

5 Diskussion und Ausblick

Für biochemischen Untersuchungen wie das Testen potentieller inhibitorischer Substanzen oder Strukturuntersuchungen durch Proteinkristallisation oder NMR-Spektroskopie, aber auch für die Herstellung von Antikörpern, ist erforderlich, dass das Protein in größeren Mengen vorliegt. Bisher war es zwar gelungen die Fucokinase partiell aus verschiedenen Geweben zu isolieren (Ishihara *et al.*, 1968; Kilker *et al.*, 1979; Park *et al.*, 1998; Richards und Serif, 1977), es war jedoch nicht möglich, homogenes Enzym in ausreichender Konzentration für die weiteren Untersuchungen zu gewinnen. Die partielle Reinigung von GDP-L-Fucose-Pyrophosphorylase (GFPP) (Ishihara und Heath, 1968; Pastuszak *et al.*, 1998) ergab ebenfalls keine ausreichende Menge an Protein. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei unterschiedliche Expressionssysteme zur Produktion der Enzyme des anabolen L-Fucose-Stoffwechsels erprobt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zum biochemischen Verständnis des L-Fucose-Stoffwechsels zu leisten, und durch die Herstellung von Antikörpern gegen die Fucokinase und die GFPP zellbiologische Untersuchungen zu ermöglichen. Die Arbeit basiert auf den 2002 (Hinderlich *et al.*, 2002) und 2003 (Niittymaki *et al.*, 2004) publizierten cDNA-Sequenzen der humanen und murinen Fucokinase bzw. der murinen GFPP, die eine rekombinante Expression von Proteinen ermöglichen.

Die Konstruktion von geeigneten Expressionsvektoren stand am Beginn der Arbeiten. Die cDNAs der Fucokinase und der GFPP unterschieden sich deutlich in ihrer Größe. Während die cDNA der GFPP mit 1,8 kb im mittleren Bereich liegt, waren die beiden cDNAs der humanen bzw. Maus-Fucokinase mit 3 bzw. 3,3 kb relativ groß. Trotzdem wurde für alle cDNAs eine PCR-Strategie gewählt, in der entsprechende Konstrukte auf der Basis von erhältlichen Vektoren mit den cDNAs als Template hergestellt wurden. Teilweise wurden durch degenerierte Primer zusätzliche Schnittstellen in die cDNAs eingefügt (Innis, 1989). Solche Schnittstellen ermöglichen prinzipiell, dass PCR-Produkte direkt mit Restriktionsenzymen geschnitten und in den entsprechend vorbereiteten Expressionsvektor kloniert werden können. Dieser Ansatz war allerdings nur in einem Falle, der murinen Fucokinase, erfolgreich. Der direkte Restriktionsverdau von PCR-Produkten mit endständigen Restriktionsschnittstellen ist oft schwierig, da die Restriktionsenzyme in der Regel flankierende Sequenzen rechts und links der Erkennungssequenz benötigen. Des Weiteren ist es nicht möglich, den Erfolg des Restriktionsverdaus zu überprüfen, da der Verlust nur weniger Basenpaare im Agarosegel zu keinem sichtbaren Bandenshift führt. Aus diesem Grunde wurden die PCR-Produkte der anderen Konstrukte zunächst in den pCR-Blunt-Vektor

kloniert, der speziell für die Ligation mit cDNAs mit glatten „Blunt“-Enden, wie sie üblicherweise bei Klonierungs-PCRs entstehen, konstruiert wurde. Die im Vektor befindlichen cDNAs können dann problemlos mit den vorgesehenen Restriktionsenzymen wieder ausgeschnitten werden. Über diesen Zwischenschritt konnten alle übrigen PCR-Produkte erfolgreich in die Zielvektoren kloniert werden.

Obwohl die cDNA der humanen Fucokinase über die oben beschriebene Methode erfolgreich in den Expressionsvektor kloniert wurde, konnte das Konstrukt nicht für die Proteinexpression verwendet werden, da die cDNAs mehrerer unabhängiger Ansätze Mutationen aufwiesen, die zur Expression fehlerhafter Proteine geführt hätte. Mutationen sind ein generelles Problem bei Klonierungs-PCRs. Die bis vor kurzem verwendete Taq-DNA-Polymerase hat eine relativ hohe Fehlerrate (ca. 1:10000), die durch die Einführung der auch in dieser Arbeit benutzten Pfu-DNA-Polymerase, die eine Korrekturlese-Funktion („Proof-Reading“-Funktion) besitzt, um etwa den Faktor 10 reduziert werden konnte (Cline *et al.*, 1996). Trotzdem kommt es gerade in cDNAs mit großer Länge, wie bei der humanen Fucokinase, immer wieder zu Mutationen, die erst bei der späteren DNA-Sequenzierung entdeckt werden können. Dieses Problem ließe sich möglicherweise durch eine entsprechende Anzahl von unabhängigen Experimenten lösen. Bei der humanen Fucokinase-cDNA führten allerdings auch die zahlreich durchgeführten Versuche nicht zum Erfolg, so dass anzunehmen ist, dass die verwendete cDNA möglicherweise Strukturen, z. B. ungewöhnliche Sekundärstrukturen, enthält, die während der DNA-Polymerisierung immer wieder zu Mutationen führen. Hier könnte möglicherweise die Verwendung einer anderen Polymerase oder die Variation der Reaktionsbedingungen durch verschiedene Puffer helfen.

Das erste im Rahmen dieser Arbeit verwendete Expressionssystem war *E. coli*. Der Prokaryont eignet sich in der Regel gut für die Überproduktion kleinerer löslicher Proteine. Dieses System ist insbesondere dann geeignet, wenn das Protein keine funktionell wichtigen posttranslationalen Modifikationen benötigt. Zu den wichtigsten Modifikationen zählen O- und N-Glycosylierung sowie die Ausbildung von Cysteinbrücken. Diese posttranslationalen Modifikationen sind essentiell für die Membranproteine, so dass diese nicht funktionell in *E. coli* exprimiert werden können. Die Fucokinase ist ein cytosolisches Protein und die Wahrscheinlichkeit, dass posttranslationale Modifikationen wichtig für ihre Funktion sind, ist relativ gering.

Erste Versuche zur Expression der humanen Fucokinase wurden bereits von Hinderlich *et al.* (2002) unternommen. In dieser Arbeit gelang zwar die Überexpression des Proteins, es war jedoch nahezu unlöslich und konnte lediglich in Einschlusskörperchen nachgewiesen werden. Das Protein wurde hier mit einem His-Tag exprimiert, der zwar die Detektion und Reinigung des Proteins erleichtert, aber keinen Beitrag zu seiner Löslichkeit leistet. Daher

wurde in dieser Promotionsarbeit die Fucokinase mit einem GST-Tag fusioniert. Dieser Tag ist bekannt dafür, dass er die Löslichkeit von Fusionsproteinen erhöht. Obwohl die Überexpression von GST-Fucokinase auch hier erfolgreich war, gelang es nicht, einen signifikanten Anteil des Proteins in die lösliche Fraktion zu überführen. Der Grund hierfür dürfte gewesen sein, dass die GST-Fucokinase mit einer Größe von ca. 100 kDa zu groß ist, als das es *E. coli* gelingen könnte, trotz eines GST-Tags dieses Protein in Lösung zu überführen. Es ist daher unwahrscheinlich, dass die Fusion der Fucokinase mit anderen Tags, etwa dem ebenfalls häufig verwendeten Maltose-bindenden Protein (MBP) (Lee *et al.*, 2006; Maina *et al.*, 1988), die Löslichkeit verbessern könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls versucht, die Kinasedomäne der humanen Fucokinase als GST-Fusionsprotein in *E. coli* zu exprimieren. Sie ist wesentlich kleiner als das komplette Protein (ca. 35 kDa) und liegt damit in einem Größenbereich, der für Expressionen in *E. coli* gut geeignet sein sollte. Trotzdem lag bei der Expression der GST-hFUK-Kinase-Domäne der wesentliche Anteil des Proteins wiederum im Sediment vor. Dies deutet darauf hin, dass die Kinasedomäne, zumindest teilweise, zum unlöslichen Verhalten der Fucokinase in *E. coli* beiträgt. Es wäre daher nahe liegend, einen Teil der Fucokinase ohne Kinasedomäne zu exprimieren, um möglicherweise eine bessere Ausbeute an löslichem Protein zu bekommen, die zumindest für die Herstellung von Antikörpern genutzt werden könnte. Trotz alledem gelang es, den Teil der löslichen GST-Fucokinase-Domäne nach der Expression über Affinitätschromatographie nahezu bis zur Homogenität zu reinigen. Die Ausbeute lag in der Größenordnung von 100 µg und eignet sich somit ebenfalls für die Herstellung von Antikörpern. Die analoge Expression der murinen GST-Fucokinase-Domäne erbrachte ebenfalls keine Verbesserung der Löslichkeit, allerdings konnte hier gezeigt werden, dass zumindest ein Teil des in den Einschlusskörperchen befindlichen Fusionsproteins durch Harnstoffbehandlung gelöst und nach Entsalzung in Lösung gehalten werden konnte. Allerdings schlug die anschließende affinitätschromatographische Reinigung fehl, was darauf hindeutet, dass sich das Protein weiterhin im denaturierten Zustand befindet. Schonendere Renaturierungsmethoden könnten hier jedoch zur Gewinnung funktionellen Proteins für biochemische Analysen führen.

Das zweite in dieser Arbeit verwendete Expressionssystem war das Baculovirus-System (BVES) (Davis *et al.*, 1993; Ntefidou *et al.*, 2006). Es eignet sich im Vergleich zu *E. coli* besser zur Expression größerer Proteine, da die verwendeten Zellen denen der Säuger in vielen Eigenschaften ähneln und auch in der Lage sind, potentiell wichtige posttranslationale Modifikationen einzuführen. Die hohe Expressionsrate des BVES wird durch die Verwendung eines rekombinanten Virus erreicht, der das Zielgen unter einen sehr starken viralen Promoter stellt. Insbesondere für die Expression des sehr großen Fucokinase-Proteins

schien daher das BVES geeignet. Nachdem die Konstruktion des Vektors der humanen Fucokinase nicht erfolgreich war, konnte lediglich die Expression der murinen Fucokinase versucht werden. Es konnte jedoch weder in der löslichen Fraktion der infizierten Insektenzellen noch im Sediment eine Überexpression des Proteins beobachtet werden. Während auch beim BVES gelegentlich unlösliche rekombinante Proteine beobachtet werden konnten (Charles *et al.*, 1993; Altmann *et al.*, 1999), ist die Tatsache, dass überhaupt keine Expression, also nicht einmal in der unlöslichen Fraktion, zu Stande kam, ungewöhnlich. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass das exprimierte Protein für die Insektenzelle toxisch ist, und somit Zellen, die mit dem Fucokinase-Baculovirus infiziert werden, absterben. Diese Möglichkeit besteht verstärkt dann, wenn das zu exprimierende Protein Membran-assoziiert ist, wie es für die Fucokinase bereits beobachtet wurde (Ch. Bauer, unveröffentlichte Ergebnisse), da dadurch unter bestimmten Umständen lebenswichtige Funktionen beeinflusst werden können.

Im Gegensatz zur Fucokinase gelang die deutliche Überexpression der GDP-L-Fucose Pyrophosphorylase (GFPP) mit dem BVES. Der Anteil des überexprimierten Proteins am Gesamtprotein betrug bis zu 20%. Die GFPP ist kleiner als die Fucokinase, und wie *E. coli* kommt auch das BEVS besser mit kleinen Proteinen als mit großen Proteinen zurecht, was sich im hier vorliegenden Fall bestätigte. Allerdings konnte die GFPP, die mit einem His-Tag ausgestattet war, nicht über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Obwohl der His-Tag N-terminal lokalisiert ist, ist er hier offensichtlich im nativen Zustand durch die übrigen Teile des Fusionsproteins verborgen und so für Interaktionen mit den Nickel-Ionen der Ni-NTA-Agarose nicht zugänglich. Hier könnte die Fusion der GFPP mit anderen Tags, etwa einem GST-Tag, Abhilfe schaffen. Entsprechende Expressionsvektoren sind allerdings nicht kommerziell erhältlich und müssten zunächst konstruiert werden. Es ist allerdings auch möglich, die GFPP ohne Tag erfolgreich zu exprimieren. Quirk und Seley-Radtke (2006) gelang die Expression des humanen Proteins in *E. coli* und die anschließende Reinigung in Größenordnungen, die ausreichend waren, um Kristalle für Röntgenstrukturanalysen herzustellen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Generierung von Antikörpern gegen die Fucokinase für weiterführende Untersuchungen. Da die ersten Versuche der rekombinanten Expression des Proteins nicht erfolgreich waren, wurde beizeiten die Herstellung von Peptidantikörpern in Angriff genommen. Dazu mussten zunächst geeignete Peptide ausgewählt werden, die möglichst Spezies übergreifend sein sollten. Einzelne Abweichungen in der Aminosäuresequenz des Fucokinase-Proteins zwischen den Spezies wurden bei der Auswahl der Peptide kritisch bewertet. Es wurden die Peptide ausgesucht, die Homogenität zeigten. Für die Auswahl von Peptiden waren neben der Spezifität auch die immunogenen Eigenschaften

von großen Bedeutung. Um die Immunantwort zu verbessern, wurden die Peptide zusätzlich an Keyhole-Limped-Hämocyanin (KLH) gekoppelt (Benjamini *et al.*, 1986; Harris und Markl, 1999). In beiden Fällen wurde das Konjugat in Verbindung mit kompletten bzw. inkompletten Freund'schen Adjuvans appliziert.

Der Nachweis der erfolgreichen Herstellung der Antikörper erfolgte zunächst durch einen Dot-Blot gegen die zur Immunisierung eingesetzten Peptide. In den Seren aller sechs Tiere konnten funktionelle Antikörper nachgewiesen werden. Ein anschließender Western-Blot zeigte jedoch, daß nur die Antikörper gegen Peptid 1 die Fucokinase erkennen können. Möglicherweise sind die Antikörper gegen Peptid 2 nur schwach reaktiv und erkennen nur das gereinigte Peptid in hoher Konzentration. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Antikörper gegen Peptid 2, deren Sequenz auf der humanen Primärstruktur basiert, keine Kreuzreaktionen mit dem Protein der Ratte eingehen. Durch die erfolgreiche Expression der rekombinanten murinen Fucokinasedomäne könnte nun auch versucht werden, die Kreuzreaktivität zur Maus zu testen. Desweiteren können die rekombinanten Proteine dazu dienen, die Antikörper affinitätschromatographisch zu reinigen.

Keines der hergestellten Antiseren war in der Lage, die Fucokinase bei einer Immunpräzipitation zu binden. Ein Grund dafür könnte sein, dass der Antikörper gegen Peptid 1 nur für Dot- und Western-Blot-Analysen und nicht für die Immunpräzipitationen geeignet ist. Antikörper gegen Peptide binden in der Regel lineare Epitope wie sie bei denaturierenden Bedingungen der Blots freigelegt werden, während bei der Immunpräzipitation das Protein in seinem nativen Zustand vorliegt und das Epitop möglicherweise verdeckt ist. Dennoch dürften sich die Antiseren gegen Peptid 1 auch für Immunfluoreszenzen eignen, da bei dieser Methode die Proteine ebenfalls denaturiert werden. Die Voraussetzungen für histochemische Experimente, die unter anderem die variable subzelluläre Lokalisation der Fucokinase untersuchen könnten, sind somit gegeben.

Wie in den oberen Abschnitten bereits diskutiert, steht nun auch rekombinantes Protein für die Immunisierung zur Verfügung. Insbesondere die Kinasedomänen der humanen und murinen Fucokinase eignen sich für diesen Zweck, obwohl sie zum Teil in unlöslicher Form oder denaturiert vorliegen, was allerdings für die Immunogenität der Proteine unerheblich ist. Andererseits sollte man vor der Immunisierung versuchen, den Fusionsteil von den Proteinen abzuspalten. Sowohl der GST-Tag, der aus einem Prokaryonten stammt, als auch der künstliche His-Tag können wesentlich immunogener als die Fucokinase selbst sein, die nativ in den immunisierten Tieren vorkommt. Es bestünde also die Gefahr, dass die erzeugten Antiseren größtenteils Antikörper gegen die Tags enthalten, die dann aufwändig abgetrennt werden müssten.

Mit den rekombinanten Proteinen kann man neben polyklonalen Antikörpern durch die Immunisierung von Kaninchen oder anderen Tieren auch monoklonale Antikörper (Köhler,

1985; Shahhosseini *et al.*, 2006) herstellen. Dazu werden zunächst Mäuse auf die gleiche Weise wie z. B. Kaninchen immunisiert. Dann wird den Mäusen die Milz entnommen, die in der Milz vorhandenen B-Zellen werden in Kultur genommen und durch Fusion mit Myelomzellen werden immortalisierte Hybridomzellen generiert. Nach mehreren Selektionsschritten können die Hybridomzellen auf Antikörperproduktion, und in einem späteren Schritt auf ihre Spezifität getestet werden. Der Vorteil monoklonaler Antikörper liegt insbesondere in der Gewinnung homogener Antikörper eines Subtyps gegen ein bestimmtes, bestimmbares Epitop und in der nahezu unbegrenzten Verfügbarkeit der Antikörper durch die Vermehrung der Hybridomzellen in Kultur. Der Nachteil dieser Antikörper ist zum einen der hohe Aufwand ihrer Herstellung, zum anderen ist durch die hohe Spezifität ihr Einsatzspektrum oft auf eine Anwendung (Western-Blot, Immunpräzipitation) beschränkt. Trotzdem wäre die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen die Fucokinase und auch die GFPP ein lohnendes Ziel für zukünftige Forschungsprojekte.

Da die fucosylierten Glykokonjugate eine fundamentale Rolle in unterschiedlichen physiologischen Prozessen haben, wurden bereits Knock-Out-Mäuse der *de novo*-Synthese von Fucose (FX *-/-*) generiert (Smith *et al.*, 2002). Ein Teil dieser Mäuse sind zwar nach der Geburt lebensfähig, sterben jedoch nach zwei bis drei Wochen an schweren Immundefekten. Diese Folge kann durch die orale Gabe von Fucose in hohen Dosen größtenteils aufgehoben werden. Die Studie (Smith *et al.*, 2002) belegt somit die Bedeutung des „Salvage-Pathways“ der Fucose für den Organismus. Es dürfte interessant sein, welchen Phänotyp eine Knock-Out-Maus der Fucokinase oder der GFPP aufweisen würde. Es ist damit zu rechnen, dass der Phänotyp weniger schwer als der der FX *-/-* Mäuse ist, da der größte Teil der Fucose (ca. 90%) über den *de novo* Weg zur Verfügung gestellt wird. Es ist jedoch anzunehmen, dass unter bestimmten Stresssituationen der „Salvage-Pathway“ der Fucose erhebliche Bedeutung erlangt und die Mäuse vor Hypofucosylierung und Immunstörungen schützen könnte. Analoge Beobachtungen dürften z. T. allerdings auch gemacht werden, wenn Tiere experimentell mit fucosefreier Nahrung versorgt werden. Eine Fucokinase-Knock-Out-Maus könnte jedoch zusätzlich klären, ob die Fucokinase neben ihrer metabolischen Funktion noch eine andere Rolle im Organismus spielt. Die Kinasedomäne nimmt nur etwa ein Drittel des Fucokinasmoleküls ein, und es ist daher nahe liegend, dass der andere Teil der Fucokinase weitere zelluläre Funktionen besitzt, die möglicherweise außerhalb des Fucosestoffwechsels liegen könnten.