

Präklinische Entwicklung einer Adeno-assoziierten Virus-Gentherapie für das Succinat-Semi-Aldehyd- Dehydrogenase-Defizit

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Sasse, Heinrich Carl Victor

aus Rinteln

Gießen 2025

Aus dem
Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Biochemisches Institut

Gutachterin und Betreuerin: Prof. Dr. Ritva Tikkanen

Gutachter: PD Dr. Jörg-Detlef Drenckhahn

Tag der Disputation: 07.07.2025

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Succinat-Semi-Aldehyd-Dehydrogenase-Defizit	1
1.2	Pathophysiologische und genetische Grundlagen	2
1.3	SSADH-Defizit Modelle	4
1.4	Therapieansätze für SSADH-Defizit	5
1.4.1	Enzymersatztherapie	6
1.4.2	Pharmakologische Chaperone, Read-Through-Drugs und Antisense-Oligonukleotide	7
1.4.3	Genherapie	7
1.5	Ziel der vorliegenden Arbeit.....	11
2	Materialien	12
2.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	12
2.2	Chemikalien und Reagenzien	16
2.3	Lösungen und Puffer	20
2.4	SDS-Polyacrylamidgele.....	22
2.5	Kits.....	22
2.6	Plasmide.....	23
2.7	Primer	25
2.8	Humane Zelllinien	26
2.9	Bakterienstamm	26
2.10	Antikörper.....	26
2.10.1	Primäre Antikörper.....	26
2.10.2	Sekundäre Antikörper.....	27
2.11	Software.....	28
3	Methoden	29
3.1	Arbeitsablauf	29
3.2	Kultivierung von HEK293T-Zellen und SSADH-KO-HEK293T-Zellen.....	30
3.3	Passagierung von HEK293T-Zellen und SSADH-KO-HEK293T-Zellen	30

3.4	Kultivierung von Kontroll-Fibroblasten und Patienten-Fibroblasten.....	30
3.5	Passagierung von Kontroll-Fibroblasten und Patienten-Fibroblasten.....	31
3.6	Plasmid-Aufreinigung mittels Midi-Präparation.....	31
3.7	Spektrofotometrische DNA-Konzentrationsmessung	32
3.8	Transfektion von SSADH-KO-HEK293T-Zellen.....	32
3.9	Zellernte der HEK293T-Zellen sowie Zelllysatherstellung nach Transfektion und Transduktion mit pAAV-SSADH	32
3.10	Herstellung der AAV in HEK293T-Zellen mittels Triple-Plasmid-Transfektion	33
3.11	Aufreinigung der AAV	34
3.12	AAV-Titration durch SYBR Green qPCR und Berechnung der Konzentration	34
3.13	Transduktion von Zellen durch AAV	37
3.14	Zellernte von HEK293T-Zellen sowie Zelllysatherstellung nach Transfektion oder Transduktion mit pAAV-GFP	38
3.15	Fibroblasten Zellernte sowie Zelllysatherstellung nach der Transduktion mit pAAV-SSADH.....	39
3.16	Proteinbestimmung nach Bradford.....	39
3.17	Western Blot.....	40
3.17.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	40
3.17.2	Blotten	40
3.17.3	Immundetektion.....	40
3.17.4	Strippen	41
3.18	GFP-Fluoreszenzmessung	41
3.19	NAD ⁺ - abhängige SSADH-Aktivitätsmessung	41
3.20	Fluoreszenzmikroskopie.....	42
3.20.1	GFP-Eigenfluoreszenz.....	42
3.20.2	SSADH-Immunfluoreszenz.....	43
3.21	Auswertung der Fluoreszenzmikroskopiebilder	44
3.22	Statistische Auswertung und Bildbearbeitung.....	44

3.22.1	Statistik.....	44
3.22.2	Elektronische Manipulation der Abbildungen	45
3.23	Ethikvotum	45
4	Ergebnisse.....	46
4.1	Etablierung des AAV-Titrationsprotokolls mittels qPCR in HEK293T-Zellen	46
4.2	Überprüfung des AAV-SSADH-Plasmids mittels MACSfectin-Transfektion an SSADH-KO-HEK293T-Zellen	46
4.3	Untersuchung der AAV-DJ-GFP-Transduktion mit niedrigen MOI an SSADH- KO-HEK293T-Zellen.....	48
4.4	Untersuchung der AAV-DJ-GFP-Transduktion mit hohen MOI in SSADH-KO- HEK293T-Zellen.....	52
4.5	Untersuchung der AAV-DJ-SSADH-Transduktion mit niedrigen MOI in SSADH-KO-HEK293T-Zellen	56
4.6	Untersuchung der AAV-DJ-SSADH-Transduktion mit hohen MOI in SSADH- KO-HEK293T-Zellen.....	58
4.7	Untersuchung von AAV-DJ-SSADH an Fibroblasten eines SSADH-Defizit- Patienten	63
5	Diskussion.....	66
5.1	Wahl des AAV-Plasmids/-Kapsids für erfolgreiche Gentherapie in Zellkulturversuchen.....	66
5.2	Biosynthetischer Weg der SSADH bei der AAV-vermittelten Transduktion..	67
5.3	Dosisabhängige Expression durch AAV-Transduktion: Einblicke in die Inkubationszeit-abhängige Transduktionseffizienz und ihre möglichen Ursachen	68
5.4	Unterschiede in der Transduktionseffizienz zwischen AAV-DJ-GFP und AAV- DJ-SSADH in SSADH-KO-HEK293T-Zellen	69
5.5	SSADH-Immunfluoreszenz.....	71
5.6	Erfolg der Gentherapie in Patienten-Fibroblasten.....	72
5.7	Angemessene Level der SSADH-Expression.....	72

5.8	Ausblick.....	73
5.8.1	Gentherapie an Mäusen.....	73
5.8.2	Schwierigkeiten einer Gentherapie der Leber.....	75
5.8.3	Optimierung des Kapsids und Plasmids für zielgerichtete Gentherapie der Leber.....	76
6	Zusammenfassung.....	78
7	Summary.....	79
8	Abkürzungsverzeichnis.....	80
9	Abbildungsverzeichnis.....	83
10	Tabellenverzeichnis.....	85
11	Literaturverzeichnis.....	86
12	Ehrenwörtliche Erklärung.....	98
13	Danksagung.....	99

1 Einleitung

1.1 Succinat-Semi-Aldehyd-Dehydrogenase-Defizit

Das Succinat-Semi-Aldehyd-Dehydrogenase-Defizit (SSADH-D) ist eine genetisch bedingte Stoffwechselstörung des inhibitorischen Neurotransmitters Gamma-Aminobuttersäure (GABA), die durch eine mangelnde Aktivität des in der mitochondrialen Matrix befindlichen Enzyms Succinat-Semi-Aldehyd-Dehydrogenase (SSADH) verursacht wird.

Der erste Fall eines jungen Patienten mit neurologischen Symptomen wurde im Jahr 1981 anhand erhöhter Gamma-Hydroxybuttersäure-Werte (GHB) in Serum, Urin und Liquor beschrieben (Jakobs et al. 1981). Zwei Jahre später konnte ein Mangel an SSADH als Krankheitsursache festgestellt werden (Gibson et al. 1983). Zurzeit sind circa 450 diagnostizierte Fälle weltweit bekannt (Didiasova et al. 2020). Die Prävalenz wird auf 1:460.000 weltweit geschätzt (Martin et al. 2021).

Das SSADH-D manifestiert sich durch eine Vielzahl heterogener Symptome, darunter Entwicklungsverzögerung (98%), intellektuelle Beeinträchtigung (95%), Sprachstörungen (82%), muskuläre Hypotonie (83%), Ataxie (74%) und generalisierte Epilepsie (50%) (Kim et al. 2011; Pearl et al. 2003; Gibson et al. 1997). Mit fortschreitendem Alter verschlechtern sich Schlafstörungen (von 34% auf 62%), Verhaltensstörungen (von 20% auf 58%) und das Risiko für epileptische Anfälle steigt (von 37% auf 68%) (DiBacco et al. 2019). Patienten leiden auch unter Verhaltensstörungen (42%), wie Aggressivität oder Angststörungen (Gibson et al. 2003). Aufgrund der beschriebenen Symptome sollten Patienten mit Autismussymptomen auf SSADH-D untersucht werden (İnci et al. 2021; Latzer et al. 2023b).

Bei Verdacht auf SSADH-D erfolgt die Messung des GHB-Spiegels im Urin (Wernli et al. 2017), gefolgt von einer Bestätigung mittels molekulargenetischer Analyse (Didiasova et al. 2020). Obwohl der Median des Erkrankungsbeginns bei 11 Monaten liegt, werden 80% der Patienten erst im Alter von 5 Jahren diagnostiziert (Attri et al. 2017). Die unspezifischen Symptome erschweren eine frühzeitigere Diagnose, daher ist in der Bevölkerung vermutlich unterdiagnostiziert (Gordon 2004; Attri et al. 2017). Infolgedessen wird SSADH-D oft erst im Erwachsenenalter diagnostiziert (Lapalme-Remis et al. 2015).

1.2 Pathophysiologische und genetische Grundlagen

Die autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung SSADH-D wird durch pathogene Mutationen im *ALDH5A1*-Gen auf Chromosom 6p22 ausgelöst, welche einen Funktionsverlust von SSADH zur Folge haben (Chambliss et al. 1998; Trettel et al. 1997). Die Proteinsequenzen für SSADH existieren in drei Isoformen in einer Größe von 1,4-1,6 kB, welche durch alternatives Spleißen entstehen (Blasi et al. 2002; Didiasova et al. 2023). Bislang sind mehr als 100 krankheitsauslösende Mutationen, darunter Missense-, Nonsense- und Spleiß-Mutationen, identifiziert (Martin et al. 2021). Dazu sind noch mehrere hundert Varianten unklarer Signifikanz bekannt (NCBI 2024). Missense-Mutationen führen zu Varianten von SSADH, die eine fehlerhafte Bildung aufweisen, wobei die Oligomerisierung, Faltung, Stabilität und Proteinmenge unterschiedlich stark beeinträchtigt sein können. Dennoch ist bei einigen SSADH-Varianten eine Restaktivität vorhanden. Nonsense-Mutationen resultieren in einem verfrühten Abbau des Proteins oder in einer gänzlich fehlenden Synthese. Spleiß-Mutationen führen zu falsch gespleißter prä-mRNA, was wiederum zu fehlerhaften SSADH-Proteinen führt (Didiasova et al. 2023). Zusätzlich wurden mehrere Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) im *ALDH5A1*-Gen identifiziert, deren Bedeutung bisher unbekannt ist (Malaspina et al. 2016; Didiasova et al. 2024). Die Ausprägung des Phänotyps korreliert dabei mit der spezifischen Mutation (Lutzer et al. 2023a).

SSADH ist als essentielles Enzym am Abbau des inhibitorischen Neurotransmitters GABA beteiligt (Abbildung 1). GABA, welches durch die Umwandlung von Glutamat mit Hilfe der Glutamatdecarboxylase (GAD) entstanden ist, wird weiter durch die GABA-Transaminase (GABA-T) in Succinyl-Semialdehyd (SSA) abgebaut. SSA fungiert als Substrat für SSADH und wird durch SSADH NAD^+ -abhängig in Succinat oxidiert, welches in den Citratzyklus eingespeist wird (Ryzlak und Pietruszko 1988; Blasi et al. 2002)

Die Mutationen im *ALDH5A1*-Gen verursachen einen Mangel von SSADH-Aktivität, sodass SSA angereichert wird. Bei ausreichend hohen Konzentrationen an SSA katalysiert GABA-T die reversible Reaktion in GABA. Darüber hinaus erfolgt die Umwandlung von SSA zu GHB durch die 4-Hydroxybutyrate Dehydrogenase (4-HBD) (Didiasova et al. 2020). Durch eine erniedrigte Aktivität der SSADH steigt der Spiegel von GABA und GHB im zentralen Nervensystem (ZNS) und peripheren Körperflüssigkeiten an (Gibson et al. 1994).

GABA ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter, welcher im Gehirn an verschiedenen GABA-Rezeptoren bindet (Tillakaratne et al. 1995). GHB fungiert als potenter inhibitorischer Neurotransmitter und Neuromodulator relaxierend, anxiolytisch und sedierend. Obwohl GHB hauptsächlich durch die Leber synthetisiert wird, ist GHB in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren und im Gehirn an GHB- und GABA_B-Rezeptoren anzudocken (Buzzi et al. 2006; Bay et al. 2014). GHB wird auch als Partydroge (Liquid Ecstasy) und Vergewaltigungsdroge (K.O.-Tropfen) missbraucht (O'Connell et al. 2000). Obwohl die Pathophysiologie des SSADH-Defizits noch nicht vollständig erforscht wurde, deuten aktuelle Erkenntnisse darauf hin, dass die Symptome vermutlich sowohl auf die erhöhten GHB-Spiegel als auch auf die veränderten GABA-Werte zurückzuführen sind (Didiasova et al. 2020). Eine aktuelle Hypothese für die epileptischen Anfälle ist, dass es durch den hyperGABAergen Zustand zu einer Down-Regulation der GABA-Rezeptoren kommt und dadurch die epileptischen Anfälle ausgelöst werden (Lee et al. 2022).

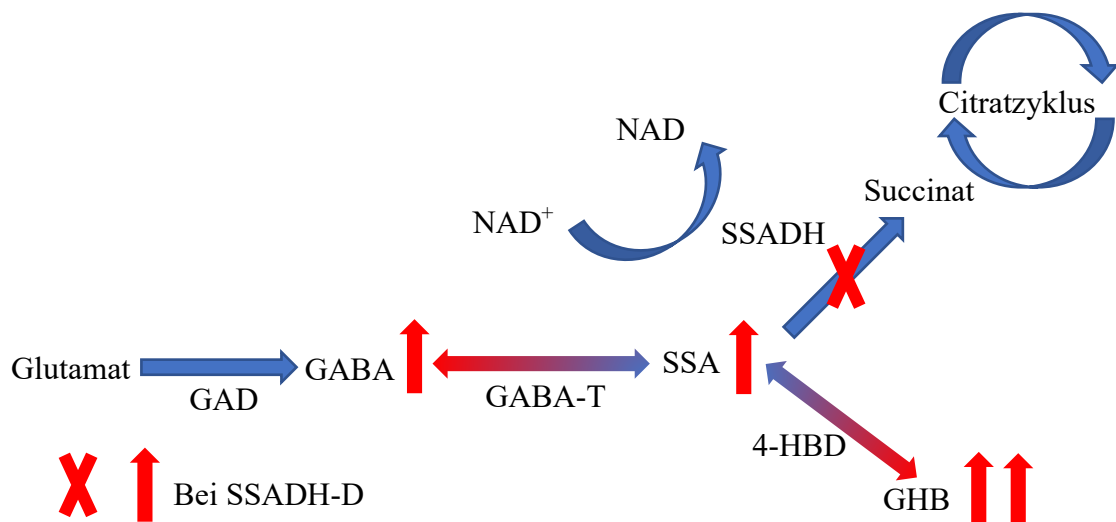


Abbildung 1: Pathophysiologie: Einfluss der fehlenden SSADH-Aktivität auf den GABA-Abbau; Modifiziert nach Buzzi et al. (Buzzi et al. 2006). Glutamat wird durch die GAD zu GABA umgewandelt. Durch die Abspaltung einer Aminogruppe mittels GABA-T wird GABA in SSA abgebaut. Im physiologisch intakten Organismus wird SSA NAD⁺-abhängig durch SSADH in Succinat oxidiert. Das entstehende Succinat wird in den Citratzyklus eingespeist. Bei SSADH-D wird SSA aufgrund der beeinträchtigten Aktivität von SSADH nicht ausreichend in Succinat abgebaut. Stattdessen wird SSA durch GABA-T in GABA und durch 4-HBD in GHB umgewandelt.

1.3 SSADH-Defizit Modelle

Zur Erforschung von SSADH-D stehen verschiedene Modelle zur Verfügung, wobei das Knockout von endogenem SSADH in gängigen Zelllinien eines der einfachsten Modelle darstellt. In diesem Kontext können verschiedene Therapieansätze, wie beispielsweise die Gentherapie oder Enzymersatztherapie, überprüft werden. Ein Beispiel für SSADH-defiziente Zellen sind die SSADH-KO-HEK293T-Zellen, welche in der AG Tikkanen entwickelt wurden. Mit diesen Zellen ist es auch möglich, die Auswirkung von SSADH-Mutationen durch transiente Expression zu erforschen (Brennenstuhl et al. 2020). Es ist jedoch zu beachten, dass SSADH-KO-HEK293T-Zellen für grundlegende Hypothesenüberprüfungen genutzt werden können, allerdings können diese Zellen (insbesondere das transiente Überexpressionssystem) nicht die Situation in SSADH-Patienten genau widerspiegeln. So ist speziell bei Patienten mit Missense-Varianten in der transienten Überexpression noch eine messbare Restaktivität vorhanden. Ein ergänzendes Modell zur stabilen Expression von Mutationen bieten die SSADH-defiziente HEK293-Flp-In-Zellen (Pop et al. 2020). Bei diesem Zellmodell wird zunächst das ALDH5A1-Gen ausgeschaltet und anschließend die zu untersuchende Mutation mittels Flp-Rekombinase an die entsprechende Stelle eingebaut (Didiasova et al. 2024). Dadurch kann eine stabile Expression der zu untersuchenden Variante gewährleistet werden, wodurch die funktionellen Auswirkungen untersucht werden können.

Ein weiteres physiologisch relevantes Modell zur Erforschung von SSADH-D sind Fibroblasten, welche von Patienten stammen. Dieses Modell ermöglicht es, mit vergleichsweise geringem Aufwand zu untersuchen, wie spezifische Genotypen auf Veränderungen durch therapeutische Maßnahmen reagieren. Darüber hinaus können durch die Verwendung von Patienten abgeleiteten induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) verschiedene Zelltypen, wie beispielsweise Neurone (Vogel et al. 2017; Chen et al. 2022; Afshar-Saber et al. 2024), oder Gehirn-Organoiden generiert werden, die komplexe Interaktionen ermöglichen (Brennenstuhl et al. 2019). Obwohl diese Systeme zeitaufwendig und kostenintensiv sind, repräsentieren sie die beste Möglichkeit zur Erforschung von patientenspezifischen Mutationen und deren Reaktion auf verschiedene Substanzen, wie etwa pharmakologische Chaperone. Diese Modelle bilden auch eine grundlegende Plattform für personalisierte Medizin.

Die therapeutischen Möglichkeiten, die sich in 2D- und 3D-Zellkulturmodellen bewährt haben, sollten zusätzlich in einem komplexeren System überprüft werden, wie etwa dem

ALDH5A1^{-/-} Mausmodell (Hogema et al. 2001). Der Knockout des *ALDH5A1*-Gens führt zu einem vollständigen Verlust des SSADH-Proteins in der Maus und resultiert in einem schweren Phänotyp. Als dessen Folge sind die Mäuse in ihrer physischen Entwicklung deutlich verzögert, haben schwere generalisierte tonisch-klonisch epileptische Anfälle und versterben in der Regel nach ca. 21 Tagen an einem Status Epilepticus (Hogema et al. 2001).

Obwohl das SSADH-Knockout-Modell bei Mäusen letal ist und daher nicht vollständig mit SSADH-D bei Patienten vergleichbar ist, stellt es ein wichtiges Werkzeug dar, um die Wirksamkeit präklinischer Ansätze in komplexen Systemen zu überprüfen. Insbesondere kann hierbei a) die Wiederherstellung des SSADH-Proteins und die Aktivität in Organen, b) mögliche Nebenwirkungen von Präparaten, c) Immunantworten (z. B. gegenüber der Gen- oder Enzyersatztherapie) und d) die Senkung von GABA- und GHB-Spiegeln in Organen untersucht werden.

Das *ALDH5A1*^{-/-}-Mausmodell ist derzeit das einzige präklinische tierische Modell zur Erforschung von SSADH-D. Es gibt zwar ein weiteres Tiermodell, welches auf dem Saluki-Hund basiert (Vernau et al. 2020). Dieser ist mangels käuflicher Beschaffungsmöglichkeiten nicht verfügbar. Eine alternative Möglichkeit wäre die Etablierung eines Mausmodells mit einem spezifischen Knock-in eines der pathogenen SSADH-Varianten. Dies gestaltet sich jedoch als herausfordernd, da derzeit mehr als 100 krankheitsauslösende Mutationen bekannt sind. Diese verschiedenen Modelle bieten unterschiedliche Möglichkeiten, um SSADH-D auf verschiedenen Ebenen zu erforschen und potenzielle Therapieansätze zu identifizieren.

1.4 Therapieansätze für SSADH-Defizit

Trotz diverser Ansätze und erzielter Fortschritte in klinischen Studien existiert bis heute keine zugelassene kurative Therapie für SSADH-D (Didiasova et al. 2020; Schreiber et al. 2021). Derzeitige therapeutische Behandlungen sind auf die symptomatische Linderung beschränkt (Latzer et al. 2024). In diesem Kontext erhalten die Patienten logopädische, physiotherapeutische und psychotherapeutische Unterstützung. Die Kontrolle der Epilepsie spielt eine zentrale Rolle, um plötzliche unerklärliche Todesfälle bei Epilepsie (SUDEP) zu verhindern (Pearl et al. 2003). Ein vielversprechender Ansatz in der bisherigen Forschung ist die Anwendung von Vigabatrin, ein Antikonvulsiva,

welches die GABA-T hemmt und somit den GABA-Spiegel im Gehirn erhöht (Gram et al. 1989). Die Verabreichung von Vigabatrin führte bei Patienten zu einer Reduktion des GHB-Spiegels und zeigte positive Effekte auf deren Verhaltensstörungen (Gibson et al. 1995; Vogel et al. 2013). Eine wesentliche Nebenwirkung unter der Therapie von Vigabatrin sind allerdings irreversible Gesichtsfeldausfälle (Miller et al. 1999; Russell-Eggitt et al. 2000). Diese Nebenwirkung muss bei der Behandlung beachtet werden, weshalb Vigabatrin eher in schweren Fällen eingesetzt wird. Nachfolgend werden verschiedene präklinische Therapieansätze näher erläutert.

1.4.1 Enzymersatztherapie

Als therapeutischer Ansatz könnte die Enzymersatztherapie (EET) in Betracht gezogen werden. Durch die Verabreichung einer EET bei *ALDH5A1*^{-/-} Mäusen konnte eine Reduktion der GABA- und GHB-Spiegel sowie eine Verlängerung der Überlebenszeit nachgewiesen werden (Vogel et al. 2018). Bei der EET wird das Enzym synthetisch hergestellt und müsste dem Patienten lebenslang in regelmäßigen Intervallen verabreicht werden. Die wiederholte Gabe ist erforderlich, da das verabreichte Enzym kontinuierlich abgebaut wird und somit unter die therapeutische Schwelle fällt. Durch regelmäßige Injektionen kann die Dosis allmählich erhöht werden, um eine schrittweise Anpassung des Körpers an das Enzym zu ermöglichen. Es ist jedoch zu beachten, dass die häufige, wiederholte Applikation potenziell zur Bildung körpereigener Antikörper gegen das Enzym führen könnte, was die Wirksamkeit der Therapie beeinträchtigen würde (Harmatz 2015).

Zusätzlich besteht das Risiko von injektionsassoziierten Nebenwirkungen wie allergischen Reaktionen, Blutungen und Infektionen. Die psychische Belastung durch regelmäßige Injektionen sollte ebenfalls nicht vernachlässigt werden. Darüber hinaus stellt die Modifikation des Enzyms, um seine Aufnahme durch Leber- und ZNS-Zellen zu ermöglichen und es in die Mitochondrien zu transportieren, eine Herausforderung dar. Besonders anspruchsvoll gestaltet sich auch die Anpassung des Enzyms, um die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden.

1.4.2 Pharmakologische Chaperone, Read-Through-Drugs und Antisense-Oligonukleotide

Ein alternativer therapeutischer Ansatz umfasst die Verwendung von pharmakologischen Chaperonen (PC), Read-Through-Drugs (RTD) und Antisense-Oligonukleotiden (ASO). Diese Substanzen sind meistens mutationsspezifisch. PC stabilisieren durch Missense-Variationen verursachte Fehlfaltung von Proteinen/Enzymen, was zu einer Erhöhung ihrer Aktivität führt (Suzuki et al. 2009). So findet Migalastat Anwendung bei der seltenen Erkrankung Morbus Fabry (McCafferty und Scott 2019).

RTD werden bei Nonsense-Varianten eingesetzt, indem sie den vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese durch ein Stoppcodon verhindern (Didiasova et al. 2020). So wurde Ataluren für die Muskel Dystrophie Duchenne zugelassen (Landfeldt et al. 2019). Allerdings sind die Ergebnisse zu diesem RTD sehr unterschiedlich, wobei der Grund hierfür vermutlich die instabilen Mengen an mRNA sind (Didiasova et al. 2023). Jedoch waren in vitro getestete RTD für verschiedene SSADH-D verursachende Nonsense-Mutationen wenig vielversprechend (Zymanczyk 2021).

Eine weitere Option für SSADH-D wären ASO, welche für Splicing-Mutationen eine Möglichkeit sind. Sie vermitteln ein alternatives Spleißen der prä-mRNA, wodurch es zu mehr funktionsfähigem Protein kommt. So findet Nusinersen als Therapieoption für alle Spinalen Muskelatrophie (SMA)-Typen Verwendung (Finkel et al. 2017).

Bei den weltweit etwa 450 bekannten SSADH-D-Fällen sind bisher mindestens 100 auslösende Mutationen identifiziert worden (Pearl et al. 2015; Didiasova et al. 2020; Martin et al. 2021). Die meisten Mutationen treten begrenzt auf einzelne Familien auf. Im Kontext einer individualisierten Therapie könnten die genannten Substanzen eine Möglichkeit darstellen, diesen spezifischen Patienten zu helfen (Didiasova et al. 2023). Es ist jedoch zu beachten, dass damit keine Therapie der Gesamtheit der Patienten möglich wäre.

1.4.3 Gentherapie

Die Fortschritte im Bereich der Gentherapie der letzten Jahre haben das Potenzial, die Behandlung genetisch bedingter Krankheiten grundlegend zu transformieren. Durch die direkte Einführung therapeutischer Gene an den Zielort im Körper wird eine gezielte Wirkung ermöglicht. Diese Methode erweist sich als effektiv bei Erkrankungen, die eine

großflächige Verteilung des therapeutischen Gens erfordern (Tang und Xu 2020). Das Hauptziel der Gentherapie besteht darin, mit einer einzigen Anwendung eine ausreichende und langfristige Expression des gewünschten Gens zu erreichen. Die Gentherapie zeigt sich erfolgversprechend bei monogenetischen, autosomal-rezessiv verursachten Krankheiten, die einen Funktionsverlust (wie bei SSADH-D) zur Folge haben (Lee et al. 2024). Für SSADH-D wird der GENE TARGET Score bei 34 von möglichen 40 Punkten angesetzt, womit die Eignung von SSADH-D zur Gentherapie als hoch eingeschätzt wird (Chopra et al. 2022; Lee et al. 2024). Durch die Auswahl des Vektors kann die Therapie organspezifisch gestaltet werden, wodurch unerwünschte Nebeneffekte minimiert werden können. Dieser Ansatz ermöglicht eine präzise Behandlung, die sich auf das betroffene Gewebe konzentriert.

Trotz der vielversprechenden Aspekte birgt die Gentherapie auch Risiken. Durch die sorgfältige Auswahl des Vektors kann das Risiko einer Immunantwort minimiert werden. Eine Herausforderung stellt die Art der Applikation dar, welche von Erkrankung zu Erkrankung variiert. Insgesamt zeigt die Gentherapie eine vielversprechende Entwicklung, wobei ihre gezielte Anwendung und die Auswahl geeigneter Vektoren entscheidend für den Erfolg und die Reduzierung potenzieller Risiken sind. Der Weg zu einer effektiven Gentherapie erfordert weiterhin umfassende Forschung und stetige Fortschritte in der Technologie, um die positiven Aspekte dieser innovativen Therapieform weiter zu optimieren. Die verschiedenen Gentherapiesysteme sollen kurz vorgestellt werden.

1.4.3.1 Adenoviren

Adenoviren (AdV) sind in der Lage genetisches Informationen (bis 45 kB) in eine Vielzahl von proliferierenden und nicht-proliferierenden Zellen zu transduzieren. Bei SSADH-D konnte eine AdV-Gentherapie der Leber von *ALDH5A1*^{-/-}-Mäusen deren Lebenserwartung signifikant verlängern (Gupta et al. 2004). Damit stützten sie die Hypothese, dass für eine SSADH-D-Therapie nicht zwangsläufig das ZNS behandelt werden muss; vielmehr könnte eine Therapie der Leber von Nutzen sein. Die Grundlage dessen ist, dass GHB in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, wodurch sich die Möglichkeit ergibt, im Rahmen eines Fließgleichgewichts das GHB-Level im ZNS durch eine Therapie der Leber zu erniedrigen (Bhattacharya und Boje 2004). GHB wird,

neben dem ZNS, zum großen Teil in der Leber metabolisiert und abgebaut (Zhang et al. 2012). Allerdings ist die immunologische Reaktion der Patienten auf AdV enorm, sodass die Effizienz der Therapie verringert wird und es sogar zu mehreren Todesfällen kam (Marshall 1999). Des Weiteren können sich AdV unerwünschter Weise in das Genom integrieren und dadurch Tumore auslösen (Wang et al. 2022). Auch ist die Langzeitexpression der transduzierten Gene schwach (Anguela und High 2019). Aufgrund dieser Daten bietet sich das AdV nicht als Gentherapie für SSADH-D an.

1.4.3.2 Lentiviren

Lentiviren haben sich als vielversprechende Vektoren für Gentherapieanwendungen erwiesen. Die Fähigkeit, sich sowohl in proliferierenden als auch in nicht-proliferierenden Zellen zu integrieren, ermöglicht eine langfristige Expression der transduzierten Gene. Die breite Anwendbarkeit auf verschiedene Zelltypen, die niedrige Immunogenität im Vergleich zu anderen Vektoren und die hohe Transduktionskapazität machen sie zu einer attraktiven Option (Anguela und High 2019). Allerdings kann die Integration der lentiviralen DNA in das Wirtsgenom an zufälligen Stellen erfolgen, was möglicherweise zu unerwünschten genetischen Effekten oder sogar zur Aktivierung von Onkogenen führen könnte (Connolly 2002). Damit haben die Lentiviren ein deutlich erhöhtes Risikoprofil und bieten sich als sicheren Vektoren nicht an.

1.4.3.3 Adeno-assoziierte Viren

Als bisheriges Maß aller Dinge werden zurzeit die Adeno-assoziierten Viren (AAV) betrachtet, welche in der Lage sind, sowohl proliferierende als auch nichtproliferierende Zellen zu transduzieren. AAV sind Parvoviren und für ihre Replikation abhängig von Helferviren wie AdV oder Herpesviren (Atchison et al. 1965; Buller et al. 1981). AAV sind nicht pathogen, und ihr einzelsträngiges DNA-Genom von etwa 4,7 kB kann modifiziert werden, um es als Transgen-Vektor zu nutzen (Hermonat und Muzyczka 1984). Die Transgene werden episomal exprimiert und integrieren sich in der Regel nicht (Duan et al. 1998; Chandler et al. 2017). Die Food and Drug Administration (FDA) und European Medicines Agency (EMA) haben bereits zwei in-vivo-Gentherapien (Luxturna® und Zolgensma®) zugelassen und viele klinische Studien prüfen ihre Wirksamkeit auch für andere Erkrankungen. Zurzeit gibt es ungefähr 11 natürliche

(Tabelle 1) und mehr als 100 rekombinant hergestellte Serotypen mit jeweils speziellen Eigenschaften, wie unterschiedlichem Gewebetropismus, Immunantwort oder der Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu überqueren (Issa et al. 2023). So ist AAV-PHP.B ein rekombinanter Vektor, welcher hochspezifisch für das ZNS ist, wohingegen die natürlichen Serotypen eine niedrigere Spezifität haben (Tabelle 1) (Dayton et al. 2018). Damit sind AAV zurzeit die sichersten und fortschrittlichsten Vektoren für Gentherapieanwendungen, weshalb sie in dieser Doktorarbeit auf ihre Anwendbarkeit bei der Behandlung von SSADH-D untersucht wurden.

Tabelle 1: AAV-Tropismus ausgewählter Serotypen. In der Tabelle sind Gewebetropismen unterschiedlicher AAV-Serotypen dargestellt. x markiert, ob ein Serotyp in der Lage ist, ein Gewebe effizient zu transduzieren. Die Serotypen AAV-1 bis AAV-9 sind natürliche Serotypen. AAV-DJ, AAV-DJ/8 und AAV-PHP.B sind ausgewählte rekombinante Serotypen. Modifiziert nach Genemedi Biotech, Inc. (Genemedi Biotech. Inc 2018).

AAV-Serotyp	Gewebetropismus							
	ZNS	Retina	Lunge	Leber	Pankreas	Nieren	Herz	Muskel
AAV-1	x	x			x		x	x
AAV-2		x		x		x		
AAV-3		x	x	x			x	
AAV-4	x	x					x	
AAV-5	x	x	x		x			
AAV-6	x		x	x			x	x
AAV-7				x				x
AAV-8		x		x	x			x
AAV-9	x		x	x			x	x
AAV-DJ		x	x	x		x		
AAV-DJ/8		x		x				x
AAV-PHP.B	x						x	x

1.4.3.4 AAV-DJ

Das AAV-DJ-Kapsid entstand als Hybrid aus den natürlichen AAV-Serotypen AAV-2, AAV-8 und AAV-9. Dieses Hybrid zeigte im Vergleich zu acht Standardserotypen die höchste Transduktionseffizienz verschiedener Zellkulturen (HEK293T-Zellen, Fibroblasten usw.). AAV-DJ wurde speziell für die Gentherapie der Leber entwickelt, und auf gepoolten Patientenseren selektiert, um eine sehr geringe Immunantwort zu generieren (Grimm et al. 2008). Außerdem bietet AAV-DJ im Vergleich zu AAV-2 eine frühere und stärkere Transduktion (Lakhan et al. 2015). Das Kapsid konnte in unterschiedlichen Studien sein Potenzial zeigen. So wurde AAV-DJ als Vektor für Epidermolysis bullosa junctionalis an Patienten-Keratinocyten getestet (Melo et al. 2014). Außerdem konnten mit COX2 beladene AAV-DJ die Frakturheilung in Mäusen deutlich verbessern (Lakhan et al. 2015). Aus den genannten Gründen wurde AAV-DJ in dieser Arbeit gewählt.

1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Dissertation werden die Möglichkeiten der AAV als Vektoren für eine Gentherapie zur Behandlung des SSADH-D mittels Zellkulturmodellen untersucht. Ein zentrales Ziel besteht darin, SSADH-enthaltende Plasmide zu validieren, welche für die Expression des SSADH-Enzyms ausgelegt sind. Diese Plasmide sollen in vitro auf ihre grundlegende Funktionalität hin überprüft werden, um zu gewährleisten, dass sie das SSADH-Enzym effektiv exprimieren können.

Zusätzlich soll innerhalb der Arbeitsgruppe eine Methode etabliert werden, welche die Produktion und Quantifizierung von AAV-Partikeln standardisiert, um die Grundlage für weitere experimentelle und potenzielle klinische Anwendungen zu schaffen. Ein weiteres wesentliches Ziel ist die Bewertung der Effektivität des AAV-DJ-Kapsids beladen mit SSADH oder GFP sowohl in HEK293T-Zellen als auch in Fibroblasten von Patienten, um umfassende Daten zur Durchführbarkeit und Effizienz dieser Gentherapieansätze zu erhalten.

2 Materialien

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Geräte, Verbrauchsmaterialien und Gefäße mit Herstellerangaben

Produktname	Produzent
Aurox Clarity Spinning-Disc Laser-freies Konfokal-Mikroskop	Aurox Ltd., Oxforshire, Vereinigtes Königreich
Bakterienschüttler, New Brunswick™; Innova ® 42R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Brozell Hygienetücher	Brod GmbH & Co. KG, Hanau, Deutschland
Cellstar® Plastikröhrchen 15 ml, 50 ml (Falcon)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Combitips advanced®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Cryo-Röhrchen, CryoPure	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland
Deckglas, Durchmesser 15 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Eiswürfelbereiter	Scotsman® Frimont, Mailand, Italien
Entwickler Maschine, Curix 60	AGFA NV, Düsseldorf, Deutschland
Filterpapier Protran BA 83	Whatman, Dassel, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Frischhaltefolie	PAP STAR GmbH, Kall, Deutschland
Glaskolben	Schott-AG, Mainz, Deutschland
Handschuhe	Ansell, Brüssel, Belgien
Heizblock	Haep Labor Consult, Bovenden, Deutschland

Inkubator, Sanyo	EWALD, Innovationstechnik GmbH, München, Deutschland
Labortücher, Kimtech Science, weiß	Kimberley-Clark Europe Limited/ Professional Sector, Reigate, Vereinigtes Königreich
Lichtmikroskop (AE 31)	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikrotestplatte 96 Well, PS, F, durchsichtig	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Multipette® E3	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
NanoQuant Plate™	Tecan Austria GmbH, Grödig, Österreich
neoLab-Rotator	neoLab®, Heidelberg, Deutschland
Nitrozellulose-Transfermembran	Whatman, Dassel, Deutschland
Objektträger	neoLab®, Heidelberg, Deutschland
Opti-Platte™-96 Well, schwarz	PerkinElmer, Zaventem, Belgien
Parafilm M ®	Bemis, Wisconsin, Vereinigte Staaten
Pasteurpipetten, Glas	VWR International, Darmstadt, Deutschland
PCR-Microseal®	Bio-Rad Laboratories GmbH, Inc., München, Deutschland
qPCR-Gerät CFX Connect Real-Time System	Bio-Rad Laboratories GmbH, Inc., München, Deutschland
96-Well PCR-Platte	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland
Pipetten, Biosphere® Filterspitzen Typ Gilson/ Eppendorf	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland
Pipetten, Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter	nerbe plus GmbH, Winsen, Deutschland

Pipettenspitzen ohne Filter	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg, Deutschland
Polystyrolküvetten, 10x4x45 mm	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg, Deutschland
Reaktionsgefäße (Eppendorf-Gefäße), 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg, Deutschland
Reaktionsgefäße (Eppendorf-Gefäße), 5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Röntgenfilm, Super RX-N	FUJIFILM, Düsseldorf, Deutschland
Röntgenkassette	BioRad Laboratories GmbH, Inc., München, Deutschland
Rundbodenröhrchen 14 ml	FALCON, Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland
Rüttelplatte (Titramax 1000)	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Scanner Epson Perfection 3200 Photo, Modell 6860B	Seiko Epson Corp., Hirooka Shiojiri-Shi, Nagano-Ken
Schwenktisch, WS-10	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
SDS-Gel Gießkammer	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
SDS-PAGE Kammer	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
Spannungsquelle, Elektrophoresis power supply, EPS 301	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
Spektralphotometer, BioPhotometer® Plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Sterilbank, Herasafe KS	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
TECAN infinite M200	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Ultraschall-Homogenisatoren, Sonopuls	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Vortex V-1 Plus	Biosan, Riga, Lettland

Vortex VELP	VELP Scientifica Srl, Usmate, Italien
Waage Toledo, PB602-S	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Waage (Analytisch), Milligramm	Denver Instrument, Göttingen, Deutschland
Wärmeschrank, Incucell	MMM-Group, Planegg, Deutschland
Wasserbad, LAUDA	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Western-Blotsystem, CriterionBlotter™	Bio-Rad Laboratories GmbH, Inc., München, Deutschland
Zellkulturflasche T 25, Standard	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland
Zellkulturplatte 6-Well, 12-Well, Standard, F	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland
Zellkulturschale, Durchmesser 100 mm	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland
Zentrifuge, J2-21	Beckmann® Instruments, Inc., Kalifornien, Vereinigte Staaten
Zentrifuge, Micro 200 R	Hettich Zentrifugen, Kirchlengern, Deutschland
Zentrifuge, Micro 22 R	Hettich Zentrifugen, Kirchlengern, Deutschland
Zentrifuge, Universal 32 R	Hettich Zentrifugen, Kirchlengern, Deutschland
Zentrifuge, Universal 320	Hettich Zentrifugen, Kirchlengern, Deutschland

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Herstellerangaben

Produktbezeichnung	Produzent
AAVanced Concentration Reagent	BioCat GmbH, Heidelberg, Deutschland
Acrylamid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin (Amp)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bradford Reagenz	BioRad Laboratories GmbH, Inc., München, Deutschland
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Vereinigte Staaten
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Vereinigte Staaten
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Merck KG, Darmstadt, Deutschland
Diethylpyrocarbonat-Wasser (DEPC-H₂O)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium, hoher Glucosegehalt (DMEM)	gibco® Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DNase I	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland
10X DNase Puffer	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	gibco® Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Glucose	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
2X HBS	Eigene Herstellung
HEPES	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Immersionsöl Type F	Leica GmbH, Wetzlar, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
iTaq Universal SYBR® Green Supermix	BioRad Laboratories GmbH, Inc., München, Deutschland
Kaliumchlorid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Luciferase Lysis-Juice 2X	PJK GmbH, Kleinblittersdorf, Germany
MACSfectin™ Reagent	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat (3 M)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
N-Octylglucosid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Non-essential Amino acids (NEAA) (100X)	gibco® Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Opti-MEM™	gibco® Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	gibco® Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA 4%)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Vereinigte Staaten
Proteaseinhibitor	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Vereinigte Staaten
Proteinmarker	BioRad Laboratories GmbH, Inc., München, Deutschland

Röntgen-Entwickler, UNIMATIC-D	Calbe Chemie GmbH, Calbe, Deutschland
Röntgen-Fixierer, UNIMATIC-F	Calbe Chemie GmbH, Calbe, Deutschland
Salzsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat 100 mM (100X)	gibco® Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Succinat-Semialdehyd (SSA)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Texas, Vereinigte Staaten
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris-Salzsäure (Tris-HCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	gibco® Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Tween-20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 30%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.3 Lösungen und Puffer

Tabelle 4: Verwendete Lösungen und Puffer mit entsprechender Zusammensetzung

Lösungen/ Puffer	Zusammensetzung
Blockierungspuffer (5%)	5% Milchpulver TBS-T
Blottingpuffer (1X)	192 mM Glycin 10% Methanol 25 mM Tris
DMEM ++	500 ml DMEM 10% FCS 1% Penicillin-Streptomycin (10.000 Einheiten/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin)
DMEM ++++	500 ml DMEM 10% FCS 1% Penicillin-Streptomycin (10.000 Einheiten/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin) 1:100 NEAA (100X) 1:100 Sodumpyruvat (100X)
2X HBS	280 mM NaCl 10 mM KCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ 12 mM Glucose 50 mM HEPES, pH 7,05
Lysepuffer (Stürmer)	50 mM Tris pH 7,4 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1% NP-40
Lysepuffer (Fibroblasten)	H ₂ O 0,2 mM PMSF 0,1% β-Mercaptoethanol
Lämmli-Gelelektrophorese-Laufpuffer	192 mM Glycin

	0,1% Natriumdodecylsulfat (SDS)
	25 mM Tris
LB-Agar	20 g Agar-Pulver
	1 l LB-Medium
LB-Medium	25 g LB-Brühe
	1 l Destilliertes Wasser
NAD⁺-Lösung (0,1 M)	66,3 mg NAD ⁺ (663,4 g/mol)
	1 ml 0,1 M NaHCO ₃
Natriumacetat-Lösung	2 M Essigsäure pH 5,2
	3 M Natriumacetat
Natriumhydrogencarbonat-Lösung (0,1 M)	50 ml Destilliertes Wasser
	0,42 g Natriumhydrogencarbonat (84,01 g/mol)
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,4	150 mM Natriumchlorid
	20 mM Natriumdihydrogenphosphat
Proteinladepuffer (4X) + DTT	0,1% Bromphenolblau
	100 mM DTT
	10% Glycerol
	2% SDS
	50 mM Tris-HCL pH 6,8
Stripping Puffer, alkalisch	0,1 M Natriumhydroxid
TBS-T (Tris gepufferte Salzlösung + Tween-20)	150 mM Natriumchlorid
	10 mM Tris-HCL pH 7,4
	0,05% Tween-20
TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer)	0,1 mM EDTA
	10 mM Tris pH 8,0
TRIS pH 8,4 (1 M)	1 M Tris pH 8,4

2.4 SDS-Polyacrylamidgele

Tabelle 5: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele

Art	Bestandteile	Volumen
Sammelgel zur Gelelektrophorese: 4% 1 mm	Destilliertes Wasser	11,7 ml
	30% Acrylamid	2,55 ml
	3 M Tris pH 6,8	0,624 ml
	10% Ammoniumpersulfat (APS)	0,075 ml
	20% Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,075 ml
	Tetramethylethylendiamin (TEMED)	0,0225 ml
Trenngel zur Gelelektrophorese: 10% 1 mm	Destilliertes Wasser	21 ml
	30% Acrylamid	13,4 ml
	3 M Tris pH 8,8	5 ml
	10% Ammoniumpersulfat (APS)	0,4 ml
	20% Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,2 ml
	Tetramethylethylendiamin (TEMED)	0,064 ml

2.5 Kits

Tabelle 6: Verwendete Kits mit Herstellerangaben

Bezeichnung	Hersteller
NucleoBond® Xtra Midi EF	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
SuperSignal® West Femto Kit (stark)	Thermo Scientific, Rockford, Vereinigte Staaten
SuperSignal® West Pico Kit (schwach)	Thermo Scientific, Rockford, Vereinigte Staaten

2.6 Plasmide

Sämtliche Plasmide mit Ausnahme von pAAV-SSADH stammen von Cell Biolabs, Inc., San Diego, USA. pAAV-SSADH wurde in der AG Tikkanen konstruiert.

Tabelle 7: Verwendete Plasmide

Konstrukt	Resistenz	Ursprung
pAAV-SSADH	Ampicillin	von AG Tikkanen zur Verfügung gestellt
pAAV-GFP	Ampicillin	Katalognummer: AAV-400
pAAV-DJ	Ampicillin	Katalognummer: VPK-420-DJ
pAAV-MCS	Ampicillin	Katalognummer: VPK-410
pHelper	Ampicillin	Katalognummer: 340202

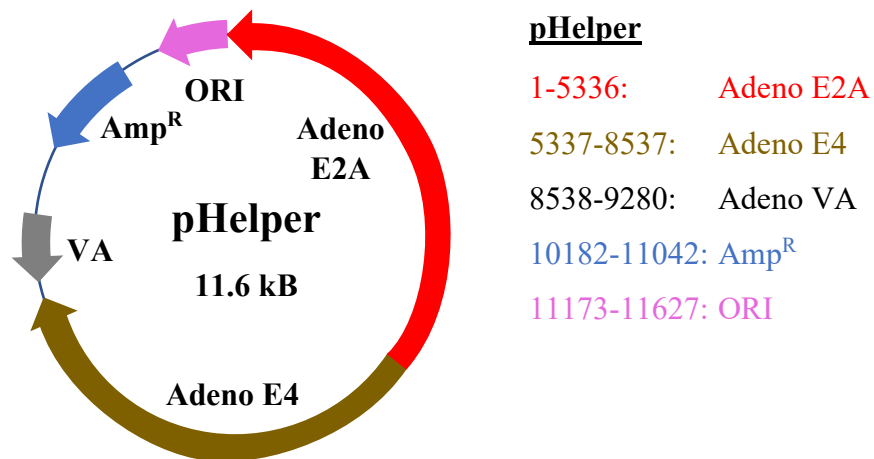
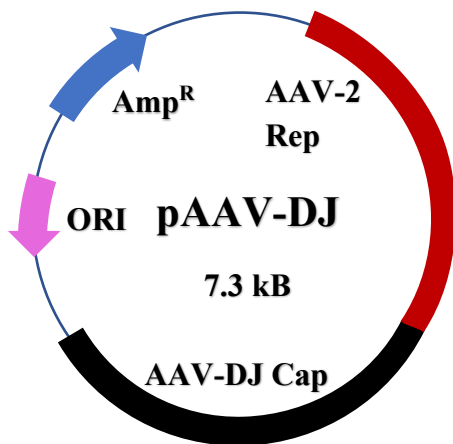
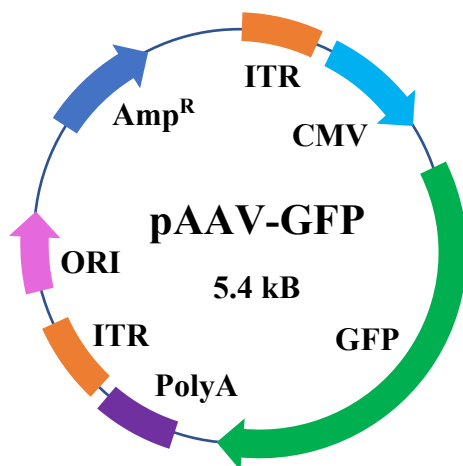


Abbildung 2: Plasmidkarte von pHelper: ORI (Origin of Replication) zeigt den Startpunkt der Replikation des Plasmids im Bakterium. Das Plasmid liefert Proteine (Adeno E2A, Adeno E4, Adeno VA), die für die Replikation der AAV obligatorisch sind. Das Plasmid hat eine Ampicillin-Resistenz (Amp^R) für die Anzucht von DNA in LB-Medium. Modifiziert nach Cell Biolabs, Inc. (Cell Biolabs, Inc. 2016).

**pAAV-DJ**

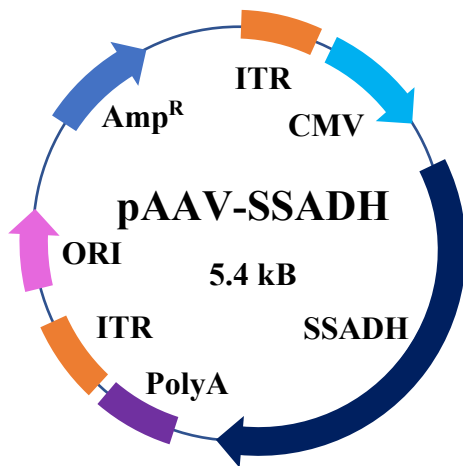
6-1871: AAV-2 Rep
 1888-4101: AAV-DJ Cap
 5606-6466: Amp^R

Abbildung 3: Plasmidkarte von pAAV-DJ: ORI zeigt den Startpunkt der Replikation des Plasmids im Bakterium. Die AAV-2 Rep Region codiert die Proteine, die für die Replikation und Verpackung des Gens von Interesse (GOI) essentiell sind. Die AAV-DJ Cap Region codiert die Proteine (VP1, VP2, VP3, AAP), die das spätere Kapsid bilden und beim Aufbau desselbigen helfen. Das Plasmid hat eine Amp^R für die Anzucht von DNA in LB-Medium. Modifiziert nach Cell Biolabs, Inc. (Cell Biolabs, Inc. 2016).

**pAAV-GFP**

1-130: Left ITR
 139-801: CMV-Promoter
 1324-2064: GFP
 2123-2601: PolyA
 2641-2781: Right ITR
 3698-4558: Amp^R

Abbildung 4: Plasmidkarte von pAAV-GFP: ORI zeigt den Startpunkt der Replikation des Plasmids im Bakterium. Left & Right ITR-Sequenzen sind essentiell für die Enkapsidierung des Transgens (Ling et al. 2015). Der CMV-Promoter fördert eine initiale, ubiquitäre, hohe Expression (Doll et al. 1996). GFP ist in diesem Fall das GOI. PolyA stabilisiert die mRNA und fördert die Expression. Das Plasmid hat eine Amp^R für die Anzucht von DNA in LB-Medium. Modifiziert nach Cell Biolabs, Inc. (Cell Biolabs, Inc. 2016).

**pAAV-SSADH**

1-130: Left ITR

139-801: CMV-Promoter

1324-2064: SSADH

2123-2601: PolyA

2641-2781: Right ITR

3698-4558: Amp^R

Abbildung 5: Plasmidkarte von pAAV-SSADH: ORI zeigt den Startpunkt der Replikation des Plasmids im Bakterium. Left & Right ITR-Sequenzen sind essentiell für die Enkapsidierung des Transgens (Ling et al. 2015). Der CMV-Promoter fördert eine initiale, ubiquitäre, hohe Expressierung (Doll et al. 1996). Humanes SSADH ist in diesem Fall das GOI. PolyA stabilisiert die mRNA und fördert die Expression. Das Plasmid hat eine Amp^R für die Anzucht von DNA in LB-Medium. Modifiziert nach Cell Biolabs, Inc. (Cell Biolabs, Inc. 2016).

2.7 Primer

Tabelle 8: Verwendete Primer

Primer	Sequenz (5' → 3')	Hersteller
AAV2 fwd ITR primer	GGAACCCCTAGTGATGGAGTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
AAV2 rev ITR primer	CGGCCTCAGTGAGCGA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

2.8 Humane Zelllinien

Tabelle 9: Verwendete Zelllinien

Bezeichnung	Information	Quelle
SSADH-KO-HEK293T-Zellen	Immortalisierte, humane, embryonale Nierenzellen, ohne SSADH-Expression, (mit CRISPR/Cas9 generiert)	(Brennenstuhl et al. 2020)
HEK293T-Zellen	Immortalisierte, humane, embryonale Nierenzellen, mit endogener SSADH-Expression	von AG Tikkanen zur Verfügung gestellt
Fibroblasten	Immortalisierte, humane Fibroblasten, mit endogener SSADH-Expression	(Mussche et al. 2013)
Fibroblasten: SSADH-Defizit-Patient	Primäre Fibroblasten, männlicher, 7-jähriger Patient <i>ALDH5A1</i> c.808G>C p. Ala270Pro und c.1111G>C p. Gly371Arg	von AG Tikkanen zur Verfügung gestellt

2.9 Bakterienstamm

Tabelle 10: Verwendete Bakterienstämme

Bezeichnung	Verwendung	Quelle
E. coli XL-1 blue	DNA-Amplifikation	Agilent/ Stratagene, La Jolla, Vereinigte Staaten

2.10 Antikörper

2.10.1 Primäre Antikörper

Tabelle 11: Verwendete Primärantikörper sowie Maßangaben für Verdünnungen

Bezeichnung	Wirt	Verwendung	Verdünnung	Hersteller
Anti-SSADH (ab155493)	Kaninchen	Immunfluoreszenz	1:100	Abcam, Cambridge,

				Vereinigtes Königreich
Anti-SSADH (ab129017)	Kaninchen	Western Blot	1:10.000	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-GFP	Maus	Western Blot	1:1.000	Roche, Basel, Schweiz
Anti-GAPDH (ab8245)	Maus	Western Blot	1:10.000	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich

2.10.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 12: Verwendete Sekundärantikörper sowie Maßangaben für Verdünnungen

Bezeichnung	Wirt	Verwendung	Verdünnung	Hersteller
Anti-Kaninchen Alexa-Fluor488	Esel	Immunfluoreszenz	1:300	Invitrogen, Dreieich, Deutschland
Polyklonale Ziege Anti-Maus Immunglobuline/ HRP-gekoppelt	Ziege	Sekundär-AK, Western Blot	1:10.000	Dako, Hamburg, Deutschland
Polyklonale Ziege Anti-Kaninchen Immunglobuline/ HRP-gekoppelt	Ziege	Sekundär-AK, Western Blot	1:10.000	Dako, Hamburg, Deutschland

2.11 Software

Tabelle 13: Verwendete Software

Software	Verwendungszweck	Hersteller
Citavi 6.14	Literaturverzeichnis	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
Microsoft Excel 2021	Berechnungen, Tabellen	Microsoft Corporation, Redmond, Vereinigte Staaten
Microsoft Word 2021	Verschriftlichung	Microsoft Corporation, Redmond, Vereinigte Staaten
FIJI (ImageJ 1.53c)	Bearbeitung & Auswertung von Fluoreszenzbildern	Open source
Aurox Visionary	Aufnahme von Fluoreszenzmikroskopiebildern	Aurox Ltd., Oxforshire, Vereinigtes Königreich
GraphPad Prism® 10.5.0	Statistische Auswertung	GraphPad Software, Inc., San Diego, Vereinigte Staaten
Bio-Rad CFX Manager™ 3.1	qPCR-Programm	BioRad Laboratories GmbH, Inc., München, Deutschland

3 Methoden

3.1 Arbeitsablauf

Der experimentelle Ablauf begann mit der Erstellung der AAV durch eine Triple-Plasmid-Transfektion in HEK293T-Zellen. Die AAV wurden gesammelt, anschließend aufgereinigt, quantifiziert und dann an verschiedenen Zellkulturen geprüft. Abschließend wurde die Expression des gewünschten Gens in den Zielzellen detailliert analysiert (Abbildung 6).

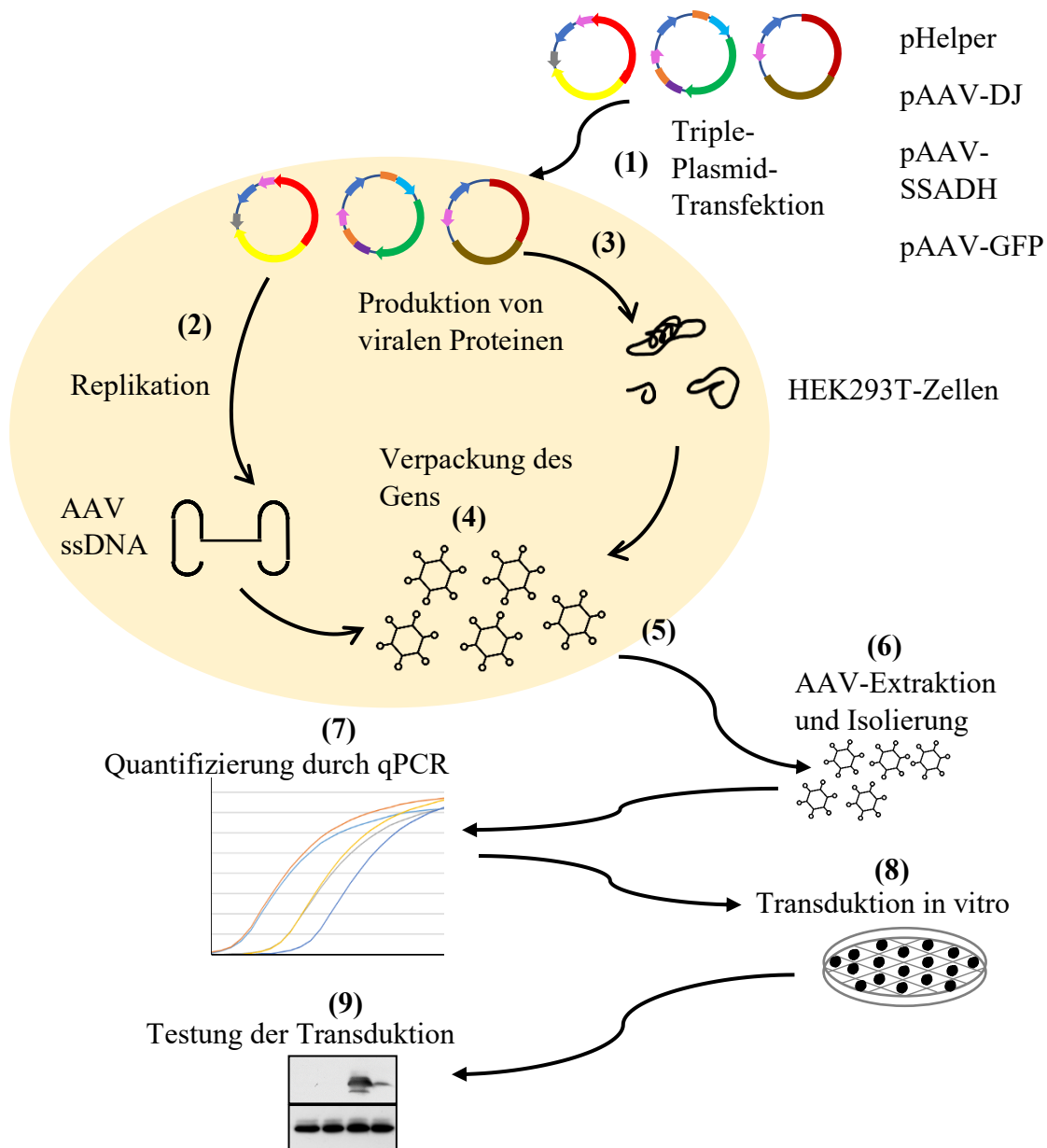


Abbildung 6: Ablauf der Produktion von AAV: Zur Initiierung der AAV-Produktion wurden HEK293T-Zellen zunächst im Rahmen einer Triple-Plasmid-Transfektion mit den Plasmiden pHelper, pAAV-DJ und dem Plasmid mit dem GOI (entweder pAAV-

GFP oder pAAV-SSADH) für einen Zeitraum von 48 bis 72 h transfiziert (1). In den transfizierten HEK293T-Zellen erfolgte die Replikation der Virus-DNA (2) und die Produktion der Virus-Proteine (3). Nachdem sich das Kapsid assemblierte, wurde das GOI verpackt (4). Das fertige Virus reichte sich sowohl in der Zelle und als auch im Zellkulturmedium an (5). Das Medium wurde eingesammelt und das Virus mithilfe von Chemikalien extrahiert und isoliert (6). Die Viruskonzentration wurde mithilfe von qPCR ermittelt (7). Die Transduktion der AAV fand an den Zielzellen statt (8). Abschließend wurden die transduzierten Zellen auf das exprimierte Protein (Gen) untersucht (9).

3.2 Kultivierung von HEK293T-Zellen und SSADH-KO-HEK293T-Zellen

Die HEK293T-Zellen wurden bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ im Inkubator kultiviert. Sie wurden auf 10 cm Platten mit 10 ml DMEM ++ gehalten. Das Medium bestand aus DMEM, 10% FCS sowie 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin.

3.3 Passagierung von HEK293T-Zellen und SSADH-KO-HEK293T-Zellen

Zum Aussäen der HEK293T-Zellen wurde erst das Medium mittels Pipetten abgesaugt. Dann wurden die Zellen vorsichtig mit 3 ml PBS gewaschen, welches wieder abgesaugt wurde. Danach wurde 2 ml 1X Trypsin zu den Zellen gegeben um deren Zell-Zell-Kontakte und Bodenhaftung zu lösen. Das Trypsin wirkte bei 37°C ca. 5-7 min im Inkubator. Gestoppt wurde dieser Prozess durch die Zugabe von 3 ml DMEM++. Im Anschluss konnten die Zellen gezählt, ausgesät und weiter prozessiert werden. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-90% 1:10 gesplittet.

3.4 Kultivierung von Kontroll-Fibroblasten und Patienten-Fibroblasten

Die Fibroblasten wurden bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ im Inkubator kultiviert. Sie wurden auf 10 cm Platten mit 10 ml DMEM ++++ gehalten. Das Medium bestand aus DMEM, 10% FCS sowie 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1:100 NEAA (100X) und 1:100 Natriumpyruvat 100 mM (100X).

3.5 Passagierung von Kontroll-Fibroblasten und Patienten-Fibroblasten

Zum Aussäen der Fibroblasten wurde erst das Medium mittels Pipetten abgesaugt. Dann wurden die Zellen vorsichtig mit 3 ml PBS gewaschen, welches wieder abgesaugt wurde. Danach wurde 2 ml 1X Trypsin zu den Zellen gegeben um deren Zell-Zell-Kontakte und Bodenhaftung zu lösen. Das Trypsin wirkte bei 37°C ca. 10 min im Inkubator. Gestoppt wurde dieser Prozess durch die Zugabe von 1 ml DMEM++++. Anschließend konnten die Zellen gezählt, ausgesät und weiter prozessiert werden. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-90% 1:3 gesplittet.

3.6 Plasmid-Aufreinigung mittels Midi-Präparation

Zuerst wurden die Plasmide (Kapitel 2.6) auf einer LB-Ampicillin (Amp)-Mediumplatte (65 µl/Platte) ausgestrichen und im Wärmeschrank bei 37°C über Nacht (ca. 18 h) inkubiert. Am nächsten Tag wurde von der Platte eine Kolonie abgetragen, die in ein 5-ml-Rundbodenröhrchen mit 4 ml LB-Amp-Flüssigmedium (100 µg/ml) getan wurde. Dies inkubierte über Nacht (ca. 18 h) bei 37°C und 220 rpm im Bakterienschüttler. Danach wurde der komplette Ansatz in 200 ml LB-Amp-Flüssigmedium (250 µg/ml) in einen 1-L-Erlenmeyerkolben überführt und wieder im Bakterienschüttler über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die optische Dichte der Lösung in Küvetten bei 600 nm gemessen. Diese sollte über 2 liegen. Dann wurde der Ansatz in 500 ml Schraubflaschen überführt und bei 4°C und 2.515 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die DNA-Extraktion der Plasmid wurde mithilfe des NucleoBond® Xtra Midi EF Kits unter Berücksichtigung der Herstelleranleitung durchgeführt. Die Isopropanolpräzipitation wurde abweichend davon durchgeführt. Nachdem 3,5 ml Isopropanol zu der Lösung gegeben wurde, wurde die Lösung 15 min bei 25.150 x g und 10°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde über Nacht (ca. 18 h) in 900 µl TE und 100 µl 3 M NaAc/ 2 M HAc gelöst. Das Gemisch wurde in ein 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend wurden 700 µl Isopropanol zur Fällung der DNA hinzugegeben. Dies wurde 30 min bei Raumtemperatur (RT) geschwenkt. Danach wurden die Eppendorf-Gefäße 15 min bei 25.150 x g und 12°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde 3-mal mit je 500 µl eiskaltem, 75-prozentigem Ethanol gewaschen. Anschließend musste das Pellet 15-20 min bei RT trocknen und wurde anschließend in TE-Puffer gelöst.

3.7 Spektrofotometrische DNA-Konzentrationsmessung

Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde am TECAN mit der NanoQuant Plate™ mit einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Hierfür wurde zuerst mit 2 µl TE-Puffer der Nullwert (Blank) gesetzt. Anschließend wurden 2 µl der in TE gelösten Plasmid DNA als Duplikate gemessen.

3.8 Transfektion von SSADH-KO-HEK293T-Zellen

Um die Plasmide zu testen, wurde eine Transfektion mittels MACSfectin Transfektionsreagenz durchgeführt. Die SSADH-KO-HEK293T-Zellen und die HEK293T-Zellen wurden auf einer 6-Well-Platte ausgesät (300.000/ Well), sodass sie am nächsten Tag ca. 50-60% konfluent waren. Hierfür wurden zunächst pro Well einer 6-Well-Platte 2 Ansätze hergestellt, die dann wie folgt beschrieben, vermischt wurden. Der erste bestand aus 100 µl Opti-MEM™ mit 1 µg Plasmid-DNA. Die zweite Mischung bestand aus 100 µl Opti-MEM™ mit 3 µl MACSfectin pro µg verwendeter Plasmid-DNA in Mix 1. Beide Mixturen inkubierten separat für 5 min bei RT. Danach wurden beide Mixturen zusammengegeben und inkubierten für 20 min bei RT. Die gesamte Menge von ca. 200 µl wurde in ein Well zu den zu transfizierenden Zellen pipettiert und 48 h inkubiert. Als Kontrolle wurden entweder unbehandelte SSADH-KO-HEK293T-Zellen (ohne SSADH Expression) oder unbehandelte HEK293T-Zellen (als positive Kontrolle für die endogene SSADH-Expression) genommen. Nachdem die Inkubationszeit abgeschlossen war, wurde das Medium abgesaugt, die Platte 1-mal mit PBS gewaschen und bei -20°C eingefroren.

3.9 Zellernte der HEK293T-Zellen sowie Zellysatherstellung nach Transfektion und Transduktion mit pAAV-SSADH

Zur Zellyse wurde die bei -20°C eingefrorene Platte auf Eis gestellt und in jedes Well der 6-Well-Platte 150 µl Stürmer-Lysepuffer (in dem 1:100 Protease-Inhibitor gelöst wurde) pipettiert. Die Zellen wurden mit einem Gummischaber abgekratzt, das Gemisch wurde in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und sofort auf Eis gestellt. Das Gemisch wurde im Abstand von 10 min 3-mal gevortext und stand in der Zwischenzeit auf Eis. Nach den 30 min Inkubationszeit wurden die Lysate 10 min bei 4°C und 25.150 x g

zentrifugiert. Der Überstand wurde in frische 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Mit diesen Lysaten wurde die SSADH-Aktivität gemessen.

3.10 Herstellung der AAV in HEK293T-Zellen mittels Triple-Plasmid-Transfektion

Zur Expressierung von SSADH und GFP wurden AAV erzeugt, welche die Transgene beinhalten. Orientierend wird auf die Abbildung 6 verwiesen. Dies geschah durch eine Triple-Plasmid-Transfektion (TPT). Diese Methode wurde gewählt, um die für die Replikation von AAV notwendigen Proteine zu liefern, welche normalerweise durch das Adenovirus 5 (AdV5) erzeugt werden. Für die TPT wurden HEK293T-Zellen als Wirtszellen ausgewählt, da sie die für die AAV-Replikation essentiellen Proteine E1A und E1B exprimieren. Die Expression von E1A und E1B ist eine charakteristische Eigenschaft dieser Zelllinie, die durch eine frühere Transformation mit AdV5 erworben wurde. Ursprünglich wurden diese Zellen entwickelt, um die Adenovirus-Forschung zu unterstützen (Graham et al. 1977). Zusätzlich sind für eine AAV-Replikation die Proteine E2A, E4 und VA erforderlich, welche durch das Plasmid pHelper bereitgestellt wurden (Abbildung 2) (Xiao et al. 1998). Auf diese Weise wurden sämtliche für die Replikation notwendigen Proteine bereitgestellt, die normalerweise durch das AdV produziert würden. Die TPT erfordert daher kein AdV und stellt somit eine sichere und praktische Methode zur AAV-Produktion dar (Nguyen et al. 2021). Für die Herstellung von AAV-Vektoren mit spezifischen Zielsequenzen wurde zusätzlich ein Plasmid benötigt, welches das GOI (in diesem Fall entweder pAAV-SSADH oder pAAV-GFP als Kontrollgen) enthielt. In diesen Plasmiden sind die ITR-Sequenzen (Inverted Terminal Repeats) aus AAV2 enthalten, welche die Verpackung des GOI in das Kapsid vermitteln (Ling et al. 2015). Außerdem ist ein CMV-Promoter enthalten, der unabhängig vom Zelltyp eine hohe anfängliche Genexpression in den Zellen gewährleistet. Zusätzlich war das Kapsid produzierende Plasmid pAAV-DJ erforderlich. Das pAAV-DJ-Plasmid besteht aus einer AAV-2 Rep-Region, welche die Proteine Rep78, Rep68, Rep52 und Rep40 kodiert, die für die Replikation notwendig sind (Abbildung 3). Außerdem kodiert die Cap-Region für die Proteine VP1, VP2, VP3 und AAP (El Andari und Grimm 2021). Diese Proteine der Cap-Region bilden das Kapsid, in welches das GOI mithilfe der ITR-Sequenzen verpackt wurde (Ling et al. 2015).

Für die TPT wurden am Vortag HEK293T-Zellen auf einer 10 cm Platte so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion möglichst 50-60% konfluent waren. Hierfür wurden zwischen 750.000 bis 2.000.000 Zellen am Vortag der Transfektion ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde zuerst das Medium (10 ml DMEM++) gewechselt. In einem 15 ml Falcon wurden je 250 µl steriles H₂O, 250 µl 0,5 M CaCl₂ und je 7 µg der Plasmide pHelper, pAAV-DJ und pAAV-SSADH/ pAAV-GFP gegeben. Dann wurde 500 µl 2X HBS in das Falcon gegeben und durch Pipettieren stark gemischt. Dieses Gemisch ruhte 30 min bei RT, bevor es auf die Zellen pipettiert wurde. Nach 4-5 h Inkubationszeit wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt (10 ml DMEM++).

3.11 Aufreinigung der AAV

Nach 48 bis 72 h wurde das AAV-enthaltende-Medium der transfizierten HEK293T-Zellen gemäß dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt, wofür das Medium in ein 15 ml Falcon überführt und dann 5 min bei 3.850 x g zentrifugiert wurde, um restliche Zellen zu entfernen. Der Überstand wurde in ein frisches 15 ml Falcon überführt. Entsprechend des Volumens wurde nun $\frac{1}{4}$ des Überstandvolumens AAVanced Concentration Reagent hinzugefügt, welches die AAV-bindenden Beads enthält und sich mit ihnen am Boden des Gefäßes absetzt. Nach dem Mischen ruhte die Lösung für 24-72 h bei 4°C. Dann wurde sie für 30 min bei 3.850 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf max. 1 ml Flüssigkeit verworfen, und das Pellet wurde in der Flüssigkeit resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Dieses Gefäß wurde nun bei 25.150 x g für 2 min zentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen. Um das restliche Virus zu überführen wurde der ursprüngliche Falcon mit 500 µl PBS gewaschen. Die Lösung wurde zu dem Eppendorf-Gefäß hinzugegeben und das Eppendorf-Gefäß wieder 2 min bei 25.150 x g zentrifugiert. Dann wurde das Pellet mit 500 µl PBS gewaschen und anschließend in 200 µl PBS resuspendiert und als 30 µl Aliquot bei -80°C eingefroren (System Biosciences 2022).

3.12 AAV-Titration durch SYBR Green qPCR und Berechnung der Konzentration

Um das aufgereinigte Virus zu quantifizieren, wurde ein modifiziertes Protokoll von Addgene angewandt. Die Quantifizierung wurde mithilfe der AAV2-ITR-Sequenzen

durchgeführt, die in AAV-DJ vorkommen, sodass dadurch nur die beladenen Kapside quantifiziert wurden. Als Referenzwert wurde das pAAV-GFP Plasmid genutzt, welches auf die Konzentration von 2×10^9 Molekülen/ μl verdünnt wurde. Hiervon wurden 7 serielle 1 zu 10-Verdünnungen hergestellt. Mithilfe dieser Verdünnungsreihe wurde eine Standardkurve erstellt. 5 μl von der AAV-Probe wurden mit 39 μl H₂O, 5 μl 10X DNase Puffer und 1 μl DNase 1 gemischt. Dieses Gemisch inkubierte 30 min bei 37°C und wurde anschließend auf Eis transferiert. Hiermit wurden mögliche Verunreinigungen durch Plasmid-DNA beseitigt. Aus diesem Mix wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. 5 μl des Referenzplasmids oder der AAV-Proben wurden dann als Template für die Real-Time PCR benutzt und doppelt in 96-Well-PCR-Platte pipettiert. Dazu kam der Master Mix, welcher aus 10 μl Universal SYBR-green, 0,03 μl 100 μM fwd Primer, 0,03 μl 100 μM rev Primer und 5 μl DEPC-H₂O bestand. Die versiegelte 96-Well-PCR-Platte wurde 2 min bei 1.380 x g zentrifugiert. In der qPCR-Maschine wurde folgendes Protokoll eingestellt: 98°C 3 min, 98°C 15 s und 60°C 30 s, Platte auslesen, 39-mal ab Schritt 2 wiederholen, Schmelzkurve (Tabelle 14) (Addgene 2019).

Tabelle 14: Temperaturprogramm für die qPCR

Zyklusschritt	Temperatur (°C)	Dauer
1. Vorinkubation	98	3 min
2. Denaturierung	98	15 s
3. Hybridisierung und Auslesen	60	30 s
4. Denaturierung	95	10 s
5. Schmelzkurve	Von 65°C in 0,5°C Schritten bis 95°C	Pro Schritt 5 s

39-mal
Wiederholen

Die Quantifizierung des gereinigten AAV wurde unter Verwendung eines Protokolls der Firma Addgene durchgeführt (Addgene 2019; Aurnhammer et al. 2012). Unter Verwendung einer Verdünnungsreihe des Referenzplasmids pAAV-GFP wurde eine lineare Regression durchgeführt (Abbildung 7). Mithilfe dieser Regressionsgleichung (bspw. $y = -3,04x + 38,05$) wurde der Ct-Wert für jede Verdünnung der AAV-Probe umgerechnet auf die Anzahl der Moleküle und damit auf die Konzentration der AAV pro ml bzw. μl (Abbildung 8). Es wurde ein Mittelwert aus mehreren Verdünnungen gebildet.

Es ist erwähnenswert, dass das Bestimmtheitsmaß R^2 der Regressionsgleichung über 0,95 lag, was auf ausgezeichnete Übereinstimmung der Daten mit dem linearen Modell hinweist (Abbildung 7).

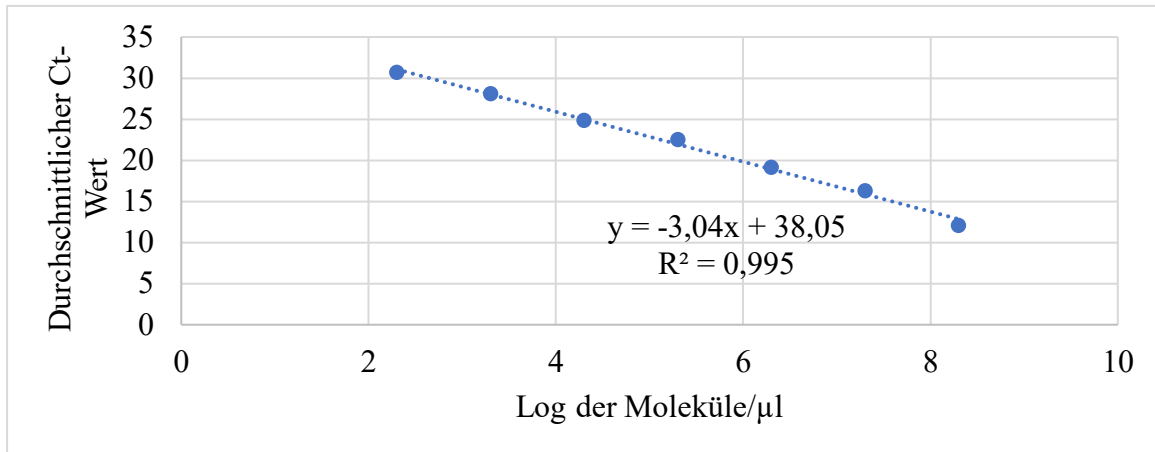


Abbildung 7: Beispiel einer Regressionsgeraden als Berechnungsgrundlage: Zuerst wurde pAAV-GFP auf 2×10^9 Moleküle pro μl verdünnt. Damit wurde eine Verdünnungsreihe zum Herstellen der Regressionsgleichung gemacht. Das Log der Moleküle wurde anhand der Verdünnung berechnet.

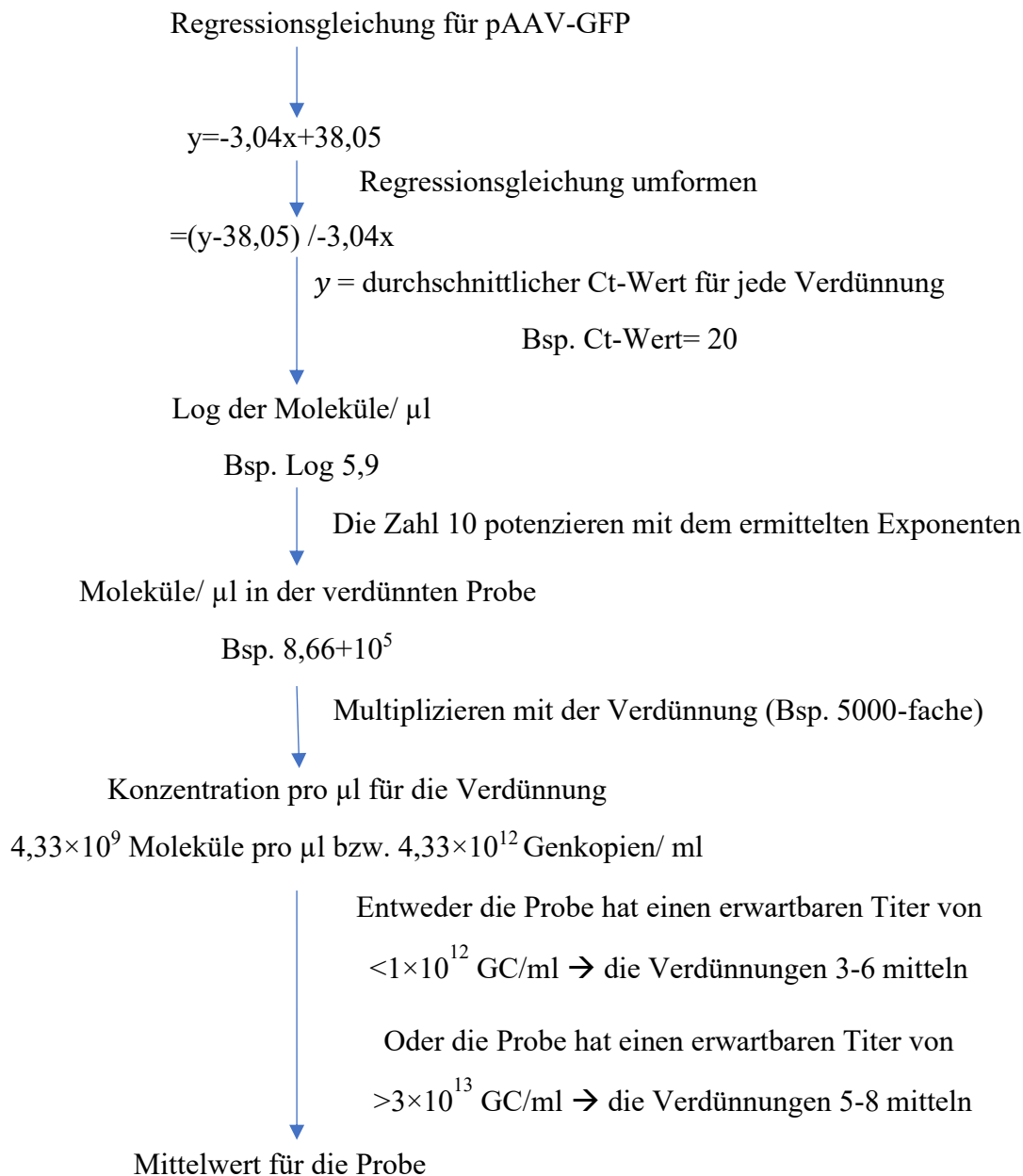


Abbildung 8: Berechnung der AAV-Konzentration in einer Probe, anhand einer Beispielrechnung.

3.13 Transduktion von Zellen durch AAV

Für die Transduktion wurden am Vortag Zellen ausgesät (Tabelle 15). Hierbei wurden unterschiedliche Zellzahlen ausgesät, um am Ende der jeweiligen Inkubationszeit eine 100-prozentige Konfluenz der Zellen zu erhalten. Dadurch wurden die Proteinkonzentrationen der Zelllysate (4-8 μ g/ μ l Lysat für HEK293T-Zellen) ähnlich. Auf den 6-Well-Platten wurden die Zellen in 2 ml Medium (DMEM++ (HEK293T-Zellen) oder DMEM++++ (Fibroblasten)), auf den 12-Well-Platten in 1 ml Medium

gehalten. Am Tag der Transduktion wurde 1 ml Medium mit der Menge an Virus, die der berechneten Multiplicity of Infection (MOI) entsprach, in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß angesetzt. Das MOI ist das Verhältnis von Viruspartikel pro zu transduzierender Zelle.

Bsp.: MOI 1.000 für HEK293T-Zellen, 12-Well, 72 h

→ $\text{MOI} \times \text{Zellzahl} = 1.000 \times 50.000 = 50.000.000$

→ 50.000.000 Viruspartikel werden benötigt.

Danach wurde das Medium abgesaugt und das Virus-Medium-Gemisch wurde auf die Zellen gegeben. Davor wurde 1 ml Medium pro Well in die 6-Well-Platten gegeben. Nachdem die Inkubationszeit abgeschlossen war, wurde das Medium abgesaugt, die Platte 1-mal mit PBS gewaschen und bei -20°C eingefroren.

Tabelle 15: Ausgesäte Zellmengen je Zelllinie, Inkubationszeit und Zweck: Die angegebenen Zellzahlen wurden am Vortag der Transduktion ausgesät. Zellzahlen sind pro Well angegeben.

	HEK293T-Zellen		Fibroblasten
	6-Well (Expressionsmessung)	12-Well (Fluoreszenz)	6-Well (Expressionsmessung)
24 h	500.000	200.000	Nicht durchgeführt
48 h	300.000	100.000	350.000
72 h	100.000	50.000	Nicht durchgeführt

3.14 Zellernte von HEK293T-Zellen sowie Zelllysatherstellung nach Transfektion oder Transduktion mit pAAV-GFP

Zur Zelllyse wurde die vorher eingefrorene Platte auf Eis gestellt und 150 µl Luciferase Lysis-Juice 1X wurde in jedes Well der 6-Well-Platte pipettiert. Danach wurde die Platte für 30 min bei RT auf eine Rüttelplatte gestellt. Anschließend wurden die Zellen mit einem Gummischaber abgekratzt, in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und bei -20°C eingefroren. Am nächsten Tag wurde das Lysat 3 min bei 4°C und $20.500 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Diese Lysate wurden für die GFP-Untersuchungen genutzt.

3.15 Fibroblasten Zellernte sowie Zellysatherstellung nach der Transduktion mit pAAV-SSADH

Zur Zellyse wurde die 6-Well-Platte von -20°C auf Eis gestellt. In jedes Well der 6-Well-Platte wurden 150 µl H₂O (mit 0,2 mM PMSF und 0,1% β-Mercaptoethanol) pipettiert. Anschließend wurden die Zellen gründlich mit einem Gummischaber abgekratzt. Das so erstellte Gemisch wurde in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße gefüllt und sofort auf Eis gestellt. Die Zellen wurden im Anschluss für 12 Sek. bei einer Stärke von 90% und einer Frequenz von 1 Hz mit Ultraschall behandelt (Sonopuls). Danach wurden die Lysate 10 min bei 4°C und 25.150 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in frische 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Mit diesen Lysaten wurde direkt die SSADH-Aktivität gemessen.

3.16 Proteinbestimmung nach Bradford

Um die Ergebnisse pro µg Protein vergleichen zu können, mussten die Proteinkonzentrationen der Lysate mithilfe des Magellan-Programms am TECAN bei 595 nm bestimmt werden. Hierfür wurde eine durchsichtige 96-Well-Platte benutzt. Pro Probe oder Standard (BSA) wurden je 10 µl als Triplikate in die Wells gefüllt. Danach wurde 200 µl Bradford-Reagenz (1:5 mit ddH₂O verdünnt) in die Wells gefüllt. Je nach Zelltyp und Zeitpunkt mussten die Lysate vorher noch mit H₂O verdünnt werden, damit sie in den linearen Messbereich fallen.

Tabelle 16: Konzentrationen der BSA-Standardreihe

BSA-Standardreihe	Konzentration (mg/ml)
S0	0
S1	0,02
S2	0,05
S3	0,1
S4	0,15
S5	0,2
S6	0,25
S7	0,3

3.17 Western Blot

3.17.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zuerst wurden 1 mm dicke Polyacrylamidgele bestehend aus einem 4%-igem Sammelgel und einem 10%-igem Trenngel hergestellt. Pro Probe wurde die Proteinmenge auf ca. 20 µg pro 30 µl mittels H₂O verdünnt. Zusätzlich wurde ein 4X Proteinladepuffer + 0,05 M DTT hinzugegeben. Für die Denaturierung der Proteine wurden die Proben 5 min bei 94°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Dann wurden die Proben in die Taschen der Gele pipettiert. Bei 20 mA Stromstärke pro Gel wurden unter Verwendung eines Lämmli-Puffers die Proteine der Größe nach aufgetrennt. Dies war nach 90-110 min abgeschlossen, wenn die kleinsten Proteine einen Abstand von ca. 1 cm zum Gelende hatten.

3.17.2 Blotten

Nach der Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Hierfür wurde das Sammelgel 1 bis 2 mm aus dem unteren Gelende abgetrennt. Auf das Gel wurde eine Nitrozellulosemembran gelegt und von jeder Seite zwischen Filterpapieren und Schwämmen umschlossen. Die Apparatur wurde in die mit gekühltem Blottingpuffer gefüllte Blotkammer gelegt. Der Proteintransfer vom Gel auf die Membran fand für 90 min bei 400 mA statt.

3.17.3 Immundetektion

Nach dem Blotten wurde die Membran in ein Glasgefäß auf einen Schwenktisch gestellt. Hier wurde sie zuerst einmal mit TBS-T gewaschen und danach für 30 min mit 5%-igem Milchpulver in TBS-T geschwenkt. Dies war zum Blockieren der Membrane notwendig. Anschließend wurde die Membran kurz mit TBS-T gewaschen und dann bei 4°C über Nacht mit primärem Antikörper (Anti-SSADH/-GFP/-GAPDH, Verdünnung siehe Kapitel 2.10.1) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran zuerst dreimal für je 10 min mit TBS-T auf dem Schwenktisch gewaschen. Danach wurde der sekundäre Antikörper (Anti-Kaninchen oder Anti-Maus Verdünnung s. Kapitel 2.10.2) für 1 h auf die Membran getan. Anschließend wurde die Membran auf dem Schwenktisch mit TBS-T dreimal für je 10 min gewaschen. Die Membran wurde dann auf eine Frischhaltefolie gelegt und mit einem Tuch kurz abgetrocknet. Danach wurde für 3 min das Substrat

(Mischung aus SuperSignal® West Femto Kit und SuperSignal® West Pico Kit) appliziert. Das Substrat wurde im Anschluss aus der Folie herausgedrückt und die Membran samt Folie in eine Röntgenkassette geklebt. Ein Röntgenfilm wurde auf die Membran gelegt und die Kassette verschlossen. Je nach Signalstärke blieb der Film unterschiedlich lange auf der Membran, bevor er entwickelt wurde.

3.17.4 Strippen

Um die gebundenen Antikörper von der Nitrozellulosemembran zu entfernen, wurde die Membran für 10 min in eine 0,1 M NaOH-Lösung geschwenkt. Danach wurde die Membran mit 5% Milch für 30 min blockiert. Anschließend wurde die Membran kurz mit TBS-T gewaschen, sodass neue Antikörper auf die Membran gegeben werden konnten.

3.18 GFP-Fluoreszenzmessung

Nach der Transduktion der SSADH-KO-HEK293T-Zellen mit den pAAV-GFP Viren wurde die relative GFP-Menge mittels einer Fluoreszenzmessung bei 485 nm Exzitation und 530 nm Emission am TECAN festgestellt. 40 µl des Lysats wurden als Duplikate auf eine schwarze Opti-Platte™-96-Well pipettiert. Dann wurden die Wells mit 100 µl H₂O aufgefüllt. Nach der Messung wurde der Mittelwert aus den Duplikaten berechnet. Die Negativkontrolle (nicht-transduzierte Zellen, SSADH-KO-HEK293T-Zellen, MOI 0) wurde von den ermittelten Werten abgezogen. Diese Werte wurden dann zu der Proteinkonzentration normalisiert und als absolute Werte dargestellt.

3.19 NAD⁺-abhängige SSADH-Aktivitätsmessung

Die SSADH-Aktivitätsmessung basiert auf der indirekten Messung von NADH (fluoreszierend), welches bei der Umwandlung von SSA (Substrat) durch SSADH (Enzym) mit dem Kofaktor NAD⁺ entsteht. Für die Messung wurden 10 µl Lysat als Duplikat auf eine schwarze Opti-Platte™-96-Well pipettiert. Zu den 10 µl wurden 90 µl Mastermix gegeben. Dieser bestand aus 200 µM SSA, 3 mM NAD⁺, 0,1 mM EDTA und 0,1 M TRIS pH 8,4. Zusätzlich gab es den gleichen Mastermix ohne das Substrat (SSA), der als Negativkontrolle diente, um etwaige SSA-unabhängige NAD⁺-Reduktionsprozesse zu messen. Danach wurde die Platte mit Parafilm verschlossen und

über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Fluoreszenzmessung bei 355 nm Exzitation und 470 nm Emission am TECAN. Die ermittelten Duplikate wurden gemittelt. Die SSADH-Aktivität wurde als absoluter Wert kalkuliert. Hierfür wurde die Emission der Proben ohne SSA von den Proben mit SSA subtrahiert. Dann wurden die Ergebnisse zur Proteinkonzentration normalisiert und in Relation zum Wildtyp dargestellt.

z.B.: Mittelwert von B 1/2 minus A 1/2 (Tabelle 17)

Tabelle 17: Beispielsanordnung für SSADH-Aktivitätsmessung

	1/2	3/4	5/6	7/8	9/10	11/12
A Master- mix +SSA	SSADH- KO- HEK293T MOI 0	SSADH- KO- HEK293T MOI 500	SSADH- KO- HEK293T MOI 1.000	SSADH- KO- HEK293T MOI 2.500	SSADH- KO- HEK293T MOI 5.000	HEK293T
B Master- mix -SSA	SSADH- KO- HEK293T MOI 0	SSADH- KO- HEK293T MOI 500	SSADH- KO- HEK293T MOI 1.000	SSADH- KO- HEK293T MOI 2.500	SSADH- KO- HEK293T MOI 5.000	HEK293T

3.20 Fluoreszenzmikroskopie

3.20.1 GFP-Eigenfluoreszenz

Um die genaue Lokalisation und Expression von GFP in den Zellen zu ermitteln, wurden HEK293T-Zellen und SSADH-KO-HEK293T-Zellen fixiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dafür wurden zuerst Deckgläser (15 mm Durchmesser) in Poly-L-Lysin getaucht und dann in ein Well einer 12-Well-Platte gelegt. Dies wurde gemacht, um die Haftung der HEK293T-Zellen auf dem Deckglas zu stärken, damit sich die Zellen während der Waschvorgänge nicht ablösen würden. Poly-L-Lysin ist eine extrazelluläre Matrix-ähnliche Substanz, welche die Haftung der Zellen an der Glasoberfläche stärkt. In die Wells wurden die Zellen gesät (Tabelle 15). Am 2. Tag wurde die AAV-DJ-GFP-Transduktion, wie in Kapitel 3.13 beschrieben, durchgeführt. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und die Zellen

zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Wells mit 300 μ l Paraformaldehyd 4% (PFA 4%) gefüllt, welches bei 37°C 10 min inkubiert. Das PFA 4% wurde abgesaugt und die Deckgläser zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläser aus den Wells geholt, die übrige Flüssigkeit wurde am Rand abgetrocknet. Auf einen Objektträger wurden 7 μ l Mounting Medium mit DAPI pipettiert, und die Deckgläser wurden mit den Zellen nach unten in das Medium gelegt. DAPI interkaliert mit der DNA der Zellkerne und färbt diese so an. Dies trocknete 1-2 h bei RT und wurde dann bei 4°C gelagert.

3.20.2 SSADH-Immunfluoreszenz

Um die genaue Lokalisation und Expression von SSADH in den Zellen zu ermitteln, wurden HEK293T-Zellen und SSADH-KO-HEK293T-Zellen angefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dafür wurden, wie bei der GFP-Eigenfluoreszenz, die Deckgläser (15 mm Durchmesser) zuerst in Poly-L-Lysin getaucht und dann in eine 12-Well-Platte gelegt. In die Wells wurden nun Zellen gesät (Tabelle 15). Am 2. Tag wurde die AAV-DJ-SSADH-Transduktion, wie in Kapitel 3.13, durchgeführt. Nachdem Abschluss der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden einmal vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend wurde in jedes Well 1 ml eiskaltes Methanol (100%) gefüllt, und die Platte für 8 min bei -20°C gelagert. Danach wurde das Methanol weggeschüttet und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und dann bei RT 10 min mit 1 ml PBS pro Well inkubiert. Dann wurden die Deckgläser mit einer Pinzette aus den Well genommen, auf einem Tuch am Rand abgetrocknet und mit den Zellen nach oben in eine Feuchtkammer gelegt. Auf jedes Deckglas wurden 30 μ l 1-prozentigem BSA in PBS pipettiert. Die Deckgläser blieben bei RT für 20 min in der Feuchtkammer. In der Zwischenzeit wurde der primäre AK (Kaninchen Anti-SSADH, AB155493) angesetzt. Dieser wurde 1:100 in 1% BSA in PBS verdünnt. Nach den 20 min wurden die Deckgläser von Flüssigkeit befreit und auf jedes Deckglas 30 μ l des primären AK-Gemisch pipettiert. Dies inkubiert bei RT für 60 min in einer Feuchtkammer. Danach mussten die Deckgläser 3-mal mit PBS gewaschen werden. Anschließend wurden 30 μ l des sekundären AK (Anti-Kaninchen, Alexa 488-gekoppelt, 1:300 in 1% BSA in PBS) auf jedes Deckglas pipettiert und für 45 min bei RT in der Feuchtkammer belassen. Anschließend wurden die Deckgläser 3-mal mit PBS und 1-mal mit ddH₂O gewaschen. Auf einen Objektträger wurden 7 μ l Mounting Medium mit DAPI

gegeben, und die Deckgläser wurden mit den Zellen nach unten in das Medium gelegt. Dies trocknete 1-2 h bei RT und wurde dann bei 4°C gelagert.

3.21 Auswertung der Fluoreszenzmikroskopiebilder

Nachdem die Zellen nach der Transduktion fixiert und angefärbt waren, erfolgte die Betrachtung der Präparate unter einem Fluoreszenzmikroskop. Für Dapi lag das Exzitationsmaximum bei einer Wellenlänge von 390 nm, das Emissionsmaximum bei 445 nm. Für GFP und SSADH lag das Exzitationsmaximum bei einer Wellenlänge von 482 nm, das Emissionsmaximum bei 525 nm (Aurox 2023). Die Belichtungszeiten waren für die Negativ-Kontrolle als auch für die transduzierten Zellen identisch. Die Bilder wurden mit 63-fachem Objektiv (Öl-Immersion) mit Aurox Visionary-Software aufgenommen. Anschließend wurden die Bilder mit der FIJI-Bildbearbeitungssoftware verarbeitet. Dort wurden zuerst die beiden Kanäle (DAPI: blau, GFP oder SSADH: beide grün) voneinander getrennt und der Hintergrund wurde mit sliding paraboloid (rolling ball radius 50 pixel) subtrahiert. Anschließend wurde die Eigenfluoreszenz durch die Negativkontrollen (MOI 0) bestimmt und zusätzlich abgezogen (GFP 40/ SSADH 800). Danach wurden die Kanäle wieder vereinigt. Die Auswertung der Fluoreszenzmikroskopiebilder erfolgte durch Zählen der positiven Zellen mittels des Plugins Cellcounter in FIJI. Pro Versuch wurden mindestens 200 Zellen gezählt. Im Anschluss wurden die Ergebnisse als positiver prozentualer Anteil der Zellen in einem Graph dargestellt.

3.22 Statistische Auswertung und Bildbearbeitung

3.22.1 Statistik

Falls nicht anders erwähnt, wurden die Experimente mindestens dreimal durchgeführt. Für die statistische Analyse wurde GraphPadPrism® Version 5.02 (San Diego, Vereinigte Staaten) verwendet. Die Auswertung wurde entweder mit der One-way-ANOVA-Varianzanalyse (ein Inkubationszeitraum) oder mit der Two-way-ANOVA-Varianzanalyse (mehrere Inkubationszeiträume) durchgeführt. Für die angegebenen p-Werte gelten folgende Grenzen als signifikant: *p <0,05, **p <0,01, ***p < 0,001 und ****p <0,0001. Diese Werte wurden zu einer festgelegten Kontrolle angegeben. Die dargestellten Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung aufgeführt. Berechnungen

von Mittelwerten und Standardabweichungen sind in Microsoft Excel (Redmond, Vereinigte Staaten) durchgeführt worden.

3.22.2 Elektronische Manipulation der Abbildungen

Die gezeigten Abbildungen wurden nur durch Kontrast- oder Helligkeitseinstellungen über die gesamte Bildfläche verändert. Die Bearbeitung der Mikroskopiebilder wird unter 3.21 beschrieben.

3.23 Ethikvotum

Unter dem Aktenzeichen 144/21 "Errichtung einer forschungsbezogenen Biobank mit Zellen/Gewebe von Patienten mit seltenen genetischen Erkrankungen" ist das positive Ethikvotum für Experimente an Patientenzellen im Rahmen der in dieser Doktorarbeit verwendeten Zellen.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung des AAV-Titrationsprotokolls mittels qPCR in HEK293T-Zellen

Während der TPT wurden die AAV in den HEK293T-Zellen produziert und in das Kulturmedium ausgeschüttet. Wie von Lock et al. beschrieben, wurde das gesammelte Kulturmedium zur Isolierung der Viren verwendet (Lock et al. 2010). Nach der Isolierung wurden die Viren quantifiziert, um die MOI für die späteren Transduktionen zu berechnen.

4.2 Überprüfung des AAV-SSADH-Plasmids mittels MACSfectin-Transfektion an SSADH-KO-HEK293T-Zellen

Die Voraussetzung für die folgenden Experimente war, dass das pAAV-SSADH funktionsfähiges SSADH-Protein exprimiert. Um dies zu gewährleisten wurde eine transiente Transfektion mit pAAV-SSADH an SSADH-KO-HEK293T-Zellen durchgeführt. Diese Zellen wurden durch die CRISPR-Cas9-Technologie in der AG Tikkanen etabliert (Brennenstuhl et al. 2020). Den Zellen fehlen jegliche SSADH-Expression und somit auch die SSADH-Aktivität. Die überprüften Zellen wurden sowohl mittels Western Blot als auch durch Aktivitätsmessung auf das Vorhandensein von SSADH untersucht. In Abbildung 9 A ist zu sehen, dass die SSADH-KO-HEK293T-Zellen, welche mit dem pAAV-SSADH-Plasmid transfiziert wurden, hohe Mengen an SSADH-Protein exprimierten. Die nicht-transfizierten HEK293T-Zellen, welche endogene SSADH-Mengen exprimierten, dienten als Positivkontrolle. Die SSADH-KO-HEK293T-Zellen, die entweder nicht transfiziert wurden oder mit einem Kontrollplasmid (pAAV-MCS) transfiziert wurden, dienten als Negativkontrolle und zeigten keine SSADH-Expression. Darüber hinaus wurde eine Aktivitätsmessung durchgeführt, bei der die Transfektion mit pAAV-SSADH in den SSADH-KO-HEK293T-Zellen eine relative SSADH-Aktivität von ca. 120% im Vergleich zu den HEK293T-Zellen (mit endogenem SSADH) hervorrief (Abbildung 9 B). Der Unterschied zwischen pAAV-SSADH und HEK293T war nicht signifikant. Die als Negativkontrolle mit pAAV-MCS (kein Transgen) transfizierten SSADH-KO-HEK293T-Zellen zeigten eine Aktivität von ca. 15% im Vergleich zu den HEK293T-Zellen. Es ist zu beachten, dass diese Aktivitätsmessung nicht direkt die SSADH-Aktivität maß. Stattdessen wurde die Fluoreszenz gemessen, welche durch die Umwandlung von NAD⁺ zu NADH durch

SSADH katalysiert wurde. Allerdings gibt es auch andere Enzyme, die diese Umwandlung katalysieren können, was zu der scheinbar geringen SSADH-Aktivität in den KO-Zellen führte.

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse, dass das pAAV-SSADH-Plasmid ausreichende Mengen an SSADH-Protein exprimiert und die Aktivität von SSADH in den SSADH-KO-HEK293T-Zellen vollständig wiederherstellte.

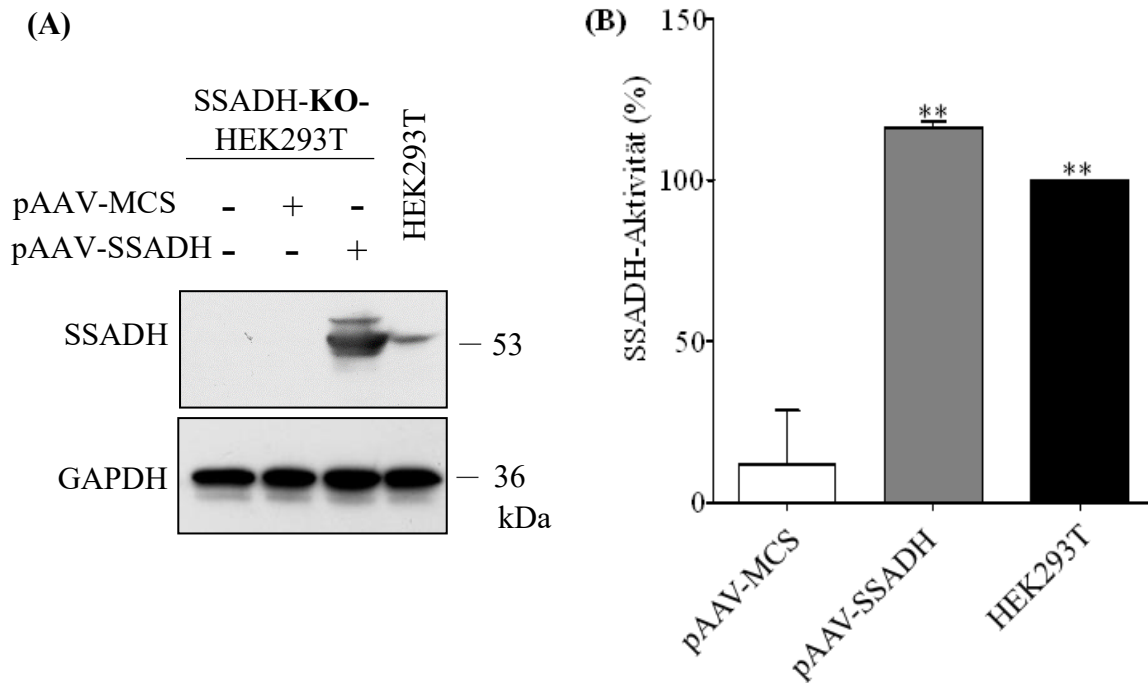


Abbildung 9 (A, B): Überprüfung des pAAV-SSADH-Plasmids: SSADH-KO-HEK293T-Zellen wurden mittels MACS-Fectin mit 1 μg pAAV-MCS oder pAAV-SSADH für 48 h transfiziert, anschließend lysiert und mittels Western Blot (A) und SSADH-Aktivitätsassay (B) analysiert. (A) 20 μg des Zelllysats wurden mit Western Blot analysiert, als Ladekontrolle wurde GAPDH (36 kDa) verwendet. Ein repräsentativer Western Blot aus 2 Experimenten wird gezeigt. (B) 10 μl des Zelllysats wurden in Duplikaten auf eine 96-Well Platte geladen und die SSADH-Aktivität wurde als Unterschied der Fluoreszenz durch die Reduktion von NAD^+ in NADH bei 470 nm gemessen. Die SSADH-Aktivität ist als relative Aktivität (in % endogener Aktivität) dargestellt. Die endogene SSADH-Aktivität von HEK293T-Zellen wurde als 100% festgesetzt. Statistik: One-way ANOVA und Tukey-Test zu pAAV-MCS (*) und pAAV-SSADH (+). Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus 3 eigenständigen Versuchen. Signifikanzgrade gegenüber pAAV-MCS sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

4.3 Untersuchung der AAV-DJ-GFP-Transduktion mit niedrigen MOI an SSADH-KO-HEK293T-Zellen

Das Potential der AAV (MOI, Proteinmenge, Inkubationsdauer, Distribution) wurde zunächst mit einer Transduktion der hergestellten AAV-DJ-GFP an SSADH-KO-HEK293T-Zellen geprüft. Das grüne fluoreszierende Protein (GFP) wurde als Reportergen gewählt, da es eine einfache und schnelle Methode (direkte Messung der Fluoreszenz, keine Immunfärbung) zur Analyse der transduzierten Zellen bot. Es wurde angenommen, dass die gewonnenen Erkenntnisse auf die Transduktion des SSADH-Gens übertragbar seien, da dasselbe Transgen-verpackende Kapsid verwendet wurde.

Die Transduktion wurde mit verschiedenen MOI (0, 500, 1.000, 2.500, 5.000) und variierenden Inkubationszeiten (24, 48 und 72 h) geprüft. Die Auswahl der MOI-Bandbreite erfolgte gemäß den Empfehlungen der Entwickler des DJ-Kapsids (Grimm et al. 2008). Die Expression von GFP wurde durch Western Blot, GFP-Fluoreszenzmessung und Fluoreszenzmikroskopie gemessen.

Im Western Blot zeigte sich, dass die Expression von GFP bei den MOI 500 und 1.000 deutlich schwächer war, im Vergleich zu den MOI 2.500 und 5.000. Dies deutet auf eine dosisabhängige Steigerung der GFP-Expression hin (Abbildung 10). Die GFP-Expression in den Zelllysaten nach 72 h Inkubationszeit war deutlich schwächer, im Vergleich zu den anderen Zeitpunkten. Hingegen war die Expression nach 24 und 48 h ähnlich stark. Die nicht-transduzierten SSADH-KO-HEK293T-Zellen, welche als Negativkontrolle dienten, zeigten keine GFP-Expression.

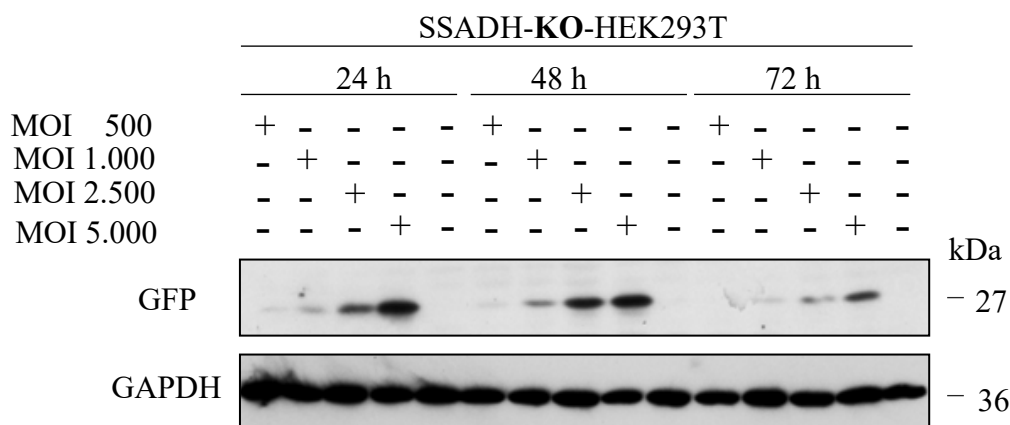


Abbildung 10: Western Blot der AAV-DJ-GFP Transduktion von SSADH-KO-HEK293T-Zellen: SSADH-KO-HEK293T-Zellen wurden auf eine 6-Well Platte ausgesät (100.000 für 72 h, 300.000 für 48 h, 500.000 für 24 h). Dann wurden sie mit ansteigenden MOI (0, 500, 1.000, 2.500, 5.000) von AAV-DJ-GFP transduziert und für

24, 48 oder 72 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und 20 µg des Lysats mit Western Blot analysiert. Zur Ladekontrolle wurde GAPDH (36 kDa) verwendet. Ein repräsentativer Western Blot aus 3 Experimenten wird gezeigt.

Unter Verwendung derselben Zelllysate, welche für den Western Blot verwendet wurden, wurde die GFP-Fluoreszenz gemessen. Für die GFP-Fluoreszenz wurde eine signifikante dosisabhängige Steigerung der Fluoreszenz gemessen, sodass der höchste Wert für MOI 5.000 für jede Inkubationszeit gemessen wurde (Abbildung 11). Zur Bestimmung der spezifischen GFP-Fluoreszenz wurden die Autofluoreszenz-Signale der nicht transduzierten Zellen (MOI 0) erfasst und gemittelt. Diese Mittelwerte wurden von den gemessenen GFP-Fluoreszenzsignalen der anderen MOI subtrahiert und die MOI 0 anschließend als Hintergrundsignal „0“ normiert. Die niedrigsten GFP-Fluoreszenzwerte wurden für MOI 500 festgestellt. Darüber hinaus zeigte sich, dass unabhängig von der MOI, die GFP-Fluoreszenz nach einer Inkubationszeit von 48 h am höchsten war. Die zweithöchsten Fluoreszenzwerte wurden nach 24 h Inkubationszeit erreicht. Die geringsten Fluoreszenzwerte wurden hingegen nach 72 h Inkubationszeit gemessen.

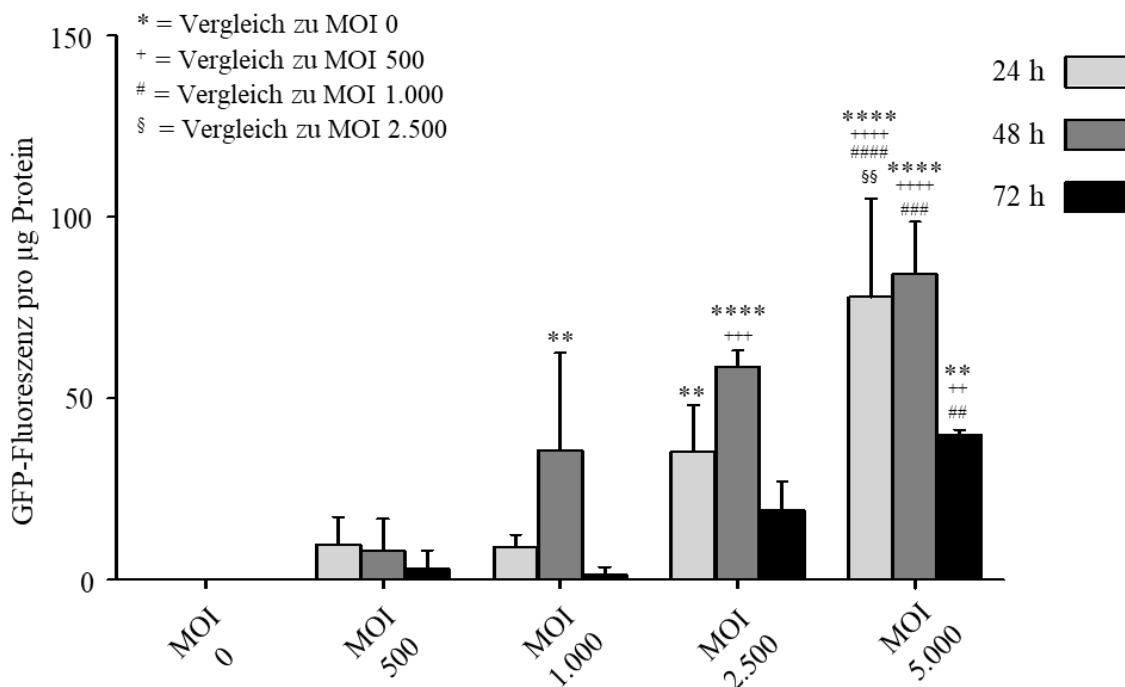


Abbildung 11: Fluoreszenzmessung der AAV-DJ-GFP Transduktion von SSADH-KO HEK293T-Zellen: SSADH-KO-HEK293T-Zellen wurden auf eine 6-Well Platte ausgesät (100.000 für 72 h, 300.000 für 48 h, 500.000 für 24 h). Dann wurden sie mit ansteigenden MOI (0, 500, 1.000, 2.500, 5.000) von AAV-DJ-GFP transduziert und für

24, 48 oder 72 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, und 40 µl des Lysats wurden pro Well in Duplikaten auf eine 96-Well Platte geladen und mit 100 µl Wasser aufgefüllt. Dann wurde die Fluoreszenz bei 485 nm Exzitation und 530 nm Emission gemessen. Negativwerte wurden mit Null gleichgesetzt. Die MOI 0 für alle Zeitpunkte wurden gemittelt, und dieser Wert wurde von den Ergebnissen abgezogen. Anschließend wurden die MOI 0 jeweils als 0 festgelegt. Die absoluten Fluoreszenzwerte sind pro 1 µg Protein im Lysat dargestellt. Statistik: Two-way ANOVA und Tukey-Multiple-Comparisons-Test zu MOI 0 (*), MOI 500 (+), MOI 1.000 (#) und MOI 2.500 (§) innerhalb einer Inkubationszeit (24/48/72h). Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus 3 eigenständigen Versuchen. Signifikanzgrade gegenüber MOI 0 sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Für die Vergleiche mit den übrigen Referenzstufen gilt das gleiche Schema in o. g. Symbolform. Vergleiche ohne statistische Signifikanz werden nicht dargestellt.

Zusätzlich zu Western Blot und GFP-Fluoreszenzmessung wurde die GFP-Expression und Transduktionseffizienz durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Dabei wurden die GFP-positiven Zellen (grünes Signal) gezählt. Die Bildanalyse erfolgte unter Verwendung der Einstellungen der nicht transduzierten SSAHD-KO-HEK293T-Zellen, um die Autofluoreszenz dieser Zellen zu erfassen und dieses Hintergrundsignal der KO-Zellen als Referenzwert zu benutzen. Dadurch wurden die GFP-Intensitäten bei allen Behandlungen vergleichbar gemacht.

Nach einer Inkubationszeit von 48 h zeigte sich eine leichte dosisabhängige Zunahme der GFP-positiven Zellen (insbesondere MOI 5.000). Die prozentuale Anzahl der transduzierten Zellen war jedoch insgesamt relativ niedrig, wobei der höchste Wert bei etwa 3% für MOI 5.000 nach 48 h (Abbildung 12 E) lag. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die maximale Transduktionseffizienz nach 48 h Inkubationszeit erreicht wurde.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass trotz der niedrigen einstelligen prozentualen Anzahl positiver Zellen am Fluoreszenzmikroskop die Transduktion der SSAHD-KO-HEK293T-Zellen mit niedrigen MOI von AAV-DJ-GFP zu einer signifikanten GFP-Expression führte.

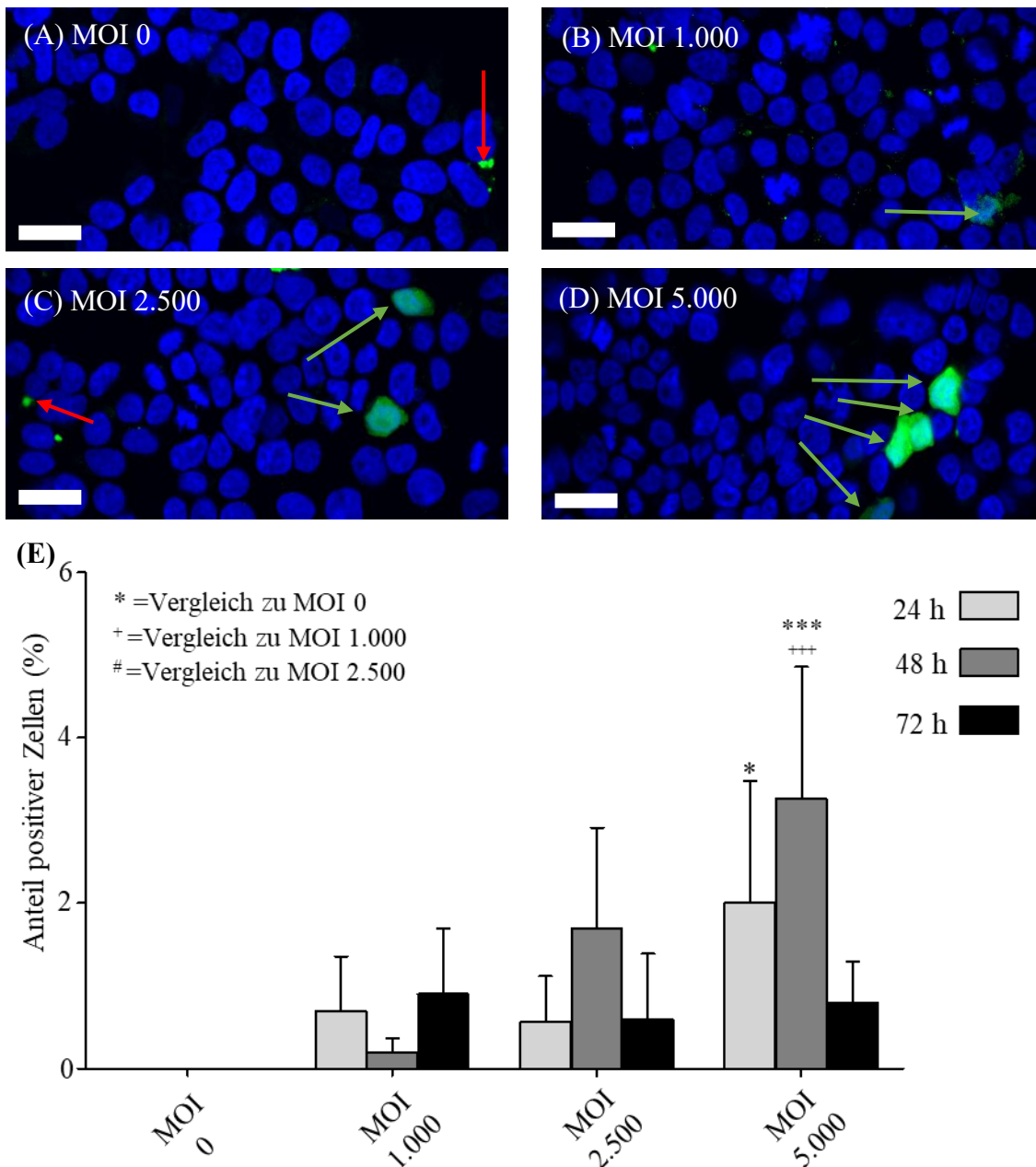


Abbildung 12 (A-E): Auswertung der AAV-DJ-GFP-Transduktion von SSADH-KO-HEK293T-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie: SSADH-KO-HEK293T-Zellen wurden in eine 12-Well Platte auf Deckgläsern ausgesät (50.000 für 72 h, 100.000 für 48 h, 200.000 für 24 h). Dann wurden die Zellen mit steigenden MOI (0, 500, 1.000, 2.500, 5.000) von AAV-DJ-GFP transduziert, für 24, 48 oder 72 h inkubiert und anschließend 10 min in PFA 4% behandelt und mit Mounting Medium auf Deckgläschen befestigt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Die Fluoreszenzmikroskopiebilder wurden mit identischen Belichtungszeiten für transduzierte und nicht-transduzierte Zellen mit der Aurox Visionary Software aufgenommen. 200 Zellen pro Deckglas wurden gezählt. Repräsentative Bilder (A-D)

werden gezeigt. Rote Pfeile zeigen Artefakte, und grüne Pfeile markieren positive Zellen. Der Maßbalken entspricht 10 μm . Der Anteil der positiven Zellen wird als prozentualer Anteil gezeigt (E). Statistik: Two-way ANOVA und Tukey-Multiple-Comparisons-Test zu MOI 0 (*), MOI 1.000 (+) und MOI 2.500 (#) innerhalb einer Inkubationszeit (24/48/72h). Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus 3 eigenständigen Versuchen. Signifikanzgrade gegenüber MOI 0 sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Für die Vergleiche mit den übrigen Referenzstufen gilt das gleiche Schema in o. g. Symbolform. Vergleiche ohne statistische Signifikanz werden nicht dargestellt.

4.4 Untersuchung der AAV-DJ-GFP-Transduktion mit hohen MOI in SSADH-KO-HEK293T-Zellen

Aufgrund der niedrig signifikanten Ergebnisse für die niedrigen MOI im Fluoreszenzmikroskopie-Experiment wurde der Versuch mit höheren MOI wiederholt, um die erzielten Ergebnisse zu verifizieren. Dabei wurden die folgenden MOI verwendet: 0, 10.000, 25.000, 50.000 und 100.000. Die Inkubationszeiten betragen wie zuvor 24, 48 sowie 72 h.

In Bezug auf die Expression von GFP im Western Blot wurden dosisabhängige Steigerungen der Intensität beobachtet (Abbildung 13). Allerdings war die GFP-Expression in den Zelllysaten nach 72 h Inkubationszeit deutlich schwächer im Vergleich zu den anderen Zeitpunkten. Hingegen war die GFP-Expression bei 24 und 48 h ähnlich stark. Die nicht-transduzierten SSADH-KO-HEK293T-Zellen, welche als Negativkontrolle dienten, zeigten keine GFP-Expression.

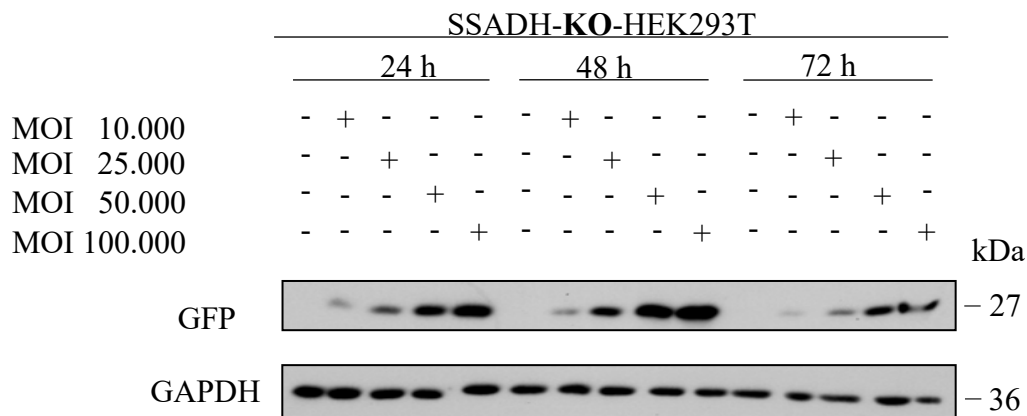


Abbildung 13: Western Blot der AAV-DJ-GFP-Transduktion von SSADH-KO-HEK293T-Zellen: SSADH-KO-HEK293T-Zellen wurden auf eine 6-Well Platte ausgesät (100.000 für 72 h, 300.000 für 48 h, 500.000 für 24 h). Dann wurden die Zellen mit ansteigenden MOI (0, 10.000, 25.000, 50.000, 100.000) von AAV-DJ-GFP transduziert und für 24, 48 oder 72 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und 20 µg des Lysats wurden mit Western Blot analysiert. Zur Ladekontrolle wurde GAPDH (36 kDa) verwendet. Ein repräsentativer Western Blot aus 3 Experimenten wird gezeigt.

Ähnlich wie im Western Blot führte die Transduktion von SSADH-KO-HEK293T-Zellen mit AAV-DJ-GFP zu einer signifikanten dosisabhängigen Steigerung der GFP-Fluoreszenz, sodass die höchsten Werte für MOI 100.000 gemessen wurden (Abbildung 14). Zur Bestimmung der spezifischen GFP-Fluoreszenz wurden die Autofluoreszenz-Signale der nicht-transduzierten Zellen (MOI 0) erfasst und gemittelt. Diese Mittelwerte wurden von den gemessenen GFP-Fluoreszenzsignalen der anderen MOI subtrahiert, und die MOI 0 dann als Hintergrund „0“ normiert. Die niedrigsten Werte wurden für MOI 10.000 beobachtet. Wie im Versuch 4.3 (niedrige MOI) war die Fluoreszenz nach 48 h Inkubationszeit am höchsten. Die GFP-Fluoreszenz war nach 24 h Inkubationszeit die zweithöchste und nahm nach 72 h Inkubationszeit ab.

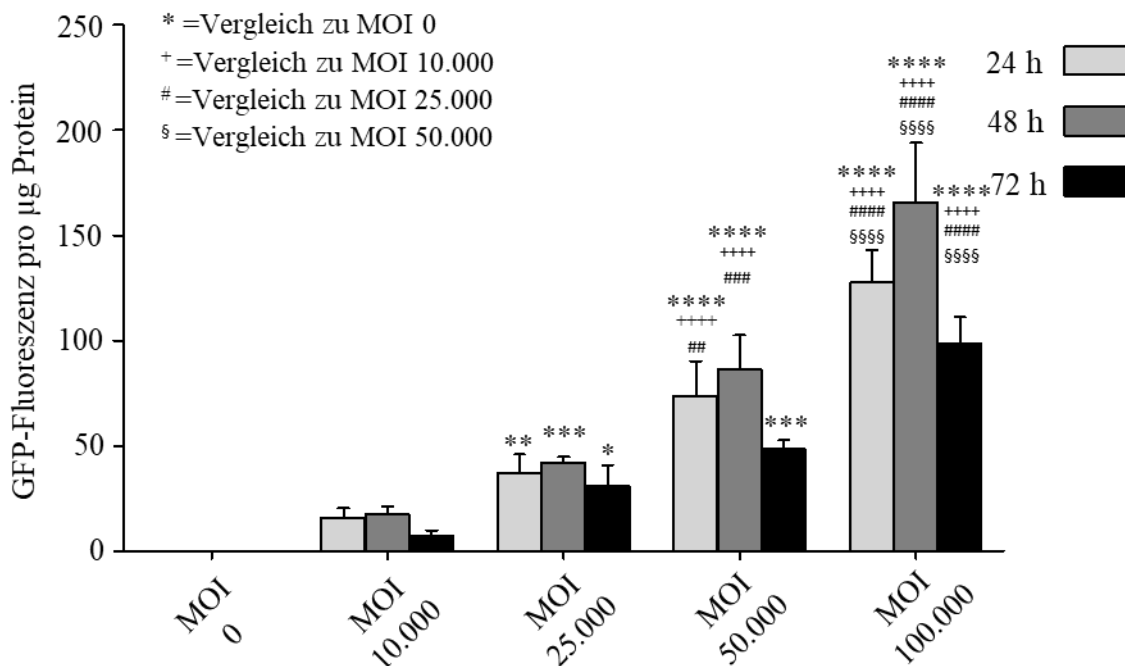


Abbildung 14: Fluoreszenzmessung der AAV-DJ-GFP Transduktion von SSADH-KO-HEK293T-Zellen: SSADH-KO-HEK293T-Zellen wurden auf eine 6-Well Platte

ausgesät (100.000 für 72 h, 300.000 für 48 h, 500.000 für 24 h). Dann wurden sie mit ansteigenden MOI (0, 10.000, 25.000, 50.000, 100.000) von AAV-DJ-GFP transduziert und für 24, 48 oder 72 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und 40 µl des Lysats wurden pro Well in Duplikaten auf eine 96-Well Platte geladen und mit 100 µl Wasser aufgefüllt. Danach wurde die Fluoreszenz bei 485 nm Exzitation und 530 nm Emission gemessen. Negativwerte wurden mit Null gleichgesetzt. Die MOI 0 für alle Zeitpunkte wurden gemittelt und dieser Wert wurde von den Ergebnissen abgezogen. Anschließend wurden die MOI 0 aller Zeitpunkte als 0 festgelegt. Die absoluten Fluoreszenzwerte sind pro 1 µg Protein im Lysat dargestellt. Statistik: Two-way ANOVA und Tukey-Multiple-Comparisons-Test zu MOI 0 (*), MOI 10.000 (+), MOI 25.000 (#) und MOI 50.000 (§) innerhalb einer Inkubationszeit (24/48/72h). Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus 3 eigenständigen Versuchen. Signifikanzgrade gegenüber MOI 0 sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Für die Vergleiche mit den übrigen Referenz-stufen gilt das gleiche Schema in o. g. Symbolform. Vergleiche ohne statistische Signifikanz werden nicht dargestellt.

Zusätzlich zu Western-Blot und GFP-Fluoreszenzmessung wurden die GFP-Expression und Transduktionseffizienz am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Das Vorgehen für das Zählen der Zellen war identisch mit dem in Versuch 4.3 beschriebenen. Es wurde eine signifikante dosisabhängige Zunahme der GFP-positiven Zellen beobachtet, insbesondere für die MOI 50.000 und 100.000 (Abbildung 15 E). Der höchste Anteil GFP-positiver Zellen wurde nach 48 h Inkubationszeit erreicht, gefolgt von 24 und 72 h. Es war jedoch keine lineare Steigerung der GFP-positiven Zellen zu erkennen, sondern eine Sättigung. Die Verwendung höherer MOI führte eher zu einer verstärkten GFP-Expression in einzelnen Zellen, anstatt zu einem deutlich erhöhten Anteil der Zellen mit GFP-Expression (Abbildung 15 A-D).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Transduktion der SSADH-KO-HEK293T-Zellen mit höheren MOI von AAV-DJ-GFP zu einer erhöhten GFP-Expression sowie einer verbesserten Verteilung in den Zellen führte, im Vergleich zu niedrigeren MOI.

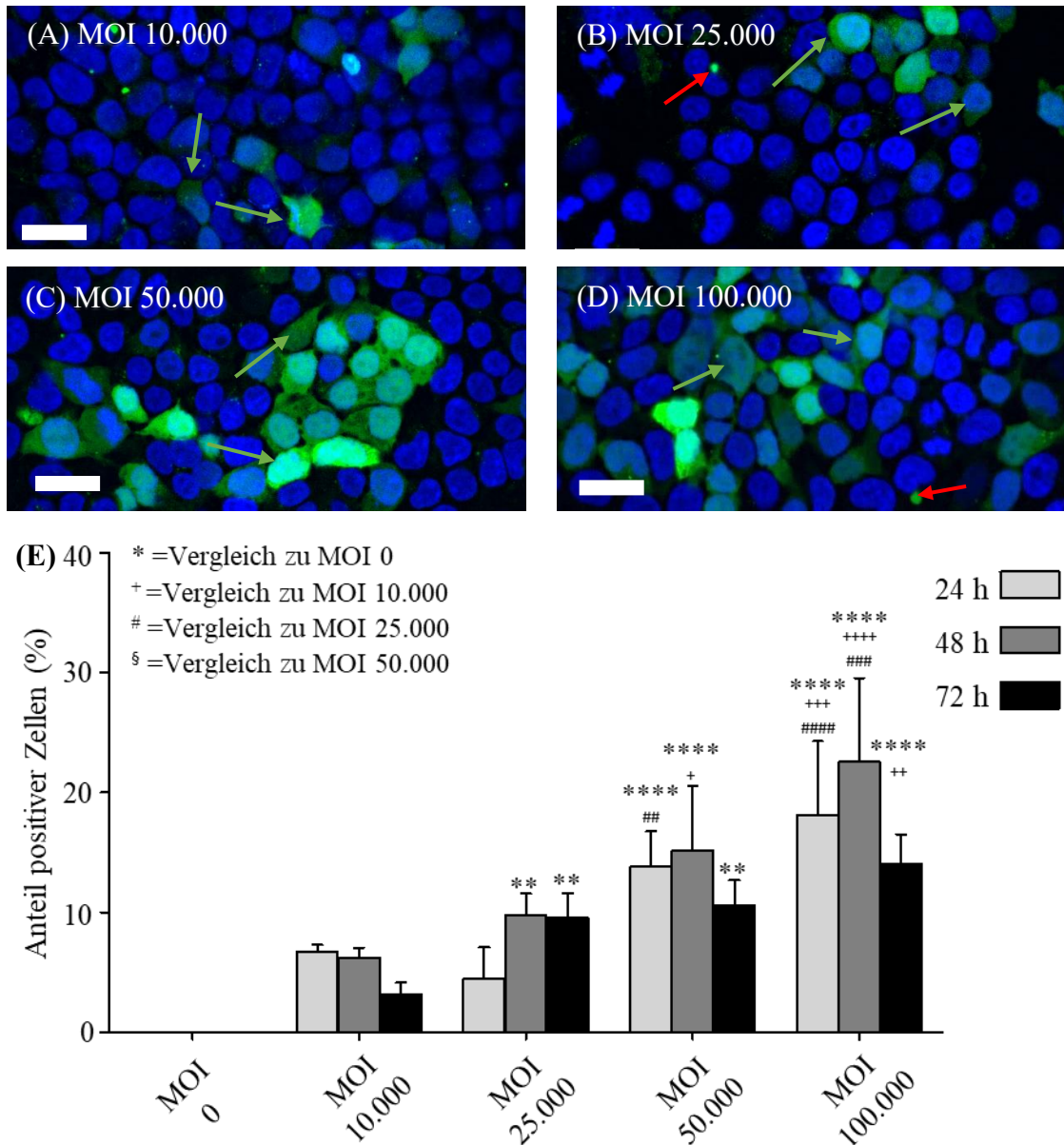


Abbildung 15 (A-E): Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie von AAV-DJ-GFP-Transduktion von SSADH-KO-HEK293T-Zellen: SSADH-KO-HEK293T-Zellen wurden in eine 12-Well Platte auf Deckgläsern ausgesät (50.000 für 72 h, 100.000 für 48 h, 200.000 für 24 h). Dann wurden die Zellen mit steigenden MOI (0, 10.000, 25.000, 50.000, 100.000) von AAV-DJ-GFP transduziert und für 24, 48 oder 72 h inkubiert. Anschließend 10 min mit PFA 4% behandelt und mit Mounting Medium auf Deckgläschen befestigt. Die Zellkerne wurden mit DAPI anfärbt. Die Fluoreszenzmikroskopiebilder wurden bei identischen Belichtungszeiten für transduzierte und nicht-transduzierte Zellen mit der Aurox Visionary Software aufgenommen. 200 Zellen wurden pro Deckglas gezählt. Repräsentative Bilder (A-D) werden gezeigt. Rote Pfeile zeigen Artefakte, und grüne Pfeile markieren positive Zellen. Der Maßbalken entspricht 10 μ m. Der Anteil der positiven Zellen wird als prozentualer

Anteil gezeigt (E). Statistik: Two-way ANOVA und Tukey-Multiple-Comparisons-Test zu MOI 0 (*), MOI 10.000 (+), MOI 25.000 (#) und MOI 50.000 (\$) innerhalb einer Inkubationszeit (24/48/72h). Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus 3 eigenständigen Versuchen. Signifikanzgrade gegenüber MOI 0 sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Für die Vergleiche mit den übrigen Referenzstufen gilt das gleiche Schema in o. g. Symbolform. Vergleiche ohne statistische Signifikanz werden nicht dargestellt.

4.5 Untersuchung der AAV-DJ-SSADH-Transduktion mit niedrigen MOI in SSADH-KO-HEK293T-Zellen

Im Anschluss an die Transduktion mit AAV-DJ-GFP wurde die Übertragbarkeit der erzielten Ergebnisse auf die AAV-DJ-SSADH-Transduktion untersucht, da beide Viren das gleiche Genom-verpackende Kapsid aufwiesen. Es wurden wiederum verschiedene MOI (0, 500, 1.000, 2.500, 5.000) sowie unterschiedliche Inkubationszeiten geprüft.

Die Analyse mittels Western Blot zeigte eine dosisabhängige Zunahme der SSADH-Expression für alle Zeitpunkte (Abbildung 16). Die SSADH-Expression war nach 72 h Inkubationszeit geringer als nach 24 oder 48 h. Dabei war die Expression für 24 und 48 h Inkubationszeit ähnlich stark ausgeprägt, wobei nach 48 h eine leicht höhere Expression zu beobachten war. Die als Positivkontrolle dienenden HEK293T-Zellen, welche SSADH endogen exprimierten, wiesen eine starke Expression auf, welche stärker war als die der transduzierten Zellen.

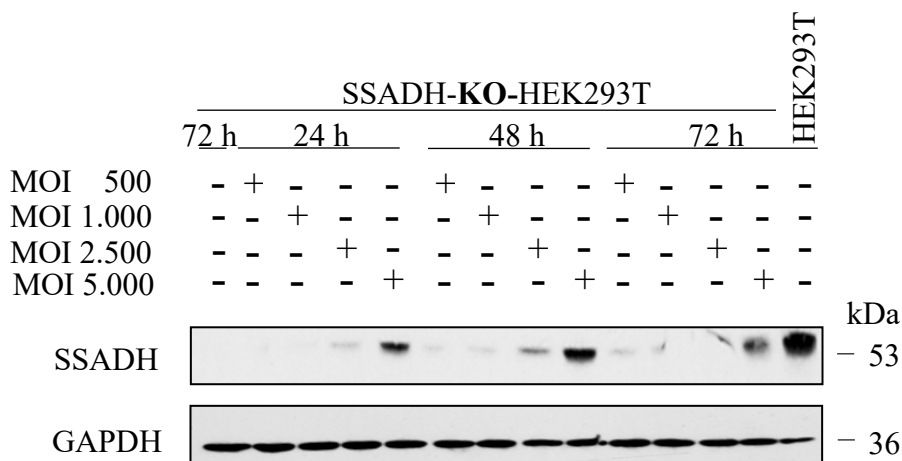


Abbildung 16: Western Blot der AAV-DJ-SSADH-Transduktion von SSADH-KO-HEK293T-Zellen: SSADH-KO-HEK293T-Zellen wurden auf eine 6-Well Platte ausgesät (100.000 für 72 h, 300.000 für 48 h, 500.000 für 24 h), dann mit ansteigenden MOI (0, 500, 1.000, 2.500, 5.000) von AAV-DJ-SSADH transduziert und für 24, 48 oder

72 h inkubiert, anschließend wurden die Zellen lysiert und 20 µg des Lysats wurden mit Western Blot analysiert. Ein repräsentativer Western Blot aus 3 Experimenten wird gezeigt, zur Ladekontrolle wurde GAPDH (36 kDa) verwendet.

Unter Verwendung derselben Zelllysate, die für den Western Blot verwendet wurden, wurden die SSADH-Aktivitätsmessungen durchgeführt. Die Ergebnisse für HEK293T-Zellen (mit endogenem SSADH) wurden für alle Zeitpunkte gemittelt und als 100% Referenzwert gesetzt. Es zeigte sich eine signifikante dosisabhängige Steigerung der SSADH-Aktivität in den transduzierten Zellen für MOI 2.500 und MOI 5.000, wobei die höchsten Aktivitätswerte für MOI von 5.000 erreicht wurden (Abbildung 17). Zwischen MOI 2.500 und MOI 5.000 wurde keine weitere signifikante Steigerung der SSADH-Aktivität erreicht. Im Vergleich der verschiedenen Inkubationszeiten waren die Aktivitätswerte ähnlich. Für die MOI von 1.000 bis 5.000 wurde eine relative Aktivität von etwa 75% bis 150% im Vergleich zu HEK293T-Zellen mit endogenem SSADH erreicht. Dies zeigt, dass die Transduktion der SSADH-KO-HEK293T-Zellen mit relativ niedrigen MOI von AAV-DJ-SSADH zu einer effizienten SSADH-Expression führte.

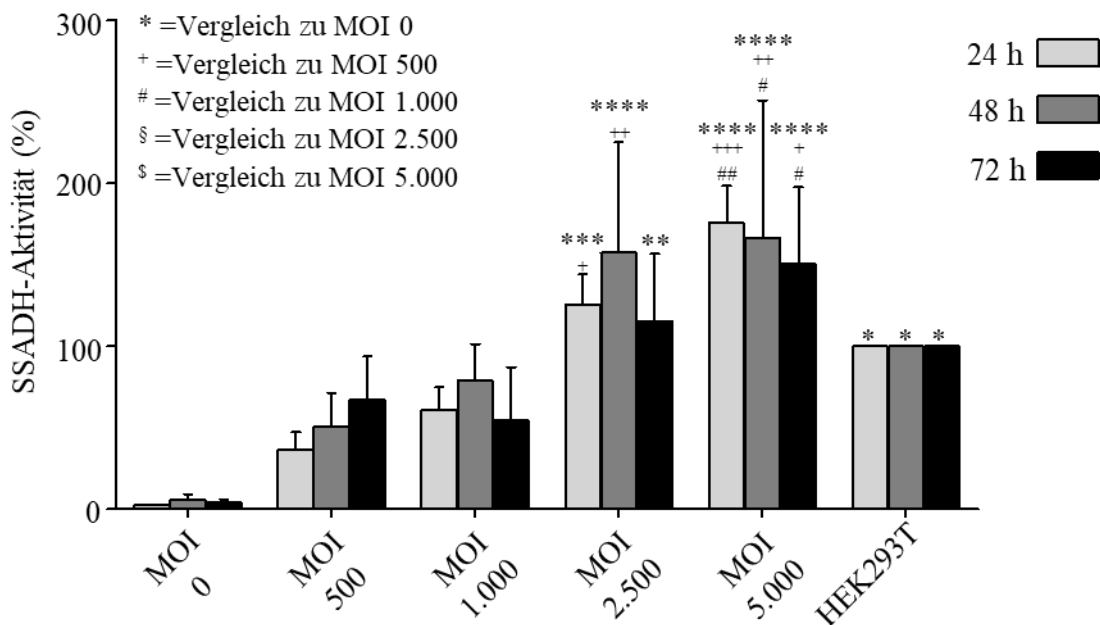


Abbildung 17: SSADH-Aktivitätsmessung der AAV-DJ-SSADH-Transduktion von SSADH-KO-HEK293T-Zellen: SSADH-KO-HEK293T-Zellen wurden auf eine 6-Well Platte ausgesät (100.000 für 72 h, 300.000 für 48 h, 500.000 für 24 h). Dann wurden sie mit steigenden MOI (0, 500, 1.000, 2.500, 5.000) von AAV-DJ-SSADH transduziert und für 24, 48 oder 72 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und 10 µl des

Lysats wurden in Duplikaten auf eine 96-Well Platte geladen. Die SSADH-Aktivität wurde als Unterschied in der Fluoreszenz durch die Reduktion von NAD^+ in NADH bei 470 nm gemessen. Negativwerte wurden mit Null gleichgesetzt. Die endogene SSADH-Aktivität von HEK293T-Zellen wurde als 100% festgesetzt. Die MOI 0 für alle Zeitpunkte wurden gemittelt und dies wurde von den Ergebnissen abgezogen. Die SSADH-Aktivität ist als relative Aktivität (in % endogener Aktivität) dargestellt. Statistik: Two-way ANOVA und Tukey-Multiple-Comparisons-Test zu MOI 0 (*), MOI 500 (+), MOI 1.000 (#), MOI 2.500 (§) und MOI 5.000 (§) innerhalb einer Inkubationszeit (24/48/72h). Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus 3 eigenständigen Versuchen. Signifikanzgrade gegenüber MOI 0 sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Für die Vergleiche mit den übrigen Referenzstufen gilt das gleiche Schema in o. g. Symbolform. Vergleiche ohne statistische Signifikanz werden nicht dargestellt.

4.6 Untersuchung der AAV-DJ-SSADH-Transduktion mit hohen MOI in SSADH-KO-HEK293T-Zellen

Im Versuch 4.5 wurde festgestellt, dass im Vergleich zu den transduzierten Zellen die SSADH-Expression im Western Blot bei HEK293T-Zellen eine höhere Intensität aufwies (Abbildung 16). Andererseits offenbarte die Aktivitätsmessung eine erhöhte SSADH-Aktivität in den transduzierten Zellen im Vergleich zur endogenen Aktivität (Abbildung 17: MOI 2.500 und 5.000). Angesichts dieser leicht inkonsistenten Ergebnisse wurden höhere MOI (5.000, 10.000, 25.000 und 50.000) getestet. Aufgrund der Erkenntnis, dass die Inkubationszeit von 48 h in den vorherigen Versuchen die höchste Expression von GFP und SSADH aufwies, wurde diese Inkubationszeit für die weiteren Analysen beibehalten. Dieses Mal wurden jedoch auch die Verteilung und Expression des SSADH nach der Transduktion mittels Immunfluoreszenzfärbung bewertet.

Im Western Blot zeigte sich eine dosisabhängige Steigerung der SSADH-Expression. Die nicht transduzierten SSADH-KO-HEK293T-Zellen zeigten keine SSADH-Expression. Die HEK293T-Zellen wiederum zeigten ein Signal (Abbildung 18). Allerdings war die Expression im Vergleich zu den Signalen in den transduzierten Zellen weniger ausgeprägt.

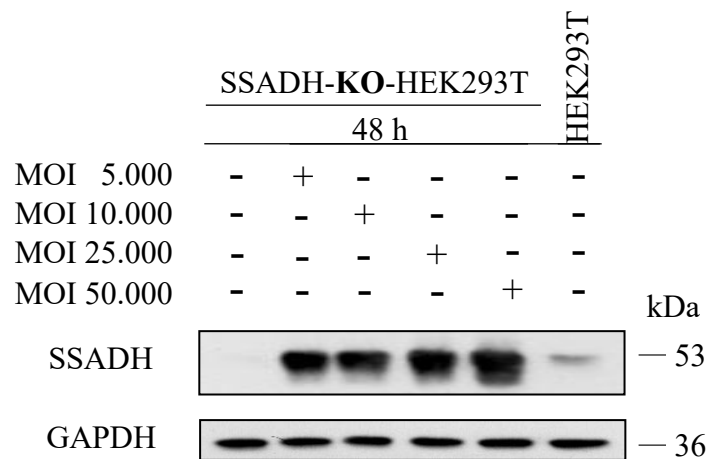


Abbildung 18: Western Blot der AAV-DJ-SSADH-Transduktion von SSADH-KO-HEK293T-Zellen: SSADH-KO-HEK293T-Zellen wurden auf eine 6-Well Platte ausgesät (300.000 für 48 h). Dann wurden die Zellen mit ansteigenden MOI (0, 5.000, 10.000, 25.000, 50.000) von AAV-DJ-SSADH transduziert und für 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und 20 µg des Lysats wurden mit Western Blot analysiert. Zur Ladekontrolle wurde GAPDH (36 kDa) verwendet. Ein repräsentativer Western Blot aus 3 Experimenten wird gezeigt.

Mit denselben Zelllysaten, die bereits für den Western Blot verwendet wurden, wurden auch die SSADH-Aktivitätsmessung durchgeführt. Hierbei wurden die Ergebnisse für HEK293T-Zellen gemittelt und als Referenzwert von 100% festgelegt. Durch die Transduktion mit AAV-DJ-SSADH wurde eine dosisabhängige Steigerung der SSADH-Aktivität bis MOI 25.000 beobachtet, wobei der höchste Wert (ca. 350%) bei einem MOI von 50.000 erreicht wurde (Abbildung 19). Eine Erhöhung der MOI von 25.000 auf 50.000 führte zu keiner weiteren signifikanten Steigerung der SSADH-Aktivität, wengleich diese MOIs zu einer signifikanten Überexpression gegenüber HEK293T führten. Es wurde festgestellt, dass die Aktivität nicht linear zunahm, sondern in eine Sättigung übergang (ca. 310% für MOI 25.000 im Vergleich zu ca. 350% für MOI 50.000). Die Ergebnisse des Western Blots und der SSADH-Aktivitätsmessung korrelierten miteinander und stützten somit die Konsistenz der erhobenen Daten.

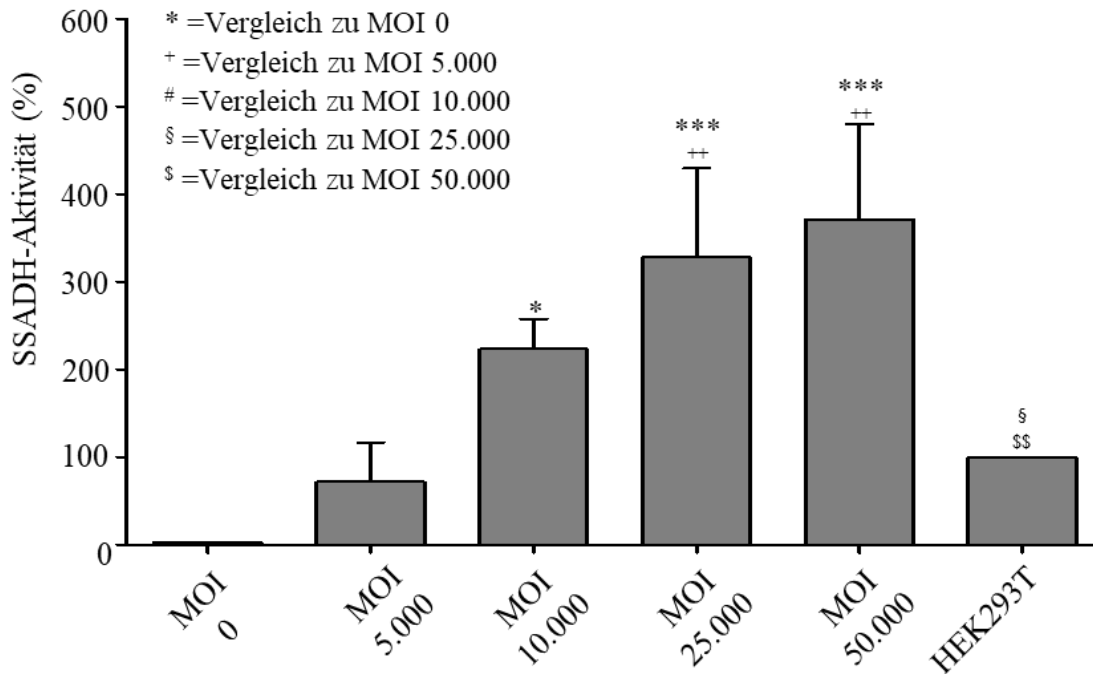


Abbildung 19: SSADH-Aktivitätsmessung der AAV-DJ-SSADH-Transduktion von SSADH-KO-HEK293T-Zellen: SSADH-KO-HEK293T-Zellen wurden auf eine 6-Well Platte ausgesät (300.000 für 48 h). Dann wurden die Zellen mit steigenden MOI (0, 5.000, 10.000, 25.000, 50.000) von AAV-DJ-SSADH transduziert und für 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und 10 µl des Lysats wurden in Duplikaten auf eine 96-Well Platte geladen. Die SSADH-Aktivität wurde als Unterschied in der Fluoreszenz durch die Reduktion von NAD⁺ in NADH bei 470 nm gemessen. Negativwerte wurden mit Null gleichgesetzt. Die MOI 0 wurden gemittelt und von den Ergebnissen abgezogen. Die endogene SSADH-Aktivität von HEK293T-Zellen wurde als 100% festgesetzt. Die SSADH-Aktivität ist als relative Aktivität (% der endogenen Aktivität) dargestellt. Statistik: One-way ANOVA und Tukey-Multiple-Comparisons-Test zu MOI 0 (*), MOI 5.000 (+), MOI 10.000 (#), MOI 25.000 (§) und MOI 50.000 (§). Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus 3 eigenständigen Versuchen. Signifikanzgrade gegenüber MOI 0 sind durch Sterne gekennzeichnet (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001). Für die Vergleiche mit den übrigen Referenzstufen gilt das gleiche Schema in o. g. Symbolform. Vergleiche ohne statistische Signifikanz werden nicht dargestellt.

Um die Verteilung von SSADH in den Zellen beurteilen zu können, wurde eine SSADH-Immunfluoreszenz angefertigt. Dabei wurden die SSADH-positiven Zellen (grünes Signal) quantifiziert. Die Bildanalyse erfolgte unter Verwendung der Einstellungen der

nicht-transduzierten SSAHD-KO-HEK293T-Zellen, um die Autofluoreszenz dieser Zellen zu erfassen und die KO-Zellen auf den Referenzwert "0" zu normieren. Dadurch wurden die SSADH-Intensitäten bei allen Behandlungen vergleichbar gemacht.

Eine Steigerung der MOI führte zu einer höheren Anzahl positiver Zellen, die ab einem MOI von 25.000 in eine Sättigung überging (Abbildung 20 G). Den höchsten Wert erreichte MOI 50.000 mit einem Mittelwert von 53% positiver Zellen. Den niedrigsten Wert hatte MOI 5.000 mit einem Mittelwert von 35%. Die Unterschiede zwischen den MOIs waren nicht-signifikant. Einschränkend muss erwähnt werden, dass alle Zellen, die ein positives Signal aufwiesen, gezählt wurden, wodurch eine unterschiedlich starke Expression zwischen den Zellen nicht berücksichtigt wurde. Dies war im direkten Vergleich zweier Bilder gut zu erkennen (vgl. Abbildung 20 C mit Abbildung 20 F). So waren bei MOI 50.000 (Abbildung 20 F) viele Zellen sehr stark grün fluoreszierend und damit positiv, wohingegen bei MOI 5.000 (Abbildung 20 C) die positiven Zellen zumeist nur schwach grün angefärbt waren.

Die Färbung der HEK293T-Zellen ergab lediglich einen durchschnittlichen positiven Anteil von etwa 35%. Dies ist darauf zurückzuführen, dass das endogene SSADH in den HEK293T-Zellen relativ niedrig exprimiert wurde und sich damit an der Nachweisgrenze des verwendeten Antikörpers befand.

SSADH ist in den Mitochondrien lokalisiert (Bernocchi et al. 1986). Ebenso sind Mitochondrien fähig, ein ausgedehntes Netzwerk innerhalb der Zellen zu formen (Hoitzing et al. 2015). Die beobachtete SSADH-Färbung wies Ähnlichkeiten mit einer netzwerkartigen Struktur auf (Abbildung 20 G), was darauf hindeutet, dass das transduzierte SSADH den Weg in die Mitochondrien gefunden hatte und somit korrekt in der zellulären Umgebung verortet war. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Transduktion der SSADH-KO-HEK293T-Zellen mit den verwendeten MOIs der AAV-DJ-SSADH zu einer signifikanten SSADH Expression und Distribution führte.

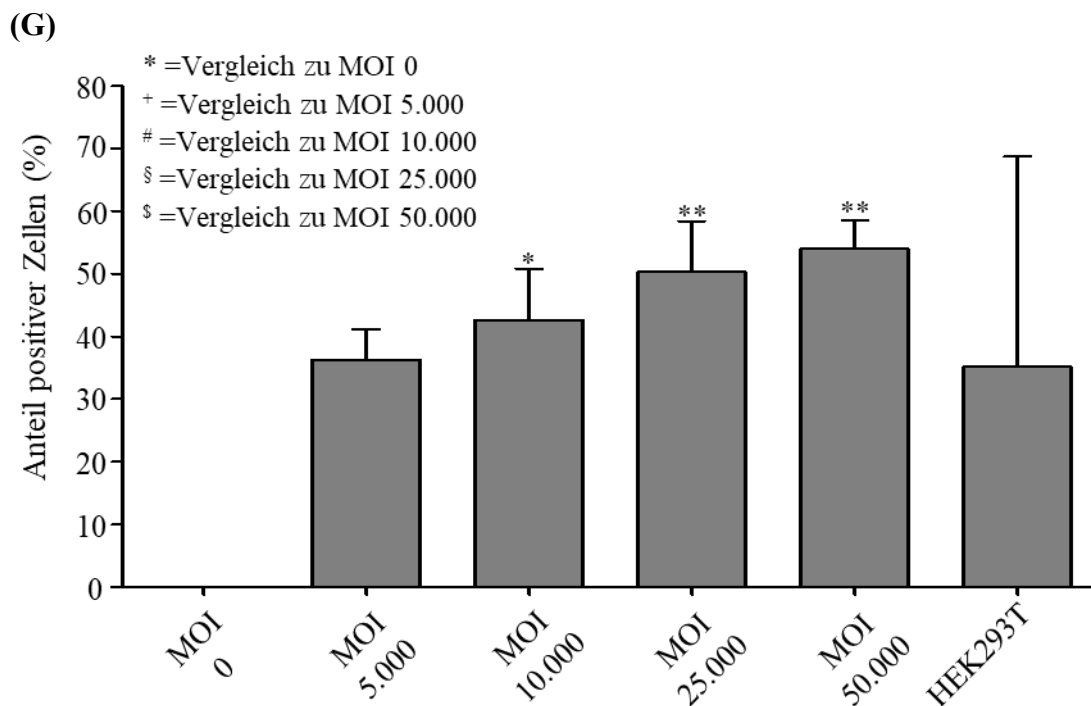
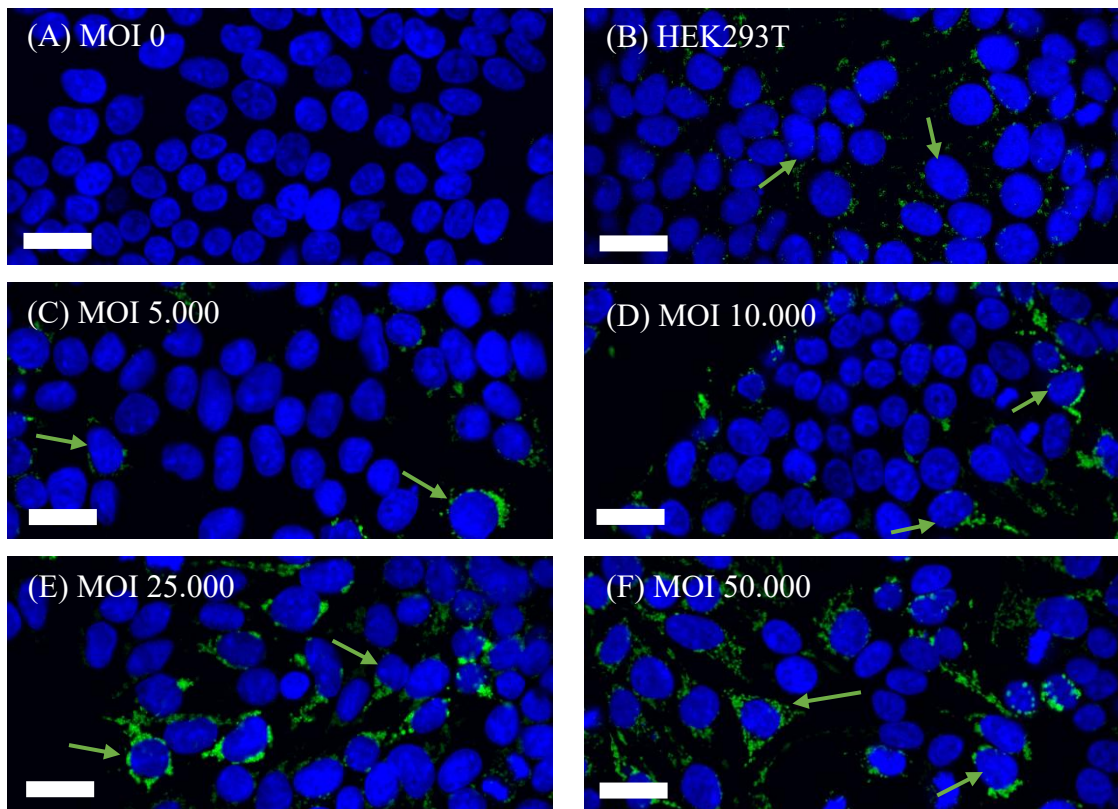


Abbildung 20 (A-G): Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie von AAV-DJ-SSADH-Transduktion von SSADH-KO-HEK293T-Zellen: SSADH-KO-HEK293T-Zellen wurden in eine 12-Well Platte auf Deckgläsern ausgesät (100.000 für 48 h). Dann wurden die Zellen mit steigenden MOI (0, 5.000, 10.000, 25.000, 50.000) von AAV-DJ-

SSADH transduziert und für 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in eiskaltem Methanol fixiert, mit primärem Anti-SSADH-Antikörper (Abcam, ab155493) und sekundärem Antikörper (Anti-Kaninchen Alexa-Fluor488, grün) inkubiert und mit Mounting Medium auf Deckgläschen befestigt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Die Fluoreszenzmikroskopiebilder wurden bei 6 identischen Belichtungszeiten für transduzierte und nicht-transduzierte Zellen mit der Aurox Visionary Software aufgenommen. 200 Zellen wurden pro Deckglas gezählt. Repräsentative Bilder (A-F) werden gezeigt. Grüne Pfeile zeigen exemplarisch positive Zellen an. Der Maßbalken entspricht 10 μm . Der Anteil der positiven Zellen wird als prozentualer Anteil aller Zellen gezeigt (G). Statistik: One-way ANOVA und Tukey-Multiple-Comparisons-Test zu MOI 0 (*), MOI 5.000 (+), MOI 10.000 (#), MOI 25.000 (\$) und MOI 50.000 (§). Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus 3 eigenständigen Versuchen. Signifikanzgrade gegenüber MOI 0 sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Für die Vergleiche mit den übrigen Referenzstufen gilt das gleiche Schema in o. g. Symbolform. Vergleiche ohne statistische Signifikanz werden nicht dargestellt.

4.7 Untersuchung von AAV-DJ-SSADH an Fibroblasten eines SSADH-Defizit-Patienten

AAV-DJ-SSADH wurden nun an Patienten-Fibroblasten evaluiert. Hierzu wurden Fibroblasten eines aus Frankreich stammenden Patienten verwendet (Mutation *ALDH5A1* c.808G>C p. Ala270Pro und c.1111G>C p. Gly371Arg), welche eine geringe residuale SSADH-Aktivität aufweisen. Um eine äquivalente Transduktionseffizienz bei den Fibroblasten zu erreichen, wurden die MOI, die zuvor in Experiment 4.6 für HEK293T-Zellen verwendet wurden, orientierend an Grimm et al, mit einem Multiplikationsfaktor von Dreißig angepasst (Grimm et al. 2008). Im Western-Blot zeigte sich eine dosisabhängige Zunahme der SSADH-Expression (Abbildung 21). Die nicht transduzierten Patienten-Fibroblasten, die als Negativkontrolle dienten, wiesen keinerlei Nachweis von SSADH-Expression auf. Im Gegensatz dazu wiesen die endogen SSADH exprimierenden Kontroll-Fibroblasten eine schwache SSADH-Expression auf.

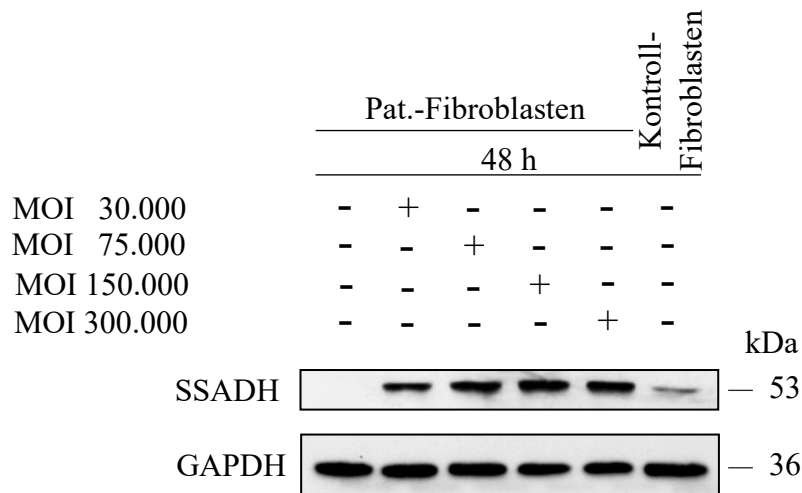


Abbildung 21: Western Blot der AAV-DJ-SSADH-Transduktion von Patienten-Fibroblasten: Fibroblasten wurden auf eine 6-Well Platte ausgesät (350.000 für 48 h). Dann wurden die Fibroblasten mit ansteigenden MOI (0, 30.000, 75.000, 150.000, 300.000) von AAV-DJ-SSADH transduziert und für 48 h inkubiert. Kontroll-Fibroblasten mit endogener SSADH-Expression wurden zur Positivkontrolle genutzt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und 20 µg des Lysats wurden mit Western Blot analysiert. Zur Ladekontrolle wurde GAPDH (36 kDa) verwendet. Ein repräsentativer Western Blot aus 3 Experimenten wird gezeigt.

Dieselben Zelllysate, welche für den Western Blot verwendet wurden, dienten auch zur Durchführung der SSADH-Aktivitätsmessung. Im Rahmen der Aktivitätsmessung wurden die Ergebnisse für die Kontroll-Fibroblasten gemittelt und als 100% festgelegt (Abbildung 22). Die Transduktion der Patienten-Fibroblasten mit AAV-DJ-SSADH führte zu einer dosisabhängigen Erhöhung der SSADH-Aktivität, wobei der höchste Wert für MOI 300.000 (ca. 600% der Kontrollfibroblasten) erreicht wurde. Die Zunahme der Aktivität erfolgte nicht linear, sondern ging in eine Sättigung über (MOIs untereinander nicht-signifikant). Alle getesteten MOI übertrafen die endogene SSADH-Aktivität der Kontroll-Fibroblasten um ein Vielfaches, wobei die MOI 150.000 und MOI 300.000 zusätzlich zu einer signifikanten Überexpression der SSADH-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollfibroblasten führten.

Diese Ergebnisse belegen, dass eine Gentherapie auf Basis der in dieser Arbeit untersuchten AAV-DJ-SSADH auch bei Patienten-Fibroblasten zu einer effizienten Wiederherstellung der SSADH-Proteinexpression und -Aktivität führte. Somit wären diese Viren für weiterführende präklinische Untersuchungen geeignet.

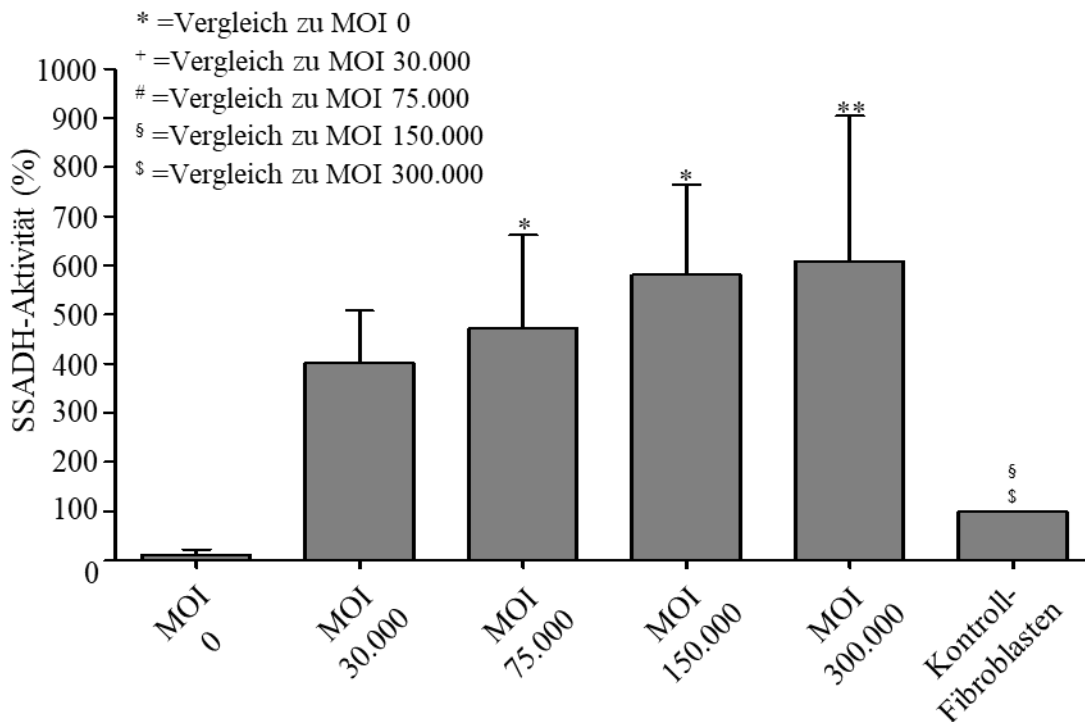


Abbildung 22: SSADH-Aktivität von AAV-DJ-SSADH-Transduktion von Patienten-Fibroblasten: Patienten-Fibroblasten wurden auf einer 6-Well Platte ausgesät (350.000 für 48 h). Dann wurden die Zellen mit ansteigenden MOI (0, 30.000, 75.000, 150.000, 300.000) von AAV-DJ-SSADH transduziert und für 48 h inkubiert. Kontroll-Fibroblasten mit endogener SSADH-Expression wurden zur Positivkontrolle genutzt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und 10 µl des Lysats wurden in Duplikaten auf eine 96-Well Platte geladen. Die SSADH-Aktivität wurde als Unterschied in der Fluoreszenz durch die Reduktion von NAD^+ in NADH bei 470 nm gemessen. Negativwerte wurden mit Null gleichgesetzt. Die MOI 0 wurden gemittelt und von den Ergebnissen abgezogen. Die endogene SSADH-Aktivität von Kontroll-Fibroblasten wurde als 100% festgesetzt. Die SSADH-Aktivität ist als relative Aktivität (in %) dargestellt. Statistik: One-way ANOVA und Tukey-Multiple-Comparisons-Test zu MOI 0 (*), MOI 30.000 (+), MOI 75.000 (#), MOI 150.000 (§) und MOI 300.000 (§). Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus 3 eigenständigen Versuchen. Signifikanzgrade gegenüber MOI 0 sind durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Für die Vergleiche mit den übrigen Referenzstufen gilt das gleiche Schema in o. g. Symbolform. Vergleiche ohne statistische Signifikanz werden nicht dargestellt.

5 Diskussion

Das SSADH-D ist eine seltene erblich bedingte Erkrankung, welche auf einem gestörten Stoffwechsel des Neurotransmitters GABA basiert. Ursächlich für diese Störung ist eine unzureichende Aktivität des mitochondrialen Enzyms SSADH (Gibson et al. 1983). Die Symptomatik dieser erblichen Krankheit zeigt vielfältige Ausprägungen, darunter Autismus, muskuläre Hypotonie, Ataxie und epileptische Anfälle (Gibson et al. 1997). Bisher steht keine anerkannte kausale Therapie für diese Erkrankung zur Verfügung, wodurch lediglich eine symptomatische Behandlung möglich ist (Didiasova et al. 2020). In diesem Kontext wurde das Potenzial einer Gentherapie mittels AAV auf Zellkulturebene untersucht.

5.1 Wahl des AAV-Plasmids/-Kapsids für erfolgreiche Gentherapie in Zellkulturversuchen

Für den Erfolg von Zellkulturversuchen mit AAV ist die Auswahl des geeigneten AAV-Serotyps von entscheidender Rolle. Die AAV-Bibliothek umfasst bisher 11 natürliche Serotypen und viele weitere Hybride, die jeweils einen spezifischen Zelltropismus aufweisen (Issa et al. 2023). Diese Präferenzen sind von essenzieller Bedeutung, um eine effiziente Transduktion der Zielzellen zu gewährleisten.

In dieser Arbeit lag der Fokus auf der Analyse der Effektivität der SSADH-Gentherapie in Zellkulturmodellen. Hierzu wurden sowohl im Labor etablierte SSADH-KO-HEK293T-Zellen als auch Fibroblasten von SSADH-Defizienz-Patienten verwendet (Brennenstuhl et al. 2020). Von besonderer Relevanz für die Zellkulturexperimente war dabei, einen AAV-Serotyp zu wählen, der beide Zelltypen erfolgreich transduzieren konnte.

Außerdem hängt das Gelingen der Transduktion maßgeblich von der Interaktion zwischen den Bindungspartnern auf der Zellmembran (wie Heparansulfatproteoglykane (HSPG), Galaktose oder Sialinsäure) und den AAV ab (Mietzsch et al. 2014; Meyer und Chapman 2022). Diese Interaktion variiert je nach AAV-Serotyp und beeinflusst so die Effizienz der Transduktion (Huang et al. 2014).

Um die oben genannten Schwierigkeiten bei der Transduktion zu umgehen, wurde das AAV-DJ-Kapsid verwendet. Als Hybrid der natürlichen Serotypen 2, 8 und 9 entwickelt,

zeigte es eine bemerkenswerte Transduktionsfähigkeit verschiedener Zelllinien (Grimm et al. 2008). Der hohe Anteil an AAV-2-Gensequenzen (92%) ermöglicht eine effiziente Bindung an HSPG (Lerch et al. 2012), die auf vielen Zellen, einschließlich HEK293T-Zellen und Fibroblasten, ubiquitär vorhanden sind (Li und Kusche-Gullberg 2016).

Nach der Bindung an den Zellrezeptor erfolgt eine zügige Prozessierung des AAV-DJ-Kapsids innerhalb der Zielzelle (Thomas et al. 2004; Ran et al. 2020). Dies führt zu einer schnellen Genexpression. Die Produktion von AAV-DJ-GFP sowie AAV-DJ-SSADH erfolgte erfolgreich mittels TPT. Die Transfektion, Aufreinigung und anschließende Quantifizierung der AAV mittels qPCR waren effektiv. Es wurden Endkonzentration von bis zu 2×10^{10} Virusgenomen pro μl , bei 200 μl Gesamtvolumen, erreicht. Die GFP- und SSADH-enthaltenden DJ-Kapside wurden an SSADH-KO-HEK293T-Zellen geprüft. Dabei wurde das finale Proteinprodukt der Transduktion gemessen, sodass die Ergebnisse unabhängig von möglicherweise auftretenden Fehlerquellen, wie fehlerhafter Endozytose der Kapside, falschem Entpacken ohne DNA oder falscher Translation, waren.

5.2 Biosynthetischer Weg der SSADH bei der AAV-vermittelten Transduktion

In Anbetracht seiner mitochondrialen Lokalisierung unterliegt der biosynthetische Weg von SSADH einer komplexen und potenziell fehleranfälligen Abfolge (Bernocchi et al. 1986). Durch die Transduktion der Zielzellen mittels AAV wird das SSADH-Gen in episomaler Form im Zellkern präsentiert (Nakai et al. 2001). Die Transkription des Gens im Zellkern endet mit der Freisetzung der reifen mRNA in das Zytoplasma. Im Zytoplasma erfolgt die Translation der mRNA an freien Ribosomen, wodurch die Proteinsynthese von SSADH in Gang gesetzt wird (Didiasova et al. 2020). Die Mitochondriale Zielsequenz (MTS) lenkt das synthetisierte SSADH zur äußeren Mitochondrienmembran, wo die MTS den gezielten Transport vermutlich über die Translokatoren der äußeren (TOM) und inneren (TIM) Mitochondrienmembranen bis in die mitochondriale Matrix ermöglichen (Neupert und Herrmann 2007). In der mitochondrialen Matrix angekommen, wird die MTS durch mitochondriale Prozessierungspeptidasen entfernt. Diese entscheidende Modifikation gestattet es SSADH, seine korrekte dreidimensionale Faltung anzunehmen und durch eine Tetramerisierung seine funktionelle Konformation zu erreichen (Didiasova et al. 2020).

In den Experimenten wurde die korrekte Lokalisation von SSADH überprüft, und die erfolgreiche Proteinexpression mittels Western Blot-Analyse verifiziert. Die korrekte

zelluläre Lokalisation wurde durch Fluoreszenzmikroskopie bestätigt, wobei eine deutliche Anfärbung der Mitochondrien erkennbar war. Diese Färbung manifestierte sich durch die charakteristische netzwerkartige Struktur der Mitochondrien (Bereiter-Hahn und Vöth 1994), welche die funktionale Wirksamkeit der MTS in SSADH bekräftigte (Didiasova et al. 2020). Abschließend wurde die korrekte Faltung und Assemblierung des SSADH-Proteins zu einem aktiven tetrameren Enzym durch die Aktivitätsmessungen bestätigt. Diese Ergebnisse belegen, dass SSADH mittels AAV erfolgreich exprimiert werden kann.

5.3 Dosisabhängige Expression durch AAV-Transduktion: Einblicke in die Inkubationszeit-abhängige Transduktionseffizienz und ihre möglichen Ursachen

Wie erwartet, wurde in den Experimenten eine dosisabhängige Steigerung der Expression beobachtet (Grimm et al. 2008; Teramoto et al. 2001). Die höchste Expression wurde nach einer Inkubationszeit von 48 h erreicht. Auffällig war jedoch ein Abfall der Expression nach 72 h Inkubation, was nicht mit früheren Befunden von Gray et al. übereinstimmt, die anhand von Versuchen mit GFP zeigten, dass längere Inkubationszeiten die Transduktionseffizienz erhöhen (Gray et al. 2011). Ein Grund dafür könnte die individuelle Halbwertszeit der exprimierten Proteine gewesen sein, welche die Stabilität beeinflusst. Der Abfall der SSADH-Expression nach 72 h könnte die Folge eines SSADH-Abbaus gewesen sein. Jedoch wurden ähnliche Beobachtungen bei GFP gemacht. Hier wurde ebenfalls eine Reduktion der Expression nach 72 h festgestellt. Dies deutet eher auf die Zellteilung als mögliche Ursache. Der Rückgang der Expression nach 72 h trat möglicherweise aufgrund des Versuchsaufbaus auf. HEK293T-Zellen haben eine Verdopplungszeit von etwa 33 h (Abaandou et al. 2021). Es wurde darauf geachtet, die Zellproliferation nicht zu beeinträchtigen, um apoptotischen Zellverlust zu vermeiden. Dies könnte passieren, wenn zu viele Zellen in einer begrenzten Nährstoffumgebung vorliegen (Patil et al. 2020). Aus Vorversuchen bestanden Informationen über die erforderliche Anfangszellzahl, um nach den jeweiligen Inkubationszeiten eine Konfluenz von 100 Prozent zu erreichen. Dementsprechend wurden für die verschiedenen Inkubationszeiten die in Kapitel 3.13 aufgeführten Anfangszellzahlen gesät. Die Virusmengen wurden auf Grundlage der eingesäten Zellen als MOI berechnet.

Aufgrund des episomalen Vorliegens des eingeführten Gens durch AAV wurde der Genabschnitt bei der Mitose der HEK293T-Zellen möglicherweise nicht an alle Tochterzellen weitergegeben, was zu einem Verdünnungseffekt der Transduktion führte (Chandler et al. 2017; Duan et al. 1998). Für den Verdünnungseffekt spricht auch, dass bei den Experimenten mit GFP und SSADH ein ähnlicher Abfall zu sehen war. Daher kann angenommen werden, dass die Transduktion von den ursprünglich gesäten 100.000 Zellen nach einer Inkubationszeit von 72 h wirksam war, jedoch aufgrund der fast dreifachen Zellverdopplung die transduzierte DNA verdünnt wurde. Es ist damit festzuhalten, dass die Effizienz der AAV höher als gemessen war, weil die MOI auf Grundlage der am Vortag ausgesäten Zellen berechnet wurden, während sich die Zellen fortlaufend teilten und damit den Verdünnungseffekt der Transduktion vergrößerten (Abbildung 23).

Unabhängig davon ist zu sehen, dass SSADH nach 48 h immer noch stabil war. Somit lässt sich festhalten, dass nicht nur ausreichende Mengen an SSADH exprimiert wurden, sondern die exprimierten Mengen auch für 48 h stabil blieben.

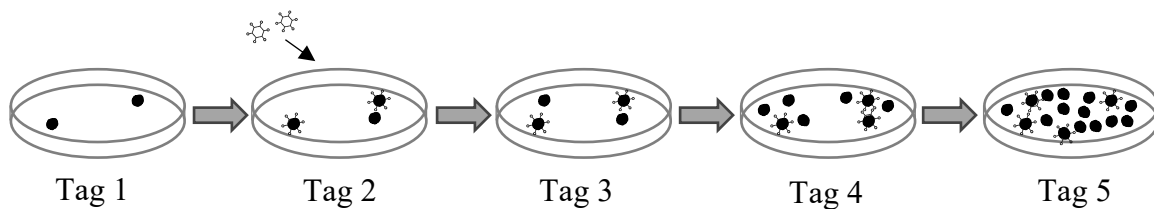


Abbildung 23: Veranschaulichung der Zellteilung von HEK293T-Zellen. Am Tag 1 werden die Zellen ausgesät. Am Tag 2 findet die Transduktion statt. Tag 3, 4 und 5 sind die unterschiedlichen Inkubationszeiten. Währenddessen findet kontinuierlich die Zellteilung statt.

5.4 Unterschiede in der Transduktionseffizienz zwischen AAV-DJ-GFP und AAV-DJ-SSADH in SSADH-KO-HEK293T-Zellen

In dem Gentherapieansatz wurde zuerst mit der GFP-Expression begonnen, um eine positive Kontrolle für die Versuche zu etablieren. Aufgrund seiner fluoreszierenden Eigenschaft ermöglicht GFP eine technisch einfache und quantitative Überprüfung (Chalfie et al. 1994). Gleichzeitig dienen die Ergebnisse der GFP-Experimente als Grundlage für die Interpretation der SSADH-Expression, da beide Proteine das gleiche AAV-Kapsid zur Transduktion nutzen.

Trotz der Tatsache, dass bei Western Blot-Analysen und Aktivitätsmessungen ähnliche Mengen an MOI sowohl für GFP als auch für SSADH zu signifikanten Überexpressionen führten, ergab sich ein Unterschied in den Ergebnissen der Fluoreszenzmikroskopie. Obwohl sich bei gleichbleibendem Kapsid und Promotoren nur das transduzierte Gen änderte, variierten die prozentualen Anteile der nachgewiesenen positiven Zellen im Fluoreszenzmikroskopie deutlich. Die Evaluation der positiven Zellen enthüllte eine deutliche Überlegenheit von AAV-DJ-SSADH gegenüber AAV-DJ-GFP in Bezug auf die Quantität (Beispielsweise: SSADH MOI 10.000 ca. 40% positive Zellen vs. GFP MOI 10.000 ca. 8%, jeweils nach 48 h).

Diese Unterschiede könnten auf die unterschiedlichen Eigenschaften der exprimierten Proteine zurückzuführen sein. Nicht-fusioniertes-GFP ist bekanntermaßen ein lösliches Protein, welches sich im Zytosol und Zellkern verteilt (Chalfie 1995). Im Gegensatz dazu ist SSADH ein mitochondriales Enzym (Bernocchi et al. 1986). Als Folge dieser Unterschiede könnte sich dieselbe Menge GFP im Zytosol auf eine größere Fläche verteilt haben und dadurch eine geringere lokale Konzentration aufweisen. Dahingegen könnte die gleiche Menge SSADH aufgrund seiner mitochondrialen Lokalisation dort stärker konzentriert und dadurch besser sichtbar gewesen sein. Dadurch könnten die beobachteten Diskrepanzen in den prozentualen positiven Zellzahlen zwischen den beiden Gruppen erklärt werden.

Andererseits könnte auch die Wahl der Detektionsmethoden eine erschwerende Rolle gespielt haben. Während SSADH mittels einer indirekten Immunfluoreszenz durch Antikörper nachgewiesen und das Signal durch die markierten Sekundärantikörper verstärkt wurde, benötigte GFP diese Art der Immunerkennung nicht, da die Fluoreszenz von GFP direkt gemessen wurde.

Möglicherweise haben diese Faktoren zu einer geringeren Detektion von GFP-positiven Zellen (mehr falsch-negative Zellen) geführt. Die konsistenten Ergebnisse im Western Blot und bei der Aktivitätsmessung legen allerdings nahe, dass die Transduktion beider Gene mit vergleichbarer Effizienz in die Zellen erfolgte. Daher deutet alles darauf hin, dass die festgestellten Unterschiede eher auf potenzielle technische Herausforderungen zurückzuführen sind. Gleichwohl kann anhand der geringen Varianz der fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse festgestellt werden, dass die Transduktion der Zellen mit GFP oder SSADH zu einer relativ stabilen Expression in den Zellen führte.

5.5 SSADH-Immunfluoreszenz

In der Fluoreszenzmikroskopie ist im Vergleich zwischen den mit AAV-DJ-SSADH transduzierten SSADH-KO-HEK293T-Zellen und den HEK293T-Zellen mit endogenem SSADH zu erkennen, dass das endogene SSADH schwächer angefärbt war. SSADH ist ein ubiquitär exprimiertes Enzym, jedoch wird seine Expression auf der Ebene der Transkription in einem gewebespezifischen Muster stark reguliert (Kang et al. 2005). Die SSADH-Expression variiert signifikant zwischen verschiedenen Zelltypen (Chambliss et al. 1995). Während Hepatozyten und Neuronen eine hohe SSADH-Proteinexpression aufweisen, zeigen Zelllinien wie Fibroblasten eine geringere Expression (The Human Protein Atlas 2024). Überexpression durch Transduktion oder Transfektion führt in der Regel zu einer erhöhten Expression des Zielproteins, im Vergleich zu physiologischen Bedingungen. Daher weisen die transduzierten Zellen eine signifikant höhere Expression auf, als HEK293T-Zellen, welche endogenes SSADH exprimieren.

Eine weitere Erklärung könnte auf technische Gründe zurückzuführen sein. Es stehen mehrere SSADH-Antikörper auf dem Markt zur Verfügung, welche bei Techniken wie der Western Blot-Analyse unterschiedlich gut funktionieren. Eine spezifische Färbung von SSADH bei immunzytochemischen Untersuchungen scheint jedoch schwierig zu sein. Die Aldehyddehydrogenasen sind eine große Familie von Enzymen, die eine ausgeprägte Homologie an manchen Bereichen aufweisen, was die Detektion einzelner Enzyme aus dieser Familie erschwert. In den Experimenten wurde daher eine schwache Färbung der SSADH-KO-HEK293T-Zellen beobachtet, welche wahrscheinlich eine unspezifische Kreuzreaktion des Antikörpers mit anderen Aldehyddehydrogenasen darstellt. Dieses schwache Fluoreszenzsignal wurde bei den Quantifizierungen als Hintergrund subtrahiert, was zu einer allgemeinen Verringerung des Signals in HEK293T-Zellen führte. Nach Entfernen des Hintergrunds wurde jedoch eine punktuelle Färbung beobachtet, welche Mitochondrien ähnelte und mit höheren Dosen von AAV-DJ-SSADH zunahm. Dies bestätigt, dass tatsächlich eine spezifische mitochondriale Färbung von SSADH erreicht werden konnte. Darüber hinaus wurde die erfolgreiche Transduktion von SSADH-KO-HEK293T durch zwei weitere Techniken (Western Blot und Aktivitätsmessung) bestätigt, die beide eine signifikante Zunahme der SSADH-Expression zeigten.

5.6 Erfolg der Gentherapie in Patienten-Fibroblasten

Die AAV-DJ-SSADH wurden schließlich an Fibroblasten eines SSADH-Defizit-Patienten getestet, um den Erfolg der Gentherapie in einem relevanteren System zu testen. Die verwendeten Fibroblasten besitzen *ALDH5A1*-Mutationen (Kapitel 2.8), welche zu kaum nachweisbarem SSADH-Protein und SSADH-Aktivität führen. Da Fibroblasten deutlich größer als HEK293T-Zellen sind, empfahlen die Entwickler von AAV-DJ, die für HEK293T-Zellen genutzten MOI für Fibroblasten mit 30 zu multiplizieren (Grimm et al. 2008). Die Transduktion mit AAV-DJ-SSADH führte zu einer signifikanten Erhöhung der Proteinmenge und Aktivität von SSADH im Vergleich zu den nicht-transduzierten Patienten-Fibroblasten. Die transduzierten Patienten-Fibroblasten übertrafen dabei die nicht-transduzierten Kontroll-Fibroblasten um ein Vielfaches. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass AAV in der Lage sind, SSADH-Protein und -Aktivität auch in Patienten-Fibroblasten wiederherzustellen.

5.7 Angemessene Level der SSADH-Expression

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie zeigen, dass selbst bei der höchsten verwendeten MOI (50.000) nur etwa 50% der SSADH-KO-HEK293T-Zellen transduziert wurden. Dies wirft die Frage auf, ob es notwendig ist, eine gleichmäßige Expression von SSADH in jeder einzelnen Zelle zu erreichen, da SSADH nicht zwischen Zellen ausgetauscht werden kann.

Mit den verwendeten MOI (50.000) wurde die Expression von SSADH im Western Blot und die endogene SSADH-Aktivität bereits um ein Vielfaches übertroffen. Selbst wenn nicht alle Zellen transduziert würden, könnte der Vektor immer noch therapeutische Effekte erzielen. Dies basiert darauf, dass SSADH-D vermutlich eine nicht-zellautonome Erkrankung ist. Das bedeutet, dass nicht jede Zelle korrigiert werden muss, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen, sondern dass das Ziel darin besteht, den allgemeinen GABA/GHB-Spiegel im gesamten Körper zu senken. Dies wäre mit der Gentherapie wahrscheinlich möglich, da die transduzierten Zellen ausreichend SSADH exprimierten und die Aktivität wiederherstellten.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die vorliegende Arbeit zwar eine vielversprechende Grundlage für die Entwicklung einer AAV-Gentherapie bei SSADH-D bietet, jedoch weitere umfassende Forschung und klinische Untersuchungen

erforderlich sind, um die Machbarkeit, Wirksamkeit und Sicherheit dieser Therapieoption zu gewährleisten.

5.8 Ausblick

5.8.1 Gentherapie an Mäusen

Diese Arbeit stellt erstmals unter Zellkulturbedingungen fest, dass eine AAV-Gentherapie in der Lage ist, die SSADH-Expression und SSADH-Aktivität in SSADH-KO-HEK293T-Zellen und Fibroblasten von Patienten wiederherzustellen. Daher könnte AAV-DJ-SSADH nun in präklinischen Studien, insbesondere an einem Mausmodell der SSADH-Defizienz (*Aldh5a1*^{-/-}-Mäusen), weiter untersucht werden (Hogema et al. 2001).

Der Knockout des *Aldh5a1*-Gens führt zu einem kompletten Verlust des SSADH-Proteins und somit zu einem sehr schweren Phänotyp. Als dessen Folge bleiben die Mäuse in ihrer physischen Entwicklung deutlich verzögert, haben schwere generalisierte tonisch-klonisch epileptische Anfälle und versterben in der Regel nach ca. 21 Tagen an einem Status Epilepticus (Hogema et al. 2001).

Ein wesentlicher Aspekt, der erörtert werden sollte, betrifft die Wahl der Anwendungsrouten des Virus. Diese Frage gewinnt besondere Bedeutung aufgrund der Organauswahl im Rahmen der Gentherapie. Es stehen verschiedene Optionen zur Verfügung, wie Viren appliziert werden können: a) intrathekal oder intrakraniell, b) intravenös und/oder c) intraperitoneal.

Die intrathekale Applikation eröffnet im Kontext des SSADH-D die Möglichkeit, das Enzym an das primär betroffene Organ, das Gehirn, bereitzustellen, ohne die Notwendigkeit, die Blut-Hirn-Schranke überwinden zu müssen (Lee et al. 2019). Dies könnte zu einer vergleichsweise reduzierten Immunreaktion im Vergleich zur systemischen Anwendung führen. Dennoch sind mit dieser Applikationsmethode auch diverse Limitationen und Risiken assoziiert.

Die Lumbalpunktion stellt beim Menschen eine vergleichsweise technisch einfache Maßnahme dar, Medikamente (Anästhetika, Zytostatika, Nusinersen) direkt in den Liquorraum zu applizieren (Wadman et al. 2019). Selten auftretende Nebenwirkungen wie Meningitiden oder Blutungen können allerdings bis zum Tod führen (Liu et al. 2017).

Die intrathekale oder intrakranielle Anwendung von Viren an *Aldh5a1*^{-/-}-Mäusen gestaltet sich jedoch als keine einfache Aufgabe. Hierbei gibt es technische Herausforderungen: Die Tiere sind aufgrund ihrer geringen Größe für die Prozedur ungeeignet (die Injektion müsste vor dem Auftreten der ersten Symptome zwischen dem 10. und 15. Tag erfolgen). Zusätzlich müssten diese bereits stark belasteten Tiere für die Durchführung anästhesiert und operiert werden, was ethische Bedenken im Sinne des Tierschutzes aufwirft. Obwohl diese Applikationsmethode bei Patienten bereits etabliert ist und scheinbar unproblematisch verläuft, gibt es bei präklinischen Studien an sehr jungen Tieren technische Einschränkungen.

Eine alternative Applikationsmethode wäre die intravenöse oder systemische Injektion. Diese Methode zeichnet sich durch ihre einfache technische Durchführbarkeit aus, indem ein intravenöser Zugang etabliert und eine Infusion durchgeführt wird, was eine hohe Sicherheit gewährleistet. Darüber hinaus bietet sie die Möglichkeit, neben dem Gehirn auch andere betroffene Organe wie die Leber zu therapieren (Gessler et al. 2019). Es ist jedoch von entscheidender Bedeutung, einen geeigneten AAV-Serotypen auszuwählen, der in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. So wird bei der Spinalen Muskelatrophie bereits ein AAV-9 Vektor namens Onasemnogen-Abeparvovec intravenöse appliziert, um das SMN-Protein in die Motoneurone zu liefern (Lim et al. 2019; Mendell et al. 2017). Die Auswahl des Serotypen ist von großer Bedeutung, da sie sicherstellt, dass die therapeutischen Viren effektiv das Zielorgan erreichen. Das Hindernis bei der weiteren Erprobung besteht in der Anwendung an Mäusen. Die intravenöse Injektion bei den Mäusen müsste über die Schwanzvene erfolgen. Obwohl es technisch gesehen herausfordernd ist, intravenöse Injektionen bei Tieren mit einem Gewicht von 2-3 Gramm durchzuführen, wie es bei *Aldh5a1*^{-/-}-Mäusen im Alter von 10 Tagen der Fall ist, wäre die intravenöse Injektion prinzipiell machbar. Diese Methode wird auch von der Ethikkommission für Tierversuche akzeptiert.

Letztlich scheint die intraperitoneale Injektion den einfachsten Anwendungsweg darzustellen. Sie ist sowohl bei Patienten als auch bei Tieren einfach durchzuführen (Baek et al. 2015). Die Frage ist jedoch, ob die intraperitoneale Injektion dieselben Wirkungen wie die direkte Anwendung im Gehirn hat. Es gibt mehrere Aspekte, die für mögliche positive Auswirkungen dieser Art der Anwendung sprechen.

Zunächst sollte daran erinnert werden, dass der pathologische Aspekt des SSADH-D aufgrund der Anhäufung von GABA und GHB im Körper und in den Körperflüssigkeiten induziert wird. Obwohl dies noch Gegenstand der Diskussion ist, scheinen sowohl GABA als auch GHB eine pathologische Rolle zu spielen, wobei einige Studien annehmen, dass GHB möglicherweise wichtiger sei (Didiasova et al. 2020). GHB wird hauptsächlich in der Leber produziert, in den Blutkreislauf freigesetzt und kann frei ins Gehirn gelangen, um sich wieder in GABA umzuwandeln (Bhattacharya und Boje 2004). Daher scheint die Beseitigung von GHB aus der Peripherie mit einer auf die Leber ausgerichteten Therapie vorteilhaft zu sein und könnte durch die intraperitoneale Injektion erreicht werden. Mehrere Studien haben gezeigt, dass intraperitoneale Injektionen abhängig vom AAV-Serotyp die Leber stark transduzieren (Dane et al. 2013; Chandler et al. 2013). Zusätzlich würden die intraperitoneal verabreichten AAV vermutlich auch das ZNS erreichen, wenn auch in geringen Dosen.

Insgesamt, unabhängig von der Applikationsweise, ist es zunächst erforderlich zu klären, welches Organ als primäres Ziel in Betracht gezogen werden sollte. Sowohl das Gehirn als auch die Leber scheinen hierbei bevorzugte Zielorgane zu sein. Dank des Tiermodells für SSADH-D besteht die Möglichkeit, die Präferenz des Organs in Bezug auf die Pathologie von SSADH-D zu untersuchen und zu klären, ob die Leber eine bedeutende Rolle in der Pathologie spielt. Diese Studien werden derzeit in der AG Tikkanen durchgeführt.

5.8.2 Schwierigkeiten einer Gentherapie der Leber

Für eine suffiziente Therapie wäre es notwendig, die Mäuse so früh wie möglich zu behandeln. Zu diesem Zeitpunkt ist die Leber in Bezug auf ihre Größe und die Zellproliferation noch nicht ausgereift. Mit dem weiteren Wachstum würde sich der Effekt der Transduktion aufgrund des episomalen Vorkommens im Genom verdünnen, was zusätzliche Injektionen erfordern könnte (Cunningham et al. 2008; Nakai et al. 2001). Eine essenzielle Frage, welche sich daraus ergibt, betrifft daher die Dauer der Genexpression im episomalen Zustand in den transduzierten Leberzellen.

Es ist jedoch wichtig zu beachten, dass jede weitere AAV-Applikation mit Risiken verbunden ist und die Effizienz beeinträchtigen kann, da das Immunsystem nach der ersten Injektion aktiviert wird (Arjomandnejad et al. 2023). Dennoch gibt es

Möglichkeiten, die Immunantwort abzuschwächen und somit die Effektivität der Transduktion zu erhöhen (Ronzitti et al. 2020). Hierbei ist von Vorteil, dass die Leber großes Potenzial als Transgen-tolerables Organ besitzt (Verdera et al. 2020).

Ein weiteres Problem bei der AAV-Transduktion der Leber ist, dass AAV in geringer Anzahl in das Genom der Leberzellen integriert werden können, wodurch sich das Risiko für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms erhöhen könnte (Donsante et al. 2007; Dalwadi et al. 2021). Es sei jedoch angemerkt, dass die Frage der Toxizität in diesem Zusammenhang nicht abschließend geklärt ist (Riyad und Weber 2021).

5.8.3 Optimierung des Kapsids und Plasmids für zielgerichtete Gentherapie der Leber

AAV-DJ wurde zwar in zahlreichen präklinischen Zellkultur- und Tierstudien intensiv untersucht, jedoch ist seine Anwendung im klinischen Umfeld mit menschlichen Probanden bisher nicht erfolgt (Aaron et al. 2023; Hickey et al. 2011; Huerta et al. 2023; National Institutes of Health (NIH) 2024). Diese Zurückhaltung könnte auf verschiedene Faktoren zurückzuführen sein, darunter die Notwendigkeit eines umfassenderen Verständnisses seiner Sicherheit, potenziellen Immunogenität und generellen Wirksamkeit im menschlichen Kontext.

Daher bleibt die Auswahl eines geeigneten Kapsids von entscheidender Bedeutung für eine gezielte Lebertherapie, ohne andere Organe zu beeinträchtigen (Rodríguez-Márquez et al. 2021). In diesem Zusammenhang könnten AAV-LK03 oder AAV-NP59 vielversprechende Kandidaten sein, da sie äußerst spezifisch sind und humane Hepatozyten effektiver transduzieren als AAV-DJ (Paulk et al. 2018; Cabanes-Creus et al. 2020; Lisowski et al. 2014).

Zusätzlich besteht die Möglichkeit, die Spezifität und das Expressionsniveau durch die Optimierung des Transgen-haltigen Plasmids zu beeinflussen (Powell et al. 2015). Dabei ist zu beachten, dass die Größe des Plasmids, aufgrund der beschränkten Verpackungskapazität, 6 kB nicht überschreiten sollte (Grieger und Samulski 2005). Als ubiquitär und stark exprimierender Promotor mit frühem Expressionsbeginn wurde der CMV-Promotor verwendet (Doll et al. 1996). Für eine spezifischere Expression in der Leber könnten Promotoren wie α 1-Antitrypsin (hAAT; 347 Bp) oder Thyroxin-Bindendes-Globulin (TBG; 400 Bp) in Betracht gezogen werden (Cunningham et al.

2008; Cabrera-Pérez et al. 2019). Um die Promotoren zu verstärken, könnten sie mit einem CMV-Enhancer in Verbindung gesetzt werden (Powell et al. 2015). Als Posttranskriptionell-regulatorisches Element zwischen SSADH und dem PolyA-Signal könnte das verkürzte Woodchuck Hepatitis-Virus-PRE3 (WPRE3; 247 Bp) eingefügt werden, um die langfristige Expression zu fördern und das Transgen vor der Stilllegung zu schützen (Powell et al. 2015; Choi et al. 2014). Ebenso könnte das PolyA-Signal zur mRNA-Stabilisierung durch ein Simian Virus 40 late-PolyA (SV40; 135 Bp) ersetzt werden (Choi et al. 2014). Als obligate Sequenzen wären letztlich die ITRs, das SSADH-Gen, die Amp^R und das ORI enthalten (Abbildung 24). Dadurch wäre ein potenziell verbessertes Plasmid zur Transduktion erstellt.

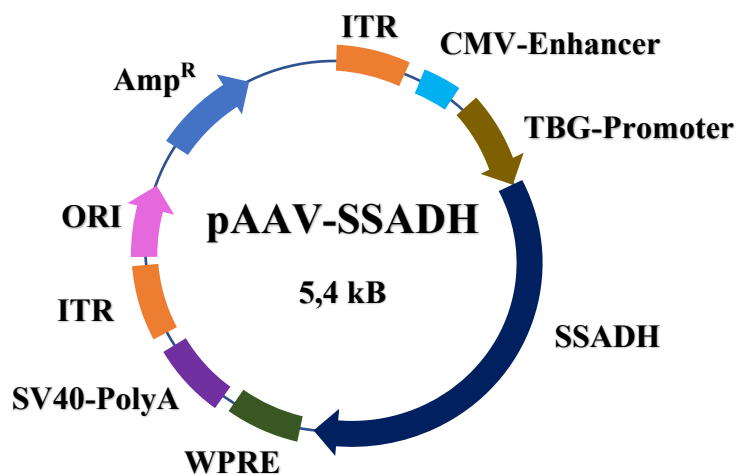


Abbildung 24: Potenziell optimiertes SSADH-Plasmid zur Gentherapie der Leber
Das Plasmid besitzt einen TBG-Promotor, welcher durch einen CMV-Enhancer verstärkt ist. Das WPRE ist für dauerhafte Genexpression und SV40 PolyA zur Stabilisierung der mRNA integriert. Zusätzlich sind die essenzielle Elemente wie ITRs, das SSADH-Gen, Ampicillin-Resistenz und der Origin of Replication vorhanden.

6 Zusammenfassung

Das SSADH-Defizit ist eine genetisch bedingte Erkrankung, die auf einem fehlerhaften Stoffwechsel des Neurotransmitters GABA basiert. Die Ursache dieser Erkrankung liegt in einer gestörten Aktivität des mitochondrialen Enzyms Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase (SSADH). Das klinische Bild der Patienten variiert stark und umfasst geistige Behinderung, Verhaltensstörungen, Autismus, muskuläre Hypotonie, Ataxie und epileptische Anfälle.

Bisher existiert trotz unterschiedlicher Ansätze noch keine kausale Therapie für das SSADH-Defizit. In dieser Arbeit wurde das Potenzial einer Gentherapie mittels AAV an SSADH-mangelnden Zellen (HEK293T-Zellen und Patienten-Fibroblasten) untersucht. AAV-Gentherapien zeichnen sich durch einen breiten Zelltropismus, eine minimale Immunreaktion und das episodale Vorliegen des transduzierten Gens in den Zellen aus. Diese Eigenschaften vermeiden eine Mutagenese und machen AAVs zu einem der vielversprechendsten Vehikel in der Gentherapie.

An SSADH-defizitären Zellen wurde das mit SSADH oder GFP beladene AAV-DJ-Kapsid erprobt. Dabei wurden verschiedene Inkubationszeiten (24 h, 48 h, 72 h) und MOI untersucht. Die Expression, Funktion und Verteilung von SSADH und GFP wurden mittels Proteinexpression, Aktivitätsmessung und Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

Die Transduktionen führten zu einer dosisabhängigen Steigerung der Expression und Verteilung von SSADH und GFP. Die SSADH-Expression in den SSADH-mangelnden Zellen konnte auf dasselbe oder höhere Niveau der Kontrollzellen gebracht werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass SSADH-D auf Zellkulturebene grundsätzlich erfolgreich mit AAV behandelt werden kann, jedoch sind weitere Untersuchungen erforderlich, um die Machbarkeit, Wirksamkeit und Sicherheit dieser Therapieoption zu gewährleisten. Die nächste Phase der Forschung sollte die Evaluierung der AAV-Gentherapie an Mäusen beinhalten, unter Berücksichtigung weiterer Optimierung des Kapsids und Plasmids.

7 Summary

SSADH deficiency is a genetic disorder that is based on a defective metabolism of the neurotransmitter gamma-amino butyric acid (GABA). The cause of this disorder is the impaired activity of the mitochondrial enzyme succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH). The clinical picture of the patients varies greatly and includes mental retardation, behavioral disorders, autism, muscular hypotonia, ataxia and epileptic seizures.

Despite various approaches for symptomatic treatment, there is still no causal therapy for SSADH-D. In this study, the potential of gene therapy using adeno-associated virus (AAV) on SSADH-deficient cells (HEK293T and patient fibroblasts) was investigated. AAV gene therapies are characterized by broad cell tropism, minimal immune response, and episomal presence of the transduced gene in cells. These features prevent mutagenesis and make AAVs one of the most promising vehicles in gene therapy.

The AAV-DJ capsid loaded with SSADH or GFP transgene was tested on SSADH-deficient cells. Different incubation times (24 h, 48 h, 72 h) and MOI were investigated. The expression, function and distribution of SSADH and GFP were analyzed by protein expression, activity measurement and fluorescence microscopy.

Transduction led to a dose-dependent increase in the expression, activity and distribution of SSADH and GFP. SSADH expression in the SSADH-deficient cells could be increased to the same or higher level as in the control-cells with endogenous SSADH. These results show that SSADH-D can, in principle, be successfully treated with AAV at the cell culture level, but further studies are needed to ensure the feasibility, efficacy and safety of this therapeutic option. The next phase of research should include the evaluation of AAV gene therapy in mice, taking into account further optimization of the capsid and the plasmid.

8 Abkürzungsverzeichnis

2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
4-HBD	4-Hydroxybutyrate Dehydrogenase
AAV	Adeno-assoziierte Viren
AdV	Adenoviren
ALDH5A1	Aldehyde Dehydrogenase 5 Family Member
Amp	Ampicillin
AmpR	Ampicillin-Resistenz
ANOVA	Varianzanalyse
APS	Ammoniumpersulfat
ASO	Antisense-Oligonukleotiden
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
Cas9	Endonuklease (CRISPR-zusammenhängend)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli XL-1 blue	Escherichia coli XL-1 blue
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EET	Enzymersatztherapie
EMA	European Medicines Agency
FCS	Fetales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
fwd	forward
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GABA-T	GABA-Transaminase
GAD	Glutamatdecarboxylase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GFP.....	Grün fluoreszierendes Protein
GHB	Gamma-Hydroxybuttersäure
GOI.....	Gens von Interesse
HEK293T-Zellen.....	Humane, embryonale Nierenzellen
Hz	Hertz
iPSC.....	induzierte pluripotente Stammzelle
ITR	Inverted Terminal Repeats
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
MOI.....	Multiplicity of Infection
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MTS.....	Mitochondriale Zielsequenz
NAD	β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NAD ⁺	oxidierte Form von Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	reduzierte Form von Nicotinamid-adenin-Dinucleotid
NEAA.....	Non-essential Amino acids
ORI	Origin of Replication
PBS.....	Phosphat gepufferte Salzlösung
PC	pharmakologische Chaperone
PFA.....	Paraformaldehyd
PMSF.....	Phenylmethylsulfonylfluorid
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
rev.....	reverse
RT	Raumtemperatur
RTD.....	Read-Through-Drugs
SDS.....	Natriumdodecylsulfat
SMA	spinale Muskeltrophie
SNP.....	Einzelnukleotid-Polymorphismen
SSA.....	Succinyl-Semialdehyd
SSADH.....	Succinat-Semi-Aldehyd-Dehydrogenase
SSADH-D.....	Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Defizit
SUDEP	plötzlich unerklärliche Todesfälle bei Epilepsie
TBS-T	Tris gepufferte Salzlösung + Tween-20

TE Tris-EDTA
TPT Triple-Plasmid-Transfektion
ZNS zentrales Nervensystem

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathophysiologie	3
Abbildung 2: Plasmidkarte von pHelper	23
Abbildung 3: Plasmidkarte von pAAV-DJ	24
Abbildung 4: Plasmidkarte von pAAV-GFP.....	24
Abbildung 5: Plasmidkarte von pAAV-SSADH.....	25
Abbildung 6: Ablauf der Produktion von AAV	29
Abbildung 7: Beispiel einer Regressionsgeraden als Berechnungsgrundlage	36
Abbildung 8: Berechnung der AAV-Konzentration in einer Probe	37
Abbildung 9 (A, B): Überprüfung des pAAV-SSADH-Plasmids.....	47
Abbildung 10: Western Blot der AAV-DJ-GFP Transduktion von SSADH-KO-HEK293T-Zellen.....	48
Abbildung 11: Fluoreszenzmessung der AAV-DJ-GFP Transduktion von SSADH-KO HEK293T-Zellen.....	49
Abbildung 12 (A-E): Auswertung der AAV-DJ-GFP-Transduktion von SSADH-KO-HEK293T-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie	51
Abbildung 13: Western Blot der AAV-DJ-GFP-Transduktion von SSADH-KO-HEK293T-Zellen.....	53
Abbildung 14: Fluoreszenzmessung der AAV-DJ-GFP Transduktion von SSADH-KO-HEK293T-Zellen.....	53
Abbildung 15 (A-E): Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie von AAV-DJ-GFP Transduktion von SSADH-KO-HEK293T-Zellen.....	55
Abbildung 16: Western Blot der AAV-DJ-SSADH Transduktion von SSADH-KO-HEK293T-Zellen.....	56
Abbildung 17: SSADH-Aktivitätsmessung der AAV-DJ-SSADH Transduktion von SSADH-KO-HEK293T-Zellen.....	57
Abbildung 18: Western Blot der AAV-DJ-SSADH-Transduktion von SSADH-KO-HEK293T-Zellen.....	59
Abbildung 19: SSADH-Aktivitätsmessung der AAV-DJ-SSADH-Transduktion von SSADH-KO-HEK293T-Zellen.....	60
Abbildung 20 (A-G): Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie von AAV-DJ-SSADH Transduktion von SSADH-KO-HEK293T-Zellen.....	62

Abbildung 21: Western Blot der AAV-DJ-SSADH Transduktion von Patienten-Fibroblasten.....64

Abbildung 22: SSADH-Aktivität von AAV-DJ-SSADH Transduktion von Patienten-Fibroblasten.....65

Abbildung 23: Veranschaulichung der Zellteilung von HEK293T-Zellen..... 69

Abbildung 24: Potenziell optimiertes SSADH-Plasmid für Gentherapie der Leber.....77

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: AAV-Tropismus ausgewählter Serotypen	10
Tabelle 2: Verwendete Geräte, Verbrauchsmaterialien und Gefäße	12
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien	16
Tabelle 4: Verwendete Lösungen und Puffer	20
Tabelle 5: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele	22
Tabelle 6: Verwendete Kits	22
Tabelle 7: Verwendete Plasmide	23
Tabelle 8: Verwendete Primer	25
Tabelle 9: Verwendete Zelllinien	26
Tabelle 10: Verwendete Bakterienstämme	26
Tabelle 11: Verwendete Primärantikörper	26
Tabelle 12: Verwendete Sekundärantikörper	27
Tabelle 13: Verwendete Software	28
Tabelle 14: Temperaturprogramm für die qPCR	35
Tabelle 15: Ausgesäte Zellmengen je Zelllinie, Inkubationszeit und Zweck	38
Tabelle 16: Konzentrationen der BSA-Standardreihe	39
Tabelle 17: Beispielsanordnung für SSADH-Aktivitätsmessung	42

11 Literaturverzeichnis

- Aaron, Ksenia A.; Pekrun, Katja; Atkinson, Patrick J.; Billings, Sara E.; Abitbol, Julia M.; Lee, Ina A. et al. (2023): Selection of viral capsids and promoters affects the efficacy of rescue of Tmprss3-deficient cochlea. In: *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 30, S. 413–428. DOI: 10.1016/j.omtm.2023.08.004.
- Abaandou, Laura; Quan, David; Shiloach, Joseph (2021): Affecting HEK293 Cell Growth and Production Performance by Modifying the Expression of Specific Genes. In: *Cells* 10 (7). DOI: 10.3390/cells10071667.
- Addgene (2019): AAV Titration by qPCR Using SYBR Green Technology. Online verfügbar unter <https://www.addgene.org/protocols/aav-titration-qpcr-using-sybr-green-technology/>, zuletzt aktualisiert am 13.02.2019, zuletzt geprüft am 28.08.2024.
- Afshar-Saber, Wardiya; Chen, Cidi; Teaney, Nicole A.; Kim, Kristina; Yang, Ziqin; Gasparoli, Federico M. et al. (2024): Generation and characterization of six human induced pluripotent stem cell lines (hiPSCs) from three individuals with SSADH Deficiency and CRISPR-corrected isogenic controls. In: *Stem cell research* 77, S. 103424. DOI: 10.1016/j.scr.2024.103424.
- Anguela, Xavier M.; High, Katherine A. (2019): Entering the Modern Era of Gene Therapy. In: *Annual review of medicine* 70, S. 273–288. DOI: 10.1146/annurev-med-012017-043332.
- Arjomandnejad, Motahareh; Dasgupta, Ishani; Flotte, Terence R.; Keeler, Allison M. (2023): Immunogenicity of Recombinant Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors for Gene Transfer. In: *Biodrugs* 37 (3), S. 311–329. DOI: 10.1007/s40259-023-00585-7.
- Atchison, R. W.; Casto, B. C.; Hammon, W. C. (1965): Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. In: *Science (New York, N.Y.)* 149 (3685), S. 754–756. DOI: 10.1126/science.149.3685.754.
- Aurnhammer, Christine; Haase, Maren; Muether, Nadine; Hausl, Martin; Rauschhuber, Christina; Huber, Ingrid et al. (2012): Universal real-time PCR for the detection and quantification of adeno-associated virus serotype 2-derived inverted terminal repeat sequences. In: *Human gene therapy methods* 23 (1), S. 18–28. DOI: 10.1089/hgtb.2011.034.
- Aurox (2023): Aurox Laser Free Confocal Spinning Disk Microscopy Filter Cubes. Online verfügbar unter <https://www.aurox.co.uk>, zuletzt aktualisiert am 07.10.2023, zuletzt geprüft am 28.08.2024.
- Baek, Jong Min; Kwak, Sung Chul; Kim, Ju-Young; Ahn, Sung-Jun; Jun, Hong Young; Yoon, Kwon-Ha et al. (2015): Evaluation of a novel technique for intraperitoneal injections in mice. In: *Lab animal* 44 (11), S. 440–444. DOI: 10.1038/labana.880.
- Bay, Tina; Eghorn, Laura F.; Klein, Anders B.; Wellendorph, Petrine (2014): GHB receptor targets in the CNS: focus on high-affinity binding sites. In: *Biochemical pharmacology* 87 (2), S. 220–228. DOI: 10.1016/j.bcp.2013.10.028.
- Bereiter-Hahn, J.; Vöth, M. (1994): Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. In: *Microscopy research and technique* 27 (3), S. 198–219. DOI: 10.1002/jemt.1070270303.

- Bernocchi, G.; Barni, S.; Biggiogera, M. (1986): Electron-cytochemical localization of succinic semialdehyde dehydrogenase activity in Purkinje neurons and hepatocytes of the rat. In: *Journal of Neuroscience Methods* 17 (1), S. 31–42. DOI: 10.1016/0165-0270(86)90032-4.
- Bhattacharya, Indranil; Boje, Kathleen M. K. (2004): GHB (gamma-hydroxybutyrate) carrier-mediated transport across the blood-brain barrier. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 311 (1), S. 92–98. DOI: 10.1124/jpet.104.069682.
- Blasi, Paola; Boyl, Pietro Pilo; Ledda, Mario; Novelletto, Andrea; Gibson, K. Michael; Jakobs, Cornelis et al. (2002): Structure of human succinic semialdehyde dehydrogenase gene: identification of promoter region and alternatively processed isoforms. In: *Molecular Genetics and Metabolism* 76 (4), S. 348–362. DOI: 10.1016/S1096-7192(02)00105-1.
- Brennenstuhl, Heiko; Didiasova, Miroslava; Assmann, Birgit; Bertoldi, Mariarita; Molla, Gianluca; Jung-Klawitter, Sabine et al. (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. In: *International journal of molecular sciences* 21 (22). DOI: 10.3390/ijms21228578.
- Brennenstuhl, Heiko; Opladen, Thomas; Ebrahimi-Fakhari, Darius; Pearl, Philipp; Shahin, Mustafa; Thome, Christian et al. (2019): Induced pluripotent stem cells (iPSCs) and iPSC-derived cerebral organoids as a tool to model Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency. In: *Journal of Inherited Metabolic Disease* 42 Suppl 1, S. 1–479. DOI: 10.1002/jimd.12153.
- Buller, R. M.; Janik, J. E.; Sebring, E. D.; Rose, J. A. (1981): Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. In: *J Virol* 40 (1), S. 241–247. DOI: 10.1128/JVI.40.1.241-247.1981.
- Buzzi, Andrea; Wu, Ying; Frantseva, Marina V.; Perez Velazquez, Jose L.; Cortez, Miguel A.; Liu, Chun C. et al. (2006): Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: GABAB receptor-mediated function. In: *Brain research* 1090 (1), S. 15–22. DOI: 10.1016/j.brainres.2006.02.131.
- Cabanes-Creus, Marti; Westhaus, Adrian; Navarro, Renina Gale; Baltazar, Grober; Zhu, Erhua; Amaya, Anais K. et al. (2020): Attenuation of Heparan Sulfate Proteoglycan Binding Enhances In Vivo Transduction of Human Primary Hepatocytes with AAV2. In: *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 17, S. 1139–1154. DOI: 10.1016/j.omtm.2020.05.004.
- Cabrera-Pérez, Raquel; Vila-Julià, Ferran; Hirano, Michio; Mingozzi, Federico; Torres-Torronteras, Javier; Martí, Ramon (2019): Alpha-1-Antitrypsin Promoter Improves the Efficacy of an Adeno-Associated Virus Vector for the Treatment of Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy. In: *Human gene therapy* 30 (8), S. 985–998. DOI: 10.1089/hum.2018.217.
- Cell Biolabs, Inc. (2016): AAV-DJ Helper Free Expression System. Online verfügbar unter <https://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/VPK-400-DJ-aav-helper-free->

packaging-system.pdf, zuletzt aktualisiert am 28.08.2024, zuletzt geprüft am 28.08.2024.

Chalfie, M. (1995): Green fluorescent protein. In: *Photochemistry and photobiology* 62 (4), S. 651–656. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1995.tb08712.x.

Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W. W.; Prasher, D. C. (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. In: *Science (New York, N.Y.)* 263 (5148), S. 802–805. DOI: 10.1126/science.8303295.

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). In: *American Journal of Human Genetics* 63 (2), S. 399–408. DOI: 10.1086/301964.

Chambliss, K. L.; Zhang, Y. A.; Rossier, E.; Vollmer, B.; Gibson, K. M. (1995): Enzymatic and Immunologic Identification of Succinic Semialdehyde Dehydrogenase in Rat and Human Neural and Nonneural Tissues. In: *Journal of neurochemistry* 65 (2), S. 851–855. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1995.65020851.x.

Chandler, R. J.; Tarasenko, T. N.; Cusmano-Ozog, K.; Sun, Q.; Sutton, V. R.; Venditti, C. P.; McGuire, P. J. (2013): Liver-directed adeno-associated virus serotype 8 gene transfer rescues a lethal murine model of citrullinemia type 1. In: *Gene Ther* 20 (12), S. 1188–1191. DOI: 10.1038/gt.2013.53.

Chandler, Randy J.; Sands, Mark S.; Venditti, Charles P. (2017): Recombinant Adeno-Associated Viral Integration and Genotoxicity: Insights from Animal Models. In: *Human gene therapy* 28 (4), S. 314–322. DOI: 10.1089/hum.2017.009.

Chen, Xiaodan; Peng, Minzhi; Cai, Yanna; Zhou, Chengcheng; Liu, Li (2022): Human iPSC-derived neural stem cells with ALDH5A1 mutation as a model of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. In: *BMC Neuroscience* 23 (1), S. 77. DOI: 10.1186/s12868-022-00755-3.

Choi, Jun-Hyeok; Yu, Nam-Kyung; Baek, Gi-Chul; Bakes, Joseph; Seo, Daekwan; Nam, Hye Jin et al. (2014): Optimization of AAV expression cassettes to improve packaging capacity and transgene expression in neurons. In: *Molecular brain* 7, S. 17. DOI: 10.1186/1756-6606-7-17.

Chopra, Maya; Modi, Meera E.; Dies, Kira A.; Chamberlin, Nancy L.; Buttermore, Elizabeth D.; Brewster, Stephanie Jo et al. (2022): GENE TARGET: A framework for evaluating Mendelian neurodevelopmental disorders for gene therapy. In: *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 27, S. 32–46. DOI: 10.1016/j.omtm.2022.08.007.

Connolly, J. B. (2002): Lentiviruses in gene therapy clinical research. In: *Gene therapy* 9 (24), S. 1730–1734. DOI: 10.1038/sj.gt.3301893.

Cunningham, Sharon C.; Dane, Allison P.; Spinoulas, Afroditi; Alexander, Ian E. (2008): Gene Delivery to the Juvenile Mouse Liver Using AAV2/8 Vectors. In: *Molecular Therapy* 16 (6), S. 1081–1088. DOI: 10.1038/mt.2008.72.

Dalwadi, Dhwanil A.; Torrens, Laura; Abril-Fornaguera, Jordi; Pinyol, Roser; Willoughby, Catherine; Posey, Jeffrey et al. (2021): Liver Injury Increases the

- Incidence of HCC following AAV Gene Therapy in Mice. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 29 (2), S. 680–690. DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.10.018.
- Dane, A. P.; Wowro, S. J.; Cunningham, S. C.; Alexander, I. E. (2013): Comparison of gene transfer to the murine liver following intraperitoneal and intraportal delivery of hepatotropic AAV pseudo-serotypes. In: *Gene therapy* 20 (4), S. 460–464. DOI: 10.1038/gt.2012.67.
- Dayton, Robert D.; Grames, Mychal S.; Klein, Ronald L. (2018): More expansive gene transfer to the rat CNS: AAV PHP.EB vector dose-response and comparison to AAV PHP.B. In: *Gene Ther* 25 (5), S. 392–400. DOI: 10.1038/s41434-018-0028-5.
- Didiasova, Miroslava; Banning, Antje; Brennenstuhl, Heiko; Jung-Klawitter, Sabine; Cinquemani, Claudio; Opladen, Thomas; Tikkanen, Ritva (2020): Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency: An Update. In: *Cells* 9 (2), S. 477. DOI: 10.3390/cells9020477.
- Didiasova, Miroslava; Banning, Antje; Tikkanen, Ritva (2023): Development of precision therapies for rare inborn errors of metabolism: Functional investigations in cell culture models. In: *Journal of Inherited Metabolic Disease*. DOI: 10.1002/jimd.12674.
- Didiasova, Miroslava; Cesaro, Samuele; Feldhoff, Simon; Bettin, Ilaria; Tiegel, Nana; Füssgen, Vera et al. (2024): Functional Characterization of a Spectrum of Genetic Variants in a Family with Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency. In: *International journal of molecular sciences* 25 (10). DOI: 10.3390/ijms25105237.
- Doll, R. F.; Crandall, J. E.; Dyer, C. A.; Aucoin, J. M.; Smith, F. I. (1996): Comparison of promoter strengths on gene delivery into mammalian brain cells using AAV vectors. In: *Gene therapy* 3 (5), S. 437–447. DOI: Study.
- Donsante, Anthony; Miller, Daniel G.; Li, Yi; Vogler, Carole; Brunt, Elizabeth M.; Russell, David W.; Sands, Mark S. (2007): AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. In: *Science (New York, N.Y.)* 317 (5837), S. 477. DOI: 10.1126/science.1142658.
- Duan, D.; Sharma, P.; Yang, J.; Yue, Y.; Dudus, L.; Zhang, Y. et al. (1998): Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. In: *J Virol* 72 (11), S. 8568–8577. DOI: 10.1128/JVI.72.11.8568-8577.1998.
- Finkel, Richard S.; Mercuri, Eugenio; Darras, Basil T.; Connolly, Anne M.; Kuntz, Nancy L.; Kirschner, Janbernd et al. (2017): Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. In: *The New England journal of medicine* 377 (18), S. 1723–1732. DOI: 10.1056/NEJMoa1702752.
- Genemedi Biotech. Inc (2018): Adeno-associated virus (AAV). User Manual. Online verfügbar unter <https://www.genemedi.net/i/aav-vector-system>, zuletzt aktualisiert am 18.08.2018, zuletzt geprüft am 28.08.2024.

- Gessler, Dominic. J.; Phillip W. L. Tai; Jia Li; Guangping Gao (2019): Intravenous Infusion of AAV for Widespread Gene Delivery to the Nervous System. In: *Methods Mol Biol.* (1950), 143–163. DOI: 10.1007/978-1-4939-9139-6_8.
- 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. In: *Journal of Inherited Metabolic Disease* 17 (6), S. 732–737. DOI: 10.1007/BF00712016.
- Gibson, K. M.; Christensen, E.; Jakobs, C.; Fowler, B.; Clarke, M. A.; Hammersen, G. et al. (1997): The clinical phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (4-hydroxybutyric aciduria): case reports of 23 new patients. In: *Pediatrics* 99 (4), S. 567–574. DOI: 10.1542/peds.99.4.567.
- Gibson, K. M.; Jakobs, C.; Ogier, H.; Hagenfeldt, L.; Eeg-Olofsson, K. E.; Eeg-Olofsson, O. et al. (1995): Vigabatrin therapy in six patients with succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. In: *Journal of Inherited Metabolic Disease* 18 (2), S. 143–146. DOI: 10.1007/BF00711750.
- Gibson, Kenneth M.; Sweetman, Lawrence; Nyhan, William L.; Jakobs, Cornells; Rating, Dietz; Siemes, Hartmut; Hanefeld, Folker (1983): Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: an inborn error of gamma-aminobutyric acid metabolism. In: *Clinica Chimica Acta* 133 (1), S. 33–42. DOI: 10.1016/0009-8981(83)90018-9.
- Gram, L.; Larsson, O. M.; Johnsen, A.; Schousboe, A. (1989): Experimental studies of the influence of vigabatrin on the GABA system. In: *British journal of clinical pharmacology* 27 Suppl 1 (Suppl 1), 13S-17S. DOI: 10.1111/j.1365-2125.1989.tb03455.x.
- Gray, Steven J.; Foti, Stacey B.; Schwartz, Joel W.; Bachaboina, Lavanya; Taylor-Blake, Bonnie; Coleman, Jennifer et al. (2011): Optimizing promoters for recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in the peripheral and central nervous system using self-complementary vectors. In: *Human gene therapy* 22 (9), S. 1143–1153. DOI: 10.1089/hum.2010.245.
- Grieger, Joshua C.; Samulski, Richard J. (2005): Packaging capacity of adeno-associated virus serotypes: impact of larger genomes on infectivity and postentry steps. In: *J Virol* 79 (15), S. 9933–9944. DOI: 10.1128/JVI.79.15.9933-9944.2005.
- Grimm, Dirk; Lee, Joyce S.; Wang, Lora; Desai, Tushar; Akache, Bassel; Storm, Theresa A.; Kay, Mark A. (2008): In Vitro and In Vivo Gene Therapy Vector Evolution via Multispecies Interbreeding and Retargeting of Adeno-Associated Viruses. In: *J Virol* 82 (12), S. 5887–5911. DOI: 10.1128/JVI.00254-08.
- Gupta, Maneesh; Jansen, Erwin E. W.; Senephansiri, Henry; Jakobs, Cornelis; Snead, O. Carter; Grompe, Markus; Gibson, K. Michael (2004): Liver-directed adenoviral gene transfer in murine succinate semialdehyde dehydrogenase deficiency. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 9 (4), S. 527–539. DOI: 10.1016/j.ymthe.2004.01.013.
- Harmatz, Paul (2015): Enzyme Replacement Therapies and Immunogenicity in Lysosomal Storage Diseases: Is There a Pattern? In: *Clinical Therapeutics* 37 (9), S. 2130–2134. DOI: 10.1016/j.clinthera.2015.06.004.

- Hermonat, P. L.; Muzyczka, N. (1984): Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (20), S. 6466–6470. DOI: 10.1073/pnas.81.20.6466.
- Hickey, Raymond D.; Lillegard, Joseph B.; Fisher, James E.; McKenzie, Travis J.; Hofherr, Sean E.; Finegold, Milton J. et al. (2011): Efficient production of Fah-null heterozygote pigs by chimeric adeno-associated virus-mediated gene knockout and somatic cell nuclear transfer. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 54 (4), S. 1351–1359. DOI: 10.1002/hep.24490.
- Hogema, B. M.; Gupta, M.; Senephansiri, H.; Burlingame, T. G.; Taylor, M.; Jakobs, C. et al. (2001): Pharmacologic rescue of lethal seizures in mice deficient in succinate semialdehyde dehydrogenase. In: *Nature genetics* 29 (2), S. 212–216. DOI: 10.1038/ng727.
- Hoitzing, Hanne; Johnston, Iain G.; Jones, Nick S. (2015): What is the function of mitochondrial networks? A theoretical assessment of hypotheses and proposal for future research. In: *Bioessays* 37 (6), S. 687–700. DOI: 10.1002/bies.201400188.
- Huang, Lin-Ya; Halder, Sujata; Agbandje-McKenna, Mavis (2014): Parvovirus glycan interactions. In: *Current Opinion in Virology* 7, S. 108–118. DOI: 10.1016/j.coviro.2014.05.007.
- Huerta, Carlos Theodore; Ortiz, Yulexi Y.; Li, Yan; Ribieras, Antoine J.; Voza, Francesca; Le, Nga et al. (2023): Novel Gene-Modified Mesenchymal Stem Cell Therapy Reverses Impaired Wound Healing in Ischemic Limbs. In: *Annals of surgery* 278 (3), S. 383–395. DOI: 10.1097/SLA.0000000000005949.
- İnci, Asli; Özaslan, Ahmet; Okur, İlyas; Biberoglu, Gürsel; Güney, Esra; Ezgü, Fatih Süheyl et al. (2021): Autism: Screening of inborn errors of metabolism and unexpected results. In: *Autism research: official journal of the International Society for Autism Research* 14 (5), S. 887–896. DOI: 10.1002/aur.2486.
- Issa, Shaza S.; Shaimardanova, Alisa A.; Solovyeva, Valeriya V.; Rizvanov, Albert A. (2023): Various AAV Serotypes and Their Applications in Gene Therapy: An Overview. In: *Cells* 12 (5). DOI: 10.3390/cells12050785.
- Jakobs, Cornelis; Bojasch, Monika; Mönch, Eberhard; Rating (1981): Urinary excretion of gamma-hydroxybutyric acid in a patient with neurological. In: *Clinica Chimica Acta* 111 (2-3), S. 169–178. DOI: 10.1016/0009-8981(81)90184-4.
- Kang, Jeong Han; Park, Yong Bok; Huh, Tae-Lin; Lee, Won-Ha; Choi, Myung-Sook; Kwon, Oh-Shin (2005): High-level expression and characterization of the recombinant enzyme, and tissue distribution of human succinic semialdehyde dehydrogenase. In: *Protein expression and purification* 44 (1), S. 16–22. DOI: 10.1016/j.pep.2005.03.019.
- Lakhan, R.; Baylink, D. J.; Lau, K-H W.; Tang, X.; Sheng, M. H-C; Rundle, C. H.; Qin, X. (2015): Local administration of AAV-DJ pseudoserotype expressing COX2 provided early onset of transgene expression and promoted bone fracture healing in mice. In: *Gene therapy* 22 (9), S. 721–728. DOI: 10.1038/gt.2015.40.

Landfeldt, Erik; Sejersen, Thomas; Tulinius, Már (2019): A mini-review and implementation model for using ataluren to treat nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy. In: *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)* 108 (2), S. 224–230. DOI: 10.1111/apa.14568.

Latzer, Itay Tokatly; Rouillet, Jean-Baptiste; Cesaro, Samuele; DiBacco, Melissa L.; Arning, Erland; Rotenberg, Alexander et al. (2023a): Phenotypic Correlates of Structural and Functional Protein Impairments Resultant from ALDH5A1 Variants. In: *Research square*. DOI: 10.21203/rs.3.rs-3111263/v1.

Latzer, Tokatly Itay; Bertoldi, Mariarita; Blau, Nenad; DiBacco, Melissa L.; Elsea, Sarah H.; García-Cazorla, Àngels et al. (2024): Consensus guidelines for the diagnosis and management of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. In: *Molecular Genetics and Metabolism* 142 (1), S. 108363. DOI: 10.1016/j.ymgme.2024.108363.

Latzer, Tokatly Itay; Hanson, Ellen; Bertoldi, Mariarita; García-Cazorla, Àngeles; Tsuboyama, Melissa; MacMullin, Paul et al. (2023b): Autism spectrum disorder and GABA levels in children with succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. In: *Developmental medicine and child neurology* 65 (12), S. 1596–1606. DOI: 10.1111/dmcn.15659.

Lee, Henry H. C.; Latzer, Itay Tokatly; Bertoldi, Mariarita; Gao, Guangping; Pearl, Phillip L.; Sahin, Mustafa; Rotenberg, Alexander (2024): Gene replacement therapies for inherited disorders of neurotransmission: Current progress in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. In: *Journal of Inherited Metabolic Disease* 47 (3), S. 476–493. DOI: 10.1002/jimd.12735.

Lee, Henry H. C.; McGinty, Gabrielle E.; Pearl, Phillip L.; Rotenberg, Alexander (2022): Understanding the Molecular Mechanisms of Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency (SSADHD): Towards the Development of SSADH-Targeted Medicine. In: *International journal of molecular sciences* 23 (5). DOI: 10.3390/ijms23052606.

Lee, Sang Hwan; Kim, Subin; Lee, Nayeon; Lee, Junghun; Yu, Seung Shin; Kim, Jin Hong; Kim, Sunyoung (2019): Intrathecal delivery of recombinant AAV1 encoding hepatocyte growth factor improves motor functions and protects neuromuscular system in the nerve crush and SOD1-G93A transgenic mouse models. In: *Acta Neuropathologica Communications* 7 (1), S. 96. DOI: 10.1186/s40478-019-0737-z.

Lerch, Thomas F.; O'Donnell, Jason K.; Meyer, Nancy L.; Xie, Qing; Taylor, Kenneth A.; Stagg, Scott M.; Chapman, Michael S. (2012): Structure of AAV-DJ, a retargeted gene therapy vector: cryo-electron microscopy at 4.5 Å resolution. In: *Structure* 20 (8), S. 1310–1320. DOI: 10.1016/j.str.2012.05.004.

Li, J-P; Kusche-Gullberg, M. (2016): Heparan Sulfate: Biosynthesis, Structure, and Function. In: *International review of cell and molecular biology* 325, S. 215–273. DOI: 10.1016/bs.ircmb.2016.02.009.

Lim, Jeong-A; Yi, Haiqing; Gao, Fengqin; Raben, Nina; Kishnani, Priya S.; Sun, Baodong (2019): Intravenous Injection of an AAV-PHP.B Vector Encoding Human Acid α -Glucosidase Rescues Both Muscle and CNS Defects in Murine Pompe Disease.

- In: *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 12, S. 233–245. DOI: 10.1016/j.omtm.2019.01.006.
- Ling, Chen; Wang, Yuan; Lu, Yuan; Wang, Lina; Jayandharan, Giridhara R.; Aslanidi, George V. et al. (2015): The Adeno-Associated Virus Genome Packaging Puzzle. In: *Journal of molecular and genetic medicine: an international journal of biomedical research* 9 (3). DOI: 10.4172/1747-0862.1000175.
- Lisowski, Leszek; Dane, Allison P.; Chu, Kirk; Zhang, Yue; Cunningham, Sharon C.; Wilson, Elizabeth M. et al. (2014): Selection and evaluation of clinically relevant AAV variants in a xenograft liver model. In: *Nature* 506 (7488), S. 382–386. DOI: 10.1038/nature12875.
- Liu, H.; Tariq, R.; Liu, G. L.; Yan, H.; Kaye, A. D. (2017): Inadvertent intrathecal injections and best practice management. In: *Acta anaesthesiologica Scandinavica* 61 (1), S. 11–22. DOI: 10.1111/aas.12821.
- Lock, Martin; Alvira, Mauricio; Vandenberghe, Luk H.; Samanta, Arabinda; Toelen, Jaan; Debyser, Zeger; Wilson, James M. (2010): Rapid, simple, and versatile manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors at scale. In: *Human gene therapy* 21 (10), S. 1259–1271. DOI: 10.1089/hum.2010.055.
- 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. In: *Neurochemistry international* 99, S. 72–84. DOI: 10.1016/j.neuint.2016.06.009.
- Marshall, E. (1999): Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. In: *Science (New York, N.Y.)* 286 (5448), S. 2244–2245. DOI: 10.1126/science.286.5448.2244.
- Martin, Kirt; McConnell, Alice; Elsea, Sarah H. (2021): Assessing Prevalence and Carrier Frequency of Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency. In: *Journal of child neurology* 36 (13-14), S. 1218–1222. DOI: 10.1177/08830738211018902.
- McCafferty, Emma H.; Scott, Lesley J. (2019): Migalastat: A Review in Fabry Disease. In: *Drugs* 79 (5), S. 543–554. DOI: 10.1007/s40265-019-01090-4.
- Melo, Sandra P.; Lisowski, Leszek; Bashkirova, Elizaveta; Zhen, Hanson H.; Chu, Kirk; Keene, Douglas R. et al. (2014): Somatic correction of junctional epidermolysis bullosa by a highly recombinogenic AAV variant. In: *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 22 (4), S. 725–733. DOI: 10.1038/mt.2013.290.
- Mendell, Jerry R.; Al-Zaidy, Samiah; Shell, Richard; Arnold, W. Dave; Rodino-Klapac, Louise R.; Prior, Thomas W. et al. (2017): Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. In: *The New England journal of medicine* 377 (18), S. 1713–1722. DOI: 10.1056/NEJMoa1706198.
- Meyer, Nancy L.; Chapman, Michael S. (2022): Adeno-associated virus (AAV) cell entry: structural insights. In: *Trends in Microbiology* 30 (5), S. 432–451. DOI: 10.1016/j.tim.2021.09.005.

- Mietzsch, Mario; Broecker, Felix; Reinhardt, Anika; Seeberger, Peter H.; Heilbronn, Regine (2014): Differential adeno-associated virus serotype-specific interaction patterns with synthetic heparins and other glycans. In: *J Virol* 88 (5), S. 2991–3003. DOI: 10.1128/JVI.03371-13.
- Miller, N. R.; Johnson, M. A.; Paul, S. R.; Girkin, C. A.; Perry, J. D.; Endres, M.; Krauss, G. L. (1999): Visual dysfunction in patients receiving vigabatrin: clinical and electrophysiologic findings. In: *Neurology* 53 (9), S. 2082–2087. DOI: 10.1212/wnl.53.9.2082.
- Mussche, Silke; Devreese, Bart; Nagabhushan Kalburgi, Sahana; Bachaboina, Lavanya; Fox, Jonathan C.; Shih, Hung-Jui et al. (2013): Restoration of cytoskeleton homeostasis after gigaxonin gene transfer for giant axonal neuropathy. In: *Human gene therapy* 24 (2), S. 209–219. DOI: 10.1089/hum.2012.107.
- Nakai, H.; Yant, S. R.; Storm, T. A.; Fuess, S.; Meuse, L.; Kay, M. A. (2001): Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. In: *J Virol* 75 (15), S. 6969–6976. DOI: 10.1128/JVI.75.15.6969-6976.2001.
- National Institutes of Health (NIH) (2024): ClinicalTrials.gov: Search for "AAV-DJ". Online verfügbar unter <https://clinicaltrials.gov/search?intr=aav-dj>, zuletzt aktualisiert am 07.08.2024, zuletzt geprüft am 28.08.2024.
- NCBI (2024): ClinVar Database. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=ssahd>, zuletzt aktualisiert am 28.08.2024, zuletzt geprüft am 15.12.2024.
- Neupert, Walter; Herrmann, Johannes M. (2007): Translocation of proteins into mitochondria. In: *Annual review of biochemistry* 76, S. 723–749. DOI: 10.1146/annurev.biochem.76.052705.163409.
- O'Connell, T.; Kaye, L.; Plosay, J. J. (2000): Gamma-hydroxybutyrate (GHB): a newer drug of abuse. In: *American family physician* 62 (11), S. 2478–2483.
- Patil, Anandrao Ashok; Bhor, Sachin Ashok; Rhee, Won Jong (2020): Cell death in culture: Molecular mechanisms, detections, and inhibition strategies. In: *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 91, S. 37–53. DOI: 10.1016/j.jiec.2020.08.009.
- Paulk, Nicole K.; Pekrun, Katja; Zhu, Erhua; Nygaard, Sean; Li, Bin; Xu, Jianpeng et al. (2018): Bioengineered AAV Capsids with Combined High Human Liver Transduction In Vivo and Unique Humoral Seroreactivity. In: *Molecular Therapy* 26 (1), S. 289–303. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.09.021.
- Pearl, P. L.; Gibson, K. M.; Acosta, M. T.; Vezina, L. G.; Theodore, W. H.; Rogawski, M. A. et al. (2003): Clinical spectrum of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. In: *Neurology* 60 (9), S. 1413–1417. DOI: 10.1212/01.wnl.0000059549.70717.80.
- Pearl, Phillip L.; Parviz, Mahsa; Vogel, Kara; Schreiber, John; Theodore, William H.; Gibson, K. Michael (2015): Inherited disorders of gamma-aminobutyric acid metabolism and advances in ALDH5A1 mutation identification. In: *Developmental medicine and child neurology* 57 (7), S. 611–617. DOI: 10.1111/dmcn.12668.

- Pop, Ana; Smith, Desirée E. C.; Kirby, Trevor; Walters, Dana; Gibson, K. Michael; Mahmoudi, Soufiane et al. (2020): Functional analysis of thirty-four suspected pathogenic missense variants in ALDH5A1 gene associated with succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. In: *Molecular Genetics and Metabolism* 130 (3), S. 172–178. DOI: 10.1016/j.ymgme.2020.04.004.
- Powell, Sara Kathleen; Rivera-Soto, Ricardo; Gray, Steven James (2015): Viral expression cassette elements to enhance transgene target specificity and expression in gene therapy. In: *Discovery medicine* 19 (102), S. 49–57.
- Ran, Gai; Chen, Xiao; Xie, Yilin; Zheng, Qingyun; Xie, Jinyan; Yu, Chenghui et al. (2020): Site-Directed Mutagenesis Improves the Transduction Efficiency of Capsid Library-Derived Recombinant AAV Vectors. In: *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 17, S. 545–555. DOI: 10.1016/j.omtm.2020.03.007.
- Riyad, Jalish M.; Weber, Thomas (2021): Intracellular trafficking of adeno-associated virus (AAV) vectors: challenges and future directions. In: *Gene therapy* 28 (12), S. 683–696. DOI: 10.1038/s41434-021-00243-z.
- Rodríguez-Márquez, Esther; Meumann, Nadja; Büning, Hildegard (2021): Adeno-associated virus (AAV) capsid engineering in liver-directed gene therapy. In: *Expert opinion on biological therapy* 21 (6), S. 749–766. DOI: 10.1080/14712598.2021.1865303.
- Ronzitti, Giuseppe; Gross, David-Alexandre; Mingozzi, Federico (2020): Human Immune Responses to Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors. In: *Front. Immunol.* 11, S. 670. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00670.
- Russell-Eggitt, I. M.; Mackey, D. A.; Taylor, D. S.; Timms, C.; Walker, J. W. (2000): Vigabatrin-associated visual field defects in children. In: *Eye (London, England)* 14 (Pt 3A), S. 334–339. DOI: 10.1038/eye.2000.83.
- Ryzlak, M. T.; Pietruszko, R. (1988): Human brain "high Km" aldehyde dehydrogenase: purification, characterization, and identification as NAD⁺-dependent succinic semialdehyde dehydrogenase. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 266 (2), S. 386–396. DOI: 10.1016/0003-9861(88)90270-6.
- Schreiber, John M.; Wiggs, Edythe; Cuento, Rose; Norato, Gina; Dustin, Irene H.; Rolinski, Rachel et al. (2021): A Randomized Controlled Trial of SGS-742, a γ -aminobutyric acid B (GABA-B) Receptor Antagonist, for Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency. In: *Journal of child neurology* 36 (13-14), S. 1189–1199. DOI: 10.1177/08830738211012804.
- Suzuki, Yoshiyuki; Ogawa, Seiichiro; Sakakibara, Yasubumi (2009): Chaperone therapy for neuronopathic lysosomal diseases: competitive inhibitors as chemical chaperones for enhancement of mutant enzyme activities. In: *Perspectives in medicinal chemistry* 3, S. 7–19. DOI: 10.4137/pmc.s2332.
- System Biosciences (2022): AAVanced Concentration Reagent User Manual. Online verfügbar unter systembio.com/wp/wp-content/uploads/2020/10/AAVanced-concentration-user-manual-1.pdf, zuletzt geprüft am 25.06.2023.

- Tang, Ran; Xu, Zhigang (2020): Gene therapy: a double-edged sword with great powers. In: *Molecular and cellular biochemistry* 474 (1-2), S. 73–81. DOI: 10.1007/s11010-020-03834-3.
- Teramoto, S.; Ishii, T.; Matsuse, T. (2001): Variables pertinent to the efficiency of adeno-associated virus (AAV) vectors mediated gene transfer to human vascular endothelial cells. In: *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 24 (4), S. 437–443. DOI: 10.1291/hypres.24.437.
- The Human Protein Atlas (2024): ALDH5A1 - Protein Expression Summary - Cell line. Online verfügbar unter <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000112294-ALDH5A1/cell+line>, zuletzt aktualisiert am 29.08.2024, zuletzt geprüft am 29.08.2024.
- Thomas, Clare E.; Storm, Theresa A.; Huang, Zan; Kay, Mark A. (2004): Rapid uncoating of vector genomes is the key to efficient liver transduction with pseudotyped adeno-associated virus vectors. In: *J Virol* 78 (6), S. 3110–3122. DOI: 10.1128/jvi.78.6.3110-3122.2004.
- Tillakaratne, N. J.; Medina-Kauwe, L.; Gibson, K. M. (1995): Gamma-aminobutyric acid (GABA) metabolism in mammalian neural and nonneural tissues. In: *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Physiology*, S. 247–263. DOI: 10.1016/0300-9629(95)00099-2.
- Trettel, F.; Malaspina, P.; Jodice, C.; Novelletto, A.; Slaughter, C. A.; Caudle, D. L. et al. (1997): Human succinic semialdehyde dehydrogenase. Molecular cloning and chromosomal localization. In: *Advances in experimental medicine and biology* 414, S. 253–260.
- Verdera, Helena Costa; Kuranda, Klaudia; Mingozi, Federico (2020): AAV Vector Immunogenicity in Humans: A Long Journey to Successful Gene Transfer. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 28 (3), S. 723–746. DOI: 10.1016/j.ymthe.2019.12.010.
- Vernau, Karen M.; Struys, Eduard; Letko, Anna; Woolard, Kevin D.; Aguilar, Miriam; Brown, Emily A. et al. (2020): A Missense Variant in ALDH5A1 Associated with Canine Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency (SSADHD) in the Saluki Dog. In: *Genes* 11 (9). DOI: 10.3390/genes11091033.
- Vogel, Kara R.; Ainslie, Garrett R.; Jansen, Erwin E.; Salomons, Gajja S.; Rouillet, Jean-Baptiste; Gibson, K. Michael (2017): In vitro modeling of experimental succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (SSADHD) using brain-derived neural stem cells. In: *PloS one* 12 (10), e0186919. DOI: 10.1371/journal.pone.0186919.
- Vogel, Kara R.; Ainslie, Garrett R.; Walters, Dana C.; McConnell, Alice; Dhamne, Sameer C.; Rotenberg, Alexander et al. (2018): Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, a disorder of GABA metabolism: an update on pharmacological and enzyme-replacement therapeutic strategies. In: *Journal of Inherited Metabolic Disease* 41 (4), S. 699–708. DOI: 10.1007/s10545-018-0153-8.
- Vogel, Kara R.; Pearl, Phillip L.; Theodore, William H.; McCarter, Robert C.; Jakobs, Cornelis; Gibson, K. Michael (2013): Thirty years beyond discovery--clinical trials in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, a disorder of GABA metabolism. In:

Journal of Inherited Metabolic Disease 36 (3), S. 401–410. DOI: 10.1007/s10545-012-9499-5.

Wadman, Renske I.; van der Pol, W. Ludo; Bosboom, Wendy Mj; Asselman, Fay-Lynn; van den Berg, Leonard H.; Iannaccone, Susan T.; Vrancken, Alexander Fje (2019): Drug treatment for spinal muscular atrophy type I. In: *The Cochrane database of systematic reviews* 12 (12), CD006281. DOI: 10.1002/14651858.CD006281.pub5.

Wang, Zhibin; Troilo, Philip J.; Griffiths, Thomas G.; Harper, Loral B.; Barnum, Amy B.; Pacchione, Stephen J. et al. (2022): Characterization of integration frequency and insertion sites of adenovirus DNA into mouse liver genomic DNA following intravenous injection. In: *Gene Ther* 29 (6), S. 322–332. DOI: 10.1038/s41434-021-00278-2.

Zhang, Guo-Fang; Sadhukhan, Sushabhan; Ibarra, Rafael A.; Lauden, Stephanie M.; Chuang, Chia-Ying; Sushailo, Sophia et al. (2012): Metabolism of γ -hydroxybutyrate in perfused rat livers. In: *The Biochemical journal* 444 (2), S. 333–341. DOI: 10.1042/BJ20112046.

Zymancyk, Alice-Miriam (2021): Therapieansätze für Nonsense-Mutationen bei Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase- Defizit.

12 Ehrenwörtliche Erklärung

„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, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. 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

Ich möchte mich an dieser Stelle bei der ganzen AG Tikkanen bedanken, dass sie mich bei der Arbeit an der Dissertation unterstützt haben. Sie haben mir nicht nur bei der Bewältigung dieser Aufgabe geholfen, sondern auch aufgezeigt, dass es berufliche und persönliche Perspektiven außerhalb des typischen klinischen Arbeitsalltags gibt.

Herzlichen Dank geht an meine Doktormutter Frau Prof. Dr. Ritva Tikkanen, die mir es ermöglichte an dem Überthema Getherapien zu arbeiten. Ihre kompetente, engagierte und herzliche Betreuung über die gesamte Dauer der Arbeit war von unschätzbarem Wert.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meiner Betreuerin Dr. Miroslava Didiasova. Ihre fachliche und emotionale Unterstützung sowie die enge und konstruktive Zusammenarbeit haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ihre ständige Bereitschaft, mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen, war eine wertvolle Hilfe in allen Phasen der Dissertation.

Insgesamt bin ich sehr froh, dass ich in der AG Tikkanen sein durfte.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei meiner Familie und besonders meinen Eltern bedanken, ohne die ich natürlich nicht dort wäre, wo ich heute bin. Danke Mama, dass du mich unterstützt. Danke Papa, dass du immer da warst.