

Inhalt

1	Einleitung	3
1.1	Struktur, Vorkommen und Funktion von L-Fucose	3
1.2	Struktur, Biosynthese und biologische Bedeutung von fucosylierten Glycokonjugaten	4
1.3	Biosynthese von Fucose und GDP-Fucose.....	8
1.4	Die Fucokinase	10
1.5	GDP-L-Fucose-Pyrophosphorylase	12
1.6	Leukozyten-Adhäsions-Defizienz Typ II oder kongenitaler Glycosylierungsdefekt Typ IIc (LAD II/CDG IIc)	13
2	Zielsetzung	14
3	Material und Methoden	15
3.1	Material.....	15
3.1.1	Chemikalien	15
3.1.2	Enzyme.....	15
3.1.3	cDNA-Klone	15
3.1.4	Vektoren	15
3.1.5	Primer.....	16
3.1.6	Bakterienstämme.....	17
3.1.7	Insektenzellen.....	18
3.1.8	Nährmedien für Zucht und Kultivierung der Zellen	18
3.1.9	Testsystem zum Klonieren.....	21
3.1.10	Geräte	21
3.2	Allgemeine molekularbiologische Methoden	22
3.2.2	Expression von rekombinantem Protein in <i>E. coli</i> -Zellen.....	31
3.2.3	Expression von rekombinantem Protein in Insektenzellen	33
3.3	Allgemeine proteinbiochemische Methoden.....	35
3.3.1	Glutathion-S-Transferase (GST)-Affinitätschromatographie.....	35
3.3.2	Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Affinitätschromatographie	36
3.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	36
3.3.4	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	36
3.3.5	Coomassie-Färbung von Proteingelen.....	38
3.3.6	Silberfärbung von Proteingelen.....	38
3.3.7	Western-Blot.....	39
3.3.8	Immunologischer Proteinnachweis auf Nitrocellulosemembranen.....	39
3.3.9	Abspaltung der Glutathion-S-Transferase (GST) von Fusionsproteinen mit Thrombin-Protease	40

3.4	Herstellung von Peptid-Antikörpern gegen Fucokinase.....	41
3.4.1	Immunisierung und Serumgewinnung.....	41
3.4.2	Analyse der Fucokinase-Peptid-Antikörpern durch die Dot-Blot-Methode.....	42
3.4.3	Herstellung von Fucokinase-haltigen Ratten- und Mäusegehirn-Fraktionen.....	42
3.4.4	Analyse der Fucokinase-Peptid-Antikörper mittels Western-Blot-Methode.....	43
3.4.5	Analyse der Fucokinase-Peptid-Antikörper mittels Immunopräzipitation.....	43
4	Ergebnisse.....	45
4.1	Expression der Fucokinase und ihrer Kinase-Domäne in <i>E. coli</i>	45
4.1.1	Konstruktion der Expressionsvektoren für die humane Fucokinase (hFUK) und für die separate humane Fucokinase-Domäne.....	47
4.1.2	Konstruktion des Expressionsvektors für hFUK-Kinase-Domäne.....	53
4.1.3	Konstruktion des Expressionsvektors für murine Fucokinase (mFUK)-Kinase- Domäne.....	60
4.1.4	Expression der hFUK in <i>E. coli</i> BL21-Zellen.....	62
4.1.5	Expression der hFUK-Kinase-Domäne in <i>E. coli</i> BL21-Zellen.....	63
4.1.6	Expression mFUK-Kinase-Domäne in <i>E. coli</i> BL21 Zellen.....	67
4.2	Expression der Fucokinase in Insektenzellen.....	69
4.2.1	Klonierung von <i>hFUK</i> in den pFastBac™HTb-Donor-Vektor.....	71
4.2.2	Klonierung von <i>mFUK</i> in den pFastBac™HTb-Donor-Vektor.....	72
4.2.3	Expression der mFUK in Insektenzellen.....	76
4.3	Herstellung von Peptid-Antikörpern.....	77
4.3.1	Die Auswahl von homologen Fucokinase Peptid-Sequenzen als Antigen für die Herstellung von Peptidantikörpern.....	78
4.3.2	Gewinnung und Charakterisierung der Peptid-Antikörper.....	79
4.4	Expression der GDP-L-Fucose-Pyrophosphorylase in Insektenzellen.....	82
4.4.1	Klonierung der mPP in den pFastBac™HTB-Donor-Vektor.....	82
5	Diskussion und Ausblick.....	87
6	Zusammenfassung.....	93
7	Summary.....	94
8	Literatur.....	95
9	Abkürzungen.....	102