

## I. Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b>	<b>2</b>
2.1	Historische Entwicklungskenntnisse der Porphyrie	2
2.2	Pathobiochemie in der Hämbiosynthese	4
2.3	Das Enzym Uroporphyrinogen Decarboxylase (Uro-D)	6
2.4	Klinische Symptome und Histologie der PCT	8
2.5	Molekulargenetische und strukturelle Eigenschaften der Uro-D	10
2.6	Mutationen im Uro-D Gen und ihre Auswirkungen	13
<b>3</b>	<b>Material</b>	<b>16</b>
<b>3.1</b>	<b>Tiere</b>	<b>16</b>
<b>3.2</b>	<b>Genbanken, Bakterien und Plasmide</b>	<b>16</b>
3.2.1	Genbanken	16
3.2.2	Bakterien	16
3.2.3	Plasmide	16
<b>3.3</b>	<b>Enzyme, Oligonukleotide, Chemikalien und Kits</b>	<b>17</b>
3.3.1	Enzyme	17
3.3.2	Oligonukleotide	17
3.3.3	Chemikalien	17
3.3.4	Kits	17
<b>3.4</b>	<b>Verbrauchsmaterialien, Glaswaren und Laborgeräte</b>	<b>18</b>
3.4.1	Verbrauchsmaterialien	18
3.4.2	Glaswaren	18
3.4.3	Laborgeräte	18
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>19</b>
<b>4.1</b>	<b>Mikrobiologische Methoden</b>	<b>19</b>
4.1.1	Bakterienkultur	19
4.1.1.1	Plattenkultur	19
4.1.1.2	Flüssigkultur	19
4.1.2	Herstellung transformationskompetenter Bakterien	19
4.1.3	Transformation von Plasmiden in Bakterien	20
<b>4.2</b>	<b>Isolierung von Plasmiden aus <i>E.coli</i></b>	<b>21</b>
4.2.1	Isolierung von Plasmiden mit Qiagen Plasmid Kits	21
4.2.2	Schnellaufschluß durch alkalische Lyse	22
<b>4.3</b>	<b>Isolierung von genomischer DNA aus Vollblut</b>	<b>22</b>
<b>4.4</b>	<b>Vermehrung und Isolierung von <math>\lambda</math>-Phagen-DNA</b>	<b>23</b>
4.4.1	Präparation phagenkompetenter Bakterien	23
4.4.2	Titerbestimmung einer Phagenlösung	23
4.4.3	Durchmustern einer Phagen-Genbank	23
4.4.4	Vermehrung, Isolierung und Reinigung der Phagen-DNA	25

---

<b>4.5</b>	<b>Enzymatische Behandlung und Analyse von DNA</b>	26
4.5.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	26
4.5.2	Dephosphorylierung von linearisierten Plasmiden	26
4.5.3	5'-Kinasierung von DNA	26
4.5.4	Ligation von Vektoren und DNA-Fragmenten	27
4.5.5	Polymerase-Kettenreaktion und Klonierung der Amplifikate	27
4.5.5.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
4.5.5.2	Klonierung der PCR-Amplifikate	27
4.5.5.2.1	Klonierung von Amplifikaten in <i>Sma</i> I - Vektor	27
4.5.5.2.2	Klonierung der PCR-Fragmente in den Vektor pCR®2.1-TOPO®	28
4.5.6	Sequenzierung doppelsträngiger DNA	28
4.5.7	Automatische DNA-Sequenzierung	29
<b>4.6</b>	<b>Auftrennung, Aufreinigung und Gewinnung von DNA</b>	29
4.6.1	Agarose-Gelektrophorese zur Auf trennung von DNA	29
4.6.2	Elution von DNA aus Agarosegelen	30
4.6.2.1	Elution mit QIAEX II	30
4.6.2.2	Elution durch Zentrifugation	30
<b>4.7</b>	<b>Transfer und Detektion von DNA auf Membranen</b>	30
4.7.1	Alkalische Transfer von DNA auf Trägermembranen	30
4.7.2	Nichtradioaktive Hybridisierung mit dem ECL Direkt Labelling System	31
<b>4.8</b>	<b>Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten</b>	32
<b>4.9</b>	<b>Isolierung und Analyse von RNA</b>	32
4.9.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe	32
4.9.2	Isolierung von mRNA	32
4.9.3	5'- und 3'- RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) mit dem Marathon cDNA Amplification Kit und dem Advantage® 2 PCR Enzyme System	33
<b>4.10</b>	<b>Mutationsanalyse</b>	34
<b>4.11</b>	<b>Protein Analyse</b>	35
4.11.1	Spaltung der cDNA Fragmente zum Einklonieren in den pRSET A Vektor	35
4.11.2	Herstellung der Mutation des cDNA-Fragments an Position 392	35
4.11.3	Expression der cDNA-Fragmente in <i>E. coli</i>	36
4.11.4	Auftrennung der Proteine im Polyacrylamidgel	36
4.11.5	Isolierung und Aufreinigung des 54 kDa Fragments	37
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	39
<b>5.1</b>	<b>Klinische Beurteilung, Labor- und Leberbiopsiebefunde</b>	39
5.1.1	Klinische Befunde	39
5.1.2	Laborchemische Befunde	39
5.1.3	Hepatologische Befunde	41
<b>5.2</b>	<b>Isolierung und molekulare Charakterisierung des Uro-D Gens</b>	41
5.2.1	Durchmusterung der ovinen $\lambda$ -Phagen Bank	41
5.2.2	Übersicht über die Subklonierung der Phagen	42
5.2.2.1	Subklonierung des Phagen $\lambda$ UD1	43
5.2.2.2	Analyse des Phagen $\lambda$ UD2	44

5.2.2.3	Kartierung des Phagen λUD3	44
5.2.3	Zusammenfassung der genomischen Struktur des Uro-D Gens	45
<b>5.3</b>	<b>Mutationsanalyse des Uro-D Gens</b>	<b>47</b>
<b>5.4</b>	<b>Herstellung der ovinen Uro-D cDNA</b>	<b>51</b>
5.4.1	Synthese der cDNA aus Leber vom gesunden Schaf	51
5.4.2	Herstellung der cDNA mit gezielter Mutagenese durch 'site directed mutagenesis'	52
<b>5.5</b>	<b>Expression der cDNA-Fragmente</b>	<b>53</b>
5.5.1	Auswahl des Expressionsvektors	53
5.5.2	Konstruktion des Plasmids pRSET A zu Expression der cDNA-Fragmente	54
5.5.3	Wahl des Expressionssystems	55
5.5.4	Nachweis der Expression von Uro-D Proteinen in <i>E.coli</i> BL21(DE3)pLysS	56
<b>5.6</b>	<b>Chromosomale Lokalisation des ovinen Uro-D Gens</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>59</b>
<b>6.1</b>	<b>Symptomatische Aspekte der PCT</b>	<b>59</b>
<b>6.2</b>	<b>Untersuchung des ovinen Uro-D Gens</b>	<b>61</b>
6.2.1	Genomische Struktur des Uro-D Gens	61
6.2.2	Polymorphismen im ovinen Uro-D Gen	63
6.2.3	Bakterielle Expression der cDNA vom ovinen Uro-D Gen	64
6.2.4	Chromosomale Lokalisation des ovinen Uro-D Gens	67
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>72</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>82</b>