

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	3
SUMMARY	4
1 EINLEITUNG	8
1.1 DIE UDP-N-ACETYLGLUKOSAMIN 2-EPIMERASE/N-ACETYL-MANNOSAMIN-KINASE (GNE)8	
1.2 EXPRESSIONSMUSTER UND SUBZELLULÄRE VERTEILUNG DER GNE.....	10
1.3 REGULATION DER GNE.....	11
1.4 PATHOLOGIE DER GNE.....	12
1.4.1 Sialurie.....	12
1.4.2 Erbliche Einschlußkörperchenmyopathie (HIBM).....	13
1.5 DIE ENTWICKLUNG DER MAUS UND DIE BEDEUTUNG DER GNE FÜR DIE EMBRYOGENES....	14
1.6 DIE BIOSYNTHESE VON SIALINSÄUREN UND IHRE STRUKTURVIELFALT.....	15
1.7 SIALINSÄUREN UND IHRE BIOLOGISCHEN FUNKTIONEN.....	18
1.7.1 Beeinflussung von Struktur und Funktion von Glycokonjugaten.....	19
1.7.2 Adhäsion und Zell-Zell-Interaktion.....	20
1.7.3 Sialinsäuren als Erkennungsdeterminanten für Pathogene.....	22
1.7.4 Antigenmaskierung.....	22
1.7.5 Bedeutung der Sialinsäuren für die Entwicklung.....	23
1.8 ZIELSETZUNG.....	26
2 ERGEBNISSE	27
2.1 OLIGOMERISIERUNG DER GNE.....	27
2.2 IDENTIFIZIERUNG VON GNE-INTERAGIERENDEN PROTEINEN.....	30
2.3 NACHWEIS DER INTERAKTION MITTELS IMMUNCHEMISCHER METHODEN.....	32
2.3.1 Spezifität des Anti-GNE-Anikörpers.....	32
2.3.2 Überprüfung der Interaktion von GNE mit CRMP1 mittels Co-Immunpräzipitation.....	33
2.3.3 Überprüfung der Interaktion von GNE und PLZF mittels Co-Immunpräzipitation und GST-pull down.....	34
2.3.4 Studien zu posttranslationalen Modifikationen der GNE.....	35
2.4 ISOLIERUNG MURINER GNE-DEFIZIENTER ES-ZELLEN.....	37
2.4.1 Pluripotenz der ES-Zellen.....	39
2.5 CHARAKTERISIERUNG MURINER GNE-DEFIZIENTER ES-ZELLEN.....	41
2.5.1 UDP-GlcNAc 2-Epimerase-Aktivität.....	41
2.5.2 Vergleich der Gesamtsialylierung von WT- und KO-ES-Zellen mittels Periodat-Resorcinol-Assay.....	42
2.5.3 Supplementierung der KO-ES-Zellen mit N-Acetylmannosamin.....	44
2.5.4 Analyse der Oberflächensialylierung mittels FACS.....	45
2.5.5 Proliferation von WT und KO ES-Zellen.....	47
3 DISKUSSION	50
3.1 OLIGOMERISIERUNG DER GNE.....	50
3.2 IDENTIFIZIERUNG VON BINDUNGSPARTNERN DER GNE.....	52
3.2.1 Der Interaktionspartner CRMP1.....	54
3.2.2 Der Interaktionspartner PLZF.....	57
3.3 ISOLIERUNG MURINER ES ZELLEN.....	60
3.4 CHARAKTERISIERUNG MURINER GNE-DEFIZIENTER ES-ZELLEN.....	62
4 ARBEITSHYPOTHESE UND AUSBLICK	67
5 MATERIAL UND METHODEN	70
5.1 MATERIAL.....	70
5.1.1 Chemikalien und Zellkulturmaterialien.....	70
5.1.2 Organismen.....	70
5.1.2.1 Prokaryotische Organismen.....	70
5.1.2.2 Eukaryotische Organismen.....	70

5.1.2.2.1	Insektenzellen Sf9/Sf900 (GibcoBRL, USA)	70
5.1.2.2.2	PC12- Zellen (ATCC, Rockville, USA)	71
5.1.2.2.3	HL60-Zellen (Kepler et al. 1999)	71
5.1.2.2.4	Embryonale Stammzellen	71
5.1.3	<i>Tiere</i>	72
5.1.3.1	C57BL/6 Mäuse (Charles River Laboratories, USA).....	72
5.1.4	<i>Vektoren</i>	72
5.1.4.1	Klonierungsvektor.....	72
5.1.4.1.1	pCR®-Blunt (Invitrogen, USA).....	72
5.1.4.2	Vektoren für das Yeast Two Hybrid-System	73
5.1.4.2.1	pBTM117c (9350 bp)	73
5.1.4.2.2	pGAD427 (9134 bp)	74
5.1.4.3	Expressionsvektor für Säugerzellen	74
5.1.4.3.1	pcDNA 3.1/Zeo (Invitrogen, Carlsbad, USA).....	74
5.1.4.4	Expressionsvektor für Insektenzellen.....	75
5.1.4.4.1	pFASTBAC™ 1 (Invitrogen, Niederlande)	75
5.1.5	<i>Oligonukleotide (MWG Biotech, München)</i>	76
5.1.5.1	Amplifizierung der GNE und deren Fragmente	76
5.1.5.2	Für die Sequenzierung der GNE und deren Fragmente.....	77
5.1.5.2.1	Unmarkierte Primer für die Sequenzierung im pCR®Blunt Vektor	77
5.1.5.2.2	Markierte Primer für die Sequenzierung im Hefevektor.....	78
5.1.5.2.3	Unmarkierte Primer für die Sequenzierung im Hefevektor.....	78
5.1.5.3	Primer für die Charakterisierung der ES-Zellen.....	78
5.1.6	<i>Enzyme</i>	78
5.1.7	<i>Antikörper</i>	79
5.1.8	<i>Lectine</i>	80
5.1.9	<i>Inhibitoren</i>	81
5.1.10	<i>Medien</i>	81
5.1.11	<i>Medienzusätze</i>	81
5.1.11.1	Antibiotika	81
5.1.11.2	Seren	82
5.1.12	<i>Bestandteile der exterazellulären Matrix</i>	82
5.1.13	<i>Wachstumsfaktoren</i>	82
5.1.14	<i>Kits</i>	82
5.1.15	<i>Größenmarker</i>	82
5.1.16	<i>Membranen</i>	83
5.1.17	<i>Agarosen und Sepharosen</i>	83
5.1.18	<i>Materialien und Substanzen für radioaktiven Enzymassay</i>	83
5.1.19	<i>Geräte</i>	83
5.2	METHODEN	85
5.2.1	<i>Behandlung von Lösungen und Geräten</i>	85
5.2.2	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	85
5.2.2.1	DNA-Grundtechniken	85
5.2.2.1.1	Plasmidisolierung aus Bakterien.....	85
5.2.2.1.1.1	Plasmidpräparation mittels alkalischer Lyse (Birnboim und Doly 1979)	85
5.2.2.1.1.2	Chromatographische Isolierung von Plasmid-DNA	87
5.2.2.1.2	Anreichern der DNA-Proben durch DNA-Fällung	87
5.2.2.1.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	88
5.2.2.1.4	Trennung von DNA-Molekülen durch Gelelektrophorese.....	88
5.2.2.1.5	Isolierung von DNA mittels Gelelektion	89
5.2.2.1.6	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) nach (Saiki 1986, Mullis und Faloona 1986).	90
5.2.2.1.7	Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen (Brooks, 1987; Smith und Wilcox, 1970)	92
5.2.2.1.8	Ligation von DNA-Fragmenten (Weiss et al. 1968, Richardson et al. 1968).....	93
5.2.2.2	DNA-Sequenzierung (Sanger et al. 1977 und Sanger und Coulson 1975)	94
5.2.2.3	RNA-Grundtechniken	96
5.2.2.3.1	Chromatographische Isolierung von Gesamt-RNA	96
5.2.2.3.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA.....	96
5.2.2.3.3	Auftrennung der RNA mittels Agarosegelelektrophorese.....	96
5.2.2.4	RT-PCR	97
5.2.3	<i>Zellbiologische Methoden</i>	98
5.2.3.1	Zellbiologische Methoden für Säugerzellen.....	98
5.2.3.1.1	Allgemeine zellbiologische Methoden für Säugerzellen.....	98

5.2.3.1.2	Kultivierung von Säugerzellen	98
5.2.3.1.3	Allgemeines zur Kultivierung embryonaler Stammzellen von Mäusen	99
5.2.3.1.4	Kultivierung von ES-Zellen	100
5.2.3.1.5	Generierung embryonaler Stammzellen von Mäusen	101
5.2.3.1.6	Isolierung, Kultivierung und Inaktivierung von Feederzellen.....	101
5.2.3.1.7	Konservierung von Säugerzellen	102
5.2.3.1.8	Transfektion von Säugerzellen mit DNA.....	103
5.2.3.1.9	Inhibition des Proteasoms in Säugerzellen	103
5.2.3.1.10	Auslösen oxidativen Stress in Säugerzellen.....	104
5.2.3.1.11	Durchflußcytometrie/FACS (fluorescence-activated cell scanning).....	104
5.2.3.1.12	Alkalische Phosphatase Assay	105
5.2.3.1.13	Proliferationsassay	105
5.2.3.2	Zellbiologische Methoden für Insektenzellen	106
5.2.3.2.1	Kultivierung von Insektenzellen	106
5.2.3.2.2	Konservierung von Insektenzellen.....	107
5.2.3.2.3	Überexpression rekombinanter Proteine in Insektenzellen mit dem Baculovirus-System 107	
5.2.3.3	Mikrobiologische Methoden für Bakterienzellen.....	108
5.2.3.3.1	Kultivierung von E. coli.....	108
5.2.3.3.2	Konservierung von Bakterien	109
5.2.3.3.3	Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA (Sambrook et al., 1989).....	109
5.2.4	<i>Identifizierung interagierender Proteine mittels des Yeast Two Hybrid-Systems.....</i>	<i>109</i>
5.2.5	<i>Biochemische Methoden</i>	<i>110</i>
5.2.5.1	Aufarbeitung von Säugerzelllysaten	110
5.2.5.2	Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976).....	111
5.2.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970).....	111
5.2.5.4	Coomassie-Blau-Färbung.....	113
5.2.5.5	Elektrotransfer von Proteinen (Towbin 1979, Burnette 1981)	114
5.2.5.6	Immunchemischer Antigennachweis nach Elektrotransfer	115
5.2.5.6.1	Detektion von Meerrettich-Peroxidase (POD).....	115
5.2.5.7	Reinigung überexprimierter poly-Histidin-markierter Fusionsproteine	116
5.2.5.8	Umpuffern von Proteinlösung mittels Gelfiltration.....	117
5.2.5.9	Kopplung von gereinigtem Protein an CNBr-aktivierte Sepharose.....	117
5.2.5.10	Aufreinigung von Anti-GNE-Antikörper aus Kanninchenserum mittels Immunaффinitätschromatographie	118
5.2.5.11	Immunpräzipitation	118
5.2.5.12	GST-pull down-Assay	119
5.2.5.13	GNE-Aktivitätsassay (Zeitler 1992).....	120
5.2.5.14	Resorcinol-Assay zur Bestimmung des Sialinsäuregehalts (Jourdain et al. 1971)	120
6	LITERATUR.....	122
7	ANHANG.....	138
7.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	138
7.2	VERÖFFENTLICHUNGEN	142
7.2.1	<i>Publikationen.....</i>	<i>142</i>
7.2.2	<i>Posterbeiträge</i>	<i>143</i>
7.3	DANKSAGUNG.....	145