

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:

Abkürzungsverzeichnis und Nomenklatur	IV
1. EINLEITUNG	1
1.1 Bedeutung von Selen für Säugetiere	1
<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>
1.2 Fälle von kindlicher Epilepsie assoziiert mit Selenmangel	9
<i>1.2.1 Klinisches Bild und Diagnostik</i>	<i>9</i>
<i>1.2.2 Therapieansatz und Verlauf</i>	<i>10</i>
1.3 Überblick über den Selenstoffwechsel	11
<i>1.3.1 Selenaufnahme und Selenumwandlung</i>	<i>11</i>
<i>1.3.2 Selenocystein-β-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>
1.4 Hypothese und Zielsetzung	20

2. MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 Material	21
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
2.2 Methoden	32
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

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

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- β -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