

Aus dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen

Abteilung Physiologie I

Abteilungsleiter: Professor Dr. F. Lang

Untersuchungen zur Pathophysiologie der

Cystinurie Typ A:

Elektrophysiologische Charakterisierung des hrBAT

Wildtyps und der Mutation T216M in Xenopus Oozyten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Eberhard Karls Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Paul Andreas Valentin Stehberger

aus

Tübingen

2006

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang

2. Berichterstatter: Professor Dr. U. Quast

Für meine Eltern
und meine Großmutter
Liselotte Wiegand

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Aminosäuretransport	1
1.2	Heteromere Aminosäuretransporter	1
1.2.1	Schwere Untereinheiten	4
1.2.2	Leichte Untereinheiten	4
1.3	Das Transportsystem $b^{0,+}$ (rBAT und $b^{0,+}$ AT)	5
1.3.1	Lokalisation und Struktur	6
1.3.2	Funktion und physiologische Rolle	7
1.4	Cystinurie	10
1.4.1	Definition und Einteilung	10
1.4.2	Klinisches Erscheinungsbild und Therapie	11
1.4.3	Genetische Grundlagen der Cystinurie	11
1.4.3.1	Mutationen in $b^{0,+}$ AT	12
1.4.3.2	Eigenschaften bekannter Mutationen in rBAT	12
1.4.3.3	Die rBAT-Mutation T216M	13
1.5	Xenopus laevis Oozyten als Expressionssystem	14
1.6	Fragestellung der Arbeit	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Substanzen und Lösungen	17
2.1.1	ND96 (nach Henry Lester)	17
2.1.2	Na^+ -freie Lösung	18
2.1.3	ND 96 – Oozytenaufbewahrungslösung	18
2.1.4	OR-2 (Oozyten-Ringer, kalziumfrei)	19
2.1.5	Weitere verwendete Substanzen	19
2.2	Oozytenpräparation	20
2.2.1	Isolierung der Oozyten	20
2.2.2	cRNA – Injektion	21
2.3	Elektrophysiologie: Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp (TEVC)	21
2.4	Durchführung der Experimente	23
2.5	Geräte und Software	24
2.6	Auswertung und Statistik	24
3	Versuche und Ergebnisse	26

3.1	hrBAT Wildtyp und die Mutation T216M zeigen elektrogene Transporteigenschaften.....	26
3.2	Eigenschaften des hrBAT Wildtyp	26
3.2.1	Alle 20 proteinogenen Aminosäuren sowie Ornithin und Cystin induzieren Ströme in hrBAT exprimierenden Oozyten	26
3.2.2	Charakterisierung der Austauschfunktion	28
3.2.2.1	Spannungsabhängigkeit.....	28
3.2.2.2	Intrazelluläre Vorbeladung (Transstimulation).....	30
3.2.3	Charakterisierung des Transports einzelner Aminosäuren	32
3.2.3.1	Neutrale Aminosäuren	34
3.2.3.2	Dibasische Aminosäuren	38
3.3	Eigenschaften der hrBAT-Mutation T216M	42
3.3.1	Charakterisierung der Austauschfunktion	42
3.3.1.1	Spannungsabhängigkeit.....	42
3.3.1.2	Intrazelluläre Vorbeladung (Transstimulation).....	43
3.3.2	Charakterisierung des Transports einzelner Aminosäuren durch die hrBAT Mutation T216M	45
3.3.2.1	Neutrale Aminosäuren	45
3.3.2.2	Dibasische Aminosäuren	49
3.4	Trafficking und Expression des hrBAT Wildtyps und der Mutation T216M .	53
3.4.1	Expressionszeitverlauf	53
3.4.2	Abhängigkeit der Expression von der injizierten cRNA-Menge	57
4	Interpretation und Diskussion.....	60
4.1	Fehlerdiskussion	60
4.1.1	Präparation der Oozyten	60
4.1.2	Lösungen	60
4.1.3	Versuchsaufbau	61
4.1.4	Auswertung	61
4.2	Funktionelle Charakterisierung des hrBAT Wildtyp	61
4.2.1	Austauschfunktion	63
4.2.2	Transportkinetiken.....	65
4.3	Funktionelle Charakterisierung der hrBAT Mutation T216M.....	66
4.3.1	Austauschfunktion	67
4.3.2	Transportkinetiken.....	68

4.4	Trafficking und Expression der hrBAT Mutation T216M im Vergleich zum Wildtyp	69
5	Zusammenfassung	72
6	Literaturverzeichnis	74
7	Danksagung	85
8	Lebenslauf	86

1 Einleitung

1.1 Aminosäuretransport

Im menschlichen Körper erfüllt der Transport von Aminosäuren über die Zellmembran verschiedenste Aufgaben. So ermöglicht er im Dünndarm die Aufnahme von Aminosäuren aus der Nahrung und deren folgende Freisetzung ins Blut, in der Niere wird er zur Rückresorption von glomerulär filtrierten Aminosäuren aus dem Primärurin benötigt. Das zentrale Nervensystem verwendet Aminosäuretransport zur Wiederaufnahme von als Neurotransmittern fungierenden Aminosäuren aus dem synaptischen Spalt in die Nervenzelle und zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke. Darüber hinaus ist der Transport von Aminosäuren an grundlegenden Prozessen der Zelle wie der Zellvolumenregulation und der Bereitstellung von Aminosäuren für die Proteinsynthese beteiligt.

Untersuchungen über den Fluss von Aminosäuren über die Zellmembran führten zunächst zur funktionellen Beschreibung verschiedener Aminosäuretransportsysteme. Eine Einteilung konnte aufgrund deren experimentell ermittelten, unterschiedlichen Eigenschaften vorgenommen werden. Diese umfassen unter anderem Substratspezifität, Sättigung, Ionenabhängigkeit, kinetische Eigenschaften, Art der Energiebereitstellung für den Transport und Regulierbarkeit. Bis heute konnte die molekulare Struktur einiger Aminosäuretransporter identifiziert und bekannten Aminosäuretransportsystemen zugeordnet werden (66, 99).

1.2 Heteromere Aminosäuretransporter

Unter den bisher bekannten Aminosäuretransportern stellt die Familie der heteromeren Aminosäuretransporter eine strukturelle Besonderheit dar. Sie setzen sich aus einer schweren und einer leichten Untereinheit zusammen, die

über eine Disulfidbrücke kovalent miteinander verbunden sind (71). Dabei scheint die leichte Untereinheit primär für die Eigenschaften des Transporters die wichtigere Rolle zu spielen, während sie jedoch nur durch die Bindung an eine schwere Untereinheit die Zellmembran erreichen kann (55, 71, 100). Es ist nicht bekannt, aus welcher Anzahl Dimere sich eine transportfähige katalytische Einheit zusammensetzt. Bis heute wurden 2 schwere und 9 verschiedene leichte Untereinheiten beschrieben. Die betreffenden Proteine lassen sich in 3 Gruppen gliedern.

1. rBAT (related to $b^{0,+}$ amino acid transport, auch NBAT oder D2), bildet mit der leichten Kette $b^{0,+}$ AT ($b^{0,+}$ amino acid transporter) einen funktionellen Aminosäure-transporter.

2. 4F2hc (heavy chain of surface antigen 4F2, auch CD98) wurde in Verbindung mit den leichten Ketten LAT1, LAT2, γ^+ LAT1, γ^+ LAT2, asc1 und xCT beschrieben.

3. Die leichten Ketten asc2 und AGT2 scheinen mit noch unbekanntem schweren Untereinheiten zu interagieren.

Alle hier beschriebenen Aminosäuretransporter konnten einem bereits vor ihrer Klonierung beschriebenen Transportsystem zugeordnet werden, mit Ausnahme von AGT1 (66).

Von den bekannten heteromeren Aminosäuretransportern sind zwei klinisch bedeutsam: Mutationen in rBAT und $b^{0,+}$ AT können zur Cystinurie (18, 31) und Mutationen in γ^+ LAT1 zur Lysinurischen Proteinintoleranz führen (94). Die Cystinurie wird in Kapitel 1.4 eingehender beschrieben.

Tabelle 1: Die bekannten Untereinheiten der heteromeren Aminosäuretransporter

Schwere Untereinheit	Leichte Untereinheit	Transport-system	Funktion	Ref.
rBAT	b ^{0,+} AT	b ^{0,+}	Na ⁺ -unabhängiger Austausch von neutralen und dibasischen Aminosäuren	(20, 31, 69)
4F2hc	LAT1	L	Na ⁺ -unabhängiger Austausch von langkettigen neutralen Aminosäuren	(47, 55, 58, 75)
	LAT2	L	Na ⁺ -unabhängiger Austausch von neutralen Aminosäuren	(73, 78, 81)
	y ⁺ LAT1	y ⁺ L	Na ⁺ -abhängiger Austausch von langkettigen neutralen und dibasischen Aminosäuren	(46, 70, 93, 94)
	y ⁺ LAT2	y ⁺ L	Na ⁺ -abhängiger Austausch von neutralen Aminosäuren, Austausch von Glutamat und Arginin	(16, 93)
	xCT	x _c ⁻	Na ⁺ -unabhängiger Austausch von Glutamat und Cystin	(5, 83)
	asc1	asc	Na ⁺ -unabhängiger Austausch von kleinen neutralen Aminosäuren, auch D-Serin und D-Glycin	(38, 62)
noch nicht bekannt	AGT1		Transport von sauren Aminosäuren	(56)
	asc2	asc	Wie asc1, jedoch Unterschiede in der Stereoselektivität	(19)

1.2.1 Schwere Untereinheiten

Die beiden bekannten schweren Untereinheiten der heteromeren Aminosäuretransporter rBAT und 4F2hc sind N-glykosylierte Typ II Membranproteine und setzen sich aus 685 beziehungsweise 529 Aminosäuren zusammen (99). Sie sind zu 30 % identisch und besitzen 50 % Ähnlichkeit zueinander (8). Für beide Proteine wurde nur eine transmembranäre Domäne mit einem intrazellulären Carboxy- und einem extrazellulären Aminoterminus beschrieben (8, 10), während frühere Studien an rBAT mit epitopspezifischen Antikörpern vier transmembranäre Domänen postulierten (61). Interessant ist eine strukturelle Ähnlichkeit beider Untereinheiten zu bakteriellen Glukosidasen, es konnte jedoch keine Glukosidaseaktivität nachgewiesen werden (101). Während rBAT vorwiegend in der Bürstensaummembran des proximalen Tubulus der Niere und in den Microvilli des Dünndarmepithels gefunden wurde, wird 4F2hc ubiquitär exprimiert. Dabei fand sich in den polarisierten Epithelzellen stets eine für rBAT apikale und für 4F2hc basolaterale Expression (39, 76). Die extrazellulär gelegenen Cystinreste C114 in rBAT beziehungsweise C109 in 4F2hc dienen zur Ausbildung der Disulfidbrücke mit der jeweiligen leichten Untereinheit (71, 99). Die Bezeichnung schwere Untereinheit bezieht sich auf das Laufverhalten bei SDS-Page, bei der die beiden Proteine langsamer migrieren als die so genannten leichten Untereinheiten und daher als schwere Proteine erscheinen.

1.2.2 Leichte Untereinheiten

Wie in Tabelle 1 gezeigt, sind derzeit 9 leichte Untereinheiten bekannt. Diese Proteine gehören phylogenetisch zur Familie der APC (Amino Acid / Polyamine / Choline) – Aminosäuretransporter. Sie sind nicht glykosylierte Proteine mit einer durchschnittlichen Proteinelänge von ca. 500 Aminosäuren und besitzen 12 putative transmembranäre Domänen, wodurch sie in der Lage sind, die typische Helixstruktur eines Transportproteins auszubilden. Carboxy- und

Aminoterminus befinden sich intrazellulär. Untereinander sind die leichten Untereinheiten zu 40 % identisch (96). Asc2 und AGT1 bilden jedoch hiervon eine Ausnahme, da sie den übrigen sieben bekannten Ketten nur zu 24 - 29 % gleichen (19, 56). Studien an der ersten identifizierten leichten Untereinheit LAT1 zeigten die Bedeutung und Lokalisation des Cysteinrestes zur Ausbildung der Disulfidbrücke mit der schweren Untereinheit zwischen der dritten und vierten transmembranären Domäne (71).

1.3 Das Transportsystem $b^{0,+}$ (rBAT und $b^{0,+}$ AT)

Die erste Beschreibung des Transportsystems $b^{0,+}$ (broad specificity for neutral (0) and cationic (\pm) amino acids), stammt von van Winkle et al., dessen Untersuchungen in Mausblastozyten ein Natrium-unabhängiges Aminosäuretransportsystem für neutrale und dibasische Aminosäuren zeigten (95), wobei Cystin kein Substrat des Transportsystems darstellte (66). In Bürstensaummembranvesikeln des proximalen Tubulus und an isolierten Rattentubuli waren zuvor ein Transportsystem niedriger und ein System hoher Affinität für Cystin, das auch dibasische Aminosäuren transportierte, beschrieben worden (37, 57, 85, 98). Weitere Studien am proximalen Tubulus der Ratte ergaben gemeinsamen Transport von Cystin und neutralen Aminosäuren durch ein Transportsystem, das jedoch nicht Cystin transportierte (97). Im Dünndarmepithel wurde ebenfalls die Expression von $b^{0,+}$ -ähnlicher Transportaktivität gefunden, welche den hochaffinen Transport von Cystin beinhaltet (53, 65). Ein solches hochaffines Transportsystem wurde funktionell im S3-Segment des proximalen Tubulus lokalisiert (84).

Auf der Suche nach dem für diese Transportaktivität entsprechenden Transportprotein wurde mittels Expressionsklonierung rBAT (auch NBAT oder D2 genannt) in Nierengewebe von Ratte und Kaninchen zeitgleich von mehreren Arbeitsgruppen isoliert (10, 92, 101), später auch in menschlichem Gewebe (9, 52). In der OK (Opossum kidney) Zelllinie wurde später eine partielle cDNA-Sequenz von rBAT gefunden, die eine Transportaktivität ähnlich

zu $b^{0,+}$ induzierte, welche hier ebenfalls Cystin als Substrat miteinschloss (60). Mit der Identifizierung der leichten Untereinheit $b^{0,+}$ AT vervollständigte sich später das Wissen über die molekulare Grundlage dieses Transportsystems (20, 31, 69).

1.3.1 Lokalisation und Struktur

rBAT wird hauptsächlich in der Niere und im Dünndarm exprimiert (10, 92, 101), darüber hinaus auch in Pankreas, Herz, Nebenniere und ZNS (99). Dabei setzt die Expression erst postnatal ein und erreicht nach dem Säuglingsalter ihr volles Ausmaß (39). In polarisierten Epithelien findet sich rBAT stets auf der apikalen Seite (39, 72), im proximalen Tubulus nimmt die Expression von den Segmenten S1 bis S3 zu (20, 48).

Es wurden zwei verschiedene mRNA-Transkripte von 2,3 beziehungsweise 4 kb Länge identifiziert, die aber für das gleiche Protein kodieren (54, 102). Wie oben erwähnt, handelt es sich bei rBAT um ein Typ II Membranprotein mit einer Länge von 685 Aminosäuren und struktureller Ähnlichkeit zu bakteriellen Glukosidasen. Erste Untersuchungen deuteten auf eine oder vier transmembranäre Domänen für rBAT hin (10, 61). Für 4F2hc wurde ein intrazellulär gelegener Aminoterminus und ein extrazellulär gelegener Carboxyterminus gezeigt und es wurde daher auf eine einzelne transmembranäre Domäne geschlossen (32). Bei rBAT vermutet man dies aufgrund der großen Homologie zu 4F2hc heute ebenfalls. Da aber auch vier transmembranäre Domänen für die Bildung einer Pore für den Transport von Substraten nicht ausreichend schienen, vermutete man schon früh, das Vorhandensein weiterer Untereinheiten neben rBAT (66). Wie oben erwähnt, wurde später $b^{0,+}$ AT als eine mit rBAT interagierende leichte Untereinheit identifiziert.

Das Protein $b^{0,+}$ AT wurde in den Epithelzellen des proximalen Tubulus und des Dünndarms nachgewiesen, wie rBAT auf der apikalen Seite der polarisierten Zellen. Die Expression im proximalen Tubulus nimmt im Gegensatz zu rBAT

von den Segmenten S1 bis S3 ab (20, 26, 69, 77), was die Vermutung nahe legt, beide Proteine könnten jeweils noch mit anderen, noch nicht identifizierten Untereinheiten interagieren. Weitere Untersuchungen legten dies vor allem für rBAT nahe (33). Die in-vitro Bindung von $b^{0,+}AT$ an 4F2hc wurde beschrieben (77), in vivo spricht die Expression an den gegenüberliegenden Seiten der polarisierten Epithelzellen jedoch dagegen. Im Menschen setzt sich $b^{0,+}AT$ aus 487 Aminosäuren zusammen. In der Struktur werden 12 transmembranäre Domänen vermutet, welche die zum Transport von Substrat über die Zellmembran notwendige Pore bilden (31).

1.3.2 Funktion und physiologische Rolle

Die Expression von rBAT in *Xenopus laevis* Oozyten führte zu hochaffinem Transport von dibasischen Aminosäuren und Cystin (K_m von 20 – 80 μM), sowie zu Transport von neutralen Aminosäuren mit etwas niedrigerer Affinität (K_m um 0,2 – 0,4 mM) (9, 10, 17). Elektrophysiologische Untersuchungen an Oozyten, die rBAT exprimierten, zeigten, dass es sich beim Aminosäuretransport um Austausch handelt, da neutrale beziehungsweise dibasische Aminosäuren Ströme von entgegen gesetzter Polarität induzierten, sowie dass dieser Austausch im Verhältnis 1:1 stattfindet (17, 21, 23). Dabei geht man von einem tertiär aktiven Transportmechanismus aus, bei dem durch die Aktivität der Na^+/K^+ ATPase der Einstrom von Natrium und neutralen Aminosäuren durch einen Kotransporter begünstigt wird, der wiederum durch den entstehenden Gradienten der neutralen Aminosäuren über die Zellmembran den Austausch von neutralen und dibasischen Aminosäuren durch rBAT antreibt (21). Bei diesem Austausch wird der Einstrom von dibasischen Aminosäuren und Cystin und der Ausstrom von neutralen Aminosäuren aufgrund mehrerer Faktoren begünstigt. Wie oben beschrieben, sind die extrazellulären Affinitäten des Transporters für dibasische Aminosäuren und Cystin höher. Zudem fördert der Cystingradient an der Zellmembran, der durch schnelle Reduktion des Cystins zu Cystein in der Zelle durch das reichlich vorhandene Glutathion entsteht, den

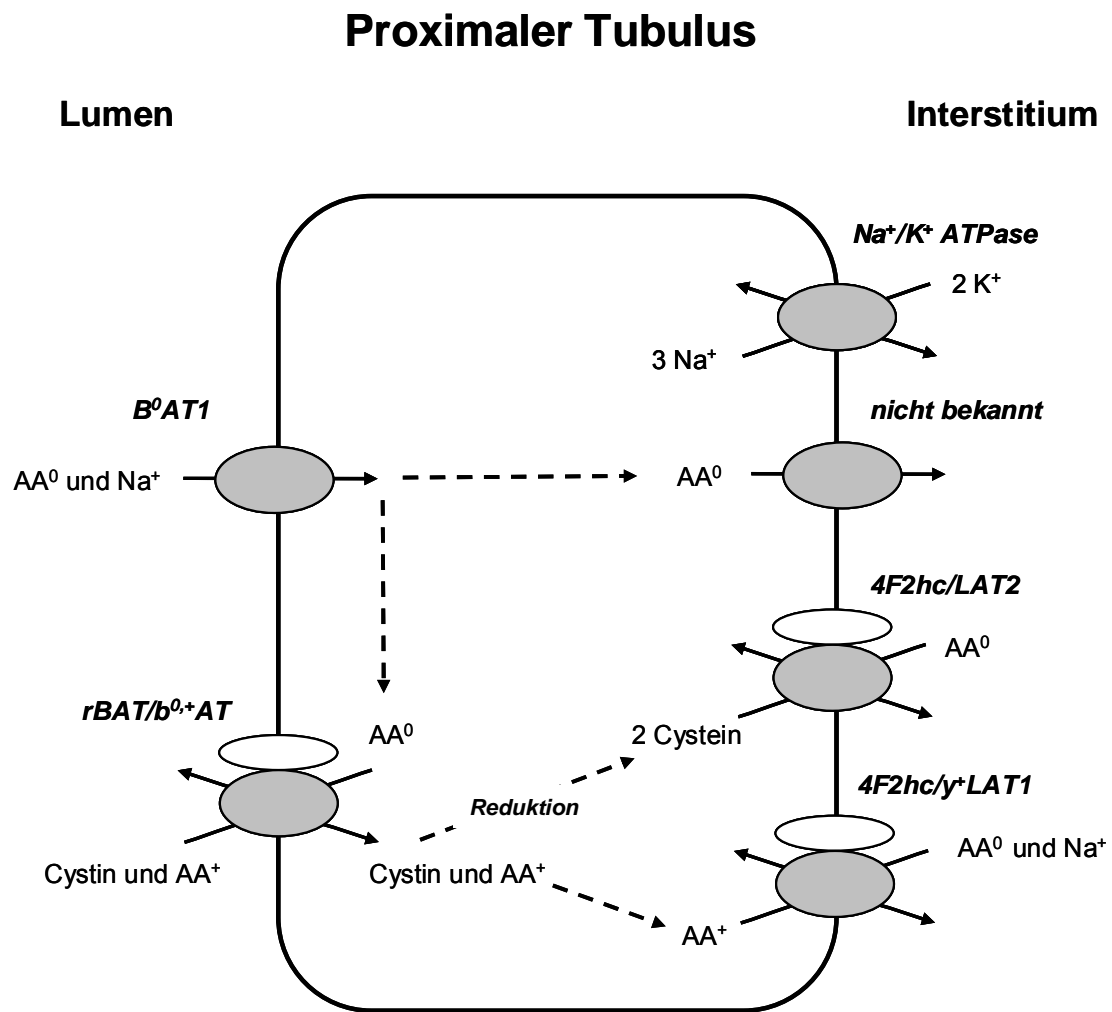
Einstrom von Cystin (91). Das entstandene Cystein und die dibasischen Aminosäuren verlassen die Zelle durch basolateral gelegene Transportsysteme (21), die heute als 4F2hc/LAT2 beziehungsweise 4F2hc/y⁺LAT1 identifiziert sind. Der Ausstrom neutraler Aminosäuren wird durch deren höhere intrazelluläre Konzentration gefördert, welche durch an Natrium gekoppelten Einstrom dieser Aminosäuren entsteht. Dieses funktionelle Zusammenwirken der Aminosäuretransporter konnte auch in verschiedenen Nierenzelllinien gezeigt werden (6, 34). Das Transportprotein B⁰AT1, das zumindest für den größten Teil des an Natrium gekoppelten Einstroms von neutralen Aminosäuren verantwortlich ist und dem zuvor beschriebenen System B⁰ entspricht, wurde vor kurzem identifiziert (14). In der Summe ergibt sich so in der Niere ein vom Tubuluslumen ins Blut gerichteter Strom von Cystin und dibasischen Aminosäuren, bei dem der Rückresorption von Cystin aus dem Primärurin besondere Bedeutung zukommt, wie in Kapitel 1.4 erläutert wird.

Die Expression von rBAT und b^{0,+}AT im proximalen Tubulus der Niere und die Identifikation beider Proteine als molekulare Grundlage des Transportsystems b^{0,+}, welches eine essentielle Rolle für die Rückresorption von Cystin aus dem Primärharn spielt, führten zuerst für rBAT und nach seiner Beschreibung auch für b^{0,+}AT zur Vermutung, dass dem Krankheitsbild der Cystinurie Störungen der Funktion dieser beiden Proteine zugrunde liegen. Dies konnte durch den Nachweis von Mutationen bei Cystinurienpatienten bestätigt werden (18, 31).

Nach der Identifikation der leichten Untereinheit b^{0,+}AT als Teil des Transportsystems b^{0,+} neben rBAT wurde in mit beiden Proteinen transfizierten COS Zellen b^{0,+}-artiger Aminosäuretransport nachgewiesen. Dabei sowie in Studien an MDCK (Madine-Darby canine kidney) Zellen wurde auch gezeigt, dass jedes der beiden Proteine die Zellmembran nur in der Anwesenheit des anderen erreichen kann (7, 20, 31). Die zuvor in nur mit rBAT cRNA injizierten *Xenopus laevis* Oozyten gefundene Transportaktivität wird mit dem Vorhandensein einer oder mehrerer endogener leichten Untereinheiten erklärt, die fast identische Eigenschaften wie der humane b^{0,+}AT aufweisen (22). Die Expression eines Fusionsproteins, das den Aminoterminus von rBAT mit dem Carboxyterminus von b^{0,+}AT verband, führte in *Xenopus laevis* Oozyten sowie

in der M1 Zelllinie der Maus ebenfalls zu einem $b^{0,+}$ -artigen Aminosäuretransport (69).

Abbildung 1: Das Transportsystem $b^{0,+}$, bestehend aus dem heteromeren Aminosäuretransporter rBAT / $b^{0,+}$ AT, ist Teil des Mechanismus zur Rückresorption von Cystin und dibasischen Aminosäuren im proximalen Tubulus (AA^0 : neutrale Aminosäuren; AA^+ : dibasische Aminosäuren)



1.4 Cystinurie

1.4.1 Definition und Einteilung

Die Cystinurie zeichnet sich durch einen gestörten Transport von Cystin und dibasischen Aminosäuren im proximalen Tubulus der Niere und im Dünndarm aus, wodurch es zur erhöhten Ausscheidung dieser Aminosäuren im Urin sowie zur verminderten Aufnahme im Dünndarm kommt. Es handelt sich um eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, wobei komplett und inkomplett rezessive Erbgänge auftreten (67). Eine erste Einteilung der Cystinurie wurde aufgrund der sehr unterschiedlichen Menge der im Urin ausgeschiedenen Aminosäuren bei Cystinurie-Heterozygoten vorgenommen (80). Wie oben beschrieben, sind inzwischen zwei der die Cystinurie verursachenden Gene und die durch sie kodierten Transportproteine bekannt. Mutationen in rBAT (SLC3A1) und $b^{0,+}$ AT (SLC7A9) wurden bei Cystinurienpatienten gefunden (18, 31). Derzeit werden zwei verschiedene Einteilungen parallel verwendet. Aus der ursprünglichen, auf dem Phänotyp basierenden Einteilung (80) wurde die Unterscheidung in Cystinurie Typ I und Cystinurie nicht-Typ I abgeleitet. Cystinurie Typ I Heterozygote scheiden mit dem Urin normale Mengen an Cystin und dibasischen Aminosäuren aus, bei Cystinurie nicht-Typ I Heterozygoten ist die Urinausscheidung erhöht, wobei die Menge stark variiert (27). In den meisten Fällen wird Cystinurie Typ I durch Mutationen in SLC3A1 (rBAT) und Cystinurie nicht-Typ I durch Mutationen in SLC7A9 ($b^{0,+}$ AT) hervorgerufen. Da inzwischen auch davon abweichende Fälle beschrieben wurden, wird aufgrund des Genotyps auch Cystinurie Typ A (Mutationen in SLC3A1, rBAT) und Cystinurie Typ B (Mutationen in SLC7A9, $b^{0,+}$ AT) unterschieden (27, 35).

1.4.2 Klinisches Erscheinungsbild und Therapie

Die Menge an Cystin und dibasischen Aminosäuren ist bei Cystinuriepatienten im Urin erhöht und im Serum normal oder leicht erniedrigt. Obwohl auch die Aufnahme dieser Substrate im Darm gestört ist, tritt keine Mangelernährung auf. Man vermutet daher im Dünndarm die Aufnahme durch alternative Transportsysteme (24). Aufgrund der vor allem bei niedrigem pH schlechten Löslichkeit des Cystins treten im Urin Cystinkristalle und im weiteren Verlauf Urolithiasis durch Cystinsteine auf, was zu wiederholten Harnwegsinfekten, Obstruktionen und schließlich zu fortschreitendem Nierenversagen mit Dialysepflichtigkeit führen kann (67). Dabei korreliert die Häufigkeit der Steinbildung nicht mit der Cystinkonzentration im Urin (27). Es wurden auch Fälle von isolierter Cystinurie beschrieben (12). Unter allen Nierensteinerkrankungen macht die Cystinurie 1-2 % aus, bei Kindern 6-8 %. Die Prävalenz liegt bei durchschnittlich 1:7000, variiert jedoch von 1:2500 bei libyschen Juden und 1:100000 in Schweden (67).

Als Therapie der Cystinurie wird versucht, durch die Einnahme großer Mengen an Flüssigkeit sowie das Alkalinisieren des Urins die Löslichkeit des Cystins im Urin zu verbessern. Mit der Einnahme von Sulfhidrylderivaten wie D-Penicillamin oder Mercaptopropionylglycin kann man die Bildung von besser löslichen Disulfiden mit Cystin erreichen, dabei treten jedoch starke Nebenwirkungen auf. Nach der Identifizierung der zwei Cystinuriegene rBAT und b^{0,+}AT wurden auch gentherapeutische Ansätze versucht, die jedoch noch nicht zur erfolgreichen Behandlung der Cystinurie führten (67).

1.4.3 Genetische Grundlagen der Cystinurie

Im Moment sind hundertunddrei verschiedene Mutationen im rBAT-Gen (SLC3A1) beschrieben, darunter als die beiden häufigsten die Mutation M467T, die zum Ersatz des Methionins an Position 467 durch Threonin führt und die T216M, die ein Threonin in Position 216 durch ein Methionin ersetzt (35). Im

b^{0,+}AT-Gen (SLC7A9) kennt man derzeit sechshundsechzig verschiedene zur Cystinurie führende Mutationen, die häufigste unter ihnen ist G105R, die an der Position 105 anstelle von Glycin Arginin aufweist (35). Auch Mischformen wurden beschrieben (sogenannte compound heterozygotes), bei denen im gleichen Patienten das gleiche Gen mehrfach oder beide Gene mutiert sind (35, 42). In einigen wenigen Fällen von Cystinurie wurden in beiden Genen keine Mutationen gefunden (35). Eine Erklärung hierfür wäre unter anderem die Existenz eines weiteren Cystinurie verursachenden Gens wie etwa eine zweite mit rBAT interagierende leichte Untereinheit (33).

1.4.3.1 Mutationen in b^{0,+}AT

Bei einigen der in b^{0,+}AT beschriebenen Mutationen wurde eine Störung der Transportfunktion gezeigt, welche die mangelnde Cystinresorption und damit die Cystinurie erklärt. Zum Teil konnte hier ein Zusammenhang der Schwere des Phänotyps mit der erhaltenen Transportfunktion des Proteins gesehen werden (36). Für die Mutation A182T wurde ein Traffickingdefekt gezeigt, während die Transportaktivität voll erhalten blieb (79). Im Mausmodell konnte zudem gezeigt werden, dass das vollständige Fehlen von b^{0,+}AT bzw. eine Punktmutation in rBAT (D140G) zur Cystinurie mit Auftreten von Cystinsteinen führt (30, 68).

1.4.3.2 Eigenschaften bekannter Mutationen in rBAT

Von den bekannten bei Cystinurienpatienten gefundenen rBAT-Mutationen wurden einige funktionell in *Xenopus laevis* Oozyten untersucht. Bei den dreizehn verschiedenen Mutationen P128Q, Y151N, R181Q, T216M, S217R, E268K, R270L, T341A, R365W, M467K/T, Y582H, F648S und C673S wurde eine verringerte Transportaktivität gezeigt (1, 18, 22, 45, 59, 74, 82).

Genauere funktionelle Untersuchungen ergaben für die Mutationen M467K und M467T eine verringerte Transportaktivität im Vergleich zum Wildtyp. Der größte Teil des Proteins erreichte die Zellmembran nicht, sondern wurde intrazellulär zurückgehalten. Abhängig von der Dauer nach cRNA-Injektion und der Menge der injizierten cRNA ließ sich die Aktivität jedoch auf das Niveau des Wildtyps steigern. Man vermutet daher einen Traffickingdefekt, bei dem das mutierte Protein intrazellulär zurückgehalten wird und die Expression an der Zellmembran gestört ist. Die Induktion höherer Aminosäuretransportaktivität bei Verwendung größerer cRNA-Mengen wird mit einer Übersättigung der intrazellulären Qualitätskontrolle im endoplasmatischen Retikulum erklärt (22). Auch für weitere Mutationen wurde ein Traffickingdefekt gezeigt (1, 45).

Untersuchungen an der Mutation R365W zeigten ebenfalls einen Traffickingdefekt. Zusätzlich wurde hier allerdings eine Änderung der Transporteigenschaften des gesamten Heteromers beobachtet. Nach Expression in *Xenopus laevis* Oozyten und humanen HeLa Zellen zeigte sich eine selektive Verringerung des Ausstroms von Arginin, während der Einstrom sowie extra- und intrazelluläre Affinitäten für Arginin unverändert blieben. Dies legte die Vermutung nahe, dass eine funktionelle Einheit des heteromeren Aminosäuretransporters rBAT/b^{0,+}AT zwei Poren für den Substrattransport beinhaltet (74). Andere Studien zeigten auch bei der Mutation C673R ein verändertes Transportverhalten, in diesem Fall waren die Affinitäten für neutrale Aminosäuren verändert (1).

1.4.3.3 Die rBAT-Mutation T216M

Die rBAT-Mutation T216M, bei der die Aminosäure Threonin an Position 216 durch Methionin ersetzt ist, wurde zunächst bei einem italienischen Cystinurie Typ I-Patienten beschrieben (11). Später wurde die Mutation vor allem bei griechischen Patienten gefunden, was auf eine populationspezifische Verteilung hinwies (2). Seither wurden weitere für T216M homozygote

Patienten identifiziert (41, 51), womit T216M eine der häufigsten beschriebenen rBAT-Mutationen ist.

Bei funktionellen Studien an dieser Mutation in Oozyten zeigte sich ebenfalls eine verringerte Transportaktivität (82). Hierbei betrug die gemessene Aktivität einen Tag nach Injektion der cRNA 25 % der Wildtypaktivität und stieg am vierten Tag nach Injektion auf 75 %. Es wurde daher ebenfalls ein Traffickingdefekt als pathophysiologische Ursache für das Auftreten der Cystinurie Typ I vermutet, (82). Dies wurde aber seither nicht genauer untersucht.

1.5 *Xenopus laevis* Oozyten als Expressionssystem

Die Expression artfremder Proteine ist nach der Injektion der entsprechenden mRNA in Eizellen verschiedener Spezies möglich, da die fremde mRNA wie zelleigene behandelt und translatiert werden kann. Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* stellen hierbei das am häufigsten gebrauchte Expressionssystem dar. Seit seiner ersten Beschreibung durch Gurdon et al. ermöglichte es zahlreiche elektrophysiologische Studien an verschiedenen Membrantransportern und Ionenkanälen (25, 43, 44, 88, 90).

Vier Membranschichten umgeben die *Xenopus laevis* Oozyten. Durch eine Behandlung mit Kollagenase werden die äußeren drei folliculären Schichten entfernt und nur die innere bindegewebige Vitellinmembran (defollikulierte Oozyte) verbleibt (3, 25). Diese Vitellinschicht besteht aus zwei Komponenten mit einem Molekulargewicht von 69 beziehungsweise 64 kDa. Sie wird im Experiment für die Elastizität und Widerstandsfähigkeit benötigt und belassen (40, 49). Die Oozyten bestehen aus zwei unterschiedlichen Hemisphären, einer animalischen und einer vegetativen. Die animalische Hälfte ist durch die Einlagerung von Melaninpigment dunkel gefärbt und enthält den größten Anteil an Mikrovilli, an endoplasmatischem Retikulum und an Zytoskelett. Sie weist zudem eine höhere Dichte an calciumabhängigen Chlorid- und Calciumkanälen

auf. Die hell gefärbte vegetative Seite enthält mehr RNA und ist der Eintrittsort des Spermiums (25).

Für die intrazellulären Ionenkonzentrationen wurden unterschiedliche Werte gemessen: Na^+ zwischen 2 und 18 mM, wahrscheinlich ~ 5 bis 6 mM, K^+ liegt bei 110 bis 130 mM, Cl^- beträgt 40 bis 50 mM und Ca^{2+} 0,1 bis 0,4 μM (25).

Einige technische Vorteile führten zur Verwendung von *Xenopus* Oozyten in der Elektrophysiologie. Ihr relativ großer Zelldurchmesser von circa 1,3 mm ermöglicht eine einfache Handhabung der einzelnen Zelle, wodurch die Injektion der fremden cRNA sowie die gleichzeitige Verwendung mehrerer intrazellulärer Glaselektroden während der Messung in einer Perfusionskammer möglich ist. Aufgrund der physiologischen Notwendigkeit, in ungünstigem Milieu zu überleben, sind die Oozyten mit allen für das eigene Wachstum und das Expressieren von Proteinen notwendigen Nährstoffen ausgestattet und exprimieren nur wenige endogene Membrantransportsysteme, was störende Einflüsse auf die Messungen verringert (25, 88). Jedoch sind auch Nachteile zu beachten. Die Oozyte weist im Vergleich zu den Zellen natürlicher Gewebe einige Unterschiede auf. Nach der Translation der injizierten mRNA durchlaufen die entstandenen Proteine noch verschiedene intrazelluläre Schritte (Processing), in deren Verlauf das Protein glykosyliert oder phosphoryliert werden kann. Dabei ist es nicht selbstverständlich, dass ein Protein in der Oozyte dieselben Processing-Schritte durchläuft wie im natürlichen Gewebe. So wurde beispielsweise für bestimmte die Mukoviszidose verursachende Mutationen des Chloridkanals CFTR beobachtet, dass diese in natürlichem Gewebe nicht an der Zellmembran exprimiert werden können, während sie in *Xenopus* Oozyten die Membran erreichen (50). Für eine Reihe von Ionenkanälen konnte in den letzten Jahren aber gezeigt werden, dass diese ihre natürlichen Eigenschaften nicht verlieren (25, 88). Ein weiteres Problem besteht in potentiellen Unterschieden der intrazellulären Signalkaskaden, wodurch sich die Regulation eines Proteins im Vergleich zur Regulation in seinem natürlichen Gewebe verändern könnte (25).

1.6 Fragestellung der Arbeit

- Charakterisierung der Transporteigenschaften des hrBAT Wildtyp in *Xenopus laevis* Oozyten, welche Untersuchungen zu Expression, Trafficking, Austauschaktivität, Maximalströmen und extrazellulären Substrataffinitäten umfasst.
- Charakterisierung der Transporteigenschaften der Mutation T216M, einer der häufigsten hrBAT-Mutanten
- Untersuchung des pathophysiologischen Mechanismus, durch den die T216M Mutation zur Cystinurie Typ I führt

2 Material und Methoden

2.1 Substanzen und Lösungen

ND96 war die Grundlösung für die Versuche und die Präparation der Oozyten. Für Experimente unter Natrium-freien Bedingungen wurde NaCl durch N-Methyl-D-Glucamin (NMDG) ersetzt.

2.1.1 ND96 (nach Henry Lester)

Tabelle 2: Zusammensetzung der ND96 – Lösung

Substanz	Konzentration
NaCl	96 mM
KCl	2 mM
MgCl ₂	1 mM
CaCl ₂	1.8 mM
Tris-HEPES	5 mM
pH	7.4

Tris-HEPES ist Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan-N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethan-sulfonat (pKs 7.4) und dient als Puffer.

2.1.2 Na⁺-freie Lösung

Tabelle 3: Zusammensetzung der Na⁺-freien Lösung

Substanz	Konzentration
NMDG	100 mM
KCl	2 mM
MgCl ₂	1 mM
CaCl ₂	1.8 mM
Tris-HEPES	5 mM
pH	7.4

2.1.3 ND 96 – Oozytenaufbewahrungslösung

Tabelle 4: Zusammensetzung der Oozytenaufbewahrungslösung

Substanz	Konzentration
NaCl	96 mM
KCl	2 mM
MgCl ₂	1 mM
CaCl ₂	1.8 mM
Tris-HEPES	5 mM
Theophyllin	0.5 mM
Na-Pyruvat	2.5 mM
Gentamicin	50 µg / ml
pH	7.4

Theophyllin hemmt die weitere Reifung der Oozyten (63). Das Antibiotikum Gentamicin wurde eingesetzt, um Infektionen zu verhindern, die die Qualität der für die Experimente verwendeten Oozyten verringern können.

2.1.4 OR-2 (Oozyten-Ringer, kalziumfrei)

Tabelle 5: Zusammensetzung der OR-2-Lösung

Substanz	Konzentration
NaCl	82.5 mM
KCl	2 mM
MgCl ₂	1 mM
Tris-HEPES	5 mM
pH	7.4

OR-2 wurde für die Kollagenasebehandlung der Oozyten verwandt und ist Kalzium-frei, wodurch die Wirkung der Kollagenase verbessert wird.

2.1.5 Weitere verwendete Substanzen

- Aminosäuren (alle L-Aminosäuren): Alanin, Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Cystein, Cystin, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Leucin, Lysin, Isoleucin, Methionin, Ornithin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Valin
- DTE (Dithioerythriol)
- Diamid

Alle hier angegebenen Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (München) und Merck (Darmstadt) bezogen. Die verwendeten Aminosäuren wurden als Stammlösung von je nach Löslichkeit 100 mM beziehungsweise 50 mM angesetzt und der Versuchslösung beigegeben, um die gewünschten Konzentrationen zu erreichen. Cystin wurde jeweils frisch in der Endkonzentration angesetzt. Alle Lösungen wurden mit HCl und NaOH, bei Versuchen unter Natrium-freien Bedingungen mit KOH auf einen pH-Wert von

7.4 titriert. Alle Stammlösungen wurden bei 4°C aufbewahrt und in regelmässigen Abständen frisch angesetzt.

2.2 Oozytenpräparation

2.2.1 Isolierung der Oozyten

Die für die Versuche verwendeten Oozyten wurden *Xenopus laevis*-Froschweibchen entnommen. Hierfür wurde der Frosch für ca. 15 min in 0.1 %ige 3-Aminobenzoessäuremethylester-Lösung gelegt, bis völlige Betäubung eingetreten war. Für die Operation wurde der Bauch mit Ethylalkohol desinfiziert. Danach erfolgte unter antiseptischen Bedingungen die Eröffnung des Bauchraums. Dazu wurden Bauchhaut, Muskelfaszie und Muskulatur im Bereich des seitlichen Unterbauches auf ca. 1 cm Länge durchtrennt. Mit Pinzette und Skalpell wurde nun ein Teil der Ovarialsäckchen, die Oozyten in allen Reifestadien enthalten, entnommen und zur Aufbewahrung in eine Petrischale mit ND96 gelegt. Anschließend wurden Muskulatur und Haut getrennt mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl) wieder verschlossen. Die Gefahr einer Wundinfektion wird durch einen antibiotikahaltigen Überzug der Froschhaut reduziert (103). Die entnommenen Ovarialsäckchen wurden mit OR-2 gespült, vorsichtig mit der Pinzette zerteilt und schließlich in OR-2-Lösung, die 1-3 g/l (je nach Aktivität) Kollagenase A (Firma Boehringer, Mannheim) enthielt, bei 30°C enzymatisch von der Follikelmembran befreit (Dauer: 30-60 min). Die Oozyten wurden dann unter der Stereolupe sortiert und nur Oozyten der Stadien V und VI nach Dumont (29) verwendet, deren Färbung und Membran intakt erschienen.

Die selektierten Oozyten wurden bis zur cRNA-Injektion im Inkubator bei etwa 15°C unter ständiger Bewegung (um Verklebungen und Deformationen zu vermeiden) in kleineren Mengen von jeweils 30 Oozyten in Petrischalen mit ND96-Aufbewahrungslösung gelagert.

2.2.2 cRNA – Injektion

Die verwendete cRNA wurde von B. Noll, Physiologisches Institut Tübingen, synthetisiert. Der cDNA Klon des hrBAT-Wildtyps stammte von Prof. Dr. M. Palacin, Barcelona. Die T216M hrBAT-Mutante wurde von Prof. Dr. S. Waldegger konstruiert.

Die Injektion der cRNA erfolgte in der Regel einen Tag nach der Isolierung der Oozyten mit Hilfe eines vollautomatischen Nanoliterinjektors (Fa. WPI, Sarasota, Fa., USA). Zur Herstellung der Injektionskapillaren wurden Borosilikat-Glaskapillaren (Fa. WPI, Sarasota, Fa., USA) mit einem Außendurchmesser von 1.2 mm verwendet, die mit Hilfe eines Mikroelektrodenpullers (DMZ-Universal-Puller der Firma Zeitz, Augsburg) entsprechend dünn ausgezogen wurden. Um die Injektionskapillaren zum Kolben hin nach außen abzudichten, wurden sie mit Paraffinöl vorbefüllt. Zur Injektion wurden die Oozyten in ND96 liegend auf einem Gitternetz fixiert. Jeder Oozyte wurden 50 nl cRNA-Lösung injiziert. Bei allen Injektionsschritten und der cRNA-Handhabung wurde jeweils darauf geachtet, eine mögliche Kontamination mit RNasen zu vermeiden. Nach 2-3 Tagen waren die Aminosäuretransporter genügend exprimiert, um an ihnen elektrophysiologische Untersuchungen durchzuführen.

2.3 Elektrophysiologie: Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp (TEVC)

Bei der TEVC wird versucht, die Zellmembran auf ein vorgegebenes Membranpotential einzustellen (zu „klemmen“) und dann direkt über die Membran fließende Ströme zu messen. Dazu wird eine Versuchsanordnung mit insgesamt drei Elektroden verwendet, zwei davon liegen intrazellulär (Two-Electrode-Voltage-Clamp). Mit einer intrazellulären Elektrode E_1 und einer extrazellulären Elektrode E_B (Badelektrode) wird das Membranpotential V_M gemessen, im Rückkopplungsamplifier hoch verstärkt und mit dem Sollwert V_S

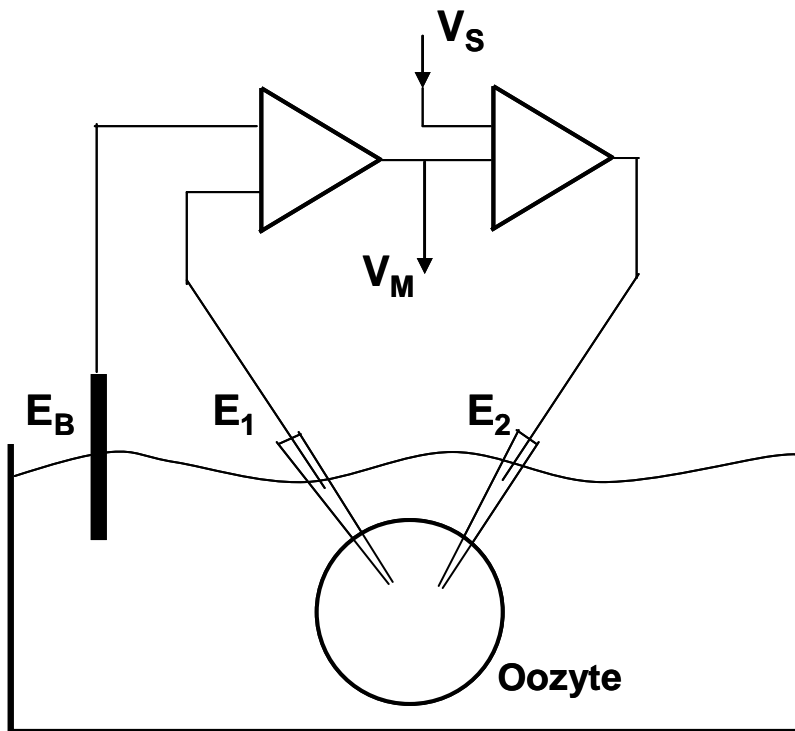
verglichen. Über die zweite intrazelluläre Elektrode E_2 wird der für die Aufrechterhaltung des vorgegebenen Potentials notwendige Strom appliziert und gemessen (3, 28).

Findet nun elektrogener Transport, also eine Nettoladungsverschiebung über die Zellmembran statt, verändert sich der Betrag des zu applizierenden Stromes. Dieser entspricht dem über die Membran fließenden Strom, der somit bestimmt und untersucht werden kann.

Die Ag-AgCl₂ Referenzelektrode E_B war über eine Brücke aus 3 % Agar und 3M KCl-Lösung mit dem Bad verbunden (4). Die intrazellulären Glasmikroelektroden (Borosilikatglaskapillaren, Außendurchmesser 1.5 mm; Typ GC150TF-15, Clark Electromedical Instruments, Pangbourne, GB) waren ebenfalls mit 3 M KCl-Lösung gefüllt und über einen chloridierten Silberdraht mit dem Spannungsmesser verbunden. Es wurden nur Mikroelektroden verwendet, bei denen der Gesamtwiderstand zwischen 0.3 und 3.0 M Ω lag.

Die Versuchsanordnung war durch einen Faradayschen Käfig weitgehend gegen äußere elektrische Störungen abgeschirmt (64). Alle 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 2: Schematische Darstellung der Messanordnung



2.4 Durchführung der Experimente

Alle Messungen wurden, soweit der Zeitpunkt nicht anders angegeben wird, 2-7 Tage nach Injektion der cRNA in die Oozyten bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Oozyten wurden während der Messung im Wasserbad ständig von Lösung umspült, wobei die Flussgeschwindigkeit 20 ml/min betrug und dadurch ein völliger Austausch der Badlösung innerhalb von 20 Sekunden erfolgte.

Soweit nicht anders vermerkt, betrug das voreingestellte Membranpotential -50 mV, nur bei der Untersuchung der Spannungsabhängigkeit der Transporteigenschaften von rBAT wurde das Potential von -90 mV bis -10 mV variiert.

Alle Experimente wurden an verschiedenen Oozytenpräparationen und an verschiedenen Tagen wiederholt. Dabei ergaben sich keine qualitativen Unterschiede, lediglich die Größe der maximalen Ströme variierte in

Abhängigkeit des Zeitpunktes der cRNA-Injektion (d.h. der schon erfolgten Expression) und der Oozytenpräparation.

2.5 Geräte und Software

Ein für die Messungen verwendetes Setup bestand jeweils aus einem Verstärker (1.), einem DA-Wandler (2.) und einem Computer (3.) zur Datenerfassung. Hierbei wurden verwendet:

1. Clampator One – Verstärker der Firma Dagan, Minneapolis, USA oder Geneclamp 500 – Verstärker der Firma Axon Instruments, Foster City, USA
2. DA – Wandler MacLab/4e oder PowerLab/400 von AD Instruments, Castle Hill, Australien
3. Apple Macintosh Performa 400 oder UMAX Apus 3000

Als Software wurden Chart und Scope (Version 3.5.2) von AD Instruments (MacLab) eingesetzt.

2.6 Auswertung und Statistik

Alle Konzentrations-Wirkungskurven wurden mit der Hill-Gleichung gefittet, die sich aus der Michaelis Menten-Gleichung ableitet.

(1) Michaelis Menten-Gleichung:
$$I = I_{\max} * \frac{C}{C + K_m}$$

I gibt hier den gemessenen Strom, I_{\max} den maximalen Strom, C die gegebene Substratkonzentration und die Michaeliskonstante K_m die Substratkonzentration bei halbmaximalem Strom an (86).

(2) Hill-Gleichung:

$$I = I_{\max} * \frac{C^n}{C^n + K_m^n}$$

Der Hill-Koeffizient n gibt Hinweise auf die Anzahl von Substratbindungsstellen am Molekül bzw. am Transporter. Da dies jedoch nur für den Fall einer starken kooperativen Bindung des Substrates gilt, muß deshalb für die Kinetiken davon ausgegangen werden, daß die nächsthöhere natürliche Zahl zu n lediglich die minimale Anzahl an möglichen Bindungsstellen angibt (86).

Alle Werte sind als arithmetisches Mittel mit dem Standardfehler des Mittelwertes angegeben (SEM für standard error of the mean). "n" gibt die Anzahl der voneinander unabhängig durchgeführten Messungen an. Zur Ermittlung einer statistischen Signifikanz wurde der Student t-Test verwendet, nur Werte mit $p < 0.05$ wurden hierbei als signifikant angesehen.

3 Versuche und Ergebnisse

3.1 hrBAT Wildtyp und die Mutation T216M zeigen elektrogene Transporteigenschaften

Am 4. Tag nach RNA-Injektion zeigten *Xenopus laevis* Oozyten, die hrBAT Wildtyp exprimierten, während einer 30 Sekunden dauernden Superfusion mit einer 1 mM Lösung der dibasischen Aminosäure Arginin im Voltage Clamp Modus mit einem Haltepotential von -50 mV einen durchschnittlichen Einwärtsstrom von $-36,3 \pm 1,6$ nA und während einer 30 Sekunden dauernden Superfusion mit 3 mM Lösung der neutralen Aminosäure Leucin einen mittleren Auswärtsstrom von $22,5 \pm 1,6$ nA.

Im unter gleichen Bedingungen durchgeführten Experiment zeigten *Xenopus laevis* Oozyten, die die hrBAT-Mutation T216M exprimierten, unter Superfusion mit Arginin einen durchschnittlichen Einwärtsstrom von $-8,5 \pm 1,1$ nA und unter Superfusion mit Leucin einen durchschnittlichen Auswärtsstrom von $6,9 \pm 1,1$ nA.

3.2 Eigenschaften des hrBAT Wildtyp

3.2.1 Alle 20 proteinogenen Aminosäuren sowie Ornithin und Cystin induzieren Ströme in hrBAT exprimierenden Oozyten

Der elektrogene Heteroaustausch von Aminosäuren durch *Xenopus laevis* Oozyten, welche den hrBAT Wildtyp exprimieren, ist durch die Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp Methode messbar (17). Dabei löst die Perfusion der Oozyten mit neutralen Aminosäuren einen mit positivem Vorzeichen bezeichneten Auswärtsstrom und die Perfusion mit dibasischen Aminosäuren einen mit negativem Vorzeichen bezeichneten Einwärtsstrom aus.

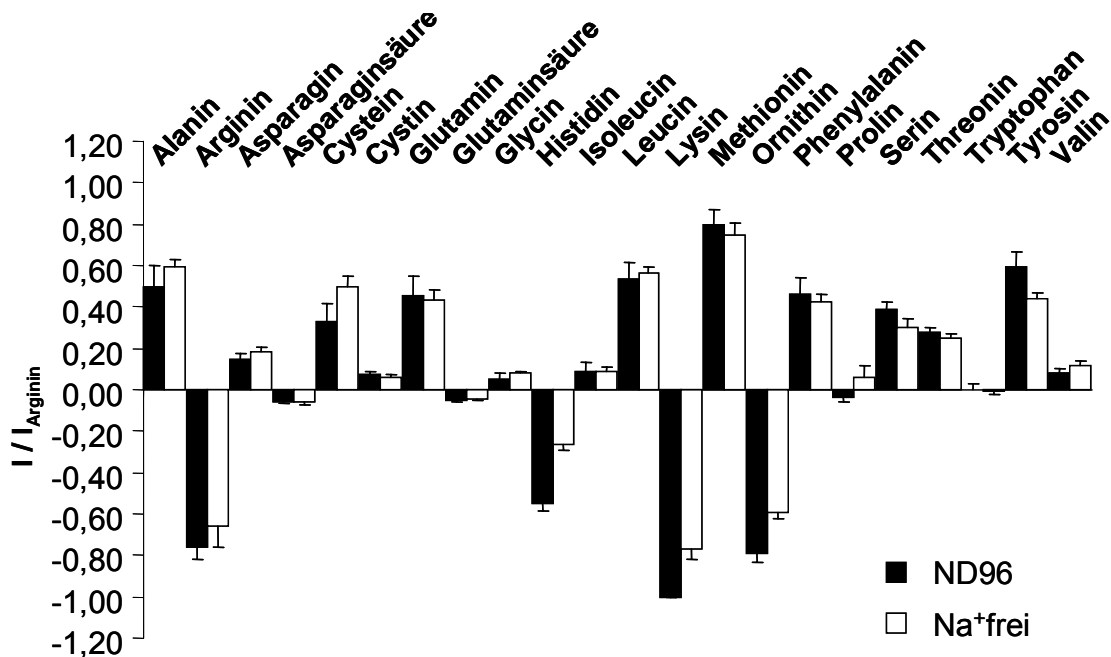
Um zu bestimmen, welche Aminosäuren als Substrate für den hrBAT Wildtyp in Frage kommen, wurden die durch alle 20 proteinogenen Aminosäuren sowie Ornithin und Cystin induzierten Ströme gemessen. Die Oozyten wurden jeweils für 30 s mit einer 3 mM Aminosäurelösung umspült, jeweils sowohl in An- als auch Abwesenheit von Natrium. Eine Ausnahme bildete die Cystinlösung, deren Konzentration aufgrund der geringeren Löslichkeit des Cystins nur maximal 1 mM betrug. Dabei induzierte Lysin in Anwesenheit von Natrium den stärksten Strom. Für jede der gemessenen Oozyten wurde dieser = 1 gesetzt (normalisiert), die anderen Ströme sind im Verhältnis dazu angegeben.

Formel:

$$I = \frac{I}{I_{\text{Lysin(ND96)}}$$

Die dibasischen Aminosäuren induzierten hierbei starke Einwärtsströme, die unter natriumfreien Bedingungen etwas schwächer ausfielen. Ein Teil der neutralen Aminosäuren führte zu Auswärtsströmen, deren Betrag bei 50 – 80 % des Lysinstromes lagen, während bei anderen nur schwache oder kaum messbare Ströme auftraten. Dabei waren die unter natriumfreien Bedingungen gemessenen Ströme entweder leicht stärker oder schwächer. Der durch Cystin ausgelöste Strom lag in der Anwesenheit von Natrium bei etwa 7 % des Lysinstromes. Die sauren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure induzierten keine signifikanten Ströme. Ebenfalls keine oder nur sehr geringe Ströme wurden durch Glycin, Prolin und Tryptophan induziert.

Abbildung 3: Ströme induziert durch die 20 proteinogenen Aminosäuren sowie Ornithin und Cystin (n = 5)



3.2.2 Charakterisierung der Austauschfunktion

Um den elektrogenen Heteroaustausch von neutralen und dibasischen Aminosäuren zu messen, wurden die Abhängigkeit der Ströme von der Spannung an der Zellmembran sowie der Einfluss einer Vorbeladung der Oozyten mit einer Aminosäure der jeweils anderen Gruppe untersucht.

3.2.2.1 Spannungsabhängigkeit

Oozyten, welche den hrBAT Wildtyp exprimierten, wurden nacheinander in Anwesenheit von Natrium mit einer 3 mM Lösung Leucin und einer 1 mM Lösung Arginin umspült und die induzierten Ströme gemessen. Das Haltepotential wurde dabei zwischen -90 mV und -10 mV in Schritten von 20 mV variiert. Sowohl die Reihenfolge der Aminosäuren als auch die der

Haltepotentiale wurde während der Experimente verändert, wobei sich keine Unterschiede in den Ergebnissen zeigten. Der größte durch Arginin ausgelöste Strom wurde bei einem Membranpotential von -90 mV gemessen, während Leucin bei -10 mV den größten Strom auslöste. Daher wurde für Arginin der bei -90 mV und für Leucin der bei -10 mV gemessene Strom gleich 1 gesetzt, die anderen Ströme sind im Verhältnis dazu angegeben:

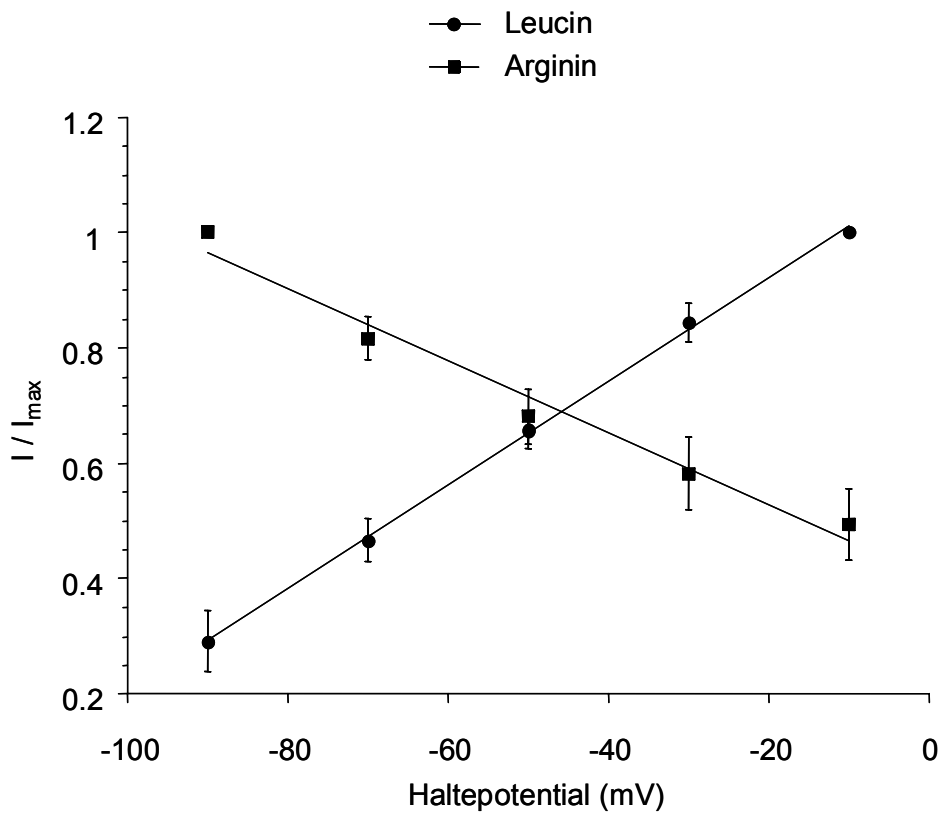
$$(1) \text{ Arginin: } I = \frac{I_{Arg}}{I_{Arg(-90mV)}}$$

$$(2) \text{ Leucin: } I = \frac{I_{Leu}}{I_{Leu(-10mV)}}$$

Tabelle 6: Spannungsabhängigkeit der durch Arginin und Leucin induzierten Ströme (hrBAT Wildtyp, Mittelwerte \pm SEM)

Haltepotential (mV)	I bei 1mM Arginin (n = 4)	I bei 3mM Leucin (n = 4)
-10	0,49 \pm 0.06	1 \pm 0
-30	0,58 \pm 0,06	0,84 \pm 0,03
-50	0,68 \pm 0,05	0,66 \pm 0,03
-70	0,82 \pm 0,04	0,47 \pm 0,04
-90	1 \pm 0	0,29 \pm 0,05

Abbildung 4: Spannungsabhängigkeit der durch Arginin (1 mM) und Leucin (3 mM) induzierten Ströme in hrBAT exprimierenden Oozyten



3.2.2.2 Intrazelluläre Vorbeladung (Transstimulation)

Die heteromeren Aminosäuretransporter sind obligate Austauscher (17). Transport findet daher nur bei sowohl intra- als auch extrazellulärer Anwesenheit von Aminosäuren statt. Dieser Austausch kann durch die Vorbeladung der Oozyten mit einer Aminosäure stimuliert werden, wovon mit elektrophysiologischen Methoden der elektrogene Anteil, der Heteroaustausch, gemessen werden kann. Die Zunahme des durch eine neutrale oder dibasische Aminosäure ausgelösten Stroms nach Vorbeladung mit einer Aminosäure der jeweils anderen Gruppe ist daher ein Maß für die Fähigkeit von rBAT, Heteroaustausch von Aminosäuren zu vermitteln. Um den Effekt einer solchen

Vorbeladung zu untersuchen, wurden die Oozyten in Anwesenheit von Natrium mit Aminosäurelösungen nach folgendem Schema umspült:

Tabelle 7: Vorbeladung mit Arginin

	Aminosäure	Dauer
1.	Arginin	30 s
2.	Leucin	30 s
3.	Arginin	15 min
4.	Leucin	30 s
5.	Arginin	30 s

Tabelle 8: Vorbeladung mit Leucin

	Aminosäure	Dauer
1.	Leucin	30 s
2.	Arginin	30 s
3.	Leucin	15 min
4.	Arginin	30 s
5.	Leucin	30 s

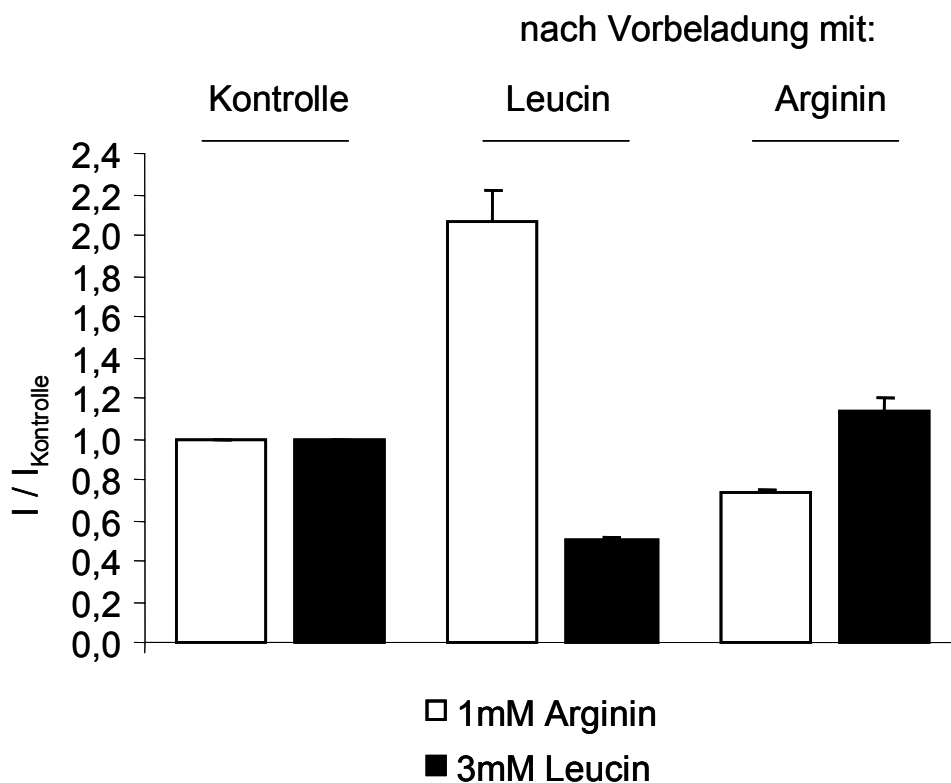
Es wurden 1 mM Arginin- und 3 mM Leucinlösungen verwendet. Die vor der Vorbeladung ermittelten Ströme wurden = 1 gesetzt und die nach der Vorbeladung gemessenen (Kontrolle) im Verhältnis dazu angegeben.

Formel:
$$I = \frac{I}{I_{\text{Kontrolle}}}$$

Bei Vorbeladung mit 1 mM Arginin konnte eine leichte Steigerung des Leucinstromes von $74,1 \pm 4,8$ nA auf $83,5 \pm 2,8$ nA (+ 12,7 %, n = 5) und eine Reduktion des Argininstromes von $-45,2 \pm 5,7$ nA auf $-33,2 \pm 4,4$ nA (- 26,5 %, n = 5) beobachtet werden, die Vorbeladung mit 3 mM Leucin führte zu einer Steigerung des Argininstromes von $-59,8 \pm 8,3$ nA auf $-120,1 \pm 13,9$ nA

(+ 101,0 %, n = 5) und einer Abnahme des Leucinstromes von $74,3 \pm 7,7$ nA auf $36,7 \pm 3,2$ nA (- 50,7 %, n = 5).

Abbildung 5: Durch Superfusion mit Leucin (3 mM) und Arginin (1 mM) induzierte Ströme (hrBAT Wildtyp) vor und nach Beladung der Oozyten mit Arginin oder Leucin



3.2.3 Charakterisierung des Transports einzelner Aminosäuren

Um den Aminosäuretransport durch hrBAT genauer zu charakterisieren, wurden die Affinitäten verschiedener Aminosäuren in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Natrium untersucht. Dabei handelte es sich um die neutralen Aminosäuren Leucin, Phenylalanin, Cystein und Cystin und die kationischen, dibasischen Aminosäuren Arginin, Lysin, Ornithin und Histidin. Histidin liegt bei pH 7.4 teilweise als positiv geladene, protonierte Aminosäure vor und verhält

sich daher elektrophysiologisch wie eine kationische Aminosäure. Für die Experimente mit neutralen Aminosäuren wurden Lösungen der Konzentrationen 3, 10, 30, 100 und 300 μM sowie 1 und 3 mM verwendet. Bei Experimenten mit dibasischen Aminosäuren wurden die gleichen Konzentrationen verwendet, außer der 3 mM Lösung. Stattdessen wurde die geringere Konzentration von 1 μM eingesetzt, da der Transport dieser Aminosäuren durch hrBAT höheraffin ist. Ausnahmen bildeten die Aminosäuren Cystin und Cystein. Für Cystin wurde die Konzentration von 3 mM nicht verwendet, stattdessen jedoch die Konzentration von 1 μM , da es nur in Konzentrationen bis 1 mM löslich war. Den Cystinlösungen wurde zum Schutz vor Reduktion zu Cystein der Reduktionshemmer Diamide in einer Konzentration von 10 mM beigemischt. Oxidation der Cysteinlösungen zu Cystin wurde durch Beimischung des Antioxidans DTE (Dithioerythriol) in einer Konzentration von 1 mM verhindert. Beide Substanzen hatten keinen Einfluss auf den Strom induziert durch andere Aminosäuren. Um zu vermeiden, dass sich neutrale oder dibasische Aminosäuren in der Oozyte anhäufen, die Konzentration der zum Austausch benötigten Aminosäuren der jeweils anderen Gruppe zu sehr abnimmt und dadurch die Messungen beeinflusst werden, wurden neutrale und dibasische Aminosäuren alternierend und in aufsteigenden Konzentrationen getestet. Dabei wurden zuerst Lösungen in ND96 und danach in NMDG verwendet, um an der gleichen Oozyte die induzierten Ströme unter Kontrollbedingungen und unter natriumfreien Bedingungen vergleichen zu können. Die größten Ströme traten in Anwesenheit von Natrium bei der jeweils höchsten Aminosäurekonzentration auf. Diese wurden für jede Aminosäure = 1 gesetzt und die übrigen Ströme im Verhältnis dazu angegeben.

Formel:
$$I = \frac{I}{I_{C_{\max}(ND96)}}$$

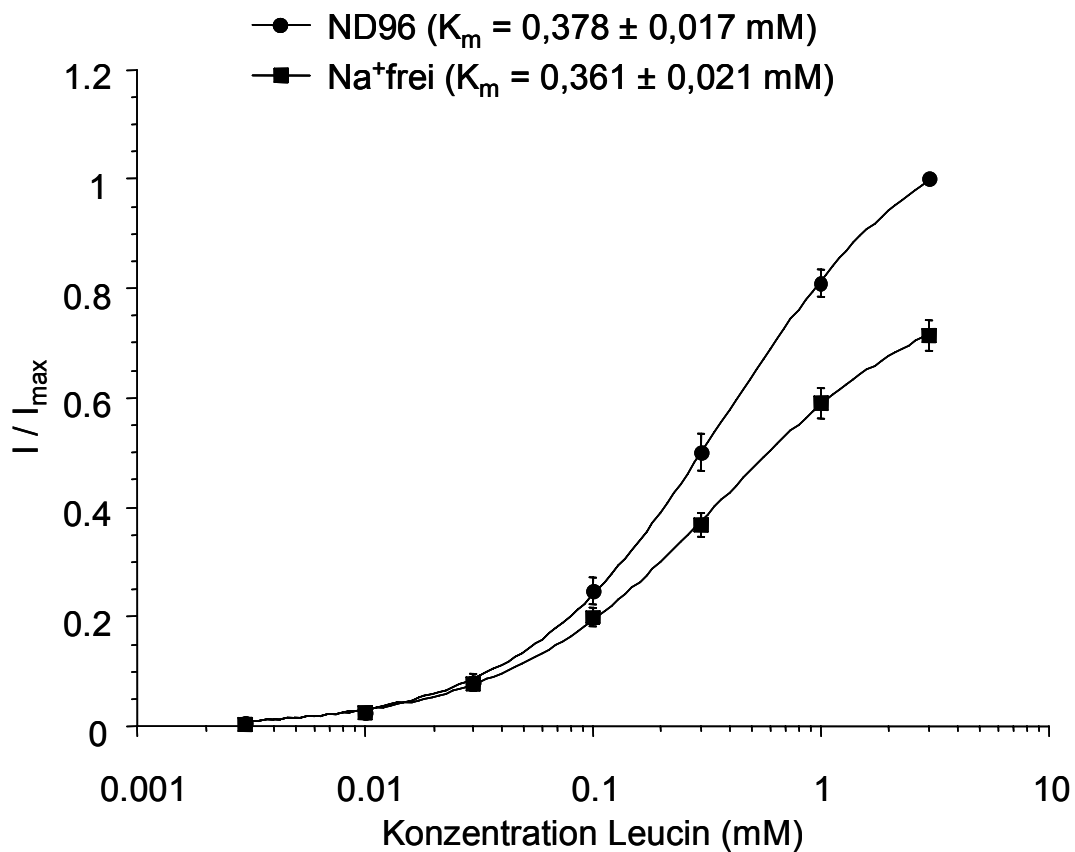
Für alle Versuche wurden die Oozyten auf ein Potential von -50 mV geklemmt, die Konzentration der injizierten cRNA betrug 250 ng/ μl .

3.2.3.1 Neutrale Aminosäuren

a) Leucin

Für Leucin wurde unter Kontrollbedingungen ein K_m -Wert von $0,378 \pm 0,017$ mM und unter natriumfreien Bedingungen ein K_m -Wert von $0,361 \pm 0,021$ mM ermittelt ($n = 10$, Hillkoeffizient: 1). Der Unterschied zwischen den K_m -Werten war statistisch nicht signifikant.

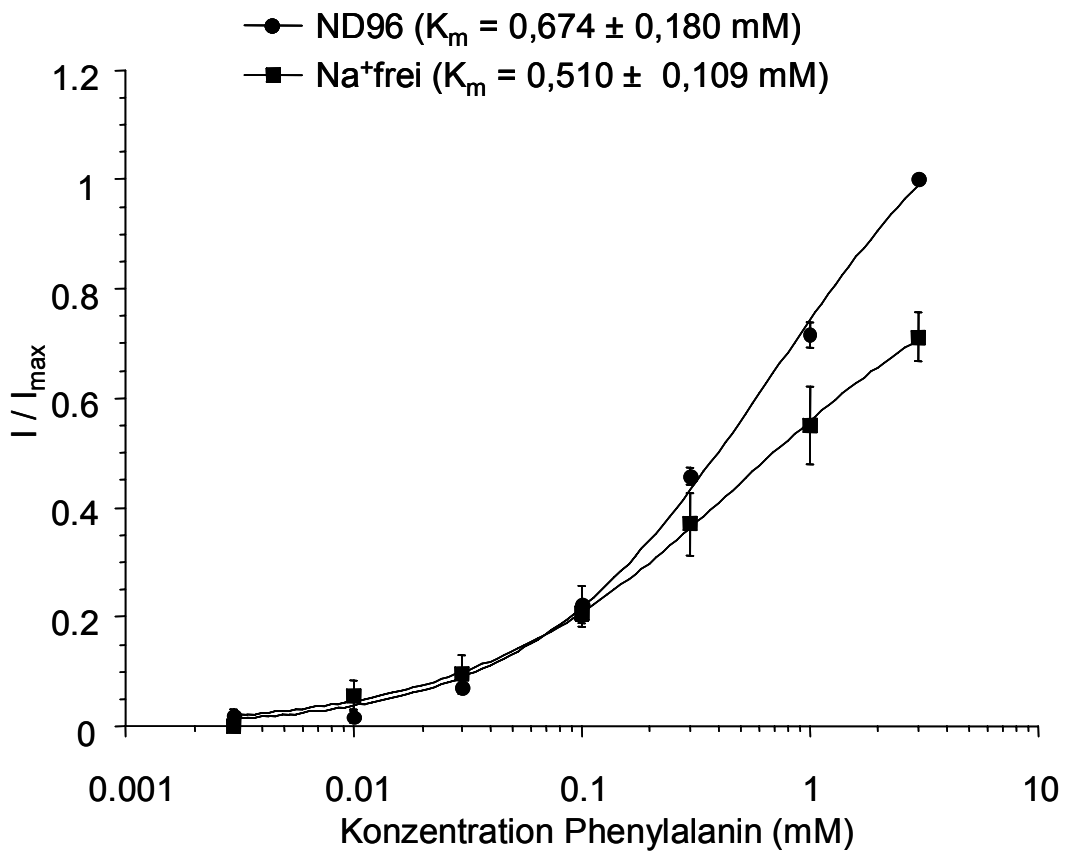
Abbildung 6: Leucin induzierte Ströme in hrBAT Wildtyp exprimierenden Oozyten.



b) Phenylalanin

Für Phenylalanin wurde unter Kontrollbedingungen ein K_m -Wert von $0,674 \pm 0,180$ mM und unter natriumfreien Bedingungen ein K_m -Wert von $0,510 \pm 0,109$ mM ermittelt ($n = 5$, Hillkoeffizient: 1). Der Unterschied zwischen den K_m -Werten war statistisch nicht signifikant.

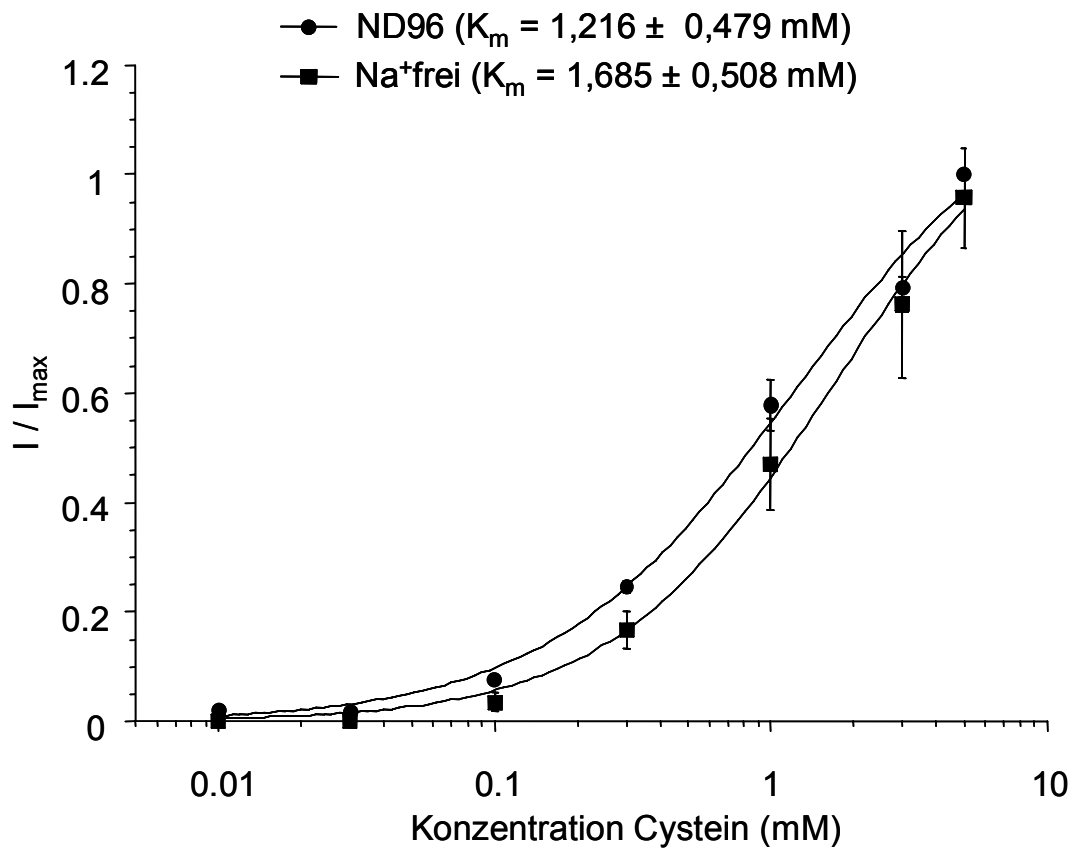
Abbildung 7: Phenylalanin induzierte Ströme in hrBAT Wildtyp exprimierenden Oozyten.



c) Cystein

Für Cystein wurde unter Kontrollbedingungen ein K_m -Wert von $1,216 \pm 0,479$ mM und unter natriumfreien Bedingungen ein K_m -Wert von $1,685 \pm 0,508$ mM ermittelt ($n = 5$, Hillkoeffizient: 1). Der Unterschied zwischen den K_m -Werten war statistisch nicht signifikant.

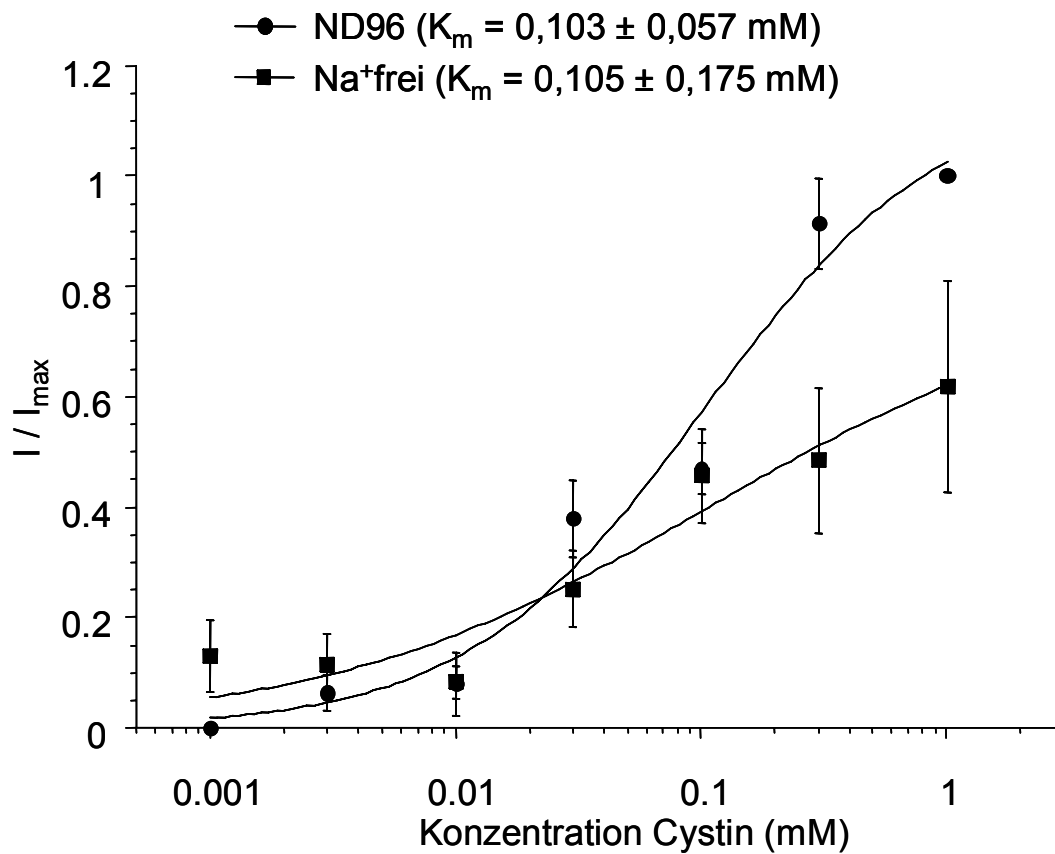
Abbildung 8: Cystein induzierte Ströme in hrBAT Wildtyp exprimierenden Oozyten.



d) Cystin

Für Cystin wurde unter Kontrollbedingungen ein K_m -Wert von $0,103 \pm 0,057$ mM und unter natriumfreien Bedingungen ein K_m -Wert von $0,105 \pm 0,175$ mM ermittelt ($n = 3$, Hillkoeffizient: 1). Der Unterschied zwischen den K_m -Werten war statistisch nicht signifikant.

Abbildung 9: Cystin induzierte Ströme in hrBAT Wildtyp exprimierenden Oozyten.

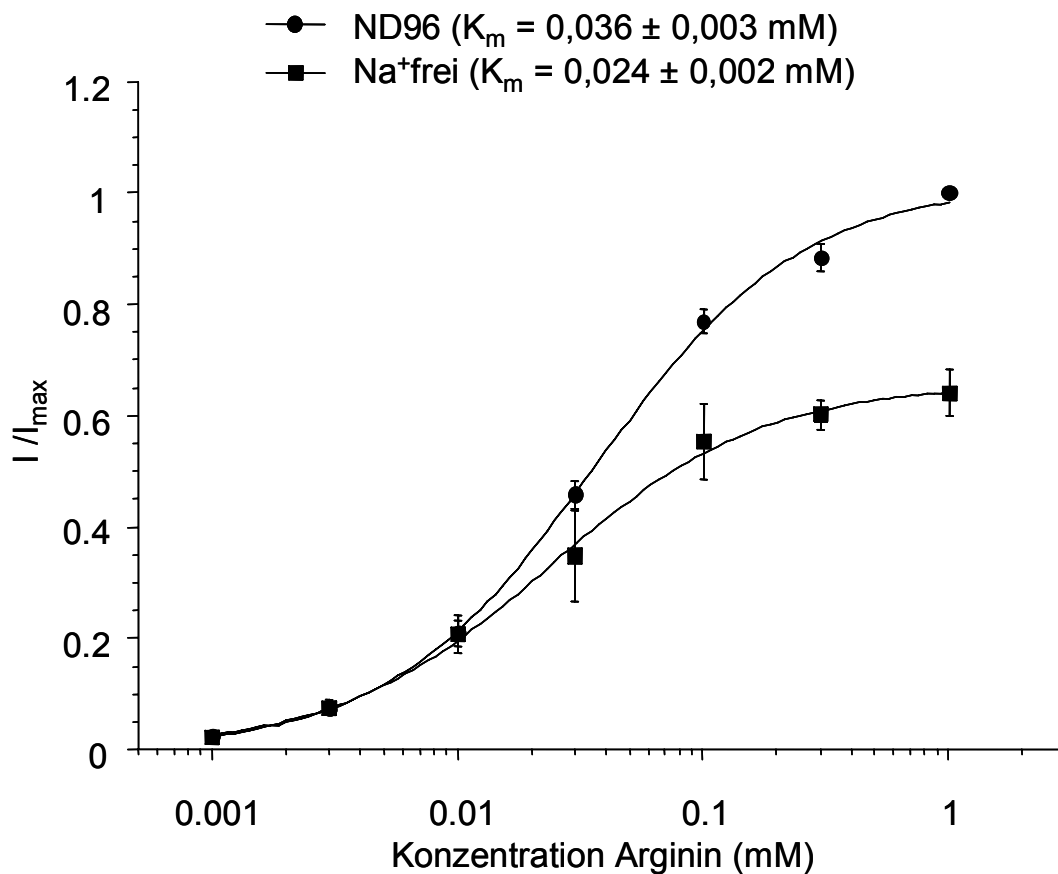


3.2.3.2 Dibasische Aminosäuren

a) Arginin

Für Arginin wurde unter Kontrollbedingungen ein K_m -Wert von $0,036 \pm 0,003$ mM und unter natriumfreien Bedingungen ein K_m -Wert von $0,024 \pm 0,002$ mM ermittelt ($n = 5$, Hillkoeffizient: 1). Der Unterschied zwischen den K_m -Werten war statistisch nicht signifikant.

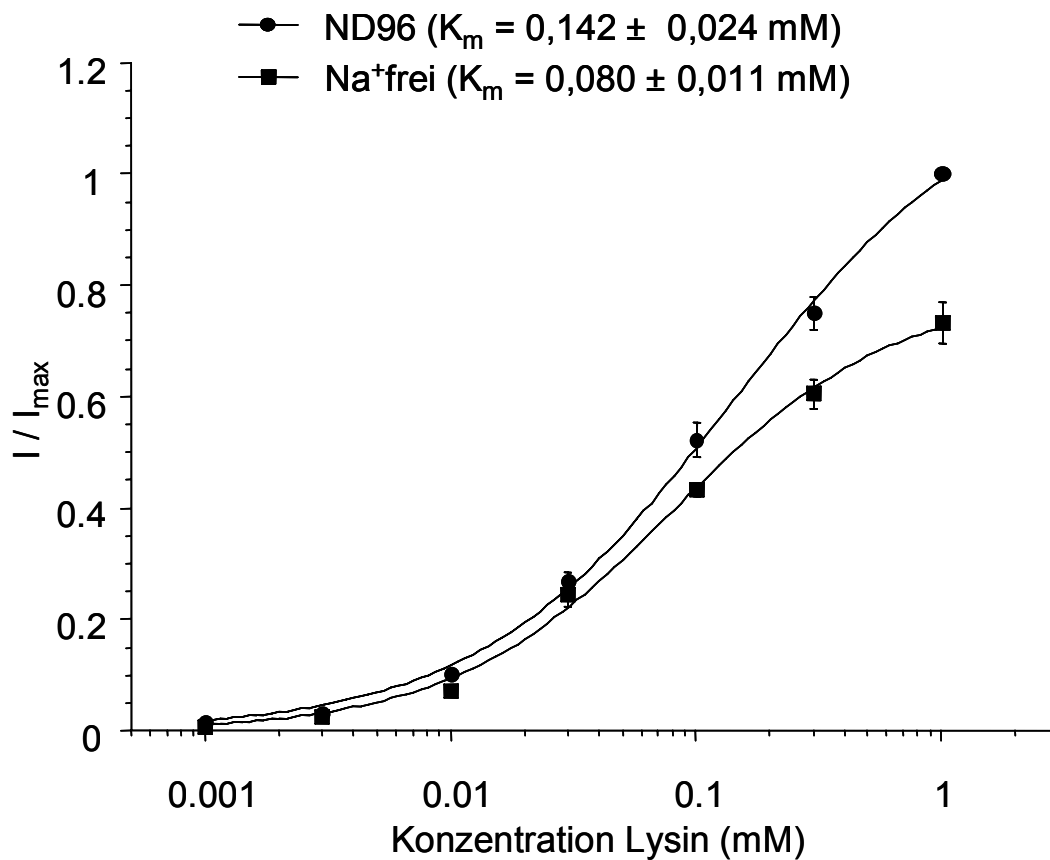
Abbildung 10: Arginin induzierte Ströme in hrBAT Wildtyp exprimierenden Oozyten.



b) Lysin

Für Lysin wurde unter Kontrollbedingungen ein K_m -Wert von $0,142 \pm 0,024$ mM und unter natriumfreien Bedingungen ein K_m -Wert von $0,080 \pm 0,011$ mM ermittelt ($n = 5$, Hillkoeffizient: 1). Der Unterschied zwischen den K_m -Werten war statistisch nicht signifikant.

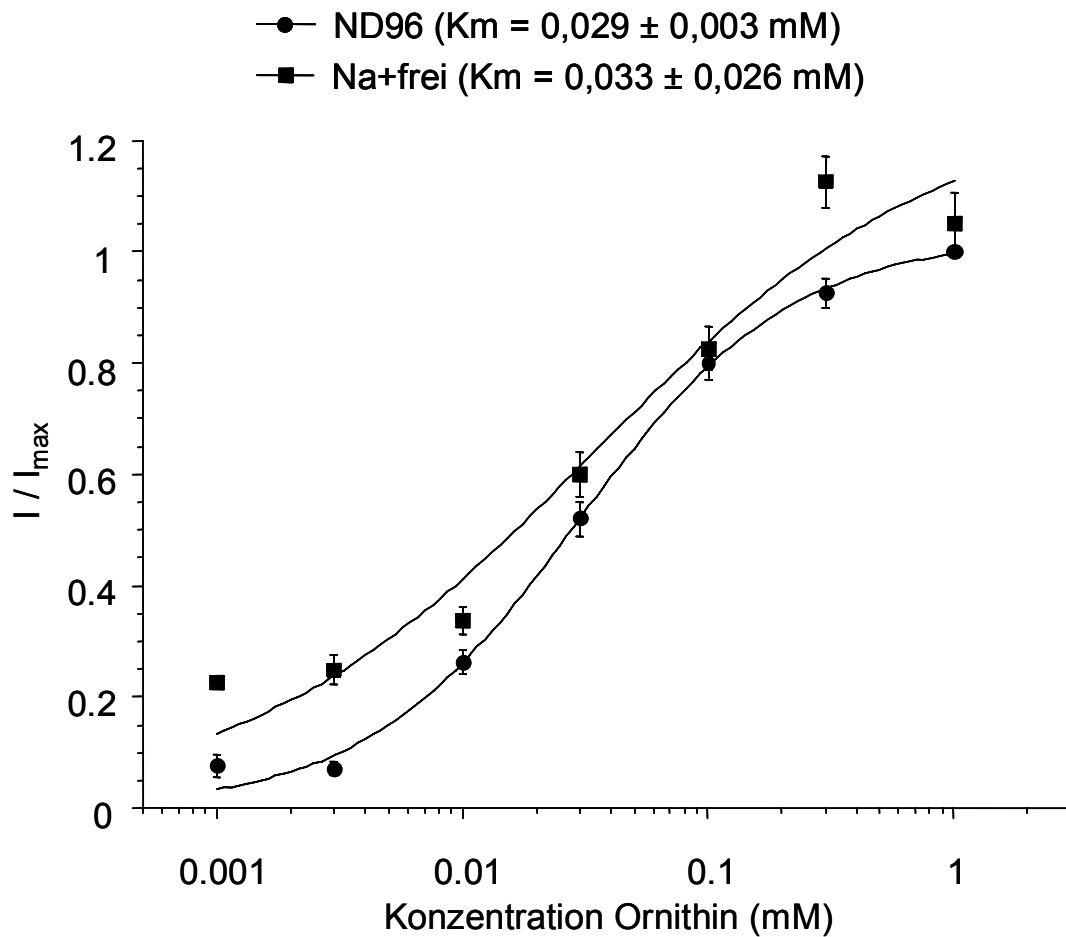
Abbildung 11: Lysin induzierte Ströme in hrBAT Wildtyp exprimierenden Oozyten.



c) Ornithin

Für Ornithin wurde unter Kontrollbedingungen ein K_m -Wert von $0,029 \pm 0,003$ mM und unter natriumfreien Bedingungen ein K_m -Wert von $0,033 \pm 0,026$ mM ermittelt ($n = 5$, Hillkoeffizient: 1). Der Unterschied zwischen den K_m -Werten war statistisch nicht signifikant.

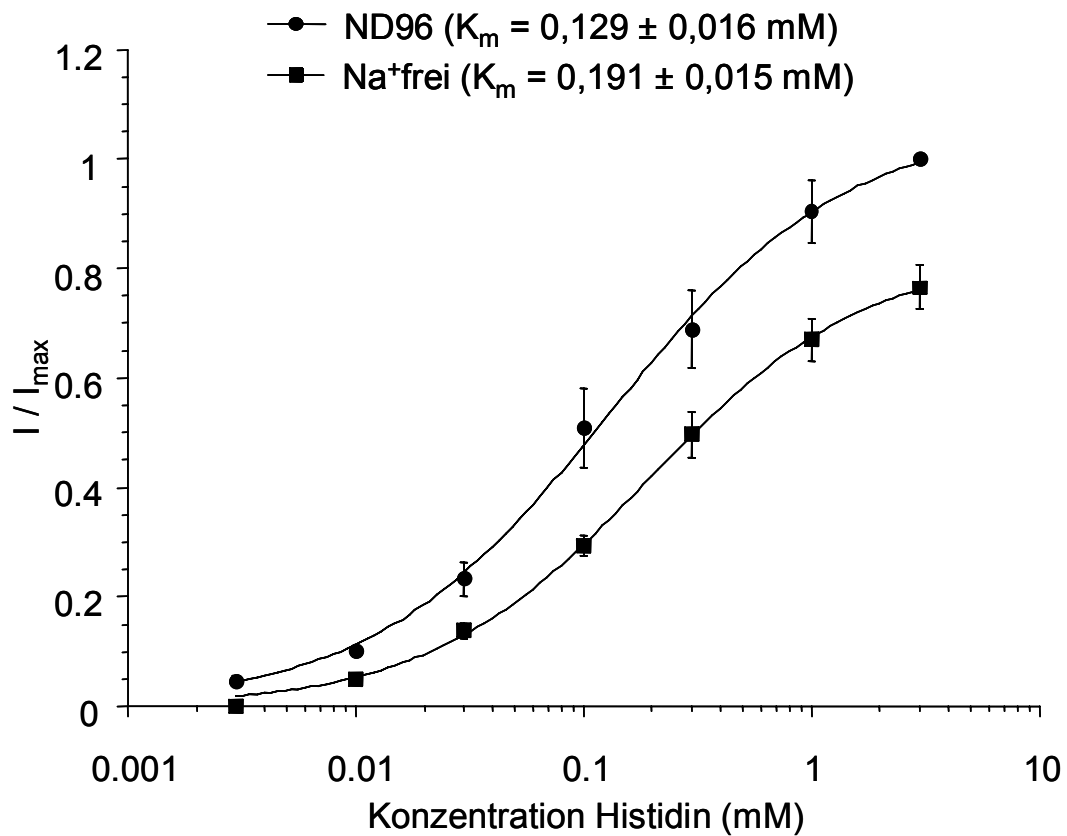
Abbildung 12: Ornithin induzierte Ströme in hrBAT Wildtyp exprimierenden Oozyten.



d) Histidin

Für Histidin wurde unter Kontrollbedingungen ein K_m -Wert von $0,129 \pm 0,016$ mM und unter natriumfreien Bedingungen ein K_m -Wert von $0,191 \pm 0,015$ mM ermittelt ($n = 3$, Hillkoeffizient: 1). Der Unterschied zwischen den K_m -Werten war statistisch nicht signifikant.

Abbildung 13: Histidin induzierte Ströme in hrBAT Wildtyp exprimierenden Oozyten.



3.3 Eigenschaften der hrBAT-Mutation T216M

3.3.1 Charakterisierung der Austauschfunktion

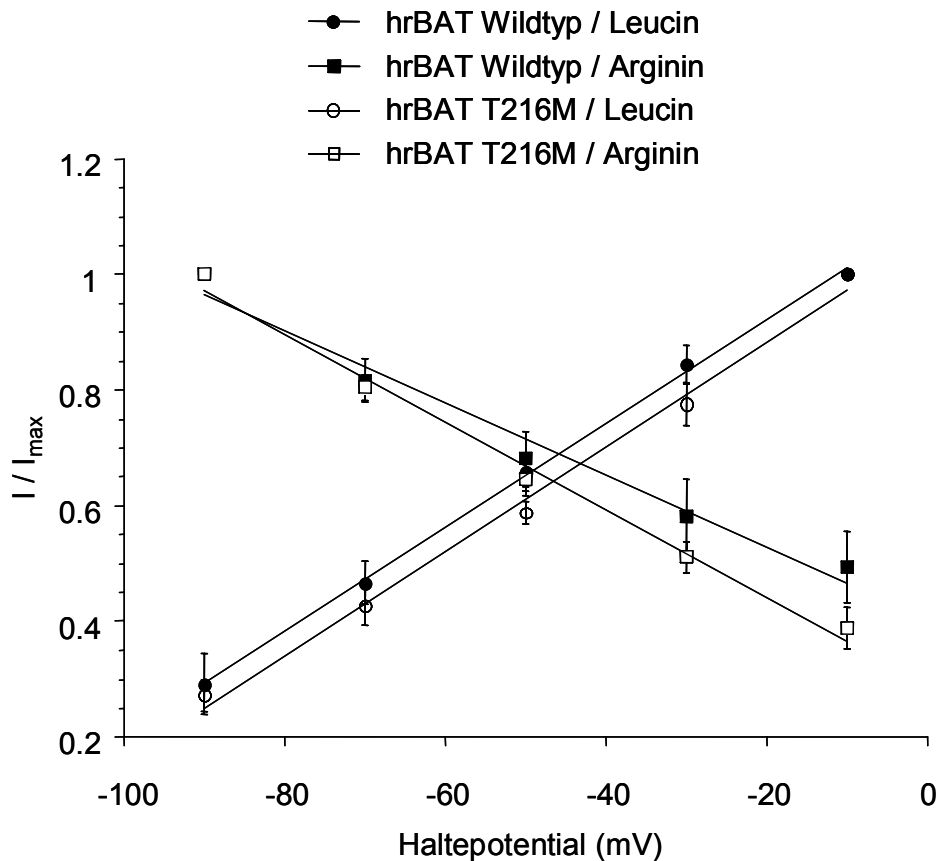
3.3.1.1 Spannungsabhängigkeit

Versuchsdurchführung und Auswertung der Ergebnisse erfolgten wie in Kapitel 3.2.2.1. beschrieben. Hier wurden jedoch Oozyten verwendet, die die hrBAT Mutante T126M exprimierten.

Tabelle 9: Spannungsabhängigkeit der durch Arginin und Leucin induzierten Ströme (hrBAT T216M, Mittelwerte \pm SEM)

Haltepotential (mV)	I bei 1mM Arginin (n = 4)	I bei 3mM Leucin (n = 4)
-10	0,39 \pm 0,04	1 \pm 0
-30	0,51 \pm 0,03	0,78 \pm 0,04
-50	0,65 \pm 0,03	0,59 \pm 0,02
-70	0,80 \pm 0,02	0,43 \pm 0,03
-90	1 \pm 0	0,27 \pm 0,03

Abbildung 14: Spannungsabhängigkeit der durch Arginin und Leucin induzierten Ströme. Die Messung des hrBAT Wildtyps ist zum Vergleich dargestellt. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied gefunden werden.



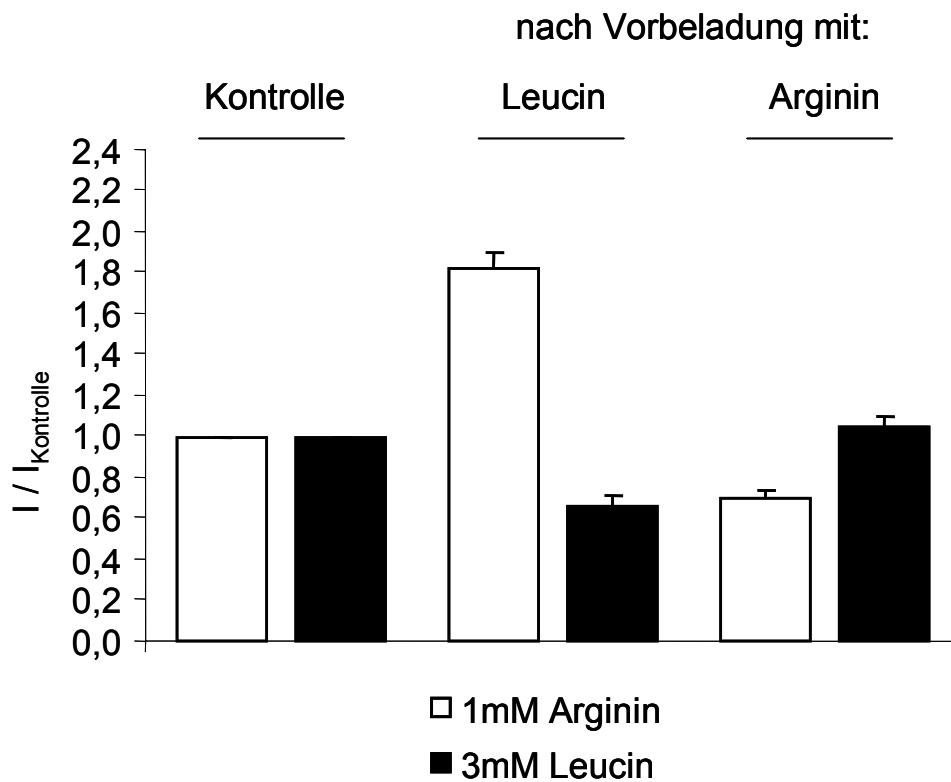
3.3.1.2 Intrazelluläre Vorbeladung (Transstimulation)

Die in Kapitel 3.2.2.2. beschriebene Versuchsdurchführung der intrazellulären Vorbeladung mit Aminosäuren wurde auf Oozyten angewandt, die die hrBAT Mutation T216M exprimierten.

Bei Vorbeladung mit 1 mM Arginin konnte eine leichte Steigerung des Leucinstromes von $47,1 \pm 6,8$ nA auf $50,7 \pm 10,1$ nA (+ 7,7%, n = 5) und eine Reduktion des Argininstromes von $-24,8 \pm 4,5$ nA auf $-17,2 \pm 2,8$ nA (- 30,6%, n = 5) beobachtet werden, die Vorbeladung mit 3 mM Leucin führte zu einer

Steigerung des Argininstromes von $-31,1 \pm 3,8$ nA auf $-57,3 \pm 8,0$ nA (+ 84,5%, n = 5) und einer Abnahme des Leucinstromes von $47,2 \pm 5,9$ nA auf $30,0 \pm 2,7$ nA (- 36,4%, n = 5). Es zeigte sich kein Unterschied zu Oozyten, die hrBAT Wildtyp exprimierten.

Abbildung 15: Durch Superfusion mit Leucin (3 mM) und Arginin (1 mM) induzierte Ströme in hrBAT T216M exprimierenden Oozyten



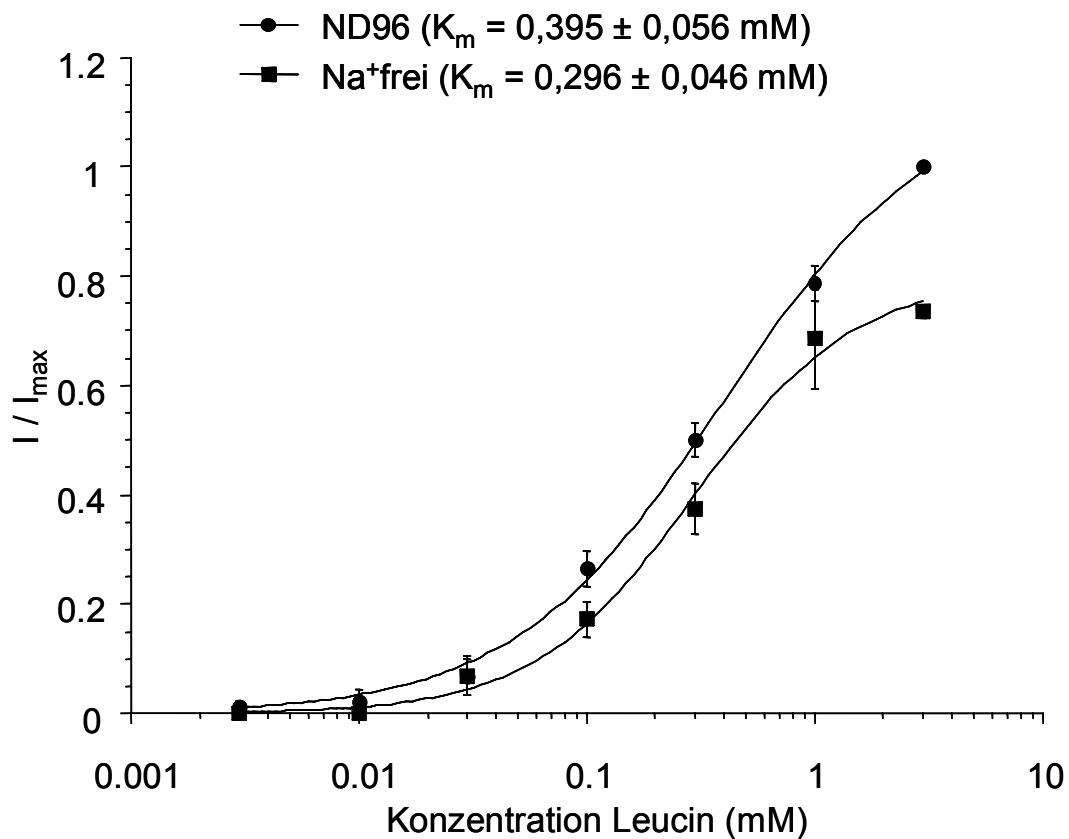
3.3.2 Charakterisierung des Transports einzelner Aminosäuren durch die hrBAT Mutation T216M

3.3.2.1 Neutrale Aminosäuren

a) Leucin

Für Leucin wurde unter Kontrollbedingungen ein K_m -Wert von $0,395 \pm 0,056$ mM und unter natriumfreien Bedingungen ein K_m -Wert von $0,296 \pm 0,046$ mM ermittelt ($n = 4$, Hillkoeffizient: 1). Der Unterschied zwischen den K_m -Werten war statistisch nicht signifikant.

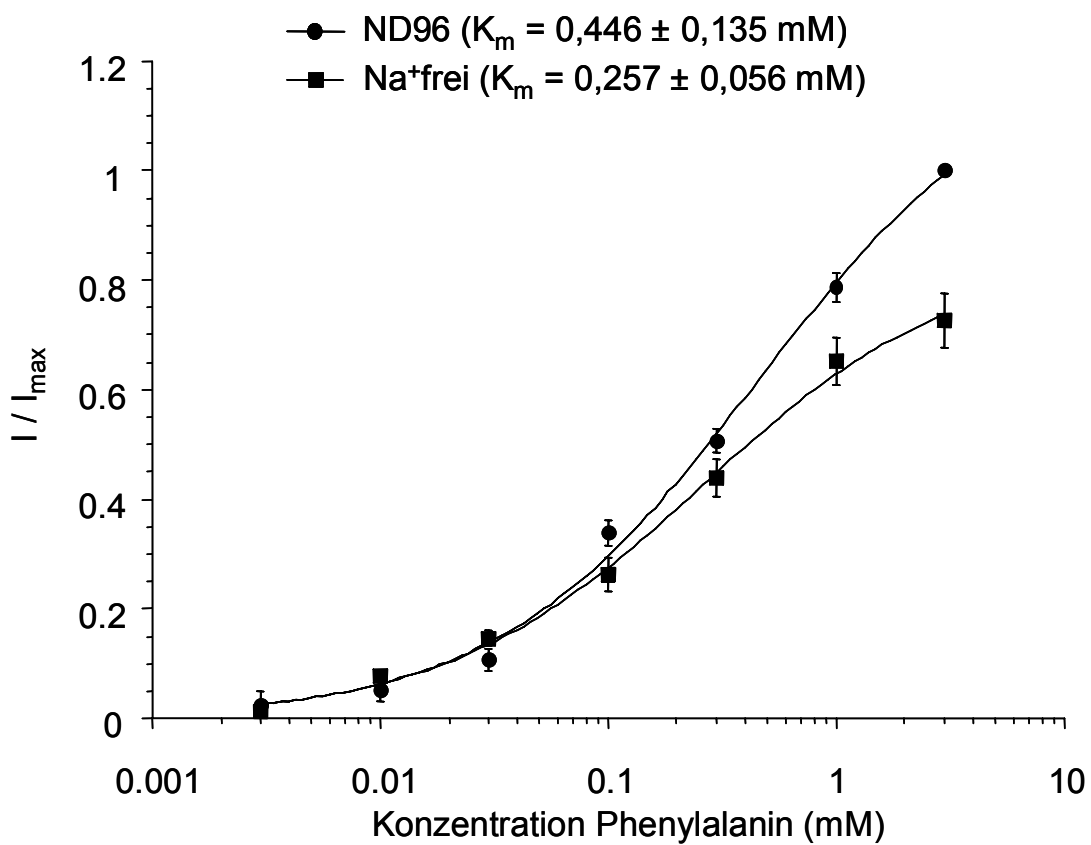
Abbildung 16: Leucin induzierte Ströme in hrBAT T216M exprimierenden Oozyten.



b) Phenylalanin

Für Phenylalanin wurde unter Kontrollbedingungen ein K_m -Wert von $0,446 \pm 0,135$ mM und unter natriumfreien Bedingungen ein K_m -Wert von $0,257 \pm 0,056$ mM ermittelt ($n = 5$, Hillkoeffizient: 1). Der Unterschied zwischen den K_m -Werten war statistisch nicht signifikant.

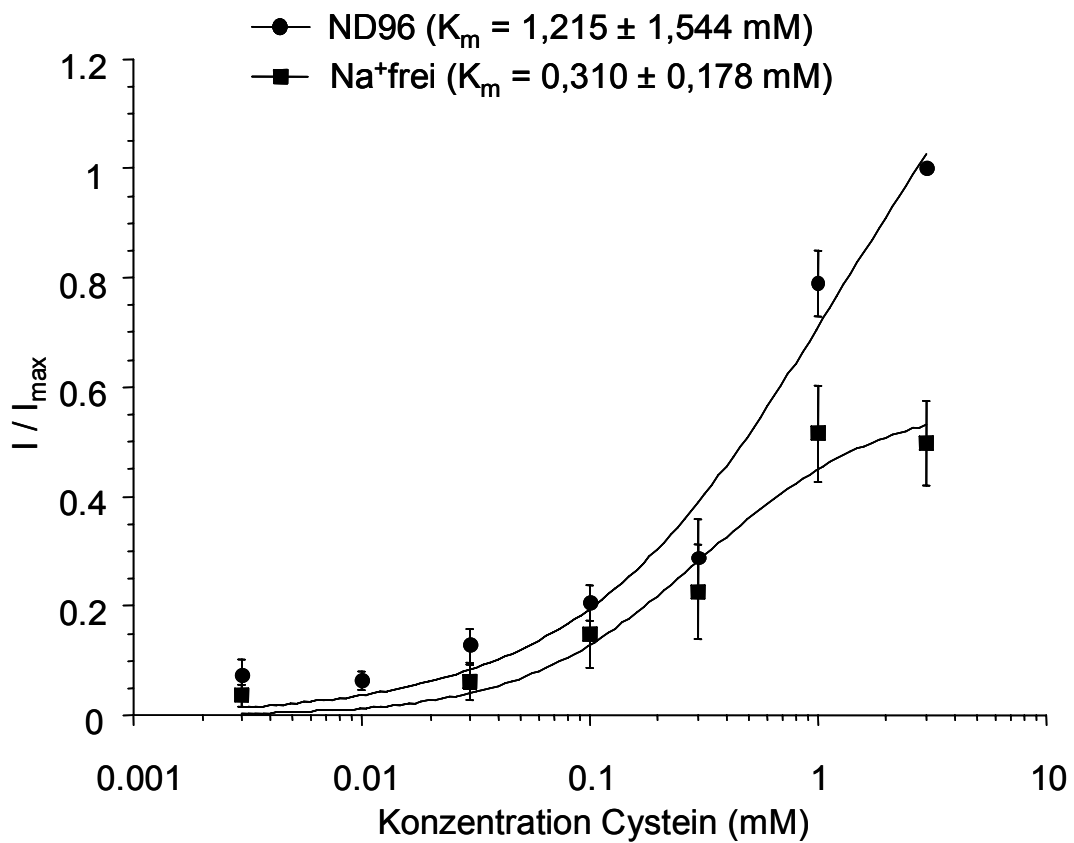
Abbildung 17: Phenylalanin induzierte Ströme in hrBAT T216M exprimierenden Oozyten.



c) Cystein

Für Cystein wurde unter Kontrollbedingungen ein K_m -Wert von $1,215 \pm 1,544$ mM und unter natriumfreien Bedingungen ein K_m -Wert von $0,310 \pm 0,178$ mM ermittelt ($n = 5$, Hillkoeffizient: 1). Der Unterschied zwischen den K_m -Werten war statistisch nicht signifikant.

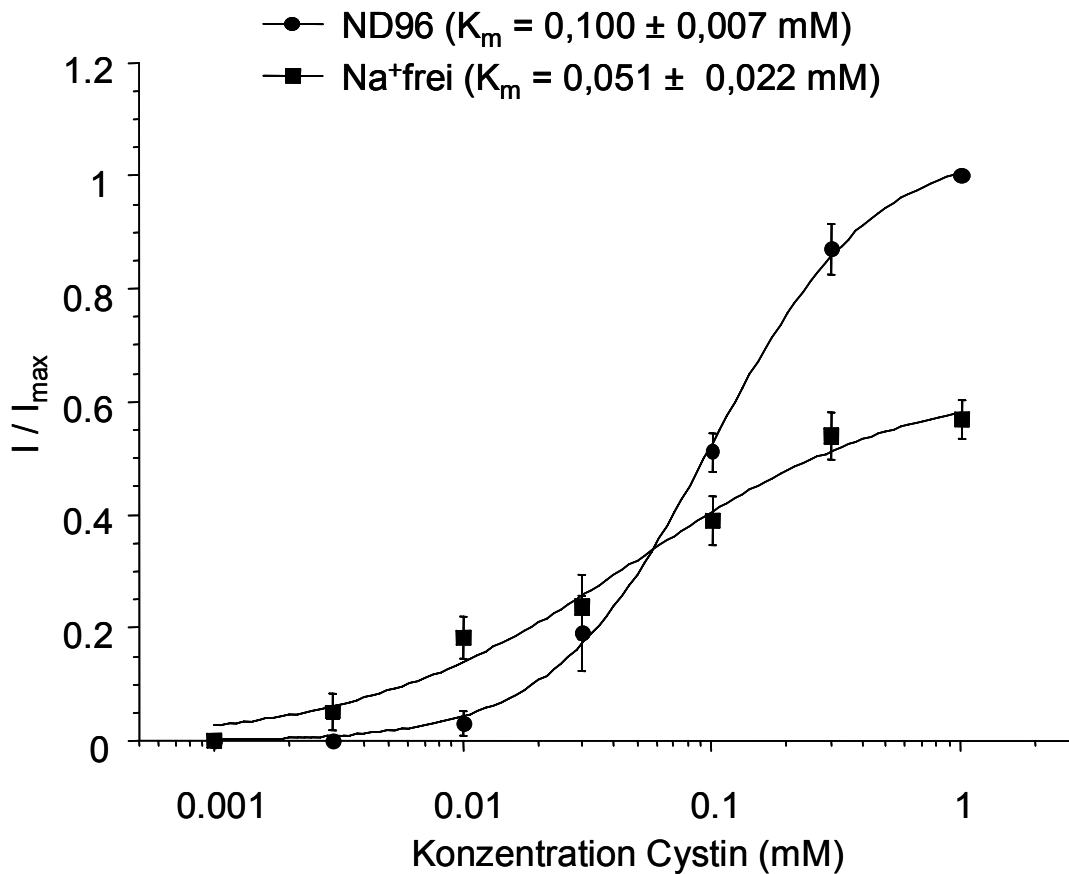
Abbildung 18: Cystein induzierte Ströme in hrBAT T216M exprimierenden Oozyten.



d) Cystin

Für Cystin wurde unter Kontrollbedingungen ein K_m -Wert von $0,100 \pm 0,007$ mM und unter natriumfreien Bedingungen ein K_m -Wert von $0,051 \pm 0,022$ mM ermittelt ($n = 5$, Hillkoeffizient: 1). Der Unterschied zwischen den K_m -Werten war statistisch nicht signifikant.

Abbildung 19: Cystin induzierte Ströme in hrBAT T216M exprimierenden Oozyten.

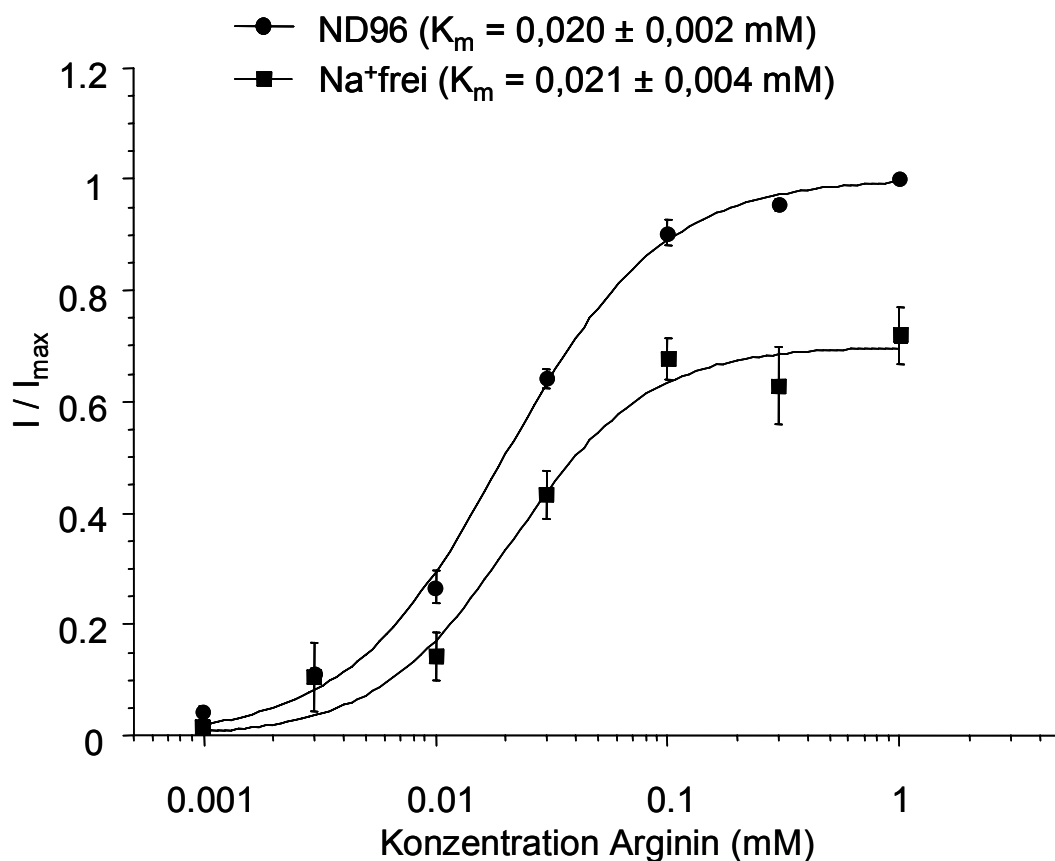


3.3.2.2 Dibasische Aminosäuren

a) Arginin

Für Arginin wurde unter Kontrollbedingungen ein K_m -Wert von $0,020 \pm 0,002$ mM und unter natriumfreien Bedingungen ein K_m -Wert von $0,021 \pm 0,004$ mM ermittelt ($n = 4$, Hillkoeffizient: 1). Der Unterschied zwischen den K_m -Werten war statistisch nicht signifikant.

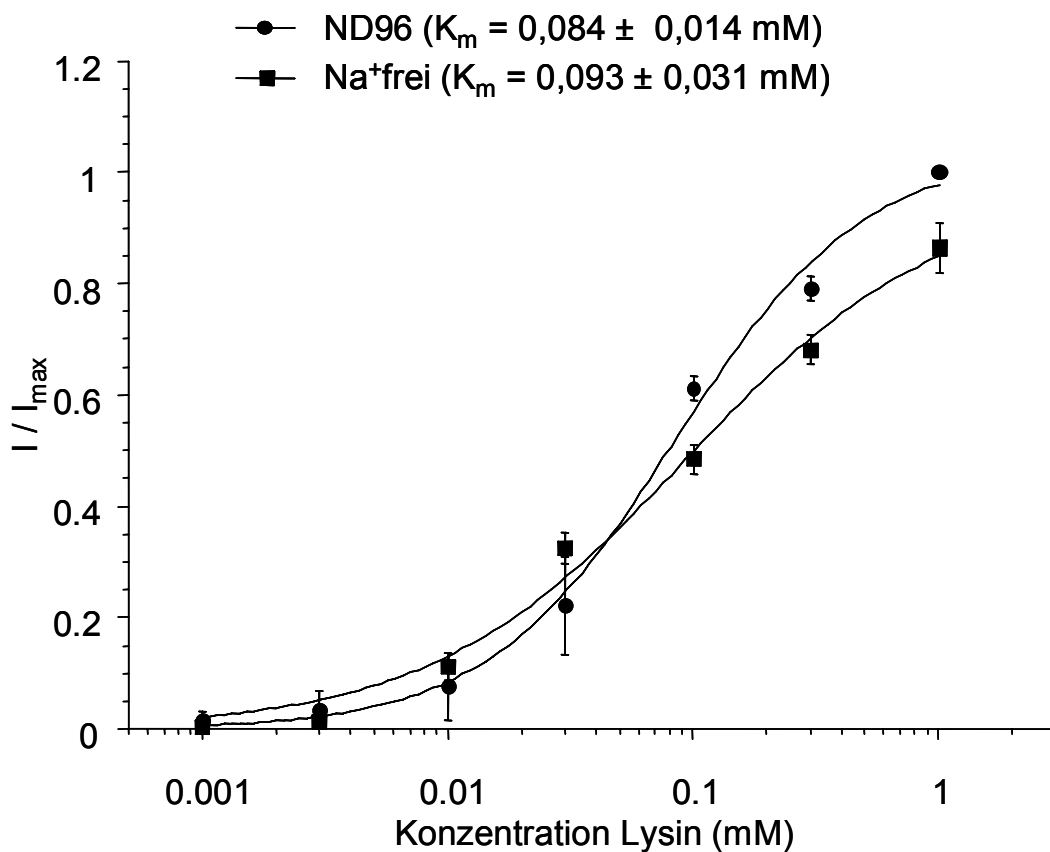
Abbildung 20: Arginin induzierte Ströme in hrBAT T216M exprimierenden Oozyten.



b) Lysin

Für Lysin wurde unter Kontrollbedingungen ein K_m -Wert von $0,084 \pm 0,014$ mM und unter natriumfreien Bedingungen ein K_m -Wert von $0,093 \pm 0,031$ mM ermittelt ($n = 5$, Hillkoeffizient: 1). Der Unterschied zwischen den K_m -Werten war statistisch nicht signifikant.

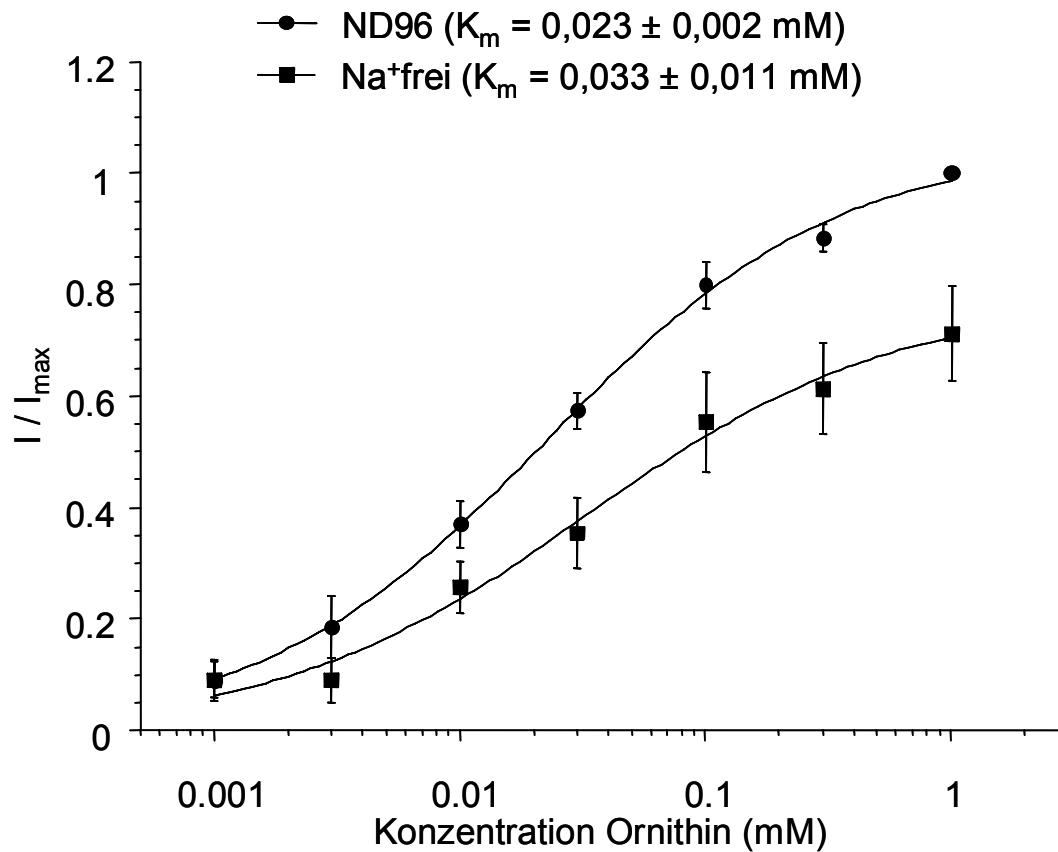
Abbildung 21: Lysin induzierte Ströme in hrBAT T216M exprimierenden Oozyten.



c) Ornithin

Für Ornithin wurde unter Kontrollbedingungen ein K_m -Wert von $0,023 \pm 0,002$ mM und unter natriumfreien Bedingungen ein K_m -Wert von $0,033 \pm 0,011$ mM ermittelt ($n = 5$, Hillkoeffizient: 1). Der Unterschied zwischen den K_m -Werten war statistisch nicht signifikant.

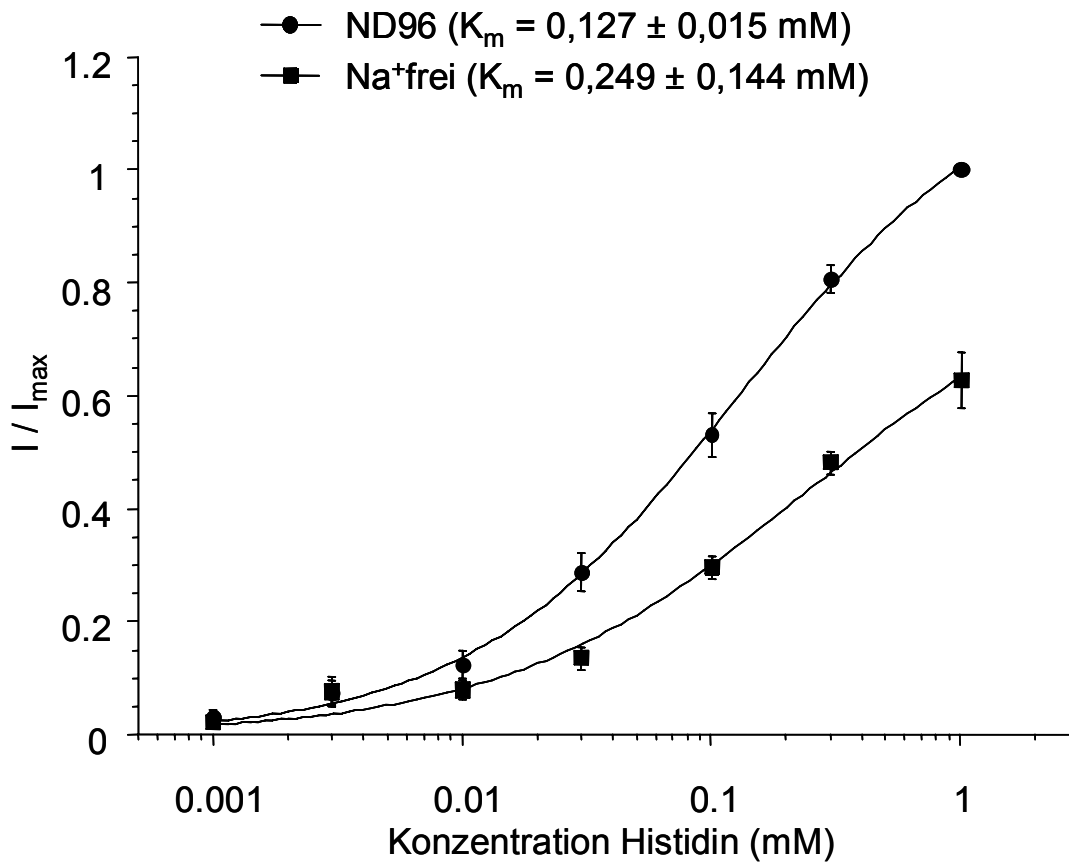
Abbildung 22: Ornithin induzierte Ströme in hrBAT T216M exprimierenden Oozyten.



d) Histidin

Für Histidin wurde unter Kontrollbedingungen ein K_m -Wert von $0,127 \pm 0,015$ mM und unter natriumfreien Bedingungen ein K_m -Wert von $0,249 \pm 0,144$ mM ermittelt ($n = 5$, Hillkoeffizient: 1). Der Unterschied zwischen den K_m -Werten war statistisch nicht signifikant.

Abbildung 23: Histidin induzierte Ströme in hrBAT T216M exprimierenden Oozyten.



3.4 Trafficking und Expression des hrBAT Wildtyps und der Mutation T216M

Bei einigen rBAT-Mutationen, darunter die am häufigsten vorkommende Mutation, die zum Austausch von Methionin an Position 467 führt, ließ sich die Pathophysiologie durch ein gestörtes Trafficking erklären, wodurch das mutierte Protein nur in vermindertem Ausmaß an der Zellmembran exprimiert wird (18, 22, 74). Zum Teil konnte durch Injektion größerer Mengen an cRNA oder eine längere Expressionsdauer die Expression gesteigert werden. Der Grund hierfür wurde in einer Übersättigung der intrazellulären Qualitätskontrolle im endoplasmatischen Retikulum vermutet, wodurch nicht mehr die gesamte Menge des mutierten Proteins intrazellulär zurückgehalten wird (22).

Um die Expression der hrBAT Mutation T216M im Vergleich zum Wildtyp weiter zu untersuchen, wurde der zeitliche Verlauf der induzierbaren Ströme nach Injektion der cRNA in die Oozyten beobachtet. Hierbei wurden bei der Mutation T216M im Vergleich zum Wildtyp deutlich niedrigere Absolutströme gemessen. Wenn hohe cRNA-Mengen injiziert wurden, zeigten sich jedoch ähnliche Affinitäten und Maximalströme wie beim Wildtyp, wie in den Kapiteln 3.2.3 und 3.3.2 gezeigt. Die beobachteten niedrigeren Absolutströme lassen sich also nicht durch einen funktionell inaktiven Transporter erklären, sondern vorwiegend durch eine geringere Expression. Daher wurde der Einfluss der je Oozyte injizierten Menge an cRNA auf den induzierten Strom und somit die Expression untersucht.

3.4.1 Expressionszeitverlauf

Um den zeitlichen Verlauf der Expression zu untersuchen, wurden Oozyten derselben Präparation an den Tagen 3, 4, 5 und 6 nach cRNA-Injektion (80 ng/ μ l) mit Lösungen von 1 mM Arginin und 3 mM Leucin je 30 s umspült und bei einem Haltepotential von -50 mV die induzierten Ströme gemessen.

Tabelle 10: Expressionsverlauf der durch 1 mM Arginin und 3 mM Leucin induzierten Ströme des hrBAT Wildtyps und der Mutation T216M für Tag 3-6 nach cRNA-Injektion (80 ng/μl), (Mittelwerte ± SEM, n = 4)

Tag	hrBAT Wildtyp (n = 4)		hrBAT T216M (n = 4)	
	1 mM Arginin	3 mM Leucin	1 mM Arginin	3 mM Leucin
3	-33,6 ± 2,4 nA	19,3 ± 2,4 nA	-4,8 ± 0,6 nA	2,1 ± 0,6 nA
4	-36,3 ± 1,6 nA	22,5 ± 1,6 nA	-8,5 ± 1,1 nA	6,8 ± 1,1 nA
5	-40,1 ± 5,3 nA	25,0 ± 1,4 nA	-10,6 ± 3,0 nA	4,9 ± 2,0 nA
6	-46,5 ± 3,6 nA	28,7 ± 3,1 nA	-11,5 ± 1,8 nA	4,9 ± 0,8 nA

Die Werte für alle Tage waren signifikant unterschiedlich zwischen hrBAT Wildtyp und hrBAT T216M. Zusätzlich wurde das Experiment mit Oozyten wiederholt, in die cRNA mit einer Konzentration von 250 ng/μl injiziert wurde.

Tabelle 11: Expressionsverlauf der durch 1 mM Arginin und 3 mM Leucin induzierten Ströme der Mutation T216M für Tag 3-6 nach cRNA-Injektion (250 ng/μl), (Mittelwerte ± SEM, n = 4)

Tag	hrBAT T216M (n = 4)	
	1 mM Arginin	3 mM Leucin
3	-11,6 ± 2,8 nA	7,8 ± 2,7 nA
4	-22,0 ± 5,0 nA	14,1 ± 3,1 nA
5	-24,8 ± 1,7 nA	19,1 ± 3,4 nA
6	-26,9 ± 3,4 nA	19,0 ± 2,3 nA

Abbildung 24: Expressionsverlauf der durch 1mM Arginin induzierten Ströme (in nA) des hrBAT Wildtyps und der Mutation T216M für Tag 3-6 nach cRNA-Injektion

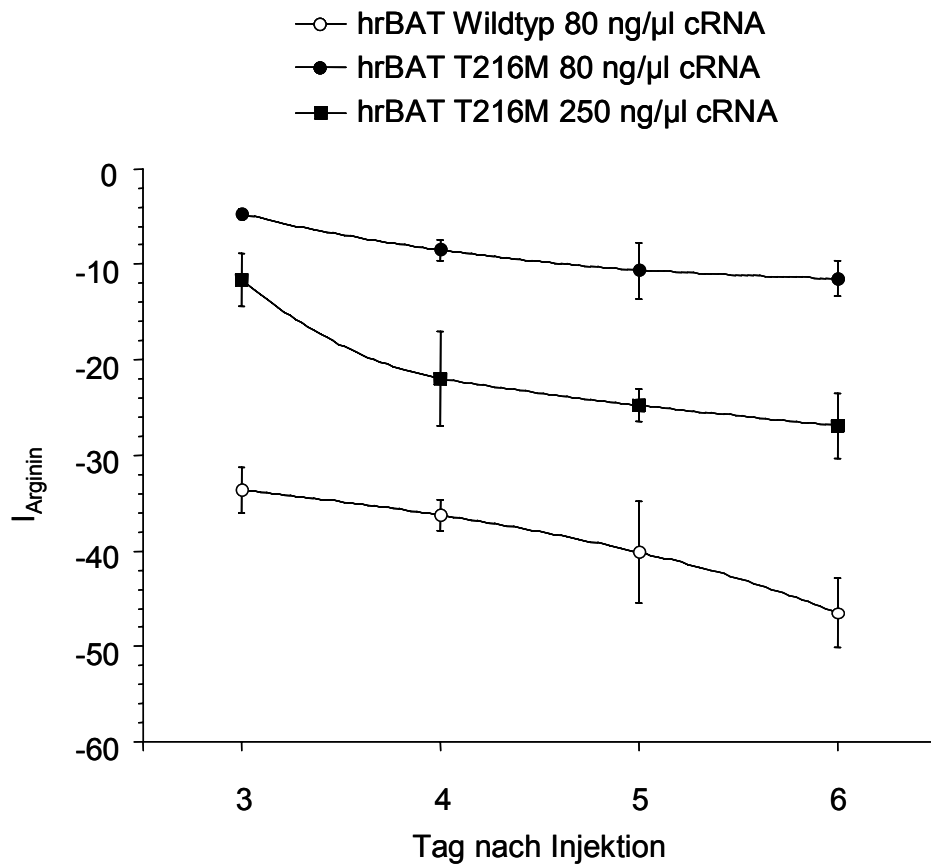
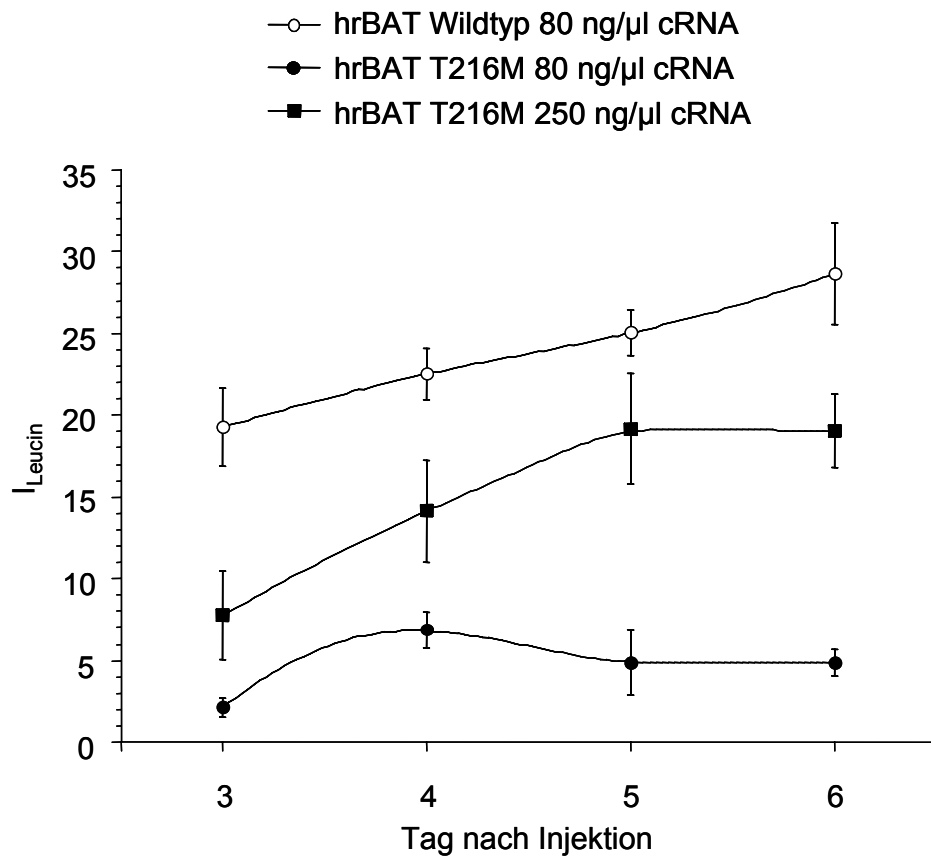


Abbildung 25: Expressionsverlauf der durch 3 mM Leucin induzierten Ströme (in nA) des hrBAT Wildtyps und der Mutation T216M für Tag 3-6 nach cRNA-Injektion



3.4.2 Abhängigkeit der Expression von der injizierten cRNA-Menge

Oozyten, in die 3, 10 oder 30 ng cRNA injiziert worden war, wurden am 4. Tag nach Injektion jeweils für 30 s mit einer 1 mM Lösung Arginin und einer 3 mM Lösung Leucin umspült und bei einem Haltepotential von -50 mV die induzierten Ströme gemessen. Während die Arginin und Leucin induzierten Ströme in Oozyten mit hrBAT Wildtyp Expression schon bei 3 ng cRNA/Oozyte maximale Werte erreichten, war dies erst bei 10 ng cRNA/Oozyte für die hrBAT T216M Mutante der Fall. Die Ströme für Arginin und Leucin waren signifikant unterschiedlich in Oozyten, die mit 3 ng cRNA/Oozyte hrBAT Wildtyp oder hrBAT T216M injiziert worden waren. Für die beiden höheren cRNA Mengen (10 und 30 ng/Oozyte) wurde kein signifikanter Unterschied gefunden.

Tabelle 12: Durch 1 mM Arginin und 3 mM Leucin induzierte Ströme des hrBAT Wildtyps sowie der Mutation T216M in Abhängigkeit von der injizierten cRNA-Menge (Mittelwerte SEM, n = 5)

cRNA	hrBAT Wildtyp (n = 5)		hrBAT T216M (n = 5)	
	1 mM Arginin	3 mM Leucin	1 mM Arginin	3 mM Leucin
3 ng	-43,9 ± 8,9 nA	40,9 ± 7,0 nA	-31,2 ± 4,4 nA	23,1 ± 3,7 nA
10 ng	-42,6 ± 4,9 nA	31,6 ± 5,3 nA	-48,9 ± 4,3 nA	37,1 ± 3,9 nA
30 ng	-52,1 ± 1,4 nA	37,5 ± 4,5 nA	-54,2 ± 6,0 nA	41,4 ± 1,7 nA

Abbildung 26: Durch 1 mM Arginin induzierte Ströme (in nA) des hrBAT Wildtyps sowie der Mutation T216M in Abhängigkeit von der injizierten cRNA-Menge

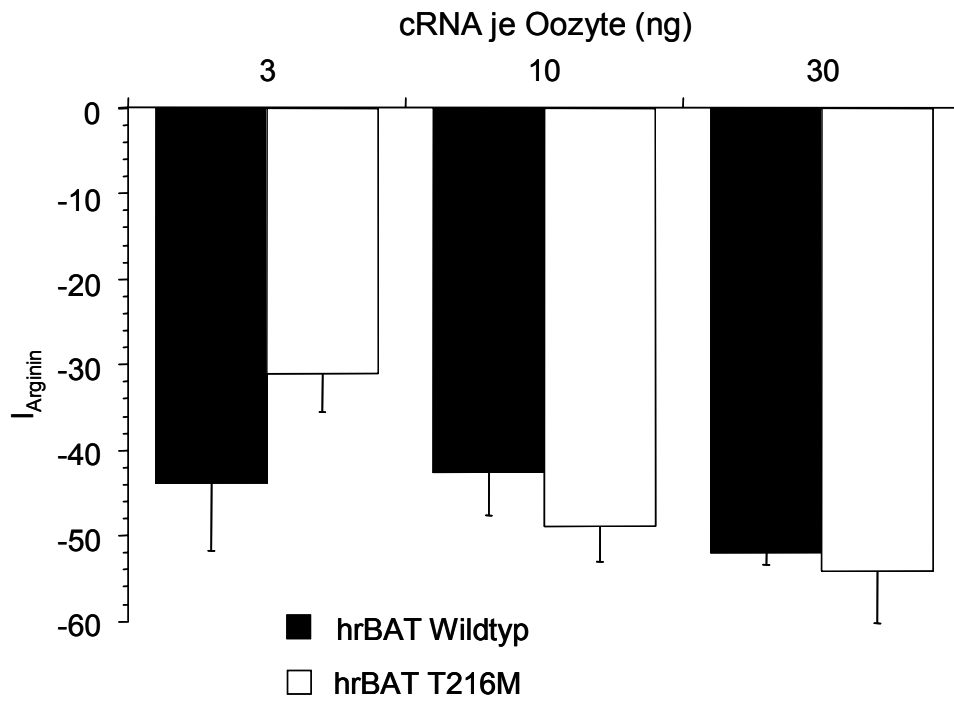
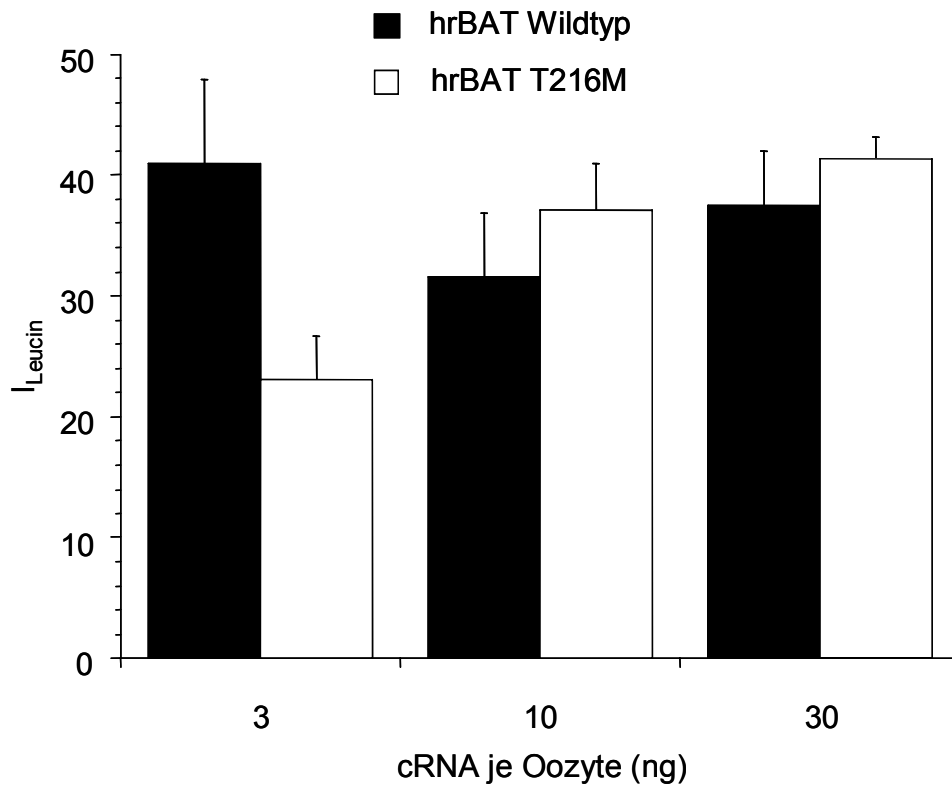


Abbildung 27: Durch 3 mM Leucin induzierte Ströme (in nA) des hrBAT Wildtyps sowie der Mutation T216M in Abhängigkeit von der injizierten cRNA-Menge



4 Interpretation und Diskussion

4.1 Fehlerdiskussion

4.1.1 Präparation der Oozyten

Die Qualität der Oozyten wies Unterschiede auf, 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. Weiters ergaben sich Unterschiede aus der Injektion der cRNA. Die Menge der injizierten cRNA und deren Qualität konnten leicht schwanken. Dies hatte allerdings nur Einfluss auf die Expressionsrate, andere Veränderungen konnten nicht leicht beeinflusst werden wie kleinste Schwankungen in der Temperatur des Oozyteninkubators, der Zusammensetzung der Aufbewahrungslösung und Unterschiede in den Oozyten selbst. Um allzu große Unterschiede zu vermeiden, wurden in der Regel nur Oozyten verwendet, die unter Perfusion mit 1 mM Arginin einen Mindeststrom von -15 nA zeigten. Die Experimente einer Serie wurden nicht alle an einer Präparation durchgeführt, sondern die Oozyten stammten von unterschiedlichen Fröschen und Präparationen.

4.1.2 Lösungen

Die genaue Zusammensetzung der Lösungen wurde mit ionenselektiven Elektroden für Kalium, Chlorid und Calcium überprüft und nur Schwankungen kleiner als 1 % wurden toleriert. Ebenso wurden die Gesamtmolarität und der pH der Lösungen regelmäßig kontrolliert. Nicht ausgeschlossen werden konnten Verunreinigungen der Testsubstanzen durch den Herstellungsprozess. Die Testchemikalien wurden zum Teil in Stammlösungen aufbewahrt, die sich unter dem Einfluss von Temperatur und Licht verändern konnten. Dies wurde durch regelmäßiges frisches Ansetzen der Stammlösungen und deren

Aufbewahrung im Kühl- oder Gefrierschrank, beziehungsweise in lichtgeschützten Behältnissen vermieden.

4.1.3 Versuchsaufbau

Eventuelle von anderen Geräten ausgehende Störungen konnten weitestgehend durch einen Faradayschen Käfig abgeschirmt werden (64). Die Beschichtung der Silberdrahtelektrode konnte beschädigt sein, was jedoch durch regelmäßiges Chloridieren korrigiert wurde. Der Widerstand der Elektroden konnte durch Verstopfen der Elektrodenspitze zunehmen, dies wurde jedoch vor und nach jedem Experiment durch Messen des Elektrodenwiderstands in der Badlösung kontrolliert.

4.1.4 Auswertung

Verschiedene Einflüsse wie etwa die Eigenschaften der Membran der einzelnen Oozyten oder die Flussrate führten teilweise zu leichten Schwankungen oder Veränderungen des basalen Stromes. Deshalb wurde als Ausgangswert für das Ausmessen der Ströme ein Mittelwert des basalen Stromes vor und nach dem Experiment genommen. Sich bei der Analyse ergebende Hill-Koeffizienten müssen mit Vorsicht interpretiert werden, da diese von der Qualität des Kurvenfittings abhängig sind. Nur bei guten Fittings und bei $p < 0,05$ wurden die Veränderungen als signifikant betrachtet.

4.2 Funktionelle Charakterisierung des hrBAT Wildtyp

Das Transportsystem $b^{0,+}$ wurde zunächst als gemeinsames Transportsystem für neutrale und dibasische Aminosäuren sowie Cystin beschrieben. Hierbei wurden für die dibasischen Aminosäuren und Cystin höhere Affinitäten

beobachtet (37, 57, 85). Später konnte gezeigt werden, dass rBAT einen Teil der molekularen Grundlage dieses Transportsystems darstellt (8, 9, 52).

Mutationen in rBAT konnten als Ursache für das Auftreten von Cystinurie identifiziert werden (18). Bei diesen Patienten ist die Ausscheidung von Cystin und dibasischen Aminosäuren im Urin erhöht (67), was die essentielle Rolle von rBAT und somit des Transportsystems $b^{0,+}$ für die Rückresorption dieser Substanzen aus dem Primärharn verdeutlicht.

Um den durch den humanen rBAT induzierten Aminosäuretransport qualitativ und quantitativ umfassend zu charakterisieren, wurden zunächst alle proteinogenen Aminosäuren sowie Ornithin und Cystin als Substrate geprüft. Dabei induzierten alle dibasischen Aminosäuren in *Xenopus* Oozyten Einwärtsströme, während einige neutrale Aminosäuren Auswärtsströme auslösten, was sich mit dem für rBAT beschriebenen Austauschmechanismus erklären lässt (17, 21). Einige neutrale Aminosäuren, darunter die heterozyklischen Aminosäuren Prolin und Tryptophan induzierten keine oder nur sehr geringe Ströme und scheinen daher bei der durch Aminosäureaustausch ermöglichten Rückresorption von dibasischen Aminosäuren und Cystin keine Rolle zu spielen. Zudem kann der geringe Transport durch andere Systeme kompensiert werden, darunter B^0 (14). Für Cystin fiel ein relativ geringer induzierter Strom auf. Dennoch ist diese Transportaktivität von Bedeutung, da die durch Mutationen in rBAT verursachte Cystinurie auf ein Fehlen von möglichen Kompensationsmechanismen schließen lässt. Ausserdem konnte bislang kein weiteres apikales Aminosäuretransportsystem identifiziert werden, das die Resorption von Cystin aus dem Urin vermitteln könnte.

Unter natriumfreien Bedingungen zeigten sich leicht unterschiedliche Ströme, diese konnten sowohl unter als auch über den in Anwesenheit von Natrium gemessenen Werten liegen. Diese Unterschiede waren jedoch nur im Falle von Histidin, Lysin und Ornithin signifikant. Das Transportsystem $b^{0,+}$ war ursprünglich als natriumunabhängig beschrieben worden (95). Später gemessene Unterschiede wurden mit der Interaktion von rBAT mit verschiedenen in *Xenopus* Oozyten vorhandenen endogenen leichten

Untereinheiten erklärt. Pfeiffer et al. beobachteten jedoch in Studien an einem Fusionsprotein aus rBAT und b^{0,+}AT ebenfalls in der Anwesenheit von Natrium leicht höhere Aminosäuretransportraten (69), was zusammen mit den hier ermittelten Werten auf eine leichte Natriumabhängigkeit des Transportsystems hinweisen könnte.

An rBAT exprimierenden *Xenopus* Oozyten konnten in der vorliegenden Arbeit sowohl durch Superfusion mit der Aminosäure Cystein als auch Cystin Ströme induziert werden. Dies ist in unbehandelten oder mit Wasser injizierten Oozyten nicht der Fall (persönliche Mitteilung von C. Wagner), was den durch rBAT induzierten Transport beider Substrate zeigt. Völkl et al. hatten im proximalen Tubulus der Rattenniere zwei unterschiedliche Transportsysteme für Cystin und Cystein postuliert (97, 98). Ein zweites Transportsystem, das Cystein transportieren kann wird durch ASCT2 dargestellt (13, 15). Die Lokalisation dieses Transporters in der Niere ist jedoch ungeklärt. Die Ergebnisse hier deuten also darauf hin, dass System b^{0,+} prinzipiell in der Lage wäre, Cystein zu resorbieren. De facto kommt der Resorption von Cystein im proximalen Tubulus aber keine Bedeutung zu, da Cystein sehr schnell zu Cystin oxidiert wird und wohl in dieser Form resorbiert wird.

4.2.1 Austauschfunktion

Für *Xenopus laevis* Oozyten, die das Protein rBAT exprimieren, wurde schon früh die Induktion von Aminosäureaustausch vermutet, bei dem neutrale Aminosäuren gegen dibasische Aminosäuren und umgekehrt ausgetauscht werden (17, 23). Weitere Studien an Oozyten sowie an OK-Zellen konnten den durch rBAT induzierten obligaten Aminosäureaustausch belegen. Transport findet also nur bei sowohl intra- als auch extrazellulärer Anwesenheit von Aminosäuren statt. Hierbei wurde auch eine 1:1 Stöchiometrie für diese Austauschaktivität gezeigt (21). rBAT kann als obligater Austauscher sowohl Heteroaustausch als auch Homoaustausch induzieren, es werden also neben dem Austausch von neutralen gegen dibasische Aminosäuren und umgekehrt

auch neutrale gegen neutrale sowie dibasische gegen dibasische Aminosäuren ausgetauscht (21, 66). Da nur bei Heteroaustausch die Verschiebung einer Nettoladung über die Zellmembran erfolgt, ist nur dieser Transport elektrogen und kann in den hier durchgeführten Experimenten mit der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp Methode gemessen werden. Für die oben beschriebene physiologische Rolle des Transportsystems $b^{0,+}$ ist der Heteroaustausch von größerer Bedeutung, da nur auf diese Weise die Anreicherung bestimmter Aminosäuren innerhalb oder außerhalb der Zelle erfolgen kann und die Nettoverschiebung der transportierten Substrate über das Epithel des Dünndarms und des proximalen Tubulus der Niere möglich wird. Die Eigenschaft des humanen rBAT, Heteroaustausch zu induzieren, wurde hier an *Xenopus laevis* Oozyten untersucht. Dazu wurde zunächst die Spannungsabhängigkeit der durch Arginin oder Leucin induzierten Ströme bestimmt. Der Transport von geladenen Teilchen über die Zellmembran, der bei elektrogenem Transport stattfindet, wird durch das Potential an der Zellmembran beeinflusst. So wird der Influx von dibasischen Aminosäuren in die Oozyte umso mehr begünstigt, je negativer das Membranpotential ist, während andererseits eine Depolarisation der Zelle diese treibende Kraft verringert. Das Variieren des Haltepotentials zwischen -90 und -10 mV ergab eine lineare Abschwächung des durch Arginin induzierten Stromes bei Depolarisation der Zelle, während Hyperpolarisation eine Verstärkung zur Folge hatte. Umgekehrt verhielt es sich für Leucin, das bei Depolarisation den stärksten Strom induzierte, welcher sich bei Hyperpolarisation verringerte. Diese Ergebnisse decken sich mit früheren Beobachtungen an der Kaninchen- und Rattenisoform von rBAT (17, 23) und weisen ebenso auf den oben beschriebenen Heteroaustausch hin. Während der Influx von Arginin direkt durch das Membranpotential beeinflusst wird, verursacht Superfusion der Oozyten mit Leucin den Efflux von dibasischen Aminosäuren und die Veränderung der induzierten Ströme verläuft in die entgegengesetzte Richtung.

Der Austausch von Substraten erfordert deren Anwesenheit auf beiden Seiten der Zellmembran. Daher lässt der Einfluss der intrazellulären Aminosäurekonzentrationen auf die durch Superfusion der Oozyte mit einer bestimmten

Aminosäure ausgelösten Ströme Rückschlüsse auf die Eigenschaften des Austauschmechanismus zu. Nach einer fünfzehn Minuten dauernden Vorbeladung der Oozyten mit Arginin wurden im Vergleich zu den vorher gemessenen Werten der Leucinstrom um 14 % gesteigert, während der Argininstrom um 27 % abnahm. Umgekehrt verursachte eine entsprechende Vorbeladung mit Leucin eine Zunahme des Argininstromes um 101 % und eine Verringerung des Leucinstromes um 50 %. Der Influx einer neutralen Aminosäure wird also durch eine erhöhte Menge einer dibasischen Aminosäure innerhalb der Zelle begünstigt und umgekehrt, was sich ebenfalls mit dem Auftreten von Heteroaustausch vereinbaren lässt. Ähnliche Studien ergaben zuvor das gleiche Ergebnis (17, 21, 23).

In den unten beschriebenen kinetischen Studien wurden für alle geprüften Aminosäuren Hill-Koeffizienten nahe 1 gefunden. Da dieser auf die Anzahl der Substratbindungsstellen am Transportprotein hinweist, ist dies mit der gezeigten 1:1 Stöchiometrie für den Aminosäureaustausch vereinbar (21).

4.2.2 Transportkinetiken

Für jeweils vier dibasische und vier neutrale Aminosäuren, darunter Cystin, wurden kinetische Studien durchgeführt, um die jeweilige Substratbindung an den Transporter zu untersuchen. Hierzu wurde für jede der Aminosäuren die Michaeliskonstante (K_m) bestimmt, die der Substratkonzentration bei halbmaximaler Transportgeschwindigkeit entspricht und die ein Maß für die Affinität darstellt. Wegen der zuvor beobachteten geringen Unterschiede in An- und Abwesenheit von Natrium wurden alle Messungen auch unter natriumfreien Bedingungen durchgeführt. Dabei ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Affinität feststellen.

Die gemessenen extrazellulären Affinitäten waren für die dibasischen Aminosäuren und Cystin deutlich höher als für die untersuchten neutralen Aminosäuren. Diese Ergebnisse sind somit konsistent mit den zuvor beschriebenen Eigenschaften des Transportsystems $b^{0,+}$ (37, 57, 85) und

bestätigen die Induktion eines $b^{0,+}$ -artigen Aminosäuretransports in *Xenopus* Oozyten durch rBAT.

Tabelle 13: Für einige dibasische und neutrale Aminosäuren ermittelte K_m -Werte in der An- und Abwesenheit von extrazellulärem Natrium (Mittelwert \pm SEM in mM)

Aminosäure	K_m -Wert (Na^+)	K_m -Wert (Na^+ frei)
L-Leucin	0,378 \pm 0,017	0,361 \pm 0,021
L-Phenylalanin	0,674 \pm 0,180	0,510 \pm 0,109
L-Cystein	1,216 \pm 0,479	1,685 \pm 0,508
L-Cystin	0,103 \pm 0,057	0,105 \pm 0,175
L-Arginin	0,036 \pm 0,003	0,024 \pm 0,002
L-Lysin	0,142 \pm 0,024	0,080 \pm 0,011
L-Ornithin	0,029 \pm 0,003	0,033 \pm 0,026
L-Histidin	0,129 \pm 0,016	0,191 \pm 0,015

4.3 Funktionelle Charakterisierung der hrBAT Mutation T216M

Mutationen in den Proteinen rBAT und $b^{0,+}$ AT, die als Heteromer das Transportsystem $b^{0,+}$ induzieren, führen zum Krankheitsbild der Cystinurie (18, 31). Dabei ist durch den defekten Membrantransport von Cystin und dibasischen Aminosäuren deren Resorption aus dem Primärharn aus dem proximalen Tubulus gestört. Die durch eine Mutation in rBAT verursachte Cystinurie wird heute als Typ A bezeichnet (27). Bis heute wurden hundertunddrei solcher Mutationen beschrieben (35), die durch die veränderte schwere Untereinheit trotz intakter leichter Kette die Funktion des gesamten heteromeren Transporters beeinträchtigen. Von diesen Mutationen wurden bislang nur wenige funktionell untersucht (1, 18, 22, 45, 59, 82).

Da ohne rBAT die leichte Untereinheit $b^{0,+}AT$ die Zellmembran nicht erreicht (71, 100), konnte in einigen Fällen ein Traffickingdefekt als Ursache für das Auftreten der Cystinurie gezeigt werden. Andere Mutationen wiesen auf einen Einfluss von rBAT auf die Transporteigenschaften des Gesamttransporters hin. Um den Mechanismus zu ermitteln, durch den die bei Cystinuriepatienten gefundene hrBAT-Mutation T216M zur Krankheit führt, wurde diese analog zum Wildtyp funktionell untersucht.

4.3.1 Austauschfunktion

Die Untersuchung der Spannungsabhängigkeit ergab für die dibasische Aminosäure Arginin bei Depolarisation der Zelle eine Abnahme sowie bei Hyperpolarisation eine Zunahme des induzierten Stromes. Für die neutrale Aminosäure Leucin verhielt es sich umgekehrt. Die induzierten Ströme wiesen keine signifikanten Unterschiede zum hrBAT Wildtyp auf. Somit konnte für den Einfluss des Haltepotentials auf die induzierten Ströme kein im Vergleich zum Wildtyp abweichendes Verhalten durch die Mutation T216M festgestellt werden. Bei den Untersuchungen zur intrazellulären Vorbeladung zeigte sich nach fünfzehn Minuten dauernder Superfusion mit Arginin eine Steigerung des Leucinstromes um 5 % und eine Verringerung des Argininstromes um 30 %. Die Vorbeladung mit Leucin bewirkte eine Zunahme des durch Arginin induzierten Stromes um 82 %, während sich eine Abnahme des Leucinstromes um 34 % zeigte. Diese Ergebnisse erbrachten ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zu den für den hrBAT Wildtyp ermittelten Eigenschaften. Insgesamt spricht dies gegen eine veränderte Austauschfunktion der hrBAT Mutation T216M und bietet daher keine Erklärung für das Auftreten der Cystinurie. Ebenso wie beim Wildtyp weist hier die größere Stimulierbarkeit des Argininstromes auf den bevorzugten Influx der dibasischen Aminosäuren hin, wie zuvor beschrieben wurde (21).

4.3.2 Transportkinetiken

Um die Affinitäten der hrBAT Mutation T216M für einige dibasische und neutrale Aminosäuren zu untersuchen, wurden analog zum Wildtyp kinetische Studien durchgeführt, bei denen durch Bestimmung der durch verschiedene Aminosäurekonzentrationen ausgelösten Ströme die Substratkonzentration bei halbmaximaler Transportgeschwindigkeit und somit der K_m -Wert ermittelt wurde. Wie aus Tabelle 14 ersichtlich, wurden für die dibasischen Aminosäuren und Cystin höhere Affinitäten als für die neutralen Aminosäuren gefunden. Die bei der Mutation T216M bestimmten Affinitäten zeigten keine signifikanten Unterschiede zu den beim Wildtyp ermittelten Werten. Ebenso ergab die Abwesenheit von Natrium keine signifikante Veränderung der Transportkinetiken. Bei allen untersuchten Aminosäuren lagen wie beim hrBAT Wildtyp die errechneten Hill-Koeffizienten nahe 1.

Tabelle 14: Für einige dibasische und neutrale Aminosäuren ermittelte K_m -Werte für die hrBAT Mutation T126M im Vergleich zum Wildtyp (Mittelwert \pm SEM in mM)

Aminosäure	hrBAT T216M	hrBAT Wildtyp
L-Leucin	0,395 \pm 0,056	0,378 \pm 0,017
L-Phenylalanin	0,446 \pm 0,135	0,674 \pm 0,180
L-Cystein	1,215 \pm 1,544	1,216 \pm 0,479
L-Cystin	0,100 \pm 0,007	0,103 \pm 0,057
L-Arginin	0,020 \pm 0,002	0,036 \pm 0,003
L-Lysin	0,084 \pm 0,014	0,142 \pm 0,024
L-Ornithin	0,023 \pm 0,002	0,029 \pm 0,003
L-Histidin	0,127 \pm 0,015	0,129 \pm 0,016

Ebenso wie die Austauschfunktion zeigen sich somit die Transportkinetiken durch die Mutation T216M unverändert und lassen keine Schlüsse auf die Pathophysiologie der durch diese Mutation verursachte Cystinurie Typ A zu.

4.4 Trafficking und Expression der hrBAT Mutation T216M im Vergleich zum Wildtyp

In den oben diskutierten Resultaten lassen sich keine funktionellen Unterschiede zwischen dem hrBAT Wildtyp und seiner Mutation T216M feststellen. Studien zum zeitlichen Verlauf von durch neutrale und dibasische Aminosäuren induzierten Strömen sowie deren Abhängigkeit von der je Oozyte injizierten cRNA-Menge wurden durchgeführt, um das Expressionsverhalten der Mutation mit dem des Wildtyps zu vergleichen. Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs ergab im gesamten Messzeitraum vom 3. bis zum 6. Tag deutlich größere Absolutströme für den hrBAT Wildtyp. Dies war sowohl für Arginin als auch für Leucin der Fall. Bei der Wiederholung des Experiments für die Mutation T216M mit der dreifachen cRNA-Konzentration konnten zwar größere Ströme gemessen werden, diese lagen jedoch immer noch deutlich unter denen, die an den den Wildtyp exprimierenden Oozyten beobachtet wurden. So betragen die Argininströme am sechsten Tag nach T216M-cRNA-Injektion trotz deren dreifacher Konzentration nur 58 % der Argininströme des Wildtyps, für Leucin waren es nur 66 %. Die durch die Mutante induzierten Ströme zeigten zwischen dem dritten und vierten Tag nach Injektion den stärksten Anstieg, während die Wildtypströme zu diesem Zeitpunkt ein Plateau erreicht hatten und in der Folge nur noch leicht zunahmten. Hier wurde also für die Mutation T216M eine durch höhere cRNA-Konzentrationen teilweise Kompensation der Ströme beobachtet. Dies konnte durch Experimente bestätigt werden, bei denen die Absolutmenge der injizierten cRNA variiert wurde. Die Erhöhung der cRNA-Menge von 3 ng auf 30 ng erbrachte beim Wildtyp keine signifikante Veränderung der gemessenen Ströme. Hingegen ließ sich der Strom bei der Mutation T216M durch Erhöhung der cRNA-Menge von 3 ng auf 10 ng steigern, die weitere Erhöhung auf 30 ng führte zu keiner signifikanten Zunahme. Dies stützt und ergänzt die für die Mutation T216M zuvor ermittelten Ergebnisse. Saadi et al. zeigten in Uptake-Studien an *Xenopus* Oozyten eine zeitabhängige Steigerung der gemessenen Substrataufnahme von 22 % auf 75 % im Vergleich zum Wildtyp nach einem beziehungsweise vier Tagen und

vermuteten daher für diese Mutation einen Traffickingdefekt (82). Untersuchungen an weiteren rBAT-Mutationen zeigten ähnliche Resultate (1, 18, 22, 59, 82). Hiervon wurden die am häufigsten identifizierte Mutation M467K und die den gleichen Aminosäurerest betreffende Mutation M467T am genauesten charakterisiert. Chillaron et al. beobachteten für diese Mutation ebenfalls eine Steigerung der Expression durch höhere cRNA-Mengen und längere Zeitdauer nach deren Injektion (22). Dabei waren die Substrataffinitäten im Vergleich zum Wildtyp unverändert, während deutlich kleinere Absolutströme gemessen wurden. Dies konnte durch die Beobachtung, dass das mutierte Protein vermehrt intrazellulär zurückgehalten wird und offenbar nicht den gesamten intrazellulären Reifungsprozess durchläuft, ergänzt werden. Für diese Mutation wurde daher ein gestörtes Trafficking des Proteins zur Zellmembran angenommen. Als Ursache für die intrazelluläre Retention des Proteins wurde eine veränderte Proteinfaltung im endoplasmatischen Retikulum vermutet, die durch die Punktmutation erfolgte Änderung der Aminosäurenreihenfolge im Protein zustande kommt (22), wie dies auch für bei Mukoviszidosepatienten gefundene Mutationen im Chloridkanal CFTR beschrieben wurde (89). Für den Anionenaustauscher AE1, dessen Mutationen Hereditäre Sphärozytose oder distal renale tubuläre Azidose verursachen können, konnte analog für einige Mutationen gezeigt werden, dass sie zur intrazellulären Retention des mutierten Transportproteins führen (87). Eine gestörte Proteinfaltung und die sich daraus ergebende Strukturveränderung kann die Bindung von rBAT zur leichten Kette $b^{0,+}$ beeinflussen.

Im Falle der in der vorliegenden Studie untersuchten hrBAT Mutation T216M könnten die beobachteten geringeren Absolutströme auf einen funktionell gestörten Aminosäuretransport hinweisen. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da für alle übrigen funktionellen Daten wie Austauschfunktion und Substrataffinitäten keine Unterschiede zum Wildtyp gezeigt werden konnte.

Somit lässt sich aus den ermittelten Resultaten für die Mutation T216M ebenfalls ein Traffickingdefekt schlussfolgern. Da die leichte Untereinheit $b^{0,+}$ AT die Plasmamembran nur in Anwesenheit der schweren Untereinheit rBAT erreichen kann, verbleibt diese bei einem gestörten Trafficking von rBAT

ebenfalls intrazellulär. Die dadurch verringerte Expression des gesamten funktionell aktiven Heteromers an der Zellmembran führt bei homozygoten Trägern dieser Mutation zu einer niedrigeren Transportaktivität für Cystin und die anderen Substrate des Transportsystems $b^{0,+}$ und erklärt das Auftreten der Cystinurie.

Der Aminosäurerest M216 in hrBAT liegt in einem Proteinabschnitt, für den Glykosylierung angenommen wurde (52). Im Falle der Mutation T216M ist dieser verändert und könnte sich über die gestörte Glykosylierung in verstärktem Maße auf die Proteinstruktur auswirken.

5 Zusammenfassung

Die beiden Membranproteine rBAT und $b^{0,+}$ AT bilden als Heteromer einen funktionellen Aminosäuretransporter. Der hierbei induzierte Transport entspricht dem zuvor beschriebenen Aminosäuretransportsystem $b^{0,+}$, bei dem dibasische und neutrale Aminosäuren sowie Cystin im Verhältnis 1:1 ausgetauscht werden. Der Einstrom von dibasischen Aminosäuren und Cystin in die Zelle wird bei diesem Austausch bevorzugt. Dadurch fungiert das Heteromer rBAT- $b^{0,+}$ AT als Teil des Mechanismus, der die Rückresorption dieser Substrate im proximalen Tubulus der Niere und deren Absorption im Dünndarm ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die Eigenschaften des durch Expression des humanen rBAT in *Xenopus laevis* Oozyten induzierten Aminosäuretransports mittels der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp Methode elektrophysiologisch untersucht.

Alle geprüften dibasischen Aminosäuren einschließlich Cystin, sowie die meisten neutralen Aminosäuren induzierten Ströme in rBAT exprimierenden Oozyten. Die unterschiedliche Polarität dieser Ströme und die Untersuchungen zur Spannungsabhängigkeit und intrazellulären Vorbeladung zeigten für den humanen rBAT Aminosäureaustausch im Verhältnis 1:1, wie zuvor an rBAT anderer Spezies beschrieben. Die kinetischen Studien zu Substrataffinitäten ergaben hohe extrazelluläre Affinitäten für die dibasischen Aminosäuren und Cystin sowie niedrigere Affinitäten für die neutralen Aminosäuren. Bis auf die hierbei beobachtete leichte Natrium-Abhängigkeit entsprechen diese Ergebnisse den für das Transportsystem $b^{0,+}$ beschriebenen Eigenschaften und bestätigen die Induktion dieses Transportsystems durch rBAT.

Die Funktion des aus rBAT und $b^{0,+}$ AT bestehenden heteromeren Aminosäuretransporters ist essentiell für die Rückresorption von Cystin aus dem Primärharn. Daher können Mutationen in einem der beiden Proteine zum Krankheitsbild der Cystinurie führen. Wegen der schlechten Löslichkeit des Cystins treten bei Cystinurie rezidivierende Cystinsteine auf, die zu

Obstruktionen, Harnwegsinfekten und bei fortschreitendem Krankheitsverlauf zur Niereninsuffizienz mit Dialysepflichtigkeit führen können.

Eine der häufigsten bei Cystinuriepatienten in rBAT gefundene Mutationen führt zum Ersatz von Threonin durch Methionin an Position 216. Zur Ermittlung des pathophysiologischen Mechanismus, durch den diese Mutation zur Krankheit führt, wurden daher entsprechend zum Wildtyp funktionelle Studien an *Xenopus laevis* Oozyten durchgeführt. Hierbei zeigten sich sowohl in der Austauschfunktion als auch bei den extrazellulären Affinitäten für die verschiedenen Aminosäuren und Cystin keine Unterschiede zu den Transporteigenschaften des Wildtyp-Proteins. Die Resultate der Experimente zur Abhängigkeit der Expression von hrBAT von der Menge der cRNA sowie von der Zeitdauer nach deren Injektion zeigten jedoch für die Mutation T216M im Vergleich zum Wildtyp eine gestörte Expression.

Somit führt die Mutation T216M zu einem gestörten Trafficking des Proteins zur Zellmembran, wie zuvor auch für andere Mutationen gezeigt werden konnte. An der Zellmembran ist das defekte Protein wie der Wildtyp funktionell aktiv, kann diese aber nicht im gleichen Ausmaß erreichen. Da auch die leichte Untereinheit $b^{0,+}AT$ nur in Anwesenheit der schweren Untereinheit rBAT an die Plasmamembran gelangen kann, verbleibt diese auch vermehrt intrazellulär. Dadurch ist in vivo der Transport von Cystin und der dibasischen Aminosäuren und damit deren Rückresorption aus dem Primärharn beeinträchtigt und erklärt bei den diese Mutation tragenden Patienten das Auftreten des Krankheitsbildes der Cystinurie.

6 Literaturverzeichnis

1. Albers A. 2001. Detektion von Mutationen in den Genen SLC3A1/rbAT und SLC7A9/b0,+AT bei Cystinurie Patienten und funktionelle Untersuchung von sieben Mutationen des SLC3A1/rbAT-Gens (Med. Dissertation): Universität Tübingen.
2. Albers A, Lahme S, Wagner C, Kaiser P, Zerres K, Capasso G, Pica A, Palacin M, Lang F, Bichler KH, and Eggermann T. 1999. Mutations in the SLC3A1 gene in cystinuric patients: frequencies and identification of a novel mutation. *Genet Test* 3: 227-231.
3. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Watson JD. 1989. *Molecular Biology of the Cell*. New York, London: Garland Publishing.
4. Alvarez-Leefmans FJ. 1992. Extracellular reference electrodes. In: *Practical Electrophysiological Methods: A guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology* (1st ed.), edited by Grantyn R and Kettenmann H. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley & Sons, Inc., p. 171-182.
5. Bassi MT, Gasol E, Manzoni M, Pineda M, Riboni M, Martin R, Zorzano A, Borsani G, and Palacin M. 2001. Identification and characterisation of human xCT that co-expresses, with 4F2 heavy chain, the amino acid transport activity system xc. *Pflugers Arch* 442: 286-296.
6. Bauch C, Forster N, Loffing-Cueni D, Summa V, and Verrey F. 2003. Functional cooperation of epithelial heteromeric amino acid transporters expressed in madin-darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 278: 1316-1322.
7. Bauch C and Verrey F. 2002. Apical heterodimeric cystine and cationic amino acid transporter expressed in MDCK cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F181-189.
8. Bertran J, Magagnin S, Werner A, Markovich D, Biber J, Testar X, Zorzano A, Kuhn LC, Palacin M, and Murer H. 1992. Stimulation of system y(+)-like amino acid transport by the heavy chain of human 4F2 surface antigen in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 5606-5610.
9. Bertran J, Werner A, Chillaron J, Nunes V, Biber J, Testar X, Zorzano A, Estivill X, Murer H, and 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.
10. Bertran J, Werner A, Moore ML, Stange G, Markovich D, Biber J, Testar X, Zorzano A, Palacin M, and Murer H. 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 U S A* 89: 5601-5605.

11. Bisceglia L, Calonge MJ, Dello Strologo L, Rizzoni G, de Sanctis L, Gallucci M, Beccia E, Testar X, Zorzano A, Estivill X, Zelante L, Palacin M, Gasparini P, and Nunes V. 1996. Molecular analysis of the cystinuria disease gene: identification of four new mutations, one large deletion, and one polymorphism. *Hum Genet* 98: 447-451.
12. Brodehl J, Gellissen K, and Kowalewski S. 1967. [An isolated defect of the tubular cystine reabsorption in a family with idiopathic hypoparathyroidism]. *Klin Wochenschr* 45: 38-40.
13. Broer A, Brookes N, Ganapathy V, Dimmer KS, Wagner CA, Lang F, and Broer S. 1999. The astroglial ASCT2 amino acid transporter as a mediator of glutamine efflux. *J Neurochem* 73: 2184-2194.
14. Broer A, Klingel K, Kowalczyk S, Rasko JE, Cavanaugh J, and Broer S. 2004. Molecular cloning of mouse amino acid transport system B0, a neutral amino acid transporter related to Hartnup disorder. *J Biol Chem* 279: 24467-24476.
15. Broer A, Wagner C, Lang F, and Broer S. 2000. Neutral amino acid transporter ASCT2 displays substrate-induced Na⁺ exchange and a substrate-gated anion conductance. *Biochem J* 346 Pt 3: 705-710.
16. Broer A, Wagner CA, Lang F, and Broer S. 2000. The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/y+LAT2 mediates arginine efflux in exchange with glutamine. *Biochem J* 349 Pt 3: 787-795.
17. Busch AE, Herzer T, Waldegger S, Schmidt F, Palacin M, Biber J, Markovich D, Murer H, and 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. Calonge MJ, Gasparini P, Chillaron J, Chillon M, Gallucci M, Rousaud F, Zelante L, Testar X, Dallapiccola B, Di Silverio F, and et al. 1994. Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine. *Nat Genet* 6: 420-425.
19. Chairoungdua A, Kanai Y, Matsuo H, Inatomi J, Kim DK, and Endou H. 2001. Identification and characterization of a novel member of the heterodimeric amino acid transporter family presumed to be associated with an unknown heavy chain. *J Biol Chem* 276: 49390-49399.
20. Chairoungdua A, Segawa H, Kim JY, Miyamoto K, Haga H, Fukui Y, Mizoguchi K, Ito H, Takeda E, Endou H, and Kanai Y. 1999. Identification of an amino acid transporter associated with the cystinuria-related type II membrane glycoprotein. *J Biol Chem* 274: 28845-28848.
21. Chillaron J, Estevez R, Mora C, Wagner CA, Suessbrich H, Lang F, Gelpi JL, Testar X, Busch AE, Zorzano A, and Palacin M. 1996. Obligatory amino acid

exchange via systems bo,+L-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.

22. Chillaron J, Estevez R, Samarzija I, Waldegger S, Testar X, Lang F, Zorzano A, Busch A, and Palacin M. 1997. An intracellular trafficking defect in type I cystinuria rBAT mutants M467T and M467K. *J Biol Chem* 272: 9543-9549.

23. Coady MJ, Jalal F, Chen X, Lemay G, Berteloot A, and Lapointe JY. 1994. Electrogenic amino acid exchange via the rBAT transporter. *FEBS Lett* 356: 174-178.

24. Daniel H. 2004. Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annu Rev Physiol* 66: 361-384.

25. Dascal N. 1987. The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit Rev Biochem* 22: 317-387.

26. Dave MH, Schulz N, Zecevic M, Wagner CA, and Verrey F. 2004. Expression of heteromeric amino acid transporters along the murine intestine. *J Physiol* 558: 597-610.

27. Dello Strologo L, Pras E, Pontesilli C, Beccia E, Ricci-Barbini V, de Sanctis L, Ponzzone A, Gallucci M, Bisceglia L, Zelante L, Jimenez-Vidal M, Font M, Zorzano A, Rousaud F, Nunes V, Gasparini P, Palacin M, and Rizzoni G. 2002. Comparison between SLC3A1 and SLC7A9 cystinuria patients and carriers: a need for a new classification. *J Am Soc Nephrol* 13: 2547-2553.

28. Dietzel ID, Bruns D, Polder H-R, and Lux HD. 1992. Voltage clamp recording. In: *Practical Electrophysiological Methods: A guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology* (1st ed.), edited by Grantyn R and Kettenmann H. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley & Sons, Inc., p. 256-262.

29. Dumont JN. 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* 136: 153-179.

30. Feliubadalo L, Arbones ML, Manas S, Chillaron J, Visa J, Rodes M, Rousaud F, Zorzano A, Palacin M, and Nunes V. 2003. Slc7a9-deficient mice develop cystinuria non-I and cystine urolithiasis. *Hum Mol Genet* 12: 2097-2108.

31. Feliubadalo L, Font M, Purroy J, Rousaud F, Estivill X, Nunes V, Golomb E, Centola M, Aksenitjevich I, Kreiss Y, Goldman B, Pras M, Kastner DL, Pras E, Gasparini P, Bisceglia L, Beccia E, Gallucci M, de Sanctis L, Ponzzone A, Rizzoni GF, Zelante L, Bassi MT, George AL, Jr., Manzoni M, De Grandi A, Riboni M, Endsley JK, Ballabio A, Borsani G, Reig N, Fernandez E, Estevez R, Pineda M, Torrents D, Camps M, Lloberas J, Zorzano A, and Palacin M. 1999.

Non-type I cystinuria caused by mutations in SLC7A9, encoding a subunit (bo,+AT) of rBAT. *Nat Genet* 23: 52-57.

32. Fenczik CA, Zent R, Dellos M, Calderwood DA, Satriano J, Kelly C, and Ginsberg MH. 2001. Distinct domains of CD98hc regulate integrins and amino acid transport. *J Biol Chem* 276: 8746-8752.

33. Fernandez E, Carrascal M, Rousaud F, Abian J, Zorzano A, Palacin M, and Chillaron J. 2002. rBAT-b(0,+AT) heterodimer is the main apical reabsorption system for cystine in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F540-548.

34. Fernandez E, Torrents D, Chillaron J, Martin Del Rio R, Zorzano A, and Palacin M. 2003. Basolateral LAT-2 has a major role in the transepithelial flux of L-cystine in the renal proximal tubule cell line OK. *J Am Soc Nephrol* 14: 837-847.

35. Font-Llitjos M, Jimenez-Vidal M, Bisceglia L, Di Perna M, de Sanctis L, Rousaud F, Zelante L, Palacin M, and Nunes V. 2005. New insights into cystinuria: 40 new mutations, genotype-phenotype correlation, and digenic inheritance causing partial phenotype. *J Med Genet* 42: 58-68.

36. Font MA, Feliubadalo L, Estivill X, Nunes V, Golomb E, Kreiss Y, Pras E, Bisceglia L, d'Adamo AP, Zelante L, Gasparini P, Bassi MT, George AL, Jr., Manzoni M, Riboni M, Ballabio A, Borsani G, Reig N, Fernandez E, Zorzano A, Bertran J, and Palacin M. 2001. Functional analysis of mutations in SLC7A9, and genotype-phenotype correlation in non-Type I cystinuria. *Hum Mol Genet* 10: 305-316.

37. Foreman JW, Hwang SM, and Segal S. 1980. Transport interactions of cystine and dibasic amino acids in isolated rat renal tubules. *Metabolism* 29: 53-61.

38. Fukasawa Y, Segawa H, Kim JY, Chairoungdua A, Kim DK, Matsuo H, Cha SH, Endou H, and Kanai Y. 2000. Identification and characterization of a Na(+)-independent neutral amino acid transporter that associates with the 4F2 heavy chain and exhibits substrate selectivity for small neutral D- and L-amino acids. *J Biol Chem* 275: 9690-9698.

39. Furriols M, Chillaron J, Mora C, Castello A, Bertran J, Camps M, Testar X, Vilaro S, Zorzano A, and Palacin M. 1993. rBAT, related to L-cysteine 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.

40. Gerton GL and Hedrick JL. 1986. The vitelline envelope to fertilization envelope conversion in eggs of *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 116: 1-7.

41. Goodyer P, Saadi I, Ong P, Elkas G, and Rozen R. 1998. Cystinuria subtype and the risk of nephrolithiasis. *Kidney Int* 54: 56-61.
42. Goodyer PR, Clow C, Reade T, and Girardin C. 1993. Prospective analysis and classification of patients with cystinuria identified in a newborn screening program. *J Pediatr* 122: 568-572.
43. Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, and Marbaix G. 1971. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233: 177-182.
44. Gurdon JB and Wickens MP. 1983. The use of *Xenopus* oocytes for the expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 101: 370-386.
45. Kaltenbach S. 2001. Untersuchungen zur Pathophysiologie der Cystinurie Typ I: Charakterisierung der hrBAT Mutationen R365W und F648S (Med. Dissertation): Universität Tübingen.
46. Kanai Y, Fukasawa Y, Cha SH, Segawa H, Chairoungdua A, Kim DK, Matsuo H, Kim JY, Miyamoto K, Takeda E, and Endou H. 2000. Transport properties of a system y⁺L neutral and basic amino acid transporter. Insights into the mechanisms of substrate recognition. *J Biol Chem* 275: 20787-20793.
47. Kanai Y, Segawa H, Miyamoto K, Uchino H, Takeda E, and Endou H. 1998. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Biol Chem* 273: 23629-23632.
48. Kanai Y, Stelzner MG, Lee WS, Wells RG, Brown D, and Hediger MA. 1992. Expression of mRNA (D2) encoding a protein involved in amino acid transport in S3 proximal tubule. *Am J Physiol* 263: F1087-1092.
49. Kelly SM, Jia YL, and Macklem PT. 1997. Measurement of elastic properties of *Xenopus* oocytes. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 118: 607-613.
50. Kopito RR. 1999. Biosynthesis and degradation of CFTR. *Physiol Rev* 79: S167-173.
51. Langen H, von Kietzell D, Byrd D, Arslan-Kirchner M, Vester U, Stuhmann M, Dork T, Saar K, Reis A, Schmidtke J, and Brodehl J. 2000. Renal polyamine excretion, tubular amino acid reabsorption and molecular genetics in cystinuria. *Pediatr Nephrol* 14: 376-384.
52. Lee WS, Wells RG, Sabbag RV, Mohandas TK, and Hediger MA. 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.
53. Magagnin S, Bertran J, Werner A, Markovich D, Biber J, Palacin M, and Murer H. 1992. Poly(A)⁺ RNA from rabbit intestinal mucosa induces b_{0,+} and

y+ amino acid transport activities in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* 267: 15384-15390.

54. Markovich D, Stange G, Bertran J, Palacin M, Werner A, Biber J, and Murer H. 1993. Two mRNA transcripts (rBAT-1 and rBAT-2) are involved in system b₀(+)-related amino acid transport. *J Biol Chem* 268: 1362-1367.

55. Mastroberardino L, Spindler B, Pfeiffer R, Skelly PJ, Loffing J, Shoemaker CB, and Verrey F. 1998. Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature* 395: 288-291.

56. Matsuo H, Kanai Y, Kim JY, Chairoungdua A, Kim do K, Inatomi J, Shigeta Y, Ishimine H, Chaekuntode S, Tachampa K, Choi HW, Babu E, Fukuda J, and Endou H. 2002. Identification of a novel Na⁺-independent acidic amino acid transporter with structural similarity to the member of a heterodimeric amino acid transporter family associated with unknown heavy chains. *J Biol Chem* 277: 21017-21026.

57. McNamara PD, Pepe LM, and Segal S. 1981. Cystine uptake by rat renal brush-border vesicles. *Biochem J* 194: 443-449.

58. Meier C, Ristic Z, Klauser S, and Verrey F. 2002. Activation of system L heterodimeric amino acid exchangers by intracellular substrates. *Embo J* 21: 580-589.

59. Miyamoto K, Katai K, Tatsumi S, Sone K, Segawa H, Yamamoto H, Taketani Y, Takada K, Morita K, Kanayama H, and et al. 1995. Mutations of the basic amino acid transporter gene associated with cystinuria. *Biochem J* 310 (Pt 3): 951-955.

60. Mora C, Chillaron J, Calonge MJ, Forgo J, Testar X, Nunes V, Murer H, Zorzano A, and Palacin M. 1996. The rBAT gene is responsible for L-cystine uptake via the b₀(+)-like amino acid transport system in a "renal proximal tubular" cell line (OK cells). *J Biol Chem* 271: 10569-10576.

61. Mosckovitz R, Udenfriend S, Felix A, Heimer E, and Tate SS. 1994. Membrane topology of the rat kidney neutral and basic amino acid transporter. *Faseb J* 8: 1069-1074.

62. Nakauchi J, Matsuo H, Kim DK, Goto A, Chairoungdua A, Cha SH, Inatomi J, Shiokawa Y, Yamaguchi K, Saito I, Endou H, and Kanai Y. 2000. Cloning and characterization of a human brain Na⁺-independent transporter for small neutral amino acids that transports D-serine with high affinity. *Neurosci Lett* 287: 231-235.

63. O'Connor CM and Smith LD. 1976. Inhibition of oocyte maturation by theophylline: possible mechanism of action. *Dev Biol* 52: 318-322.

64. Ohlemeyer C and Meyer JW. 1992. The Faraday cage and grounding arrangements. In: *Practical Electrophysiological Methods: A guide for in vitro*

studies in vertebrate neurobiology (1st ed.), edited by Grantyn R and Kettenmann H. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley & Sons, Inc., p. 3-5.

65. Ozegovic B, McNamara PD, and Segal S. 1982. Cystine uptake by rat jejunal brushborder membrane vesicles. *Biosci Rep* 2: 913-920.

66. Palacin M, Estevez R, Bertran J, and Zorzano A. 1998. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol Rev* 78: 969-1054.

67. Palacin M, Goodyer P, Nunes V, and Gasparini P. 2001. Cystinuria. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, edited by Scriver C, AL. B, SW. S and D. V. New York: McGraw Hill, p. 4957-4969.

68. Peters T, Thaete C, Wolf S, Popp A, Sedlmeier R, Grosse J, Nehls MC, Russ A, and Schlueter V. 2003. A mouse model for cystinuria type I. *Hum Mol Genet* 12: 2109-2120.

69. Pfeiffer R, Loffing J, Rossier G, Bauch C, Meier C, Eggermann T, Loffing-Cueni D, Kuhn LC, and Verrey F. 1999. Luminal heterodimeric amino acid transporter defective in cystinuria. *Mol Biol Cell* 10: 4135-4147.

70. Pfeiffer R, Rossier G, Spindler B, Meier C, Kuhn L, and Verrey F. 1999. Amino acid transport of y+L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *Embo J* 18: 49-57.

71. Pfeiffer R, Spindler B, Loffing J, Skelly PJ, Shoemaker CB, and Verrey F. 1998. Functional heterodimeric amino acid transporters lacking cysteine residues involved in disulfide bond. *FEBS Lett* 439: 157-162.

72. Pickel VM, Nirenberg MJ, Chan J, Mosckovitz R, Udenfriend S, and Tate SS. 1993. Ultrastructural localization of a neutral and basic amino acid transporter in rat kidney and intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7779-7783.

73. Pineda M, Fernandez E, Torrents D, Estevez R, Lopez C, Camps M, Lloberas J, Zorzano A, and 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.

74. Pineda M, Wagner CA, Broer A, Stehberger PA, Kaltenbach S, Gelpi JL, Martin Del Rio R, Zorzano A, Palacin M, Lang F, and Broer S. 2004. Cystinuria-specific rBAT(R365W) mutation reveals two translocation pathways in the amino acid transporter rBAT-b0,+AT. *Biochem J* 377: 665-674.

75. Prasad PD, Wang H, Huang W, Kekuda R, Rajan DP, Leibach FH, and 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.

76. Quackenbush EJ, Gougos A, Baumal R, and Letarte M. 1986. Differential localization within human kidney of five membrane proteins expressed on acute lymphoblastic leukemia cells. *J Immunol* 136: 118-124.
77. Rajan DP, Huang W, Kekuda R, George RL, Wang J, Conway SJ, Devoe LD, Leibach FH, Prasad PD, and Ganapathy V. 2000. Differential influence of the 4F2 heavy chain and the protein related to b(0,+)-amino acid transport on substrate affinity of the heteromeric b(0,+)-amino acid transporter. *J Biol Chem* 275: 14331-14335.
78. Rajan DP, Kekuda R, Huang W, Devoe LD, Leibach FH, Prasad PD, and Ganapathy V. 2000. Cloning and functional characterization of a Na(+)-independent, broad-specific neutral amino acid transporter from mammalian intestine. *Biochim Biophys Acta* 1463: 6-14.
79. Reig N, Chillaron J, Bartoccioni P, Fernandez E, Bendahan A, Zorzano A, Kanner B, Palacin M, and Bertran J. 2002. The light subunit of system b(0,+)-amino acid transport is fully functional in the absence of the heavy subunit. *Embo J* 21: 4906-4914.
80. Rosenberg LE, Downing S, Durant JL, and Segal S. 1966. Cystinuria: biochemical evidence for three genetically distinct diseases. *J Clin Invest* 45: 365-371.
81. Rossier G, Meier C, Bauch C, Summa V, Sordat B, Verrey F, and Kuhn LC. 1999. LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J Biol Chem* 274: 34948-34954.
82. Saadi I, Chen XZ, Hediger M, Ong P, Pereira P, Goodyer P, and Rozen R. 1998. Molecular genetics of cystinuria: mutation analysis of SLC3A1 and evidence for another gene in type I (silent) phenotype. *Kidney Int* 54: 48-55.
83. Sato H, Tamba M, Ishii T, and 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.
84. Schafer JA and Watkins ML. 1984. Transport of L-cystine in isolated perfused proximal straight tubules. *Pflugers Arch* 401: 143-151.
85. Segal S, McNamara PD, and Pepe LM. 1977. Transport interaction of cystine and dibasic amino acids in renal brush border vesicles. *Science* 197: 169-171.
86. Segel IH. 1990. Biochemical calculations. How to solve mathematical problems in general biochemistry. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley & Sons, Inc.
87. Shayakul C and Alper SL. 2004. Defects in processing and trafficking of the AE1 Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger associated with inherited distal renal tubular acidosis. *Clin Exp Nephrol* 8: 1-11.

88. Sigel E. 1990. Use of *Xenopus* oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins. *J Membr Biol* 117: 201-221.
89. Skach WR. 2000. Defects in processing and trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Kidney Int* 57: 825-831.
90. Soreq H. 1985. The biosynthesis of biologically active proteins in mRNA-microinjected *Xenopus* oocytes. *CRC Crit Rev Biochem* 18: 199-238.
91. States B and Segal S. 1990. Cystine and dibasic amino acid uptake by opossum kidney cells. *J Cell Physiol* 143: 555-562.
92. Tate SS, Yan N, and Udenfriend S. 1992. Expression cloning of a Na(+)-independent neutral amino acid transporter from rat kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 1-5.
93. Torrents D, Estevez R, Pineda M, Fernandez E, Lloberas J, Shi YB, Zorzano A, and Palacin M. 1998. Identification and characterization of a membrane protein (γ +L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity γ +L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance. *J Biol Chem* 273: 32437-32445.
94. 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 ML, Aula P, and Palacin M. 1999. Identification of SLC7A7, encoding γ +LAT-1, as the lysinuric protein intolerance gene. *Nat Genet* 21: 293-296.
95. Van Winkle LJ, Campione AL, and Gorman JM. 1988. Na⁺-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.
96. Verrey F, Jack DL, Paulsen IT, Saier MH, Jr., and Pfeiffer R. 1999. New glycoprotein-associated amino acid transporters. *J Membr Biol* 172: 181-192.
97. Volkl H and Silbernagl S. 1982. Mutual inhibition of L-cystine/L-cysteine and other neutral amino acids during tubular reabsorption. A microperfusion study in rat kidney. *Pflugers Arch* 395: 190-195.
98. Volkl H and Silbernagl S. 1982. Reexamination of the interplay between dibasic amino acids and L-cystine/L-cysteine during tubular reabsorption. *Pflugers Arch* 395: 196-200.
99. Wagner CA, Lang F, and Broer S. 2001. Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C1077-1093.
100. Wang Y and Tate SS. 1995. Oligomeric structure of a renal cystine transporter: implications in cystinuria. *FEBS Lett* 368: 389-392.

101. Wells RG and Hediger MA. 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 U S A* 89: 5596-5600.

102. Yan N, Mosckovitz R, Udenfriend S, and Tate SS. 1992. Distribution of mRNA of a Na(+)-independent neutral amino acid transporter cloned from rat kidney and its expression in mammalian tissues and *Xenopus laevis* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 9982-9985.

103. Zasloff M. 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 5449-5453.

7 Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Freund und Betreuer Carsten Wagner für die stets hervorragende und geduldige Betreuung dieser Arbeit. Er ermöglichte mir weit über diese Promotion hinaus den hochinteressanten Zugang zur Wissenschaft.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Florian Lang danke ich für das Überlassen dieses Themas und die Möglichkeit der Promotion, sowie für viele anregende und heitere Diskussionen.

Frau Birgitta Noll möchte ich für die große Hilfsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung bei der Arbeit im Labor, wie die Synthese der cRNA und deren Injektion in die Oozyten herzlich danken.

Prof. Dr. Siegfried Waldegger danke ich für die Konstruktion der hrBAT T216M-Mutante.

Für die gute, kollegiale Atmosphäre bei der Laborarbeit möchte ich mich bei Carsten Wagner, Michael Ott, Birgitta Noll, Ivano Moschen, Alexandra Albers und Jürgen Bock, sowie allen anderen Mitarbeitern des Physiologischen Instituts bedanken.

Herzlichst bedanke ich mich bei meinen Eltern, die diese Arbeit und das ganze Medizinstudium mit größtmöglicher Unterstützung begleiteten.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Paul Stehberger
Geburtstag und -ort 25.07.1976 – Tübingen

Schulbildung

1982-1986 Grundschule Winkelwiese in Tübingen
1986-1995 Uhland-Gymnasium in Tübingen
27. Juni 1995 Abitur

Wehrdienst

Oktober 1995 bis Juli 1996 4./Gebirgsjägerbataillon 233 in Mittenwald

Studium

Oktober 1996 Beginn des Medizinstudiums an der Eberhard Karls Universität Tübingen
7. September 1998 Ärztliche Vorprüfung
31. August 1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 1999 bis Juni 2000 Studium an der Medizinischen Fakultät der Università degli studi di Padova (Italien)
27. März 2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
12. November 2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Abschluss des Medizinstudiums

Berufsausbildung

Januar 2004 bis April 2005 Assistent am Physiologischen Institut der Universität Zürich (Schweiz)
Seit Juli 2005 Assistenzarzt auf der Abteilung für Innere Medizin am Ospedale della Beata Vergine in Mendrisio (Schweiz)

Publikationen

Wagner CA, Kovacicova J, Stehberger PA, Winter C, Benabbas C, Mohebbi N. 2005. Renal Acid-Base Transport: Old and New Players. *Nephron Physiol.* 103(1):p1-p6.

Stehberger PA, Schulz N, Finberg KE, Karet FE, Giebisch G, Lifton RP, Geibel JP, Wagner CA. 2003. Localization and regulation of the ATP6V0A4 (a4) vacuolar H⁺-ATPase subunit defective in an inherited form of distal renal tubular acidosis. *J Am Soc Nephrol.* 14(12):3027-38.

Finberg KE, Wagner CA, Stehberger PA, Geibel JP, Lifton RP. 2003. Molecular cloning and characterization of Atp6v1b1, the murine vacuolar H⁺ -ATPase B1-subunit. *Gene.* 318:25-34.

Pineda M, Wagner CA, Broer A, Stehberger PA, Kaltenbach S, Gelpi JL, Martin Del Rio R, Zorzano A, Palacin M, Lang F, Broer S. 2004. Cystinuria-specific rBAT(R365W) mutation reveals two translocation pathways in the amino acid transporter rBAT-b0,+AT. *Biochem J.* 377(Pt 3):665-74.

Wagner CA, Finberg KE, Stehberger PA, Lifton RP, Giebisch GH, Aronson PS, Geibel JP. 2002. Regulation of the expression of the Cl⁻/anion exchanger pendrin in mouse kidney by acid-base status. *Kidney Int.* 62(6):2109-17.