

GLYCOBIOLOGIE: BIOTECHNISCHES VERFAHREN ZUR MASSENPRODUKTION VON GLYCOSYLTRANSFERASEN

Komplexe, aus verschiedenen Zuckern bestehende Kohlenhydrate (Glycane), die an Proteine oder Lipide gebunden sind, versetzen den menschlichen Organismus in die Lage, verschiedene Zelltypen und biologisch aktive Substanzen zu erkennen und zu binden. Verantwortlich für den Aufbau dieser lebensnotwendigen Makromoleküle sind sogenannte Glycosyltransferasen. Die Erforschung dieser Enzyme gestaltet sich schwierig, da sie nur in äusserst geringen Mengen vorhanden sind. Dies könnte sich nun mit der Arbeit einer Forschungsgruppe am Physiologischen Institut der Universität Zürich ändern.

Lebende Zellen des Tier- und Pflanzenreiches stellen drei verschiedene chemische Klassen von Makromolekülen her: Nukleinsäuren, Proteine und Glycane. Die Biosynthese der beiden erstgenannten erfolgt nach dem genetischen Bauplan entlang einer vorgegebenen Matrize. Glycane hingegen werden enzymatisch zusammengesetzt. Die glycosidischen Bindungen werden durch spezifische Glycosyltransferasen geknüpft. So wird zum Beispiel ein Glycan, das aus 10 verschiedenen Bausteinen besteht, von 9 verschiedenen Enzymen zusammengebaut.

Grosses Anwendungspotential

Der Wissenschaftszweig, der sich mit der Biologie der Glycane befasst – die Glycobiologie – ist auch für die Pharmaindustrie höchst interessant. Denn Glycane spielen unter anderem eine Rolle bei der Ausbildung von Gewebestrukturen, bei der Blutgerinnung, bei Entzündungen oder bei der Abwehr von Infektionen. Vor allem in den USA und in Japan hat diese Forschung wegen ihres grossen Anwendungspotentials eine hohe Priorität. Trotzdem weiss man bisher nur wenig über die Struktur und Funktionsweise der an der Glycan-Synthese beteiligten Enzyme. Dies vor allem deshalb, weil diese Enzyme nur in äusserst geringen Mengen vorhandenen sind. Bisher mussten die Forscher und Forscherinnen das benötigte Enzymmaterial mit schlechter Ausbeute aus natürlichen Quellen wie bovinem Kolostrum¹ oder Frauenmilch gewinnen.

Wie die Pressestelle des Schweizerischen Nationalfonds vor kurzem mitteilte, ist es einer Forschungsgruppe unter Leitung von Eric Berger, Professor am Physiologischen In-

stitut der Universität Zürich, gelungen, grössere Mengen von humaner β -1,4-Galactosyltransferase auf biotechnischem Weg herzustellen (HERRMANN et al., 1995). Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit einem Basler Pharmakonzern und dem Institut für Biotechnologie des Forschungszentrums Jülich in Deutschland durchgeführt.

Bäckerhefe produziert Human-Enzym

Den Wissenschaftlern und Wissenschaftlerinnen gelang es, entsprechende DNA-Sequenzen in das Erbmateriale der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* einzubringen, sodass diese nun aktive, lösliche β -1,4-Galactosyltransferase produziert (KLEENE et al., 1994). Dann wurde die gentechnisch veränderte Bäckerhefe in einem Grossfermenter gezüchtet. Anschliessend musste das von der Hefe hergestellte Enzym mittels sequentieller Affinitätschromatografie (N-Acetylglucosaminy- und α -Lactalbumin-Sepharose) gereinigt werden. Der momentane Projektstand erlaubt nun dem Zürcher Forschungsteam, Versuche zur Kristallisierung durchzuführen, damit die Enzym-Struktur mittels Röntgendiffraktionsanalyse untersucht werden kann.

Eine praktische Anwendung der günstig und in grossen Mengen in Bäckerhefe produzierten Enzyme ist ihr Einsatz als Katalysatoren für die technische Synthese biologisch aktiver Oligosaccharide. Enzyme haben nämlich den Vorteil, dass sie «saubere» Werkzeuge sind – ganz im Gegensatz zur chemischen Synthese von komplexen Zuckermolekülen, die wegen der niedrigen Ausbeute sowie toxischen Ausgangssubstanzen und Nebenprodukten alles andere als unproblematisch ist.

Literatur

HERRMANN, G.F. et al. 1995. Large-scale production of a soluble human β -1,4-galactosyltransferase using a *Saccharomyces cerevisiae* expression system. – *Protein Express. Purif.* 6, 72–78.

KLEENE, R. et al. 1994. Expression of soluble active human β -1,4 galactosyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. – *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201, 160–167.

ULTRASCHALLMIKROSKOP ERZEUGT BILDER FÜR GRUNDLAGENFORSCHUNG UND INDUSTRIE

Die Bedeutung von Erkenntnissen der Grundlagenforschung für industrielle Anwendungen zeigt sich meist erst Jahre später. Ein Beispiel dafür ist das am Institut für Biomedizinische Technik der Universität und ETH Zürich entwickelte Ultraschallmikroskop. Auch 5 Jahre nach Fertigstellung

¹ Erstmilch nach dem Kalben.

setzt der Prototyp immer noch Massstäbe: Bei der Auflösung in axialer Ebene ist er andern Geräten um den Faktor 10 überlegen. Was ursprünglich für die biologische und medizinische Grundlagenforschung gedacht war, interessiert heute vorwiegend die Werkstofftechnik.

Bildgebende Ultraschalluntersuchungen haben in der Medizin schon lange ihren festen Platz. Diese Geräte arbeiten nach dem Reflexionsprinzip, das heisst, der vom Objekt reflektierte Schall wird erfasst und zur Bildgebung verwendet. Die dafür verwendeten Ultraschallfrequenzen liegen im Bereich von 2 bis 20 MHz und ergeben geometrische Auflösungen von etwa 0.75 mm.

Um mikroskopische Auflösungen im Bereich von 1 µm und weniger zu erreichen, muss man mit höheren Frequenzen (bis zu einigen GHz) arbeiten. Die ersten einfachen Ultraschallmikroskope wurden bereits 1980 an der amerikanischen Stanford-Universität gebaut. In der Schweiz machte sich bald darauf die Arbeitsgruppe von Max Anliker, Professor am Institut für Biomedizinische Technik der Universität und ETH Zürich, an die Verbesserung der Idee aus Stanford. Diese Arbeiten wurden im Rahmen des Nationalen Forschungsprogramms NFP 18 «Biomedizinische Technik» durchgeführt.

Die Ultraschallmikroskopie ist ein Gebiet, das noch in den Kinderschuhen steckt. Für den Ingenieur Hartmut Kanngiesser war deshalb klar, dass das gleiche Objekt immer auch mit einem Lichtmikroskop abgebildet werden sollte. Die Lichtmikroskopie eignet sich als Vergleichsverfahren, weil man auf sehr viel Erfahrung zurückgreifen kann und der apparative Aufwand verhältnismässig gering ist. Um vergleichende Untersuchungen durchführen zu können, baute Kanngiesser beide Mikroskop-Typen im gleichen Gerät ein. Die Bilder der beiden Mikroskop-Typen werden durch prinzipiell verschiedene kontrastgebende Mechanismen erzeugt. Während das Lichtmikroskop Hell-Dunkel-Unterschiede erfasst, registriert das Ultraschallmikroskop Hart-Weich-Unterschiede. Im Gegensatz zur Lichtmikroskopie, bei der ein zweidimensionales Bild mit Millionen von Sinneszellen im Auge oder mit Millionen lichtempfindlicher Kristalle auf einem Fotofilm parallel erfasst wird, steht beim Ultraschallmikroskop nur eine Sinneszelle zur Verfügung. Mit diesem sogenannten Transducer – der im Puls-Echo-Betrieb sowohl als Sender als auch als Empfänger arbeitet – muss das Objekt Punkt für Punkt abgetastet werden. Durch Auffangen und Analysieren der reflektierten Wellen lässt sich ein Bild der verborgenen Strukturen gewinnen.

Bezüglich axialer Auflösung Weltspitze

Ein grosses Problem bei der Ultraschallmikroskopie sind Interferenzen. Diese entstehen dadurch, dass sich die Echos verschiedener Strukturen im Objekt überlagern. Hartmut Kanngiesser gelang es, den Bereich, aus dem Echos empfangen werden, einzuschränken. Das von ihm entwickelte Ultraschallmikroskop erreicht eine axiale Auflösung von 1.3 µm. Dies ist möglich durch den Einsatz extrem kurzer Wellenpakete (Dauer < 1.5 nsec). Zu deren Erzeugung und Verarbeitung braucht es einen eigens dafür entwickelten Schalter (Gallium/Arsenid-Halbleiter für Hochfrequenztechnik). Bezüglich axialer Auflösung ist das an der ETH Zürich entwickelte Ultraschallmikroskop andern Geräten um den Faktor 10 überlegen. In horizontaler Richtung liegt die Auflösung bei 0.54 µm.

Während der Zeit an der ETH Zürich untersuchte Kanngiesser eine Vielzahl biologischer Objekte. So erfasste er mit dem Ultraschallmikroskop beispielsweise den Innenaufbau von Knochen und studierte Zellkulturen. Dabei zeigte sich, dass das Gerät gut geeignet ist, um auch die Reflexionen von sehr schwach reflektierenden biologischen Objekten zu erfassen. Dank der hohen axialen Auflösung war es möglich, Schichtaufnahmen der Objekte anzufertigen, die sich für eine dreidimensionale Darstellung eignen.

Heute arbeitet Hartmut Kanngiesser für die Arbeitsgemeinschaft für industrielle Forschung (AFIF) im Technopark Zürich. Die AFIF ist eine private Organisation mit dem Ziel, die an öffentlichen Forschungsstätten erzielten Resultate umzusetzen. Dort studiert der Ingenieur beispielsweise zusammen mit Metallurgen Fehler im Stahl, die beim Bearbeiten von Werkstücken durch Funkenerosion entstehen. Zudem hat er, abgeleitet vom ETH-Ultraschallmikroskop, ein Messgerät zur Schichtdickenmessung von Biofilmen in der Papierindustrie entwickelt.

Auch wenn sich das Interesse zusehends auf die Werkstofftechnik verlagert hat, bleiben Anwendungen der Ultraschallmikroskopie in der Biologie und Medizin weiterhin von Interesse. So möchten zum Beispiel deutsche Forscher an der Universität Frankfurt mit Hilfe des Ultraschallmikroskops die mechanischen Eigenschaften von Zellen testen. Die Ergebnisse dürften wichtige Hinweise auf Stabilität und Elastizität biologischer Stoffe liefern. In der Schweiz allerdings wird mit dem an der ETH entwickelten Gerät gegenwärtig keine biologisch, medizinische Grundlagenforschung mehr betrieben.

SUSANNE HALLER-BREM