

Auswirkungen der SSADH-Defizit-Mutationen auf die Oligomerisierung des SSADH-Enzyms

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Boettcher, Nadine
aus Bremen

Gießen 2022

Auswirkungen der SSADH-Defizit-Mutationen auf die Oligomerisierung des SSADH-Enzyms

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Boettcher, Nadine
aus Bremen

Gießen 2022

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

1. Gutachterin: Frau Prof. Dr. Ritva Tikkanen
2. Gutachterin: Frau Prof. Dr. Nolte

Tag der Disputation: 09.06.2022

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Stoffwechselstörungen	1
1.2. SSADH-Defizit	1
1.3. Phänotyp	2
1.4. Pathogenese	3
1.5. Diagnose	4
1.6. Enzymfunktion im GABA-Metabolismus	5
1.7. Enzymstruktur	7
1.8. ALDH5A1-Gen	9
1.9. Pathogene Varianten im <i>ALDH5A1</i>-Gen	9
1.10. Auswirkung von Mutationen auf Proteine	10
1.11. Therapieansätze für SSADH-Defizit	10
1.12. Ziel der Arbeit	12
2. Material und Methoden	13
2.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien	13
2.2. Chemikalien und Reagenzien	16
2.3. Lösungen und Puffer	19
2.4. SDS-Polyacrylamidgele	21
2.5. Verwendete Kits	21
2.6. Plasmide	22
2.7. Mutageneseprimer	22
2.8. Bakterienstämme	24
2.9. Humane Zelllinien	24
2.10. Antikörper	25
2.11. Molekularbiologische Methoden	25
2.11.1. Zielgerichtete Mutagenese	25
2.11.2. DNA-Fällung	26

2.11.3. Eliminierung der Matrizen-DNA durch Restriktionsverdau	27
2.11.4. Transformation.....	27
2.11.5. Mini-Plasmidpräparation	27
2.11.6. DNA-Konzentrationsmessung	28
2.11.7. Midi-Plasmidpräparation	28
2.11.8. Herstellen von Glycerolstocks	29
2.12. Zellbiologische Methoden	29
2.12.1. Kultivierung von HEK-KO-Zellen	29
2.12.2. Passagieren von HEK-KO-Zellen.....	29
2.12.3. Transiente Transfektion	30
2.12.4. Zellysatherstellung für anschließenden Western-Blot.....	30
2.12.5. Zellysatherstellung für Pulldown-Assay.....	31
2.12.6. Zellysatherstellung für Aktivitäts-Assay	31
2.12.7. Proteinbestimmung nach Bradford	31
2.12.8. Fluorimetrische Aktivitätsmessung	32
2.13. Biochemische Methoden	33
2.13.1. Pulldown mit Strep-Tactin® XT Beads.....	33
2.13.2. Polyacrylamid-Gel	34
2.13.3. Western-Blot.....	35
2.13.3.1. Transfer	35
2.13.3.2. Immundetektion	35
2.13.3.3. Strippen	36
2.14. Statistische Auswertung und Bildbearbeitung	36
2.14.1. Statistik	36
2.14.2. Elektrische Manipulation der Abbildungen.....	36
3. Ergebnisse	37
3.1. Klonierung der SSADH-Varianten in den Vektor pcDNA3 und pEXPR- IBA 103 mit Twin-Strep-tag®	37

3.2. Klonierung verschiedener pathogener SSADH-Varianten in den Vektor pcDNA3 mit anschließender Transfektion in HEK-KO Zellen.....	38
3.3. Klonierung verschiedener pathogener SSADH-Varianten in den Vektor pEXPR-IBA103 mit Twin-Strep-tag®	39
3.4. SSADH-Aktivität der pathogenen Varianten in pcDNA3 im Vergleich zum Wildtyp	41
3.5. Vergleich der Expression von SSADH in Wildtyp-Fibroblasten und Patienten-Fibroblasten	43
3.6. Untersuchung der Oligomerisierung der pathogenen Varianten mittels Pulldown	44
3.7. Pulldown-Assay der co-transfizierten Varianten mit und ohne Twin-Strep-tag®	48
4. Diskussion	51
4.1. Klonierung verschiedener pathogener SSADH-Varianten in den Vektor pcDNA3.....	51
4.2. Klonierung verschiedener pathogener SSADH-Varianten in den Vektor pEXPR-IBA 103 mit Twin-Strep-tag®	52
4.3. Methodische Diskussion	54
4.4. SSADH-Aktivität der pathogenen Varianten in pcDNA3 im Vergleich zum Wildtyp	54
4.5. Vergleich der Expression von SSADH in Wildtyp-Fibroblasten und Patienten-Fibroblasten	56
4.6. Pulldown-Assay der mit dem Wildtyp co-transfizierten Varianten	56
4.7. Pulldown-Assay der co-transfizierten Varianten.....	57
4.8. Bedeutung für die Therapie	58
4.9. Ausblick	60
5. Zusammenfassung.....	61
6. Summary.....	62
7. Abkürzungsverzeichnis.....	IX
8. Abbildungsverzeichnis	XII

9. Tabellenverzeichnis	XIII
10. Quellenverzeichnis	XIV
11. Internetquellen	XXI
12. Erklärung zur Dissertation	XXII
13. Danksagung.....	XXIII

1. Einleitung

1.1. Stoffwechselstörungen

Stoffwechselstörungen sind Erkrankungen, welche die Stoffwechselwege im Körper betreffen. Sie können die unterschiedlichsten Bereiche beeinflussen, wie z.B. den Fettstoffwechsel oder den Kohlenhydratstoffwechsel. Für jede Abfolge im Stoffwechsel sind bestimmte Enzyme notwendig, damit unsere Stoffwechselleistungen funktionieren. Stoffwechselstörungen lassen sich in „angeboren“ und „erworben“ unterteilen, wobei die angeborenen durch genetisch determinierte Enzymdefekte hervorgerufen werden. Die erworbenen Stoffwechselstörungen werden hingegen durch eine Fehlregulation bzw. durch ein Ungleichgewicht des Stoffwechsels oder durch verminderte Enzymfunktionalität verursacht, die wiederum durch exogene Einflüsse hervorgerufen werden, wie zum Beispiel der Diabetes mellitus Typ 2. Außerdem werden Stoffwechselerkrankungen auch nach dem Stoffwechselweg bzw. nach dem Zellkompartiment, in dem der Enzymdefekt vorliegt, eingeteilt (Finsterer & Frank, 2014). Der Mangel an dem Enzym Succinat-Semi-Aldehyd-Dehydrogenase gehört ebenfalls zu den Stoffwechselerkrankungen, und zwar zu den Erkrankungen des Gamma-Aminobuttersäure-Stoffwechsels. Zu dieser Gruppe der Erkrankungen gehören auch der GABA-Transaminase-Mangel, Homocarnosinose, GABA_{A1}-Rezeptor-Defekte (juvenile myoklonische Epilepsie), GABA_{B1}-Rezeptor-Defekte (Temporallappenepilepsie) und GABA_{G2}-Rezeptor-Defekte, auch Absence-Epilepsie genannt (Hoffmann & Grau, 2004).

1.2. SSADH-Defizit

Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Mangel (SSADH-Defizit) ist eine Erkrankung, die den Metabolismus des Neurotransmitters GABA betrifft (Akaboshi et al., 2003). Die autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselstörung ist auf einen Gendefekt (*ALDH5A1*-Gen) der Succinat-Semi-Aldehyd-Dehydrogenase zurückzuführen (Kim et al., 2011). Dieser erbliche Defekt verursacht eine Akkumulation von GABA und Succinat-Semialdehyd, wobei letzteres daraufhin zu γ -Hydroxy-Buttersäure (GHB) verstoffwechselt wird. Die Konsequenz ist eine deutlich erhöhte Konzentration von GHB, GABA und weiteren Metaboliten im zentralen Nervensystem, in peripheren Geweben und Körperflüssigkeiten der Patienten (Gordon, 2004). Die Patienten zeigen vor allem sprachliche und motorische Entwicklungsverzögerungen auf, sind häufig mental

zurückgeblieben und klagen über umfangreiche neurologische Symptome wie Ataxie und Epilepsie von unterschiedlich starker Ausprägung (Gibson et al., 2003; Pearl & Gibson et al., 2003).

Die Vielfältigkeit und Ausprägung der Symptome sowie die unterschiedlich starken klinischen Erscheinungsbilder von SSADH-Defizit erschweren die Diagnose der Erkrankung (Chambliss et al., 1998). Seit der ersten diagnostizierten Erkrankung im Jahre 1981 sind bisher etwa 450 Fälle dieser genetischen Erkrankung bekannt (Gibson K.M., 2001; Vogel et al., 2013). Damit zählt sie per Definition zu den seltenen Krankheiten. Betrachtet man jedoch lediglich die Erkrankungen des GABA-Metabolismus, zählt sie zu den häufigsten genetisch determinierten Störungen (Pearl et al., 2007).

1.3. Phänotyp

Durch die eingeschränkte Aktivität des mutierten SSADH-Enzyms wird der ursprüngliche Stoffwechselprozess von GABA gestört. Die beeinträchtigte Signalübertragung nimmt Einfluss auf das zentrale Nervensystem, welches zu einem klinischen Phänotyp mit zahlreichen neurologischen Symptomen führt (Gibson et al., 1998). Bereits im Säuglings- und Kleinkindalter treten erste Beeinträchtigungen in der Fortentwicklung und deutliche Defizite in der Sprache auf, wobei letztere aufgrund schlechter Hörwahrnehmung zustande kommen (Pearl et al., 2009; Pearl & Novotny et al., 2003; Philippe et al., 2004). Viele von den Betroffenen leiden unter psychischen Störungen wie Angstzuständen, Aggressionen, Halluzinationen, selbstverletzendes Verhalten, Zwangsstörungen und Verhaltensproblemen (Knerr et al., 2008; Pearl & Gibson, 2004). Aber auch Beeinträchtigungen wie Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS) und Autismus treten begleitend bei SSADH-Mangel auf (Pearl & Novotny et al., 2003).

Über 80 % der Patienten sind von Ataxie und Muskelhypotonie betroffen, wobei sich letzteres durch eine Überstreckungshaltung der Extremitäten zeigt. Weitere typische neurologische Symptome der Erkrankten sind Hypotonie und Hyporeflexie, aber auch EEG-Abnormalitäten und Nystagmen werden beschrieben (Cardinal & Bullmore, 2011; Pearl et al., 2009). Mehr als 50 % der Erkrankten leiden an Epilepsie, vor allem mit generalisierten, tonisch-klonischen Anfällen und Absence-Anfällen. Nur wenige sind von der Epilepsieform mit myoklonischen Anfällen betroffen (Pearl & Gospe, 2007). Oft sind SSADH-D-Patienten auch von Hyposomnie geplagt, die sich sowohl durch

außergewöhnliche Schläfrigkeit am Tag als auch durch Probleme beim Einschlafen oder durch unterbrochene Schlafphasen in der Nacht äußert (Pearl et al., 2009; Philippe et al., 2004).

Stoffwechselerkrankungen verlaufen häufig intermittierend und episodisch, während ein SSADH-Defizit diese Rhythmik hingegen nicht zeigt. Der Verlauf dieser Erkrankung ist einigermaßen statisch und nicht fortschreitend. Lediglich die epileptischen Anfälle zeigen eine zunehmende Progression (Pearl et al., 2005). Die Ausmaße der Symptome können bei jedem Betroffenen stark variieren, heterozygote Genträger zeigen jedoch keine Symptome. In Familien mit denselben pathogenen Varianten des defekten SSADH-Enzyms kann die Bandbreite und die Ausprägung der Symptome sich trotzdem stark unterscheiden (Didiášová et al., 2020; Gibson et al., 1997).

1.4. Pathogenese

SSADH spielt eine essenzielle Rolle im GABA-Metabolismus. Durch die massive Beeinträchtigung des Enzyms im Abbauweg akkumulieren sich GABA und GHB in den Körperflüssigkeiten der Patienten. In der weißen und grauen Hirnsubstanz der Patienten konnten erhöhte Werte von beiden Neuromodulatoren festgestellt werden (Ethofer et al., 2004). Vor allem ist GHB im Urin, im Plasma und im Liquor cerebrospinalis deutlich erhöht (Pearl & Gibson et al., 2003). Aber auch andere Metaboliten wie SSA, D-2-Hydroxyglutarsäure, 4,5-Dihydroxyhexansäure (DHHA), Homocarnosin und Guanodinobutyrat weisen abweichende Konzentrationen in den unterschiedlichen Körperflüssigkeiten auf (Übersicht in Didiášová et al., 2020; Gordon, 2004; Jansen et al., 2006). Ob einer der Metaboliten der Verursacher der komplexen Symptome ist oder ob diese auf fehlende Stoffwechselprodukte in darauffolgenden Zyklen zurückzuführen sind, ist bisher noch unklar (Niemi et al., 2014). Für die Theorie, dass einer der Metaboliten verantwortlich ist, könnte die hohe Konzentration von GHB im Körper der erkrankten Personen sprechen. So kann GHB nicht nur im Körper selbst durch den Abbau von GABA produziert werden, sondern kann dem Körper auch über synthetisch hergestellte Medikamente und Drogen zugeführt werden.

GHB wird in der Medizin als intravenöses Narkotikum benutzt und kam früher als Medikament unter anderem bei Patienten mit Narkolepsie und Alkoholentzug zum Einsatz (Craig et al., 2000). In der Drogenszene ist GHB hingegen unter dem Namen Liquid-Ecstasy bekannt, denn es hat sowohl sedative als auch euphorisierende

Wirkungen. Wird die Droge als Betäubungsmittel bei sexuellen Übergriffen eingesetzt, wird sie auch als „date rape drug“ bezeichnet (Trendelenburg & Ströhle, 2005). In unserem Körper bindet GHB sowohl im ZNS als auch im peripheren Nervensystem an eigene GHB-Rezeptoren, allerdings kann es auch an bestimmte GABA-Rezeptoren binden (Andriamampandry et al., 2003; Kaupmann et al., 2003). GABA wirkt dabei nur auf seine GABA_A-, GABA_B- und GABA_C-Rezeptoren (Übersicht in Tillakaratne et al., 1995). In Mäuseversuchen konnte festgestellt werden, dass die erhöhten GABA- und GHB-Werte eine Herunterregulation von GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren zur Folge haben und somit die Neurotransmission erheblich beeinflusst wird. Diese Beeinflussung der Neurotransmission könnte somit die hyper-GABAergen epileptischen Anfälle zur Folge haben, die bei SSADH-Patienten üblicherweise auftreten (Cortez et al., 2004).

Auch Prozesse, wie eine mitochondriale Dysfunktion, ein Redox-Ungleichgewicht und Autophagiedefekte, können diverse Zellfunktionen schädigen (Lakhani et al., 2014; Latini et al., 2007; Niemi et al., 2014). Sowohl in Mausmodellen als auch in in-vitro-Experimenten konnten für mitochondriale Dysfunktionen eine veränderte Signalübertragung über den mTOR-Weg und oxidativer Stress in Zusammenhang mit SSADH-D gebracht werden (Lakhani et al., 2014; Niemi et al., 2014). Die oxidativen Schäden zeigten sich unter anderem durch stark verminderte, nicht enzymatische, antioxidative Abwehrmechanismen sowie durch oxidative Schädigung der Lipide in Geweben wie der Leber (Latini et al., 2007). Der Neurotransmitter GABA ist zudem an der Regulierung von bestimmten autophagischen Mechanismen beteiligt. Durch die beeinträchtigte Funktion des lysosomalen Auf- und Abbaus von Zellorganellen kam es in murinen Modellen zur vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und oxidativem Stress (Lakhani et al., 2014).

1.5. Diagnose

Die Diagnose eines SSADH-Defizites wird mit einem Durchschnittsalter von 2 Jahren gestellt (Lapalme-Remis et al., 2015). Ein geringer Teil der Patienten erhält die Diagnose erst im Jugend- und Erwachsenenalter. Der wichtigste biochemische Parameter zur Diagnosestellung der Erkrankung ist der erhöhte Wert von GHB im Urin, welchen alle Patienten gleichermaßen aufweisen (Übersicht in Malaspina et al., 2016). Die Akkumulation von GHB ist auch im Plasma und im Liquor cerebrospinalis messbar. Hier übersteigt der GHB-Wert sogar das 30-Fache des Normalwerts. Im Liquor

cerebrospinalis ist ebenfalls eine erhöhte GABA-Konzentration messbar (Pearl & Gibson et al., 2003). Weitere Möglichkeiten zur Diagnose der Erkrankung können Magnetresonanztomographie-Befunde und die Elektroenzephalographie sein.

Bei einigen Patienten können spezifische neuroradiologische Veränderungen festgestellt werden. Sie zeigen Hyperintensitäten in den T2-gewichteten Sequenzen der MRT im Globus pallidus, im Nucleus subthalamicus sowie im Nucleus dentatus. Weitere Befunde zeigen zerebrale Atrophien, Kleinhirnatrophien sowie verzögerte Myelinisierung (Yalçinkaya et al., 2000; Ziyeh et al., 2002). Im EEG manifestieren sich bei einigen Betroffenen generalisierte Spike-Wellen. In der Magnetresonanzspektroskopie (MRS), welche ein spezielles Verfahren zur Konzentrationsbestimmung von Metaboliten in Geweben darstellt, konnten ebenfalls erhöhte Konzentrationen von GABA, GHB und anderen verwandten Verbindungen nachgewiesen werden. Die endgültige Diagnosestellung erfolgt durch eine Sequenzanalyse des *ALDH5A1*-Gens, wodurch die pathogenen Varianten identifiziert werden (Pearl et al., 2009; Phillip L Pearl et al., 2016).

1.6. Enzymfunktion im GABA-Metabolismus

Das Enzym SSADH spielt eine wesentliche Rolle im Katabolismus des Neurotransmitters Gamma-Aminobuttersäure, auch GABA genannt. GABA ist einer der wichtigsten Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (ZNS), der eine inhibitorische Wirkung an spezifischen GABA-Rezeptoren entfaltet. Ein Drittel aller Synapsen nutzen GABA zur neurophysiologischen Hemmung (Kim et al., 2011). Bei elektrophysiologischer Aktivierung wird GABA in den synaptischen Spalt freigesetzt und kann dort an seinen drei Rezeptoren eine entsprechende Wirkung erzielen. Nach Beendigung der Neurotransmission wird GABA aus dem synaptischen Spalt entfernt und in Astrozyten aufgenommen. GABA wird hierbei durch die GABA-Transaminase in SSA umgewandelt, indem eine Aminogruppe von GABA entfernt wird. Normalerweise wird SSA durch funktionierendes SSADH zu Succinat oxidiert und kann von dort als Substrat für den Citratzyklus dienen. Fehlt das Enzym SSADH, kann SSA nicht normal eliminiert werden und wird stattdessen durch eine Aldo-Keto-Reduktase in GHB umgewandelt, welches zu einem erhöhten GHB-Spiegel führt (Übersicht in Didiášová et al., 2020). Infolgedessen reichern sich auch die Metaboliten SSA und GABA an (Vogel et al., 2018). SSADH spielt somit eine wichtige Rolle, um das Substrat für den Citratzyklus zu produzieren. Dieser mitochondriale Vorgang ist im Gehirn besonders wichtig und

verbindet den Metabolismus des Neurotransmitters Glutamat mit GABA bis hin zur oxidativen Phosphorylierung und ATP-Erzeugung (Kim et al., 2011).

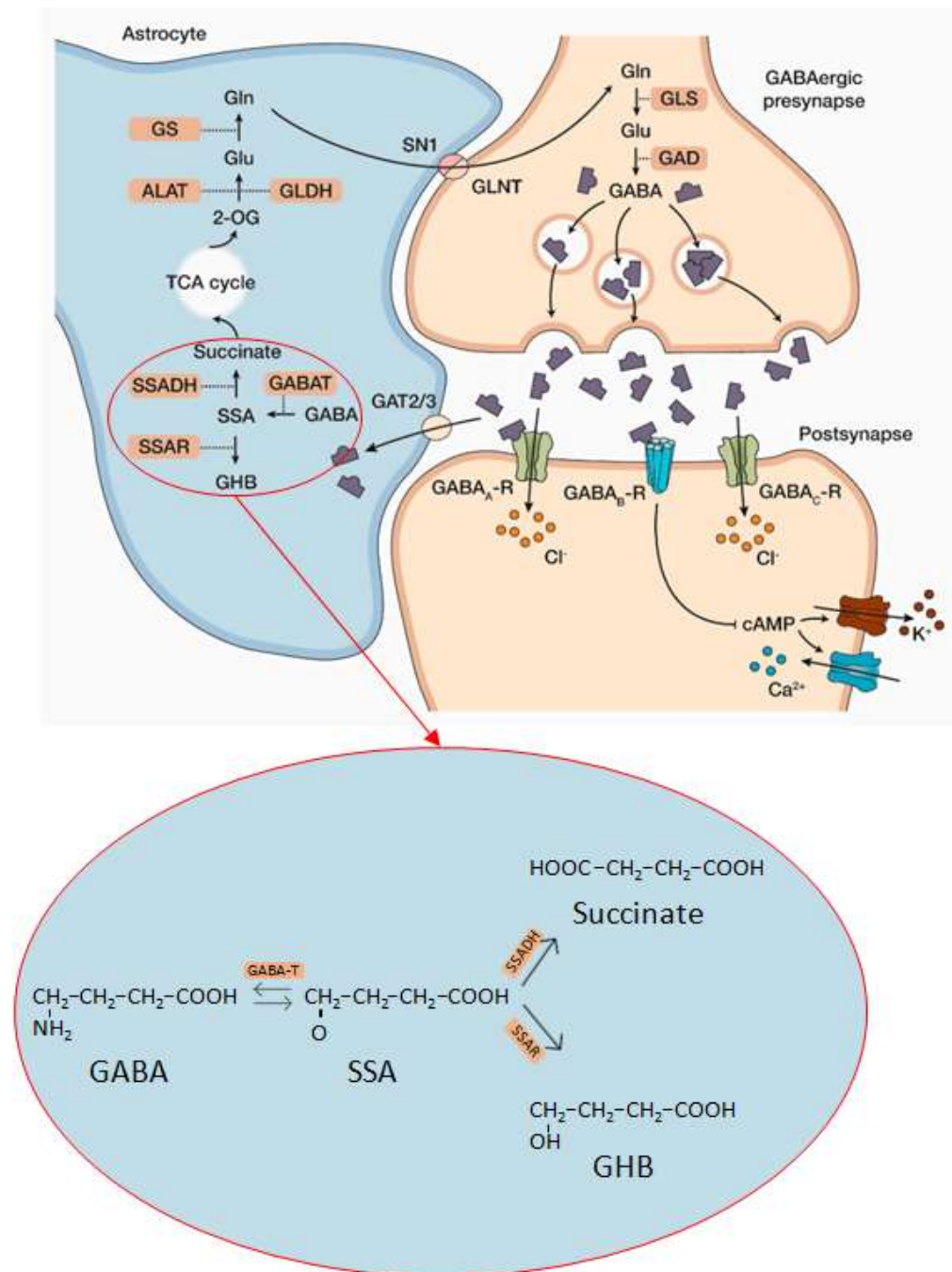


Abbildung 1: Überblick der GABAergen Synapse im synaptischen Spalt und der metabolischen Synapse, modifiziert nach Didiášová et al., 2020: Glutamat wird durch die Glutaminsäuredecarboxylase (GAD) mittels Decarboxylierung zu GABA umgewandelt und anschließend in Vesikeln verpackt. Kommt es zu einem Aktionspotenzial, wird GABA in den synaptischen Spalt freigesetzt und bindet an seine Rezeptoren. Das Entfernen von GABA aus dem synaptischen Spalt erfolgt über eine Aufnahme durch den GABA-Transporter 2/3 in die Astrozyten. Dort wird es durch die

GABA-Transaminase (GABA-T) in Succinat-Semialdehyd (SSA) umgewandelt. SSA wird daraufhin durch SSADH zu Succinat oxidiert. Succinat kann dann in den Citratzyklus eintreten. Das Produkt α -Ketoglutarat (2-OG) kommt aus dem Citratzyklus und wird daraufhin durch die Alanintransaminase (ALAT) und Glutamatdehydrogenase (GLDH) zu Glutamat umgewandelt. Infolgedessen wird Glutamin (GLN) durch Glutaminase (GS) synthetisiert. Durch die Glutamintransporter kann Glutamin wieder zu der präsynaptischen GABAergen Synapse zurückgebracht werden.

1.7. Enzymstruktur

SSADH ist ein mitochondriales Enzym, welches NAD^+ -abhängig Succinat-Semialdehyd irreversibel zu Succinat verstoffwechselt (Blasi et al., 2002). Es gehört zur Proteinfamilie der Aldehyddehydrogenasen (ALDH) und seine 3-dimensionale Struktur zeigt eine klare Homologie zu anderen bekannten Mitgliedern dieser Familie (Chambliss et al., 1995; Kim et al., 2009). Das Vorläuferpolypeptid von SSADH besteht aus 535 Aminosäuren und wird von den freien Ribosomen im Zytosol synthetisiert. Am N-terminalen Ende enthält es ein mitochondriales Signalpeptid mit 47 Aminosäuren (Jakobs et al., 1981). Diese Peptide besitzen eine amphipathische α -Helix, die auf einer Seite der Helix positiv geladene Aminosäurereste und auf der anderen Seite ungeladene, hydrophobe Reste aufweist (Brix et al., 1997). Diese Sequenz wird von spezifischen Transportkomplexen an der Mitochondrienmembran erkannt, woraufhin diese die Einbringung des Proteins veranlassen. Der Proteintransfer wird von 3 Proteinkomplexen vermittelt, wobei der TOM-Komplex (translocase of the outer membrane) Proteine über die Außenmembran hineintransportiert. Die anderen beiden TIM-Komplexe (translocase of the inner membrane) transportieren weiter über die innere Mitochondrienmembran (Jadiya & Tomar, 2020). SSADH als ein tetrameres Protein nimmt in der mitochondrialen Matrix seine endgültige Faltung vor. Dort bildet es Oligomere (Tetramere), welche die aktive Form des Enzyms darstellen (Chambliss et al., 1995; Kim et al., 2009).

Man kann die monomere Struktur von SSADH in 3 unterschiedliche Domänen einteilen: eine Oligomerisierungsdomäne (174–195 und 525–535), eine katalytische Domäne (308–508) und eine NAD -Bindungsdomäne (Reste 48–173, 196–307 und 509–524). Die katalytischen Domänen weisen überwiegend eine α -Helix- und eine β -Faltblatt-Struktur auf, genau wie die NAD^+ -bindende Domäne.

SSADH-Protein

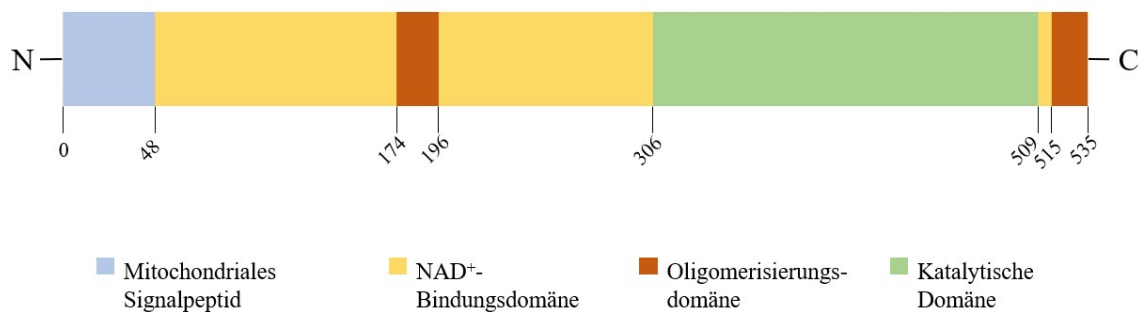


Abbildung 2: Proteinstruktur von SSADH, eigene Darstellung in Anlehnung an Didiášová et al., 2020: Übersicht der Proteinstruktur eingeteilt in Domänen.

Die Oligomerisierungsdomäne hingegen besitzt drei antiparallele β -Faltblatt-Strukturen. Die dreidimensionale Faltung von SSADH weist im Gegensatz zu anderen ALDH-Proteinfamilien einen Unterschied am aktiven Zentrum und am Substrateingang auf, welcher durch Disulfidbrücken zwischen zwei benachbarten Cysteinresten zustande kommt (Kim et al., 2009). Diese Disulfidbrücken sind wahrscheinlich auch für die hohe Substratspezifität von SSADH zu SSA verantwortlich, welches einen weiteren Unterschied zu anderen ALDH-Proteinen darstellt (Kim et al., 2009; Rothacker and Ilg, 2008). Diese hohe Substratspezifität gegenüber SSA wird vermutlich durch sogenannte Redox-Schalter am aktiven Zentrum des Enzyms verursacht. Dieser Redox-Switch-Mechanismus überträgt dabei Elektronen auf bestimmte Redoxgruppen. Bei der Enzymreaktion von SSADH wird SSA unter Verwendung des Co-Faktors NAD⁺ zu Succinylsäure umgesetzt. Ist das Enzym inaktiv, auch oxidiertes Zustand genannt, wird am aktiven Zentrum des Enzyms eine Disulfidbrücke zwischen Cys340 und Cys342 geschlossen. Diese Disulfidbrücke verhindert den Zugang für das Substrat und für den Co-Faktor. Diese Bindung wird gelöst, wenn die Umgebungsbedingungen reduzierend werden. Die Konformation des Enzyms wechselt in eine offene Form, welche daraufhin den Zugang für Substrat und Co-Faktor zum aktiven Zentrum gewährt. Somit könnte die Aktivität des Enzyms durch oxidativen Stress und Redoxzustände innerhalb der mitochondrialen Matrix beeinflusst werden (Kim et al., 2009).

1.8. ALDH5A1-Gen

Das Gen von *ALDH5A1*, welches für das Enzym Succinat-Semi-Aldehyd-Dehydrogenase codiert, hat eine Größe von 38 kB. Dabei weist die cDNA eine Länge von 1605 Basenpaaren auf. Es besteht aus 10 Exons und befindet sich auf dem Chromosom 6p22.3 (Wang et al., 2019).

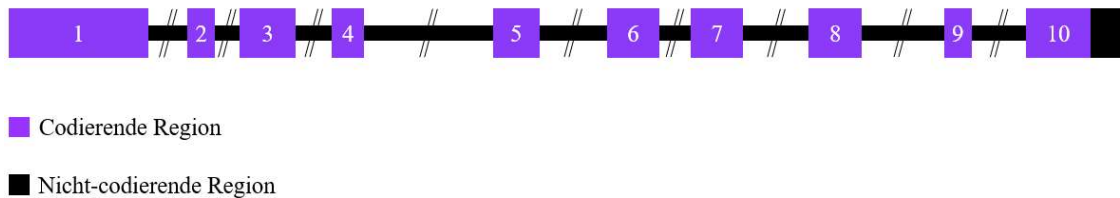


Abbildung 3: SSADH-Struktur mit Exons und Introns, eigene Darstellung in Anlehnung an Didiášová et al., 2020: Übersicht der codierenden und nicht-codierenden Bereiche.

1.9. Pathogene Varianten im *ALDH5A1*-Gen

Bis zum Jahre 2016 wurden im *ALDH5A1*-Gen 45 pathogene Mutationen beschrieben (Pearl et al., 2015). Aktuell sind über 70 verschiedene krankheitsverursachende Varianten bekannt (Pop et al., 2020). Diese Gen-Varianten basieren auf verschiedenen Mutationsformen, darunter die Missense-, Nonsense- und Splicing-Mutationen sowie Insertionen und Deletionen (Akaboshi et al., 2003). Die häufigste Mutationsform des *ALDH5A1*-Gens sind Punktmutationen, insbesondere die Missense-Mutation (Pop et al., 2020). Hierbei wird ein Nukleotid ausgetauscht, wodurch eine Veränderung des Codons und somit ein Aminosäureaustausch stattfindet. Die Auswirkung dieser Veränderung hängt von der Eigenschaft der ausgetauschten Aminosäure und der anschließenden Funktionalität des mutierten Proteins ab. Bei einer Nonsense-Mutation wird ein einzelnes Nukleotid ausgetauscht, wodurch ein Stoppcodon entsteht und die Translation verfrüht abgebrochen wird. Bei einer Deletion gehen einzelne Basen oder auch längere Basensequenzen verloren. Bei der Insertion hingegen werden ein oder mehrere Nukleotide einer DNA-Sequenz hinzugefügt (Übersicht in Mahdieh & Rabbani, 2013). Diese vererbaren Veränderungen konnten bei etwa 40 % der betroffenen Familien mit konsanguinen Verhältnissen der Eltern ausgemacht werden (Yalçinkaya et al., 2000). Neben den bekannten SSADH-Varianten wurden zudem SNPs (Single Nucleotide

Polymorphism), auch Einzelnukleotidpolymorphismus genannt, in der codierenden Region von SSADH nachgewiesen. SNP bezeichnet eine vererbare genetische Variation eines einzelnen Basenpaares in einem komplementären DNA-Doppelstrang, die mit einer Häufigkeit von mehr als einem Prozent in der Population auftaucht (Menduti et al., 2018). Die Auswirkungen der verschiedenen SNPs auf die Enzymfunktion und ihre Enzymaktivität ist bisher unbekannt. Allerdings wurde gezeigt, dass die nicht-pathogene Variante p.His180Tyr (SNP rs2760118) in Kombination mit einer anderen SSADH-Variante oder bei homozygotem Vorliegen der Variante p.His180Tyr auf den beiden homologen Allelen, die Enzymaktivität beeinflusst (Akaboshi et al., 2003).

1.10. Auswirkung von Mutationen auf Proteine

Ein essenzieller Erfolgsfaktor für die Funktionalität des Proteins ist seine Faltung. Um dieses zu erreichen, falten sich Proteine ausgehend von ihrer Primärstruktur zu einer dreidimensionalen Tertiär- bzw. Quartärstruktur zusammen. Dabei falten sich bestimmte Bereiche eines Proteins autonom zu Einheiten in Form von Domänen zusammen (Übersicht in Schaeffer & Daggett, 2011). Diese Tertiärstruktur wird dabei u.a. von Wasserstoff- und Disulfidbrücken und van-der-Waals-Wechselwirkungen stabilisiert. Die Eigenschaften der Aminosäuren haben dabei einen bedeutenden Einfluss auf die endgültige Faltung des Proteins, wobei die Aminosäureabfolge die Sekundärstruktur bestimmt (Huang et al., 2012). Fehlerhafte Proteine, welches z.B. durch eine Mutation in der Aminosäuresequenz ausgelöst wurde, werden in der Zelle als fehlerhaft erkannt und einem Abbauweg, dem Protein-Qualitätskontrollsystem, zugeführt. Es besteht aus dem Ubiquitin-Proteasom-System und molekularen Chaperonen (Kinjo & Takada, 2003). Störungen in dem Faltungsprozess können verheerende Folgen für die Funktion des Proteins bzw. Enzyms haben und daraufhin zu Krankheiten führen.

1.11. Therapieansätze für SSADH-Defizit

Gegenwärtig gibt es keine kurative Therapie für SSADH-D-Betroffene, um das dysfunktionale Enzym und die daraus resultierenden Folgen zu behandeln. Der bisherige Behandlungsansatz besteht aus individuellen, symptomgegebenen Behandlungen wie Logopädie, Ergo-, Physio- und auch Psychotherapien (Pearl et al., 2006). Pharmakologische Therapien wie Antiepileptika und Psychopharmaka gegen

Unaufmerksamkeit, Aggressivität und Angstzustände wurden ebenfalls erprobt (DiBacco et al., 2020; Gibson et al., 2003). Da viele Patienten an Epilepsien leiden, konnten Antikonvulsiva wie die Natriumkanalblocker Lamotrigin und Carbamazepin erfolgreich eingesetzt werden, verursachten bei einigen Patienten jedoch verschlimmerte Anfälle (Parviz et al., 2014). Ein weiteres Antiepileptikum, wie Vigabatrin, welches die GABA-Transaminase hemmt, zeigte uneinheitliche Ergebnisse mit starken Nebenwirkungen, wie Gesichtsfeldeinschränkungen (Gropman, 2003; Gross-Tsur et al., 2000). Das Anfallsmedikament Magnesiumvalproat, auch Valproinsäure genannt, kann bei bestimmten Fällen von refraktären Epilepsieformen angewandt werden, wobei es jedoch zur Reduktion der noch vorhandenen SSADH-Aktivität führt (Pearl et al., 2014). Ein GABA_B-Rezeptorantagonist, der in präklinischen Untersuchungen unter anderem zur Verringerung von Abwesenheitsanfällen führte, konnte in der klinischen Phase-II-Studie zu keiner Verbesserung der Symptome führen (Schreiber et al., 2021).

Ein wichtiger Grundstein für mögliche Therapien bei SSADH-Defizit könnte die Enzymersatztherapie darstellen. Bisher konnten diese Therapien bei anderen Stoffwechselerkrankungen, wie z.B. lysosomale Speicherkrankheiten, erfolgreich eingesetzt werden. Problematisch an dieser Therapieform für SSADH-D ist unter anderem die Lokalisation des Enzyms in den Zielzellen. Bisherige Erfolge wurden bislang nicht für mitochondriale Enzyme erzielt, wie es bei SSADH der Fall ist. Bisher konnte dieser Therapieansatz nur in einem Mäuseversuch gezeigt werden (Vogel et al., 2018). Auch wurden Therapieansätze, wie die Gentherapie, bereits 2004 an Mäusen durchgeführt. Gupta et al. benutzte für die Gentherapie ein Adenovirus, das intraperitoneal und retroorbital injiziert wurde. Sie konnten zeigen, dass die GHB-Konzentration für einige Zeit reduziert und die Überlebensrate der Mäuse verbessert werden konnte (Gupta et al., 2004). Heutzutage werden diese Adenoviren nicht mehr verwendet.

1.12. Ziel der Arbeit

Bisher konnten über 70 verschiedene pathogene Varianten im *ALDH5A1*-Gen nachgewiesen werden. Einige von diesen Varianten liegen im Oligomerisierungsbereich des Enzyms. Dieser Bereich ist verantwortlich für die korrekte Enzymfaltung und Oligomerisierung, die eine Voraussetzung für die fehlerfreie Funktion des Enzyms sind. In dieser Arbeit sollen die Auswirkungen der SSADH-Defizitmutationen in dem C-terminalen und mittleren Bereich des Enzyms auf die Oligomerisierung des Enzyms überprüft werden. Hierzu sollen die unterschiedlichen Varianten als Expressionskonstrukte produziert werden, bevor sie in SSADH-Knockout-Zellen exprimiert und funktionell untersucht werden. Es soll gezeigt werden, inwiefern die Enzymaktivität, Stabilität und Expression des SSADH-Enzyms durch die Mutationen beeinflusst werden. Die Tetramerisierung der mutierten Varianten soll mit einem Pulldown-Assay überprüft werden. Auch sollen Patientenfibroblasten mit entsprechenden Mutationen untersucht werden.

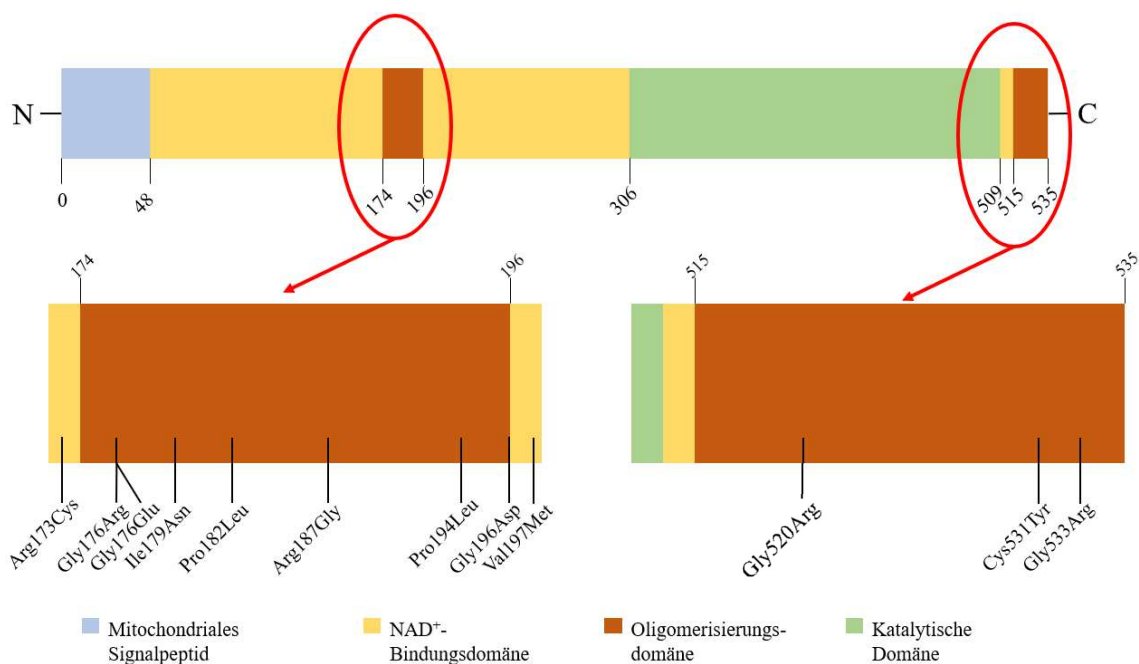


Abbildung 4: Proteinstruktur von SSADH mit den untersuchten Varianten, eigene Darstellung in Anlehnung an Didiášová et al., 2020: Übersicht der untersuchten Varianten in dem Oligomerisierungsbereich von SSADH

2. Material und Methoden

2.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verwendete Geräte, Verbrauchsmaterialien und Gefäße

Produktname	Hersteller
Agarose-Gelelektrophoresekammer	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
B & W Isoplate™-96 Well, schwarz-weiß	Saveen & Werner AB, Limhamn, Schweden
Bakterienschüttler, KS-15 Control	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, Deutschland
Cellstar® Plastikröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Deckgläschen, Durchmesser 15 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eiswürfelbereiter	Scotsman Ice, Mailand, Italien
Entwicklungsmaschine, Curix 60	AGFANV, Düsseldorf, Deutschland
Scanner Epson Perfection 3200 Photo, Modell 6860B	Seiko Epson Corp., Suwa, Nagano, Japan
Filmkassetten	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Filterpapier Protran BA 83	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Glaskolben	Schott AG, Mainz, Deutschland
Heizblock	Heinrich Haep HLC Haep Labor Consult, Bovenden, Deutschland
Inkubator, Sanyo	EWALD Innovationstechnik GmbH, München Deutschland
Laser-Scanning-Mikroskop Zeiss LSM710 Meta	Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland
Lichtmikroskop (AE 31)	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikrotestplatte 96 Well F	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Mikrotestplatte 96 Well F	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Multipipette, elektr., HandyStep®	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
NanoQuantplate™	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Österreich
Nitrozellulose-Transfermembran	Whatman, Dassel, Deutschland
Objektträger	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Opi-Platte™-96 Well, schwarz	PerkinElmer Inc., Zaventem, Belgien
Parafilm "M"®	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim von der Rhön, Deutschland
Pasteurpipetten, Glas	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
PCR System 2700	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
PCR-Gerät T personal Kombi	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Petrischale, Glas, 20 cm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pipetten, Biosphere® Filter tips Typ Gilson/ Eppendorf	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Pipetten, Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten, Filter tips	nerbe plus GmbH & Co. KG, Winsen, Deutschland
Pipettenspitzen ohne Filter	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Polystyrolküvetten, 10x4x45 mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße, 0,5; 1,5; 2 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Röntgenfilm, Super RX-N	FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland

Rotator	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Rundbodenröhrchen, 14 ml	FALCON, Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland
Schwenktisch, WS-10	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
SDS-Gel Gießkammer	Amersham Bioscience Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
SDS-PAGE Kammer	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
Spannungsquelle, Electrophoresispower supply, EPS 301	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
Spektralphotometer, BioPhotometer Plus	Eppendorf, Wesseling- Berzdorf, Deutschland
Sterilbank, Herasafe KS	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Tecan infinite M200	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Ultraschallgerät, Sonoplus	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Vortex V-1 Plus	Biosan SIA, Riga, Lettland
Vortex VELP	VELP Scientifica Srl, UsmateVenate, Italien
Waage Toledo, PB602-S	Mettler-Toledo Garvens GmbH, Gießen, Deutschland
Wasserbad, LAUDA	LAUDA DR. R. WOBSE GMBH & CO. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Western-Blotsystem, CriterionBlotter	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Zellkulturflasche T 25, Standard	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatte 6; 12; 24, 48, 96 Well, Standard F	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschale 100, Standard	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Zellkulturschale 60, Cell +	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zentrifuge J2-21	Beckman Coulter, Inc., Brea, USA
Zentrifuge, Micro 200 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, 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 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Produktbezeichnung	Hersteller
10x CutSmartpuffer	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland
10x PCR Puffer	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland
2x Lysis-Juice Renilla	PJK GmbH, Kleinblittersdorf, Deutschland
Acrylamid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bradford-Reagenz	BioRad, München, Deutschland
Bromphenolblau, Na-Salz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
BSA (Bovine Serum Albumine)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA

Cumarinsäure	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Diethyl-Pyrokarbonat (DEPC-H ₂ O)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium, high glucose	gibco®Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
DNA-Größenmarker	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland
dNTPs	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland
ECL-Lösung	eigene Herstellung
Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	gibco®Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Luminol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
MACSfectin™ Reagent	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland
Magnesiumsulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
N-Octylglucosid	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland
NAD ⁺	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NADH (Dinatriumsalz)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat (3M)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pansorbin-Cells	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Penicillin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PfuTurbo Polymerase	Agilent Technologies GmbH, Waldbronn, Deutschland
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Ponceau S	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Proteinmarker	BioRad Laboratories Inc, München, Deutschland
Salzsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Strep-Tactin [®] XT Beads	IBA GmbH, Göttingen, Deutschland
SuperSignal [®] West Femto	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
SuperSignal [®] West Pico	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland

Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris-Salzsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), 30 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.3. Lösungen und Puffer

Tabelle 3: Verwendete Lösungen und Puffer

Puffer/ Lösungen	Zusammensetzung
Blockierungspuffer	5 % Milchpulver TBST
Blottingpuffer (1x)	192 mM Glycin 25 mM Tris 10 % Methanol
TBST (Tris-buffered saline + Tween 20)	10 mM Tris-HCl (pH 7,4) 150 mM Natriumchlorid 0,05 % Tween 20
Lämmli-Gelelektrophorese-Laufpuffer	192 mM Glycin 25 mM Tris 0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS)
Lysepuffer	50 mM Tris pH 7,4 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1 % NP-40
CO-IP-Puffer	10 mM Tris 150 mM NaCl 5 mM EDTA

	0,5 % Triton
CO-IP-Lysepuffer	10 mM Tris 150 mM NaCl 5 mM EDTA 0,5 % Triton 60 mM N-Octylglucosid
ECL	8,5 mM Tris 250 mM Luminol 90 mM p-Cumarinsäure
DMEM ++	500 ml DMEM high glucose 10 % FCS 1 % Penicillin 1 % Streptomycin
Glycerol-Stock Puffer	65 % Glycerol 0,1 M Magnesiumsulfat 25 mM Tris-HCl, pH 8
LB-Agar	15 g Agar Pulver 1 l LB-Medium
Luria/ Miller Medium (LB-Medium)	20 g LB-Brühe 1 l destilliertes Wasser
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,4	150 mM Natriumchlorid 20 mM Natriumdihydrogenphosphat
Ponceau Färbelösung	5 % Essigsäure 1 % Ponceau S
Proteinladepuffer, 4x	0,1 % Bromphenolblau 100 mM DTT 10 % Glycerin 2 % SDS 50 mM Tris-HCl pH 6,8
SOC-Medium	40 mM Glukose LB-Medium
Stripping Puffer, alkalisch	0,1 M Natriumhydroxid
Stripping Puffer, sauer	0,2 M Glycin, pH 2,5

Transferpuffer, 1x	192 mM Glycin 10 % Methanol
Tris 0,1 M	0,1 M Tris, pH 8,4

2.4. SDS-Polyacrylamidgele

Tabelle 4: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

Gelart:	Zusammensetzung	Volumen (in ml)
Trenngel, 10 %, 1 mm	Acrylamid 30 %	13,4
	APS 10 %	0,4
	destilliertes Wasser	21
	SDS 20 %	0,2
	TEMED	0,064
	Tris pH 8,8 (3M)	5
	Sammelgel, 4 %, 1 mm	Tris pH 6,8 (3M)
Acrylamid 30 %		2,55
APS 10 %		0,075
destilliertes Wasser		11,7
SDS 20 %		0,075
TEMED		0,0225

2.5. Verwendete Kits

Tabelle 5: Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
NucleoBond® Xtra Midi EF	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland

2.6. Plasmide

Tabelle 6: Verwendete Plasmide

Konstrukt	Resistenz	Ursprung
pcDNA3	Ampicillin	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
pEXPR-IBA 103	Ampicillin	IBA GmbH, Göttingen, Deutschland

2.7. Mutageneseprimer

Die Sequenzen der verwendeten Primer wurden gemäß der Anwendung in Mutagenese-PCR des *ALDH5A1*-Gens entworfen und von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland synthetisiert. Vor der Mutagenese wurde das Gen in die Vektoren pcDNA3 (Brennstuhl et al., 2020) und pEXPR-IBA 103 kloniert.

Tabelle 7: Verwendete Mutagenese-Primer für die Vektoren pcDNA3 und pEXPR-IBA 103

Primer mit gezieltem Aminosäureaustausch	Primer Sequenz (5'-3')
hSSADH-Arg173Cys-fwd	CTGAGGAAGCCCGCTGTGTTTACGGAGAC
hSSADH-Arg173Cys-rev	GTCTCCGTAAACACAGCGGGCTTCCTCAG
hSSADH-Gly176Arg-fwd	GCCCGCCGTGTTTACAGAGACATTATCCACAC
hSSADH-Gly176Arg-rev	GTGTGGATAATGTCTCTGTAAACACGGCGGGC
hSSADH-Gly176Glu-fwd	GCCCGCCGTGTTTACGAAGACATTATCCACACC
hSSADH-Gly176Glu-rev	GGTGTGGATAATGTCTTCGTAAACACGGCGGGC
hSSADH-Ile179Asn-fwd	GTGTTTACGGAGACATTAACCACACCCCGGCA
hSSADH-Ile179Asn-rev	TGCCGGGGTGTAGTTAATGTCTCCGTAAACAC
hSSADH-His180Tyr-fwd	GTGTTTACGGAGACATTATCTACACCCCGGCAAAG
hSSADH-His180Tyr-rev	CTTTGCCGGGGTGTAGATAATGTCTCCGTAAACAC
hSSADH-Pro182Leu-fwd	ACATTATCCACACCCTGGCAAAGGACAGGCG

hSSADH-Pro182Leu-rev	CGCCTGTCCTTTGCCAGGGTGTGGATAATGT
hSSADH-Arg187Gly-fwd	GCAAAGGACAGGGGGGCCCTGGTCC
hSSADH-Arg187Gly-rev	GGACCAGGGCCCCCTGTCCTTTGC
hSSADH-Pro194Leu-fwd	GGTCCTCAAGCAGCTCATAGGCGTGGCTG
hSSADH-Pro194Leu-rev	CAGCCACGCCTATGAGCTGCTTGAGGACC
hSSADH-Gly196Asp-fwd	CAAGCAGCCCATAGACGTGGCTGCAGTCA
hSSADH-Gly196Asp-rev	TGACTGCAGCCACGTCTATGGGCTGCTTG
hSSADH-Val197Met-fwd	AGCAGCCCATAGGCATGGCTGCAGTCATC
hSSADH-Val197Met-rev	GATGACTGCAGCCATGCCTATGGGCTGCT
hSSADH-Gly520Arg-fwd	GCGAGAGGGGTCCAAGTATCGCATTGATGAGTA
hSSADH-Gly520Arg-rev	TACTCATCAATGCGATACTTGGACCCCTCTCGC
hSSADH-Cys531Tyr-fwd	GGAACTCAAGTATGTGTATTACGGGGGCTTGTAG
hSSADH-Cys531Tyr-rev	CTACAAGCCCCCGTAATACACATACTTGAGTTCC
hSSADH-Gly533Arg-Stop-fwd	CTCAAGTATGTGTGTTACAGGGGCTTGTAGCTCGA
hSSADH-Gly533Arg-Stop-rev	TCGAGCTACAAGCCCCTGTAACACACATACTTGAG

Tabelle 8: Verwendete Sequenzen zur Mutagenese des hSSADH-Gens innerhalb des Expressionsvektors pEXPR-IBA 103

Primer	Primer Sequenz (5'-3') Vektor pEXPR-IBA 103
hSSADH-Cys531Tyr-NONSTOP-fwd	GGAACTCAAGTATGTGTATTACGGGGGCTTGTCTC
hSSADH-Cys531Tyr-NONSTOP-rev	GAGCAAGCCCCCGTAATACACATACTTGAGTTCC
hSSADH-Gly533Arg-Stop-fwd	CTCAAGTATGTGTGTTACAGGGGCTTGTAGCTCGA

hSSADH-Gly533Arg-Stop- rev	TCGAGCTACAAGCCCCTGTAACACACATACTTGAG
hSSADH-Gly533Arg-Stop- fwd	CTCAAGTATGTGTGTTACAGGGGCTTGTAGCTCGA
hSSADH-Gly533Arg-Stop- rev	TCGAGCTACAAGCCCCTGTAACACACATACTTGAG

2.8. Bakterienstämme

Tabelle 9: Verwendete Bakterienstämme

Bezeichnung	Verwendung	Genotyp	Quelle
E. coli XL-1 blue	DNA- Amplifikation	F- Tn10 proA+B+ lacI Δ (lacZ)M15/recA Δ endA Δ gyrA96(NaI) thi hsdR17 (rK-mK+) supE44 reIA Δ lac	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland

2.9. Humane Zelllinien

Tabelle 10: Verwendete Zelllinien

Bezeichnung	Information	Quelle
HEK-KO 293T	HEK 293T ohne SSADH-Expression (mit CRISPR/CAS9 generiert)	von AG-Tikkanen zur Verfügung gestellt (Brennstuhl et al., 2020)
Fibroblasten: Wildtyp	Immortalisierte, humane Hautfibroblasten	(Mussche et al., 2013)
Fibroblasten Patient	Primäre Hautfibroblasten, Patient ist compound-heterozygot; c.1597G>A (G533R) und c.1015-2A>C (Spleißdefekt)	entnommen in Boston, USA; genehmigter Ethikantrag (Nummer 144/21), sowie Einverständnis der Eltern liegen vor

2.10. Antikörper

Tabelle 11: Verwendete Antikörper

Primärantikörper			
Bezeichnung	Wirt	Verdünnung	Hersteller
<i>ALDH5A1</i> (D-3), sc-390754	Maus	1:1.000	Santa-Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland
Anti-GAPDH Antikörper (6C5), ab 8245	Maus	1:10.000	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-SSADH ab129017	Kaninchen	1:10.000	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Strep-Tag® II Monoklonal Antikörper (71590-3)	Maus	1:1.000	Novagen®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Sekundärantikörper			
Bezeichnung	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Polyklonale Ziege Anti- Kaninchen Immunglobuline/ HRP	Ziege anti Kaninchen	1:10.000	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Polyklonale Ziege Anti- Maus Immunglobuline/ HRP	Ziege anti Maus	1:10.000	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

2.11. Molekularbiologische Methoden

2.11.1. Zielgerichtete Mutagenese

Für die zielgerichtete Mutagenese des humanen *ALDH5A1*-Gens wurden die Vektoren pcDNA3 (Brennstuhl et al., 2020) und pEXPR-IBA 103 verwendet. In deren Polyklonierungsstelle wurde das Gen mittels molekularbiologischer Methoden eingefügt. Das Plasmid pEXPR-IBA 103 wurde, wie das Plasmid pcDNA3 kloniert, es besitzt jedoch keinen STOP-Codon.

Tabelle 12: Pipettierschema des PCR-Ansatzes:

Komponente	Volume
DEPC-H ₂ O	30,5 µl
Plasmid-DNA	0,5 µl (500 ng)
10 x PCR-Puffer	5 µl
GC-Enhancer	10 µl
dNTPs	1 µl
PfuTurbo-Polymerase	1 µl
Primer-forward (10 µM)	1 µl
Primer-reverse (10 µM)	1 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Die Mutagenese PCR wurde mit folgendem Zyklusprotokoll durchgeführt:

Tabelle 13: Temperaturprogramm für die PCR-Reaktion

Zyklusschritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	
Vorinkubation	95°C	5	
Denaturierung	95°C	1	} 19 Zyklen
Hybridisierung	60°C	1	
Elongation	68°C	12	
Finale Elongation	68°C	7	
Termination	10°C	Pause	

2.11.2. DNA-Fällung

Das PCR-Produkt wurde mit 5 µl 3 M Natrium-Acetatlösung versetzt, gut durchmischt, 110 µl 100%iges, kaltes Ethanol hinzugegeben und für mindestens 30 min bei -20°C gefällt. Nach 10-minütiger Zentrifugation mit 25100 g bei 4°C, wurde der Überstand verworfen und 200 µl 70%iges Ethanol hinzugegeben und erneut für 5 min mit 25100 g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das entstandene Pellet an der Luft getrocknet und daraufhin in 22,5 µl DEPC-H₂O aufgenommen.

2.11.3. Eliminierung der Matrizen-DNA durch Restriktionsverdau

Um die methylierte Matrizen-DNA aus dem PCR-Ansatz zu entfernen, wurde ein DpnI-Verdau durchgeführt:

Tabelle 14: Pipettierschema des Restriktionsverdau

Komponente	Volumen
Probe aus PCR-Ansatz	22,5 µl
10x CutSmart-Puffer	2,5 µl
Restriktionsenzym DpnI (1U)	1 µl
Gesamtvolumen	26 µl

Der Ansatz wurde entsprechend zusammenpipettiert und 2 h bei 37°C inkubiert, danach 10 min bei 80°C inaktiviert.

2.11.4. Transformation

Die kompetenten *E. coli* XL-1 blue wurden für 10 min auf Eis aufgetaut. In vorgekühlte Eppendorfgläser wurde 100 µl *E. coli* XL-1 blue und 10 µl des Restriktionsansatzes zusammengegeben und für 30 min auf Eis kühl gestellt. Es folgte ein Hitzeschock für 90 s bei 45°C mit anschließender Abkühlung für 2 min auf Eis. Um die Bakterien ohne Selektionsdruck wachsen zu lassen und die Ausbildung der Antibiotikaresistenzen zu ermöglichen, wurden diese in 1 ml reinem LB-Medium bei 37°C und einer Drehzahl von 220 rpm für 45 min inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Eppendorfgläser mit einer Drehzahl von 2790 g für 30 s zentrifugiert und der Überstand auf 200 µl reduziert und wieder resuspendiert.

Die kompletten 200 µl wurden auf selektive LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.11.5. Mini-Plasmidpräparation

Von den LB-Agarplatten wurden jeweils 3 Einzelkolonien aufgenommen, in Rundbodenröhrchen mit 5 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) gegeben und über Nacht bei 37°C mit 220 rpm geschüttelt.

Um die Plasmid-DNA zu isolieren, wurde am nächsten Tag die Bakteriensuspension in 2-ml-Eppendorfgläser gefüllt und mit einer Drehzahl von 25100 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und zum entstandenen Pellet wieder 2 ml der

Bakteriensuspension zugegeben. Daraufhin wurde nochmals wie zuvor angegeben zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die übriggebliebene Kultur wurde gut verschlossen bei 4°C gelagert.

Mit dem entstandenen Pellet wurde die Plasmidpräparation mit dem Kit NucleoSpin® Plasmid nach Herstellerangaben durchgeführt. Im Anschluss wurde die Konzentration der DNA, wie in Punkt 2.11.6 beschrieben, ermittelt. Die Proben wurden auf 80 ng/µl DNA verdünnt. Um den Mutagenese-Erfolg nachzuweisen, wurden die Proben extern mittels Sanger-Sequencing sequenziert (Microsynth Seqlab GmbH, Göttingen, Deutschland).

2.11.6. DNA-Konzentrationsmessung

Die DNA-Konzentrationsbestimmung wurde spektrophotometrisch auf der TECAN NanoQuantplate™ durchgeführt. Zur Messung des Nullabgleichs wurden 3 µl des jeweiligen Elutionspuffers verwendet und anschließend auf gereinigter Messplatte die Extinktion der DNA-Proben bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen.

2.11.7. Midi-Plasmidpräparation

Aus den korrekten mutationstragenden Kulturen wurden 100 µl entnommen und in Rundbodenröhrchen mit 5 ml LB-Medium, welches Ampicillin (100 µg/ml) enthält, gegeben und über Nacht bei 37°C mit 220 rpm geschüttelt. Aus diesen Vorkulturen wurden 900 µl entnommen und in einen 1000-ml-Erlenmeyer-Kulturkolben mit 200 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) gegeben. Über Nacht inkubierten die Kolben bei 37°C und 220 rpm. Am darauffolgenden Tag wurde die Plasmid-Isolierung mit dem Kit NucleoBondXtra Midi EF nach Herstellerangaben bis zum Elutionsschritt durchgeführt. Nach der Elution mit 5 ml Puffer ELU-EF wurden 3,5 ml Isopropanol zum Probenröhrchen hinzugegeben, gevortext und mit einer Drehzahl von 25100 g für 15 min bei 10°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet in 1 ml TE resuspendiert und anschließend über Nacht im Kühlschrank weiter gelöst. Am nächsten Tag wurden 100 µl 3 M Natriumacetat hinzugegeben und das gesamte Volumen in 2-ml-Eppendorfgefäße überführt, 700 µl Isopropanol hinzugefügt und für 15 min im Rotator gedreht. Anschließend wurde die ausgefallene DNA mit 25100 g bei 10°C für 12 min zentrifugiert, die Flüssigkeit abgenommen und das DNA-Pellet mit 3 x 500 µl eiskaltem 80%igem Ethanol gewaschen und für 15 min an der Luft getrocknet. Das Pellet

wurde in 100 µl TE-Puffer gelöst, und die anschließende Konzentrationsbestimmung der DNA wie in Punkt 2.11.6 beschrieben, durchgeführt.

2.11.8. Herstellen von Glycerolstocks

Aus den Vorkulturen der passenden Klone wurden zur Lagerung und Konservierung Glycerolstocks hergestellt. In Rundbodenröhrchen mit 3 ml LB-Medium, welches Ampicillin (100 µg/ml) enthält, wurde 50 µl der Vorkultur gegeben. Diese wurden über Nacht mit 220 rpm bei 37°C im Schüttler inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 800 µl der Kultur mit 800 µl Glycerollösung in Kryoröhrchen gefüllt und diese bei -80°C eingefroren.

2.12. Zellbiologische Methoden

2.12.1. Kultivierung von HEK-KO-Zellen

Die HEK-KO-Zellen, in denen das Gen *ALDH5A1* ausgeknockt wurde, wurden im Inkubator bei 37°C, 8 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Für die Kultivierung wurden T25-Zellkulturflaschen und 5 ml DMEM++ mit 10 % FCS, 1 % Penicillin und 1 % Streptomycin verwendet.

Die Konfluenz der Zellkultur wurde mittels Lichtmikroskop täglich geprüft. Bei ausreichender Konfluenz von 80 % wurden die Zellen geerntet und verdünnt ausgesät. Jeden 3. Tag wurden die Zellen passagiert.

2.12.2. Passagieren von HEK-KO-Zellen

Um die HEK-KO-Zellen zu passagieren, wurde das komplette Medium abgesaugt und im Anschluss ein Waschschrift mit 1 ml PBS durchgeführt. Im zweiten Schritt wurde 1 ml PBS + EDTA für 90 s auf die Zellen gegeben. Um die Zellen vom Zellflaschenboden zu lösen, wurden 0,5 ml Trypsinlösung hinzugegeben. Hierbei spalten die enthaltenen Peptidasen die Zell-Matrix-Kontakte. Um diesen Vorgang zu unterbinden, wurde nach ca. einminütiger Einwirkzeit 1 ml DMEM++ hinzugegeben und die Zellen in der Trypsin-Medium-Lösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für weitere Zellkulturaussaaten und zur Zellkulturerhaltung verwendet.

2.12.3. Transiente Transfektion

Tabelle 15: Transfektionsschema

Versuche	Konstrukt pcDNA3	Konstrukt pEXPR-IBA 103
Expression ohne Tag	0,5 µg Mut-DNA	
Expression Tag-Konstrukte		0,5 µg Mut-DNA
Pulldown-Assay WT nicht-getaggt und Tag-Mutante	0,2 µg WT-DNA	0,3 µg Mut-DNA
Pulldown-Assay Mutante nicht-getaggt und Tag-Mutante	0,25 µg Mut-DNA	0,25 µg Mut-DNA

Die Transfektion erfolgte mittels Lipofektion mit dem Transfektionsreagenz MACSfectin.

Am ersten Tag wurden die HEK-KO-Zellen in 12-Well-Platten in passender Dichte ausgesät und mit 1 ml temperiertem DMEM++ versetzt, um am darauffolgenden Tag eine ideale Transfektionskonfluenz von 80 % zu gewährleisten. Am nächsten Tag wurde 30 min vor der Transfektion ein Mediumwechsel vorgenommen. Für die Transfektion wurde in 2 sterile Eppendorfgefäße jeweils 100 µl DMEM vorgelegt. In dem einen Ansatz wurde die Plasmid-DNA, wie in Tabelle 10 angegeben, pipettiert, während der andere Ansatz mit 2 µl MACSfectin versetzt wurde (Verhältnis von DNA zu MACSfectin-Reagenz 1:4). Nach einer kurzen Inkubation wurde der MACSfectin-Ansatz aufgenommen und mit dem Plasmidansatz vereint. Nach 20-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde das komplette Transfektionsgemisch unter kreisenden Bewegungen vorsichtig in je ein Well pipettiert. Nach einer Inkubation von 24 h bei 37°C im Inkubator wurden die Zellen auf 6-cm-Schalen umgesetzt und ein Mediumwechsel vorgenommen.

2.12.4. Zellysatherstellung für anschließenden Western-Blot

Die Zellen wurden bei ausreichender Konfluenz von 80 % unter Kühlung geerntet. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 1 ml PBS gewaschen und darauffolgend mit einem

Zellschaber und 2 ml PBS von der Zellkulturschale gelöst, in ein Eppendorfggefäß überführt und bei 2790 g für 3 min bei 4°C abzentrifugiert.

Das entstandene Zellpellet wurde auf Eis mit einer entsprechenden Menge (ca. 500 µl) an Lysepuffer, der einen Protease-Inhibitor-Cocktail (Verdünnung des Stocks 1:100) enthält, versetzt und für 30 min unter ständigem Vortexen lysiert. Nach dem Lysevorgang erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 25100 g für 10 min bei 4°C. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfggefäß überführt. Das fertige Lysat stand für anschließende Western-Blot-Versuche zur Verfügung.

2.12.5. Zellysatherstellung für Pulldown-Assay

Die Zellernte der Co-Transfektionen fand, wie in Punkt 2.12.4 beschrieben, statt.

Das entstandene Zellpellet wurde mit 2 ml CO-IP-Lysepuffer, der 2 µl Protease-Inhibitor-Cocktail enthielt, versetzt und für 30 min unter ständigem Vortexen lysiert. Nach dem Lysevorgang erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 25100 g für 12 min bei 4°C. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfggefäß überführt. Das fertige Lysat konnte direkt für das Pulldown-Assay eingesetzt werden.

2.12.6. Zellysatherstellung für Aktivitäts-Assay

Wie auch in Punkt 2.12.4 beschrieben, fand die Zellernte bei ausreichender Konfluenz auf Eis statt. Die Zellen wurden mit 80 µl 1x Lysis-Juice versehen und für 20 min schwenkend inkubiert. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen geerntet und in Eppendorfggefäße überführt. Nach dem Lysevorgang erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 25100 g für 10 min bei 4°C. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfggefäß überführt. Das fertige Lysat wurde für mindestens 24 h bei -20°C eingefroren. Danach konnte es direkt für die Aktivitätsmessung verwendet werden.

2.12.7. Proteinbestimmung nach Bradford

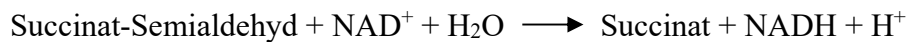
Um den Proteingehalt der gewonnenen Lysate zu ermitteln, wurde die Proteinbestimmung nach Bradford am Spektralphotometer mit Einmalküvetten bei einer Wellenlänge von 595 nm durchgeführt. Hierzu wurden in Eppendorfggefäße 1 ml der fertigen Bradford-Reagenz (1:5) mit 4 µl des Zellysates vermischt und gemessen. Die Standardreihe wurde mit BSA ermittelt und im Photometer gespeichert. Es wurde eine Standardreihe von 0 - 0,3 mg/ml BSA zur Messung genutzt. Die Messung des

Nullabgleichs erfolgte ebenfalls mit 1 ml Bradford-Reagenz (1:5) und 4 μ l des entsprechenden Lysepuffers.

2.12.8. Fluorimetrische Aktivitätsmessung

Zur Aktivitätsmessung wurden die Zellen wie in Punkt 2.12.5 geerntet und lysiert.

Die Messung beruht auf dem Umsatz des Cofaktors NAD^+ zu NADH bei folgender Reaktion:



Da nur NADH fluoreszierend ist, wird die veränderte Absorption gemessen, die durch die Oxidation des Substrats durch die Succinat-Semi-Aldehyd-Dehydrogenase hervorgerufen wird. Die Messung von NADH entspricht dabei der Messung des Produktes, da die Reaktion äquimolar abläuft. Bei dieser Gleichgewichtsreaktion kann dieser ablaufende Prozess zur Konzentrationsbestimmung sowohl für die Substrate als auch für die Produkte erfolgen.

Die Messung wurde in Duplikaten in einer schwarzen 96-Well-Platte im Mikrotiterplatten-Reader durchgeführt.

Die Standardreihe der NADH-Konzentration von 0 mM, 0,1 mM, 0,3 mM, 1 mM, 1,5 mM und 3 mM wurde in 0,1 M Tris pH 8,4 angesetzt. Zunächst wurden in die Wells 10 μ l der Standardreihe pipettiert und danach erfolgte die Bestückung der Wells mit 10 μ l der Lysate.

Nach dem Starten der Messung wurden vom Mikrotiterplatten-Reader automatisch 90 μ l des Substratgemisches, bestehend aus 2 mM SSA, 0,1 M NAD^+ , 0,1 M Tris pH 8,4, hinzugegeben. Die ablaufende Reaktion wurde dann über 45 min jede Minute mit einer Exzitation von 355 nm und einer Emission von 470 nm, welches der Fluoreszenz von NADH entspricht, gemessen und aufgezeichnet.

Die Berechnung der Aktivitäten erfolgte anhand der NADH-Standardreihe, wobei auf die Einheit U/mg umgerechnet wurde.

$$1 \text{ U} = 1000 \text{ nmol/min}$$

$$\Delta F = \text{Fluoreszenz/NADH nmol}$$

Im Anschluss wurde die SSADH-Aktivität in $\Delta F/\text{min}$ pro μg Gesamtprotein berechnet und zur Aktivität der Wildtyp-Variante normalisiert.

Dabei erfolgte die Berechnung der Aktivitäten anhand der NADH-Standardreihe, wobei auf die Einheit U/mg umgerechnet wurde.

2.13. Biochemische Methoden

2.13.1. Pulldown mit Strep-Tactin® XT Beads

Ein Pulldown-Assay ist eine Methode, um Interaktionen zweier Makromoleküle nachzuweisen. Beim Pulldown wird jedoch kein Antikörper genutzt, wie es bei der Immunpräzipitation der Fall ist. Beim Pulldown erfolgt die Bindung des Strep-Tag's an immobilisiertem Streptavidin (Streptactin) an Beads. Dabei bindet das mit dem Twin-Strep-tag® exprimierte rekombinante Zielprotein an immobilisiertem Streptavidin, während es mit seinem Bindungspartner interagiert. Die Analyse der Interaktionspartner erfolgt im Western-Blot.

Der Vektor pEXPR-IBA 103 beinhaltet hinter der Gensequenz des hSSADH-Gens eine Sequenz, die für ein Peptid codiert, das sogenannte Twin-Strep-tag®. Dieses ist C-terminal am rekombinanten Protein fusioniert und besteht aus zwei aufeinanderfolgenden Aminosäureabfolgen aus Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys, die durch eine bestimmte Glycin-Serin-Abfolge (Spacer) getrennt sind.

Durch die sehr hohe Affinität des Strep-Tags zum Strep-Tactin macht es einen Nachweis und eine Reinigung von Proteinen durch Affinitätschromatographie möglich. Bei milden Bedingungen bleiben Protein-Protein-Interaktionen bestehen und Interaktionspartner des Zielproteins können somit aufgereinigt werden. Damit dient der Pulldown mit dem Strep-Tactin® XT Beads zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen.

Der erste Schritt des Verfahrens bestand aus der Waschung des Pansorbins. Dieser Waschschrift ist notwendig, damit die unspezifische Adsorption von Fremdmaterial verhindert wird. Pansorbin besteht aus Formalin-fixierten Staphylococcus aureus Zellen, welche vorher gewaschen wurden. Hierzu wurden 300 µl Pansorbin pro Probe entnommen, bei 1700 g zentrifugiert und das Pansorbin-Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Das saubere Pansorbin-Pellet wurde in jeweils 150 µl CO-IP-Puffer gelöst. Für die Entfernung von unspezifisch bindendem Material wurden 500 µl des Lysates mit 50 µl des gewaschenen Pansorbins versetzt und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt von 2 min bei 25100 g. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Es folgten zwei weitere Inkubationsschritte mit Pansorbin nach dem gleichen Verfahren. Beim

letzten Schritt wurde das Pansorbin 10 min abzentrifugiert, um keinerlei Rückstände des Pansorbins in dem Lysat vorzufinden.

30 µl des gewaschenen Lysates wurden als Gel-Probe abgenommen, mit 10 µl 4x Proteinladepuffer versetzt, für 4 min bei 94°C aufgeköcht und anschließend eingefroren. Für den eigentlichen Pulldown wurden pro Probe 30 µl der magnetischen Strep-Tactin® XT Beads mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl CO-IP-Puffer mit 1 % BSA versehen. Zum gewaschenen Lysat wurden daraufhin die 100 µl magnetischen Strep-Tactin® XT Beads gegeben und über Nacht bei 4°C im Rotator präzipitiert. Am nächsten Tag wurden die Proben viermal mit jeweils 1 ml CO-IP-Puffer gewaschen und nach jedem Waschgang gevortext. Am Schluss wurden die Proben, ohne jeglichen Flüssigkeitsrückstand, mit 35 µl 2x Proteinladepuffer versehen und für 4 min bei 94°C aufgeköcht.

Nach diesem Schritt waren die Proben für die anschließende SDS-Gelelektrophorese bereit. Hierzu wurden die Proben in einen Magnetständer gestellt und ohne die magnetischen Strep-Tactin® XT Beads auf das SDS-Gel geladen. Die Kontrolllysate vom Vortag wurden auf ein separates Gel pipettiert.

2.13.2. Polyacrylamid-Gel

Vor dem Western-Blot wurde das Zellysate mit seinen enthaltenen Proteinen mittels Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. SDS als negatives Tensid schirmt die Eigenladung des Proteins ab, sodass die gleiche negative Ladungsdichte pro Protein vorherrscht. Damit ist die Wanderung nur noch von der Masse abhängig.

Für die Gelelektrophorese wurde ein 1 mm dickes Polyacrylamid-Gel, wie in Punkt 2.4. in Tabelle 4 aufgeführt, angefertigt. Es wurde ein 10%iges Trenn- und ein 4%iges Sammelgel mit einem Taschenvolumen von 30 µl angefertigt.

Hierzu wurden Acrylamid, SDS, destilliertes Wasser und 3 M Tris zusammengegeben und vermischt. Zur Polymerisation kamen entsprechend APS und TEMED hinzu.

Die Lysate wurden mit destilliertem Wasser auf gleiche Proteinkonzentrationen (3 µg Gesamtprotein) angeglichen, mit 4x Proteinladepuffer versehen und für 5 min bei 94°C erhitzt. Zusätzlich wurde 2,5 µl des Proteinmarkers Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Color Standard in eine Gel-Tasche geladen, um später die Größe der Proteine verifizieren zu können.

Die Auftrennung erfolgte im Lämmli-Puffer bei 20 mA pro Gel für mindestens 1,5 h. Die Laufzeit wurde 1 cm vor Ende des Gels beendet.

2.13.3. Western-Blot

2.13.3.1. Transfer

Der Transfer fand in einer Blot-Kammer mit 1x Blottingpuffer statt. Hierzu wurde eine Blot-Wanne mit Blottingpuffer befüllt und mit dazugehöriger Haltevorrichtung bestückt. In diese wurde das geschnittene Polyacrylamidgel mit einer Nitrozellulosemembran blasenfrei versehen und zu jeder Seite mit einem Filterpapier und einem Schwamm fixiert. Die Halterung wurde fest verschlossen, dann in die Blot-Kammer gestellt und mit Blottingpuffer aufgefüllt. Um das benötigte elektrische Feld zu erzeugen, wurde die Blot-Kammer für 1,5 h bei 400 mA an die Elektrophorese-Apparatur angeschlossen. Die aufgetrennten Proteine von dem Polyacrylamidgel wurden bei diesem Prozess auf die aufgelegte Nitrozellulosemembran übertragen.

Im Anschluss wurde für 1 min eine Kontrollfärbung mit dem roten Farbstoff Ponceau S vorgenommen, um den erfolgten Proteintransfer sichtbar zu machen und eventuelle Mängel zu erkennen. Im Anschluss wurde die Membran in einem Waschschrift mit 1x TBST entfärbt.

2.13.3.2. Immundetektion

Um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern, wurde die Membran unter kontinuierlicher Schwenkbewegung für 30 min in 5%iges Milchpulver mit 1x TBST gelegt. Nach einem Waschschrift mit 1x TBST wurde der spezifische, primäre Antikörper hinzugegeben, um über Nacht bei 4°C im Kühlschrank einzuwirken.

Am darauffolgenden Tag erfolgten 3 Waschschriffe mit 1x TBST für jeweils 10 min, und danach eine einstündige Inkubation unter ständigem Schwenken bei Raumtemperatur mit passendem Sekundär-Antikörper, der mit Meerrettichperoxidase gekoppelt war. Im Anschluss wurde die Membran erneut in 3 Waschschriften für je 10 min mit 1x TBST gewaschen und danach getrocknet.

Die Membran wurde auf eine Haftfolie gegeben und mit ECL-Lösung oder Super Signal® West Femto/Pico in angegebener Konzentration für 3 min gleichmäßig überschichtet.

Darauffolgend wurde die Membran getrocknet, in Haftfolie eingeschlagen und in einer Röntgenkassette fixiert. In der Dunkelkammer wurden die Röntgenfilme mit einer

Auflagezeit von 10 s, 30 s, 90 s und 5 min auf der Membran belassen und im Anschluss entwickelt.

2.13.3.3.Strippen

Um Nitrozellulosemembranen mit deren Proteinen mehrfach detektieren zu können, musste der bereits gebundene Antikörper wieder entfernt werden. Beim sogenannten Strippen wurde die Membran für 5 min in 0,1 M NaOH eingelegt und danach gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen. Danach erfolgte ein 5-minütiger Waschvorgang mit 1x TBST. Damit unspezifische Antikörperbindungen vermieden werden konnten, musste im Anschluss eine 30-minütige Inkubation mit 5%igem Milchpulver in 1x TBST erfolgen. Benötigte der neue Primär-Antikörper denselben sekundären Antikörper wie zuvor, wurde zuerst für 10 min mit einer 0,2 M Glycinlösung sauer gestrippt und im Anschluss, wie bereits beschrieben, alkalisch gestrippt, um eine vollständige Entfernung von Antikörpern zu erreichen.

2.14. Statistische Auswertung und Bildbearbeitung

2.14.1. Statistik

Alle aufgeführten Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. Die statische Analyse wurde mit der GraphPadPrism® 8.4.2 Software (Kalifornien, Vereinigte Staaten) durchgeführt. Zur Auswertung wurde die One-way-Varianzanalyse (ANOVA) angewendet. Die angegebenen p-Werte gelten als signifikant: *p <0,05, **p <0,01 und ***p < 0,001. 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 (Washington, Vereinigte Staaten) durchgeführt worden.

2.14.2. Elektrische Manipulation der Abbildungen

Alle gezeigten Abbildungen wurden nur durch Kontrast- oder Helligkeitseinstellungen angepasst. Sonstige Manipulationen wurden nicht durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Klonierung der SSADH-Varianten in den Vektor pcDNA3 und pEXPR-IBA 103 mit Twin-Strep-tag®

Seit der Entdeckung des SSADH-Defizits sind bis heute 40 Jahre vergangen. Bisher gibt es für diese genetische Stoffwechselstörung keine kurative Therapie. Deshalb ist es wichtig, mehr biochemische und genetische Kenntnisse eines SSADH-Mangels zu erlangen, um die Krankheit mit ihrem Pathomechanismus besser verstehen zu können. In der vorliegenden Arbeit werden potenziell pathogene SSADH-Varianten untersucht, welche in spezifischen funktionellen Regionen des Enzyms vorkommen. Dabei wurden insbesondere die Effekte auf die Proteinexpression und Aktivität betrachtet.

Damit die Expression des Enzyms untersucht werden kann, werden Zellen benötigt, die kein SSADH produzieren. Solche Zellen werden auch Knock-out-Zellen genannt. Dafür wurden bereits in der Arbeitsgruppe von Prof. Tikkanen SSADH-Knock-out-Zellen generiert, indem das SSADH-codierende *ALDH5A1*-Gen zuvor in den HEK 293T-Zellen mittels CRISPR/Cas9 ausgeknockt wurde, sodass die entsprechenden Zellen kein SSADH mehr produzieren können (Brennenstuhl et al., 2020). Damit war die Grundlage für die Untersuchung der Auswirkung der SSADH-Varianten gegeben.

Das SSADH-Enzym besitzt 2 Oligomerisierungsdomänen zwischen den Aminosäuren 174-195 und 525-535 (Kim et al., 2009). Die hier untersuchten Varianten sind in den beiden Bereichen lokalisiert, welche für die Oligomerisierungsfähigkeit des Enzyms verantwortlich sind. Um die molekularen Auswirkungen einzelner SSADH-Varianten im Oligomerisierungsbereich des Enzyms zu charakterisieren, wurden die unterschiedlichen Varianten in dem humanen SSADH-Gen zunächst mittels zielgerichteter Mutagenese durch die entsprechenden Punktmutationen in zwei verschiedenen Vektoren hergestellt, (siehe Brennenstuhl et al., 2020). Dafür wurden die Vektoren pcDNA3 ohne Tag und pEXPR-IBA 103 mit Twin-Strep-tag® gewählt. Die entstandenen Konstrukte wurden durch eine Transformation in *E. coli* XL-1 blue eingeführt, daraufhin die Plasmide isoliert und sequenziert.

3.2. Klonierung verschiedener pathogener SSADH-Varianten in den Vektor pcDNA3 mit anschließender Transfektion in HEK-KO Zellen

In den ersten Versuchen wurden die in der Tabelle 16 dargestellten Varianten in den pcDNA3-Vektor eingefügt.

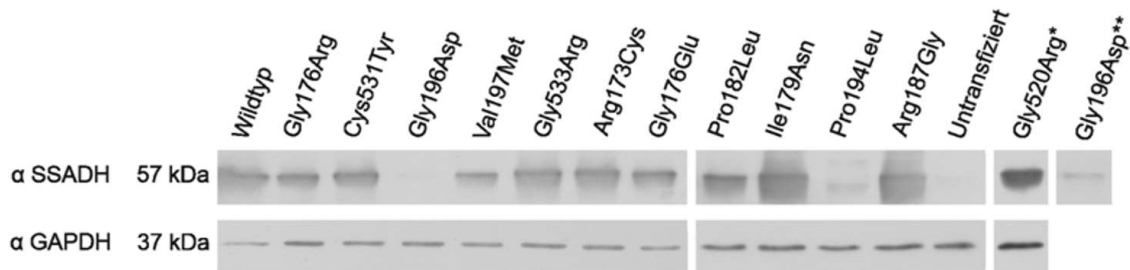
Tabelle 16: SSADH-Varianten in dem nicht-getaggtten Vektor pcDNA3

Oligomerisierungsdomäne 174-195	Oligomerisierungsdomäne 525-535
Arg 173 Cys	Gly 520 Arg
Gly 176 Arg	Gly 533 Arg-Stop
Gly 176 Glu	Cys 531 Tyr
Ile 179 Asn	
Arg 187 Gly	
Pro 194 Leu	
Gly 196 Asp	
Val 197 Met	

Die SSADH-Varianten in dem Vektor pcDNA3 wurden in HEK 293T-SSADH-KO-Zellen transfiziert und exprimiert. Nach der Transfektion wurden Zellysate hergestellt und die Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Eine konstante Proteinmenge von 3 µg pro Lysat wurde auf das Gel aufgetragen. Die erfolgreiche Transfektion und Expression der rekombinanten SSADH-Varianten wurden anschließend mittels Western-Blot-Analyse validiert.

Die Abbildung 5 zeigt, dass jene Varianten, welche aus den pcDNA3-Konstrukten exprimiert wurden, ebenso stark exprimiert werden wie der Wildtyp. Obwohl diese Varianten krankheitsverursachend sind, werden sie nicht weniger als der Wildtyp selbst exprimiert. Das bedeutet, dass fast alle untersuchten Varianten offensichtlich nicht instabil sind. Die Variante Gly520Arg konnte mit dem Standard-Anti-SSADH-Antikörper (Abcam) nicht detektiert werden, da der respektive Aminosäureaustausch in dem Bereich des Epitops des Antikörpers liegt. Darum wurde diese Variante mit dem Anti-SSADH-Antikörper der Firma Santa Cruz nachgewiesen, wie in den Abbildungen mit „*“ verwiesen oder die Abbildung entsprechend gekennzeichnet.

Die Varianten Gly196Asp sowie Pro194Leu sind sehr schwach erkennbar. Daher ist die Variante Gly196Asp nochmals mit einer erhöhten Belichtungszeit von 90 s aufgenommen worden und wurde in Abbildung 5 mit „Gly196Asp**“ erkenntlich gemacht und separat aufgeführt (Abbildung 5). Bei allen anderen Varianten war eine Belichtungszeit von 30 s ausreichend.



* Anti-SSADH-Antikörper, Santa Cruz

** Belichtungszeit 90 s

Abbildung 5: Western-Blot von HEK-KO-Zellen nach Transfektion mit pcDNA3-Konstrukten: HEK-KO-Zellen wurden mit den SSADH-Varianten, Leervektor pcDNA3 und dem Wildtyp SSADH transfiziert. Die Expression der verschiedenen Varianten und des Wildtyps wurde mittels SDS-Page und Western-Blot-Analyse mit dem Anti-SSADH-Antikörper (Abcam) nachgewiesen. Gly520Arg wurde mit einem anderen Anti-SSADH-Antikörper (Santa Cruz) nachgewiesen. Als Ladekontrolle ist bei 37 kDa der Antikörpernachweis mittels Anti-GAPDH durchgeführt worden.

3.3. Klonierung verschiedener pathogener SSADH-Varianten in den Vektor pEXPR-IBA103 mit Twin-Strep-tag®

Bisher gibt es keine publizierten Daten, ob SSADH mit einem C-terminal angefügten Strep-Tag exprimiert werden kann und ob diese zu gleichem Maße wie die nicht-getaggen Varianten exprimiert werden können. Diese Untersuchung kann somit den wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn über die funktionellen und strukturellen Bereiche des SSADH-Proteins erweitern. Dazu wurden alle pathogenen SSADH-Varianten, die in dem Vektor pcDNA3 exprimiert wurden, auch in den Vektor pEXPR-IBA 103 eingebracht. Der Vektor pEXPR-IBA 103 besitzt einen Twin-Strep-tag®, welcher C-terminal am rekombinanten Protein fusioniert ist. Die SSADH-Varianten in dem Vektor pEXPR-IBA 103, welche für die verschiedenen SSADH-Varianten codieren, wurden auch hier in SSADH-Knock-out-Zellen transfiziert (Brennstuhl et al.,2020). Die Tabelle 17 zeigt die Varianten, die in den Vektor pEXPR-IBA 103 kloniert wurden.

Tabelle 17: SSADH-Varianten in den getaggtten Vektor pEXPR-IBA 103

Oligomerisierungsdomäne 174-195	Oligomerisierungsdomäne 525-535
Arg 173 Cys	Gly 520 Arg
Gly 176 Arg	Gly 533 Arg-Stop
Gly 176 Glu	Cys 531 Tyr
Ile 179 Asn	
His 180 Tyr	
Arg 187 Gly	
Pro 194 Leu	
Gly 196 Asp	
Val 197 Met	

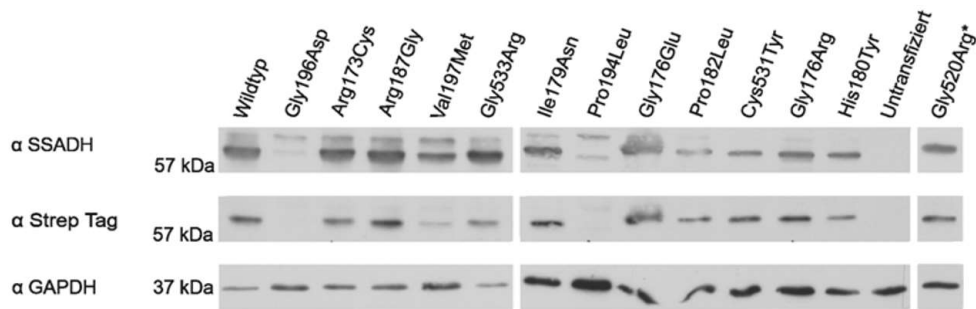
Von besonderem Interesse ist die Variante p.His180Tyr. Diese wurde bereits in der codierenden Region von SSADH nachgewiesen und untersucht. Die Expression von p.His180Tyr wurde in verschiedenen Publikationen gezeigt (Blasi et al., 2002; Akaboshi et al., 2003). Die Variante p.His180Tyr ist auch bei nicht an SSADH-Defizit erkrankten Personen vorzufinden (ca. 30 % der Gesamtbevölkerung) und stellt im Allel alleinig vorkommend keine pathogene Variante dar. Kommt die Mutation in Kombination als compound-heterozygot vor, ist die Aktivität des Enzyms beeinflusst und verschlechtert sich (Blasi et al., 2002). Daher wurde diese Variante im Folgenden weiter untersucht, um ihren Effekt auf die Oligomerisierung in späteren Pulldown-Versuchen nachvollziehen zu können.

Nach der Transfektion mit den o.g. Varianten wurden ebenfalls Zellysate hergestellt und die Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Eine konstante Proteinmenge von 3 µg pro Lysat wurde auf das SDS-Gel aufgetragen. Die Transfektion und Expression der rekombinanten SSADH-Varianten wurden auch in diesem Versuch mittels Western-Blot-Analyse validiert.

Alle Varianten, die in pEXPR-IBA 103 mit dem Twin-Strep-tag[®] transfiziert wurden, konnten detektiert werden und wurden teilweise genauso stark, andere Varianten hingegen deutlich schwächer wie der Wildtyp exprimiert. Das Ergebnis in Abbildung 6 zeigt auch in diesem Fall, dass die meisten Varianten, bis auf Gly196Asp und Pro194Leu, problemlos exprimiert wurden und nicht instabil sind. Die Variante Gly520Arg musste erneut mit dem Anti-SSADH-Antikörper der Firma Santa Cruz nachgewiesen werden und ist deshalb mit einem „*“ gekennzeichnet. Der angefügte Twin-Strep-tag[®] wurde mit dem

Anti-Strep-tag-AK nachgewiesen, wobei das getaggte SSADH-Protein bei etwa 60 kDa (knapp über 57 kDa) sichtbar ist. Das getaggte SSADH-Protein konnte bei allen anderen SSADH-Varianten, außer bei Gly196Asp und Pro194Leu, nachgewiesen werden. Bei den Varianten Gly196Asp und Pro194Leu konnte mit dem Anti-Strep-tag-AK jedoch kein SSADH mit angefügtem Tag nachgewiesen werden. Diese beiden Varianten zeigen aber eine schwache Expression mit dem Anti-SSADH-Antikörper. Das lässt darauf schließen, dass die oben genannten Varianten wahrscheinlich mit und ohne Tag instabil sind.

In der Abbildung 6 ist beim Nachweis mit dem Anti-SSADH-AK ein größeres SSADH-Protein bei etwa 62 kDa zu erkennen, welches das Vorläuferprotein von SSADH darstellt. Das Signal bei 60 kDa stellt dabei die reife Form des SSADH-Proteins in den Mitochondrien dar.



* Anti-SSADH-Antikörper, Santa Cruz

Abbildung 6: Western-Blot von HEK-KO-Zellen nach Transfektion mit SSADH-pEXPR-IBA 103-Konstrukten: HEK-KO-Zellen wurden mit SSADH-Varianten, Leervektor pEXPR-IBA103 und dem Wildtyp transfiziert. Die Expression von den verschiedenen Varianten und dem Wildtyp wurde mittels SDS-Page und Western-Blot-Analyse mit dem Anti-SSADH-Antikörper (Abcam) nachgewiesen. Der Twin-Strep-tag® wurde mit dem Anti-Strep-tag-AK detektiert. Gly520Arg* wurde mit dem Anti-SSADH-Antikörper (Santa Cruz) nachgewiesen. Als Ladekontrolle ist bei 37 kDa der Antikörpernachweis mittels Anti-GAPDH durchgeführt worden.

3.4. SSADH-Aktivität der pathogenen Varianten in pcDNA3 im Vergleich zum Wildtyp

Die krankheitsverursachenden Varianten, die in dem Oligomerisierungsbereich des SSADH-Enzyms vorkommen, sollten nun im Hinblick auf ihre enzymatische Aktivität

untersucht werden. Anhand ihrer potenziell beeinträchtigten Enzymaktivität kann somit ein Aufschluss über die möglichen Mechanismen der Pathogenität gegeben werden.

Bisher konnte man in vorherigen Experimenten ihre stabile Expression zeigen. Allerdings ist bekannt, dass die verschiedenen pathogenen Varianten unterschiedlich stark ausgeprägte Auswirkungen auf die Enzymaktivität haben. In vorherigen Untersuchungen von Akaboshi et al. konnte gezeigt werden, dass einige Missense-Varianten, die auch bei Patienten mit SSADH-Mangel diagnostiziert wurden, zu einem fast vollständigen Verlust der SSADH-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp geführt haben (Akaboshi et al., 2003).

Die SSADH-Aktivität wurde in $\Delta F/\text{min}$ pro μg Gesamtprotein berechnet und als relative Aktivität im Vergleich zur Wildtyp-Aktivität angegeben. Die Werte sind zur besseren Vergleichbarkeit in Prozent angegeben.

Bei der Aktivitätsmessung der Varianten in pcDNA3 zeigten 8 von den insgesamt 12 untersuchten Varianten im Vergleich zum Wildtyp eine sehr geringe Aktivität auf, (siehe Abbildung 7). Die Varianten Arg173Cys, Gly176Arg, Gly176Glu, Ile179Asn, Pro194Leu, Gly196Asp, Gly520Arg und Cys531Tyr besitzen im Vergleich zum Wildtyp kaum eine Enzymaktivität. Eine deutlich höhere Restaktivität weist Gly533Arg mit 15 % und Arg187Gly mit 13 % im Vergleich zum Wildtyp auf. Eine deutlich höhere Aktivität weist die Variante Val197Met auf (37 % der Wildtyp-Aktivität). Der einzige, sich hervorhebende und erhöhte Aktivitätswert ist mit über 66 % die Variante Pro182Leu. Die Abbildung 7 zeigt zudem, dass die gemessene Aktivität zwischen den vier unterschiedlichen Experimenten variiert. Dies ist anhand der aufgeführten Standardabweichungen zu erkennen. Die Variabilität der gemessenen Aktivität wird vor allem bei den Varianten mit erhöhter Aktivität deutlicher.

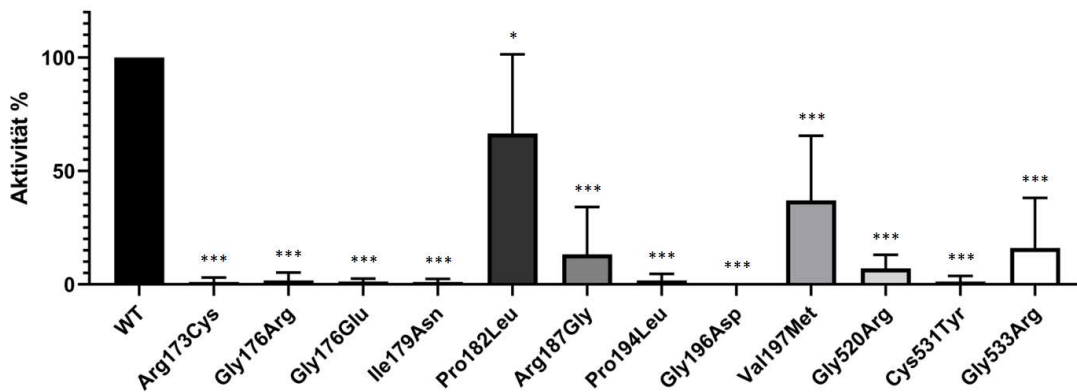
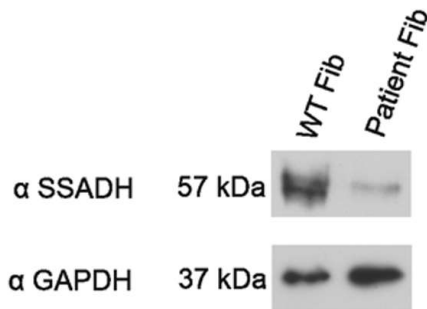


Abbildung 7: Relative SSADH-Aktivität der Varianten in pcDNA3: Als WT ist der Wildtyp mit einer 100%igen Aktivität als Referenzwert abgebildet. Der Großteil der Varianten weist eine deutliche Reduktion der Enzymaktivität auf. Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert \pm Standardabweichung von vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die statistische Auswertung wurde mit der One-way-Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Die angegebenen p-Werte gelten als signifikant: * $p < 0,05$, und *** $p < 0,001$.

3.5. Vergleich der Expression von SSADH in Wildtyp-Fibroblasten und Patienten-Fibroblasten

Die Patientenzellen wurden der Arbeitsgruppe Prof. Tikkanen für Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Aus den Wildtyp-Fibroblasten und den Patienten-Fibroblasten mit der Gly533Arg-Variante wurden Lysate hergestellt, die Proteinkonzentrationen dann mittels Bradford bestimmt und anschließend mit einem Western-Blot analysiert. Der Patient ist compound-heterozygot und besitzt auf den Allelen folgende Varianten: c.1597G>A (G533R) und c.1015-2A>C, welche auf dem Intron 6 vorzufinden ist. Damit hat die DNA des Patienten einen Spleiß-Defekt bei der mRNA-Prozessierung, sowie eine Missense-Variante. Basierend auf der Annahme, dass die Variante Gly533Arg stabil exprimiert wird, wie anhand der zuvor genannten Ergebnisse verdeutlicht wurde, so würde man eine Expression von ungefähr 50 % im Vergleich zu den Wildtyp-Fibroblasten erwarten.

Die Abbildung 8 zeigt, dass die Kombination der beiden Varianten mit Gly533Arg und dem Spleiß-Defekt eine deutlich geringere Expression als 50 % verursacht.



Anti-SSADH-Antikörper, Santa Cruz

Abbildung 8: SSADH-Expression in Patientenzellen mit Gly533Arg und der c.1015-2A>C Spleiß-Variante: Es wurden Zelllysate aus Kontroll- und Patienten-Fibroblasten hergestellt. Die Proteinkonzentrationen der Lysate wurden angeglichen, 3 µg Gesamtprotein auf dem Polyacrylamidgel aufgetrennt. SSADH wurde mit dem Anti-SSADH-Antikörper von Santa Cruz nachgewiesen. Als Ladekontrolle ist bei 37 kDa der Antikörpernachweis für Anti-GAPDH durchgeführt worden.

3.6. Untersuchung der Oligomerisierung der pathogenen Varianten mittels Pulldown

Zunächst wurde die Expression der verschiedenen Varianten in den beiden unterschiedlichen Vektoren pcDNA3 und pEXPR-IBA 103 in HEK-SSADH-KO-Zellen gezeigt. Mithilfe des Pulldown-Assays sollte untersucht werden, ob die unterschiedlichen Varianten in der Lage sind, mit dem Wildtyp zu oligomerisieren.

Für das Pulldown-Assay wurden die HEK-KO-Zellen mit Wildtyp-DNA (ohne Tag) und Mut-DNA (Variante mit angefügtem Tag) co-transfiziert. Der angefügte Tag wurde für den Pulldown selbst benötigt, denn im Pulldown wurden die Varianten heruntergezogen, welche als getaggte Proteine exprimiert wurden. Im darauffolgenden Pulldown-Versuch wurden dann die gleichen Varianten nicht-getaggt und getaggt co-transfiziert und untersucht. Kann in diesem Pulldown sowohl der nicht-getaggte Wildtyp mit der getaggten Variante heruntergezogen werden, so ist die Oligomerisierung mit dem Wildtyp möglich. Wenn sowohl getaggte als auch nicht-getaggte Varianten heruntergezogen werden, können diese ebenfalls miteinander oligomerisieren. Die Abbildung 9 zeigt schematisch den Vorgang des Pulldowns nach Co-Transfektion der HEK-KO-Zellen.

Nach der Zellernte wurden die Zellen lysiert und mit Pansorbin vorgereinigt. Der angefügte Tag, welcher an die Varianten gekoppelt ist, verbindet sich in diesem Verfahren mit den Strep-Tactin® XT Beads. Durch einen Magneten werden lediglich jene magnetisch gebundenen Komplexe aus der getaggtten Variante und dem nicht-getaggtten Wildtyp gezogen. Durch diesen Vorgang können nur die Varianten, die einen Tag besitzen, bzw. solche, die mit der getaggtten Variante oligomerisiert haben, magnetisch herausgezogen werden. Diese präzipitierten Komplexe können im nächsten Schritt mithilfe des Western-Blots nachgewiesen werden (Abbildung 9).

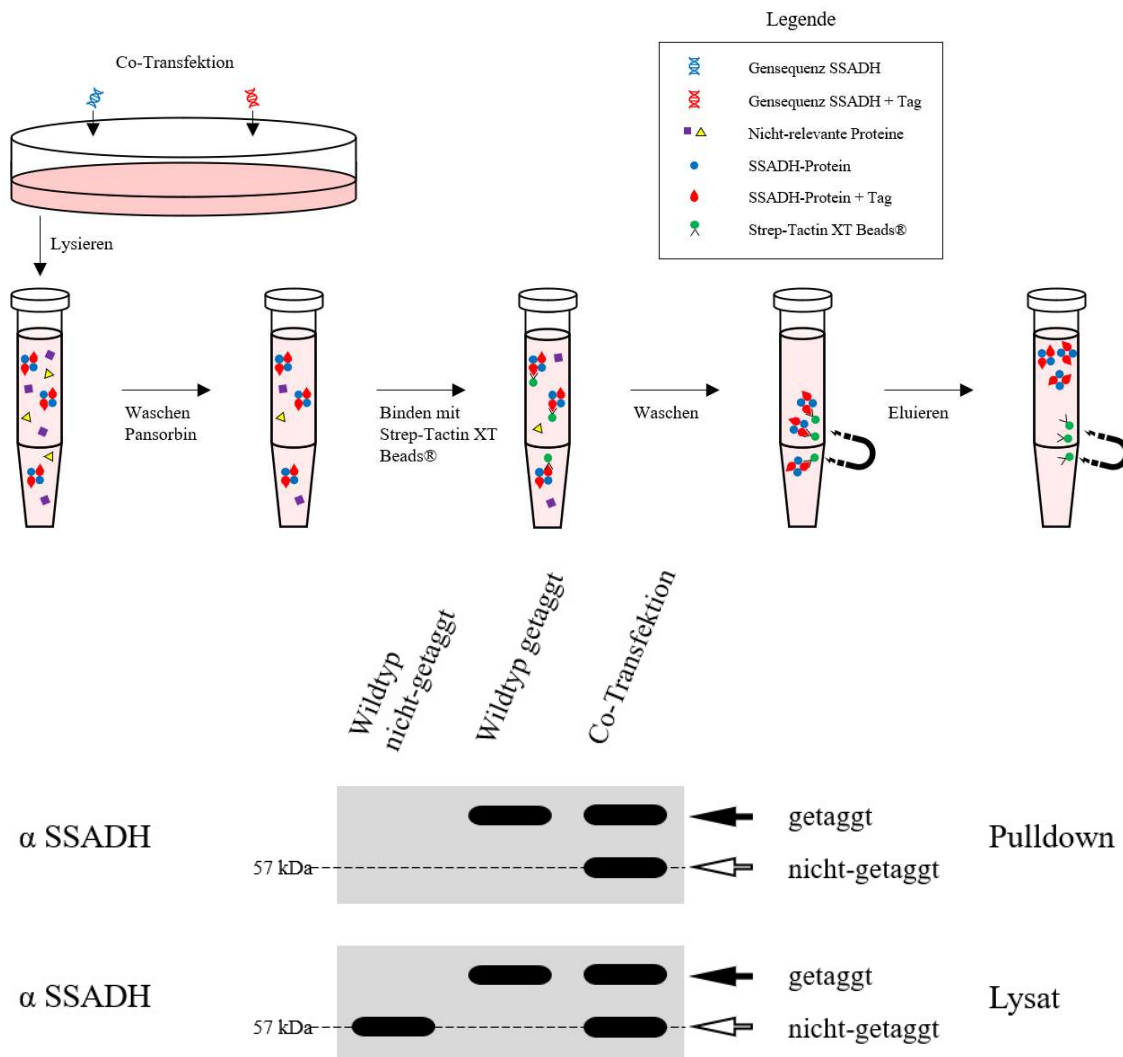


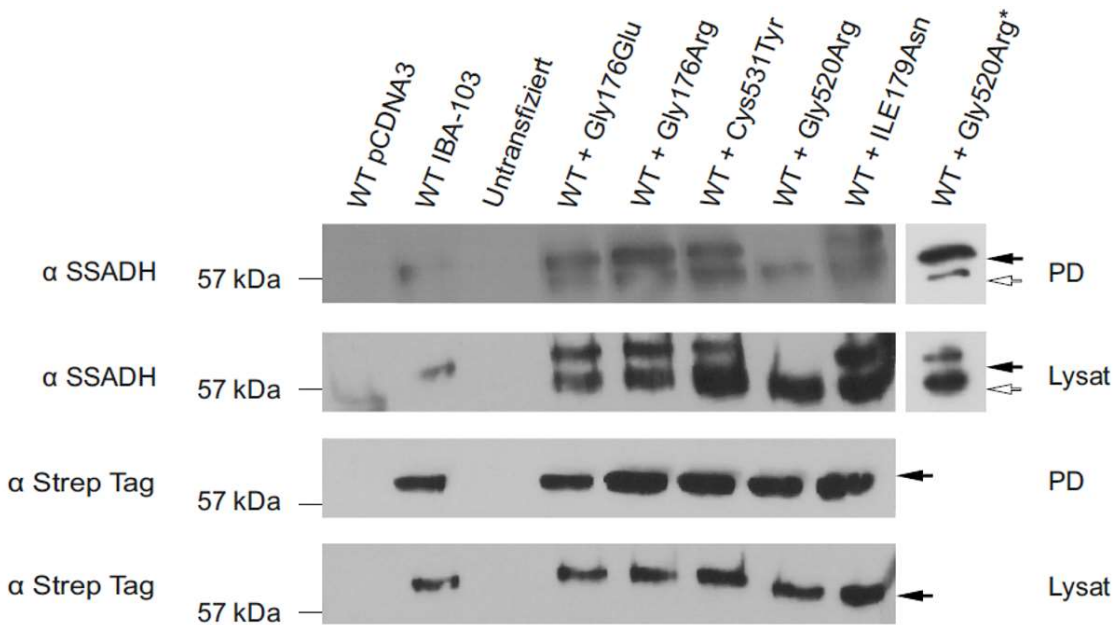


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Pull-down-Versuchs, eigene Darstellung: Für den Pull-down-Versuch wurden die co-transfizierten HEK-KO-Zellen nach der Zellernte lysiert und zunächst mittels Pansorbin vorgereinigt. Anschließend wurden zum aufgereinigten Lysat magnetische Strep-Tactin® XT Beads zugegeben. Diese Beads wurden in CO-IP-Puffer mit 1 % BSA gelöst und präzipitierten über Nacht bei 4°C. In dieser Phase hat sich der Strep-tag-Teil mit den magnetischen Strep-Tactin®



XT Beads verbunden und eine feste Bindung erzeugt. Durch einen Magneten wurden lediglich jene magnetisch gebundenen Komplexe herausgezogen und im Anschluss im Western-Blot detektiert werden. Dabei sind die getaggten Varianten mit schwarzen Pfeilen  und die nicht-getaggten Varianten mit weißen Pfeilen  gekennzeichnet. Der dargestellte Western-Blot ist fiktiv und dient nur dem Verständnis.

Die Ergebnisse in Abbildung 10 zeigen, dass der nicht-getaggte Wildtyp mit der getaggten Variante zusammen im Pulldown nachgewiesen werden konnte. In der Abbildung 10 ist dieses deutlich im Pulldown und im Lysat mit dem Anti-SSADH-AK erkennbar. Das bedeutet, dass die monomeren Polypeptidketten miteinander interagieren. Dies kann nur passieren, wenn sich eine dimere oder tetramere Struktur des Enzyms bilden kann. In der Abbildung 10 ist zu erkennen, dass das nicht-getaggte Wildtyp-SSADH in Kombination mit der getaggten Variante vorhanden ist.



* nochmalige Darstellung mit Anti-SSADH-Antikörper, Santa Cruz

Abbildung 10: Oligomerisierung der pathogenen Varianten mit Wildtyp-SSADH mittels Pulldown in co-transfizierten HEK-KO-Zellen (1): Die HEK-KO-Zellen wurden mit den pathogenen SSADH-Varianten mit Tag (pEXPR-IBA 103) und dem Wildtyp ohne Tag (pcDNA3) co-transfiziert. Der Pulldown und die entsprechenden Lysate wurden zuerst mit dem Anti-SSADH-Antikörper von Abcam detektiert. Der Twin-Strep-tag[®] wurde mit dem Anti-Strep-tag-AK detektiert. Gly520Arg* wurde mit dem Anti-SSADH-Antikörper (Santa Cruz) nachgewiesen. Die getaggten Varianten sind

mit schwarzen Pfeilen  und das nicht-getaggte Wildtyp-SSADH mit weißen Pfeilen  gekennzeichnet.

Die Abbildung 11 zeigt, dass die Varianten Gly196Asp und Pro194Leu ebenfalls mit dem Wildtyp oligomerisieren. Allerdings konnte im Lysat der beiden Varianten kein Strep-tag nachgewiesen werden, da die Expression niedriger ist als bei den anderen Varianten. Die Expression der beiden Varianten ist sehr gering, sodass diese im Lysat nicht detektierbar sind. Im eigentlichen Pulldown sind die Varianten deutlich erkennbar, da diese dort angereichert werden. In Abbildung 11 ist erkennbar, dass die Varianten Gly196Asp und Pro194Leu deutlich schlechter detektierbar sind als die anderen untersuchten Varianten. Dieses deckt sich mit den vorherigen Ergebnissen (siehe Abbildung 5, 6 und 10). Allerdings zeigt es, dass diese auch fähig sind, mit dem Wildtyp zu oligomerisieren. Dieses kann dadurch begründet werden, dass durch den Pulldown das Protein, im Gegensatz zum Lysat, aufkonzentriert wird und somit eine eindeutige Detektion mit einem Antikörper ermöglicht wird.

Außerdem zeigen die Varianten in Kombination mit dem Wildtyp (WT + Val197Met, WT + Gly196Asp und WT + Pro194Leu) in dem Pulldown-Assay der Abbildung 11 im Vergleich zum Wildtyp-Signal ein deutlich schwächeres Signal für die Variante, sowohl im Pulldown selbst als auch im Lysat. Bei allen anderen Varianten sind die Signale im Pulldown (Variante vs. Wildtyp) etwa gleich stark. Diese unterschiedlich starken Signale könnten auf eine veränderte Stöchiometrie der Interaktion hindeuten. Außerdem ist die Variante Pro194Leu offensichtlich kleiner als alle anderen Varianten.

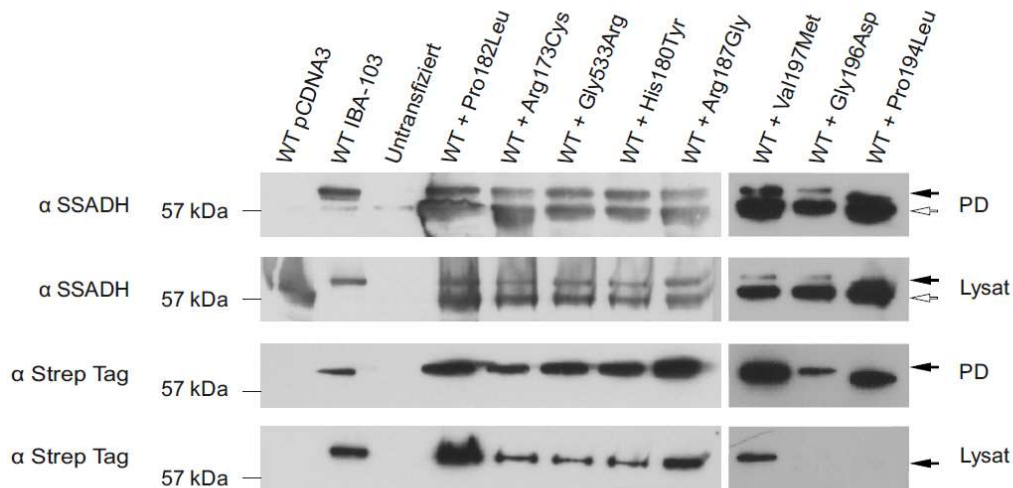




Abbildung 11: Oligomerisierung der pathogenen Varianten mit Wildtyp-SSADH mittels Pulldown in co-transfizierten HEK-KO-Zellen (2): Die HEK-KO-Zellen wurden mit den SSADH-Varianten mit vorhandenem Tag (pEXPR-IBA 103) und dem Wildtyp ohne Tag (pcDNA3) co-transfiziert. Der Pulldown und die entsprechenden Lysate wurden zuerst mit dem Anti-SSADH-Antikörper vom Abcam detektiert. Der Twin-Strep-tag® wurde mit dem Anti-Strep-tag-AK detektiert. Die getaggten Varianten sind mit schwarzen Pfeilen  und das nicht-getaggte Wildtyp-SSADH mit weißen Pfeilen  gekennzeichnet.

3.7. Pulldown-Assay der co-transfizierten Varianten mit und ohne Twin-Strep-tag®

Nachdem die Oligomerisierung der pathogenen Variante in Kombination mit dem Wildtyp-SSADH bei allen Varianten nachgewiesen werden konnte, wurde der Pulldown-Assay mit Varianten mit und ohne Tag durchgeführt. Hierfür wurde die nicht-getaggte Variante (pcDNA3) mit derselben Variante mit angefügtem Tag (pEXPR-IBA 103) co-transfiziert, um zu überprüfen, ob dieselben Varianten auch miteinander oligomerisieren können. Jedoch soll in diesem Assay untersucht werden, ob die Varianten Oligomere bilden, wenn kein Wildtyp-SSADH vorhanden ist.

Für diesen Pulldown-Versuch wurden ebenfalls die co-transfizierten HEK-KO-Zellen nach der Zellernte lysiert und mittels Pansorbin vorgereinigt. Anschließend erfolgte, genau wie in den Versuchen vorher, der eigentliche Pulldown mit anschließendem Western-Blot.

Die Abbildung 12 und 13 machen deutlich, dass alle co-transfizierten Varianten, außer Pro194Leu und Gly196Asp, im Pulldown nachgewiesen werden konnten. Folglich können die nachgewiesenen Varianten miteinander interagieren und somit oligomerisieren. Diese Varianten sind sowohl im Pulldown als auch im Kontrolllysat sichtbar und sie waren auch mit dem angefügtem Strep-tag detektierbar.

In der Abbildung 13 zeigen die Varianten Pro194Leu + Pro194Leu mit Strep-tag und Gly196Asp + Gly196Asp mit Strep-tag im Pulldown und im Kontrolllysat keine Signale, weder mit dem Anti-Strep-tag-AK noch mit dem Anti-SSADH-AK. Die Expression der Varianten ist somit so gering, dass diese Varianten nicht mehr detektierbar sind.

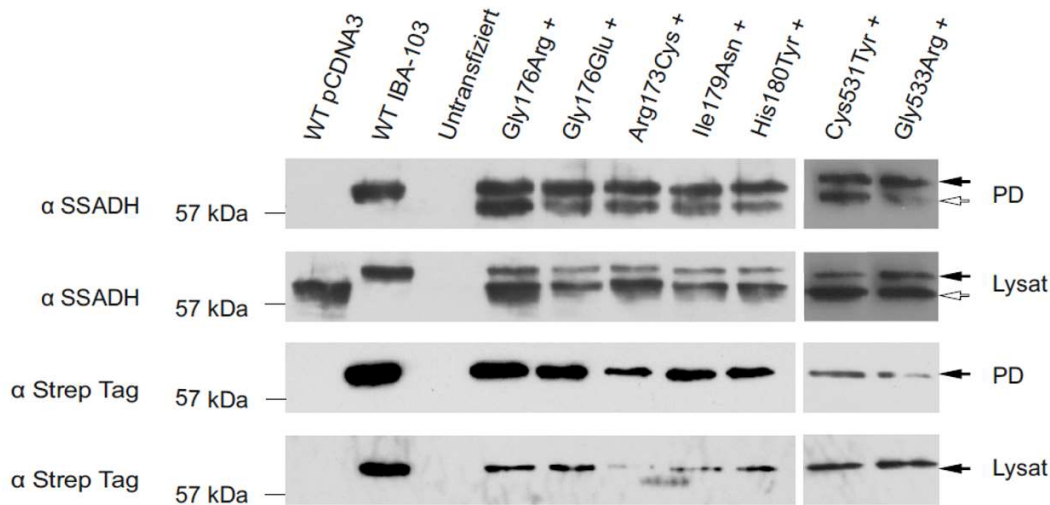


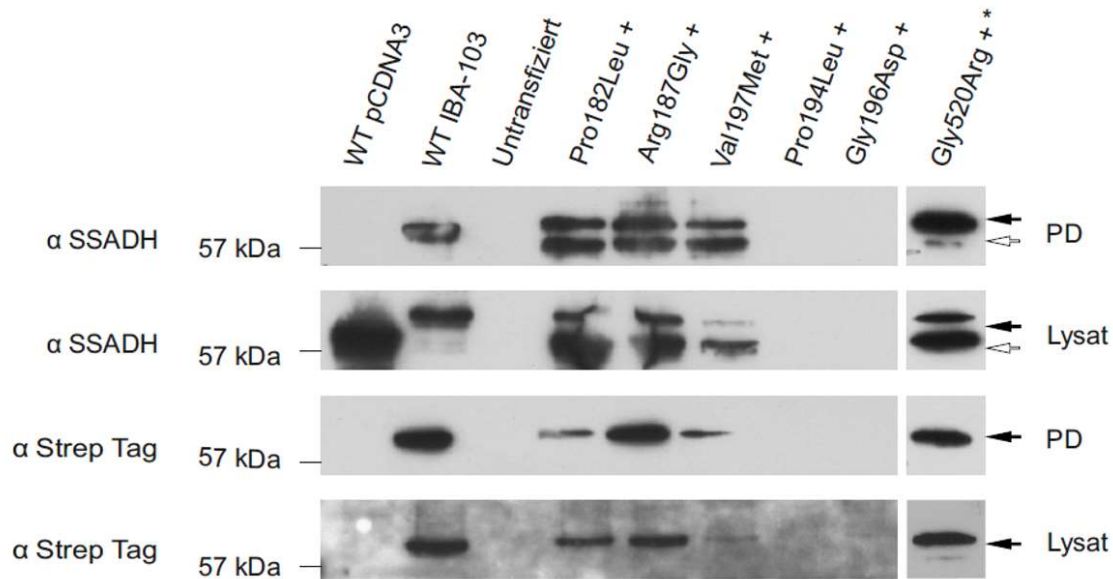




Abbildung 12: Selbst-Oligomerisierung der pathogenen Varianten mittels Pulldown von co-transfizierten HEK-KO-Zellen (1): Die HEK-KO-Zellen wurden mit SSADH-Varianten mit vorhandenem Tag (pEXPR-IBA 103) und derselben Variante ohne Tag (pcDNA3), transfiziert. Der Pulldown und die entsprechenden Lysate wurden zuerst mit dem Anti-SSADH-Antikörper vom Abcam detektiert. Der Twin-Strep-tag[®] wurde mit dem Anti-Strep-tag-AK detektiert. Die getaggtten Varianten sind mit schwarzen Pfeilen  und die nicht-getaggtten Varianten mit weißen Pfeilen  gekennzeichnet.



* Anti-SSADH-Antikörper, Santa Cruz

Abbildung 13: Selbst-Oligomerisierung der pathogenen Varianten mittels Pull-down von co-transfizierten HEK-KO-Zellen (2): Die HEK-KO-Zellen wurden mit SSADH-Varianten mit vorhandenem Tag (pEXPR-IBA 103) und derselben Variante ohne Tag (pCDNA3) transfiziert. Der Pull-down und die entsprechenden Lysate wurden zuerst mit dem SSADH-Antikörper vom Abcam detektiert. Der Twin-Strep-tag® wurde mit dem Anti-Strep-tag-AK detektiert. Gly520Arg* wurde mit dem Anti-SSADH-Antikörper (Santa Cruz) nachgewiesen. Die getaggten Varianten sind mit schwarzen Pfeilen  und die nicht-getaggten Varianten mit weißen Pfeilen  gekennzeichnet.

4. Diskussion

Das SSADH-Defizit geht mit einer neurometabolischen Störung des GABA-Stoffwechsels einher. Der Mangel an dem Enzym wird durch eine Mutation im *ALDH5A1*-Gen verursacht. Einige dieser Mutationen liegen in dem Oligomerisierungsbereich des Enzyms. In dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss die Mutationen auf die Oligomerisierung des Enzyms haben, d.h. ob Oligomerisierungsdefekte vorliegen könnten. Dazu wurden in dieser Arbeit verschiedene SSADH-Mutanten untersucht, welche Veränderungen im Oligomerisierungsbereich des Enzyms aufweisen. Es wurden 12 Varianten in 2 verschiedenen Plasmiden (pcDNA3 und pEXPR-IBA 103) kloniert und im Anschluss durch Transfektion in humane Zelllinien auf ihre Expressionsfähigkeit untersucht. Außerdem wurden die verschiedenen Varianten auf ihre Enzymaktivität getestet. Mithilfe eines Pulldown-Assays wurde sowohl die Oligomerisierung der Varianten (getaggt und nicht-getaggt) als auch zusammen mit dem Wildtyp untersucht. Patientenzellen mit pathogenen SSADH-Mutationen im Oligomerisierungsbereich des Enzyms wurden untersucht, um die Proteinexpression zu analysieren. Im Folgenden werden die Ergebnisse der oben beschriebenen Untersuchungen diskutiert.

4.1. Klonierung verschiedener pathogener SSADH-Varianten in den Vektor pcDNA3

Die Klonierung in den Vektor pcDNA3 mit anschließender Transfektion in HEK-KO-Zellen zeigte eine Expression aller Varianten. Gleichzeitig war zu erkennen, dass die Varianten Gly196Asp und Pro194Leu ein deutlich niedrigeres Expressionslevel zeigten. Dafür können verschiedene Gründe in Frage kommen: Bei Gly196Asp könnte die Stabilität des Proteins beeinträchtigt worden sein, da der Austausch der apolaren Aminosäure Glycin zur polaren Aminosäure Aspartat einen Ladungswechsel zur Folge hat. Dieser Ladungswechsel kann sich auf die korrekte Faltung eines Proteins auswirken. Ist die Faltung des Proteins nicht mehr im nativen Zustand, kann dies durchaus Auswirkungen auf die Proteinstabilität und Degradation haben. Im ungefalteten Zustand ist das Protein in einem thermodynamisch instabilen Zustand und wird im Rahmen der unfolded protein response (UPR) vermehrt abgebaut. Somit können Mutationen die Faltungsreaktionen von Proteinen beeinflussen (Übersicht in Dobson et al., 1998).

Auch kann beim Austausch von der heterocyclischen Aminosäure Prolin zu Leucin (Pro194Leu) Probleme bei der Faltung auftreten. Prolin ist eine proteinogene Aminosäure, hat jedoch außergewöhnliche stereochemische Eigenschaften. Prolin ist aufgrund seiner zyklischen Struktur sterisch gehindert und kann nur bestimmte Konformationen mit einem Phi-Winkel von ca. -60° einnehmen. Dies kann starke Auswirkungen auf die komplette Proteinstruktur nehmen und dort die Sekundärstrukturen beeinflussen (Brennenstuhl et al., 2020). Dabei kann Prolin in Proteinen sowohl destabilisierend als auch stabilisierend wirken (Choi & Mayo, 2006). Der Aminosäureaustausch in der Pro194Leu-Mutante könnte somit erhebliche Auswirkungen auf die Faltung oder auch Stabilität haben.

4.2. Klonierung verschiedener pathogener SSADH-Varianten in den Vektor pEXPR-IBA 103 mit Twin-Strep-tag®

Die Klonierung in den pEXPR-IBA 103 Vektor mit anschließender Transfektion in den HEK-KO-Zellen zeigte ebenso eine Expression aller Varianten. Wie auch in dem vorherigen Ergebnis mit pcDNA3, zeigen die Varianten Gly196Asp und Pro194Leu eine deutlich geringere Expression als der Wildtyp. Alle anderen Varianten, außer Gly196Asp und Pro194Leu, konnten trotz des C-terminalen Tags nachgewiesen werden. Bei dem angefügten Tag handelt es sich um ein Twin-Strep-Tag®. Dieser hat den Vorteil, dass er an rekombinante Proteine ohne vorherige Kenntnisse seiner biochemischen Eigenschaften fusioniert werden kann und an ein einzelnes Strep-Tactin®-Tetramer bindet (Schmidt et al., 2013). Dennoch kann die C-terminale Position des Twin-Strep-tag® zu sterischen Hinderungen oder Faltungsdefekten führen. In diesem Fall können Epitope maskiert werden, was zu Problemen bei der Detektion mittels Anti-Strep-tag-AK führen kann. Eine denkbare andere Möglichkeit wäre, dass der Tag nicht vollständig oder nur teilweise exprimiert wird. Dies wird später bei den Pulldown-Versuchen (siehe Kapitel 4.5.) diskutiert.

In Abbildung 6 ist im Western-Blot ein weiteres Signal über der „normal-großen“ Bande beim Nachweis mit Anti-SSADH bei etwa 62 kDa zu erkennen. Diese höhere Bande stellt vermutlich das größere Vorläuferprotein von SSADH mit 62 kDa dar, welche die mitochondriale Targetingsequenz von 47 Aminosäuren beinhaltet. Da das Protein mit der Targetingsequenz größer ist, stellt es die höhere Bande in dem Western-Blot dar. Es handelt sich dabei um die zytosolische Vorläufer-Variante von SSADH.

Eine weitere mögliche Erklärung für die schwerere Bande, könnten posttranslationale Modifikationen sein, die das Molekulargewicht des Proteins erhöhen. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Acetylierungen, Succinylierungen und Phosphorylierungen (ALDH5A1- Succinate-semialdehyde-dehydrogenase, 2021). Da die Intensitäten der zytosolischen und mitochondrialen Signale nicht gleich stark sind, kann dieses Rückschlüsse auf die Akkumulation der Proteinvarianten in den entsprechenden Kompartimenten liefern. Möglich wäre ebenfalls, dass einige Varianten besser oder schlechter in das Mitochondrium gelangen.

Die Expression aller Varianten konnte sowohl in pcDNA3 als auch in pEXPR-IBA 103 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse wurden in einem Überexpressionsmodell generiert und müssen daher kritisch betrachtet werden. Eine Optimierung der Methode wäre daher die Untersuchung der Varianten mit einem sogenannten Flp-InTM-System, welches mittlerweile auch in der Arbeitsgruppe Tikkanen etabliert ist und von anderen Arbeitsgruppen zur Identifizierung von möglichen pathogenen Mutationen bei SSADH-Defizit genutzt wird. Dieses Flp-InTM-System erzeugt stabile Expressionszelllinien durch Nutzung des Enzyms Flp-Rekombinase, welches ursprünglich aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* stammt (Flp-In System: For Generating Constitutive Expression Cell Lines, 2021). Durch ein DNA-Rekombinationssystem, welches die Rekombinase Flippase (Flp) darstellt, wird ein Genabschnitt an eine ortsspezifische Stelle in das Genom integriert und die DNA-Sequenz spezifisch ausgetauscht (Golic & Lindquist, 1989; Sauer, 1994). War die Insertion erfolgreich, sind die Zellen resistent gegenüber Hygromycin und können selektiert werden. Die Vorteile dieser Flp-InTM-Methode sind zum einen die schnelle und effiziente Expression der Proteine und zum anderen die Herstellung isogener stabiler Zelllinien. Ein weiterer wesentlicher Vorteil gegenüber der transienten Transfektion ist, dass nicht immer wieder in die HEK-KO-Zellen hinein transfiziert werden muss und die Expression im Anschluss konstante Mengen aufweist. Die konstante Expression der Konstrukte liefert somit eine höhere Aussagekraft bei der relativen Quantifizierung der Expressionslevels. Daher wäre es für nachfolgende Untersuchungen angebracht, die Varianten mit der Flp-InTM-Methode zu untersuchen. Der Nachteil der Flp-InTM-Methode ist allerdings, dass in diesem System eine deutlich geringere Expression vorhanden ist und unter Umständen damit Varianten, die eine sehr geringe Expression aufweisen, kaum oder gar nicht detektiert werden können und somit keine weiteren Untersuchungen damit möglich wären.

4.3. Methodische Diskussion

In den Abbildungen 5, 6, 10, und 13 musste für die Variante Gly520Arg jeweils ein anderer Antikörper genutzt werden. Die Variante Gly520Arg konnte mit dem „Standard“-Antikörper von Abcam (Anti-ALDH5A1 - ab129017), nicht detektiert werden. Die Bindungsregion des Antikörpers liegt laut Hersteller zwischen den Aminosäuren 500 – 600 (Recombinant Anti-ALDH5A1/SSADH antibody, 2021). In diesem Bereich ist die Variante Gly520Arg vorzufinden. Durch den Aminosäureaustausch scheint es zu einer Epitopveränderung zu kommen, sodass keine Bindung des Antikörpers mehr erfolgt. Der Antikörper von Santa Cruz bindet zwischen den Aminosäuren 1 - 226 und kann Gly520Arg einwandfrei detektieren (Aldehyde dehydrogenase 5 - A1/SSADH/ALDH5A1 Antikörper, 2021). Daher wurde auf allen angefertigten Western-Blots die Variante Gly520Arg mit dem Antikörper der Firma Santa Cruz (ALDH5A1 – sc 390754) detektiert.

Außerdem hat sich im Laufe der Versuche gezeigt, dass die getaggtten Varianten Gly196Asp und Pro194Leu durch den Anti-Strep-tag-AK nur im Pulldown mit dem Wildtyp zusammen detektierbar waren. In allen anderen Versuchen konnten die getaggtten Varianten Gly196Asp und Pro194Leu nicht mit dem Anti-Strep-tag-AK detektiert werden. Dieses Ergebnis spricht für eine zu hohe Nachweisgrenze des Anti-Strep-tag-AK für die beiden getaggtten Varianten, denn auch eine hohe Belichtungszeit von über 5 min konnten diese Varianten nicht zum Vorschein bringen.

4.4. SSADH-Aktivität der pathogenen Varianten in pcDNA3 im Vergleich zum Wildtyp

Bei der Aktivitätsmessung der pcDNA3-Varianten weisen die meisten Varianten eine deutlich geringere Aktivität im Vergleich zum Wildtyp auf. Die beiden Varianten Gly196Asp und Pro194Leu, die in den Expressionsversuchen deutlich reduziert waren, wiesen ebenfalls kaum messbare Restaktivitäten auf. Dies war auch für die Varianten Arg173Cys, Gly167Glu, Ile179Asn und Cys531Tyr zu sehen. Die ermittelten Restaktivitäten decken sich mit den in der Literatur beschriebenen Befunden (Pop et al., 2020). Ähnliche Aktivitäten waren bei den Varianten Pro182Leu und Arg187Gly zu finden. Pop et al. und Blasi et al. zeigten in ihren Studien für die Variante Pro182Leu eine Restaktivität von 48 % (Blasi et al., 2002; Pop et al., 2020). In meiner Arbeit wurde eine Restaktivität von 66 % bestimmt, welcher der Größenordnung der vorangegangenen

Studie entspricht. Für die Variante Arg187Gly deckt sich die bestimmte Restaktivität mit den Literaturwerten. Die Variante Gly533Arg weist in den Messungen meiner Arbeit eine Aktivität von 15 % auf, wobei Pop et. al und Akaboshi et. al keinerlei Aktivität gemessen haben (Akaboshi et al., 2003; Pop et al., 2020). Die Varianten Val197Met und Gly520Arg sind in der Literatur mit ihrer Aktivität bisher nicht aufgeführt.

Auch deutlich erkennbar in der Abbildung 7 ist die Varianz der Ergebnisse, vor allem bei den höheren Aktivitätswerten. Würde man auch hier ein stabiles Transfektionsmodell benutzen, könnte man deutlich niedrigere Varianzen erwarten und eindeutigere Ergebnisse erzielen. In dem Überexpressionsmodell sind die Expressionen sehr hoch und könnten dabei das genaue Ergebnis verfälschen. Auch beschreibt Pop et. al, dass anscheinend extreme Unterschiede von Restaktivitäten im transienten und stabilen Transfektionsmodell zu finden sind (Pop et al., 2020).

Anhand der aufgeführten Daten ist zu erkennen, dass es recht schwierig ist, eine genaue Aussage über die vorhandene Restaktivität der einzelnen Varianten zu treffen. Aus experimenteller Hinsicht können die Abweichungen auch von Ungenauigkeiten von Puffern, pH-Bedingungen, Reinheit und Qualität der Substrate sowie der Menge an Substrat und vorhandenem Enzym kommen. Auch die unterschiedliche Menge an SSADH-Enzym in den Proben kann einen Einfluss auf die Varianz der Ergebnisse haben. Letztendlich zeigen alle möglichen pathogenen Varianten, die in der Oligomerisierungsdomäne vorhanden sind, eine deutlich erniedrigte Restaktivität im Vergleich zum Wildtyp. Daher ist ein Oligomerisierungsdefekt bei den untersuchten Varianten nicht gänzlich ausgeschlossen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die ermittelten Restaktivitäten eine Trendorientierung zeigen, um die Pathogenität der einzelnen Varianten zu bewerten. Die in der Literatur als nicht-pathogen beschriebene Mutante Pro182Leu zeigt in allen Aktivitätsversuchen eine deutlich höhere Aktivität als alle anderen untersuchten Varianten. Die anderen untersuchten, in der Literatur als pathogen beschriebenen Varianten sind hingegen sehr stark in ihrer Aktivität erniedrigt. Kommt die Variante Pro182Leu in Kombination mit p.His180Tyr vor, welche auch als nicht-pathogen eingestuft wird, so erniedrigt sich die Restaktivität des Enzyms deutlich (Blasi et al., 2002).

4.5. Vergleich der Expression von SSADH in Wildtyp-Fibroblasten und Patienten-Fibroblasten

Bei der Untersuchung der Patientenfibroblasten konnte eine geringe Expression, von SSADH detektiert werden (siehe Abbildung 8). Der Patient weist eine compound-heterozygote Mutation im *ALDH5A1*-Gen auf. Auf einem Allel liegt ein Spleiß-Defekt c.1015-2A>C vor und auf dem anderen Allel die Missense-Mutation c.1597G>A (G533R). Durch den Spleiß-Defekt wird entweder das Entfernen der Introns verhindert oder aber das korrekte Zusammenlagern der Exons blockiert, sodass eine stark veränderte Proteinstruktur zu einem inaktiven Protein führt (VCV000959623.3-ClinVar, 2021).

Das SSADH-Protein kann somit nur von dem Allel gebildet werden, welches die Missense-Mutation enthält. Daher würden wir eine Expression von ca. 50 % erwarten, wenn die Variante keinerlei Auswirkungen auf die Expression hätte. Die Expression zeigt in der Abbildung 8 eine deutlich geringere Expression als erwartet, welches die Pathogenität der Variante Gly533Arg verdeutlicht. Die Pathogenität der Variante bewiesen Akaboshi et. al und Pop et al. in vorangegangenen Studien (Akaboshi et al., 2003; Pop et al., 2020). In neuen Untersuchungen von 2020 wurde ein weiterer Spleiß-Defekt c.1015-3 C>G in diesem Bereich entdeckt (DiBacco et al., 2020).

4.6. Pulldown-Assay der mit dem Wildtyp co-transfizierten Varianten

Das Pulldown-Assay zeigt, dass die einzelnen Varianten mittels Western-Blot in den Elutionsfraktionen nachweisbar sind. Sie sind über den Pulldown zu isolieren und jeweilig mit einem Wildtyp-Bindungspartner zu präzipitieren. Das stellt den Nachweis dafür da, dass trotz der Mutation in der Oligomerisierungsdomäne der spezifischen Variante eine Oligomerisierung mit dem Wildtyp stattfinden kann. Aus diesem Ergebnis geht jedoch nicht hervor, in welcher stöchiometrischen Art und Weise diese Oligomerisierung stattfindet. SSADH bildet in der mitochondrialen Matrix während des Faltungsvorgangs ein Tetramer, welches sich aus 2 Dimeren zusammensetzt (Kim et al., 2011). Das könnte bedeuten, dass das Verhältnis von Wildtyp-Monomeren zu Varianten-Monomeren in dem gebildeten Tetramer unterschiedlich ist, und somit auch ihre Oligomerisierungsfähigkeit unterschiedlich ausgeprägt ist.

Die Abbildung 14 soll folgende gedachte Beispiele für die unterschiedliche stöchiometrische Verteilung der Monomere veranschaulichen.

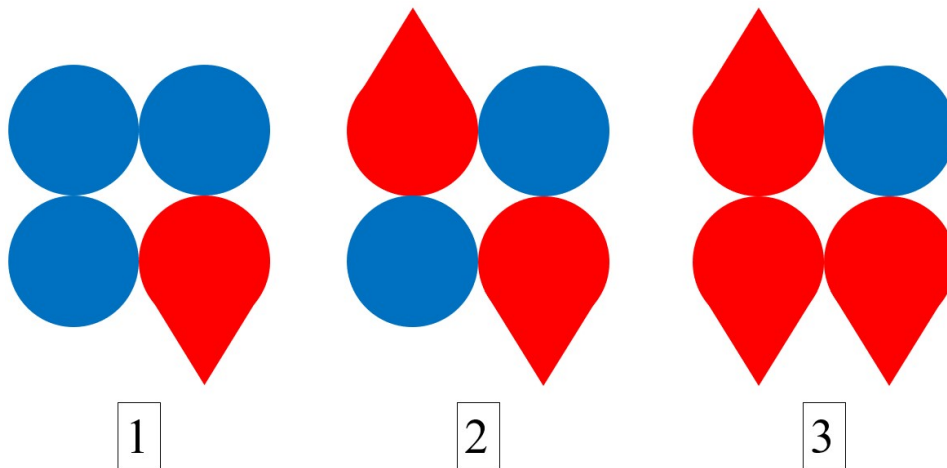


Abbildung 14: Möglichkeiten zur Tetramerbildung, eigene Darstellung:
 Beispiel 1 zeigt 3 Wildtyp-Monomere, die mit einem Varianten-Monomer interagieren
 Beispiel 2 zeigt 2 Wildtyp-Monomere, die mit zwei Varianten-Monomeren interagieren
 Beispiel 3 zeigt 3 Varianten-Monomere, die mit einem Wildtyp-Monomer interagieren

Die Oligomerisierungsfähigkeit könnte bei dem Beispiel 3 deutlicher beeinträchtigt werden als beim ersten gezeigten Beispiel. Dies wäre jedoch im durchgeführten Pulldown-Assay experimentell nicht nachweisbar. Daher sind bei großen Proteinen die Faltung und ihre Oligomerisierung von besonderem Interesse. Die kleineren Domänen bilden sich getrennt voneinander aus, bevor sich die komplette 3D-Struktur des Proteins ausbildet (Übersicht in Balch et al., 2008). Daher ist das Protein erst im oligomeren Zustand aktiv und nicht schon als Monomer, da es erst im endgültigen Faltungszustand funktionsfähig wird (Übersicht in Dobson et al., 1998).

Besonderheiten in dem Pulldown weisen wieder die Varianten Gly196Asp und Pro194Leu auf. In Abbildung 11 ist zu erkennen, dass die getaggten Varianten mit dem Anti-Strep-tag-Antikörper im Lysat nicht detektierbar sind. Der Nachweis gelingt jedoch in der Elutionsfraktion des Pulldown-Assays. Damit liegt nahe, dass die Konzentration der getaggten Varianten Pro194Leu und Gly196Asp im Lysat unterhalb der Nachweisgrenze lagen, um mit dem AK mittels Western-Blot detektiert zu werden.

4.7. Pulldown-Assay der co-transfizierten Varianten

Mit dem Pulldown-Assay wurde ein Screening in Bezug auf die Oligomerisierungsfähigkeit von verschiedenen SSADH-Mutanten im Bereich der Oligomerisierungsdomäne etabliert. Dabei lassen sich Informationen über einen möglichen Faltungsdefekt ableiten. Das Pulldown-Assay hat gezeigt, dass alle Varianten,

außer Pro194Leu und Gly196Asp, in der Lage sind, mit anderen SSADH-Molekülen, welche dieselbe Mutation tragen, zu oligomerisieren. Bei den beiden Varianten Gly196Asp und Pro194Leu liegt nahe, dass eventuell ein Oligomerisierungsproblem vorliegt. Diese Varianten können mit dem Wildtyp im Pulldown dargestellt werden, welches für ein stabiles Protein spricht. Bei der Co-Transfektion der getaggtten und nicht-getaggtten Varianten sind sie im Pulldown nicht nachweisbar. Da diese beiden Varianten kaum Aktivität aufweisen, und diese auch in den letzten Pulldown-Versuchen nicht detektierbar sind, könnte dieses Ergebnis auf ein Problem der Proteinstabilität und ihre anschließende Degradation hinweisen.

Viele der pathogenen Mutationen bei SSADH-Mangel sind Substitutionen der Aminosäure Glycin. Diese Glycin-Reste sind in ALDH-Proteinfamilien sehr gut konserviert und könnten die Struktur von SSADH erheblich beeinflussen (Hempel et al., 1993). Auch bei den Varianten Gly176Arg und Gly533Arg wird vermutet, dass ihre Oligomerisierung und Proteinstabilität durch die sterisch anspruchsvolle, basische Aminosäure Arginin gestört wird, da Substitutionen an der Oligomerisierungsgrenzfläche vorhanden sind (Kim et al., 2011).

Die Varianten wurden in einem Überexpressionsmodell untersucht. Ob diese Ergebnisse auch in Patientenzellen reproduzierbar sind, müsste weiterhin untersucht werden. Leider standen uns zu diesem Zeitpunkt keine Patientenzellen zur weiteren Untersuchung zur Verfügung.

4.8. Bedeutung für die Therapie

Die Untersuchungen zeigten, dass die meisten SSADH-Varianten in den Oligomerisierungsbereichen eine Expression in der Zellkultur aufweisen, was jedoch zu einem starken Verlust der Enzymaktivität führte. Somit könnte das mutierte Protein in seiner reifen Form mit normaler Oligomerisierung seine Funktion erfüllen, allerdings könnte es aufgrund einer störenden Faltung auch instabil sein und aggregiert werden. Das Enzym könnte aber auch einfach funktionslos sein. Mögliche weitere Erklärungen könnten elektrostatische Störungen oder Behinderungen am aktiven Zentrum sein, die diese Probleme des Enzyms verursachen.

Eine Therapiemöglichkeit für SSADH-Mangel könnte die pharmakologische Chaperontherapie sein. Dabei wird das Protein stabilisiert und seine Proteinfunktion kann wieder hergestellt werden (Suzuki et al., 2009). Pharmakologische Chaperone sind

chemische Moleküle mit niedrigen Molekulargewicht, die Proteine während ihres Faltungsvorgangs unterstützen, indem sie spezifisch an ihr Zielprotein binden und die Verarbeitung mit anschließendem Transport zu ihrem benötigten Ort in der Zelle erleichtern (Ringe & Petsko, 2009). Allerdings kommen pharmakologische Chaperone nicht für alle Missense-Mutationen in Frage, da sie sehr mutationspezifisch wirken. Ein Beispiel stellt die zugelassene orale Chaperontherapie mit Migalastat bei Morbus Fabry dar, die nur für „ansprechende“ Mutationen geeignet ist. Dabei werden die Varianten vorher *in vitro* auf ihre „Ansprechbarkeit“ entsprechend getestet (Lenders et al., 2019). Bislang sind für SSADH-Defizit keine pharmakologischen Chaperone bekannt. Diese Art der Therapiemöglichkeit sollte in Betracht gezogen werden, indem bisherige verfügbare pharmakologische Chaperone für SSADH-Varianten getestet werden. Auf diese Weise könnten geeignete Therapie-Chaperone identifiziert und ggf. angepasst oder gar neu entwickelt werden.

Auch nur begrenzt einsetzbar und mutationspezifisch für Nonsense-Varianten ist die „Read-Through-Therapie“, die durch Verabreichung von spezifischen pharmazeutischen Wirkstoffen, wie Gentamycin und Amlexanox ein Überlesen von Stopcodonen bewirkt, siehe auch (Zymanczyk, 2021). Diese Therapie wäre vor allem für solche Mutationen sinnvoll, in denen ein verfrühtes Stopcodon entsteht. Bisher konnte die Wirksamkeit von Amlexanox bei den Nonsense-Varianten im Protein p53, bei Muskeldystrophie des Typs Duchenne und bei zystischer Fibrose belegt werden (Wiechers et al., 2017). In Zukunft wäre es wichtig, weitere Therapieansätze zu verfolgen, da einige Patienten mit SSADH-Defizit von diesen möglichen und wenig invasiven Therapien profitieren könnten.

Auch Therapieformen wie die Enzyersatztherapie oder die Gentherapie mit viralen Trägern von Adeno-assoziierten Viren oder Lentiviren, wären für Patienten mit SSADH-Defizit denkbar. Bei der Enzyersatztherapie wird dem Körper das fehlende Enzym in einer synthetischen Form bzw. ein ähnlich wirkendes Enzym durch Injektion verabreicht. Hierbei wird das ersetzte Enzym von den Zellen aufgenommen und die fehlende Enzymaktivität im Idealfall wiederhergestellt (Mayr et al., 2021). Die Problematik, die mit dem SSADH-Enzym bei einer Enzyersatztherapie einhergeht, ist unter anderem die Lokalisation des gefalteten Enzyms im Mitochondrium, die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke sowie die notwendige lebenslange Therapie, die zu einer Immunreaktion gegenüber dem rekombinanten Enzym führen kann. Diese zusätzlichen Barrieren erschweren die Forschung für die ganzheitliche Enzyersatztherapie. Eine weitere denkbare und zudem deutlich einfachere Therapie im Sinne einer Enzyersatztherapie

wäre, die vorwiegende Therapie der Leber, wodurch der GHB-Spiegel in der Peripherie und somit auch in Gänze gesenkt werden könnte.

4.9. Ausblick

Das SSADH-Defizit ist eine angeborene Stoffwechselstörung, die auf einen Gendefekt im *ALDH5A1*-Gen zurückzuführen ist. Dieser Gendefekt beeinträchtigt das Enzym Succinat-Semi-Aldehyd-Dehydrogenase und führt zu einer Akkumulation verschiedener Metaboliten im GABA-Stoffwechselweg. Seit der ersten Entdeckung der Krankheit im Jahre 1981 wurden bis heute eine Vielzahl von pathogenen Varianten weltweit identifiziert, wobei viele dieser Mutationen familienspezifisch sind. Um die Bedeutung des defekten Enzyms und seiner klinischen Folgen mit den vielfältigen Symptomen besser verstehen zu können, wurden die Enzymfunktionen von SSADH bis heute eingehend untersucht und sind Stand aktueller Forschung.

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit zeigen, dass ein Teil der untersuchten Varianten einen Oligomerisierungsdefekt verursachen könnten. Um genauere Aussagen über Fehler im Oligomerisierungsprozess treffen zu können, sollten diesbezüglich weitere Untersuchungen der unterschiedlichen Varianten durchgeführt werden, wobei stabile Transfektionsmodelle wie z.B. das Flp-InTM-System zum Einsatz kommen sollten. Hierbei sollten weiterhin auch mögliche pharmakologische Chaperone für entsprechende Varianten überprüft und identifiziert werden, um personalisierte Therapien entwickeln zu können.

Auch sollten molekulare Veränderungen und ihre Auswirkungen auf die Zellfunktionen wie Redox-Ungleichgewicht, mitochondriale Dysfunktionen und veränderte Ionenströme in neuronalen Zellen weiter erforscht werden. Zusätzlich wäre es wichtig zu verstehen, wie die erhöhten GHB-Werte die neurotoxische Wirkung für den Patienten erzielen.

5. Zusammenfassung

Bei SSADH-Defizit handelt es sich um eine angeborene Stoffwechselstörung, verursacht durch das dysfunktionale Enzym Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase. Durch die reduzierte Aktivität des Enzyms kommt es zu einer Akkumulation von verschiedenen Metaboliten, insbesondere der Neuromodulatoren GABA und GHB. Der Mangel an SSADH führt zu einer gestörten Signalübertragung, welche zu erheblichen Einschränkungen der neurologischen Funktionen führt. Die betroffenen Patienten weisen vom Kindesalter an Entwicklungsverzögerungen auf und sind von geistiger Behinderung in unterschiedlichen Ausprägungen betroffen. Hinzu kommen weitere Symptome wie Ataxie, Autismus sowie epileptische Anfälle. Das klinische Bild ist sehr heterogen, wobei die Symptome unterschiedlich starke Ausprägungen aufweisen. SSADH verstoffwechselt NAD^+ -abhängig Succinat-Semialdehyd irreversibel zu Succinat und ist in den Mitochondrien lokalisiert, wo sich auch die tetramere Struktur des Enzyms ausbildet.

Das Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, inwiefern Mutationen, die in dem Oligomerisierungsbereich des Enzyms vorhanden sind, Einfluss auf das Enzym und dessen Faltung haben. Dafür wurden potenziell pathogene Punktmutationen bei SSADH-Defizit untersucht und deren Einflüsse auf die Expression, Stabilität und Enzymaktivität ermittelt. Die Varianten wurden in verschiedenen Vektoren exprimiert und wiesen kaum Instabilitäten auf. Zwei Varianten, Gly196Asp und Pro194Leu, zeigten ein niedrigeres Expressionslevel als alle anderen untersuchten Varianten auf. Die Aktivität aller untersuchten Varianten war im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert. Dabei wies die Variante Pro182Leu mit 66 % den höchsten Restaktivitätswert auf.

Ein weiterer, wichtiger Aspekt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der Oligomerisierungsfähigkeit einzelner Varianten. Die Oligomerisierung der Varianten in Kombination mit dem Wildtyp konnte für alle untersuchten Varianten bestätigt werden. Die Varianten Gly196Asp und Pro194Leu konnten keine Homo-Oligomere bilden, anders als alle weiteren untersuchten Varianten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Varianten, welche in den Oligomerisierungsbereichen vorkommen, im Gegensatz zu vielen anderen pathogenen Varianten, weniger instabil zu sein scheinen. Diese Varianten könnten somit ein Ziel für Therapeutika wie pharmakologische Chaperone darstellen.

6. Summary

SSADH deficiency is a congenital metabolic disorder caused by the dysfunctional enzyme succinate semialdehyde dehydrogenase. The reduced activity of the enzyme, results in accumulation of various metabolites, especially neuromodulators GABA and GHB. The deficiency of SSADH leads to abnormal neurotransmission, which causes significant limitations of neurological functions in the patients. Affected patients show developmental delays from infancy on, but are affected by developmental delay in varying degrees. Further symptoms such as ataxia, autism and epileptic seizures are also present, but the symptoms of the disease show different degrees of intensity. The enzyme mitochondrial SSADH irreversibly metabolizes succinate semialdehyde to succinate. The precursor polypeptide is synthesized by free ribosomes in the cytosol and subsequently transported to the mitochondrial matrix. The active enzyme forms its tetrameric structure in the mitochondrial matrix.

The purpose of this study was to verify to what extent the mutations that reside in the potential oligomerization domains of SSADH influence the enzyme function. For this purpose, potentially pathogenic SSADH deficiency point mutations residing in the oligomerization domains of the enzyme were investigated and their influences on expression, stability and enzyme activity were determined. The variants were expressed in different vectors and did not show substantial instabilities. Two variants, Gly196Asp and Pro194Leu, showed lower expression levels than all other variants examined. The activity levels of all investigated variants were significantly reduced compared to the wild type SSADH. Among them, the Pro182Leu variant showed the highest residual activity of 66 %.

Another important aspect of this work was the investigation of the oligomerization ability of the individual variants. Oligomerization with the wildtype SSADH was confirmed for each variant. The Gly196Asp and Pro194Leu variants were unable to form homooligomers, different from all other variants examined in this study.

The results of this work show that, unlike many other pathogenic variants, the variants found in the oligomerisation regions appear to be less unstable than many other variants. They may thus represent a potential target for therapeutics such as pharmacological chaperones.

7. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
2-OG	alpha-Ketoglutarat
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung
AK	Antikörper
ALAT	Alanintransaminase
ALDH	Aldehyddehydrogenase
ALDH5A1	Aldehyddehydrogenase 5 Familienmitglied A1
ANOVA	Varianzanalyse
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
Cl ⁻	Chlorid
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRISPR/Cas9	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ associated protein 9
C-terminal	Carboxy-Terminus
Cys	Cystein
DEPC-H ₂ O	Diethyl-Pyrokarbonat-Wasser
DHHA	4,5-Dihydroxyhexansäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetal calf serum (Fetales Kälberserum)
Fib	Fibroblasten

fwd	forward
g	Erdbeschleunigung: 9,81 m/s ²
GABA	Gamma-Aminobutyric acid (Gamma-Aminobuttersäure)
GABA-T	Gamma-Aminobuttersäure-Transaminase
GAD	Glutaminsäuredecarboxylase
GAPDH	Glyceraldehyd 3-phosphat Dehydrogenase
GAT2/3	Gamma-Aminobuttersäure-Transporter
GHB	Gamma-Hydroxybuttersäure
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GLN	Glutamin
GLNT	Glutamin-Transporter
GLS	Glutamin-Synthetase
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
GS	Glutaminase
h	Stunden
HCl	Salzsäure
HEK/HEK 293T	Human embryonic kidney 293 cells (humane, embryonale Nierenzellen)
His	Histidin
HRP	Meerrettichperoxidase
hSSADH	Humane Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase
IF	Immunfluoreszenz
Ile	Isoleucin
K ⁺	Kalium
kB	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB-Agar	Lysogeny broth-Agar
LB-Medium	Lysogeny broth-Medium
Leu	Leucin
M	Molare Masse
mA	Milliampere
Met	Methionin
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MRS	Magnetresonanztomographie
MRT	Magnetresonanztomographie
m-Tor	Mammalian target of Rapamycin (Ziel des Rapamycins im Säugetier)
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
NAD ⁺	Oxidierter Form des Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
NADH	Reduzierter Form des Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid

NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
N-terminal	Amino-Terminus
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pfu-Turbo-Polymerase	Pyrococcus furiosus-Turbo-Polymerase
Pro	Prolin
rev	reverse
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	revolutions per minute
s	Sekunden
SDS	Sodium lauryl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SN1	Glutamin-Transporter
SNP	Single nucleotide polymorphism (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
SOC-Medium	SOB (Super Optimal Broth with glucose) -Medium
SSA	Succinat-Semialdehyd
SSADH	Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase
SSADH-D	Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Defizit
SSAR	Succinat-Semialdehyd-Reduktase
T2-gewichtete Sequenz	Kontrastdarstellung von MRT-Bildern
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBST	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIM-Komplex	translocase of the inner membrane-Komplex
TOM-Komplex	translocase of the outer membrane-Komplex
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
U	Enzymeinheit
UPR	Unfolded protein response
Val	Valin
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem
ΔF	Fluoreszenz/NADH nmol

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überblick der GABAergen Synapse im synaptischen Spalt und der metabolischen Synapse, modifiziert nach Didiášová et al., 2020	6
Abbildung 2: Proteinstruktur von SSADH, eigene Darstellung in Anlehnung an Didiášová et al., 2020	8
Abbildung 3: SSADH-Struktur mit Exons und Introns, eigene Darstellung in Anlehnung an Didiášová et al., 2020	9
Abbildung 4: Proteinstruktur von SSADH mit den untersuchten Varianten, eigene Darstellung in Anlehnung an Didiášová et al., 2020	12
Abbildung 5: Western-Blot von HEK-KO-Zellen nach Transfektion mit pcDNA3-Konstrukten	39
Abbildung 6: Western-Blot von HEK-KO-Zellen nach Transfektion mit SSADH-pEXPR-IBA 103-Konstrukten.....	41
Abbildung 7: Relative SSADH-Aktivität der Varianten in pcDNA3	43
Abbildung 8: SSADH-Expression in Patientenzellen mit Gly533Arg und der c.1015-2A>C Spleiß-Variante	44
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Pulldown-Versuchs, eigene Darstellung ..	45
Abbildung 10: Oligomerisierung der pathogenen Varianten mit Wildtyp-SSADH mittels Pulldown in co-transfizierten HEK-KO-Zellen (1)	46
Abbildung 11: Oligomerisierung der pathogenen Varianten mit Wildtyp-SSADH mittels Pulldown in co-transfizierten HEK-KO-Zellen (2)	48
Abbildung 12: Selbst-Oligomerisierung der pathogenen Varianten mittels Pulldown von co-transfizierten HEK-KO-Zellen (1)	49
Abbildung 13: Selbst-Oligomerisierung der pathogenen Varianten mittels Pulldown von co-transfizierten HEK-KO-Zellen (2)	50
Abbildung 14: Möglichkeiten zur Tetramerbildung, eigene Darstellung	57

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte, Verbrauchsmaterialien und Gefäße.....	13
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien	16
Tabelle 3: Verwendete Lösungen und Puffer.....	19
Tabelle 4: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele.....	21
Tabelle 5: Verwendete Kits.....	21
Tabelle 6: Verwendete Plasmide.....	22
Tabelle 7: Verwendete Mutagenese-Primer für die Vektoren pcDNA3 und pEXPR-IBA 103	22
Tabelle 8: Verwendete Sequenzen zur Mutagenese des hSSADH-Gens innerhalb des Expressionsvektors pEXPR-IBA 103	23
Tabelle 9: Verwendete Bakterienstämme	24
Tabelle 10: Verwendete Zelllinien.....	24
Tabelle 11: Verwendete Antikörper.....	25
Tabelle 12: Pipettierschema des PCR-Ansatzes:	26
Tabelle 13: Temperaturprogramm für die PCR-Reaktion.....	26
Tabelle 14: Pipettierschema des Restriktionsverdaus	27
Tabelle 15: Transfektionsschema.....	30
Tabelle 16: SSADH-Varianten in dem nicht-getaggen Vektor pcDNA3	38
Tabelle 17: SSADH-Varianten in getaggen Vektor pEXPR-IBA 103	40

10. Quellenverzeichnis

- Akaboshi, S., Hogema, B. M., Novelletto, A., Malaspina, P., Salomons, G. S., Maropoulos, G. D., Jakobs, C., Grompe, M. & Gibson, K. M. (2003) „Mutational spectrum of the succinate semialdehyde dehydrogenase (ALDH5A1) gene and functional analysis of 27 novel disease-causing mutations in patients with SSADH deficiency“, *Human Mutation*, Vol. 22, No. 6, S. 442–450.
- Andriamampandry, C., Taleb, O., Viry, S., Muller, C., Humbert, J. P., Gobaille, S., Aunis, D. & Maitre, M. (2003) „Cloning and characterization of a rat brain receptor that binds the endogenous neuromodulator gamma-hydroxybutyrate (GHB)“, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, Vol. 17, No. 12, S. 1691–1693.
- Balch, W. E., Morimoto, R. I., Dillin, A. & Kelly, J. W. (2008) „Adapting proteostasis for disease intervention“, *Science*, Vol. 319, No. 5865, S. 916–919.
- Blasi, P., Boyd, P. P., Ledda, M., Novelletto, A., Gibson, K., Jakobs, C., Hogema, B., Akaboshi, S., Loreni, F. & Malaspina, P. (2002) „Structure of human succinic semialdehyde dehydrogenase gene: identification of promoter region and alternatively processed isoforms“, *Molecular Genetics and Metabolism*, Vol. 76, No. 4, S. 348–362.
- Brennenstuhl, H., Didiasova, M., Assmann, B., Bertoldi, M., Molla, G., Jung-Klawitter, S., Kuseyri Hübschmann, O., Schröter, J., Opladen, T. & Tikkanen, R. (2020) „Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency: In Vitro and In Silico Characterization of a Novel Pathogenic Missense Variant and Analysis of the Mutational Spectrum of ALDH5A1“, *International journal of molecular sciences*, Vol. 21, No. 22.
- Brix, J., Dietmeier, K. & Pfanner, N. (1997) „Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70“, *The Journal of biological chemistry*, Vol. 272, No. 33, S. 20730–20735.
- Cardinal, R. & Bullmore, E. (2011) „Neurodevelopmental disorders and chromosomal abnormalities“, in Cardinal, R. N. & Bullmore, E. T. (Hg.) *The diagnosis of psychosis*, Cambridge, Cambridge University Press, S. 10–15.
- Chambliss, K. L., Caudle, D. L., Hinson, D. D., Moomaw, C. R., Slaughter, C. A., Jakobs, C. & Gibson, K. M. (1995) „Molecular cloning of the mature NAD(+)-dependent succinic semialdehyde dehydrogenase from rat and human. cDNA isolation, evolutionary homology, and tissue expression“, *The Journal of biological chemistry*, Vol. 270, No. 1, S. 461–467.
- Chambliss, K. L., Hinson, D. D., Trettel, F., Malaspina, P., Novelletto, A., Jakobs, C. & Gibson, K. M. (1998) „Two exon-skipping mutations as the molecular basis of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (4-hydroxybutyric aciduria)“, *American journal of human genetics*, Vol. 63, No. 2, S. 399–408.

- Choi, E. J. & Mayo, S. L. (2006) „Generation and analysis of proline mutants in protein G“, *Protein engineering, design & selection : PEDS*, Vol. 19, No. 6, S. 285–289.
- Cortez, M. A., Wu, Y., Gibson, K. M. & Snead, O. C. (2004) „Absence seizures in succinic semialdehyde dehydrogenase deficient mice: a model of juvenile absence epilepsy“, *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, Vol. 79, No. 3, S. 547–553.
- Craig, K., Gomez, H. F., McManus, J. L. & Bania, T. C. (2000) „Severe gamma-hydroxybutyrate withdrawal: a case report and literature review“, *The Journal of Emergency Medicine*, Vol. 18, No. 1, S. 65–70.
- DiBacco, M. L., Pop, A., Salomons, G. S., Hanson, E., Rouillet, J.-B., Gibson, K. M. & Pearl, P. L. (2020) „Novel ALDH5A1 variants and genotype: Phenotype correlation in SSADH deficiency“, *Neurology*, Vol. 95, No. 19, e2675-e2682.
- Didiášová, M., Banning, A., Brennenstuhl, H., Jung-Klawitter, S., Cinquemani, C., Opladen, T. & Tikkanen, R. (2020) „Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency: An Update“, *Cells*, Vol. 9, No. 2, S. 477 [Online]. DOI: 10.3390/cells9020477.
- Dobson, C. M., Šali, A. & Karplus, M. (1998) „Protein Folding: A Perspective from Theory and Experiment“, *Angewandte Chemie International Edition*, Vol. 37, No. 7, S. 868–893.
- Ethofer, T., Seeger, U., Klose, U., Erb, M., Kardatzki, B., Kraft, E., Landwehrmeyer, G. B., Grodd, W. & Storch, A. (2004) „Proton MR spectroscopy in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency“, *Neurology*, Vol. 62, No. 6, S. 1016–1018.
- Finsterer, J. & Frank, M. (2014) *Stoffwechselerkrankungen des Erwachsenen und Epilepsie* [Online], Springer. Verfügbar unter <https://link-springer-com.ezproxy.uni-giessen.de/article/10.1007%2Fs10309-014-0373-3> (Abgerufen am 28 Oktober 2020).
- Gibson, K., Gupta, M., Pearl, P. L., Tuchman, M., Vezina, L., Snead, O., Smit, L. M. & Jakobs, C. (2003) „Significant behavioral disturbances in succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) deficiency (Gamma-Hydroxybutyric aciduria)“, *Biological Psychiatry*, Vol. 54, No. 7, S. 763–768.
- Gibson, K. M., Christensen, E., Jakobs, C., Fowler, B., Clarke, M. A., Hammersen, G., Raab, K., Kobori, J., Moosa, A., Vollmer, B., Rossier, E., Iafolla, A. K., Matern, D., Brouwer, O. F., Finkelstein, J., Aksu, F., Weber, H. P., Bakkeren, J. A., Gabreels, F. J., Bluestone, D., Barron, T. F., Beauvais, P., Rabier, D., Santos, C. & Lehnert, W. (1997) „The clinical phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (4-hydroxybutyric aciduria): case reports of 23 new patients“, *Pediatrics*, Vol. 99, No. 4, S. 567–574 [Online]. DOI: 10.1542/peds.99.4.567.
- Gibson, K. M., Hoffmann, G. F., Hodson, A. K., Bottiglieri, T. & Jakobs, C. (1998) „4-Hydroxybutyric acid and the clinical phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, an inborn error of GABA metabolism“, *Neuropediatrics*, Vol. 29, No. 1, S. 14–22.

- Gibson K.M., J. C. (2001) „Disorders of beta- and alpha-amino acids in free and peptide-linked forms“, *Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D., Childs B., Kinzler K.W., Vogelstein B., editors. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 8th ed. McGraw-Hill; New York, NY, USA, S. 2079–2105.*
- Golic, K. G. & Lindquist, S. (1989) „The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the drosophila genome“, *Cell*, Vol. 59, No. 3, S. 499–509.
- Gordon, N. (2004) „Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (SSADH) (4-hydroxybutyric aciduria, gamma-hydroxybutyric aciduria)“, *European journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society*, Vol. 8, No. 5, S. 261–265.
- Gropman, A. (2003) „Vigabatrin and newer interventions in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency“, *Annals of neurology*, 54 Suppl 6, S66-72.
- Gross-Tsur, V., Banin, E., Shahar, E., Shalev, R. S. & Lahat, E. (2000) „Visual impairment in children with epilepsy treated with vigabatrin“, *Annals of neurology*, Vol. 48, No. 1, S. 60–64.
- Gupta, M., Jansen, E. E. W., Senephansiri, H., Jakobs, C., Snead, O. C., Grompe, M. & Gibson, K. M. (2004) „Liver-directed adenoviral gene transfer in murine succinate semialdehyde dehydrogenase deficiency“, *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, Vol. 9, No. 4, S. 527–539.
- Hempel, J., Nicholas, H. & Lindahl, R. (1993) „Aldehyde dehydrogenases: widespread structural and functional diversity within a shared framework“, *Protein science : a publication of the Protein Society*, Vol. 2, No. 11, S. 1890–1900.
- Hoffmann, G. & Grau, A. (2004) *Stoffwechselerkrankungen in der Neurologie* [Online], s.l., THIEME. Verfügbar unter <http://ebooks.thieme.de/9783131363213/1>.
- Huang, J. T., Xing, D. J. & Huang, W. (2012) „Relationship between protein folding kinetics and amino acid properties“, *Amino acids*, Vol. 43, No. 2, S. 567–572.
- Jadiya, P. & Tomar, D. (2020) „Mitochondrial Protein Quality Control Mechanisms“, *Genes*, Vol. 11, No. 5, S. 563 [Online]. DOI: 10.3390/genes11050563.
- Jansen, E. E. W., Verhoeven, N. M., Jakobs, C., Schulze, A., Senephansiri, H., Gupta, M., Snead, O. C. & Gibson, K. M. (2006) „Increased guanidino species in murine and human succinate semialdehyde dehydrogenase (SSADH) deficiency“, *Biochimica et biophysica acta*, Vol. 1762, No. 4, S. 494–498.
- Kaupmann, K., Cryan, J. F., Wellendorph, P., Mombereau, C., Sansig, G., Klebs, K., Schmutz, M., Froestl, W., van der Putten, H., Mosbacher, J., Bräuner-Osborne, H., Waldmeier, P. & Bettler, B. (2003) „Specific gamma-hydroxybutyrate-binding sites but loss of pharmacological effects of gamma-hydroxybutyrate in GABA(B)(1)-deficient mice“, *The European journal of neuroscience*, Vol. 18, No. 10, S. 2722–2730.

- Kim, K.-J., Pearl, P. L., Jensen, K., Snead, O. C., Malaspina, P., Jakobs, C. & Gibson, K. M. (2011) „Succinic semialdehyde dehydrogenase: biochemical-molecular-clinical disease mechanisms, redox regulation, and functional significance“, *Antioxidants & redox signaling*, Vol. 15, No. 3, S. 691–718.
- Kim, Y.-G., Lee, S., Kwon, O.-S., Park, S.-Y., Lee, S.-J., Park, B.-J. & Kim, K.-J. (2009) „Redox-switch modulation of human SSADH by dynamic catalytic loop“, *The EMBO journal*, Vol. 28, No. 7, S. 959–968.
- Kinjo, A. R. & Takada, S. (2003) „Competition between Protein Folding and Aggregation with Molecular Chaperones in Crowded Solutions: Insight from Mesoscopic Simulations“, *Biophysical Journal*, Vol. 85, No. 6, S. 3521–3531.
- Knerr, I., Gibson, K. M., Jakobs, C. & Pearl, P. L. (2008) „Neuropsychiatric morbidity in adolescent and adult succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency patients“, *CNS spectrums*, Vol. 13, No. 7, S. 598–605.
- Lakhani, R., Vogel, K. R., Till, A., Liu, J., Burnett, S. F., Gibson, K. M. & Subramani, S. (2014) „Defects in GABA metabolism affect selective autophagy pathways and are alleviated by m TOR inhibition“, *EMBO Molecular Medicine*, Vol. 6, No. 4, S. 551–566.
- Lapalme-Remis, S., Lewis, E. C., Meulemeester, C. de, Chakraborty, P., Gibson, K. M., Torres, C., Guberman, A., Salomons, G. S., Jakobs, C., Ali-Ridha, A., Parviz, M. & Pearl, P. L. (2015) „Natural history of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency through adulthood“, *Neurology*, Vol. 85, No. 10, S. 861–865.
- Latini, A., Scussiato, K., Leipnitz, G., Gibson, K. M. & Wajner, M. (2007) „Evidence for oxidative stress in tissues derived from succinate semialdehyde dehydrogenase-deficient mice“, *Journal of inherited metabolic disease*, Vol. 30, No. 5, S. 800–810.
- Lenders, M., Stappers, F., Niemietz, C., Schmitz, B., Boutin, M., Ballmaier, P. J., Zibert, A., Schmidt, H., Brand, S.-M., Auray-Blais, C. & Brand, E. (2019) „Mutation-specific Fabry disease patient-derived cell model to evaluate the amenability to chaperone therapy“, *Journal of medical genetics*, Vol. 56, No. 8, S. 548–556.
- Mahdieh, N. & Rabbani, B. (2013) „An overview of mutation detection methods in genetic disorders“, *Iranian Journal of Pediatrics*, Vol. 23, No. 4, S. 375–388.
- Malaspina, P., Rouillet, J.-B., Pearl, P. L., Ainslie, G. R., Vogel, K. R. & Gibson, K. M. (2016) „Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (SSADHD): Pathophysiological complexity and multifactorial trait associations in a rare monogenic disorder of GABA metabolism“, *Neurochemistry international*, Vol. 99, S. 72–84.
- Mayr, J. A., Feichtinger, R. G., Achleitner, M. T., Brugger, K., Kutsam, K., Spenger, J., Koch, J., Hofbauer, P., Lagler, F. B., Sperl, W., Weghuber, D. & Wortmann, S. B. (2021) „Molekulare Medizin: Pathobiochemie als Schlüssel zur personalisierten Therapie vererbter

- Krankheiten“, *Monatsschrift Kinderheilkunde : Organ der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde*, S. 1–8.
- Menduti, G., Biamino, E., Vittorini, R., Vesco, S., Puccinelli, M. P., Porta, F., Capo, C., Leo, S., Ciminelli, B. M., Iacovelli, F., Spada, M., Falconi, M., Malaspina, P. & Rossi, L. (2018) „Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: The combination of a novel ALDH5A1 gene mutation and a missense SNP strongly affects SSADH enzyme activity and stability“, *Molecular Genetics and Metabolism*, Vol. 124, No. 3, S. 210–215 [Online].
DOI: 10.1016/j.ymgme.2018.05.006.
- Mussche, S., Devreese, B., Nagabhushan Kalburgi, S., Bachaboina, L., Fox, J. C., Shih, H.-J., van Coster, R., Samulski, R. J. & Gray, S. J. (2013) „Restoration of cytoskeleton homeostasis after gigaxonin gene transfer for giant axonal neuropathy“, *Human gene therapy*, Vol. 24, No. 2, S. 209–219.
- Niemi, A.-K., Brown, C., Moore, T., Enns, G. M. & Cowan, T. M. (2014) „Evidence of redox imbalance in a patient with succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency“, *Molecular genetics and metabolism reports*, Vol. 1, S. 129–132.
- Parviz, M., Vogel, K., Gibson, K. M. & Pearl, P. L. (2014) „Disorders of GABA metabolism: SSADH and GABA-transaminase deficiencies“, *Journal of pediatric epilepsy*, Vol. 3, No. 4, S. 217–227.
- Pearl, P. L., Capp, P. K., Novotny, E. J. & Gibson, K. M. (2005) „Inherited disorders of neurotransmitters in children and adults“, *Clinical biochemistry*, Vol. 38, No. 12, S. 1051–1058.
- Pearl, P. L. & Gibson, K. M. (2004) „Clinical aspects of the disorders of GABA metabolism in children“, *Current opinion in neurology*, Vol. 17, No. 2, S. 107–113.
- Pearl, P. L., Gibson, K. M., Acosta, M. T., Vezina, L. G., Theodore, W. H., Rogawski, M. A., Novotny, E. J., Gropman, A., Conry, J. A., Berry, G. T. & Tuchman, M. (2003) „Clinical spectrum of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency“, *Neurology*, Vol. 60, No. 9, S. 1413–1417.
- Pearl, P. L., Gibson, K. M., Cortez, M. A., Wu, Y., Carter Snead, O., Knerr, I., Forester, K., Pettiford, J. M., Jakobs, C. & Theodore, W. H. (2009) „Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: lessons from mice and men“, *Journal of inherited metabolic disease*, Vol. 32, No. 3, S. 343–352.
- Pearl, P. L. & Gospe, S. M. (2007) „Pyridoxal phosphate dependency, a newly recognized treatable catastrophic epileptic encephalopathy“, *Journal of inherited metabolic disease*, Vol. 30, No. 1, S. 2–4.
- Pearl, P. L., Hartka, T. R. & Taylor, J. (2006) „Diagnosis and treatment of neurotransmitter disorders“, *Current treatment options in neurology*, Vol. 8, No. 6, S. 441–450.

- Pearl, P. L., Novotny, E. J., Acosta, M. T., Jakobs, C. & Gibson, K. M. (2003) „Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency in children and adults“, *Annals of neurology*, 54 Suppl 6, S73-80.
- Pearl, P. L., Parviz, M., Vogel, K., Schreiber, J., Theodore, W. H. & Gibson, K. M. (2015) „Inherited disorders of gamma-aminobutyric acid metabolism and advances in ALDH5A1 mutation identification“, *Developmental medicine and child neurology*, Vol. 57, No. 7, S. 611–617.
- Pearl, P. L., Schreiber, J., Theodore, W. H., McCarter, R., Barrios, E. S., Yu, J., Wiggs, E., He, J. & Gibson, K. M. (2014) „Taurine trial in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency and elevated CNS GABA“, *Neurology*, Vol. 82, No. 11, S. 940–944.
- Pearl, P. L., Taylor, J. L., Trzcinski, S. & Sokohl, A. (2007) „The pediatric neurotransmitter disorders“, *Journal of child neurology*, Vol. 22, No. 5, S. 606–616.
- Philippe, A., Deron, J., Geneviève, D., Lonlay, P. de, Gibson, K. M., Rabier, D. & Munnich, A. (2004) „Neurodevelopmental pattern of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (gamma-hydroxybutyric aciduria)“, *Developmental medicine and child neurology*, Vol. 46, No. 8, S. 564–568.
- Phillip L Pearl, Natrujee Wiwattanadittakul, Jean-Baptiste Rouillet & K Michael Gibson (2016) „Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency“, in Pearl, P. L., Wiwattanadittakul, N., Rouillet, J.-B. & Gibson, K. M. (Hg.) *GeneReviews® [Internet]*, University of Washington, Seattle.
- Pop, A., Smith, D. E. C., Kirby, T., Walters, D., Gibson, K. M., Mahmoudi, S., van Dooren, S. J. M., Kanhai, W. A., Fernandez-Ojeda, M. R., Wever, E. J. M., Koster, J., Waterham, H. R., Grob, B., Roos, B., Wamelink, M. M. C., Chen, J., Natesan, S. & Salomons, G. S. (2020) „Functional analysis of thirty-four suspected pathogenic missense variants in ALDH5A1 gene associated with succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency“, *Molecular Genetics and Metabolism*, Vol. 130, No. 3, S. 172–178 [Online]. DOI: 10.1016/j.ymgme.2020.04.004.
- Ringe, D. & Petsko, G. A. (2009) „What are pharmacological chaperones and why are they interesting?“, *Journal of biology*, Vol. 8, No. 9, S. 80.
- Sauer, B. (1994) „Site-specific recombination: developments and applications“, *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 5, No. 5, S. 521–527.
- Schaeffer, R. D. & Daggett, V. (2011) „Protein folds and protein folding“, *Protein engineering, design & selection : PEDS*, Vol. 24, 1-2, S. 11–19.
- Schmidt, T. G. M., Batz, L., Bonet, L., Carl, U., Holzapfel, G., Kiem, K., Matulewicz, K., Niermeier, D., Schuchardt, I. & Stanar, K. (2013) „Development of the Twin-Strep-tag® and its application for purification of recombinant proteins from cell culture supernatants“, *Protein Expression and Purification*, Vol. 92, No. 1, S. 54–61.

- Suzuki, Y., Ogawa, S. & Sakakibara, Y. (2009) „Chaperone therapy for neuronopathic lysosomal diseases: competitive inhibitors as chemical chaperones for enhancement of mutant enzyme activities“, *Perspectives in medicinal chemistry*, Vol. 3, S. 7–19.
- Tillakaratne, N. J., Medina-Kauwe, L. & Gibson, K. (1995) „Gamma-aminobutyric acid (GABA) metabolism in mammalian neural and nonneural tissues“, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, Vol. 112, No. 2, S. 247–263.
- Trendelenburg, G. & Ströhle, A. (2005) „Gamma-hydroxybuttersäure--Neurotransmitter, Medikament und Droge“, *Der Nervenarzt*, Vol. 76, No. 7, 832, 834-8.
- Vogel, K. R., Ainslie, G. R., Walters, D. C., McConnell, A., Dhamne, S. C., Rotenberg, A., Rouillet, J.-B. & Gibson, K. M. (2018) „Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, a disorder of GABA metabolism: an update on pharmacological and enzyme-replacement therapeutic strategies“, *Journal of inherited metabolic disease*, Vol. 41, No. 4, S. 699–708.
- Vogel, K. R., Pearl, P. L., Theodore, W. H., McCarter, R. C., Jakobs, C. & Gibson, K. M. (2013) „Thirty years beyond discovery--clinical trials in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, a disorder of GABA metabolism“, *Journal of inherited metabolic disease*, Vol. 36, No. 3, S. 401–410.
- Wang, P., Cai, F., Cao, L., Wang, Y., Zou, Q., Zhao, P., Wang, C., Zhang, Y., Cai, C. & Shu, J. (2019) „Clinical diagnosis and mutation analysis of four Chinese families with succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency“, *BMC medical genetics*, Vol. 20, No. 1, S. 88.
- Wiechers, L., Samanta, A. & Nagel-Wolfrum, K. (2017) „Das Überlesen von Nonsense-Mutationen“, *medizinische Genetik*, Vol. 29, No. 2, S. 217–224.
- Yalçinkaya, C., Gibson, K. M., Gündüz, E., Koçer, N., Fiçicioğlu, C. & Küçükercan, I. (2000) „MRI findings in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency“, *Neuropediatrics*, Vol. 31, No. 1, S. 45–46.
- Ziyeh, S., Berlis, A., Korinthenberg, R., Spreer, J. & Schumacher, M. (2002) „Selective involvement of the globus pallidus and dentate nucleus in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency“, *Pediatric radiology*, Vol. 32, No. 8, S. 598–600.
- Zymancyk, A.-M. (2021) *Therapieansätze für Nonsense-Mutationen bei Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Defizit*, Dissertation, Gießen, Justus-Liebig-Universität.

11. Internetquellen

Aldehyde dehydrogenase 5-A1/SSADH/ALDH5A1 Antikörper (D-3), Santa Cruz,

Online im Internet: URL: <https://www.scbt.com/p/aldh5a1-antibody-d-3> (Stand: 12.09.2021, Aufgerufen am: 12.09.2021)

ALDH5A1 - Succinate-semialdehyde dehydrogenase (UniProtKB-P51649), Online im

Internet: URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/P51649> (Stand: 02.06.2021, Aufgerufen am: 08.10.2021)

Flp-In System: For Generating Constitutive Expression Cell Lines, Thermo Fisher

Scientific, Online im Internet: URL:

<https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/protocols/proteins-expression-isolation-and-analysis/protein-expression-protocol/flp-in-system-for-generating-constitutive-expression-cell-lines.html> (Stand: 22.08.2021, Aufgerufen am 22.08.2021)

Recombinant Anti-ALDH5A1/SSADH antibody [EPR7794] (ab129017), Abcam,

Online im Internet: URL: <https://www.abcam.com/aldh5a1ssadh-antibody-epr7794-ab129017.html> (Stand: 12.09.2021, Aufgerufen am: 12.09.2021)

VCV000959632.3 – ClinVar, NCBI, Online im Internet: URL:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/959632/> (Stand: 28.08.2021, Aufgerufen am: 28.08.2021)

12. Erklärung zur Dissertation

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. 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 an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Obertshausen, 26.01.2022

Ort, Datum

Unterschrift

13. Danksagung

Diese Dissertation wurde zwar selbständig angefertigt, jedoch wäre das nicht möglich gewesen ohne die Unterstützung von vielen großartigen Menschen, bei denen ich mich hiermit bedanken möchte.

An erster Stelle gilt mein Dank meiner Doktormutter Prof. Dr. Ritva Tikkanen. Danke für alle erklärenden Gespräche, Aufmunterungen nach nicht geglückten Versuchen, die Erreichbarkeit und schnellen Rückmeldungen per Telefon und E-Mail oder das stets offene Ohr während unserer gemeinsamen Zeit im Labor – ich hätte mir keine bessere Doktormutter vorstellen können!

Darüber hinaus möchte ich mich bei der gesamten AG Tikkanen für die großartige, gemeinsame Zeit im Labor bedanken. Besonderem Dank gilt dabei Dr. Antje Bannig, Dr. Miroslava Didiasova und PD Dr. Anna Zakrewicz, Ralf Füllkrug und Simone Kegel für die fachliche Betreuung im Labor sowie für den wissenschaftlichen Austausch, den schönen, die Wartezeiten überbrückenden Gesprächen bei einem Kuchen oder bei einem prickelndem Kaltgetränk nach Feierabend. Auch möchte ich mich bei meinen Mitdoktoranden Alice Zymaczyk, Ralph Orzyck und Aileen Ritter bedanken, denn das gegenseitige Unterstützen und die konstruktiven Kaffeepausen haben mir die Arbeit im Labor enorm vereinfacht. Die daraus entstandenen Freundschaften bleiben hoffentlich noch lange bestehen.

Besonderer Dank gilt auch Lukas Hoeren für das Teilhabenlassen an seinem fachlichen Wissen und die vielen konstruktiven Diskussionen. Sara Albrecht danke ich für unsere lange Freundschaft, welche auch nicht durch das Korrekturlesen dieser Arbeit erschüttert werden konnte.

Meiner gesamten Familie – in Bremen, als auch in Obertshausen - möchte ich dafür danken, dass sie stets an mich geglaubt und mich bestärkt hat. Ohne die vielen motivierenden Telefonate und Gespräche, wären die letzten 2 Jahre deutlich härter geworden.

Abschließend möchte ich meinem Partner Philip danken. Durch seinen Rückhalt und seine Unterstützung war es mir möglich, mich vollends auf diese Arbeit zu konzentrieren. Seine Geduld, sein Verständnis und die vielen Motivationen haben mir unglaublich viel geholfen.