

6 Zusammenfassung

L-Fucose ist ein wichtiger Monosaccharidbaustein komplexer N- und O-Glycane und Glycolipide von Säugetieren. Sie findet sich in der Regel terminal in den Oligosaccharidketten und ist an einer Reihe biologischer Prozesse beteiligt. Die Biosynthese der L-Fucose findet im Cytosol von Zellen statt. Die *de novo*-Synthese erfolgt über GDP-Mannose. Ein Multienzymkomplex wandelt dabei Mannose in Fucose um. 10% der GDP-Fucose werden jedoch über den sogenannten „Salvage Pathway“ gebildet, der die Fucose aus der Nahrung oder dem Abbau von Glycokonjugaten wiederverwertet. Zwei Enzyme sind an diesem Weg beteiligt, die L-Fucosekinase und die GDP-Fucose-Pyrophosphorylase.

In dieser Arbeit wurden die Enzyme des „Salvage Pathways“ der L-Fucose in zwei unterschiedlichen Systemen rekombinant exprimiert. Zum einen wurden die humane Fucokinase und ihre C-terminal lokalisierte Kinasedomäne als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert. Es war zwar nicht möglich, die komplette GST-Fucokinase in löslicher Form herzustellen, da sämtliches überexprimiertes Protein in Einschlusskörperchen vorlag. Die GST-Fucokinase-Domäne bildete zwar ebenfalls Einschlusskörperchen, ein signifikanter Anteil des Proteins war jedoch löslich und konnte durch Affinitätschromatographie nahezu bis zur Homogenität gereinigt werden. Zusätzlich konnten Einschlusskörperchen der ebenfalls als GST-Fusionsprotein exprimierten Kinasedomäne der murinen Fucokinase durch denaturierende Bedingungen wieder in Lösung gebracht werden.

Das zweite verwendete Expressionssystem war das Baculovirus-Expressionssystem, das sich in der Regel gut für die heterologe Expression von Säugerproteinen in Insektenzellen eignet. Allerdings gelang es auch mit dieser Methode nicht, die Fucokinase als lösliches Protein zu exprimieren. Möglicherweise hatte das überexprimierte Protein hier einen toxischen Effekt auf die verwendeten Zellen. Im Gegensatz dazu war die Expression der GDP-Fucose-Pyrophosphorylase in Insektenzellen erfolgreich. Die löslichen Fraktionen der Zellen enthielten bis zu 20% rekombinantes Protein.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Antiseren gegen die humane Fucokinase hergestellt. Da zu Beginn dieser Experimente noch kein rekombinantes Protein vorlag, erfolgte die Immunisierung von Kaninchen mit chemisch synthetisierten Peptiden, die aus Teilsequenzen der Primärstruktur der Fucokinase bestanden. Insgesamt wurden sechs Kaninchen immunisiert, und alle gewonnenen Antiseren waren im Dot-Blot gegen die ausgewählten Peptide reaktiv. Zusätzlich konnten die Antikörper gegen eines der beiden Peptide im Western-Blot die Fucokinase der Ratte identifizieren. Die hier präsentierten Ergebnisse bieten die Voraussetzung für weitere biochemische und immunhistologische Untersuchungen, die die Rolle des „Salvage Pathways“ der Fucose weiter entschlüsseln können.