

# 1 Einleitung

## 1.1 Struktur, Vorkommen und Funktion von L-Fucose

L-Fucose (6-Desoxy-L-Galaktose) ist ein wichtiges Kohlenhydrat, das nicht nur in den N- und O-Glycanen und Glycolipiden der Säuger, sondern auch in Bakterien und Pflanzen vorkommt (Ishihara und Heath, 1968). D-Fucose hingegen wurde nur in Pflanzen und einigen Mikroorganismen nachgewiesen (Flowers, 1981). Bereits im Jahr 1890 wurde das L-Enantiomer der Fucose zum ersten mal durch die Hydrolyse von Polysacchariden gewonnen und kristallisiert (Günter und Tollens, 1890).

Das Grundgerüst der L-Fucose bildet die D-Mannose, ein aus sechs Kohlenstoffatomen bestehendes Monosaccharid. Die Hydroxymethylgruppe des C6-Atoms der Mannose ist jedoch durch eine Methylgruppe ersetzt worden, zudem hat eine Epimerisierung des Substituenten am C5-Atom stattgefunden (die Epimerisierung wird deutlicher in der Fischer-Projektion).

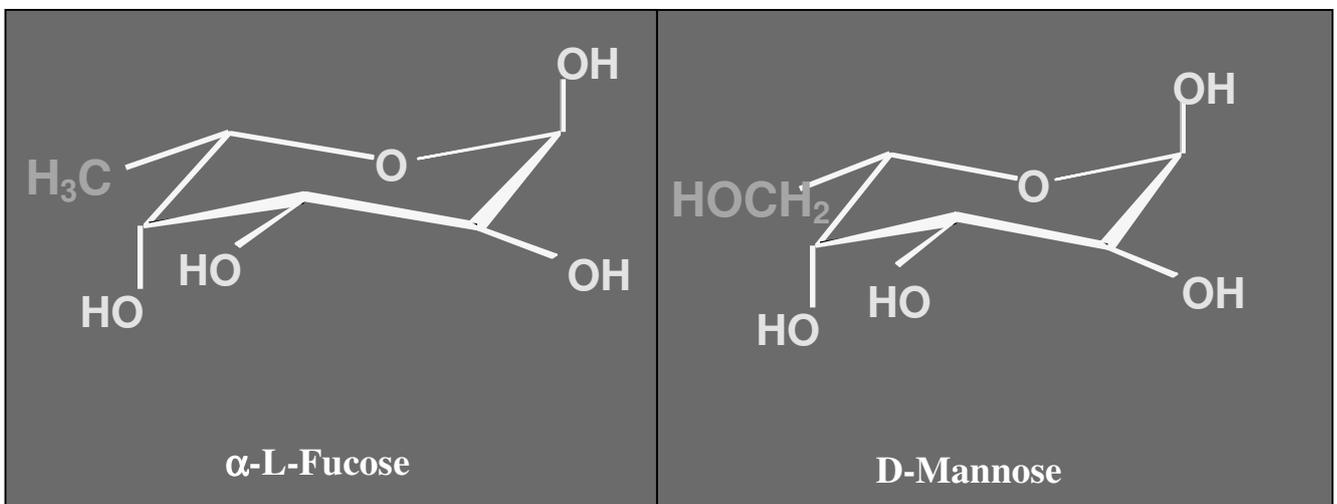


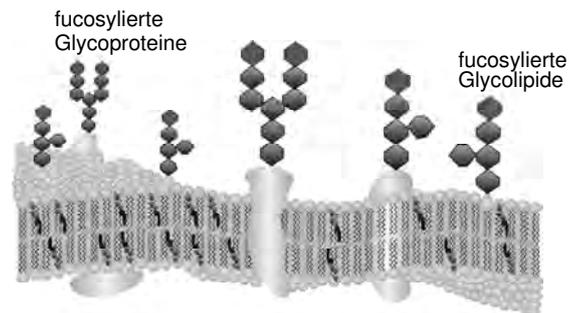
Abb. 1: Struktur von L-Fucose und D-Mannose.

Die L-Fucose ist der einzige L-Zucker, der von Säugern synthetisiert werden kann. L-Fucose findet man in geringer Konzentration als freien Zucker im Blut (Radhakrishnamurthy *et al.*, 1976). Bei Menschen kommt die L-Fucose auch als Bestandteil der Milcholigosaccharide vor (Flowers, 1981). Meistens ist die L-Fucose jedoch beim Menschen und anderen Säugern

terminal als Monosaccharidbaustein in den peripheren Teilen der Kohlenhydratketten der Glycokonjugate integriert, dabei vorwiegend in Glycoproteinen (Wiese *et al.*, 1994; Wiese *et al.*, 1997), aber auch zu ca. 2% in Glycolipiden (McKibbin, 1978). Es gibt jedoch auch Glycosyltransferasen, die in der Lage sind, Fucose subterminal in Oligosaccharidketten einzubauen (Moloney und Haltiwanger, 1999).

## 1.2 Struktur, Biosynthese und biologische Bedeutung von fucosylierten Glycokonjugaten

Die fucosylierten Glycokonjugate – vor allem Glycoproteine, die aus einem Polypeptid und unterschiedlich strukturierten Monosacchariden oder Oligosaccharidketten aufgebaut sind - sowie fucosehaltige Glycolipide, spielen eine wichtige Rolle bei den unterschiedlichen biologischen Prozessen in der Zelle.



**Abb. 2: Glycokonjugate auf der Zelloberfläche.**

Die Oligosaccharideinheiten werden dabei im Falle der N-Glycane (diese besitzen eine N-glycosidische Bindung) an einen Asparagin-Rest gebunden. N-Glycane haben trotz ihrer Diversität eine gemeinsame „Core“-Struktur: 2 x N-Acetylglucosamin und 3 x Mannose (GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>). Dieses Motiv ist bestimmt durch einen gemeinsamen Biosyntheseweg mit Dolicholphosphat (Abeijon und Hirschberg, 1987). Dolicholphosphat ist in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) verankert und ragt mit seinem Phosphatende in das Cytosol. Dort werden dann die unterschiedlichen Zucker ausgehend von der aktivierten Form, dem Nukleotidzucker, durch entsprechende Transferasen auf das Dolicholphosphat übertragen. Durch eine Translokation, deren Mechanismus bis heute nicht eindeutig geklärt

ist, wird das Oligosaccharid mit dem Anker anschließend in das ER-Lumen verlagert, dort werden weitere Mannose- bzw. Glucoseresten angeheftet.

Der membrangebundene Oligosaccharidtransferase-Komplex überträgt den Oligosaccharidvorfürer *en bloc* auf einen Asparagin-Rest eines naszierenden Glycoproteins. Das Asparagin ist dabei Bestandteil der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr (X kann außer Prolin jede beliebige Aminosäure sein). Nicht jede Konsensussequenz dient als (potenzieller) Akzeptor, da nur etwa 30% der möglichen N-Glycosylierungsstellen tatsächlich besetzt werden. Auch ist der Einfluss der nachfolgenden Aminosäuren auf die Effizienz der Glycosylierung durch neuere Untersuchungen belegt (Mellquist *et al.*, 1998). Nach diesem *en bloc*-Transfer werden Glc-Reste sowie z. T. auch Man-Reste abgespalten („trimming“). Ist ein Protein nicht korrekt gefaltet, wird es von einer  $\alpha$ -Glucosyltransferase wieder reglucosyliert. Reglucosylierte N-Glycane können entweder korrekt weiter prozessiert oder auch deglucosyliert und abgebaut werden. Durch die Entdeckung des Calnexins als membranständiges Chaperon konnte dieser Vorgang verständlicher gemacht werden (Hammond *et al.*, 1994). Calnexin bindet an die neusynthese-tisierten Proteine, die eine fehlerhafte Konformation aufweisen. Durch seine Lektinfunktion erkennt das Calnexin spezifisch glucosylierte Glycoproteine. Faltet sich das an Calnexin-gebundene Protein korrekt, können nach Lösen der Calnexinbindung die Glucosereste abgespalten und das Protein weiter prozessiert werden. Bei nicht korrekter Faltung wird das Protein reglucosyliert. Dieser Prozess kann sich wiederholen, bis keine Glucose mehr an das Protein gebunden wird, Calnexin löst sich dann vom Protein. Unterstützt wird Calnexin durch Calreticulin, einem löslichen Lektin im Lumen des ER (Parodi, 2000).

Nach dem Transport der Glycoproteine vom ER zum Golgi-Apparat werden die Kohlenhydrateinheiten der Glycoproteine modifiziert. Im cis-Kompartiment des Golgi-Apparats werden drei Mannosereste von den Oligosaccharidketten solcher Proteine entfernt, die für sekretorische Vesikel oder für die Plasmamembran bestimmt sind. Im mittleren Golgi-Kompartiment können weitere Mannosereste entfernt und ein GalNAc- und ein Fucose-Rest hinzugefügt werden. Die Schlüsselrolle spielen hier die Fucosyl-transferasen. Im humanen Genom sind bis jetzt dreizehn Fucosyltransferase-Gene indentifiziert worden (Roos *et al.*, 2002; Becker und Lowe, 2003). Im trans-Golgi erfolgt schließlich die terminale Modifikation mit Sialinsäuren. Auf Grund des variablen Strukturteils können N-Glycane in drei Klassen unterteilt werden: Neben dem Mannose-reichen Typ und dem komplexen Typ (Abb. 3) existieren hybride Strukturen aus beiden Typen.

Die O-glycosidische Bindung zwischen dem Kohlenhydrat-Anteil und dem Protein erfolgt über N-Acetylgalactosamin (GalNAc) und einem Serin- oder Threonin-Rest der Polypeptidkette. Die GalNAc-Transferase überträgt im Golgi-Apparat vom UDP-GalNAc den Zucker direkt auf die entsprechende Aminosäure und nicht wie bei N-Glycanen erst über einen

Vorläufer/Anker (Abeijon und Hirschberg, 1987). O-Glycane sind weniger verzweigt, meistens biantennär und Bestandteil von Mucinen.

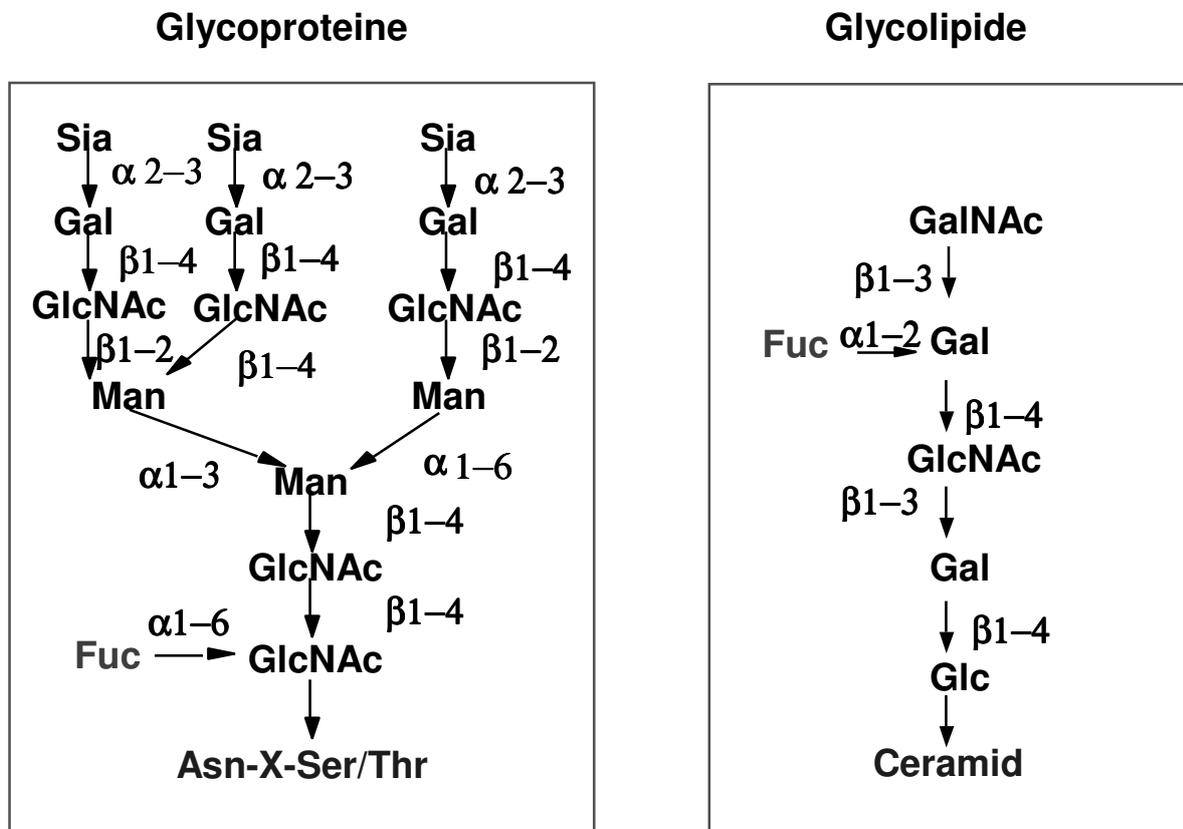


Abb. 3: Grundstruktur eines triantennären, komplexen N-Glycans (links) und eines Glycolipids (rechts).

Es gibt eine Vielzahl an unterschiedlichen Glykokonjugaten die Fucose enthalten, daher sind fucosylierte Glykane an vielen, essentiellen biologischen Prozessen beteiligt (Listinsky *et al.*, 1998; Staudacher *et al.*, 1999). Terminale Zucker beeinflussen oder bestimmen die stereochemischen und antigenen Eigenschaften der Glykokonjugate. So werden das ABO- und das Lewis<sup>x</sup>-Blutgruppensystem neben anderen Zuckern auch durch die L-Fucose mit-determiniert. Weiterhin sind Glykane mit  $\alpha 1,3$ -gebundenen Fucose-Molekülen wichtig für die Selektin-vermittelte Leukozyten-Endothel-Adhäsion im Rahmen von Entzündungsprozessen (Becker und Lowe, 2003). Sie initiieren die Extravasation von Leukozyten durch die Anheftung an das Endothel. Die Abwesenheit von Fucose auf bestimmten Oligosaccharidketten der Leukozyten führt beim Menschen zum Leukozyten-Adhäsionsdefekt Typ 2 (LAD II), auch bekannt als kongenitaler Glycolisierungsdefekt Typ IIc (CDG-IIc) (Lubke *et al.*, 2001; Marquardt *et al.*, 1999; Becker und Lowe, 2003; Etzioni *et al.*, 2002; Hidalgo *et al.*, 2003) (s. Abschnitt 1.6.). Die Fucosylierung scheint weiterhin eine

wichtige Rolle bei der Ontogenese, Fertilisation (Lefebvre *et al.*, 1997; Johnston *et al.*, 1998; Lucas *et al.*, 1994; Talevi *et al.*, 1997) sowie bei der Initiation der Apoptose in einigen Zelltypen zu spielen (Becker und Lowe, 2003). Des Weiteren wird die Signalübertragung über den Notch-Rezeptor durch die Bereitstellung von Fucose reguliert (Moloney *et al.*, 2000). Schließlich sind fucosylierte Glycane an der Interaktion zwischen Wirt und Mikroorganismus beteiligt (Coyne *et al.*, 2005).

Unterschiede in der Expression von fucosylierten Oligosacchariden sind bei vielen pathologischen Prozessen, wie z. B. bei der malignen Transformation (Wilkinson *et al.*, 1980) und der Arteriosklerose (Ricken *et al.*, 1990; Becker und Lowe, 2003) beobachtet worden. Bei Patienten mit hepatocellulärem Carcinom ist ein Anstieg der  $\alpha$ 1,6-gebundenen Fucose an dem  $\alpha$ -Foetoprotein festgestellt worden. Dies könnte als klinischer Marker für die Differenzierung von chronischen Lebererkrankungen benutzt werden (Miyoshi *et al.*, 1999). Weiterhin wurde der Fucosylierungsgrad von Serumproteinen als potenzieller biologischer Marker für Patienten mit Mammakarzinom (Waalkes *et al.*, 1978) und Cervixkarzinom (Bandlish *et al.*, 1991) beschrieben. Von Smith *et al.*, 2002 wurde eine transgene Maus mit verminderter Expression von fucosylierten Glycanen generiert. Diese transgene Maus zeigte einen pleiotropen Phänotyp, Durchfall und Infertilität.

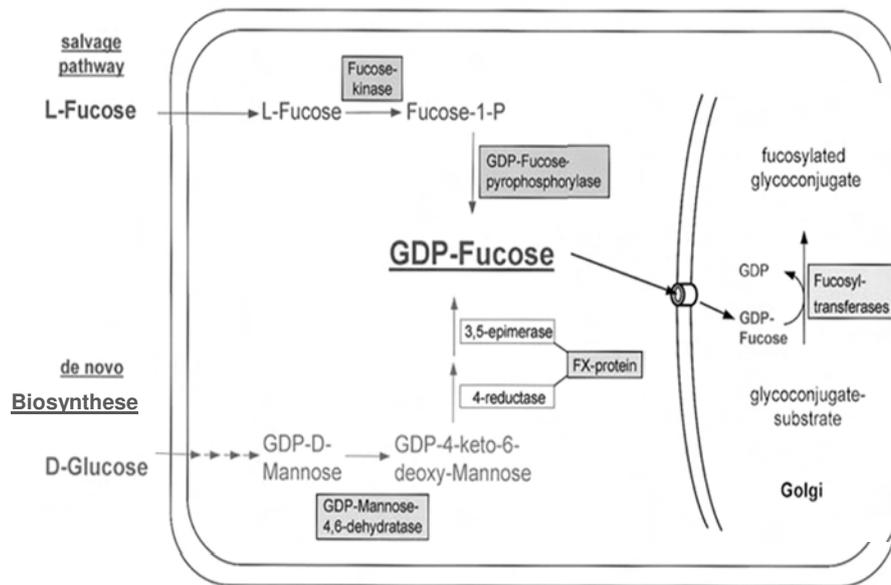
Eine weitere wichtige Funktion haben fucosylierte Glycoproteine als integraler Bestandteil neuronaler Membranstrukturen. Fucosylierte Glycoproteine sind für die zellulären Mechanismen, die Lern- und Gedächtnisprozesse beeinflussen, entscheidend. Bei psychoneuronalen Störungen der Informationsverarbeitung im Zentralnervensystem modifizieren sie darüber hinaus auch die Prozesse der interneuronalen Kommunikation. Es wurde bei Ratten beobachtet, dass es nach dem Erlernen einer neuen Verhaltensweise zu einem verstärkten Einbau von  $^3\text{H}$ -Fucose in Glycoproteine des Hippokampus kommt (Pohle *et al.*, 1979; Popov *et al.*, 1983). Diese erhöhte Makromolekülsynthese war sowohl unmittelbar nach Beendigung des Lernens als auch in einem längeren zeitlichen Abstand zum Lernprozess nachweisbar (Jork *et al.*, 1986). Aufgrund dieser Untersuchungen nahm man auch an, dass bei pathologischen Störungen der Signalvermittlung über die Synapse dem Fucosylierungsgrad und damit auch indirekt der Fucokinaseaktivität eine wesentliche Bedeutung zukommt.

### 1.3 Biosynthese von Fucose und GDP-Fucose

Die Biosynthese fucosylierter Glycokonjugate findet im Golgi-Apparat von Säugetierzellen statt. Fucosyltransferasen übertragen die Fucose auf wachsende Oligosaccharidketten. Sie benötigen dafür als Substrat den aktivierten Nukleotidzucker GDP-Fucose. GDP-Fucose kann auf zwei Wegen synthetisiert werden (Foster und Ginsburg, 1961): Die *de novo*-Synthese erfolgt über GDP-Mannose. Ein Multienzymkomplex wandelt dabei Mannose in Fucose um (Chang *et al.*, 1988). Diese Umwandlung wird durch drei Teilreaktionen unter Beteiligung von zwei Enzymen, der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase und der GDP-keto-6-desoxymannose-3,5-Epimerase/4-Reduktase katalysiert (FX-Protein) (Tonetti *et al.*, 1996). Die bis jetzt durchgeführten quantitativen Untersuchungen zum L-Fucose-Stoffwechsel in HeLa-Zellen haben gezeigt, dass mehr als 90% der GDP-Fucose aus dieser *de novo*-Synthese stammen (Yurchenco und Atkinson, 1975).

Alternativ existiert ein sogenannter „Salvage-Pathway“ (Coffey *et al.*, 1964; Foster und Ginsburg, 1961), der die Fucose aus der Nahrung oder aus dem Abbau von Glycoproteinen oder Glycolipiden der Fucose-Wiederverwertung zuführt (Michalski und Klein, 1999). Bis jetzt ist jedoch über den Transport von Fucose in die Zelle selbst wenig bekannt (Wiese *et al.*, 1994). Erste Untersuchungen bei der Ratte haben gezeigt, dass eine Verbindung zwischen dem Fucosetransport und dem Myo-Inositol-Transporter besteht (Yorek *et al.*, 1993).

Die L-Fucose-Kinase (Fucokinase) (s. Abschnitt 1.4.) katalysiert den ersten Schritt dieses Salvage-Pathways. Sie synthetisiert Fucose-1-phosphat direkt aus Fucose und ATP (Ishihara und Heath, 1968; Park *et al.*, 1998; Richards *et al.*, 1978). Die GDP-Fucose-Pyrophosphorylase (GFPP) bildet dann GDP-Fucose aus Fucose-1-phosphat und GTP (Ishihara und Heath, 1968; Pastuszak *et al.*, 1998).



**Abb. 4: Biosynthese der GDP-Fucose in Säugetieren (nach Marquardt *et al.*, 1999).**

Eine wichtige Rolle in der Synthesekette von fucosylierten Glykokonjugaten im Golgi-Apparat spielt der spezifische Transporter für die GDP-Fucose (Hirschberg *et al.*, 1998; Gerardy-Schahn *et al.*, 2001). Sein Gen wurde beim Menschen, bei *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* identifiziert (Lubke *et al.*, 2001; Luhn *et al.*, 2004) und das Protein aus Golgi-Membranen von Rattenlebern isoliert (Puglielli und Hirschberg, 1999).

Einige Pharmaka zeigen Einfluss auf den anabolen Stoffwechsel der Fucose. So stimuliert Dopamin den Einbau von Fucose in das Gehirn (Jork *et al.*, 1984). Die durch Dopamin hervorgerufene Stimulierung der Fucosylierung konnte durch Dopaminantagonisten jedoch nur teilweise wieder aufgehoben werden (Lossner *et al.*, 1985). Nicht nur Pharmaka (Angenstein *et al.*, 1992), sondern auch Zuckernanaloga wie 2-Desoxygalaktose beeinflussen den anabolen Fucose-Stoffwechsel (Reutter und Bauer, 1985). In Hühnern bewirkt die Fütterung mit 2-Desoxygalaktose eine Amnesie (Bullock *et al.*, 1990).

## 1.4 Die Fucokinase

Die Fucose wird nach dem Eintritt in die Säugerzelle zuerst durch das Enzym Fucokinase (ATP: 6-desoxy-L-galactose-1-phosphotransferase, EC 2.7.1.52; Ishihara *et al.*, 1968) phosphoryliert. Die Fucokinase kann beide Anomere,  $\alpha$ -L-Fucose und  $\beta$ -L-Fucose, umsetzen (Butler und Serif, 1985). Wie in zurückliegenden Publikationen beschrieben, wurde die Fucokinase partiell aus Leber (Ishihara und Heath, 1968), Niere (Park *et al.*, 1998) und der Schilddrüse des Schweins (Kilker *et al.*, 1979) angereichert. Auch die Fucokinase aus der Schilddrüse des Hundes wurde charakterisiert (Richards und Serif, 1977). Eine Reinigung bis zur Homogenität gelang erstmals aus Rattenhirngewebe (Ch. Bauer, unpublizierte Ergebnisse). Die Genexpression konnte in Leber, Niere, Ovarien, Testes, Milz, Gehirn, Herz und in der Lunge verschiedener Nagetiere nachgewiesen werden; signifikante Enzymaktivitäten wurden in Aorta, Pankreas, Niere, Herz, Lunge, Milz, Gehirn und in der Leber bestimmt (Miller *et al.*, 2005). Die höchste Gen-Expression sowie Enzym-aktivität wurde im Gehirn (Park *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 2005), die niedrigste in der Leber (Leck und Wiese, 2004; Niittymaki *et al.*, 2004) beobachtet. In anderen Organen scheint sich die Genexpressionsrate und die Enzymaktivität voneinander zu unterscheiden, was auf eine unterschiedlich regulierte Translation hindeuten könnte.

Die humane Fucokinase ist ein Polypeptid bestehend aus 990 Aminosäuren. Ihre molare Masse beträgt 107 kDa. Am C-terminalen Ende der Fucokinase finden sich Aminosäuresequenzen mit typischen Motiven für Zuckerkinasen (Abb. 5). Daher wird hier auch die katalytisch aktive Kinasedomäne vermutet (Hinderlich *et al.*, 2002). Die rekombinante Expression der Fucokinase gelang bisher in *E.coli*-BL21-Zellen (Hinderlich *et al.*, 2002) und in COS-Zellen (Niittymaki *et al.*, 2004).

Außerdem wurden Versuche zur Beeinflussung des Fucosestoffwechsels mit Hilfe von L-Fucose-Analoga *in vitro* und *in vivo* durchgeführt. Dabei wurde die Aufnahme von L-Fucose in Anwesenheit von Desoxy-Derivaten (4,6-Didesoxy-4-iodo-L-glucopyranose; 4,6-Didesoxy-L-xylo-hexopyranose) um 52% reduziert und die Incorporation von L-Fucose in Glycoproteinen um 45% vermindert (Zeitler *et al.*, 1997). Die Aktivität der Fucokinase im Gehirn von Ratten kann durch Dopamin (Jork *et al.*, 1984) bzw. Dopaminderivaten (Hoher *et al.*, 1993) gesteigert werden.

		<b>Phosphat 1</b>		<b>Connect 1</b>
<b>Fucokinase-human</b>	633	<u>L</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>G</u>		718 <u>L</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>H</u>
<b>GlcNAc Kinase-human</b>	6	<u>G</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>D</u>		99 <u>S</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u>
<b>ManNAc Kinase-Ratte</b>	410	<u>L</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>M</u> <u>K</u>		509 <u>H</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>R</u>
<b>Glucokinase-Ratte</b>	75	<u>L</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>M</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>G</u>		197 <u>M</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>M</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>C</u> <u>Y</u>
<b>Hexokinase-Hefe</b>	83	<u>L</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>V</u>		203 <u>I</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>Y</u>
<b>ATP-Bindungsdomäne</b>		fxfDxGssxxhxxp		hxxxxhxxptxxshfpxh

E

		<b>Phosphat 2</b>		<b>Adenosin</b>
<b>Fucokinase-human</b>	739	<u>E</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>H</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>G</u>		833 <u>L</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>W</u> <u>Y</u>
<b>GlcNAc Kinase-human</b>	120	<u>G</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>C</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>N</u>		264 <u>L</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>W</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>W</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>L</u>
<b>ManNAc Kinase-Ratte</b>	537	<u>F</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>H</u>		576 <u>G</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>C</u> <u>S</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>H</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>M</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>E</u>
<b>Glucokinase-Ratte</b>	221	<u>E</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>M</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>Y</u> <u>M</u> <u>E</u>		404 <u>I</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>H</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>Y</u>
<b>Hexokinase-Hefe</b>	227	<u>K</u> <u>M</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>D</u>		412 <u>G</u> <u>H</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>R</u> <u>Y</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>A</u>
<b>ATP-Bindungsdomäne</b>		thhxxxGTstxxhxp		pphhhxGfxhxxxxxxfxphhxp

		<b>Connect 2</b>
<b>Fucokinase-human</b>	312	<u>L</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>K</u>
<b>GlcNAc Kinase-human</b>	312	<u>A</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>H</u>
<b>ManNAc Kinase-Ratte</b>	701	<u>L</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>M</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>D</u>
<b>Glucokinase-Ratte</b>	441	<u>S</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>V</u>
<b>Hexokinase-Hefe</b>	456	<u>A</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>L</u>
<b>ATP-Bindungsdomäne</b>		pxxtthhGhhhxxh

**Abb. 5: Vergleich von ATP-Bindungsstellen verschiedener Kinasen.**

Es sind die Subdomänen für die Phosphat-Bindungsstellen (Phosphat 1 und Phosphat 2), für das Adenosin und die Verbindungspeptide (Connect 1 und Connect 2) dargestellt. Aminosäuren die an der ATP-Bindung beteiligt sind, sind unterstrichen, Aminosäuren homolog zu humane Fucokinase sind mit entsprechenden Buchstaben in Fettdruck gekennzeichnet. Kleinbuchstaben bei der ATP-Bindungsdomäne stellen die Aminosäurenomenklatur nach Bork *et al.* (1992): h – rein hydrophob (VLIFWY); f – teilweise hydrophob (VLIFWYMCGATKHR); s - klein (GSATNDVCP); p – winzig und polar (GSATNDQEKHR); x – jede Aminosäure.

## 1.5 GDP-L-Fucose-Pyrophosphorylase

Die GDP-L-Fucose-Pyrophosphorylase (GFPP, E.C.2.7.7.30) ist das Enzym, das die Reaktion von  $\beta$ -L-Fucose-1-phosphat und GTP zu GDP-L-Fucose innerhalb des Salvage-Pathways katalysiert (Coffey *et al.*, 1964). Das dabei entstehende Produkt dient im Golgi-Apparat als Donor von Fucose für die Herstellung von fucosylierten Glycokonjugaten.

GFPP wurde erstmals aus der cytosolischen Fraktion der Schweineniere gereinigt, und anschließend die korrespondierende humane GFPP-cDNA geklont (Pastuszak *et al.*, 1998). Auf Grund der bekannten humanen Sequenz wurde ebenfalls die murine cDNA des GFPP-Proteins isoliert und in COS-7 Zellen exprimiert (Niittymaki *et al.*, 2004). Die Expression des GFPP-Proteins in unterschiedlichen Geweben bei der Maus und Ratte verhält sich analog zur Expression der Fucokinase. Die höchste Expression wurde im Gehirn, in Ovarien, in den Testes und in der Niere beobachtet (Niittymaki *et al.*, 2004). Des Weiteren wurden die Aminosäuren des aktiven Zentrums der humanen GFPP identifiziert (Quirk und Seley, 2005) und vor kurzem die Kristallstruktur des Proteins aufgeklärt (Quirk und Seley-Radtke, 2006).

## 1.6 Leukozyten-Adhäsions-Defizienz Typ II oder kongenitaler Glycosylierungsdefekt Typ IIc (LAD II/CDG IIc)

Die Leukozyten-Adhäsions-Defizienz Typ II (LAD II), auch als kongenitaler Glycosylierungsdefekt Typ IIc (CDG IIc) bekannt, ist eine seltene autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, charakterisiert durch das Fehlen fucosylierter Glykokonjugate an der Zelloberfläche einschließlich der H- und Lewis-Blutgruppen-Antigene. Dies impliziert auch das Fehlen der Selektinliganden, was zu einer defekten Leukozytenadhäsion führt. Außerdem kommt es zu morphologischen und neurologischen Abnormalitäten. Die Krankheit manifestiert sich auch in einer verminderten Immunkompetenz. Dies führt zu rezidivierenden Infektionen mit Fieberschüben und zu einem dramatischen Anstieg der Leukozytenzahl im Blut. Zum anderen kommt es zu schwerwiegenden psychomotorischen Entwicklungsstörungen und Defekten der höheren neuronalen Funktionen. Es treten auch Abnormalitäten des Skeletts auf (Etzioni *et al.*, 1992). Grund für die Entstehung dieser Krankheit ist ein Gendefekt, der zu einem reduzierten Transport von GDP-L-Fucose aus dem Cytosol in den Golgi-Apparat führt (Lubke *et al.*, 2001; Sturla *et al.*, 2001). In dem Fibroblasten der LAD II-Patienten wurde eine Punktmutation des GDP-Fucose-Transporter- Gens nachgewiesen (Lubke *et al.*, 2001; Luhn *et al.*, 2004). Bei einer weiteren Gruppe von LAD II-Patienten ist eine Doppelmutation identifiziert worden (Helmus *et al.*, 2006).

Bei den Untersuchungen von Gewebezellen der LAD II-Patienten konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung dieser Zellen in Gegenwart von Fucose zur Aufhebung des Fucosylierungsdefekt führte. Aufbauend darauf ist es gelungen, in einem Fall eine erfolgreiche Therapie dieser Krankheit auf der Basis der oralen Verabreichung von Fucose zu entwickeln (Marquardt *et al.*, 1999). In anderen Fällen war die Therapie durch die orale Gabe von Fucose jedoch leider nicht erfolgreich (Sturla *et al.*, 2003).