

Aus dem Institut für Experimentelle Endokrinologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

## DISSERTATION

Genetische Untersuchungen der Selenoproteinbiosynthese bei Kindern mit  
unbehandelbarer Epilepsie

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

von

Alexandra Mihalache

aus Bukarest (Rumänien)

Gutachter: 1. Prof. Dr. J. Köhrle  
2. Prof. Dr. R. Brigelius-Flohé  
3. Priv.-Doz. Dr. med. habil. St. Gromer

Datum der Promotion: 28.09.2007

## **Inhaltsverzeichnis:**

<b>Abkürzungsverzeichnis und Nomenklatur .....</b>	<b>IV</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Bedeutung von Selen für Säugetiere .....</b>	<b>1</b>
<i>1.1.1 Selenocystein - die 21. Aminosäure .....</i>	<i>1</i>
<i>1.1.2 Selenoproteine .....</i>	<i>3</i>
<i>1.1.3 Selenmangel .....</i>	<i>6</i>
<b>1.2 Fälle von kindlicher Epilepsie assoziiert mit Selenmangel .....</b>	<b>9</b>
<i>1.2.1 Klinisches Bild und Diagnostik .....</i>	<i>9</i>
<i>1.2.2 Therapieansatz und Verlauf .....</i>	<i>10</i>
<b>1.3 Überblick über den Selenstoffwechsel .....</b>	<b>11</b>
<i>1.3.1 Selenaufnahme und Selenumwandlung .....</i>	<i>11</i>
<i>1.3.2 Selenocystein-<math>\beta</math>-Lyase .....</i>	<i>13</i>
<i>1.3.3 Selenocystein-Elongationsfaktor .....</i>	<i>13</i>
<i>1.3.4 SECIS Binding Protein .....</i>	<i>15</i>
<i>1.3.5 RPL30 .....</i>	<i>16</i>
<i>1.3.6 Selenoprotein P .....</i>	<i>17</i>
<i>1.3.7 Überblick: Einbau und Wiederverwertung des essentiellen                 Spurenelements Selen .....</i>	<i>19</i>
<b>1.4 Hypothese und Zielsetzung .....</b>	<b>20</b>

<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>21</b>
2.1.1 <i>Proben zur DNA-Analytik .....</i>	21
2.1.2 <i>Verwendete Materialien, Chemikalien und Geräte .....</i>	22
2.1.2.1 Allgemeines .....	22
2.1.2.2 Enzyme .....	22
2.1.2.3 „Kits“ .....	22
2.1.2.4 Lösungen und Puffer .....	23
2.1.2.5 Geräte .....	23
2.1.3 <i>DNA-Oligonukleotide .....</i>	24
<b>2.2 Methoden .....</b>	<b>32</b>
2.2.1 <i>DNA-Extraktion aus Leukozyten .....</i>	32
2.2.1.1 Durchführung der Extraktion .....	32
2.2.1.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung, Verdünnung und Lagerung .....	32
2.2.2 <i>Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....</i>	33
2.2.2.1 Allgemeines .....	33
2.2.2.2 Optimierung der PCR-Bedingungen .....	34
2.2.2.3 Prüfung durch Gelelektrophorese .....	36
2.2.3 <i>Sequenzierung .....</i>	36
2.2.3.1 Allgemeines .....	36
2.2.3.2 Enzymatische Aufreinigung der PCR-Produkte .....	36
2.2.3.3 Sequenzierungsreaktion .....	37
2.2.3.4 Aufreinigung und Fluoreszenzmessung .....	38
2.2.3.5 Auswertung .....	38

<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>40</b>
	<b>2.3 EFSEC .....</b>	<b>40</b>
	2.3.1 <i>Produkt 1</i> .....	41
	2.3.2 <i>Produkt 4</i> .....	41
	2.3.3 <i>Produkt 7</i> .....	42
	<b>2.4 SBP2 .....</b>	<b>43</b>
	2.4.1 <i>Produkt 1</i> .....	44
	2.4.2 <i>Produkt 16</i> .....	45
	<b>2.5 RPL30 .....</b>	<b>45</b>
	2.5.1 <i>Produkt 4</i> .....	46
	<b>2.6 SEPP .....</b>	<b>46</b>
	2.6.1 <i>Produkt 5.1</i> .....	48
	2.6.2 <i>Produkt 5.2</i> .....	48
	2.6.3 <i>Produkt 5.4</i> .....	48
	<b>2.7 SCLY .....</b>	<b>49</b>
	2.7.1 <i>Produkt 5</i> .....	50
	2.7.2 <i>Produkt 8</i> .....	52
	2.7.3 <i>Produkt 12</i> .....	52
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>53</b>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>60</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURLISTE .....</b>	<b>62</b>

## Abkürzungsverzeichnis und Nomenklatur

Für die Schreibweise von Genen und Proteinen beim Menschen wurde folgende Regel verwendet:

Bei Proteinnamen wurde der jeweils erste Buchstabe groß geschrieben, bei Gennamen sämtliche Buchstaben.

A	Adenin
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	„complementary DNA“
CK	Creatinkinase
CT	Computertomogramm
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEG	Elektroenzephalogramm
EFSec	Selenocystein-Elongationsfaktor
Exo	Exonuklease
fwd	„forward“ (Hinstrang der DNA)
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
GPx	Glutathionperoxidase
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
KO	„Knock out“ (induzierte Deletion in der DNA)
Min	Minute(n)
mRNA	„messenger RNA“
MRT	Magnetresonanztomogramm

PCR	Polymerasekettenreaktion
PNDC	„Progressive Neuronal Degeneration of Childhood“
rev	„reverse“ (Rückstrang der DNA)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„rounds per minute“
SAP	Shrimp Alkalische Phosphatase
SBP2	SECIS-bindendes Protein
Scly	Selenocystein- $\beta$ -Lyase
SECIS	Selenocystein-Insertionselement
SePP	Selenoprotein P
T	Thymin
TAE	Tris-Acetyl-EDTA
TE	Tris-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
UV	ultraviolett
V	Volt
VEP	visuell evozierte Potentiale

## **Danksagung**

Herzlichen Dank an

Herrn Prof. Dr. J. Köhrle für die Überlassung des Themas, Durchsicht und Begutachtung des Manuskriptes

Herrn Dr. V. T. Ramaekers, Pädiatrische Neurologie der Universitätsklinik Aachen, für die freundliche Überlassung der Blutproben

den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Nürnberg und Prof. Dr. Hübner, Max-Delbrück-Zentrum in Berlin-Buch, für die Bereitstellung des Sequencers und technische Unterstützung bei Aufreinigung und Sequenzierung der Proben

Frau V. Seher, A. Kinne, A. Kunze und allen anderen Mitarbeitern des Instituts für technische Anleitung, Unterstützung und Motivation

Frau A. Ahlendorf für die Zusammenarbeit bei der Etablierung der Methoden, Materialaufbereitung und Auswertung der Ergebnisse

Herrn Dr. L. Schomburg für lehrreiche Diskussionen, Unterstützung bei der Literaturrecherche und bei der graphischen Ausgestaltung der Arbeit

und ganz besonders

Herrn Dr. U. Schweizer für Betreuung, Unterstützung, konstruktive Kritik und vieles mehr.

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

## **Erklärung**

„Ich, Alexandra Mihalache, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Genetische Untersuchungen der Selenoproteinbiosynthese bei Kindern mit unbehandelbarer Epilepsie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 28.09.2007