

**Abschlussbericht
zum Forschungsstipendium der
Max-Buchner-Forschungstiftung
Kennziffer 2724:**

**Entwicklung eines Enzym-Modul-Systems
zur Synthese von UDP-Glucuronsäure
aus Saccharose und UMP**

**Stipendiatin:
Frau Dipl.-Biol. Leonie Engels**

Förderjahr 2008/2009

1. ZIELSETZUNG DES PROJEKTES

In der kombinatorischen Biokatalyse haben sich in der AG Elling Synthesestrategien bewährt, Glykokonjugate mit Hilfe eines hoch flexiblen Enzym Modul Systems (EMS) und *in situ* Regeneration von Nukleotidzuckern zu synthetisieren ^[1-6]. Die Zielsetzung dieses Projektes war zunächst die Etablierung eines EMS zur *in vitro* Synthese von UDP-Glucuronsäure (UDP-GlcA) aus Saccharose. UDP-GlcA ist eine wichtige Ausgangsverbindung für *in vitro* Tests zur Glucuronidierung von Pharmazeutika und für die *in vitro* Synthese von kurzkettiger Hyaluronsäure.

Ausgehend von Saccharose und UMP sollten im EMS rekombinante Enzyme zur Synthese von UDP-GlcA kombiniert werden. Im SuSy-Modul gewährleistet eine geeignete rekombinante UMP-Kinase die Synthese von UDP. In einem nächsten Schritt ermöglicht die Sucrose Synthase 1 (SuSy 1) die Umsetzung von Saccharose und UDP zu UDP-Glucose (UDP-Glc) (Abbildung 1, SuSy-Modul)^[7]. Im UDP-Glucose Dehydrogenase Modul (UDP-GlcDH-Modul) sollte schließlich die Oxidation von UDP-Glc mit Hilfe der UDP-Glucose Dehydrogenase aus *E. coli* oder *Homo sapiens* die Synthese von UDP-GlcA erfolgen. Die Verwendung der rekombinanten UDP-Glc Dehydrogenase aus *E. coli* oder *Homo sapiens* erforderte ein geeignetes Expressionssystem.

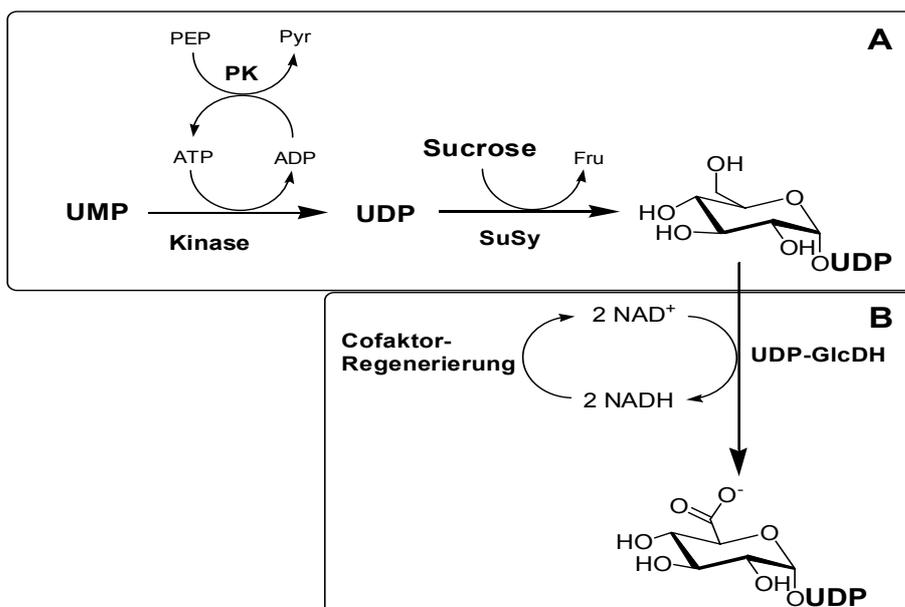


Abbildung 1: Enzym-Modul-System zur Synthese von UDP-GlcA aus Saccharose und UMP.
 A: SuSy-Modul; B: UDP-GlcDH-Modul

2. ERWEITERTE ZIELSETZUNG DES PROJEKTES

Innerhalb des ersten Förderungsjahres konnte die humane UMP-Kinase (UMPK) als neue rekombinante Kinase mit hoher Stabilität und guten spezifischen Aktivitäten exprimiert und umfassend charakterisiert werden. Insgesamt betrachtet, erweist sich die UMPK hinsichtlich der biochemischen und proteinchemischen Eigenschaften als gut geeignet für das EMS. Erstmals konnte die Synthese von UDP-Glc durch die Kombination einer rekombinanten UMPK mit der rekombinanten Sucrose Synthase 1 im SuSy Modul gezeigt werden. Auch die funktionelle Ankopplung des zweiten Moduls zur Synthese von UDP-GlcA konnte in einem Zwei-Reaktoren-System zunächst mit einer kommerziell erhältlichen UDP-GlcDH gezeigt werden.

Die erzielten Ergebnisse stellen eine wichtige Basis für die *in vitro* Synthese einer zweiten Glycanstruktur, des HNK1-Epitops dar. Das humane HNK-1-Epitop, $\text{HSO}_3\text{-3GlcA}(\beta\text{1-3})\text{Gal}(\beta\text{1-4})\text{GlcNAc}(\beta\text{1-R})$, wird von Zelladhäsionsmolekülen des Nervensystems exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Adhäsion, Migration und dem Neuritenwachstum. Daher ist die Biofunktionalisierung von Biomaterialoberflächen mit Sulfoglucuronyl-Liganden von großem Interesse für die Nervenzellregeneration und Stammzellendifferenzierung. Die chemische Synthese des HNK-1-Epitops ist aufgrund der aufwendigen Schutzgruppentechnik problematisch. Im Gegensatz dazu bietet das hoch flexible Enzym Modul System (EMS) durch Kombination des SuSy- Moduls und des Dehydrogenase Moduls mit dem Glucuronosyltransferase- und dem Sulfotransferase Modul eine geeignete Methode^[1-6] (Abbildung 2). Die Kombination der Module garantiert zusätzlich die *in situ* Regeneration von UDP-GlcA. Zielsetzung im weiteren Projektverlauf war es, eine rekombinante Glucuronyltransferase zur Glucuronidierung von *N*-Acetyllactosamin (LacNAc, $\text{Gal}(\beta\text{1-4})\text{GlcNAc}$) bereitzustellen und anschließend die Sulfatierung der terminalen Glucuronsäure mit Hilfe einer rekombinanten Sulfotransferase und damit die Synthese des HNK-1 Epitopes $\text{HSO}_3\text{-3GlcA}(\beta\text{1-3})\text{Gal}(\beta\text{1-4})\text{GlcNAc}(\beta\text{1-R})$ zu etablieren. Die Linker Struktur am nicht-reduzierenden Ende des Glycokonjugates hat sich bereits in anderen Arbeiten der AG Elling für die Biofunktionalisierung von Oberflächen bewährt.

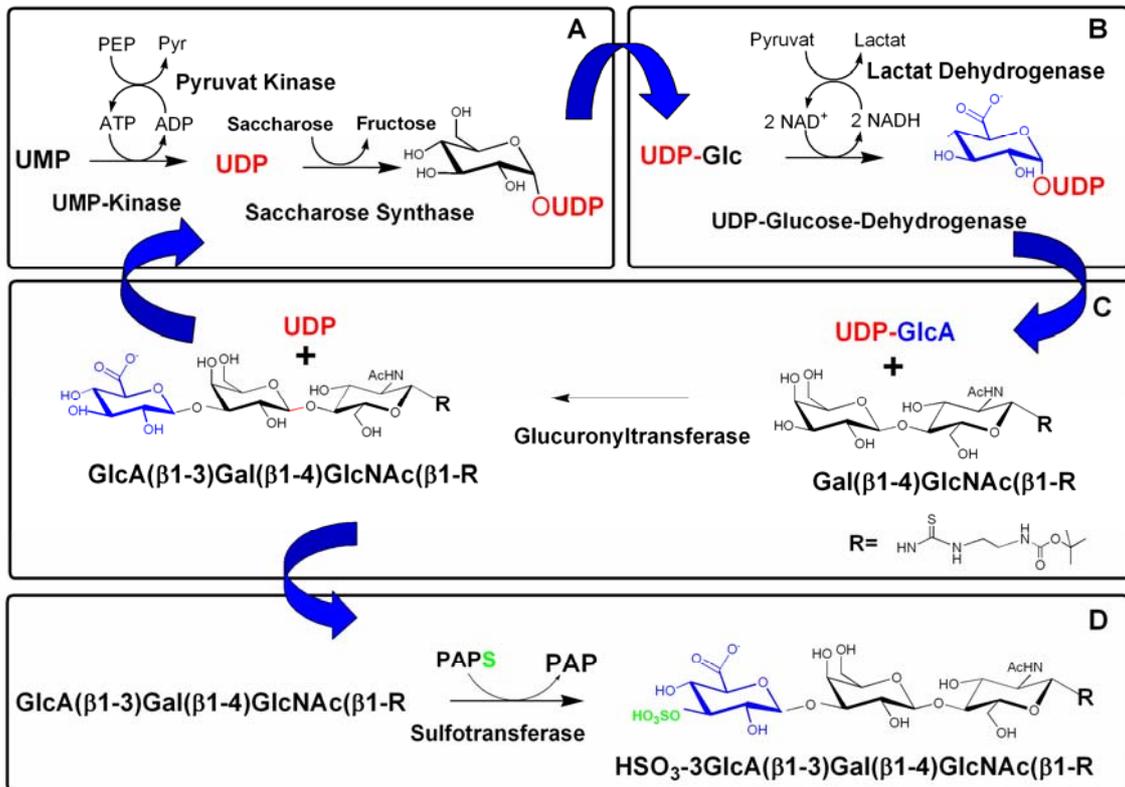


Abbildung 2: EMS zur Synthese der UDP-Glucuronsäure und des Glykan-Epitops HNK1
A (SuSy-Modul): Produktion von UDP-Glucose (UDP-Glc) mit rekombinanter UMP-Kinase und SuSy 1 (Sucrose Synthase 1)
B (Dehydrogenase Modul): Synthese von UDP-Glucuronsäure (UDP-GlcA) durch Oxidation von UDP-Glc mit der UDP-Glucose Dehydrogenase
C (Glucuronyltransferase Modul): Glucuronidierung von LacNAc-R (Gal(β1-4)GlcNAc(β1-R)) durch die Glucuronyltransferase
D (Sulfotransferase Modul): Sulfatierung von GlcA(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-R) durch die Sulfotransferase. Die Kombination der Module ermöglicht die Regeneration des UDP und darüber hinaus der UDP-GlcA

3. ERGEBNISBERICHT DES ZWEITEN FÖRDERUNGSJAHRES (2008/2009)

3.1. UDP-GlcDH Modul

Die Produktion der rekombinanten UDP-GlcDH aus *E. coli* oder *Homo sapiens*, die zur Oxidation der im SuSy Modul gebildeten UDP-Glc zu UDP-GlcA eingesetzt werden sollten, konnte im ersten Förderungsjahr nicht zufrieden stellend gelöst werden.

3.1.1. Klonierung, Expression und Aufreinigung der UDP-Glucose Dehydrogenase (*E. coli*)

Die Klonierung der UDP-Glucose Dehydrogenase aus *E. coli* K12 (Expasy primary accession number: P76373) wurde erfolgreich durchgeführt. Die ermittelten spezifischen Aktivitäten der gereinigten UDPGlc-DHHis₆ und His₆UDPGlc-DH aus den Expressionsstämmen *E. coli* BL21 DE3 und *E. coli* JM109 DE3 mit 10-40 mU/mg erwiesen sich als sehr gering. Die rekombinanten Enzyme waren daher für den Einsatz in das EMS nicht geeignet. Die UDP-Glucose Dehydrogenase (*kfid*) aus *E. coli* K5 bot eine Alternative. Im ersten Schritt erfolgte die Amplifikation des Gens ausgehend von der bereits zuvor isolierten genomischen DNA aus *E. coli* Stammes (Nissle Strain 1917), der von der Firma Ardeypharm (Herdecke, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurde. Zur vereinfachten Aufreinigung der Enzyme über Ni²⁺-NTA-IMAC und einer späteren Immobilisierung der Enzyme wurde das Gen mit einem N-terminalen His₆-Tag in den Vektor pETDuet1 (Novagen[®]) kloniert. Nach positivem Sequenzierungsergebnis wurde das klonierte Gene in *E. coli* BL21 DE3 bzw. *E. coli* JM109 DE3 unter Induktion exprimiert. Die Aufreinigung des Enzyms erfolgte über Ni²⁺-NTA-IMAC. Die Expressionsanalysen durch SDS PAGE und Western-Blot zeigten in allen Untersuchungen lösliches Protein im Elutionspool, jedoch auch „inclusion bodies“ im Zellpellet. Die spezifischen Aktivitäten wurden mittels Fotometer bestimmt und die Produktsynthese mittels Kapillarelektrophorese analysiert. Die rekombinante UDP-Glucose Dehydrogenase aus *E. coli* K5 (Nissle Strain 1917) kann mit hoher Stabilität und guten spezifischen Aktivitäten exprimiert werden (Tabelle 1). Zurzeit wird die Dehydrogenase umfassend charakterisiert.

Tabelle 1: Spezifische Aktivität der aufgereinigten His₆UDPGlcDH aus *E. coli* K5 (Nissle Strain 1917) in den Expressionsstämmen BL21 DE3 und *E. coli* JM109 DE3

	Spezifische Aktivität [mU/mg]
His ₆ UDPGlc-DH (<i>E. coli</i> BL21 DE3)	0,95 U/mg
His ₆ UDPGlc-DH (<i>E. coli</i> JM109 DE3)	1,07 U/mg

3.1.2. Klonierung, Expression und Aufreinigung der UDP-Glucose Dehydrogenase (*Homo sapiens*)

Im Förderungsjahr 2007/208 wurde das Gen ausgehend von der humanen cDNA in den Vektor pET Duet1 (Novagen[®]) mit einem N-terminalem His₆ Tag kloniert, anschließend in *E. coli* Rosetta (DE3) (Novagen[®]) unter Induktion exprimiert und über Ni²⁺-NTA-IMAC erfolgreich aufgereinigt. Die Aktivität der His₆UDPG-DH (*E. coli* Rosetta DE3) mit 228 U/mg war für die Synthese von UDP-GlcA noch nicht zufrieden stellend. Daher sollte im zweiten Förderungsjahr geklärt werden, ob eine Expressionsoptimierung zu wesentlich höheren spezifischen Aktivitäten führt. Nach umfangreichen Versuchen zur Expressionsoptimierung konnte das beste Ergebnis für den Expressionsstamm *E. coli* Rosetta DE3 mit 1,4 U/mg bei 28°C nach einer Postinduktionszeit von 24 h unter Verwendung von 0,1mM IPTG erzielt werden. Die humane rekombinante UDP-Glucose Dehydrogenase stand damit für eine weitere Charakterisierung zur Verfügung. Das lösliche Enzym zeigt für das TRIS- und HEPES Puffersystem ein pH Optimum von 8,6 - 8,7 und ein Temperaturoptimum von 31°C. Das Enzym weist hinsichtlich des Temperaturoptimums und des pH Optimums der verwendeten TRIS- und HEPES Puffersysteme analoge Eigenschaften zu der bereits charakterisierten UMP-Kinase des SuSy Moduls auf. Messungen zur Temperaturstabilität bei 30°C ergaben ein zufrieden stellendes Ergebnis mit einer Halbwertszeit ($t_{0,5}$) von 57 h und einem Inaktivierungskoeffizienten (k) von 0,012. Mithilfe der Michaelis-Menten Gleichung und unter Benutzung der Software SigmaPlot 2007 konnten für die Substrate NAD⁺ und UDP-Glc kinetische Daten ermittelt werden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Kinetische Daten der human His₆UDPG-DH für die Substrate NAD⁺ und UDP-Glc.

	K _m [mM]	V _{max} [U/mg]
NAD ⁺	0,62 ± 0,02	1,73 ± 0,17
UDP-Glc	0,1 ± 0,01	1,43 ± 0,1

Produktinhibition durch UDP-GlcA und Inhibitionen durch UDP, ATP oder UMP sowie für das Abbauprodukt ADP des Phosphat-Donors ATP konnten nicht nachgewiesen werden. Die Regenerierung des Cofaktors NAD^+ mit Hilfe der Lactat-Dehydrogenase unter Verwendung von Pyruvat konnte ebenfalls erfolgreich durchgeführt werden. Die Ergebnisse wurden mittels HPLC Analytik verifiziert. Der Cofaktor NAD^+ stellt somit keine Limitierung in der Oxidation von UDP-Glc zu UDP-GlcA dar.

3.1.3. Immobilisierung der rekombinanten Enzyme zur Produktion von UDP-GlcA

Nach Produktion der rekombinanten UDP-GlcDH und UMPK in geeigneten Expressionssystemen sollten alle rekombinanten Enzyme an magnetische Mikropartikel (Chemicell[®]) immobilisiert und umfassend charakterisiert werden. Die Immobilisierung an magnetische Partikel ermöglicht zusammen mit einem Separationsmodul die schnelle und einfache Detektion der Produktsynthese. Das in der AG Elling entwickelte Separationsmodul MAGICA (MAGnetic Immobilized Continuous Assay)^[8] erlaubt die Aufnahme von Enzymkinetiken von immobilisierten Enzymen mit einem kontinuierlichen Enzymtest. Diese Daten sollten im weiteren Verlauf des Projektes mit den ermittelten Werten der löslichen Enzyme verglichen werden.

3.1.3.1. Immobilisierung der humanen rekombinanten UMPK

Zur kovalenten Immobilisierung der UMPK wurden die magnetischen Mikropartikel SiMAG Cyanuric[®], SiMAG-PGL[®], SiMAG-Amino[®] und SiMAG-Carboxyl[®] verwendet. Die terminalen reaktiven 1.3.5 Triazin-Chlorid Gruppen der SiMAG Cyanuric[®] und die reaktiven Polyglutaraldehyd Gruppen der SiMAG-PGL[®] erlauben eine effiziente kovalente Bindung des Enzyms über Aminogruppen von Lysin-Seitenketten. Die Immobilisierung der Kinase an SiMAG-Amino[®] und SiMAG-Carboxyl[®] Mikropartikeln erfolgt mit Hilfe der Carbodiimid-Methode als binäres kovalentes Bindungssystem. Hierbei reagiert Carbodiimid mit terminalen Carboxylgruppen der Mikropartikel (SiMAG-Carboxyl[®]) bzw. mit den Carboxylgruppen des Proteins (SiMAG-Amino[®]). Die UMPK konnte erfolgreich an allen genannten Mikropartikeln immobilisiert werden. Hinsichtlich der Immobilisierungsausbeuten bezüglich des gebundenen Enzyms und der spezifischen Aktivität des Enzyms (Units/mg Protein) ergaben sich jedoch deutliche Unterschiede (Tabelle 3). Die Produktsynthese wurde mittels Kapillarelektrophorese (CE) verfolgt.

Tabelle 3: Immobilisierungsausbeute und spezifische Aktivität [U/mg Protein] der immobilisierten UMPK

	Immobilisierungsausbeute [%]	Spezifische Aktivität [U/mg]
SiMAG Cyanuric [®]	37	1,3
SiMAG-PGL [®]	57	2,0
SiMAG-Amino [®]	12	2,1
SiMAG-Carboxyl [®]	10	1,3

Zurzeit erfolgt eine biochemische Charakterisierung der immobilisierten UMPK im Rahmen einer Bachelorarbeit.

3.1.3.2. Immobilisierung der rekombinanten Sucrose Synthase1 (SuSy1)

Zur kovalenten Immobilisierung der Sucrose Synthase1 wurden die magnetischen Mikropartikel SiMAG Cyanuric[®], SiMAG-PGL[®], SiMAG-Amino[®], SiMAG-Carboxyl[®], verwendet. Trotz signifikanter Proteinbindung konnte keine Enzymaktivität nach Immobilisierung gemessen werden. Ein Grund hierfür könnte in der Störung der oligomeren Struktur des homotetrameren Proteins liegen. Für die Spaltaktivität der SuSy1 sind die vier Untereinheiten erforderlich, die jedoch nach kovalenter Bindung an Mikropartikeln in ihrer Anordnung gestört sind^[9]. Darüber hinaus erwiesen sich SiMAG-C8[®] Mikropartikel zur adsorptiven Immobilisierung über hydrophobe Wechselwirkung als ungeeignet. Dies ist jedoch sehr wahrscheinlich mit der schwachen Bindung des Enzyms an die Magnetpartikel begründet.

SiMAG-DEAE[®]- SiMAG-PEI[®]-Partikel mit Anionenaustauschfunktion zeigten eine Bindung der SuSy1. An SiMAG-DEAE[®]-Partikel konnten wegen der schwachen Anionenaustauschfunktion des Diethylaminoethyl als funktionelle Gruppe nach Proteinbestimmung nur 10% Protein gebunden werden. Der Einsatz dieser Partikel ist daher nicht realistisch. Die Immobilisierungsausbeute von SuSy an SiMAG-PEI[®]-Partikeln mit Polyethylenimin als starkem Anionenaustauscher betrug 60% an gereinigtem Protein. Die spezifische Aktivität betrug 48 mU/mg Enzym. Wiederholte Messungen der gleichen immobilisierten Proben über einen Zeitraum von 10 Tagen zeigten eine gleichbleibende Enzymaktivität. Somit erweisen sich die SiMAG-PEI[®]-Partikel für eine Immobilisierung der SuSy1 als geeignet und stehen für eine nachfolgende Charakterisierung des Enzyms zur Verfügung.

3.1.3.3. Immobilisierung der rekombinanten UDP-Glucose Dehydrogenase (*E. coli* K5 und *Homo sapiens*)

Zur Immobilisierung der UDP-Glucose Dehydrogenase wurden bisher die magnetischen Mikropartikel SiMAG Cyanuric[®], SiMAG-PGL[®] untersucht. Erste Versuchsergebnisse zeigen eine signifikante Proteinbindung von 68-72%. Für die humane UDP-Glucose Dehydrogenase ließ sich nach Immobilisierung jedoch keine Enzymaktivität mehr nachweisen. Auch hier könnte die Inaktivierung des Enzyms in einer Störung der oligomeren Struktur des homohexameren Proteins begründet sein, die für die Oxidationsreaktion erforderlich ist. Die homodimere Dehydrogenase aus *E. coli* K5 zeigt hingegen spezifische Aktivitäten von 0,57 mU/mg Enzym. In weiteren Versuchen soll ihre Charakterisierung erfolgen.

3.1.4. Synthese von UDP-GlcA

In einem ersten Syntheseansatz wurde zunächst die Synthese von UDP-Glc durch lösliche UMPK und lösliche SuSy1 aus UMP und Saccharose untersucht. Im Anschluss wurde die produzierte UDP-Glc zur Synthese von UDP-GlcA mit der humanen UDP-Glucose Dehydrogenase eingesetzt. Alle Syntheseprodukte wurden durch Kapillarelektrophorese (CE) analysiert. In den Elektropherogrammen der CE-Analyse konnte eindeutig die Produktion von UDP-GlcA detektiert werden. In weiteren Versuchen sollen nun die erfolgreich immobilisierten Enzyme zur Synthese von UDP-GlcA eingesetzt werden.

3.2. Glucuronyltransferase Modul

Die Etablierung des Glucuronyltransferase Moduls erforderte die Bereitstellung einer geeigneten Glucuronyltransferase. Hierzu wurden die Glucuronyltransferasen GlcATP (ExPasy primary accession number: Q9CW73) und GlcATS (ExPasy primary accession number P59270) ausgewählt. Im ersten Schritt erfolgte die Amplifikation der Gene ausgehend von der bereits zuvor isolierten mRNA des Gehirns (*Mus musculus*). In einem weiteren Schritt wurde die katalytische Domäne der membrangebundenen Enzyme zur vereinfachten Aufreinigung über Ni²⁺-NTA-IMAC mit einem N-terminalen His₆-Tag in den Vektor pET46EK/LIC (Novagen[®]) kloniert.

Die Sequenzierungsergebnisse bestätigen die Identität der Gene. Die Glucuronyltransferasen GlcATP wurde anschließend in *E. coli* BL21 DE3 unter Induktion exprimiert. Bei der Aufreinigung des Enzyms konnte lösliches Protein detektiert werden.

Zurzeit wird ein geeigneter Aktivitätstest mittels Fotometer und HPLC etabliert. Das Enzym GlcATS soll eine Alternative zu der bereits erfolgreich exprimierten Glucuronyltransferase bieten.

3.3. Sulfotransferase Modul

Für die Etablierung des Sulfotransferase Moduls steht die Carbohydrate Sulfotransferase 10 (CHST10) mit zwei Isoformen zur Verfügung (ExPasy primary accession number: Q6PGK7Q6PGK7-1 und primary accession number: Q6PGK7Q6PGK7-2).

Bisher konnte die erfolgreiche Klonierung des Gens *chst10-1* ausgehend von der mRNA des Gehirns (*Mus musculus*) in den Vektor pGMT-Easy (Promega) durch Sequenzierung bestätigt werden. Nachfolgend wird die katalytische Domäne der membrangebundenen Enzyme zur vereinfachten Aufreinigung über Ni²⁺-NTA-IMAC mit einem N-terminalen His₆-Tag in den Vektor pET46EK/LIC (Novagen[®]) kloniert und in *E. coli* BL21 DE3 unter Induktion exprimiert.

3.4. Zusammenfassung der Arbeitsergebnisse

Innerhalb dieses Projektes wurden sieben für die AG Elling neue Gene erfolgreich kloniert. Dabei konnten die rekombinante UMP Kinase (*Homo sapiens*), die UDP-Glucose Dehydrogenase (*Homo sapiens*) und die UDP-Glucose Dehydrogenase (*E. coli* K5) mit hoher Stabilität und guten spezifischen Aktivitäten exprimiert und umfassend charakterisiert werden. Insgesamt betrachtet, erweisen sich die Enzyme hinsichtlich der biochemischen und proteinchemischen Eigenschaften als gut geeignet für das EMS. Die Kombination dieser rekombinanten Enzyme zur Synthese von UDP-GlcA aus Saccharose und UMP ist in der kombinatorischen Biokatalyse ein weiterer innovativer Schritt. In einem Zwei-Reaktoren-System gelang die Synthese von UDP-GlcA inklusive der Cofaktorregenerierung von NAD⁺. Damit wurde die Funktionalität des EMS zur Synthese von UDP-GlcA bestätigt. Die Ergebnisse stellen somit eine Basis für die weitere Arbeit dar. In weiteren Versuchen ist die Synthese von UDP-GlcA mit Hilfe der repetitiven Batch Technik, die die Wiederverwendung der eingesetzten Enzyme ermöglicht, geplant. Diese

garantiert eine Steigerung der Enzymproduktivität und eine sehr ökonomische Verwendung der beteiligten Enzyme [10-11].

Ein alternatives Konzept stellt die Synthese der UDP-GlcA mit immobilisierten Enzymen dar. Erste Versuche mit den magnetischen Mikropartikeln SiMAG Cyanuric[®], SiMAG-PGL[®] und SiMAG-PEI[®] zeigen die Möglichkeit zur Immobilisierung der Enzyme im SuSy- und UDP-Glc-DH-Modul auf. Nach Immobilisierungsoptimierung und Charakterisierung der Enzyme stehen diese für die kombinierte enzymatische Synthese von UDP-GlcA zur Verfügung. Die Produktion der UDP-GlcA in einem derartigen System ist bisher nicht beschrieben und stellt ein neuartiges Konzept dar. Für die Kombination dieser Module mit dem Glucuronyltransferase- und Sulfotransferase Modul stehen bisher insgesamt drei weitere Gene zur Verfügung. Die lösliche Expression der Glucuronyltransferase (GlcATP) konnte bereits in *E. coli* BL21DE3 nachgewiesen werden. Dies wurde für diese Glucuronyltransferase (*Mus musculus*) in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Zusammenfassend bieten die erzielten Ergebnisse eine sehr gute Basis für die weiteren Arbeiten der laufenden Dissertation.

Literatur

- [1] B. Sauerzapfe, L. Elling, in *Multi-Step Enzyme Catalysis: Biotransformations and Chemoenzymatic Synthesis* (Ed.: E. Garcia-Junceda), WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, **2008**, pp. 83.
- [2] S. Amann, G. Draeger, C. Rupprath, A. Kirschning, L. Elling, *Carbohydr. Res.* **2001**, 335, 23.
- [3] L. Elling, C. Rupprath, N. Günther, U. Römer, S. Verseck, P. Weingarten, G. Dräger, A. Kirschning, W. Piepersberg, *ChemBioChem* **2005**, 6, 1423.
- [4] C. Rupprath, T. Schumacher, L. Elling, *Curr. Med. Chem.* **2005**, 12, 1637.
- [5] M. Kopp, C. Rupprath, H. Irschik, A. Bechthold, L. Elling, R. Müller, *ChemBioChem* **2007**, 8, 813.
- [6] C. Rupprath, M. Kopp, D. Hirtz, R. Müller, L. Elling, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, 349, 1489.
- [7] U. Römer, H. Schrader, et al., *J. Biotech.* **2004**, 107, 135.
- [8] C. Rupprath, Dissertation „Entwicklung eines Enzym-Modul-Systems zur Synthese und *in situ* Regeneration von dDTP-aktivierten Desoxyzuckern“, RWTH Aachen, **2007**.
- [9] B. Sauerzapfe, L. Engels, L. Elling, *EMT.* **2008**, 43, 289.
- [10] T. Bülter, C. Wandrey, L. Elling, *Carbohydr. Res.* **1997**, 305, 469.
- [11] A. Zervosen, A. Stein, H. Adrian, L. Elling, *Tetrahedron* **1996**, 52, 2395.