

인체 복합당쇄의 생합성제어 및 당쇄리모델링 연구

김 철 호

동국대학교 한의과대학 생화학교실

서 론

핵산, 단백질, 당쇄(당(糖)鎖)는 생체에 널리 분포하는 3대 고분자이다. 핵산과 단백질연구로 발전한 유전공학이나 단백질공학으로 생체내에 여러 가지 분자기구(分子機構)가 밝혀지고 있다. 그러나 다세포생물(多細胞生物)이 만드는 단백질의 대부분이 당쇄(糖鎖)를 갖는 당단백질(糖蛋白質)로 존재하고 있다. 당쇄정보는 생명현상 그 자체에는 필수적이지 않지만 다세포사회의 유지에 필요할 것으로 보인다. 이와 같이 糖鎖生物學의 역할은 장래의 생명공학의 발전에 중요한 역할을 할 것이다. 최근 이러한 糖鎖의 정보를 해명하고 생물학을 이해해 가려는 학문영역을 만들어 이를 당쇄생물학(糖鎖生物學) 또는 당쇄공학(糖鎖工學)이라 한다.

당쇄가 생체내에서 여러 가지 역할을 한다는 보고는 많다. 그중에는 염증부위의 selectin이나 간장의 asialo당단백질 receptpr 등처럼 널리 알려진 것들도 있다. 당쇄를 단백질이나 펩타이드의 수식, 디자인에 이용하려는 경우 어느 당쇄를 어느 위치에 결합시킬까가 문제이다. 당쇄의 생합성은 유전정보로 만들어진 당전이효소군의 공동작업으로 진행된다. 이 합성에는 주형이 존재하지 않으므로 만들어지는 당쇄구조는 단백질만큼은 엄밀하지 않다. 즉, 당쇄는 세포내 소포체에서 부가되어 소포체와 골지체에서 당쇄생합성효소군에 의해 수식을 받아 성숙한다. 이와 같은 당쇄수식은 소포체에서 골지체에 걸쳐 순차적으로 분포하는 각종의 glycosidase나 당전이효소로 된 당쇄생합성효소군 사이를 당단백질이 통과하는 과정에서 이들 효소반응으로 이루어진다. 이 일련의 반응은 모든 당단백질에 균일하게 작용하지는 않으므로 당쇄의 분지도나 그 크기(당쇄 말단까지의 신장도)는 각 단백질마다 다르다. 이것이 주형을 이용하는 DNA나 단백질과 다른 점이다.

당단백질을 재조합하여 생산하려고 할 때 보통 숙주로서 주로 동물세포를 이용되고 있으나 동물세포가 만드는 당단백질 당쇄도 균일하지가 않다. 즉, 한개의 당단백질에 부가되는 당쇄의 갯수가 수십종이상인 경우도 있다. 또한 인간이 아닌 다른 동물세포가 생산하는 당단백질의 당쇄페턴은 사람의 것과

다른 경우도 많아 사람에 대한 항원성을 나타내는 당쇄구조도 많다[1, 2]. 따라서 의약품개발을 고려하는 경우, 사용하는 동물세포의 당쇄생합성 능력을 개선할 필요가 있다. 또한, 특정 당쇄구조를 갖는 당단백질의 glycoform 유용성을 검정하여 응용을 하려면 그 특성의 충분하지는 않지만 적혈구증식인자인 erythropoietin의 경우 분지가 많은 당쇄형을 갖는 glycoform 이 *in vivo*활성이 높다.

본 총설에서는 동물세포를 이용한 당단백질생산에 다양한 glycoform에서 특정 glycoform을 균일성을 높이는 기술을 소개하고, 이를 위하여 생체내 세포표면인식을 위한 시그널분자로서 중요한 asparagine결합형(*N*-결합형), 세포표층 당쇄 및 당쇄생합성 primer와 이들 당쇄생합성제어 연구를 소개한다.

N-결합형당쇄의 구조조절 전략

N-결합형당쇄의 생합성은 소포체에서 당쇄전구체가 되는 올리고당 블록이 dolicol위에 합성되어 소포체에 있는 단백질의 Asn잔기에 전이되며 이 단백질은 골지체를 통과하여 분비되는 동안 당쇄는 여러 가지 수식을 받아 성숙형으로 성장하여 간다. 이 과정에서 당쇄는 처음 고만노스(high mannose)형 구조를 취하지만 도중에 하이브리드(hybrid)형을 거쳐 마지막에는 복합형(complex) 구조로 된다. 즉, 복합형당쇄는 가장 성숙한 당쇄형으로 복합형당쇄를 조절하는 것이 *N*-결합형당쇄의 구조조절에서 가장 중요한 것이된다.

당쇄페턴은 소포체, 골지체에 분포하는 당쇄생합성효소군의 발현상태를 어느정도 반영하고 있다. 실제로 같은 단백질이라도 부가되는 당쇄페턴은 그단백질을 생산하는 장기에 따라 다르며 동물종에 따라서도 다르다. 또한, 같은 세포가 생산하는 단백질이라도 반드시 같은 종류의 당쇄페턴을 나타내지는 않는다. 한 단백질의 다수의 당쇄가 부가되어 있는 경우에도 당쇄의 결합위치에 따라 구조가 다르기도 하다. 이처럼 단백질에 부가되는 당쇄구조에 영향을 미치는 요소로는 숙주세포에 있는 당쇄생합성기구에 관한 것과 당쇄가 부가되는 단백질에 관한 요소등 2종류를 들 수 있다. 따라서, 당쇄구조를 조절하

거나 개변하기 위해서는 숙주세포의 당쇄생합성기구를 다루거나 단백질의 아미노산서열을 바꾸는 2가지를 들 수 있다. 그러나 단백질기능을 유지하고 항원성을 고려한다면 숙주세포의 당전이효소군의 발현양을 조절하여 각효소활성 균형을 조절하는 연구가 효과적이다. 이를 당쇄공학의 일면이라 하겠다. 그러나 당전이효소군의 유전자클로닝이 필수이다. 1990년대에 이르러 당전이효소유전자의 클로닝이 시작되어 현재는 응용단계에 있다.

복합형당쇄의 고분지화를 통한 당쇄리모델링(개변)

복합형당쇄의 골격은 각종 *N*-acetylglucosamine전이효소(GnT)에 의해 추가되는 GlcNAc에 의해 형성되는 분지구조(Fig. 1)로 구성된다. 사람을 포함하는 포유류의 복합형당쇄는 4분지형까지 알려져 있는데(Fig. 2) 이것이 복합형당쇄의 기본 골격이며 앞에는 측쇄가 형성된다. 3분지형이나 4분지형의 당쇄형성에 필요한 GnT효소는 GnT-IV와 GnT-V이다. GnT로 추가되는 GlcNAc라도 GnT-III로 추가되는 bisecting GlcNAc에는 그 앞에 측쇄가 형성되지 않게 된다(Fig. 3). 따라서 bisecting GlcNAc는 복합형당쇄의 작은 분지로 분류한다.

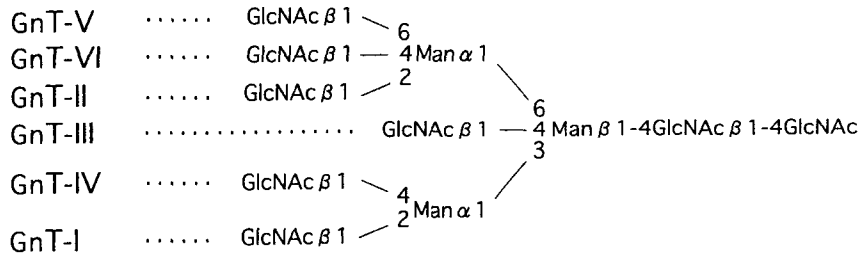


Fig. 1. Classification of GnTs.

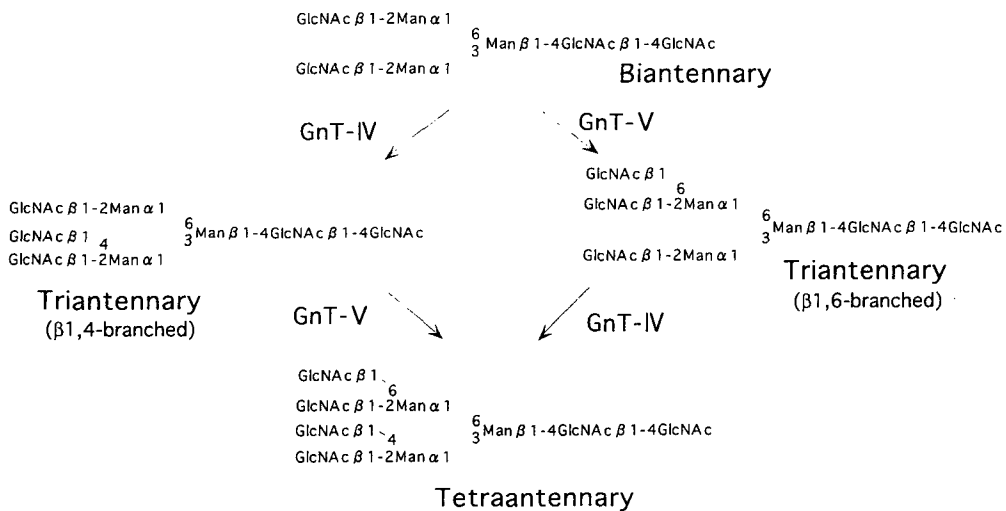
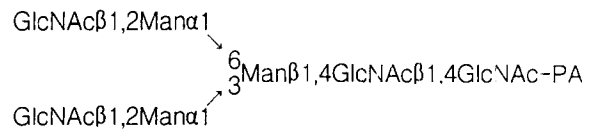


Fig. 2. Enzymatic reactions of GnT-IV and GnT-V.

GlcN,GlcN-biant-PA



GlcNAc-transferase-III

UDP-GlcNAc

UDP

GlcN,(GlcN),GlcN-biant-PA

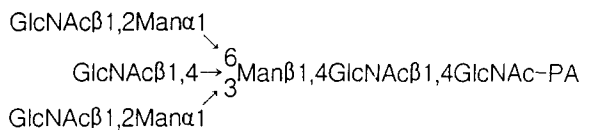


Fig. 3. Enzymatic reactions of GnT-III.

GnT-III의 cDNA는 1992년 Nishikawa 등[3]과 Kim 등[4]에 의해 보고되었으며, GnT-V의 cDNA는 1993년 Shoreibah 등 [5]와 1994년 Saito 등[6] 및 Park 등[7]에 의해 보고되었다. GnT-IV는 1998년 Minowa에 의해 보고되었다[8]. 이들 당쇄 전이효소 유전자를 CHO 등과 같은 사람과 유사한 강쇄를 함

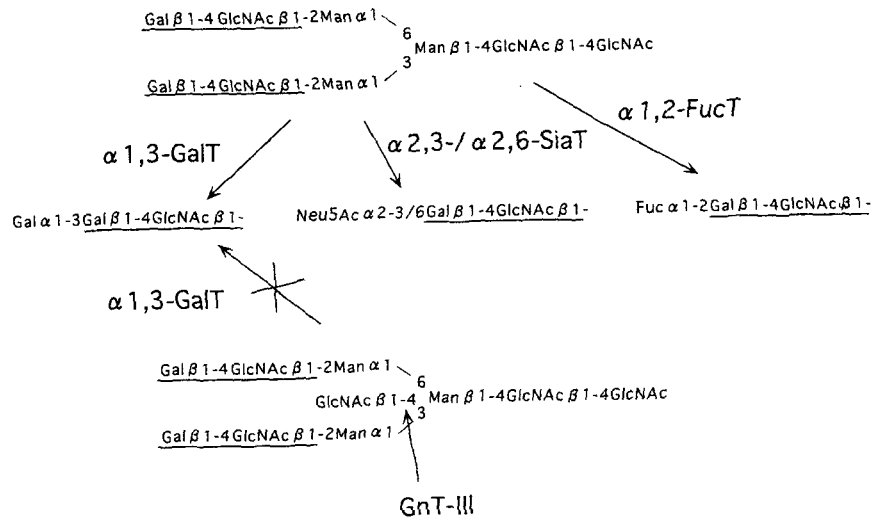


Fig. 4. Glycosyltransferases which compete with $\alpha 1,3$ -GalT.

성하는 동물세포주에 도입하여 당쇄구조를 개변한 당단백질을 인위적으로 만들 수 있다.

이식항원 제어와 Galactose전이효소의 활성조절에 의한 bisecting GlcNAc잔기의 부가조절

세포안에서 당쇄구조를 조절하는 요소는 여러 가지 있을 수 있으나 적극적인 방법으로 당전이효소들끼리 길항작용시킴으로서 당쇄구조조절을 할 수 있다. 즉 당전이효소중에는 같은 구조를 갖는 기질을 공통으로 사용하여 결국 경합하게 되며 어느쪽의 효소가 먼저 작용하는가에 따라 당쇄구조는 다르게 된다. 이러한 기질경합성을 갖는 당전이효소의 활성을 조절함으로써 당쇄구조를 조절하게 되는 것이다.

예를들어 이식항원으로 잘 알려진 Gal $\alpha 1$ -3Gal결합항원의

생성조절이 가능하다. Gal $\alpha 1$ -3Gal결합단위를 갖는 당쇄는 mouse나 돼지 등에 존재하지만 사람에게는 합성되지 않는다. Gal $\alpha 1$ -3Gal결합구조를 갖는 조직을 사람에게 이식하게되면 생체거부반응을 야기하게 된다. 이러한 이식항원을 제거하기 위해서는 Gal $\alpha 1$ -3Gal결합을 만드는 $\alpha 1$ -3Galactose전이효소 ($\alpha 1$ -3GalT)를 억제하기 위하여 $\alpha 1$ -3GalT와 경합하는 당전이효소 유전자를 mouse나 돼지세포에 도입해야 한다. Fig. 4처럼 $\alpha 1$ -3GalT는 기질당쇄에 대해 $\alpha 1,2$ -fucose전이효소, $\alpha 2,3$ -sialyl전이효소 또는 $\alpha 2,6$ -sialyl전이효소, GnT-III와 경합하며 이들 경합효소중 어느것을 대량으로 발현시키게 되면 Gal $\alpha 1$ -3Gal결합생성은 억제된다[9-14].

또한, 당쇄가 galactosyl화되면 다른 당전이효소의 작용이 저해된다는 점에 착안하여, gene targeting에 의한 $\beta 1,4$ -GalT 유전자파괴를 통해 galactose잔기의 부가가 억제된 세포주를 얻는다. 이 세포주는 bisecting GlcNAc잔기의 부가는 증가하

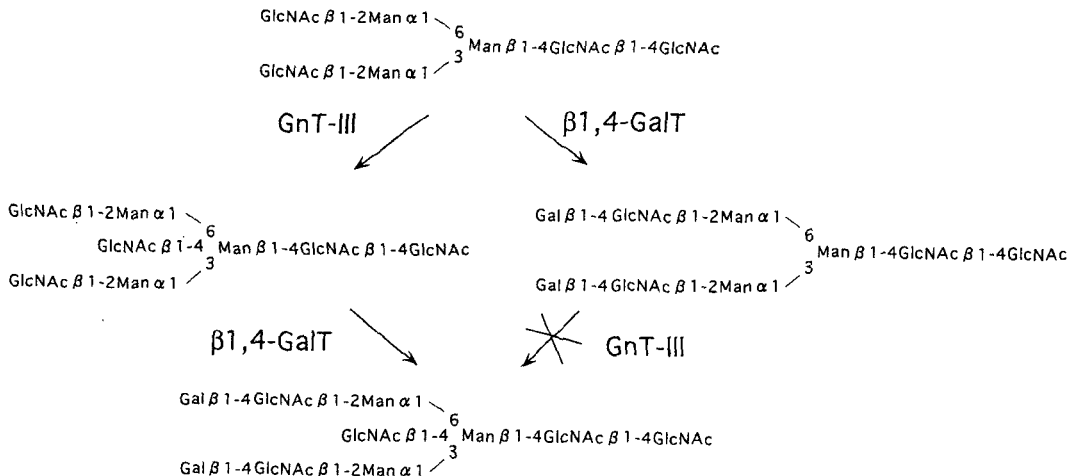


Fig. 5. Enzymatic reactions of GnT-III and $\beta 1,4$ -GalT.

게 되는데 이는 같은 당쇄기질을 β 1,4-GalT와 GnT-III가 경합함으로써 생기는 결과이다. 즉, bisecting GlcNAc는 GnT-III에 의해 부가되지만 GnT-III는 galactose부가를 받은 당쇄에는 기질로 하지 않는다는 것을 알 수 있다(Fig. 5)[15-20]. 즉, 우연하게 acceptor당쇄에 galactose잔기가 부가되면 이 galactosyl화 당쇄에 대해서 GnT-III는 반응할 수 없게 된다. 즉 GnT-III와 β 1,4-GalT는 같은 기질을 두고 서로 경합하는 것이다.

이처럼, 당전이효소군의 발현조절을 통하여 당쇄구조를 유효하게 조절할 수 있다. 현재 상업적으로 생산되는 당단백질의 당쇄는 엄밀하게는 조절되지 않으며 여기서 설명한 대로 당쇄구조를 조절하는 기술은 당쇄의 불균일성을 억제하는 의미에서 공업적인 품질관리에 필수적이다. 또한 당단백질의 기능을 향상시키고 당쇄생물학의 영역에서 당쇄의 구조와 기능관계를 해명하는 길이 된다.

앞으로 당쇄구조를 정교하게 조절하기 위한 문제로서는 다음과 같은 것을 들 수 있다. 원래, 당쇄생합성은 골지체에서 당전이효소에 의해 단당부기뿐 아니라 기질인 당뉴클레오타이드의 합성, 골지체안으로 당뉴클레오타이드 수송등도 포함된다. 각각의 단당을 당쇄에 결합시키는 일련의 과정을 전체적으로 정비하는 일이 보다 당쇄구조제어의 효율을 향상시키는 것이 될 것이다.

세포표층의 당쇄

세포표층의 여러 가지 복합당질(당단백질, proteoglycan, 당지질)상에 존재하는 당쇄는 세포인식과 접착, 세균의 결합과 침입, 이식, 염증, 그리고 암화와 암전이등에 리간드 혹은 수용체로서 관여한다[21]. 이러한 과정은 단백질수용체와 당쇄사이의 상호작용에 의존하므로 당쇄생합성저해는 인체질환의 치료약의 개발을 의미한다.

당쇄생합성을 담당하는 각기 다른 당전이효소는 ER-골지체에 존재하며 활성화된 당공여체(예, sugar-nucleotide, dolichol-phosphomannose)에서 특정수용체기질에 전이반응을 촉매한다. 이들 당전이효소는 한 개의 효소반응생성물인 올리고당을 다음 전이효소의 기질로 이용하고 최종적으로는 직선형 또는 분지형의 당고분자를 형성한다. 따라서 이들효소의 저해제의 개발은 인체질환의 원인이되는 당쇄생합성을 저해하는 의약품으로 개발가능하다.

당쇄생합성 효소저해제

당전이효소는 glycosyl화반응저해제를 디자인하는데 최적의 목표가 되는데 한가지 전략으로서 당전이효소의 반응이 일어날 때 작용하는 저해제(probe)로서 당공여체인 sugar-nucleotide 생물산업

를 변형시킨 라이브러리를 통해 개발될 수 있다[22]. 대부분의 당전이효소는 acceptor에 강한 특이성을 나타내므로 기질 아나로그를 기초로 한 저해제 고안도 효과적일 것이다. 즉, 기질 인식에 관여하는 acceptor의 OH기질을 다른 관능기로 바꾸어 저해제개발이 가능하다. 이 방법으로 Hindsgaul그룹이 많은 저해제개발을 보고한 바 있다[23,24].

N-결합형 당쇄생합성에 관여하는 당전이효소들은 식물의 polyhydroxylalkaloid(예, swainsonine, 카스타노스페루민)[25]에 의해 저해 받는다. 이들 화합물의 유도체들은 항박테리아제나 당지질축적억제 약품으로서 임상시험중에 있다. 예를 들어 Glycosidase-I 저해제인 N-butyldeoxynojirimycin(NB-DNJ)는 glycosylceramide합성을 저해한다[26, 27]. Glycosylceramide유도체도 sphingolipid의 생합성을 저해한다[28]. 또 다른 예는 대사경로에서 생성되는 중간체의 당잔기를 수식하는 방법으로 합성된 N-alkyl화 mannosamine 유도체(시알산의 전구체)는 바이러스의 감염능을 억제한다[29]. Keton기를 갖는 mannosamine유도체는 세포표층공학에도 이용가능하다[29]. 이들 유도체는 아데노바이러스이용 유전자 전달계를 촉진한다[30].

Glycoside primer의 다른 당전이효소의 저해제로의 이용

N-결합당쇄 이외의 O-결합당쇄의 코아당쇄, glycosaminoglycan 및 mucin형 당쇄가 만들어지기 위한 처음 개시물질(primer)은 무엇일까? 25년전으로 거슬러 올라가면 Okayama 등이 β -D-xylopyranoside가 glycosaminoglycan(GAG)생합성의 primer로 작용한다는 사실을 보고한 바 있다. 즉, β -D-xylopyranoside가 β -1,4-galactosyl전이효소의 수용체가되며 사슬이 없는 상태에서 작용되어 세포로부터 분비되는 것이다[31]. 동시에 이들은 내인성 proteoglycan의 xylosyl 화된 core단백질과 길항하여 결국 proteoglycan생합성의 저해제로 작용하는 것이다[32]. 대부분의 xyloside는 chondroitin sulfate만 prime하며, estradiol은 CHO의 chondroitin sulfate나 heparan sulfate모두를 prime 한다[33]. 이들은 chondroitin sulfate사슬을 선택적으로 생성하는 primer라기 보다는 효과적으로 heparan sulfate의 proteoglycan 합성을 저해하고 있는 것이다.

일반적으로 priming은 내인성화합물의 glycosyl화를 저해하는 것으로 생각되어지며 고농도의 primer를 첨가하여 많은 당쇄를 생성시킨다는 것은 당뉴클레오타이드의 pool를 고갈시키거나 다른 glycosyl화 반응경로에 영향을 주게되는 것이다. 또한 xyloside는 glycosaminoglycan이외에 다른 당쇄합성의 primer로도 작용한다[34].

Xyloside가 proteoglycan생합성변화에 영향을 준다는 사실로부터 다른 glycoside도 primer로 작용가능하다(Table 1). 몇

Table 1. Examples of glycoside primers

Glycoside	Pathway affected
Xyl β -O-R	Glycosaminoglycans and glycolipids
Gal β -O-R, Gal β 4Xyl-O-R	Glycosaminoglycans
GalNAc α -O-R	O-glycans found on glycoproteins and mucins
GalNAc β -O-R	Polylectosamines
Gal β 4GlcNAc β -O-R	Peracetylated Lewis X

가지 단당류들을 세포에 mM농도로 첨가하면 O-결합형 (mucin)당쇄를 약간 저해하며 N-acetylgalactosaminide(예, GalcNAc- α -O-Bn)은 세포표층의 Lewis식 혈액형항원발현을 변화시키므로 GalcNAc- α -O-Bn를 첨가한 세포와 활성화내피 세포와의 접착이 저해된다[35]. GalcNAc- α -O-Bn는 mucin에 있는 대표적인 당쇄와 같은 O-결합형당쇄를 prime하며, 당단백질생합성 초기를 방해하여 결국은 세포내 모든 O-결합형당쇄 생합성에 영향을 미친다. 비슷하게 N-acetylglucosaminide도 그 말단에 sialic acid가 결합한 것과 결합하지 않은 polylectosamine사슬의 primer로서 작용한다. 그러나 단당으로서 prime로 작용하는(mannose는 작용않음) 것은 극이 일부이다.

단당외에 2당류도 동물세포에서는 primer로서 작용한다. 2당은 단당에 비해 효과적이며 효소들의 표적으로 작용가능하다(Fig. 6). 그러나 2당과 긴사슬의 올리고당들은 극성의 많은 수산기를 가지므로 세포막에 들어가기 어려우므로 수산기를 methyl기 등으로 보호할 필요가 있다.

몇가지 par-acetyl화 2당류(예 Gal β 1-4GlcNAcGalGal β -O-

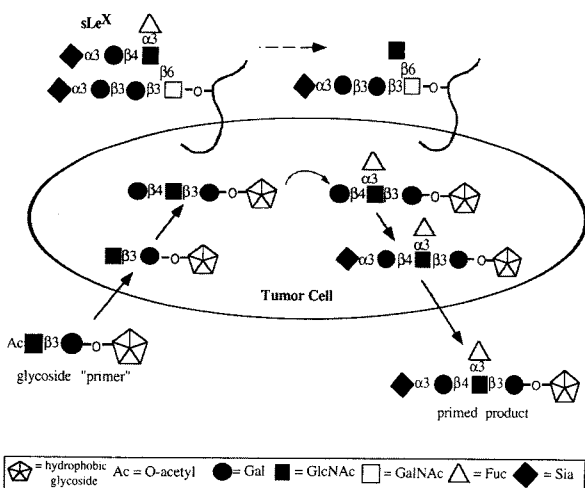


Fig. 6. The concept of “Priming”. Synthetic oligosaccharides block O-linked glycan assembly by serving as alternative substrates and diverting the synthesis of Lewis antigen away from endogenous O-linked(mucin-like) chains, and onto exogenous disaccharide primer.

naphthalenemethanol(NM), GlcNAc β 1-3Gal β -O-NM, 및 Gal β 1-3GalNAc α -O-NM)은 올리고당합성의 primer로 작용하여 O-결합형(mucin형)당쇄를 생성한다. 이들 metabolic decoy 들은 selectin에 인식되는 당쇄말단의 Lewis항원발현이 GalcNAc- α -O-Bn에 의해 저해되었기 내인성당단백질의 O-결합형당쇄생합성의 경로를 바꾸게 된다[36]. 이는 단당primer (1-2 mM)보다도 낮은 농도(-25 μ M)에서 일어난다.

Glycoside primer의 인체질환에 응용

숙주-병원균의 감염, 비정상백혈구-내피세포의 상호작용, 숙주세포-조양세포와의 접착, signaling을 담당하는 접착현상은 당쇄-receptor의 상호작용중 affinity와 abinity에 의존하므로 당쇄ligand나 receptor의 발현량에 매우 민감하다. 세포접착의 경우, 2당 primer는 *in vitro*에서 리간드발현을 적당히 저해하지만(40~80%), 세포접착능에는 큰 변화를 주게된다. Selectin과 그 ligand의 경우는 높은 결합affinity를 얻기 위하여 당쇄말단에 “cluster”존재가 필요하다(예, sLeX)[37]. 따라서 sLeX 합성에 약간의 차이라도 Selectin에 의존하는 세포접착에 충분한 영향을 미친다. 결장adenocarcinoma에서의 sLeX발현이 낮은 농도의 acetyl화Gal β 1-4GlcNAc-O-NM 또는 GlcNAc β 1-3Gal-O-NM처리로 감소되며 *in vivo*에서는 훨씬 효과적이다.

Glycoside primer들은 질환치료약으로서 유용한 바, 먼저 염증반응을 들 수 있다. 활성화된 내피세포와 당쇄의 상호작용을 저해하여 얼마나 호중구로부터 손상을 막느냐일 것이다 [38]. 허혈[39]과 같은 급성질환이나 간접질환인 류마티스통 [40]과 같은 만성염증은 충분한 응용연구대상이 된다. 몇가지 병원성세균(예, *Streptococcus pneumoniae*, *Nigeria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylorii*)는 숙주인 상피조직당쇄를 포함한 Gal β 1-4GlcNAc 또는 GlcNAc β 1-3Gal구조를 인식하는 adhesin을 함유하므로 primer는 항균제로도 유용하다[41]. 또한, 세균세포벽과 외막성분인 다당류(peptidoglycan, LPS)를 목표로한 primer고안도 가능하다[42]. 또한, 비정상구조를 갖는 당단백질이나 독특한 LPS를 만드는 특이적인 기생충에 대한 primer고안도 가능하여[43], 앞으로 primer유도체를 약학적, 독성학적 및 분자생물학적 응용연구가 필요하며 의학적이용면에서 장래가 밝다.

마지막으로, 당쇄공학의 중요성을 제일 먼저 인식한 일본에서는 <糖鎖공학의 기반형성에 관한 총합적 연구개발의 추진정책>이라는 자문기구가 과학기술청장관에 제출되어 과학기술청, 통산성, 후생성, 농림수산성이 중심이되어 당쇄공학연구협의회가 설치된 바 있다. 이외에 미국, 영국, 네델란드에 국가지원 연구기관들이 있다.

참고문헌

1. Galili U, Macher BA, Buehler J, Shohet SB. 1985. Human natural anti-alpha-galactosyl IgG. II. The specific recognition of alpha(1-3)-linked galactose residues. *J. Exp. Med.* **162**: 573-582.
2. Noguchi A, Mukuria CJ, Suzuki E, Naiki M. 1995. Immunogenicity of N-glycolylneuraminic acid-containing carbohydrate chains of recombinant human erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biochem.* **117**: 59-62.
3. Nishikawa A, Ihara Y, Hatakeyama M, Kangawa K, Taniguchi N. 1992. Purification, cDNA cloning, and expression of UDP-N-acetylglucosamine: beta-D-mannoside beta-1,4N-acetylglucosaminyltransferase III from rat kidney. *J. Biol. Chem.* **267**: 18199-18204.
4. Kim YJ, Park JH, Kim KS, Chang JE, Ko JH, Kim MH, Chung DH, Chung TW, Choe IS, Lee YC, Kim CH. 1996. Sequence analysis of the 5'-flanking region of the gene encoding human N-acetylglucosaminyltransferase III. *Gene* **170**: 281-283.
5. Shoreibah MG, Hindsgaul O, Pierce M. 1992. Purification and characterization of rat kidney UDP-N-acetylglucosamine: alpha-6-D-mannoside beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* **267**: 2920-2927.
6. Saito H, Nishikawa A, Gu J, Ihara Y, Soejima H, Wada Y, Sekiya C, Niikawa N, Taniguchi N. 1994. cDNA cloning and chromosomal mapping of human N-acetylglucosaminyltransferase V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**: 318-327.
7. Park C, Jin UH, Lee YC, Cho TJ, Kim CH. 1999. Characterization of UDP-N-acetylglucosamine:alpha-6-d-mannoside beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase V from a human hepatoma cell line Hep3B. *Arch. Biochem. Biophys.* **367**: 281-288.
8. Minowa MT, Oguri S, Yoshida A, Hara T, Iwamatsu A, Ikenaga H, Takeuchi M. 1998. cDNA cloning and expression of bovine UDP-N-acetylglucosamine: alpha1,3-D-mannoside beta1,4-N-acetylglucosaminyltransferase IV. *J. Biol. Chem.* **273**: 11556-11562.
9. Sandrin MS, Fodor WL, Mouhtouris E, Osman N, Cohny S, Rollins SA, Guilmette ER, Setter E, Squinto SP, McKenzie IF. 1995. Enzymatic remodelling of the carbohydrate surface of a xenogenic cell substantially reduces human antibody binding and complement-mediated cytotoxicity. *Nature Med.* **1**: 1261-1267.
10. Sharma A, Okabe J, Birch P, McClellan SB, Martin MJ, Platt JL, Logan JS. 1996. Reduction in the level of Gal(alpha1,3)Gal in transgenic mice and pigs by the expression of an alpha(1,2) fucosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 7190-7195.
11. Tanemura M, Miyagawa S, Koyota S, Koma M, Matsuda H, Tsuji S, Shirakura R, Taniguchi N. 1998. Reduction of the major swine xenoantigen, the alpha-galactosyl epitope by transfection of the alpha2,3-sialyltransferase gene. *J. Biol. Chem.* **273**: 16421-16425.
12. Tanemura M, Miyagawa S, Ihara Y, Mikata S, Matsuda H, Shirakura R, Taniguchi N. 1997. Reduction of the major swine xenoantigen Gal alpha(1,3)Gal by transfection of N-acetylglucosaminyl transferase III(GnT-III) gene. *Transplant Proc.* **29**: 891-892.
13. Tanemura M, Miyagawa S, Ihara Y, Nishikawa A, Suzuki M, Yamamura K, Matsuda H, Shirakura R, Taniguchi N. 1997. Suppression of the xenoantigen Gal alpha(1,3)Gal by N-acetylglucosaminyltransferase III(GnT-III) in transgenic mice. *Transplant Proc.* **29**: 895-896.
14. Koma M, Miyagawa S, Honke K, Ikeda Y, Koyota S, Miyoshi S, Matsuda H, Tsuji S, Shirakura R, Taniguchi N. 2000. Reduction of the major xenoantigen on glycosphingolipids of swine endothelial cells by various glycosyltransferases. *Glycobiology* **10**: 745-751.
15. Schachter H. 1986. Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides. *Biochem. Cell. Biol.* **64**: 163-181.
16. Schachter H. 1991. The 'yellow brick road' to branched complex N-glycans. *Glycobiology* **1**: 453-461.
17. Schachter H, Narasimhan S, Gleeson P, Vella G. 1983. Control of branching during the biosynthesis of asparagine-linked oligosaccharides. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* **61**: 1049-1066.
18. Gleeson PA, Schachter H. 1983. Control of glycoprotein synthesis. *J. Biol. Chem.* **258**: 6162-6173.
19. Fujii S, Nishiura T, Nishikawa A, Miura R, Taniguchi N. 1990. Structural heterogeneity of sugar chains in immunoglobulin G. Conformation of immunoglobulin G molecule and substrate specificities of glycosyltransferases. *J. Biol. Chem.* **265**: 6009-6018.
20. Song EY, Kang SK, Lee YC, Park YG, Chung TH, Kwon DH, Byun SM, Kim CH. 2001. Expression of bisecting N-acetylglucosaminyltransferase-III in human hepatocarcinoma tissues, fetal liver tissues, and hepatoma cell lines of Hep3B and HepG2. *Cancer Invest.* **19**: 799-807.
21. Varki A. 1993. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **3**: 97-130.
22. Armstrong JI, Portley AR, Chang YT, Nierengarten DM, Cook BN, Bowman KG, Bishop A, Gray NS, Shokat KM, Schultz PG, Bertozzi CR. 2000. Discovery of Carbohydrate Sulfotransferase Inhibitors from a Kinase-Directed Library. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* **39**: 1303-1306.
23. Lowary TL, Hindsgaul O. 1993. Recognition of synthetic deoxy and deoxyfluoro analogs of the acceptor alpha-L-Fuc p-(1->2)-beta-D-Gal p-OR by the blood-group A and

- B gene-specified glycosyltransferases. *Carbohydr. Res.* **249**: 163-195.
24. Lu PP, Hindsgaul O, Li H, Palcic MM. 1997. Synthesis and evaluation of eight aminodeoxy trisaccharide inhibitors for N-acetylglucosaminyltransferase-V. *Carbohydr. Res.* **303**: 283-291.
25. Dennis JW, Granovsky M, Warren CE. 1999. Protein glycosylation in development and disease. *Bioessays* **21**: 412-421.
26. Raney MK, El-Abbadi M, Manfredi MG, Mukherjee P, Platt FM, Seyfried TN. 2001. N-butyldeoxynojirimycin reduces growth and ganglioside content of experimental mouse brain tumours. *Br. J. Cancer* **84**: 1107-1114.
27. Zacharias C, van Echten-Deckert G, Plewe M, Schmidt RR, Sandhoff K. 1994. A truncated epoxy-glucosylceramide uncouples glycosphingolipid biosynthesis by decreasing lactosylceramide synthase activity. *J. Biol. Chem.* **269**: 13313-13317.
28. Keppler OT, Horstkorte R, Pawlita M, Schmidt C, Reutter W. 2001. Biochemical engineering of the N-acyl side chain of sialic acid: biological implications. *Glycobiology* **11**: 11R-18R.
29. Hang HC, Bertozzi CR. 2001. Ketone isosteres of 2-N-acetamidoglycans as substrates for metabolic cell surface engineering. *J. Am. Chem. Soc.* **123**: 1242-1243.
30. Lee JH, Baker TJ, Mahal LK, Zabner J, Bertozzi CR, Wiemer DF, Welsh MJ. 1999. Engineering novel cell surface receptors for virus-mediated gene transfer. *J. Biol. Chem.* **274**: 21878-21884.
31. Robinson HC, Brett MJ, Tralaggan PJ, Lowther DA, Okayama M. 1975. The effect of D-xylose, beta-D-xylosides and beta-D-galactosides on chondroitin sulphate biosynthesis in embryonic chicken cartilage. *Biochem. J.* **148**: 25-34.
32. Kolset SO, Ehlorsson J, Kjellen L, Lindahl U. 1986. Effect of benzyl beta-D-xyloside on the biosynthesis of chondroitin sulphate proteoglycan in cultured human monocytes. *Biochem. J.* **238**: 209-216.
33. Lagemwa FN, Sarkar AK, Esko JD. 1996. Unusual beta-D-xylosides that prime glycosaminoglycans in animal cells. *J. Biol. Chem.* **271**: 19159-19165.
34. Shibata S, Takagaki K, Nakamura T, Izumi J, Kojima K, Kato I, Endo M. 1995. HNK-1-reactive novel oligosaccharide, sulfate-O-3GlcA beta 1-4Xyl beta 1-(4-methylumbelliferone), synthesized by cultured human skin fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **270**: 13794-13798.
35. Kojima N, Handa K, Newman W, Hakomori S. 1992. Inhibition of selectin-dependent tumor cell adhesion to endothelial cells and platelets by blocking O-glycosylation of these cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**: 1288-1295.
36. Sarkar AK, Rostand KS, Jain RK, Matta KL, Esko JD. 1997. Fucosylation of disaccharide precursors of sialyl LewisX inhibit selectin-mediated cell adhesion. *J. Biol. Chem.* **272**: 25608-25616.
37. Varki A. 1994. Selectin ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7390-7397.
38. Rosen SD, Bertozzi CR. 1994. The selectins and their ligands. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**: 663-673.
39. Lefer DJ. 2000. Pharmacology of selectin inhibitors in ischemia/reperfusion states. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**: 283-294.
40. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. 1996. Rheumatoid arthritis. *Cell* **85**: 307-310.
41. Hooper LV, Gordon JI. 2001. Glycans as legislators of host-microbial interactions: spanning the spectrum from symbiosis to pathogenicity. *Glycobiology* **11**: 1R-10R.
42. Wyckoff TJ, Ractz CR, Jackman JE. 1998. Antibacterial and anti-inflammatory agents that target endotoxin. *Trends Microbiol.* **6**: 154-159.
43. Ferguson MA, Brimacombe JS, Brown JR, Crossman A, Dix A, Field RA, Guther ML, Milne KG, Sharma DK, Smith TK. 1999. The GPI biosynthetic pathway as a therapeutic target for African sleeping sickness. *Biochim. Biophys. Acta.* **1455**: 327-340.