

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer zellulären Plasmamembran. _____	6
Abbildung 2: Die Glycokalix eukaryontischer Zellen. _____	7
Abbildung 3: Struktur von Sialinsäuren. _____	8
Abbildung 4: Synthetische metabolische Sialinsäurevorläufer. _____	10
Abbildung 5: Systematik der Deuterostomia und ihre Vorkommen an Sialinsäuren. _____	12
Abbildung 6: Strukturen typischer N- bzw. O-glycosidisch verknüpfter Oligosaccharide von Glycoproteinen. _____	14
Abbildung 7: Struktur des Gangliosids G _{M1} . _____	17
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Selektine und ihrer Liganden. _____	19
Abbildung 9: N-terminale Bindungsdomäne des Siglec-1 (Sialoadhäsin). _____	20
Abbildung 10: Proteinfamilie der humanen Siglecs. _____	21
Abbildung 11: Biosynthese von UDP-GlcNAc in Säugetierzellen. _____	29
Abbildung 12: Sialinsäurebiosynthese in Säugetierzellen. _____	30
Abbildung 13: Schematische Darstellung der humanen GNE-Exonstruktur der GNE-Spleißvarianten nach Watts <i>et al.</i> (2003). _____	35
Abbildung 14: Klassifikation der wichtigsten Muskelkrankheiten. _____	36
Abbildung 15: Muskelquerschnitt eines h-IBM-Patienten. _____	37
Abbildung 16: Schematische Darstellung der Lokalisation der h-IBM- (oben) und Sialurie- (unten) Punktmutanten im GNE-Gen. _____	38
Abbildung 17: Amplifikation von GNE2- und GNE3-codierender cDNA aus humaner Plazenta. _____	43
Abbildung 18: N-terminale Sequenzen der hGNE-Isoformen. _____	44
Abbildung 19: Aminosäure-Sequenzvergleich der N-Termini des humanen und murinen GNE2-Proteins. _____	45
Abbildung 20: Verteilung der GNE-Isoformen innerhalb verschiedener humaner Zelllinien. _____	46
Abbildung 21: Gewebsspezifische Verteilung der humanen GNE-Isoformen codierenden mRNAs. _____	47
Abbildung 22: Gewebsspezifische Verteilung der murinen GNE-Isoformen codierenden mRNAs. _____	48
Abbildung 23: Schematische Darstellung der cDNAs der klonierten Konstrukte. _____	49
Abbildung 24: PCR-Produkte der humanen und murinen GNE-Isoform-codierenden cDNAs. _____	49
Abbildung 25: PCR-Analyse zum Nachweis von Virus im Erststock. _____	51
Abbildung 26: Expression der humanen und murinen GNE isoformen. _____	53
Abbildung 27: Aufgereinigte mGNE2 in einer SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung. _____	54
Abbildung 28: MALDI-MS-Analyse zur Identifizierung der mGNE2-Doppelbande. _____	54
Abbildung 29: Behandlung aufgereinigter mGNE2-Fractionen mit alkalischer Phosphatase. _____	55
Abbildung 30: SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung von in Anwesenheit von MG132 exprimierter mGNE2. _____	56
Abbildung 31: Aufgereinigte mGNE2-Mutante M32A in einer SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung. _____	57
Abbildung 32: α -GST-Western-Blot von hGNE3-Eluat. _____	57

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 33: UDP-GlcNAc-2-Epimerase- und ManNAc-Kinase-Aktivitäten der gereinigten GNE-Isoformen. _____	58
Abbildung 34: Gelfiltrationsanalysen der gereinigten GNE-Isoformen. _____	60
Abbildung 35: Gekoppelt-optischer Enzymtest zur hGNE2-Tetramer-Rückbildung. _____	61
Abbildung 36: Radiometrischer UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay der in <i>CHO</i> -Lec3-Zellen exprimierten GNE-Isoformen. _____	62
Abbildung 37: Amplifikation der cDNA-Konstrukte der GNE-Isoformen. _____	63
Abbildung 38: Radiometrischer UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay der hGNE-Pools und einzelner hGNE1-Klone. _____	64
Abbildung 39: PCR-Analyse der mit hGNE1 transfizierten BJA-B-Zelllinien. _____	65
Abbildung 40: Histogramm der FACS-Analyse mit VVA-Lektin. _____	66
Abbildung 41: Schematische Darstellung der Herstellung der cDNA des GNE2-Hybridproteins. ____	67
Abbildung 42: α -GST-Immunoblot der Aufreinigung von GST-VCP. _____	69
Abbildung 43: α -GST-Immunoblot des GST- <i>Pull-downs</i> mit GST-VCP und C-terminal His-getagtem hGNE1. _____	70
Abbildung 44: α -His- und α -GST-Immunoblot des His- <i>Pull-downs</i> mit GST-VCP bzw. GST und hGNE1-C-His. _____	71
Abbildung 45: α -GST-Immunoblot des <i>Pull-downs</i> mit GST-VCP bzw. GST und hGNE1-C-His. ____	72
Abbildung 46: (A) α -GST-Immunoblot von über Glutathion-Sepharose aufgereinigten Lysaten der mit GST-VCP bzw. GST und hGNE1 co-transfizierten <i>Sf900</i> -Zellen. (B) α -His-Immunoblot von über Ni-NTA-Agarose aufgereinigten Lysaten der mit GST-VCP bzw. GST und hGNE1 co-transfizierten <i>Sf900</i> -Zellen. _____	73
Abbildung 47: α -His-Immunoblot von Co-IP-Präzipitaten der Lysate von co-transfizierten <i>Sf900</i> -Zellen. _____	74
Abbildung 48: Western-Blot-Analysen von Co-IP-Präzipitaten der Lysate von einzeln mit GST-VCP bzw. GST und hGNE1 transfizierten <i>Sf900</i> -Zellen. _____	76
Abbildung 49: Überexpression der Oxr1-Isoformen in <i>E.coli</i> BL21-Zellen. _____	78
Abbildung 50: SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung von in <i>E.coli</i> BL21-Zellen exprimierten Oxr1 long- bzw. Oxr1 short-Protein. _____	79
Abbildung 51: MALDI-MS-Spektrum von Oxr1 short. _____	80
Abbildung 52: Sequenzabgleich zwischen den in der MALDI-MS-Analyse gefundenen Peptide und den Datenbankeinträgen. _____	80
Abbildung 53: Western-Blot-Analysen des His- <i>Pull-downs</i> mit Lysaten von GST-Oxr1 bzw. GST und hGNE1 transfizierten Insektenzellen. _____	83
Abbildung 54: Alternatives Spleißen des α -Tropomyosin-Gens der Ratte. _____	96
Abbildung 55: BAC-TO-BAC®-Baculovirus-Expressionssystem. _____	116
Abbildung 56: Morgan-Elson-Reaktion nach Reissig <i>et al.</i> , 1955. _____	127
Abbildung 57: Colorimetrischer ManNAc-Kinase-Assay. _____	128