

Aus dem Institut für Physiologie der Universitätsklinik Tübingen

Abteilung Physiologie I

Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. F. Lang

**Untersuchungen zur Pathophysiologie der Cystinurie Typ I:  
Charakterisierung der hrBAT Mutationen R365W und F648S**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der medizinischen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Simone Christine Kaltenbach

aus

Albstadt-Ebingen

2002

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang

2. Berichterstatter: Professor Dr. D. Wilbert

Meinen Eltern gewidmet



## Inhaltsverzeichnis:

### I Einleitung 8

#### I.1 Aminosäuren 8

#### I.2.Aminosäuretransporter 9

##### I.2.1.funktionelle und strukturelle Eigenschaften 9

##### I.2.2 Heterodimere Aminosäuretransporter 10

##### I.2.2.1 Die leichten Ketten 10

##### I.2.2.2 Die schweren Ketten rBAT und 4F2hc 11

##### I.2.2.3 Klinische Relevanz der heterodimeren Aminosäuretransporter 12

#### I.3 rBAT (related to $b^{0,+}$ amino acid transport) 13

##### I.3.1 Vorkommen und Struktur des rBAT Proteins 14

##### I.3.2 Funktion und physiologische Rolle von rBAT 16

#### I.4 Cystinurie 17

##### I.4.1 Definition 17

##### I.4.2 Subtypen der Cystinurie 19

##### I.4.3 Physiologie und Pathophysiologie des Transportes von Cystin und dibasischen Aminosäuren 20

#### I.5 Die molekulare Genetik von Cystinurie 21

##### I.5.1 Funktionelle Eigenschaften der hrBAT Mutation M467T / K 22

##### I.5.2 Mutationen des $b^{0,+}$ AT 23

##### I.5.3 Die hrBAT Mutationen R365W und F648S 23

#### I.6 *Xenopus laevis* Oozyten als Expressionssystem 24

#### I.7 Fragestellung der Arbeit 25

### II Material und Methoden 26

#### II.1 Lösungen 26

##### II.1.1 96 Mm Natrium (ND 96) 26

##### II.1.2 100mM NMDG ( $Na^+$ -frei) 26

##### II.1.3 ND 96-Oozytenaufbewahrungslösung 27

##### II.1.4 OR $2^+$ (Calcium-frei) 28

##### II.1.5 Weitere verwendete Substanzen 28

#### II.2 Oozytenpräparation 29

#### II.3 cRNA-Injektion 29

#### II.4 Elektrophysiologische Methoden 30

II.4.1 Zwei Elektroden Voltage Clamp (TEVC) 30  
II.4.2. Versuchsdurchführung 31

II.5 Tracer Flux Messungen 32

II.5.1 Uptake Messungen 33

II.5.2 Efflux Messungen 33

II.6 Auswertung und Statistik 34

III. Versuche und Ergebnisse 36

III.1 Elektrogene Eigenschaft des hrBAT Wildtyps und seiner Mutationen R365W und F648S 36

III.2 Expression und Expressionsverlauf 37

III.2.1 Expression der hrBAT Mutation R365W 37

III.2.1.1 Expression des Leucinstromes 37

III.2.1.2 Expression des Argininstromes 38

III.2.2 Expression der hrBAT Mutation F648S 40

III.2.2.1 Expression des Leucinstromes 40

III.2.2.2 Expression des Argininstromes 41

III.3 Konzentrationsabhängiger Expressionsverlauf 42

III.3.1 hrBAT Wildtyp 43

III.3.1.1 Expression des Leucinstromes 43

III.3.1.2 Expression des Argininstromes 44

III.3.2 hrBAT Mutation R365W 45

III.3.2.1 Expression des Leucinstromes 45

III.3.2.2 Expression des Argininstromes 46

III.3.3 hrBAT Mutation F648S 47

III.3.3.1 Expression des Leucinstromes 47

III.3.3.2 Expression des Argininstromes 48

III.4 Charakterisierung des Transportes einzelner Aminosäuren durch die hrBAT Mutationen R365W und F648S 49

III.4.1 Eigenschaften des Aminosäuretransport durch R365W 51

III.4.1.1 neutrale Aminosäuren 51

a) Phenylalanin 51

b) Leucin 52

c) Cystin 53

d) Cystein 54

III.4.1.2 dibasische Aminosäuren 55

a) Arginin 55

b) Histidin 56

c) Ornithin 57

d) Lysin 58

III.4.2	Eigenschaften des Aminosäuretransportes durch F648S	59
III.4.2.1	neutrale Aminosäuren	59
a)	Phenylalanin	59
b)	Leucin	60
c)	Cystin	61
d)	Cystein	62
III.4.2.2	dibasische Aminosäuren	63
a)	Arginin	63
b)	Histidin	64
c)	Ornithin	65
d)	Lysin	66
III.5	Spannungsabhängigkeit	67
III.5.1	Die hrBAT Mutation R365W	68
III.5.2	Die hrBAT Mutation F648S	69
III.6	Intrazelluläre Vorbeladung des hrBAT Wildtypes und der hrBAT Mutationen R365W und F648S	70
III.6.1	Vorbeladung der hrBAT Mutation R365W	70
III.6.1.1	Vorbeladung mit einer neutralen Aminosäuren (Leucin)	70
III.6.1.2	Vorbeladung mit einer dibasischen Aminosäuren (Arginin)	71
III.6.2	Vorbeladung der hrBAT Mutation F648S	72
III.6.2.1	Vorbeladung mit einer neutralen Aminosäuren (Leucin)	72
III.6.2.2	Vorbeladung mit einer dibasischen Aminosäuren (Arginin)	73
III.7	Untersuchung der Austauschfunktion der hrBAT Mutation R365W mit Tracer-Flux-Messungen	74
III.7.1	Argininaufnahme durch die hrBAT Mutation R365W	74
III.7.2	Leucinaufnahme durch die hrBAT Mutation R365W	75
<b>IV.</b>	<b><u>Interpretation und Diskussion</u></b>	<b>77</b>
IV.1	Fehlerdiskussion	77
IV.1.1	<i>Xenopus laevis</i> Oozyten als Expressionssystem	77
IV.1.2	Oozytenpräparation	78
IV.1.3	Lösungen	78
IV.1.4	Geräte	79
IV.1.5	Auswertung	79
IV.2	Funktionelle Charakterisierung der hrBAT Mutationen R365W und F648S	80
IV.2.1	Expressionsverhalten der hrBAT Mutationen R365W und F648S	80
IV.2.2	Kinetische Studien für neutrale und dibasische Aminosäuren	82
IV.2.3	Austauschfunktion	84
IV.2.3.1	Veränderung des Austauschmodus durch die hrBAT Mutation R365W	84
IV.2.3.2	Mechanismus des veränderten Austauschmodus	86

IV.3 hrBAT als funktionelle Untereinheit des heterodimeren  
Aminosäuretransporters b<sup>0+</sup> 88

IV.4 Erklärungsmodelle der Pathomechanismen für die hrBAT Mutationen  
R365W und F648S bei der Typ I Cystinurie 88

V. Zusammenfassung 93

VI. Literaturverzeichnis 96

VII. Danksagung 108

VIII. Lebenslauf 109

# I Einleitung

## I.1 Aminosäuren

### I.1.1 Vorkommen und Funktion

Aminosäuren besitzen im Stoffwechsel der Zellen viele verschiedene wichtige Funktionen. Die 20 proteinogenen Aminosäuren sind die Grundbausteine für die Biosynthese der Proteine, die den bedeutendsten Anteil an organischen Makromolekülen von Zellen, Geweben und Organen darstellen. Nach groben Schätzungen enthält der menschliche Organismus über 50000 verschiedene Proteine. Ebenso sind Aminosäuren Stickstoff- bzw. Aminogruppendonatoren bei der Biosynthese anderer stickstoffhaltiger Verbindungen wie Purinen und Pyrimidinen und spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Glukosehaushaltes im Organismus. Nicht zuletzt wirken Aminosäuren im ZNS als exzitatorische und inhibitorische Neurotransmitter. Wie bei fast allen Körperbausteinen mit Ausnahme der Desoxyribonukleinsäuren, besteht auch bei den Proteinen ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau. Die Halbwertszeit der einzelnen Proteine schwankt zwischen Minuten und Stunden bei einigen Enzymen, Tage bis Wochen bei einigen Plasmaproteinen und Monate bei Strukturproteinen wie dem Kollagen (72).

Die meisten Aminosäuren können vom menschlichen Organismus selbst synthetisiert werden, mit Ausnahme der neun essentiellen Aminosäuren, Lysin, Methionin, Threonin, Isoleucin, Valin, Leucin, Phenylalanin, Tryptophan und Histidin. Der menschliche Organismus ist daher darauf angewiesen, dass diese Aminosäuren in ausreichendem Maße mit der Nahrung zugeführt werden (72).

Im Dünndarm, aber auch in allen anderen Geweben des Körpers wie Niere, Leber, Gehirn oder Muskulatur gewährleisten und kontrollieren Aminosäuretransporter die Aufnahme und den Austausch dieser ionischen Nährstoffe zwischen Blut und Gewebe (90).

## I.2. Aminosäuretransporter

### I.2.1 funktionelle und strukturelle Eigenschaften

Der Transfer der Aminosäuren durch die hydrophobe Domäne der Plasmamembran wird durch Proteine möglich, die die jeweilige Aminosäure erkennen, an sich binden und dann aus dem extrazellulären Medium in das Zellinnere, oder gegebenenfalls auch umgekehrt, transportieren (9, 90). In den sechziger Jahren wurden mit Hilfe der Pionierarbeit der Arbeitsgruppe von Halvor N. Christensen, verschiedene substratspezifische Aminosäuretransportsysteme identifiziert und verschiedene generelle Eigenschaften der Aminosäuretransporter von Säugetieren aufgedeckt (9, 28, 90).

Seit diesen Untersuchungen werden Aminosäuretransporter vor allem nach folgenden funktionellen Kriterien charakterisiert: 1. der Typ von Aminosäure, der transportiert wird (neutral, anionisch oder kationisch). 2. die thermodynamischen Eigenschaften des Transporters (z.B. ob der Transporter mit oder gegen einen Konzentrationsgradienten arbeitet).

Bis heute wurde diese funktionelle Klassifikation beibehalten, da bisher die Informationen über die molekularen und strukturellen Eigenschaften der Aminosäuretransporter höherer eukaryotischer Organismen noch unvollständig sind (90).

Funktionelle Studien der Sättigbarkeit des Transportes, der Substratspezifität, dem kinetischen Verhalten, dem Antriebsmechanismus und den verschiedenen Regulationsmechanismen wurden an perfundierten Organen, isolierten Zellen und Plasmamembranen durchgeführt, und führten zur Identifikation von verschiedenen Haupttransportsystemen für Aminosäuren in mammalischen Plasmamembranen (26, 27, 28, 37, 90).

Durch diese Studien konnte auch gezeigt werden, dass ein einzelner Transporter verschiedene Aminosäuren transportieren kann, und dass Aminosäuretransportsysteme sich in ihrer Spezifität gegenüber den einzelnen Aminosäuren überlappen. Verschiedene Zellen besitzen unterschiedliche Kombinationen aus Aminosäuretransportern. Manche sind wenig gewebespezifisch und kommen

ubiquitär im menschlichen Körper vor, während andere wiederum sehr gewebespezifisch sind und speziell auf bestimmte Gewebearten ausgerichtet sind (90).

Wie bereits erwähnt, ist das Wissen über die Struktur der Aminosäuretransporter auf molekularer Ebene noch weitgehend unvollständig.

Aufgrund der Verfügbarkeit neuer molekularbiologischen Methoden konnten seit 1990, als der erste Aminosäuretransporter, ein neuronaler GABA-Transporter isoliert wurde, eine ständig wachsende Anzahl an cDNAs von mammalischen Aminosäuretransportern oder verwandten Proteinen identifiziert werden (53, 74, 90).

Von den 20 gegenwärtig bekannten Familien der Aminosäuretransportern besitzen nur vier Familien Mitglieder, die bei Säugetieren identifiziert wurden (135). Darunter die APC Transporter Superfamilie (**A**minoacid/**P**olyamin/**C**holin).

Eine Untergruppe dieser Superfamilie bilden die heterodimeren Aminosäuretransporter, die alternativ auch als Glykoprotein-assoziierte Transporter (gpaATs) bezeichnet werden (135).

### I.2.2. Heterodimere Aminosäuretransporter

Heterodimere Aminosäuretransporter bestehen aus zwei Untereinheiten, einer sogenannten schweren Kette und einer assoziierten leichten Kette, die die Spezifität des jeweiligen Heterodimers zu bestimmen scheint. Die leichten Ketten sind Permeasen verwandte Proteine und besitzen 12 transmembranären Domänen, die sich mit der schweren Kette, einem Glykoproteinen des Typ II zusammenlagern müssen, um in die Membran transportiert zu werden und dort aktiv zu sein.

#### I.2.2.1. Die leichten Ketten

Wie oben schon erwähnt gehören die leichten Ketten in die APC (Amino acid / Polyamin / Cholin) Transporter-Superfamilie, die mit 300 Mitglieder momentan eine der größten Transporterfamilien darstellt (135).

Sie werden als LAT-Familie (benannt nach der ersten beim Vertebraten gefundenen leichten Kette) bezeichnet. Das sind vor allem Aminosäureaustauscher, die neutrale,

kationische und anionische Aminosäuren transportieren. Die Namen der kürzlich gefundenen leichten Ketten resultieren aus der Nomenklatur, die von Christensen et al. aufgestellt wurde (siehe auch oben) und basieren auf funktionellen Expressionsstudien (135). Alle bei Vertebraten vorkommenden charakterisierten Mitglieder dieser Familie weisen untereinander eine Identität von mehr als 40 % auf und benötigen zur funktionellen Oberflächenexpression, wie schon angesprochen, ein Typ II transmembranäres Glykoprotein.(5, 75, 95, 99, 105, 113)

Es sind Permease-verwandte Proteine mit einer durchschnittlichen Länge von 500 Aminosäuren und mit 12 transmembranären Domänen.(135)

Studien mit den ersten identifizierten heterodimeren Transportern zeigten, dass ein Cystein in der extrazellulären Schleife zwischen den mutmaßlichen 3. und 4. Domäne der leichten Kette eine Disulfidbrücke mit dem ihr assoziierten Typ II Glykoprotein ausbildet. (135)

Momentan sind sieben leichte Ketten bekannt, die mit den Typ II Glykoproteinen 4F2hc und rBAT assoziieren.

### **I.2.2.2 Die schweren Ketten rBAT und 4F2hc**

Die schweren Ketten, die Typ II Glykoproteine, wurden zeitlich vor den dazugehörenden leichten Ketten, den Transporterproteinen mit 12 transmembranären Domänen entdeckt (135). Zu diesen Typ II Glykoproteinen gehören, wie oben schon erwähnt, die verwandten Proteine rBAT (related to  $b^{0,+}$  aminoacid transport) und 4F2hc (heavy chain)

Welche Funktion die assoziierten Typ II Glykoproteine im Verband des heterodimeren Aminosäuretransporters besitzen, ist momentan noch größtenteils unbekannt.

Es wird vermutet, dass 4F2hc für die Stabilisierung, funktionelle Reifung und das Trafficking des zugehörigen Transporters verantwortlich ist (75). Ob 4F2hc auch eine Rolle für die funktionellen Eigenschaften des Transportes spielt, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Ebenso ist noch weitgehend unklar, welche Rolle rBAT als Untereinheit des heterodimeren Transportsystems  $b^{0,+}$  zukommt. Bisher konnte gezeigt werden, dass die C-terminale Domäne von rBAT auch an den Transportereigenschaften beteiligt sein muß und, dass  $b^{0,+}$ AT rBAT in die

Plasmamembran in COS Zellen transportiert (41, 42, 80). Ein interessanter Unterschied in der subzellulären Expression dieser beiden Proteine ist, dass bisher alle mit 4F2hc assoziierten Transporter an der basolateralen und der mit rBAT dimerisierte Transporter  $b^{0,+}$ AT an der apikalen Plasmamembran lokalisiert wurden (44, 104)

### I.2.2.3 Klinische Relevanz der heterodimeren Aminosäuretransporter

Durch Genanalysen und funktionellen Untersuchungen konnten bisher zwei heterodimere Aminosäuretransporter erbliche Stoffwechselkrankheiten zugeordnet werden.

So wurde gezeigt, dass Mutationen in Genlocus SLC7A7, das für die leichte Kette  $y^+$ LAT1 kodiert, zu Lysinurischen Proteinintoleranz führen. Die Lysinurische Proteinintoleranz ist eine seltene autosomal-rezessive Erbkrankheit, die zu Gedeihstörungen, Wachstumsretardierung, muskulärer Hypotonie und Hepatosplenomegalie führt.(132)

Mutationen in den Genloci SLC3A1, das für die schwere Kette rBAT kodiert und SLC7A9, das für die mit rBAT assoziierenden leichten Kette  $b^{0,+}$ AT kodiert, führen zu Cystinurie (11, 19, 20, 42, 69, 143, 139). Die Cystinurie wird in einem der nachfolgenden Kapitel noch eingehend besprochen.

Tabelle 1

#### Heterodimere Transporter

Zuordnung der leichten Ketten zu der assoziierten schweren Kette mit funktioneller Charakterisierung und klinischer Relevanz.

Leichte Kette	Funktionelle Beschreibung	Schwere Kette	Transport	Assoziierte Krankheit	Ref.
LAT1	L-type	4F2hc	$Na^+$ unabhängiger Transport von neutralen AS mit verzweigten oder aromatischen Seitenketten		65 75, 84, 101

LAT2	L-type	4F2hc	ähnlich wie LAT1, Km für Phe niedriger.		99, 111, 116
y <sup>+</sup> LAT1	y <sup>+</sup> L-type	4F2hc	Na <sup>+</sup> -abhängiger Austausch von kationischen AS gegen neutrale AS. Und Na <sup>+</sup> -unabhängiger Austausch von kationischen AS	Lysinurische Proteinintoleranz	13, 95, 131, 132
y <sup>+</sup> LAT2	y <sup>+</sup> L-type	4F2hc	wie y <sup>+</sup> LAT1, bevorzugt Austausch von Arginin gegen Glutamin/ Na <sup>+</sup>		95, 135
xCT	x <sub>c</sub> <sup>-</sup>	4F2hc	Na <sup>+</sup> -unabhängiger Austausch von L-Cystin gegen L-Glutamat		113
asct1	asc	4F2hc	Na <sup>+</sup> -unabhängiger Austausch kleiner Aminosäuren		137
b <sup>0,+</sup> AT	b <sup>0,+</sup> -like	rBAT	Na <sup>+</sup> -unabhängiger Transport von L-Cystin, dibasischen AS und neutralen AS	Cystinurie	21, 42, 96

### I.3 rBAT (related to $\underline{b}^{0,+}$ amino acid transport)

Durch Expressionklonierung eines Aminosäuretransportsystems in *Xenopus laevis* Oozyten wurde 1992 unabhängig von mehreren Arbeitsgruppen, die cDNA eines mutmaßlichen Transportproteins aus der Kaninchen-, der Ratten- und der menschlichen Niere isoliert (8, 5, 69, 128, 140). Dieser Transporter hatte Eigenschaften, die dem  $\underline{b}^{0,+}$ -Transportsystem (für broad specificity for neutral(0) and

dibasic(+) amino acids) ähnlich waren, die Van Winkles Arbeitsgruppe an Mausblastozyten beschrieben hatte, mit der Besonderheit, dass der neue entdeckte Transporter auch Cystin transportiert (deswegen rBAT für related to b<sup>0,+</sup>amino acid transport) (5, 90, 134). Es wurde auch von einer partiellen rBAT cDNA-Sequenz in OK-Zellen (Opossum kidney) berichtet, die ebenfalls ein b<sup>0,+</sup>-like System in *Xenopus laevis* Oozyten induziert (81).

Dieses Protein hat 30 % Identität, bzw. 50 % Ähnlichkeit mit der schweren Kette des Zelloberflächen-Antigens 4F2hc (deswegen 4F2 heavy chain) (16, 103, 105). 4F2hc war ursprünglich durch Versuche, Gene von Lymphoblasten-Zelloberflächen-Glykoproteinen zu identifizieren gefunden worden (73). Trotzdem sind rBAT und 4F2hc eindeutig Mitglieder der gleichen Familie und auch die Expression von 4F2hc in *Xenopus laevis* Oozyten, induzierte eine deutliche System L und System y<sup>+</sup>L-Aminosäuren-Transportaktivität (7, 16.). All diese Ergebnisse ließen vermuten, dass beide Proteine in den Aminosäuretransport involviert sind.

### I.3.1 Vorkommen und Struktur des rBAT Proteins

Exprimiert wird rBAT in der Niere und in der Mukosa des Dünndarms (5, 8, 65, 139, 141). Darüberhinaus auch im ZNS (frontaler Kortex, Striatum, Corpora amygdala, Ncl. Paraventricularis (98).

In situ Hybridisierung konnten zeigen, dass rBAT in den Mikrovilli der Dünndarmmukosa und in den Epithelzellen der pars recta des proximalen Tubulus, genauer im Segment 3, in der Niere lokalisiert ist (44, 65, 97). Interessant ist, dass seine Expression in der Niere durch die Entwicklung reguliert wird. Die rBAT-Transkripte sind schon nach der Geburt nachweisbar, die Proteinexpression geht allerdings mit der postnatalen Nephronreifung einher und erreicht erst in Erwachsenenalter ihr volles Ausmaß (44). rBAT wird sowohl im Dünndarm als auch in der Niere in der apikalen Bürstensaummembran exprimiert.

rBAT-Transkripte wurden auch im Pankreas gefunden, deren Bedeutung ist allerdings noch unklar (8).

Die Proteinstruktur von rBAT ist der von 4F2hc sehr ähnlich, beide besitzen keine Membran-leader-sequenz, weisen die gleichen hydrophoben Stellen auf und besitzen 4 hoch konservierte Regionen (12-17 Aminosäurenreste lang mit 67-80 % Identität) (87). Momentan wird angenommen, dass es sich bei rBAT um ein Typ II Glykoprotein handelt, mit einem zytoplasmatischem N-Terminus, einer oder vier transmembranären Domäne(n) und einem N-glykolisiertem intra- oder extrazellulären C-Terminus (5, 82, 128). Die Frage der Struktur von rBAT ist aber noch nicht hinreichend geklärt. In Kontrast dazu wird bei 4F2hc nur eine transmembranäre Domäne angenommen. rBAT besitzt 685 Aminosäuren beim Menschen, beim Kaninchen 677 (5, 90).

Allerdings scheinen weder eine noch vier TMD ausreichend zu sein, um eine polare Pore für das Durchschleusen von Aminosäuren zu formen. Das führte schon früh zu der Hypothese, dass die Proteine rBAT und 4F2hc Aktivatoren eines endogenen stillen  $b^{0,+}$ -like bzw. eines  $y^+$ -like/ L-like Transporters der Oozyten darstellen. (90)

Dieser Mechanismus ist dem der Aktivierung einer  $\beta$ -katalytischen Untereinheit der  $Na^+/K^+$ -ATPase in den Oozyten, durch die Expression einer fremden  $\beta$ -Untereinheit der  $Na^+/K^+$ -ATPase ähnlich (47). Ebenso wurde ein ähnliches Modell für heteromultimere Kanäle beschrieben (4).

Schon 1982 war bekannt, dass das leukozytäre Zelloberflächenantigen 4F2hc ein Heterodimer (125 kDa), bestehend aus einer schweren Kette mit 85 kDa und einer leichten Kette mit 40 kDa, darstellt (56, 59). Auch für rBAT war schon lange die Hypothese aufgestellt worden, dass es Teil eines heterodimeren Transporters sei, mit einer schweren Kette mit 90 kDa und einer leichten mit 40-50 kDa (89). Wie oben schon erwähnt konnten im letzten Jahr 6 verschiedenen Proteine identifiziert werden, die sich als leichte Kette mit 4F2hc zusammenlagern und es konnte ein Protein ( $b^{0,+}$ AT) gefunden werden, das mit rBAT assoziiert.

Das menschliche Protein  $b^{0,+}$ AT mit 12 TMD besteht aus 487 Aminosäuren und besitzt 44 % Identität mit den anderen leichten Ketten LAT1 und  $y^+$ -LAT1 (96).  $b^{0,+}$ AT konnte genauso wie rBAT in der Niere und im Dünndarm lokalisiert werden (96). Aufnahmestudien von radioaktiv markierten Aminosäuren in Oozyten und der M1 Mauszell-Linie konnten beweisen, dass der rBAT/  $b^{0,+}$ AT Komplex einen hoch affinen L-Cystin Transporter exprimiert, der auch dibasische und neutrale Aminosäuren  $Na^+$ -unabhängig transportiert.

### I.3.2 Funktion und physiologische Rolle von rBAT

Die Transporteigenschaften rBATs wurden hauptsächlich in *Xenopus leavis* Oozyten untersucht. rBAT induziert den Transport von Cystin, dibasischen und neutralen Aminosäuren. Für die Aminosäuren L-Cystin, L-Arginin, L-Lysin, L-Ornithin, L-Leucin und L-Histidin induziert hrBAT ein hochaffines Transportsystem im  $\mu\text{M}$ -Bereich, zumindest unter  $\text{Na}^+$ -freien Bedingungen (5). Weitere Studien konnten zeigen, dass der Transport unabhängig ist von extrazellulären Kalium und extrazellulärem Chlorid und auch von extrazellulären pH-Änderungen und intrazellulärem ATP (17, 29, 90).

Die Frage, wie ein Natrium-, Kalium-, Protonen-, und ATP-unabhängiger Transporter einen aktiven Prozess, wie die Rückresorption von Cystin und dibasischen Aminosäuren bewerkstelligen kann, wurde 1994 von Busch et al. geklärt. Diese Studien erbrachten den Beweis, dass es sich bei  $\text{b}^{0,+}$ -like/rBAT um einen Aminosäureaustauscher handelt, der als tertiär aktiver Transporter funktioniert. Und zwar wird bevorzugt, eine extrazelluläre dibasische gegen eine intrazelluläre neutrale Aminosäure ausgetauscht. Daneben besteht aber auch der Austausch neutraler Aminosäuren gegen neutrale und dibasischer gegen dibasische. In vivo werden die neutralen Aminosäuren durch einen weiteren apikalen  $\text{Na}^+$  getriebenen Aminosäuretransporter aufgenommen. Der bevorzugte Einwärtstransport der dibasischen Aminosäuren im Austausch gegen neutrale wird durch drei Faktoren sichergestellt. Die höhere Affinität der dibasischen Aminosäuren, die positive Ladung der dibasischen Aminosäuren und den Gradienten für neutrale Aminosäuren. Cystin wird wie eine dibasische Aminosäure behandelt und intrazellulär sofort zu Cystein verstoffwechselt. (17, 22). Es konnte auch gezeigt werden, dass es sich dabei nicht um ein Oozyten-Artefakt handelt, da der gleiche Effekt auch bei der OK-Zelllinie nachgewiesen werden konnte, die physiologisch rBAT exprimiert (81).

Aufgrund seiner Lokalisation in der Niere und der hohen Affinität dieses  $\text{b}^{0,+}$ -like Transporters für Cystin und dibasische Aminosäuren unter  $\text{Na}^+$ -freien Bedingungen (siehe oben), wird angenommen, dass rBAT ein Teil des Transportsystems mit niedriger Kapazität und hoher Affinität für Cystin im proximalen Tubulus (S3 Segment) darstellt.

Mutationen im rBAT-Gen, die bei Cystinurie Typ I Patienten gefunden wurden, untermauern diese Vermutung noch zusätzlich (19, 23, 79).

### I.4 Cystinurie

#### I.4.1 Definition:

Cystinurie ist eine angeborene Aminosäuretransportfehlfunktion, die die Epithelzellen des proximalen Nierentubulus und die Mukosa des Dünndarms betrifft. So kommt es zu einer verringerten Aufnahme im Dünndarm und vermehrter Ausscheidung von Cystin und der dibasischen Aminosäuren Arginin, Lysin und Ornithin über den Urin. Der beeinträchtigte Transport für Cystin, Lysin, Arginin, und Ornithin wird autosomal-rezessiv vererbt (92, 125, 143). Klinisch manifestiert sich die Cystinurie als vermehrtes Auftreten von Harnsteinen, was auf die niedrige Löslichkeit von Cystin bei niedrigem pH im Sammelrohr zurückzuführen ist. Unterschiedliche hexagonale Cystin-Kristalle erscheinen im Urin und es bilden sich wiederholt Steine, die das Nierenbecken verlegen können und auf einem normalen Röntgenbild oder mit Hilfe des Ultraschalls darstellbar sind (92, 102, 127, 141). Die rekurrierenden Harnsteine können von der Kindheit an zu häufigen Harnwegsinfekten, Obstruktionen und letztendlich zum fortschreitenden Nierenversagen mit Dialysepflichtigkeit führen (92).

Die Diagnose kann gestellt werden, indem die selektive Hyperexkretion von Cystin und der dibasischen Aminosäuren im Urin oder die Zusammensetzung der Nierensteine untersucht wird. Steine entstehen vornehmlich in saurem Urin, wenn die Cystin-Konzentration 300 mg/l überschreitet.

Zur Prävention der Harnsteine wird die Einnahme von hohen Flüssigkeitsmengen und das Alkalisieren des Urins empfohlen, da so die Cystin-Löslichkeit verbessert werden kann (36). Die orale Einnahme von Sulfhydryl-Derivaten wie D-Penicillamin oder Mercaptopropionylglycin zur Bildung löslicher Disulfide mit Cystin im Urin (32, 76, 67, 108, 126) wird inzwischen wegen den häufigen Nebenwirkungen nicht mehr empfohlen (51, 122, 126). Weitere Therapieansätze arbeiten mit natriumreduzierter Diät, wobei ein möglicher Mechanismus noch unbekannt ist (62, 93).

Die Entdeckung der verschiedenen Cystinurie-Gene, rBAT und b<sup>0+</sup>AT, ermöglicht nun auch gentechnische Therapieansätze. Momentan werden verschiedene Verfahren erprobt, z.B. die Injektion eines Adenovirus-Expressionsvektors in die renalen Arterien, um die Niere mit therapeutischen cDNAs zu versorgen. Allerdings waren die bisher erreichten Expressionsintensitäten zu niedrig (92).

Bei vielen Cystinurie-Patienten ist auch die Resorption von Cystin und dibasischen Aminosäuren im Darm beeinträchtigt. Dies konnte durch orale Belastungstests und in vitro-Studien an jejunalen Biopsiepräparaten gezeigt werden (15, 109). Trotzdem treten keine gastrointestinalen Symptome auf, und die Plasmakonzentrationen der Aminosäuren liegen bei normaler oraler Proteinzufuhr auch im normalen Bereich. Es wird deshalb angenommen, dass es alternative Resorptionsmechanismen gibt (57, 58).

Die Homozygotenfrequenz der Cystinurie liegt bei 1:7000 weltweit (71), was einer Heterozygotenfrequenz von 1 : 50 entspricht. Damit ist die Cystinurie eine der häufigsten autosomal rezessiven Erberkrankungen. Es gibt jedoch Unterschiede zwischen den einzelnen Populationen, so ist die Inzidenz unter Neugeborenen in England deutlich höher als zum Beispiel in Schweden (14).

### I.4.2 Subtypen der Cystinurie

Die Ausscheidung von Cystin, Lysin, Arginin und Ornithin im Urin variiert bei Cystinurie-Heterozygoten (33). Deswegen wurde 1972 von Rosenberg et al. aufgrund biochemischer Untersuchungen folgende Einteilung vorgenommen (46, 50, 110):

Tabelle 2:

Einteilung der Cystinurie

Typ	Erbgang	Urin Cystinkonzentration $\mu\text{mol/ g Creatinin}$	Intestinale Aminosäureabsorption
I	Autosomal rezessiv	0-100 (silent carrier)	normal
II	Autosomal dominant	900-1740 (schwerwiegend)	30%
III	Unvollständig autosomal rezessiv	1100-600 (milde)	60%

Interessant ist, dass in den ersten Lebensmonaten der renale Aminosäuretransport durch rBAT /  $b^{0,+}$ AT noch nicht vollständig entwickelt ist, und so manche heterozygoten Neugeborene zunächst als homozygote Genträger des Cystinuriegens erscheinen. Die Klassifizierung sollte demnach nicht vor Beendigung des ersten Lebensjahr vorgenommen werden (44).

Aufgrund der einzelnen Subtypen wurde zuerst angenommen, dass es sich bei den verschiedenen Subtypen um Allele handelt, um entweder eine leichte, mäßige oder schwere Mutation des selben Gen-Locus. Aber es war schon bald klar, dass es sich um mehr als nur einen Gen-Locus handeln musste (50, 52).

Mit der Klonierung 1992 von rBAT konnte dessen cDNA auf der Region p16.3-p21 auf dem Chromosom 2 lokalisiert werden und durch Linkage-Analysen dem vollkommen rezessiven Cystinurie-Gen (Typ I) zugeordnet werden (19, 20, 69, 144).

Weitere Linkage-Analysen konnten Typ III einem zweiten Gen-Lokus auf dem langen Arm des Chromosom 19 zuordnen (11, 139). Diesem Gen-Lokus konnte nun das Protein  $b^{0,+}$ AT zugeordnet werden. (42). Für Typ II Patienten war eine Zuordnung nicht

möglich. Genetische Untersuchungen bei Typ II Cystinuriepatienten zeigten ebenfalls Mutationen in  $b^{0,+}AT$ , so dass es sich beim Typ II vermutlich nur um eine schwerere Ausprägung des Typ III handelt.(92) Aufgrund der neueren genetischen Erkenntnisse, wird die Cystinurie nun in einen Typ I (rBAT Mutationen) und einen non-Typ I (ehemals Typ II und Typ III,  $b^{0,+}AT$  Mutationen) eingeteilt (92)

### I.4.3 Physiologie und Pathophysiologie des Transportes von Cystin und dibasischen Aminosäuren

Aminosäuren werden in ihren Plasmakonzentrationen in den Glomerula der Niere ultrafiltriert und dann zu >98% durch aktive Transportmechanismen (gegen einen elektrochemischen Gradienten) wieder rückresorbiert (40, 133). Stop-Flow-, Mikropunktionen und Mikroperfusionsstudien, haben gezeigt, dass die Rückresorption der Aminosäuren hauptsächlich in der pars convoluta proximalis stattfindet (63, 120, 119, 121). Bei Erwachsenen wird 99 % des filtrierten Cystin rückresorbiert, wobei etwa 60 % im S1 und S2 Segment durch ein niedrig affines,  $Na^+$  abhängiges System reabsorbiert wird, während das restliche Drittel im S3 Segment durch einen  $Na^+$  unabhängigen, hochaffinen Transportprozess resorbiert wird (121).

Obwohl schon lange klar war, dass bei Cystinurie die Rückresorption von Cystin und der dibasischen Aminosäuren im proximalen Tubulus beeinträchtigt ist, war lange Zeit der zugrunde liegende defekte Transportmechanismus nicht bekannt. 1951 wurde zum ersten Mal vermutet, dass es sich um ein Transportsystem handelt, das sowohl Cystin als auch dibasische Aminosäuren transportiert (35). Diese Annahme konnte dann durch weitere Studien bestätigt werden (66, 70).

Mikroperfusionsstudien an Tubuli der Rattenniere, an isolierten Tubulifragmenten oder an isolierten Bürstensaummembranvesikeln konnten zeigen, dass es zwei Transportsysteme für Cystin in der Niere gibt (31, 43, 115, 118).

1. ein hoch affines System ( $K_m = 10 \mu M$ ),  $Na^+$  unabhängiges, das sowohl neutrale als auch dibasische Aminosäuren transportiert und in der pars recta proximalis (Segment S3) lokalisiert ist (43, 114, 136).

2. ein niedrig affines System ( $K_m = 500 \mu\text{M}$ ),  $\text{Na}^+$  abhängiges, das nicht dibasische Aminosäuren transportiert und in der pars convoluta proximalis (Segment S1 und S2) lokalisiert ist (114, 136).

Auch OK-Zellen (Opossum Kidney, eine immortalisierte Nierenzelllinie) weisen einen hoch-affinen  $\text{Na}^+$ -unabhängigen Transporter für Cystin und dibasische Aminosäuren auf (124). Es konnte gezeigt werden, dass es sich dabei um einen  $\text{b}^{0,+}$ -like Transporter handelt (81). Von einem Cystin-Transport durch ein  $\text{b}^{0,+}$ -like Transportsystem in Bürstensaummembran-Vesikeln im Dünndarm von Hühnern wurde ebenfalls berichtet (130).

Wie oben schon angedeutet, führten die funktionellen Eigenschaften des hoch affinen Transportsystem für Cystin und dibasische Aminosäuren und die übereinstimmende Gen-Loci, zu der Hypothese, dass die Proteine rBAT und später dann auch  $\text{b}^{0,+}$ -AT, die zusammen eine  $\text{b}^{0,+}$ -like Transportfunktion exprimieren, das bei Cystinurie defekte Transportsystem bilden.

## I.5 Die molekulare Genetik bei Cystinurie

Wie oben beschrieben, sind bislang zwei Cystinurie verursachende Gene identifiziert: hrBAT (SLC3A1) und  $\text{b}^{0,+}$ AT (SLC7A9) (11, 19, 20, 42, 69, 139, 144).

Bis heute sind 40 verschiedene Mutationen und 9 Polymorphismen des hrBAT-Gens SLC3A1 bekannt (10, 46, 49, 92, 100). Dabei ist die Mutation M467T (Methionin ist an der Position 467 durch Threonin ersetzt) das am häufigsten auftretende Cystinurie-Allel (es wurde in 38 verschiedenen Chromosomen gefunden (23). Nur vier weitere Mutationen sind weltweit verbreitet, die Mehrheit der hrBAT Mutationen sind populationsspezifisch (92).

Nachdem  $\text{b}^{0,+}$ AT als leichte Kette von hrBAT identifiziert wurde, konnten auch in dem entsprechenden Gen SLC7A9, sieben verschiedene Mutationen bei nicht Typ I Cystinuriepatienten in verschiedenen Populationen gefunden werden. Momentan ist die am häufigsten bei Kaukasieren auftretende Mutation G105R (42).

Um den Pathomechanismus der hrBAT Mutationen untersuchen zu können, wurden die veränderten Sequenzen in Plasmidvektoren kloniert, damit so der Effekt auf den Aminosäuretransport an Oozyten beobachtet werden kann.

Durch einfache Expression konnte bisher ein verringerter Transport an sieben Cystinurie-spezifischen hrBAT-Mutationen (M467K/T, T216M, S217R, R270L, I618M, E268K, T341A) nachgewiesen werden (19, 23, 79, 112). Lediglich bei einer Mutation, M467T, wurde der genaue Mechanismus weiter aufgeklärt (23).

### I.5.1 Funktionelle Eigenschaften der hrBAT Mutationen M467T/K

Die Mutationen M467T/K wurden als erste und bisher einzige hrBAT Mutationen, im Oozytenexpressionssystem auf ihre funktionellen Eigenschaften genau untersucht (19, 23).

M467T/K zeigten dabei eine verringerte Transportaktivität im Vergleich zum Wildtyp. Dies war zeitabhängig und abhängig von der Menge an exprimierter cRNA. Bei Expression höherer Mengen cRNA oder einer längeren Expressionszeit, zeigte die Mutation die gleiche Transportaktivität wie der Wildtyp. Da die Mutationen weniger glykosiliert wird, ist eine verringerte Einbaurate des ansonsten funktionellen Proteins in die Plasmamembran sehr wahrscheinlich(23). Es wurde auch beobachtet, dass im Vergleich zum Wildtyp nur ca. 10% des veränderten Proteins an der Plasmamembran notwendig ist, um eine 100%-ige Aktivität zu exprimieren und auch, dass eine Zunahme des hrBAT –Proteins an der Zelloberfläche nicht mit einer Zunahme in der Aminosäureaufnahme korreliert(23). Das alles lässt vermuten, dass eine endogene leichte Kette der Oozyten nur in limitierten Mengen zur Verfügung steht, um mit hrBAT zu dimerisieren, so dass die maximale Menge der funktionellen Einheiten schon erreicht ist, wenn nur 10 % des Wildtyp-hrBAT Proteins die Zellmembran erreicht hat. (23)

Es wurden noch weitere rBAT–Mutationen auf ihre Expressionsrate untersucht (79, 112). Expressionsanalysen der Mutation T216M (Threonin an der Stelle 216 durch Methionin ersetzt), wiesen auch eine verminderte Aktivität 24 h nach cRNA-Injektion

auf (entspricht 25 % der Kontrollloozyten). Dieser Wert stieg am 4. Tag auf 75 % der Kontrollloozyten an (112).

Aus den bisher bekannten Daten wurde geschlossen, dass die Mehrheit der rBAT-Punktmutationen Dysfunktionen im Verlauf des Trafficking zur Oozytenplasmamembran bewirken. Es wird angenommen, dass die Interaktion des veränderten rBAT-Proteins mit seiner Untereinheit auf dem Weg zur Plasmamembran verändert ist (92).

### I.5.2 Mutationen des $b^{0,+}$ AT

Von den sieben gefundenen  $b^{0,+}$  AT (SLC7A9) Mutationen sind zwei Rasterverschiebungen und fünf Punktmutationen an hochkonservierten Aminosäurestellen.

Co-Transfektionen von rBAT mit dem Wildtyp  $b^{0,+}$  AT oder seiner Mutation V170M (Valin ist durch Methionin an der Stelle 170 ersetzt) in COS-Zelle, konnten zeigen, dass die Aufnahme von L-Arginin vollständig durch die Mutation V170M aufgehoben ist (42).

### I.5.3 Die hrBAT-Mutationen R365W und F648S

1995 wurden innerhalb einer Screening-Studie für Cystinurie-Gene vier neue hrBAT-Mutationen, die nur auf Chromosomen der betroffenen Patienten gefunden wurden und drei Polymorphismen, die auch auf Chromosomen der Kontrollgruppe gefunden wurden, identifiziert (46).

In dem Kollektiv aus 51 italienischen und spanischen Cystinurie-Patienten, wurden unter anderem die hrBAT-Mutationen R365W und F648S gefunden.

Die Mutation F648S bewirkt einen Austausch der Aminosäure Phenylalanin durch Serin an der Stelle F648S (46). Es liegt bisher noch keine funktionelle Charakterisierung dieser rBAT Mutation vor.

Die Mutation R365W, die Arginin durch Tryptophan an der Stelle 365 ersetzt, wurde in nur einem Allel bei einem Patienten gefunden, der ebenso jeweils nur auf einem Allel die Mutationen R181Q und T652R aufwies (46). Leider war es ohne funktionelle Untersuchung nicht möglich herauszufinden, welche dieser drei Mutationen für die

Cystinurie verantwortlich ist (46). In einer weiteren Studie wurde bei einem jugoslawischen Patienten an derselben Stelle die Mutation R365L (Austausch des Arginins gegen ein Leucin) im homozygoten Zustand gefunden (1). Auch die funktionelle Bedeutung der R365L Mutation ist bislang unbekannt.

### I.6 *Xenopus laevis* Oozyten als Expressionssystem

Schon in den frühen 50iger Jahren dienten Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* als Studienobjekte für entwicklungsbiologische Studien (61, 3).

Später dann wurden sie erfolgreich zur Aufklärung der Mechanismen bei der Genexpression verwendet (55). Es wurde dabei beobachtet, dass sich das Membranpotential, die intrazelluläre Ionenkonzentrationen und verschiedene andere Eigenschaften der Membran der Oozyten im Verlauf des Wachstums und der Entwicklung verändern. Seither sind Oozyten vielverwendete Studienobjekte für verschiedene Ionenkanäle. Ebenso konnten Veränderungen der Membran nach Neurotransmitterstimulation beobachtet werden, was zur Folge hatte, dass nun auch molekulare Mechanismen von second messenger vermittelten Antworten auf Neurotransmitterstimulation an Oozyten beobachtet werden konnten (68).

Die bahnbrechende Beobachtung, die den Hauptverwendungszweck der *Xenopus laevis* Oozyten innerhalb der Laborarbeit bestimmen sollte, machte Gurdons Arbeitsgruppe 1971. Sie konnten zeigen, dass Oozyten in der Lage sind, nach Injektion von fremder cRNA, exogene Proteine funktionell zu synthetisieren (54).

So werden sie heute von vielen Arbeitsgruppe als Expressionssysteme verwendet, um Wildtyp-Proteine und mutierte Proteine zu exprimieren und funktionell zu vergleichen und, um das Verhältnis zwischen Struktur und Funktion aufzuklären (34).

Die Oozyten besitzen 6 Membranschichten (53). Bis auf die innerste Membran, die Vitellinmembran, können alle Schichten durch Kollagenase oder andere proteolytische Enzyme entfernt werden. Jede Oozyte ist morphologisch und funktionell in zwei Hälften gegliedert: die aufgrund Melaninpigmenten dunkelbraune (animalische) und die gelbe (vegetative). Die animalische Hälfte weist Mikrovilli und Verbindungen

zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und der Plasmamembran auf, während die vegetative Hälfte den größten Teil der RNA beinhaltet (34, 45).

Vor allem zwei Eigenschaften der Oozyten machen sie besonders attraktiv für Forschungsarbeiten: 1. Ihre Größe (sie besitzen einen Durchmesser von bis zu 1.3 mm), welche die Penetration mit Mikroelektroden erlaubt, was besonders beim Voltage Clamp und anderen elektrophysiologischen Methoden eine Rolle spielt. Und 2. Die Tatsache, dass Oozyten nach Injektion exogener DNA oder RNA exogene Proteine synthetisieren (34).

Allerdings müssen auch einige Nachteile bzw. Fehlerquellen beim Gebrauch der Oozyten als Expressionssystem bedacht werden. So sind möglicherweise die posttranslationalen Modifikations-Schritte der korrekt translatierten fremden RNA, wie Glykosylierung, Phosphorylierung oder der intrazellulärer Transport gewebespezifisch und führen zu veränderten und verschiedenen Endprodukten. Es ist deswegen beinahe unerlässlich, nach Ausschöpfung der Möglichkeiten des Oozyten-Expressionssystems, die erhobenen Ergebnisse mit denen des ursprünglichen Gewebes zu vergleichen und zu überprüfen. Auf diese Problematik soll auch später im Diskussionsteil nochmals eingegangen werden (34)

### I.7 Fragestellung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Pathomechanismen zu untersuchen, die bei den hrBAT Mutationen R365W und F648S zur Ausbildung von Cystinurie führen. Dabei sollen beide Mutationen hinsichtlich verschiedener Merkmale in *Xenopus* Oozyten charakterisiert werden:

- Expression und Expressionsrate
- Kinetische Eigenschaften des Aminosäuretransportes
- Spannungsabhängigkeit
- Austauschmechanismus
- Trafficking in die Membran

## II. Material und Methoden

### II.1.Lösungen

#### II.1.1 96 mM Natrium (ND96)

Diese Lösung war die Grundlösung für alle Versuche und auch die Aufbewahrungslösung für die Oozyten. Bei Bedarf wurde sie auch verändert.

Tabelle 3

<b>Salz</b>	<b>Konzentration</b>
NaCl	96.0 mM
KCl	2.0 mM
MgCl <sub>2</sub>	1.0 mM
CaCl <sub>2</sub>	1.8 mM
Tris-HEPES	5.0 mM
pH	7.4

Tris-Hepes entspricht Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan-N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonat (pKs 7.4) und ist ein Puffer.

#### II.1.2 100 mM NMDG (Na<sup>+</sup>-frei)

Zur Untersuchung der Natriumabhängigkeit der Aminosäuretransporter wurde die ND96-Lösung verändert, dabei wurde Natrium durch die entsprechende Konzentration NMDG ersetzt. Die anderen Lösungsbestandteile blieben gleich. NMDG ist N-Methyl D-Glucamin und wurde mit 37%-iger HCl titriert.

Tabelle 4

<b>Salz</b>	<b>Konzentration</b>
NMDG	100.0 mM
KCl	2.0 mM
MgCl <sub>2</sub>	1.0 mM
CaCl <sub>2</sub>	1.8 mM
Tris-HEPES	5.0 mM
pH	7.4

NMDG = N-Methyl D-Glucamin

### II.1.3 ND96-Oozytenaufbewahrungslösung Mit Antibiotikum

Tabelle 5

<b>Salz</b>	<b>Konzentration</b>
NaCl	100.0 mM
KCl	2.0 mM
MgCl <sub>2</sub>	1.0 mM
CaCl <sub>2</sub>	1.8 mM
Tris-HEPES	5.0 mM
Theophyllin	0.5 mM
Na-Pyruvat	2.5 mM
Gentamicin	50 µg/ml
pH	7.4

Theophyllin inhibiert die weitere Reifung der Oozyten, das Antibiotikum Gentamicin soll Infektionen verhindern (85)

### II.1.4 OR 2<sup>+</sup>(Calcium-frei )

Tabelle 6

<b>Salz</b>	<b>Konzentration</b>
NaCl	82.5 mM
KCl	2.0 mM
MgCl <sub>2</sub>	1.0 mM
Tris-HEPES	5.0 mM
pH	7.4

OR 2<sup>+</sup> wird verwendet zur Kollagenasebehandlung der Zellen und ist Ca<sup>2+</sup> frei, da die Kollagenase in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> in ihrer Wirkung verbessert wird.

### II.1.5 Weitere verwendete Substanzen

Aminosäuren

Tabelle 7

**L-Arginin**

**L-Cystein**

**L-Cystin**

**L-Histidin**

**L-Leucin**

**L-Lysin**

**L-Ornithin**

**L-Phenylalanin**

Alle hier aufgelisteten Substanzen wurden von SIGMA (München) und MERCK (Darmstadt) bezogen. Sie wurden als 100 mM Stammlösung angesetzt und dann je nach gewünschter Konzentration den Versuchslösungen ND96 und NMDG zugegeben. Die

Lösungen wurden immer auf ihren pH-Wert untersucht und gegebenenfalls mit NaOH bzw. KOH (bei Versuchen unter Na-freien Bedingungen) und HCl titriert.

### II.2. Oozytenpräparation

Zur Entnahme der Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis*, wurde der dafür zu operierende Frosch erst einmal für ca. 10-15 Minuten in 0.1% Aminobenzoesäure-methylester-methansulfonat-Lösung betäubt. Zeigte er keine Regung mehr, wurde der Frosch auf Eis gelagert und sein Bauch mit Ethylalkohol desinfiziert.

Nach einem Schnitt quer oberhalb der Inguinalfalte durch Haut und Muskulatur wurden die Ovarialsäckchen herausgezogen und die Menge an benötigten Oozyten abgetrennt.

Danach wurde die Wunde mit einem resorbierbaren Faden zugenäht.

Die entnommenen Oozyten wurden zuerst in ND96 aufbewahrt und vorsichtig mit einer Pinzette separiert, danach mehrmals mit OR2<sup>+</sup>-Lösung gespült und dann zur Defollikulierung für ca. 20-30 Minuten bei ca. 35°C und unter ständiger Kontrolle des Zustandes der Oozyten im Schüttler mit Kollagenase (Kollagenase Typ CLS, Seromed 1g/l) verdaut.

Durch mehrmaliges Spülen mit ND96 wurde dann der Verdauungsvorgang gestoppt und die reifen und unbeschädigten Oozyten aussortiert (Stadium V und VI nach Dumont (39)).

Bis zur weiteren Verwendung wurden die aussortierten Oozyten um Aneinanderlagerungen zu verhindern in der Aufbewahrungslösung in Petrischalen auf einem Schüttler im Inkubator aufbewahrt und am darauffolgenden Tag vor der RNA-Injektion nochmals sortiert.

### II.3.cRNA-Injektion

Die cDNA-Klone der hrBAT –Mutationen F648S und R365W wurden von A. Albers durch site-directed mutagenesis synthetisiert und im Physiologischen Institut, Tübingen

von Dr. Wagner und B. Noll zur *in vitro*-Synthese der cRNA verwendet. Der hrBAT Wildtyp Klon war die freundliche Gabe von Prof. M. Palacin, Barcelona.

Zur Injektion der RNA wurden spezielle Injektionselektroden an einem Mikroelektrodenpuller (Firma DMZ Universal-Puller der Firma Zeitz, Augsburg) gezogen (Borosilikatglaselektroden, Aussendurchmesser 1.2 mm (Fa.Hilgenberg)) und dann deren Spitze unter dem Mikroskop vorsichtig abgebrochen. Danach wurden sie mit Paraffin-Öl abgedichtet und dann auf die Injektorstange eines Microliterinjektors (WPI) aufgesetzt. Nun wurden gewöhnlich 2  $\mu$ l cRNA ohne Luftblasen in die Kapillare aufgezogen und dann in die Oozyten injiziert (jeweils 50 nl pro Oozyte, entspricht 10 ng F648S-cRNA/Oozyte und 4 ng R365W-cRNA/Oozyte).

Um die Kontaminierung der cRNA mit RNAsen möglichst zu verhindern, wurden während dieser Arbeitsschritte Handschuhe getragen und die cRNAs sofort nach dem Auftauen verwendet.

### II.4. Elektrophysiologische Methoden

#### II.4.1 Zwei Elektroden Voltage Clamp (TEVC: two electrodes voltage clamp)

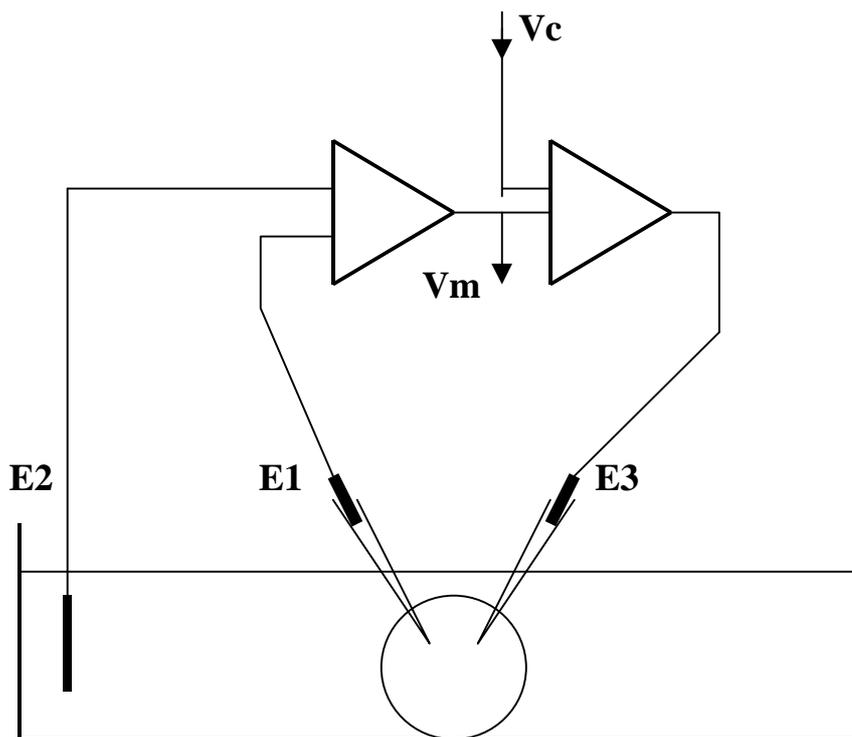
Während der meisten elektrophysiologischen Messungen muss das Membranpotential kontrollierbar sein. Dies wird durch die Methode des Two electrodes voltage clamp (TEVC) erreicht. Bei diesem Verfahren wird mit einer intrazellulären Mikroelektrode E1 und einer extrazellulären Referenzelektrode E2 (im Bad) das aktuelle Membranpotential  $V_m$  gemessen und mit einem Rückkopplungsamplifier (Gene Clamp Amplifier Axon Instruments) hochverstärkt (2, 83). Dieser Wert wird dann mit dem vom Experimentator vorgegebenen Wert für das Membranpotential  $V_c$  verglichen und dann über die zweite intrazelluläre Mikroelektrode E3 die Menge an Strom  $I$  appliziert und gemessen, die notwendig ist um das vorgegebene Membranpotential aufrecht zu erhalten. So kann über die Veränderungen dieses Betrages  $I$ , transmembranäre Ströme gemessen werden und somit Ladungsverschiebungen wie sie z.B. bei elektrogenem Aminosäuretransport entstehen, untersucht werden (123, 38, 72).

Für die Messungen wurden als intrazelluläre Mikroelektroden Borosilicatelektroden (Außendurchmesser 1.5 mm des Typs GC150-TF-15, Clark Electromedical Instruments) verwendet, die mit 3 mM KCl gefüllt waren und in die Ag-AgCl-Drähte tauchten. Als extrazelluläre Referenzelektrode wurde ebenfalls ein Ag-AgCl – Elektrodendraht verwendet, der über eine 3% Agar-3 mM KCl-Brücke mit dem Bad in Verbindung stand.

Zum Schutz vor äußeren, elektrischen Signalen, war der Versuchsaufbau fast vollständig von einem Faradaykäfig umgeben (86).

Die Daten wurden mit 10 Hz gefiltert und mit einer Samplingrate von 100 Datenpunkten pro Minute über ein MacLab-Interface in einem Macintosh-Computer aufgenommen und ausgewertet.

Abbildung 1:



**Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus:**  $V_m$  entspricht dem Potential, das zwischen Badelektrode E2 und Oozytenelektrode E1 gemessen wurde.  $V_m$  wird mit dem vorgegebenen  $V_c$  verglichen und die aus der Differenz erforderliche Menge Strom  $I$  wird dann über die Oozytenelektrode E3 in die Oozyte appliziert.

### II.4.2 Versuchsdurchführung

Die Messungen an den Oozyten wurden 1-8 Tage nach cRNA-Injektion durchgeführt. Es wurde bei Raumtemperatur und unter ständiger Durchspülung der Zellbad-Kammer mit der jeweiligen Versuchslösung (Flussgeschwindigkeit ca. 20 ml/min, so dass ein vollständiger Lösungsaustausch der Zellkammer in 10 s gewährleistet war) experimentiert.

Vor jeder Messung wurden die Widerstände der Mikroelektroden überprüft, so dass ihre Widerstände immer zwischen 0.5-1.3 M $\Omega$  lagen.

So weit nicht anders angegeben, wurde mit einem Haltepotential von -50 mV gemessen, bei einzelnen Versuche wurde dieser Wert auch verändert und es wurde bei Haltepotentialen zwischen -10 mV und -90 mV gemessen..

Die jeweiligen Versuche wurden an verschiedenen Tagen nach cRNA-Injektion und an verschiedenen Oozytenpräparationen wiederholt, dabei konnten keine qualitativen Unterschiede festgestellt werden, lediglich der Betrag des maximalen Stromes veränderte sich je nach Expressionsstadium und Oozytenpräparation.

### II.5. Tracer Flux Messungen

Obwohl Transportstudien mit radioaktiv markierten Substraten zeitaufwendiger sind als elektrophysiologische Techniken, sind sie unerlässlich für die Untersuchung von Transportprozessen an Oozyten. Elektroneutrale Transportmechanismen sind natürlich ein wichtiges Anwendungsgebiet, aber auch Fluxmessungen an elektrogenen Transportprozessen ermöglichen einen tieferen Einblick in den Transportmechanismus. Tracerfluxmessungen sind sensitiver als elektrophysiologische Methoden. Ströme  $> 5$  nA können an Oozyten mit ziemlicher Genauigkeit festgestellt und beobachtet werden. Ein Strom von 5 nA entspricht einem Flux von 180 pmol Ladungen / Stunde, eine Menge, die einfach festgestellt werden kann, wenn radioaktiv markierte Substrate verwendet werden. Um die höchste Sensitivität zu erreichen, sollte die Substratkonzentration im Gegensatz zu elektrophysiologischen Messungen, weit unter dem Km-Wert liegen. Konzentrationen, die über der des Km-Werte liegen, reduzieren die Aufnahme von markiertem Substrat, da es zu einer Kompetition von markiertem

und nicht markiertem Substrat am Transportermolekül kommt. Im Normalfall kann mit einer Substratkonzentration begonnen werden, die bei 10  $\mu\text{mol}$  liegt, da dieser Wert unter den  $K_m$ -Werten der meisten Transporter liegt.

Die bisher veröffentlichten Transportaktivitäten liegen zwischen ein paar  $\text{pmol} / \text{h}$  und  $\text{nmol} / \text{min}$ .

Tracer Flux -Untersuchungen werden mit 7 Oozyten in ND96 mit einem Volumen von 70 – 100  $\mu\text{l}$ . Es wurden wasserabstoßende 5 ml Polypropylen Röhren verwendet.

### II.5.1 Uptake Messungen

Der Vorinkubationspuffer wurde vollständig mit einer Pipette abgezogen und durch 100  $\mu\text{l}$  eines Transportpuffer, der die markierten Substrate beinhaltet, ersetzt. So waren die Oozyten in den Röhren auch bei geringen Puffervolumina vollständig bedeckt. Nach der Inkubationszeit wurden die Oozyten 3 mal mit eiskaltem Inkubationspuffer gewaschen. Nach dem Waschvorgang, der keine vollständige Reinigung der Oozyten von der Pufferlösung erfordert, da dabei Oozyten beschädigt werden können, wurden die Oozyten in 1 ml Inkubationspuffer manuell lysiert und dann mit einer Plastik-Pasteur-Pipette in die Szintillationsgefäße transferiert. Um die Radioaktivität zu messen, wurden zu den Oozyten 200  $\mu\text{l}$  einer 10 % SDS-Lösung gegeben, die sofort im Anschluß durch einen Vortex-Mixer gleichmäßig verteilt wird. Dieses Vorgehen wird empfohlen, da eine verlängerte Inkubation der Oozyten in 10 % SDS-Lösung die Homogenisierung behindern kann.

### II.5.2 Efflux Messungen

Efflux-Messungen können nach zwei Protokollen durchgeführt werden. Oozyten können entweder mit markierten Substraten vorgeladen oder injiziert werden. Injektion ist die Methode der Wahl, wenn hohe intrazelluläre Konzentrationen erreicht werden sollen. Der Punktionsort schließt sich sehr schnell wieder, so dass die Oozyten kurz nach der Injektion für die Efflux-Messungen verwendet werden können. Die Vorbeladung wird analog zu einer Influxmessung durchgeführt, es werden niedrige radioaktive Substratkonzentrationen verwendet um die spezifische Aktivität zu steigern. Für diese Arbeit wurden lediglich die Aufnahmetechnik verwendet da hierbei genug radioaktiv markierte Aminosäuren in den Oozyten akkumuliert werden konnte. Nach

der Vorbeladung wurden die Oozyten einmalig mit eiskaltem Transportpuffer gewaschen und in 1 ml Transportpuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Da hrBAT als obligater Austauscher funktioniert, wird das radioaktiv markierte Substrat nur freigesetzt, wenn auch extrazellulär, d.h. im Transportpuffer nicht-radioaktiv markierte Aminosäuren vorhanden sind. Für jeden Zeitpunkt wurden 100 µl des Transportpuffers abgezogen und um eine gleichmäßige Verteilung in der Probe zu gewährleisten, wurde das Polypropylen-Röhrchen entweder leicht geschüttelt oder die Probe mehrmalig auf und ab pipettiert. Zur Erstellung der vollständigen Efflux-Kurve müssen die Ergebnisse jeder einzelnen Entnahme über die Zeit integriert werden.

### II.6. Auswertung und Statistik

Alle Ergebnisse wurden mit der Michaelis-Menten-Gleichung bzw. der Hill-Gleichung bearbeitet und ausgewertet.

Gleichung 1:

Michaelis-Menten-Gleichung:

$$I_{max} = I_{max} * S / (K_m + S)$$

$I_{max}$  = maximaler gemessener Strom

$S$  = Substratkonzentration

$K_m$  = Substratkonzentration bei  $I_{max}/2$

Gleichung 2:

Hill-Gleichung :

$$I_{max} = I_{max} * S^n / (S^n + K_m^n)$$

$n$  = Hillkoeffizient

## II. Material und Methoden

Der Hillkoeffizient  $n$  gibt Hinweise auf die Anzahl von Substratbindungsstellen am Molekül, bzw. am Transporter. Dies gilt jedoch nur für die Anzahl an stark kooperativen Bindungsstellen, für die genaue Anzahl an Bindungsstellen muss davon ausgegangen werden, dass die nächst höhere natürliche Zahl zu  $n$  lediglich die minimale Anzahl an Substratbindungsstellen angibt.

Alle ermittelten Werte sind als arithmetisches Mittel (mean)  $\pm$  Standardfehler (SEM, standard error of the mean) angegeben. Der Wert  $n$  bezeichnet die Anzahl der voneinander unabhängigen Messungen der einzelnen Experimente. Die Signifikanz der Werte wurde mit dem gepaarten und ungepaarten students'-t-Test geprüft, und nur Werte mit einer Signifikanz  $p < 0.05$  wurde als signifikant angesehen.

Ströme, die mit dem Vorzeichen  $-$  angegeben werden sind Einwärtsströme (depolarisierend). Ströme mit dem Vorzeichen  $+$  sind Auswärtsströme (hyperpolarisierend).

### III. Kapitel Versuche und Ergebnisse

#### III.1 Elektrogene Eigenschaft des hrBAT Wildtyps und seiner Mutationen R365W und F648S

*Xenopus laevis* Oozyten, die den hrBAT Wildtyp exprimierten, zeigten unter einer 30 s Perfusion mit einer 1 mM Lösung der dibasischen Aminosäure Arginin im Voltage Clamp Modus bei einem Haltepotential von  $-50$  mV am 4. Tag nach RNA-Injektion einen Einwärtsstrom von durchschnittlich  $-54,9 \pm 11,4$  nA ( $n = 4$ ), während die Perfusion einer 3 mM Lösung der neutralen Aminosäure Leucin, unter identischen Bedingungen ein Auswärtsstrom von durchschnittlich  $54,5 \pm 8,77$  nA ( $n = 4$ ) zeigte. Parallel dazu, wurde unter Perfusion einer 1 mM Arginin-Lösung ein durchschnittlicher Einwärtsstrom bei R365W-Oozyten von  $17,69 \pm 3,25$  nA ( $n = 4$ ) und bei F648S-Oozyten von  $7,71 \pm 1,62$  nA ( $n = 4$ ) gemessen und unter Perfusion einer 3 mM Leucin-Lösung, einen durchschnittlicher Auswärtsstrom bei R365W-Oozyten von  $31,51 \pm 3,0$  nA ( $n = 4$ ) und bei F648S-Oozyten von  $9,35 \pm 1,35$  nA ( $n = 4$ ).

Tabelle 8

**Mittelwerte und SEM** der durch die Aminosäuren Arginin und Leucin induzierten Absolutströme ( $I_A$ ) der Aminosäuretransporter hrBAT Wildtyp, hrBAT R365W und hrBAT F648S ( $n = 4$ )

-50 mV	$I_A$ Arginin (nA)	$I_L$ Leucin (nA)
Wildtyp ( $n = 4$ )	$-54,0 \pm 11,4$	$+54,5 \pm 8,$
R365W ( $n = 4$ )	$-17,7 \pm 3,3$	$+31,5 \pm 3.0$
F648S ( $n = 4$ )	$-7,7 \pm 1,6$	$+9,4 \pm 1,4$

## III.2 Expression und Expressionsverlauf

Um die Expression der beiden hrBat Mutanten R365W und F648S zu untersuchen, wurden die durch 1 mM Arginin bzw. 3 mM Leucin induzierten Ströme, beginnend am 1.Tag bis zum 6.Tag nach cRNA-Injektion an Oozyten der selben Oozytenpräparation, täglich im Voltage Clamp Modus und bei einem Haltepotential von  $-50$  mV im Vergleich zum Wildtyp hrBAT gemessen.

### III.2.1 Expression der hrBAT Mutation R365W

#### III.2.1.1 Expression des Leucinstromes

Die Beträge der Ströme, induziert durch 3 mM Leucin, die an den R365W Oozyten gemessen wurden, nahmen in den ersten 5 Tagen täglich zu, erreichten am 5. Tag ihre Maximalwerte und fielen dann am 6.Tag wieder leicht ab. Dennoch war die Expression im Vergleich zum hrBAT Wildtyp sichtbar schwächer.

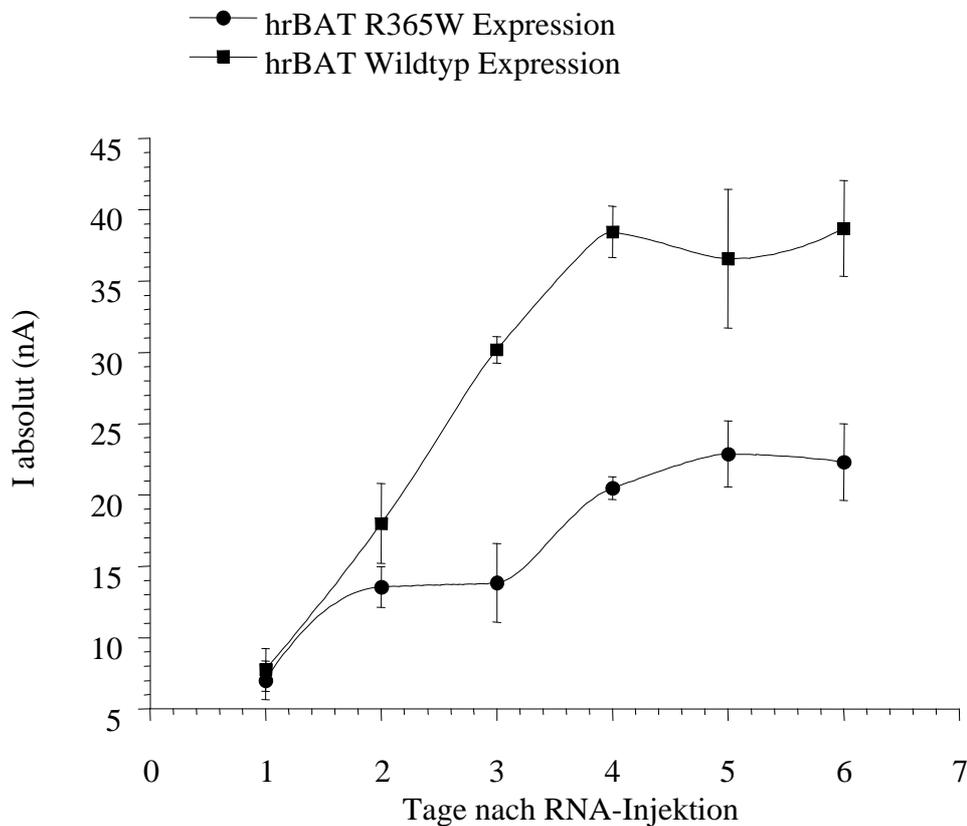
Tabelle 9:

Expressionsverlauf der durch **3 mM Leucin** induzierten Ströme ( $I_A$ ) des **hrBAT Wildtyps** und der **hrBAT R365W** Mutation (Mittelwerte und SEM,  $n = 4$ )

	hrBAT R365W (n = 4)	hrBAT Wildtyp (n = 4)
1.Tag	$+7,0 \pm 1,4$ nA	$+7,8 \pm 1,5$ nA
2.Tag	$+13,6 \pm 1,4$ nA	$+18,0 \pm 2,8$ nA
3.Tag	$+13,9 \pm 2,8$ nA	$+30,2 \pm 0,9$ nA
4.Tag	$+20,5 \pm 0,8$ nA	$+38,4 \pm 1,8$ nA
5.Tag	$+22,9 \pm 2,3$ nA	$+36,6 \pm 4,9$ nA
6.Tag	$+22,1 \pm 2,7$ nA	$+38,7 \pm 3,4$ nA

Abbildung 2:

Expression des **Leucinstromes** 1-6. Tag nach RNA-Injektion des **hrBAT Wildtyp** und der **hrBAT Mutation R365W**



### III.2.1.2 Expression des Argininstromes

Die Expression des durch 1 mM Arginin induzierten Stromes, die an R365W-Oozyten ermittelt wurde, nahm kontinuierlich vom 1. bis zum 6.Tag zu. Allerdings fielen auch die Argininströme im Vergleich zum hrBAT-Wildtyp schwächer aus, auch wenn der Unterschied erst ab dem 4.Tag deutlich sichtbar wurde.

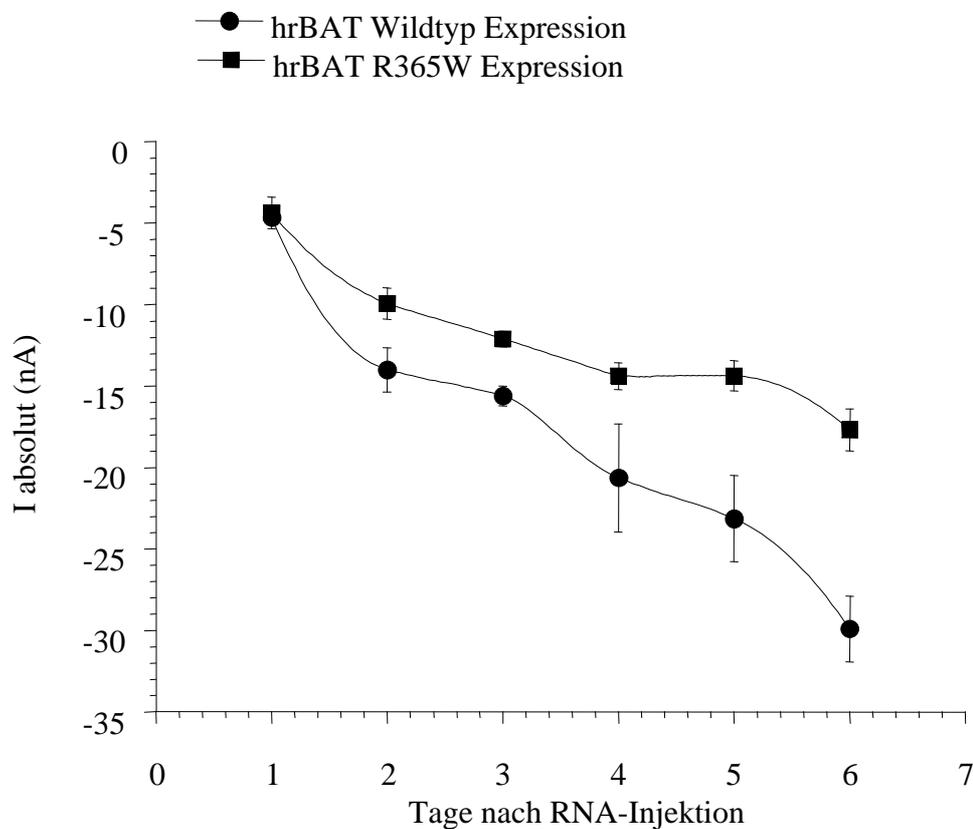
Tabelle 10:

Expressionsverlauf der durch **1 mM Arginin** induzierten Ströme ( $I_A$ ) des **hrBAT Wildtyps** und der **hrBAT R365W Mutation** (Mittelwerte und SEM,  $n = 4$ )

	hrBAT R365W (n = 4)	hrBAT Wildtyp (n = 4)
1.Tag	$-4,4 \pm 1,0$ nA	$-4,6 \pm 0,4$ nA
2.Tag	$-9,9 \pm 1,0$ nA	$-14,0 \pm 1,4$ nA
3.Tag	$-12,1 \pm 0,5$ nA	$-15,6 \pm 0,6$ nA
4.Tag	$-14,4 \pm 0,8$ nA	$-20,6 \pm 3,3$ nA
5.Tag	$-14,8 \pm 0,9$ nA	$-23,1 \pm 2,7$ nA
6.Tag	$-17,7 \pm 1,3$ nA	$-29,9 \pm 2,0$ nA

Abbildung 3:

Expression des **Argininstromes 1.-6.Tag** nach RNA-Injektion des **hrBAT Wildtyps** und der **hrBAT Mutation R365W**



### III.2.2 Expression der hrBAT Mutation F648S

Die Beträge der Ströme, die durch 1 mM Arginin und 3 mM Leucin, an den Oozyten der rBAT Mutation F648S induziert wurden, waren an den Tagen 1-2 nach cRNA-Injektion kaum messbar und zeigten auch nur eine geringe Zunahme an diesen Tagen. Am 3.Tag konnte dann eine leichte Steigerung der Expression des Argininstromes festgestellt werden, während eine Steigerung des Leucinstromes erst am 4. Tag nachzuweisen war. Allerdings ließ sich dann bis zum 6. Tag nach cRNA-Injektion keine nennenswerte Steigerung der Ströme beider Aminosäuren mehr nachweisen, sondern die Werte der Ströme blieben nahezu auf dem Niveau der Werte der Argininströme, die am 3. Tag, bzw. der Leucinströme die am 4. Tag nach cRNA-Injektion ermittelt worden waren.. Im Vergleich zu den Beträgen der Ströme des hrBAT- Wildtyps, war die Expression sowohl der Leucinströme als auch der Argininströme signifikant verringert.

#### III.2.2.1 Expression des Leucinstromes

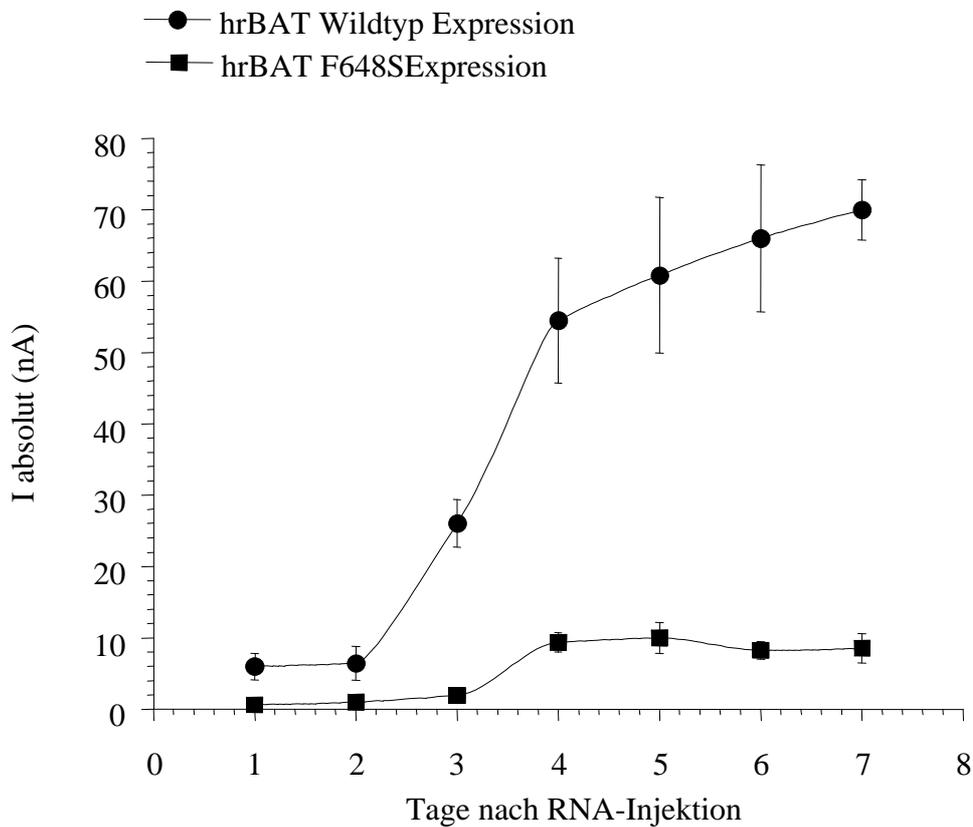
Tabelle 11:

Expressionsverlauf der **Leucinströme** ( $I_A$ ) des **hrBAT Wildtyps** und der **hrBAT Mutation F648S** (Mittelwerte und SEM, n = 4)

	hrBAT F648S (n = 4)	hrBAT Wildtyp (n = 4)
1.Tag	+ 0,6 ± 0,3 nA	+ 6,0 ± 1,8nA
2.Tag	+ 1,0 ± 0,2 nA	+ 6,4 ± 2,4 nA
3.Tag	+ 1,9 ± 0,3 nA	+26,0 ± 3,3 nA
4.Tag	+ 9,4 ± 1,4 nA	+54,5 ± 8,8 nA
5.Tag	+10,0 ± 2,1 nA	+60,8 ±10,9 nA
6.Tag	+ 8,3 ± 1,2 nA	+66,0 ±10,3 nA

Abbildung 4:

Expression des **Leucinstromes 1.-6.-Tag** nach RNA-Injektion des **hrBAT Wildtyps** und der **hrBAT Mutation F648S**



### III.2.2.2 Expression des Argininstromes

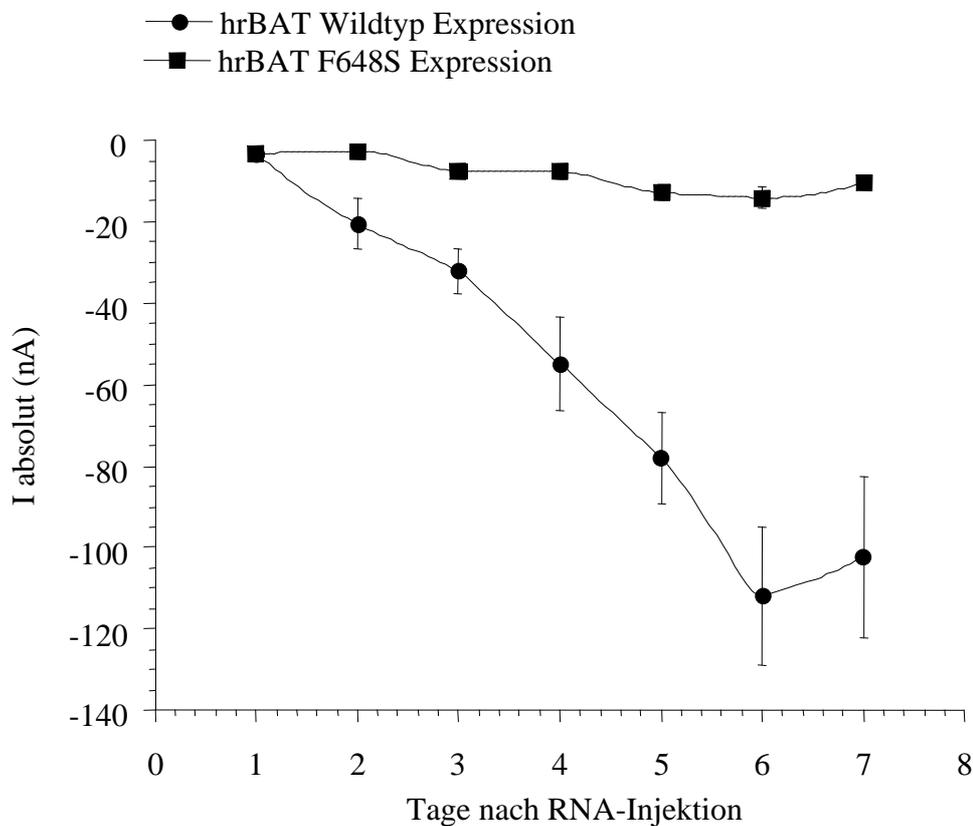
Tabelle 12:

Expressionsverlauf der **Argininströme** ( $I_A$ ) des **hrBAT Wildtyps** und der **hrBAT Mutation F648S** (Mittelwerte und SEM, n = 4)

Tag p.I	HrBAT F648S (n = 4)	hrBAT Wildtyp (n = 4)
1.Tag	-3,2 ± 0,9 nA	- 3,3 ± 0,5 nA
2.Tag	-2,6 ± 0,5 nA	-20,6 ± 6,1 nA
3.Tag	-7,5 ± 0,6 nA	-32,1 ± 5,4 nA
4.Tag	-7,7 ± 1,6 nA	-54,9 ± 11,4 nA
5.Tag	-12,8 ± 1,8 nA	-78,1 ± 11,1 nA
6.Tag	-14,1 ± 2,8 nA	-111,9 ± 16,8 nA

Abbildung 5:

Expression des **Argininstromes 1.-6.Tag** nach cRNA-Injektion des **hrBAT Wildtyps** und der **hrBAT Mutation F648S**



### III.3 Konzentrationsabhängiger Expressionsverlauf

Eine Reihe von hrBAT Mutationen führen aufgrund eines Traffickingdefektes zu einer verringerten Expressionsrate des mutierten Proteins in der Membran (19, 23). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Expression solcher Mutanten durch die Injektion höherer cRNA Konzentrationen gesteigert werden kann, was auf die Übersättigung der intrazellulären Qualitätskontrollmaschinerie zurückgeführt wurde (23). Der Wildtyp dagegen kann nur begrenzt verstärkt exprimiert werden, da die

endogene *Xenopus* Untereinheit limitierend ist. Aufgrund der schwachen Expression beider hrBAT Mutationen R365W und F648S, sollte untersucht werden, ob die Expression, durch Steigerung der Konzentration der injizierten cRNA verstärkt werden kann.

Dazu wurden jeweils *Xenopus laevis* Oozyten der selben Präparation mit 20 ng/μl (= 1 ng cRNA/ Oozyte), 100 ng/μl (= 5 ng cRNA/ Oozyte), 200 ng/μl (= 10 ng cRNA/ Oozyte) und 400 ng/μl (= 20 ng cRNA/ Oozyte) der cRNA des hrBAT Wildtypes oder der hrBAT-R365W bzw. hrBAT-F648S Mutanten injiziert und am 2. und 4. Tag nach cRNA-Injektion für die Messungen verwendet. Die Messungen wurden wie in 2.2 durchgeführt.

Es konnte hiermit gezeigt werden, dass der hrBAT Wildtyp und die hrBAT Mutation R365W Mutation durch Steigerung der Konzentration injizierten cRNA keine wesentliche Expressionsverstärkung aufwiesen.

Dagegen konnte bei der hrBAT Mutation beobachtet werden, dass sich die durch Leucin und Arginin induzierten Ströme mit aufsteigender cRNA-Konzentration deutlich steigern ließen.

#### III.3.1 hrBAT Wildtyp

##### III.3.1.1 Expression des Leucinstromes

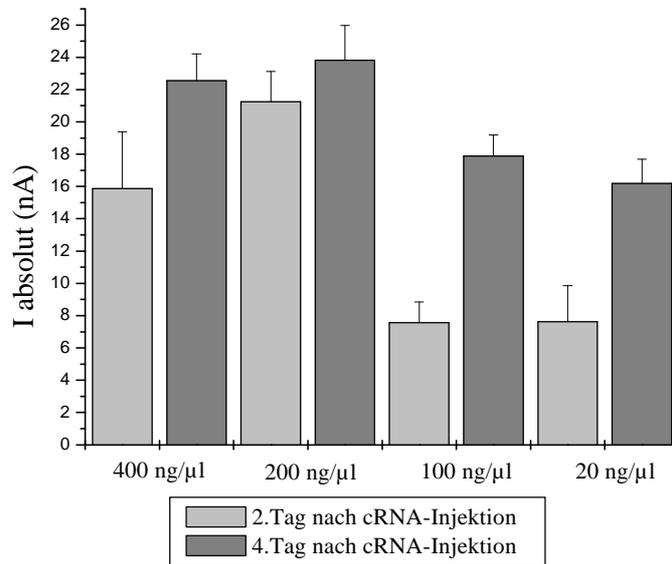
Tabelle 13:

Expression der durch **3 mM Leucin** induzierten Ströme am **2.Tag und 4.Tag** nach cRNA-Injektion des **hrBAT Wildtyps** (Mittelwerte und SEM; n = 4)

C <sub>cRNA</sub>	WT 2.Tag	WT 4.Tag
20 ng/μl	+ 7,6 ± 2,2 nA	+16,2 ± 1,5 nA
100 ng/μl	+ 7,6 ± 1,3 nA	+17,9 ± 1,3 nA
200 ng/μl	+21,3 ± 1,9 nA	+23,8 ± 2,2 nA
400 ng/μl	+15,9 ± 3,5 nA	+22,6 ± 1,7 nA

Abbildung 6:

Absolutwerte der **Leucinströme am 2. und 4.Tag** nach cRNA-Injektion des **hrBAT Wildtypes**



### III.3.1.2 Expression des Argininstromes

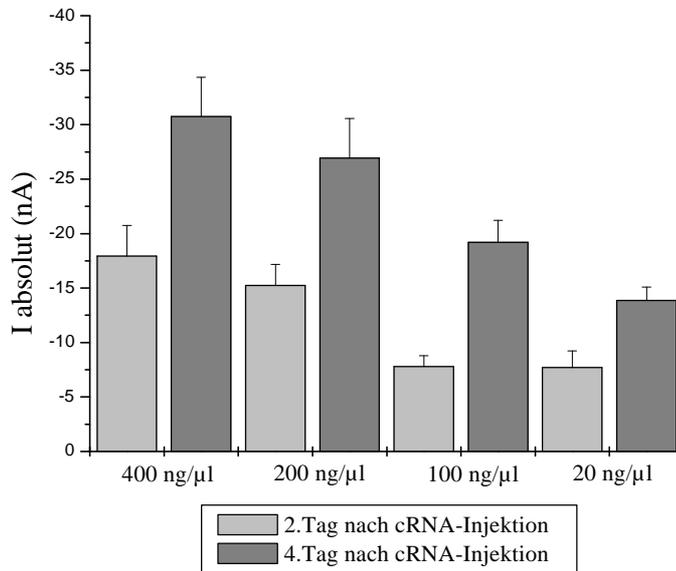
Tabelle 14

Expression der durch **1 mM Arginin** induzierten Ströme am **2.Tag und 4.Tag** nach cRNA-Injektion des **hrBAT Wildtypes** (Mittelwerte und SEM, n = 4)

C <sub>CRNA</sub>	WT 2.Tag	WT 4.Tag
20 ng/μl	- 7,7 ± 1,5 nA	-13,9 ± 1,2 nA
100 ng/μl	- 7,8 ± 1,0 nA	-19,2 ± 2,1 nA
200 ng/μl	-15,3 ± 1,9 nA	-26,9 ± 3,6 nA
400 ng/μl	-17,9 ± 2,8 nA	-30,8 ± 3,6 nA

Abbildung 7:

Absolutwerte der **Argininströme** am **2. und 4.Tag** nach cRNA-Injektion des **hrBAT Wildtypes**.



### III.3.2 hrBAT Mutation R365W

#### III.3.2.1 Expression des Leucinstromes

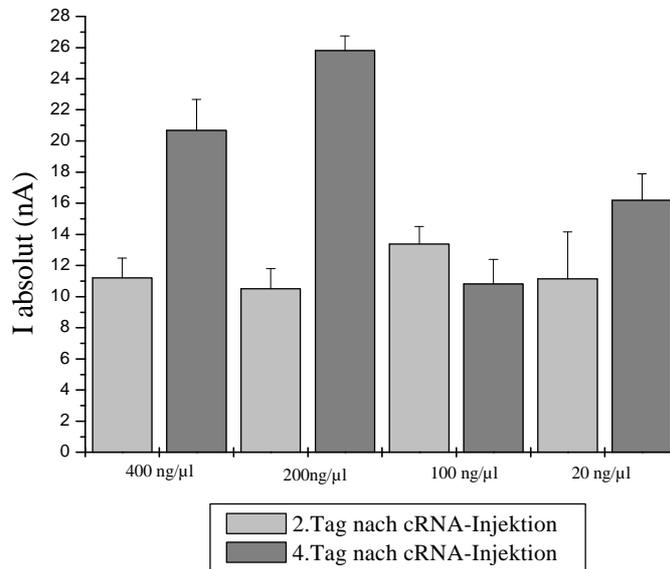
Tabelle 15:

Expression der durch **3 mM Leucin** induzierten Ströme am **2.Tag und 4.Tag** nach cRNA-Injektion der **hrBAT Mutation R365W** (Mittelwerte und SEM, n = 4)

C <sub>cRNA</sub>	R365W 2.Tag	R365W 4.Tag
20 ng/μl	+11,1 ± 3,0 nA	+16,2 ± 1,7 nA
100 ng/μl	+13,4 ± 1,1 nA	+10,8 ± 1,6 nA
200 ng/μl	+10,5 ± 1,3 nA	+25,8 ± 1,0 nA
400 ng/μl	+11,2 ± 1,3 nA	+20,7 ± 2,0 nA

Abbildung 8:

Absolutwerte der **Leucinströme** am **2. und 4. Tag** nach cRNA-Injektion des **hrBAT R365W**



### III.3.2.2 Expression des Argininstromes

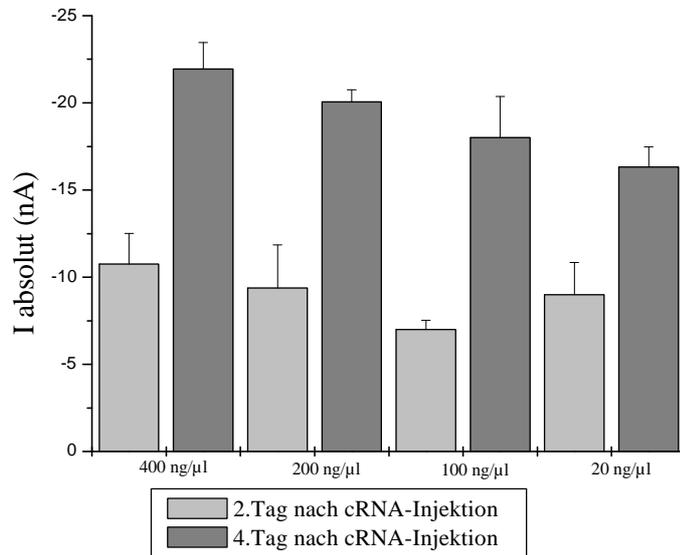
Tabelle 16:

Expression der durch **1 mM Arginin** induzierten Ströme am **2.Tag und 4.Tag** nach cRNA-Injektion der **hrBAT Mutation R365W** (Mittelwerte und SEM, n = 4)

C <sub>cRNA</sub>	R365W 2.Tag	R365W 4.Tag
20 ng/μl	- 9,0 ± 1,9 nA	-16,3 ± 1,2 nA
100 ng/μl	- 7,0 ± 0,5 nA	-18,0 ± 2,4 nA
200 ng/μl	- 9,4 ± 2,5 nA	-20,1 ± 0,7 nA
400 ng/μl	-10,8 ± 1,8 nA	-21,9 ± 1,5 nA

Abbildung 9:

Absolutwerte der **Argininströme** am **2.und 4. Tag** nach cRNA-Injektion des **hrBAT R365W**



### III.3.3 hrBAT Mutation F648S

#### III.3.3.1 Expression des Leucinstromes

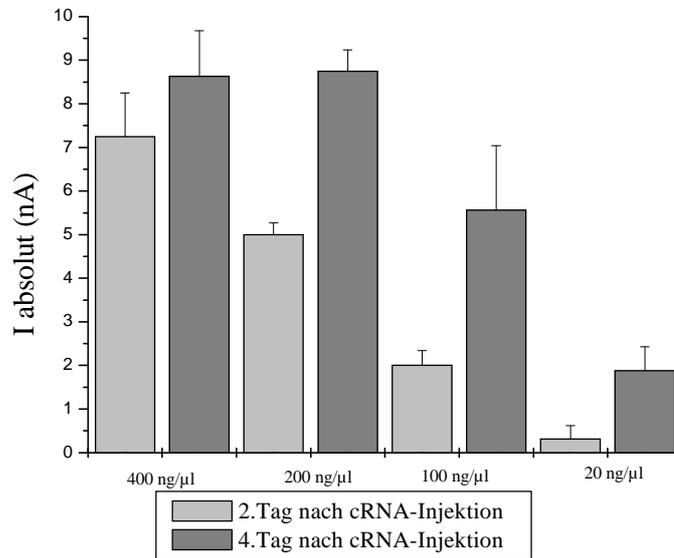
Tabelle 17:

Expression der durch **3 mM Leucin** induzierten Ströme am **2.Tag und 4.Tag** nach cRNA-Injektion der **hrBAT Mutation F648S** (Mittelwerte und SEM, n = 4)

C <sub>cRNA</sub>	F648S 2.Tag	F648S 4.Tag
20 ng/μl	+0,3 ± 0,3 nA	+1,9 ± 0,6 nA
100 ng/μl	+2,0 ± 0,3 nA	+5,6 ± 1,5 nA
200 ng/μl	+5,0 ± 0,3 nA	+8,8 ± 0,5 nA
400 ng/μl	+7,3 ± 1,0 nA	+8,6 ± 1,1 nA

Abbildung 10:

Absolutwerte der **Leucinströme** am **2.und 4.Tag** nach cRNA-Injektion des **hrBAT F648S**



### III.3.3.2 Expression des Argininstromes

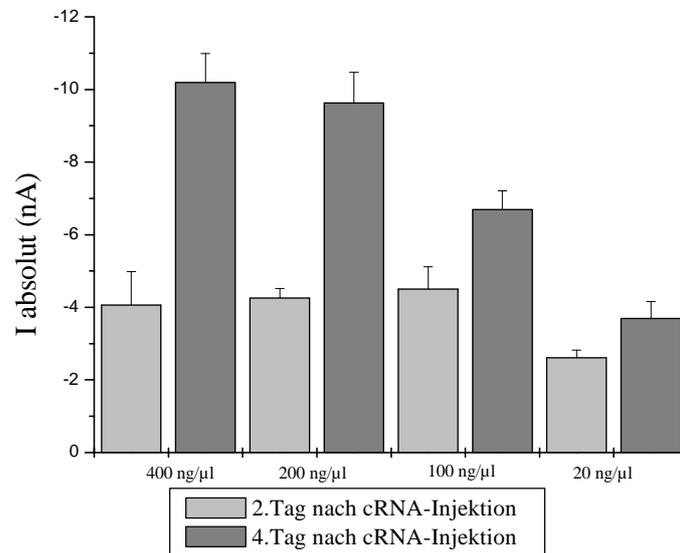
Tabelle 18:

Expression der durch **1 mM Arginin** induzierten Ströme am **2.Tag** nach cRNA-Injektion der **hrBAT Mutation F648S** (Mittelwerte und SEM, n = 4)

C <sub>cRNA</sub>	F648S 2.Tag	F648S 4.Tag
20 ng/μl	-2,6 ± 0,2 nA	- 3,7 ± 0,5 nA
100 ng/μl	-4,5 ± 0,6 nA	- 6,7 ± 0,5 nA
200 ng/μl	-4,3 ± 0,3 nA	- 9,6 ± 0,8 nA
400 ng/μl	-4,1 ± 0,9 nA	-10,2 ± 0,8 nA

Abbildung 11:

Absolutwerte der **Argininströme** am **2.und 4.Tag** nach cRNA-Injektion des **hrBAT F648S**



### III.4 Charakterisierung des Transportes einzelner Aminosäuren durch die hrBAT Mutationen R365W und F648S

Wie oben dargestellt, induziert die Expression von hrBAT in *Xenopus* Oozyten das Aminosäuretransportsystem  $b^{0,+}$ . Dieses System vermittelt den  $\text{Na}^+$ -unabhängigen Transport von neutralen und dibasischen Aminosäuren. Darüberhinaus induziert hrBAT noch  $\text{Na}^+$ -abhängigen Transport dieser Aminosäuren durch Interaktion mit weiteren leichten Untereinheiten (41). Um den von hrBAT induzierten Aminosäuretransport weiter zu charakterisieren, wurden die Affinitäten verschiedener neutraler und dibasischer Aminosäuren in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Natrium untersucht. Dabei handelte es sich um Cystin, Cystein, Phenylalanin, Leucin, und um Lysin ,Ornithin, Histidin und Arginin.

### III. Versuche und Ergebnisse

Für die Gruppe der neutralen Aminosäuren wurden Lösungen folgender Konzentrationen verwendet: 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1 und 3 mM. Eine Ausnahme bildet Cystein. Anstatt 0,003 mM ist 0,01 mM die niedrigste Konzentration und anstelle von 3 mM ist die höchst konzentrierte Lösung 3,5 mM. Außerdem wurde den Cystein-Lösungen zum Schutz vor Oxidation zu Cystin das Anti-Oxidanz DTE (Dithioerythriol, 1 mM) zugesetzt. Cystin war nur in Konzentration bis 0,5 mM löslich.

Für die Gruppe der dibasischen Aminosäuren, deren Transport höheraffin ist, wurden Lösungen dieser Konzentrationen verwendet: 0,001, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3 und 1 mM.

Um zu vermeiden, dass durch die repetitive Gabe einer Aminosäure die intrazelluläre Konzentration der entsprechenden Gegenaminosäure verringert wurde und dies die Messungen beeinflusst, wurde jeweils eine neutrale und dibasische Aminosäure alternierend getestet. Dabei wurde mit den jeweils niedrigsten Konzentrationen unter ND96 ( $\text{Na}^+$ ) begonnen und im Anschluss dieselbe Messung mit NMDG ( $\text{Na}^+$  frei) wiederholt. Dadurch konnten jeweils an einer einzelnen Oozyte der direkten Vergleich der Transporteigenschaften der verschiedenen Aminosäuren unter natriumfreien Bedingungen und unter Kontrollbedingungen (ND96) durch den jeweiligen Transporter erzielt werden.

Soweit nicht anders angegeben, wurden sowohl die erhaltenen Werte der verschiedenen konzentrierten Aminosäurenlösungen der ND96-Versuchsreihe, als auch die Werte der NMDG-Versuchsreihe, auf den Wert der höchstkonzentrierten Lösung der jeweiligen Aminosäure der ND96-Versuchsreihe genormt.

Gleichung 3:

Formel:  $I_0 = I / I_{\text{Cmax(ND96)}}$

## III.4.1 Eigenschaften des Aminosäuretransport durch R365W

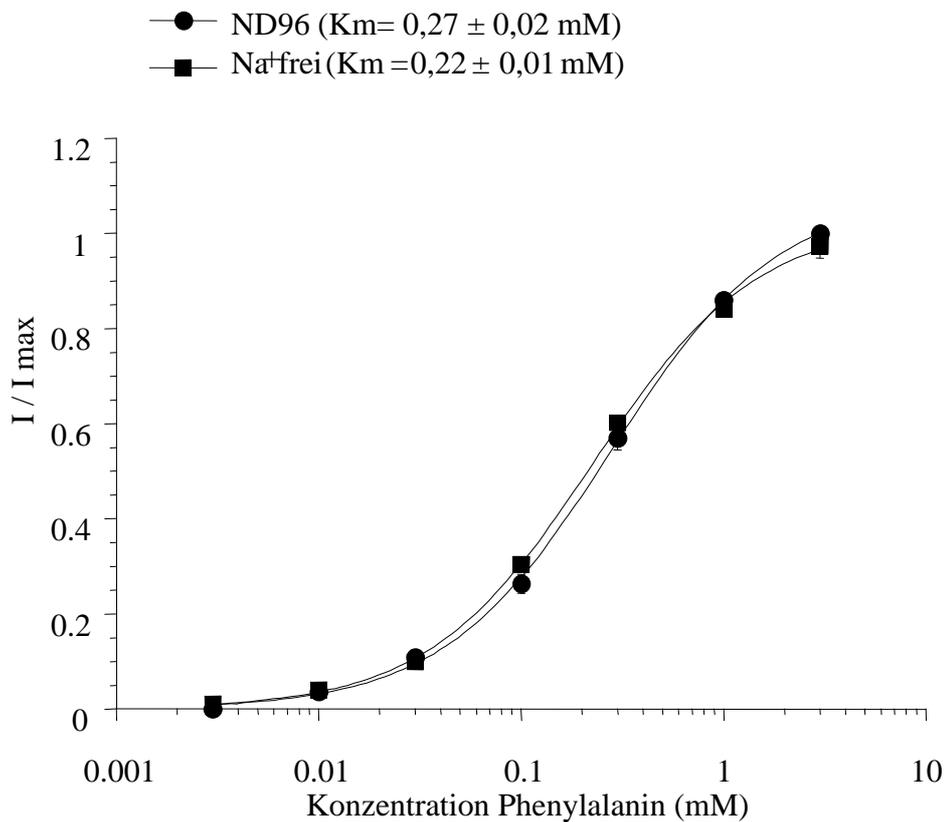
## III.4.1.1 neutrale Aminosäuren

## a) Phenylalanin

Für Phenylalanin ließ sich ein  $K_m$ -Wert für ND96 von  $0,27 \pm 0,02$  mM ( $n = 5$ , Hillkoeffizient: 1) und für natriumfreie Bedingungen ein  $K_m$ -Wert von  $0,22 \pm 0,01$  mM ermitteln ( $n = 5$ , Hillkoeffizient : 1)

Abbildung 12:

Transport der Aminosäure Phenylalanin durch die hrBAT Mutation R365W

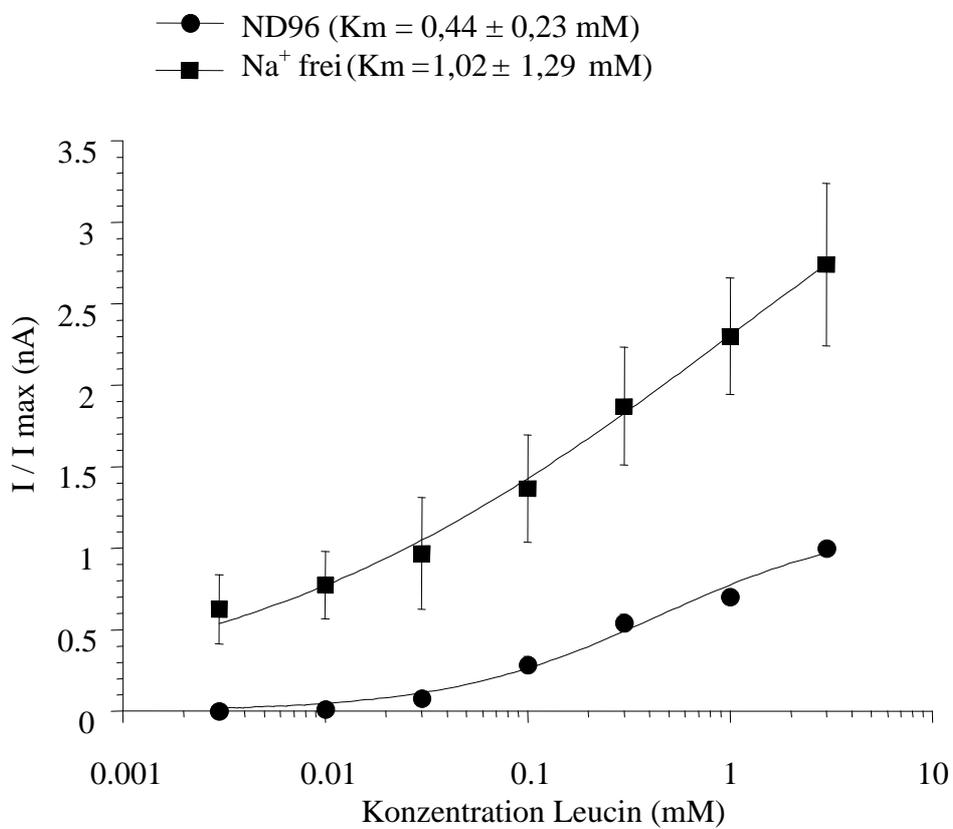


**b) Leucin**

Der  $K_m$ -Wert für Leucin unter ND96 betrug  $K_m$  (ND 96 ) =  $0,44 \pm 0,23$  mM (n = 5, Hillkoeffizient 1). Für die unter natriumfreien Bedingungen gemessenen Werte, konnte ein  $K_m$ -Wert über 1 mM (n = 5, Hillkoeffizient: 1) aufgrund der fehlenden Sättigung nur geschätzt werden

Abbildung 13:

Transport der Aminosäure Leucin durch die hrBAT Mutation R365W

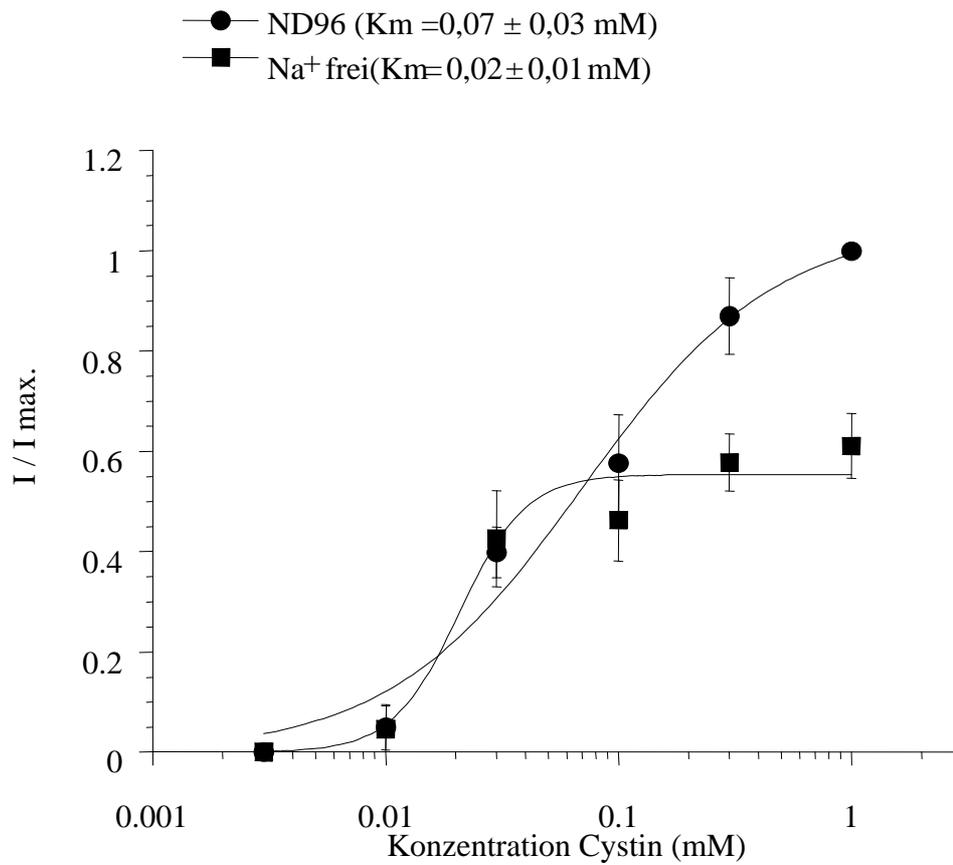


c) Cystin

Für Cystin konnten ein  $K_m$ -Wert unter ND96 von  $0,07 \pm 0,03$  mM ( $n = 5$ , Hillkoeffizient:1) und unter  $\text{Na}^+$ -freien Bedingungen von  $0,02 \pm 0,01$  mM ( $n = 5$ , Hillkoeffizient: 3) ermittelt werden.

Abbildung 14:

Transport der Aminosäure Cystin durch die hrBAT Mutation R365W

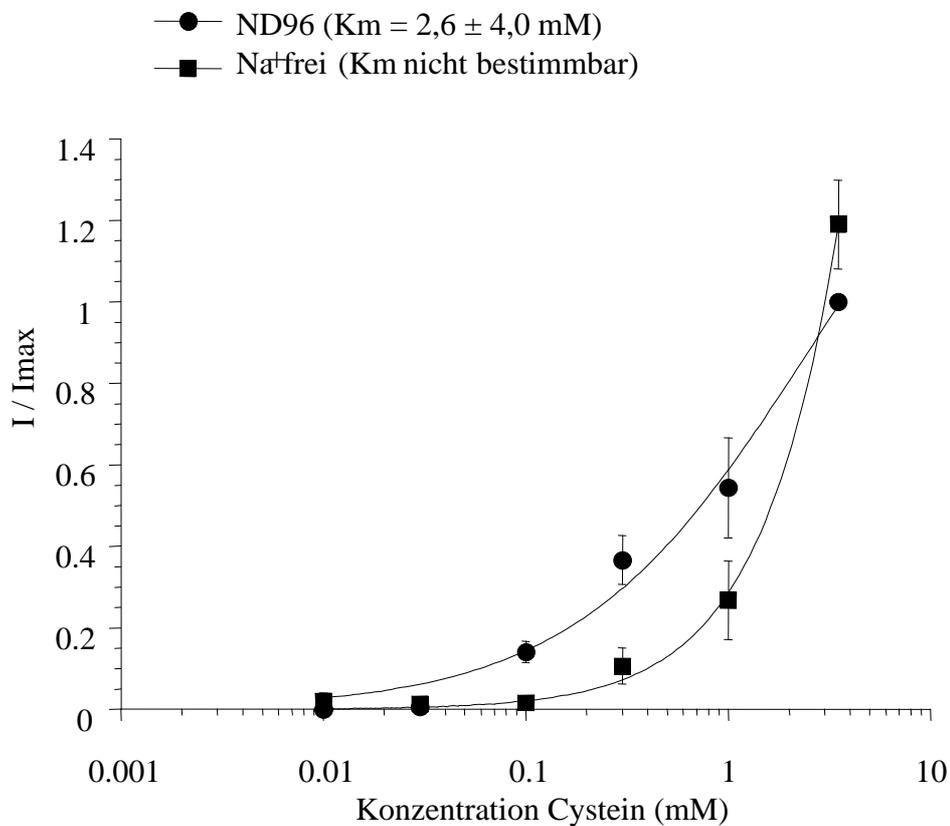


## d) Cystein

Für den Transport von Cystein durch hrBAT R365W konnte unter ND96 ein  $K_m$ -Wert von ca. 3 mM geschätzt werden ( $n = 5$ , Hillkoeffizient: 1), während unter  $\text{Na}^+$ -freier Lösung der  $K_m$ -Wert nicht bestimmbar war. ( $n = 5$ )

Abbildung 15:

Transport der Aminosäure Cystein durch die hrBAT Mutation R365W:



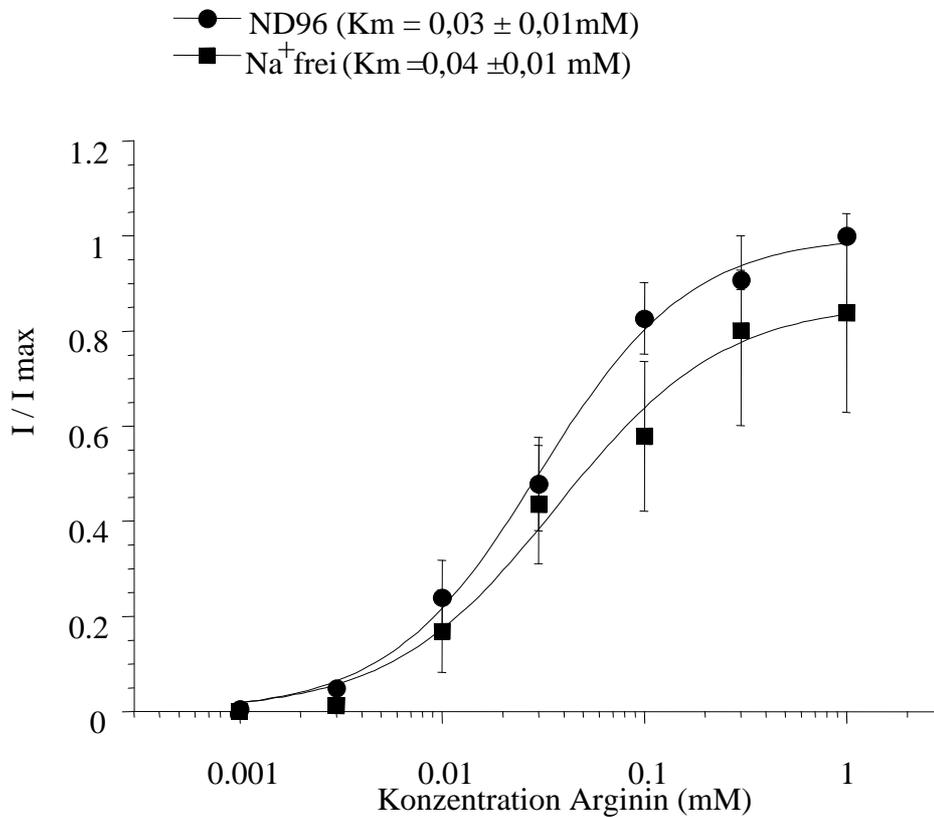
## III.4.1.2 dibasische Aminosäuren

## a) Arginin

Für ND96 konnte ein  $K_m$ -Wert von  $0,03 \pm 0,01$  mM ( $n = 5$ , Hillkoeffizient: 1) bestimmt werden und unter  $\text{Na}^+$ freier Lösung betrug der  $K_m$ -Wert für Arginin  $0,04 \pm 0,01$  mM ( $n = 5$ , Hillkoeffizient: 1).

Abbildung 16:

Transport der Aminosäure Arginin durch die hrBAT Mutation R365W:

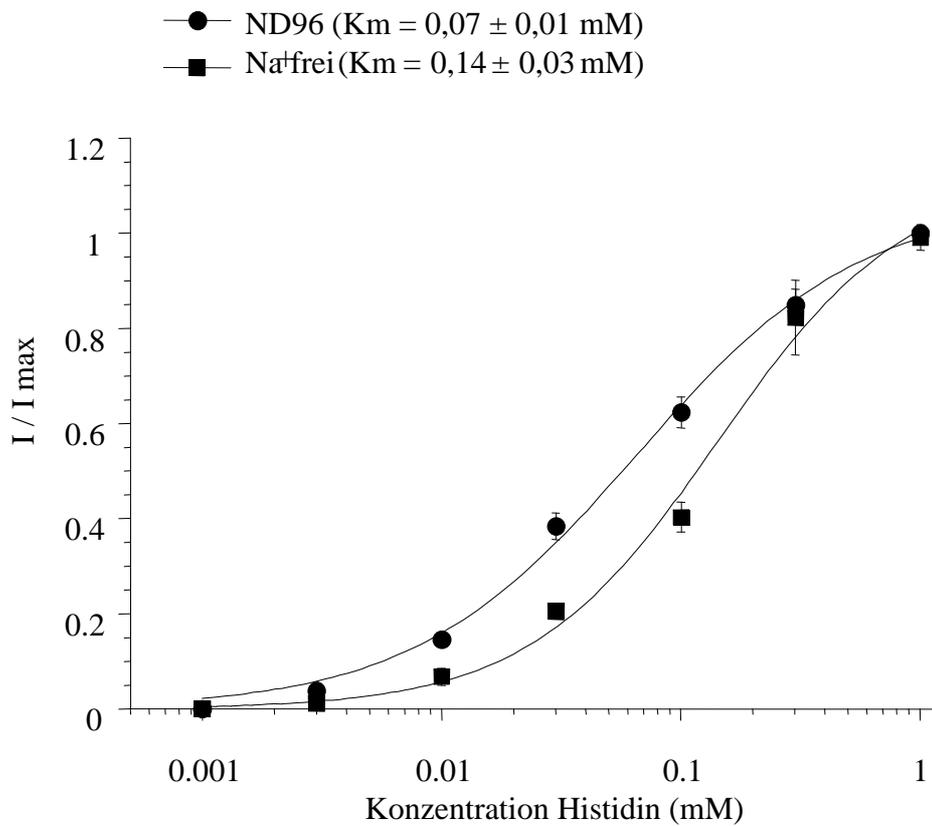


**b) Histidin**

Für Histidin lagen die  $K_m$ -Werte unter ND96 bei  $0,07 \pm 0,01$  mM ( $n = 5$ , Hillkoeffizient: 1) und unter  $\text{Na}^+$ -freier Lösung bei  $0,14 \pm 0,03$  mM ( $n = 5$ , Hillkoeffizient: 1).

Abbildung 17:

Transport der Aminosäure Histidin durch die hrBAT Mutation hrBAT R365W

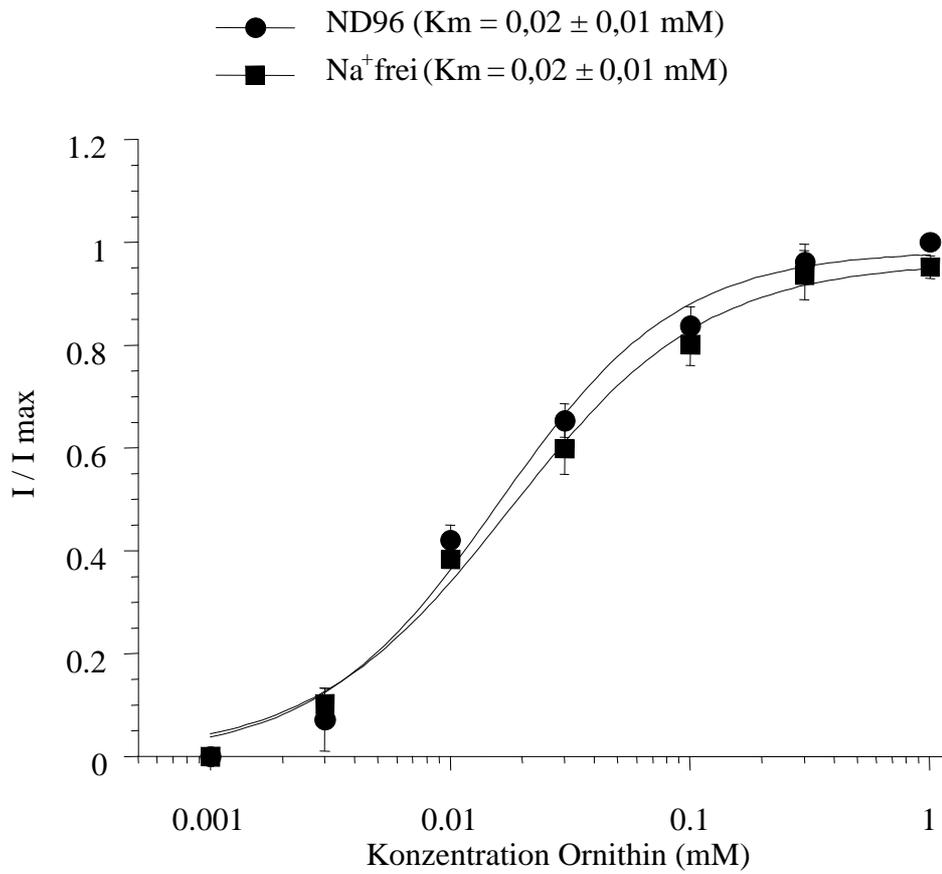


**c) Ornithin**

Unter ND96 konnte ein  $K_m$ -Wert von  $0,02 \pm 0,01$  mM ( $n = 5$ , Hillkoeffizient: 1), ermittelt werden. Unter  $\text{Na}^+$  freier Lösung betrug der  $K_m$ -Wert  $0,02 \pm 0,01$  mM ( $n = 5$ , Hillkoeffizient: 1).

Abbildung 18:

Transport der Aminosäure Ornithin durch die hrBAT Mutation R365W

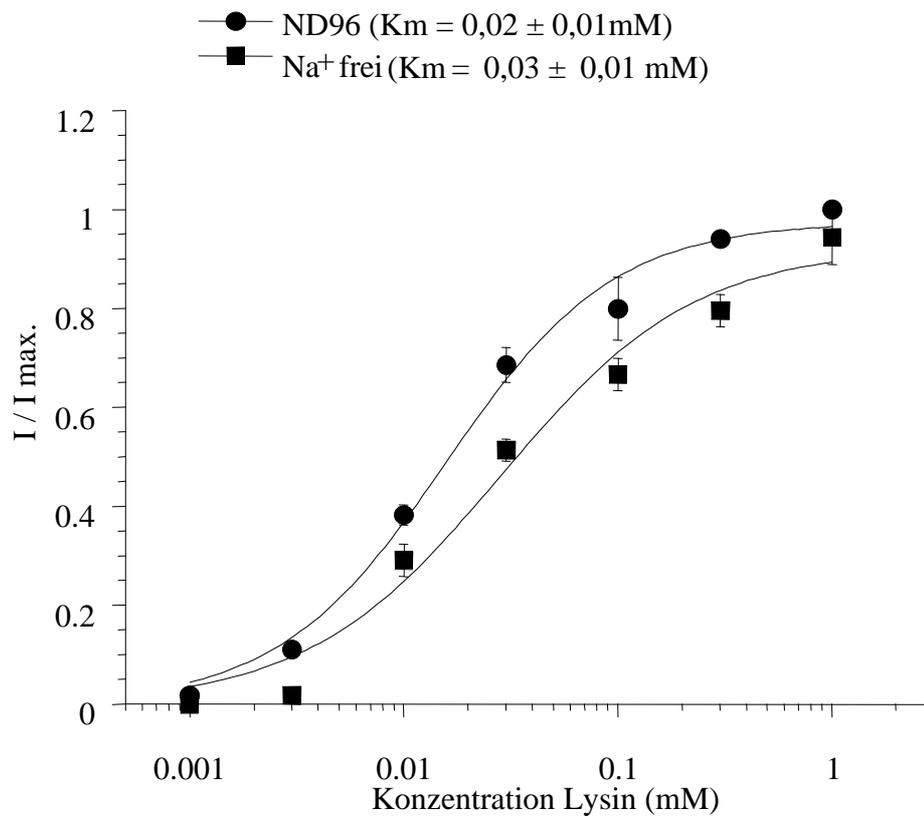


**d) Lysin**

Für Lysin wurde unter ND96 ein  $K_m$ -Wert von  $0,02 \pm 0,01$  mM ( $n = 5$ , Hillkoeffizient: 1) ermittelt und unter  $\text{Na}^+$ -freier Lösung konnte ein  $K_m$ -Wert für Lysin von  $0,03 \pm 0,01$  mM ( $n = 5$ , Hillkoeffizient: 1) gemessen werden.

Abbildung 19:

Transport der Aminosäure Lysin durch die hrBAT Mutation R365W



## III.4.2 Eigenschaften des Aminosäuretransport durch F648S

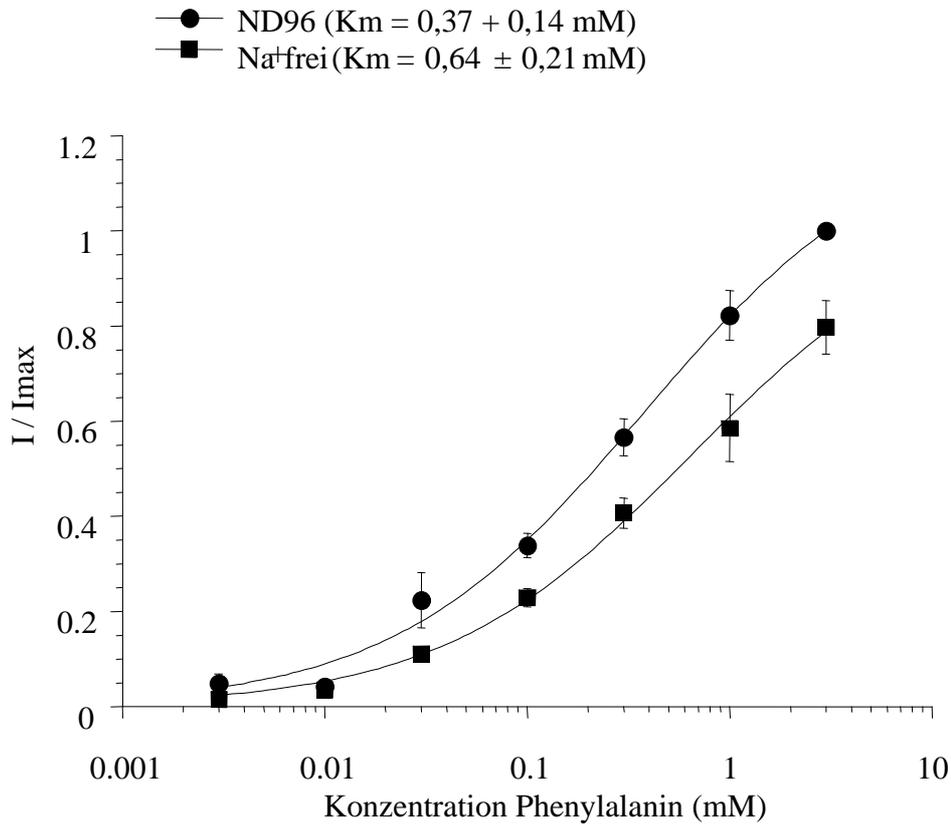
## III.4.2.2 neutrale Aminosäuren

## a) Phenylalanin

Für Phenylalanin wurde unter ND 96 ein  $K_m$ -Wert von  $0,37 \pm 0,14$  mM ( $n = 5$ , Hillkoeffizient: 1), ein ermittelt. Unter  $\text{Na}^+$ -freien Bedingungen wurde ein  $K_m$ -Wert von  $0,64 \pm 0,21$  mM ( $n = 5$ , Hillkoeffizient: 1) gemessen.

Abbildung 20 :

Transport der Aminosäure Phenylalanin durch die hrBAT Mutation F648S



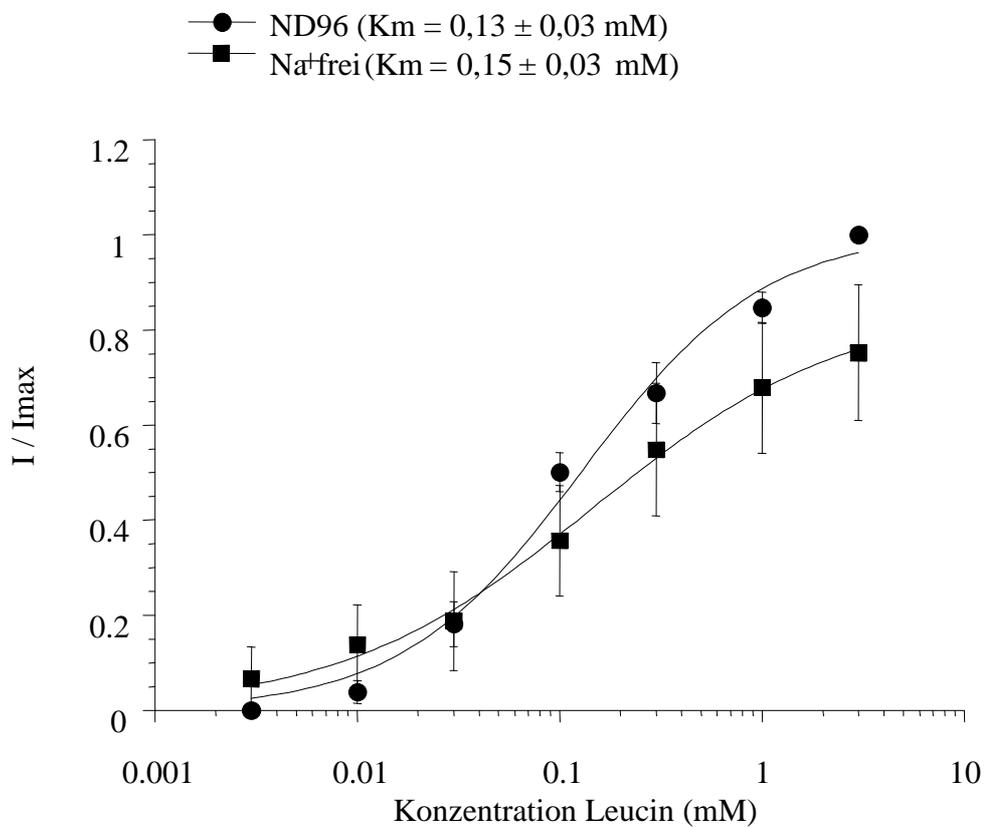
**b) Leucin**

Unter ND96 wurde für Leucin ein  $K_m$ -Wert von  $0,13 \pm 0,03$  mM ( $n = 5$ , Hillkoeffizient: 1) gemessen.

Für  $\text{Na}^+$ -freie Bedingungen ergab sich ein  $K_m$ -Wert von  $0,15 \pm 0,03$  mM ( $n = 5$ , Hillkoeffizient: 1).

Abbildung 21:

Transport der Aminosäure Leucin durch die hrBAT Mutation F648S

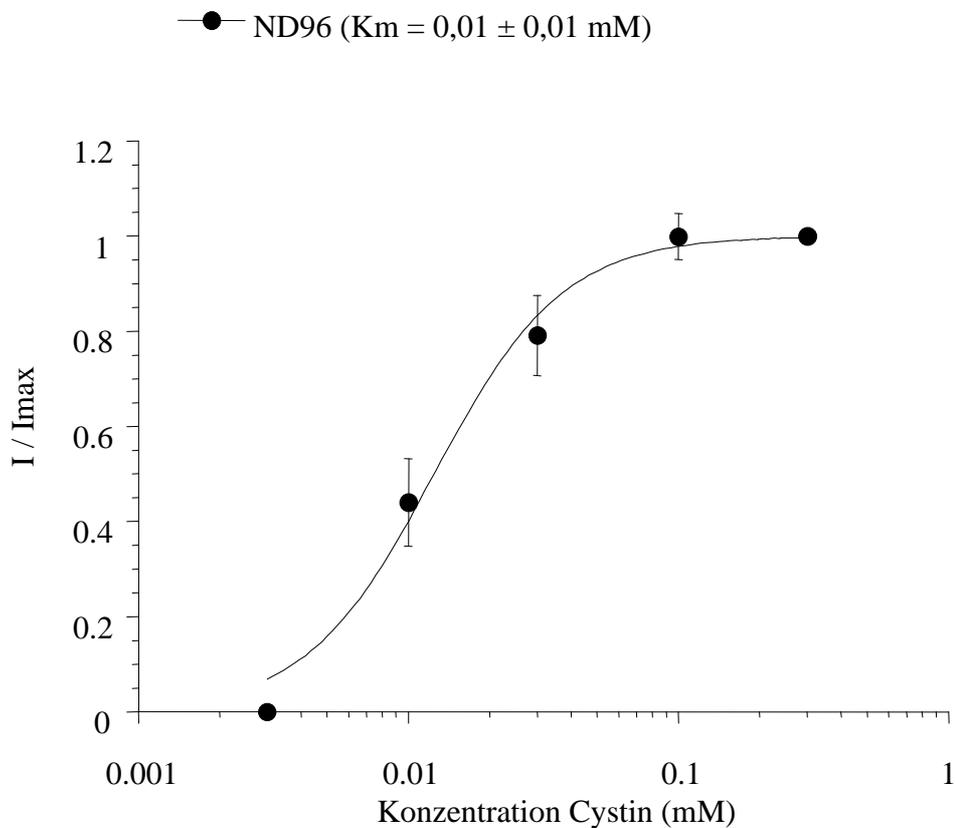


**c) Cystin**

Für Cystin wurde unter ND96 ein  $K_m$ -Wert von  $0,01 \pm 0,01$  mM ( $n = 5$ , Hillkoeffizient: 2) ermittelt. Unter  $\text{Na}^+$ -freien Bedingungen konnte kein konzentrationsabhängiger Transport von Cystin durch hrBAT F648S festgestellt werden ( $n = 5$ ).

Abbildung 22:

Transport der Aminosäure Cystin durch die hrBAT Mutation F648S

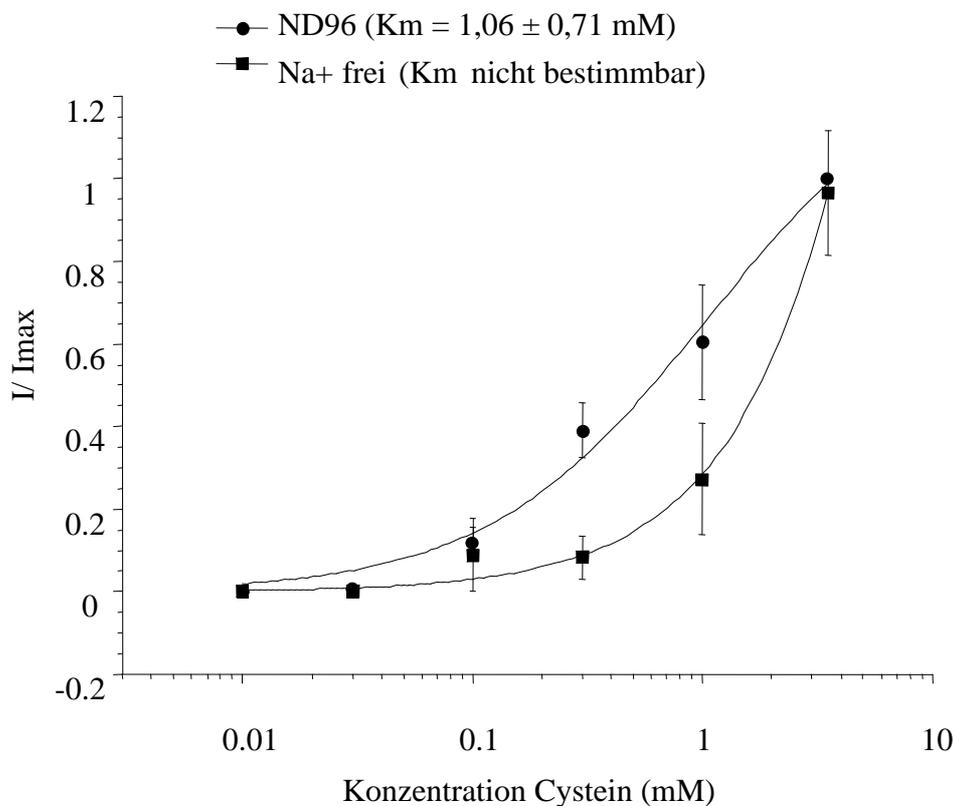


## d) Cystein

Für Cystein wurde unter ND 96 ein  $K_m$ -Wert von  $1,06 \pm 0,72$  mM gemessen ( $n = 6$ , Hillkoeffizient: 1). Unter  $\text{Na}^+$ -freier Lösung konnten der  $K_m$ -Wert ( $n = 6$ , Hillkoeffizient: 1) und der  $I_{\text{max}}$ -Wert nicht ermittelt werden. Die Messergebnisse der 3,5 mM Cystein-Lösung war unter ND96 erheblich niedriger als unter  $\text{Na}^+$ -freier Lösung, während die niedriger konzentrierten Cystein-Lösungen unter ND96 stets höhere Messergebnisse lieferten als unter  $\text{Na}^+$ -freien Bedingungen. Unter  $\text{Na}^+$ -freier Lösung waren größtenteils bis zur Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  Cystein keine Ströme zu messen. ( $1,0 \pm 1,0$  nA) während mit ND 96 kleine, aber signifikante Ströme detektierbar waren ( $2,1 \pm 0,5$  nA)( $n = 6$ )

Abbildung 23:

Transport der Aminosäure Cystein durch die hrBAT Mutation F648S



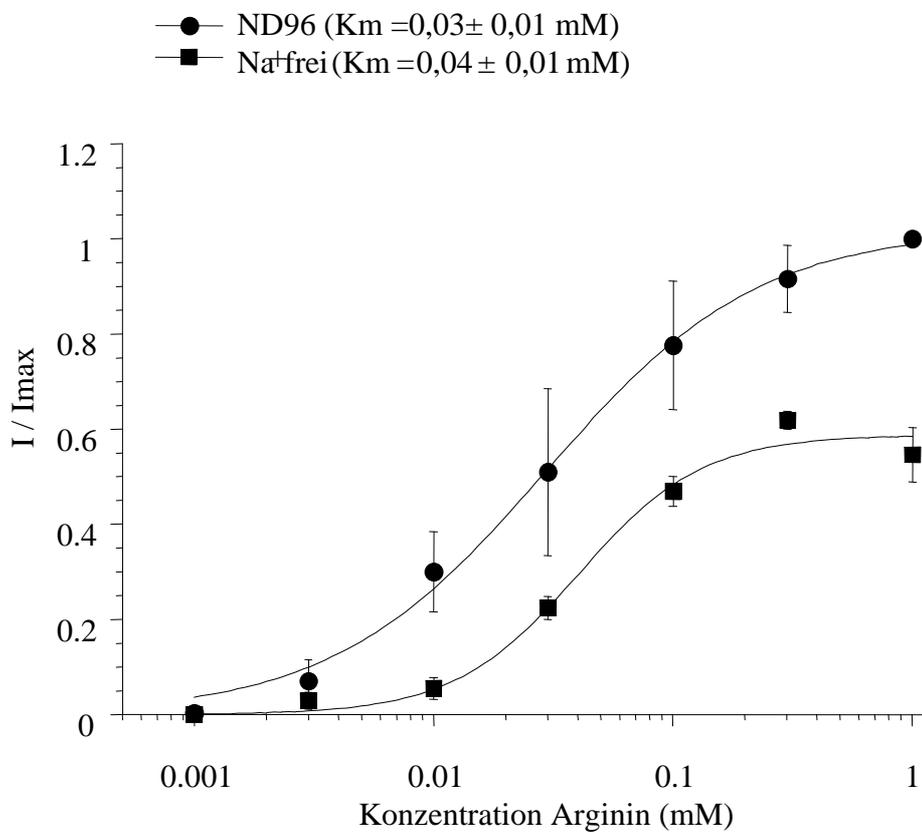
## III.4.2.2 dibasische Aminosäuren

## a) Arginin

Für Arginin ergab sich unter ND 96 ein  $K_m$ -Wert von  $0,03 \pm 0,01$  mM ( $n = 5$ , Hillkoeffizient: 1). Unter  $\text{Na}^+$ -freien Bedingungen konnte ein  $K_m$ -Wert von  $0,04 \pm 0,01$  mM ( $n = 5$ , Hillkoeffizient: 2) ermittelt werden.

Abbildung 24:

Transport der Aminosäure Arginin durch die hrBAT Mutation F648S

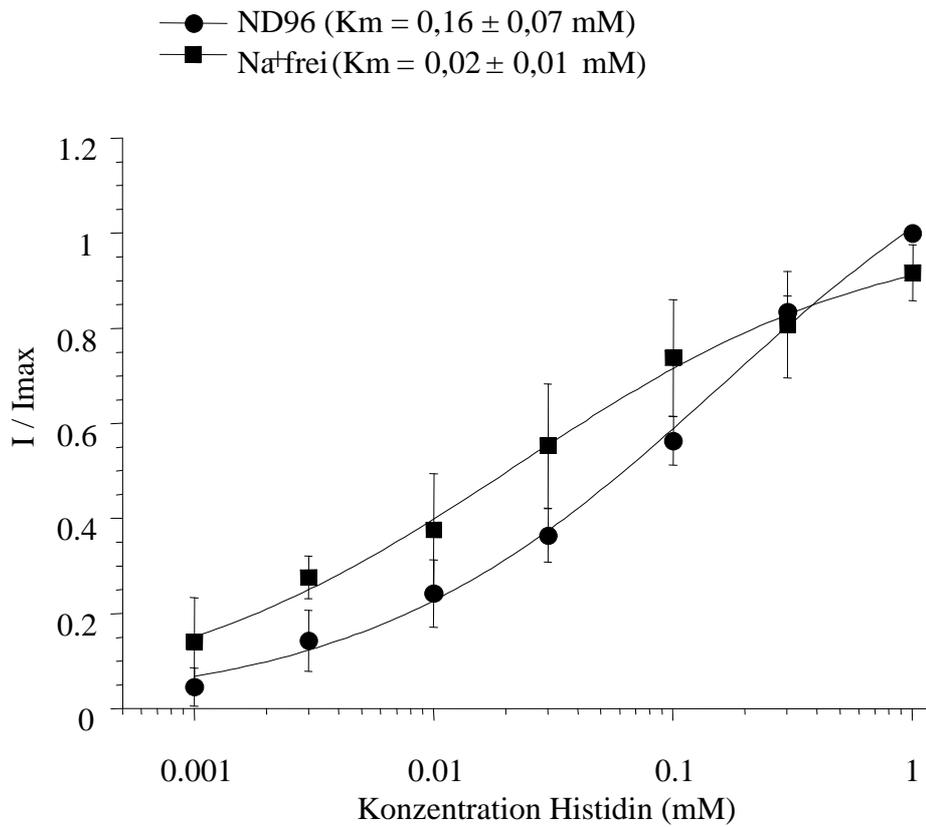


**b) Histidin**

Für Histidin wurde unter ND96 ein  $K_M$ -Wert von  $0,16 \pm 0,07$  mM ( $n = 5$ , Hillkoeffizient: 1) und unter  $\text{Na}^+$ -freier Lösung ein  $K_M$ -Wert von  $0,02 \pm 0,01$  mM ( $n = 5$ , Hillkoeffizient: 1) ermittelt.

Abbildung 25:

Transport der Aminosäure Histidin durch die hrBAT Mutation F648S

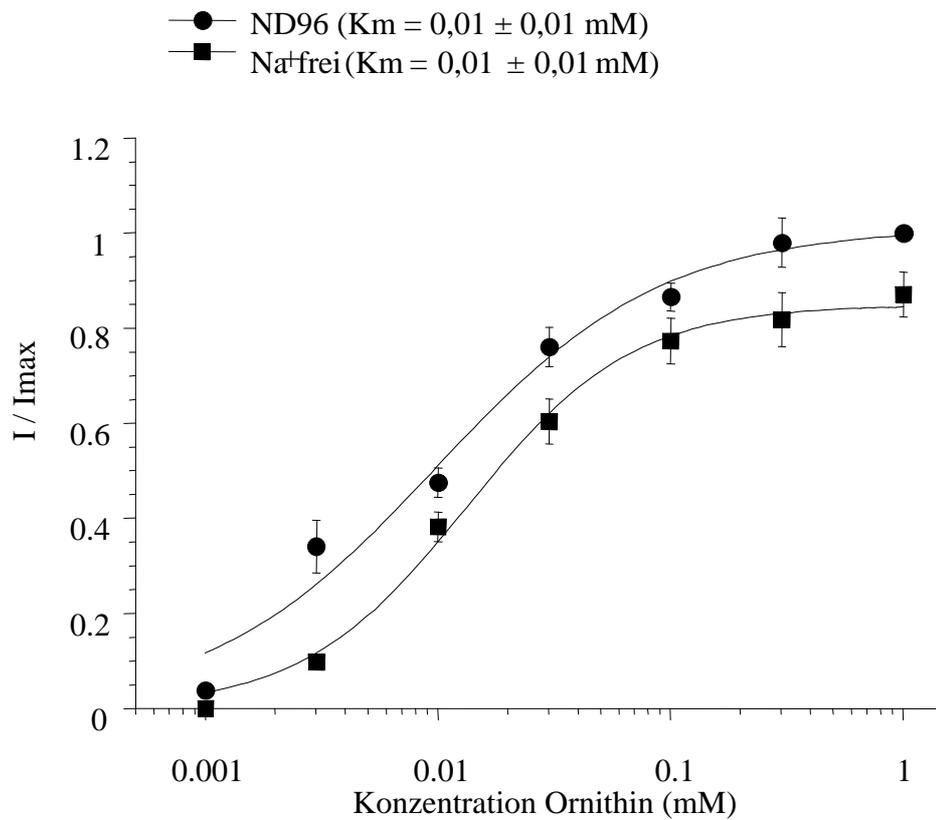


**c) Ornithin**

Für Ornithin ergab sich unter ND 96 ein  $K_m$ -Wert von  $0,01 \pm 0,01$  mM ( $n = 5$ , Hillkoeffizient: 1) und unter  $\text{Na}^+$ -freier Lösung ein  $K_m$ -Wert von  $0,01 \pm 0,01$  mM ( $n = 5$ , Hillkoeffizient: 1).

Abbildung 26:

Transport der Aminosäure Ornithin durch die hrBAT Mutation F648S

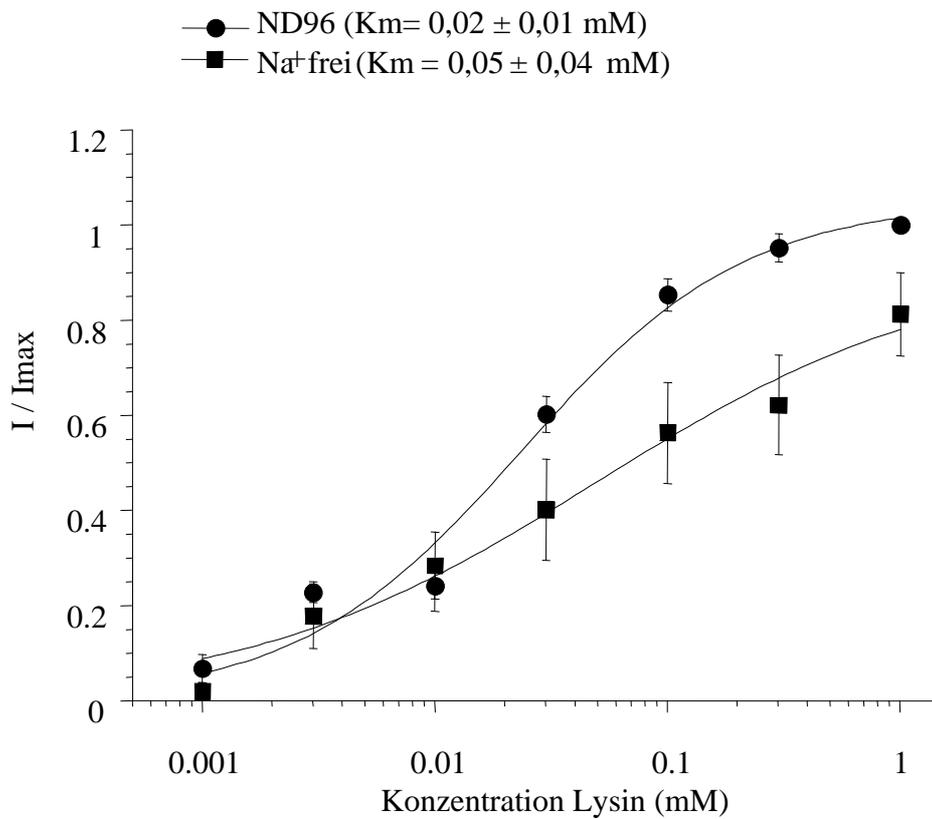


**d) Lysin**

Unter ND96 wurde für Lysin ein  $K_m$ -Wert von  $0,02 \pm 0,01$  mM ( $n = 5$ , Hillkoeffizient: 1) und unter  $\text{Na}^+$ -freie Lösung ein  $K_m$ -Wert von  $0,05 \pm 0,04$  mM ( $n = 5$ , Hillkoeffizient: 1) ermittelt.

Abbildung 27:

Transport der Aminosäure Lysin durch die hrBAT Mutation F648S



### III.5 Spannungsabhängigkeit

Um den elektrogenen Heteroaustausch zu messen, wurde als erstes die Spannungsabhängigkeit untersucht. An derselben Oozyte wurde der durch 1 mM Arginin-Lösung bzw. 3 mM Leucin-Lösung induzierte Strom bei verschiedenen Haltepotentialen gemessen. Dabei wurde das Haltepotential im Bereich zwischen -90 mV und -10 mV in Schritten von 20 mV verändert. Um einen Sättigungseffekt auszuschließen, wurde ein Teil der Versuche beginnend mit -90 mV gemessen, während die restlichen Versuche bei -10 mV gestartet wurden. Dabei zeigte sich kein Unterschied in den ermittelten Werten.

Die Oozyten wurden bei dem jeweiligen Haltepotential, nach Erreichen eines stabilen Membranpotentials und unter ständiger Perfusion mit ND 96, für 30 s mit 1 mM Arginin bzw. 3 mM Leucin umspült. Dies führte dazu, dass bei beiden Mutanten der durch Arginin induzierte Strom seine größten Beträge bei -90 mV erreichte, während die durch Leucin induzierten Ströme ihre größten Werte bei -10 mV zeigten. Dementsprechend wurden die Messergebnisse der Argininversuchsreihe auf die bei -90 mV ermittelten Werte bezogen, während die Leucinströme auf den bei -10 mV gemessenen Wert.

Gleichung 4 und 5:

$$\begin{aligned} \text{Formel: für Arginin: } I_0 &= I_0 / I_{(-90\text{mV})} \\ \text{für Leucin: } I_0 &= I_0 / I_{(-10\text{mV})} \end{aligned}$$

(Die Daten für den hrBAT Wildtyp mit freundlicher Genehmigung von Paul Stehberger)

III.5.1 Die hrBAT Mutation R365W

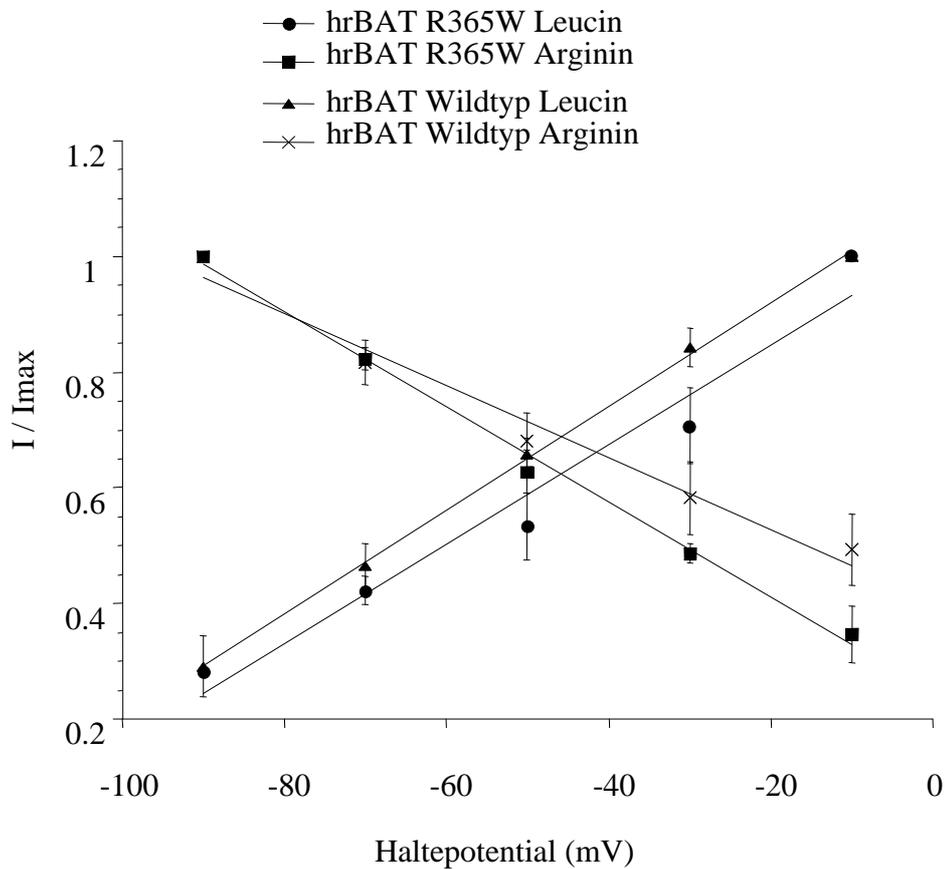
Tabelle 19:

Spannungsabhängigkeit der durch Leucin und Arginin induzierten Ströme der hrBAT R365W Mutation (**Mittelwerte  $\pm$  SEM**)

Spannung (mV)	Io 3 mM Leucin (n = 4)	Io 1 mM Arginin (n = 4)
-90	0,28 $\pm$ 0,01	1
-70	0,42 $\pm$ 0,02	0,82 $\pm$ 0,02
-50	0,53 $\pm$ 0,06	0,62 $\pm$ 0,04
-30	0,71 $\pm$ 0,07	0,49 $\pm$ 0,02
-10	1	0,35 $\pm$ 0,05

Abbildung 28:

hrBAT Mutation R365W: Spannungsabhängigkeit der Leucin und Arginin induzierten Ströme im Vergleich zum hrBAT Wildtyp.



III.5.2 Die hrBAT Mutation F648S

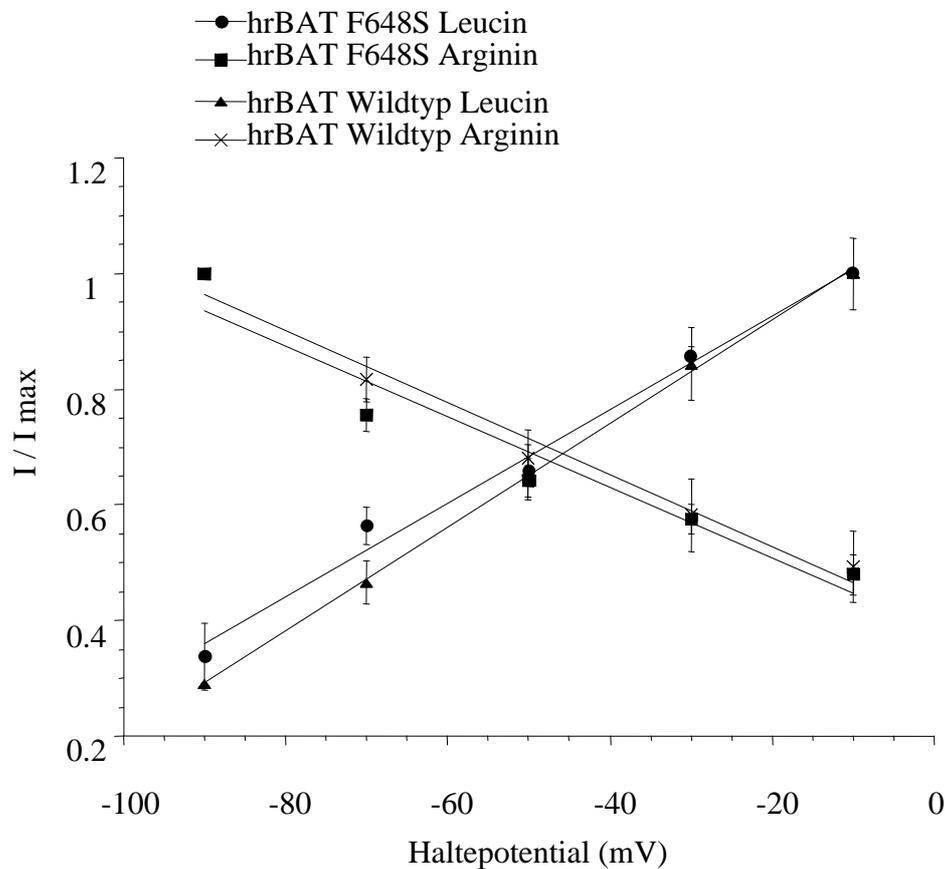
Tabelle 20:

Spannungsabhängigkeit der Leucin und Arginin induzierten Ströme der hrBAT Mutation F648S (**Mittelwerte und SEM**)

Spannung (mV)	Io 3 mM Leucin (n = 4)	Io 1 mM Arginin (n = 4)
-90	0,34 ± 0,06	1
-70	0,57 ± 0,03	0,76 ± 0,03
-50	0,66 ± 0,02	0,64 ± 0,03
-30	0,86 ± 0,02	0,58 ± 0,02
-10	1	0,48 ± 0,03

Abbildung 29:

hrBAT F648S Mutation: Spannungsabhängigkeit der Leucin und Arginin induzierten Ströme im Vergleich zum hrBAT Wildtyp.



### III.6 Intrazelluläre Vorbeladung des hrBAT Wildtypes und der hrBAT Mutationen R365W und F648S

Die heterodimeren Aminosäuretransporter sind obligate Austauscher, d.h es findet Transport nur in Anwesenheit von Substrat sowohl intra- als auch extrazellulär statt. rBAT induziert Heteroaustausch (neutrale gegen dibasische Aminosäuren) und Homoaustausch (neutrale Aminosäure gegen neutrale und dibasische gegen dibasische Aminosäure) wie oben dargestellt. Der elektrogene Anteil, der Heteroaustausch, kann durch Vorbeladen der Oozyten, stimuliert werden und ist damit ein Parameter für die Fähigkeit als Heteroaustauscher zu funktionieren.

Es wurden daher die durch Arginin (1 mM) und Leucin (3 mM) induzierten Ströme gemessen, die Oozyten dann für 15 min entweder 1 mM Arginin oder 3 mM Leucin ausgesetzt um danach wiederum die Arginin und Leucin induzierten Ströme zu messen.

Zur Auswertung wurden die Ströme der Aminosäuren Leucin und Arginin, die vor der Stimulation ermittelt wurden als 1,0 angesehen. Die nach der Stimulation gemessenen Werte, wurden dann in Relation zu diesen Anfangswerten gesetzt.

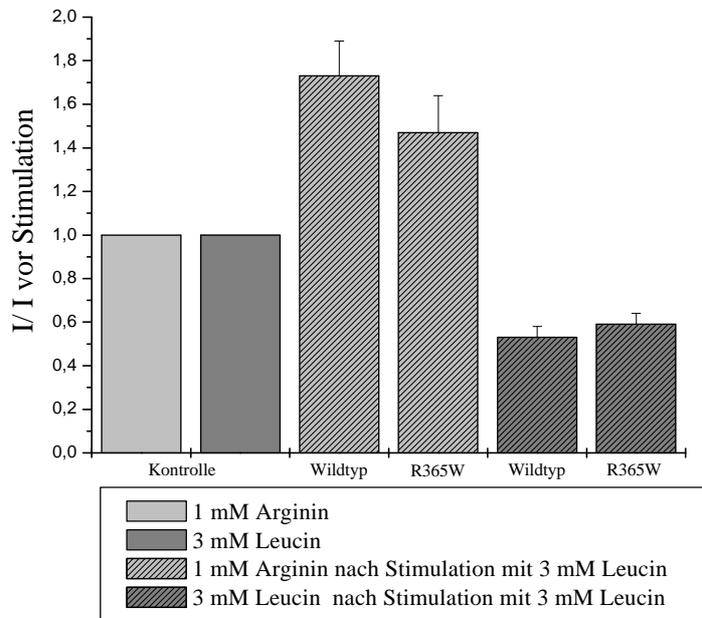
#### III.6.1 Vorbeladung der hrBAT Mutation R365W

##### III.6.1.1 Vorbeladung mit einer neutralen Aminosäure (Leucin)

Bei Vorbeladung der hrBAT Mutation R365W mit 3 mM Leucin konnte eine Steigerung der Argininströme von  $65,0 \pm 12,3$  nA vor der Leucinperfusion auf  $96,21 \pm 20,2$  nA (+ 46,7 %) (n = 6) und eine Reduktion der Leucinströme von  $38,4 \pm 5,6$  nA auf  $24,2 \pm 3,8$  nA (- 41,1 %) (n = 6) beobachtet werden.

Abbildung 30:

Vorbeladung des hrBAT R365W Mutation und des hrBAT Wildtypes mit einer neutralen Aminosäure (Leucin 3 mM)



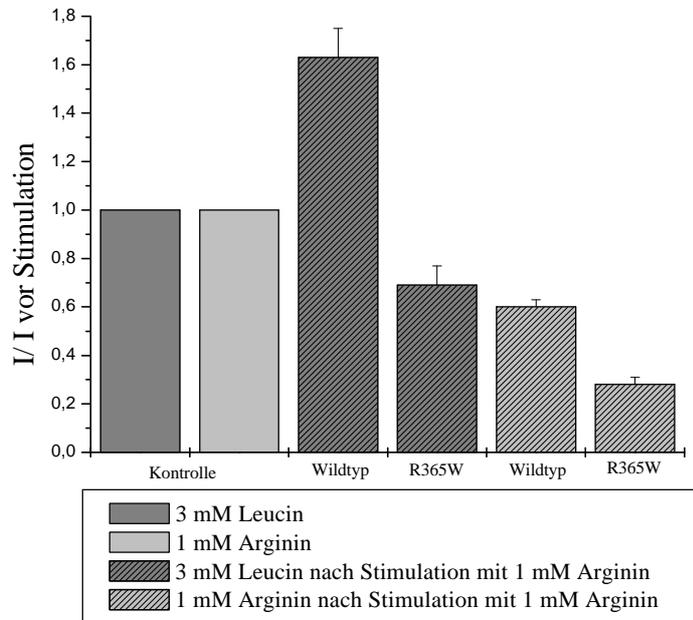
### III.6.1.1.2 Vorbeladung mit einer dibasischen Aminosäure (Arginin)

Hier zeigte sich, dass bei Oozyten, die mit RNA der hrBAT Mutanten R365W injiziert waren, keine Stimulation des Leucinstromes durch eine 15 Minuten Perfusion mit einer 1 mM Arginin-Lösung, sondern vielmehr eine Reduktion nachzuweisen war. Der durch 3 mM Leucin induzierte Strom betrug vor der Argininperfusion  $+36,3 \pm 5,7$  nA und danach  $+26,8 \pm 5,6$  nA (-31 %)(n = 8, signifikante Reduktion).

Der durch 1 mM Arginin induzierte Strom, der vor der Argininperfusion  $-55,6 \pm 5,2$  nA war, reduzierte sich signifikant danach auf  $-14,5 \pm 2,7$  nA. (- 72 %) (n = 8).

Abbildung 31:

Vorbeladung mit einer dibasischen Aminosäure (1 mM Arginin) der hrBAT R365W Mutation und des hrBAT Wildtypes.



### III.6.2 Vorbeladung der hrBAT Mutation F648S

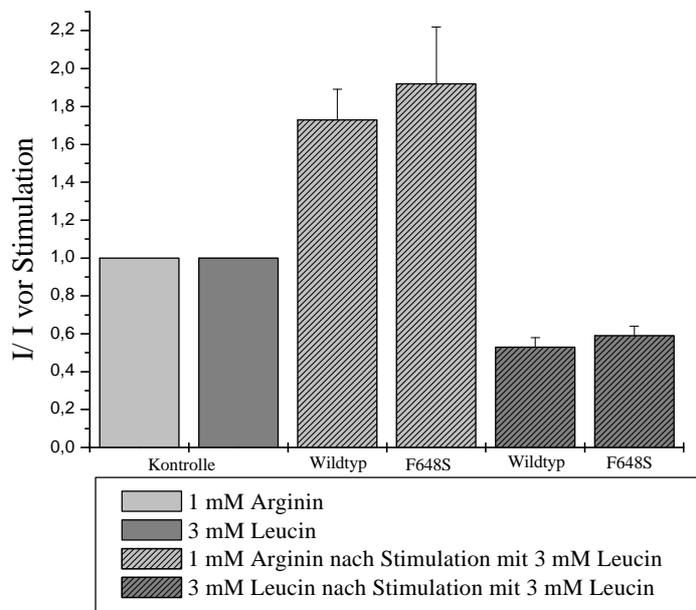
#### III.6.2.1 Vorbeladung mit einer neutralen Aminosäure (Leucin)

Bei den hrBAT F648S Oozyten ließ sich eine Stimulation des Argininstromes durch 15 Minuten Perfusion mit 3 mM Leucin erzielen. Der durch 1 mM Arginin induzierte Strom betrug vor der Leucinperfusion  $-9,8 \pm 2,2$  nA und nach der Perfusion  $-16,6 \pm 2,0$  nA (+ 92 %) (n = 5).

Der durch 3 mM Leucin induzierte Strom wurde durch die Leucinbeladung reduziert, er wies vor Beladung  $+17,1 \pm 1,9$  nA und danach  $+10,4 \pm 2,3$  nA auf (- 41 %) (n = 5).

Abbildung 32:

Vorbeladung mit einer neutralen Aminosäure (3 mM Leucin) des hrBAT Wildtypes und der hrBAT F648S Mutation.



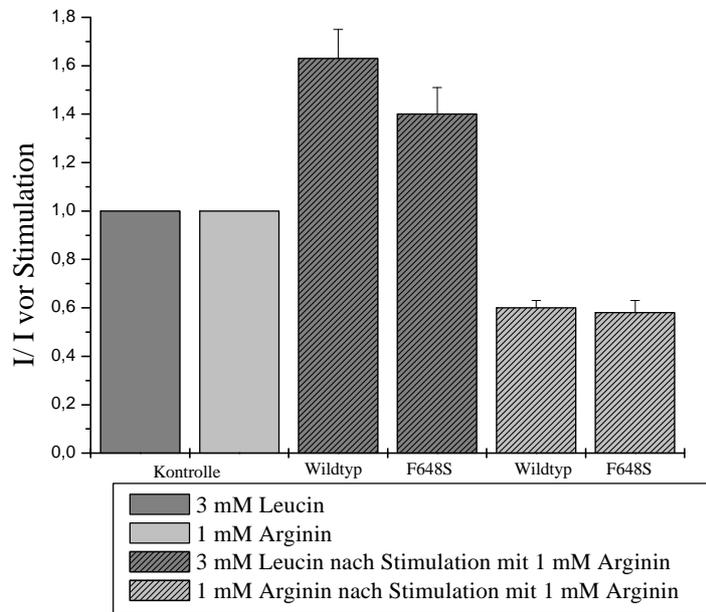
### III.6.2.2 Vorbeladung der hrBAT F648S Mutation mit einer dibasischen Aminosäure ( Arginin)

Auch hier ließ sich an hrBAT F648S exprimierenden Oozyten eine Stimulation des Leucinstromes durch 15 Minuten Vorbeladung durch 1 mM Arginin nachweisen. Es konnte vor der Argininvorbeladung ein Strom von  $+11,0 \pm 1,2$  nA ermittelt werden, der dann nach der Beladung auf  $+15,1 \pm 1,2$  nA anstieg (+ 39,8 %) (n = 5).

Dagegen fiel der durch 1 mM Arginin induzierte Strom von  $-15,7 \pm 1,1$  nA vor der Argininbeladung auf  $-9,0 \pm 0,7$  nA danach (- 42,1 %) (n = 5).

Abbildung 33:

Vorbeladung des hrBAT Wildtypes und der hrBAT F648S Mutation mit einer dibasischen Aminosäure (1 mM Arginin)



### III.7 Untersuchung der Austauscherfunktion der hrBAT Mutation R365W mit Tracer-Flux-Messungen

Influx-Messungen von L-[<sup>3</sup>H]Arginin und L-[<sup>3</sup>H]Leucin wurden in ND 96 am 4. Tag nach cRNA-Injektion durchgeführt.

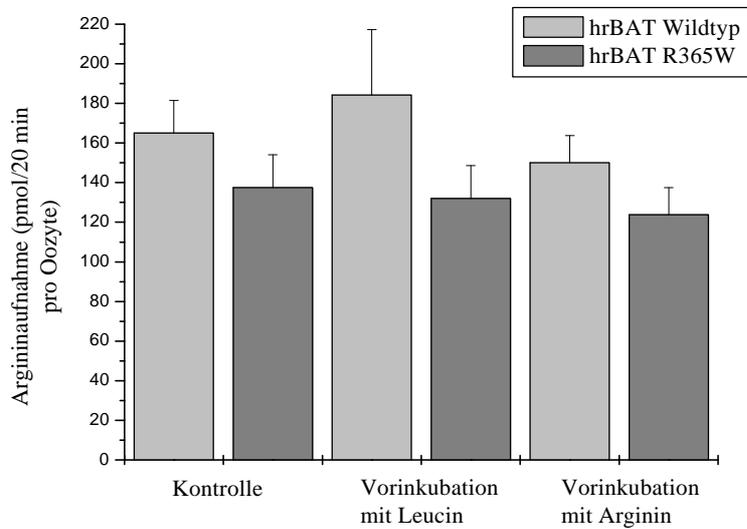
#### III.7.1 Argininaufnahme durch die hrBAT Mutation R365W

Am 4.Tag nach cRNA-Injektion ist die Gesamttransportrate von L-Arginin durch den hrBAT-R365W Mutanten nicht signifikant geringer als die des hrBAT Wildtyps. Auch nach Vorinkubation mit L-Leucin (3 mM) oder L-Arginin (1 mM) konnte keine

veränderte Transportaktivität in hrBAT-R365W Mutanten exprimierenden Oozyten im Vergleich zum hrBAT Wildtyp festgestellt werden.

Abbildung 34:

Gesamttransportaktivität des hrBAT-R365W Mutanten für Arginin im Vergleich zum hrBAT Wildtyp

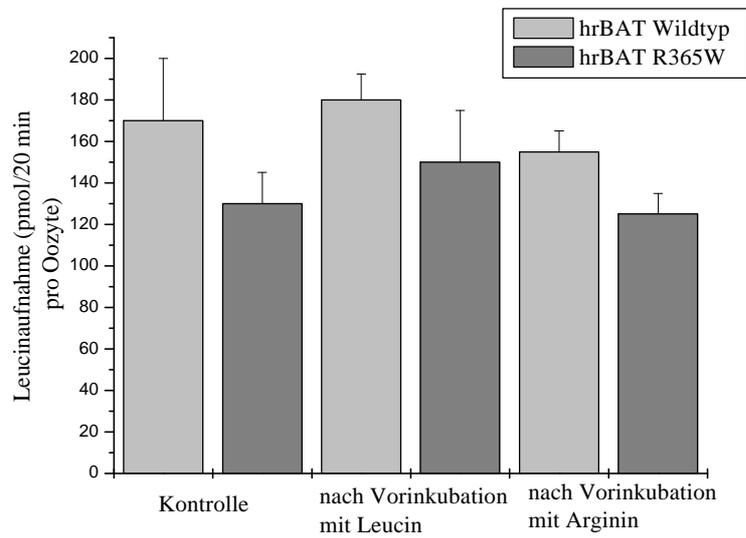


#### III.7.2 Leucinaufnahme durch die hrBAT Mutation R365W

Die Gesamttransportrate von Leucin des hrBAT R365W ist im Vergleich zum hrBAT Wildtyp etwas jedoch nicht signifikant vermindert. Doch ist auch hier für die Leucinaufnahme durch hrBAT\_R365W nach Vorinkubationen mit entweder L-Leucin (3 mM) oder L-Arginin (1 mM) keine veränderte Transportrate erkennbar.

Abbildung 35:

Gesamtransportaktivität des hrBAT-R365W Mutanten für L-Leucin im Vergleich zum hrBAT Wildtyp



## IV. Kapitel Interpretation und Diskussion

### IV.1 Fehlerdiskussion

#### IV.1.1 *Xenopus laevis* Oozyten als Expressionssystem

Wie schon in der Einleitung dargelegt, werden zahlreiche funktionelle und elektrophysiologische Studien an Ionenkanälen und Transporter an *Xenopus laevis* Oozyten durchgeführt. Prinzipielle Fehlerquellen liegen in Fehlinterpretationen der Messergebnisse, da endogene *Xenopus* Proteine vorhanden sein können, die der exprimierten Spezies nicht entsprechen und etwa als Kanäle, oder etwa als Aktivatoren der exprimierten Kanäle bzw. Transporter agieren können. Weiterhin liefern die bei Transportern gemessenen Ströme nur bedingt quantitative Aussagen zur Substrat-Transportrate (18). Die natürliche Umgebung des Transportproteins kann nicht in den Oozyten simuliert werden. Regulationsprozesse, die zelluläre Systeme miteinbeziehen (z.B. intrazelluläre *second-messenger* Kaskaden) müssen sehr vorsichtig interpretiert werden und können nicht ohne weiteres auf *in vivo* übertragen werden. Molekularbiologische Prozesse lassen sich mit elektrophysiologischen Methoden kaum untersuchen (18, 34).

Zudem muss beachtet werden, dass durch die Penetration der Mikroelektroden Schäden in der Oozytenmembran entstehen und es so zu Unterschätzungen des Ruhemembranpotentials und des Membranwiderstandes kommen kann (34).

Trotzdem ist die Charakterisierung einzelner Kanäle und Transporter in Oozyten mit Hilfe der Voltage Clamp Methode genauer als mit anderen Methoden. Kinetiken zeigen kleinere Abweichungen, die Ergebnisse sind besser reproduzierbar, und durch das kontrollierte Austauschen von Lösungsbestandteilen lassen sich Abhängigkeiten, etwa die Na<sup>+</sup>-Abhängigkeit, sehr leicht und präzise studieren (18). Außerdem ermöglicht der Vergleich rBAT-Wildtyp injizierter Oozyten mit rBAT-Mutationen injizierten Oozyten und mit Kontrolloozyten eine klare Trennung zwischen Transportphänomenen und Artefakten, da das durch cRNA-Injektion exprimierte Protein in sehr hoher Konzentration an der Zelloberfläche vorhanden ist. Veränderungen der Transporteigenschaften durch die rBAT-Mutationen können genauso analysiert werden.

### IV.1.2 Oozytenpräparationen

Es gab deutliche Unterschiede in der Qualität der Oozyten, die sich in der Größe ihres Ausgangsmembranpotentials und des basalen Leckstromes ausdrückten. Die Qualität war abhängig vom präparierten Frosch, der Präparation selbst und dem Alter der Oozyten.

Ebenso ergaben sich Unterschiede aus der Injektion der cRNA. Die Menge der injizierten cRNA und deren Qualität konnten leicht schwanken. Allerdings beeinflusste dies lediglich die Expressionsrate, andere Veränderungen wurden nicht beobachtet. Die Expression der cRNA konnte durch mehrere Faktoren beeinflusst werden: Temperatur des Oozyteninkubators, Schwankungen in der Zusammensetzung der Aufbewahrungslösung und Unterschiede in den Oozyten selbst.

Um allzu große Unterschiede zu vermeiden, wurden nur Oozyten verwendet, die unter Perfusion mit 1 mM Arginin einen Mindeststrom von -15 nA aufwiesen. Dies galt jedoch nur für den hrBAT Wildtyp. Außerdem wurden die Experimente einer Serie an Oozyten verschiedener Präparationen durchgeführt. Durch den gepaarten und ungepaarten student's t-Test konnten signifikante Unterschiede entdeckt werden.

### IV.1.3 Lösungen

Die genaue Zusammensetzung der Lösungen wurden regelmäßig mit ionenselektiven Elektroden für Kalium, Chlorid, und Calcium überprüft und Schwankungen größer als 1 % wurden nicht toleriert. Ebenso wurden die Gesamtosmolarität und der pH der Lösungen regelmäßig kontrolliert. Nicht ausgeschlossen werden konnten Verunreinigungen der Testsubstanzen durch den Herstellungsprozeß.

Die Testchemikalien wurden in Stammlösungen aufbewahrt, die sich unter dem Einfluß von Temperatur und Licht verändern konnten. Dies wurde vermieden durch das regelmäßige frische Ansetzen der Stammlösungen und ihre Aufbewahrung im Kühl- oder Gefrierschrank.

### IV.1.4 Geräte

Eventuelle elektrische Störungen ausgehend von anderen Geräten, konnten weitgehend durch einen Faraday'schen Käfig verringert werden.

Außerdem konnte die Beschichtung der Silberchlorid-Elektrode beschädigt sein, was jedoch durch regelmäßiges Neubeschichten korrigiert wurde. Der Widerstand der Elektroden konnte durch Verstopfen der Elektrodenspitze zunehmen, dies wurde jedoch vor und nach jedem Experiment durch Messen des Elektrodenwiderstandes in der Badlösung kontrolliert.

### IV.1.5 Auswertung

Verschiedene Einflüsse, etwa die Eigenschaft der Membran der einzelnen Oozyten oder die Flussrate, führten teilweise zu leichten Schwankungen oder Veränderungen der basalen Stromes. Deshalb wurde als Ausgangswert für das Ausmessen der Ströme ein Mittelwert des basalen Stromes vor und nach dem Experiment genommen. Die bei der Analyse ermittelten Hill-Koeffizienten müssen mit Vorsicht interpretiert werden, da diese von der Qualität des Kurvenfittings abhängig sind und nur signifikante Veränderungen bei guten Fittings als signifikant betrachtet wurden.

### IV.2 Funktionelle Charakterisierung der hrBAT Mutationen R365W und F648S

Die Lokalisation des Proteins hrBAT in der apikalen Bürstensaummembran des proximalen renalen Tubulus und die mit ihm assoziierte Aminosäuretransport-Aktivität, identifizierten hrBAT als Teil des hoch-affinen und natriumunabhängigen Reabsorptionssystems für Cystin im S3 Segment des proximalen Tubulus (136, 114, 8, 69). Mutationen im hrBAT-Gen SLC3A1 bei Cystinurie Typ I Patienten konnten diese Hypothese bestärken (10, 19, 46, 49, 79). Da aber hrBAT nur eine Untereinheit eines heterodimeren Transporters darstellt, war zunächst unklar, wie sich hrBAT Mutationen auf die Funktion des gesamten Transporterkomplexes auswirken.

Um den Pathomechanismus der hrBAT Mutationen bei Typ I Cystinurie und die Rolle von hrBAT im Gesamttransporter aufzuklären, müssen diese deswegen funktionell untersucht und charakterisiert werden. Für nur wenige der bisher 40 identifizierten hrBAT Mutationen liegen weitgehend unvollständige funktionelle Daten vor (23, 79, 112).

#### IV.2.1 Expressionsverhalten der hrBAT Mutationen R365W und F648S

Die Expressionsstudien für die hrBAT Mutation R365W konnten zeigen, dass die Leucinströme im Vergleich zum hrBAT Wildtyp ab dem 2.Tag nach cRNA-Injektion deutlich und signifikant erniedrigt waren und auch im Expressionsverlauf nur eine geringe Steigerung aufwiesen. Die Argininströme steigerten sich zwar stärker in ihrer Expression, blieben aber auch unter dem Niveau des hrBAT Wildtyps. Im Gegensatz zu den elektrophysiologischen Messungen, zeigten die radioaktiven Fluxmessungen keinen Unterschied in der Expressionsrate zwischen Wildtyp und R365W Mutation. Die verringerte Stromgröße kann daher auf einen verminderten Anteil an elektrogenem Transport zurückgeführt werden, und reflektiert nicht eine verringerte Expressionsrate.

Anders verhielt es sich bei der Mutation F648S. Der Ausgangsstrom war nur sehr klein und es fand keine starke Steigerung statt. Um weiter aufzuklären, ob dies mit einem verringerten Trafficking des Transportproteines zusammenhängt, wurden aufsteigende

cRNA Konzentrationen des rBAT Wildtypes und der beiden Mutationen injiziert und Arginin- und Leucinströme am 2. und 4. Tag gemessen, wie dies für die M467T und M467K Mutationen gezeigt worden war (23). Der limitierende Faktor für die Stromexpression ist im Normalfall die Verfügbarkeit der endogenen *Xenopus* Untereinheit  $b^{0,+}AT$ . Da diese nur in kleinen Mengen vorhanden ist, reichen beim Wildtyp niedrige cRNA Konzentrationen um eine Sättigung der Expression zu erreichen. Bei einem Traffickingmutanten müssen aber höhere cRNA Mengen injiziert werden, da nur eine geringe Effizienz des Proteintrafficking zur Membran besteht. Beim F648S Mutanten konnte genau dieses Phänomen beobachtet werden, dass selbst bei der höchsten cRNA Konzentration noch keine Expressionssättigung erreicht wurde, während beim Wildtyp und R365W keine signifikante Steigerung mehr zwischen den beiden höchsten cRNA Konzentrationen eintrat.

Ähnliche Ergebnisse wurde für andere hrBAT Mutationen beobachtet (19, 23, 79, 112). Die bisher am häufigsten identifizierte Mutation M467T reduzierte 3 Tage nach cRNA-Injektion die Transportaktivität für Arginin, Leucin und Cystin um ca. 80% gegenüber der des hrBAT-Wildtypes (19, 23). Weitere Untersuchungen konnten allerdings hier zeigen, dass 7 Tage nach der cRNA-Injektion die Expression der hrBAT Mutation M467T nicht mehr signifikant unterschiedlich zu der des hrBAT Wildtypes war (23). Außerdem wurde auch hier die Nichtsättigbarkeit der Expressionsgröße durch hohe cRNA Konzentrationen beobachtet (23). Bei einer Reihe weiterer hrBAT Mutationen wurden Verringerungen der Transportrate berichtet, jedoch in keinem Fall weiter untersucht. T341A und E268K zeigten im Vergleich zum hrBAT-Wildtyp eine signifikant geringere Aufnahme von Cystin und Arginin (79). Und auch die hrBAT Mutationen T216M und R270L führten 30 Stunden nach cRNA-Injektion zu einer Substrataufnahme, die nur 30 % bzw. 7 % der Substrataufnahme des hrBAT-Wildtypes entspricht (112).

Man vermutet, und dies gilt besonders für die hrBAT Mutation M467T, dass diese Mutationen zu einem intrazellulären Traffickingdefekt des hrBAT-Proteins führen. Für die hrBAT Mutation M476T konnte auch ein längerer Verbleib im endoplasmatischen Retikulum und, eine im Verhältnis zu Wildtyp verminderte Menge an hrBAT-Protein in der Zellmembran nachgewiesen werden (23). Es wird vermutet, dass es aufgrund des Aminosäureaustauschs zu einer veränderten Faltung des hrBAT-Proteins im ER

kommt oder, dass die Interaktion mit der leichten Untereinheit beeinträchtigt ist, welche aber essentiell für den Transfer aus dem ER sein könnte (12, 23, 30).

Die Ergebnisse für die hrBAT Mutation F648S lassen darauf schließen, dass das veränderte Protein selbst nach 6 Tagen nicht, oder nicht in ausreichendem Maße die Plasmamembran erreicht. In vivo wird eine verringerte Expression des funktionellen Proteins in der Plasmamembran im proximalen Tubulus oder Dünndarm zu einer verringerten Transportkapazität führen und damit das Auftreten der Cystinurie bei betroffenen Patienten erklären.

### IV.2.2 Kinetische Studien für neutrale und dibasische Aminosäuren

Um herauszufinden, ob die veränderte Funktion der beiden hrBAT Mutationen sich durch eine Veränderung der Bindung der Substrate, d.h. erhöhte  $K_m$ -Werte für verschiedene Substrate äußert, wurden kinetische Analysen des Transportes durchgeführt. Da in anderen Arbeiten beobachtet worden war, dass die Expression von hrBAT in Oozyten durch unspezifische Interaktion mit verschiedenen endogenen Untereinheiten zu  $\text{Na}^+$ -abhängigen und unabhängigen Strömen und Transport führt, wurden alle kinetischen Messungen sowohl in An- als auch Abwesenheit von  $\text{Na}^+$  durchgeführt.

Wie aus der unten aufgeführten Tabelle ersichtlich ist, konnte weder eine Veränderung der Affinitäten zu den einzelnen Substraten noch irgendeine andere kinetische Veränderung des Aminosäuretransportes der beiden hrBAT Mutationen R365W und F648S im Vergleich zum hrBAT Wildtyp festgestellt werden.

Auch die Abwesenheit von  $\text{Na}^+$ -Ionen in der Perfusionslösung zeigte bei beiden hrBAT Mutationen keine signifikante Veränderung der Transportkinetik.

Somit konnte aus diesem Versuch für keine der beiden untersuchten hrBAT Mutationen eine veränderte Transportkinetik festgestellt werden, die den Transportdefekt des hrBAT /  $\text{b}^{0,+}$ AT-Komplexes bei der Cystinurie Typ I erklären könnte.

Tabelle 21:

Folgende Km-Werte (mM) konnten für die beiden rBAT Mutationen und den Wildtyp bestimmt werden (Die Daten für den Wildtyp mit freundlicher Genehmigung von Paul Stehberger):

Aminosäure		hrBAT WT	R365W	F648S
L-Arginin	Na <sup>+</sup>	0,04 ± 0,01	0,030 ± 0,01	0,03 ± 0,01
	Na <sup>+</sup> -frei	0,02 ± 0,01	0,037 ± 0,01	0,04 ± 0,01
L-Lysin	Na <sup>+</sup>	0,04 ± 0,01	0,016 ± 0,01	0,024 ± 0,01
	Na <sup>+</sup> -frei	0,03 ± 0,01	0,028 ± 0,01	0,05 ± 0,04
L-Ornithin	Na <sup>+</sup>	0,03 ± 0,01	0,016 ± 0,01	0,01 ± 0,01
	Na <sup>+</sup> -frei	0,03 ± 0,03	0,018 ± 0,01	0,013 ± 0,01
L-Histidin	Na <sup>+</sup>	0,13 ± 0,02	0,065 ± 0,01*	0,157 ± 0,07
	Na <sup>+</sup> -frei	0,19 ± 0,02	0,142 ± 0,03	0,022 ± 0,01*
L-Leucin	Na <sup>+</sup>	0,38 ± 0,02	0,439 ± 0,23	0,129 ± 0,03*
	Na <sup>+</sup> -frei	0,36 ± 0,08	1,021 ± 1,29	0,147 ± 0,03*
L-Phenylalanin	Na <sup>+</sup>	0,67 ± 0,18	0,276 ± 0,02#	0,372 ± 0,14
	Na <sup>+</sup> -frei	0,51 ± 0,11	0,224 ± 0,01	0,643 ± 0,21
L-Cystein	Na <sup>+</sup>	1,69 ± 0,51	2,596 ± 4,00	1,061 ± 0,72
	Na <sup>+</sup> -frei	1,22 ± 0,48	n. b.	n.b.
L-Cystin	Na <sup>+</sup>	0,08 ± 0,02	0,07 ± 0,03	0,012 ± 0,01
	Na <sup>+</sup> -frei	0,04 ± 0,07	0,021 ± 0,01	n.b.

n.b = nicht bestimmbar

\* signifikant unterschiedlich zum rBAT WT

#signifikant unterschiedlich zum Na<sup>+</sup>freien-Wert

### IV.2.3. Austauschfunktion

#### IV.2.3.1 Veränderung des Austauschmodus durch die hrBAT Mutation R365W

Wie oben dargestellt, vermittelt hrBAT einen obligatorischen Aminosäureaustausch (17). Dabei kann ein elektrogener Heteroaustausch und ein elektroneutraler Homoaustausch unterschieden werden (90). Zur Charakterisierung des physiologisch wichtigeren elektrogenen Heteroaustauschs, wurde der Expressionsverlauf (s.o.), die Spannungsabhängigkeit der Arginin und Leucin induzierten Ströme und die Steigerung bzw. Reduzierung der Ströme nach Vorbeladung der Oozyten mit einer neutralen oder dibasischen Aminosäure untersucht. Um die Gesamttransport- und austauschaktivität zu untersuchen wurden darüberhinaus auch die Aufnahme und der Efflux radioaktiv markierter Aminosäuren gemessen. Es wird keine Aminosäure auf die andere Seite der Plasmamembran transportiert, wenn auf der Gegenseite keine Aminosäure zum Austausch vorhanden ist. Die durch Arginin induzierten Ströme spiegeln den Austausch von Arginin nach intrazellulär gegen neutrale Aminosäuren nach extrazellulär wider, während die durch Leucin induzierten Ströme den Austausch gegen dibasische Aminosäuren zeigen. Berücksichtigt werden muss allerdings, dass hrBAT nicht nur Heteroaustausch sondern auch Homoaustausch vermittelt. D.h., dass auch dibasische Aminosäuren gegen dibasische und neutrale Aminosäuren gegen neutrale ausgetauscht werden können (90). Lediglich der Heteroaustausch ist elektrogen und kann mit elektrophysiologischen Mitteln gemessen werden.

Die Spannungsabhängigkeit der Arginin- und Leucinströme wies bei beiden rBAT Mutationen keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp auf. So konnte bei Depolarisation eine Steigerung der Leucinströme und eine Verringerung der Argininströme beobachtet werden, während bei Hyperpolarisation das Gegenteil zu sehen war.

Die Vorbeladung der Oozyten mit entweder Leucin oder Arginin führte beim hrBAT-Wildtyp zu einer Steigerung des durch Leucin induzierten Stromes um ca. 60 % nach

Argininbeladung und des Argininstromes um ca. 70 % nach Leucinbeladung. Eine neutrale Aminosäure ist demnach in der Lage den elektrogenen Transport einer dibasischen Aminosäure zu stimulieren und umgekehrt (17). Dies stellt jedoch keine Steigerung der Gesamtaustauschaktivität dar, sondern reflektiert lediglich, dass die Zusammensetzung des intrazellulären Aminosäuren-pools geändert wurde und nach Vorbeladung vermehrt elektrogener Heteroaustausch stattfindet.

Dies war auch für die hrBAT-Mutation F648S der Fall. So konnte sowohl eine Vorbeladung der Oozyten mit Arginin die Transportströme für Leucin um ca. 50 % steigern als auch eine Vorbeladung der Oozyten mit Leucin eine Steigerung des Argininstromes um ca. 100 % bewirken.

Für die hrBAT-Mutation R365W konnte ebenfalls eine Stimulation des Arginin induzierten Stromes durch eine Leucin-Vorbeladung um ca. 50 % beobachtet werden. Allerdings konnte keine Stimulation des des Leucinstromes durch Arginin festgestellt werden. Vielmehr reduzierte eine Argininvorbeladung den durch Leucin induzierten Strom um ca. 30 %. Dieses Ergebnis gab Anlass zu der Hypothese, dass das veränderte hrBAT-Protein in einem verändertem Aminosäureaustauschmodus durch den  $b^{0,+}$ -like Transporter resultiert. Um dies noch weiter zu klären, wurde die Gesamttransportrate mit radioaktiv markiertem Arginin bzw. Leucin vor und nach Vorbeladung der Oozyten gemessen. Da hierbei elektrogener und elektroneutraler Transport gemessen werden, sollte eine Vorbeladung der Oozyten zu keiner Veränderung der Gesamttransportrate beim Wildtyp führen. Dies bestätigte sich auch und zeigte auch bei der R365W Mutation keine Verringerung der Gesamtaustauschrate. Dies bedeutet, da die Gesamtaustauschrate gleich blieb, aber die elektrogene Komponente des Heteroaustausches bei Vorbeladung mit dibasischer Aminosäure verringert wurde, dass der Heteroaustauschmodus in Richtung vermehrten Homoaustausch verschoben wurde. Dies konnte mittlerweile durch weitere Effluxmessungen durch A. Albers bestätigt werden. Hierbei zeigte sich, dass der Heteroaustausch sowohl für neutrale als auch dibasische Aminosäuren verringert ist und elektrogener Homoaustausch dominiert (persönliche Mitteilung A. Albers).

Ebenso konnte auch die Arbeitsgruppe von Manuel Palacin durch Kotransfektion von  $b^{0,+}$ AT und hrBAT bzw. hrBAT R365W-Mutation in HeLa Zellen (Uterus-Ca Zelllinie)

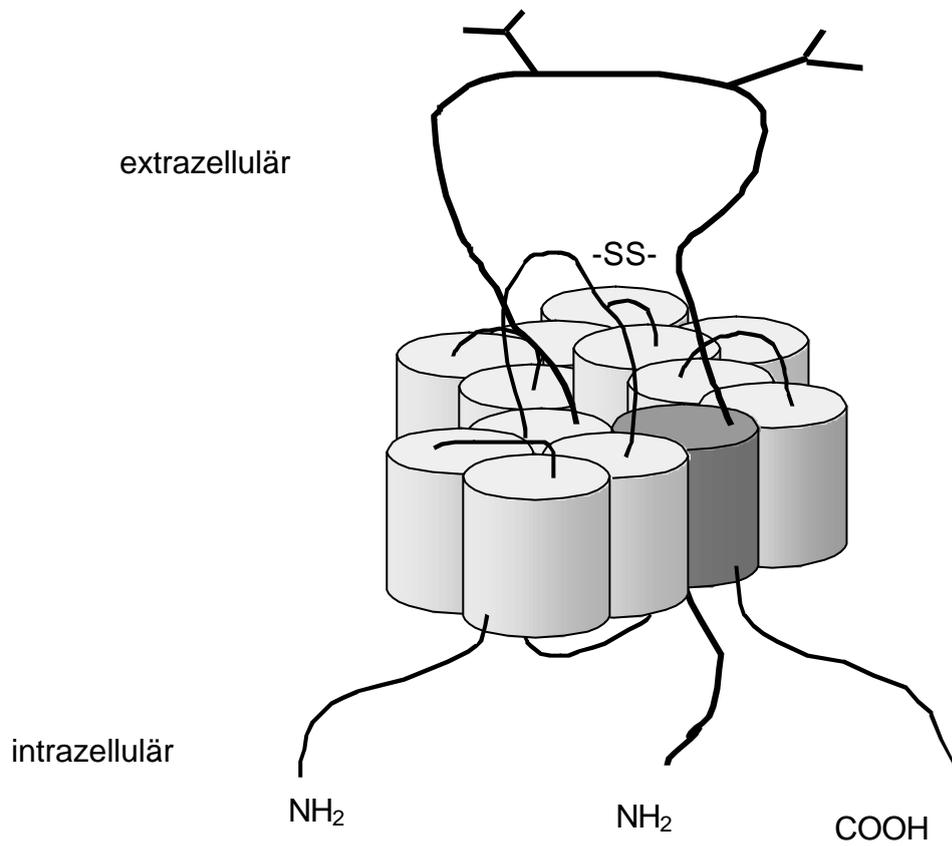
einen vermehrten Homoaustausch durch die hrBAT R365W Mutation beobachten. (mündliche Mitteilung von Manuel Palacin) Das bedeutet auch, dass es sich bei unseren Ergebnissen nicht um einen Oozytenartefakt handelt.

### **IV.2.3.2 Mechanismus des veränderten Austauschmodus**

Welcher Mechanismus bei der hrBAT R365W Mutation zur Veränderung des Austauschmodus führt, kann aufgrund der bisherigen Daten nicht genau geklärt werden. Mehrere sich nicht gegenseitig ausschließende Modelle sind möglich: eine Veränderung in der intrazellulären Bindungsstelle für die Aminosäure, oder eine Veränderung in der Interaktion mit der zweiten Untereinheit  $b^{0,+}AT$ . Diese Veränderung führt in jedem Fall zu einer Verschiebung in der Relation von Homo- und Heteroaustausch durch den  $b^{0,+}$  Transporter. Die Tatsache, dass der Transporter in der Lage ist zu unterscheiden welche Aminosäure innen bzw. außen gebunden ist, deutet darauf hin, dass der Transportmechanismus nicht sequentiell ist, sondern, dass eine gleichzeitige Bindung beider Substrate innen und außen erfolgen muss. Hierfür ist ein Transporter, der aus einem heterodimeren Homodimer aus jeweils zwei hrBAT und zwei  $b^{0,+}AT$  Proteinen besteht, das einfachste Erklärungsmodell. Weitere Studien zur Struktur dieses Transporters sind jedoch noch nötig, um diese Hypothese zu untermauern. Die Daten dieser Doktorarbeit liefern aber einen ersten Hinweis in diese Richtung.

Abbildung 35:

Modell eines Heterodimers bestehend aus einem rBAT-Protein und einem  $b^{0,+}$  AT-Protein.



### IV.4 hrBAT als funktionelle Untereinheit des heterodimeren Aminosäuretransporters $b^{0,+}$

Die Tatsache, dass eine Punktmutation in der hrBAT Untereinheit zu veränderten Eigenschaften des gesamten  $b^{0,+}$  Transporters führt, deutet darüberhinaus stark darauf hin, dass hrBAT eine wichtige funktionelle Rolle in diesem Komplex spielt. Bisher konnte für hrBAT lediglich gezeigt werden, dass es in COS-Zellen von der leichten Untereinheit  $b^{0,+}$ AT zur Plasmamembran begleitet wird, dass die C-terminale Domäne rBATs ebenfalls für die funktionellen Eigenschaften des Transporters von Bedeutung zu sein scheint und, dass hrBAT auch Einfluss auf die Substrataffinität zu haben scheint (41, 42, 107). Die hier dargelegte Veränderung der Austauschfunktion weist auch darauf hin, dass hrBAT direkt in die Austauschfunktion involviert sein muss und die Bindung des intrazellulären Substrates direkt beeinflusst.

### IV.5 Erklärungsmodelle der Pathomechanismen für die hrBAT Mutationen F648S und R365W bei der Typ I Cystinurie

Die beiden in dieser Arbeit charakterisierten hrBAT Mutanten führen demnach durch zwei unterschiedliche Mechanismen zur Ausbildung von Typ I Cystinurie. Während die R365W Mutation eine normale Expression des mutierten Proteins erlaubt, führt die F648S Mutation vermutlich aufgrund eines Trafficking-Defektes zu einer stark reduzierten Expression des ansonsten vollständig funktionellen Proteins.

Für den durch die R365W Mutation veränderten Austauschmechanismus gibt es zwei verschiedene Erklärungsmodelle: 1. Unter physiologischen Bedingungen mit einer intrazellulären hohen Konzentration an neutralen Aminosäuren, werden vermehrt neutrale Aminosäuren resorbiert, so dass für dibasische Aminosäuren und Cystin kein regelrechter Resorptionsmechanismus mehr zur Verfügung steht. Dies scheint allerdings anhand der zum hrBAT Wildtyp nur unwesentlich veränderten extrazellulären Substrataffinitäten und unveränderten Gesamttransportrate der hrBAT Mutation R365W für dibasische Aminosäuren und Cystin eher unwahrscheinlich.

2. Die hrBAT Mutation R365W führt zu einer vermehrten Sekretion von dibasischen Aminosäuren und Cystin. So führt die hrBAT Mutation R365W dazu, dass der Transporterkomplex R365W hrBAT /  $b^{0,+}$  den homologen dem heterologen Austausch vorzieht und somit vermehrt dibasische Aminosäuren gegen dibasische Aminosäuren austauscht.

Die vermehrte Ausscheidung der neutralen Aminosäure Cystin lässt sich am besten damit erklären, dass Cystin vom  $b^{0,+}$  System eher als eine dibasische Aminosäure behandelt wird. Die Affinität für Cystin liegt im Bereich der Affinität für dibasische Aminosäuren und damit ca. 5-10 höher als für neutrale Aminosäuren.

Abbildungx: Modelle für den jeweiligen Pathomechanismus:

**1. Normale Tubuluszelle** hrBAT transportiert bevorzugt dibasische AS ( $AA^+$  und Cystin im Austausch gegen neutrale AS ( $AA^0$ ).  $AA^+$  werden im Austausch gegen  $AA^0$  /  $Na^+$  durch 4F2hc /  $\gamma^+$ LAT1 an der basolateralen Membran sezerniert. Cystin wird mit Hilfe von Gluthation zu Cystein reduziert und dann durch 4F2/LAT2 gegen  $AA^0$  an der basolateralen Membran sezerniert.

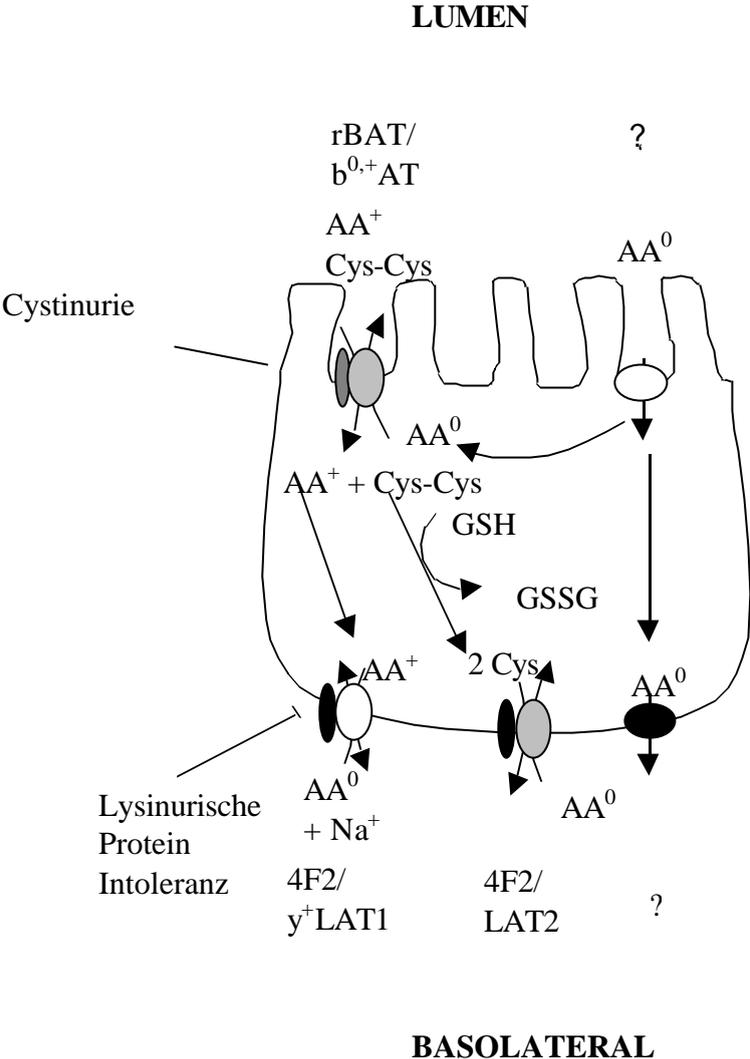
### **2. hrBAT R365W:**

a) die hrBAT Mutation R365W bedingt einen vermehrten homologen Austausch von  $AA^+$ / Cystin gegen  $AA^+$ / Cystin, so werden zwar dibasische Aminosäuren und Cystin resorbiert , aber auch gleichzeitig wieder vermehrt in das Tubuluslumen sezerniert.

b) die hrBAT Mutation R365W führt zu einem vermehrten Austausch von  $AA^0$  gegen  $AA^0$ ,  $AA^+$  und Cystin werden vermehrt in den Urin ausgeschieden.

**3. hrBAT F648S:** das hrBAT F648S Protein ist zwar vollständig funktionsfähig, aber ein Trafficking-Defektes führt zu einer reduzierten Expression in der Plasmamembran. Der Hauptanteil des Transporterproteins bleibt im Endoplasmatischen Retikulum / Golgi-Apparat zurück.

Abbildung 36 :1. Normale Tubuluszelle



2.R365W

Abbildung 37:

a)

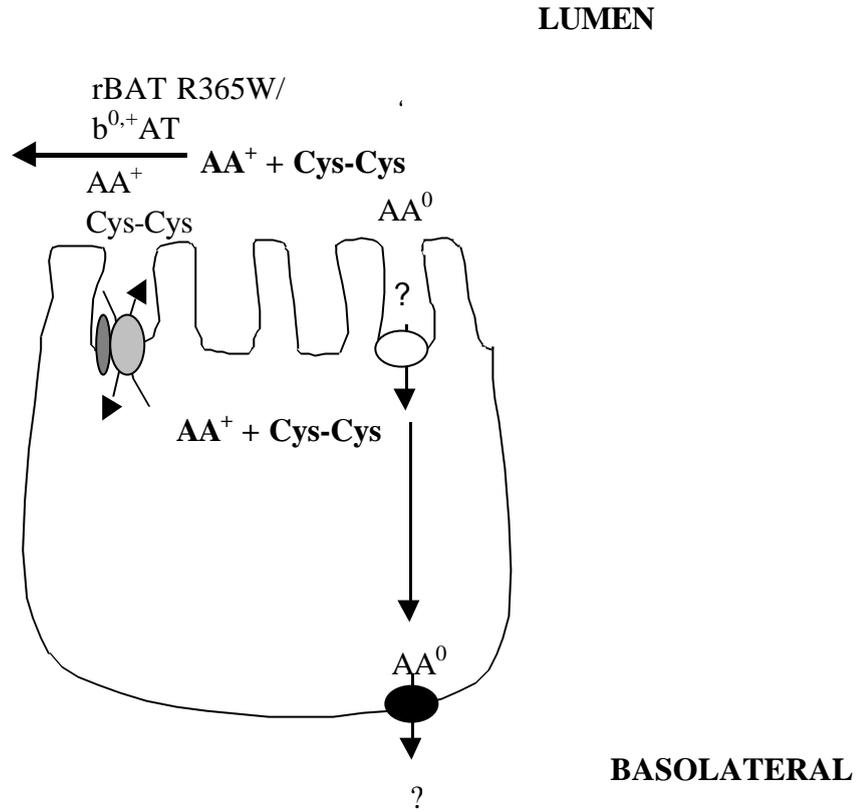


Abbildung 38:

b)

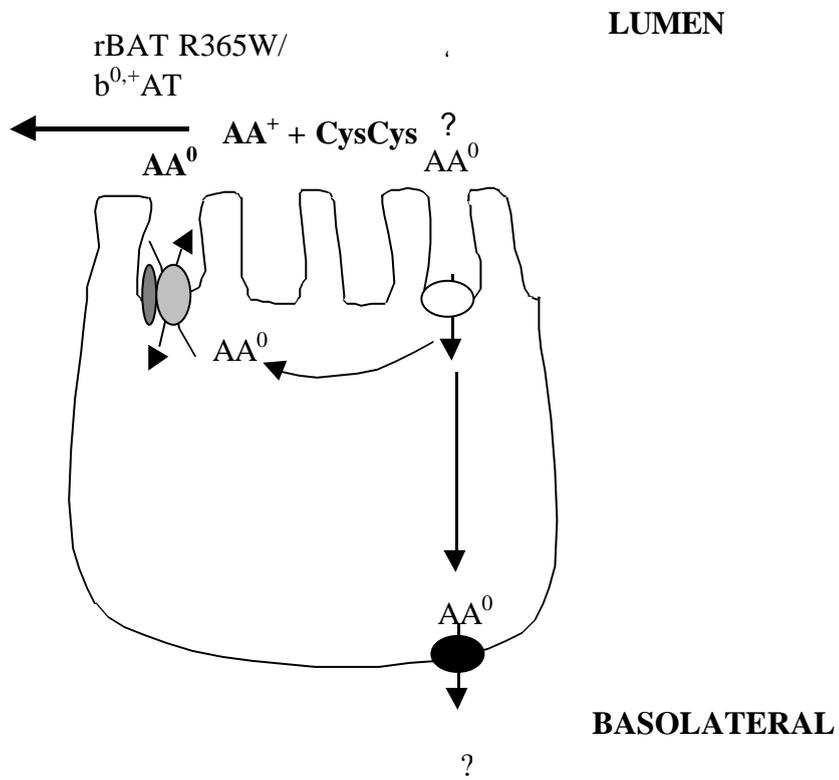
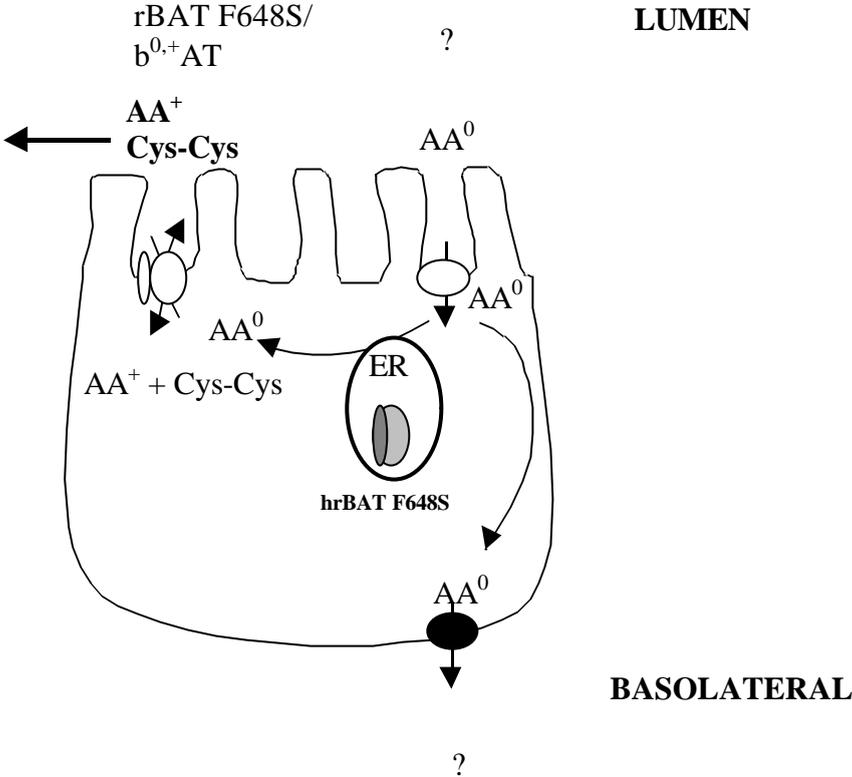


Abbildung 39

3. F648S



## V.Kapitel Zusammenfassung

Die Cystinurie ist eine der häufigsten autosomal rezessiven Erbkrankheiten, die durch rezidivierende Cystinierensteine charakterisiert ist und bei langen oder schweren Krankheitsverläufen zum Nierenversagen führen kann.

Durch Gen-Analysen und funktionelle Untersuchungen wurde das hrBAT-Protein als ursächlicher Kandidat für die Cystinurie Typ I identifiziert. Bis heute sind 40 verschiedene Mutationen und 9 Polymorphismen des hrBAT Gens SLC3A1 bekannt.

Sowohl die Auswirkungen der mutierten hrBAT Proteine auf den heterodimeren Transporterkomplex  $b^{0,+}$ , als auch die grundsätzliche funktionelle Rolle des hrBAT-Proteins innerhalb des Transporter-Komplexes sind noch weitgehend unbekannt.

Funktionelle Untersuchungen und Charakterisierungen der bekannten hrBAT Mutationen sollen den zu Cystinurie führenden Pathomechanismus aufklären. Aus diesen Studien gewonnenen Informationen führen eventuell auch zu weiteren Erkenntnissen, sowohl über die Rolle des hrBAT Proteins im Komplex mit  $b^{0,+}$ AT, als auch zu weiteren Informationen über strukturelle-funktionelle Eigenschaften des heterodimeren Aminosäuretransporters  $b^{0,+}$ .

Zwei hrBAT Mutationen, hrBAT R365W und F648S, wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit auf ihre funktionellen Eigenschaften mit Zwei-Elektroden Voltage Clamp und Tracer-Flux-Messungen im *Xenopus laevis* Expressionssystem untersucht.

Für die hrBAT Mutation F648S konnte im Vergleich zum hrBAT Wildtyp eine deutlich verringerte Expression festgestellt werden, die sich durch Injektion höherer cRNA Konzentrationen jedoch steigern ließ und auch bei hohen cRNA Konzentrationen noch nicht das Niveau des Wildtyps erreichte.

Die Transporteigenschaften wie Substrataffinität, Austauschfunktion und Spannungsabhängigkeit waren im Vergleich zum hrBAT Wildtyp nicht verändert. Demnach scheint es sich bei der hrBAT Mutation F648S um einen Traffickingdefekt zu handeln. Das ansonsten vollständig funktionsfähige Transporterprotein hrBAT F648S gelangt vermutlich aufgrund einer veränderten Proteinfaltung des Gesamttransporterproteins oder eines unverhältnismäßig langen Aufenthaltes im

endoplasmatischen Retikulums in zu geringen Mengen in die Plasmamembran, um dort die regelgerechte Transporterfunktion erfüllen zu können.

Die hrBAT Mutation R365W wies im Vergleich zum hrBAT Wildtyp auch geringere Ströme auf, jedoch waren diese durch Injektion höherer cRNA Konzentrationen nicht bedeutsam zu steigern. Radioaktive Fluxmessungen zeigten eine normale Transportrate. Die Untersuchung der Transportfunktion ergab eine nicht beeinträchtigte Substrataffinität und Spannungsabhängigkeit. Allerdings wies die hrBAT Mutation R365W unter Vorbelastung mit einer dibasischen Aminosäure eine veränderte Austauschfunktion auf. Die Mutation scheint zu bewirken, dass anstatt eines Heteroaminosäureaustausches vermehrt Homoaustausch stattfindet. So kann kein regelrechter Austausch der Aminosäuren stattfinden, was die bei Cystinurie Typ I vorliegende Transporterfehlfunktion erklären könnte.

So lassen die Ergebnisse dieser Untersuchung darauf schließen, dass das hrBAT Protein zumindest zwei Aufgaben besitzt. Zum einen scheint es in den intrazellulären Traffickingprozessen des Transporterkomplex hrBAT /  $b^{0,+}$ AT zur Plasmamembran involviert zu sein, was schon durch funktionelle Untersuchungen an anderen Typ I Cystinurie hrBAT Mutationen gezeigt werden konnte, aber auch nochmals durch die in dieser Arbeit untersuchte hrBAT Mutation F648S untermauert werden konnte.

Auch die Homologie des hrBAT Proteins zu 4F2hc, von dem gezeigt wurde, dass es für den Transport seiner leichten Ketten zur Plasmamembran verantwortlich ist, legt nahe, dass hrBAT eine wichtige Rolle im Traffickingprozess des Holotransporters zur Plasmamembran spielt.

Und zum Anderen kann mit den Ergebnissen der funktionellen Charakterisierung der hrBAT Mutation R365W zum ersten Mal dem hrBAT-Protein auch eine funktionelle, die Transportaktivität bestimmende Funktion zugesprochen werden. Es ist allerdings noch unklar, ob das hrBAT Protein direkt in den Transportmechanismus involviert ist, oder ob Strukturveränderungen in hrBAT Konformationsveränderungen der leichten Untereinheit  $b^{0,+}$  AT bewirken, die dann zu Veränderungen in den Austauscheigenschaften führen.

Um das Verständnis von hrBAT und der Beziehung zwischen seiner Struktur und Funktion innerhalb des  $b^{0,+}$ -like Transportkomplexes zu vervollständigen, wird es demnach zukünftig notwendig sein, die genaue Topologie des rBAT Proteins in der Membran zu bestimmen, um daraus Schlüsse auf seine Interaktion mit der leichten Untereinheit ziehen zu können.

## Literaturverzeichnis:

1. Albers, A., Lahme, S., Wagner, C.A., Kaiser, P., Zerres, K., Capasso, G., Pica, A., Palacin, M., Lang, F., Bichler, K.H., Eggermann, T. (1999). Mutations in the SLC3A1 gene in cystinuric patients: frequencies and identification of a novel mutation. *Genetic Testing*, 3, 227-231
2. Alvarez-Leefmans F.J.(1992): Extracellular Reference Electrodes.171-182 In: Graytn, R., Kettenmann, H.(eds.):Practical Electrophysiological Methods:A guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology.1<sup>st</sup> ed., New York
3. Balinsky, B.I. (1981) An introduction to embryology. Saunders, W.B., Philadelphia
4. Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M., Romey, G.(1996) KvLQT1 and I<sub>SK</sub> (minK) proteins associate to form the I<sub>KS</sub> cardiac potassium current. *Nature*, 384, 78-80
5. Bertran, J., Werner, A., Moore, M.L., Stange, G., Markovich, D., Biber, J., Testar, X., Zorzano, A., Palacin, M.(1992). Expression cloning of a cDNA from rabbit kidney cortex that induces a single transport system for cystine and dibasic and neutral amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5601-56051.
6. Bertran, J., Roca A., Pola, E., Testar, X., Zorano, A. Palacin, M.(1991). Modification of system A amin oacid carrier by diethyl-pyrocabonate. *J.Biol.Chem.*, 266, 798-802
7. Bertrans, J., Magagnin, S., Werner, A., Markovich, D., Biber, J, Tastar, X., Zorzano, A., Kühn, L.C., Palacin, M., Murer, H.(1992) Stimulation of system y<sup>+</sup>-like amino acid transport by the heavy chain of human 4F2 surface antigen in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 5606-5610
8. Bertran, J., Werner, A., Chillaron, J., Nunes, V., Biber, J., Tester, X., Zorzano, A., Estivill, X., Murer, H., Palacin, M.(1993). Expression cloning of a human renal cDNA that induces high affinity transport of L-cystine shared with dibasic amino acids in *Xenopus* Oocytes. *J. Biol. Chem.*, 268, 14842-14849
9. Bertran, J., Testar, X., Zorzano, A., Palacin M.(1994) A new age for mammalian Plasma Membrane Amino Acid Transporters. *Cell. Physiol. Biochem.*, 4, 217-241
10. Bisceglia, L., Calonge, M.J., Dello Strologo, L., Rizzoni, G., de Sanctis, L., Gallucci, M., Beccia, E., Testar, X., Zorzano, A., Estivill, X., Zelante, L., Palacin, M., Gasparini, P., Nunes, V.(1996) Molecular analysis of cystinuria disease gene: identification of four new mutations one large deletion and one polymorphism. *Hum. Genet.*, 98, 447-451
11. Bisceglia, L., Calonge, M.J., Totaro, A., Feliubadalo, L., Melchionda, S., Garcia, J., Testar, X., Gallucci, M., Ponzzone, A., Zelante, L., Zorzano, A., Estivill, X., Gasparini, P., Nunes, V., Palacin, M.(1997) Localization, by linkage analysis, of the cystinuria type III gene to chromosome 19q13.1. *Am. J.Hum. Genet.*, 60, 611-616

12. Bonifacino, J.S., Suzuki, C.K., Lippincot-Schwartz, J., Weissman A.M., Klausner, R.D.(1989) pre-golgi degradation of newly synthesized T-cell antigen receptor chains: intrinsic sensitivity and the role of subunit assembly., *J .Cell Biol.*, 109, 73-83
13. Borsani, G., Bassi, M.T., Sperandeo, M.P., De Grandi, A., Buoninconti, A., Riboni, M., Manzoni, M., Incerti, B., Pepe, A., Andria, G., Ballabio, A., Sebastio, G.(1999). SLC7A7, encoding a putative permease-related protein, is mutated in patients with lysinuric protein intolerance. *Nat. Genet.*, 21, 297-301
14. Bostrom, H., Hambræus, L.(1964) Cystinuria in Sweden.VII. Clinical, histopathological and medical-social aspects of the disease. *Acta. Med. Scand. Suppl.*, 411, 1-5
15. Brand, E., Cahill, G.F.(1934) Further studies on metabolism of sulfur compounds in cystinuria. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 31, 1247-1253
16. Bröer, S., Bröer, A., Hamprecht, B.(1995). The 4F2hc surface antigen is necessary for expression of system L-like neutral amino-acid-transport activity in C6 BU-1 rat glioma cells; evidence from expression studies in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem. J.*, 312, 863-870
17. Busch, A., Herzer, T., Waldegger, S., Schmidt, F., Palacin, M., Biber, J., Markovich, D., Murer, H., Lang, F.(1994). Opposite directed currents induced by the transport of dibasic and neutral amino acids in *Xenopus* oocytes expressing the protein rBAT. *J. Biol. Chem.*, 269, 25581-25586
18. Busch, A.E., Waldegger, S., Murer, H., Lang, F.(1996) The molecules of proximal tubular transport-insights from electrophysiology. *Nephron*, 72, 1-8
19. Calonge, M.J., Gasparini, P., Chillaron, J., Chillon, M., Gallucci, M., Rousaud, F., Zelante, L., Testar, X., Dallapicola, B., DiSilverio, F., Barcelo, P., Estivill, X., Zorzano, A., Nunes, V., Palacin, M.(1994) Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine. *Nat. Genet.*, 6, 420-425
20. Calonge, M.J., Volpini, V., Bisceglia, L., Rousaud, F., DeSantis, L., Brescia, E., Zelante, L., Testar, X., Zorzano, A., Estivill, X., Gasparini, P., Nunes, V., Palacin, M.(1995) Genetic heterogeneity in cystinuria. The rBAT gene is linked to type I not to type III cystinuria. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 92, 9667-9671
21. Chairoungdua, A., Segawa, H., Kim, J.Y., Miyamoto, K., Haga, H., Fukui, Y., Mizoguchi, K., Ito, H., Takeda, E., Endou, H., Kanai, Y.(1999) Identification of an amino acid transporter associated with the cystinuria-related type II membrane glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, 274, 28845-28848
22. Chillaron, J., Estevez, R., Mora, C., Wagner, C.A., Suessbrich, A., Lang, F., Gelpi, J.L., Testar, X., Busch, A.E., Zorzano, A., Palacin, M.(1996). Obligatory Amino acid

- exchange via system  $b^{0+}$ -like and  $y^+$ L-like. A tertiary active transport mechanism for renal reabsorption of cystine and dibasic amino acids. *J. Biol. Chem.*, 271, 17761-17770
23. Chillaron, J., Estevez, R., Samerzija, I., Waldegger, S., Testar, X., Lang, F., Zorzano, A. Busch, A., Palacin, M.(1997a) An intracellular trafficking defect in type I cystinuria rBAT mutants M467 and M467K. *J. Biol. Chem.*, 272, 9543-9549
24. Christensen, H.N., Oxender, D.L., Liang, M., Vatz, K.A.(1965). The use of N-methylation to direct route of mediated transport of amino acids. *J.Biol.Chem.*, 240, 3609-3616
25. Christensen, H.N.(1982). Interorgan aminoacid nutrition. *Physiol. Rev.*, 62, 1193-1233
26. Christensen, H.N.(1985). On the strategy of kinetic discrimination of amino acid transport systems. *J.Memb. Biol.*, 84, 97-103
27. Christensen, H.N. (1989). Distinguishing amino acid transport systems of a given cell or tissue. *Methods Enzymol.*, 173, 576-616
28. Christensen, H. N. (1990). Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol. Rev.*, 70, 43-77
29. Coady, M.J., Jalal, F., Chen, X., Lemay, G., Berteloot, A., Lapoint, J.Y.(1994). Electrogenic amino acid exchange via the rBAT transporter. *FEBS Lett.*, 356, 174-178
30. Copeland, C.S., Doms, R.W., Bolzau, E.M., Webster, R.G., Helenius, A. (1986) Assembly of influenza hemagglutinin trimers and its role in intracellular transport., *J. Cell Biol.*, 103, 1179-1191
31. Craan, A.G., Bergeron, M.(1975) Experimental cystinuria: The cycloleucine model. I. Amino acid interactions in renal and intestinal epithelia. *Can. J. Physiol.*, 53, 1027-36
32. Crawhall, J.C., Scowen, E.F., Watts, R.W.E.(1963) Effect of penicillamine on cystinuria . *Brit. Med. J.*, 1, 588-594
33. Crawhall, J.C., Purkiss, P., Watts, R.W.E., Young, E.P.(1969) The excretion of amino acids by cystinuric patients and their relatives. *Ann. Hum. Genet.*, 33, 149-69
34. Dascal N.(1987) The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit. Rev Biochem.*, 22, 317-387
35. Dent, C., Rose, G.A.(1951) Amino acid metabolism in cystinuria. *Q. J. Med.*, 20, 205-210
36. Dent, C., Senior, B.(1955) Studies on the treatment of cystinuria. *Brit. J. Urol.*, 27, 312-324

37. Deves, R., Boyd, C.A.R.(1998). Transporters for cationic amino acids in animal cells –discovery, structure, and function. *Physiol.Rev.*, 78, 487-545
38. Dietzel, I.D., Bruns D., Polder H.-R., Lux H.D. (1992). Voltage clamp Recording. 256-262 In : Graytn, R.: Kettenmann H.(eds.):Practical Electrophysiological Methods:A guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology.1<sup>st</sup> ed., New York
39. Dumont, J.N.(1972): Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin) I.Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.*, 136, 153-179
40. Eisenbach, G.M., Weise, M., Stolte, H.(1975). Amino acid reabsorption in the rat nephron. Free flow micropuncture study. *Pflügers Arch.*, 357, 63-76
41. Estevez, R., Wagner, C.A., Pineda, M., Camps, M., Albers, A., Bröer, S., Zorzano, A., Lang, F., Palacin M.(-) rBAT can surrogate 4F2hc for interaction with several light chains of the heteromeric amino acid transporter family.(Publikation in Vorbereitung)
42. Feliubadalo,L., Font, M., Purroy, J., Rousaud, F., estivill,X., Nunes, V., Golomb, E., Centola, M., Aksentijevich, I., Kreiss, Y., Goldmann, B., Pras, M., Kastner, D.L., Pras, E., Gasparini, P., Bisceglia, L., Beccia, L., Galluci, M., de-Sanctis, L., Ponzzone, A., Rizzoni, G.F., Zelante, L., Bassi, M.T., George, A.L., Palacin, M. (1999). Non-type I cystinuria caused by mutations in SLC7A9, encoding a subunit (b<sup>0+</sup>AT) of rBAT International Cystinuria Consortium. *Nat. Genet.*, 23, 52-57
43. Foreman, J.W., Hwang, S.M., Segal, S.(1980) Transport interaction of cystine and dibasic amino acids in isolated rat renal tubules. *Metabolism*, 29, 53-61
44. Furriols,M., Chillaron, J., Conchi, M., Castello, A., Bertran, J., Camps, M., Testar, X., Vilaro, S., Zorzano, A., Palacin, M.(1993). rBAT, related to cystine transport, is localized to the microvilli of proximal straight tubules, and its expression is regulated in kidney by development. *J.Biol. Chem.*, 268, 27060-27068
45. Gardiner, D.M., Grey, R.D.(1983) Membrane junctions in *Xenopus* eggs: their distribution suggests a role in calcium regulation. *J. Cell. Biol.*, 96, 1159-63
46. Gasparini, P., Calonge, M.J., Bisceglia, L., Purroy, J., Dianzani, I., Notarangelo, A., Rousaud, F., Gallucci, M., Testar, X., Ponzzone, A., Estivill, X., Zorzano, A., Palacin, M., Nunes, V., Zelante, L.(1995) Molecular genetics of cystinuria: identification of four new mutations and seven polymorphisms, and evidence for genetic heterogeneity. *Am. J. Hum. Gent.*, 57, 781-788
47. Geering,K., Theulaz., I., Verey, M., Häuptle, M.T., Rossier, .C.(1989) A role for the -subunit in the expression of functional Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in *Xenopus* oocytes. *Am. J. Physiol.*, 257, C851-C858
48. Gitomer, W.L., Pak, C.Y.(1996) Recent advances in the biochemical and molecular biological basis of cystinuria. *J. Urol.*, 156, 1907-1912

49. Gitomer, W.L., Reed, B.Y., Ruml, L.A., Sakhaee, K., Pak, C.Y.C.(1998) Mutations in the genomic desoxyribonucleic acid for SLC3A1 in patients with cystinuria. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83, 3688-3694
50. Goodyer, P.R., Clow, C., Reade, T., Girardin, C.(1993) Prospective analysis and classification of patients with cystinuria identified in a newborn screening program. *J. Pediatr.*, 122, 568-72
51. Goodyer, P., Khoury, M.(1995) Cystinuria: current approaches to medical management. *J. Nephrol.*, 8, 35-37
52. Goodyer, P., Saadi, I., Ong, P., Elkas, G., Rozen, R.(1998) Cystinuria subtype and the risk of nephrolithiasis. *Kidney Inter.*, 54, 56-61
53. Guastella, J., Nelson, N., Nelson, H., Czyzyk, L., Keynan, S., Miedel, M.C. Davidson, N., Lester, H.A. Kanner, B.I. (1990). Cloning and expression of rat brain GABA transporter. *Science*, 249, 1303-1306
54. Gurdon, J.B, Lane, C.D., Woodland, H.R., Marbalx, G.(1971) Use of frog eggs for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature (London)*, 233, 177-82
55. Gurdon, J.B.(1974) *The control of gene expression in animal development*, University Press, Oxford
56. Haynes, B.F., Hemler, M.E., Mann, D.L., Eisenbarth, G.S., Shelhamer, J.H., Mostowski, H.S., Thomas, C.A., Strominger, J.L., Fauci, A.S.(1981) Characterization of monoclonal antibody (4F2) that binds to human monocytes and to subset of activated lymphocytes. *J. Immunol.*, 126, 1409-1414
57. Hellier, M.D., Perrett, D., Holdsworth, C.D.(1970) Dipeptide absorption in cystinuria. *Brit. Med. J.*, 4, 782-783
58. Hellier, M.D., Holdsworth, C.D., Perrett, D.(1973) Dibasic amino acid absorption in man. *Gastroenterology*, 65, 613-8
59. Hemler, M.E., Strominger, J.L.(1982) Characterization of the antigen recognized by the monoclonal antibody (4F2): different molecular forms on human T and B lymphoblastoid cell lines. *J. Immunol.*, 129, 623-628
60. Hisano, S., Haga, H., Myamoto, K., Takeda, E., Fukui, Y.(1996). The basic amino acid transporter (rBAT)-like immunoreactivity in paraventricular and supraoptic magnocellular neurons of the rat hypothalamus. *Brain. Res.*, 710, 299-302
61. Holmes, S.J.(1952) *The biology of the frog*. Macmillan, New York

62. Jaeger, P., Portman, L., Saunders, A., Rosenberg, L.E., Thier, S.O. (1986) Anticystinuric effects of glutamine and of dietary sodium restriction. *N.Eng. J. Med.*, 315, 1120-3
63. Jullia, P., Segal, S., Thier, S.O.(1973) Renal handling of amino acids, section 8, Chapter 20 in : *Handbook of physiology. Renal Physiology*. Washington, D.C. Am. Physiol. Soc.
64. Jullia, P., Foeman, J.W., Hwang, S.M., Segal, S.(1980) Transport interactions of cystine and dibasic amino acids in isolated rat renal tubules. *Metabolism*, 29, 53-59
65. Kanai, Y., Segawa, H., Miyamoto, K., Uchino, H., Takeda, E., Endou, H.(1998). Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2hc antigen (CD98). *J. Biol. Chem.*, 273, 23629-23632
66. Kato, T.(1977) Renal handling of dibasic amino acids and cystine in cystinuria. *Clin. Sci. Mol. Med.* 53, 9-15
67. King, J.S.(1968) Treatment of cystinuria with  $\gamma$ -mercaptopropionylglycine: a preliminary report with some notes on column chromatography of mercaptans. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 129, 927-32
68. Kusano, K., Miledi, R., Stinnakre, J.(1977) Acetylcholine receptors in the oocyte membrane. *Nature (London)*, 270, 739-41
69. Lee, W.S., Wells, R.G., Sabbag, R.V., Mohandas, T.K., Heidiger, M.A.(1993). Cloning and chromosomal localization of a human kidney cDNA involved in cystine, dibasic, and neutral amino acid transport. *J. Clin. Invest.*, 91, 1959-1963
70. Lester, F.T., Cusworth, D.C.(1973) Lysine infusion in cystinuria: theoretical renal thresholds for lysine. *Clin. Sci.*, 44, 99-111
71. Levy, H.L.(1973) Genetic Screening. *Adv. Hum. Genet.*, 4, 1-104
72. Löffler, G., Pertides, P.(1997) *Biochemie und Pathobiochemie*; 5.Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
73. Lumadue, J.A., Glick, A.B., Ruddle, F.H.(1987) Cloning, sequence analysis, and expression of the large subunit of the human lymphocyte activation antigen 4F2. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 84, 9204-9208
74. Malandro, M.S., Kilberg, M.S.(1996). *Molecular biology of mammalian amino acid transporters*. *Annu.Rev.Biochem.*, 65, 305-336
75. Mastroberardino, L. Spindler, B., Pfeiffer, R., Skelly, P.J., Loffing, J., Shoemaker, C.B., Verrey, F.(1998) Amino Acid Transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature*, 395, 288-291

76. McDonald, J.E., Hennemann, P.H.(1965) Stone dissolution in vivo and control of cystinuria with penicillamine. *New Engl. J. Med.*, 273, 578-85
77. McNamara, P.D., Pepe, L.M., Segal, S.(1981) Cystine uptake by rat renal brush border membrane vesicles. *Biochem. Biophys. Acta*, 1103, 101-107
78. McNamara, P.D., Rea, C.T., Segal, S.(1992) Ion dependence of cystine and lysine uptake by rat renal brush border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* , 103, 101-8
79. Miyamoto, K., Katai, K., Tatsumi, S., Sone, K., Segawa, H., Yamamoto, H., Taketani, Y., Takada, K., Morita, K., Kanayama, H., Kagawa, S., Takeda, E.(1995) Mutations of the basic amino acid transporter gene associated with cystinuria. *Biochem.J.*, 310, 951-955
80. Miyamoto, K., Segawa, H., Tatsumi, S., Katai, K., Yamamoto, H., Taketani, Y., Haga, H., Morita, K., Takeda, E.(1996) Effects of truncation of the COOH-terminal region of a Na<sup>+</sup>-independent neutral and basic amino acid transporter on amino acid transport in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.*, 271, 16758-16768
81. Mora, C., Chillaron, J., Calonge, M.J., Forgo, J., Testar, X., Nunes, V., Murer, H., Zorzano, A., Palacin, M.(1996) The rBAT Gene is responsible for L-cystine uptake via the b<sup>0,+</sup>-like amino acid transport system in a renal proximal tubular cell line (OK cells). *J. Biol. Chem.*, 271, 10569-10576
82. Moskowitz, R., Udenfriend, S., Felix, A., Heimer, E., Tate, S.S.(1994) Membrane topology of the rat kidney neutral and basic amino acid transporter. *FASEB J.*, 8, 1069-1074
83. Müller, C.(1992) : Intracellular Microelectrodes. 183-188 In: Graytn, R.; Kettenmann H.(eds.): *Practical Electrophysiological Methods: A guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology*. 1<sup>st</sup> ed., New York
84. Nakumara, E., Sato, M., Yang, H., Miyagawa, F., Harasaki, M., Tomita, K., Matsuoka, S., Noma, A., Iwai, K., Minato, N.(1999) 4F2 (CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. *J. Biol. Chem.*, 274, 3009-3016
85. O'Connor, C.M. and Smith, D.L. (1976): Inhibition of oocyte maturation by theophylline: possible mechanism of action. *Developmental Biology*, 52, 318-322.
86. Ohlemeyer, C., Meyer, J.W.(1992). The Farraday and grounding Arrangements. 3-5, In: Graytn, R.; Kettenmann, H.(eds.): *Practical Electrophysiological Methods: A guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology*. 1<sup>st</sup> ed., New York

87. Palacin, M. (1994) A new family of proteins (rBAT and 4F2hc) involved in cationic and zwitterionic amino acid transport: a tale of two proteins in search of transport function. *J. Exp. Biol.*, 196, 123-137
88. Palacin, M., Mora, C., Chillaron, J., Calonge, M.J., Estevez, R., Torrents, D., Testar, X., Zorzano, A., Nunes, V., Purroy, J., Estivill, X., Gasparini, P., Bisceglia, L., Zelante, L.(1996a) The molecular basis of cystinuria: the role of the rBAT gene. *Amino acids*, 11, 225-246
89. Palacin, M., Chillaron, J., Mora, C.(1996b) Role of the b<sup>0+</sup> like amino acid-transport system in the renal reabsorption of cystine and dibasic amino acids. *Biochem. Soc. Trans.*, 24, 856-863
90. Palacin, M, Estevez, Bertran, J, Zorzano, A(1998). Molecular Biology of Mammalian Plasma Membrane Amino Acid Transporters. *Physiological Reviews*, 78, 969-1054
91. Palacin, M.(1999) Non-type I cystinuria caused by mutations in SLC7A9, encoding a subunit (b<sup>0+</sup>AT) of rBAT. *Nat. Genet.*, 23, 52-57
92. Palacin, M., Goodyer, P., Nunes, V., Gasparini, P.(-) Cystinuria (Publikation in Vorbereitung)
93. Peces, R., Sanchez, L., Gorodstidi, M., Alvarez, J.(1991) Effects of variation in sodium intake on cystinuria. *Nephron*, 57, 421-3
94. Pfeiffer, R., Spindler, B, Loffing, J., Skelly, P, CB,S.; Verrey, F.(1998a). Functional heterodimeric amino acid transporters lacking cysteine residues involved in disulfide bond. *FEBS Lett.*, 439, 157-162
95. Pfeiffer, R., Rossier, G., Spindler, B, Meier, C., Kühn, L.C., Verrey, F.(1998b). Amino Acid Transport of y<sup>+</sup>L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of glycoprotein-associated amino acid transporter family. *EMBO J.*, 18, 49-57
96. Pfeiffer,R., Loffing, J., Rossier, G., Bauch, C., Meier, C., Eggermann, T., Loffing-Cueni, D., Kühn, L., Verrey, F.(1999). Luminal heterodimeric amino acid transport defective in Cystinuria. *Mol. Biol. Cell.*, 10, 4135-4147
97. Pickel, V.M., Nirenberg, M.J., Chan, J., Moscovitz, R., Udenfriend, S., Tate, S.S.(1993) Ultrastructural localization of a neutral and basic amino acid transporter in rat kidney and intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 7779-7783
98. Pickel, V.M., Pohorille, A., Chan, J., Tate, S.S, Nirenberg, M.J. (1999) Regional and subcellular distribution of a neutral and basic amino acid transporter in forebrain neurons containing nitric oxide synthase. *J. Comp. Neuro.*, 404, 459-472
99. Pineda, M, Fernandez, E., Torrents, D., Estevez, R., C., L.p., Camps, M., Lloberas, J., Zorzano, A., Palacin, M.(1999) Identification of a membrane protein, LAT-2, that

co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *J. Biol. Chem.*, 274, 19738-19744

100. Pras, E., Raben, N., Golomb, E., Arber, N., Aksentijevitch, I., Schapiro, J., Harel, D., Katz, G., Liberman, U., Pras, M., Kastner, D.L.(1995) Mutations in the SLC3A1 transporter gene in cystinuria. *Am. J. Hum. Genet.*, 56, 1297-303

101. Prasad, P.D., Wang, H., Huang, W., Kekuda, R., Rajan, D.P., Leibach, F.H., Ganapathy, V.(1999) Human LAT1, a subunit of system L amino acid transporter: molecular cloning and transport function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 255, 283-288

102. Prout, W.(1823) *Traite de la gravelle*. Paris p278

103. Purroy, J., Bisceglia, L., Calonge, M.J., Zelante, L., Testar, X., Zorzano, A., Estivill, X., Palacin, M., Nunes, V., Gasparini, P.(1996) Genomic structure and organization of the human rBAT gene (SLC3A1). *Genomics*, 37, 249-252

104. Quackenbush, E.J., Gougos, A., Baumal, R., Letarte, M.(1986) Differential localization within human kidney of five membrane proteins expressed on acute lymphoblastic leukemia cells. *J. Immunol.*, 136, 118-124

105. Quackenbush, E., Clabby, M., Gottesdiener, K.M., Barbosa, J., Jones, N.H., Strominger, J.L., Speck, S., Leiden, J.M.(1987). Molecular cloning of complementary DNAs encoding the heavy chain of the human 4F2-cell surface antigen: a type II membrane glycoprotein involved in normal and neoplastic cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 6526-6530

106. Rajan, D.P., Kekuda, R., Huang, W., Wang, H., Devoe, L.D., Leibach, F.H., Prasad, P.D., Ganapathy, V.(1999) Cloning and Expression of a b<sup>0+</sup>-like amino acid transporter functioning as a heterodimer with 4F2hc instead of rBAT. *J. Biol. Chem.*, 274, 29005-29010

107. Rajan, D.P., Huang, W., Kekuda, R., George, R.L., Wang, J., Conway, S.J., Devoe, L.D., Leibach, F.H., Prasad, P.D., Ganapathy, V.(2000) Differential influence of the 4F2 heavy chain and the protein related to b<sup>0+</sup> amino acid transporter on substrate affinity of the heteromeric b<sup>0+</sup> amino acid transporter. *J. Biol. Chem.*, 275, 14331-14335

108. Remien, A., Kallistratos, G., Burchardt, P.(1975) Treatment of cystinuria with thiola (alpha-mercaptopropionylglycine). *Eur. Urol.*, 1, 227-8

109. Rosenberg, L.E., Durant, J.L., Holland, I.M.(1965) Intestinal absorption and renal excretion of cystine and cysteine in cystinuria. *N. Engl. J. Med.*, 273, 1239-45

110. Rosenberg, L.E., Downing, S., Durant, J.L., Segal, S.(1966) Cystinuria: Biochemical evidence for three genetically distinct diseases. *J. Clin. Invest.*, 45, 365-71

111. Rossier, G., Meier, C., Bauch, B., Summa, V., Sordat, B., Verrey, F., Kühn, L.(1999) LAT2: A new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J. Biol. Chem.*, 274, 34948-34954
112. Saadi, I., Chen, X.Z., Hediger, M., Ong, P., Pereira, P., Goodyer, P., Rozen, R.(1998) Molecular genetics of cystinuria: mutation analysis of SLC3A1 and evidence for another gene in the type I (silent) phenotype. *Kidney Int.*, 54, 48-55
113. Sato, H., Tamba, M., Ishii, T., Bannai, S.(1999) Cloning and expression of a plasma membrane cystine / glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *J. Biol. Chem.*, 274, 11455-11458
114. Schafer, J.A., Watkins, M.L.(1984) Transport of L-cystine in isolated perfused proximal straight tubules. *Pflügers Arch.*, 401, 143-151
115. Segal, S., McNamara, P.D., Pepe, L.M.(1977) Transport interaction of cystine and dibasic amino acids in renal brush border vesicles. *Science*, 197, 169-71
116. Segawa, H., Fukasawa, Y., Miyamoto, K., Takeda, E., Endou, H., Kanai, Y.(1999) Identification and functional characterization of a Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J. Biol. Chem.*, 274, 19745-19751
117. Segel, Irwin, H.(1976). *Biochemical calculations. How to solve mathematical problems in general biochemistry.* 2<sup>d</sup> ed. John Wiley&Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore
118. Silbernagl, S., Deetjen, P.(1972) The tubular reabsorption of L-cystine and L-cysteine: A common transport system or not? *Pflügers Arch.*, 337, 277-84
119. Silbernagl, S., Foulkes, E.C., Deetjen, P.(1975) Renal transport of amino acids. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 64, 105-67
120. Silbernagl, S.(1985) Amino acids and oligopeptides, p.1677, in: Seldin, D.W., Giebisch, G.: *Kidney: Physiology and Pathophysiology.* New York, Raven
121. Silbernagl, S.(1988). The renal handling of amino acids and oligopeptides. *Physiol. Rev.*, 68, 911-1007
122. Siskind, M.S., Popovtzer, M.M.( 1992) Hyperlipidemia associated with alpha-mercaptopropionylglycine therapy for cystinuria. *Am. J. Kidney Dis.*, 19, 179-80
123. Smith, T.G., Lecar, J. Redmann, S.J., Gage, P.W(1985) : *Voltage and Patch Clamping with Microelectrodes.* American Physiological Society, Bethesda, Maryland
124. States, B., Segal, S.(1990) Cystine and dibasic amino acid uptake by opossum kidney cells. *J. Cell. Physiol.*, 143, 555-62

125. Stein, W.H.(1951) Excretion of amino acids in cystinuria. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 78, 705-709
126. Stephens, A.D.(1989) Cystinuria and its treatment: 25 years experience at St. Bartholomew's Hospital. J. Inherit. Metab. Dis., 12, 197-209
127. Stromeyer, L.(1824) Oxide cystique. Ann. Chim. et Phys., 27, 221-224
128. Tate, S.S., Yan, N., Udenfriend, S.(1992). Expression cloning of a Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transporter from rat kidney. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89, 1-5
129. Teixeira, S., Di Grandi, S., Kühn, L.C.(1987). Primary structure of the human 4F2 antigen heavy chain predicts a transmembrane protein with a cytoplasmic NH<sub>2</sub>-terminus. J. Biol. Chem., 262, 9574-9580
130. Torras-Llort, M., Ferrer, R., Soriano-Garcia, J.F., Moreto, M.(1996) L-Lysine transport in chicken jejunal brush border membrane vesicles. J.Membr. Biol., 152, 183-93
131. Torrents, D., Estevez, R., Pineda, M., Fernandez, E., Lloberas, J., Shi, Y., Zorzano, A., Palacin, M.(1998) Identification and characterization of a membrane protein ( $\gamma^L$  amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity  $\gamma^L$ . A candidate gene for lysinuric protein intolerance. J. Biol. Chem., 273, 32437-32445
132. Torrents, D., Mykkanen, J., Pineda, M., Feliubadalo, L., Estevez, R., de Cid, R., Sanjurjo, P., Zorzano, A., Nunes, V., Huoponen, K., Reinikainen, A., Simell, O., Savontaus, M.L., Aula, P., Palacin, M.(1999). Identification of SLC7A7, encoding  $\gamma^L$ LAT-1, as the lysinuric protein intolerance gene. Nat. Genet., 21, 293-296
133. Ullrich, K.J., Rumrich, G., Klos, S.(1974) Sodium dependence on the amino acid transport in the proximal convolution of the rat kidney. Pflügers Arch, 351, 49-60
134. Van Winkle, L.J., Campione, A.L., Gorman, J.M.(1988). Na<sup>+</sup> -independent transport of basic and zwitterionic amino acids in mouse blastocysts by a shared system and by processes which distinguish between these substrates. J. Biol. Chem., 263, 3150-3163
135. Verrey, F., Jack, D.L., Paulsen, I.T., Saier, M.H., Pfeiffer, R.(1999) New glycoprotein-associated Amino Acid Transporters. J.Membrane Biol., 172, 181-192
136. Volkl, H., Silbernagl, S., Ascher, A.(1982) Mutual inhibition of L-cystine /L-cysteine and other neutral amino acids during tubular reabsorption. A microperfusion study in rat kidney. Pflügers Arch., 395, 190-195
137. Wagner, C., Lang, F., Bröer, S. Function of heterodimeric amino acid transporters. Publikation in Vorbereitung

138. Wang, Y., Tate, S.S.(1995) Oligomeric structure of a renal cystine transporter: Implications in cystinuria. *FEBS Lett.*, 368, 389-392
139. Wartenfeld, R., Golomb, E., Katz, G., Bale, S.J., Goldman, B., Pras, M., Kastner, D.L., Pras, E.(1997) Molecular analysis of cystinuria in Libyan Jews: exclusion of the SLC3A1 gene and mapping of a new locus on 19q. *Am. J. Hum. Genet.*, 60, 617-624
140. Wells, R.G., Hediger, M.A.(1992). Cloning of a rat kidney cDNA that stimulates dibasic and neutral amino acid transport and has sequence similarity to glucosidases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 5596-5600
141. Wollaston, W.H.(1810) On cystic oxide, a new species of urinary calculus. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond.*, 100, 233-235
142. Yan, N., Mosckovitz, R., Udenfriend, S., Tate, S.(1992). Distribution of mRNA of a Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transporter cloned from rat kidney and its expression in mammalian tissue *Proc. Natl. Acad., Sci., USA*, 89, 9982-9985
143. Yeh, H.L., Frankl, W., Dunn, M.S., Parker, P., Hughes, B., Gyorgy, P.(1947) The urinary excretion of amino acids by a cystinuric subject. *Am. J. Med. Sci.*, 214, 507-515
144. Zhang, X.X., Rozen, R., Hediger, M.A., Goodyer, P., Eydoux, P.(1994) Assignment of the gene for cystinuria (SLC3A1) to human chromosome 2p21 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*, 24, 413-4

## Danksagung

Besonders möchte ich mich bei meinem engagierten Betreuer Carsten Wagner bedanken, der die Idee hatte zu dieser Arbeit und durch hilfsbereite Unterstützung und ideenreiche und geduldige Beratung einen großen Teil zur Fertigstellung und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Mein Dank gilt auch Herrn Professor F. Lang für das Überlassen dieses Themas und für die Möglichkeit der Promotion.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Brigitta Noll bedanken, ohne deren Unterstützung durch RNA-Synthese und durch ihre Mitarbeit und Hilfsbereitschaft bei Froschpräparationen und cRNA-Injektion, mir das Fertigstellen der Experimente wohl nicht so einfach gelungen wäre.

Ebenso danke ich Alexandra Albers( cDNA-Klone-Synthese und Tracer Flux Messungen), Angelika Bröer (Tracer Flux Messung), Uwe Schüler und Paul Stehberger für die tatkräftige Unterstützung.

Ulrike Lükewille danke ich für den ständigen emotionalen und praktischen Beistand und für die netten Worte, die mich stets anspornten und immer wieder motivierten, den Kampf mit den Oozyten weiterzuführen.

Für die nette Atmosphäre während der vielen langen Stunden im Labor, möchte ich Ivano Moschen, Björn Friedrich, Iwan Setiawan und Alexandra Albers danken.

Auch meinen Eltern möchte ich hier meinen Dank aussprechen, da sie mir mit aufopfernder Unterstützung dieses Medizinstudium und somit auch diese Promotion ermöglichten.

Nicht zuletzt möchte ich Wolfgang Liebmann danken, der mir während der ganzen Zeit unterstützend zur Seite stand.



## Lebenslauf

Geburtsdatum: 11.Juli 1975

Geburtsort : Albstadt-Ebingen

### Schulbildung:

1986 - 1995 Grundschule und Gymnasium in Reutlingen

1995 Abitur

### Freiwilliges Soziales Jahr:

Sommer 1995- Frühjahr 1996

### Studium:

1996 – 2002 Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität  
Tübingen

August 2000-Januar 2001 Medizinstudium an der Medical School der Brown  
University, Rhode Island, USA

Sommer 2001 2.Staatsexamen

Praktisches Jahr: Medical School der University of Birmingham, England  
(Gynäkologie)  
Klinikum am Steinenberg, Reutlingen  
(Chirurgie und Innere Medizin)

12. November 2002 3.Staatsexamen und Abschluß des Medizinstudiums

### Promotion:

Mit der hier vorgelegten Arbeit am Physiologischen Institut der Eberhard-Karls-  
Universität, Tübingen