

I. Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	Historische Entwicklungskennntnisse 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
3	Material	16
3.1	Tiere	16
3.2	Genbanken, Bakterien und Plasmide	16
3.2.1	Genbanken	16
3.2.2	Bakterien	16
3.2.3	Plasmide	16
3.3	Enzyme, Oligonukleotide, Chemikalien und Kits	17
3.3.1	Enzyme	17
3.3.2	Oligonukleotide	17
3.3.3	Chemikalien	17
3.3.4	Kits	17
3.4	Verbrauchsmaterialien, Glaswaren und Laborgeräte	18
3.4.1	Verbrauchsmaterialien	18
3.4.2	Glaswaren	18
3.4.3	Laborgeräte	18
4	Methoden	19
4.1	Mikrobiologische Methoden	19
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
4.2	Isolierung von Plasmiden aus <i>E.coli</i>	21
4.2.1	Isolierung von Plasmiden mit Qiagen Plasmid Kits	21
4.2.2	Schnellaufschluß durch alkalische Lyse	22
4.3	Isolierung von genomischer DNA aus Vollblut	22
4.4	Vermehrung und Isolierung von λ-Phagen-DNA	23
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

4.5	Enzymatische Behandlung und Analyse von DNA	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
4.6	Auftrennung, Aufreinigung und Gewinnung von DNA	29
4.6.1	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung 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
4.7	Transfer und Detektion von DNA auf Membranen	30
4.7.1	Alkalische Transfer von DNA auf Trägermembranen	30
4.7.2	Nichtradioaktive Hybridisierung mit dem ECL Direkt Labelling System	31
4.8	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	32
4.9	Isolierung und Analyse von RNA	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
4.10	Mutationsanalyse	34
4.11	Protein Analyse	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
5	Ergebnisse	39
5.1	Klinische Beurteilung, Labor- und Leberbiopsiebefunde	39
5.1.1	Klinische Befunde	39
5.1.2	Laborchemische Befunde	39
5.1.3	Hepatologische Befunde	41
5.2	Isolierung und molekulare Charakterisierung des Uro-D Gens	41
5.2.1	Durchmusterung der ovinen λ -Phagen Bank	41
5.2.2	Übersicht über die Subklonierung der Phagen	42
5.2.2.1	Subklonierung des Phagen λ UD1	43
5.2.2.2	Analyse des Phagen λ UD2	44

5.2.2.3	Kartierung des Phagen λ UD3	44
5.2.3	Zusammenfassung der genomischen Struktur des Uro-D Gens	45
5.3	Mutationsanalyse des Uro-D Gens	47
5.4	Herstellung der ovinen Uro-D cDNA	51
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
5.5	Expression der cDNA-Fragmente	53
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
5.6	Chromosomale Lokalisation des ovinen Uro-D Gens	58
6	Diskussion	59
6.1	Symptomatische Aspekte der PCT	59
6.2	Untersuchung des ovinen Uro-D Gens	61
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
7	Zusammenfassung	68
7	Summary	70
8	Literaturverzeichnis	72
9	Anhang	82