

Molekulare Charakterisierung pathogener Succinat-Semialdehyd- Dehydrogenase-Varianten

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Füssgen, Vera Simone

aus Köln

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Biochemisches Institut

Gutachter/in: Prof. Dr. Ritva Tikkanen

Gutachter/in: Prof. Dr. Hahn

Tag der Disputation: 17. Februar 2023

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Mangel	1
1.2	Pathophysiologie des SSADH-Mangels	4
1.3	Das <i>ALDH5A1</i> -Gen und das SSADH-Enzym	7
1.4	Pathogene <i>ALDH5A1</i> -Genvarianten mit dem Fokus auf Missense-Mutationen	9
1.5	Modelle zur Charakterisierung von <i>ALDH5A1</i> -Genvarianten	10
1.6	Ziele der Arbeit	14
2	Material	15
2.1	Geräte	15
2.2	Verbrauchsmaterialien und Gefäße	17
2.3	Chemikalien und Reagenzien	18
2.4	Lösungen und Puffer	22
2.5	Kits	24
2.6	Plasmide	24
2.7	Primer	25
2.8	DNA-modifizierende Enzyme	26
2.9	Bakterienstämme	26
2.10	Humane Zelllinien	27
2.11	Antikörper	27
2.12	Fluoreszenzfarbstoffe und Mikroskopie-Reagenzien	28
2.13	Sequenzierlabor	28
2.14	Software	28
3	Methoden	30
3.1	Molekularbiologische Methoden	30
3.1.1	Klonierung	30
3.1.2	In-vitro-Mutagenese	31
3.1.3	Transformation	32

3.1.4	Mini-Plasmidpräparation	33
3.1.5	DNA-Konzentrationsmessung	33
3.1.6	Übersicht der hergestellten Konstrukte	33
3.1.7	Midi-Plasmidpräparation	34
3.1.8	Glycerin-Stocks	34
3.2	Zellbiologische Methoden	35
3.2.1	Kultivierung von HEK-Zellen	35
3.2.2	Passagieren von HEK-Zellen	35
3.2.3	Zählen von HEK-Zellen	35
3.2.4	Einfrieren von HEK-Zellen	35
3.2.5	Transiente Transfektion	36
3.2.6	Immunfluoreszenzfärbung	36
3.2.7	SSADH-Knock-Out in Flp-In™ HEK293-Zellen	37
3.2.8	Überprüfung des SSADH-Knock-Outs mit genomischer PCR	38
3.2.9	Wildtyp-SSADH- und CAT-Knock-In	39
3.2.10	Zellernte	41
3.2.11	Zelllysatherstellung	41
3.2.12	Proteinbestimmung nach Bradford	42
3.3	Western Blot	42
3.3.1	SDS-PAGE	42
3.3.2	Transfer	43
3.3.3	Immundetektion	43
3.3.4	Strippen	44
3.4	SSADH-Aktivitätsassay	44
3.5	Statistische Auswertung	44
3.6	Bildbearbeitung	45
4	Ergebnisse	46
4.1	Molekulare Charakterisierung ausgewählter SSADH-Defizit verursachender Missense-Varianten mittels transienter Überexpression ..	46

4.1.1	Mutagenese ausgewählter SSADH-Defizit verursachender Missense-Mutationen	46
4.1.2	Transiente Überexpression der SSADH-Missense-Varianten in HEK293T-SSADH-KO-Zellen	46
4.1.3	SSADH-Aktivitätsnachweis der Missense-Varianten	48
4.2	Herstellung einer SSADH-defizienten Flp-In™ HEK293-Zell-linie	49
4.3	Immunfluoreszenzfärbung von Flp-In™ HEK293-Zellen	53
4.4	Stabile SSADH-Wildtyp-Expression in Flp-In™ HEK293-SSADH-KO-Zellen	56
4.4.1	Integration des SSADH-Wildtyp in das pcDNA5/FRT-Plasmid....	58
4.4.2	Überprüfung des hSSADH-pcDNA5/FRT-Plasmids	59
4.4.3	Stabile Expression von Wildtyp-SSADH in Flp-In™ HEK293-SSADH-KO-Zellen	61
4.5	Herstellung von SSADH-Missense-Mutationen enthaltenden pcDNA5/FRT-Plasmiden	63
5	Diskussion.....	67
5.1	Die molekulare Charakterisierung von vier SSADH-Missense-Varianten ..	67
5.1.1	Expression der untersuchten SSADH-Missense-Varianten	67
5.1.2	Aktivität der untersuchten SSADH-Missense-Varianten	69
5.1.3	Subzelluläre Lokalisation der untersuchten SSADH-Missense-Varianten sowie Beurteilung der Mitochondrien	71
5.1.4	Mitochondriale Schäden durch Akkumulation von Metaboliten und oxidativen Stress	73
5.2	Etablierung des Flp-In™ Systems für SSADH	74
5.2.1	Das Flp-In™ System: transiente versus stabile Transfektion	74
5.2.2	Verwendung von SSADH-Knock-Out-Zellen.....	76
5.2.3	Stabile Expression der Wildtyp-SSADH	76
5.2.4	Nutzen des Flp-In™ Systems.....	77
5.3	Künftiger Knock-In von SSADH-Missense-Mutationen	80
5.3.1	SSADH-Cys93Phe.....	80
5.3.2	SSADH-His180Tyr.....	81

5.3.3	SSADH-Asn255Asp und SSADH-His180Tyr-Asn255Asp.....	81
5.4	Ausblick.....	83
6	Zusammenfassung	85
7	Summary.....	86
8	Abkürzungsverzeichnis	87
9	Abbildungsverzeichnis	90
10	Tabellenverzeichnis	91
11	Literaturverzeichnis.....	92
12	Erklärung zur Dissertation	106
13	Danksagung	107

1 Einleitung

1.1 Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Mangel

Der Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Mangel (kurz: SSADH-Mangel; Synonyme: 4-Hydroxybutyrazidurie, Bernsteinsäure-Semialdehyd-Dehydrogenase-Mangel, γ -Hydroxybutyrazidurie) ist eine autosomal rezessiv vererbte Störung des Abbaus von γ -Aminobuttersäure (GABA; Übersicht in Didiášová et al., 2020). Der erste Fall von einem SSADH-Mangel wurde im Jahr 1981 festgestellt, als bei einem geistig und körperlich zurückgebliebenen Patienten mit neurologischen Auffälligkeiten γ -Hydroxybuttersäure (GHB) und Succinat-Semialdehyd (SSA) im Urin nachgewiesen wurden (Jakobs et al., 1981). Seitdem wurde diese Stoffwechselstörung weltweit bei circa 450 Personen diagnostiziert (Didiášová et al., 2020). Die genaue Inzidenz ist unbekannt, wird aber auf $1:10^6$ geschätzt (Malaspina et al., 2016). Zwei Jahre nach der Erstbeschreibung wurde die mangelnde Aktivität der Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase (SSADH) als Ursache identifiziert (Gibson et al., 1983). Chambliss et al. entdeckten im Jahr 1998 für SSADH-Mangel verantwortliche Mutationen im *ALDH5A1*-Gen (Chambliss et al., 1998).

Das klinische Erscheinungsbild des SSADH-Mangels ist unspezifisch. Es umfasst eine verzögerte intellektuelle, motorische, sprachliche und geistige Entwicklung. Viele erkrankte Personen weisen Hypotonie, Ataxie sowie Verhaltensprobleme auf (Gibson et al., 1997; Jakobs et al., 1981; 1993; Pearl et al., 2003a). Krampfanfälle treten bei etwa der Hälfte der von SSADH-Mangel Betroffenen auf, darunter tonisch-klonische, Absence- und myoklonische Anfälle, einschließlich des Status epilepticus (Gibson et al., 1997; Pearl et al., 2003a). Außerdem besteht das Risiko eines plötzlichen unerklärlichen Todes bei Epilepsie (SUDEP; Knerr et al., 2010; Lapalme-Remis et al., 2015; Lee et al., 2022). Betroffene können auch unter Hyporeflexie, Halluzinationen oder autistischen sowie aggressiven Verhaltensweisen leiden (Gibson et al., 1997; Pearl et al., 2003b). Die Augen können unter anderem durch Strabismus, Nystagmus und Retinitis betroffen sein. Es besteht eine Neigung zur Frühgeburt. Außerdem wurden bei Neugeborenen Lethargie, vermindertes Saugen, Atembeschwerden und Hypoglykämie beschrieben (Gibson et al., 1997; Pearl et al., 2003a).

Man kann zwei Gruppen von an SSADH-Mangel erkrankten Personen anhand des Verlaufs der Frühentwicklung unterscheiden. Die eine Gruppe durchläuft eine normale Frühentwicklung, während in der anderen Gruppe Entwicklungsprobleme im Säuglings- bzw. Kindesalter auftreten (Gibson et al., 1997). Die Inzidenz und der Schweregrad der

Krampfanfälle und der psychiatrischen Symptome können im Jugend- und Erwachsenenalter zunehmen (Lapalme-Remis et al., 2015; Pearl et al., 2021). Außerdem können sich die Symptome im Rahmen von Infekten verschlechtern (Zeiger et al., 2016). Um den Krankheitsverlauf sowie das gesamte Krankheitsbild des SSADH-Mangels besser zu verstehen, wurde im Jahr 2019 die „SSADH Natural History Study“ initiiert. Diese Studie ist noch nicht abgeschlossen. Erste Ergebnisse wurden aber bereits zur Halbzeit der Studie veröffentlicht (Pearl et al., 2021).

Das Fehlen eines eindeutigen Phänotyps sowie die große Variabilität der klinischen Symptomatik verdeutlichen die Schwierigkeit der Diagnosestellung. Selbst unter Geschwistern zeigt sich das Krankheitsbild nicht einheitlich. Deshalb wird SSADH-Mangel häufig nicht oder falsch diagnostiziert. Das Alter bei der Diagnosestellung reicht von pränatal bis zum 25. Lebensjahr. In etwa 40% der Fälle sind Kinder von blutsverwandten Eltern betroffen (Gibson et al., 1997; Pearl et al., 2003a).

Bei dem klinischen Verdacht eines SSADH-Mangels ist der wichtigste laborchemische diagnostische Hinweis der Nachweis erhöhter GHB im Urin. Die GHB-Konzentration kann auch im Plasma und Liquor erhöht sein (Gibson et al., 1997; Jakobs et al., 1981; 1993). Zur Bestätigung der Diagnose kann die SSADH-Aktivität in den Lymphozyten, Lymphoblasten oder Fibroblasten der Betroffenen gemessen werden (Gibson et al., 1991; 1994; 1997; Pearl et al., 2003a). Alternativ sichert der molekulargenetische Nachweis einer Mutation im *ALDH5A1*-Gen die Diagnose (Aoshima et al., 2002). Eine pränatale Diagnose des SSADH-Mangel ist möglich. Bei betroffenen Schwangerschaften ist die GHB-Konzentration im Fruchtwasser erhöht und die SSADH-Aktivität fehlt in kultivierten Amniozyten und biopsierten Chorionzotten (Chambliss et al., 1993; Gibson et al., 1994). Neuere Studienergebnisse zeigen, dass ein SSADH-Mangel durch die Messung der GHB-Konzentration in getrockneten Blutropfen von Neugeborenen festgestellt werden kann (Brown et al., 2019). Gegebenenfalls könnte mit dieser Methode ein Neugeborenen-Screening für SSADH-Mangel etabliert und die Diagnoserate verbessert werden (Didiášová et al., 2020; Forni et al., 2013; Pearl et al., 2021).

In der Elektroenzephalographie können eine Hintergrundverlangsamung sowie generalisierte und fokale epileptiforme Entladungen auftreten. Auffälligkeiten in der kranialen Magnetresonanztomographie sind bilateral symmetrisch erhöhte T2-gewichtete Signale im Globus pallidus, in den subthalamischen Kernen, in den zerebellären Nuclei dentati, in der subkortikalen weißen Substanz und im Hirnstamm. Eine zerebrale und zerebellare Atrophie kann ebenfalls auftreten (Afacan et al., 2021; Lapalme-Remis et al., 2015; Parviz et al., 2014; Pearl et al., 2003a).

Bis heute ist keine kurative Therapie für den SSADH-Mangel bekannt. Deshalb steht derzeit die Behandlung der am stärksten behindernden Symptome im Vordergrund. Dazu zählen die Krampfanfälle und neurologischen Verhaltensstörungen, insbesondere die Zwangs- und Angststörungen (Didiášová et al., 2020; Gropman, 2003; Lee et al., 2022; Parviz et al., 2014; Schreiber et al., 2021; Vanadia et al., 2013; Vogel et al., 2013). Als Therapie gegen Unaufmerksamkeit, Aggressivität und Angstzustände haben sich verschiedene Psychopharmaka als wirksam erwiesen. Dazu gehören Methylphenidat, Risperidon, Fluoxetin, Thioridazin und Benzodiazepine (Gropman, 2003; Parviz et al., 2014; Pearl et al., 2006). Nicht-pharmakologische Maßnahmen in der Behandlung des SSADH-Mangels stellen die Physio-, Ergo- und Sprachtherapie dar, die den Erkrankten helfen, z. B. Kraft und Feinmotorik sowie Kommunikationsmöglichkeiten zu erlangen und zu erhalten (Parviz et al., 2014).

Zur Therapie der Krampfanfälle werden Antiepileptika wie die Natriumkanalblocker Lamotrigin und Carbamazepin verschrieben (Benke & Möhler, 2018). Vigabatrin galt als vielversprechender Therapieansatz, da es ein irreversibler Inhibitor der GABA-Transaminase ist und somit die Umwandlung von GABA in SSA bzw. GHB hemmt. Jedoch wurde von einer mangelnden Wirksamkeit (Vogel et al., 2013), einer Verschlechterung bestimmter Symptome wie der Krampfanfälle (Gropman, 2003; Matern et al., 1996) und schweren Nebenwirkungen, wie irreversiblen Gesichtsfeldausfällen (Gropman, 2003), berichtet. Valproinsäure (Synonyme: Natriumvalproat, Magnesiumvalproat, Valproat) wird bei der Behandlung des SSADH-Mangels im Allgemeinen vermieden, da es die Restaktivität des SSADH-Enzyms hemmen kann (Shinka et al., 2003). Vanadia et al. berichteten jedoch über eine Patientin mit SSADH-Mangel, bei der mithilfe von Magnesiumvalproat eine refraktäre Epilepsie behandelt werden konnte (Vanadia et al., 2013). Ein Jahr nach Therapiebeginn blieb die Betroffene anfallsfrei und zeigte deutliche Verbesserungen des Verhaltens und des EEGs (Vanadia et al., 2013).

Vorläufige Tierversuche mit dem SSADH-Knock-Out-Modell zeigten positive Ergebnisse bei einer Behandlung mit 3-Aminopropyl-n-butylphosphinsäure (SGS-742), einem GABA-B-Rezeptor-Antagonisten (Helm et al., 2005). Jedoch konnten diese Ergebnisse in einer klinischen Phase-II-Studie mit von SSADH-Mangel Betroffenen nicht bestätigt werden. Die Daten sprechen derzeit nicht für eine Anwendung von SGS-742 an von SSADH-Mangel Betroffenen (Schreiber et al., 2021).

Weitere optionale Therapeutika, wie z. B. GHB-Rezeptorantagonisten (NCS-382) oder mTOR-Inhibitoren (Rapamycin, Temsirolimus), werden unter anderem in der Arbeit von

Vogel et al. beschrieben (Vogel et al., 2018a). Die Enzyersatz- und Gentherapie, pharmakologische Chaperone sowie Read-Through-Medikamente sind Gegenstand der aktuellen Forschung unserer Arbeitsgruppe (Didiášová et al., 2020). Diese Therapieformen werden in dem Review-Artikel von Didiášová et al. detaillierter besprochen (Didiášová et al., 2020). Für tiefere Einblicke in die Therapieoptionen können die beiden zuletzt genannten Arbeiten gelesen werden.

1.2 Pathophysiologie des SSADH-Mangels

Ein SSADH-Mangel führt zu einer Störung des Abbaus von GABA. Letzteres wurde im Jahr 1950 von Roberts und Frankel entdeckt und später als wichtigster inhibitorischer Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (ZNS) von Säugetieren identifiziert (Krnjević & Schwartz, 1967; Roberts & Frankel, 1950). GABA entfaltet seine hemmende Wirkung über ligandengesteuerte Ionenkanäle, die GABA-A-Rezeptoren (Olsen & Tobin, 1990), und metabotrope Rezeptoren, die GABA-B-Rezeptoren (Bowery & Smart, 2006; Hill & Bowery, 1981). Über die GABA-A-Rezeptoren wird dabei eine schnelle Neurotransmission vermittelt, im Gegensatz zu den langsameren GABA-B-Rezeptoren (Bowery & Smart, 2006).

In Abbildung 1 wird der GABA-Stoffwechsel mit und ohne die SSADH dargestellt. Der größte Teil von GABA liegt in gebundenen Formen wie Homocarnosin vor (Tillakaratne et al., 1995). Glutamin stellt die wichtigste Transportform für Glutamat und GABA zwischen den Neuronen und den sie umgebenden Astrozyten dar (K.-J. Kim et al., 2011). Im sogenannten Glutamin-Glutamat-Shuttle wird GABA von den Gliazellen aufgenommen und durch die Glutamin-Synthetase in Glutamin umgewandelt. Glutamin wird zu den Neuronen zurückgeführt und dort durch die Glutaminase wieder in Glutamat umgebaut. Dadurch wird der Kreislauf geschlossen und die Versorgung mit der GABA-Vorstufe bleibt erhalten (Parviz et al., 2014). In den Neuronen kann aus Glutamat in einer von der Glutamat-Decarboxylase katalysierten Reaktion GABA gebildet werden. Nach Freisetzung und Interaktion mit postsynaptischen Rezeptoren wird GABA in die präsynaptischen Neuronen resorbiert und entweder wiederverwendet oder abgebaut. Am GABA-Abbau sind die Enzyme GABA-Transaminase und SSADH beteiligt, die das GABA-Grundgerüst in Succinat umwandeln. Succinat kann im Citratzyklus verstoffwechselt werden, wodurch ATP und α -Ketoglutarat gebildet werden, was wiederum zur Synthese von Glutamat führt. SSADH-Mangel führt zur Umwandlung von SSA durch die SSA-Reduktase in GHB (Pearl et al., 2021; Pearl & Gibson, 2004; Pop et al., 2020).

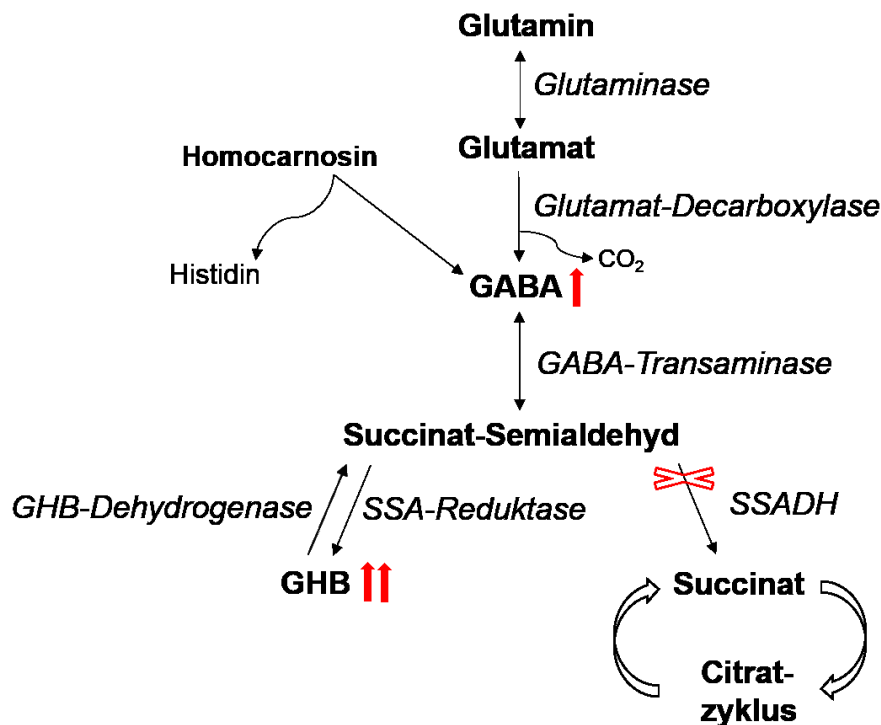


Abbildung 1: GABA-Stoffwechsel mit und ohne SSADH (modifiziert nach Pearl & Gibson, 2004; Pop et al., 2020): Glutamin stellt die wichtigste Transportform für Glutamat dar. Die Glutaminase wandelt Glutamin in Glutamat um. Anschließend kann aus Glutamat GABA in einer durch die Glutamat-Decarboxylase katalysierten Reaktion unter CO₂-Abgabe hergestellt werden. Ein Teil von GABA liegt in der gebundenen Form Homocarnosin vor und kann bei Bedarf unter Abspaltung von Histidin in GABA umgewandelt werden. Überschüssiges GABA wird durch die GABA-Transaminase in Succinat-Semialdehyd (SSA) abgebaut. Aus SSA wird in der Regel durch die SSADH Succinat hergestellt, das im Citratzyklus verstoffwechselt werden kann. Bei an SSADH-Mangel erkrankten Personen ist der GABA-Stoffwechsel aufgrund der geringen oder fehlenden Aktivität der SSADH gestört (rotes Kreuz). Aus diesem Grund kann akkumuliertes SSA nicht über den üblichen Stoffwechselweg eliminiert werden und wird durch die SSA-Reduktase zu GHB reduziert. Dadurch häufen sich GHB und GABA an, wobei der GABA-Spiegel weniger stark als der GHB-Spiegel ansteigt (rote Pfeile).

Der SSADH-Mangel ist insofern eine einzigartige Störung, da mit GHB und GABA große Mengen von zwei neuropharmakologisch aktiven Verbindungen in Körperflüssigkeiten akkumulieren (Chambliss et al., 1998; Gibson et al., 1998). In den Gehirnen von an SSADH-Mangel Erkrankten kommt es zu einem 30-fachen Anstieg von GHB und einem zwei- bis vierfachen Anstieg von GABA im Vergleich zu normalen Konzentrationen dieser Substanzen (Gibson et al., 1998). In einer neueren Studie wurde der GABA-Anstieg im Gehirn mithilfe der Magnetresonanztomographie verifiziert (Afacan et al., 2021).

GHB wurde in den frühen 1960er Jahren als Analogon von GABA, das die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann, entdeckt (Laborit, 1964). Im ZNS wirkt GHB an GHB- und GABA-B-Rezeptoren. Dabei bindet GHB in physiologischen Konzentrationen an die präsynaptischen, G-Protein-gekoppelten GHB-Rezeptoren. In hohen Konzentrationen, wie sie bei exogener Zufuhr oder bei SSADH-Mangel vorliegen, vermittelt GHB seine (pharmakologische) Wirkung als direkter Agonist am GABA-B-Rezeptor (Bay et al., 2014; Buzzi et al., 2006; Drasbek et al., 2006; Snead, 2000; Snead & Gibson, 2005). Im Jahr 2012 wurde gezeigt, dass eine Untereinheit des GABA-A-Rezeptors ebenfalls an der GHB-Bindung beteiligt ist (Absalom et al., 2012). Zusätzlich dazu wird exogen verabreichtes GHB in GABA umgewandelt, das ebenfalls zu einer Aktivierung von GABA-A- und GABA-B-Rezeptoren führt (Caputo et al., 2009; Carter et al., 2009; Snead & Gibson, 2005).

Aufgrund der sedierenden und betäubenden Eigenschaften galt GHB als wirksames intravenöses Anästhetikum (Gibson et al., 1998; Jakobs et al., 1981; Roth & Giarman, 1966). Jedoch ist die Verwendung von GHB als Narkosemittel heute rückläufig. GHB kann zur Behandlung von Kataplexie und übermäßiger Tagesschläfrigkeit bei Narkolepsie sowie unterstützend beim Alkoholentzug eingesetzt werden (Caputo et al., 2009; Carter et al., 2009; Snead & Gibson, 2005). Heutzutage spielt die Verbindung als Freizeitdroge („Liquid-Ecstasy“) eine große Rolle. Aufgrund seiner amnestischen Wirkung ist GHB auch als KO-Tropfen bekannt. Neben Gedächtnisverlust führt GHB zu Euphorie, Anxiolyse sowie zu Schläfrigkeit. Eine GHB-Überdosis präsentiert sich klinisch mit dem raschen Auftreten von tiefem Koma, Myoklonien, Atemdepression, Hypoventilation und Bradykardie. Häufig konsumieren Personen GHB zeitgleich mit Alkohol, was durch Atemdepression und Hypotonie das Risiko einer GHB-Überdosis erhöht. Spezifische Gegenmittel gegen GHB sind nicht bekannt (Drasbek et al., 2006; Snead & Gibson, 2005). GHB kann durch α - oder β -Oxidation in 3- oder 2-Desoxytetronsäure umgewandelt werden (Wang et al., 2019).

Obwohl erhöhtes GHB die führende Stoffwechselstörung im Liquor von an SSADH-Mangel erkrankten Personen ist, erklärt die GHB-vermittelte Neurotransmission allein nicht das gesamte klinische Bild. Auch die chronische Erhöhung von GABA kann erhebliche Folgen haben. Es konnte gezeigt werden, dass die Anhäufung von GABA eine höhere motorische Ruheschwelle sowie längere kortikale Ruhephasen bei von SSADH-Mangel Betroffenen bewirkt (Tsuboyama et al., 2021). Außerdem führt eine längere Besetzung von GABA-A- und GABA-B-Rezeptoren zu einer nutzungsabhängigen Herunterregulierung dieser Rezeptoren (Buzzi et al., 2006; K.-J. Kim et al., 2011; Kölker, 2018;

Pearl et al., 2009; Reis et al., 2012; Wu et al., 2006). Eine Herunterregulierung von GABA-A-Rezeptoren wurde kürzlich auch in postmortalem Hirngewebe von Erkrankten durch Genexpressionsanalysen nachgewiesen (Walters et al., 2021) und könnte zu dem insgesamt verringerten inhibitorischen Tonus beitragen, der letztlich zu den Krampfanfällen bei den Betroffenen führt (Lee et al., 2021; 2022).

Neben GHB und GABA akkumulieren weitere Metaboliten sowohl im ZNS als auch in den peripheren Geweben und Körperflüssigkeiten der Erkrankten, die zur Pathogenese des SSADH-Mangels beitragen können. Außerdem hat sich gezeigt, dass zahlreiche andere Störungen ebenfalls an der Entwicklung des Krankheitsbildes beteiligt sind. Dazu zählen mitochondriale Dysfunktion, Redox-Ungleichgewicht, oxidativer Stress, Myelinanomalien, Neurosteroidverarmung, eine veränderte Signalübertragung über den mTOR-Signalweg oder eine veränderte Genexpression (Didiášová et al., 2020; K.-J. Kim et al., 2011; Malaspina et al., 2016).

1.3 Das *ALDH5A1*-Gen und das SSADH-Enzym

Die SSADH ist ein mitochondriales Enzym, das die Oxidation von SSA in Succinat katalysiert. NAD⁺ dient als Kofaktor der SSADH und wird bei deren Aktivität zu NADH reduziert (Cash et al., 1979; Y.-G. Kim et al., 2009; Tillakaratne et al., 1995). Die SSADH wurde im Jahr 1992 erstmals aus Ratten- und menschlichen Gehirnen gereinigt (Chambliss & Gibson, 1992).

Das für die SSADH kodierende *ALDH5A1*-Gen (*aldehyde dehydrogenase 5 family member A1*-Gen) befindet sich auf dem Chromosom 6p22 und beinhaltet zehn Exons, die ein Polypeptid mit 535 Aminosäuren kodieren (Chambliss et al., 1995; 1998; Trettel et al., 1997). Die vollständige genomische Struktur des *ALDH5A1*-Gens wurde im Jahr 2002 beschrieben. Dabei wurden zwei mRNA-Isoformen identifiziert, die durch alternatives Spleißen des Exons 4B entstehen. Die längere Isoform mit Exon 4B produziert jedoch ein nahezu inaktives Enzym. Zusätzlich wurde ein alternativ gespleißtes kleines Exon entdeckt, das zu einer dritten Isoform des Enzyms führt (Blasi et al., 2002).

Das Vorläuferpolypeptid der SSADH wird von den freien Ribosomen synthetisiert. Am Amino-Terminus (N-terminal) befindet sich die mitochondriale Transportsequenz, die für die mitochondriale Ausrichtung des SSADH-Vorläufers verantwortlich ist (Chambliss et al., 1995; 1998; Didiášová et al., 2020). An diese Sequenz schließen sich drei NAD⁺-Bindungs-, zwei Oligomerisierungs- und eine katalytische Domäne an. Die Oligomerisierungsdomänen bestehen aus drei β -Faltblatt-Strängen in antiparalleler Ausrichtung. In

der mitochondrialen Matrix reagieren die Oligomerisierungsdomänen miteinander und bilden eine tetramere Struktur (Chambliss & Gibson, 1992; Y.-G. Kim et al., 2009; Ryzlak & Pietruszko, 1988). Die monomere Struktur des SSADH-Vorläuferpeptids wird in Abbildung 2 dargestellt.

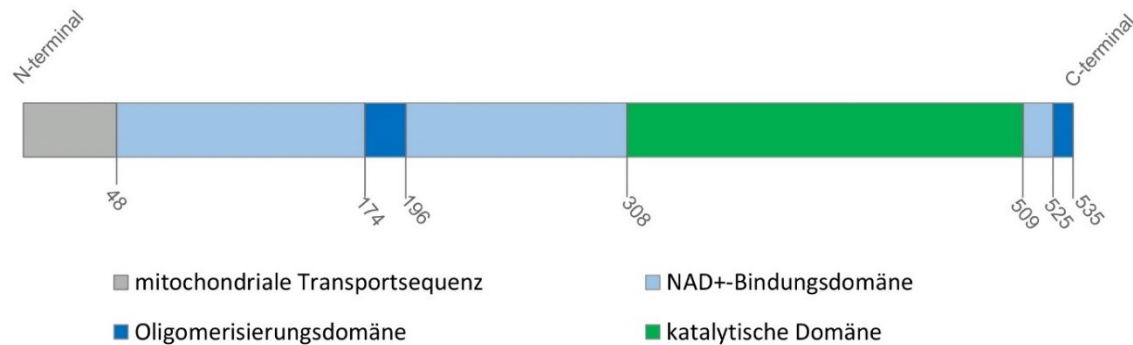


Abbildung 2: Domänenstruktur der SSADH (modifiziert nach Zymanczyk, 2021): Dargestellt wird die monomere Struktur der humanen SSADH, die 535 Aminosäuren umfasst. Farblich voneinander abgegrenzt sind die verschiedenen Proteindomänen. Die Zahlen unter dem Balken beziehen sich auf die erste Aminosäure der jeweiligen Domäne.

Die SSADH ist ein Mitglied der Aldehyd-Dehydrogenase-Proteinfamilie (Blasi et al., 2002; Chambliss et al., 1995). Aldehyd-Dehydrogenasen enthalten in der Regel einen hydrophoben Tunnel, um hydrophobe Substrate umzusetzen. Im Gegensatz dazu nutzt die SSADH hydrophile Reste, um eine optimale Umgebung für SSA als Substrat zu schaffen, da SSA hydrophile Carboxylenden besitzt (Y.-G. Kim et al., 2009; K.-J. Kim et al., 2011).

Die Aktivität der humanen SSADH wird durch einen Redox-Switch-Mechanismus gesteuert, der wiederum durch oxidativen Stress und den Redox-Zustand innerhalb der mitochondrialen Matrix beeinflusst wird. In der oxidierten Form ist das SSADH-Enzym inaktiv, da das aktive Zentrum durch eine Disulfidbrücke blockiert wird. Die Disulfidbrücke befindet sich zwischen einem katalytischen (Cys340) und einem benachbarten Cysteinrest (Cys342). Dadurch bildet sich die „geschlossene“ Konformation der katalytischen Schleife, die nicht nur den Zugang des Substrats, sondern auch des Kofaktors zu ihren jeweiligen Bindungsstellen verhindert. Durch die Spaltung der Disulfidbrücke ändert sich die Konformation der katalytischen Schleife, sodass das aktive Zentrum und die Kofaktor-Bindungsstelle zugänglich werden. So entsteht die reduzierte, aktive Form der SSADH. Sowohl die „offene“ als auch die „geschlossene“ Konformation der „dynamischen katalytischen Schleife“ werden durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert (Y.-G. Kim et al., 2009).

1.4 Pathogene *ALDH5A1*-Genvarianten mit dem Fokus auf Missense-Mutationen

Wie bereits zuvor erwähnt, haben Chambliss et al. im Jahr 1998 für den SSADH-Mangel verantwortliche Mutationen im *ALDH5A1*-Gen entdeckt (Chambliss et al., 1998). Seitdem wurden verschiedene Arten von Mutationen im *ALDH5A1*-Gen nachgewiesen. Dazu zählen Missense-, Nonsense- und Spleißmutationen, Deletionen, Insertionen sowie Duplikationen. Zusätzlich sind auch Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. Single Nucleotide Polymorphism, SNPs) des *ALDH5A1*-Gens identifiziert worden, die alleine oder, wenn sie in Kombination mit einer anderen Mutation im selben *ALDH5A1*-Allel vorhanden sind, zu einer verringerten SSADH-Aktivität führen können (Akaboshi et al., 2003; Menduti et al., 2018; Pop et al., 2020). Insgesamt wurden für das *ALDH5A1*-Gen etwa 70 verschiedene krankheitsassoziierte Varianten beschrieben und es werden mit der zunehmenden Diagnosestellung des SSADH-Mangels weitere entdeckt (Pop et al., 2020).

Ungefähr die Hälfte der im *ALDH5A1*-Gen beschriebenen pathogenen Varianten sind Missense-Varianten (Akaboshi et al., 2003; Pop et al., 2020). Bei einer Missense-Mutation kommt es zum Austausch einer Base (Punktmutation), wodurch eine andere Aminosäure ins Protein eingebaut wird. Missense-Mutationen können unterschiedliche Folgen haben. Sie können zu einer verringerten Stabilität und somit zu einem vorzeitigen Abbau des Proteins führen. Wichtige funktionelle Eigenschaften des Enzyms können verloren gehen, woraus eine verminderte Aktivität des Enzyms resultieren kann. Die korrekte posttranslationale Modifikation eines Proteins kann verhindert oder das Spleißen der prä-mRNA verändert werden. Es gibt auch Missense-Varianten, die keine erkennbaren Auswirkungen auf die Funktionstüchtigkeit des betroffenen Proteins haben (Schaaf & Zschocke, 2013).

Auch bei den Missense-Mutationen im *ALDH5A1*-Gen wurden unterschiedliche Auswirkungen auf das SSADH-Enzym beschrieben (Y.-G. Kim et al., 2009; Menduti et al., 2018). Kim et al. teilten dabei die von ihnen untersuchten Missense-Varianten in zwei Gruppen ein (Y.-G. Kim et al., 2009). Diese Einteilung basiert auf Vorhersagen, da noch keine Experimente dazu durchgeführt wurden. Die erste Gruppe von Missense-Mutationen betrifft Aminosäuren, die vermutlich Auswirkungen auf die SSADH-Struktur haben und dadurch zur Verringerung bis zum Verlust der Proteinstabilität führen können. Zum Beispiel beeinflusst die Substitution der kleinen Glycin-Reste in der Oligomerisierungs-

domäne durch die sperrige, basische Aminosäure Arginin die korrekte Faltung des Enzyms und stört damit seine Stabilität (Y.-G. Kim et al., 2009). Die zweite Gruppe von Missense-Mutationen könnte sich durch eine beeinträchtigte Substrat- oder Kofaktorbindung direkt auf die katalytische Aktivität der SSADH auswirken. Dies könnte bei Substitutionen von Aminosäuren, die an der Bildung der NAD⁺-Bindungsstelle, des aktiven Zentrums oder der „dynamischen katalytischen Schleife“ beteiligt sind, der Fall sein (Y.-G. Kim et al., 2009).

Die meisten der pathogenen Varianten betreffen die Kofaktor-Bindungsdomäne. Dies steht aber mehr mit der Größe der NAD⁺-Bindungsdomäne (254 der 535 Aminosäuren; siehe Abbildung 2) als mit einer gesteigerten Anfälligkeit dieser Region im Zusammenhang (Didiášová et al., 2020). Wahrscheinlich hat nur ein kleiner Teil der Missense-Varianten innerhalb dieser Domäne einen direkten Einfluss auf die NAD⁺-Bindung. Vielmehr trägt die NAD⁺-Bindungsdomäne aufgrund ihrer Größe und Faltung zur strukturellen Integrität und Stabilität sowie zur Oligomerisierung des SSADH-Proteins bei (Brennenstuhl et al., 2020). SSADH-Missense-Varianten, die andere Bereiche des Proteins, z. B. die mitochondriale Transportsequenz, betreffen, könnten mit dem Zellüberleben unvereinbar sein (Brennenstuhl et al., 2020).

Generell sind die strukturellen und funktionellen Auswirkungen von Missense-Mutationen schwierig vorherzusagen, weshalb bereits mehrere Studien zur verbleibenden SSADH-Enzymaktivität von pathogenen *ALDH5A1*-Varianten durchgeführt wurden. In diesen zeigte sich meistens eine erheblich reduzierte SSADH-Aktivität der Missense-Varianten. Nur bei wenigen SSADH-Mangel verursachenden Missense-Mutationen konnte eine geringfügig verminderte oder normale SSADH-Enzymaktivität festgestellt werden (Akaboshi et al., 2003; Blasi et al., 2002; DiBacco et al., 2020; Didiášová et al., 2020; Leo et al., 2017; Menduti et al., 2018; Pop et al., 2020).

1.5 Modelle zur Charakterisierung von *ALDH5A1*-Genvarianten

Heutzutage wird in der Diagnostik des SSADH-Mangels die Sequenzierung vermehrt eingesetzt, wodurch viele neue *ALDH5A1*-Varianten identifiziert werden (Pop et al., 2020). Um die Pathogenität der verschiedenen Varianten sowie z. B. ihre Auswirkungen auf die Proteininstabilität vorherzusagen, können In-silico-Analysen genutzt werden. Hierfür werden verschiedene Softwaretools wie PolyPhen2, SIFT oder FoldX verwendet (Brennenstuhl et al., 2020; DiBacco et al., 2020; Malaspina et al., 2016; Menduti et al., 2018; Pop et al., 2020). Obwohl die In-silico-Vorhersagen häufig mit den Daten aus den

Aktivitätsmessungen übereinstimmen, korreliert die vorhergesagte Pathogenität mit der gemessenen Restaktivität der SSADH nicht immer ganz genau. Deshalb spielt die funktionelle Analyse der SSADH-Varianten eine wichtige Rolle (Pop et al., 2020).

Bisher erfolgte die funktionelle Analyse der mutierten Allele häufig durch die transiente Überexpression der SSADH-Varianten. Dabei werden mutierte *ALDH5A1*-Konstrukte in geeignete Zelllinien, wie z. B. HEK293-Zellen, transient transfiziert, sodass heterogene Zellpopulation mit einer ektopen Überexpression der SSADH-Varianten entstehen. Die SSADH-Varianten können anschließend auf ihre verbleibende Enzymaktivität untersucht werden (siehe unter anderem Akaboshi et al., 2003; Blasi et al., 2002; Brennenstuhl et al., 2020; DiBacco et al., 2020; Leo et al., 2017; Menduti et al., 2018; Pop et al., 2020).

Um eine homogene Zellpopulation, die den *ALDH5A1*-Genotyp eines von SSADH-Mangel Betroffenen repräsentiert, herzustellen, können moderne Genome-Editing-Methoden, wie die CRISPR/Cas-Technologie, genutzt werden (Didiášová et al., 2020). Alternativ stellten Pop et al. mit dem Modell der stabilen, Rekombinase-vermittelten Flp-In-Transfektion ein robustes Expressionssystem vor, bei dem rekombinante SSADH von einer isogenen Wirtszelllinie in einer kontrollierten Weise synthetisiert wurde (Pop et al., 2020).

Pop et al. verglichen das transiente mit dem stabilen Transfektionsmodell (Pop et al., 2020). Dafür untersuchten sie sieben *ALDH5A1*-Genmutationen, die bei transienter Transfektion eine SSADH-Restaktivität von über 25% aufwiesen, in dem stabilen Flp-In-Transfektionsmodell. Durch die stabile Expression war die Restaktivität der SSADH-Varianten geringer. Bei der Variante Asn493Ser wurde sogar eine drastische Verringerung der Restaktivität von 43% (im transienten System) auf 4% (im stabilen System) gemessen, sodass diese - basierend auf den Ergebnissen der stabilen Transfektion - als pathogen eingestuft wurde. Die Messung der SSADH-Restaktivität erbrachte also im stabilen Transfektionsmodell genauere Ergebnisse als bei der transienten Transfektion. Jedoch ist der Zeitfaktor ein Nachteil des stabilen Transfektionsverfahrens. Dieses dauert etwa zwei Monate im Vergleich zu einer Woche bei transienten Transfektionen. Deshalb halten die Forschenden generell die transiente Transfektion für das schnellste und bequemste Modell zur Validierung neuer *ALDH5A1*-Missense-Allele. Allerdings können im Falle einer signifikanten Restaktivität Folgeuntersuchungen in einem stabilen Transfektionssystem in Betracht gezogen werden und sich als wertvoll erweisen (Pop et al., 2020).

Sowohl bei der transienten als auch bei der stabilen Transfektion ist es sinnvoll, die Auswirkungen der verschiedenen SSADH-Varianten in Zellen zu charakterisieren, die keine endogene SSADH exprimieren. Dadurch spiegelt die gemessene enzymatische Aktivität nur die Funktionalität der SSADH-Variante wider. Mithilfe der CRISPR/Cas-Methode können SSADH-Knock-Out-Zellen erzeugt werden, die keine endogene SSADH exprimieren (Brennenstuhl et al., 2020; Didiášová et al., 2020; Pop et al., 2020).

In den meisten Studien, die sich mit den Folgen von SSADH-Mangel verursachenden Genvarianten befassen, wurde nur die verbleibende Enzymaktivität der SSADH gemessen. Das Expressionsniveau oder die Lokalisation von SSADH in der Zelle wurden nicht berücksichtigt. Dabei kann insbesondere in den Überexpressionssystemen die Überexpression zur Anhäufung der SSADH oder zur Sättigung der für die mitochondriale Translokation erforderlichen Transporter führen (Didiášová et al., 2020). Menduti et al. nutzten die Immunfluoreszenzfärbung, um die subzelluläre Lokalisation von SSADH zu untersuchen (Menduti et al., 2020). Außerdem bestimmten die Forschenden mithilfe des Western Blots das SSADH-Expressionsniveau. Dabei verglichen sie Wildtyp-SSADH mit einer dreifach mutierten SSADH-Variante (Gly36Arg, His180Tyr, Pro182Leu) in U87-Glioblastom-Zellen. Die Immunfluoreszenzfärbung zeigte, dass beide SSADH-Proteine in den Mitochondrien lokalisiert waren, wobei die dreifach mutierte SSADH-Variante in einer sehr geringen Menge vorkam. Auch im Western Blot konnte eine starke Abnahme des dreifach mutierten SSADH-Proteins im Vergleich zur Wildtyp-SSADH detektiert werden. Zusätzlich wiesen die Fragmentierung und Depolarisierung der Mitochondrien in der Immunfluoreszenzfärbung auf das Auftreten mitochondrialer Schäden hin. Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass die In-vitro-Expression der dreifach mutierten SSADH-Variante zur Schädigung der Mitochondrien sowie zu einer verringerten Lebensfähigkeit der Zellen führte. Die Forschenden stellten die Hypothese auf, dass die verringerte Expression und die verminderte Aktivität der SSADH-Variante das Ergebnis eines synergistischen Effekts sein könnte. Zum einen könnte dieser Effekt durch eine strukturelle Veränderung durch die Substitutionen His180Tyr und Pro182Leu verursacht werden. Zum anderen könnte dieser durch einen verminderten mitochondrialen Import hervorgerufen werden, da die Substitution Gly36Arg die mitochondriale Transportsequenz betrifft (Menduti et al., 2020).

Neben den Überexpressionssystemen gibt es weitere Modelle zur Erforschung des SSADH-Mangels. Didiášová et al. beschreiben diese ausführlich in ihrer Übersichtsarbeit (Didiášová et al., 2020). An dieser Stelle soll nur noch auf die Tiermodelle eingegan-

gen werden. Hogema et al. entwickelten im Jahr 2002 das erste Tiermodell zur Erforschung des SSADH-Mangels, die SSADH-Knock-Out-Mäuse (*ALDH5A1*^{-/-} Mäuse; Hogema et al., 2001). Der Phänotyp dieser Mäuse ist weitaus schwerwiegender als bei den meisten an SSADH-Mangel erkrankten Personen. Dennoch konnten mit diesem Tiermodell viele neue Erkenntnisse gewonnen werden (K.-J. Kim et al., 2011; Lee et al., 2022; Vogel et al., 2018a). Unter anderem wurden an diesem Mausmodell symptomorientierte Therapieansätzen getestet (Cortez et al., 2004; Gupta et al., 2002; Hogema et al., 2001; Nylén et al., 2008; 2009; Vogel et al., 2018b; 2015; 2016). Die Gen- und die Enzyersatztherapie zielen jedoch nicht auf die Symptome des SSADH-Mangels, sondern direkt auf die zugrundeliegende Störung ab. Um an diesen Therapieoptionen zu forschen, konstruierten Lee et al. im Jahr 2021 ein neuartiges genetisches Mausmodell, das eine SSADH-Wiederherstellung „auf Abruf“ ermöglicht (*ALDH5A1*^{STOP/STOP} Mäuse; Lee et al., 2021). Diese Mäuse haben aufgrund der Inaktivierung des *ALDH5A1*-Gens, wie beim humanen SSADH-Mangel, zu Beginn keine SSADH. Durch einen genetischen Schalter ist es jedoch möglich, das inaktivierte *ALDH5A1*-Gen unter genau definierter molekularer Kontrolle wieder einzuschalten. Durch diesen Mechanismus soll dieses Tiermodell helfen, zu verstehen, wie sich die Wiederherstellung von SSADH auf molekularer Ebene bis hin zum Phänotyp auswirkt und somit bei der Erforschung der Gen- und Enzyersatztherapie behilflich sein kann (Lee et al., 2021; 2022).

1.6 Ziele der Arbeit

Der SSADH-Mangel wird durch verschiedenen Mutationen, unter anderem Missense-Mutationen, im *ALDH5A1*-Gen verursacht (Akaboshi et al., 2003; Chambliss et al., 1998). Da die strukturellen und funktionellen Auswirkungen von SSADH-Mangel verursachenden Mutationen schwierig vorherzusagen sind, kommt der funktionellen Analyse dieser Varianten eine große Bedeutung zu (Pop et al., 2020). Deshalb sollten in dieser Arbeit die Auswirkungen von vier bei SSADH-Mangel auftretenden Missense-Mutationen auf die SSADH-Expression sowie die Enzymaktivität mithilfe der transienten Transfektion untersucht werden. Außerdem sollten die subzelluläre Lokalisation der SSADH-Varianten sowie die Morphologie der Mitochondrien beurteilt werden.

Bei der transienten Transfektion variiert die Expression des rekombinanten Proteins je nach Transfektionseffizienz und der *ALDH5A1*-Genotyp der Betroffenen wird nicht korrekt widerspiegelt. Deshalb sollte zur genaueren Charakterisierung von SSADH-Mangel verursachenden Mutationen ein stabiles Transfektionsmodell – das Flp-In™ System von Thermo Fisher Scientific – etabliert werden. Da es sinnvoll ist, die molekularen Folgen der SSADH-Varianten in einem Versuchsmodell ohne endogenen SSADH-Hintergrund zu analysieren, sollte hierfür das endogene *ALDH5A1*-Gen mithilfe der CRISPR/Cas-Technologie in der zum Flp-In™ System gehörenden Zelllinie ausgeschaltet werden.

Schließlich sollten für die Versuche zur Charakterisierung der SSADH-Missense-Varianten mithilfe des stabilen Transfektionssystems einige bei SSADH-Mangel vorliegende Missense-Mutationen in das zum Flp-In™ System gehörende Expressionsplasmid integriert und mithilfe der transienten Transfektion auf ihre Funktionalität überprüft werden.

2 Material

2.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bakterieninkubator, Incucell	MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Darmstadt, Deutschland
Bakterienschüttler, KS-15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
Elektrophorese-Netzgerät, Elektrophoresis power supply, EPS 301	Amersham Bioscience Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Entwickler-Maschine, Curix 60	AGFA, Düsseldorf, Deutschland
Epson Perfection 3200 Photo Scanner	Herzog Computer Systeme GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland
Heizblock, HLC	Labomedic GmbH, Bonn, Deutschland
Konfokales Laserscan Mikroskop, LSM 710	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Lichtmikroskop AE 31	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, Deutschland
New Brunswick™ Innova® 42/42R-Inkubationsschüttler	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
PCR System 2700, Gene Amp®	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
PCR-Gerät T personal Kombi	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Pipettierhilfe accu jet®	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Sanyo MCO-20AIC CO2 Incubator	EWALD Innovationstechnik GmbH, Roden-berg, Deutschland
Schwenktisch, WS-10	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland

Scotsman Flockeneisbereiter AF 80	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
SDS-Gel-Gießvorrichtungen, Hoefer™	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
SDS-PAGE Kammer, Hoefer Mighty small II™	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Spektralphotometer, BioPhotometer Plus	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Sterilwerkbank, Herasafe KS	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Tecan infinite M200	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Ultraschallapparat Sonoplus	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
UV-Transilluminator NU72	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Vortex V-1 plus	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Waage Toledo, PB602-S	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Waage, Denver Instrument SI-64	Denver Instrument GmbH, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	LAUDA Dr. R. Wobser GmbH & CO. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Western-Blotsystem, Criterion™ Blotter	BioRad Laboratories GmbH, Inc., München, Deutschland
Zentrifuge, 5424	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge, J2-21	Beckman Coulter GmbH, Sinsheim, Deutschland
Zentrifuge, Micro 22 R	Hettich Holding GmbH & Co. oHG, Kirchlen- gern, Deutschland
Zentrifuge, Universal 32 R	Hettich Holding GmbH & Co. oHG, Kirchlen- gern, Deutschland
Zentrifuge, Universal 320	Hettich Holding GmbH & Co. oHG, Kirchlen- gern, Deutschland

2.2 Verbrauchsmaterialien und Gefäße

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Gefäße

Bezeichnung	Hersteller
Cellstar® Pipetten, 5; 10; 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar® Plastikröhrchen, 15; 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Deckgläschen, Durchmesser 15 mm	Menzel, Braunschweig, Deutschland
FALCON™ Rundbodenröhrchen-Polystyrolröhrchen, 14 ml	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Frischhaltefolie	PAPSTAR GmbH, Kall, Deutschland
Glaskolben	Schott-AG, Mainz, Deutschland
Impfnadeln	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Impfschlingen, Inoculation loops	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Mikrotiterplatte 96 Well F	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Nitrozellulosemembran, Whatman Protran BA83	Sigma-Aldrich Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Objektträger, 76x26 mm	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Opti-Platte™-96 Well, schwarz	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Parafilm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pasteurpipetten, Glas	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Petrischale, Glas, 10 cm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pinzette, Edelstahl, 120 mm	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland

Pipetten, Eppendorf Research	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	nerbe plus GmbH & CO. KG, Winsen, Deutschland
Polystyrolküvetten, 10x4x45 mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße, 0,5; 1,5; 2 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Röntgenfilm, Super RX-N	FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Rotilabo®-Blottingpapiere, Dicke 0,35 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Skalpell	Schreiber GmbH, Fridingen, Deutschland
Tecan NanoQuant Plate™	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Zellkulturflasche T 25, Standard	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatte, 6; 12; 24; 96 Well, Standard F	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschale, 6; 10 cm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
1 kb DNA Ladder	New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutschland
Acrylamid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Agar-Pulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Bradford Reagenz	BioRad Laboratories GmbH, Inc., München, Deutschland
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
BSA (Bovine Serum Albumine)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Cumarinsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Cut-Smart Puffer	New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutschland
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle medium)	Gibco® Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Gibco® Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
DRAMA DNA-Marker	Eigene Herstellung der AG Tikkanen
DTT (Dithiothreitol)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
EGTA (pH 8) (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
FCS (Fetales Kälberserum)	Gibco® Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland

Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Hygromycin B	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol (2-Propanol)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
MACSfectin™ Transfektionsreagenz	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
NAD (Nicotinamidadenindinukleotid)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NP-40	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
One Taq GC-Enhancer	New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutschland
Penicillin/ Streptomycin	Gibco® Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
PFA (Paraformaldehyd)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pipes (pH 6,8)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ponceau S	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Protease-Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Proteinmarker	BioRad Laboratories GmbH, Inc., München, Deutschland
Puromycin	Invitrogen Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Röntgenentwickler	Calbe Chemie GmbH, Calbe, Deutschland
Röntgenfixierer	Calbe Chemie GmbH, Calbe, Deutschland
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SSA (Succinat-Semialdehyd) Lösung	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SuperSignal™ West Femto Chemilumineszenz-Substrat	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
SuperSignal™ West Pico Chemilumineszenz-Substrat	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylenamin)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Gibco® Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Trypsin	Gibco® Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Tween 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylencyanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zeocin	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland

2.4 Lösungen und Puffer

Tabelle 4: Verwendete Lösungen und Puffer

Lösungen/ Puffer	Zusammensetzung	
Blockierungspuffer (Western Blot)	5%	Milchpulver TBST
DMEM++	500 ml 10% 1%	DMEM FCS Penicillin/ Streptomycin (10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin)
Einfriermedium	10%	DMSO FCS
Ladepuffer für DNA-Gele	2 mg/ml 50 mM 75% 4 mg/ml	Bromphenolblau EDTA Glycerol Xylencyanol
Glycerol-Stock-Lösung	65% 0,1 M 25 mM	Glycerol Magnesiumsulfat Tris pH 8
Luria-Bertani-Agar (LB-Agar)	15 g 1 l	Agar-Pulver LB-Medium
LB-Medium	20 g 1 l	LB-Broth doppelt dest. Wasser
Homogenisierungspuffer	1,5 ml 0,1% 0,2 mM	dest. Wasser β-Mercaptoethanol PMSF
Natriumacetat-Lösung	2 M	Essigsäure pH 5,2

	3 M	Natriumacetat
Natriumhydrogencarbonat-Lösung	0,1 M	Natriumhydrogencarbonat
PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung), pH 7,4	150 mM 20 mM	Natriumchlorid Natriumdihydrogenphosphat
Ponceau Färbelösung	5% 1%	Essigsäure Ponceau S
SDS-Elektrophorese-Puffer (Laemmli)	192 mM 0,1% 25 mM	Glycin SDS Tris
SDS-Ladepuffer (4x) + DTT	0,1% 100 mM 10% 2% 50 mM	Bromphenolblau DTT Glycerin SDS Tris pH 6,8
Stripping Puffer, alkalisch	0,1 M	Natriumhydroxid
Stürmer Lysepuffer	50 mM 150 mM 2 mM 1%	Tris pH 7,4 Natriumchlorid EDTA NP-40
TAE-Puffer (Tris-Acetate-EDTA-Puffer)	1 mM 20 mM 40 mM	EDTA Essigsäure Tris pH 8
TBST (Tris gepufferte Salzlösung + Tween 20)	150 mM 10 mM 0,05%	Natriumchlorid Tris pH 7,4 Tween 20
TE (Tris-EDTA-Pufferlösung)	10 mM 0,1 mM	Tris pH 8,0 EDTA
Transferpuffer (Western Blot)	192 mM 25 mM 10%	Glycin Tris-Base Methanol

2.5 Kits

Tabelle 5: Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
Flp-In™ System	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
NucleoBond® Xtra Midi EF	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Phire™ Tissue Direct PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland

2.6 Plasmide

Tabelle 6: Verwendete Plasmide

Konstrukt	Verwendung	Ursprung
hSSADH-5'UTR-pcDNA3	Klonierung Insert	AG Tikkanen (Brennenstuhl et al., 2020)
hSSADH-His180Tyr-Asn255Asp-pcDNA3	Klonierung Insert	AG Tikkanen (Unveröffentlichte Daten der AG Tikkanen)
hSSADH-pcDNA5/FRT	Mutagenese	Diese Arbeit
pcDNA5/FRT	Klonierungsvektor	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
pcDNA5/FRT/CAT	Knock-In Transfektion	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
pOG44	Knock-In Transfektion	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
SSADH-gRNA1-px459	Knock-Out von SSADH rev 5'-CCTTTTTCCTAG AGTGGTTC-3'	AG Tikkanen (Brennenstuhl et al., 2020)

SSADH-gRNA2-px459	Knock-Out von SSADH rev 5'-TAGGCGTGGCT GCAGTCATC-3'	AG Tikkanen (Brennenstuhl et al., 2020)
-------------------	---	---

2.7 Primer

Alle Primer wurden bei Sigma-Aldrich Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland bestellt.

Tabelle 7: Verwendete Primer mit jeweiliger Sequenz

Anwendung	Primer	Sequenz (5'-3')
Mutagenese	hSSADH-Gly268Glu fwd	GAATGCCAAGGAAGTAGAGGAGG CAATTTGTACTG
	hSSADH-Gly268Glu rev	CAGTACAAATTGCCTCCTCTACTTC CTTGGCATTTC
	hSSADH-Gly284Asp fwd	GTGTCCAAAATTTCTTTACTGATT CAACAACACTACAGGAAAGATC
	hSSADH-Gly284Asp rev	GATCTTTCCTGTAGTTGTTGAATCA GTAAAGGAAATTTTGGACAC
	hSSADH-Phe419Leu fwd	AAAACGACACCAACTTGGAAAAAA TTTATTTGAGCCTACCCTG
	hSSADH-Phe419Leu rev	CAGGGTAGGCTCAAATAAATTTTTT CCAAGTTGGTGTCTGTTTT
	hSSADH-Gly441Arg fwd	CATGAAGAGACTTTCAGGCCTCTG GCACCAG
	hSSADH-Gly441Arg rev	CTGGTGCCAGAGGCCTGAAAGTCT CTTCATG
	hSSADH-Cys93Phe fwd	GGGCATGGTAGCCGACTTCGGGG TGCG
	hSSADH-Cys93Phe rev	CGCACCCCGAAGTCGGCTACCATG CCC
	hSSADH-His180Tyr fwd	GTGTTTACGGAGACATTATCTACAC CCCGGCAAAG
	hSSADH-His180Tyr rev	CTTTGCCGGGGTGTAGATAATGTC TCCGTAAACAC

	hSSADH-Asn255Asp fwd	GATTCCTTCAGGTGTATACGATGTT ATTCCCTGTTCTCG
	hSSADH-Asn255Asp rev	CGAGAACAGGGAATAACATCGTAT ACACCTGAAGGAATC
Knock-Out PCR	hSSADH-Intron rev	GCAAAAGCATCAGGAAACCAGG
	hSSADH-Intron fwd 1	TTGAGAATGCAATGACTTGTGG
Knock-Out Se- quenzierung	hSSADH-Intron fwd 2	CTCTATGGGTATCGTTATAGG
Sequenzie- rung	pcDNA3 fwd	GGCTAACTAGAGAACCCACTG
	pcDNA3 rev	GGCAACTAGAAGGCACAGTC

2.8 DNA-modifizierende Enzyme

Tabelle 8: Verwendete DNA-modifizierende Enzyme

Enzyme	Hersteller
Bam HI-Restriktionsenzym	NEB New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutsch- land
Dpn I-Restriktionsenzym	NEB New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutsch- land
Pfu-Turbo-Polymerase	Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Frankfurt a. M., Deutschland
rSAP (rekombinante Shrimp Alkalische Phosphatase)	NEB New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutsch- land
T4-DNA-Ligase	NEB New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutsch- land
Xho I-Restriktionsenzym	NEB New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutsch- land

2.9 Bakterienstämme

Tabelle 9: Verwendete Bakterienstämme

Bezeichnung	Verwendung	Quelle
E. coli K12 XL-1 blue	Plasmidamplifikation	Stratagene, San Diego, USA

2.10 Humane Zelllinien

Tabelle 10: Verwendete humane Zelllinien

Bezeichnung	Informationen	Quelle
HEK293T-SSADH-KO Human Embryonic Kidney	SSADH-Knock-Out mit CRISPR/Cas in HEK293T-Zellen	AG Tikkanen (Brennenstuhl et al., 2020)
Flp-In™ HEK293 Human Embryonic Kidney	Mit Flp-In Rekombinase-Stelle zur Integration eines Gens ins Genom	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Flp-In™ HEK293-SSADH-KO Human Embryonic Kidney	SSADH-Knock-Out mit CRISPR/Cas in Flp-In™ HEK293-Zellen	Diese Arbeit

2.11 Antikörper

Tabelle 11: Für den Western Blot verwendete primäre und sekundäre Antikörper

Primärantikörper			
Bezeichnung	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Anti-SSADH (ab129017)	Kaninchen	1:10.000	Abcam, Berlin, Deutschland
Anti-GAPDH	Maus	1:10.000	Abcam, Berlin, Deutschland
Anti-CAT (MAB3678)	Maus	1:5.000	Sigma-Aldrich Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Sekundärantikörper			
Bezeichnung	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Anti-Kaninchen	Ziege	1:20.000	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Anti-Maus	Ziege	1:10.000 und 1:20.000	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

Tabelle 12: Für die Immunfluoreszenzfärbung verwendete primäre und sekundäre Antikörper

Primärantikörper			
Bezeichnung	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Anti-SSADH (ab155493)	Kaninchen	1:100	Abcam, Berlin, Deutschland
Sekundärantikörper			
Bezeichnung	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Anti-Kaninchen Alexa-Fluor448	Ziege	1:300	Invitrogen Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland

2.12 Fluoreszenzfarbstoffe und Mikroskopie-Reagenzien

Tabelle 13: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe und Mikroskopie-Reagenzien

Bezeichnung	Konzentration	Hersteller
MitoTracker® Orange CMTMRos	100 nM	Invitrogen Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Roti®-Mount FluorCare DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)		Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.13 Sequenzierlabor

Microsynth SeqLab GmbH, Göttingen, Deutschland

2.14 Software

Tabelle 14: Verwendete Softwares

Software	Verwendungszweck	Hersteller
Citavi 6.10	Literaturverwaltung	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
GraphPad Prism 5	Statistische Auswertung	GraphPad Software, Inc., San Diego, USA
Microsoft Excel 2013	Tabellenkalkulation	Microsoft Corporation, Redmond, USA

Microsoft Power-Point 2013	Erstellung von Abbildungen	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word 2013	Textverarbeitung	Microsoft Corporation, Redmond, USA
ZEN lite 3.4	Bearbeitung der Immunfluoreszenzbilder	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Klonierung

Die Klonierung wurde verwendet, um den SSADH-Wildtyp (*ALDH5A1*-Gen) aus dem in der AG Tikkanen existierenden hSSADH-5'UTR-pcDNA3-Plasmid (Brennenstuhl et al., 2020) in das zum Flp-In™ System gehörige pcDNA5/FRT-Plasmid einzubauen. Des Weiteren wurde mit dieser Methode die SSADH-Variante His180Tyr-Asn255Asp aus dem SSADH-H180Y-N255D-pcDNA3-Plasmid (unveröffentlichte Daten der AG Tikkanen) ausgeschnitten und in den gleichen Vektor integriert. Für die Umklonierung wurde das SSADH-Insert zuerst durch einen Restriktionsverdau aus dem jeweiligen Ursprungs-Plasmid ausgeschnitten und der pcDNA5/FRT-Vektor mit den gleichen Restriktionsenzymen gespalten. Anschließend konnte das Insert mithilfe der Ligation in den pcDNA5/FRT-Vektor eingebaut werden.

Restriktionsverdau

Für den Restriktionsverdau wurden in einem Reaktionsgefäß 10 µg des Ursprungs-Plasmids und in einem zweiten Reaktionsgefäß 10 µg des Ziel-Vektors zu 7 µl Cut-Smart Puffer, 20 U Bam HI und 20 U Xho I pipettiert und mit destilliertem Wasser auf 70 µl aufgefüllt. Der Verdau wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Die bei dem Restriktionsverdau entstandenen DNA-Fragmente wurden mithilfe eines 1%igem Agarosegels mit Ethidiumbromid (1:10.000) in TAE-Puffer elektrophoretisch voneinander getrennt. Dazu wurden 7 µl des Vektorverdaus mit circa 2 µl DNA-Ladepuffer und der gesamte Insertverdau mit circa 14 µl DNA-Ladepuffer versetzt. Neben dem Vektor und dem Insert wurden 2 µl Marker (DRAMA) auf das Gel aufgetragen. Die Fragmente wurden bei 120 V aufgetrennt und das Gel wurde auf eine UV-Lampe (UV-Transilluminator NU72 von Intas Science Imaging Instruments) gelegt. Hier wurde das nun sichtbare Insert (SSADH bei circa 1.700 bp) aus dem Gel ausgeschnitten. Die Vektorbande (pcDNA5/FRT bei circa 5.000 bp) diente zur Kontrolle des Restriktionsverdau. Das aus dem Gel ausgeschnittene Insert und der restliche Restriktionsverdau des pcDNA5/FRT-Vektors wurden nach dem Protokoll des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit von Macherey-Nagel aufgereinigt und die DNA-Konzentrationen gemessen (siehe Kapitel 3.1.5).

Ligation

Um vor der Ligation zu verhindern, dass die klebrigen Enden der unvollständig verdauten Vektorfragmente religieren und sich dadurch die Ausbeute an neu zusammengesetzten Plasmiden vermindert, wurden die 5'-Enden des Vektors mit rSAP-Phosphatase dephosphoryliert. Dafür wurde der Vektor mit 3,7 µl Cut-Smart Puffer und 3 U rSAP 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde dieser erneut mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel) aufgereinigt und die DNA-Konzentration gemessen (siehe Kapitel 3.1.5). Zum Einfügen des Inserts in den Vektor wurden 6 µl Insert zu 2 µl Vektor und 400 U T4-DNA-Ligase mit 1 µl des zugehörigen Ligasepuffers pipettiert. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C.

Restriktionsanalyse

Nachdem 7 µl des Ligationsansatzes zur Amplifikation in *E. coli* XL-1 blue transformiert (siehe Kapitel 3.1.3) und die DNA mittels Mini-Plasmidpräparation aus den Bakterien isoliert wurden (siehe Kapitel 3.1.4), wurden die hergestellten Plasmide mit einer Restriktionsanalyse überprüft. Dazu wurden zu circa 1,2 µg Plasmid 1 µl Cut-Smart Puffer sowie je 3 U der Restriktionsenzyme Bam HI und Xho I pipettiert und mit destilliertem Wasser auf insgesamt 10 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für mindestens 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine elektrophoretische Größenauftrennung mithilfe eines 1%igem Agarosegel mit Ethidiumbromid (1:10.000) und TAE-Puffer. Es wurden die Marker DRAMA und 1 kb DNA Ladder (NEB) verwendet. Die Proben wurden mit circa 2 µl DNA-Ladepuffer versetzt. Die Klone mit erfolgreicher Klonierung zeigten eine Vektorbande bei circa 5.000 bp und eine Insertbande bei circa 1.700 bp. Die Mini-Plasmidpräparationen von den positiven Klonen wurden extern sequenziert.

3.1.2 In-vitro-Mutagenese

Die In-vitro-Mutagenese dient dem zielgerichteten Einbau von Punktmutationen in eine Plasmid-DNA. Hierbei wird die DNA mithilfe von maßgeschneiderten, synthetisch hergestellten Primer im Rahmen einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verändert und vermehrt. Mithilfe dieser Methode wurden bei SSADH-Mangel vorliegende Missense-Mutationen in die hSSADH-pcDNA3- (Brennenstuhl et al., 2020) und hSSADH-pcDNA5/FRT-Plasmide (diese Arbeit) eingebaut.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die PCR-Ansätze wurden zunächst 500 ng Plasmid, 10 µl GC-Enhancer, 5 µl 10xPCR-Puffer (zur Pfu-Turbo-Polymerase gehörig) und 1 µl dNTPs in ein Reaktionsgefäß pipettiert und mit DEPC-Wasser auf 47 µl aufgefüllt. Anschließend wurden je 1 µM Primer fwd und rev sowie schließlich 2,5 U Pfu-Turbo-Polymerase hinzugegeben. Die Primersequenzen sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Es wurde das PCR-Gerät T personal Kombi von Biometra verwendet. Zur ersten Denaturierung wurde der PCR-Ansatz einmalig für 5 min auf 95°C erhitzt. Es schlossen sich 19 Zyklen an, in denen die Denaturierung bei 95°C für 1 min, das Annealing bei 60°C für 1 min und die DNA-Synthese bei 68°C für 12 min erfolgten. Für die finale Elongation wurde der PCR-Ansatz nach dem letzten Zyklus für weitere 7 min auf 68°C erwärmt. Anschließend wurden die PCR-Produkte nach dem Protokoll des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel) aufgereinigt.

Dpn I-Verdau der Plasmid-DNA

Um die nicht-mutierten Plasmide aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, wurde ein Restriktionsverdau mit Dpn I durchgeführt. Dpn I spaltet die parentale, methylierte DNA. Da die PCR-Produkte während der Mutagenese nicht methyliert wurden, wurden diese nicht abgebaut. Der Restriktionsverdau wurde aus 44 µl der aufgereinigten DNA, 5 µl Cut-Smart Puffer und 10 bis 20 U Dpn I angesetzt und mindestens 3,5 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Verdau mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel) aufgereinigt und schließlich mit 15 µl TE-Puffer eluiert.

3.1.3 Transformation

Zur Vervielfältigung der rekombinanten DNA wurde diese in *E. coli* XL-1-blue transformiert. Hierfür wurden 7 µl des Ligationsansatzes (siehe Kapitel 3.1.1) bzw. des Dpn I-Verdaus (siehe Kapitel 3.1.2) zu circa 100 µl chemisch kompetenten *E. coli* XL-1-blue pipettiert und auf Eis gekühlt. Nach 30 min wurde die Probe für 90 s bei 45°C im Heizblock erhitzt und anschließend 90 s auf Eis abgekühlt. Es wurde 1 ml LB-Medium hinzugefügt. Die Bakterien wurden 45 bis 60 min bei 37°C und 220 rpm im Bakterienschüttler bewegt und anschließend für 20 s bei 6.000 x g zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgekippt wurde, wurden die restlichen Bakterien resuspendiert, auf eine LB-Agarplatte mit Ampicillin (250 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die Transformation der zum Flp-In™ System von Thermo Fisher Scientific gehörenden Plasmide pcDNA5/FRT, pOG44 und pcDNA5/FRT/CAT wurden je 50 bis 100 ng DNA verwendet.

3.1.4 Mini-Plasmidpräparation

Für die Isolation und anschließende Sequenzierung von zunächst kleinen Mengen DNA aus den Bakterien, wurden Einzelkolonien von LB-Agarplatten gepickt und in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin (250 µg/ml) in Rundbodenröhrchen über Nacht bei 37°C und 220 rpm geschüttelt. Die Mini-Plasmidpräparation wurde am darauffolgenden Tag nach dem Protokoll des NucleoSpin® Plasmid Kit (Macherey-Nagel) durchgeführt. Anschließend wurde die DNA-Konzentration gemessen (siehe Kapitel 3.1.5) und die DNA mit den pcDNA3-Primern (siehe Tabelle 7 für die Sequenzen) zum Sequenzieren verschickt.

3.1.5 DNA-Konzentrationsmessung

Zur Konzentrationsmessung der doppelsträngigen DNA wurden der Tecan infinite M200 und die Tecan Nano Quant Plate™ verwendet. Der Nullabgleich erfolgte mit 2 µl des Puffers, indem die DNA gelöst wurde. Anschließend erfolgte die Messung mit 2 µl der Proben bei 260 und 280 nm.

3.1.6 Übersicht der hergestellten Konstrukte

In Tabelle 15 sind die in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte aufgelistet. Die Primersequenzen werden in Tabelle 7 aufgeführt. Für jede Mutation wurden eine Midi-Plasmidpräparation durchgeführt (siehe Kapitel 0) und von zwei korrekt sequenzierten Plasmiden Glycerin-Stocks angelegt (siehe Kapitel 3.1.8).

Tabelle 15: Durch Umklonierung und mit In-vitro-Mutagenese hergestellte Konstrukte

Durch Umklonierung hergestellte Konstrukte		
Bezeichnung	Vektor	Ursprung Insert
hSSADH-pcDNA5/FRT	pcDNA5/FRT	Wildtyp-hSSADH aus pcDNA3
hSSADH-His180Tyr-Asn255Asp-pcDNA5/FRT		hSSADH-His180Tyr-Asn255Asp aus pcDNA3
Mit In-vitro-Mutagenese hergestellte Konstrukte		
Bezeichnung	Primer	Plasmid
hSSADH-Gly268Glu-pcDNA3	hSSADH-Gly268Glu fwd & rev	hSSADH-pcDNA3
hSSADH-Gly284Asp-pcDNA3	hSSADH-Gly284Asp fwd & rev	
hSSADH-Phe419Leu-pcDNA3	hSSADH-Phe419Leu fwd & rev	
hSSADH-Gly441Arg-pcDNA3	hSSADH-Gly441Arg fwd & rev	

hSSADH-Gly268Glu-pcDNA5/FRT	hSSADH-Gly268Glu fwd & rev	hSSADH-pcDNA5/FRT
hSSADH-Gly284Asp-pcDNA5/FRT	hSSADH-Gly284Asp fwd & rev	
hSSADH-Phe419Leu-pcDNA5/FRT	hSSADH-Phe419Leu fwd & rev	
hSSADH-Gly441Arg-pcDNA5/FRT	hSSADH-Gly441Arg fwd & rev	
hSSADH-Cys93Phe-pcDNA5/FRT	hSSADH-Cys93Phe fwd & rev	
hSSADH-His180Tyr-pcDNA5/FRT	hSSADH-His180Tyr fwd & rev	
hSSADH-Asn255Asp-pcDNA5/FRT	hSSADH-Asn255Asp fwd & rev	

3.1.7 Midi-Plasmidpräparation

Für die Isolation größerer DNA-Mengen via Midi-Plasmidpräparation wurden 50 bis 100 µl der Bakterienvorkultur aus der Minipräparation mit der korrekten Sequenz (siehe Kapitel 3.1.4) zusammen mit 4 ml LB-Medium mit Ampicillin (250 µg/ml) in ein Rundbodenröhrchen gegeben. Dies wurde für mindestens 7 h bei 37°C und 220 rpm im Bakterienschüttler inkubiert. Anschließend wurde aus dieser Bakteriensuspension 1 ml entnommen und mit 200 ml LB-Medium mit Ampicillin (250 µg/ml) in einem Erlenmeyerkolben über Nacht bei 37°C und 220 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurde das Plasmid nach dem Protokoll des NucleoSpin® Xtra Midi EF Kit (Macherey-Nagel) isoliert.

Abweichend von den Herstellerangaben wurde die Ausfällung nach dem Hinzufügen von 3,5 ml Isopropanol und Mischen mit dem Vortex bei 10.000 x g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und auf das Pellet wurden 900 µl TE-Puffer sowie 100 µl Natriumacetat-Lösung gegeben. Das Pellet wurde mithilfe des Vortex gelöst. Frühestens nach 30 min wurde die Suspension mit 700 µl Isopropanol in ein Reaktionsgefäß überführt und vorsichtig bei Raumtemperatur gemischt. Nach 15 min wurde das Reaktionsgefäß für 10 min bei 15.000 x g und 10°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet drei Mal mit 70%igem, -20°C kaltem Ethanol gewaschen. Zum Schluss wurde das Reaktionsgefäß bei 10.000 x g für 5 min zentrifugiert und die restliche Flüssigkeit abpipettiert. Das Pellet wurde für 10 bis 15 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend über Nacht bei 4°C in TE-Puffer gelöst. Am nächsten Tag wurde die DNA-Konzentration gemessen (siehe Kapitel 3.1.5).

3.1.8 Glycerin-Stocks

Zum Anlegen von Glycerin-Stocks wurden 100 µl der Bakteriensuspension mit der korrekten Sequenz mit 2 ml LB-Medium mit Ampicillin bei 37°C und 220 rpm im Bakterienschüttler über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 600 µl der Bakterien zusammen

mit 600 µl Glycerol-Stock-Lösung in Kryoröhrchen pipettiert. Diese wurden bei -80°C eingefroren. Alternativ wurden vor der Midi-Plasmidpräparation 600 µl der Über-Nacht-Kultur entnommen und mit 600 µl Glycerol-Stock-Lösung eingefroren.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von HEK-Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten HEK-Zellen wurden in T25-Flaschen mit 5 ml DMEM++ im Inkubator bei 37°C, 8% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. DMEM++ bestand aus DMEM, 10% FCS sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin.

3.2.2 Passagieren von HEK-Zellen

Zum Passagieren der HEK-Zellen wurden zunächst das alte Medium mit einer Pipette abgesaugt und die Zellen mit PBS vorsichtig gewaschen. Danach wurde der Gefäßboden mit Trypsin bedeckt und circa 3 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die nun vom Boden abgelösten Zellen in DMEM++ resuspendiert, gegebenenfalls gezählt und für Experimente oder als Erhaltungskultur ausgesät.

3.2.3 Zählen von HEK-Zellen

Zum Zählen der HEK-Zellen wurden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau vermischt. Anschließend wurden circa 2 µl der Mischung in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zellen unter dem Lichtmikroskop gezählt.

3.2.4 Einfrieren von HEK-Zellen

Um HEK-Zellen einzufrieren, wurden diese zunächst mit PBS gewaschen, trypsiniert und mit DMEM++ in ein Reaktionsgefäß oder 15-ml-Falcon-Röhrchen übertragen. Das Reaktionsgefäß wurde mit 5.000 rpm, das Falcon-Röhrchen mit 3.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen im Einfriermedium resuspendiert. Das Einfriermedium bestand aus FCS mit 10% DMSO. Es wurden je 500 µl der im Einfriermedium suspendierten Zellen in Kryoröhrchen gegeben und diese bei -150°C eingefroren.

3.2.5 Transiente Transfektion

Mit der transienten Transfektion kann Fremd-DNA in eukaryotische Zellen eingebracht werden. Diese Methode wurde genutzt, um Wildtyp-SSADH sowie mutierte SSADH in Zellen transient zu exprimieren. Dazu wurden die HEK293T-SSADH-KO-Zellen auf einer 6-Well-Platte so ausgesät, dass sie am nächsten Tag maximal 80% konfluent waren. Für die Transfektion wurde in ein Reaktionsgefäß 1 µg DNA mit 200 µl DMEM und in ein zweites Reaktionsgefäß 3 µl MACSfectin™ Transfektionsreagenz mit 200 µl DMEM pipettiert. Anschließend wurden beide Ansätze gemischt und bei Raumtemperatur 20 min inkubiert. Währenddessen wurde das Medium der Zellen ausgetauscht. Nach 20 min wurde das DNA-MACSfectin-Gemisch auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden bei 37°C inkubiert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt. Nach 48 h wurden die Zellen mit PBS geerntet und standen für weitere Versuche zur Verfügung. Als Kontrolle wurden nicht-transfizierte Zellen mitgeführt.

3.2.6 Immunfluoreszenzfärbung

Bei der Immunfluoreszenzfärbung von Zellen werden Antigene mithilfe von Antikörpern, an die fluoreszierende Farbstoffe gebunden sind, detektiert. Diese Methode wurde genutzt, um die subzelluläre Lokalisation der SSADH-Missense-Varianten zu untersuchen.

Zunächst wurden Flp-In™ HEK293-Zellen bzw. Flp-In™ HEK293-SSADH-KO-Zellen auf einer 12-Well-Platte so ausgesät, dass sie am nächsten Tag maximal 80% konfluent waren. Für die transiente Transfektion wurden 0,5 µg DNA, 1,5 µl MACSfectin™ Transfektionsreagenz und je 100 µl DMEM verwendet. Der Ablauf der Transfektion erfolgte wie unter Kapitel 3.2.5 beschrieben. Nach 24 h wurden die Zellen auf Deckgläschen (Durchmesser 15 mm) ausgesät. Dazu wurde zunächst mithilfe einer Pinzette ein Deckgläschen pro Well auf einer 12-Well-Platte verteilt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert und in DMEM++ resuspendiert. Die in DMEM++ resuspendierten Zellen wurden auf zwei Deckgläschen verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das alte Medium abgesaugt und frisches DMEM++ mit Mito-tracker Orange CMTMRos (Konzentration 100 nM) auf die Deckgläschen gegeben. Diese wurden für 30 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen mit kaltem Methanol für 8 min bei -20°C fixiert und anschließend 10 min mit PBS gewaschen. Zum Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen wirkte in einer Feuchtkammer 1% BSA in PBS für 20 min bei Raumtemperatur auf die Zellen ein. Der Primärantikörper (Anti-

SSADH-Antikörper, Abcam, ab155493) wurde 1:100 in 1% BSA in PBS verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur auf die Deckgläschen gegeben. Es folgte nach drei fünfminütigen Waschschritten mit PBS der 1:300 verdünnte Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen Alexa-Fluor448, Invitrogen) für 45 min. Die Zellen wurden erneut drei Mal für 5 min mit PBS gewaschen und mit destilliertem Wasser abgespült. Zum Eindeckeln wurden circa 7 µl Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium mit DAPI (1:1.000) auf einen Objektträger gegeben und die Deckgläschen mit den Zellen auf der Unterseite auf den Tropfen gelegt. Die Objektträger wurden bei 4°C gelagert.

3.2.7 SSADH-Knock-Out in Flp-In™ HEK293-Zellen

Um das endogene *ALDH5A1*-Gen in Flp-In™ HEK293-Zellen auszuschalten, wurde das CRISPR/Cas-System genutzt. Bei diesem wird mithilfe einer gRNA die Ziel-DNA gefunden und durch das Schneideprotein Cas9 zerschnitten. Durch zelleigene Reparaturmechanismen werden Basenpaare zufällig eingefügt und so das betroffene Gen, in dieser Arbeit das für die SSADH kodierende *ALDH5A1*-Gen, inaktiviert.

In das px459-Plasmid wurden Oligonukleotide, die als Zielsequenz Exon 3 des menschlichen *ALDH5A1*-Gens haben, kloniert (Brennenstuhl et al., 2020). So entstanden die Plasmide SSADH-gRNA1-px459 und SSADH-gRNA2-px459. Nachdem diese Plasmide in Zellen transfiziert wurden, wurde daraus das Schneideprotein Cas9 mit der Zielsequenz (gRNA) im Exon 3 des *ALDH5A1*-Gens exprimiert. Außerdem erhielten die Zellen durch das px459-Plasmid eine Puromycin-Resistenz.

Zunächst wurden die Flp-In™ HEK293-Zellen so ausgesät, dass sie am nächsten Tag circa 80% konfluent waren. Vor der Transfektion wurde das Medium der Zellen gewechselt. Transfiziert wurde in zwei Ansätzen mit 1 µg SSADH-gRNA1-px459 bzw. SSADH-gRNA2-px459 und je 4 µl MACSfectin™ Transfektionsreagenz. Der Ablauf der Transfektion erfolgte wie unter Kapitel 3.2.5 beschrieben. Nach 24 h wurde auf die Zellen DMEM++ mit Puromycin (2 µg/ml) gegeben. Durch die Selektion mit Puromycin sollten nur die Zellen überleben, bei denen die Transfektion erfolgreich und damit das *ALDH5A1*-Gen ausgeschaltet war. Nach weiteren 24 h wurden die transfizierten Zellen in eine 6-cm-Schale überführt und für 3 Tage in DMEM++ kultiviert.

Da nach der Selektion mit Puromycin nicht sichergestellt werden konnte, dass das *ALDH5A1*-Gen aus allen Zellen homolog ausgeknockt wurde, wurden die Zellen im nächsten Schritt auf einer 96-Well-Platte vereinzelt. Dafür wurden die transfizierten Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert und mit DMEM++ in ein 15-ml-Falcon-Röhrchen

überführt. Nachdem die Zellen gezählt wurden (siehe Kapitel 3.2.3), wurden sie in drei Schritten auf eine rechnerische Dichte von 2,5 Zellen pro 200 µl DMEM++ verdünnt. Es wurden je 200 µl der DMEM++-Zell-Mischung pro Well auf einer 96-Well-Platte verteilt. In den folgenden Wochen wurde unter dem Lichtmikroskop regelmäßig kontrolliert, ob keine, eine oder mehrere Kolonien in einem Well wuchsen. Die Wells, in denen nur eine Kolonie wuchs, wurden ab 50% Konfluenz auf eine 24-Well-Platte und anschließend auf eine 6-Well-Platte umgesetzt. Dadurch stammten alle Zellen in einem Well von einer einzelnen Zelle mit oder ohne erfolgreichem Knock-Out ab und stellten damit jeweils eine klonale Zellpopulation dar.

Um zu überprüfen, ob der Knock-Out erfolgreich war, wurden die Zellen bei 100% Konfluenz von der 6-Well-Platte geerntet (siehe Kapitel 3.2.10). Aus circa 75% der Zellen wurde ein Lysat für den Western Blot hergestellt (siehe Kapitel 3.2.11) und 20% der Zellen wurden für die PCR mit dem Phire™ Tissue Direct PCR Master Mix verwendet (siehe Kapitel 3.2.8). Die restlichen Zellen wurden weiter kultiviert.

3.2.8 Überprüfung des SSADH-Knock-Outs mit genomischer PCR

Um den Knock-Out von SSADH in den Flp-In™ HEK293-Klonen auf genomischer Ebene zu bestätigen, wurde die DNA-Sequenz in dem Bereich der verwendeten gRNA bestimmt. Dafür wurde die DNA der Zellen mit dem Phire™ Tissue Direct PCR Master Mix von Thermo Fisher Scientific vervielfältigt. Hierbei war keine vorausgehende DNA-Aufreinigung notwendig, die PCR konnte direkt mit den Zellen durchgeführt werden.

Zunächst wurden die Zellen geerntet (siehe Kapitel 3.2.10). Anschließend wurden auf das dabei entstandene Pellet 20 µl Dilution Buffer und 0,5 µl DNA-Release Buffer gegeben. Beide Puffer gehören zum Phire™ Tissue Direct PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Das Lysat wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dabei regelmäßig mit dem Vortex gemischt. Es folgten 2 min im vorgeheizten Heizblock bei 98°C. Danach wurde das Lysat für circa 10 s zentrifugiert.

Für die PCR wurden zu 10 µl 2x Phire Mastermix, je 1 µM Primer hSSADH-Intron fwd 1 und hSSADH-Intron rev (siehe Tabelle 7 für die Sequenzen) sowie 9,3 µl destilliertes Wasser und 0,5 µl des Lysats gegeben. Es wurde das PCR-Gerät T personal Kombi von Biometra verwendet. Die initiale Denaturierung erfolgte für 5 min bei 98°C. Es schlossen sich 40 Zyklen mit 10 s Denaturierung bei 98°C, 10 s Annealing bei 66°C und 30 s Elongation bei 72°C an. Zur finalen DNA-Synthese wurde der PCR-Ansatz für weitere 10 min auf 72°C erwärmt.

Der PCR-Ansatz wurde zusammen mit den Markern DRAMA und 1 kb DNA Ladder auf ein 1%iges Agarosegel mit Ethidiumbromid (1:10.000) aufgetragen und bei 120 V in TAE-Puffer aufgetrennt. Anschließend wurden auf der UV-Licht-Lampe (UV-Transilluminator NU72 von Intas Science Imaging Instruments) die Banden bei 520 bp ausgeschnitten und nach dem Protokoll des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kits (Macherey-Nagel) aufgereinigt. Es wurden die DNA-Konzentrationen gemessen (siehe Kapitel 3.1.5) und die Proben mit dem hSSADH-Intron fwd 2 Primer (siehe Tabelle 7 für die Sequenz) zum Sequenzieren geschickt.

3.2.9 Wildtyp-SSADH- und CAT-Knock-In

Um in das zelluläre Genom einen DNA-Abschnitt dauerhaft zu integrieren, wurde das Flp-In™ System von Thermo Fisher Scientific genutzt. Dieses System verwendet die Rekombinase Flippase (Flp), die an FRT-Sequenzen (Flp Recombination Target) bindet, um ein Expressionsplasmid (pcDNA5/FRT und pcDNA5/FRT/CAT) an einer spezifischen Stelle ins Genom einzubauen. Mithilfe dieser Technik wurden das Wildtyp-*ALDH5A1*- oder das *CAT*-Gen (Chloramphenicol-Acetyltransferase) in das Genom von Flp-In™ HEK293-SSADH-KO-Zellen (siehe Kapitel 3.2.7) eingebaut. Das zu dem Flp-In™ System (Thermo Fisher Scientific) gehörende pcDNA5/FRT/CAT-Plasmid diente als Positivkontrolle. Das Genom der Flp-In™ HEK293-SSADH-KO-Zellen enthält bereits eine FRT-Sequenz sowie das lacZ-Zeocin™-Gen, wodurch die Zellen gegen Zeocin resistent sind.

Für den Knock-In des *ALDH5A1*- und *CAT*-Gens in das Genom der Flp-In™ HEK293-SSADH-KO-Zellen wurden diese auf einer 12-Well-Platte so ausgesät, sodass sie am nächsten Tag circa 80% konfluent waren. Die Zellen wurden mit 1,5 µl MACSfectin™ Transfektionsreagenz und 0,5 µg DNA transfiziert (siehe Kapitel 3.2.5 für den genauen Ablauf). Hierbei wurden die Plasmide pOG44 und hSSADH-pcDNA5/FRT in einem 9:1 Verhältnis kotransfiziert. Das pOG44-Plasmid exprimiert die Flp-Rekombinase, die das homologe Rekombinationsereignis zwischen den FRT-Stellen im hSSADH-pcDNA5/FRT-Plasmid und im Genom der Flp-In™ HEK293-SSADH-KO-Zellen vermittelt. Als Flp-Rekombinationskontrolle wurde zusätzlich ein Well nur mit dem hSSADH-pcDNA5/FRT-Plasmid transfiziert. Als Negativkontrolle dienten nicht-transfizierte Zellen. Als Positivkontrolle wurde außerdem in einem 9:1 Verhältnis die Plasmide pOG44 und pcDNA5/FRT/CAT kotransfiziert. In Abbildung 3 werden die Transfektionen schematisch dargestellt.

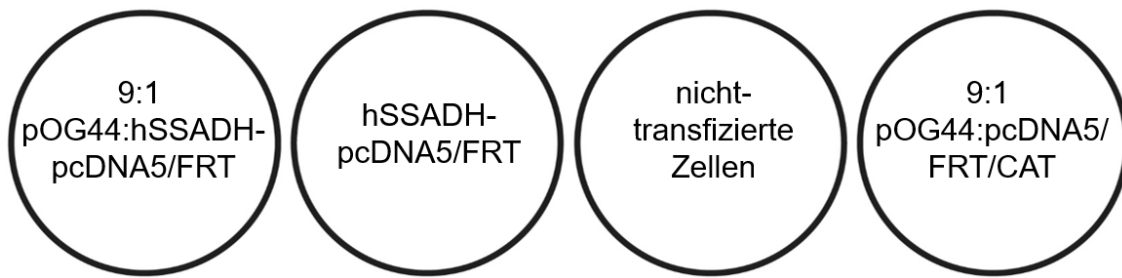


Abbildung 3: Schematische Übersicht der Knock-In-Transfektionen: *Flp-In™* HEK293-SSADH-KO-Zellen wurden auf einer 12-Well-Platte so ausgesät, dass sie am nächsten Tag circa 80% konfluent waren. Die Zellen wurden mit 1,5 µl MACSfectin™ Transfektionsreagenz und 0,5 µg DNA transfiziert. Hierbei wurden die Plasmide pOG44 und hSSADH-pcDNA5/FRT in einem 9:1 Verhältnis kotransfiziert. Als Flp-Rekombinationskontrolle wurde ein Well nur mit dem hSSADH-pcDNA5/FRT-Plasmid transfiziert. Als Negativkontrolle dienten nicht-transfizierte Zellen. Als Positivkontrolle wurden in einem 9:1 Verhältnis die Plasmide pOG44 und pcDNA5/FRT/CAT kotransfiziert.

24 h nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Da die Zellen mit der Transfektion ihre Zeocin-Resistenz verloren und eine Hygromycin-Resistenz erhielten, konnten sie mit Hygromycin selektiert werden. Die benötigte Hygromycin-Konzentration wurde im Vorhinein an nicht-transfizierten Flp-In™ HEK293-SSADH-KO-Zellen getestet. Dazu wurden diese mehrere Tage in DMEM++ mit verschiedenen Hygromycin-Konzentrationen kultiviert. Bei DMEM++ mit 100 µg/ml Hygromycin starben alle Zellen, sodass diese Konzentration ausgewählt wurde. Für die Selektion der Transfektionen wurden 48 h nach der Transfektion die Zellen auf 10-cm-Platten mit DMEM++ mit Hygromycin (100 µg/ml) überführt.

Nach vier Tagen wurde erneut DMEM++ ohne Hygromycin auf die Zellen gegeben. Ab jetzt wurden die Zellen beobachtet. Durch die Behandlung mit Hygromycin sollten die nicht-transfizierten und ohne das pOG44-Plasmid transfizierten Zellen sterben und nur die kotransfizierten, Hygromycin-resistenten Zellen überleben. Falls dies nicht der Fall war, mussten die Zellen erneut mit DMEM++ mit 100 µg/ml Hygromycin behandelt werden. Nach zwei bis drei Wochen bildeten sich Kolonien, die zunächst nur unter dem Mikroskop, später aber auch mit bloßem Auge sichtbar waren.

Sobald die Kolonien gut sichtbar waren, wurden diese gepickt. Dazu wurden die Kolonien von außen am Boden der 10-cm-Platte markiert. Das alte Medium wurde abgesaugt und der Boden mit PBS bedeckt. Mit einer Pipette wurden die Kolonien abgekratzt und zugleich eingesogen. Die Zell-PBS-Mischung wurde auf eine 12-Well-Platte zu 100 µl zweifachem Trypsin gegeben. Sobald die Zellen sich im Trypsin trennten, wurde das Gemisch vorsichtig auf- und abpipettiert und in 1 ml DMEM ++ kultiviert. Als die Zellen sich abgesetzt hatten, wurde das Medium gewechselt.

Auf den 12-Well-Platten wuchsen die Zellen bis sie circa 50% konfluent waren. Dann wurden 80% der Zellen als Kopie auf eine zweite 12-Well-Platte überführt. Die restlichen 20% wurden weiter kultiviert. Wenn die Kopie-Zellen 100% konfluent waren, wurden diese mit PBS geerntet (siehe Kapitel 3.2.10), Lysate mit Stürmer Lysepuffer hergestellt (siehe Kapitel 3.2.11) und ein Western Blot zur Überprüfung des Knock-Ins durchgeführt (siehe Kapitel 3.3).

3.2.10 Zellernte

Bei ausreichender Konfluenz konnten die Zellen geerntet werden. Dazu wurde das alte Medium abpipettiert und die Zellen wurden mit PBS gewaschen.

Wenn die Zellen weiter kultiviert werden sollten, wurden die Zellen trypsinisiert und in DMEM++ resuspendiert. 10% der Zellen wurden in DMEM++ weiter kultiviert, während die restlichen 90% der Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 5.000 rpm für 1 min zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde sorgfältig abgesaugt und das Zellpellet auf Eis gelegt oder eingefroren.

Alternativ wurde auf die Zellen 8°C kaltes PBS gegeben. Anschließend wurden alle Zellen mithilfe eines Zellschabers mobilisiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde bei 5.000 x g für 1 min zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Dieser Schritt wurde wiederholt. Die entstandenen Zellpellets wurden auf Eis gelegt oder eingefroren.

3.2.11 Zelllysatherstellung

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden zunächst Stürmer Lysepuffer mit Proteaseinhibitor Cocktail im Verhältnis 1:100 gemischt. Je nach der Größe der Zellpellets wurden zwischen 85 und 250 µl der Mischung auf die Pellets gegeben. Die Lysate wurden 30 min auf Eis inkubiert und zwischendurch kräftig mit dem Vortex gemischt.

Alternativ wurden 150 µl vom Homogenisierungspuffer auf die Zellpellets gegeben und diese drei Mal für 15 s mit Ultraschall behandelt (1 s Ultraschallwellen, 1 s Pause). Zwischendurch wurden die Zellen auf Eis abgekühlt.

Sowohl bei der Zelllysatherstellung mit dem Lyse- als auch mit dem Homogenisierungspuffer wurden die Proben zum Schluss für 10 min bei 15.000 x g und 4°C in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde als fertiges Lysat in neue Reaktionsgefäße pipettiert.

3.2.12 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinmenge in den Zelllysaten wurden in Reaktionsgefäße 1 ml Bradford Reagenz, die zuvor 1:5 in destilliertem Wasser verdünnt wurde, und 2 µl der Lysate pipettiert. Diese wurden mit dem Vortex gemischt und in Küvetten überführt. Zum Nullabgleich wurden 2 µl des Puffers, mit dem die Lysate hergestellt wurden, in 1 ml Bradford Reagenz 1:5 verwendet. Nachdem der Nullabgleich erfolgt war, wurden die Konzentrationen im Spektralphotometer bei 595 nm gemessen.

3.3 Western Blot

Der Western Blot dient dem Nachweis von Proteinen in einem Proteingemisch. Dazu wurden die Proteine zunächst mithilfe der SDS-PAGE in Polyacrylamidgelen nach ihrer Größe aufgetrennt. Anschließend erfolgte der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und die Visualisierung der Proteine mittels Immundetektion.

3.3.1 SDS-PAGE

Für die SDS-PAGE („sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“) wurden Zelllysate mit Natriumdodecylsulfat (SDS) versetzt, wodurch sich die Proteine entfalteten und eine negative Ladung proportional zu ihrer Masse erhielten. Zusätzlich wurde Dithiothreitol (DTT) hinzugegeben, das als Reduktionsmittel Disulfidbrücken spaltet, und die Lysate wurden erhitzt. Dadurch denaturierten die Proteine fast vollständig und konnten anschließend in Polyacrylamidgelen durch Anlage eines elektrischen Feldes nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Polyacrylamidgele wurden folgendermaßen hergestellt:

Tabelle 16: Herstellung von 10% Polyacrylamidgelen mit 10 Taschen

Art	Zusammensetzung	
Sammelgel: 1 mm, 4%	2,55 ml	Acrylamid 30%
	0,075 ml	APS 10%
	0,03 ml	Bromphenolblau
	11,7 ml	dest. Wasser
	0,075 ml	SDS 20%
	0,0225 ml	TEMED
	0,624 ml	Tris pH 6,8 (3 M)

Trenngel: 1 mm, 10%	13,4 ml	Acrylamid 30%
	0,4 ml	APS 10%
	21 ml	dest. Wasser
	0,2 ml	SDS 20%
	0,064 ml	TEMED
	5 ml	Tris pH 8,8 (3 M)

Die Zelllysate (siehe Kapitel 3.2.11) wurden mit 4x SDS-Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben sowie 2 µl Proteinmarker auf das Gel aufgetragen.

Die Größenauftrennung erfolgte in Laemmli-Puffer. Zunächst wurde eine Spannung von 15 mA pro Gel angelegt. Sobald die Proben das Trenngel erreicht hatten, wurde die Spannung auf 20 mA pro Gel erhöht. Die SDS-PAGE wurde gestoppt, sobald die Banden circa 1 cm vor dem Ende des Gels angekommen waren.

3.3.2 Transfer

Für den Transfer der im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde eine mit Transferpuffer gefüllte Blotkammer verwendet. Der Transfer lief bei 400 mA für 60 bis 90 min (CAT 60 min, SSADH 90 min). Anschließend konnte dieser mit einer Ponceau-S-Färbung überprüft werden. Dazu wurde die Nitrozellulosemembran mit Ponceau-S-Lösung gefärbt, wodurch die Proteinbanden sichtbar wurden. Die Farbe wurde mit TBST abgewaschen.

3.3.3 Immundetektion

Zur Visualisierung der Proteine auf der Nitrozellulosemembran wurde die Immundetektion verwendet. Dafür wurden zunächst die freien Bindungsstellen blockiert, indem 5% Milchpulver in TBST gelöst und die Membran darin für 30 min auf dem Schwenktisch inkubiert wurde. Anschließend wurde die Membran mit TBST gewaschen. Über Nacht band der erste Antikörper bei 4°C an das gewünschte Antigen. Dieser wurde am nächsten Tag in drei Schritten mit TBST für je 10 min abgewaschen. Anschließend erfolgte eine circa einstündige Inkubation mit einem Sekundärantikörper, der an den ersten Antikörper band. Auch dieser wurde in drei zehnminütigen Waschschritten mit TBST abgewaschen. Durch die an den Sekundärantikörper gebundene Peroxidase kann Luminol oxidiert und so die Lumineszenz detektiert werden. Hierfür wurde auf die trockene Membran 1 ml ECL-Reagenz (SuperSignal™ West Femto/ Pico Chemilumineszenz-

Substrat von Thermo Fisher Scientific) gegeben. Nach 3 min wurde die Membran getrocknet und in einer Röntgenkassette befestigt. In einer Dunkelkammer wurde abhängig von der Signalstärke für 2 s bis zu 1 h ein Röntgenfilm auf die Membran gelegt und anschließend in der Entwickler-Maschine (Curix 60 von AGFA) entwickelt.

3.3.4 Strippen

Um die Antikörperbindungen wieder zu lösen, wurde die Membran 10 min in alkalischem Stripping-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit TBST gewaschen und 20 min mit 5% Milch bedeckt. Danach stand die Membran für eine neue Immunodetektion bereit.

3.4 SSADH-Aktivitätsassay

Zur Bestimmung der Aktivität von verschiedenen SSADH-Missense-Varianten wurde die Umsetzung von NAD^+ zu NADH gemessen. Als Substrat diente SSA. Der Kofaktor $0,1 \text{ M NAD}^+$ wurde in $0,1 \text{ M NaHCO}_3$ gelöst. Die Zelllysate (siehe Kapitel 3.2.11) wurden 1:10 in destilliertem Wasser verdünnt und als Duplikate ($2 \times 10 \mu\text{l}$) auf eine schwarze 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Als Nullwert wurde ein Lysat aus nicht-transfizierten SSADH-KO-Zellen und als Positivkontrolle wurden mit Wildtyp-SSADH transfizierte Zellen verwendet.

Für den Assay wurden zu $10 \mu\text{l}$ Lysatverdünnung $10 \mu\text{l}$ 2 mM SSA , $3 \mu\text{l}$ $0,1 \text{ M NAD}^+$ sowie $77 \mu\text{l}$ $0,1 \text{ M Tris pH } 8,4$ gegeben. Um die Reaktion unmittelbar vor der Messung zu starten, wurde die Substratlösung erst im Fluoreszenz-Reader (Tecan infinite M200) durch den Injektor hinzugefügt. Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei 355 nm Exzitation und 470 nm Emission ein Mal pro Minute über 40 min .

3.5 Statistische Auswertung

Die SSADH-Aktivitätsmessung zur molekularen Charakterisierung der verschiedenen Missense-Varianten wurde vier Mal durchgeführt. Die einzelnen SSADH-Aktivitätsassays wurden zunächst mit Microsoft Excel ausgewertet, um die Mittelwerte zu ermitteln. Anschließend erfolgte die statistische Analyse mit der GraphPad Prism 5 Software. Die Ergebnisse wurden mit 1-way Varianzanalysen (ANOVA) und dem Dunnett-Test ausgewertet. Als hoch signifikant (***) gelten Werte von $p < 0,001$. Die Werte wurden im Bezug zu nicht-transfizierten Zellen ermittelt und in Prozent Wildtyp-Aktivität (%) als Mittelwert

mit Standardabweichung im Säulendiagramm dargestellt. Die Proteinkonzentrationen wurden in der Auswertung berücksichtigt.

3.6 Bildbearbeitung

Die dargestellten Western Blot Abbildungen wurden zugeschnitten und bei Bedarf durch Kontrast- und Helligkeitseinstellungen angepasst. Die Änderungen wurden für die gesamte Abbildung durchgeführt.

Die Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung wurden mit dem konfokalen Laserscan Mikroskop (LSM 710) von Carl Zeiss angefertigt. Anschließend wurden diese mit Zeiss ZEN lite 3.4 Software bearbeitet.

4 Ergebnisse

4.1 Molekulare Charakterisierung ausgewählter SSADH-Defizit verursachender Missense-Varianten mittels transienter Überexpression

4.1.1 Mutagenese ausgewählter SSADH-Defizit verursachender Missense-Mutationen

Um die molekularen Auswirkungen bestimmter SSADH-Defizit verursachender Missense-Varianten, die bei von SSADH-Mangel Betroffenen vorkommen, zu charakterisieren, wurden zunächst die Varianten SSADH-Gly268Glu, -Gly284Asp, -Phe419Leu und -Gly441Arg mithilfe der In-vitro-Mutagenese in das hSSADH-pcDNA3-Plasmid eingebracht. Die entstandenen Plasmide wurden zur Amplifikation in *E. coli* XL-1 blue transformiert. Anschließend folgten eine DNA-Präparation sowie die Überprüfung der hergestellten Plasmide mittels Sequenzierung. Tabelle 17 gibt einen Überblick über die in meiner Arbeit untersuchten SSADH-Varianten.

Tabelle 17: SSADH-Missense-Varianten mit den entsprechenden Aminosäuresubstitutionen und der betroffenen Domäne

Exon	Genetische Variante	Aminosäuresubstitution	Betroffene Domäne
5	c.803G>A	p.Gy268Glu	NAD ⁺ -Bindungsdomäne
5	c.851G>A	p.Gly284Asp	NAD ⁺ -Bindungsdomäne
8	c.1296C>A	p.Phe419Leu	Katalytische Domäne
8	c.1321G>A	p.Gly441Arg	Katalytische Domäne

4.1.2 Transiente Überexpression der SSADH-Missense-Varianten in HEK293T-SSADH-KO-Zellen

Für die transiente Überexpression der SSADH-Missense-Varianten wurden HEK293T-Zellen verwendet, aus denen bereits mithilfe der CRISPR/Cas-Technologie das für die SSADH kodierende *ALDH5A1*-Gen ausgeknockt wurde (Brennenstuhl et al., 2020). Diese HEK293T-SSADH-KO-Zellen exprimieren keine endogene SSADH, sodass nach der Transfektion nur die Funktionalität der SSADH-Varianten widerspiegelt wurde.

Im nächsten Schritt wurden die Plasmide mit den verifizierten Sequenzen, die folglich die Missense-Mutationen enthielten, transient in die HEK293T-SSADH-KO-Zellen transfiziert. Als Kontrolle wurde die Wildtyp-SSADH in die HEK293T-SSADH-KO-Zellen eingeschleust. Anschließend wurden Zelllysate aus nicht-transfizierten HEK293T-SSADH-KO-Zellen sowie aus den transfizierten Zellen hergestellt. Um die Proteinmenge in den Lysaten zu bestimmen, wurde die Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Die in den Zelllysaten enthaltenden Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Hierbei wurden 2 µg Gesamtprotein pro Lysat verwendet. Anschließend erfolgte der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran via Western Blot zur Immundetektion.

Abbildung 4 stellt die Ergebnisse des Western Blots dar. Es zeigte sich eine SSADH-Expression bei der Wildtyp-SSADH (WT) sowie bei allen untersuchten Varianten. Bei der Variante SSADH-Gly284Asp lag jedoch nur eine geringe Menge an SSADH vor. Dies könnte auf eine reduzierte Stabilität dieser SSADH-Variante hindeuten. Bei der Variante SSADH-Gly441Arg erschien das SSADH-Signal in allen Versuchen unterhalb von 54 kDa, was auf eine geringere Größe dieser SSADH-Variante hinweist. Ein Lysat aus nicht-transfizierten HEK293T-SSADH-KO-Zellen (Non-tr.) diente als Negativkontrolle und zeigte keine SSADH-Expression. Bei der Ladekontrolle mit GAPDH entstand bei allen Lysaten ein ungefähr gleich starkes Signal bei 35 kDa. Dies bestätigte, dass in allen Spuren die gleiche Menge an Proteinen aufgetragen wurde.

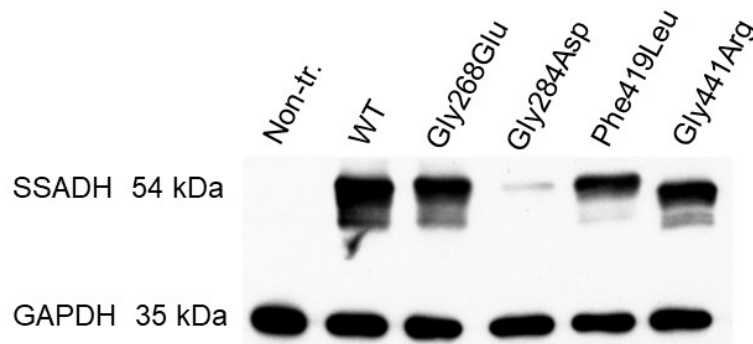


Abbildung 4: Western Blot der untersuchten SSADH-Missense-Varianten: Es wurden HEK293T-SSADH-KO-Zellen mit den SSADH-Wildtyp sowie SSADH-Missense-Varianten enthaltenden pcDNA3-Plasmiden transient transfiziert. Nach der Zelllysatherstellung wurden pro Spur 2 µg Protein auf das 10% Polyacrylamidgel aufgetragen. Das SSADH-Protein liegt bei 54 kDa und wurde mit dem Anti-SSADH-Antikörper (Abcam, ab129017) detektiert. Dieser Versuch wurde vier Mal durchgeführt. Als Ladekontrolle diente GAPDH (35 kDa).

4.1.3 SSADH-Aktivitätsnachweis der Missense-Varianten

Anschließend wurde mithilfe eines SSADH-Aktivitätsassays überprüft, ob die verschiedenen Varianten des SSADH-Enzyms eine Aktivität aufweisen. Hierfür wurde die Umsetzung von NAD^+ zu NADH, gemessen als Fluoreszenz bei 355 nm Exzitation und 470 nm Emission, im Vergleich zur Wildtyp-SSADH bestimmt. In der Auswertung wurden die unterschiedlichen Proteinkonzentrationen der Zelllysate berücksichtigt. Die Ergebnisse werden in Abbildung 5 dargestellt. Die Wildtyp-Aktivität wurde auf 100% festgelegt und die relative Aktivität der SSADH-Varianten in Prozent Wildtyp-Aktivität angegeben. Die gemessenen Fluoreszenzwerte der nicht-transfizierten HEK293T-SSADH-KO-Zellen wurden von den Fluoreszenzwerten des SSADH-Wildtyps und der SSADH-Missense-Varianten abgezogen. Bei keiner der untersuchten SSADH-Varianten konnte eine signifikante SSADH-Aktivität gemessen werden.

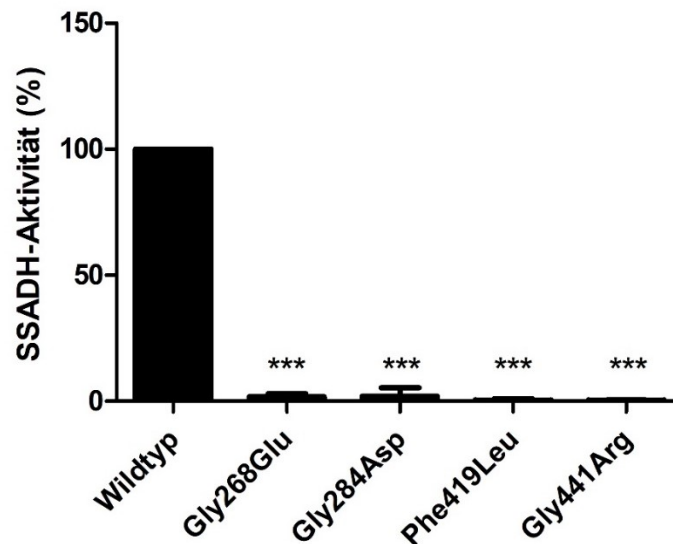


Abbildung 5: SSADH-Aktivitätsassay der untersuchten SSADH-Missense-Varianten: Dargestellt wird die relative SSADH-Aktivität (in % vom WT) in Zelllysaten aus HEK293T-SSADH-KO-Zellen nach transienter Transfektion mit pcDNA3-Plasmiden. Die Zelllysate wurden 1:10 in destilliertem Wasser verdünnt und in Duplikaten gemessen. Das Säulendiagramm zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichung von vier unabhängigen Transfektionen. Die statistische Analyse erfolgte mit 1-way Varianzanalysen (ANOVA) und dem Dunnett-Test. Als hoch signifikant (***) gelten Werte von $p < 0,001$.

Da bei den mit dem detergenzhaltigen Lysepuffer hergestellten Zelllysaten keine Restaktivität der SSADH-Varianten festgestellt werden konnte, wurde der Versuch mit Lysaten, die mit dem Homogenisierungspuffer erzeugt wurden, wiederholt. In diesem Puffer befand sich unter anderem β -Mercaptoethanol, das die SSADH reduziert, wodurch die Disulfidbrücken im aktiven Zentrum der SSADH gespalten werden

(Y.-G. Kim et al., 2009). Dadurch wird das aktive Zentrum der SSADH zugänglich und es wird mehr Substrat umgesetzt. Abgesehen von der Zelllysatherstellung wurde der Versuchsaufbau nicht geändert. Bei den mit dem Homogenisierungspuffer hergestellten Zelllysaten aus den transfizierten HEK293T-SSADH-KO-Zellen wurde ebenfalls keine Restaktivität im SSADH-Aktivitätsassay gemessen. Der Western Blot zeigte die gleichen Ergebnisse wie die vorherigen Versuche (vergleiche Abbildung 4). Der SSADH-Aktivitätsassay sowie der Western Blot wurden mit den mit dem Homogenisierungspuffer hergestellten Zelllysaten nur ein Mal durchgeführt, weshalb die Daten hier nicht graphisch dargestellt werden.

4.2 Herstellung einer SSADH-defizienten Flp-In™ HEK293-Zelllinie

Bei der transienten Transfektion der modifizierten Plasmide in die HEK293T-SSADH-KO-Zellen variiert die Expression der rekombinanten Proteine je nach Transfektionseffizienz. Um eine stabile SSADH-Expression zu gewährleisten, wurde in dieser Arbeit das Flp-In™ System etabliert. Mit diesem System können die SSADH-Missense-Varianten ins Genom integriert und anschließend stabil exprimiert werden (Pop et al., 2020). Zuvor wurde mithilfe der CRISPR/Cas-Technik das endogene, für die SSADH kodierende *ALDH5A1*-Gen in den zum Flp-In™ System gehörigen Flp-In™ HEK293-Zellen ausgeschaltet und somit ein SSADH-Knock-Out in den Zellen erzielt.

Zu diesem Zweck wurden die in der AG Tikkanen existierenden SSADH-gRNA1- und -gRNA2-px459-Plasmide (Brennenstuhl et al., 2020) in die Flp-In™ HEK293-Zellen transfiziert. Da die px459-Plasmide ein Puromycin-Resistenzgen enthielten, wurden die transfizierten Zellen mit Puromycin (2 µg/ml) selektiert. Anschließend wurden die Zellen vereinzelt und kultiviert. Sobald ausreichend Zellen eines Klons vorhanden waren, wurden die Zellen geerntet. Der SSADH-Knock-Out wurde mittels Western Blot und Sequenzierung verifiziert.

Abbildung 6 zeigt einen Western Blot mit Klonen, bei denen kein SSADH-Signal erschien. Anhand der Positivkontrolle aus parentalen Flp-In™ HEK293-Zellen konnte eine SSADH-Expression nachgewiesen werden, obwohl weniger Protein als bei den verschiedenen Klonen aufgetragen wurde. Dies verdeutlichte das, verglichen mit den Lysaten der Klone, sehr schwache GAPDH-Signal. Trotz der größeren aufgetragenen Proteinmenge wurde bei den Klonen keine SSADH-Expression im Western Blot detektiert. Es entstand kein SSADH-Signal trotz langer Belichtung des Röntgenfilms, was auf einen

gelungenen SSADH-Knock-Out hindeutet. Dies war nicht bei allen untersuchten Klonen der Fall. Es gab einige Klone, bei denen im Western Blot eine SSADH-Expression nachgewiesen werden konnte (nicht gezeigt). Diese Klone wurden vernichtet und mit ihnen wurde nicht weitergearbeitet.

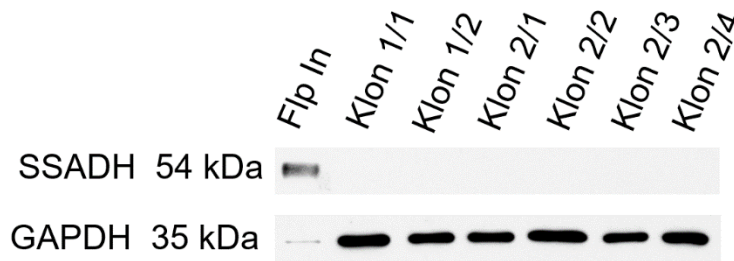


Abbildung 6: Western Blot des SSADH-Knock-Out in Flp-In™ HEK293-Zellen: Es wurden Flp-In™ HEK293-Zellen mit den Plasmiden SSADH-gRNA1-px459 und SSADH-gRNA2-px459 transfiziert, um das endogene ALDH5A1-Gen auszuschalten. Mithilfe des Western Blots wurde überprüft, ob die Klone SSADH exprimierten. Die Klone 1/x wurden mit gRNA1, die Klone 2/x mit gRNA2 transfiziert und anschließend über Nacht mit Puromycin (2 µg/ml) selektiert. Da nach der Selektion mit Puromycin nicht sichergestellt werden konnte, dass das ALDH5A1-Gen aus allen Zellen homolog ausgeknockt wurde, wurden die Zellen vereinzelt. Sobald ausreichend Zellen eines Einzelzellklons vorhanden waren, wurden aus einem Teil der Zellen Zelllysate mit Lysepuffer hergestellt und die Proteinkonzentrationen mittels Bradford-Proteinbestimmung ermittelt. Es wurden pro Spur 2 µg Protein auf das 10% Polyacrylamidgel aufgetragen. Das SSADH-Protein wurde mit dem Anti-SSADH-Antikörper (Abcam, ab129017) detektiert. Dieser Versuch wurde ein Mal durchgeführt, da er nur zur Identifikation der Knock-Out-Klone diente. Ein Lysat aus nicht-transfizierten Flp-In™ HEK293-Zellen (Flp In) diente als Positivkontrolle für den Western Blot.

Bei den Klonen, bei denen im Western Blot keine SSADH-Expression nachgewiesen wurde, wurde die genomische *ALDH5A1*-Sequenz um der gRNA-Sequenz herum überprüft. Hierfür wurde die entsprechende Sequenz mittels PCR aus der genomischen DNA nach dem Protokoll des Phire™ Tissue Direct PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) amplifiziert. Mit diesem Kit konnte die PCR ohne vorherige DNA-Aufreinigung direkt aus Zellpellets durchgeführt werden. Als Primer wurden hSSADH-Intron fwd 1 und hSSADH-Intron rev verwendet. Die fertigen PCR-Ansätze wurden in einem 1%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid (1:10.000) aufgetrennt.

Abbildung 7 zeigt das entsprechende Agarosegel. Die Banden bei 520 bp wurden aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und sequenziert. Da bei den Klonen 2/1 und 2/4 keine sauberen Banden bei 520 bp entstanden waren, wurde die PCR sowie die elektrophoretische Auftrennung wiederholt und anschließend die Sequenz bestimmt.

Abbildung 8 stellt die Ergebnisse der Sequenzierung dar. Ein homozygoter Knock-Out von SSADH aus dem Genom der Flp-In™ HEK293-Zellen gelang bei den beiden Klonen 1/1 und 2/2. In Klon 1/1 wurde eine Base ins Exon 3 des *ALDH5A1*-Gen eingefügt (Insertion), in Klon 2/2 wurde eine Base im Exon 3 des *ALDH5A1*-Gen entfernt (Deletion). Sowohl durch die Insertion als auch durch die Deletion verändert sich das Leseraster für die Basentriplets hinter der Mutation und es kommt zu einer veränderten Polypeptidkette (Schaaf & Zschocke, 2013).

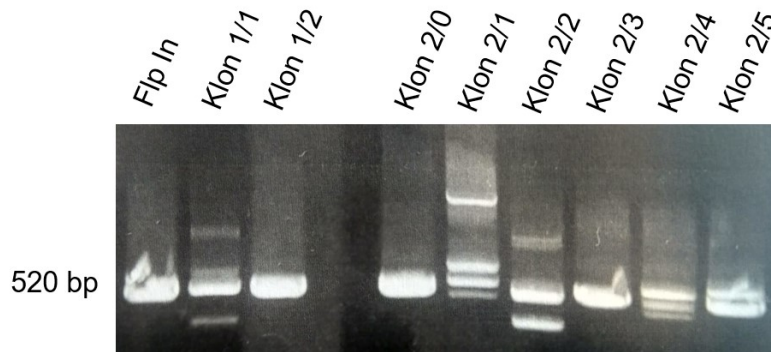


Abbildung 7: Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Ansätze im Agarosegel: Die genomische DNA der Klone, bei denen keine SSADH-Expression im Western Blot nachgewiesen wurde, wurde mit dem Phire™ Tissue Direct PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) vervielfältigt. Als Primer wurden hSSADH-Intron fwd 1 und hSSADH-Intron rev verwendet. Die Annealing-Temperatur betrug 66°C. Anschließend wurden die PCR-Ansätze in einem Agarosegel aufgetrennt. Als Kontrolle dienten nicht-transfizierte Flp-In™ HEK293-Zellen (Flp In).

A Exon 3 mit gRNA1, gRNA2 und PAM

GGAAAGCCACTGAAGGAGGCACATGGAGAAATTCTCTATTCCGCCTTTTTTCCTAGAGTG
 GTTCCTCTGAGGAAGCCCGCCGTGTTTACGGAGACATTATCCACACCCCGGCAAAGGACA
 GGCGGGCCCTGGTCCTCAAGCAGCCCA TAGGCGTGGCTGCAGTCATCACCCCG

B Klon 1/1: Insertion von 1xT neben PAM

ACACAGAGCCATGCTTTTATTATTAGAAAGGTAATACGTGGGTTCTTTTCTGATTTAATT
 TAGGGAAAGCCACTGAAGGAGGCACATGGAGAAATTCTCTATTCCGCCTTTTTTCCTAG
 AGTGGTTCTCTGAGGAAGCCCGCCGTGTTTACGGAGACATTATCCACACCCCGGCAAAG
 GACAGGCGGGCCCTGGTCCTCAAGCAGCCCA TAGGCGTGGCTGCAGTCATCACCCCGGT
 AGGTGACAGGATCAGCAAGATCCTAGGGTGGGAGATTGGATAGGGAGTTGGGAAACAAT
 TCATTCTTCCTCGTGAGCAGGTGTGCTCATCCTGTTAGTTTTGTCACCTGTTCTGCTT
 TCCTGATGCTTTTG

C Klon 2/2: Deletion von 1xG neben PAM

GGACACAGAGCCATGCTTTTATTATTAGAAAGGTAATACGTGGGTTCTTTTCTGATTTAA
 TTTAGGGAAAGCCACTGAAGGAGGCACATGGAGAAATTCTCTATTCCGCCTTTTTTCCTA
 GAGTGGTTCTCTGAGGAAGCCCGCCGTGTTTACGGAGACATTATCCACACCCCGGCAAA
 GGACAGGCGGGCCCTGGTCCTCAAGCAGCCCA TAGGCGTGGCTGCAGTCATCACCCCGG
 TAGGTGACAGGATCAGCAAGATCCTAGGGTGGGAGATTGGATAGGGAGTTGGGAAACAA
 TTCATTCTTCCTCGTGAGCAGGTGTGCTCATCCTGTTAGTTTTGTCACCTGTTCTGCTT
 TTCCTGATGCTTTT

Abbildung 8: Sequenzierungsanalyse des SSADH-Knock-Out in Flp-In™ HEK293-Zellen: Abbildung A stellt die genomische Sequenz von Exon 3 der SSADH-Sequenz dar. Es wurden die Sequenzen der gRNA1 und gRNA2 sowie der PAMs farbig hinterlegt. Abbildungen B und C zeigen die Ergebnisse der Sequenzierung der Klone 1/1 und 2/2.

Nachdem die Ergebnisse der Sequenzierung ausgewertet worden waren, wurden die Klone ohne erfolgreichen oder mit einem unklaren SSADH-Knock-Out vernichtet. Die Klone mit heterozygotem SSADH-Knock-Out wurden eingefroren und aus der Kultur genommen. Von den beiden Klonen mit homozygotem SSADH-Knock-Out (siehe Abbildung 8) wurden mehrere Ampullen eingefroren. Außerdem wurden diese als Klon 1 und 2 weiter kultiviert, um im nächsten Schritt eine Immunfluoreszenzfärbung mit diesen Zellen durchzuführen (siehe Kapitel 4.3) und das Wildtyp-*ALDH5A1*-Gen in das Genom dieser beiden Flp-In™ HEK293-SSADH-KO-Zellklonen zu integrieren (siehe Kapitel 4.4).

4.3 Immunfluoreszenzfärbung von Flp-In™ HEK293-Zellen

Um das Auftreten und die subzelluläre Lokalisation von SSADH sowie das Aussehen der Mitochondrien in Zellen, welche SSADH-Mangel verursachende Missense-Varianten exprimierten, zu beurteilen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Dafür wurden die zum Flp-In™ System gehörenden Flp-In™ HEK293-Zellen verwendet, da diese flacher als HEK293T-Zellen sind und das Zytosol-zu-Kern-Verhältnis höher ist. Es wurden Flp-In™ HEK293-Zellen vor dem SSADH-Knock-Out, nicht-transfizierte Flp-In™ HEK293-SSADH-KO-Zellen (Klon 1) und mit pcDNA3-Plasmiden transient transfizierte Flp-In™ HEK293-SSADH-KO-Zellen (Klon 1) gefärbt. Mithilfe der transienten Transfektion wurden die Wildtyp-SSADH sowie die SSADH-Missense-Varianten Gly268Glu, Gly284Asp, Phe419Leu und Gly441Arg in die Zellen eingeschleust.

In Abbildung 9 werden Flp-In™ HEK293-Zellen vor und nach dem SSADH-Knock-Out dargestellt. In den Flp-In™ HEK293-Zellen vor dem SSADH-Knock-Out wurde endogene SSADH exprimiert und war in den mit dem Mitotracker angefärbten Mitochondrien lokalisiert. Die Mitochondrien hatten eine tubuläre Form und bildeten ein retikuläres Netzwerk. In den Flp-In™ HEK293-SSADH-KO-Zellen erschien trotz des SSADH-Knock-Outs ein geringes SSADH-Signal. Dies ist damit zu erklären, dass der verwendete SSADH-Antikörper nicht 100% spezifisch ist und deswegen gegebenenfalls andere Aldehyd-Dehydrogenasen an den Mitochondrien angefärbt wurden. Dies störte jedoch bei der Beurteilung der transfizierten Flp-In™ HEK293-SSADH-KO-Zellen nicht, da durch die Überexpression das Hintergrundsignal übertönt wurde (vergleiche Abbildung 10).

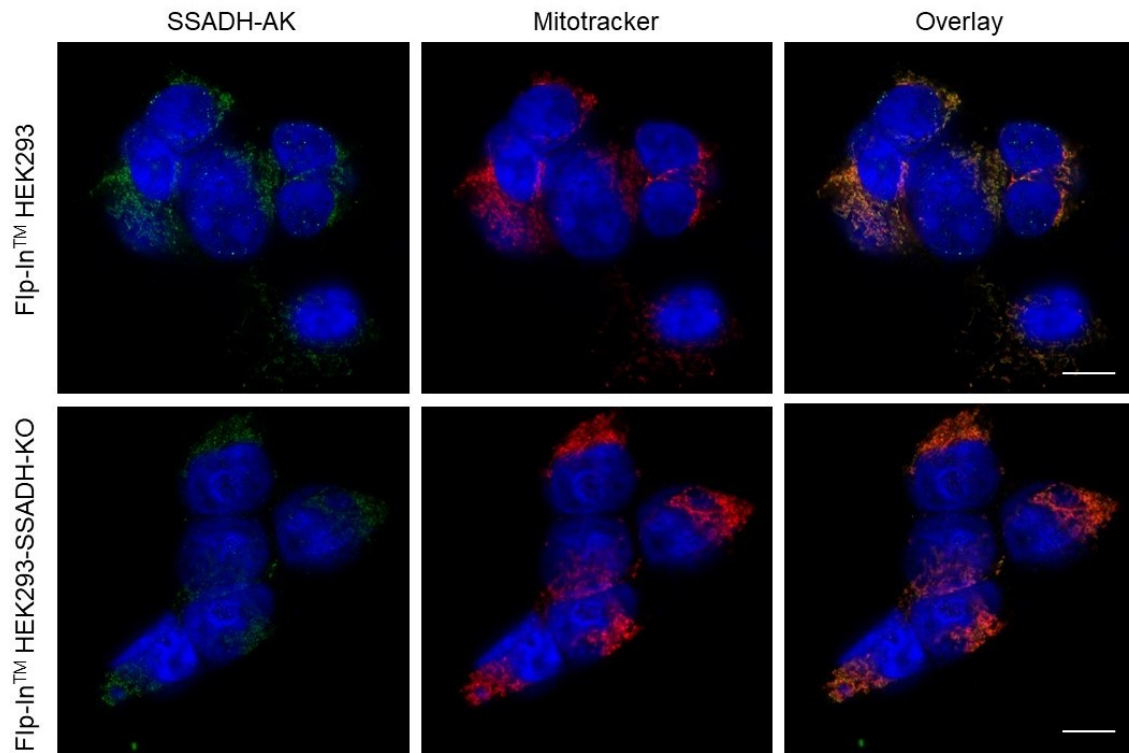
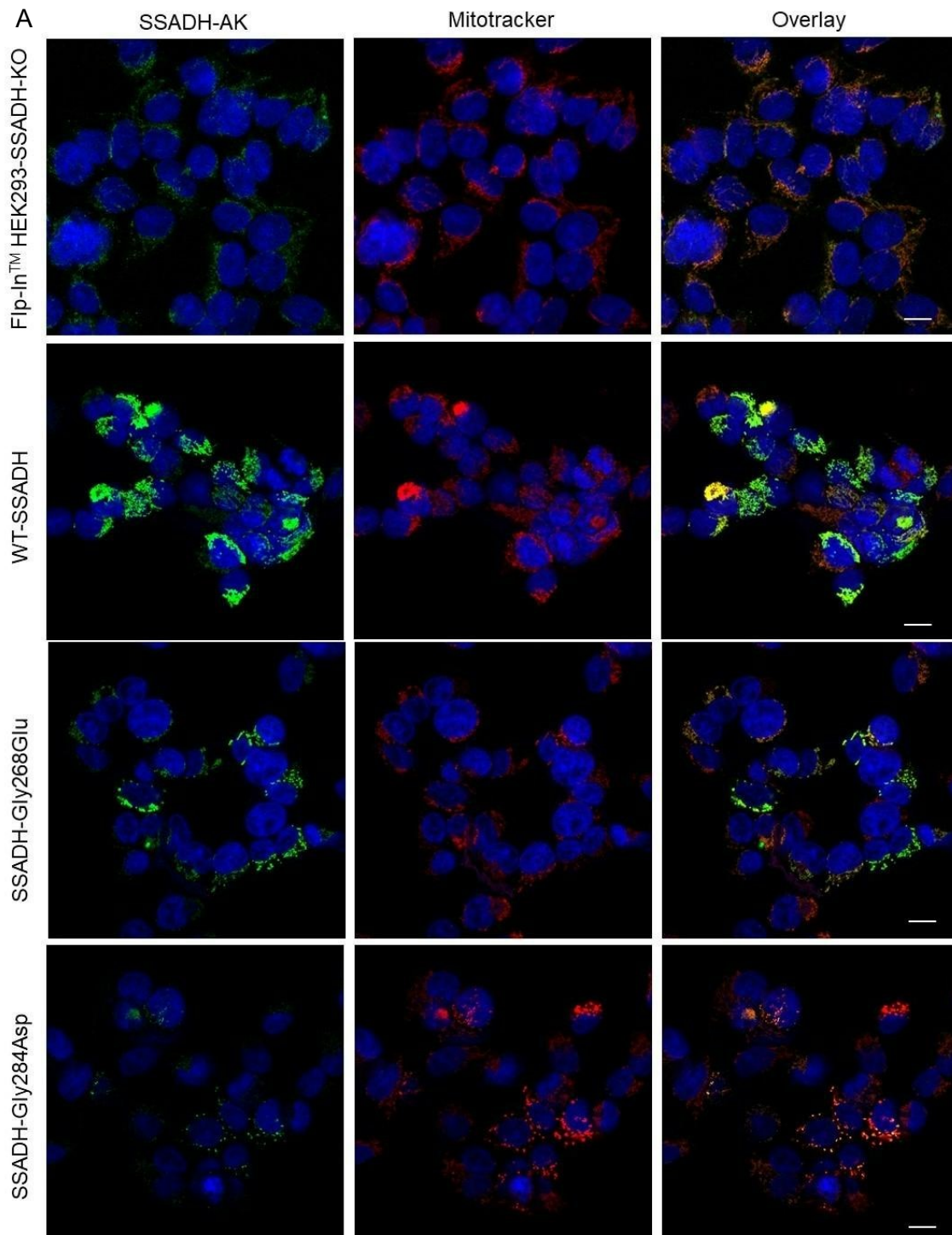


Abbildung 9: Immunfluoreszenzfärbung von SSADH und Mitochondrien in Flp-In™ HEK293-Zellen (Klon 1) vor und nach dem SSADH-Knock-Out: Die Zellen wurden 30 min mit dem Mitotracker (100 nM) inkubiert und mit Methanol bei -20°C fixiert. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden mit 1% BSA in PBS blockiert, bevor der Anti-SSADH- (Abcam, ab155493) und anschließend der Sekundärantikörper (Invitrogen, Anti-Kaninchen Alexa-Fluor448) verwendet wurden. Die Deckgläschen wurden mit Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium mit DAPI (1:1.000) eingedeckelt und bei 4°C gelagert. Die Färbung wurde zwei Mal durchgeführt. Der Maßstabsbalken kennzeichnet 10 µm.

In Abbildung 10 A werden in der obersten Reihe nicht-transfizierte Flp-In™ HEK293-SSADH-KO-Zellen dargestellt. Die transfizierte Wildtyp-SSADH war in den Mitochondrien lokalisiert und es war ein starkes grünes Signal sichtbar, was darauf hindeutet, dass viel SSADH exprimiert wurde. Die Mitochondrien sahen tubulär aus und bildeten ein Netzwerk. Die SSADH-Gly268Glu-Variante war in den Mitochondrien lokalisiert. Die Intensität des SSADH-Signals war vergleichbar mit den mit dem SSADH-Wildtyp transfizierten Zellen. Die SSADH-Expression schien also nicht reduziert zu sein, was mit den Ergebnissen im Western Blot korreliert (vergleiche Abbildung 4). Bei der SSADH-Variante Gly284Asp erschien wenig grünes Signal. Es war also wahrscheinlich wenig SSADH vorhanden. Dies stimmt ebenfalls mit den Ergebnissen aus dem Western Blot überein (vergleiche Abbildung 4). Die Mitochondrien stellten sich als einzelne Punkte dar, was so wirkte, als hätten sie ihr Netzwerk verloren und wären fragmentiert. Bei den in Abbildung 10 B dargestellten SSADH-Varianten Phe419Leu und Gly441Arg erschien

wieder ein starkes SSADH-Signal. Die SSADH-Expression wirkte bei den Varianten nicht reduziert, was ebenfalls mit den Ergebnissen aus dem Western Blot übereinstimmt (vergleiche Abbildung 4). Beide Varianten waren in den Mitochondrien lokalisiert und die Mitochondrien sahen unter näherer Betrachtung zum Teil fragmentiert aus.



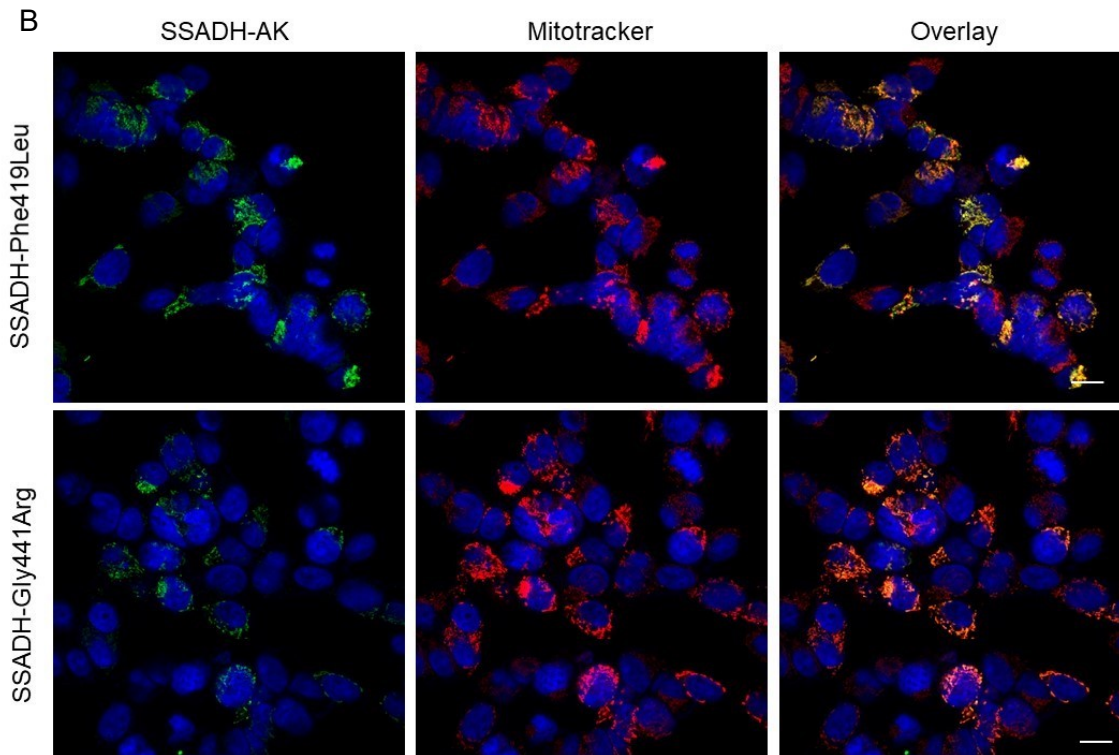


Abbildung 10 (A und B): Immunfluoreszenzfärbung von SSADH und Mitochondrien in nicht-transfizierten und transfizierten Flp-InTM HEK293-SSADH-KO-Zellen (Klon 1): Es wurden Flp-InTM HEK293-SSADH-KO-Zellen mit den SSADH-Wildtyp und SSADH-Missense-Varianten enthaltenden pcDNA3-Plasmiden transient transfiziert und anschließend auf Deckgläschen ausgesät. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte wie unter Abbildung 9 beschrieben. Die Färbung wurde fünf Mal durchgeführt. Zum Vergleich werden nicht-transfizierte Flp-InTM HEK293-SSADH-KO-Zellen dargestellt. Der Maßstabsbalken kennzeichnet 10 μm .

4.4 Stabile SSADH-Wildtyp-Expression in Flp-InTM HEK293-SSADH-KO-Zellen

Mithilfe des Flp-InTM Systems kann ein beliebiges Gen ins Genom einer Flp-InTM Wirtszelllinie integriert werden. Als Flp-InTM Wirtszelllinie dienen die Flp-InTM HEK293-SSADH-KO-Zellen, aus denen die endogene SSADH, wie unter Kapitel 4.2 beschrieben, ausgeknockt wurde. Diese Zellen enthalten in ihrem Genom eine FRT-Sequenz. Eine solche FRT-Sequenz befindet sich ebenfalls in dem pcDNA5/FRT-Expressionsvektor. In dieses Plasmid kann ein beliebiges Gen eingebaut und im Anschluss über die Flp-Rekombinase-vermittelte DNA-Rekombination an der FRT-Stelle in das Genom integriert werden. Da das pcDNA5/FRT-Plasmid eine Hygromycin-Resistenz enthält, können die Zellen nach der Transfektion mit Hygromycin selektiert werden. Abbildung 11 zeigt eine schematische Darstellung des Flp-InTM Systems.

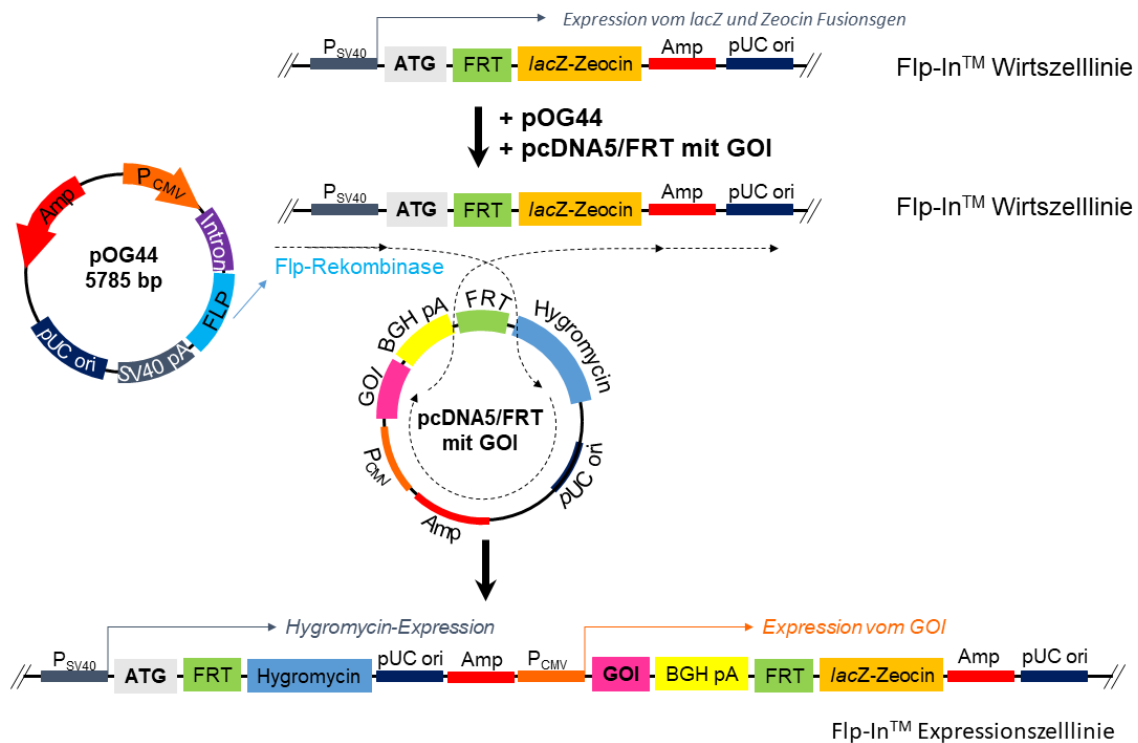


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Flp-In™ Systems (modifiziert nach Invitrogen Corporation, 2010; https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2Fflpinsystem_man.pdf): Oben wird die Sequenz der Flp-In™ Wirtszelllinie dargestellt. Die Zellen enthalten einen SV40-Promotor (P_{SV40}), ein ATG-Startcodon (ATG), eine FRT-Stelle (FRT), das lacZ-Zeocin™-Fusionsgen (lacZ-Zeocin) sowie ein Ampicillin-Gen (Amp) und einen Replikationsursprung (pUC ori). Durch das lacZ-Zeocin™-Fusionsgen, dessen Expression durch den SV40-Promotor gesteuert wird, erhalten die Zellen eine Zeocin-Resistenz. Der pcDNA5/FRT-Expressionsvektor mit einem eingebauten Gen (GOI, gene of interest) wird zusammen mit dem pOG44-Plasmid in die Wirtszelllinie kotransfiziert. Das pOG44-Plasmid exprimiert die Rekombinase Flippase (FLP) unter der Kontrolle des CMV-Promotors (P_{CMV}). Außerdem enthält das pOG44-Plasmid ein synthetisches Intron (Intron), das die Expression des Flp-Gens verstärkt. Die Flp-Rekombinase vermittelt eine DNA-Rekombination zwischen der FRT-Stelle im Genom der Wirtszelllinie und der FRT-Stelle im pcDNA5/FRT-Plasmid. Das pcDNA5/FRT-Plasmid enthält ein Hygromycin-Resistenzgen (Hygromycin), einen Replikationsursprung (pUC ori) und ein Ampicillin-Gen (Amp). Die Expression des eingebauten Gens (GOI) steht unter der Kontrolle eines CMV-Promotors (P_{CMV}). Es folgt eine Polyadenylierungssequenz (BGH pA, bovine growth hormone polyadenylation signal). Unten wird die entstandene Flp-In™ Expressionszelllinie mit der integrierten Expressionskassette des pcDNA5/FRT-Plasmids dargestellt. Diese Zellen sind gegen Hygromycin resistent und exprimieren das in den pcDNA5/FRT-Expressionsvektor integrierte Gen stabil.

4.4.1 Integration des SSADH-Wildtyp in das pcDNA5/FRT-Plasmid

Um nun das für die SSADH kodierende *ALDH5A1*-Gen in das Genom der Flp-In™ HEK293-SSADH-KO-Zellen zu integrieren, wurde das offene Leseraster (ORF) des Gens zusammen mit der untranslatierten Region (5'UTR) zunächst in das Expressionsplasmid, das pcDNA5/FRT-Plasmid, eingebaut. Dazu wurde das SSADH-Insert aus dem hSSADH-5'UTR-pcDNA3-Plasmid ausgeschnitten und mittels Klonierung in das pcDNA5/FRT-Plasmid eingebaut (siehe Abbildung 12). Die hergestellten Plasmide wurden mit der Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft. Abbildung 13 stellt die Ergebnisse der Restriktionsanalyse dar. Für die Isolation größerer DNA-Mengen wurde von den hSSADH-pcDNA5/FRT Klonen 3 und 4 eine Midi-Plasmidpräparation durchgeführt und es wurden Glycerin-Stocks angelegt.

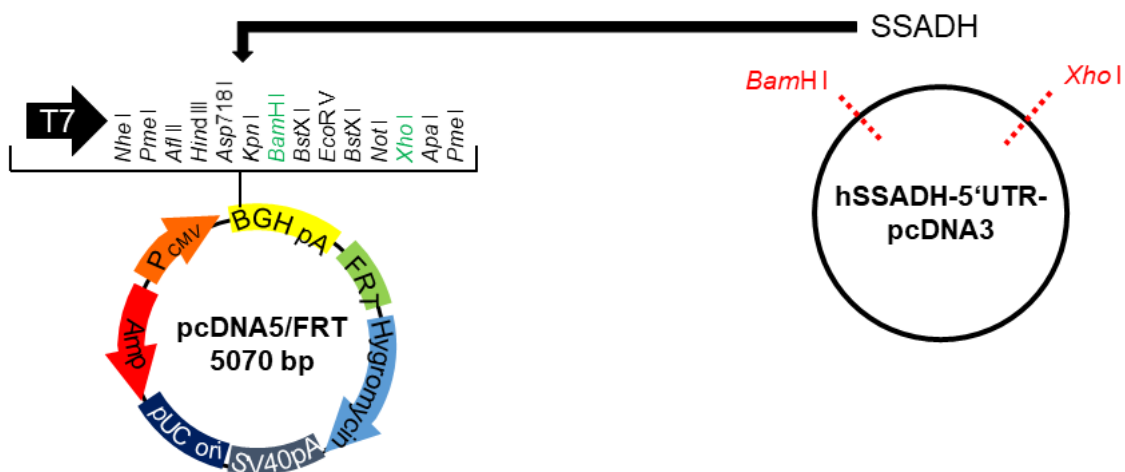


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Umklonierung der Wildtyp-SSADH in das pcDNA5/FRT-Plasmid (modifiziert nach Invitrogen Corporation, 2010; https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Fflp-insystem_man.pdf): Das SSADH-Insert (5'UTR und ORF) wurde mithilfe der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Xho*I aus dem hSSADH-5'UTR-pcDNA3-Plasmid (Brennenstuhl et al., 2020) ausgeschnitten. Der pcDNA5/FRT-Vektor wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen gespalten (grün markiert; es werden auch die anderen möglichen Restriktionsstellen des pcDNA5/FRT-Plasmids dargestellt). Die bei dem Restriktionsverdau entstandenen DNA-Fragmente wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch voneinander getrennt. Das SSADH-Insert (circa 1.700 bp) wurde aus dem Gel ausgeschnitten. Die Vektorbande (pcDNA5/FRT bei circa 5.000 bp) diente zur Kontrolle des Restriktionsverdau. Das aus dem Gel ausgeschnittene Insert und der restliche Restriktionsverdau des pcDNA5/FRT-Vektors wurden aufgereinigt. Anschließend wurde das Insert mittels Ligation in den Vektor eingefügt.

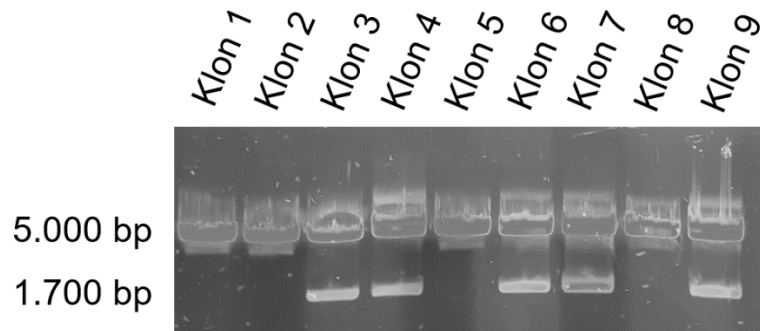


Abbildung 13: Restriktionsanalyse der hSSADH-pcDNA5/FRT-Plasmide: Das SSADH-Insert wurde mittels Klonierung in das pcDNA5/FRT-Plasmid eingebaut. Nach der Transformation in *E. coli* XL-1 blue wurden neun Kolonien gepickt und die DNA von diesen präpariert. Es folgte ein Restriktionsverdau mit Bam HI und Xho I. Die Proben wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Bei den Klonen 3, 4, 6, 7, und 9 erschienen eine Vektorbande bei circa 5.000 bp und eine Insertbande bei circa 1.700 bp. Die Mini-Plasmidpräparationen von diesen Klonen wurden sequenziert.

4.4.2 Überprüfung des hSSADH-pcDNA5/FRT-Plasmids

Um zu überprüfen, ob die neu hergestellten hSSADH-pcDNA5/FRT-Plasmide funktionierten, wurden die Klone 3 und 4 transient in HEK293T-SSADH-KO-Zellen (Brennstuhl et al., 2020) transfiziert. Die nach der Transfektion von den HEK293T-SSADH-KO-Zellen exprimierten Wildtyp-SSADH-Enzyme wurden mithilfe des Western Blots und des SSADH-Aktivitätsassays, wie unter Kapitel 4.1.2 und 4.1.3 beschrieben, charakterisiert.

Abbildung 14 stellt die Ergebnisse des Western Blots dar. Es erschien ein deutliches Signal bei 54 kDa beim hSSADH-5'UTR-pcDNA3-Plasmid, das als Positivkontrolle diente. Die Plasmide hSSADH-pcDNA5/FRT Klon 3 und 4 zeigten ebenfalls eine deutliche SSADH-Expression.

Die Ergebnisse des SSADH-Aktivitätsassays werden in Abbildung 15 abgebildet. Es konnte gezeigt werden, dass die SSADH-Aktivität der transient transfizierten hSSADH-pcDNA5/FRT Klone vergleichbar mit dem transient transfizierten hSSADH-5'UTR-pcDNA3-Plasmid war. Da verdeutlicht werden konnte, dass beide neu hergestellten hSSADH-pcDNA5/FRT-Klone gut funktionierten, wurde im Folgenden mit dem hSSADH-pcDNA5/FRT Klon 3 weitergearbeitet.

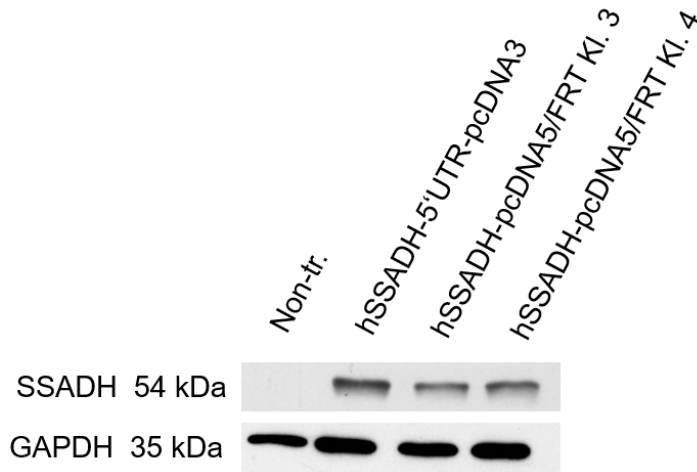


Abbildung 14: Western Blot zur Überprüfung der hSSADH-pcDNA5/FRT-Plasmide: Es wurden HEK293T-SSADH-KO-Zellen mit den Plasmiden hSSADH-5'UTR-pcDNA3 sowie hSSADH-pcDNA5/FRT Klon 3 und 4 transient transfiziert. Nach der Zelllysatherstellung mit Lysepuffer wurden pro Spur 2 µg Protein auf das 10% Polyacrylamidgel aufgetragen. Das SSADH-Protein wurde mit dem Anti-SSADH-Antikörper (Abcam, ab129017) detektiert. Dieser Versuch wurde ein Mal zur Überprüfung der hSSADH-pcDNA5/FRT-Plasmide durchgeführt. Als Ladekontrolle diente GAPDH. Das Lysat aus nicht-transfizierten HEK293T-SSADH-KO-Zellen diente als Negativkontrolle.

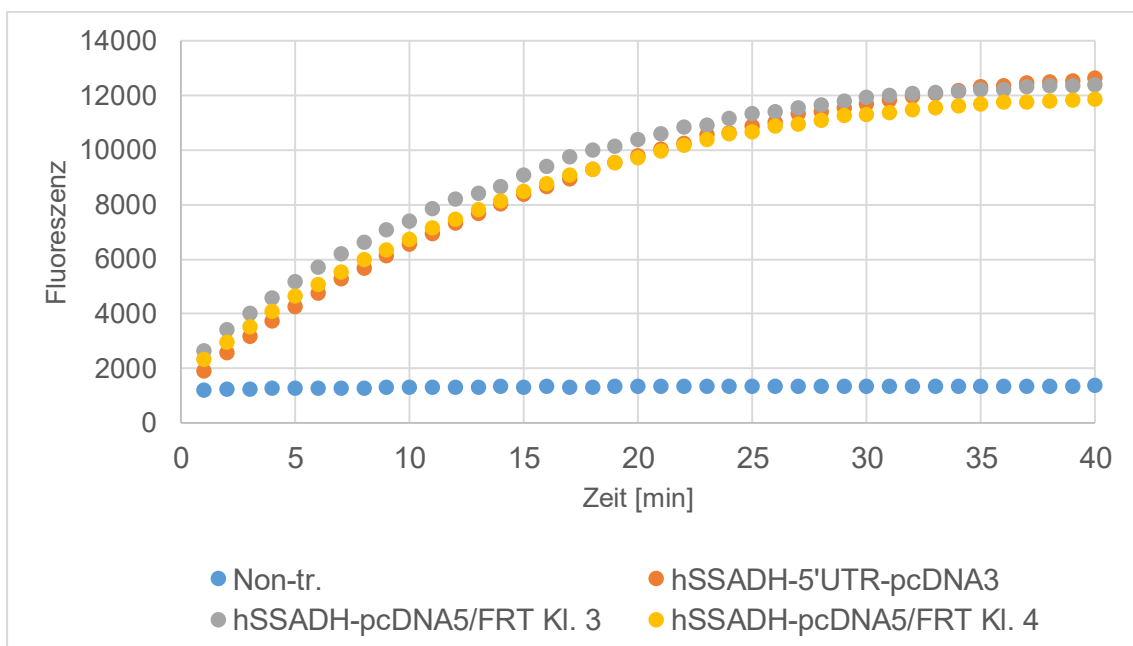


Abbildung 15: SSADH-Aktivitätsassay zur Überprüfung der hSSADH-pcDNA5/FRT-Plasmide: Gemessen wurde die Fluoreszenz und damit die Umsetzung von NAD^+ zu NADH bei 355 nm Exzitation und 470 nm Emission ein Mal pro Minute über 40 min. Dafür wurden die Plasmide hSSADH-5'UTR-pcDNA3 sowie hSSADH-pcDNA5/FRT Klon 3 und 4 transient in HEK293T-SSADH-KO-Zellen transfiziert. Die Zelllysate wurden 1:10 in destilliertem Wasser verdünnt und in Duplikaten gemessen. Die Mittelwerte wurden mit Microsoft Excel bestimmt. Da der Versuch nur ein Mal durchgeführt wurde, konnte keine interferenzstatistische Auswertung erfolgen.

4.4.3 Stabile Expression von Wildtyp-SSADH in Flp-In™ HEK293-SSADH-KO-Zellen

Im nächsten Schritt wurde das neu hergestellte hSSADH-pcDNA5/FRT-Plasmid (siehe Kapitel 4.4.1 und 4.4.2) durch stabile Transfektion in das Genom der Flp-In™ HEK293-SSADH-KO-Zellen eingebaut. Dazu wurde nach dem Protokoll des Flp-In™ Kits (Thermo Fisher Scientific) gearbeitet. Das pOG44-Plasmid wurde im Verhältnis 9:1 mit dem hSSADH-pcDNA5/FRT-Plasmid in die Flp-In™ HEK293-SSADH-KO-Zellen kotransfiziert. Nach der Kotransfektion vermittelte die vom pOG44-Plasmid exprimierte Flp-Rekombinase ein homologes Rekombinationsereignis zwischen den FRT-Stellen, sodass die Expressionskassette des hSSADH-pcDNA5/FRT-Plasmids in das Genom der Flp-In™ HEK293-SSADH-KO-Zellen eingefügt wurde (siehe Abbildung 11).

Zu dem Flp-In™ Kit gehört ein Kontrollplasmid, welches das CAT-Gen enthält und nach Kotransfektion mit pOG44 in die Flp-In™ Zellen die Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) exprimiert. Die CAT ist ein bakterielles Enzym, welche das Antibiotikum Chloramphenicol acetyliert. Es ist der häufigste Mechanismus der mikrobiellen Resistenz gegen Chloramphenicol (Shaw & Leslie, 1991). Die CAT-Expression kann mit verschiedenen Methoden nachweisen werden, z. B. mit einer Western-Blot-Analyse. Dieser positive Kontrollvektor soll zeigen, dass das Flp-In™ System ordnungsgemäß funktioniert. Das pcDNA5/FRT/CAT-Plasmid wird in Abbildung 16 dargestellt.

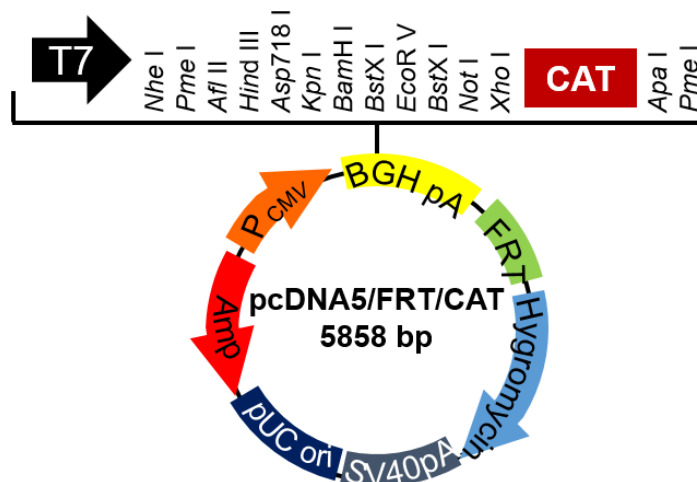


Abbildung 16: Schematische Darstellung des pcDNA5/FRT/CAT-Plasmid (modifiziert nach Invitrogen Corporation; https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Ftools.thermofisher.com%2Fcontent%2Ffsfs%2Fvectors%2Fpcdna5firtcat_map.pdf): Das pcDNA5/FRT/CAT-Plasmid besteht aus 5.858 bp und ist wie das pcDNA5/FRT-Plasmid aufgebaut (vergleiche Abbildung 11). Allerdings wurde in die Sequenz bereits das CAT-Gen integriert.

Als Positivkontrolle wurde deshalb das pcDNA5/FRT/CAT-Plasmid mit dem pOG44-Plasmid ebenfalls im Verhältnis 9:1 in die Flp-InTM HEK293-SSADH-KO-Zellen kotransfiziert. Zusätzlich wurden die Flp-InTM HEK293-SSADH-KO-Zellen als Flp-Rekombinationskontrolle nur mit dem hSSADH-pcDNA5/FRT-Plasmid (ohne pOG44) transfiziert. Nicht-transfizierte Flp-InTM HEK293-SSADH-KO-Zellen wurden mitgeführt.

Mit der Transfektion verloren die Zellen ihre Zeocin-Resistenz und erhielten eine Hygromycin-Resistenz, sodass die transfizierten Zellen mit Hygromycin (100 µg/ml) selektiert werden konnten. Dabei sollten die nicht-transfizierten und ohne das pOG44-Plasmid transfizierten Zellen sterben und nur die kotransfizierten, Hygromycin-resistenten Zellen überleben. Falls dies nicht der Fall war, musste die Hygromycin-Behandlung wiederholt werden.

Nach zwei bis drei Wochen bildeten sich Kolonien. Sobald die Kolonien gut sichtbar waren, wurden diese gepickt und weiter kultiviert. Wenn genug Zellen eines Klons vorhanden waren, konnte ein Teil der Zellen geerntet und Zellysate mit dem Lysepuffer hergestellt werden. Die Klone wurden mittels Western Blot auf die Expression von SSADH bzw. CAT (nicht dargestellt) untersucht, um zu überprüfen, ob der Knock-In erfolgreich war.

Abbildung 17 stellt die Ergebnisse des SSADH-Knock-Ins dar. Das Lysat aus den parental Flp-InTM HEK293-Zellen diente als Positivkontrolle, da diese Zellen endogene SSADH exprimieren. Obwohl bei der Ladekontrolle mit GAPDH gezeigt werden konnte, dass Protein aufgetragen wurde, erschien hier kein Signal. Wahrscheinlich war das Signal nicht stark genug, da die Zellen weniger (endogene) SSADH exprimierten als die mit der Wildtyp-SSADH transfizierten Flp-InTM HEK293-SSADH-KO-Zellen. Von den mit der Wildtyp-SSADH stabil transfizierten Flp-InTM HEK293-SSADH-KO-Zellen exprimierten manche Klone SSADH. Der SSADH-Knock-In ist allerdings nur bei den Zellen gelungen, in denen das endogene *ALDH5A1*-Gen zuvor mit der gRNA1 ausgeknockt wurde (Klon 1/1). Bei den Klonen 1/a-e entstand ein kräftiges SSADH-Signal im Western Blot, bei den Klonen 2/a-b konnte kein SSADH-Signal detektiert werden. Ein Lysat aus Flp-InTM HEK293-SSADH-KO-Zellen diente als Negativkontrolle. Hier erschien kein SSADH-Signal im Western Blot. Die Zellen mit einem erfolgreichen Knock-In wurden eingefroren und stehen für weitere Experimente zur Verfügung.

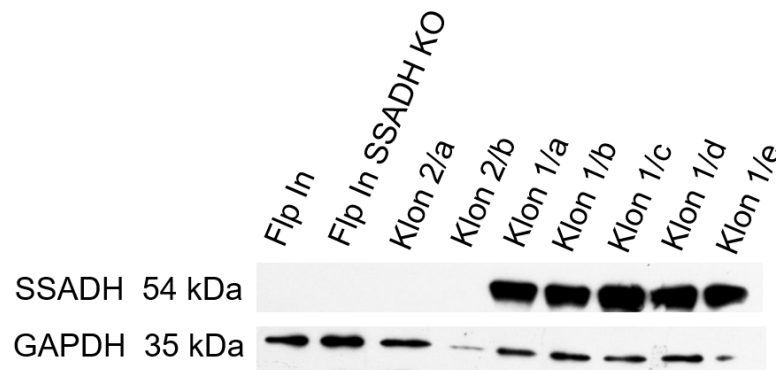


Abbildung 17: Western Blot des SSADH-Knock-In in Flp-InTM HEK293-SSADH-KO-Zellen: Es wurden Flp-InTM HEK293-SSADH-KO-Zellen mit den Plasmiden pOG44 und hSSADH-pcDNA5/FRT im Verhältnis 9:1 transfiziert. Nach der Selektion mit Hygromycin wurden einzelne Kolonien gepickt, kultiviert und Zelllysate hergestellt. Für den Western Blot wurden 2 µg Protein auf das 10% Polyacrylamidgel aufgetragen. Das SSADH-Protein wurde mit dem Anti-SSADH-Antikörper (Abcam, ab129017) detektiert. Als Ladekontrolle diente GAPDH. Der Versuch wurde ein Mal durchgeführt. Das Lysat aus Flp-InTM HEK293-Zellen (Flp In) diente als Positivkontrolle, das Lysat aus Flp-InTM HEK293-SSADH-KO-Zellen als Negativkontrolle.

4.5 Herstellung von SSADH-Missense-Mutationen enthaltenden pcDNA5/FRT-Plasmiden

Nachdem die stabile Expression des SSADH-Wildtyps in Flp-InTM HEK293-SSADH-KO-Zellen gelungen war, können auch andere SSADH-Varianten von diesen Zellen stabil exprimiert und anschließend analysiert werden. Dazu müssen die SSADH-Missense-Mutationen in das hSSADH-pcDNA5/FRT-Expressionsplasmid eingebaut werden.

Mithilfe der In-vitro-Mutagenese wurden die in dieser Arbeit genauer untersuchten Mutationen sowie einige weitere pathogene SSADH-Varianten in das hSSADH-pcDNA5/FRT-Plasmid integriert. Die Doppelmutation hSSADH-His180Tyr-Asn255Asp wurde mithilfe der Klonierung aus dem in der AG Tikkanen existierenden hSSADH-His180Tyr-Asn255Asp-pcDNA3-Plasmid ausgeschnitten und in das pcDNA5/FRT-Plasmid eingebaut. Tabelle 18 gibt, ergänzend zu Tabelle 17, einen Überblick über die Missense-Varianten.

Tabelle 18: SSADH-Missense-Varianten mit den entsprechenden Aminosäuresubstitutionen und der betroffenen Domäne (Ergänzung zu Tabelle 17)

Exon	Genetische Variante	Aminosäuresubstitution	Betroffene Domäne
1	c.278G>T	p.Cys93Phe	NAD ⁺ -Bindungsdomäne
3	c.538C>T	p.His180Tyr	Oligomerisierungsdomäne
5	c.763A>G	p.Asn255Asp	NAD ⁺ -Bindungsdomäne

Die entstandenen Plasmide sind in Tabelle 19 aufgelistet. Diese wurden zur Amplifikation in *E. coli* XL-1 blue transformiert. Anschließend folgten eine DNA-Präparation sowie die Überprüfung der hergestellten Plasmide mittels Sequenzierung.

Tabelle 19: SSADH-Missense-Varianten enthaltende hSSADH-pcDNA5/FRT-Konstrukte

Hergestellte pcDNA5/FRT-Konstrukte
hSSADH-Gly268Glu-pcDNA5/FRT
hSSADH-Gly284Asp-pcDNA5/FRT
hSSADH-Phe419Leu-pcDNA5/FRT
hSSADH-Gly441Arg-pcDNA5/FRT
hSSADH-Cys93Phe-pcDNA5/FRT
hSSADH-His180Tyr-pcDNA5/FRT
hSSADH-Asn255Asp-pcDNA5/FRT
hSSADH-His180Tyr-Asn255Asp-pcDNA5/FRT

Um zu überprüfen, ob die pcDNA5/FRT-Konstrukte ähnliche Ergebnisse wie die bisherigen Versuche mit den entsprechenden pcDNA3-Konstrukten ergaben, wurden die pcDNA5-Konstrukte zunächst transient in HEK293T-SSADH-KO-Zellen transfiziert. Die nach der Transfektion von den HEK293T-SSADH-KO-Zellen exprimierten Varianten des SSADH-Enzyms wurden mithilfe des Western Blots und des SSADH-Aktivitätsassays, wie unter Kapitel 4.1.2 und 4.1.3 beschrieben, charakterisiert.

Die Ergebnisse des Western Blot werden in Abbildung 18 dargestellt. Es zeigte sich eine deutliche SSADH-Expression beim SSADH-Wildtyp (WT) sowie bei den SSADH-Varianten Gly268Glu, Phe419Leu, Gly441Arg und His180Tyr. Wie auch in Abbildung 4, erschien das SSADH-Signal bei der Variante Gly441Arg unterhalb von 54 kDa. Bei den Varianten Gly284Asp und Cys93Phe wurde eine geringe SSADH-Expression detektiert. Es wurde kein SSADH-Protein bei den Varianten Asn255Asp und His180Tyr-Asn255Asp

exprimiert. Das Lysat aus nicht-transfizierten HEK293T-SSADH-KO-Zellen diene als Negativkontrolle und zeigte kein SSADH-Signal.

Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse des SSADH-Aktivitätsassays. In diesem wurde bei der Variante His180Tyr eine relative Restaktivität von 63,5% der Wildtyp-Aktivität gemessen. Bei den restlichen SSADH-Missense-Varianten lag keine Restaktivität vor. Die Ergebnisse des Western Blots und des SSADH-Aktivitätsassays verdeutlichen, dass die hier hergestellten pcDNA5/FRT-Konstrukte funktionieren und in weiteren Versuchen verwendet werden können.

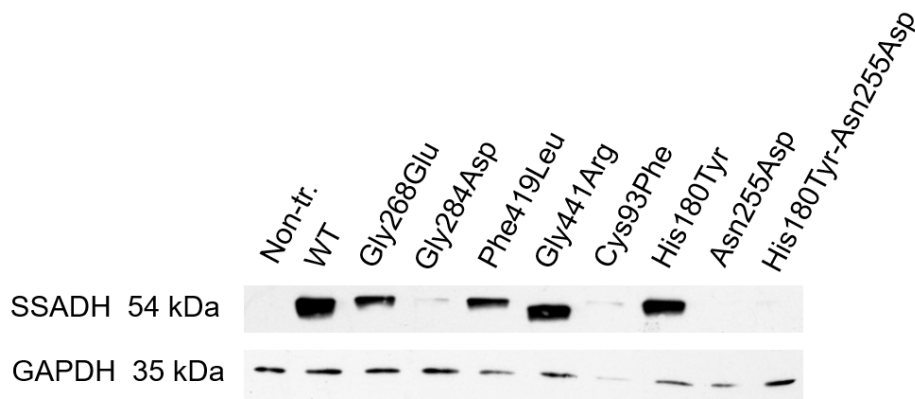


Abbildung 18: Western Blot zur Überprüfung der SSADH-Missense-Varianten enthaltenden pcDNA5/FRT-Plasmide: Es wurden HEK293T-SSADH-KO-Zellen mit den SSADH-Wildtyp und SSADH-Missense-Mutationen enthaltenden pcDNA5/FRT-Plasmiden transient transfiziert. Nach der Zelllysatherstellung mit Lysepuffer wurden pro Spur 2 µg Protein auf das 10% Polyacrylamidgel aufgetragen. Das SSADH-Protein wurde mit dem Anti-SSADH-Antikörper (Abcam, ab129017) detektiert. Dieser Versuch wurde ein Mal zur Überprüfung der pcDNA5/FRT-Plasmide durchgeführt. Als Ladekontrolle diente GAPDH.

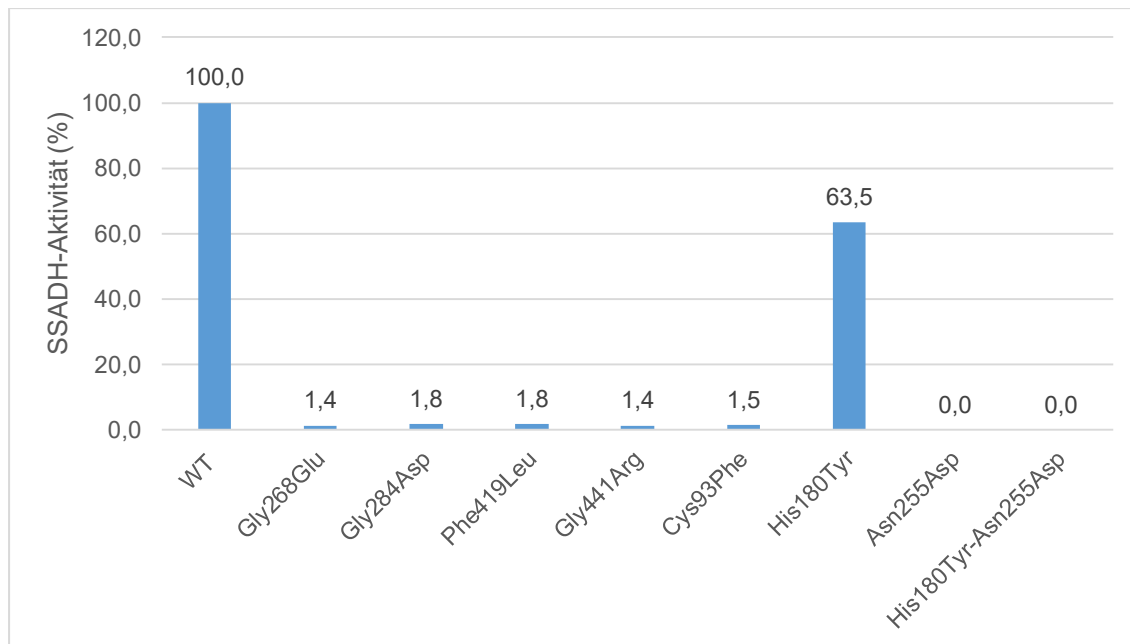


Abbildung 19: SSADH-Aktivitätsassay zur Überprüfung der SSADH-Missense-Mutationen enthaltenden pcDNA5/FRT-Plasmide: Dargestellt wird die relative SSADH-Aktivität (in % vom WT) in Zelllysaten aus HEK293T-SSADH-KO-Zellen nach transienter Transfektion mit pcDNA5/FRT-Plasmiden, die den SSADH-Wildtyp sowie SSADH-Missense-Varianten enthalten. Die Zelllysate wurden 1:10 in destilliertem Wasser verdünnt und in Duplikaten gemessen. Die Mittelwerte wurden mit Microsoft Excel bestimmt. Da der Versuch nur ein Mal durchgeführt wurde, konnte keine statistische Auswertung erfolgen. Die Wildtyp-Aktivität wurde auf 100% gesetzt und die Aktivität der SSADH-Varianten in Prozent Wildtyp-Aktivität angegeben. Die Fluoreszenz der nicht-transfizierten HEK293T-SSADH-KO-Zellen wurde von der Fluoreszenz des SSADH-Wildtyps und der SSADH-Missense-Varianten abgezogen. Negative Werte wurden mit 0 gleichgesetzt.

5 Diskussion

5.1 Die molekulare Charakterisierung von vier SSADH-Missense-Varianten

Der SSADH-Mangel beschreibt eine seltene angeborene Stoffwechselstörung (Übersicht in Didiášová et al., 2020). Durch den Mangel des Enzyms SSADH wird der Abbau des Neurotransmitters GABA gestört, wodurch die beiden neuroaktiven Substanzen GABA und GHB in Körperflüssigkeiten akkumulieren (Chambliss et al., 1998; Gibson et al., 1998). Zu den Symptomen zählen insbesondere eine verzögerte psychomotorische, geistige und sprachliche Entwicklung sowie Hypotonie und Ataxie (Pearl et al., 2003a). Ursächlich für den SSADH-Mangel sind verschiedene Arten von Mutationen im *ALDH5A1*-Gen, unter anderem Missense-Mutationen (Akaboshi et al., 2003; Chambliss et al., 1998). Da die Auswirkungen der verschiedenen Missense-Mutationen auf das SSADH-Enzym schwierig vorherzusagen sind, wurden einige von diesen bereits in unterschiedlichen Studien charakterisiert. Dabei nutzten die Forschenden meistens transiente Überexpressionsmodelle (siehe unter anderem Akaboshi et al., 2003; Blasi et al., 2002; Brennenstuhl et al., 2020; DiBacco et al., 2020; Leo et al., 2017; Menduti et al., 2018; Pop et al., 2020). Häufig bestimmten sie dabei nur die verbliebene Enzymaktivität. Das Expressionsniveau oder die Lokalisation von SSADH in der Zelle berücksichtigten die Forschenden hingegen nicht. Da diese beiden Faktoren jedoch ebenfalls einen Einfluss auf die Funktion der SSADH-Varianten haben, wurden in meiner Arbeit mithilfe der transienten Überexpression vier verschiedene SSADH-Missense-Varianten nicht nur bezüglich der verbliebenen Enzymaktivität, sondern auch ihres Expressionsniveaus und ihrer subzellulären Lokalisierung untersucht. Da es sich generell als vorteilhaft erwiesen hat, die funktionelle Analyse der SSADH-Missense-Varianten in Zellen durchzuführen, in denen zuvor das endogene *ALDH5A1*-Gen ausgeschaltet wurde (Brennenstuhl et al., 2020; Didiášová et al., 2020; Pop et al., 2020), wurden dazu in meiner Arbeit SSADH-Knock-Out-Zellen verwendet, die folglich keine endogene SSADH exprimierten (Brennenstuhl et al., 2020).

5.1.1 Expression der untersuchten SSADH-Missense-Varianten

Nachdem die SSADH-Missense-Varianten durch zielgerichtete Mutagenese produziert und anschließend transient exprimiert wurden, konnte mithilfe der Western-Blot-Analyse die SSADH-Expression beurteilt werden. Die untersuchten SSADH-Missense-Varianten

Gly268Glu, Gly284Asp, Phe419Leu und Gly441Arg zeigten alle eine SSADH-Expression im Western Blot (siehe Abbildung 4). Die SSADH-Menge war bei den Varianten Gly268Glu, Phe419Leu und Gly441Arg vergleichbar mit der der Wildtyp-SSADH. Bei der SSADH-Gly284Asp-Variante wurde im Vergleich zur Wildtyp-SSADH ein schwächeres SSADH-Signal im Western Blot detektiert, was auf eine geringere Expression dieser SSADH-Variante hindeutet. Da das Experiment mehrfach durchgeführt wurde und alle Versuche eine geringere Expression der SSADH-Gly284Asp-Variante ergaben, konnte das Auftragen einer geringeren Proteinmenge ausgeschlossen werden. Auch die Ladekontrolle mit GAPDH bestätigte in allen vier Experimenten, dass beim SSADH-Wildtyp und allen SSADH-Varianten eine ähnliche Proteinmenge aufgetragen wurde. Da die Substitution Gly284Asp die NAD⁺-Bindungsdomäne betrifft, die wahrscheinlich aufgrund ihrer Größe und Faltung zur Stabilität des SSADH-Proteins beiträgt (Brennenstuhl et al., 2020), könnte der Austausch der kleinen Aminosäure Glycin durch die größere und negativ beladene Aminosäure Aspartat die korrekte Faltung des Enzyms beeinflussen und dadurch die Stabilität der Gly284Asp-Variante reduzieren. Dies hätte einen vorzeitigen Abbau dieser Variante zur Folge, woraus das schwächere SSADH-Signal im Western Blot resultiert haben könnte.

Bei der Variante SSADH-Gly441Arg erschien das SSADH-Signal in allen Versuchen unterhalb des erwarteten 54 kDa Signals. Dies war auch in den Experimenten von DiBacco et al. der Fall, die ebenfalls ein geringeres Molekulargewicht für die Variante Gly441Arg feststellten (DiBacco et al., 2020). Sie vermuteten, dass dies auf die Instabilität und den teilweisen Abbau des mutierten Proteins zurückzuführen sein könnte. Jedoch konnten Veränderungen der posttranslationalen Modifikation auch nicht ausgeschlossen werden (DiBacco et al., 2020). Die Ergebnisse meiner Arbeit stützen diese These.

Auch in der Immunfluoreszenzfärbung konnte bei allen vier in meiner Arbeit untersuchten SSADH-Missense-Varianten eine SSADH-Expression detektiert werden (siehe Abbildung 10). Hierbei war die SSADH-Menge der Varianten Gly268Glu, Phe419Leu und Gly441Arg vergleichbar mit der der Wildtyp-SSADH. Nur die SSADH-Gly284Asp-Variante zeigte eine verminderte SSADH-Expression. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen aus der Western-Blot-Analyse überein (vergleiche Abbildung 4).

In der Immunfluoreszenzfärbung waren ferner alle vier SSADH-Varianten in den Mitochondrien lokalisiert (siehe Abbildung 10). Der mitochondriale Import scheint also bei allen Varianten funktioniert zu haben. Die Immunfluoreszenzfärbung wird in den Kapiteln 5.1.3 und 5.1.4 ausführlicher diskutiert.

5.1.2 Aktivität der untersuchten SSADH-Missense-Varianten

Mithilfe des SSADH-Aktivitätsassays konnte bei keiner der vier untersuchten SSADH-Missense-Varianten eine relevante Restaktivität gemessen werden (siehe Abbildung 5). Um dafür mögliche Ursachen zu erwägen, ist es sinnvoll, zu betrachten, welche veränderten Eigenschaften die substituierte Aminosäure hat und welche Stelle bzw. Domäne im SSADH-Protein von der Substitution betroffen ist.

Die Aminosäure Gly268 ist an der Bildung der Bindungstasche der Adeninbase des Kofaktors NAD⁺ beteiligt. Ein Aminosäureaustausch an dieser Stelle beeinträchtigt wahrscheinlich die Kofaktorbindung, wodurch die katalytische Aktivität der SSADH gestört wird (Y.-G. Kim et al., 2009). Der Austausch des kleinen Glycins mit dem größeren, negativ geladenen Glutamat könnte die Bildung der „dynamischen katalytischen Schleife“ (Y.-G. Kim et al., 2009) behindern. Die „dynamische katalytische Schleife“ beschreibt die Konformationsänderung zwischen der oxidierten, inaktiven und der reduzierten, aktiven Form des SSADH-Proteins. In der inaktiven Form ist das aktive Zentrum von SSADH durch eine Disulfidbrücke nicht zugänglich. Durch die Spaltung dieser Disulfidbrücke ändert sich die Konformation des Enzyms, sodass das Substrat SSA und der Kofaktor NAD⁺ ans aktive Zentrum binden können (Y.-G. Kim et al., 2009). Die Störung dieser Dynamik durch den Aminosäureaustausch könnte die Aktivität der SSADH behindern. Außerdem könnte der Aminosäureaustausch auch die korrekte Faltung des Proteins und dadurch die Stabilität und Aktivität negativ beeinflussen. Akaboshi et al. stellten bereits fest, dass die Substitution Gly268Glu zu einem fast vollständigen Verlust der SSADH-Aktivität auf weniger als 1% der Wildtyp-Aktivität führte, wenn diese Variante durch zielgerichtete Mutagenese produziert und transient in HEK293-Zellen exprimiert wurde (Akaboshi et al., 2003). Allerdings erfolgte diese Messung in HEK293-Zellen ohne vorherigen SSADH-Knock-Out. Die in meiner Arbeit durchgeführte Messung in SSADH-Knock-Out-Zellen, die keine endogene SSADH exprimierten, bestätigt den Mangel an Restaktivität der SSADH-Gly268Glu-Variante. Zudem wurde von Akaboshi et al. nur die verbliebene Enzymaktivität bestimmt (Akaboshi et al., 2003). Das Expressionsniveau und die subzelluläre Lokalisation wurden jedoch außer Acht gelassen, anders als in meiner Arbeit.

Die Aminosäure Gly284 ist ebenfalls an der Bindung des Kofaktors NAD⁺ beteiligt. Die Substitution mit Aspartat könnte ähnliche Folgen auf die Kofaktorbindung, die Bildung der „dynamischen katalytischen Schleife“ sowie die Oligomerisierung haben, wie es für die Variante Gly268Glu beschrieben wurde. Die Aktivität dieser SSADH-Variante wurde ebenfalls bereits in HEK293-Zellen ohne vorherigen SSADH-Knock-Out bestimmt. Dabei

ergab sich mit 3% Restaktivität, verglichen mit der Wildtyp-Aktivität, eine tiefgreifend reduzierte SSADH-Aktivität (Pop et al., 2020), was mit den Messungen aus meiner Arbeit übereinstimmt.

Auch für die SSADH-Gly441Arg-Variante wurde bereits in HEK293-Zellen ohne vorherigen SSADH-Knock-Out die Enzymaktivität bestimmt. DiBacco et al. maßen ebenfalls keine verbliebene SSADH-Aktivität für diese Variante (DiBacco et al., 2020), was mit den in SSADH-Knock-Out-Zellen gemessenen Ergebnissen aus meiner Arbeit übereinstimmt.

Für die Substitution Phe419Leu liegen bisher keine Daten in der Literatur vor. Die Aminosäuren Phe419 und Gly441 befinden sich in der katalytischen Domäne der SSADH. Missense-Mutationen, welche die katalytische Domäne betreffen, können sich in verschiedenen Weisen auf die Funktionalität der SSADH auswirken. Zum einen kann die Substratbindung beeinträchtigt werden. Leo et al. führten In-silico-Proteinmodellierungsanalysen für die Missense-Mutationen Gly409Asp und Val500Leu, die sich ebenfalls in der katalytischen Domäne der SSADH befinden, durch (Leo et al., 2017). Dabei stellten sie fest, dass die Substitution von Valin mit der um eine Methylgruppe längeren Seitenkette von Leucin die SSA-Bindungsstelle teilweise blockierte. Durch die veränderte Struktur wurde die SSA-Bindungsstelle destabilisiert, was zu einer fast kompletten Beeinträchtigung der Enzymaktivität führte. Für die Substitution Gly409Asp zeigten die Forschenden, dass die unmittelbare Nähe des substituierten sauren Aspartats zum sauren Glutamat an Stelle 421 eine lokale Instabilität erzeugte, die sich über das gesamte Protein ausbreiten und somit die Enzymaktivität tiefgreifend beeinträchtigen konnte (Leo et al., 2017). Auch Kim et al. beschrieben, dass die Substitution Gly409Asp zu einer Destabilisierung der SSADH führte (Y.-G. Kim et al., 2009). Zum anderen zeigten sie anhand der Substitution Asn335Lys, die an der Bildung der „dynamischen katalytischen Schleife“ beteiligt ist, dass der Austausch einer Aminosäure in der katalytischen Domäne die Umgebung des aktiven Zentrums stark störte und die Dynamik der „dynamischen katalytischen Schleife“ verringerte (Y.-G. Kim et al., 2009). Die andersartigen Eigenschaften der substituierten Aminosäuren können also nicht nur die Substratbindung, sondern auch die Konformation sowie die besonderen Eigenschaften der SSADH (wie die Bildung der „dynamischen katalytischen Schleife“) beeinflussen. Dadurch können die Stabilität und Funktion des Enzyms schwerwiegend beeinträchtigt werden. Jedoch kommt es scheinbar nicht zu schweren Faltungsdefekten, bei denen ein Abbau erwartet werden würde, da die meisten im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Mutanten exprimiert wurden.

Bei der Substitution Phe419Leu wird die Aminosäure Phenylalanin an Stelle 419 durch Leucin ausgetauscht. Phenylalanin enthält im Gegensatz zu Leucin einen Benzolring. Der fehlende Benzolring könnte Auswirkungen auf die Struktur und die Eigenschaften der SSADH haben. Der Austausch der kleinen Aminosäure Glycin durch das größere Aspartat an Stelle 441 könnte sich ähnlich, wie die Substitution Gly409Arg, auf die Stabilität der SSADH auswirken. Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen, dass beide SSADH-Varianten bei transienter Überexpression normal exprimiert wurden. Beide Substitutionen destabilisierten das SSADH-Protein also nicht vollständig. Die SSADH-Aktivität war jedoch bei beiden tiefgreifend reduziert.

Um die Auswirkungen der Missense-Mutationen auf die Substratbindung und die Struktur der SSADH genauer beurteilen zu können, müssten die in meiner Arbeit untersuchten Substitutionen mithilfe der Kristallstruktur von Kim et al. im SSADH-Protein lokalisiert (Y.-G. Kim et al., 2009) und In-silico-Proteinmodellierungsanalysen, wie von Leo et al. beschrieben (Leo et al., 2017), durchgeführt werden.

Generell ist noch anzumerken, dass der in meiner Arbeit durchgeführte SSADH-Aktivitätsassay nicht zur präzisen Messung sehr niedriger SSADH-Aktivitäten anwendbar ist (Erfahrung der AG Tikkanen). Dies wäre z. B. bei den Fibroblasten von an SSADH-Mangel Erkrankten der Fall, sodass keine akkuraten prozentualen Restaktivitäten darstellen werden können. Die Versuche wurden mit Zelllysaten, die mit einem anderen Puffer hergestellt wurden, wiederholt. Dieser Puffer sollte durch die Spaltung der Disulfidbrücken im aktiven Zentrum den Zugang von SSADH zu diesem erleichtern und somit die Umsetzung des Substrats SSA verbessern (AG Tikkanen, unveröffentlicht). Die Ergebnisse waren jedoch ähnlich zu dem hier verwendeten Assay.

5.1.3 Subzelluläre Lokalisation der untersuchten SSADH-Missense-Varianten sowie Beurteilung der Mitochondrien

Um die subzelluläre Lokalisation von SSADH zu bestimmen und den Zustand der Mitochondrien zu beurteilen, wurden in dieser Arbeit in nicht-transfizierten und transfizierten Flp-InTM HEK293-Zellen SSADH, die Mitochondrien und die Zellkerne mithilfe von Immunfluoreszenzfarbstoffen gefärbt. Zunächst wurden Flp-InTM HEK293-Zellen vor dem SSADH-Knock-Out betrachtet (siehe Abbildung 9). Diese Zellen exprimierten endogene SSADH, die in den Mitochondrien lokalisiert war. Die Mitochondrien sahen normal aus und bildeten netzwerkartige Strukturen. Nach dem SSADH-Knock-Out war ein schwächeres SSADH-Signal sichtbar. Durch den Knock-Out sollte theoretisch keine SSADH mehr exprimiert werden. Der verwendete SSADH-Antikörper ist aber offensichtlich bei

der Immunfluoreszenzfärbung nicht 100% spezifisch, sodass wahrscheinlich andere, mit SSADH homologe Aldehyd-Dehydrogenasen in den Mitochondrien angefärbt wurden. Die Mitochondrien sahen bei den SSADH-KO-Zellen fragmentiert aus, was wahrscheinlich mit dem SSADH-Knock-Out zusammenhängt und in Kapitel 5.1.4 näher exploriert wird.

Anschließend wurden transfizierte Flp-InTM HEK293-SSADH-KO-Zellen beurteilt. Generell ist bei der transienten Transfektion zu beachten, dass heterogene Zellpopulationen entstehen. Das heißt, dass nicht unbedingt alle Zellen transfiziert worden sein müssen. Außerdem haben die transient transfizierten Zellen aufgrund des starken viralen Promotors im Expressionsvektor eine höhere Genexpression, verglichen mit der endogenen Expression. Es kommt also zu einer Überexpression an SSADH.

Wie bereits unter Kapitel 5.1.1 beschrieben, konnte in der Immunfluoreszenzfärbung bei allen vier untersuchten SSADH-Missense-Varianten eine SSADH-Expression detektiert werden (siehe Abbildung 10). Hierbei war die SSADH-Menge der SSADH-Gly284Asp-Variante jedoch vermindert. Die Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen aus der Western-Blot-Analyse überein (vergleiche Abbildung 4). Außerdem waren sowohl der SSADH-Wildtyp als auch alle vier SSADH-Varianten in den Mitochondrien lokalisiert. In den mit dem SSADH-Wildtyp transfizierten Zellen sahen die Mitochondrien normal aus und bildeten ein Netzwerk. Nach der Transfektion mit den vier SSADH-Missense-Varianten sahen die Mitochondrien zum Teil fragmentiert aus und als hätten sie ihr Netzwerk verloren. Dies könnte durch die verminderte Aktivität der SSADH und den damit verbundenen Stoffwechselstörungen verursacht worden sein. Unter Kapitel 5.1.4 wird näher auf diese Hypothese eingegangen.

In der Vergangenheit wurde die Immunfluoreszenzfärbung bereits von Menduti et al. für SSADH angewandt (Menduti et al., 2020). Die Forschenden untersuchten die intrazelluläre Lokalisation vom SSADH-Wildtyp und einer dreifach mutierten SSADH-Variante (Gly36Arg/ His180Tyr/ Pro182Leu) in transfizierten U87-Glioblastom-Zellen. Die Zellen wurden neben der SSADH für den mitochondrialen Marker TOM20 immungefärbt. Die dreifach mutierte SSADH-Variante war in der durchgeführten Immunfluoreszenzfärbung in den Mitochondrien lokalisiert. Jedoch kam sie in einer sehr geringen Menge vor. Zusätzlich wiesen die Fragmentierung und Depolarisierung der Mitochondrien auf das Auftreten mitochondrialer Schäden hin. Die Forschenden vermuteten, dass die verringerte Expression und die verminderte Aktivität der SSADH-Variante das Ergebnis eines synergistischen Effekts ist. Dieser wird möglicherweise durch eine strukturelle Veränderung durch die Substitutionen His180Tyr und Pro182Leu sowie durch einen verringerten

mitochondrialen Import verursacht, da die Substitution Gly36Arg die mitochondriale Transportsequenz betrifft (Menduti et al., 2020). Die in meiner Arbeit untersuchten SSADH-Varianten betreffen nicht die mitochondriale Transportsequenz, sondern die NAD⁺-Bindungs- oder die katalytische Domäne. Deshalb ist kein gestörter mitochondrialer Import zu vermuten, was sich in der Immunfluoreszenzfärbung auch bestätigt hat. Da die Aktivität bei allen vier Varianten tiefgreifend reduziert ist, kann jedoch von dem Auftreten struktureller Veränderungen ausgegangen werden (vergleiche Abbildung 5 und Kapitel 5.1.2).

5.1.4 Mitochondriale Schäden durch Akkumulation von Metaboliten und oxidativen Stress

Zusammenfassend zeigte sich, dass alle in meiner Arbeit untersuchten SSADH-Missense-Varianten exprimiert wurden. Dabei war die Variante Gly284Asp jedoch in einem geringeren Maß vorhanden (Western Blot, Färbung). Alle Varianten gelangten in die Mitochondrien (Färbung). Die Aktivität, gemessen anhand der Umsetzung des Substrats SSA, war jedoch bei allen hier untersuchten SSADH-Missense-Varianten tiefgreifend reduziert. Die mangelnde SSADH-Enzymaktivität führt wahrscheinlich, wie es für das Krankheitsbild des SSADH-Mangels beschrieben wird (Didiášová et al., 2020; Malaspina et al., 2016), zur Störung des GABA-Abbaus und zur Anhäufung von GABA und GHB sowie weiterer Metaboliten. Die kumulative Wirkung dieser Metaboliten könnte zur Schädigung der Mitochondrien beigetragen haben, die mithilfe der Immunfluoreszenzfärbung beobachtet wurde. Dies würde auch die fragmentierten Mitochondrien in den SSADH-Knock-Out-Zellen erklären, da sich in diesen aufgrund der mangelnden SSADH-Aktivität ebenfalls Metaboliten anhäufte.

An der Pathogenese des SSADH-Mangels ist oxidativer Stress beteiligt und es besteht die Hypothese, dass eine verringerte SSADH-Enzymaktivität zu zerebralem oxidativen Stress führt und die Geschwindigkeit der Hirnschädigung beschleunigen kann (Rango et al., 2008). Durch die verringerte SSADH-Aktivität akkumulieren Metaboliten, die ebenfalls mit der Entstehung von oxidativen Schäden bei SSADH-Mangel in Verbindung gebracht werden können (Didiášová et al., 2020; K.-J. Kim et al., 2011; Latini et al., 2007; Malaspina et al., 2016; Sauer et al., 2007). Es wurde bereits gezeigt, dass die exogene Verabreichung von GHB an Ratten oxidative Schäden im Kortex verursachte (Sgaravatti et al., 2007). Außerdem beeinträchtigt GHB wahrscheinlich den mitochondrialen Stoffwechsel durch die Hemmung der Lipidsynthese (Silva et al., 1999). SSA selbst ist ein reaktives Aldehyd, was bei Akkumulation zu oxidativen Schäden führen kann (Malaspina

et al., 2016). Die Metaboliten 4,5-Dihydroxyhexansäure und 4-Hydroxynonenal akkumulieren auch bei von SSADH-Mangel Betroffenen und spielen wahrscheinlich eine Rolle bei der Entstehung von oxidativen Stress (Malaspina et al., 2016). Diese Substanzen könnten ebenfalls zur Schädigung der Mitochondrien führen, wie sie in dieser Arbeit beobachtet wurde.

Oxidativer Stress wird im Allgemeinen als ein Ungleichgewicht definiert, wobei die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gegenüber der antioxidativen Abwehr begünstigt ist. Die Mitochondrien sind die wichtigste intrazelluläre Quelle für ROS. Jedoch sind die Mitochondrien nicht nur eine wichtige Quelle für die Erzeugung von ROS, sondern auch ein empfindliches Ziel für die schädlichen Auswirkungen von Sauerstoffradikalen (Orrenius et al., 2007). Deshalb resultierte womöglich aus der mangelnden SSADH-Aktivität der untersuchten Missense-Varianten und der damit verbundenen Anhäufung schädlicher Metaboliten oxidativer Stress, der die Mitochondrien angegriffen hat. Dadurch erschienen diese in Zellen ohne SSADH oder mit SSADH-Missense-Varianten, die keine oder eine sehr geringe Restaktivität aufweisen, in der Immunfluoreszenzfärbung fragmentiert oder dysmorph und netzwerklos.

5.2 Etablierung des Flp-In™ Systems für SSADH

5.2.1 Das Flp-In™ System: transiente versus stabile Transfektion

Bisher wurde in unserer Arbeitsgruppe, sowie in vielen weiteren Studien, die Charakterisierung der verschiedenen SSADH-Varianten mithilfe des transienten Transfektionsmodells durchgeführt (siehe unter anderem Akaboshi et al., 2003; Blasi et al., 2002; Brennenstuhl et al., 2020; DiBacco et al., 2020; Leo et al., 2017; Menduti et al., 2018; Pop et al., 2020). Bei der transienten Transfektion wird ein Gen temporär in eukaryotische Zellen eingebracht. Dabei wird das Gen nicht ins Genom der Wirtszellen integriert, sondern befindet sich episomal in Form einer ringförmigen Plasmid-DNA im Zellkern. Diese Plasmid-DNA wird vermehrt transkribiert, was zu einer hohen mRNA-Kopienzahl und damit zur Überexpression des entsprechenden Proteins führt. Die extrachromosomal vorliegende Plasmid-DNA wird in einem Zeitraum von wenigen Tagen durch zelluläre Nukleasen abgebaut, wodurch die Transgen-Expression zeitlich begrenzt ist (Colosimo et al., 2000). Vorteile der transienten Transfektion sind die einfache und schnelle Anwendung (Didiášová et al., 2020; Pop et al., 2020), während unter anderem die schwierige Reproduzierbarkeit, die geringe Effizienz sowie die Heterogenität Nachteile dieser Methode darstellen (Jensen et al., 2020).

Um eine genauere Charakterisierung der bei den Betroffenen bestehenden SSADH-Varianten durch die Darstellung des *ALDH5A1*-Genotyps zu ermöglichen, wurde in meiner Arbeit ein stabiles Transfektionssystem – das Flp-In™ System – in der AG Tikkanen etabliert. Mithilfe des Flp-In™ Systems lässt sich ein beliebiges Gen dauerhaft ins Genom einer geeigneten Zelllinie integrieren. Dadurch entsteht eine homogene Zellpopulation, welche die gleiche Anzahl von Kopien eines spezifischen rekombinanten Konstrukts trägt. Damit stellt dieses System, im Gegensatz zur transienten Transfektion, ein robustes Expressionssystem dar, weil die Expression des rekombinanten Proteins nicht je nach Transfektionseffizienz variiert. Dies ermöglicht eine genauere Untersuchung der rekombinanten Proteine und bildet eine physiologischere Untersuchungssituation nach. Außerdem erlaubt dieses System den Vergleich der SSADH-Varianten mit einer isogenen Kontrolle (Pop et al., 2020).

Pop et al. nutzten das Flp-In™ System bereits zur Untersuchung verschiedener SSADH-Missense-Varianten (Pop et al., 2020). Die Forschenden untersuchten zunächst 34 SSADH-Missense-Varianten in einem transienten Transfektionsmodell. Um die sieben Varianten, bei denen mithilfe der transienten Transfektion eine Restaktivität von über 25% gemessen wurde, besser bewerten zu können, wiederholten sie die SSADH-Aktivitätsmessung mit dem stabilen Flp-In™ System. Dabei zeigte sich für die SSADH-Missense-Variante Asn493Ser eine drastische Verringerung der Restaktivität im Vergleich zu den Ergebnissen im transienten Expressionsmodell (Pop et al., 2020). Das natürlichere Expressionslevel im Rahmen der stabilen Transfektion ermöglichte wahrscheinlich die nachträgliche Einstufung dieser Variante als pathogen. Dies hängt womöglich damit zusammen, dass eine sehr hohe Überexpression, wie sie durch die transiente Transfektion erzeugt wurde, zu einem veränderten Verhalten des Proteins, z. B. durch Aggregation oder Sättigung der mitochondrialen Transportmechanismen, führte (Didiášová et al., 2020). Da die transiente Transfektion von Pop et al. in HEK-Zellen ohne vorherigen SSADH-Knock-Out erfolgte (Pop et al., 2020), ist es außerdem möglich, dass das Wildtyp-SSADH-Protein mit der SSADH-Varianten Oligomere bildete, da SSADH ein tetrameres Protein ist (Ryzlak & Pietruszko, 1988). Dies könnte ebenfalls zu einem abweichenden Verhalten des SSADH-Enzyms geführt haben. Ein Nachteil der stabilen Transfektion war der höhere Zeitaufwand mit zwei Monaten im Vergleich zu der circa eine Woche dauernden transienten Transfektion (Pop et al., 2020). Auch in meiner Arbeit war die stabile Transfektion mit circa zwei Monaten wesentlich zeitaufwendiger als die transiente Transfektion.

5.2.2 Verwendung von SSADH-Knock-Out-Zellen

Bei der Untersuchung der Auswirkungen von SSADH-Varianten mithilfe der transienten oder stabilen Transfektion hat es sich als sinnvoll erwiesen, Zellen zu verwenden, in denen zuvor das endogene *ALDH5A1*-Gen ausgeschaltet wurde. Dadurch exprimierten die Zellen keine endogene SSADH und in den Experimenten wurde nur die Funktionalität der untersuchten SSADH-Variante widerspiegelt (Brennenstuhl et al., 2020; Didiášová et al., 2020; Pop et al., 2020). Unsere Arbeitsgruppe generierte HEK293T-SSADH-KO-Zellen, die zur Analyse einer SSADH-Missense-Variante benutzt wurden (Brennenstuhl et al., 2020). Diese HEK293T-SSADH-KO-Zellen wurden auch in meiner Arbeit für die transiente Transfektion mit anschließender Analyse der SSADH-Missense-Varianten genutzt.

Pop et al. erzeugten mithilfe der CRISPR/Cas-Technologie eine SSADH-defiziente HEK293-Flp-In-Zelllinie, in der anschließend SSADH-Missense-Varianten stabil exprimiert werden konnten (Pop et al., 2020). Auch in meiner Arbeit wurde mithilfe der CRISPR/Cas-Technik das endogene, für die SSADH kodierende *ALDH5A1*-Gen in den zum Flp-In™-System gehörigen Flp-In™ HEK293-Zellen ausgeschaltet. Der SSADH-Knock-Out wurde mittels Western Blot und Sequenzierung überprüft (siehe Abbildung 6 und Abbildung 8). Die Sequenzierung ergab für sechs Klone einen heterozygoten SSADH-Knock-Out. Das bedeutet, dass auf verschiedenen Chromosomen unterschiedliche Mutationen vorlagen. Ein homozygoter SSADH-Knock-Out-Klon, bei dem das *ALDH5A1*-Gen auf beiden Allelen die gleiche Mutation trägt, war bei zwei Klonen gelungen; in Klon 1/1 durch die Insertion, in Klon 2/2 durch die Deletion einer Base im Exon 3 des *ALDH5A1*-Gens. Sowohl durch die Insertion als auch durch die Deletion hat sich das Leseraster hinter der Mutation verschoben und es kam zu einer veränderten Polypeptidkette. In der Regel entsteht dadurch früher oder später ein Stoppcodon, das zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinsequenz führt (Schaaf & Zschocke, 2013). Dadurch wird die endogene SSADH nicht korrekt exprimiert und vorzeitig abgebaut.

5.2.3 Stabile Expression der Wildtyp-SSADH

Für die stabile Expression der Wildtyp-SSADH in den Flp-In™ HEK293-SSADH-KO-Zellen wurde das *ALDH5A1*-Gen in das pcDNA5/FRT-Plasmid integriert. Danach wurden die neu hergestellten hSSADH-pcDNA5/FRT-Plasmide mittels Western Blot und SSADH-Aktivitätsassay überprüft. Im Western Blot erschien bei dem hSSADH-pcDNA5/FRT-Plasmid Klon 3 ein deutliches SSADH-Signal (siehe Abbildung 14). Im SSADH-Aktivitätsassays konnte gezeigt werden, dass die SSADH-Aktivität von dem

transient transfizierten hSSADH-pcDNA5/FRT-Plasmid Klon 3 vergleichbar mit dem transient transfizierten hSSADH-5'UTR-pcDNA3-Plasmid war (siehe Abbildung 15).

Das hier hergestellte hSSADH-pcDNA5/FRT-Plasmid konnte damit stabil in die Flp-InTM HEK293-SSADH-KO-Zellen transfiziert werden. Anschließend wurden die Zellen auf die Expression von SSADH mittels Western Blot untersucht. Von den mit der Wildtyp-SSADH stabil transfizierten Flp-InTM HEK293-SSADH-KO-Zellen exprimierten manche Klone SSADH (siehe Abbildung 17). Der SSADH-Knock-In ist jedoch nur in den Zellen gelungen, in denen das endogene *ALDH5A1*-Gen zuvor mit der gRNA1 ausgeknockt wurde.

5.2.4 Nutzen des Flp-InTM Systems

Wie bereits zuvor beschrieben, stellt das Flp-InTM System ein stabiles Transfektionssystem dar, mit dem genomische SSADH-Varianten, die den Genotyp der Betroffenen widerspiegeln, hergestellt und mit geeigneter isogener Kontrollen verglichen werden können (Didiášová et al., 2020; Pop et al., 2020). Bei von SSADH-Mangel Betroffenen treten Mutationen im *ALDH5A1*-Gen häufig auch als compound heterozygote Mutationen auf (DiBacco et al., 2020). Compound heterozygot beschreibt das Vorliegen von zwei unterschiedlich mutierten Allelen des gleichen Gens (Schaaf & Zschocke, 2013). Durch eine Modifikation des Flp-InTM Systems wäre die bisher schwierige, gleichzeitige, stabile Überexpression zweier Gene bzw. Varianten möglich (Jensen et al., 2020). Dies ist deshalb wegweisend, da ein Gegenstand der aktuellen Forschung ist, inwieweit das Vorhandensein von homozygoten oder compound heterozygoten Varianten des *ALDH5A1*-Gens einen direkten Einfluss auf die SSADH-Proteinexpression und insbesondere auf die Enzymaktivität hat (Brennenstuhl et al., 2020; Didiášová et al., 2020).

Außerdem wurden für SSADH-Mangel auch dominant negative Effekte beschrieben (Dervent et al., 2004). Hierbei unterdrückt eine dominante Mutation die Wirkung des Wildtyp-Allels (Schaaf & Zschocke, 2013). Durch den Aufbau der SSADH als Homotetramer kann ein verkürztes Polypeptid, das aus dem mutierten Allel generiert wird, eine dominant negative Wirkung auf andere „Wildtyp“-Polypeptide ausüben, wodurch es zu einem erheblichen Verlust der Enzymaktivität kommen kann. Bisherige Ergebnisse sprechen jedoch gegen ein völliges Fehlen der SSADH-Aktivität (Dervent et al., 2004). Sowohl bei homozygoten und compound heterozygoten als auch beim dominant negativen Effekt bieten die verbliebene SSADH-Expression bzw. -Aktivität Potenzial für innovative therapeutische Optionen, wie pharmakologische Chaperone. Diese können in der Lage sein, die Enzymaktivität zu erhöhen (Brennenstuhl et al., 2020; Didiášová et al., 2020).

Da die Therapie des SSADH-Mangels bislang nur symptomatisch erfolgt (Lee et al., 2022), kommt der Erforschung einer kurativen Therapie eine große Bedeutung zu. Durch das immer bessere Verständnis der Pathophysiologie dieser Stoffwechselstörung entsteht ein immer größer werdendes Potenzial für eine kurative Behandlung (Didiášová et al., 2020). Dabei gibt es Therapieformen, wie die GHB- oder GABA-Rezeptorantagonisten sowie Gen- und Enzymersatztherapien, die bei allen Betroffenen angewendet werden können (Didiášová et al., 2020; Schreiber et al., 2021; Vogel et al., 2018a). Andere Therapieformen funktionieren nur bei bestimmten Mutationen. Dazu zählen pharmakologische Chaperone für Missense-Varianten oder Read-Through-Substanzen für Nonsense-Varianten (Didiášová et al., 2020).

Pharmakologische Chaperone sind kleine Moleküle, die an Zielproteine binden, um diese zu stabilisieren. Sie unterstützen die korrekte Faltung sowie den anschließenden Transport der krankheitsverursachenden Proteinvariante an ihren Bestimmungsort (Leidenheimer, 2018). In der Regel sind pharmakologische Chaperone nicht in der Lage, jedem einzelnen Zielmolekül, sondern nur einem kleinen Teil der Zielproteine, zur korrekten Faltung zu verhelfen (Didiášová et al., 2020). Dies könnte jedoch bereits zu einem erheblichen therapeutischen Nutzen führen, wenn eine geringe Erhöhung der Aktivität der SSADH-Variante einen therapeutischen Effekt erzielen könnte. Da heterozygote Träger, die nur ein defektes Allel besitzen, keine Symptome haben (Didiášová et al., 2020), könnte bereits eine geringe SSADH-Aktivität ausreichen, um eine Verbesserung bei den Betroffenen zu erzielen. Außerdem könnten bei compound heterozygoten Erkrankten beide Varianten bereits von der Korrektur einer Variante profitieren, da SSADH ein Tetramer bildet. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass die Faltung von einem Polypeptid, das Dimere bildet und eine krankheitsverursachende Substitution trägt, deutlich verbessert wurde, wenn sie zusammen mit dem Wildtyp-Polypeptid exprimiert wurde (Banning et al., 2018). Dadurch ließen sich die SSADH-Aktivität und damit die Symptome der Betroffenen möglicherweise verbessern.

Mithilfe des Flp-InTM Systems könnte man also die Auswirkungen von homozygoten oder compound heterozygoten Varianten des *ALDH5A1*-Gens auf die SSADH-Expression und -Aktivität untersuchen, um mögliche Therapieoptionen, wie die pharmakologischen Chaperone, zu identifizieren. Das Flp-InTM System eignet sich jedoch nicht zur Untersuchung aller Varianten. Zum Beispiel lassen sich Varianten, die einen Einfluss auf das Spleißen haben, nur als Missense-Varianten exprimieren. Ein besserer Charakterisierungsansatz für diese Mutationen wären die Analyse der mRNA von Zellen von an SSADH-Mangel erkrankten Personen oder die Anwendung von Minigenen, wenn kein

Material von Betroffenen zur Verfügung steht (Banning & Tikkanen, 2021; Pop et al., 2020). Minigene sind Vektoren, mit denen sich die Auswirkungen von Mutationen auf den Spleißprozess nachweisen lassen. Der Minigen-Vektor enthält meistens mehrere Exons sowie die dazwischen liegenden Intron-Sequenzen. Nach der Herstellung wird der Minigen-Vektor in eine etablierte Zelllinien transfiziert, sodass anschließend das Spleißmuster des Minigens analysiert werden kann (Banning & Tikkanen, 2021; Desviat et al., 2012).

Nach der Charakterisierung der SSADH-Varianten sollte die Wirksamkeit der verschiedenen Therapieansätze vor der klinischen Anwendung in geeigneten Zellkulturmodellen für jede einzelne Variante getestet werden (Didiášová et al., 2020). In der Arzneimittelforschung sind Zelllinien, die bestimmte Gene transient oder stabil überexprimieren, ein wichtiges Screening-Instrument (Jensen et al., 2020). Dabei kann die Therapieeffektivität in dem stabilen Transfektionsmodell bereits besser als im transienten beurteilt werden. Dies hängt damit zusammen, dass durch die stabile Expression der SSADH-Variante ohne variierende Transfektionseffizienz eventuelle Fehler während der Versuchsdurchführung beglichen und somit repräsentativere Ergebnisse gewonnen werden können (Didiášová et al., 2020; Pop et al., 2020). Mithilfe des Flp-In™ Systems ließen sich also nicht nur die SSADH-Varianten charakterisieren, sondern auch Therapieoptionen testen.

Die Wirkstoffe bzw. Wirkstoffkombination, die einen positiven Effekt für eine bestimmte Variante bei Überexpression zeigen, sollten allerdings im Anschluss in primären Zellen, die von an SSADH-Mangel Erkrankten stammen, wie Fibroblasten, untersucht werden, um aussagekräftigere Schlussfolgerungen für die Behandlung am Menschen zu treffen. Anschließend müssen Studien an Tieren und an SSADH-Mangel Erkrankten folgen, um letztendlich Erkenntnisse über Nebenwirkungen, Interaktionen oder die Bioverfügbarkeit treffen zu können und zu entscheiden, ob sich ein Medikament für den Einsatz an Betroffenen eignet.

5.3 Künftiger Knock-In von SSADH-Missense-Mutationen

Nachdem der Knock-In des SSADH-Wildtyps in die Flp-In™ HEK293-SSADH-KO-Zellen erfolgreich war, können in Zukunft auch SSADH-Varianten mit dem Flp-In™ System charakterisiert werden. Dazu müssen diese Varianten in das pcDNA5/FRT-Expressionsplasmid eingebaut werden. Dies wurde in meiner Arbeit bereits mit den vier in dieser Arbeit behandelten Missense-Mutationen und vier weiteren pathogenen SSADH-Missense-Varianten durchgeführt. Die vier weiteren Mutationen wurden ausgesucht, da sie bei einem compound heterozygot erkrankten Patienten aufgetreten sind. Die beiden Eltern sind nicht verwandt, haben aber beide italienische Wurzeln. Das maternale Allel trägt die Varianten Asn255Asp und His180Tyr und das paternale Allel die Substitution Cys93Phe (R. Tikkanen, nicht veröffentlichte Daten). Die Funktionalität der neu hergestellten pcDNA5/FRT-Konstrukte wurde mithilfe der transienten Transfektion in HEK293T-SSADH-KO-Zellen und anschließendem Western Blot und SSADH-Aktivitätsassay überprüft (siehe Abbildung 18 und Abbildung 19).

5.3.1 SSADH-Cys93Phe

Bei der SSADH-Variante Cys93Phe, die in mehreren scheinbar nicht verwandten Familien unterschiedlicher ethnischer Herkunft auftritt (Didiášová et al., 2020), wurde im Western Blot ein schwaches SSADH-Signal detektiert, was auf eine geringere Expression dieser Variante hindeutet. In der SSADH-Aktivitätsmessung wurde keine Restaktivität dieser Variante gemessen. Auch Akaboshi et al. stellten bei transients Überexpression in HEK-Zellen ohne SSADH-Knock-Out einen fast vollständigen Verlust der SSADH-Aktivität mit ungefähr 3% der Wildtyp-Aktivität fest (Akaboshi et al., 2003).

Die Variante Cys93Phe befindet sich in der NAD⁺-Bindungsdomäne. Laut Kim et al. betrifft die Substitution eine tief im SSADH-Protein vergrabene, für die Proteinstruktur wichtige Stelle und führt deshalb zu einem Verlust oder einer Verringerung der Proteinstabilität (Y.-G. Kim et al., 2009). Wahrscheinlich beeinflusst der Austausch des kleinen Cysteins mit dem größeren Phenylalanin die korrekte Faltung des Enzyms. Durch die reduzierte Stabilität könnte die SSADH-Cys93Phe-Variante vorzeitig abgebaut werden, was das schwächere SSADH-Signal im Western Blot erklären würde. Außerdem könnte dies auch der Grund für die mangelnde Restaktivität sein. Jedoch beschrieben Brennenstuhl et al. auch einen engen Kontakt von Cys93 zu einer α -Helix, die für die NAD⁺-Bindung wichtig ist (Brennenstuhl et al., 2020). Durch die Substitution mit Phenylalanin

könnte die Bildung dieser α -Helix beeinflusst werden, wodurch die Bindung des Kofaktors NAD⁺ gestört sein könnte. Dies könnte ebenfalls ein Grund für die tiefgreifend reduzierte SSADH-Aktivität dieser Variante sein.

5.3.2 SSADH-His180Tyr

Die SSADH-His180Tyr-Variante zeigte ein SSADH-Signal im Western Blot, das vergleichbar zu dem der Wildtyp-SSADH ist. Die Expression schien also nicht reduziert zu sein. Im SSADH-Aktivitätsassay wurde für diese Variante eine Restaktivität von 63,5% der Wildtyp-Aktivität gemessen. Auch in vorherigen Experimenten mit Mutagenese und Überexpression dieser SSADH-Variante wurde eine verbliebene Aktivität um etwa 83% gemessen (Akaboshi et al., 2003; Blasi et al., 2002). Diese, die Oligomerisierungsdomäne betreffende SSADH-Variante, dürfte also keine pathogene Bedeutung haben. Der Unterschied von den in meiner Arbeit gemessenen 63,5% im Gegensatz zu den zuvor gemessenen 83% (Akaboshi et al., 2003) könnte durch die unterschiedliche Transfektionseffizienz bei transienter Transfektion zustande gekommen sein. Außerdem wurden unterschiedliche Versuchsprotokolle verwendet. Eine andere Erklärung wäre die Verfälschung der Restaktivität durch die Verwendung von HEK-Zellen ohne SSADH-Knock-Out in den früheren Studien. Die Restaktivität von 83% spiegelte gegebenenfalls nicht nur die Restaktivität der Variante His180Tyr, sondern auch die der endogenen SSADH wider, während die Messung von 63,5% in dieser Arbeit ohne endogenen SSADH-Hintergrund erfolgte.

5.3.3 SSADH-Asn255Asp und SSADH-His180Tyr-Asn255Asp

Bei alleiniger Expression ist bei der SSADH-Variante His180Tyr, wie bereits unter Kapitel 5.3.2 beschrieben wurde, die Aktivität nicht tiefgreifend reduziert, sodass sie eine geringe pathogene Bedeutung haben dürfte (Akaboshi et al., 2003; Blasi et al., 2002). Wurde diese Variante jedoch in Kombination mit einer anderen pathogenen Variante exprimiert, schien es, als würde sie die restliche Enzymaktivität der anderen Variante weiter reduzieren (Akaboshi et al., 2003; Didiášová et al., 2020; Pop et al., 2020).

Für die SSADH-Asn255Asp-Variante wurde jedoch in dieser Arbeit bereits bei alleiniger Expression keine SSADH-Expression im Western Blot detektiert. Auch in Kombination mit der Substitution His180Tyr erschien kein SSADH-Signal im Western Blot. Passend zu diesen Ergebnissen wurde im SSADH-Assay für beide Varianten keine Restaktivität gemessen. Bereits zuvor wurden für die in mehreren Familien auftretende Variante Asn255Asp schwerwiegende Auswirkungen auf die Aktivität des SSADH-Enzyms bei

Überexpression beschrieben (Didiášová et al., 2020). Die alleinige Expression der Substitution Asn255Asp scheint also nicht vorteilhaft gegenüber der Kombination Asn255Asp-His180Tyr zu sein. Die Beobachtung, dass die in der Oligomerisierungsdomäne lokalisierte Substitution His180Tyr bei alleiniger Expression nur eine geringe Beeinträchtigung der SSADH-Tetramerisierung verursacht und bei gemeinsamer Expression mit einer anderen, milden SSADH-Variante die verbliebene Enzymaktivität der milden Variante noch weiter reduziert (Akaboshi et al., 2003; Didiášová et al., 2020; Pop et al., 2020), konnte bei der Variante His180Tyr-Asn255Asp nicht festgestellt werden. Dies liegt daran, dass die Variante Asn255Asp bereits bei alleiniger Expression schwerwiegende Auswirkungen auf das SSADH-Enzym hat.

Die SSADH-Asn255Asp-Variante betrifft die NAD⁺-Bindungsdomäne. Die Aminosäure Asparagin enthält eine ungeladene, polare Seitenkette, während Aspartat eine saure Seitenkette beinhaltet. Durch die Substitution von Asparagin mit Aspartat ändern sich also die chemischen Eigenschaften innerhalb des SSADH-Proteins, was wahrscheinlich nicht nur die Kofaktorbindung, sondern die gesamte Tertiärstruktur des SSADH-Enzyms beeinflusst. Schließlich konnte nicht nur keine Restaktivität im SSADH-Assay bei dieser Variante festgestellt werden, sondern im Western Blot zeigte sich auch keine Expression. Wie bereits zuvor beschrieben, spielt die NAD⁺-Bindungsdomäne wahrscheinlich nicht nur bei der Kofaktorbindung eine Rolle, sondern trägt aufgrund ihrer Größe zur Stabilität des SSADH-Proteins bei (Brennenstuhl et al., 2020). Die Substitution Asn255Asp führt also möglicherweise zu einer so großen Instabilität innerhalb des SSADH-Proteins, dass diese SSADH-Variante schneller abgebaut wird. Da das Enzym nicht exprimiert wurde, konnte auch keine Restaktivität gemessen werden. Auch die Kombination mit der SSADH-Variante His180Tyr scheint die Stabilität des SSADH-Proteins nicht zu verbessern, sondern verschlechtert wahrscheinlich die Fähigkeit zur Oligomerisierung noch weiter. Menduti et al. beobachteten für die Variante Gly176Arg in Kombination mit His180Tyr ähnliche Ergebnisse (Menduti et al., 2018). Die Forschenden untersuchten dabei die Proteinstabilität mithilfe der In-silico-Proteinmodellierung und entdeckten, dass die Kombination der Aminosäuresubstitutionen Gly176Arg und His180Tyr die Tetramerstabilität bedeutend beeinträchtigt, insbesondere die des doppelt mutierten Homotetramers. Daher führten auch sie die reduzierte Menge der SSADH-Gly176Arg-His180Tyr-Variante auf die Instabilität des Proteins zurück (Menduti et al., 2018). Für die Varianten Asn255Asp und Asn255Asp-His180Tyr müssten ebenfalls weitere Experimente, wie die Beurteilung der Struktur mithilfe einer In-silico-Proteinmodellierungsanalyse (vergleiche Leo et al., 2017; Menduti et al., 2018), durchgeführt werden, um die in meiner Arbeit aufgestellten Thesen zur Proteinstabilität zu bestätigen.

5.4 Ausblick

Beim SSADH-Mangel akkumulieren aufgrund der fehlenden oder verminderten Aktivität des SSADH-Enzyms verschiedene Metaboliten in den Körperflüssigkeiten der Betroffenen (Didiášová et al., 2020; Malaspina et al., 2016). Ursächlich für die mangelnde Aktivität der SSADH sind verschiedene Arten von Genvarianten im *ALDH5A1*-Gen (Akaboshi et al., 2003; Chambliss et al., 1998). Da die Therapie des SSADH-Mangels bisher nur symptomatisch erfolgt, ist ein großes Ziel der Forschung, eine auf SSADH gezielte Therapie zu finden (Lee et al., 2022). Dabei gibt es Therapieansätze, die bei allen Betroffenen angewendet werden können (Schreiber et al., 2021; Vogel et al., 2018a), aber auch welche, die nur bei bestimmten Mutationen funktionieren. Für die bei SSADH-Mangel auftretenden Missense-Varianten stellen pharmakologische Chaperone, welche die SSADH-Aktivität erhöhen können, einen potenziellen Therapieansatz dar (Didiášová et al., 2020). Für die Anwendung von pharmakologischen Chaperonen ist es wichtig zu wissen, inwieweit die Missense-Mutationen einen direkten Einfluss auf die SSADH-Expression und insbesondere auf die Enzymaktivität haben (Brennenstuhl et al., 2020; Didiášová et al., 2020). Deshalb wurden in dieser Arbeit verschiedene SSADH-Missense-Varianten auf ihr Expressionsniveau und die verbleibende Aktivität untersucht. Da bei fast allen Erkrankten individuelle Varianten des *ALDH5A1*-Gens auftreten (Akaboshi et al., 2003; DiBacco et al., 2020; Didiášová et al., 2020; Malaspina et al., 2016), müssen die pharmakologischen Chaperone für jede Variante im Einzelnen getestet werden.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wieso die SSADH-Aktivität durch manche Missense-Mutationen tiefgreifend reduziert ist. Um dies jedoch genauer beurteilen zu können, sollten die in dieser Arbeit untersuchten Missense-Varianten mithilfe der Kristallstruktur von Kim et al. (Y.-G. Kim et al., 2009) oder durch In-silico-Analysen (Leo et al., 2017; Menduti et al., 2018) untersucht werden. Die durch die mangelnde Aktivität der SSADH-Varianten akkumulierenden Metaboliten (Didiášová et al., 2020; Malaspina et al., 2016) sind womöglich für die in der Immunfluoreszenzfärbung beobachteten mitochondrialen Schäden verantwortlich.

Die Experimente zur Charakterisierung der SSADH-Missense-Varianten erfolgten in meiner Arbeit in einem transienten Transfektionsmodell mit HEK293T-SSADH-KO-Zellen. Hierbei variiert die Proteinexpression jedoch je nach Transfektionseffizienz. Im Gegensatz dazu stellt das Flp-In™ System ein stabiles Transfektionsmodell dar, bei dem eine homogene Zellpopulation entsteht, in der alle Zellen die gleiche Anzahl von Kopien

eines spezifischen rekombinanten Konstrukts exprimieren und den *ALDH5A1*-Genotypen eines Betroffenen nachahmen. Das Flp-In™ System wurde in dieser Arbeit für die AG Tikkanen etabliert. In Zukunft können nun die in dieser Arbeit untersuchten und weitere SSADH-Missense-Varianten mithilfe des Flp-In™ Systems charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurden in meiner Arbeit bereits acht bei SSADH-Mangel vorliegende Missense-Mutationen in das zum Flp-In™ System gehörende Expressionsplasmid eingebaut. Sobald die Ergebnisse aus dem stabilen Transfektionsmodell vorliegen, können diese mit den Ergebnissen aus dem transienten Transfektionssystem verglichen werden. Hierbei ist es von Vorteil, dass die Ergebnisse in demselben Labor und dadurch unter möglichst ähnlichen Versuchsbedingungen gewonnen werden.

Außerdem können mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung der zum Flp-In™ System gehörenden HEK293-Zellen die subzelluläre Lokalisation der SSADH-Varianten sowie die Auswirkungen auf die Mitochondrien beurteilt werden. Dabei können mitochondriale Schäden dargestellt werden, die Informationen zur Pathogenese geben. Dies ist für die Forschung insofern weiterführend, da das Verständnis der Pathogenese sowie das Aufdecken von mitochondrialen Schäden, wie die verbliebene SSADH-Expression und -Aktivität, mögliche Ansatzpunkte bieten, um Therapien zu entwickeln. Zudem können nicht nur neue Erkenntnisse zu den einzelnen SSADH-Varianten, sondern auch allgemein zur Anwendung und Qualität des Flp-In™ Systems bei der Erforschung des SSADH-Mangels gefunden werden.

Durch die genaue Charakterisierung der SSADH-Varianten können künftig personalisierte Therapiemöglichkeiten für jeden einzelnen an SSADH-Mangel Erkrankten identifiziert und etabliert werden. Dies wäre ein großer Fortschritt für die Therapie des SSADH-Mangels und ein großer Gewinn für jeden einzelnen Betroffenen, die zum Teil unter stark einschränkenden Symptomen leiden (Pearl et al., 2003a).

6 Zusammenfassung

Der SSADH-Mangel ist eine autosomal-rezessiv vererbte Störung des GABA-Stoffwechsels, die durch Mutationen im *ALDH5A1*-Gen verursacht wird. Das klinische Erscheinungsbild ist unspezifisch. Bisher erfolgt die Therapie des SSADH-Mangels symptomatisch. Dabei steht vor allem die Behandlung von Krampfanfällen oder neurologischen Verhaltensstörungen im Vordergrund. Die Etablierung einer kurativen oder auf SSADH gezielten Therapie spielt daher eine große Rolle in der Forschung am SSADH-Mangel.

Für die Etablierung innovativer Therapieansätze, wie pharmakologische Chaperone, ist es wichtig, zu wissen, inwieweit die pathogenen Varianten des *ALDH5A1*-Gens einen Einfluss auf die SSADH-Expression und -Aktivität haben. Deshalb wurden in dieser Arbeit SSADH-Missense-Varianten mithilfe des Western Blots und eines Fluoreszenz-basierten SSADH-Aktivitätsassays charakterisiert. Um ein besseres Verständnis über die Pathophysiologie der Erkrankung zu bekommen, wurden zudem die subzelluläre Lokalisation der SSADH-Varianten sowie das Aussehen der Mitochondrien in immunfluoreszenz-gefärbten Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass bei allen untersuchten Varianten des *ALDH5A1*-Gens SSADH exprimiert wurde und in die Mitochondrien gelangte. Allerdings war die SSADH-Menge bei der Variante Gly284Asp vermindert. Die Aktivität war bei allen untersuchten SSADH-Missense-Varianten tiefgreifend reduziert. Dadurch akkumulierten wahrscheinlich toxische Metaboliten, die zu der mithilfe der Immunfluoreszenzfärbung beobachteten Schädigung der Mitochondrien beitrugen.

Die Charakterisierung der SSADH-Missense-Varianten erfolgte in einem transienten Transfektionsmodell mit HEK293T-SSADH-KO-Zellen. Um ein stabiles Transfektionsmodell zu generieren, wurde aus der Flp-InTM HEK293-Zelllinie das endogene *ALDH5A1*-Gen ausgeknockt. Anschließend wurde das Wildtyp-*ALDH5A1*-Gen in das Genom der Zellen integriert, um stabil SSADH exprimierende Zellen zu generieren.

In Zukunft könnten SSADH-Missense-Varianten mithilfe dieses Systems untersucht werden, um weitere Erkenntnisse über die Pathogenese zu gewinnen. Dafür wurden bereits acht bei SSADH-Mangel vorliegende Missense-Mutationen in das zum Flp-InTM System gehörende Expressionsplasmid eingebaut und mittels transients Transfektion auf ihre Funktionalität überprüft. Als nächstes können die SSADH-Missense-Varianten stabil in Flp-InTM HEK293-SSADH-KO-Zellen exprimiert und anschließend detaillierter charakterisiert werden. Durch die genauere Charakterisierung der SSADH-Varianten könnten künftig möglicherweise personalisierte Therapiemöglichkeiten für jeden einzelnen Erkrankten identifiziert und etabliert werden.

7 Summary

The SSADH deficiency is an autosomal recessive disorder of GABA metabolism caused by mutations in the *ALDH5A1* gene. The clinical presentation of SSADH deficiency is non-specific. So far, the therapy of SSADH deficiency is based on symptomatic treatment, with the main focus on the treatment of seizures or neurobehavioral disturbances. Thus, the establishment of a curative or targeted therapy plays a major role in research on SSADH deficiency.

To establish innovative therapeutic approaches, such as pharmacological chaperones, it is important to know to what extent the pathogenic variants of the *ALDH5A1* gene have an influence on SSADH expression and activity. In my study, SSADH missense variants were characterised using Western blotting and a fluorescence-based SSADH activity assay. Additionally, in order to gain a better understanding of the pathophysiology of the disease, the subcellular localisation of SSADH variants and the appearance of mitochondria in fluorescently stained cells were investigated. This showed that all variants of the *ALDH5A1* gene studied here were expressed and localised in the mitochondria. However, the amount of the Gly284Asp SSADH variant was reduced. The activity was profoundly reduced for all SSADH missense variants examined. As a result, toxic metabolites probably accumulated, contributing to the mitochondrial damage observed using fluorescent staining.

The characterisation of the SSADH missense variants was performed in a transient transfection model with HEK293T-SSADH-KO cells. To generate a stable transfection model, the Flp-In™ expression system was established. For this purpose, firstly, the endogenous *ALDH5A1* gene was knocked out in the Flp-In™ HEK293 cell line. Subsequently, the wildtype *ALDH5A1* coding region was integrated into the genome of the cells.

In the future, SSADH missense variants could be investigated with the help of the Flp-In™ system for the purpose of gaining new insights into the pathogenesis of SSADH deficiency. Therefore, eight missense mutations found in SSADH deficiency were integrated into the expression plasmid belonging to the Flp-In™ system, and their functionality was tested by using transient transfection. Next, the SSADH missense variants can be stably expressed in Flp-In™ HEK293-SSADH-KO cells and subsequently characterised in more detail. By characterising the SSADH variants more precisely, it may be possible to identify and establish personalised therapy options for each individual patient.

8 Abkürzungsverzeichnis

ALDH5A1	aldehyde dehydrogenase 5 family member A1
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATG	ATG-Startcodon
ATP	Adenosintriphosphat
BGH pA	bovine growth hormone polyadenylation signal
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serumalbumin
C	Cytosin
Cas	CRISPR assoziiertes Protein
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
C-terminal	Carboxy-Terminus
Cys	Cystein
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethyldicarbonat
dest. Wasser	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FCS	Fetales Kälberserum
Flp	Flippase
FRT	Flp Recombination Target

fwd	forward
g	Fallbeschleunigung = 9,81 m/s ²
G	Guanin
GABA	γ-Aminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GHB	γ-Hydroxybuttersäure
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
GOI	gene of interest
gRNA	guide-RNA
HEK	humane, embryonale Nierenzellen
His	Histidin
hSSADH	humane Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase
kb	Kilobase
KO	Knock-Out
lacZ-Zeocin	lacZ-Zeocin™-Fusionsgen
LB	Luria-Bertani
Leu	Leucin
Lys	Lysin
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid NAD ⁺ = oxidierte Form/ NADH = reduzierte Form
NEB	New England Biolabs
Non-tr.	nicht-transfiziert
N-terminal	Amino-Terminus
ORF	offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAM	Protospacer adjacent Motif
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
pcDNA	plasmid cloning DNA
P _{CMV}	CMV-Promotor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
Phe	Phenylalanin
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
prä-mRNA	precursor messenger ribonucleic acid

Pro	Prolin
P _{SV40}	SV40-Promotor
pUC ori	Replikationsursprung
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
rSAP	rekombinante Shrimp Alkalische Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SGS-742	3-Aminopropyl-n-butylphosphinsäure
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
SSA	Succinat-Semialdehyd
SSADH	Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase
SUDEP	plötzlicher unerklärlicher Tod bei Epilepsie
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TE	Tris-EDTA-Pufferlösung
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylenamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
Val	Valin
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: GABA-Stoffwechsel mit und ohne SSADH.....	5
Abbildung 2: Domänenstruktur der SSADH	8
Abbildung 3: Schematische Übersicht der Knock-In-Transfektionen	40
Abbildung 4: Western Blot der untersuchten SSADH-Missense-Varianten	47
Abbildung 5: SSADH-Aktivitätsassay der untersuchten SSADH-Missense-Varianten	48
Abbildung 6: Western Blot des SSADH-Knock-Out in Flp-In™ HEK293-Zellen	50
Abbildung 7: Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Ansätze im Agarosegel	51
Abbildung 8: Sequenzierungsanalyse des SSADH-Knock-Out in Flp-In™ HEK293-Zellen.....	52
Abbildung 9: Immunfluoreszenzfärbung von SSADH und Mitochondrien in Flp-In™ HEK293-Zellen (Klon 1) vor und nach dem SSADH-Knock-Out.....	54
Abbildung 10 (A und B): Immunfluoreszenzfärbung von SSADH und Mitochondrien in nicht-transfizierten und transfizierten Flp-In™ HEK293-SSADH-KO-Zellen (Klon 1).....	56
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Flp-In™ Systems	57
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Umklonierung der Wildtyp-SSADH in das pcDNA5/FRT-Plasmid	58
Abbildung 13: Restriktionsanalyse der hSSADH-pcDNA5/FRT-Plasmide.....	59
Abbildung 14: Western Blot zur Überprüfung der hSSADH-pcDNA5/FRT-Plasmide ...	60
Abbildung 15: SSADH-Aktivitätsassay zur Überprüfung der hSSADH-pcDNA5/FRT-Plasmide.....	60
Abbildung 16: Schematische Darstellung des pcDNA5/FRT/CAT-Plasmid	61
Abbildung 17: Western Blot des SSADH-Knock-In in Flp-In™ HEK293-SSADH-KO-Zellen.....	63
Abbildung 18: Western Blot zur Überprüfung der SSADH-Missense-Varianten enthaltenden pcDNA5/FRT-Plasmide.....	65
Abbildung 19: SSADH-Aktivitätsassay zur Überprüfung der SSADH-Missense-Mutationen enthaltenden pcDNA5/FRT-Plasmide.....	66

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Geräte	15
Tabelle 2:	Verwendete Verbrauchsmaterialien und Gefäße	17
Tabelle 3:	Verwendete Chemikalien und Reagenzien	18
Tabelle 4:	Verwendete Lösungen und Puffer	22
Tabelle 5:	Verwendete Kits	24
Tabelle 6:	Verwendete Plasmide.....	24
Tabelle 7:	Verwendete Primer mit jeweiliger Sequenz	25
Tabelle 8:	Verwendete DNA-modifizierende Enzyme	26
Tabelle 9:	Verwendete Bakterienstämme	26
Tabelle 10:	Verwendete humane Zelllinien	27
Tabelle 11:	Für den Western Blot verwendete primäre und sekundäre Antikörper ..	27
Tabelle 12:	Für die Immunfluoreszenzfärbung verwendete primäre und sekundäre Antikörper	28
Tabelle 13:	Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe und Mikroskopie-Reagenzien	28
Tabelle 14:	Verwendete Softwares.....	28
Tabelle 15:	Durch Umklonierung und mit In-vitro-Mutagenese hergestellte Konstrukte.....	33
Tabelle 16:	Herstellung von 10% Polyacrylamidgelen mit 10 Taschen	42
Tabelle 17:	SSADH-Missense-Varianten mit den entsprechenden Aminosäuresubstitutionen und der betroffenen Domäne	46
Tabelle 18:	SSADH-Missense-Varianten mit den entsprechenden Aminosäuresubstitutionen und der betroffenen Domäne (Ergänzung zu Tabelle 17).....	64
Tabelle 19:	SSADH-Missense-Varianten enthaltende hSSADH-pcDNA5/FRT-Konstrukte.....	64

11 Literaturverzeichnis

- Absalom, N., Eghorn, L. F., Villumsen, I. S., Karim, N., Bay, T., Olsen, J. V., Knudsen, G. M., Bräuner-Osborne, H., Frølund, B., Clausen, R. P., Chebib, M. & Wellendorph, P. (2012). $\alpha 4\beta\delta$ GABA(A) receptors are high-affinity targets for γ -hydroxybutyric acid (GHB). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(33), 13404–13409. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204376109>
- Afacan, O., Yang, E., Lin, A. P., Coello, E., DiBacco, M. L., Pearl, P. L., Warfield, S. K. & Consortium, S. D. I. (2021). Magnetic Resonance Imaging (MRI) and Spectroscopy in Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency. *Journal of child neurology*, 36(13-14), 1162–1168. <https://doi.org/10.1177/0883073821991295>
- Akaboshi, S., Hogema, B. M., Novelletto, A., Malaspina, P., Salomons, G. S., Maropoulos, G. D., Jakobs, C., Grompe, M. & Gibson, K. M. (2003). Mutational spectrum of the succinate semialdehyde dehydrogenase (ALDH5A1) gene and functional analysis of 27 novel disease-causing mutations in patients with SSADH deficiency. *Human mutation*, 22(6), 442–450. <https://doi.org/10.1002/humu.10288>
- Aoshima, T., Kajita, M., Sekido, Y., Ishiguro, Y., Tsuge, I., Kimura, M., Yamaguchi, S., Watanabe, K., Shimokata, K. & Niwa, T. (2002). Mutation analysis in a patient with succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: a compound heterozygote with 103-121del and 1460T A of the ALDH5A1 gene. *Human heredity*, 53(1), 42–44. <https://doi.org/10.1159/000048603>
- Banning, A., Schiff, M. & Tikkanen, R. (2018). Amlexanox provides a potential therapy for nonsense mutations in the lysosomal storage disorder Aspartylglucosaminuria. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1864(3), 668–675. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.12.014>
- Banning, A. & Tikkanen, R. (2021). Towards Splicing Therapy for Lysosomal Storage Disorders: Methylxanthines and Luteolin Ameliorate Splicing Defects in Aspartylglucosaminuria and Classic Late Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis. *Cells*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/cells10112813>

- Bay, T., Eghorn, L. F., Klein, A. B. & Wellendorph, P. (2014). GHB receptor targets in the CNS: focus on high-affinity binding sites. *Biochemical Pharmacology*, 87(2), 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.10.028>
- Benke, D. & Möhler, H. (2018). Impact on GABA systems in monogenetic developmental CNS disorders: Clues to symptomatic treatment. *Neuropharmacology*, 136(Pt A), 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.07.030>
- Blasi, P., Boyl, P. P., Ledda, M., Novelletto, A., Gibson, K. M., Jakobs, C., Hogema, B. M., Akaboshi, S., Loreni, F. & Malaspina, P. (2002). Structure of human succinic semialdehyde dehydrogenase gene: identification of promoter region and alternatively processed isoforms. *Molecular genetics and metabolism*, 76(4), 348–362. [https://doi.org/10.1016/s1096-7192\(02\)00105-1](https://doi.org/10.1016/s1096-7192(02)00105-1)
- Bowery, N. G. & Smart, T. G. (2006). GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. *British Journal of Pharmacology*, 147 Suppl 1(Suppl 1), S109-19. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706443>
- Brennenstuhl, H., Didiášová, M., Assmann, B., Bertoldi, M., Molla, G., Jung-Klawitter, S., Kuseyri Hübschmann, O., Schröter, J., Opladen, T. & Tikkanen, R. (2020). Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency: In Vitro and In Silico Characterization of a Novel Pathogenic Missense Variant and Analysis of the Mutational Spectrum of ALDH5A1. *International journal of molecular sciences*, 21(22). <https://doi.org/10.3390/ijms21228578>
- Brown, M., Ashcraft, P., Arning, E., Bottiglieri, T., Rouillet, J.-B. & Gibson, K. M. (2019). Gamma-Hydroxybutyrate content in dried bloodspots facilitates newborn detection of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. *Molecular genetics and metabolism*, 128(1-2), 109–112. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.07.010>
- Buzzi, A., Wu, Y., Frantseva, M. V., Velazquez, J. L. P., Cortez, M. A., Liu, C. C., Shen, L. Q., Gibson, K. M. & Snead, O. C. (2006). Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: GABAB receptor-mediated function. *Brain research*, 1090(1), 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.02.131>
- Caputo, F., Vignoli, T., Maremmanni, I., Bernardi, M. & Zoli, G. (2009). Gamma hydroxybutyric acid (GHB) for the treatment of alcohol dependence: a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(6), 1917–1929. <https://doi.org/10.3390/ijerph6061917>

- Carter, L. P., Koek, W. & France, C. P. (2009). Behavioral analyses of GHB: receptor mechanisms. *Pharmacology & therapeutics*, 121(1), 100–114. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.10.003>
- Cash, C. D., Maitre, M. & Mandel, P. (1979). Purification from human brain and some properties of two NADPH-linked aldehyde reductases which reduce succinic semialdehyde to 4-hydroxybutyrate. *Journal of neurochemistry*, 33(6), 1169–1175. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1979.tb05261.x>
- Chambliss, K. L., Caudle, D. L., Hinson, D. D., Moomaw, C. R., Slaughter, C. A., Jakobs, C. & Gibson, K. M. (1995). Molecular cloning of the mature NAD(+)-dependent succinic semialdehyde dehydrogenase from rat and human. cDNA isolation, evolutionary homology, and tissue expression. *The Journal of biological chemistry*, 270(1), 461–467. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.1.461>
- Chambliss, K. L. & Gibson, K. M. (1992). Succinic semialdehyde dehydrogenase from mammalian brain: Subunit analysis using polyclonal antiserum. *The International journal of biochemistry*, 24(9), 1493–1499. [https://doi.org/10.1016/0020-711x\(92\)90077-e](https://doi.org/10.1016/0020-711x(92)90077-e)
- Chambliss, K. L., Hinson, D. D., Trettel, F., Malaspina, P., Novelletto, A., Jakobs, C. & Gibson, K. M. (1998). Two exon-skipping mutations as the molecular basis of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (4-hydroxybutyric aciduria). *American journal of human genetics*, 63(2), 399–408. <https://doi.org/10.1086/301964>
- Chambliss, K. L., Lee, C. F., Ogier, H., Rabier, D., Jakobs, C. & Gibson, K. M. (1993). Enzymatic and immunological demonstration of normal and defective succinic semialdehyde dehydrogenase activity in fetal brain, liver and kidney. *Journal of inherited metabolic disease*, 16(3), 523–526. <https://doi.org/10.1007/BF00711671>
- Colosimo, A., Goncz, K. K., Holmes, A. R., Kunzelmann, K., Novelli, G., Malone, R. W., Bennett, M. J. & Gruenert, D. C. (2000). Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. *BioTechniques*, 29(2), 314-8, 320-2, 324 passim. <https://doi.org/10.2144/00292rv01>
- Cortez, M. A., Wu, Y., Gibson, K. M. & Snead, O. C. (2004). Absence seizures in succinic semialdehyde dehydrogenase deficient mice: a model of juvenile absence

- epilepsy. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 79(3), 547–553.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2004.09.008>
- Dervent, A., Gibson, K. M., Pearl, P. L., Salomons, G. S., Jakobs, C. & Yalcinkaya, C. (2004). Photosensitive absence epilepsy with myoclonias and heterozygosity for succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) deficiency. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 115(6), 1417–1422. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2004.01.002>
- Desviat, L. R., Pérez, B. & Ugarte, M. (2012). Minigenes to confirm exon skipping mutations. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 867, 37–47.
https://doi.org/10.1007/978-1-61779-767-5_3
- DiBacco, M. L., Pop, A., Salomons, G. S., Hanson, E., Rouillet, J.-B., Gibson, K. M. & Pearl, P. L. (2020). Novel ALDH5A1 variants and genotype: Phenotype correlation in SSADH deficiency. *Neurology*, 95(19), e2675–e2682.
<https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000010730>
- Didiášová, M., Banning, A., Brennenstuhl, H., Jung-Klawitter, S., Cinquemani, C., Opladen, T. & Tikkanen, R. (2020). Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency: An Update. *Cells*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/cells9020477>
- Drasbek, K. R., Christensen, J. & Jensen, K. (2006). Gamma-hydroxybutyrate--a drug of abuse. *Acta neurologica Scandinavica*, 114(3), 145–156.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2006.00712.x>
- Forni, S., Pearl, P. L., Gibson, K. M., Yu, Y. & Sweetman, L. (2013). Quantitation of gamma-hydroxybutyric acid in dried blood spots: feasibility assessment for newborn screening of succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) deficiency. *Molecular genetics and metabolism*, 109(3), 255–259.
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.05.002>
- Gibson, K. M., Baumann, C., Ogier, H., Rossier, E., Vollmer, B. & Jakobs, C. (1994). Pre- and postnatal diagnosis of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency using enzyme and metabolite assays. *Journal of inherited metabolic disease*, 17(6), 732–737. <https://doi.org/10.1007/BF00712016>
- Gibson, K. M., Christensen, E., Jakobs, C., Fowler, B., Clarke, M. A., Hammersen, G., Raab, K., Kobori, J., Moosa, A., Vollmer, B., Rossier, E., lafolla, A. K., Ma-

- tern, D., Brouwer, O. F., Finkelstein, J., Aksu, F., Weber, H.-P., Bakkeren, J. A. J. M., Gabreels, F. J. M., . . . Lehnert, W. (1997). The clinical phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (4-hydroxybutyric aciduria): case reports of 23 new patients. *Pediatrics*, 99(4), 567–574. <https://doi.org/10.1542/peds.99.4.567>
- Gibson, K. M., Hoffmann, G. F., Hodson, A. K., Bottiglieri, T. & Jakobs, C. (1998). 4-Hydroxybutyric acid and the clinical phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, an inborn error of GABA metabolism. *Neuropediatrics*, 29(1), 14–22. <https://doi.org/10.1055/s-2007-973527>
- Gibson, K. M., Lee, C. F., Chambliss, K. L., Kamali, V., Francois, B., Jaeken, J. & Jakobs, C. (1991). 4-Hydroxybutyric aciduria: Application of a fluorometric assay to the determination of succinic semialdehyde dehydrogenase activity in extracts of cultured human lymphoblasts. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 196(2-3), 219–221. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(91\)90076-O](https://doi.org/10.1016/0009-8981(91)90076-O)
- Gibson, K. M., Sweetman, L., Nyhan, W. L., Jakobs, C., Rating, D., Siemes, H. & Hanefeld, F. (1983). Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: an inborn error of gamma-aminobutyric acid metabolism. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 133(1), 33–42. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(83\)90018-9](https://doi.org/10.1016/0009-8981(83)90018-9)
- Gropman, A. (2003). Vigabatrin and newer interventions in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. *Annals of neurology*, 54 Suppl 6, S66–72. <https://doi.org/10.1002/ana.10626>
- Gupta, M., Greven, R., Jansen, E. E. W., Jakobs, C., Hogema, B. M., Froestl, W., Snead, O. C., Bartels, H., Grompe, M. & Gibson, K. M. (2002). Therapeutic intervention in mice deficient for succinate semialdehyde dehydrogenase (gamma-hydroxybutyric aciduria). *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 302(1), 180–187. <https://doi.org/10.1124/jpet.302.1.180>
- Helm, K. A., Haberman, R. P., Dean, S. L., Hoyt, E. C., Melcher, T., Lund, P. K. & Gallagher, M. (2005). GABAB receptor antagonist SGS742 improves spatial memory and reduces protein binding to the cAMP response element (CRE) in the hippocampus. *Neuropharmacology*, 48(7), 956–964. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.01.019>

- Hill, D. R. & Bowery, N. G. (1981). 3H-baclofen and 3H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA B sites in rat brain. *Nature*, 290(5802), 149–152. <https://doi.org/10.1038/290149a0>
- Hogema, B. M., Gupta, M., Senephansiri, H., Burlingame, T. G., Taylor, M., Jakobs, C., Schutgens, R. B., Froestl, W., Snead, O. C., Diaz-Arrastia, R., Bottiglieri, T., Grompe, M. & Gibson, K. M. (2001). Pharmacologic rescue of lethal seizures in mice deficient in succinate semialdehyde dehydrogenase. *Nature genetics*, 29(2), 212–216. <https://doi.org/10.1038/ng727>
- Invitrogen Corporation (Hrsg.). *Comments for pcDNA5/FRT/CAT*. https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Ftools.thermofisher.com%2Fcontent%2Fsf%2Fvectors%2Fpcdna5frcat_map.pdf
- Invitrogen Corporation (Hrsg.). (2010). *Flp-In™ System: For Generating Stable Mammalian Expression Cell Lines by Flp Recombinase-Mediated Integration*. Catalog nos. K6010–01, K6010–02. https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2Fflpinsystem_man.pdf
- Jakobs, C., Bojasch, M., Mönch, E., Rating, D., Siemes, H. & Hanefeld, F. (1981). Urinary excretion of gamma-hydroxybutyric acid in a patient with neurological abnormalities. The probability of a new inborn error of metabolism. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 111(2-3), 169–178. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(81\)90184-4](https://doi.org/10.1016/0009-8981(81)90184-4)
- Jakobs, C., Jaeken, J. & Gibson, K. M. (1993). Inherited disorders of GABA metabolism. *Journal of inherited metabolic disease*, 16(4), 704–715. <https://doi.org/10.1007/BF00711902>
- Jensen, O., Ansari, S., Gebauer, L., Müller, S. F., Lowjaga, K. A. A. T., Geyer, J., Tzvetkov, M. V. & Brockmöller, J. (2020). A double-Flp-in method for stable overexpression of two genes. *Scientific reports*, 10(1), 14018. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71051-5>
- Kim, K.-J., Pearl, P. L., Jensen, K., Snead, O. C., Malaspina, P., Jakobs, C. & Gibson, K. M. (2011). Succinic semialdehyde dehydrogenase: biochemical-molecular-clinical disease mechanisms, redox regulation, and functional significance.

- Antioxidants & redox signaling*, 15(3), 691–718.
<https://doi.org/10.1089/ars.2010.3470>
- Kim, Y.-G., Lee, S., Kwon, O.-S., Park, S.-Y., Lee, S.-J., Park, B.-J. & Kim, K.-J. (2009). Redox-switch modulation of human SSADH by dynamic catalytic loop. *The EMBO journal*, 28(7), 959–968. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.40>
- Knerr, I., Gibson, K. M., Murdoch, G., Salomons, G. S., Jakobs, C., Combs, S. & Pearl, P. L. (2010). Neuropathology in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. *Pediatric neurology*, 42(4), 255–258. <https://doi.org/10.1016/j.pediatr-neurol.2009.11.011>
- Kölker, S. (2018). Metabolism of amino acid neurotransmitters: the synaptic disorder underlying inherited metabolic diseases. *Journal of inherited metabolic disease*, 41(6), 1055–1063. <https://doi.org/10.1007/s10545-018-0201-4>
- Krnjević, K. & Schwartz, S. (1967). The action of gamma-aminobutyric acid on cortical neurones. *Experimental brain research*, 3(4), 320–336. <https://doi.org/10.1007/BF00237558>
- Laborit, H. (1964). Sodium 4-hydroxybutyrate. *International Journal of Neuropharmacology*, 3(4), 433-IN8. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(64\)90074-7](https://doi.org/10.1016/0028-3908(64)90074-7)
- Lapalme-Remis, S., Lewis, E. C., Meulemeester, C. de, Chakraborty, P., Gibson, K. M., Torres, C., Guberman, A., Salomons, G. S., Jakobs, C., Ali-Ridha, A., Parviz, M. & Pearl, P. L. (2015). Natural history of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency through adulthood. *Neurology*, 85(10), 861–865. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001906>
- Latini, A., Scussiato, K., Leipnitz, G., Gibson, K. M. & Wajner, M. (2007). Evidence for oxidative stress in tissues derived from succinate semialdehyde dehydrogenase-deficient mice. *Journal of inherited metabolic disease*, 30(5), 800–810. <https://doi.org/10.1007/s10545-007-0599-6>
- Lee, H. H. C., McGinty, G. E., Pearl, P. L. & Rotenberg, A. (2022). Understanding the Molecular Mechanisms of Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency (SSADHD): Towards the Development of SSADH-Targeted Medicine. *International journal of molecular sciences*, 23(5). <https://doi.org/10.3390/ijms23052606>

- Lee, H. H. C., Pearl, P. L. & Rotenberg, A. (2021). Enzyme Replacement Therapy for Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency: Relevance in γ -Aminobutyric Acid Plasticity. *Journal of child neurology*, 36(13-14), 1200–1209. <https://doi.org/10.1177/0883073821993000>
- Leidenheimer, N. J. (2018). Pharmacological Chaperones: Beyond Conformational Disorders. *Handbook of experimental pharmacology*, 245, 135–153. https://doi.org/10.1007/164_2017_68
- Leo, S., Capo, C. R., Ciminelli, B. M., Iacovelli, F., Menduti, G., Funghini, S., Donati, M. A., Falconi, M., Rossi, L. & Malaspina, P. (2017). SSADH deficiency in an Italian family: a novel ALDH5A1 gene mutation affecting the succinic semialdehyde substrate binding site. *Metabolic brain disease*, 32(5), 1383–1388. <https://doi.org/10.1007/s11011-017-0058-5>
- Malaspina, P., Rouillet, J.-B., Pearl, P. L., Ainslie, G. R., Vogel, K. R. & Gibson, K. M. (2016). Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (SSADHD): Pathophysiological complexity and multifactorial trait associations in a rare monogenic disorder of GABA metabolism. *Neurochemistry international*, 99, 72–84. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.06.009>
- Matern, D., Lehnert, W., Gibson, K. M. & Korinthenberg, R. (1996). Seizures in a boy with succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency treated with vigabatrin (gamma-vinyl-GABA). *Journal of inherited metabolic disease*, 19(3), 313–318. <https://doi.org/10.1007/BF01799261>
- Menduti, G., Biamino, E., Vittorini, R., Vesco, S., Puccinelli, M. P., Porta, F., Capo, C. R., Leo, S., Ciminelli, B. M., Iacovelli, F., Spada, M., Falconi, M., Malaspina, P. & Rossi, L. (2018). Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: The combination of a novel ALDH5A1 gene mutation and a missense SNP strongly affects SSADH enzyme activity and stability. *Molecular genetics and metabolism*, 124(3), 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.05.006>
- Menduti, G., Vitaliti, A., Capo, C. R., Lettieri-Barbato, D., Aquilano, K., Malaspina, P. & Rossi, L. (2020). SSADH Variants Increase Susceptibility of U87 Cells to Mitochondrial Pro-Oxidant Insult. *International journal of molecular sciences*, 21(12). <https://doi.org/10.3390/ijms21124374>

- Nylen, K., Velazquez, J. L. P., Likhodii, S. S., Cortez, M. A., Shen, L [Lily], Leshchenko, Y., Adeli, K., Gibson, K. M., Burnham, W. M. & Snead, O. C. (2008). A ketogenic diet rescues the murine succinic semialdehyde dehydrogenase deficient phenotype. *Experimental neurology*, 210(2), 449–457. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.11.015>
- Nylen, K., Velazquez, J. L. P., Sayed, V., Gibson, K. M., Burnham, W. M. & Snead, O. C. (2009). The effects of a ketogenic diet on ATP concentrations and the number of hippocampal mitochondria in Aldh5a1(-/-) mice. *Biochimica et biophysica acta*, 1790(3), 208–212. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.12.005>
- Olsen, R. W. & Tobin, A. J. (1990). Molecular biology of GABAA receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 4(5), 1469–1480. <https://doi.org/10.1096/fasebj.4.5.2155149>
- Orrenius, S., Gogvadze, V. & Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 47, 143–183. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105122>
- Parviz, M., Vogel, K. R., Gibson, K. M. & Pearl, P. L. (2014). Disorders of GABA metabolism: SSADH and GABA-transaminase deficiencies. *Journal of pediatric epilepsy*, 3(4), 217–227. <https://doi.org/10.3233/PEP-14097>
- Pearl, P. L., DiBacco, M. L., Papadelis, C., Opladen, T., Hanson, E., Rouillet, J.-B. & Gibson, K. M. (2021). Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency: Review of the Natural History Study. *Journal of child neurology*, 36(13-14), 1153–1161. <https://doi.org/10.1177/0883073820981262>
- Pearl, P. L. & Gibson, K. M. (2004). Clinical aspects of the disorders of GABA metabolism in children. *Current opinion in neurology*, 17(2), 107–113. <https://doi.org/10.1097/00019052-200404000-00005>
- Pearl, P. L., Gibson, K. M., Acosta, M. T., Vezina, L. G., Theodore, W. H., Rogawski, M. A., Novotny, E. J., Gropman, A., Conry, J. A., Berry, G. T. & Tuchman, M. (2003b). Clinical spectrum of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. *Neurology*, 60(9), 1413–1417. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000059549.70717.80>

- Pearl, P. L., Gibson, K. M., Quezado, Z., Dustin, I. H., Taylor, J., Trzcinski, S., Schreiber, J. M., Forester, K., Reeves-Tyer, P., Liew, C., Shamim, S., Herscovitch, P., Carson, R., Butman, J., Jakobs, C. & Theodore, W. H. (2009). Decreased GABA-A binding on FMZ-PET in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. *Neurology*, 73(6), 423–429. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181b163a5>
- Pearl, P. L., Hartka, T. R. & Taylor, J. (2006). Diagnosis and treatment of neurotransmitter disorders. *Current treatment options in neurology*, 8(6), 441–450. <https://doi.org/10.1007/s11940-006-0033-7>
- Pearl, P. L., Novotny, E. J., Acosta, M. T., Jakobs, C. & Gibson, K. M. (2003a). Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency in children and adults. *Annals of neurology*, 54 Suppl 6, S73-80. <https://doi.org/10.1002/ana.10629>
- Pop, A., Smith, D. E. C., Kirby, T., Walters, D. C., Gibson, K. M., Mahmoudi, S., van Dooren, S. J. M., Kanhai, W. A., Fernandez-Ojeda, M. R., Wever, E. J. M., Koster, J., Waterham, H. R., Grob, B., Roos, B., Wamelink, M. M. C., Chen, J., Natesan, S. & Salomons, G. S. (2020). Functional analysis of thirty-four suspected pathogenic missense variants in ALDH5A1 gene associated with succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. *Molecular genetics and metabolism*, 130(3), 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2020.04.004>
- Rango, F. de, Leone, O., Dato, S., Novelletto, A., Bruni, A. C., Berardelli, M., Mari, V., Feraco, E., Passarino, G. & Benedictis, G. de (2008). Cognitive functioning and survival in the elderly: the SSADH C538T polymorphism. *Annals of human genetics*, 72(Pt 5), 630–635. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.2008.00450.x>
- Reis, J., Cohen, L. G., Pearl, P. L., Fritsch, B., Jung, N. H., Dustin, I. H. & Theodore, W. H. (2012). GABAB-ergic motor cortex dysfunction in SSADH deficiency. *Neurology*, 79(1), 47–54. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31825dcf71>
- Roberts, E. & Frankel, S. (1950). gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *The Journal of biological chemistry*, 187(1), 55–63.
- Roth, R. H. & Giarman, N. J. (1966). γ -Butyrolactone and γ -hydroxybutyric acid—I. *Biochemical Pharmacology*, 15(9), 1333–1348. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(66\)90045-1](https://doi.org/10.1016/0006-2952(66)90045-1)

- Ryzlak, M. T. & Pietruszko, R. (1988). Human brain "high Km" aldehyde dehydrogenase: Purification, characterization, and identification as NAD⁺-dependent succinic semialdehyde dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 266(2), 386–396. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(88\)90270-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(88)90270-6)
- Sauer, S. W., Kölker, S., Hoffmann, G. F., Brink, H. J. ten, Jakobs, C., Gibson, K. M. & Okun, J. G. (2007). Enzymatic and metabolic evidence for a region specific mitochondrial dysfunction in brains of murine succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (Aldh5a1^{-/-} mice). *Neurochemistry international*, 50(4), 653–659. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.12.009>
- Schaaf, C. P. & Zschocke, J. (2013). *Basiswissen Humangenetik*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-28907-1>
- Schreiber, J. M., Wiggs, E., Cuento, R., Norato, G., Dustin, I. H., Rolinski, R., Austermuehle, A., Zhou, X., Inati, S. K., Gibson, K. M., Pearl, P. L. & Theodore, W. H. (2021). A Randomized Controlled Trial of SGS-742, a γ -aminobutyric acid B (GABA-B) Receptor Antagonist, for Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency. *Journal of child neurology*, 36(13-14), 1189–1199. <https://doi.org/10.1177/08830738211012804>
- Sgaravatti, A. M., Sgarbi, M. B., Testa, C. G., Durigon, K., Pederzoli, C. D., Prestes, C. C., Wyse, A. T. S., Wannmacher, C. M. D., Wajner, M. & Dutra-Filho, C. S. (2007). Gamma-hydroxybutyric acid induces oxidative stress in cerebral cortex of young rats. *Neurochemistry international*, 50(3), 564–570. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.11.007>
- Shaw, W. V. & Leslie, A. G. (1991). Chloramphenicol acetyltransferase. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*, 20, 363–386. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.20.060191.002051>
- Shinka, T., Ohfu, M., Hirose, S. & Kuhara, T. (2003). Effect of valproic acid on the urinary metabolic profile of a patient with succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. *Journal of Chromatography B*, 792(1), 99–106. [https://doi.org/10.1016/s1570-0232\(03\)00276-9](https://doi.org/10.1016/s1570-0232(03)00276-9)
- Silva, A. R., Ruschel, C., Helegda, C., Brusque, A. M., Wannmacher, C. M. D., Wajner, M. & Dutra-Filho, C. S. (1999). Inhibition of rat brain lipid synthesis in

- vitro by 4-hydroxybutyric acid. *Metabolic brain disease*, 14(3), 157–164.
<https://doi.org/10.1023/A:1020658624567>
- Snead, O. C. (2000). Evidence for a G protein-coupled gamma-hydroxybutyric acid receptor. *Journal of neurochemistry*, 75(5), 1986–1996.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0751986.x>
- Snead, O. C. & Gibson, K. M. (2005). Gamma-hydroxybutyric acid. *The New England journal of medicine*, 352(26), 2721–2732. <https://doi.org/10.1056/NEJMra044047>
- Tillakaratne, N. J., Medina-Kauwe, L. & Gibson, K. M. (1995). Gamma-aminobutyric acid (GABA) metabolism in mammalian neural and nonneural tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 112(2), 247–263.
[https://doi.org/10.1016/0300-9629\(95\)00099-2](https://doi.org/10.1016/0300-9629(95)00099-2)
- Trettel, F., Malaspina, P., Jodice, C., Novelletto, A., Slaughter, C. A., Caudle, D. L., Hinson, D. D., Chambliss, K. L. & Gibson, K. M. (1997). Human succinic semialdehyde dehydrogenase. Molecular cloning and chromosomal localization. *Advances in experimental medicine and biology*, 414, 253–260.
- Tsuboyama, M., Liu, J., Kaye, H., DiBacco, M. L., Pearl, P. L. & Rotenberg, A. (2021). Transcranial Magnetic Stimulation in Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency: A Measure of Maturational Trajectory of Cortical Excitability. *Journal of child neurology*, 36(13-14), 1169–1176.
<https://doi.org/10.1177/08830738211008735>
- Vanadia, E., Gibson, K. M., Pearl, P. L., Trapolino, E., Mangano, S. & Vanadia, F. (2013). Therapeutic efficacy of magnesium valproate in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. *JIMD Reports*, 8, 133–137.
https://doi.org/10.1007/8904_2012_170
- Vogel, K. R., Ainslie, G. R. & Gibson, K. M. (2016). mTOR inhibitors rescue premature lethality and attenuate dysregulation of GABAergic/glutamatergic transcription in murine succinate semialdehyde dehydrogenase deficiency (SSADHD), a disorder of GABA metabolism. *Journal of inherited metabolic disease*, 39(6), 877–886.
<https://doi.org/10.1007/s10545-016-9959-4>

- Vogel, K. R., Ainslie, G. R., Jansen, E. E. W., Salomons, G. S. & Gibson, K. M. (2015). Torin 1 partially corrects vigabatrin-induced mitochondrial increase in mouse. *Annals of clinical and translational neurology*, 2(6), 699–706. <https://doi.org/10.1002/acn3.200>
- Vogel, K. R., Ainslie, G. R., McConnell, A., Rouillet, J.-B. & Gibson, K. M. (2018b). Toxicologic/transport properties of NCS-382, a γ -hydroxybutyrate (GHB) receptor ligand, in neuronal and epithelial cells: Therapeutic implications for SSADH deficiency, a GABA metabolic disorder. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 46, 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.10.015>
- Vogel, K. R., Ainslie, G. R., Walters, D. C., McConnell, A., Dhamne, S. C., Rotenberg, A., Rouillet, J.-B. & Gibson, K. M. (2018a). Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, a disorder of GABA metabolism: an update on pharmacological and enzyme-replacement therapeutic strategies. *Journal of inherited metabolic disease*, 41(4), 699–708. <https://doi.org/10.1007/s10545-018-0153-8>
- Vogel, K. R., Pearl, P. L., Theodore, W. H., McCarter, R. C., Jakobs, C. & Gibson, K. M. (2013). Thirty years beyond discovery--clinical trials in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, a disorder of GABA metabolism. *Journal of inherited metabolic disease*, 36(3), 401–410. <https://doi.org/10.1007/s10545-012-9499-5>
- Walters, D. C., Lawrence, R., Kirby, T., Ahrendsen, J. T., Anderson, M. P., Rouillet, J.-B., Murphy, E. J. & Gibson, K. M. (2021). Postmortem Analyses in a Patient With Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency (SSADHD): II. Histological, Lipid, and Gene Expression Outcomes in Regional Brain Tissue. *Journal of child neurology*, 36(13-14), 1177–1188. <https://doi.org/10.1177/0883073820987742>
- Wang, P., Cai, F., Cao, L., Wang, Y., Zou, Q., Zhao, P., Wang, C., Zhang, Y., Cai, C. & Shu, J. (2019). Clinical diagnosis and mutation analysis of four Chinese families with succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. *BMC medical genetics*, 20(1), 88. <https://doi.org/10.1186/s12881-019-0821-z>
- Wu, Y., Buzzi, A., Frantseva, M. V., Velazquez, J. L. P., Cortez, M. A., Liu, C., Shen, L [Liqing], Gibson, K. M. & Snead, O. C. (2006). Status epilepticus in mice deficient for succinate semialdehyde dehydrogenase: GABAA receptor-mediated mechanisms. *Annals of neurology*, 59(1), 42–52. <https://doi.org/10.1002/ana.20686>

Zeiger, W. A., Sun, L. R., Bosemani, T., Pearl, P. L. & Stafstrom, C. E. (2016). Acute Infantile Encephalopathy as Presentation of Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency. *Pediatric neurology*, 58, 113–115. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2015.10.009>

Zymanczyk, A.-M. (2021). *Therapieansätze für Nonsense-Mutationen bei Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Defizit*. VVB Lauferweiler Verlag.

12 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus- Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

13 Danksagung

Zuallererst gilt mein besonderer Dank meiner Betreuerin Prof. Dr. Ritva Tikkanen, die mir diese Arbeit in Ihrer Arbeitsgruppe ermöglicht hat. Vielen Dank für Deine zuverlässige und engagierte Betreuung, die konstruktive und immer freundliche Kritik sowie Deine außergewöhnlich gute Erreichbarkeit. Du hattest immer eine offene Tür für alle aufkommenden Nachfragen oder Anliegen.

Außerdem danke ich dem gesamten Team der AG Tikkanen. Vielen Dank an Ralf Füllkrug für die geduldige Einarbeitung und die Beantwortung jeder meiner Fragen - ob während der Laborphase oder auch darüber hinaus. Bei dem gesamten Team möchte ich mich für die produktiven Gespräche, die angenehme Arbeitsatmosphäre mit der stets guten Hintergrundmusik, die abwechslungsreichen Mittagspausen und die ausgezeichnete Stimmung im Labor bedanken. Die Laborzeit wird mir immer positiv in Erinnerung bleiben.

An nächster Stelle bedanke ich mich bei meinem Mann Lukas Füssgen. Du hast mir während der gesamten Zeit zur Seite gestanden und mich nicht nur inhaltlich, sondern insbesondere emotional unterstützt. Vielen Dank für Deine Bewunderung, Deine Motivation und die langen, aufbauenden Gespräche.

Ein besonderer Dank geht an meine restliche Familie. Tausend Dank an meine Eltern, Petra und Ivo Füssgen, für die großartige emotionale und finanzielle Unterstützung sowie Euer immer offenes Ohr für meine Anliegen - nicht nur während der Anfertigung meiner Doktorarbeit, sondern während des gesamten Studiums und auch sonst immer. Ebenso herzlichen Dank an meine beiden Schwestern, Eva und Pia Füssgen, für Eure Hilfe bei allen aufkommenden Fragen und Herausforderungen, unterem anderem bezüglich der Literatursuche, -bearbeitung, Zitation und dem Format. Ihr habt mir sehr geholfen. Dieser Dank gilt auch meiner langjährigen Freundin Harriet Schulte.

Schließlich danke ich meinen Freundinnen und Freunden für den Beistand, das gemeinsame Durchstehen der Doktorarbeitsphase und das Anhören meiner Probleme mit den aufbauenden sowie hilfreichen Ratschlägen. Die Studienzeit wäre ohne Euch nicht so großartig gewesen.