

Diastereoselektive Synthese von Glykosylphosphaten mit einem Phosphorylase-Phosphatase-Kombikatalysator

Patricia Wildberger, Martin Pfeiffer, Lothar Brecker und Bernd Nidetzky*

Abstract: Zuckerphosphate sind biologisch bedeutsam im Zellmetabolismus, bei der Signübertragung und als Bausteine in Makromolekülen. Die selektive chemische Phosphorylierung von Zuckern ist schwierig, vor allem am anomeren Zentrum. Eine durch Phosphatase katalysierte diastereoselektive Phosphorylierung am anomeren Zentrum unterschiedlicher Aldosen wird beschrieben. Als Phosphoryldonor der Reaktion fungiert α -D-Glukosylphosphat, welches über eine Phosphorylase-katalysierte Reaktion aus Saccharose und Phosphat hergestellt wird. Simultan und sequenziell durchgeführte Biotransformationen mithilfe des hier entwickelten Phosphorylase-Phosphatase-Kombikatalysators ermöglichten die Herstellung verschiedener Glykosylphosphate mit definierter anomerer Konfiguration in Ausbeuten von bis zu 70 % basierend auf der anfänglich eingesetzten Phosphatkonzentration. Für die Isolation der Reaktionsprodukte wurde eine effiziente, enzymunterstützte Aufreinigungsstrategie entwickelt.

Phosphorylierte Kohlenhydrate sind wichtige Biomoleküle.^[1] Sie fungieren als Intermediate im Metabolismus und spielen eine wesentliche Rolle bei der Signalübertragung. Makromolekulare Strukturen wie jene im Genom sind aus Zuckerphosphaten aufgebaut.^[1] Technologisch finden Zuckerphosphate Anwendungen in der Lebensmittel-, Kosmetik- und Detergenzindustrie.^[2,3] Ferner dienen sie als Ausgangsstoffe für die Herstellung von nukleotidaktivierten Zuckern^[2d,4a] und als Zwischenprodukte in der Synthese von

seltenen Zuckern.^[2e,f] Eine effiziente und praktische Methode zur Synthese von Zuckerphosphaten wäre daher von großer Bedeutung für verschiedene Disziplinen in Wissenschaft und Technologie. Eine vielversprechende Option ist dabei die gezielte direkte Phosphorylierung von Zuckern. Allerdings macht die inhärente strukturelle Komplexität der Zucker dies zu einer schwierigen Aufgabe.

Speziell in der Synthese von Glykosylphosphaten kommt der Kontrolle der Stereochemie am anomeren Zentrum eine besondere Bedeutung zu. Chemische Synthesemethoden erfordern normalerweise mehrere Schritte,^[4] selbst dann wenn auf Schutzgruppenchemie verzichtet wird.^[5] Die meisten der beschriebenen Synthesen verlaufen über Reaktionen mit eher geringen Ausbeuten und sind auf eine kleinere Anzahl von Glykosylphosphaten limitiert. Einige Glykosylphosphate wurden mit guter Effizienz aus den entsprechenden β -Glykosylsulfonhydraziden erzeugt, welche wiederum direkt aus freien Zuckerhalbacetalen gewonnen wurden. Allerdings war die Diastereoselektivität gerade ausreichend, um eine gewisse Anreicherung des α -Anomers in den finalen Produkten zu erreichen.^[5] Nukleotidtriphosphat (NTP)-abhängige Zucker-1-Kinasen, welche die Phosphorylierung an der anomeren Hydroxygruppe mit absoluter Stereokontrolle katalysieren, sind geeignet, um das Problem der Stereokontrolle in den Griff zu bekommen.^[6] Jedoch ist durch die hohe Substratspezifität (z. B.: D-Gal,^[7a] L-Fuc,^[7b] D-GalNAc/b-GlcNAc,^[7c] D-GlcUA,^[7d] D-GalUA,^[7e] L-Ara^[7f]) die synthetische Anwendung dieser Enzyme zumeist auf die Phosphorylierung ihres physiologischen Zuckersubstrats oder auf nahe strukturelle Analoga davon limitiert. Erst vor kurzem wurden Zucker-1-Kinasen mit einem etwas breiteren Substratspektrum entdeckt^[8] oder durch Protein-Engineering erzeugt.^[9] Chen und Mitarbeiter benutzten entweder die D-GalNAc/b-GlcNAc-Kinase oder die D-Gal-Kinase, je nach Substratspezifität, für die Synthese der α -Glykosylphosphate von D-Gal, D-Glc und D-Man. Derivate dieser drei Zucker, welche Substitutionen durch H, F, NH₂, NHAc oder N₃ am 2-OH aufwiesen, konnten ebenfalls erfolgreich phosphoryliert werden.^[10]

Trotz Fortschritten in der Entwicklung von breit spezifischen Zucker-1-Kinasen besteht eine Diskrepanz zwischen den benötigten und den mit vorhandenen Enzymen gut herstellbaren Glykosylphosphaten. Außerdem ist es nicht wirtschaftlich, NTPs in stöchiometrischen Mengen einzusetzen. Obwohl nennenswerte Entwicklungen in Kinase-katalysierten Zuckerphosphorylierungen in Grammskalen erzielt wurden, erhöht die Notwendigkeit, NTPs enzymatisch zu regenerieren, die Gesamtkomplexität der Umsetzungen.^[11,12]

Aus diesen Gründen wäre eine biokatalytische Phosphorylierungsmethode, die sowohl die Schlüsseleigenschaft der Stereoselektivität und den zusätzlichen Vorteil einer

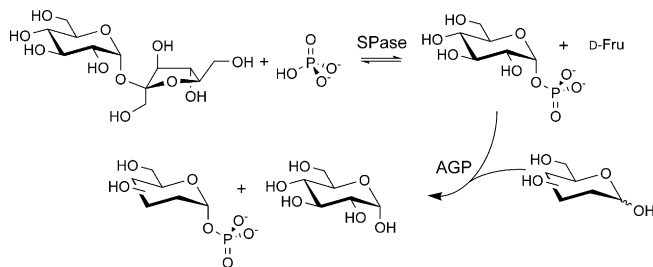
[*] Dr. P. Wildberger,^[a] M. Pfeiffer,^[a] Prof. Dr. B. Nidetzky
Institut für Biotechnologie und Bioprozesstechnik
Technische Universität Graz
Petersgasse 12, 8010 Graz (Österreich)
E-Mail: bernd.nidetzky@tugraz.at
Prof. Dr. B. Nidetzky
acib – Austrian Centre of Industrial Biotechnology (Österreich)
Prof. Dr. L. Brecker
Institut für Organische Chemie, Universität Wien
Währingerstraße 38, 1090 Wien (Österreich)

[†] Gemeinsame Erstautoren

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (Methoden inklusive Enzymproduktion und Aufreinigung, Assays, Analytik, enzymatische Umsetzungen, Produktanalyse, Aufreinigung und Produktidentifikation) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201507710> zu finden.

© 2015 Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License, die eine Nutzung und Verbreitung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird und keine Änderungen und Anpassungen vorgenommen werden.

breiten Substratazeptanz vereint, von großer Bedeutung, insbesondere wenn man die Produktion von Glykosylphosphaten als Plattformchemikalien in Betracht zieht. Zusätzlich könnte die Verwendung eines alternativen Phosphatdonors, der einfacher verfügbar ist als die bereits angewandten NTPs, den Prozess noch weiter verbessern. Die vorliegende Studie beschreibt die Entwicklung eines Phosphorylase-Phosphatase-Kombikatalysators für die Phosphorylierung von Zuckern am anomeren Zentrum ausgehend von anorganischem Phosphat (Schema 1).



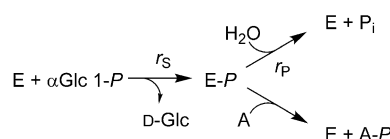
Schema 1. Diastereoselektive Synthese von Glykosylphosphaten mit einem Kombikatalysator aus Saccharose-Phosphorylase (SPase) und Glucose-1-phosphatase (AGP).

Die hier angewandte Umsetzung verläuft in zwei Stufen über den aktivierten Phosphatdonor α -D-Glukosylphosphat (α Glc 1-P), welcher mittels Saccharose-Phosphorylase (aus *Leuconostoc mesenteroides*; SPase; EC 2.4.1.7)^[13] durch eine thermodynamisch begünstigte Reaktion aus freiem Phosphat und Saccharose erzeugt wird. α Glc 1-P wird anschließend in einer spezifischen Transphosphorylierung in Anwesenheit eines Zuckerakzeptors und einer geeigneten Phosphomonoester-Hydrolase (Glucose-1-Phosphatase; AGP; EC 3.1.3.10) umgesetzt. Die große Vielfalt an Phosphatasen und deren zum Teil oft überlappende Substratspezifitäten^[14] machen die gezielte Auswahl eines geeigneten Biokatalysators für die Transphosphorylierung zu einer anspruchsvollen Aufgabe.

Die Synthese einiger Aldohexosephosphate mittels Phosphatase-katalysierter Transphosphorylierung ausgehend von Pyrophosphat wurde bereits beschrieben.^[15] Allerdings fand die Phosphorylierung immer am C6, nie aber am anomeren Zentrum statt. α Glc 1-P wird von vielen Phosphatasen hydrolysiert, aber erst kürzlich wurde die Verwendung von α Glc 1-P als Phosphoryldonor in der enzymatischen Synthese in Betracht gezogen.^[16] Unsere Arbeitshypothese war, dass Phosphatasen, welche α Glc 1-P spalten, potenziell auch fähig sein könnten, effektiv und spezifisch die Synthese von Phosphomonoestern am anomeren Zentrum zu katalysieren. Drei verschiedene Phosphatasen aus dem Bakterium *Escherichia coli* (AGP, HAD4, HAD13; siehe Hintergrundinformationen), deren bevorzugtes Substrat α Glc 1-P ist,^[14,17] wurden auf ihre Fähigkeit zur Phosphorylierung unterschiedlicher Zucker (siehe unten, 100–200 mM) in der Anwesenheit von α Glc 1-P (20 mM) getestet. Der Verbrauch von α Glc 1-P, die Phosphatfreisetzung und die Entstehung neuer Produkt(e) wurden dabei gemessen (Hintergrundinformationen; Methoden). HAD4 und HAD13 verwerteten α Glc 1-P ausschließlich durch Hydrolyse und sind daher für die Synthese ungeeignet. Im Unterschied dazu war AGP mit unterschied-

lichen Akzeptoren (z. B. D-Man) aktiv und nutzte eine beträchtliche Menge ($\geq 50\%$) des bereitgestellten Donorsubstrats für die Synthese von neuen Zuckerphosphaten. Eine vorläufige Analyse der Produkte ergab, dass das Hauptprodukt der Phosphorylierung nicht D-Mannose-6-phosphat war. Dies wies darauf hin, dass AGP möglicherweise eine von den bisher in der Literatur beschriebenen Phosphatasen deutlich verschiedene Stereoselektivität besitzt.^[15]

AGP gehört zur Familie der sauren Phosphatasen mit katalytischem Histidin.^[18] Der für diese Enzyme vorgeschlagene Reaktionsmechanismus verläuft über eine zweifache nukleophile Substitution und involviert ein kovalentes Phosphoenzym-Intermediat.^[17] Der Phosphoryltransfer erklärt sich durch Weiterreaktion des Enzymintermediats entweder mit Wasser oder mit alternativen Akzeptoren (Schema 2).^[16]



Schema 2. Kinetisches Schema der Transphosphorylierung durch die Phosphatase AGP. A ist der Zuckerakzeptor, P_i das freie Phosphat, P die kovalent gebundene Phosphorylgruppe.

Die Synthese von Zuckerphosphaten mittels AGP erfolgt daher unter kinetischer Kontrolle und wird stark durch die Eigenschaften des Enzyms beeinflusst. Wesentliche Enzymparameter in der Transphosphorylierung sind die Hydrolyse des Phosphoenzym-Intermediats sowie Hydrolyse des Syntheseprodukts.^[16]

Aufgereinigte AGP (0.2 U mL^{-1}) wurde für die Phosphorylierung (37°C ; pH 7.0) unterschiedlicher Monosaccharide (200 mM; D-Man, D-Gal, D-GlcNAc, D-GlcNH₂, D-GalNH₂, D-GlcUA, L-Fuc, D-Xyl, D-Ara, L-Ara) sowie von Xylit ausgehend von α Glc 1-P (20 mM) verwendet. Die zugehörigen Reaktionsverläufe sind in Abbildung S2 (Hintergrundinformationen) gezeigt. Bis auf D-GlcUA und D-GalNH₂ wurden alle getesteten Akzeptoren phosphoryliert. Zur Produktidentifizierung wurden 1D- und 2D-NMR-Analysen (^1H , ^{31}P) entweder direkt mit den Reaktionsgemischen oder mit grob aufgereinigten Reaktionsprodukten durchgeführt (Abbildungen S3–S7, Tabellen S2 und S3). AGP phosphorylierte D-Man, D-GlcNAc, D-Gal und L-Fuc an der anomeren Hydroxygruppe mit absoluter axialer Selektivität und erzeugte ausschließlich die entsprechenden α -D- oder β -L-Glykosylphosphate (Abbildungen S3–S6). Interessanterweise wurde bei D-GlcNH₂ die Phosphorylierung an 6-OH festgestellt (Abbildung S7). Xol, D-Xyl, D-Ara und L-Ara wurden ebenfalls phosphoryliert.

Die Effizienz, mit der jeder Zuckerakzeptor phosphoryliert wurde, wurde anhand von Schema 2 analysiert. Schlüsselparmeter sind hierbei die Verbrauchsrate von α Glc 1-P (r_s) und die Phosphatfreisetzungsrates (r_p). Bei reinen Hydrolysereaktionen beträgt das r_s/r_p -Verhältnis eins, findet allerdings ein Phosphoryltransfer auf einen Akzeptor statt, so ist das r_s/r_p -Verhältnis größer als eins. Abbildung 1 reiht die unterschiedlichen Akzeptoren nach ihren r_s/r_p -Werten.

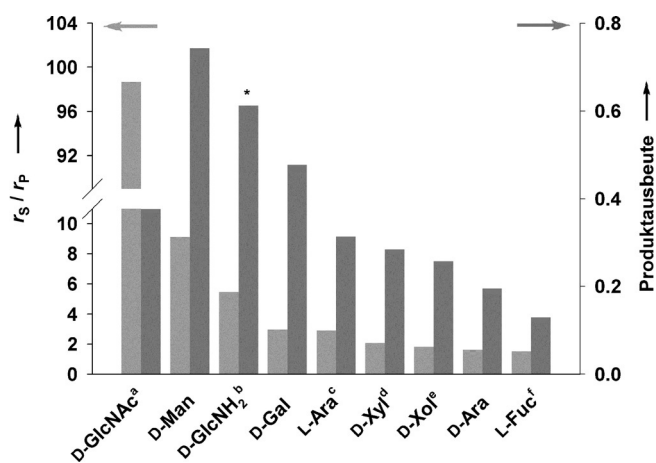


Abbildung 1. AGP katalysiert die Phosphorylierung unterschiedlicher Akzeptoren (200 mM) ausgehend von α Glc 1-P (20 mM). Die Produktionsausbeute wurde bei einem Umsatz an α Glc 1-P von $\geq 90\%$ berechnet, ausgenommen bei [a] 38 %, [b] 81 %, [c] 69 %, [d] 86 %, [e] 89 % und [f] 75 %. Der Stern (*) markiert die absolute Menge an gebildetem Zucker-1-phosphat (GlcNH₂ 1-P, GlcNH₂ 6-P), die zur Berechnung der Produktausbeute herangezogen wurde.

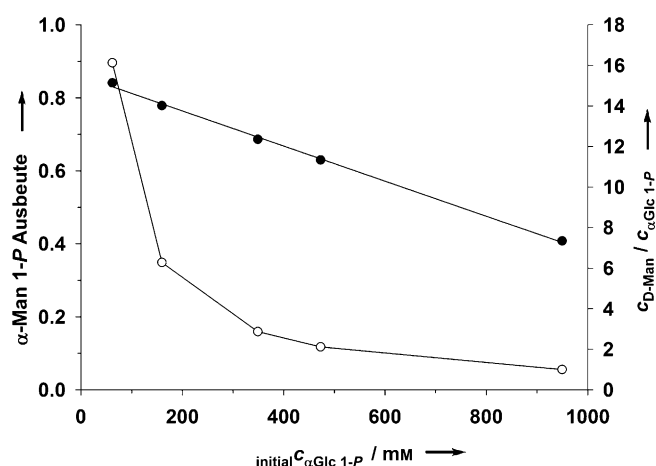


Abbildung 2. Die AGP-katalysierte Synthese von α Man 1-P bei unterschiedlichen Konzentrationen von α Glc 1-P (Donor) und D-Man (Akzeptor). (○) α Man 1-P Ausbeute, (●) $c_{D-Man} / c_{\alpha-Glc\ 1-P}$. Die Ausbeute von α Man 1-P wurde nach 120 min Reaktionszeit berechnet. Der Umsatz an α Glc 1-P verringerte sich von 95 % auf 52 % mit ansteigender Anfangskonzentration des Donorsubstrats.

Wie man aus Schema 2 ableiten kann, steigt erwartungsgemäß sowohl das r_s/r_p -Verhältnis wie auch die Ausbeute an phosphoryliertem Produkt in Abhängigkeit zur eingesetzten Akzeptorkonzentration (Abbildung S8). Da es im synthetischen Maßstab unpraktisch ist, bei niedrigen Verhältnissen der Konzentrationen von Donor- und Akzeptorsubstrat zu arbeiten, war es essentiell, dass auch bei hohen Substratkonzentrationen der Akzeptor und der Donor gleichmäßig umgesetzt werden. Dies ist exemplarisch für die Synthese von α Man 1-P in Abbildung 2 gezeigt. Es war möglich, bis zu 400 mM (ca. 100 g L⁻¹) an phosphoryliertem Produkt ausgehend von ca. 1M α Glc 1-P und D-Man herzustellen.

Hohe Substratkonzentrationen waren zudem auch nützlich, um Kontrolle über zwei auftretende Nebenreaktionen zu erlangen, nämlich die Sekundärhydrolyse der synthetisierten Zuckerphosphate und die Erzeugung von D-Glukose-6-phosphat (Glc 6-P) als Nebenprodukt. Glc 6-P entsteht aus der in der Reaktion durch Hydrolyse freigesetzten D-Glc. Im Allgemeinen erwiesen sich die von AGP erzeugten Glykosylphosphate als ausreichend kinetisch stabil, um eine komfortable Herstellung zu ermöglichen (Abbildung S2). Im Falle von α Gal 1-P, α Man 1-P und β -L-Fuc 1-P sank allerdings bei längerer Reaktionszeit die Produktkonzentration etwas ab, was zeigte, dass zeitliche Kontrolle einen wichtigen Faktor der Reaktionsführung darstellte (Abbildung S2). Dieser Effekt wurde in einem In-situ-NMR-Experiment bestätigt, in welchem die Synthese von α Man 1-P (Abbildung S10) verfolgt wurde. Bis zur optimalen Reaktionszeit (ca. 300 min) wurde das Hauptprodukt im großen Überschuss zu Hydrolyse- und Nebenprodukten gebildet. Danach jedoch sank der Produkttitel und die Reinheit nahm ab. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass erhöhte Substratkonzentration (≥ 400 mM) der Hydrolyse von α Man 1-P stark entgegenwirkte (Abbildung S9). Bezüglich Phosphorylierung am C-6 der freigesetzten Glukose kann festgestellt werden, dass die relative Konzentration an Glc 6-P stark vom r_s/r_p -Verhältnis

abhang, wobei sie im Falle von guten Akzeptoren ($r_s/r_p \geq 3$; Abbildung S11) maximal 10 % des gesamten Produkts ausmachte. Ein ausreichender Überschuss an Akzeptor über dem Donor ist daher geeignet, um die Produktion von Glc 6-P zu minimieren.

Als nächstes wurde die Synthese von Glykosylphosphaten unter Anwendung der kombikatalytischen Kaskade (Schema 1) vorgenommen. Die Umsetzungen wurden im sequenziellen oder simultanen Modus jeweils im Eintopfverfahren durchgeführt. D-Man, D-Gal und D-GlcNAc (1M) wurden ausgehend von Saccharose und Phosphat (je 100 mM) erfolgreich phosphoryliert (Abbildung 3, Abbildung S12).

Basierend auf die anfänglich eingesetzte Konzentration an freiem Phosphat wurde eine Ausbeute von 50 % bis 70 % je nach Akzeptorsubstrat erzielt (Abbildung 3, Abbildung S12). Der Zeitverlauf für die Synthese von α Man 1-P ist in Abbildung 3 gezeigt. Bei der sequenziellen Umsetzung (Abbildung 3a) wurde zuerst in einer gleichgewichtskontrollierten Reaktion α Glc 1-P (150 mM; ca. 80 % Substratumsatz) erzeugt, welches nach Zugabe von AGP und Akzeptor als Phosphoryldonor für die Phosphorylierung von D-Man diente. α Glc 1-P wurde vollkommen umgesetzt und eine etwa äquivalente Menge an α Man 1-P synthetisiert. Die Produktion von Glc 6-P war gering ($\leq 6\%$). Phosphorylierung von D-Fru,^[16] die durch die Spaltung der Saccharose entsteht (Schema 1), war unter der Nachweisgrenze. Phosphorylierung von Saccharose wurde nicht beobachtet. Die Konzentration an freiem Phosphat nahm im Verlauf der zweiten Reaktion mit AGP leicht ab (Abbildung 3a). Dies deutete auf eine fortgesetzte Umsetzung von Saccharose durch SPase hin, da α Glc 1-P schrittweise aufgebraucht wurde.

Interessanterweise war die simultane Reaktion von AGP und SPase ebenfalls sehr leistungsfähig und erbrachte eine Phosphorylierung von D-Man mit ähnlicher Effizienz und Ausbeute wie die Umsetzung im sequenziellen Modus (Abbildung 3b). Um den graduellen Abbau von α Man 1-P und

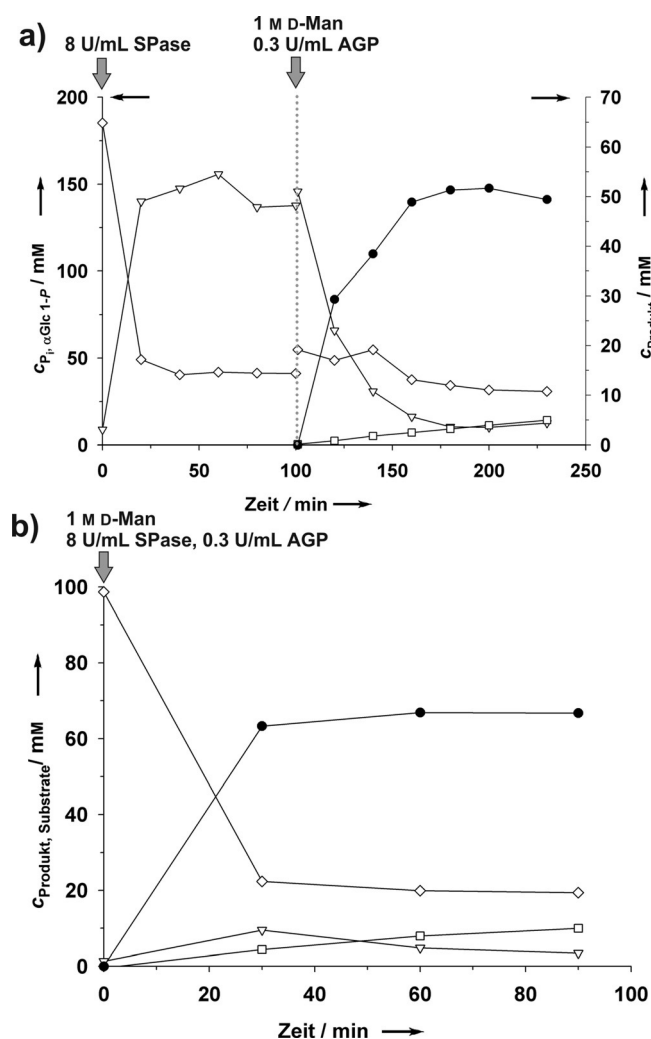


Abbildung 3. Synthese von α Man 1-P (●) durch kaskadische Umsetzung mit Phosphorylase und Phosphatase ausgehend von Saccharose und freiem Phosphat. Resultate aus einer a) sequenziellen und b) simultanen Reaktion sind gezeigt. Glc 1-P (▽), Glc 6-P (□) und Phosphat (◇).

die Produktion von Glc 6-P zu unterdrücken, war die Kontrolle der Reaktionszeit in beiden Reaktionsmodi essenziell. Überdies war das Verhältnis der volumetrischen Aktivitäten von Phosphorylase und Phosphatase ein wesentlicher Optimierungsparameter, wobei ein Überschuss der Aktivität der Phosphorylase (≥ 20 -fach) als optimal erkannt wurde. Aufgrund der geringeren Gesamtreaktionszeit war die Raum-Zeit-Ausbeute bei der Reaktion im simultanen Modus um den Faktor 5 höher als im Falle der sequenziellen Synthese (Abbildung 3).

Die Abtrennung des Glykosylphosphat-Syntheseprodukts von geringen Mengen an anderen Zuckerphosphaten (z. B. Glc 6-P), welche in den Reaktionsgemischen vorhanden waren, war das Hauptproblem der Produktaufarbeitung. Eine effiziente Trennmethode wurde etabliert, wobei der Schlüsselschritt in einer selektiven enzymatischen Hydrolyse der ungewollten Zuckerphosphate lag. Für diesen Zweck wurde die Phosphatase BT4131 aus *Bacteroides thetaiotaomicron* ausgewählt. Kinetische Studien in der Literatur^[19] und in hier

durchgeführten Experimenten (Abbildung S13) zeigten, dass dieses Enzym effektiv zwischen Zuckern unterscheidet, die an einem primären oder dem anomeren Hydroxyrest phosphoryliert sind. Somit war es möglich, phosphorylierte Nebenprodukte effizient aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen, wie es beispielhaft für die Produktion von Man 1-P, α GlcNAc 1-P und α Gal 1-P gezeigt wurde (Abbildungen S14–S19, Tabellen S4 und S5). Authentische Glykosylphosphate konnten nach Aufreinigung mit Anionenaustauschchromatographie und Fällung als Bariumsalz erhalten werden. Von einer einzelnen Umsetzung im kleinen Maßstab (1.5 mL) konnten bis zu 40 mg Produkt mit einer ausreichenden Reinheit (Tabelle S5) erzeugt werden.

Zusammengefasst berichten wir hier über die diastereoselektive Synthese von Glykosylphosphaten mithilfe einer Phosphatase-katalysierten Transphosphorylierung unter Verwendung ungeschützter Aldosezucker als Akzeptoren. Essenziell war hierbei die gezielte Auswahl des Biokatalysators, wobei die Phosphatase AGP ausgezeichnete Eigenschaften für die Synthese von Glykosylphosphaten besitzt. Die hier vorgestellte Reaktionskaskade in zwei Stufen basiert auf der Anwendung eines neu entwickelten Phosphorylase-Phosphatase-Kombikatalysators, der eine anomere Phosphorylierung ausgehend von anorganischem Phosphat und Saccharose über ein intermediär gebildetes α Glc 1-P ermöglicht. Verschiedene strukturell definierte Glykosylphosphate konnten in guten Ausbeuten (bis 70% basierend auf der anfänglich eingesetzten Phosphatkonzentration) erzeugt werden. Die so hergestellten Glykosylphosphate wurden mithilfe einer enzymunterstützten Aufreinigungsmethode aus den Reaktionsansätzen isoliert. Hiermit stellen wir eine neue vielversprechende Route zur Synthese definierter Glykosylphosphate vor, welche die bereits existierenden Kinase-katalysierten Systeme im Anwendungsbereich ergänzen kann.

Danksagung

Wir danken dem Österreichischen Fonds zur Förderung der Wissenschaftlichen Forschung (FWF-Projekte L-586-B03 und W901-B05, B.N.) für finanzielle Unterstützung, Prof. Hansjörg Weber (Institut für Organische Chemie, TU Graz) für die durchgeführten NMR-Analysen der gereinigten Produkte sowie Prof. Karen N. Allen (Department of Chemistry, Boston) für die Bereitstellung des Plasmids pET-3A-042, welches für die Phosphatase BT4131 kodiert.

Stichwörter: Biokatalyse · Kohlenhydrate · Phosphatase-Phosphorylase-Katalysator · Phosphorylierung · Zuckerphosphat

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 15867–15871
Angew. Chem. **2015**, 127, 16093–16097

- [1] a) F. H. Westheimer, *Science* **1987**, 235, 1173–1178; b) S. C. Kamerlin, P. K. Sharma, R. B. Prasad, A. Warshel, *Q. Rev. Biophys.* **2013**, 46, 1–132; c) A. V. Nikolaev, I. V. Botvinko, A. J. Ross, *Carbohydr. Res.* **2007**, 342, 297–344.
- [2] a) D. Auriol, F. Lefevre, R. Nalin, G. Redziniak, *Cosmetic and Pharmaceutical Composition Comprising N-Acetylglucosamine-*

- 6-Phosphate, **2011**, US 20130012475; b) R. Woodyer, P. Taylor, D. Demirjian, *Activated Sugars*, **2011**, US 20140024082 A1; c) M. R. de Groeve, V. Depreitere, T. Desmet, W. Soetaert, *Biotechnol. Lett.* **2009**, *31*, 1873–1877; d) T. Bültner, L. Elling, *Glycoconjugate J.* **1999**, *16*, 147–159; e) L. Wen, K. Huang, M. Wei, J. Meisner, Y. Liu, K. Garner, L. Zang, X. Wang, X. Li, J. Fang, H. Zhang, P. G. Wang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 12654–12658; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 12845–12849; f) P. Clapés, W.-D. Fessner, G. A. Sprenger, A. K. Samland, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 154–167.
- [3] a) S. Woo-Jung, B.-Y. Kim, W.-G. Bang, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *17*, 769–773; b) K. Ishikawa, Y. Mihara, N. Shimba, N. Ohtsu, H. Kawasaki, E. Suzuki, Y. Asano, *Protein Eng.* **2002**, *15*, 539–543.
- [4] a) G. K. Wagner, T. Pesnot, R. A. Field, *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 1172–1194; b) P. Pale, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4547–4549; c) M. M. Sim, H. Kondo, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2260–2267; d) M. Arlt, O. Hindsgaul, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 14–15; e) H. Dohi, et al., S. P. Vincent, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 9530–9539; f) O. J. Plante, R. B. Andrade, P. H. Seeberger, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 211–214; g) M. K. Patel, B. J. Davis, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 346–349; h) S. C. Timmons, D. L. Jakeman, *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 865–874; i) G. Y. Boons, A. Burton, P. Wyatt, *Synlett* **1996**, 310–312.
- [5] L. J. G. Edgar, S. Dasgupta, M. Nitz, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 4226–4229.
- [6] a) J. Yang, et al., *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2223–2226; b) S. H. Park, I. Pastusza, R. Drake, A. D. Elbein, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 5685–5691; c) M. Nishimoto, M. Kitaoka, *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 6444–6449; d) A. M. Pieslinger, M. C. Hoepflinger, R. Tenhaken, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 2902–2910; e) T. Yang, L. Bar-Peled, L. Gebhart, S. G. Lee, M. Bar-Peled, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 21526–21535; f) S. Sherson, I. Gy, J. Medd, R. Schmidt, C. Dean, M. Kreis, A. Lecharny, C. Cobbett, *Plant Mol. Biol.* **1999**, *39*, 1003–1012.
- [7] a) Y. Zou, W. Wang, L. Cai, L. Chen, M. Xue, X. Zhang, J. Shen, M. Chen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 3540–3543; b) V. Bourgeaux, F. Piller, V. Piller, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 5459–5462; c) M. Chen, et al., *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 2421–2425; d) L. Li, Y. Liu, W. Wang, J. Cheng, W. Zhao, P. Wang, *Carbohydr. Res.* **2012**, *355*, 35–39.
- [8] a) Y. Li, et al., *Molecules* **2011**, *16*, 6396–6407; b) L. Cai, W. Guan, M. Kitaoka, J. Shen, C. Xia, W. Chen, P. G. Wang, *Chem. Commun.* **2009**, 2944–2946.
- [9] a) D. Hoffmeister, J. Yang, L. Liu, J. S. Thorson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13184–13189; b) D. Hoffmeister, J. S. Thorson, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 989–992; c) J. Yang, X. Fu, J. Liao, L. Liu, J. S. Thorson, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 657–664.
- [10] M. M. Muthana, J. Qu, Y. Li, L. Zhang, H. Yu, L. Ding, H. Malekan, X. Chen, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 2728–2730.
- [11] Y. Liu, M. Nishimoto, M. Kitaoka, *Carbohydr. Res.* **2015**, *401*, 1–4.
- [12] a) W. Berke, H. J. Schütz, C. Wandrey, M. Morr, G. Denda, M. R. Kula, *Biotechnol. Bioeng.* **1988**, *32*, 130–139; b) H. Zhao, W. A. van der Donk, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 583–589.
- [13] C. Goedel, A. Schwarz, A. Minani, B. Nidetzky, *J. Biotechnol.* **2007**, *129*, 77–86.
- [14] E. Kuznetsova, et al., *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 36149–36161.
- [15] a) T. van Herk, A. F. Hartog, A. M. van der Burg, R. Wever, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 1155–1162; b) N. Tanaka, Z. Hasan, A. F. Hartog, T. van Herk, R. Wever, R. J. Sanders, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2833–2839.
- [16] P. Wildberger, M. Pfeiffer, L. Brecker, G. N. Rechberger, R. Birner-Gruenberger, B. Nidetzky, *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 1559–1572.
- [17] D. C. Lee, M. A. Cottrill, C. W. Forsberg, Z. Jia, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 31412–31418.
- [18] H. Chi, G. E. Tiller, M. J. Dasouki, P. R. Romano, J. Wang, J. O’Keefe, J. E. Puzas, R. N. Rosier, P. R. Reynolds, *Genomics* **1999**, *56*, 324–336.
- [19] Z. Lu, D. Dunaway-Mariano, K. N. Allen, *Biochemistry* **2005**, *44*, 8684–8696.

Eingegangen am 18. August 2015

Online veröffentlicht am 13. November 2015