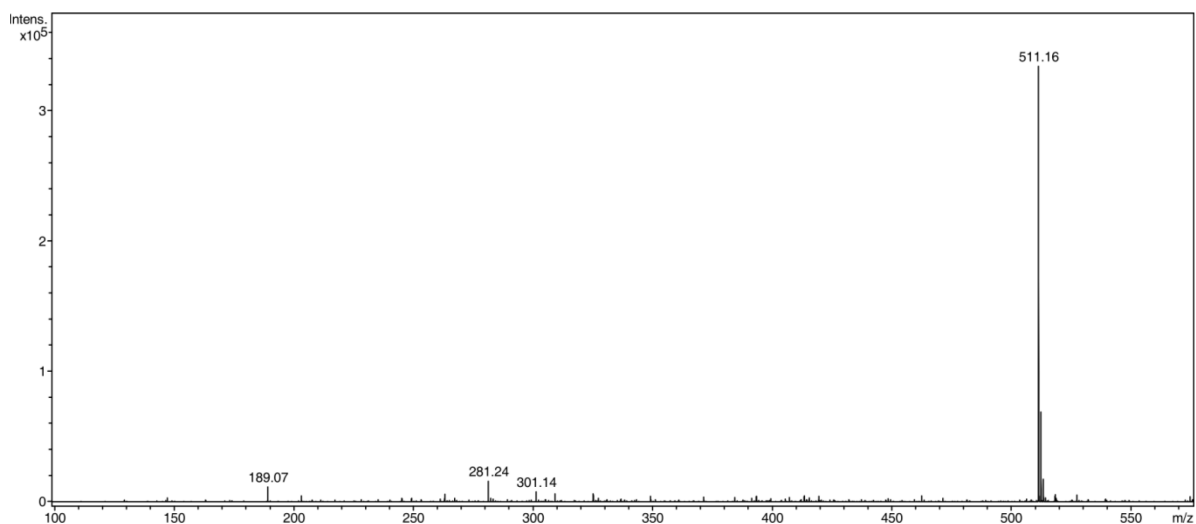


Abbildung A.1: ESI-Massenspektrum der synthetisierten und isolierten 2'-Fucosyllactose. Aufgenommen mit einem Bruker microTOF-Q System im positiven Messfeld. Stärkstes Signal entspricht der Masse des Na^+ -Addukts von 2'-FL ($m/z = 511,16$).

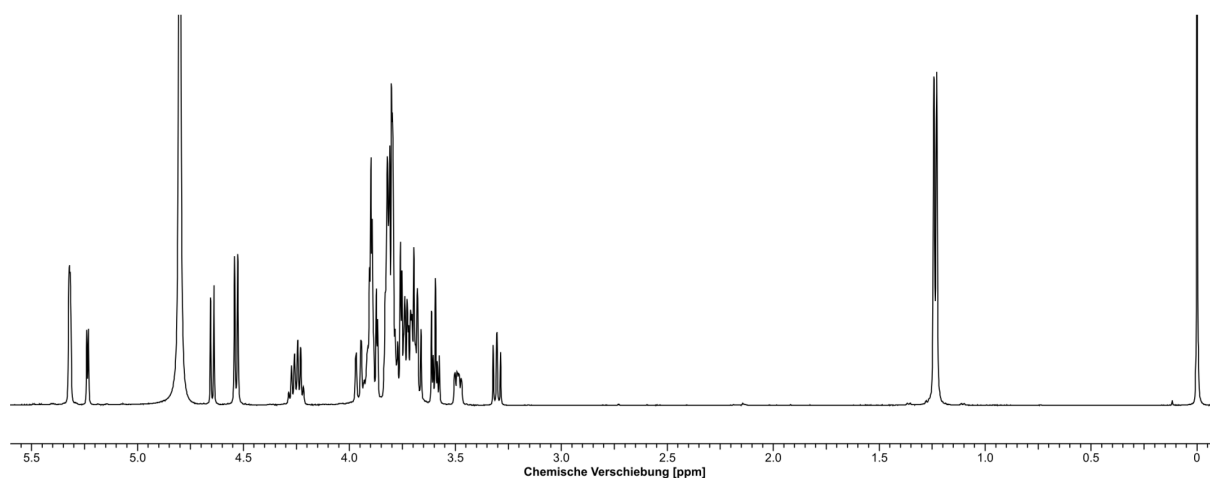


Abbildung A.2: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz) der synthetisierten 2'-Fucosyllactose. Aufgenommen in D_2O . Zugegebenes TMS diente als Referenz ($\delta = 0$ ppm). In anderer Form bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2013).

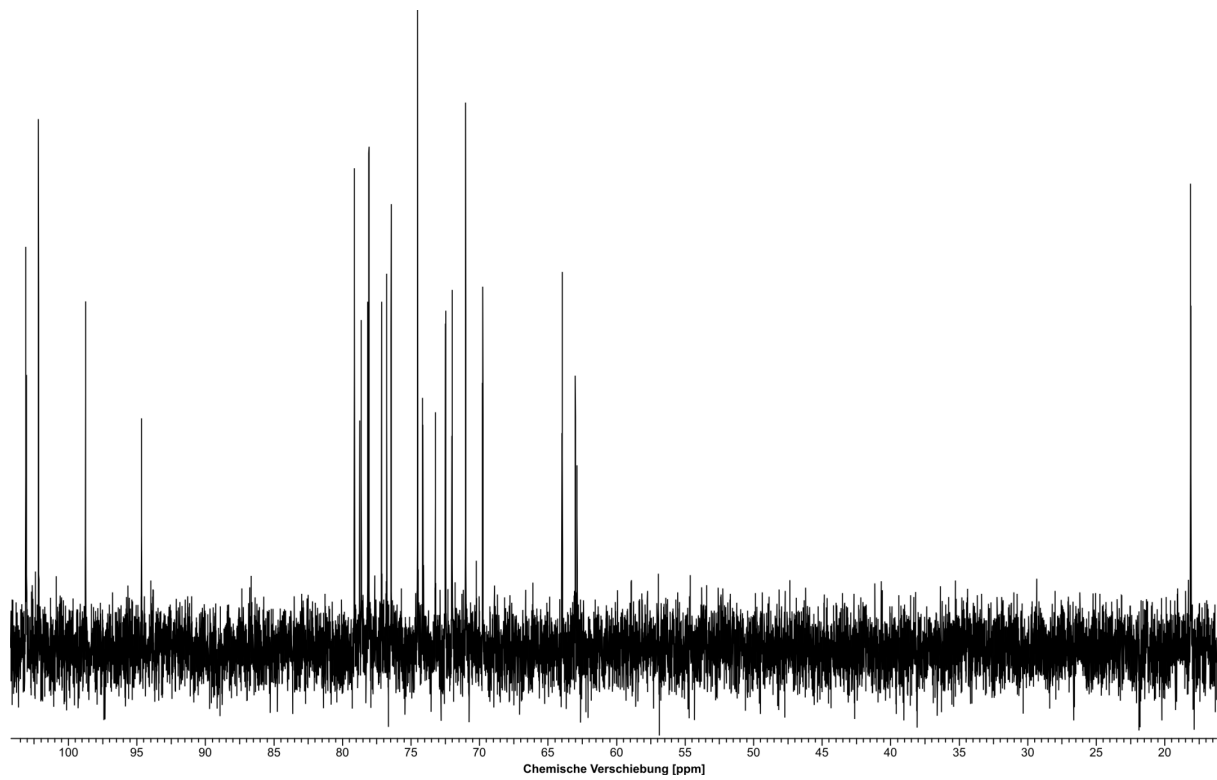


Abbildung A.3: ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) der synthetisierten 2'-Fucosyllactose. Aufgenommen in D_2O . Zugegebenes TMS diente als Referenz ($\delta = 0$ ppm).

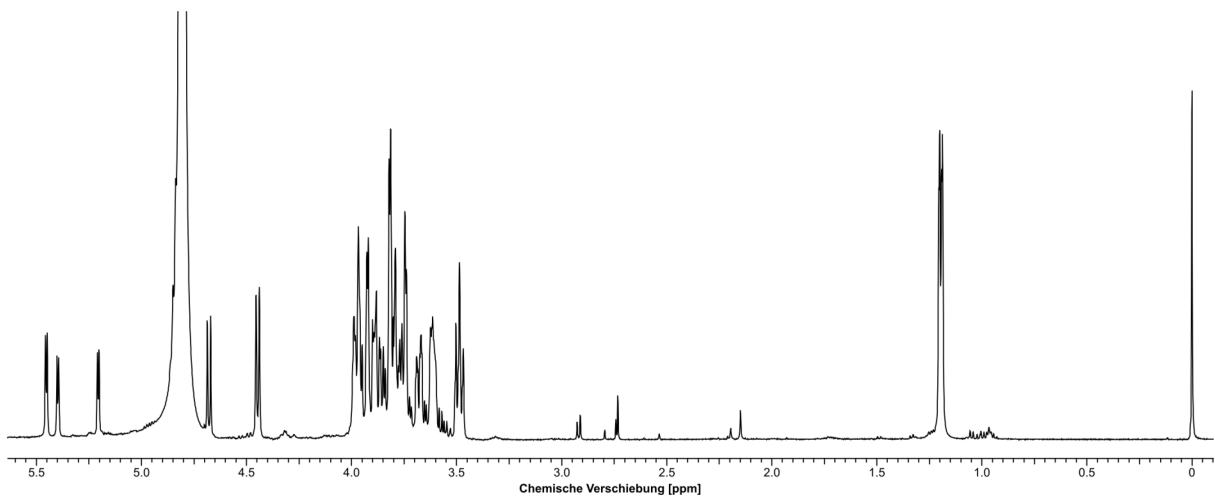
A.1.2. 3-Fucosyllactose (3-FL)

Abbildung A.4: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) der synthetisierten 3-Fucosyllactose. Aufgenommen in D_2O . Zugegebenes TMS diente als Referenz ($\delta = 0$ ppm).

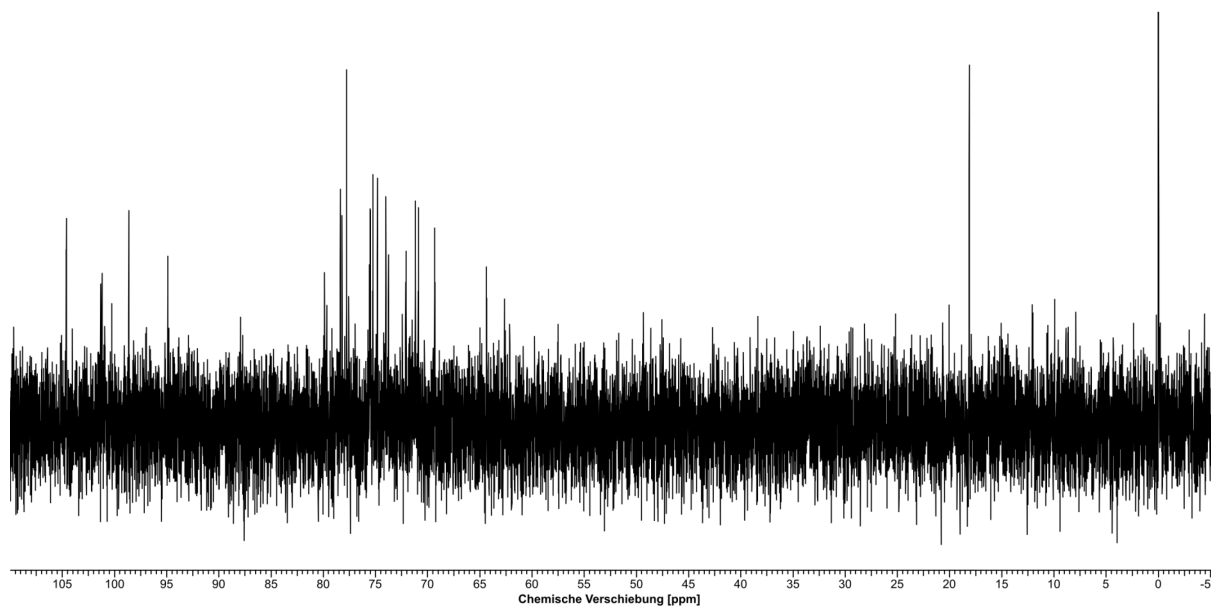


Abbildung A.5: ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) der synthetisierten 3-Fucosyllactose. Aufgenommen in D_2O . Zugegebenes TMS diente als Referenz ($\delta = 0$ ppm).

A.1.3. Lacto-N-triose II (LNT II)

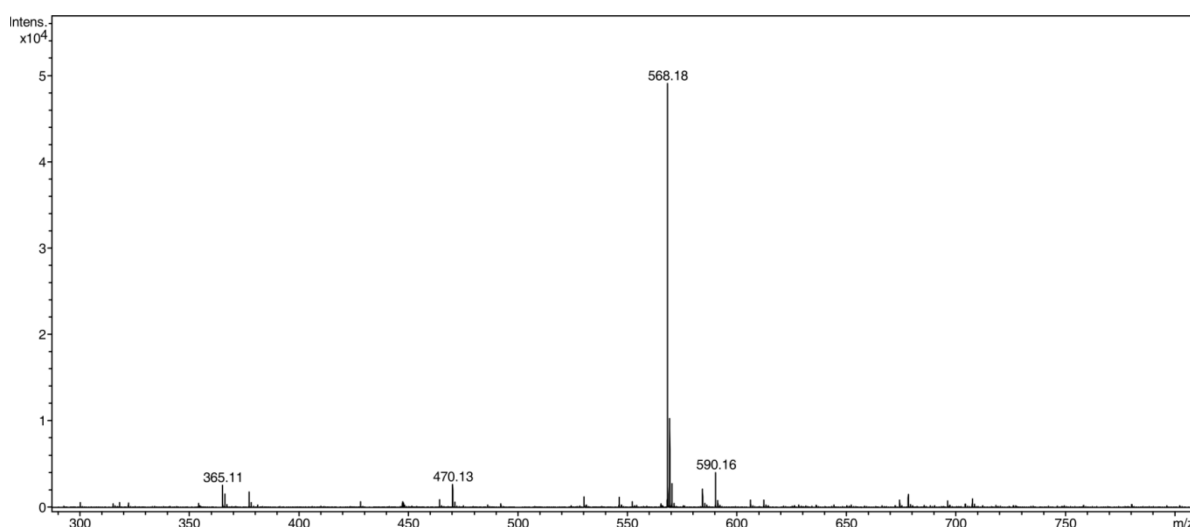


Abbildung A.6: ESI-Massenspektrum der synthetisierten und isolierten Lacto-N-triose II. Aufgenommen mit einem Bruker microTOF-Q System im positiven Messfeld. Stärkstes Signal entspricht der Masse des Na⁺-Addukts von LNT II (erwartet: m/z = 568,19). Weitere Massen entsprechen dem K⁺-Addukt von LNT II (erwartet: m/z = 590,17), sowie dem Na⁺-Addukt der Lactose (m/z = 365,11).

Tabelle A.1: ¹H-NMR Daten der synthetisierten Lacto-N-triose II.^[a]

| Glycosyl-Gruppe | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6 (1) | H-6 (2) |
|-------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---|------------------------------------|------------------------------------|
| Glc (α) | 5,14 d <i>J</i> = 4,0 | 3,50 dd <i>J</i> = 9,8; 3,7 | 3,75 dd <i>J</i> = 9,5; 9,5 | 3,56 dd <i>J</i> = 10,0; 9,5 | 3,87 ddd <i>J</i> = 9,8; 4,6; 2,4 | 3,75 dd <i>J</i> = 12,2; 4,6 | 3,80 dd <i>J</i> = 12,5; 1,5 |
| Glc (β) | 4,59 d <i>J</i> = 7,9 | 3,20 dd <i>J</i> = 9,5; 8,2 | 3,56 dd <i>J</i> = 9,5; 9,5 | 3,57 dd <i>J</i> = 10,0; 10,0 | 3,52 ddd <i>J</i> = 9,7; 5,0; 2,1 | 3,75 dd <i>J</i> = 12,2; 4,6 | 3,80 dd <i>J</i> = 12,0; 2,0 |
| β1,4Gal (α) | 4,36 d <i>J</i> = 7,9 | 3,52 dd <i>J</i> = 10,1; 7,9 | 3,65 dd <i>J</i> = 9,8; 2,4 | 4,07 bd <i>J</i> = 3,4 | 3,64 bdd <i>J</i> = 8,2; 4,1 | 3,65 dd <i>J</i> = 11,0; 4,2 | 3,71 dd <i>J</i> = 11,0; 9,0 |
| β1,4Gal (β) | | 3,51 dd <i>J</i> = 10,1; 7,9 | 3,64 dd <i>J</i> = 9,8; 3,1 | | | | |
| β1,3GlcNAc (α)^[b] | 4,61 d <i>J</i> = 8,6 | 3,67 dd <i>J</i> = 10,5; 8,5 | 3,49 dd <i>J</i> = 10,4; 8,3 | 3,39 dd <i>J</i> = 9,5; 9,5 | 3,36 ddd <i>J</i> = 9,8; 5,3; 2,0 | 3,68 dd <i>J</i> = 12,0; 5,0 | 3,82 dd <i>J</i> = 12,8; 2,4 |
| β1,3GlcNAc (β)^[b] | 4,60 d <i>J</i> = 8,5 | | | | | | |

^[a] Chemische Verschiebungen in ppm, gefolgt von der Multiplizität des Signals (d = Duplett, dd = Duplett eines Dupletts, ddd = Duplett eines Dupletts eines Dupletts, bd = Breites Duplett, bdd = Breites Duplett eines Dupletts) und den Kopplungskonstanten (*J*) in Hz. Daten zusammengetragen aus verschiedenen 1D- und 2D-NMR-Spektren, jeweils aufgenommen in D₂O (500 MHz / 125 MHz für ¹H- / ¹³C-Spektren). Das Signal des enthaltenen Wassers (δ = 4,7 ppm) wurde verwendet als Referenz. Ergebnisse bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2014).

^[b] Die Protonen des N-Acetylrests zeigten ein Singulett bei 1,92 ppm.

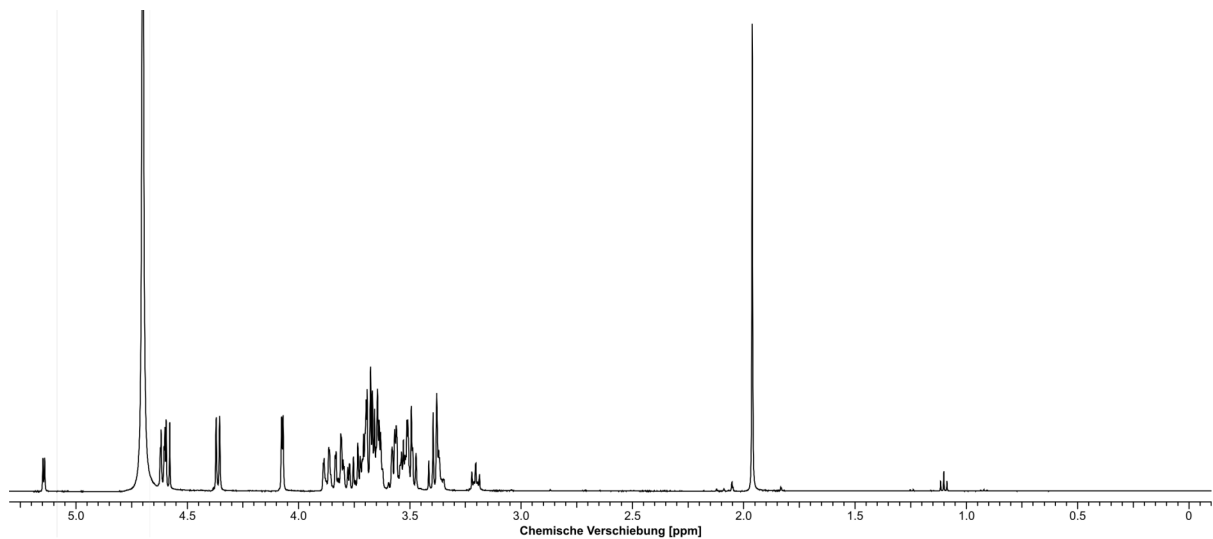


Abbildung A.7: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz) der synthetisierten Lacto-N-triose II. Aufgenommen in D₂O. Das Signal des verbleibenden H₂O diente als interne Referenz ($\delta = 4,7$ ppm).

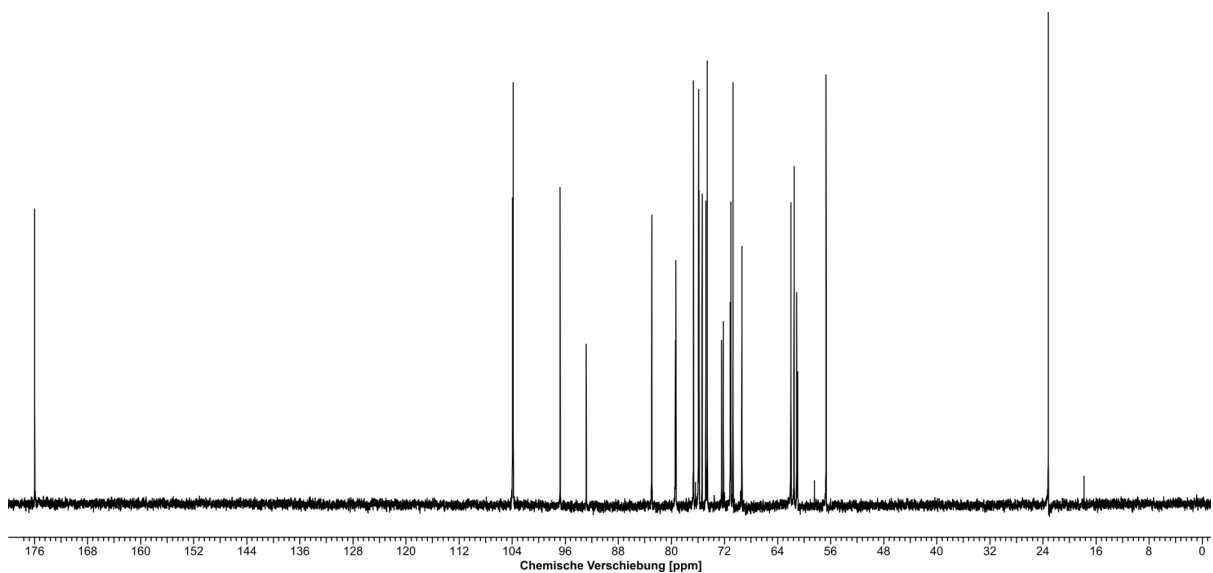


Abbildung A.8: ¹³C-NMR-Spektrum (125 MHz) der synthetisierten Lacto-N-triose II. Aufgenommen in D₂O. Später zugesetztes Methanol-d₄ diente als Referenz ($\delta = 49$ ppm).

A.1.4. Lacto-N-tetraose

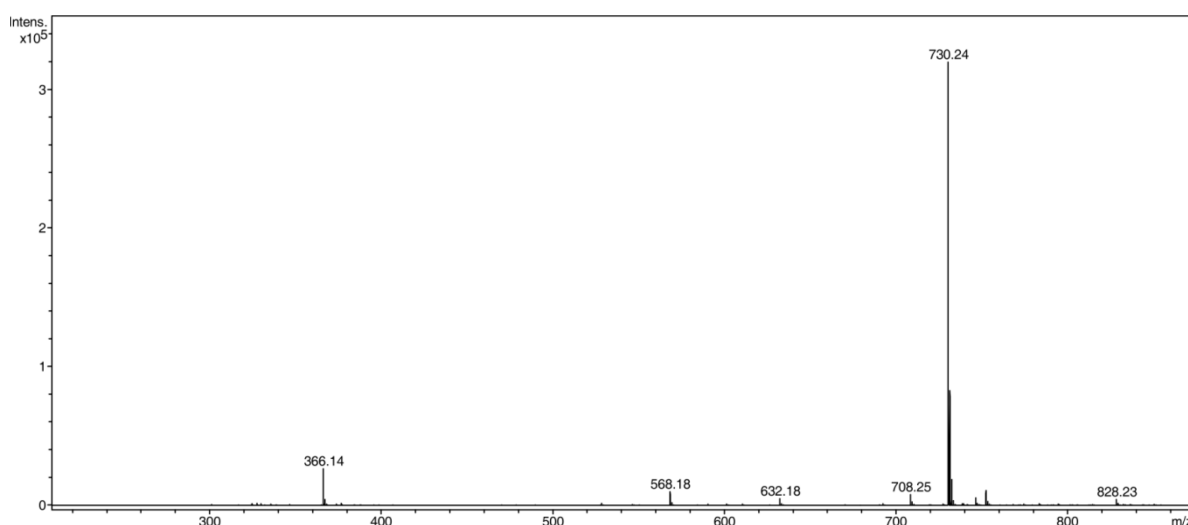


Abbildung A.9: ESI-Massenspektrum der synthetisierten und isolierten Lacto-N-tetraose. Aufgenommen mit einem Bruker microTOF-Q System im positiven Messfeld. Stärkstes Signal entspricht der Masse des Na⁺-Addukts von LNT (erwartet: m/z = 730,24). Weitere Massen entsprechen dem Protonen-Addukt von LNT (m/z = 708,25) und dem Na⁺-Addukt von LNT II (erwartet: m/z = 568,19). Ergebnisse bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2014).

Tabelle A.2: ¹H-NMR Daten der synthetisierten Lacto-N-tetraose.^[a]

| Glycosyl-Gruppe | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6 (1) | H-6 (2) |
|---------------------------------|--------------------------|------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|---------------------------------|---------------------------------|
| Glc (α) | 5,14 d <i>J</i> = 3,7 | 3,50 dd <i>J</i> = 5,0; 9,9 | 3,75 dd <i>J</i> = 9,1; 9,1 | 3,56 dd <i>J</i> = 9,1; 9,1 | 3,87 ddd <i>J</i> = 10,0; 4,0; 3,0 | 3,81 dd <i>J</i> = 11,6; 2,3 | 3,75 dd <i>J</i> = 12,0; 4,5 |
| Glc (β) | 4,59 d <i>J</i> = 7,3 | 3,20 dd <i>J</i> = 8,5; 8,0 | 3,56 dd <i>J</i> = 9,1; 9,1 | 3,57 dd <i>J</i> = 9,8; 9,8 | 3,52 ddd <i>J</i> = 9,1; 5,0; 2,5 | 3,87 dd <i>J</i> = 12,4; 2,5 | 3,71 dd <i>J</i> = 12,0; 4,6 |
| β1,4Gal (α) | | 3,53 dd <i>J</i> = 10,5; 8,5 | 3,663 dd <i>J</i> = 9,9; 2,5 | | 3,63 bdd <i>J</i> = 7,8; 5,0 | 3,72 dd <i>J</i> = 10,8; 9,1 | 3,67 dd <i>J</i> = 11,6; 4,2 |
| β1,4Gal (β) | 4,36 d <i>J</i> = 8,1 | 3,52 dd <i>J</i> = 11,0; 8,0 | 3,658 dd <i>J</i> = 9,9; 2,5 | 4,08 bd <i>J</i> = 3,75 | | | |
| β1,3GlcNAc^[b] | 4,66 d <i>J</i> = 8,3 | 3,82 dd <i>J</i> = 10,3; 8,8 | 3,74 dd <i>J</i> = 9,1; 9,1 | 3,49 dd <i>J</i> = 10,0; 9,1 | 3,40 bdd <i>J</i> = 10,8; 4,6 | 3,85 dd <i>J</i> = 12,0; 5,4 | 3,97 bd <i>J</i> = 11,6 |
| β1,3Gal | 4,36 d <i>J</i> = 8,1 | 3,45 dd <i>J</i> = 9,9; 8,3 | 3,57 dd <i>J</i> = 10,0; 3,3 | 3,84 bd <i>J</i> = 3,7 | 3,63 bdd <i>J</i> = 8,3; 4,1 | 3,70 dd <i>J</i> = 11,7; 8,7 | 3,67 dd <i>J</i> = 12,4; 4,9 |

^[a] Chemische Verschiebungen in ppm, gefolgt von der Multiplizität des Signals (d = Duplett, dd = Duplett eines Dupletts, ddd = Duplett eines Dupletts eines Dupletts, bd = Breites Duplett, bdd = Breites Duplett eines Dupletts) und den Kopplungskonstanten (*J*) in Hz. Daten zusammengetragen aus verschiedenen 1D- und 2D-NMR-Spektren, jeweils aufgenommen in D₂O (500 MHz / 125 MHz für ¹H- / ¹³C-Spektren). Das Signal des enthaltenen Wassers (δ = 4,7 ppm) wurde verwendet als Referenz. Ergebnisse bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2014).

^[b] Die Protonen des N-Acetylrests zeigten ein Singulett bei 1,95 ppm.

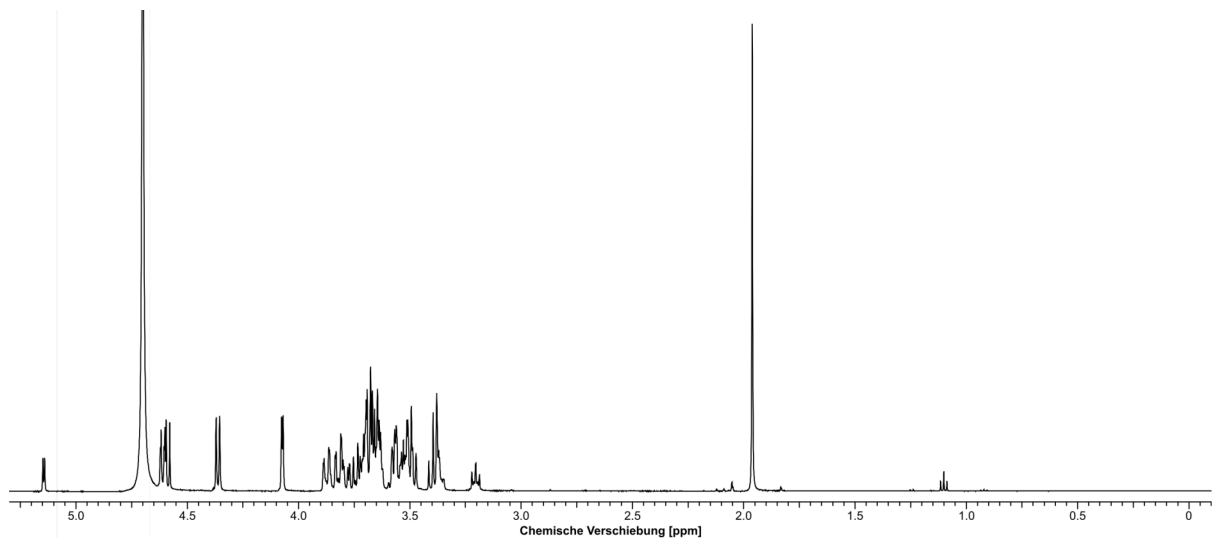


Abbildung A.10: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz) der synthetisierten Lacto-N-tetraose. Aufgenommen in D₂O. Das Signal des verbleibenden H₂O diente als interne Referenz ($\delta = 4,7$ ppm). Ergebnisse bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2014).

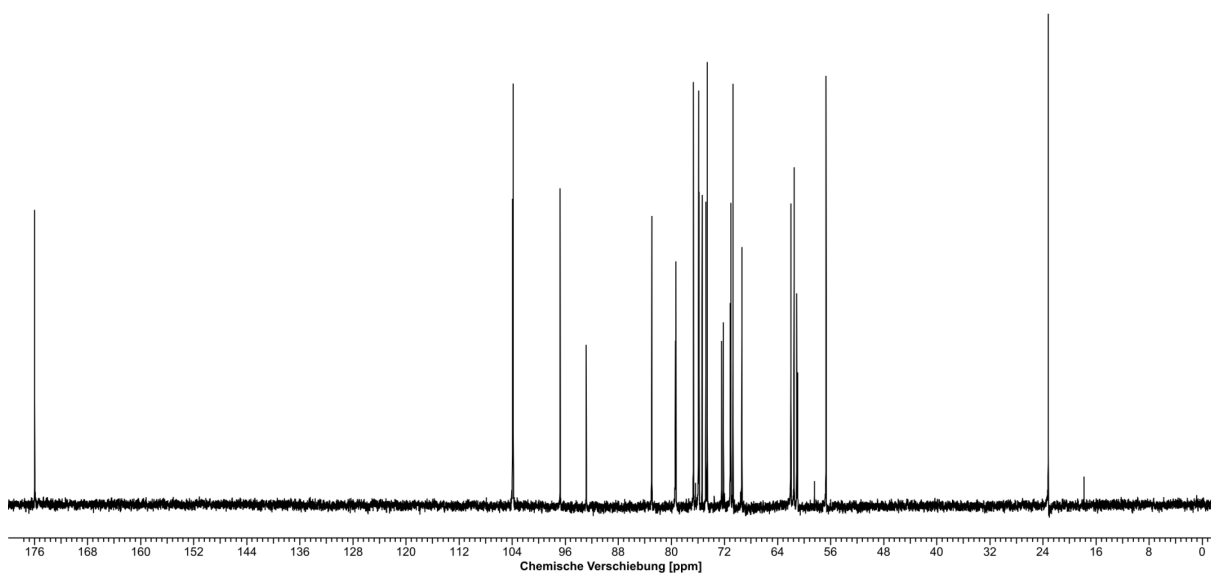


Abbildung A.11: ¹³C-NMR-Spektrum (125 MHz) der synthetisierten Lacto-N-tetraose. Aufgenommen in D₂O. Später zugesetztes Methanol-d₄ diente als Referenz ($\delta = 49$ ppm). Ergebnisse bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2014).

A.1.5. Lacto-N-neotetraose

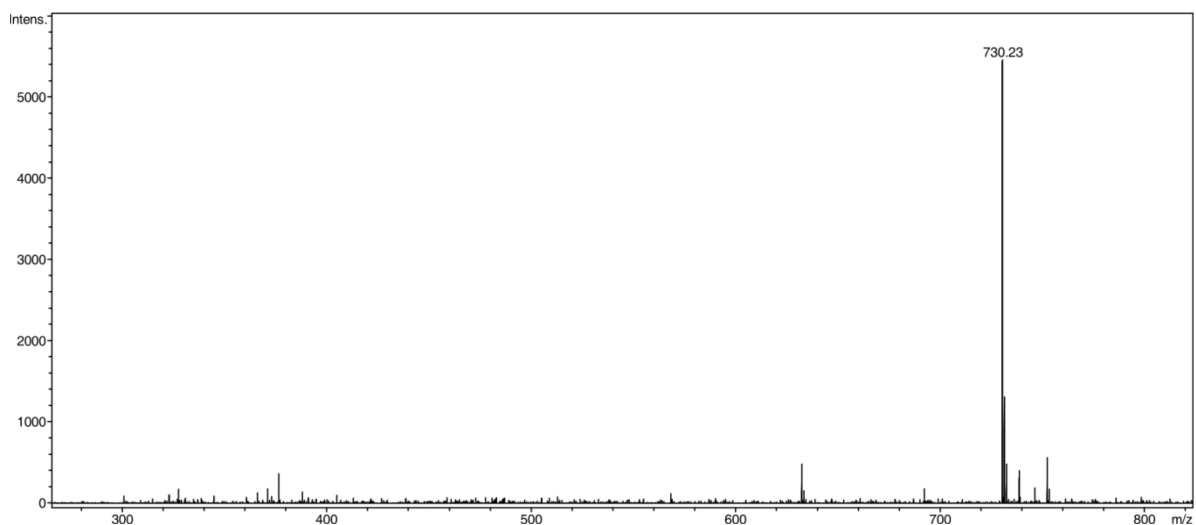


Abbildung A.12: ESI-Massenspektrum der synthetisierten und isolierten Lacto-N-neotetraose. Aufgenommen mit einem Bruker microTOF-Q System im positiven Messfeld. Stärkstes Signal entspricht der Masse des Na⁺-Addukts von LNNt (erwartet: m/z = 730,24).

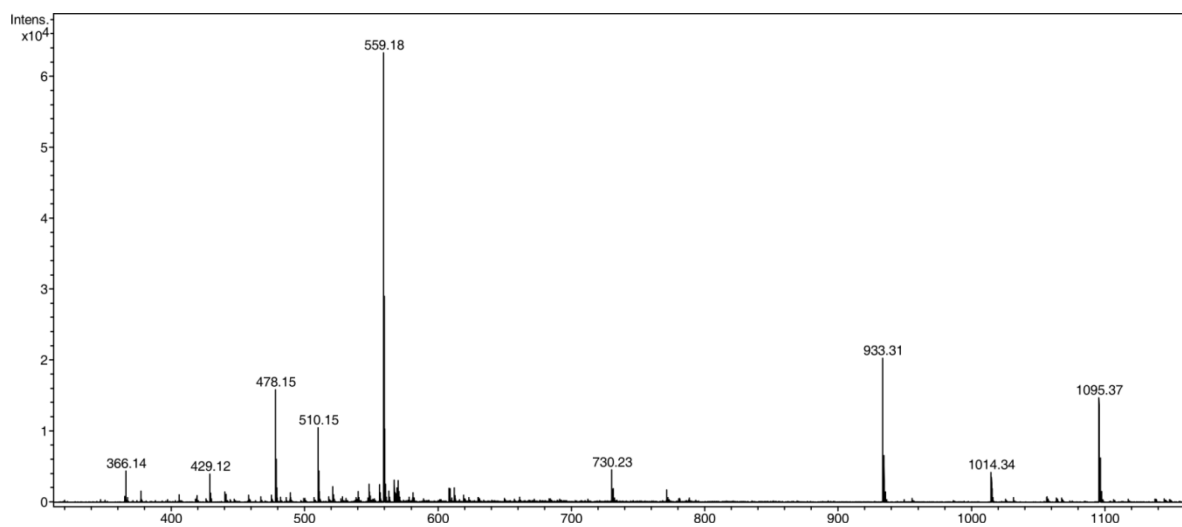


Abbildung A.13: ESI-Massenspektrum der bei der LNNt-Reinigung aufgefangenen Nebenprodukt-Fraktion. Aufgenommen mit einem Bruker microTOF-Q System im positiven Messfeld. Die Signale entsprechen den Massen der 2Na⁺-Addukte einer Lacto-N-pentaose (z.B. GlcNAc-LNNt, erwartet: m/z = 478,16) und einer Lacto-N-hexaose (m/z = 559,18) sowie der Na⁺-Addukte von LNNt (m/z = 730,24) einer Lacto-N-pentaose (erwartet: m/z = 933,32) und Lacto-N-hexaose (m/z = 1095,37).

Tabelle A.3: $^1\text{H-NMR}$ Daten der synthetisierten Lacto-N-neotetraose.^[a]

| Glycosyl-Gruppe | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6 (1) | H-6 (2) |
|--|---------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------------|-----------------------|----------------------------|
| Glc (α) | 5,14 d $J = 3,7$ | 3,49 dd $J = 9,9; 3,6$ | 3,75 dd $J = 9,4; 9,4$ | 3,56 dd $J = 9,9; 9,9$ | 3,86 ddd $J = 9,9; 3,5; 2,5$ | ov; etwa 3,80 | ov; etwa 3,75 |
| Glc (β) | 4,58 d $J = 8,1$ | 3,20 dd $J = 8,8; 8,8$ | 3,55 dd $J = 9,0; 9,0$ | 3,56 ov; m | 3,51 ov; m | 3,86 bd $J = 11,7$ | 3,71 dd $J = 12,6; 4,5$ |
| β1,4 Gal (α) | | | 3,64 dd $J = 9,9; 2,7$ | 4,07 bd $J = 2,9$ | 3,62 ov; m | ov; etwa 3,70 | |
| β1,4Gal (β) | 4,35 d $J = 8,1$ | 3,50 bdd $J = 8,7; 8,7$ | 3,63 dd $J = 9,9; 2,7$ | | | | |
| β1,3GlcNAc^[b] | 4,62 d $J = 8,1$ | 3,72 dd $J = 9,9; 9,9$ | 3,65 ov | 3,66 ov | 3,50 ov; m | 3,87 bd $J = 11,7$ | 3,76 dd $J = 12,5; 4,5$ |
| β1,4Gal (terminal) | 4,39 d $J = 7,3$ | 3,46 dd $J = 9,0; 9,0$ | 3,58 bd $J = 9,9$ | 3,84 ov; m | 3,64 ov; m | ov; etwa 3,67 | |

^[a] Chemische Verschiebungen in ppm, gefolgt von der Multiplizität des Signals (d = Duplett, dd = Duplett eines Dupletts, ddd = Duplett eines Dupletts eines Dupletts, bd = Breites Duplett, bdd = Breites Duplett eines Dupletts, m = Multipllett, ov = Signal überlagert) und den Kopplungskonstanten (J) in Hz. Daten zusammengetragen aus verschiedenen 1D- und 2D-NMR-Spektren, jeweils aufgenommen in D_2O (500 MHz / 125 MHz für ^1H - / ^{13}C -Spektren). Das Signal des enthaltenen Wassers ($\delta = 4,7$ ppm) wurde verwendet als Referenz.

^[b] Die Protonen des N-Acetylrests zeigten ein Singulett bei 1,95 ppm.

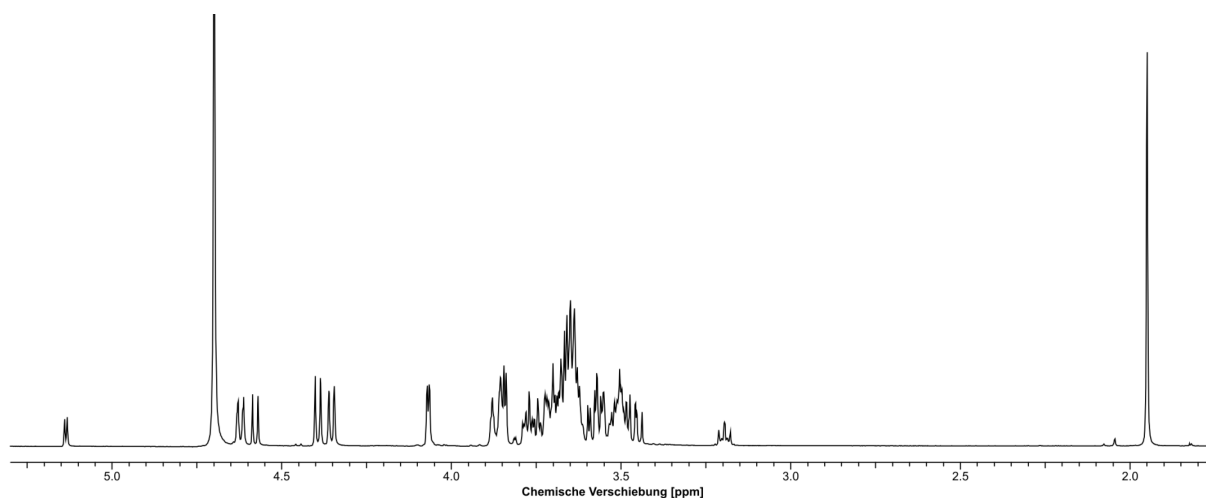


Abbildung A.14: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz) der synthetisierten Lacto-N-neotetraose. Aufgenommen in D_2O . Das Signal des verbleibenden H_2O diente als interne Referenz ($\delta = 4,7$ ppm).

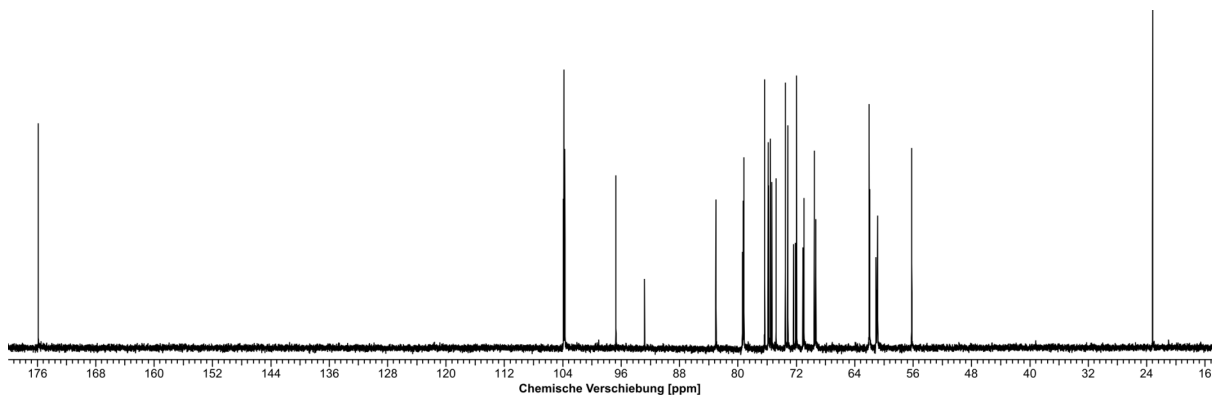


Abbildung A.15: ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) der synthetisierten Lacto-N-neotetraose. Aufgenommen in D_2O . Später zugesetztes Methanol- d_4 diente als Referenz ($\delta = 49$ ppm).

A.1.6. Lacto-N-fucopentaose I (LNFP I)

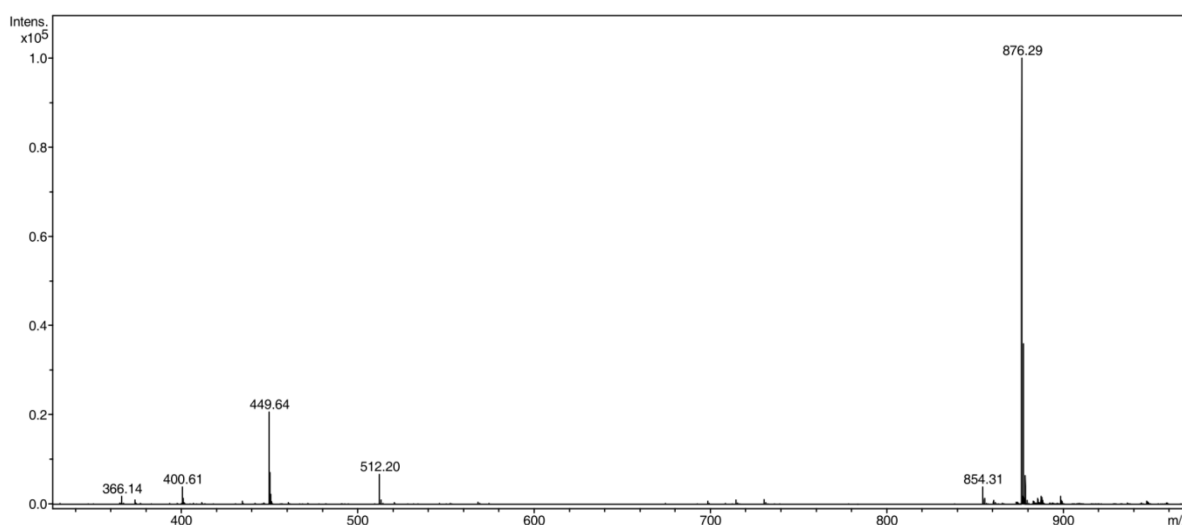


Abbildung A.16: ESI-Massenspektrum der synthetisierten und isolierten Lacto-N-fucopentaose I. Aufgenommen mit einem Bruker microTOF-Q System im positiven Messfeld. Die dominantesten Signale entsprechen den Massen des 2Na^+ -Addukts von LNFP I (erwartet: $m/z = 449,65$) sowie des Na^+ -Addukts von LNFP I (erwartet: $m/z = 876,30$). Außerdem zu erkennen ist das Signal des Protonen-Addukts von LNFP I (erwartet: $m/z = 854,32$). Ergebnisse bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2015a).

Tabelle A.4: ^1H -NMR Daten der synthetisierten Lacto-N-fucopentaose I.^[a]

| Glycosyl-Gruppe | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6 (1) | H-6 (2) |
|--|---------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Glc (α) | 5,14 d $J = 3,7$ | 3,50 dd $J = 9,9; 3,7$ | 3,75 dd $J = 9,3; 9,3$ | 3,56 dd $J = 9,2; 9,2$ | 3,86 ddd $J = 10,0; 3,9; 2,3$ | ov; etwa 3,76 – 3,82 | |
| Glc (β) | 4,58 d $J = 8,1$ | 3,20 dd $J = 8,8; 8,8$ | 3,56 dd $J = 9,0; 9,0$ | 3,57 dd $J = 9,9; 9,6$ | 3,53 ov; m | 3,87 bd $J = 12,2$ | 3,71 dd $J = 12,3; 4,2$ |
| β1,4Gal (α) | 4,34 d $J = 8,1$ | 3,49 dd $J = 8,8; 8,8$ | 3,65 dd $J = 9,9; 2,2$ | 4,06 bd $J = 3,3$ | 3,63 bdd $J = 8,1; 4,4$ | ov; etwa 3,64 – 3,73 | |
| β1,4Gal (β) | | 3,49 dd $J = 9,5; 8,2$ | 3,64 dd $J = 9,9; 2,9$ | | | | |
| β1,3GlcNAc (α)^[b] | 4,55 d $J = 8,1$ | 3,73 dd $J = 10,3; 8,8$ | 3,91 dd $J = 10,6; 8,4$ | 3,45 dd $J = 9,5; 9,5$ | 3,40 ddd $J = 9,9; 4,8; 2,2$ | 3,82 bd $J = 12,1$ | 3,72 dd $J = 12,5; 4,4$ |
| β1,3GlcNAc (β)^[b] | 4,54 d $J = 8,1$ | | | | | | |
| β1,3Gal | 4,57 d $J = 7,7$ | 3,51 dd $J = 8,4; 8,4$ | 3,75 dd $J = 9,9; 3,3$ | 3,76 bd $J = 3,3$ | 3,61 bdd $J = 8,8; 3,7$ | 3,72 dd $J = 11,0; 8,1$ | 3,66 dd $J = 11,0; 2,9$ |
| α1,2Fuc | 5,11 d $J = 4,4$ | 3,69 dd $J = 10,3; 4,0$ | 3,58 dd $J = 10,3; 3,3$ | 3,66 bd $J = 2,2$ | 4,21 q $J = 6,6; 6,6; 6,6$ | 1,15 d $J = 6,6$ | |

^[a] Chemische Verschiebungen in ppm, gefolgt von der Multiplizität des Signals (d = Duplett, dd = Duplett eines Dupletts, ddd = Duplett eines Dupletts eines Dupletts, bd = Breites Duplett, bdd = Breites Duplett eines Dupletts, q = Quadruplett, m = Multiplett, ov = Signal überlagert) und den Kopplungskonstanten (J) in Hz. Daten zusammengetragen aus verschiedenen 1D- und 2D-NMR-Spektren, jeweils aufgenommen in D_2O (500 MHz / 125 MHz für ^1H - / ^{13}C -Spektren). Das Signal des enthaltenen Wassers ($\delta = 4,7$ ppm) wurde verwendet als Referenz. Ergebnisse bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2015a).

^[b] Die Protonen des N-Acetylrests zeigten ein Singulett bei 1,98 ppm.

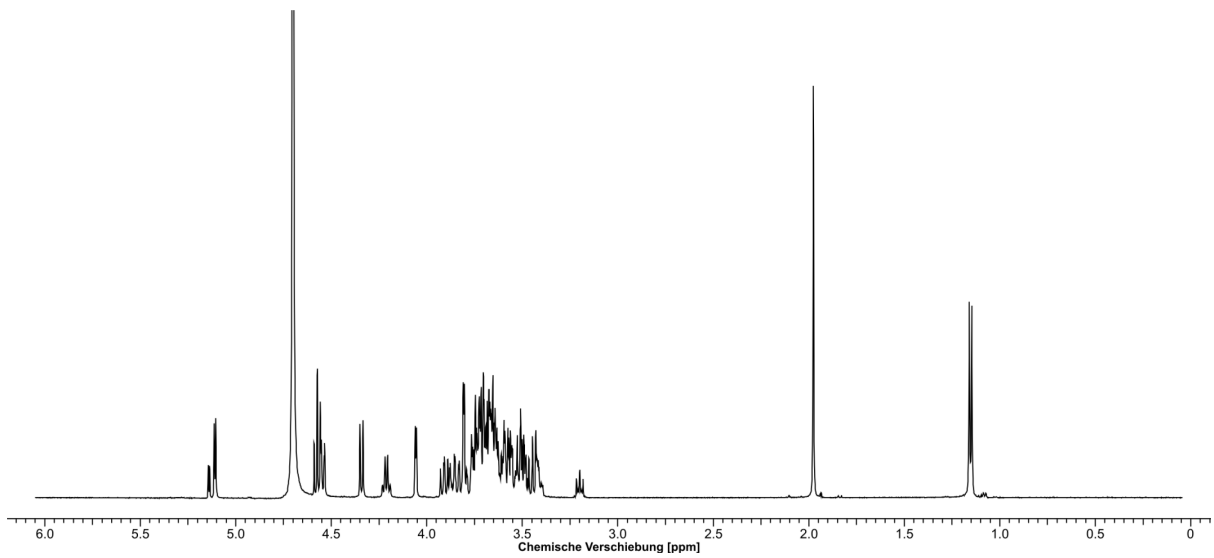


Abbildung A.17: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz) der synthetisierten Lacto-N-fucopentaose I. Aufgenommen in D₂O. Das Signal des verbleibenden H₂O diente als interne Referenz ($\delta = 4,7$ ppm). Ergebnisse bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2015a).

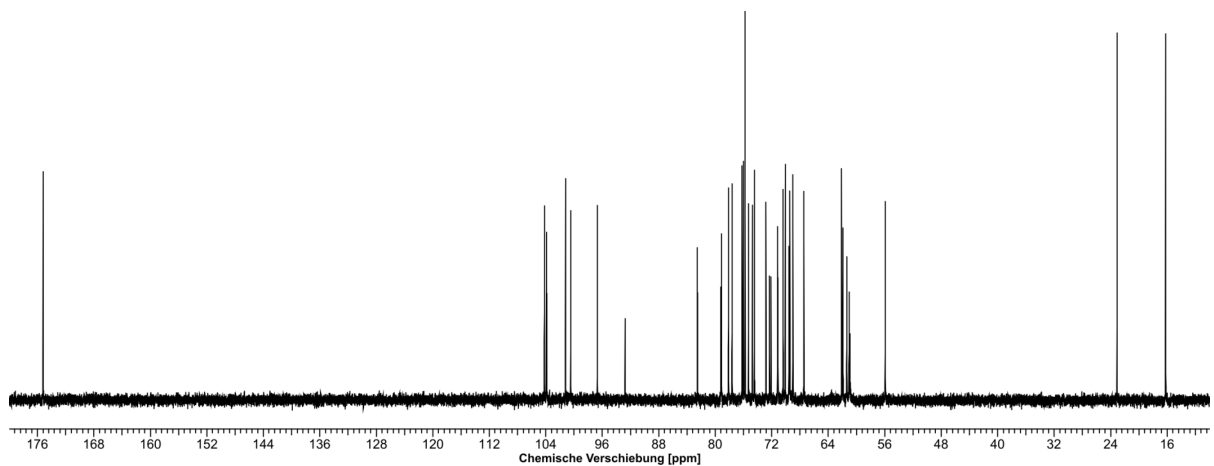


Abbildung A.18: ¹³C-NMR-Spektrum (125 MHz) der synthetisierten Lacto-N-fucopentaose I. Aufgenommen in D₂O. Später zugesetztes Methanol-d₄ diente als Referenz ($\delta = 49$ ppm). Ergebnisse bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2015a).

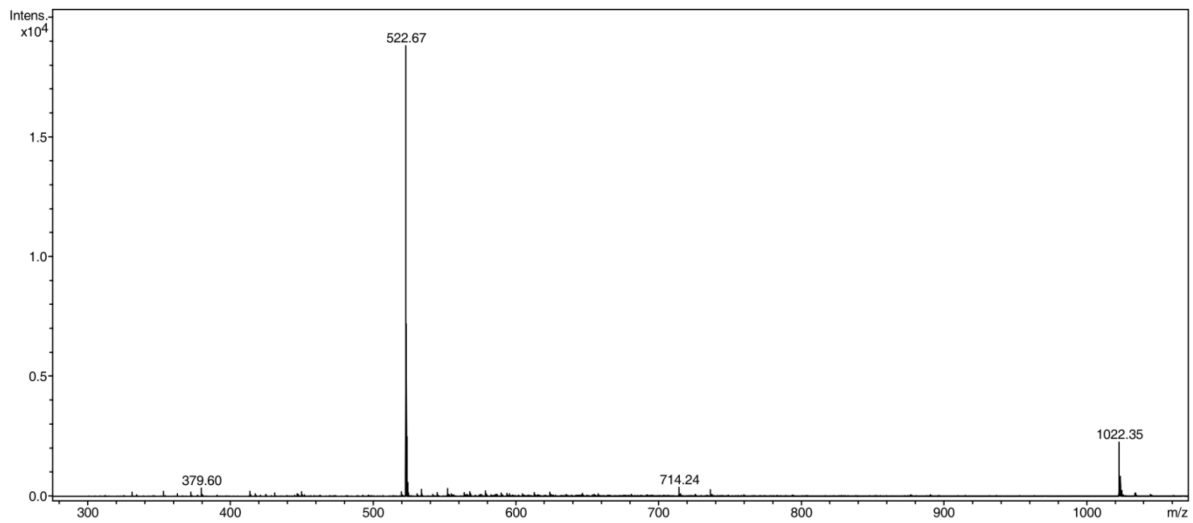
A.1.7. Lacto-N-difucohexaose II (LNDFH II)

Abbildung A.19: ESI-Massenspektrum der synthetisierten und isolierten Lacto-N-difucohexaose II. Aufgenommen mit einem Bruker microTOF-Q System im positiven Messfeld. Die dominantesten Signale entsprechen den Massen des 2Na^+ -Addukts von LNDFH II ($m/z = 522,67$) sowie des Na^+ -Addukts von LNDFH II ($m/z = 1022,35$). Außerdem zu erkennen ist das Signal des Na^+ -Addukts von fucosylierter Lacto-N-triose II ($m/z = 714,24$). Ergebnisse bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2015a).

Tabelle A.5: ¹H-NMR Daten der synthetisierten Lacto-N-difucohexaose II.^[a]

| Glycosyl-Gruppe | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6 (1) | H-6 (2) |
|-----------------------|--------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| Glc (α) | 5,07 d <i>J</i> = 3,9 | 3,65 dd <i>J</i> = 9,6; 3,2 | 3,83 dd <i>J</i> = 9,8; 9,5 | 3,75 dd <i>J</i> = 9,6; 9,6 | 3,85 bd <i>J</i> = 10,1 | ov; etwa 3,75 – 3,79 | |
| Glc (β) | 4,54 d <i>J</i> = 7,8 | 3,35 dd <i>J</i> = 8,5; 8,5 | 3,66 dd <i>J</i> = 9,3; 9,3 | 3,76 dd <i>J</i> = 9,1; 9,1 | 3,47 ov; m | 3,85 bd <i>J</i> = 11,7 | 3,71 dd <i>J</i> = 12,3; 4,3 |
| α1,3Fuc (α) | 5,26 d <i>J</i> = 3,9 | 3,68 dd <i>J</i> = 10,4; 4,0 | 3,84 dd <i>J</i> = 10,4; 3,0 | 3,68 ov; m 4,70 ov; m | | ov; etwa 1,06 | |
| α1,3Fuc (β) | 5,32 d <i>J</i> = 3,9 | 3,68 dd <i>J</i> = 10,1; 3,7 | 3,84 dd <i>J</i> = 10,5; 3,1 | | | 1,05 d <i>J</i> = 6,8 | |
| β1,4Gal (α) | 4,31 d <i>J</i> = 7,8 | 3,40 dd <i>J</i> = 8,5; 8,5 | 3,59 bd <i>J</i> = 10,1 | 3,98 bd <i>J</i> = 3,4 | 3,47 ov; m | ov; etwa 3,58 – 3,68 | |
| β1,4Gal (β) | | 3,39 dd <i>J</i> = 8,7; 8,7 | | | | | |
| β1,3GlcNAc (α) | 4,59 d <i>J</i> = 8,3 | 3,85 dd <i>J</i> = 9,6; 9,6 | 3,97 dd <i>J</i> = 10,1; 10,1 | 3,66 dd <i>J</i> = 9,1; 9,1 | 3,43 bd <i>J</i> = 9,1 | 3,85 bd <i>J</i> = 12,3 | 3,78 dd <i>J</i> = 12,1; 3,2 |
| β1,3GlcNAc (β) | 4,59 d <i>J</i> = 8,3 | | | | | | |
| β1,3Gal | 4,40 d <i>J</i> = 7,8 | 3,38 dd <i>J</i> = 8,5; 8,5 | 3,51 dd <i>J</i> = 9,6; 3,7 | 3,77 m | 3,46 ov; m | ov; etwa 3,62 | |
| α1,4Fuc | 4,92 d <i>J</i> = 3,9 | 3,69 dd <i>J</i> = 10,1; 3,7 | 3,78 dd <i>J</i> = 10,1; 3,2 | 3,68 bd <i>J</i> = 2,6 | 4,77 q <i>J</i> = 6,7; 6,7; 6,7 | 1,07 d <i>J</i> = 6,8 | |

^[a] Chemische Verschiebungen in ppm, gefolgt von der Multiplizität des Signals (d = Duplett, dd = Duplett eines Dupletts, ddd = Duplett eines Dupletts eines Dupletts, bd = Breites Duplett, q = Quadruplett, m = Multipllett, ov = Signal überlagert) und den Kopplungskonstanten (*J*) in Hz. Daten zusammengetragen aus verschiedenen 1D- und 2D-NMR-Spektren, jeweils aufgenommen in D₂O (500 MHz / 125 MHz für ¹H- / ¹³C-Spektren). Das Signal des enthaltenen Wassers ($\delta = 4,7$ ppm) wurde verwendet als Referenz. Ergebnisse bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2015a).

^[b] Die Protonen des N-Acetylrests zeigten ein Singulett bei 1,92 ppm.

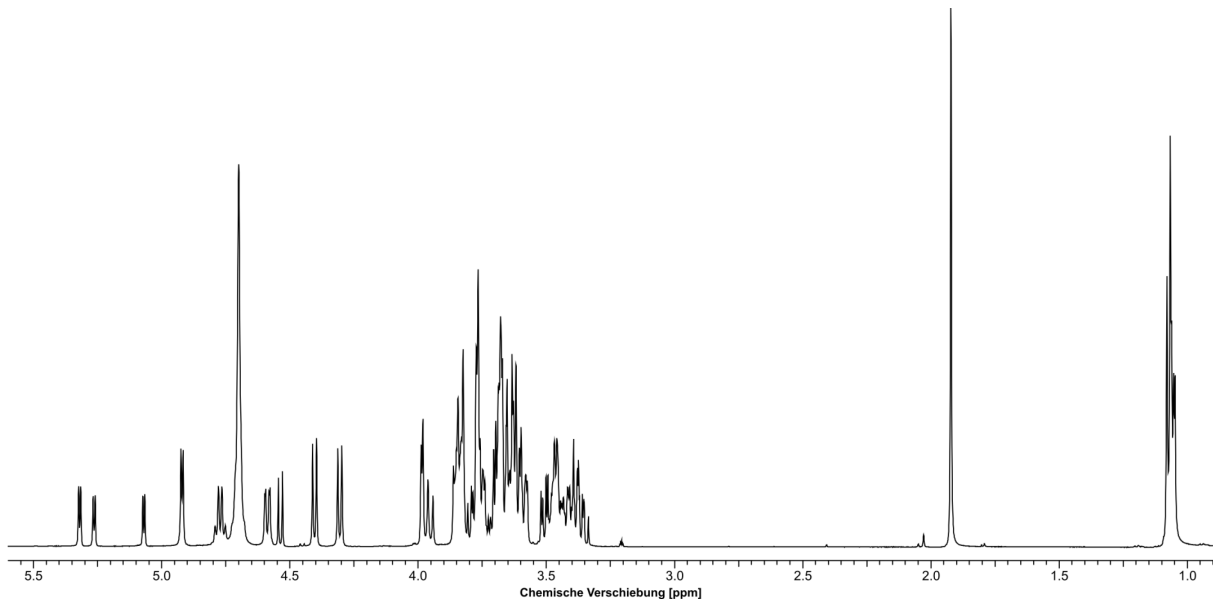


Abbildung A.20: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz) der synthetisierten Lacto-N-difucohexaose II. Aufgenommen in D₂O. Das Signal des verbleibenden H₂O diente als interne Referenz ($\delta = 4,7$ ppm). Ergebnisse bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2015a).

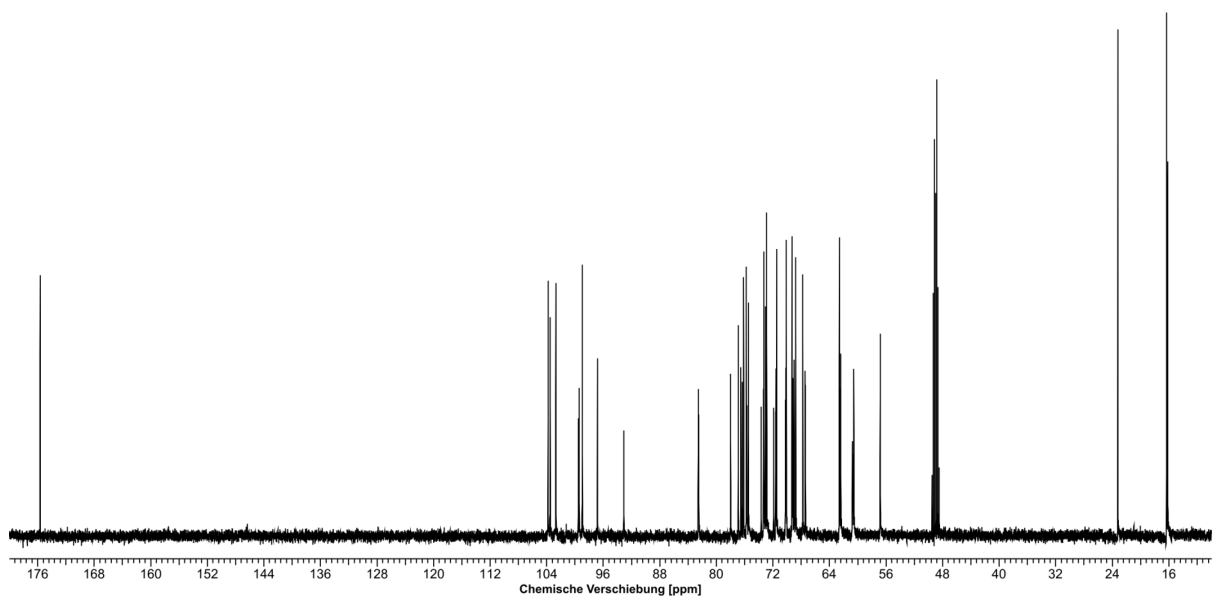


Abbildung A.21: ¹³C-NMR-Spektrum (125 MHz) der synthetisierten Lacto-N-difucohexaose II. Aufgenommen in D₂O. Zugegebenes Methanol-d₄ diente als Referenz ($\delta = 49$ ppm). Ergebnisse bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2015a).

A.1.8. Fucosylierte Lacto-N-triose II

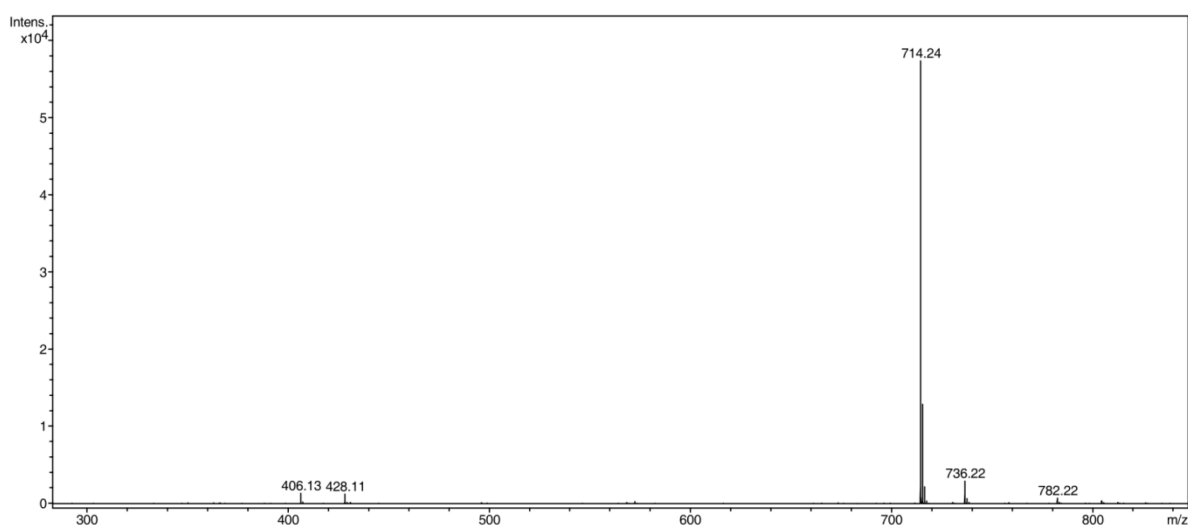


Abbildung A.22: ESI-Massenspektrum der synthetisierten und isolierten fucosylierten Lacto-N-triose II. Aufgenommen mit einem Bruker microTOF-Q System im positiven Messfeld. Das dominanteste Signal entspricht der Masse des Na⁺-Addukts fucosylierter LNT II ($m/z = 714,24$). Außerdem der fucosylierten LNT II zuzuordnen ist $m/z = 736,22$ als das Addukt [Fuc. LNT II + 2 Na-H]⁺. Das Signal bei $m/z = 428,11$ entspricht dem Addukt [LacNAc + 2 Na-H]⁺. Ergebnisse bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2015a).

Tabelle A.6: ¹³C-NMR Daten der synthetisierten fucosylierten Lacto-N-triose II.^[a]

| Glycosyl-Gruppe | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 | CO des NAc | CH ₃ des NAc |
|--------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|------------|-------------------------|
| Glc (α) | 93,08 | 73,65 | 75,66 | 73,25 | 71,89 | 60,69 | | |
| Glc (β) | 96,80 | 76,51 | 77,98 | 73,34 | 76,32 | 60,76 | | |
| α1,3Fuc (α) | 99,50 | 69,01 | 70,23 | 72,89 | 67,39 | | | |
| α1,3Fuc (β) | 99,40 | 68,98 | 70,18 | 72,87 | 67,43 | 16,18 | | |
| β1,4Gal (α) | | 71,67 | 82,35 | 69,24 | | | | |
| β1,4Gal (β) | 102,68 | 71,63 | 82,42 | 69,21 | 75,45 | 62,44 | | |
| β1,3GlcNAc | 103,73 | 56,58 | 74,47 | 70,67 | 76,58 | 61,44 | 175,81 | 23,10 |

^[a] ¹³C-NMR-Spektrum (125 MHz) aufgenommen in D₂O. Chemische Verschiebungen in ppm. Methanol-d₄ (δ = 49 ppm) wurde als interner Standard verwendet. Ergebnisse bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2015a).

Tabelle A.7: ¹H-NMR Daten der synthetisierten fucosylierten Lacto-N-triose II.^[a]

| Glycosyl-Rest | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6 (1) | H-6 (2) |
|----------------|--------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| Glc (α) | 5,08 d <i>J</i> = 4,0 | 3,66 dd <i>J</i> = 9,7; 3,6 | 3,83 dd <i>J</i> = 9,7; 9,7 | 3,76 dd <i>J</i> = 10,2; 10,2 | 3,85 bd <i>J</i> = 10,8 | ov; etwa 3,75 – 3,79 | |
| Glc (β) | 4,55 d <i>J</i> = 8,2 | 3,36 dd <i>J</i> = 8,7; 8,7 | 3,67 dd <i>J</i> = 9,5; 9,5 | 3,77 dd <i>J</i> = 9,5; 9,5 | 3,48 bdd <i>J</i> = 10,7; 2,6 | 3,86 bd <i>J</i> = 12,5 | 3,71 dd <i>J</i> = 12,5; 5,0 |
| α1,3Fuc (α) | 5,27 d <i>J</i> = 4,1 | 3,70 dd <i>J</i> = 10,2; 4,1 | 3,85 dd <i>J</i> = 10,5; 3,1 | 3,68 ov; m | 4,71 ov; m | 1,07 d <i>J</i> = 6,1 | |
| α1,3Fuc (β) | 5,33 d <i>J</i> = 4,1 | 3,69 dd <i>J</i> = 10,0; 3,3 | 3,85 dd <i>J</i> = 10,5; 3,2 | | | 1,06 d <i>J</i> = 6,6 | |
| β1,4Gal (α) | 4,32 d <i>J</i> = 7,7 | 3,41 dd <i>J</i> = 8,7; 8,7 | 3,61 dd <i>J</i> = 10,2; 3,0 | 3,99 bd <i>J</i> = 3,6 | 3,48 ov; m | ov; etwa 3,59 – 3,63 | |
| β1,4Gal (β) | | 3,40 dd <i>J</i> = 8,7; 8,7 | 3,60 dd <i>J</i> = 10,2; 3,1 | | | | |
| β1,3GlcNAc (α) | 4,59 d <i>J</i> = 8,5 | 3,65 dd <i>J</i> = 10,2; 8,7 | 3,46 dd <i>J</i> = 10,2; 8,7 | 3,37 dd <i>J</i> = 9,7; 8,2 | 3,34 ov; m | 3,80 bd <i>J</i> = 10,7 | 3,66 dd <i>J</i> = 12,0; 4,3 |
| β1,3GlcNAc (β) | 4,58 d <i>J</i> = 8,7 | | | | | | |

^[a] Chemische Verschiebungen in ppm, gefolgt von der Multiplizität des Signals (d = Duplett, dd = Duplett eines Dupletts, bd = Breites Duplett, bdd = Breites Duplett eines Dupletts, q = Quadruplett, m = Multipllett, ov = Signal überlagert) und den Kopplungskonstanten (*J*) in Hz. Daten zusammengetragen aus verschiedenen 1D- und 2D-NMR-Spektren, jeweils aufgenommen in D₂O (500 MHz / 125 MHz für ¹H- / ¹³C-Spektren). Das Signal des enthaltenen Wassers ($\delta = 4,7$ ppm) wurde verwendet als Referenz. Ergebnisse bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2015a).

^[b] Die Protonen des N-Acetylrests zeigten ein Singulett bei 1,93 ppm.

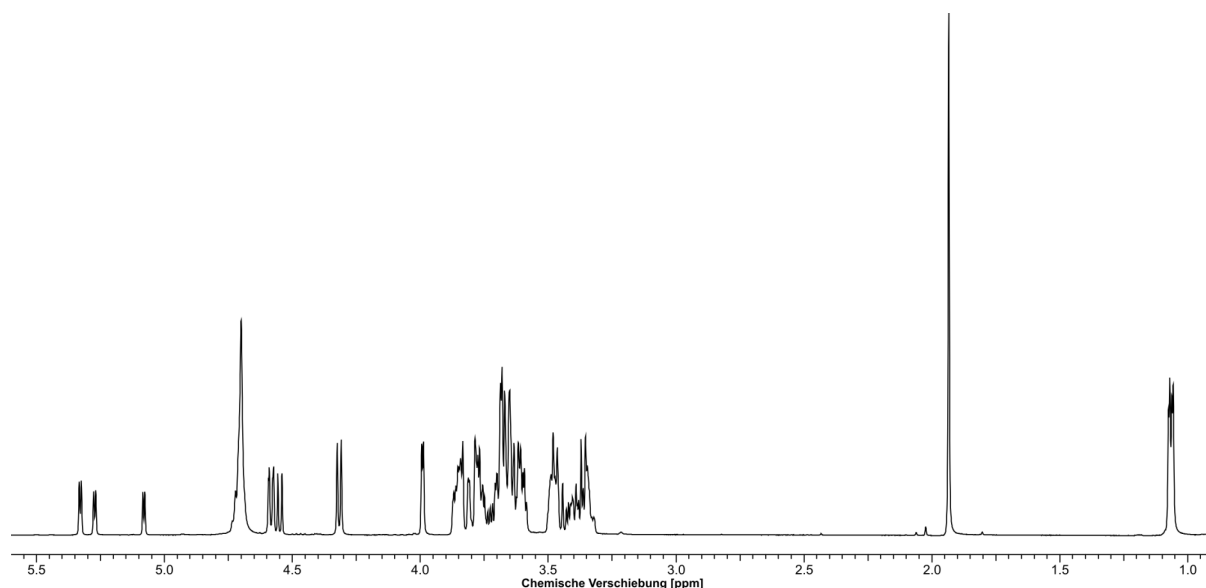


Abbildung A.23: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz) der synthetisierten fucosylierten LNT II. Aufgenommen in D₂O. Das Signal des verbleibenden H₂O diente als interne Referenz ($\delta = 4,7$ ppm). Ergebnisse bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2015a).

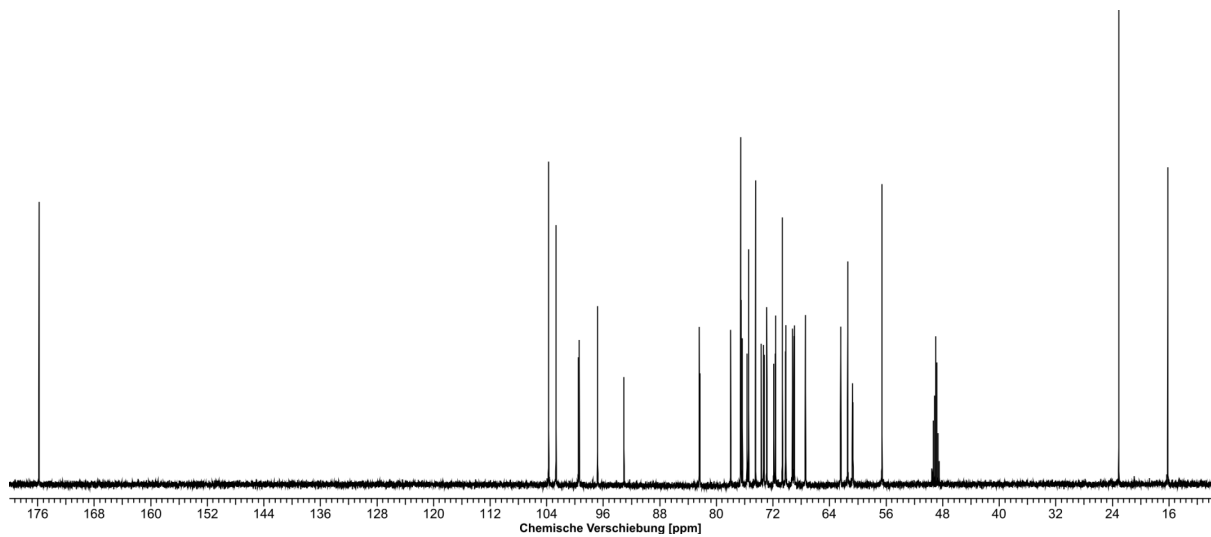


Abbildung A.24: ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) der synthetisierten fucosylierten LNT II. Aufgenommen in D_2O . Zugegebenes Methanol- d_4 diente als Referenz ($\delta = 49$ ppm). Ergebnisse bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2015a).

A.1.9. Lacto-N-difucoheptaose (LNDFHep)

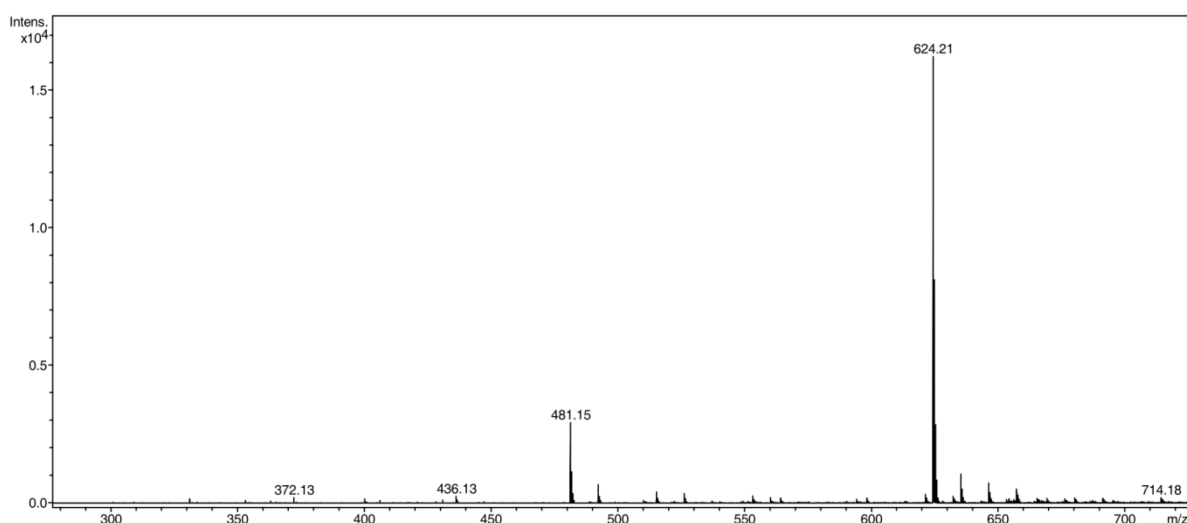


Abbildung A.25: ESI-Massenspektrum der synthetisierten Lacto-N-difucoheptaose. Aufgenommen mit einem Bruker microTOF-Q System im positiven Messfeld. Das dominanteste Signal entspricht der Masse des 2Na^+ -Addukts der Lacto-N-difucoheptaose ($m/z = 624,21$). Außerdem der fucosylierten LNT II zuzuordnen ist $m/z = 736,22$ als das Addukt $[\text{fuc. LNT II} + 2 \text{Na-H}]^+$. Das Signal bei $m/z = 428,11$ entspricht dem Addukt $[\text{LacNAc} + 2 \text{Na-H}]^+$. Ergebnisse bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2015a).

Tabelle A.8: ^{13}C -NMR Daten der synthetisierten Lacto-N-difucoheptaose.^[a]

| Glycosyl-Gruppe | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 | CO des NAc | CH ₃ des NAc |
|------------------------------|--------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| Glc (α) | 93,19 | 73,83 | 75,83 | 73,42 | 71,96 | 60,77 | | |
| Glc (β) | 96,59 | 76,69 | 78,15 | 73,47 | 76,45 | 60,84 | | |
| α 1,3Fuc (α) | 99,62 | 69,19 | 70,36 | 72,99 | 67,43 | 16,26 oder | | |
| α 1,3Fuc (β) | 99,51 | 69,15 | 70,31 | 72,98 | 67,48 | 16,37 ^[c] | | |
| β 1,4Gal (α) | | 71,66 | 82,65 | 69,26 | 75,44 | (62,46 und 62,48) ^[g] | | |
| β 1,4Gal (β) | 102,84 | und 71,71 ^[b] | und 82,73 ^[b] | und 69,29 ^[b] | oder 75,56 ^[d] | | | |
| β 1,3GlcNAc 1 | 103,58 | 56,93 | 76,51 | 73,13 | 76,24 | 60,58 | 175,63 oder 175,69 ^[e] | 23,11 oder 23,31 ^[f] |
| α 1,4Fuc | 99,10 | 68,86 | 70,19 | 72,93 | 67,82 | 16,26 oder 16,37 ^[c] | | |
| β 1,3Gal | 103,75 | 71,52 | 81,99 | 69,42 | 75,44 oder 75,56 ^[d] | (62,60) ^[g] | | |
| β 1,3GlcNAc (terminal) | 103,64 | 56,68 | 74,64 | 70,89 | 76,76 | 61,59 | 175,63 oder 175,69 ^[e] | 23,11 oder 23,31 ^[f] |

^[a] ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) aufgenommen in D_2O . Chemische Verschiebungen in ppm. Methanol- d_4 ($\delta = 49$ ppm) wurde als interner Standard verwendet. Ergebnisse bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2015a).

^[b] Zuordnung der chemischen Verschiebungen zum α - oder β -Anomer war nicht möglich.

^{[c]-[f]} Chemische Verschiebungen nicht eindeutig zugeordnet. Chemische Verschiebungen evtl. paarweise ausgetauscht.

^[g] Zuordnung basiert nicht auf eindeutigen 2D-NMR-Spektren und gehört evtl. ausgetauscht.

Tabelle A.9: ¹H-NMR Daten der synthetisierten Lacto-N-difucoheptaose.^[a]

| Glycosyl-Gruppe | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6 (1) | H-6 (2) |
|--|--------------------------|---------------------------------|---|-------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| Glc (α) | 5,02 d <i>J</i> = 3,4 | 3,61 dd <i>J</i> = 9,8; 3,4 | 3,80 dd <i>J</i> = 9,4; 9,4 | 3,72 dd <i>J</i> = 10,4; 10,4 | 3,81 ov; m | 3,73 ov; m | |
| Glc (β) | 4,49 d <i>J</i> = 7,8 | 3,32 dd <i>J</i> = 9,4; 8,1 | 3,62 dd <i>J</i> = 9,2/9,2 | 3,73 dd <i>J</i> = 9,8; 9,8 | 3,42 ov; m | 3,81 bd <i>J</i> = 11,4 | 3,67 ov; m |
| α1,3Fuc (α) | 5,23 d <i>J</i> = 3,9 | 3,65 dd <i>J</i> = 10,5; 4,1 | 3,81 dd <i>J</i> = 10,3; 3,4 | | 4,68 ov; m | | |
| α1,3Fuc (β) | 5,29 d <i>J</i> = 3,9 | 3,64 dd <i>J</i> = 10,3; 3,8 | 3,81 dd <i>J</i> = 10,5; 3,2 | 3,64 ov; m | 4,67 ov; m | 1,04 ov; d | |
| β1,4Gal (α) | 4,27 d <i>J</i> = 7,8 | 3,37 ov; m | 3,54 dd <i>J</i> = 9,8; 2,6 und 3,53 dd <i>J</i> = 9,8; 2,6 ^[c] | 3,94 bd <i>J</i> = 3,4 | 3,42 ov; m | ov; etwa 3,77 – 3,75 ^[d] | |
| β1,3GlcNAc^[b] | 4,55 d <i>J</i> = 8,8 | 3,81 dd <i>J</i> = 9,4; 9,4 | 3,94 dd <i>J</i> = 9,8; 9,8 | 3,62 dd <i>J</i> = 8,6; 8,6 | 3,38 ov; m | ov; etwa 3,74 und 3,79 | |
| α1,4Fuc | 4,36 d <i>J</i> = 7,3 | 3,37 dd <i>J</i> = 8,9; 8,1 | 3,54 dd <i>J</i> = 9,7; 3,4 | 3,91 d <i>J</i> = 3,4 | 3,42 ov; m | ov; etwa 3,56 – 3,61 ^[d] | |
| β1,3Gal | 4,88 d <i>J</i> = 3,9 | 3,65 dd <i>J</i> = 10,5; 3,5 | 3,73 dd <i>J</i> = 10,7; 3,4 | 3,64 ov; m | 4,69 q <i>J</i> = 7,0; 7,0; 7,0 | 1,02 d <i>J</i> = 6,8 | |
| β1,3GlcNAc (terminal)^[b] | 4,57 d <i>J</i> = 8,8 | 3,59 dd <i>J</i> = 10,3; 8,5 | 3,39 d <i>J</i> = 10,3; 9,0 | 3,31 dd <i>J</i> = 9,8; 9,8 | 3,28 ov; m | 3,75 dd <i>J</i> = 11,7; 1,6 | 3,61 dd <i>J</i> = 12,4; 5,4 |

^[a] Chemische Verschiebungen in ppm, gefolgt von der Multiplizität des Signals (d = Duplett, dd = Duplett eines Dupletts, bd = Breites Duplett, q = Quadruplett, m = Multiplett, ov = Signal überlagert) und den Kopplungskonstanten (*J*) in Hz. Daten zusammengetragen aus verschiedenen 1D- und 2D-NMR-Spektren, jeweils aufgenommen in D₂O (500 MHz / 125 MHz für ¹H- / ¹³C-Spektren). Das Signal des enthaltenen Wassers (δ = 4,7 ppm) wurde verwendet als Referenz. Ergebnisse bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2015a).

^[b] Die Protonen der N-Acetyl-Gruppen zeigten Singulets bei 1,89 ppm und 1,91 ppm.

^[c] Zuordnung der chemischen Verschiebungen zum α- oder β-Anomer war nicht möglich.

^[d] Zuordnung basiert nicht auf eindeutigen 2D-NMR-Spektren und gehört evtl. ausgetauscht.

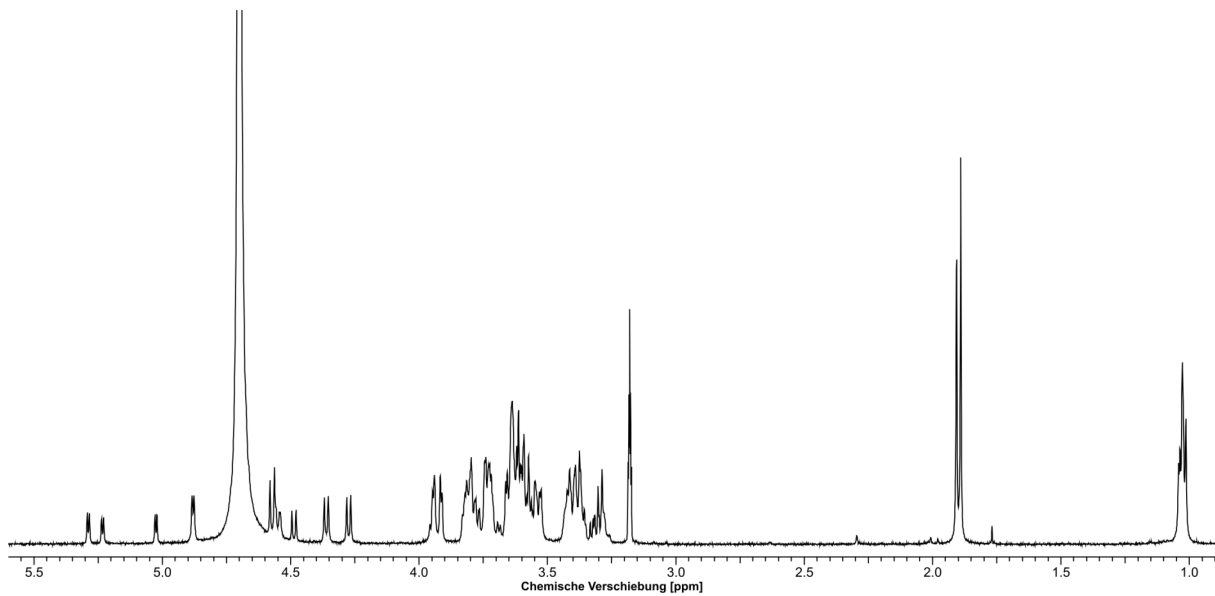


Abbildung A.26: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz) der synthetisierten Lacto-N-difucoheptaose. Aufgenommen in D₂O. Das Signal des verbleibenden H₂O diente als interne Referenz ($\delta = 4,7$ ppm). Ergebnisse bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2015a).

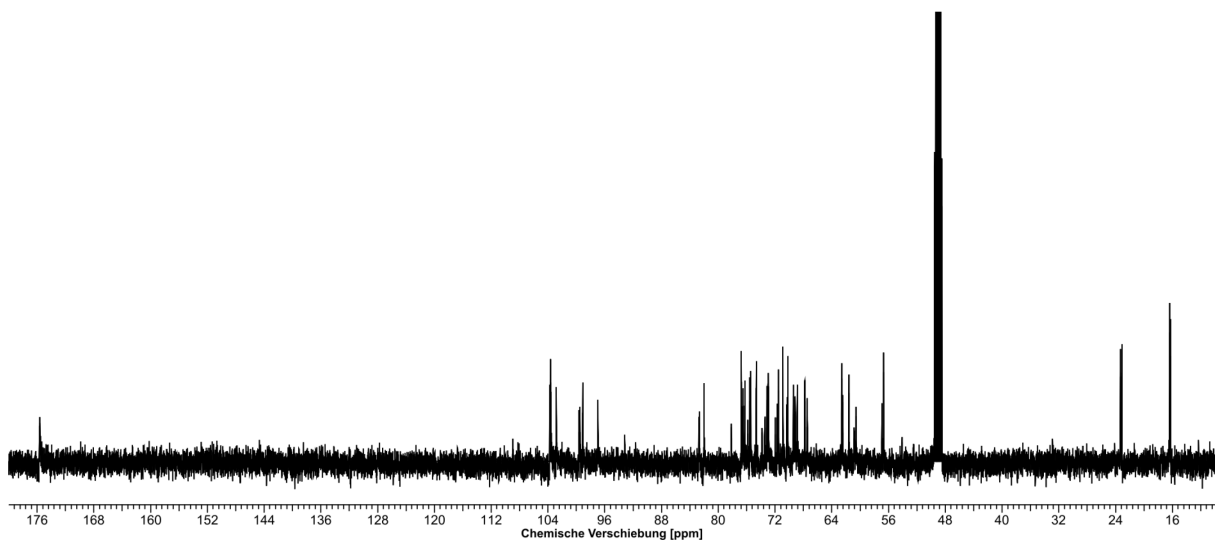


Abbildung A.27: ¹³C-NMR-Spektrum (125 MHz) der synthetisierten Lacto-N-difucoheptaose. Aufgenommen in D₂O. Zugegebenes Methanol-d₄ diente als Referenz ($\delta = 49$ ppm). Ergebnisse bereits publiziert (Baumgärtner *et al.*, 2015a).

A.2 Produkte der Synthesen fucosylierter Typ II-Oligosaccharide

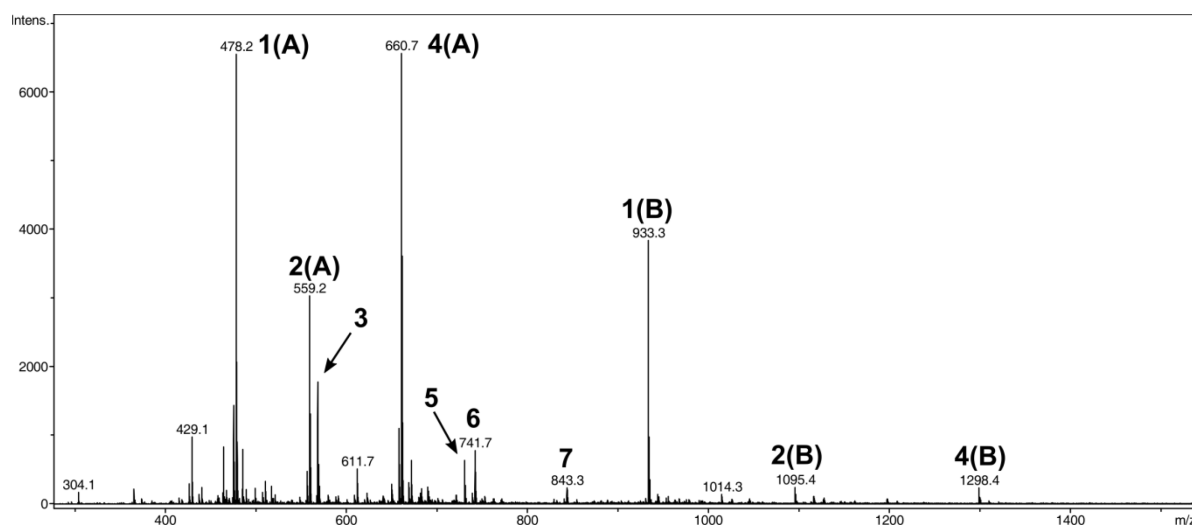


Abbildung A.28: ESI-Massenspektrum des zellfreien Extrakts von LJ-AYBF-cat zum Endpunkt der Kultur zur Synthese von Typ II-Oligosacchariden. Spektrum aufgenommen mit einem Bruker microTOF-Q System im positiven Messfeld. Massen von potentiellen Produkten in fetter Schrift nummeriert und in Tabelle A.10 aufgeführt.

Tabelle A.10: Zuordnungen identifizierter Masse-zu-Ladung-Verhältnisse im ESI-Massenspektrum von LJ-AYBF-cat (Abbildung A.28).

| Nr. | Masse ^[a] | Addukt | Mögliche Summenformel ^[b] | Hexosen | N-Acetylhexosamine | Desoxyhexosen | Mögliches Oligosaccharid |
|-------------|----------------------|--------------------------|--|---------|--------------------|---------------|--------------------------|
| 1(A) | 478,15 | [M + 2 Na] ²⁺ | C ₃₄ H ₅₈ N ₂ O ₂₆ | 3 | 2 | 0 | Kern-pentasaccharid |
| 2(A) | 559,18 | [M + 2 Na] ²⁺ | C ₄₀ H ₆₈ N ₂ O ₃₁ | 4 | 2 | 0 | Lacto-N-neohexaose |
| 3 | 568,18 | [M + Na] ⁺ | C ₂₀ H ₃₅ N ₁₆ O ₁₆ (568,19) | 2 | 1 | 0 | Lacto-N-triose II |
| 4(A) | 660,72 | [M + 2 Na] ²⁺ | C ₄₈ H ₈₁ N ₃ O ₃₆ | 4 | 3 | 0 | Kern-heptasaccharid |
| 5 | 730,24 | [M + Na] ⁺ | C ₂₆ H ₄₅ N ₂₁ | 3 | 1 | 0 | Lacto-N-neotetraose |
| 6 | 741,74 | [M + 2 Na] ²⁺ | C ₅₄ H ₉₁ N ₃ O ₄₁ | 5 | 3 | 0 | Lacto-N-neooctaose |
| 7 | 843,28 | [M + 2 Na] ²⁺ | C ₆₂ H ₁₀₄ N ₄ O ₄₆ | 5 | 4 | 0 | Lacto-N-nonasaccharid |
| 1(B) | 933,31 | [M + Na] ⁺ | C ₃₄ H ₅₈ N ₂ O ₂₆ (933,32) | 3 | 2 | 0 | Kern-pentasaccharid |
| 2(B) | 1095,37 | [M + Na] ⁺ | C ₄₀ H ₆₈ N ₂ O ₃₁ | 4 | 2 | 0 | Lacto-N-neohexaose |
| 4(B) | 1298,43 | [M + Na] ⁺ | C ₄₈ H ₈₁ N ₃ O ₃₆ (1298,45) | 4 | 3 | 0 | Kern-heptasaccharid |

^[a] Bestimmtes Masse-zu-Ladung-Verhältnis in einem Massenspektrum, aufgenommen mit einem Bruker microTOF-Q System im positiven Messfeld.

^[b] Plausible Summenformel des ermittelten Masse-zu-Ladung-Verhältnisses bei Annahme, dass das angegebene Addukt vorliegt. Theoretisches Masse-zu-Ladung-Verhältnis des jeweiligen Addukts angegeben in Klammern, falls abweichend von dem ermittelten Wert.

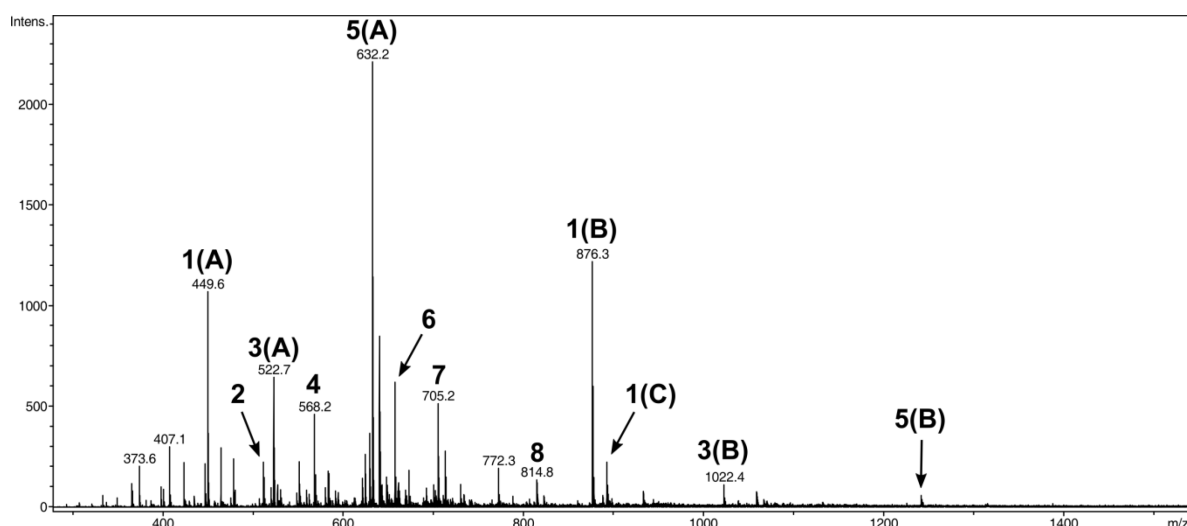


Abbildung A.29: ESI-Massenspektrum des zellfreien Extrakts von LJ-AYBFC-cat zum Endpunkt der Kultur zur Synthese von α 1,2-fucosylierten Typ II-Oligosacchariden. Spektrum aufgenommen mit einem Bruker microTOF-Q System im positiven Messfeld. Massen von potentiellen Produkten in fetter Schrift nummeriert und in Tabelle A.11 aufgeführt.

Tabelle A.11: Zuordnungen identifizierter Masse-zu-Ladung-Verhältnisse im ESI-Massenspektrum von LJ-AYBFC-cat (Abbildung A.29).

| Nr. | Masse ^[a] | Addukt | Mögliche Summenformel ^[b] | Hexosen | N-Acetylhexosamine | Desoxyhexosen | Mögliches Oligosaccharid |
|-------------|----------------------|-------------------|--------------------------------------|---------|--------------------|---------------|------------------------------|
| 1(A) | 449,64 | $[M + 2 Na]^{2+}$ | $C_{32}H_{55}NO_{25}$ | 3 | 1 | 1 | Monofuc. Lacto-N-neotetraose |
| 2 | 511,16 | $[M + Na]^+$ | $C_{18}H_{32}O_{15}$ | 2 | 0 | 1 | 2'-Fucosyllactose |
| 3(A) | 522,67 | $[M + 2 Na]^{2+}$ | $C_{38}H_{65}NO_{29}$ | 3 | 1 | 2 | Difuc. Lacto-N-neotetraose |
| 4 | 568,19 | $[M + Na]^+$ | $C_{20}H_{35}NO_{16}$ | 2 | 1 | 0 | Lacto-N-triose II |
| 5(A) | 632,21 | $[M + 2 Na]^{2+}$ | $C_{46}H_{78}N_2O_{35}$ | 4 | 2 | 1 | Monofuc. Lacto-N-neohexaose |
| 6 | 657,22 | $[M + Na]^+$ | $C_{24}H_{42}O_{19}$ | 2 | 0 | 2 | Difucosyllactose |
| 7 | 705,24 | $[M + 2 Na]^{2+}$ | $C_{52}H_{88}N_2O_{39}$ | 4 | 2 | 2 | Difuc. Lacto-N-neohexaose |
| 8 | 814,77 | $[M + 2 Na]^{2+}$ | $C_{60}H_{101}N_3O_{45}$ | 5 | 3 | 1 | Monofuc. Lacto-N-neooctaose |
| 1(B) | 876,29 | $[M + Na]^+$ | $C_{32}H_{55}NO_{25}$ (876,30) | 3 | 1 | 1 | Monofuc. Lacto-N-neotetraose |
| 1(C) | 892,27 | $[M + K]^+$ | $C_{32}H_{55}NO_{25}$ | 3 | 1 | 1 | Monofuc. Lacto-N-neotetraose |
| 3(B) | 1022,35 | $[M + Na]^+$ | $C_{38}H_{65}NO_{29}$ | 3 | 1 | 2 | Difuc. Lacto-N-neotetraose |
| 5(B) | 1241,42 | $[M + Na]^+$ | $C_{46}H_{78}N_2O_{35}$ (1241,43) | 4 | 2 | 1 | Monofuc. Lacto-N-neohexaose |

^[a] Bestimmtes Masse-zu-Ladung-Verhältnis in einem Massenspektrum, aufgenommen mit einem Bruker microTOF-Q System im positiven Messfeld.

^[b] Plausible Summenformel des ermittelten Masse-zu-Ladung-Verhältnisses bei Annahme, dass das angegebene Addukt vorliegt. Theoretisches Masse-zu-Ladung-Verhältnis des jeweiligen Addukts angegeben in Klammern, falls abweichend von dem ermittelten Wert.

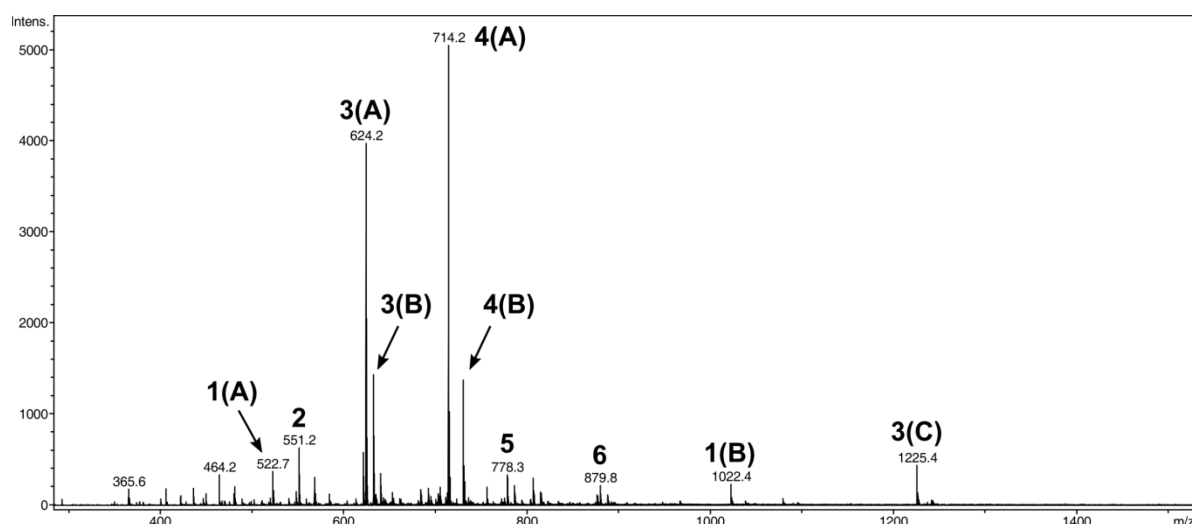


Abbildung A.30: ESI-Massenspektrum des zellfreien Extrakts von LJ-AYBFA-cat zum Endpunkt der Kultur zur Synthese von α 1,3-fucosylierten Typ II-Oligosacchariden. Spektrum aufgenommen mit einem Bruker microTOF-Q System im positiven Messfeld. Massen von potentiellen Produkten in fetter Schrift nummeriert und in Tabelle A.12 aufgeführt.

Tabelle A.12: Zuordnungen identifizierter Masse-zu-Ladung-Verhältnisse im ESI-Massenspektrum von LJ-AYBFA-cat (Abbildung A.30).

| Nr. | Masse ^[a] | Addukt | Mögliche Summenformel ^[b] | Hexosen | N-Acetylhexosamine | Desoxyhexosen | Mögliches Oligosaccharid |
|-------------|----------------------|---------------------|--------------------------------------|---------|--------------------|---------------|------------------------------|
| 1(A) | 522,67 | $[M + 2 Na]^{2+}$ | $C_{38}H_{65}NO_{29}$ | 3 | 1 | 2 | Difuc. Lacto-N-neotetraose |
| 2 | 551,18 | $[M + 2 Na]^{2+}$ | $C_{40}H_{68}N_2O_{30}$ | 3 | 2 | 1 | Monofuc. Kern-pentasaccharid |
| 3(A) | 624,21 | $[M + 2 Na]^{2+}$ | $C_{46}H_{78}N_2O_{34}$ | 3 | 2 | 2 | Difuc. Kern-pentasaccharid |
| 3(B) | 632,20 | $[M + Na + K]^{2+}$ | $C_{46}H_{78}N_2O_{34}$ | 3 | 2 | 2 | Difuc. Kern-pentasaccharid |
| 4(A) | 714,24 | $[M + Na]^+$ | $C_{26}H_{45}NO_{20}$ | 2 | 1 | 1 | Monofuc. Lacto-N-triose II |
| 4(B) | 730,22 | $[M + K]^+$ | $C_{26}H_{45}NO_{20}$ (730,21) | 2 | 1 | 1 | Monofuc. Lacto-N-triose II |
| 5 | 778,26 | $[M + 2 Na]^{2+}$ | $C_{58}H_{98}N_2O_{43}$ | 4 | 2 | 3 | Trifuc. Lacto-N-neohexaose |
| 6 | 879,8 | $[M + 2 Na]^{2+}$ | $C_{66}H_{111}N_3O_{48}$ | 3 | 2 | 3 | Trifuc. Kern-pentasaccharid |
| 1(B) | 1022,35 | $[M + Na]^+$ | $C_{38}H_{65}NO_{29}$ | 3 | 1 | 2 | Difuc. Lacto-N-neotetraose |
| 3(C) | 1225,43 | $[M + Na]^+$ | $C_{46}H_{78}N_2O_{34}$ | 3 | 2 | 2 | Difuc. Kern-pentasaccharid |

^[a] Bestimmtes Masse-zu-Ladung-Verhältnis in einem Massenspektrum, aufgenommen mit einem Bruker microTOF-Q System im positiven Messfeld.

^[b] Plausible Summenformel des ermittelten Masse-zu-Ladung-Verhältnisses bei Annahme, dass das angegebene Addukt vorliegt. Theoretisches Masse-zu-Ladung-Verhältnis des jeweiligen Addukts angegeben in Klammern, falls abweichend von dem ermittelten Wert.

A.3 Weiterer Anhang

Tabelle A.13: In diesem Projekt verwendete Geräte.

| Gerät | Komponenten/Typ und Hersteller |
|---|---|
| Agarose-Gelelektrophorese | Laufzelle: Mini-Sub Cell GT System (Bio-Rad, München) Netzteil: PowerPAC 300 (Bio-Rad, München) |
| Agarosegel-Dokumentation | UV-Schirm: UVT-20 M/L (Herolab, Wiesloch) Bildsensor-System: IDA (Raytest, Straubenhardt) Monitor: RMB92 (Rainbow CCTV, USA) Drucker: P91 (Mitsubishi Electric, Ratingen) |
| Autoklav | 3870EL (Tuttnauer Autoclave, USA) |
| Elektroporationssystem | GenePulser II (Bio-Rad, München) |
| Filtergerät (Lactose-Aufnahme) | 6-fach Filtergerät (H. Hölzel, Wörth/Hörlkofen) |
| FPLC-Systeme (Produktisolierung) | FPLC System: Controller: LCC-501 Pumpe: LKB P-500 Fraktionssammler: FRAC-500 (jeweils Pharmacia Biotech, Schweden) ÄKTApurifier-System: Pumpe: P-900 Fraktionssammler: Frac-950 Analytik-Einheit: pH/C-900 UV/Vis-Detektor: UV-900 Software: Unicorn 5.11 (je Amersham Bioscience/GE Healthcare, München) Säulen: XK26 (2,6 cm · 30 cm, Amersham Biosciences, Schweden), K 50/60 (5,0 cm · 60 cm, Pharmacia Fine Chemicals, Schweden), XK26 (2,6 cm · 100 cm, Amersham Biosciences, Schweden), XK50 (50 cm · 100 cm, Amersham Biosciences, Schweden) |
| Gefriertrocknungsanlage | Alpha I-5 (Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode am Harz) Vakuumpumpe: DUO 5 M (Pfeiffer Vacuum, Aßlar) |
| HPLC-System (Analytik von Acetat) | Agilent Series 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn) Brechungsindex-Detektor: RI-71 (Showa Denko, Japan) Software: Chemstation for LC 3D Systems (Agilent Technologies, Waldbronn) Säule: Organic Acid Säule (300 mm · 8 mm, CS-Chromatographie, Germany) |
| HPLC-System (Analytik von Oligosacchariden und Nukleotid-aktivierten Zuckern) | Autosampler: Dionex Gina 50 Pumpe: Dionex P580 UV/Vis-Detektor: Dionex UVD340 Fluoreszenzdetektor: Dionex RF2000 Software: Chromeleon 6.80 SR11 (je Thermo Fisher Scientific, Braunschweig) |
| Inkubationsschrank | Säulen: Luna C18 (2) (250 mm · 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex, Aschaffenburg), Gemini-NX C18 (250 · 4 mm, 5 µm, Phenomenex, Aschaffenburg) Function Line B6 (Heraeus Instruments, Hanau) |

| Gerät | Komponenten/Typ und Hersteller |
|--|--|
| LC-MS (Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart) | Agilent 1260 LC-MS Massenspektrometer: Agilent 6130 Quadrupol Software: LC/MSD Chemstation (je Agilent Technologies, Waldbronn) Säule: Luna C18 (2) (250 mm · 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex, Aschaffenburg) |
| Magnetrührer | MR2000 (Heidolph Instruments, Schwabach) |
| MS (Institut für Organische Chemie, Universität Stuttgart) | microTOF-Q (Bruker, Reinstetten) |
| NMR (Institut für Bioorganische Chemie, Universität Hohenheim) | Unity Inova 500 MHz Spektrometer (Varian, USA) Pulssequenzen: CHEMPACK 4.0 Pulssequenzen (Varian Vnmrj 2.1 B Software, Varian, USA) |
| NMR (Institut für Organische Chemie, Universität Stuttgart) | Bruker Avance 500 Spektrometer (Bruker, Reinstetten) |
| Photometer | Varian Cary 50 Bio (Agilent Technologies, Waldbronn) |
| Rotationsverdampfer | VV2000 (Heidolph Instruments, Schwabach) Wasserbad: WB2000 (Heidolph Instruments, Schwabach) Thermostat: RK20 (Lauda, Lauda-Königshofen) Vakuumpumpe: M2-C2 (Vacuubrand, Wertheim) |
| Rührkesselreaktor | 30 l, <i>in situ</i> sterilisierbar (Bioengineering, Schweiz) |
| Schüttelinkubatoren | 37 °C: Infors HAT RFI-125 (Infors, Schweiz) 30 °C: Infors BC-406 (Infors, Schweiz) in einem auf 30 °C temperierten Raum |
| Szintillationszähler | Tri-Carb Liquid Scintillation Counter 1900 TR (Packard Instruments, USA) |
| SDS-PAGE | Laufzelle: Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, München) Netzteil: PowerPAC 300 (Bio-Rad, München) |
| Software | ACD/NMR Processor 12.0 (Advanced Chemistry Development (Frankfurt)) ChemDraw 15.0 Professional (PerkinElmer, USA) Clone Manager 7 (Sci-Ed Software, USA) GATCViewer 1.0 (GATC Biotech, Konstanz) Inkscape 0,91 (Software Freedom Conservancy, USA) SigmaPlot 9.0 (Systat Software, Erkrath) |
| Thermocycler | TGradient (Biometra, Göttingen) |
| Ultraschall | Pulsgerät: Sonopuls HD200 (BANDELIN electronic, Berlin) Sonde: HD 200 (BANDELIN electronic, Berlin) |
| Vakuumkonzentrator | Speedvac CON-1000 (Fröbel, Lindau) |
| Zentrifugen | Tisch-Zentrifuge: 5417c (Eppendorf, Hamburg) Gekühlte Tischzentrifuge: Mikro 22 R (Hettich, Tuttlingen) PCR-Zentrifuge: Tube-Strip Picofuge (Stratagene, USA) Gekühlte Zentrifugen für Schraubdeckel-Gefäße: Rotina 380R (Hettich, Tuttlingen) Avanti J-25 (Beckman, Krefeld) LE-80K Ultracentrifuge mit 70.1Ti Rotor (Beckman, Krefeld) |

Tabelle A. 14: Sequenzen der Codon-optimieren Gene.

| Gen | Sequenz |
|---------------|---|
| <i>fucT14</i> | 5'-ATGTTTCAGCCGCTGCTGGATGCATATATTGATAGCACCCGCTCTGGATGAAACCGATTATAAACCGCCTCTGAA AATTGCAGTTGCAAATTGGTGGGGTGGTGTGGAAGAATTCAAGAAAAGCACCTGTATTTTATCCTGAGCCAGCGT TATACCATTACCTGCATCGTAATCCGGATAAACCGGCAGATATTGTTTTGGTAATCCGCTGGGTAGCGCACGTA AAATCTGAGCTATCAGAATGCAAAACGCGTGTTTTATACCGGTGAAAATGAAGTGCCGAACCTCAACCTGTTTGA TTATGCCATTGGTTTCGATGAGCTGGATTTAATGATCGCTATCTGCGTATGCCGCTGTATTATGCACATCTGCAT TATGAAGCAGAAGCTGGTGAATGATACCACAGTCCGTATAAAATCAAAGACAATAGCCTGTATGCCCTGAAGAAAC CGAGCCATCATTTTAAAGAAAATCATCCGAATCTGTGTGCCGTGGTGAATAATGAAAGCGATCCGCTGAAACGTGG TTTTGCCAGCTTGTGTGCAAGCAATCCGAATGCACCGAAACGTAATGCATTTTATGATGCGCTGAATAGCATTGAA CCGTTTACCGTGGTGGTAGCGTGAAAAACACCTGGGTTATAACGTCAAAAACAAAAACGAATTTCTGAGCCAGT ATAAATTCAATCTGTGCTTTGAAAACAGCCAGGGTTATGGTTATGTGACCGAGAAAATTTCTGGATGCCTATTTTCAG CCATACCATTCCGATTTATTGGGGTAGCCCGAGCGTTGCAAAAGATTTCAATCCGAAAAGTTTTGTGAACGTGCAC GACTTCAACAACCTTGTATGAAGCCATTGATCATGTGCGTTATCTGCATACCCATCCGAACGCATATCTGGATATGC TGATGAAAACCCGCTGAATACCCTGGATGGTAAAGCATACTTTTATCAGAACCCTGAGCTTCAAGAAAATCCTGGA CTTTTTCAAACCATCCTGAAAACGATACCATCTATCATTTGTGATGCCATAACTATAGCGCACTGCATCGTGAT CTGAATGAACCGCTGGTTAGCATTGATGATCTGCGCATTAAATTATGATGACCTGCGTATCAACTACGACGATCTGC GGATCAACTATGACGACCTGCGCATTAAATTACGAACGTCTGCTGCAGAATGCATCACCTCTGCTGGAACCTGAGCCA GAATACCAGCTTTAAATCTATCGTAAAGCCTATCAGAAAAGCCTGCCTCTGCTGCGTGCAATTCCTGCTGGGTG AAGAAATAA-3' |
| <i>lgtA</i> | 5'-ATGCAGCCGCTGGTTAGCGTCTGATTTGTGCATATAATGTGAAAAATACTTTGCCAGAGCCTGGCAGCAGT TGTTAATCAGACCTGGCGTAATCTGGATATTCTGATTGTTGATGATGGTAGCACCATGGCACCCTGGCAATTGCA CAGCGTTTTCAAGAACAGGATGGTCGTATTCTGATTTCTGGCACAGCCTCGTAATAGCGGTCTGATTCCGAGCCTGA ATATTGGTCTGGATGAACTGGCAAAAAGCGGTGGTGGTGGCGAATATATTGCACGTACCATGCAGATGATATTGC AGCACCGGATTGGATTGAAAAAATTTGGGGTGGAGATGAAAAAGACCGTAGCATCATCGCGATGGGTGCATGGCT GGAAGTCTGAGCGAAGAAAAAGATGGTAATCGTCTGGCAGTCATCATGAACATGGTAAAAATTTGAAAAAAC GACCCGTCATGAAGATATCGCAGATTTTTTTCCGTTTGGCAACCCGATTTCATAACAACACCATGATTATGCGTCTG AGCGTTATTGATGGTGGTCTGCGTTATAATACCGAACGTGATTGGGCAGAAGATTATCAGTTTTGGTATGATGTTA GCAAACTGGTCTGCTGGCCTATTATCCGGAAGCACTGGTTAAATATCGCCTGCATGCAATCAGTTAGCAGCAA ATATAGCATTCCGCAGCATGAAATGGCCAGGGTATTAGAAAACCCGACGTAATGATTTTTCTGCAGAGCATGGGC TTTAAAACCCGTTTTGATAGCCTGGAATATCGCCAGATTAAGCAGTTGCCTATGAACTGCTGAAAAACATCTGC CGGAAGAAGATTTTGAGCTGGCAGCCGTTTTCTGTATCAGTGTTTTAAACGCACCGATACCCTGCCTGCCGTGGC TGCTGGATTTTGCAGCAGATGGTCGCATGCGTCTGTTTTACCCTGCGTCAGATTTTGGTATTCTGCATCGTCT GCTGAAAAACCGCTAA-3' |
| <i>lgtB</i> | 5'-ATGCAAAACCAGTTATCAGCTTAGCTTCCGCCGAGAACGCAGGGCGCACATTGCCGCAACCTTCGGCGCGCGC GGCATCCCCTTCAGTTTTTCGACGCACTGATGCCGCTGAAAGGCTGGAACAGGCAATGGCGGAACTCGTCCCCGG CTTGTGCGCGCACCCCTATTGAGCGGAGTGGAAAAAGCCTGCTTTATGAGCCACGCCGATTTGTGAAAACAGGCA TTGGACGAAGGTCTGCCGTATATCGCCGATTTTGAGGACGACGTTTTACTCGCGGAAGGCGCGGAGAAATTCCTTG CCGAAGACGCTTGGCTAAAAGAACGCTTTGACCCCGATTCCGCTTTATCGTCCGCTTGGAAACGATGTTTATGCAC GTCCTGACCTCGCCCTCCGGTGTGGCGGACTACTGCGGGCGTGCCTTTCCGCTGTTGGAAAAGCGAACACTGGGGGAC GGCGGGCTATATCATTTCCAAAAAGCGATACGGTTTTTCTGCAACATTTCTGTAATGTTGCAGCCGGAACAGATA AAACCTATCGACTTAATGATGTTCACTGATTTTTTTCGATAAGGAGGGGATGCCTGTTTATCAGGTCAGTCCGGCCT TATGCGCCCAAGAGCTGCATTATGCCAAGTTTACGACCAAAAACAGCGCATTGGGCAGCCTGATCGAACACGACCG CCTCCTGAACCGCAAAACAGCAAAGGCGCGATTTCCCGCCCAACACATTCAAACGCGCCTGATCCGCGCCTTGACCA AAATCAGCAGGGAAGGAAAAACGCGGCAAAAGGCGGAAACAGTTTATTGTGCTTTTCCAATAA-3' |
| <i>wbgO</i> | 5'-ATGATTATCGATGAAGCCGAAAGCGCAGAAAGCACCCATCCGTTGTTAGCGTTATTCTGCCGTTAAACAAAA AAACCCGTTTTCTGGATGAAGCCATTAACAGCATTCTGAGCCAGACCTTTAGCAGCTTTGAAATTATCATTGTTGCC AACTGTTGACCGATGATTTCTATAACGAACTGAAACACAAAAGTGAACGATAAAATCAAACCTGATCCGCACCAATA TTGCCATCTGCCGTATAGCCTGAATAAAGCAATTGATCTGAGCAACGGTGAATTTATTGCACGCATGGATTGAGA TGATATTAGCCATCCGATCGTTTTACCAAACAGTGGATTTTCTGAAAAACAACCCGATGTTGATGTTGTTGGC ACCAATGCCATCTTCATTGATGATAAAGGTCGCGAGATCAACAAAAACCAAACCTGCCGGAAGAAAATCTGGACATTG TTAAAAACCTGCCGTACAAATGCTGTATTGTTTCATCCGAGCGTTATGTTCCGCAAAAAGTTATTGCAAGCATCGG TGGCTATATGTTACGAATTATAGCGAAGATTATGAGCTGTGGAATCGTCTGAGCCTGGCAAAAATCAAATTCAG AATCTGCCGAATACCTGTTCTATTATCGTCTGCATGAAGGTCAGAGCACCGGAAAAAAAACCTGTATATGGTTA TGGTGAACGATCTGGTATCAAAAATGAAATGCTTTTTTCTGACCGCAACATTAACCTGTTCCGTTGGTATTCCG TACCATTGCAAGCTTTATCTACTGCAAAATATATCAAATAA-3' |

Tabelle A.15: Retentionsfaktoren (R_f) verschiedener Oligosaccharide in der Dünnschichtchromatographie bei Verwendung verschiedener mobiler Phasen.

| Oligosaccharid | k für Chloroform:Essigsäure:H ₂ O (6:7:1) | k für n-Butanol:Essigsäure:H ₂ O (4:8:1) |
|---------------------|---|--|
| Lactose | 0,280 | 0,164 |
| 2'-Fucosyllactose | 0,193 | 0,113 |
| Lacto-N-triose II | 0,102 | 0,062 |
| Lacto-N-tetraose | 0,043 | 0,033 |
| Lacto-N-neotetraose | 0,050 | 0,033 |

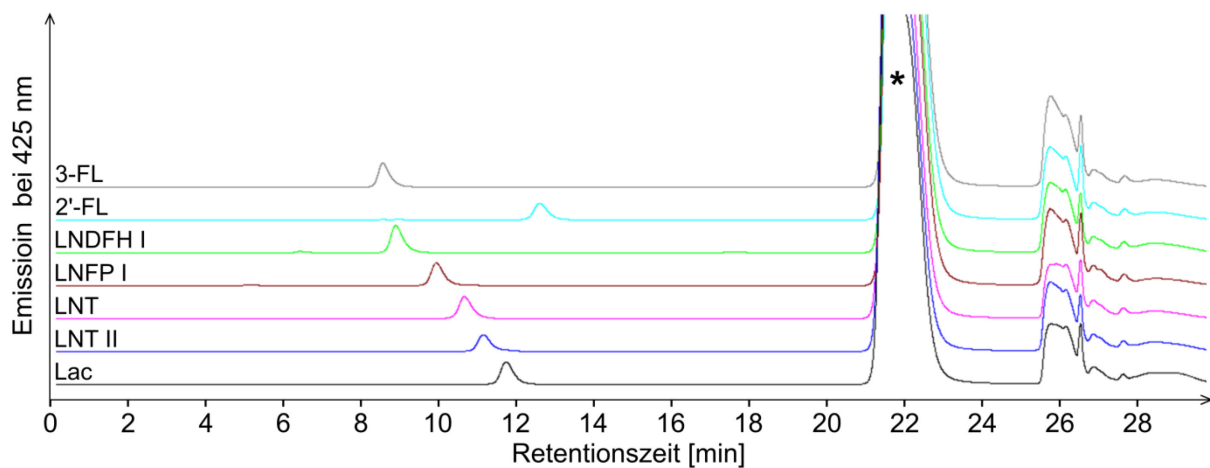


Abbildung A. 31: HPLC-Chromatogramme kommerzieller bzw. selbst synthetisierter HMO-Standards. Standards (Ausgangskonz. je 0,3 – 0,5 mM) wurden derivatisiert mit Anthranilsäure und 2-Picolinboran sowie analysiert mittels reversed-phase HPLC, wie in Abschnitt 2.7.3 beschrieben und zeigen Signale mit Retentionszeiten zwischen acht und 14 min. Der Stern markiert das Signal der in der Derivatisierung im Überschuss zugegebenen Anthranilsäure.

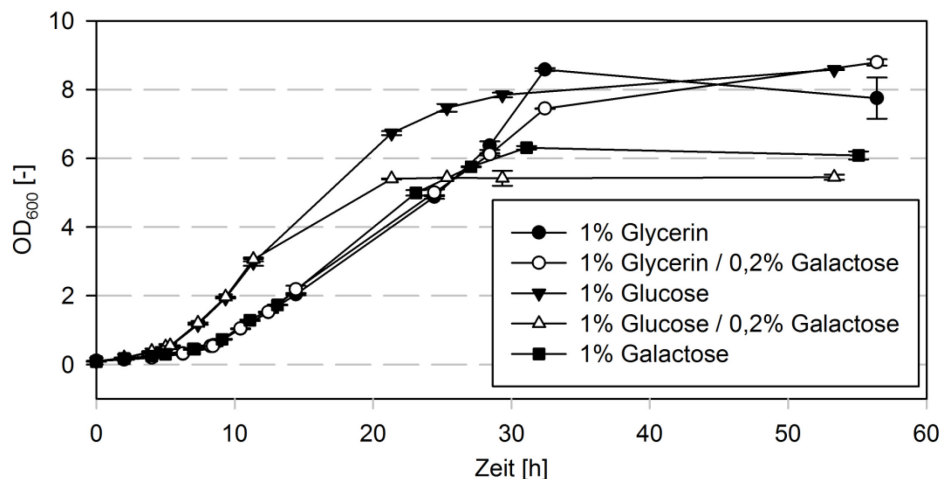


Abbildung A.32: Wachstum von Kulturen des Stammes *E. coli* LJ-AYO-cat in Minimalmedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen. Schüttelkolben-Kulturen durchgeführt in Duplikaten in Minimalmedium mit den angegebenen Kohlenstoffquellen und 2 g l⁻¹ Lactose. Lactose und, falls zutreffend, zusätzlich 2 g l⁻¹ Galactose wurden zugegeben zum Zeitpunkt der Induktion durch IPTG (0,5 mM, Endkonz.) bei einer optischen Dichte von 0,4 bis 0,6.

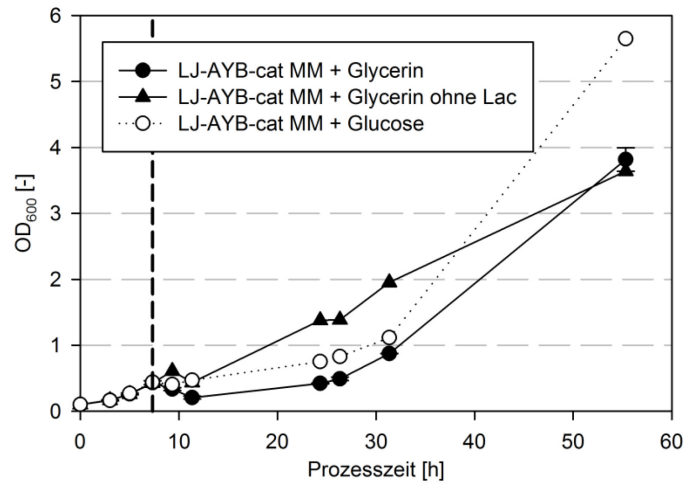


Abbildung A.33: Wachstum des Stammes *E. coli* LJ-AYB-cat in Minimalmedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen. Schüttelkolben-Kulturen mit Glycerin, Induktion mit IPTG (0,5 mM, Endkonz.) und Lactose (2 g l⁻¹, Endkonz.), durchgeführt in Duplikaten. Kulturen mit Glycerin aber ohne Lactose-Zugabe bzw. mit Glucose jeweils einfach durchgeführt. Die vertikale Linie bei einer Prozesszeit von 7,33 h markiert den Zeitpunkt der Induktion und ggf. Lactose-Zugabe.

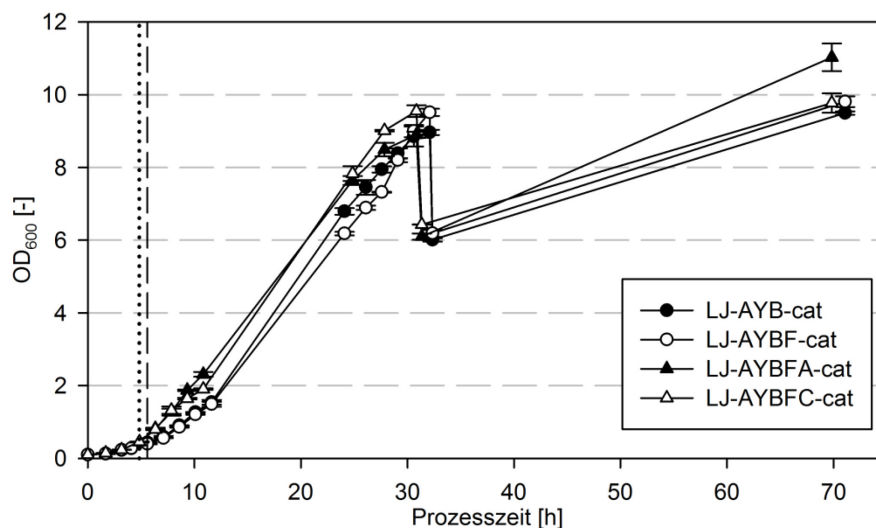


Abbildung A.34: Wachstum verschiedener Typ II-HMO synthetisierender *E. coli* Stämme in Minimalmedium mit Glucose und Casaminsäuren. Schüttelkolbenkulturen durchgeführt in Duplikaten in Minimalmedium mit Glucose (10 g l⁻¹, Endkonz.) und Casaminsäuren (1 g l⁻¹, Endkonz.), Induktion mit IPTG (0,5 mM, Endkonz.) und gleichzeitige Zugabe von Lactose (2 g l⁻¹, Endkonz.). Erhöhung des Kulturvolumens um 50 % mit Minimalmedium mit Glucose (10 g l⁻¹ im zugegebenen Medium) 26 h nach Induktion. Die senkrechten Linien markieren die Zeitpunkte der Induktion von LJ-AYB-cat und LJ-AYBF-cat (gestrichelt) bzw. LJ-AYBFA-cat und LJ-AYBFC-cat (gepunktet).

Literatur

- Abramson J, Smirnova I, Kasho V, Verner G, Kaback HR, Iwata S** (2003) Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* 301:610–615.
- Albermann C** (2015) Rekombinante Darstellung und Modifikation von Naturstoffen durch Biologische Synthese und Synthese Biologie. Habilitationsschrift. Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart.
- Albermann C, Distler J, Piepersberg W** (2000) Preparative synthesis of GDP- β -L-fucose by recombinant enzymes from enterobacterial sources. *Glycobiology* 10:875–881.
- Albermann C, Ghanegaonkar S, Lemuth K, Vallon T, Reuss M, Armbruster W, Sprenger GA** (2008) Biosynthesis of the vitamin E compound δ -tocotrienol in recombinant *Escherichia coli* cells. *ChemBioChem* 9:2524–2533.
- Albermann C, Piepersberg W, Wehmeier UF** (2001) Synthesis of the milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose using recombinant bacterial enzymes. *Carbohydr. Res.* 334:97–103.
- Albermann C, Trachtmann N, Sprenger GA** (2010) A simple and reliable method to conduct and monitor expression cassette integration into the *Escherichia coli* chromosome. *Biotechnol. J.* 5:32–38.
- Albrecht S, Schols HA, van den Heuvel EGHM, Voragen AGJ, Gruppen H** (2010) CE-LIF-MS n profiling of oligosaccharides in human milk and feces of breast-fed babies. *Electrophoresis* 31:1264–73.
- Albrecht S, Schols HA, van den Heuvel EGHM, Voragen AGJ, Gruppen H** (2011) Occurrence of oligosaccharides in feces of breast-fed babies in their first six months of life and the corresponding breast milk. *Carbohydr. Res.* 346:2540–2550.
- Aly MRE, Ibrahim E-SI, El Ashry ESH, Schmidt RR** (2000) Synthesis of lacto-N-neohexaose and lacto-N-neooctaose using the dimethylmaleoyl moiety as an amino protective group. *Eur. J. Org. Chem.* 2000:319–326.
- Aly MRE, Ibrahim E-SI, El Ashry E-SH, Schmidt RR** (1999) Synthesis of lacto-N-neotetraose and lacto-N-tetraose using the dimethylmaleoyl group as amino protective group. *Carbohydr. Res.* 316:121–132.
- Amano J, Messer M, Kobata A** (1985) Structures of the oligosaccharides isolated from milk of the platypus. *Glycoconj. J.* 2:121–135.
- Anderson A, Donald AS** (1981) Improved method for the isolation of 2'-fucosyllactose from human milk. *J. Chromatogr.* 211:170–174.
- Andrianopoulos K, Wang L, Reeves PR** (1998) Identification of the fucose synthetase gene in the colanic acid gene cluster of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 180:998–1001.

- Angeloni S, Ridet JL, Kusy N, Gao H, Crevoisier F, Guinchard S, Kochhar S, Sigrist H, Sprenger N** (2005) Glycoprofiling with micro-arrays of glycoconjugates and lectins. *Glycobiology* 15:31–41.
- Anumula KR** (1994) Quantitative determination of monosaccharides in glycoproteins by high-performance liquid chromatography with highly sensitive fluorescence detection. *Anal. Biochem.* 220:275–283.
- Aoyama K, Haase AM, Reeves PR** (1994) Evidence for effect of random genetic drift on G+C content after lateral transfer of fucose pathway genes to *Escherichia coli* K-12. *Mol. Biol. Evol.* 11:829–838.
- Appelmelk BJ, Negrini R, Moran AP, Kuipers EJ** (1997) Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* and the host. *Trends Microbiol.* 5:70–73.
- Asakuma S, Urashima T, Akahori M, Obayashi H, Nakamura T, Kimura K, Watanabe Y, Arai I, Sanai Y** (2008) Variation of major neutral oligosaccharides levels in human colostrum. *Eur. J. Clin. Nutr.* 62:488–494.
- Asakuma S, Akahori M, Kimura K, Watanabe Y, Nakamura T, Tsunemi M, Arai I, Sanai Y, Urashima T** (2007) Sialyl oligosaccharides of human colostrum: changes in concentration during the first three days of lactation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71:1447–1451.
- Asakuma S, Hatakeyama E, Urashima T, Yoshida E, Katayama T, Yamamoto K, Kumagai H, Ashida H, Hirose J, Kitaoka M** (2011) Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria. *J. Biol. Chem.* 286:34583–34592.
- Ashida H, Miyake A, Kiyohara M, Wada J, Yoshida E, Kumagai H, Katayama T, Yamamoto K** (2009) Two distinct α -L-fucosidases from *Bifidobacterium bifidum* are essential for the utilization of fucosylated milk oligosaccharides and glycoconjugates. *Glycobiology* 19:1010–1017.
- Ashline D, Singh S, Hanneman A, Reinhold V** (2005) Congruent strategies for carbohydrate sequencing. 1. Mining structural details by MSn. *Anal. Chem.* 77:6250–6262.
- Aslanidis C, de Jong PJ** (1990) Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res.* 18:6069–6074.
- Baldomà L, Aguilar J** (1988) Metabolism of L-fucose and L-rhamnose in *Escherichia coli*: Aerobic-anaerobic regulation of L-lactaldehyde dissimilation. *J. Bacteriol.* 170:416–421.
- Bao Y, Chen C, Newburg DS** (2013) Quantification of neutral human milk oligosaccharides by graphitic carbon high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 433:28–35.
- Bao Y, Zhu L, Newburg DS** (2007) Simultaneous quantification of sialyloligosaccharides from human milk by capillary electrophoresis. *Anal. Biochem.* 370:206–214.
- Barreteau H, Kovac A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blanot D** (2008) Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 32:168–207.

- Baumgärtner F, Conrad J, Sprenger GA, Albermann C** (2014) Synthesis of the human milk oligosaccharide lacto-N-tetraose in metabolically engineered, plasmid-free *E. coli*. *ChemBioChem* 15:1896–1900.
- Baumgärtner F, Jurzitza L, Conrad J, Beifuss U, Sprenger GA, Albermann C** (2015a) Synthesis of fucosylated lacto-N-tetraose using whole-cell biotransformation. *Bioorg. Med. Chem.* 23:6799–6806.
- Baumgärtner F, Seitz L, Sprenger GA, Albermann C** (2013) Construction of *Escherichia coli* strains with chromosomally integrated expression cassettes for the synthesis of 2'-fucosyllactose. *Microb. Cell. Fact.* 12:40.
- Baumgärtner F, Sprenger GA, Albermann C** (2015b) Galactose-limited fed-batch cultivation of *Escherichia coli* for the production of lacto-N-tetraose. *Enzyme Microb. Technol.* 75–76:37–43.
- Baumgärtner F, Sprenger GA, Albermann C** (2015c) Biotechnological production of LNT, LNnT and the fucosylated derivatives thereof. Patentanmeldung. WO2016/008602.
- Becker DJ, Lowe JB** (2003) Fucose: Biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology* 13:41R–53R.
- Bennett BD, Kimball EH, Gao M, Osterhout R, van Dien SJ, Rabinowitz JD** (2009) Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nat. Chem. Biol.* 5:593–599.
- Bertani G** (1951) Studies on lysogenesis I.: The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 62:293–300.
- Beyer HM, Gonschorek P, Samodelov SL, Meier M, Weber W, Zurbriggen MD** (2015) AQUA cloning: A versatile and simple enzyme-free cloning approach. *PLoS One* 10:1–20.
- Bigge JC, Patel TP, Bruce JA, Goulding PN, Charles SM, Parekh RB** (1995) Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid. *Anal. Biochem.* 230:229–238.
- Bisswanger H** (2008) Enzyme kinetics - Principles and methods 2., Rev. A. Weinheim: Wiley-VCH.
- Blank D, Dotz V, Geyer R, Kunz C** (2012) Human milk oligosaccharides and Lewis blood group: individual high-throughput sample profiling to enhance conclusions from functional studies. *Adv. Nutr.* 3:440S–449S.
- Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y** (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453–1462.
- Blixt O, van Die I, Norberg T, van den Eijnden DH** (1999) High-level expression of the *Neisseria meningitidis lgtA* gene in *Escherichia coli* and characterization of the encoded N-acetylglucosaminyltransferase as a useful catalyst in the synthesis of GlcNAc β 1-3Gal and GalNAc β 1-3Gal linkages. *Glycobiology* 9:1061–1071.

- Bode L, Kuhn L, Kim HY, Hsiao L, Nissan C, Sinkala M, Kankasa C, Mwiya M, Thea D, Aldrovandi G** (2012) Human milk oligosaccharide concentration and risk of postnatal transmission of HIV through breastfeeding. *Am. J. Clin. Nutr.* 96:831–839.
- Bode L** (2006) Recent advances on structure, metabolism, and function of human milk oligosaccharides. *J. Nutr.* 136:2127–2130.
- Bode L** (2009) Human milk oligosaccharides: prebiotics and beyond. *Nutr. Rev.* 67:183–191.
- Bode L** (2012) Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology* 22:1147–1162.
- Bode L** (2015) The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Hum. Dev.* 91:619–622.
- Boehm G, Stahl B** (2003) Oligosaccharides. In: Mattila-Sandholm, T, Saarela, M, editors. *Funct. Dairy Prod.* Cambridge: Woodhead Publishing Ltd, Seiten 203–243.
- Boehm G, Stahl B** (2007) Oligosaccharides from milk. *J. Nutr.* 137:847–849.
- De Boer HA, Comstock LJ, Vasser M** (1983) The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80:21–25.
- Brabetz W, Liebl W, Schleifer K-H** (1991) Studies on the utilization of lactose by *Corynebacterium glutamicum*, bearing the lactose operon of *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 155:607–612.
- Brabetz W, Liebl W, Schleifer K-H** (1993) Lactose permease of *Escherichia coli* catalyzes active β -galactosidase transport in a gram-positive bacterium. *J. Bacteriol.* 175:7488–7491.
- Bradford MM** (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254.
- Bradley SA, Tinsley CR, Muiry JA, Henderson PJF** (1987) Proton-linked L-fucose transport in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 248:495–500.
- Breton C, Šnajdrová L, Jeanneau C, Koča J, Imberty A** (2006) Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology* 16:29–37.
- Bruntz R, Dabrowski U, Dabrowski J, Ebersold A, Peter-Katalinic J, Egge H** (1988) Fucose-containing oligosaccharides from human milk from a donor of blood group 0 Le^a nonsecretor. *Biol. Chem.* 369:257–273.
- Bush CA, Panitch MM, Dua VK, Rohr TE** (1985) Carbon nuclear magnetic resonance spectra of oligosaccharides isolated from human milk and ovarian cyst mucin. *Anal. Biochem.* 145:124–136.
- Castanys-Muñoz E, Martin MJ, Prieto PA** (2013) 2'-Fucosyllactose: An abundant, genetically determined soluble glycan present in human milk. *Nutr. Rev.* 71:773–89.
- Chakrabarti T, Chen YM, Lin ECC** (1984) Clustering of genes for L-fucose dissimilation by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 157:984–986.

- Chassy BM, Mercenier A, Flickinger J** (1988) Transformation of bacteria by electroporation. *Trends Biotechnol.* 6:303–309.
- Chaturvedi P, Warren CD, Ruiz-Palacios GM, Pickering LK, Newburg DS** (1997) Milk oligosaccharide profiles by reversed-phase HPLC of their perbenzoylated derivatives. *Anal. Biochem.* 251:89–97.
- Chaturvedi P, Warren CD, Altaye M, Morrow AL, Ruiz-Palacios G, Pickering LK, Newburg DS** (2001) Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation. *Glycobiology* 11:365–372.
- Chen X** (2015) Human milk oligosaccharides (HMOs): Structure, function, and enzyme-catalyzed synthesis. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 72:113–190.
- Chen X, Zhou L, Tian K, Kumar A, Singh S, Prior BA, Wang Z** (2013) Metabolic engineering of *Escherichia coli*: A sustainable industrial platform for bio-based chemical production. *Biotechnol. Adv.* 31:1200–1223.
- Cheng C, Gu J, Su J, Ding W, Yin J, Liang W, Yu X, Ma J, Wang PG, Xiao Z, Liu Z-J** (2014) Crystallization, preliminary X-ray crystallographic and cryo-electron microscopy analysis of a bifunctional enzyme fucokinase/L-fucose-1-P-guanylyltransferase from *Bacteroides fragilis*. *Acta Crystallogr. Sect. F, Struct. Biol. Commun.* 70:1206–1210.
- Cherepanov PP, Wackernagel W** (1995) Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R and Km^R cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158:9–14.
- Chernyak A, Oscarson S, Turek D** (2000) Synthesis of the Lewis b hexasaccharide and squarate acid-HSA conjugates thereof with various saccharide loadings. *Carbohydr. Res.* 329:309–316.
- Chin Y-W, Kim J-Y, Lee W-H, Seo J-H** (2015) Enhanced production of 2'-fucosyllactose in engineered *Escherichia coli* BL21star(DE3) by modulation of lactose metabolism and fucosyltransferase. *J. Biotechnol.* 210:107–115.
- Chin Y-W, Park J-B, Park Y-C, Kim KH, Seo J-H** (2013) Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* to produce GDP-L-fucose from glucose and mannose. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 36:749–756.
- Chin Y-W, Seo N, Kim J-H, Seo J-H** (2016) Metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce 2'-fucosyllactose via Salvage pathway of guanosine 5'-diphosphate (GDP)-L-fucose. *Biotechnol. Bioeng.* Im Druck (DOI: 10.1002/bit.26015).
- Choi YH, Kim JH, Park BS, Kim B-G** (2016) Solubilization and iterative saturation mutagenesis of α 1,3-fucosyltransferase from *Helicobacter pylori* to enhance its catalytic efficiency. *Biotechnol. Bioeng.* 113:1666–1675.
- Chung CT, Niemela SL, Miller RH** (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86:2172–2175.

- Cintolesi A, Clomburg JM, Rigou V, Zygourakis K, Gonzalez R** (2012) Quantitative analysis of the fermentative metabolism of glycerol in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 109:187–198.
- Cole ST, Eiglmeier K, Ahmed S, Honore N, Elmes L, Anderson WF, Weiner JH** (1988) Nucleotide sequence and gene-polypeptide relationships of the *glpABC* operon encoding the anaerobic sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 170:2448–2456.
- Coppa G V., Pierani P, Zampini L, Carloni I, Carlucci A, Gabrielli O** (1999) Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation. *Acta. Paediatr. Suppl.* 88:89–94.
- Coppa G V, Zampini L, Galeazzi T, Facinelli B, Ferrante L, Capretti R, Orazio G** (2006) Human milk oligosaccharides inhibit the adhesion to Caco-2 cells of diarrheal pathogens: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, and *Salmonella typhis*. *Pediatr. Res.* 59:377–382.
- Cottaz S, Samain E** (2005) Genetic engineering of *Escherichia coli* for the production of N^I,N^{II}-diacetylchitobiose (chitinbiose) and its utilization as a primer for the synthesis of complex carbohydrates. *Metab. Eng.* 7:311–317.
- Coulet M, Phothirath P, Allais L, Schilter B** (2014) Pre-clinical safety evaluation of the synthetic human milk, nature-identical, oligosaccharide 2'-O-fucosyllactose (2'FL). *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 68:59–69.
- Coyne MJ, Reinap B, Lee MM, Comstock LE** (2005) Human symbionts use a host-like pathway for surface fucosylation. *Science* 307:1778–1781.
- Crasnier-Mednansky M, Park MC, Saier MHJ** (1997) Cra-mediated regulation of *Escherichia coli* adenylate cyclase. *Microbiology* 143:785–792.
- Danchin A** (2009) Cells need safety valves. *BioEssays* 31:769–773.
- Datsenko KA, Wanner BL** (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:6640–6645.
- Death A, Ferenci T** (1994) Between feast and famine: Endogenous inducer synthesis in the adaptation of *Escherichia coli* to growth with limiting carbohydrates. *J. Bacteriol.* 176:5101–5107.
- Dékany G, Agoston K, Bajza I, Boutet J, Bojstrup M, Fanefjord M, Pérez IF, Hederos M, Horvath F, Kovács-Pérez P, Kröger L, Olsson J, Röhrig C** (2010) Synthesis of 2'-O-fucosyllactose. Patentanmeldung. WO2010/115934.
- Deutscher J** (2008) The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 11:87–93.
- Donald AS, Feeney J** (1988) Separation of human milk oligosaccharides by recycling chromatography. First isolation of lacto-N-neo-difucohexaose II and 3'-galactosyllactose from this source. *Carbohydr. Res.* 178:79–91.

- Dong C, Beis K, Nesper J, Brunkan-Lamontagne AL, Clarke BR, Whitfield C, Naismith JH** (2006) Wza the translocon for *E. coli* capsular polysaccharides defines a new class of membrane protein. *Nature* 444:226–229.
- Doudna JA, Charpentier E** (2014) The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346:1258096.
- Dreisewerd K, Kölbl S, Peter-Katalinić J, Berkenkamp S, Pohlentz G** (2006) Analysis of native milk oligosaccharides directly from thin-layer chromatography plates by matrix-assisted laser desorption/ionization orthogonal-time-of-flight mass spectrometry with a glycerol matrix. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 17:139–150.
- Drouillard S, Driguez H, Samain E** (2006) Large-scale synthesis of H-antigen oligosaccharides by expressing *Helicobacter pylori* α 1,2-fucosyltransferase in metabolically engineered *Escherichia coli* cells. *Angew. Chemie Int. Ed. Engl.* 45:1810–1812.
- Drouillard S, Mine T, Kajiwara H, Yamamoto T, Samain E** (2010) Efficient synthesis of 6'-sialyllactose, 6,6'-disialyllactose, and 6'-KDO-lactose by metabolically engineered *E. coli* expressing a multifunctional sialyltransferase from the *Photobacterium sp.* JT-ISH-224. *Carbohydr. Res.* 345:1394–1399.
- Dumon C, Bosso C, Utile JP, Heyraud A, Samain E** (2006) Production of Lewis x tetrasaccharides by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Chembiochem* 7:359–365.
- Dumon C, Priem B, Martin SL, Heyraud A, Bosso C, Samain E** (2001) *In vivo* fucosylation of lacto-N-neotetraose and lacto-N-neohexaose by heterologous expression of *Helicobacter pylori* α -1,3 fucosyltransferase in engineered *Escherichia coli*. *Glycoconj. J.* 18:465–474.
- Dumon C, Samain E, Priem B** (2004) Assessment of the two *Helicobacter pylori* α -1,3-fucosyltransferase ortholog genes for the large-scale synthesis of LewisX human milk oligosaccharides by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 20:412–419.
- Ebel W, Trempey JE** (1999) *Escherichia coli* RcsA, a positive activator of colanic acid capsular polysaccharide synthesis, functions to activate its own expression. *J. Bacteriol.* 181:577–584.
- Elling L, Ritter JE, Verseck S** (1996) Expression, purification and characterization of recombinant phosphomannomutase and GDP- α -D-mannose pyrophosphorylase from *Salmonella enterica*, group B, for the synthesis of GDP- α -D-mannose from D-mannose. *Glycobiology* 6:591–597.
- Endo T, Koizumi S, Tabata K, Ozaki A** (2000) Large-scale production of CMP-NeuAc and sialylated oligosaccharides through bacterial coupling. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53:257–261.
- Engels L, Elling L** (2014) WbgL: A novel bacterial α 1,2-fucosyltransferase for the synthesis of 2'-fucosyllactose. *Glycobiology* 24:170–178.

- Engfer MB, Stahl B, Finke B, Sawatzki G, Daniel H** (2000) Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 71:1589–1596.
- Engler C, Kandzia R, Marillonnet S** (2008) A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One* 3:e3647.
- Eppler T, Eppler T, Postma P, Postma P, Boos W, Boos W** (2002) Glycerol-3-Phosphate-Induced Catabolite Repression in *Escherichia coli*. *Microbiology* 184:3044–3052.
- Erney RM, Malone WT, Skelding MB, Marcon AA, Kleman-Leyer KM, O’Ryan ML, Ruiz-Palacios G, Hilty MD, Pickering LK, Prieto PA** (2000) Variability of human milk neutral oligosaccharides in a diverse population. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 30:181–192.
- Eschenlauer AC, Reznikoff WS** (1991) *Escherichia coli* catabolite gene activator protein mutants defective in positive control of lac operon transcription. *J. Bacteriol.* 173:5024–5029.
- Escherich T** (1886) Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung. Stuttgart: *Ferdinand Enke Verlag*.
- Fajardo DA, Cheung J, Ito C, Sugawara E, Nikaido H, Misra R** (1998) Biochemistry and regulation of a novel *Escherichia coli* K-12 porin protein, OmpG, which produces unusually large channels. *J. Bacteriol.* 180:4452–4459.
- Fernández-Castané A, Vine CE, Caminal G, López-Santín J** (2012) Evidencing the role of lactose permease in IPTG uptake by *Escherichia coli* in fed-batch high cell density cultures. *J. Biotechnol.* 157:391–398.
- Fernandez-Mayoralas A, Martin-Lomas M** (1986) Synthesis of 3- and 2'-fucosyl-lactose and 3,2'-difucosyl-lactose from partially benzylated lactose derivatives. *Carbohydr. Res.* 154:93–101.
- Fierfort N, Samain E** (2008) Genetic engineering of *Escherichia coli* for the economical production of sialylated oligosaccharides. *J. Biotechnol.* 134:261–5.
- Fitzgerald DK, Brodbeck U, Kiyosawa I, Mawal R, Colvin B, Ebner KE** (1970) α -Lactalbumin and the lactose synthetase reaction. *J. Biol. Chem.* 245:2103–2108.
- Fong BY, Ma K, McJarrow P** (2011) Quantification of bovine milk oligosaccharides using liquid chromatography selected reaction monitoring-mass spectrometry. *J. Agric. Food. Chem.* 59:9788–9795.
- Frey PA** (1996) The Leloir pathway: A mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *FASEB J.* 10:461–470.
- Friebs K** (2004) Plasmid copy number and plasmid stability. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 86:47–82.

- Fürste JP, Pansegrau W, Frank R, Blöcker H, Scholz P, Bagdasarian M, Lanka E** (1986) Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range *tacP* expression vector. *Gene* 48:119–131.
- Gabrielli O, Zampini L, Galeazzi T, Padella L, Santoro L, Peila C, Giuliani F, Bertino E, Fabris C, Coppa GV** (2011) Preterm milk oligosaccharides during the first month of lactation. *Pediatrics* 128:e1520–e1531.
- Garrido D, Ruiz-Moyano S, Lemay DG, Sela DA, German JB, Mills DA** (2015) Comparative transcriptomics reveals key differences in the response to milk oligosaccharides of infant gut-associated bifidobacteria. *Sci. Rep.* 5:13517.
- Gauhe A, György P, Hoover JRE, Kuhn R, Rose CS, Ruelius HW, Zilliken F** (1954) Bifidus factor. IV. Preparations obtained from human milk. *Arch. Biochem. Biophys.* 48:214–224.
- Ge Z, Chan NWC, Palcic MM, Taylor DE** (1997) Cloning and heterologous expression of an α 1,3-fucosyltransferase gene from the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* 272:21357–21363.
- Gerdes S, Scholle MD, Campbell JW, Balázs G, Ravasz E, Daugherty MD, Somera AL, Kyrpides NC, Anderson I, Gelfand MS, Bhattacharya A, Kapatral V, D'Souza M, Baev M V, Grechkin Y, Mseeh F, Fonstein M, Overbeek R, Barabási A-L, Oltvai ZN, Osterman AL** (2003) Experimental determination and system level analysis of essential genes in *Escherichia coli* MG1655. *J. Bacteriol.* 185:5673–5684.
- Geu-Flores F, Nour-Eldin HH, Nielsen MT, Halkier BA** (2007) USER fusion: A rapid and efficient method for simultaneous fusion and cloning of multiple PCR products. *Nucleic Acids Res.* 35:e55.
- Ghalambor MA, Heath EC** (1962) The metabolism of L-fucose: II. The enzymatic cleavage of L-fuculose 1-phosphate. *J. Biol. Chem.* 237:2427–2433.
- Gibson DG, Young L, Chuang R-Y, Venter JC, Hutchison C a, Smith HO, Iii CAH, America N** (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* 6:343–345.
- Gibson GR, Roberfroid MB** (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125:1401–1412.
- Gilbert M, Bayer R, Cunningham A-M, DeFrees S, Gao Y, Watson DC, Young NM, Wakarchuk WW** (1998) The synthesis of sialylated oligosaccharides using a CMP-Neu5Ac synthetase/sialyltransferase fusion. *Nat. Biotechnol.* 16:769–772.
- Gnoth MJ, Kunz C, Kinne-Saffran E, Rudloff S** (2000) Human milk oligosaccharides are minimally digested *in vitro*. *J. Nutr.* 130:3014–3020.
- Gnoth MJ, Rudloff S, Kunz C, Kinne RKH** (2001) Investigations of the *in vitro* transport of human milk oligosaccharides by a Caco-2 monolayer using a novel high performance liquid chromatography-mass spectrometry technique. *J. Biol. Chem.* 276:34363–34370.

- Goehring KC, Kennedy AD, Prieto PA, Buck RH** (2014) Direct evidence for the presence of human milk oligosaccharides in the circulation of breastfed infants. *PLoS One* 9:e101692.
- Gonzalez R, Murarka A, Dharmadi Y, Yazdani SS** (2008) A new model for the anaerobic fermentation of glycerol in enteric bacteria: Trunk and auxiliary pathways in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 10:234–245.
- Gotschlich E** (1994) Genetic locus for the biosynthesis of the variable portion of *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharide. *J. Exp. Med.* 180:2181–2190.
- Gottesman S, Stout V** (1991) Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K12. *Mol. Microbiol.* 5:1599–1606.
- Gottlieb K, Albermann C, Sprenger GA** (2014) Improvement of L-phenylalanine production from glycerol by recombinant *Escherichia coli* strains: The role of extra copies of *glpK*, *glpX*, and *tktA* genes. *Microb. Cell Fact.* 13:96.
- Green M, Cohen SS** (1956) Enzymatic conversion of L-fucose to L-fuculose. *J. Biol. Chem.* 219:557–568.
- Gu P, Yang F, Su T, Wang Q, Liang Q, Qi Q** (2015) A rapid and reliable strategy for chromosomal integration of gene(s) with multiple copies. *Sci. Rep.* 5:9684.
- Hale TW, Hartmann PE** (2007) Textbook of human lactation. Amarillo, USA: Hale Publishing.
- Han NS, Kim T-J, Park Y-C, Kim J, Seo J-H** (2012) Biotechnological production of human milk oligosaccharides. *Biotechnol. Adv.* 30:1268–1278.
- Hanahan D** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557–580.
- Hayashi K, Morooka N, Yamamoto Y, Fujita K, Isono K, Choi S, Ohtsubo E, Baba T, Wanner BL, Mori H, Horiuchi T** (2006) Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Mol. Syst. Biol.* 2:2006.0007.
- Heath EC, Ghalambor MA** (1962) The Metabolism of L-Fucose: I. The Purification and Properties of L-Fuculose Kinase. *J. Biol. Chem.* 237:2423–2426.
- Heller KB, Lin EC, Wilson TH** (1980) Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 144:274–278.
- Henderson PJ, Giddens RA, Jones-Mortimer MC** (1977) Transport of galactose, glucose and their molecular analogues by *Escherichia coli* K12. *Biochem. J.* 162:309–320.
- Hermansson K, Jansson P-E, Kenne L, Widmalm G, Lindh F** (1992) A ¹H and ¹³C NMR study of oligosaccharides from human milk. Application of the computer program CASPER. *Carbohydr. Res.* 235:69–81.
- Hernández-Montalvo V, Martínez A, Hernández-Chavez G, Bolivar F, Valle F, Gosset G** (2003) Expression of *galP* and *glk* in a *Escherichia coli* PTS mutant restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation products. *Biotechnol. Bioeng.* 83:687–694.

- Hong P, Niñonuevo MR, Lee B, Lebrilla C, Bode L** (2009) Human milk oligosaccharides reduce HIV-1-gp120 binding to dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN). *Br. J. Nutr.* 101:482–486.
- Hong Q, Ruhaak LR, Totten SM, Smilowitz JT, German JB, Lebrilla CB** (2014) Label-free absolute quantitation of oligosaccharides using multiple reaction monitoring. *Anal. Chem.* 86:2640–2647.
- Hounsell EF, Jones NJ, Gooi HC, Feizi T, Donald A, Feeney J** (1988) 500-MHz ¹H-N.M.R. and conformational studies of fucosyloligosaccharides recognised by monoclonal antibodies with specificities related to Le^a, Le^b, and SSEA-1. *Carbohydr. Res.* 178:67–78.
- Hsu Y, Lu X-A, Zulueta MML, Tsai C-M, Lin K-I, Hung S-C, Wong C-H** (2012) Acyl and silyl group effects in reactivity-based one-pot glycosylation: Synthesis of embryonic stem cell surface carbohydrates Lc₄ and IV²Fuc-Lc₄. *J. Am. Chem. Soc.* 134:4549–4552.
- Huang CJ, Lin H, Yang XM** (2012) Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39:383–399.
- Hudson JM, Fried MG** (1990) Co-operative interactions between the catabolite gene activator protein and the *lac* repressor at the lactose promoter. *J. Mol. Biol.* 214:381–396.
- Hüfner E, Parkot J, Jennewein S** (2011) Synthesis of fucosylated compounds. Patent. US2011/0300584.
- Ichikawa Y, Wong C-H** (1991) Enzyme-catalyzed synthesis of sialyl oligosaccharide with *in situ* regeneration of CMP-sialic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 113:4698–4700.
- Inada T, Kimata K, Aiba H** (1996) Mechanism responsible for glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*: Challenge to the cAMP model. *Genes to Cells* 1:293–301.
- Ishizuka Y, Nemoto T, Fujiwara M, Fujita K, Nakanishi H** (1999) Three-dimensional structure of fucosyllactoses in an aqueous solution. *J. Carbohydr. Chem.* 18:523–533.
- Itoh N, Matsuda M, Mabuchi M, Dairi T, Wang J** (2002) Chiral alcohol production by NADH-dependent phenylacetaldehyde reductase coupled with *in situ* regeneration of NADH. *Eur. J. Biochem.* 269:2394–2402.
- Jantscher-Krenn E, Lauwaet T, Bliss LA, Reed SL, Gillin FD, Bode L** (2012) Human milk oligosaccharides reduce *Entamoeba histolytica* attachment and cytotoxicity *in vitro*. *Br. J. Nutr.* 108:1839–1846.
- Jenkins G, Bradbury J** (1984) Determination of the structures of fucosyl-lactose and difucosyl-lactose from the milk of monotremes, using ¹³C-n.m.r. spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 126:157–161.
- Jennewein S, Hüfner E, Parkot J** (2010) HMO Synthesis. Patentanmeldung. WO2010/142305.

- Jennings MP, Hood DW, Peak IR, Virji M, Moxon ER** (1995) Molecular analysis of a locus for the biosynthesis and phase-variable expression of the lacto-N-neotetraose terminal lipopolysaccharide structure in *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* 18:729–740.
- Jennum CA, Fenger TH, Bruun LM, Madsen R** (2014) One-pot glycosylations in the synthesis of human milk oligosaccharides. *European J. Org. Chem.* 2014:3232–3241.
- Jeong H, Barbe V, Lee CH, Vallenet D, Yu DS, Choi S-H, Couloux A, Lee S-W, Yoon SH, Cattolico L, Hur C-G, Park HS, Ségurens B, Kim SC, Oh TK, Lenski RE, Studier FW, Daegelen P, Kim JF** (2009) Genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3). *J. Mol. Biol.* 394:644–652.
- Jiang X, Huang P, Zhong W, Tan M, Farkas T, Morrow AL, Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Pickering LK** (2004) Human milk contains elements that block binding of noroviruses to human histo-blood group antigens in saliva. *J. Infect. Dis.* 190:1850–1859.
- Jiang X, Villafuerte MKR, Andersson M, White SH, Kaback RH** (2014) Galactoside-binding site in LacY. *Biochemistry* 53:1536–1543.
- Jiang Y, Chen B, Duan C, Sun B, Yang J, Yang S** (2015) Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system. *Appl. Environ. Microbiol.* 81:2506–2515.
- Jin RZ, Lin EC** (1984) An inducible phosphoenolpyruvate:dihydroxyacetone phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 130:83–88.
- Johnson KF** (1999) Synthesis of oligosaccharides by bacterial enzymes. *Glycoconj. J.* 146:141–146.
- Jones KL, Kim S-W, Keasling JD** (2000) Low-copy plasmids can perform as well as or better than high-copy plasmids for metabolic engineering of bacteria. *Metab. Eng.* 2:328–338.
- Jurzitza L** (2013) Konstruktion und Charakterisierung eines *E. coli* Stammes zur Ganzzellsynthese von 3-Fucosyllactose. Diplomarbeit. Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart.
- Kaback RH** (1983) The Lac carrier protein in *Escherichia coli*. *J. Membr. Biol.* 76:95–112.
- Kataoka Y, Ozeki S, Miyake K, Iijima S** (2006) Functional expression of streptococcal galactosyltransferase in baculovirus/insect cell expression system. *J. Biosci. Bioeng.* 101:372–375.
- Katayama T** (2016) Host-derived glycans serve as selected nutrients for the gut microbe: Human milk oligosaccharides and bifidobacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80:621–632.
- Katayama T, Sakuma A, Kimura T, Makimura Y, Hiratake J, Sakata K, Yamanoi T, Kumagai H, Yamamoto K** (2004) Molecular cloning and characterization of *Bifidobacterium bifidum* 1,2- α -L-fucosidase (AfcA), a novel inverting glycosidase (Glycoside Hydrolase Family 95). *J. Bacteriol.* 186:4885–4893.

- Kaufman RL, Ginsburg V** (1968) The metabolism of L-fucose by HeLa cells. *Exp. Cell Res.* 50:127–132.
- Keseler IM, Mackie A, Peralta-Gil M, Santos-Zavaleta A, Gama-Castro S, Bonavides-Martinez C, Fulcher C, Huerta AM, Kothari A, Krummenacker M, Latendresse M, Muniz-Rascado L, Ong Q, Paley S, Schroder I, Shearer AG, Subhraveti P, Travers M, Weerasinghe D, Weiss V, Collado-Vides J, Gunsalus RP, Paulsen I, Karp PD** (2013) EcoCyc: fusing model organism databases with systems biology. *Nucleic Acids Res.* 41:D605–D612.
- Khan L** (2012) Konstruktion und Optimierung eines *Escherichia coli* Stammes zur heterologen *in vivo* Synthese von 2'-Fucosyllactose. Studienarbeit. Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart.
- Kitagawa H, Nakada H, Numata Y, Kurosaka A, Fukui S, Funakoshi I, Kawasaki T, Shimada I, Inagaki F, Yamashina I** (1990) Occurrence of tetra- and pentasaccharides with the sialyl-Le(a) structure in human milk. *J. Biol. Chem.* 265:4859–4862.
- Knuhr P, Castro-palomino J, Grathwohl M, Schmidt RR** (2001) Complex structures of antennary human milk oligosaccharides synthesis of a branched octasaccharide. *Eur. J. Org. Chem.* 2001:4239–4246.
- Kobata A** (2010) Structures and application of oligosaccharides in human milk. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 86:731–747.
- Kobata A, Ginsburg V, Tsuda M** (1969) Oligosaccharides of human milk - I. Isolation and characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* 130:509–513.
- Koebnik R, Locher KP, van Gelder P** (2000) Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol. Microbiol.* 37:239–253.
- Koizumi S, Endo T, Tabata K, Nagano H, Ohnishi J, Ozaki A** (2000) Large-scale production of GDP-fucose and Lewis X by bacterial coupling. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 25:213–217.
- Kuhn R, Baer H** (1956) Die Konstitution der Lacto-N-tetraose. *Chem. Ber.* 89:504–511.
- Kuhn R, Baer HH, Gauhe A** (1956a) Kristallisierte Fucosido-lactose. *Chem. Ber.* 89:2513.
- Kuhn R, Baer HH, Gauhe A** (1956b) Kristallisation und Konstitutionsermittlung der Lacto-N-fucopentaose I. *Chem. Ber.* 89:2514–2523.
- Kuhn R, Gauhe A** (1960) Über ein kristallisiertes, Le^a-aktives Hexasaccharid aus Frauenmilch. *Chem. Ber.* 93:647–651.
- Kuhn R, Helmut H, Gauhe A** (1955) Fucosido-Lactose: Das Trisaccharid der Frauenmilch. *Chem. Ber.* 88:1135–1146.
- Kuntz S, Kunz C, Rudloff S** (2009) Oligosaccharides from human milk induce growth arrest via G2/M by influencing growth-related cell cycle genes in intestinal epithelial cells. *Br. J. Nutr.* 101:1306–1315.

- Kuntz S, Rudloff S, Kunz C** (2008) Oligosaccharides from human milk influence growth-related characteristics of intestinally transformed and non-transformed intestinal cells. *Br. J. Nutr.* 99:462–471.
- Kunz C** (2012) Historical aspects of human milk oligosaccharides. *Adv. Nutr.* 3:430S–439S.
- Kunz C, Rudloff S, Baier W, Klein N, Strobel S** (2000) Oligosaccharides in human milk: Structural, functional, and metabolic aspects. *Annu. Rev. Nutr.* 20:699–722.
- Kunz C, Rudloff S, Hintelmann A, Pohlentz G, Egge H** (1996) High-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection and molar response factors of human milk oligosaccharides. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* 685:211–221.
- Kunz C, Rudloff S, Schad W, Braun D** (1999) Lactose-derived oligosaccharides in the milk of elephants: comparison with human milk. *Br. J. Nutr.* 82:391–399.
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Lairson LL, Henrissat B, Davies GJ, Withers SG** (2008) Glycosyltransferases: Structures, functions, and mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* 77:521–555.
- Lay L, Manzoni L, Schmidt RR** (1998) Synthesis of N-acetylglucosamine containing Lewis A and Lewis X building blocks based on N-tetrachlorophthaloyl protection - synthesis of Lewis X pentasaccharide. *Carbohydr. Res.* 310:157–171.
- Lederberg J** (1950) The Beta-D-galactosidase of *Escherichia coli*, Strain K-12. *J. Bacteriol.* 60:381–392.
- Lee SJ, Trostel A, Le P, Harinarayanan R, Fitzgerald PC, Adhya S** (2009a) Cellular stress created by intermediary metabolite imbalances. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:19515–19520.
- Lee WH, Kim JW, Park EH, Han NS, Kim MD, Seo JH** (2013) Effects of NADH kinase on NADPH-dependent biotransformation processes in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97:1561–1569.
- Lee W-H, Chin Y-W, Han NS, Kim M-D, Seo J-H** (2011) Enhanced production of GDP-L-fucose by overexpression of NADPH regenerator in recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91:967–976.
- Lee W-H, Han N-S, Park Y-C, Seo J-H** (2009b) Modulation of guanosine 5'-diphosphate-D-mannose metabolism in recombinant *Escherichia coli* for production of guanosine 5'-diphosphate-L-fucose. *Bioresour. Technol.* 100:6143–6148.
- Lee W-H, Pathanibul P, Quarterman J, Jo J-H, Han NS, Miller MJ, Jin Y-S, Seo J-H** (2012a) Whole cell biosynthesis of a functional oligosaccharide, 2'-fucosyllactose, using engineered *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* 11:48.
- Lee W-H, Shin S-Y, Kim M-D, Han NS, Seo J-H** (2012b) Modulation of guanosine nucleotides biosynthetic pathways enhanced GDP-L-fucose production in recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93:2327–2334.

- Van Leeuwen SS, Schoemaker RJW, Gerwig GJ, van Leusen-van Kan EJM, Dijkhuizen L, Kamerling JP** (2014) Rapid milk group classification by ^1H NMR analysis of Le and H epitopes in human milk oligosaccharide donor samples. *Glycobiology* 24:728–739.
- Lemuth K, Steuer K, Albermann C** (2011) Engineering of a plasmid-free *Escherichia coli* strain for improved *in vivo* biosynthesis of astaxanthin. *Microb. Cell Fact.* 10:29.
- Leo F, Asakuma S, Nakamura T, Fukuda K, Senda A, Urashima T** (2009) Improved determination of milk oligosaccharides using a single derivatization with anthranilic acid and separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1216:1520–1523.
- Levy DE, Fügedi P** (2005) The organic chemistry of sugars. Boca Raton, USA: CRC Press.
- Lewendon A, Ellis J, Shaw WV** (1995) Structural and mechanistic studies of galactoside acetyltransferase, the *Escherichia coli lacA* gene product. *J. Biol. Chem.* 270:26326–26331.
- Lewis M** (2005) The *lac* repressor. *C. R. Biol.* 328:521–548.
- Li MZ, Elledge SJ** (2007) Harnessing homologous recombination *in vitro* to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat. Methods* 4:251–256.
- Li X, Thomason LC, Sawitzke JA, Costantino N, Court DL** (2013) Positive and negative selection using the *tetA-sacB* cassette: Recombineering and P1 transduction in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 41:e204.
- Li Y, Lin Z, Huang C, Zhang Y, Wang Z** (2015) Metabolic engineering of *Escherichia coli* using CRISPR-Cas9 mediated genome editing. *Metab. Eng.* 31:13–21.
- Lim HG, Seo SW, Jung GY** (2013) Engineered *Escherichia coli* for simultaneous utilization of galactose and glucose. *Bioresour. Technol.* 135:564–567.
- Liu JY, Miller PF, Gosink M, Olson ER** (1999) The identification of a new family of sugar efflux pumps in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 31:1845–1851.
- Liu X-W, Xia C, Li L, Guan W-Y, Pettit N, Zhang H, Chen M, Wang PG** (2009) Characterization and synthetic application of a novel β 1,3-galactosyltransferase from *Escherichia coli* O55:H7. *Bioorg. Med. Chem.* 17:4910–4915.
- Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B** (2014) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* 42:490–495.
- Love KR, Seeberger PH** (2005) Solution syntheses of protected type II Lewis blood group oligosaccharides: Study for automated synthesis. *J. Org. Chem.* 70:3168–3177.
- Lu D, Grayson P, Schulten K** (2003) Glycerol conductance and physical asymmetry of the *Escherichia coli* glycerol facilitator GlpF. *Biophys. J.* 85:2977–2987.
- Ma B, Simala-Grant JL, Taylor DE** (2006) Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes. *Glycobiology* 16:158R–184R.

- Magalhães PO, Lopes AM, Mazzola PG, Rangel-Yagui C, Penna TC V, Pessoa A (2007)** Methods of endotoxin removal from biological preparations: A review. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 10:388–404.
- Mamat U, Woodard RW, Wilke K, Souvignier C, Mead D, Steinmetz E, Terry K, Kovacich C, Zegers A, Knox C (2013)** Endotoxin-free protein production-ClearColi™ Technology. *Nat. Methods* 10:iii–iv.
- Manthey CF, Autran CA, Eckmann L, Bode L (2014)** Human milk oligosaccharides protect against enteropathogenic *Escherichia coli* attachment *in vitro* and EPEC colonization in suckling mice. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 58:165–168.
- Manzoni L, Lay L, Schmidt RR (1998)** Synthesis of Lewis a and Lewis X pentasaccharides based on N-trichloroethoxycarbonyl protection. *J. Carbohydr. Chem.* 17:739–758.
- Marcobal A, Barboza M, Froehlich JW, Block DE, German JB, Lebrilla CB, Mills DA (2010)** Consumption of human milk oligosaccharides by gut-related microbes. *J. Agric. Food Chem.* 58:5334–5340.
- Marcobal A, Barboza M, Sonnenburg ED, Pudlo N, Martens EC, Desai P, Lebrilla CB, Weimer BC, Mills DA, German JB, Sonnenburg JL (2011)** *Bacteroides* in the infant gut consume milk oligosaccharides via mucus-utilization pathways. *Cell Host Microbe* 10:507–514.
- Marisch K, Bayer K, Scharl T, Mairhofer J, Krempl PM, Hummel K, Razzazi-Fazeli E, Striedner G (2013)** A comparative analysis of industrial *Escherichia coli* K-12 and B strains in high-glucose batch cultivations on process-, transcriptome- and proteome level. *PLoS One* 8:e70516.
- Martin SL, Edbrooke MR, Hodgman TC, van den Eijnden DH, Bird MI (1997)** Lewis X biosynthesis in *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* 272:21349–21356.
- Martinez-Ferez A, Rudloff S, Guadix A, Henkel CA, Pohlentz G, Boza JJ, Guadix EM, Kunz C (2006)** Goats' milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: Isolation by membrane technology. *Int. Dairy J.* 16:173–181.
- Mattila P, Rabinä J, Hortling S, Helin J, Renkonen R (2000)** Functional expression of *Escherichia coli* enzymes synthesizing GDP-L-fucose from inherent GDP-D-mannose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Glycobiology* 10:1041–1047.
- Matwiejuk M, Chassagne P, Osztrovszky G, Horváth F, Dekany G (2015)** Separation of 2'-O-fucosyllactose from fermentation broth. Patentanmeldung, WO2015/188834.
- Messer M, Gadiel PA, Ralston GB, Griffiths M (1983)** Carbohydrates of the milk of the platypus. *Aust. J. Biol. Sci.* 36:129–137.
- Messer M, Kerry KR (1973)** Milk carbohydrates of the echidna and the platypus. *Science* 180:201–203.
- Meyer H, Werbitzky O (2011)** How Green can the industry become with biotechnology? In: Tao, J, Kazlauskas, R, editors. *Biocatal. Green Chem. Chem. Process Dev.* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., Seiten 23–43.

- Miyazaki T, Sato T, Furukawa K, Ajisaka K** (2010) Enzymatic synthesis of lacto-N-difucohexaose I which binds to *Helicobacter pylori*. *Methods Enzymol.* 480:511–524.
- Montreuil J** (1956) Structure de deux triholosides isolés du lait de femme. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 242:192–193.
- Moro E** (1900) Morphologie und bakteriologische Untersuchungen über die Darmbakterien des Säuglings: Die Bakterien-Flora des normalen Frauenmilchstuhls. *Jahrb. f. Kinderheilk.* 61:686–734.
- Morrison DC, Ulevitch RJ** (1978) The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. *Am. J. Pathology* 93:527–618.
- Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, Jiang X, Guerrero L, Meinzer-Derr JK, Farkas T, Chaturvedi P, Pickering LK, Newburg DS** (2004) Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. *J. Pediatr.* 145:297–303.
- Mullis KB, Faloona FA** (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335–350.
- Murata T, Inukai T, Suzuki M, Yamagishi M, Usui T** (1999) Facile enzymatic conversion of lactose into lacto-N-tetraose and lacto-N-neotetraose. *Glycoconj. J.* 16:189–195.
- Murray EL, Conway T** (2005) Multiple regulators control expression of the Entner-Doudoroff aldolase (Eda) of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187:991–1000.
- Musumeci M, Simpoire J, D'Agata A, Sotgiu S, Musumeci S** (2006) Oligosaccharides in colostrum of Italian and Burkinabe women. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 43:372–378.
- Neidhardt FC, Curtiss R, Ingraham JL, Lin ECC, Low Jr KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE** (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular Biology 2nd ed. Washington D.C., USA: American Society for Microbiology.
- Nelson SO, Wright JK, Postma PW** (1983) The mechanism of inducer exclusion. Direct interaction between purified III^{Glc} of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system and the lactose carrier of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 2:715–720.
- Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, Chaturvedi P, Meinzen-Derr J, Guerrero MDL, Morrow AL** (2004) Innate protection conferred by fucosylated oligosaccharides of human milk against diarrhea in breastfed infants. *Glycobiology* 14:253–263.
- Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Morrow AL** (2005) Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Annu. Rev. Nutr.* 25:37–58.
- Newburg DS, Tanritanir AC, Chakrabarti S** (2016) Lactodifuco-tetraose, a human milk oligosaccharide, attenuates platelet function and inflammatory cytokine release. *J. Thromb. Thrombolysis* 42:46–55.

- Nguyen TTH, Kim JW, Park JS, Hwang KH, Jang TS, Kim CH, Kim D** (2016) Identification of oligosaccharides in human milk bound onto the toxin a carbohydrate binding site of *Clostridium difficile*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26:659–665.
- Ni Y, Chen R** (2009) Extracellular recombinant protein production from *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 31:1661–1670.
- Ni Y, Reye J, Chen RR** (2007) *lpp* deletion as a permeabilization method. *Biotechnol. Bioeng.* 97:1347–1356.
- Nikaido H** (2003) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:593–656.
- Niñonuevo MR, Park Y, Yin H, Zhang J, Ward RE, Clowers BH, German JB, Freeman SL, Killeen K, Grimm R, Lebrilla CB** (2006) A strategy for annotating the human milk glycome. *J. Agric. Food Chem.* 54:7471–7480.
- Pacheco AR, Barile D, Underwood MA, Mills DA** (2015) The impact of the milk glycobiome on the neonate gut microbiota. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 3:419–445.
- Pan JG, Rhee JS, Lebeault JM** (1987) Physiological constraints in increasing biomass concentration of *Escherichia coli* B in fed-batch culture. *Biotechnol. Lett.* 9:89–94.
- Pao SS, Paulsen IT, Saier MH** (1998) Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1–34.
- Park JE, Lee K-Y, Do S-I, Lee SS** (2002) Expression and characterization of β -1,4-galactosyltransferase from *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Biochem. Mol. Biol.* 35:330–336.
- Parkot J, Hübner E, Jennewein S** (2012) Novel Fucosyltransferases and their applications. Patentanmeldung. WO2012/049083.
- Payne SM, Ames BN** (1982) A procedure for rapid extraction and high-pressure liquid chromatographic separation of the nucleotides and other small molecules from bacterial cells. *Anal. Biochem.* 123:151–161.
- Pelletier M, Barker WA, Hakes DJ, Zopf DA** (2004) Methods for producing sialyloligosaccharides in a dairy source. Patent. US6706497.
- Perret S, Sabin C, Dumon C, Pokorná M, Gautier C, Galanina O, Ilia S, Bovin N, Nicaise M, Desmadril M, Gilboa-Garber N, Wimmerová M, Mitchell EP, Imberty A** (2005) Structural basis for the interaction between human milk oligosaccharides and the bacterial lectin PA-IIL of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. J.* 389:325–332.
- Peterson R, Cheah WY, Grinyer J, Packer N** (2013) Glycoconjugates in human milk: protecting infants from disease. *Glycobiology* 23:1425–1438.
- Petschacher B, Nidetzky B** (2016) Biotechnological production of fucosylated human milk oligosaccharides: Prokaryotic fucosyltransferases and their use in biocatalytic cascades or whole cell conversion systems. *J. Biotechnol.* Im Druck (DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.03.052)

- Piepersberg W, Distler J, Albermann C** (1997) Method for enzymatically producing guanosine diphosphate-6-desoxyhexoses and the use thereof for producing oligosaccharides. Patentanmeldung. WO9909180.
- Plante OJ, Palmacci ER, Seeberger PH** (2001) Automated solid-phase synthesis of oligosaccharides. *Science* 291:1523–1527.
- Platzer N, Davoust D** (1989) Structural analysis of five lactose-containing oligosaccharides by improved, high-resolution, two-dimensional $^1\text{H-N.M.R}$ spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 191:191–207.
- Podolny V, Lin ECC, Hochschild A** (1999) A cyclic AMP receptor protein mutant that constitutively activates an *Escherichia coli* promoter disrupted by an IS5 insertion. *J. Bacteriol.* 181:7457–7463.
- Polonovski M** (1932) Les glucides du lait de femme. *Lait* 12:738–748.
- Polonovski M, Lespagnol A** (1930) Sur l'existence de plusieurs glucides dans le lactoserum de femme. *C. R. Soc. Biol.* 104:555–557.
- Polonovski M, Lespagnol A** (1931) Sur deux nouveaux sucres du lait de femme, le gynolactose et l'allolactose. *C. R. Acad. Sci.* 192:1319.
- Polonovsky M, Lespagnol A** (1929) Sur la nature glucidique de la substance levogyre du lait de femme. *Bull. Soc. Biol.* 101:61–63.
- Polonovsky M, Lespagnol A** (1933) Nouvelles acquisitions sur les composés glucidiques du lait de femme. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 15:320–349.
- Postma PW, Lengeler JW, Jacobson GR** (1993) Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57:543–594.
- Priem B, Gilbert M, Wakarchuk WW, Heyraud A, Samain E** (2002) A new fermentation process allows large-scale production of human milk oligosaccharides by metabolically engineered bacteria. *Glycobiology* 12:235–240.
- Pyne ME, Moo-Young M, Chung DA, Perry C** (2015) Coupling the CRISPR/Cas9 system to lambda Red recombineering enables simplified chromosomal gene replacement in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 81:5103–5114.
- Rabbani S, Corona F, Ernst B** (2009) Biochemical characterization of *Helicobacter pylori* α -1,4 fucosyltransferase: Metal ion requirement, donor substrate specificity and organic solvent stability. *Biometals* 22:1011–1017.
- Rabbani S, Miksa V, Wipf B, Ernst B** (2005) Molecular cloning and functional expression of a novel *Helicobacter pylori* α -1,4 fucosyltransferase. *Glycobiology* 15:1076–1083.
- Ramakrishnan B, Boeggeman E, Qasba PK** (2002) Breakthroughs and views: β -1,4-galactosyltransferase and lactose synthase: Molecular mechanical devices. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291:1113–1118.
- Reddy P, Kamireddi M** (1998) Modulation of *Escherichia coli* adenylyl cyclase activity by catalytic-site mutants of protein IIA^{Glc} of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* 180:732–736.

- Reisch CR, Prather KLJ** (2015) The no-SCAR (Scarless Cas9 Assisted Recombineering) system for genome editing in *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* 5:15096.
- Richey DP, Lin EC** (1972) Importance of facilitated diffusion for effective utilization of glycerol by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 112:784–790.
- Rose CS, Kuhn R, Zilliken F, György P** (1954) Bifidus factor. V. The activity of α - and β -methyl-N-acetyl-D-glucosamines. *Arch. Biochem. Biophys.* 49:123–129.
- Routenberg Love K, Seeberger PH** (2004) Automated solid-phase synthesis of protected tumor-associated antigen and blood group determinant oligosaccharides. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 43:602–605.
- Rudloff S, Obermeier S, Borsch C, Pohlentz G, Hartmann R, Brösicke H, Lentze MJ, Kunz C** (2006) Incorporation of orally applied ^{13}C -galactose into milk lactose and oligosaccharides. *Glycobiology* 16:477–487.
- Rudloff S, Pohlentz G, Borsh C, Lentze MJ, Kunz C** (2012) Urinary excretion of *in vivo* ^{13}C -labelled milk oligosaccharides in breastfed infants. *Br. J. Nutr.* 107:957–963.
- Ruffing A, Chen RR** (2006) Metabolic engineering of microbes for oligosaccharide and polysaccharide synthesis. *Microb. Cell Fact.* 5:25.
- Ruhaak LR, Steenvoorden E, Koeleman CAM, Deelder AM, Wuhrer M** (2010) 2-Picoline-borane: A non-toxic reducing agent for oligosaccharide labeling by reductive amination. *Proteomics* 10:2330–2336.
- Ruiz-Moyano S, Totten SM, Garrido DA, Smilowitz JT, German JB, Lebrilla CB, Mills DA** (2013) Variation in consumption of human milk oligosaccharides by infant-gut associated strains of *Bifidobacterium breve*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:6040–6049.
- Sabharwal H, Nilsson B, Chester MA, Sjöblad S, Lundblad A** (1984) Blood group specific oligosaccharides from faeces of a blood group a breast-fed infant. *Mol. Immunol.* 21:1105–1112.
- Sabharwal H, Nilsson B, Grönberg G, Chester MA, Dakour J, Sjöblad S, Lundblad A** (1988) Oligosaccharides from feces of preterm infants fed on breast milk. *Arch. Biochem. Biophys.* 265:390–406.
- Sakurama H, Fushinobu S, Hidaka M, Yoshida E, Honda Y, Ashida H, Kitaoka M, Kumagai H, Yamamoto K, Katayama T** (2012) 1,3-1,4- α -L-fucosynthase that specifically introduces Lewis a/x antigens into type-1/2 chains. *J. Biol. Chem.* 287:16709–16719.
- Sambrook J, Russell DW** (2001) Molecular cloning - A laboratory manual 3rd. ed. Cold Spring Harbor, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sauerzapfe B, Namdjou D-J, Schumacher T, Linden N, Křenek K, Křen V, Elling L** (2008) Characterization of recombinant fusion constructs of human β 1,4-galactosyltransferase 1 and the lipase pre-propeptide from *Staphylococcus hyicus*. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 50:128–140.

- Saumonneau A, Champion E, Peltier-Pain P, Molnar-Gabor D, Hendrickx J, Tran V, Hederos M, Dekany G** (2015) Design of an α -L-transfucosidase for the synthesis of fucosylated HMOs. *Glycobiology* 26:261–269.
- Såwén E, Stevansson B, Östervall J, Maliniak A, Widmalm G** (2011) Molecular conformations in the pentasaccharide LNF-1 derived from NMR spectroscopy and molecular dynamics simulations. *J. Physical Chem. B* 115:7109–7121.
- Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B** (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409:258–268.
- Schmidt D, Thiem J** (2010) Chemical synthesis using enzymatically generated building units for construction of the human milk pentasaccharides sialyllacto-N-tetraose and sialyllacto-N-neotetraose epimer. *Beilstein J. Org. Chem.* 6:18.
- Schönfeld H** (1926) Über die Beziehungen der einzelnen Bestandteile der Frauenmilch zur Bifidusflora. *Jahrb. f. Kinderheilk.* 113:19–60.
- Schryvers A, Lohmeier E, Weiner JH** (1978) Chemical and functional properties of the native and reconstituted forms of the membrane-bound, aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 253:783–788.
- Seemann JE, Schulz GE** (1997) Structure and mechanism of L-Fucose isomerase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 273:256–268.
- Shafer WM, Datta A, Kolli VSK, Rahman MM, Balthazar JT, Martin LE, Veal WL, Stephens DS, Carlson R** (2002) Phase variable changes in genes *lgtA* and *lgtC* within the *lgtABCDE* operon of *Neisseria gonorrhoeae* can modulate gonococcal susceptibility to normal human serum. *J. Endotoxin Res.* 8:47–58.
- Shen Z, Warren CD, Newburg DS** (2000) High-performance capillary electrophoresis of sialylated oligosaccharides of human milk. *Anal. Biochem.* 279:37–45.
- Sherman AA, Yudina ON, Mironov Y V, Sukhova E V, Shashkov AS, Menshov VM, Nifantiev E** (2001) Study of glycosylation with N-trichloroacetyl-D-glucosamine derivatives in the syntheses of the spacer-armed pentasaccharides sialyl lacto-N-neotetraose and sialyl lacto-N-tetraose, their fragments, and analogues. *Carbohydr. Res.* 336:13–46
- Shimizu H, Ito Y, Kanie O, Ogawa T** (1996) Solid phase synthesis of polylactosamine oligosaccharide. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 6:3841–2846.
- Smilowitz JT, Lebrilla CB, Mills DA, German JB, Freeman SL** (2014) Breast milk oligosaccharides: Structure-function relationships in the neonate. *Annu. Rev. Nutr.* 34:143–169.
- Smirnova IN, Kaback HR** (2003) A mutation in the lactose permease of *Escherichia coli* that decreases conformational flexibility and increases protein stability. *Biochemistry* 42:3025–3031.
- Stein DB, Lin Y-N, Lin C-H** (2008) Characterization of *Helicobacter pylori* α 1,2-fucosyltransferase for enzymatic synthesis of tumor-associated antigens. *Adv. Synth. Catal.* 350:2313–2321.

- Steinsiek S, Bettenbrock K** (2012) Glucose transport in *Escherichia coli* mutant strains with defects in sugar transport systems. *J. Bacteriol.* 194:5897–5908.
- Stevenson G, Andrianopoulos K, Hobbs M, Reeves PR** (1996) Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *J. Bacteriol.* 178:4885–4893.
- Stevenson G, Lee SJ, Romana LK, Reeves PR** (1991) The *cps* gene cluster of *Salmonella* strain LT2 includes a second mannose pathway: Sequence of two genes and relationship to genes in the *rfb* gene cluster. *Mol. Gen. Genet.* 227:173–180.
- Strecker G, Wieruszkeski J-M, Michalski J-C, Montreuil J** (1989) Assignment of the ¹H- and ¹³C-NMR spectra of eight oligosaccharides of the lacto-N-tetraose and neotetraose series. *Glycoconj. J.* 6:67–83.
- Stringer AM, Singh N, Yermakova A, Petrone BL, Amarasinghe JJ, Reyes-diaz L, Mantis NJ, Wade JT** (2012) FRUIT, a scar-free system for targeted chromosomal mutagenesis, epitope tagging, and promoter replacement in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *PLoS One* 7:e44841.
- Sturla L, Bisso A, Zanardi D, Benatti U, De Flora A, Tonetti M** (1997) Expression, purification and characterization of GDP-D-mannose 4,6-dehydratase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 412:126–130.
- Sumiyoshi W, Urashima T, Nakamura T, Arai I, Saito T, Tsumura N, Wang B, Brand-Miller J, Watanabe Y, Kimura K** (2003) Determination of each neutral oligosaccharide in the milk of Japanese women during the course of lactation. *Br. J. Nutr.* 89:61–69.
- Syldatk C, Chmiel H** (2011) Mikrobielle Stoffproduktion. In: Chmiel, H, editor. *Bioprozesstechnik*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, Seiten 477–505.
- Taguchi S, Ooi T, Mizuno K, Matsusaki H** (2015) Advances and needs for endotoxin-free production strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99:9349–9360.
- Takamura T, Chiba T, Ishihara H, Tejima S** (1980) Chemical modification of lactose. XIII. Synthesis of lacto-N-tetraose. *Chem. Pharm. Bull.* 28:1804–1809.
- Takamura T, Chiba T, Tejima S** (1981) Chemical modification of lactose. XVI. Synthesis of lacto-N-neohexaose. *Chem. Pharm. Bull.* 29:2270–2276.
- Talmadge K, Siebert C** (1989) Efficient endotoxin removal with a new sanitizable affinity column: Affi-Prep polymyxin. *J. Chromatogr.* 476:175–185.
- Tao N, Wu S, Kim J, An HJ, Hinde K, Power ML, Gagneux P, German JB, Lebrilla CB** (2011) Evolutionary glycomics: Characterization of milk oligosaccharides in primates. *J. Proteome Res.* 10:1548–1557.
- Tatusova T, Ciufu S, Fedorov B, O'Neill K, Tolstoy I** (2014) RefSeq microbial genomes database: New representation and annotation strategy. *Nucleic Acids Res.* 42:D553–D559.

- Teather RM, Müller-Hill B, Abrutsch U, Aichele G, Overath P** (1978) Amplification of the lactose carrier protein in *Escherichia coli* using a plasmid vector. *Mol. Gen. Genet.* 159:239–248.
- Terpe K** (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72:211–222.
- Thierauf A, Perez G, Maloy AS** (2009) Generalized transduction. *Methods Mol. Biol.* 531:267–286.
- Thurl S, Henker J, Siegel M, Tovar K, Sawatzki G** (1997) Detection of four human milk groups with respect to Lewis blood group dependent oligosaccharides. *Glycoconj. J.* 14:795–799.
- Thurl S, Müller-Werner B, Sawatzki G** (1996) Quantification of individual oligosaccharide compounds from human milk using high-pH anion-exchange chromatography. *Anal. Biochem.* 235:202–206.
- Thurl S, Munzert M, Henker J, Boehm G, Müller-Werner B, Jelinek J, Stahl B** (2010) Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods. *Br. J. Nutr.* 104:1261–1271.
- Tissier H** (1900) Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (état normal et pathologique). Paris, Frankreich: G. Carré et C. Naud.
- Totten SM, Wu LD, Parker EA, Davis JCC, Hua S, Stroble C, Ruhaak LR, Smilowitz JT, German JB, Lebrilla CB** (2014) Rapid-throughput glycomics applied to human milk oligosaccharide profiling for large human studies. *Anal. Bioanal. Chem.* 30:7925–7935.
- Tseng K, Hedrick JL, Lebrilla CB** (1999) Catalog-library approach for the rapid and sensitive structural elucidation of oligosaccharides. *Anal. Chem.* 71:3747–3754.
- Tyo KEJ, Ajikumar PK, Stephanopoulos G** (2009) Stabilized gene duplication enables long-term selection-free heterologous pathway expression. *Nat. Biotechnol.* 27:760–765.
- Urashima T, Fukuda K, Messer M** (2012a) Evolution of milk oligosaccharides and lactose: A hypothesis. *Animal* 6:369–374.
- Urashima T, Asakuma S, Leo F, Fukuda K, Messer M, Oftedal OT** (2012b) The predominance of type I oligosaccharides is a feature specific to human breast milk. *Adv. Nutr.* 3:473S–482S.
- Urashima T, Kitaoka M, Terabayashi T, Fukuda K, Ohnishi M, Kobata A** (2011) Milk oligosaccharides. In: Gordon, NS, editor. *Oligosaccharides Sources, Prop. Appl.* New York, USA: Nova Science Publishers, Seiten 1–53.
- Urashima T, Saito T, Nakamura T, Messer M** (2001) Oligosaccharides of milk and colostrum in non-human mammals. *Glycoconj. J.* 18:357–371.

- Urashima T, Yamashita T, Nakamura T, Arai I, Saito T, Derocher AE, Wiig O** (2000) Chemical characterization of milk oligosaccharides of the polar bear, *Ursus maritimus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1475:395–408.
- Vallon T, Ghanegaonkar S, Vielhauer O, Müller A, Albermann C, Sprenger GA, Reuss M, Lemuth K** (2008) Quantitative analysis of isoprenoid diphosphate intermediates in recombinant and wild-type *Escherichia coli* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81:175–182.
- Volff J-N, Eichenseer C, Viell P, Piendl W, Altenbuchner J** (1996) Nucleotide sequence and role in DNA amplification of the direct repeats composing the amplifiable element AUD1 of *Streptomyces lividans* 66. *Mol. Microbiol.* 21:1037–1047.
- Volkmer B, Heinemann M** (2011) Condition-dependent cell volume and concentration of *Escherichia coli* to facilitate data conversion for systems biology modeling. *PLoS One* 6:e23126.
- Wada J, Honda Y, Nagae M, Kato R, Wakatsuki S, Katayama T, Taniguchi H, Kumagai H, Kitaoka M, Yamamoto K** (2008) 1,2- α -L-fucosyltransferase: A glycosyltransferase derived from an inverting α -glycosidase with an unusual reaction mechanism. *FEBS Lett.* 582:3739–3743.
- Wakarchuk W, Martin A, Jennings MP, Moxon ER, Richards JC** (1996) Functional relationships of the genetic locus encoding the glycosyltransferase enzymes involved in expression of the lacto-N-neotetraose terminal lipopolysaccharide structure in *Neisseria meningitidis*. *J. Biol. Chem.* 271:19166–19173.
- Wakarchuk WW, Cunningham A, Watson DC, Young NM** (1998) Role of paired basic residues in the expression of active recombinant galactosyltransferases from the bacterial pathogen *Neisseria meningitidis*. *Protein Eng.* 11:295–302.
- Wandersman C, Schwartz M, Ferenci T** (1979) *Escherichia coli* mutants impaired in maltodextrin transport. *J. Bacteriol.* 140:1–13.
- Wang CH, Stern I, Gilmour CM, Klungsoyr S, Reed DJ, Bialy JJ, Christensen BE, Cheldelin VH** (1958) Comparative study of glucose catabolism by the radiorespirometric method. *J. Bacteriol.* 76:207–216.
- Wang G, Boulton PG, Chan NWCC, Palcic MM, Taylor DE** (1999) Novel *Helicobacter pylori* α 1, 2-fucosyltransferase, a key enzyme in the synthesis of Lewis antigens. *Microbiology* 145:3245–3253.
- Wang W, Hu T, Frantom PA, Zheng T, Gerwe B, Del Amo DS, Garret S, Seidel RD, Wu P** (2009) Chemoenzymatic synthesis of GDP-L-fucose and the Lewis X glycan derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:16096–16101.
- Ward A, O'reilly J, Rutherford NG, Ferguson SM, Hoyle CK, Palmer SL, Clough JL, Venter H, Xie H, Litherland GJ, Martin GEM, Wood JM, Roberts PE, Groves MAT, Liang W-J, Steel A, McKeown BJ, Henderson PJF** (1999) Expression of prokaryotic membrane transport proteins in *Escherichia coli*. *Biochem. Soc. Trans.* 27:893–899.

- Ward RE, Niñonuevo M, Mills DA, Lebrilla CB, German JB** (2006) *In vitro* fermentation of breast milk oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gasseri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4497–4499.
- Weichert S, Jennewein S, Hüfner E, Weiss C, Borkowski J, Putze J, Schroten H** (2013) Bioengineered 2'-fucosyllactose and 3-fucosyllactose inhibit the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* and enteric pathogens to human intestinal and respiratory cell lines. *Nutr. Res.* 33:831–838.
- Weickert MJ, Adhya S** (1993) The galactose regulon of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 10:245–251.
- Weiner M, Albermann C, Gottlieb K, Sprenger GA, Weuster-Botz D** (2014) Fed-batch production of L-phenylalanine from glycerol and ammonia with recombinant *Escherichia coli*. *Biochem. Eng. J.* 83:62–69.
- Wenzel M, Müller A, Siemann-Herzberg M, Altenbuchner J** (2011) Self-inducible *Bacillus subtilis* expression system for reliable and inexpensive protein production by high-cell-density fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:6419–6425.
- Weston BW, Nair RP, Larsen RD, Lowe JB** (1992) Isolation of a novel human $\alpha(1,3)$ fucosyltransferase gene and molecular comparison to the human Lewis blood group $\alpha(1,2/1,4)$ fucosyltransferase gene. *Biochemistry* 267:4152–4160.
- Whistler RL, Durso DF** (1950) Chromatographic separation of sugars on charcoal. *J. Am. Chem. Soc.* 72:667–679.
- Wickramasinghe S, Pacheco AR, Lemay DG, Mills DA** (2015) Bifidobacteria grown on human milk oligosaccharides downregulate the expression of inflammation-related genes in Caco-2 cells. *BMC Microbiol.* 15:172.
- Wilms B, Hauck A, Reuss M, Syldatk C, Mattes R, Siemann M, Altenbuchner J** (2001a) High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli rhaBAD* promoter. *Biotechnol. Bioeng.* 73:95–103.
- Wilms B, Wiese A, Syldatk C, Mattes R, Altenbuchner J** (2001b) Development of an *Escherichia coli* whole cell biocatalyst for the production of L-amino acids. *J. Biotechnol.* 86:19–30.
- Wu S, Grimm R, German JB, Lebrilla CB** (2011) Annotation and structural analysis of sialylated human milk oligosaccharides. *J. Proteome Res.* 10:856–868.
- Wu S, Tao N, German JB, Grimm R, Lebrilla CB** (2010) Development of an annotated library of neutral human milk oligosaccharides. *J. Proteome Res.* 9:4138–4151.
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J** (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103–119.
- Yao W, Yan J, Chen X, Wang F, Cao H** (2015) Chemoenzymatic synthesis of lacto-N-tetrasaccharide and sialyl lacto-N-tetrasaccharides. *Carbohydr. Res.* 401:5–10.

- Yazdani SS, Gonzalez R** (2007) Anaerobic fermentation of glycerol: A path to economic viability for the biofuels industry. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18:213–219.
- Yildiz O, Vinothkumar KR, Goswami P, Kühlbrandt W** (2006) Structure of the monomeric outer-membrane porin OmpG in the open and closed conformation. *EMBO J.* 25:3702–3713.
- Yoshida E, Sakurama H, Kiyohara M, Nakajima M, Kitaoka M, Ashida H, Hirose J, Katayama T, Yamamoto K, Kumagai H** (2012) *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* uses two different β -galactosidases for selectively degrading type-1 and type-2 human milk oligosaccharides. *Glycobiology* 22:361–368.
- Yu D, Ellis HM, Lee EC, Jenkins NA, Copeland NG, Court DL** (2000) An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:5978–5983.
- Yu H, Lau K, Li Y, Sugiarto G, Chen X** (2012) One-pot multienzyme synthesis of Lewis x and sialyl Lewis x antigens. *Curr. Protoc. Chem. Biol.* 4:233–247.
- Yu Z-T, Chen C, Newburg DS** (2013a) Utilization of major fucosylated and sialylated human milk oligosaccharides by isolated human gut microbes. *Glycobiology* 23:1281–1292.
- Yu Z-TT, Chen C, Kling DE, Liu B, McCoy JM, Merighi M, Heidtman M, Newburg DS** (2013b) The principal fucosylated oligosaccharides of human milk exhibit prebiotic properties on cultured infant microbiota. *Glycobiology* 23:169–177.
- Zeppenfeld T, Larisch C, Lengeler JW, Jahreis K** (2000) Glucose transporter mutants of *Escherichia coli* K-12 with changes in substrate recognition of IICB^{Glc} and induction behavior of the *ptsG* gene. *J. Bacteriol.* 182:4443–4452.
- Zeuner B, Jers C, Mikkelsen JD, Meyer AS** (2014) Methods for improving enzymatic trans-glycosylation for synthesis of human milk oligosaccharide biomimetics. *J. Agric. Food Chem.* 62:9615–9631.
- Zhai Y, Han D, Pan Y, Wang S, Fang J** (2015) Enhancing GDP-fucose production in recombinant *Escherichia coli* by metabolic pathway engineering. *Enzyme Microb. Technol.* 69:38–45.
- Zhang Y-M, Esnault J, Mallet J-M, Sinay P** (1999) Synthesis of the β -methyl glycoside of lacto-N-fucopentaose III. *J. Carbohydr. Chem.* 18:419–427.
- Zhang Z, Xie J, Zhang F, Linhardt R** (2007) Thin layer chromatography for the analysis of glycosaminoglycan oligosaccharides. *Anal. Biochem.* 371:118–120.
- Zheng D, Constantinidou C, Hobman JL, Minchin SD** (2004) Identification of the CRP regulon using *in vitro* and *in vivo* transcriptional profiling. *Nucleic Acids Res.* 32:5874–5893.
- Zivkovic AM, German JB, Lebrilla CB, Mills DA** (2011) Human milk glycobiome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:4653–4658.

Zwaig N, Kistler WS, Lin EC (1970) Glycerol kinase, the pacemaker for the dissimilation of glycerol in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 102:753–759.