

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Stoffwechselerkrankungen	1
1.2	Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Mangel	1
1.3	Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase	2
1.3.1	SSADH-Proteinstruktur und -faltung	2
1.3.2	Die Rolle von SSADH im Metabolismus	3
1.4	Nonsense-Mutationen	5
1.5	Read-through-Wirkstoffe	7
1.5.1	Amlexanox	7
1.5.2	Gentamicin	8
1.5.3	PTC124	8
1.5.4	Coffein	9
1.6	Ziele der vorliegenden Arbeit	10
2	Materialien	12
2.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	12
2.2	Chemikalien und Reagenzien	15
2.3	Lösungen und Puffer	18
2.4	SDS-Polyacrylamidgele	20
2.5	Kits	20
2.6	Plasmid	21
2.7	Primer	21
2.8	Humane Zelllinie	23
2.9	Bakterienstamm	23
2.10	Antikörper	23
2.11	Softwares	24
3	Methoden	25
3.1	Molekularbiologische Methoden	25
3.1.1	Mutagenese	25
3.1.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
3.1.1.2	Aufreinigung der PCR-Produkte	25
3.1.1.3	DpnI-Verdau der Plasmid-DNA	25
3.1.1.4	Transformation	26
3.1.1.5	Mini-Plasmidpräparation	26
3.1.1.6	DNA-Konzentrationsmessung	26

3.1.1.7 Sequenzierung	26
3.1.2 Midi-Plasmidpräparation	26
3.1.3 Herstellung von Glycerol-Stocks	27
3.2 Zellbiologische Methoden	27
3.2.1 Kultivierung von SSADH-KO HEK293T-Zellen	27
3.2.2 Passagieren von SSADH-KO HEK293T-Zellen	28
3.2.3 Transfektion von SSADH-KO HEK293T-Zellen	28
3.2.4 Medikamentenbehandlung von SSADH-KO HEK293T-Zellen	28
3.2.5 Zellernte und Zelllysatherstellung aus SSADH-KO HEK293T-Zellen	29
3.2.6 Proteinbestimmung nach Bradford am Plattenphotometer	29
3.2.7 Proteinbestimmung nach Bradford am Spektralphotometer	30
3.3 Biochemische Methoden	30
3.3.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30
3.3.2 Western-Blot	31
3.3.2.1 Transfer	31
3.3.2.2 Immundetektion	31
3.3.2.3 Strippen	32
3.4 Assays	32
3.4.1 Fluoreszenz-basiertes SSADH-Aktivitätsassay	32
3.4.2 Lumineszenzassay	33
3.5 Statistische Auswertungen	33
3.6 Elektronische Manipulationen der Abbildungen	33
4 Ergebnisse	35
4.1 Mutagenese, Proteinexpression und SSADH-Aktivität der SSADH-Varianten	35
4.1.1 Mutagenese und Proteinexpression der SSADH-Varianten	35
4.1.2 SSADH-Aktivitätsnachweis der Nonsense-Varianten	37
4.2 Proteinexpression und -aktivität nach der Behandlung mit read-through-Substanzen	38
4.2.1 SSADH-Variante Gln79X	39
4.2.1.1 Ergebnisse des Western-Blots der Variante Gln79X	39
4.2.1.2 Ergebnisse des SSADH-Aktivitätsassays der Variante Gln79X	41
4.2.2 SSADH-Variante Tyr128X	42
4.2.2.1 Ergebnisse des Western-Blots der Variante	

Tyr128X	42
4.2.2.2 Ergebnisse des SSADH-Aktivitätsassays der Variante Tyr128X	42
4.2.3 SSADH-Variante Gln133X	43
4.2.3.1 Ergebnisse des Western-Blots der Variante Gln133X	43
4.2.3.2 Ergebnisse des SSADH-Aktivitätsassays der Variante Gln133X	44
4.2.4 SSADH-Variante Lys192X	45
4.2.4.1 Ergebnisse des Western-Blots der Variante Lys192X	45
4.2.4.2 Ergebnisse des SSADH-Aktivitätsassays der Variante Lys192X	46
4.2.5 SSADH-Variante Trp204X	47
4.2.5.1 Ergebnisse des Western-Blots der Variante Trp204X	47
4.2.5.2 Ergebnisse des SSADH-Aktivitätsassays der Variante Trp204X	48
4.2.6 SSADH-Variante Ser251X	49
4.2.6.1 Ergebnisse des Western-Blots der Variante Ser251X	49
4.2.6.2 Ergebnisse des SSADH-Aktivitätsassays der Variante Ser251X	50
4.2.7 SSADH-Variante Arg261X	51
4.2.7.1 Ergebnisse des Western-Blots der Variante Arg261X	51
4.2.7.2 Ergebnisse des SSADH-Aktivitätsassays der Variante Arg261X	52
4.2.8 SSADH-Variante Arg412X	53
4.2.8.1 Ergebnisse des Western-Blots der Variante Arg412X	53
4.2.8.2 Ergebnisse des SSADH-Aktivitätsassays der Variante Arg412X	54
4.2.9 SSADH-Variante Gln477X	55
4.2.9.1 Ergebnisse des Western-Blots der Variante Gln477X	55
4.2.9.2 Ergebnisse des SSADH-Aktivitätsassays der Variante Gln477X	

Variante Gln477X	56
4.2.10 SSADH-Variante Arg514X	57
4.2.10.1 Ergebnisse des Western-Blots der Variante Arg514X	57
4.2.10.2 Ergebnisse des SSADH-Aktivitätsassays der Variante Arg514X	59
4.2.11 SSADH-Variante Tyr519X	59
4.2.11.1 Ergebnisse des Western-Blots der Variante Tyr519X	59
4.2.11.2 Ergebnisse des SSADH-Aktivitätsassays der Variante Tyr519X	60
4.2.12 Zusammenfassung der Behandlungsergebnisse aller SSADH-Varianten	61
4.3 Auswirkungen der Behandlungen auf den Wildtyp	62
4.4 Vergleich verschiedener SSADH-Antikörper	63
5 Diskussion	66
5.1 Expression und Aktivität der untersuchten SSADH-Varianten	66
5.2 Auswirkungen der Behandlungen mit read-through-Substanzen	67
5.3 Stabilisierung der mRNA durch Coffein und damit Verbesserung der Proteinexpression	71
5.4 Doppelbanden und trunkierte Formen des SSADH-Proteins	73
5.5 SSADH-Proteinexpression in einem Klon von Ser251X ohne Behandlung	74
5.6 Antikörper-Vergleich	74
5.7 Ausblick	75
6 Zusammenfassung	78
7 Summary	79
8 Abkürzungsverzeichnis	80
9 Abbildungsverzeichnis	83
10 Tabellenverzeichnis	84
11 Literaturverzeichnis	85
12 Erklärung zur Dissertation	94
13 Danksagung	95
14 Lebenslauf	96