

Mutationsspektrum in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 bei
jugendlichen Cystinuriepatienten

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Elke Maria Botzenhart

aus

Aachen

Berichter: Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Klaus Zerres

Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Jürgen Floege

Tag der mündlichen Prüfung: 15. September 2003

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung und Fragestellung	1
II	Grundlagen	3
1.	Cystinurie (OMIM 220100)	3
1.1	Ätiologie der Erkrankung und Vererbungsformen	3
1.2	Biochemische Typisierung	4
1.3	Häufigkeit	5
1.4	Diagnosestellung und klinische Symptomatik	6
1.5	Biochemische Analyseverfahren	8
1.6	Therapieoptionen	9
2.	Molekularbiologische Grundlagen	11
2.1	Aufbau und Funktionsweise des Cystintransporters rBAT/b ^{0,+} AT	12
2.1.1	Genetik der Untereinheiten des Transporters	15
2.1.2	SLC3A1/rBAT (OMIM 104614)	15
2.1.3	SLC7A9/b ^{0,+} AT (OMIM 604144)	16
2.2	Bekannte Sequenzabweichungen in den Genen SLC3A1 und SLC7A9	17
2.2.1	SLC3A1-Gen	18
2.2.2	SLC7A9-Gen	20
2.2.3	Expressionsstudien - funktionelle Charakterisierung	22
III	Material und Methoden	24
1.	Patientenkollektiv	24
2.	Arbeitsmaterialien	25
2.1	Geräte und Arbeitsutensilien	25
2.2	Chemikalien	27
2.3	Oligonukleotidprimer	27
2.4	Feinchemikalien und Enzyme	29
3.	Methoden	29
3.1	Isolation menschlicher genomischer DNA	29
3.1.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung	31
3.2	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)	31
3.3	Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte	35
3.3.1	Auftrennung im Agarosegel	35
3.3.2	Single-Strand-Conformation-Polymorphism-Analysis (SSCP)	36
3.3.3	Detektion der SSCP-Fragmente durch Silberfärbung	38
3.4	Direkter Mutationsnachweis	39
3.4.1	Mutationsnachweis durch Restriktionsspaltung	40
3.4.2	Mutationsnachweis durch direktes Sequenzieren nach Sanger	42
IV	Ergebnisse	46
1.	Isolation genomischer DNA aus gefrorenem Blut	47
2.	Etablierung der PCR-Bedingungen für das SLC3A1- und SLC7A9-Gen	48
3.	Mutationsscreening mittels SSCP-Analyse	48
4.	Direkter Mutationsnachweis	51
4.1	Mutationsnachweis durch Restriktionsverdau	51
4.2	Mutationsnachweis durch Sequenzierung	52
5.	Ergebnisse des Mutationsscreenings	53
5.1	Mutationen im SLC3A1-Gen	57
5.1.1	T216M (c647C/T), Exon 3	58

5.1.2	R270X (c808C/T), Exon 4	58
5.1.3	R362C (c1084C/T) und R365W (c1093C/T), Exon 6	59
5.1.4	IVS6+del2/3T	60
5.1.5	M467T (c1400T/C), Exon 8	60
5.1.6	P508A (c1523C/G), Exon 9	61
5.1.7	S547W (c1640C/G), Exon 10	62
5.1.8	c1749_1751del, Exon 10	62
5.2	Polymorphismen im SLC3A1-Gen	62
5.2.1	nt114C/A, Exon 1	63
5.2.2	nt231T/A, Exon 1	63
5.2.3	nt1035G/A, Exon 6	64
5.2.4	nt1854A/G (M618I), Exon 10	64
5.2.5	nt2189C/T, 3'untranslatierte Region	65
5.3	Mutationen im SLC7A9-Gen	65
5.3.1	G105R (c496G/A), Exon 4	66
5.3.2	A224V (c856C/T), Exon 6	66
5.3.3	c969_971del, Exon 8	67
5.3.4	A331V (c1177C/T), Exon 10	67
5.4	Polymorphismen im SLC7A9-Gen	68
5.4.1	c147C/T, Exon 2.1	69
5.4.2	c386C/T, Exon 3	69
5.4.3	c420+22T/G, Intron 3	70
5.4.4	c584C/T, c596T/C, c610T/C, c663+10T/C, Exon 4	70
5.4.5	c692C/T, Exon 5	70
5.4.6	c852C/A und c872C/T, Exon 6	71
5.4.7	c1157G/A, Exon 9 und c1162+51G/A, Intron 9	71
5.4.8	c1328C/T, Exon 11	71
V	Diskussion	73
1.	Sensitivität der angewandten Screeningmethoden	73
1.1	Polymerasekettenreaktion	73
1.2	SSCP	74
1.3	Restriktionsverdau	75
2.	Ergebnisse des Mutationsscreenings	76
2.1	Interpretation der erzielten Mutationsdetektionsraten	77
2.2	Mutationen im SLC3A1-Gen	79
2.3	Mutationen im SLC7A9-Gen	82
3.	Polymorphismen in SLC3A1 und SLC7A9	84
3.1	Polymorphismen in SLC3A1	85
3.2	Polymorphismen in SLC7A9	88
3.3	Diskussion der Bedeutung einzelner Polymorphismen im Hinblick	88
	auf den klinischen Schweregrad der Erkrankung	
3.3.1	SLC3A1-Gen	88
3.3.2	SLC7A9-Gen	89
4.	Genotyp-Phänotyp Korrelation	90
5.	Modellvorstellungen zur Funktion der Untereinheiten-Interpretation	92
	in Bezug auf den Erbgang	
6.	Einfluß weiterer Gene auf die Erkrankung	92
7.	Ausblick	93
VI	Zusammenfassung	95

VII Literaturverzeichnis	97
VIII Abbildungsverzeichnis	108
IX Tabellenverzeichnis	109
X Anhang.....	110
XI Danksagung.....	111
XII Publikationen.....	112
XIII Lebenslauf	113

I Einleitung und Fragestellung

Die Cystinurie stellt ein erbliches Nierensteinleiden dar, das auf einen renalen tubulären Defekt der Reabsorption von Cystin und der dibasischen Aminosäuren Lysin, Ornithin und Arginin zurückzuführen ist. Durch die Überschreitung des Löslichkeitsproduktes von Cystin kommt es zur Präzipitation und infolgedessen zur rezidivierenden Bildung von Nierensteinen. Die Steinbildung selbst und alle daraus resultierenden Komplikationen bestimmen den Krankheitsverlauf.

Die Inzidenz der Erkrankung in der Bevölkerung beträgt 1:7000. Somit zählt die Cystinurie zu den häufigsten erblichen Erkrankungen weltweit. Unter den Nierensteinerkrankungen beträgt der Anteil der Cystinurie etwa 1% bei Erwachsenen und 6-8% bei Kindern.

Der den oben genannten Reabsorptionsdefekt bedingende Transporter ist in der apikalen Membran der proximalen Nierentubuli lokalisiert. Er setzt sich aus zwei Untereinheiten (rBAT und b^{0,+}AT) zusammen, die von den Genen SLC3A1 und SLC7A9 kodiert werden.

Die schwere Untereinheit rBAT hat hierbei eine entscheidende Bedeutung bei dem Transport des funktionellen Transporters in die apikale Membran, wohingegen der leichten Untereinheit b^{0,+}AT die katalytische Aktivität zugeschrieben wird.

Defekte in einer der beiden Untereinheiten führen zu einer verminderten Transportaktivität bzw. dem völligen Funktionsverlust des Transporters und infolgedessen zu erhöhten Konzentrationen von Cystin und den dibasischen Aminosäuren im Harn.

Die Erkrankung wird mittels eines Aminosäureprofils aus dem Harn Betroffener sowie deren Angehöriger biochemisch in verschiedene Subtypen unterteilt, die mit Mutationen in den beiden Genen SLC3A1 und SLC7A9 assoziiert sind. Dabei zeigt die Typ I-Cystinurie, die durch Mutationen im SLC3A1-Gen hervorgerufen wird, einen autosomal-rezessiven Erbgang, die nicht-Typ I-Cystinurie, bedingt durch Mutationen im SLC7A9-Gen, einen autosomal-dominanten Erbgang mit variabler Penetranz.

Es werden auch eine gemischte Heterozygotie für Mutationen in beiden Genen sowie eine Form der isolierten Cystinurie beschrieben. Bei der letztgenannten ist das Ausmaß der Beteiligung der beiden bisher bekannten Gene am Krankheitsbild bislang unklar. Die Rolle weiterer indirekt am Resorptionsmechanismus von Cystin beteiligter Transporter wird für wahrscheinlich gehalten.

Für einige in beiden Genen bekannte Mutationen wurde ein populationsspezifisch gehäuftes Auftreten beschrieben. Die Mutation M467T im SLC3A1-Gen soll hierbei

vor allem unter italienischen und spanischen Patienten gehäuft auftreten, die Mutation T216M vor allem unter griechischen Patienten. Die im SLC7A9-Gen gehäuft bei libyschen Juden nachgewiesene Mutation V170M wurde auf einen in dieser Population vorliegenden Founder-Effekt zurückgeführt.

Bestimmte in beiden Genen beschriebene Polymorphismen sollen eine Prävalenz bestimmter Haplotypen unter Patienten zeigen, die mit dem Ausmaß der Erkrankung korrelieren könnte.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluß von Mutationen in den beiden Genen SLC3A1 und SLC7A9 auf die Pathogenese frühmanifestester Formen der Cystinurie untersucht werden. Zu diesem Zweck erfolgte das Screening der kodierenden Bereiche beider Gene sowie der Exon/Intron-Übergänge innerhalb eines Kollektives biochemisch klassifizierter pädiatrischer Patienten. Zusätzlich wurde eine zweite Gruppe unklassifizierter Patienten untersucht, die sich aufgrund der rezidivierenden Bildung von Cystin-Nierensteinen in Behandlung befanden. Die Mutationsdetektionsraten in beiden Genen sollten in beiden Gruppen unabhängig voneinander bewertet werden. Zudem sollte der Vergleich der Mutationshäufigkeiten innerhalb der einzelnen Gruppen sowie der Gruppen untereinander Rückschlüsse auf das Manifestationsalter und den Schweregrad der Erkrankung ermöglichen.

Durch den Vergleich der erhaltenen Detektionsraten für beide Gene im Gesamtkollektiv mit den in der Literatur genannten Werten sollte eine Beurteilung der zur Mutationssuche angewandten Methodik stattfinden. Die Untersuchung der Häufigkeiten der ebenfalls in der Literatur beschriebenen Polymorphismen sollte zur Klärung der Präferenzen bestimmter Haplotypen innerhalb der Patientengruppe beitragen. Der Einfluß neu identifizierter Sequenzvarianten auf das Krankheitsbild wird diskutiert.

II Grundlagen

1. Cystinurie (OMIM 220100)

Die Cystinurie macht von den weltweit mit einer Häufigkeit von 15% auftretenden Nierensteinerkrankungen etwa 1% aus [Stapleton et al. 1987]. Der Prozentsatz liegt dabei mit 6-8% bei Kindern deutlich über dem vorgenannten für Erwachsene [Milliner 1990].

Der Erkrankung liegt ein genetischer Defekt zugrunde, der in einer verminderten renalen und intestinalen Cystinreabsorption resultiert [Dent u. Rose 1951].

Im Vordergrund steht hierbei der renale Defekt, der zur rezidivierenden Bildung von Nierensteinen führt und oftmals chirurgische Interventionen notwendig macht. Der intestinale Defekt bleibt in der Regel folgenlos.

Bisher konnten zwei die Erkrankung verursachende Gene beschrieben werden: Das SLC3A1-Gen und das SLC7A9-Gen [Calonge et al. 1994, Pras et al. 1995, International Cystinuria Consortium 1999, Feliubadaló et al. 1999]. Mutationen verursachen im Falle des SLC3A1-Gens die Typ I-Cystinurie [Calonge et al. 1994], im Falle des SLC7A9-Gens die nicht-Typ I-Cystinurie [Font et al. 2001, International Cystinuria Consortium 2001]. Bei Vorliegen von jeweils einer Mutation in beiden Genen spricht man von der sogenannten Mixed-type-Cystinurie [International Cystinuria Consortium 1999, Palacín et al. 2000].

Die Produkte der genannten Gene bilden einen heterodimeren Aminosäure-transporter, der die Aufnahme von Cystin und der dibasischen Aminosäuren Lysin, Arginin und Ornithin bewirkt. Dieser ist in der apikalen Membran des proximalen Tubulus des Nephrons lokalisiert [Pfeiffer et al. 1999].

1.1 Ätiologie der Erkrankung und Vererbungsformen

Ursächlich liegen der Erkrankung genetische Defekte in den beiden Genen SLC3A1 und SLC7A9 zugrunde. Es wird jedoch die Existenz weiterer, bisher nicht charakterisierter Gene für wahrscheinlich gehalten, die zum Krankheitsbild beitragen [Bisceglia et al. 2001, International Cystinuria Consortium 2001].

Aufgrund des biochemischen Musters bei heterozygoten Anlageträgern bzw. homozygot Betroffenen nimmt man verschiedene Vererbungsformen der Cystinurie an. Die Typ I-Cystinurie wird autosomal-rezessiv vererbt. Heterozygote Anlageträger zeigen

keine Erhöhung von Cystin und der dibasischen Aminosäuren im Harn [Goodyer et al. 1998] und bilden keine Nierensteine.

Die nicht-Typ I-Cystinurie wird autosomal-dominant vererbt, zeigt jedoch eine variable Penetranz [Palacín et al. 1999]. Heterozygote Anlageträger weisen eine variable Erhöhung von Cystin und der dibasischen Aminosäuren im Urin auf [Goodyer et al. 1998] und können Nierensteine ausbilden. Bei gemischt Heterozygoten liegt eine Mischform der beiden Erbgänge vor. Dabei liegt die Exkretion von Cystin und der dibasischen Aminosäuren unter der von Typ I/Homozygoten [Palacín et al. 2000]. Dies repräsentiert eine insgesamt mildere Verlaufsform der Erkrankung [Goodyer et al. 1998].

Es wurde auch ein Fall von isolierter Cystinurie berichtet, d.h. alleinige Erhöhung der Cystinwerte im Harn, während die Werte für die dibasischen Aminosäuren im Normbereich liegen [Brodehl et al. 1967]. Durch weitere Untersuchung der Patientin konnte ein Defekt im SLC3A1-Gen ausgeschlossen werden. Die im SLC7A9-Gen detektierten Mutationen wurden allerdings für sich alleine genommen als nicht ausreichend zur Begründung der Krankheitsgenese betrachtet [Schmidt, Diplomarbeit 2000]. Somit bleibt der Zusammenhang mit den bisher beschriebenen Formen der Cystinurie derzeit unklar.

1.2 Biochemische Typisierung

Die Typisierung der Betroffenen erfolgt in der Regel durch Erstellung eines Aminosäure-Profils aus dem Harn der Eltern, die obligat heterozygote Anlageträger für die Erkrankung sind (siehe hierzu auch Tabelle 1, S.5). Anhand dieses Aminosäureprofils sowie der intestinalen Absorption von Cystin und der dibasischen Aminosäuren homozygot Betroffener wurden drei Subtypen der Erkrankung beschrieben [Rosenberg et al. 1966]:

Die für Typ I-heterozygoten Anlageträger zeigen ein normales Aminosäureprofil (0-100µmol Cystin/g Kreatinin), Typ II-Anlageträger zeigen eine starke (990-1740µmol Cystin/g Kreatinin) und Typ III-Anlageträger eine mäßige (100-600µmol Cystin/g Kreatinin) Erhöhung von Cystin und der dibasischen Aminosäuren im Urin (Cystinwerte im Urin nach Goodyer et al. 1998).

Nach oraler Gabe von Cystin zeigt sich bei Typ I- und Typ II-Homozygoten nur ein minimaler Anstieg in der Plasmakonzentration dieser Aminosäuren, wohingegen bei Typ III-Homozygoten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen ein Anstieg bis auf fast normale Werte beobachtet wurde [Rosenberg et al. 1966]. Da Typ II Anlage-

träger stark erhöhte Cystinkonzentrationen im Urin zeigen, ist eine Differenzierung zu homozygot Betroffenen allein aufgrund der Cystinexkretion nicht möglich. Die weitere Differenzierung sollte daher durch Vergleich der Ausscheidung der Summe der dibasischen Aminosäuren und Cystin erfolgen, die eine Unterscheidung dieser beiden Gruppen ermöglicht [Pras et al.1998^a].

Neuere molekulargenetische Studien konnten die auf Rosenberg et al. (1966) und Goodyer et al. (1998) zurückzuführende o.g. Klassifikation in drei Subtypen nicht bestätigen und zeigen, daß aufgrund der Aminosäureexkretion im Harn Heterozygoter lediglich zwei Typen unterschieden werden können: Typ I-heterozygote und nicht-Typ I-heterozygote Anlageträger [International Cystinuria Consortium 1999, Langen et al. 2000].

Zudem wird durch Kopplungsanalysen die Möglichkeit eines gemeinsamen genetischen Hintergrundes der vormals getrennt betrachteten Subtypen II und III für wahrscheinlich gehalten [Bisceglia et al. 2001].

Typisierung	Cystin ($\mu\text{mol/g}$ Kreat.)	Ornithin ($\mu\text{mol/g}$ Kreat.)	Lysin ($\mu\text{mol/g}$ Kreat.)	Arginin ($\mu\text{mol/g}$ Kreat.)
Typ I-heterozygote Anlageträger (normale Exkretion)	22-122	3-67	12-694	3-43
nicht-Typ I-heterozygote Anlageträger (mäßig erhöhte Exkretion)	52-2129	8-953	327-8153	9-550
Typ I-homozygote/ nicht- Typ I-homozygote gemischt-heterozygote Anlageträger (stark erhöhte Exkretion)	1565-4494	901-4569	5427-28530	325-8439

Tab.1: Aminosäureprofil im Harn obligat heterozygoter Anlagegeträger sowie homozygot Betroffener nach Langen et al. 2000

1.3 Häufigkeit

Für das weltweite Auftreten der Cystinurie wird eine Inzidenz von 1:7000 angegeben [Segal und Thier, 1995]. Die daraus abgeleitete Heterozygotenfrequenz beträgt 1:42. Die Angaben zur Inzidenz weisen jedoch je nach Studienpopulation eine erhebliche Spannweite auf: So sind Häufigkeiten von 1:2000 unter Neugeborenen in England [Palacín et al. 2000], 1:2500 unter libyschen Juden [Weinberger et al.1974], 1:4000 unter Neugeborenen in Australien [Turner et al.1972], 1:17000 unter Neugeborenen in den USA [Levy et al. 1972] und 1:100000 in Schweden [Bostrom et al.1964] beschrieben worden.

Dies deutet zum einen auf eine populationsspezifische Häufigkeitsverteilung der Erkrankung hin, spiegelt jedoch andererseits in gewissem Rahmen auch Abweichungen wieder, die sich aus der Anwendung verschiedener Screening-Methoden ergeben. So wurde in einigen der o.g. Studien der Cyanid-Nitroprussid-Test angewandt, der zur Einschätzung der Krankheitshäufigkeit wegen fehlender Differenzierung des Homo- bzw. Heterozygotenstatus ungeeignet ist [Palacín et al. 2000]. Auch Neugeborenen-Screening-Programme lassen aufgrund der unvollständigen Ausreifung des renalen Tubulusapparates bis zum ersten Lebensjahr nur eine bedingte Einschätzung der Häufigkeit zu [Scriver et al. 1985]. Diese wird oftmals überschätzt. Somit wird ein Vergleich der populationsspezifischen Häufigkeiten problematisch.

1.4 Diagnosestellung und klinische Symptomatik

Rezidivierende Bildung von Nierensteinen und eine positive Familienanamnese erhärten den klinischen Verdacht auf das Vorliegen einer Cystinurie. Dieser wird durch die Bestimmung der Konzentration von Cystin und der dibasischen Aminosäuren (Lysin, Arginin und Ornithin) mittels HPLC-Analyse aus einem 24-Stunden Sammelurin bestätigt. Auch eine röntgendiffraktometrische Steinanalyse dient zur Sicherung der Diagnose. Die Beurteilung eines Urinsedimentes der Betroffenen ist ebenfalls möglich. Das präzipitierte Cystin ist in Form hexagonaler Kristalle im Sediment sichtbar. Über die Sensitivität dieser Methode herrscht allerdings Unklarheit. Während einige Autoren das Vorliegen von Cystinkristallen bei lediglich 17-26% homozygot betroffener Patienten beschreiben [Gupta et al. 1995], sprechen andere vom Auftreten der Kristalle in fast jeder Urinprobe Betroffener [Palacín et al. 2000].

Beim Vorliegen von Steinen kann deren Lage im Harntrakt sowie eine Abschätzung der Größe durch Ultraschalldiagnostik erfolgen. Exaktere Aussagen lassen sich durch Ausscheidungsurographie oder computertomographische Untersuchungen treffen. Im Einzelfall kann auch eine retrograde Pyelographie zur Lagebestimmung erforderlich werden. Röntgenologische Untersuchungen lassen aufgrund der schwachen Kontrastierung der Cystinsteine nur eine bedingte Lage- und Größeneinschätzung zu und sind daher nicht als Diagnostikmethode der ersten Wahl zu betrachten.

Die Steinbildung mit allen daraus resultierenden Komplikationen steht im Vordergrund der klinischen Symptomatik: So kann es zu Hämaturie, Infektionen und Koliken

mit Steinabgang kommen [Gupta et al. 1995]. Besonders schwere Fälle mit erforderlicher Nephrektomie, Dialyse oder Nierentransplantation werden ebenfalls beschrieben [Kelly et al. 1980, Linari et al. 1981, Krizek et al. 1983].

Zur Steinbildung kommt es aufgrund der geringen Löslichkeit des Cystins im Urin bei dem sowohl bei Gesunden als auch Betroffenen vorliegenden pH-Wert von 5,0-7,0 [Dörner 1998]. Wird das Löslichkeitsprodukt überschritten kommt es zur Auskristallisation von Cystin und anschließender Steinformation.

Die hexagonalen Cystinkristalle lassen sich im Harnsediment Betroffener nachweisen. Durch Assoziation der Kristalle kann es zur Konkrementbildung kommen. Die Größe der Steine reicht hierbei von Gries bis zu Nierenbeckenausgußsteinen, die zur Obstruktion und bei Infektion zu Begleitpyelonephritiden führen können. Die Steine besitzen eine glatte, wachsartige Oberfläche, sind blaßgelblich gefärbt und haben eine weiche Konsistenz.

Zusätzlich oder unabhängig vom Auftreten reiner Cystinsteine kann es in 21-43% der Fälle auch zur Bildung von Mischsteinen von Cystin mit Struvit, Calciumoxalat oder Calciumphosphat kommen. In 9-13% der Fälle kommt es zum Vorliegen von Steinen, die kein Cystin enthalten [Gupta et al. 1995]. Die Entstehung der Mischsteine wird unter anderem auf die therapeutische Harnalkalisierung mit Natriumbicarbonat, Sekundärinfektionen und begleitende prädisponierende Stoffwechselerkrankungen zurückgeführt [Gupta et al. 1995].

Die Angaben über das Manifestationsalter variieren stark: Stephens et al. (1989) berichteten eine Steinbildung in der ersten Lebensdekade bei 25% der symptomatischen Patienten. Weitere 50% bildeten Steine in der zweiten Lebensdekade aus.

Goodyer et al. (1998) stellten bei 50% der homozygot betroffenen Typ-I Cystinuriker eine Steinbildung in der ersten Lebensdekade fest.

Pras et al. (1998^a) beschrieben eine Steinbildung bei 85% der homozygot betroffenen nicht-Typ I-Anlageträger (mittleres Alter bei Auftreten der Symptome 12 ± 10 Jahre) sowie bei 13% der nicht-Typ I heterozygot Betroffenen (Alter der ersten Steinbildung 30 bzw. 65 Jahre).

Insgesamt erweist sich eine Risikoeinschätzung zur Steinbildung als schwierig.

Pras et al. (1998^a) und Palacín et al. (2000) beschrieben, dass der Schweregrad der Erkrankung selbst unter Geschwistern einer starken Variabilität unterliegt. So erlitten zwei homozygot betroffene Geschwister bereits im Alter von 11 bzw. 13 Jahren Nierenkoliken, wohingegen das dritte homozygot betroffene Kind bis ins Alter von 26

Jahren asymptomatisch war, ohne jemals eine Therapie erhalten zu haben [Pras et al. 1998^a]. Dies führt zu der Annahme, daß es zusätzlich zu vorliegenden Mutationen weitere Determinanten der Steinbildung gibt, die starke Auswirkung auf den klinischen Schweregrad der Erkrankung haben. Bei diesen multifaktoriellen Determinanten handelt es sich u.a. um den pH-Wert des Urins, das Harnvolumen, Sekundärinfektionen, fehlendes oder mangelndes Vorliegen von Steininhibitoren und weitere bisher nicht identifizierte Umweltfaktoren.

1.5 Biochemische Analyseverfahren

Screeningversuche zur frühzeitigen Erfassung Betroffener und adäquater Therapieeinleitung vor dem Auftreten erster Steine sind möglich, werden aber nicht in allen Ländern praktiziert. Der häufig angewandte Cyanid-Nitroprussid-Test stellt dabei eine qualitative Nachweismöglichkeit von Cystin im Harn dar. Die Nachweisgrenze liegt bei einer Cystinausscheidung über 75mg/g Kreatinin. Das im Urin enthaltene Cystin wird durch Cyanid zu Cystein reduziert und die Lösung färbt sich in Anwesenheit von Nitroprussid rot. Dies geschieht durch Bindung von Nitroprussid an den Sulfidrest des Cysteins. Der Test erfaßt sowohl homozygot Betroffene, gemischt Heterozygote als auch nicht-Typ I-Heterozygote Merkmalsträger. Biochemische Untersuchungsverfahren zur weiteren Differenzierung sind erforderlich.

Interpretationsschwierigkeiten des Tests ergeben sich beim Vorliegen von Harnbestandteilen, die durch Wechselwirkung mit einer der beiden Hauptkomponenten zu falsch positiven Testergebnissen führen können. Dies ist der Fall bei Vorliegen von Homocystinurie, Acetonurie oder bei Patienten, die schwefelhaltige Medikamente wie z.B. N-Acetylcystein einnehmen [Pahira 1987]. Nicht-Typ I-Heterozygote mit nur leicht erhöhten Cystinwerten könnten der Detektion durch den Test entgehen [Gupta et al. 1995].

Bei Neugeborenen erfolgt die vollständige Ausreifung des tubulären Rückresorptionsmechanismus für Cystin und die dibasischen Aminosäuren innerhalb der ersten zwölf Lebensmonate [Scriver et al. 1985]. Alle vor diesem Zeitraum durchgeführten Untersuchungen lassen lediglich einen bedingten Rückschluß auf das Vorliegen der Erkrankung zu. So beschrieben bereits Brodehl et al. (1968) und Buehler et al. (1981) eine erhöhte Cystinexkretion bei Neugeborenen im Alter von weniger als sechs Monaten, die auf die Unreife des renalen Tubulusapparates zurückzuführen war. Quantitative Analysen vor Erreichen des zwölften Lebensmonates erlauben

ebenfalls keine Differenzierung des Homo- bzw. Nicht-Typ I-Heterozygotenstatus der Anlageträger [Scriver et al. 1985].

Desweiteren sind differentialdiagnostisch andere Ursachen für das Vorliegen einer erhöhten Cystinexkretion wie z.B. das Fanconi-Syndrom und andere organische Hyperaminoacidurien auszuschließen [Gupta et al. 1995].

1.6 Therapieoptionen

Eine kausale Therapie ist vor dem genetischen Hintergrund der Erkrankung derzeit nicht möglich. Die Behandlung beschränkt sich daher auf Maßnahmen zur gezielten Harnsteinmetaphylaxe und Vermeidung aller daraus resultierenden Komplikationen.

Das primäre Ziel ist eine Senkung der Cystinkonzentration im Harn. Diese kann auf verschiedene Art und Weise erreicht werden. An erster Stelle ist hierbei eine Erhöhung des Harnvolumens zu nennen, die zu einer relativen Erniedrigung der Cystinkonzentration führt, so daß das Löslichkeitsprodukt nicht überschritten wird.

Zu diesem Zweck ist eine gleichmäßig über den Tag verteilte Flüssigkeitsaufnahme von etwa 2,5-4l notwendig, die auch die Flüssigkeitsaufnahme während der Nacht einschließen sollte, um einen Konzentrationsanstieg während dieser Zeit zu verhindern [Gupta et al. 1995]. Da die Löslichkeit des Cystins in Abhängigkeit vom pH-Wert des Urins steigt und bei einem pH-Wert von 8 bereits bei 1000mg/l liegt [Dent und Senior 1955] sollte zusätzlich zur Trinkmengenerhöhung eine Harnalkalisierung erfolgen. Diese wird durch Gabe von Citrat, Bicarbonat oder Mischpräparaten erreicht. Da Kaliumhaltige Präparate die sekundäre Bildung von Mischsteinen aus Calcium und Cystin weniger fördern, sollten diese Natriumhaltigen Präparaten vorgezogen werden [Sakhaee et al. 1983, Pak et al. 1986].

Das Risiko für die Bildung von Calcium-Steinen durch erhöhte Hydroxyapatit-Konzentration im Harn im alkalischen Milieu steigt. Deshalb sollten regelmäßige Kontrollen des pH-Wertes erfolgen. Der therapeutische Bereich liegt bei einem pH-Wert von 7,2-7,5 [Gupta et al. 1995].

Eine weitere therapeutische Möglichkeit besteht darin, die Disulfidbindung des Cystins zu spalten und das entstehende Cystein, dessen Löslichkeit über der des Cystins liegt, zu komplexieren. Bei den derzeit zu diesem Zweck eingesetzten Medikamenten handelt es sich um D-Penicillamin und α -Mercaptopropionylglycin. Die Reduktionsreaktion und Komplexbildung wird durch ein alkalisches Milieu gefördert [Gupta et al. 1995]. Beide Medikamente können schwere Nebenwirkungen

hervorrufen, die u.a. Hautausschlag, Arthralgien, Fieber, Panzytopenie, Epidermolyse, Geschmacksstörungen, Übelkeit, Erbrechen, Anorexie, Proteinurie, nephrotisches Syndrom und eine Thrombozytopenie einschließen. Nebenwirkungen unter der Therapie mit α -Mercaptopropionylglycin sind weniger häufig und schwerwiegend. Eine verminderte Häufigkeit der Steinbildung wurde in 81-94% der Patienten beobachtet, Remission bei 63-71% und vollständiges Lösen der Steine in etwa 30-40% der Fälle [Gupta et al. 1995].

Studien zur Wirkung von Captopril als Reduktionsmittel und Chelatbildner sind sehr widersprüchlich und die Ergebnisse z.T. nicht reproduzierbar. Palacín et al. (2000) mutmaßten, daß die verschiedenen Ergebnisse vorausgehender Studien eher auf Effekte, die die renale Durchblutung und glomeruläre Filtrationsrate von Cystin betreffen zurückzuführen seien, als auf die chelatbildende Wirkung des Medikamentes. Diätetische Maßnahmen zur Reduktion von Cystin beinhalten eine Verminderung der Kochsalzaufnahme [Jaeger et al. 1986] oder eine methioninarme Diät. Da Methionin metabolisch zu Cystin umgesetzt wird, könnte eine verminderte Aufnahme theoretisch die Cystinproduktion herabsetzen. Die Einhaltung dieser Diät erweist sich jedoch als praktisch fast unmöglich, da Methionin in nahezu allen Lebensmitteln enthalten ist. Studien zum Metabolismus zeigten zudem, daß das mit der Nahrung aufgenommene Methionin zu etwa 96% zu körpereigenem Protein umgewandelt wird und somit der tatsächlich zu Cystin verstoffwechselte Anteil vergleichsweise gering ist [Weinberg et al. 1952].

Kommt es trotz der o.g. präventiven Maßnahmen zur Größenzunahme bereits bestehender Steine bzw. der Formation neuer Steine wird ein urologischer Eingriff meist unumgänglich. Die Art der angewandten Steinsanierung hat dabei geringen Einfluß auf das Wiederholungsrisiko [Chow et al. 1998]. Auch das Erreichen eines steinfreien Status erniedrigte in einer Studie von Chow et al. (1998) nicht die Wahrscheinlichkeit des neuerlichen Auftretens von Steinen, es wurde lediglich eine Verlängerung des Zeitintervalls bis zum erneuten Auftreten von Steinen beobachtet. In Anbetracht des hohen Wiederholungsrisikos bei bereits betroffenen Steinträgern, der Gefahr von Komplikationen wie z.B. Infektionen und mit Rücksicht auf den Patienten sollte jedoch auf minimal invasive Verfahren zurückgegriffen werden. Hierbei sind vor allem die ESWL (Extracorporal shock wave lithotripsy), die perkutane ultrasonographische Lithotripsie, die ureterskopische Steinentfernung und die Chemolitholyse zu nennen.

Die ESWL zeigt bis zu einem Steindurchmesser von 1,5cm bessere Erfolge als bei größeren Steinen [Lingeman et al. 1987, Newman et al. 1987, Riehle et al. 1987], bei denen bevorzugt die perkutane ultrasonographische Lithotripsie zur Anwendung kommen sollte.

Insgesamt stellen Cystinsteine jedoch aufgrund der uniformen Gitterstruktur des reinen Cystins die am schwierigsten zu fragmentierenden Harnsteine dar [Dretjer, 1988]. Daher ist in der Mehrzahl der Fälle die Anwendung mehrerer Verfahren bis zum Erreichen des steinfreien Status erforderlich.

Bei Vorliegen von Harnwegsobstruktionen, infizierten Steinen oder Nierenbeckenausgußsteinen kann eine offen operative Steinentfernung unvermeidlich werden, auch wenn diese das Risiko einer zu einem späteren Zeitpunkt stattfindenden Nephrektomie erhöht [Daudon und Reveillaud 1985].

2. Molekularbiologische Grundlagen

Durch die renale glomeruläre Filtration gelangen Aminosäuren in Plasmakonzentrationen in die Tubulusflüssigkeit [Eisenbach et al. 1975]. Aus dieser erfolgt während der Passage durch das Nephron eine mehr als 98%ige Reabsorption durch aktive Transportmechanismen, die in Abhängigkeit vom Na^+ -Gradienten und intrazellulären Energiereservoirs stattfinden [Ullrich et al. 1974]. Für Cystin wurden bisher zwei Reabsorptionsmechanismen beschrieben [Silbernagl 1988]: Im S1- und S2-Segment des Nephrons (pars convoluta des proximalen Tubulus) werden etwa 90% des filtrierte Cystins über ein Transportsystem mit hoher Kapazität und niedriger Affinität reabsorbiert. Im S3-Segment des proximalen Tubulus (Pars recta) findet eine Cystinreabsorption mit geringer Kapazität jedoch hoher Affinität statt.

Der für die Erkrankung ursächliche Transportdefekt wurde dem in der luminalen Membran des S3-Segmentes gelegenen Cystintransporter zugeschrieben [Kanai et al. 1992, Furriols et al. 1993, Pickel et al. 1993, Calonge et al. 1994].

Der im S1 und S2-Segment gelegene Transportmechanismus wurde bisher nicht näher charakterisiert. Da Transportsysteme für Aminosäuren überlappende Transportspezifitäten zeigen [Palacín et al. 1998] ist anzunehmen, daß außer den o.g. Mechanismen noch andere Reabsorptionsformen existieren, die je nach Kompensationskapazität für den z.T. sehr variablen Ausprägungsgrad der Erkrankung mitverantwortlich sein könnten.

2.1 Aufbau und Funktionsweise des Cystintransporters rBAT/b⁰,+AT

Bei dem in der luminalen Membran des S3-Segmentes gelegenen Cystintransporter handelt es sich um ein Heterodimer, dessen Untereinheiten die Genprodukte des SLC3A1- und SLC7A9-Gens bilden [Chairoungdua et al. 1999, International Cystinuria Consortium 1999, Pfeiffer et al. 1999]. Die Lokalisation der von den o.g. Genen kodierten Untereinheiten im proximalen Tubulus des Nephrons erfolgte durch immunohistochemische Analysen.

Das Genprodukt des SLC3A1-Gens - rBAT - wird überwiegend im S3-Segment exprimiert, mit schwächerer Expression in den S1 und S2-Segmenten, wohingegen b⁰,+AT, das Genprodukt des SLC7A9-Gens in den S1 und S2-Segmenten stärker als im S3-Segment exprimiert wird [Chairoungdua et al. 1999, Pfeiffer et al. 1999].

Das geschilderte Verteilungsungleichgewicht gibt Anlaß zu der Annahme, daß weitere bisher unidentifizierte Assoziationsproteine für b⁰,+AT bzw. rBAT existieren [Chairoungdua et al. 1999, Pfeiffer et al. 1999, Goodyer et al. 2000, Verrey et al. 2000].

Die schwere Untereinheit des Transporters wird von rBAT, einem Typ II-Membran-glykoprotein mit einer Transmembrandomäne, intrazellulär gelegenem N-Terminus und einem extrazellulär gelegenen, glykosilierten, umfangreichen C-Terminus gebildet [Bertran et al. 1992, Tate et al. 1992, Wells und Hediger 1992, Verrey et al. 2000].

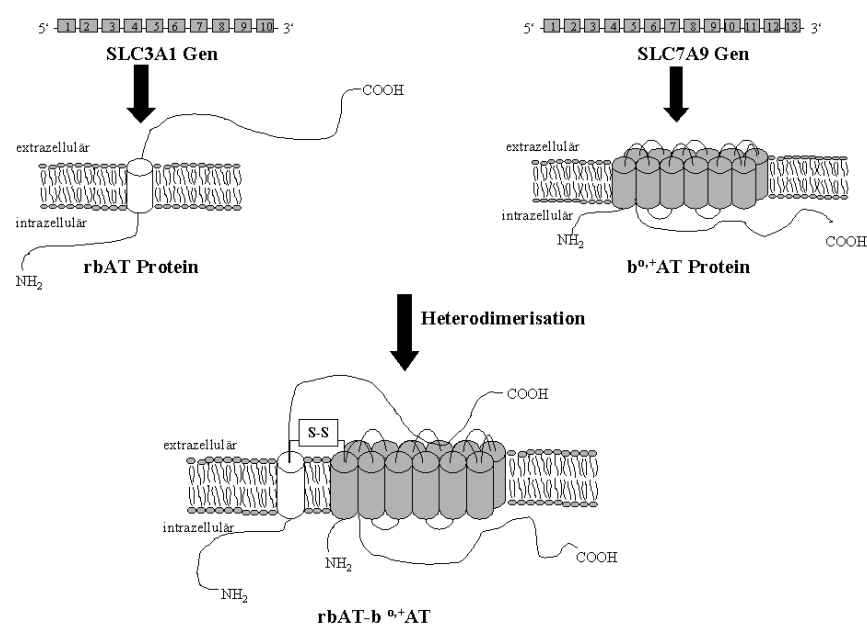


Abb.1: Aufbau des Transporters rBAT/b⁰,+AT

Die leichte katalytische Untereinheit $b^{0,+}AT$ besitzt zwölf Transmembrandomänen. Sowohl der N- als auch der C-Terminus liegen intrazellulär [Verrey et al. 2000].

Die Assoziation der Untereinheiten erfolgt über eine Disulfidbrücke. Diese wird zwischen zwei Cysteinresten der beiden Proteine gebildet (siehe hierzu auch Abb.:2, S.12). Der Cysteinrest der leichten Kette wurde in der extrazellulären Schleife zwischen der dritten und vierten Transmembrandomäne des Moleküls lokalisiert [Pfeiffer et al. 1999].

Die schwere Kette rBAT zeigt eine 30%ige Homologie mit dem in der basolateralen Membran von Epithelien exprimierten 4F2hc [Quackenbusch et al. 1986, Lumadue et al. 1987, Parmacek et al. 1989]. Beide Ketten spielen eine wichtige Rolle in der Bestimmung der Polarität der Oberflächenexpression der ihnen zugeordneten katalytischen leichten Ketten. Inwiefern die schweren Ketten auch modulierend in den Transport bzw. dessen Kinetik eingreifen ist bislang unklar [Pfeiffer et al. 1999, Verrey et al. 2000].

Der im S3-Segment gelegene Transporter vermittelt einen sekundär oder tertiär aktiven Transport von Aminosäuren [Verrey et al. 2000], der nicht natriumabhängig ist [Wells et al. 1992]. Es handelt sich zudem um einen obligatorischen Austausch von Aminosäuren, dessen stöchiometrisches Verhältnis 1:1 ist [Verrey et al. 2000].

Die Aufnahme von Cystin erfolgt über einen Konzentrationsgradienten im Austausch gegen eine neutrale Aminosäure. Intrazellulär wird das aufgenommene Cystin zur Aufrechterhaltung des Gradienten zu Cystein reduziert. Die ins Lumen exportierten neutralen Aminosäuren werden über einen ebenfalls in der apikalen Membran gelegenen Transporter (B^0) [Palacín et al. 1998, Pineda et al. 1999] gemeinsam mit Natrium zurückresorbiert. Dieser intrazellulär aufgebaute Konzentrationsgradient stellt vermutlich zusammen mit dem Membranpotential die treibende Kraft für die ebenfalls von rBAT/ $b^{0,+}AT$ katalysierte Aufnahme der dibasischen Aminosäuren Arginin, Ornithin und Lysin dar [Verrey et al. 2000].

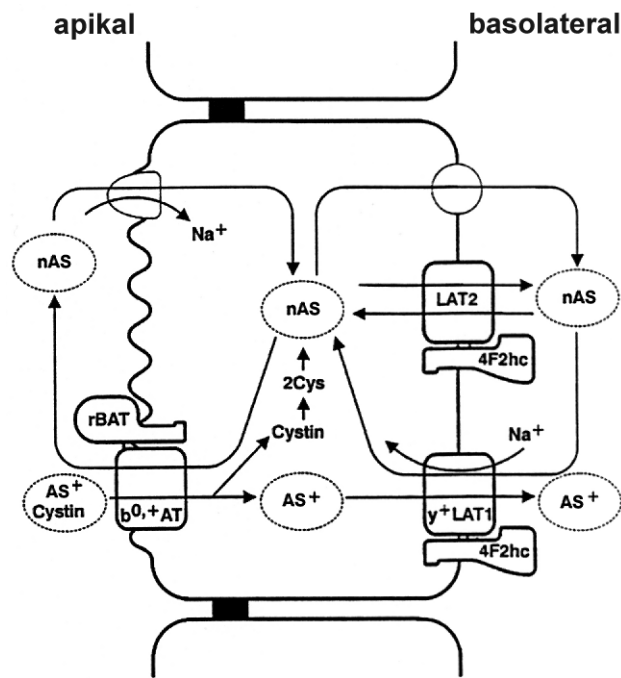


Abb.2: Resorptionsmechanismus für neutrale Aminosäuren im Tubuluslumen nach Verrey et al. 2000

Eine weitere Quelle zur Aufrechterhaltung des intrazellulären Gradienten für neutrale Aminosäuren sind die in der basolateralen Membran lokalisierten Transporter γ^+ LAT1 und LAT2. Diese exportieren im Fall von LAT2 das intrazellulär hochkonzentrierte L-Cystein im Austausch gegen eine neutrale Aminosäure ins Plasma [Meier und Verrey, unpublished results] wohingegen γ^+ LAT1 intrazelluläre kationische Aminosäuren im Austausch mit Natrium und neutralen Aminosäuren aus dem Plasma aus der Zelle entfernt [Verrey et al. 2000].

Mutationen im für den letztgenannten Transporter kodierenden Gen führen zu der autosomal-rezessiven Erkrankung Lysin-Protein-Intoleranz [Borsani et al. 1999, Torrents et al. 1999].

Trotz der bereits ausgeführten Erkenntnisse über die Funktionsweise des Transporters sind das Wissen über die Genregulation von rBAT und $b^{0,+}$ AT und deren Eingliederung in den Gesamtkontext der Aminosäureresorption im proximalen Tubulus bisher sehr gering [Palacín et al. 2000]. So wird z.B. auch der modifizierende Einfluß regulatorischer Proteine auf die Transportfunktion, sowie die Beeinflussung durch hormonelle Stimulation diskutiert [Pfeiffer et al. 1999, Verrey et al. 2000, Mizoguchi et al. 2001].

2.1.1 Genetik der Untereinheiten des Transporters

Durch die Aufklärung der Untereinheitenstruktur des Transporters konnte die bereits zuvor durch mehrere Arbeitsgruppen postulierte genetische Heterogenität der Erkrankung bestätigt werden [Calonge et al. 1995^a, Horsford et al. 1996, Goodyer et al. 1998, Saadi et al. 1998]. Der Aufbau der für diese Untereinheiten kodierenden Gene SLC3A1 und SLC7A9 soll im folgenden näher beschrieben werden.

2.1.2 SLC3A1/rBAT (OMIM 104614)

Bereits 1988 beschrieb van Winkle einen natriumunabhängigen, hochaffinen Transport von dibasischen und neutralen Aminosäuren (System $b^{0,+}$ -Aktivität) in Mausblastocysten. Durch Expressionsklonierung in *Xenopus*-Oozyten gelang drei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander die Isolation einer cDNA, deren Transkript eine dem bereits funktionell charakterisierten $b^{0,+}$ -System vergleichbare Transportaktivität induzierte [Bertran et al. 1992, Tate et al. 1992, Wells und Hediger 1992].

Die genannten cDNAs entstammten Genbanken, die aus Nierengewebe von Ratte bzw. Kaninchen erstellt worden waren und wurden durch die Arbeitsgruppen verschieden benannt: NBAT [Tate et al. 1992], D2 [Wells und Hediger 1992] und rBAT [Bertran et al. 1992]. Die letztgenannte Bezeichnung rBAT für "related to $b^{0,+}$ amino-acid transporter" hat sich hierbei im Hinblick auf die induzierten Transporteigenschaften als die Meistverwendete erwiesen.

Im folgenden Jahr wurde die zugehörige humane cDNA identifiziert [Bertran et al. 1993, Lee et al. 1993]. Die Lokalisation des zugehörigen Gens SLC3A1 in der chromosomalen Region 2p16-21 erfolgte durch somatische Zell-Hybridisierung [Lee et al. 1993], FISH [Yan et al. 1994, Zhang et al. 1994, Calonge et al. 1995^b] und Linkage-Analysen [Pras et al. 1994].

Im folgenden wurden auch erste Mutationen im SLC3A1-Gen bei Cystinurie Patienten detektiert und es wurde somit der Nachweis erbracht, daß das Gen ursächlich an der Krankheitsgenese der Typ I-Cystinurie beteiligt ist [Calonge et al. 1994, Pras et al. 1995].

Die Sequenz des Gens ist unter der Nummer 4507018 in der Gen-Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* abrufbar. Das SLC3A1-Gen besitzt eine Länge von 45kb, die cDNA 2,3kb [Bertran et al. 1993, Lee et al. 1993]. Es besteht aus 10 Exons, deren Länge zwischen 162 und 480bp liegt [Pras et al. 1996,

Purroy et al. 1996, Endsley et al. 1997]. Die Introns besitzen eine Größe von 50bp bis zu 15kb [Pras et al. 1996]. Alle Exon-Intron-Grenzen stimmen mit der GT/AG-Regel überein und entsprechen somit den für Eukaryonten beschriebenen Consensus-Sequenzen [Pras et al. 1996, Purroy et al. 1996, Endsley et al. 1997].

Das von SLC3A1 kodierte Protein besteht aus 685 Aminosäuren und ist 90kD schwer [Palacín et al. 1996].

Die Expression erfolgt überwiegend in den Mikrovilli der Dünndarmmukosa und den Epithelzellen des proximalen geraden Tubulus der Niere [Kanai et al. 1992, Furriols et al. 1993, Pickel et al. 1993]. Es wurde jedoch auch eine schwache Expression in der pars convoluta des proximalen Tubulus nachgewiesen [Kanai et al. 1992].

Die zunächst durch Tate et al. (1992) und Moschkovitz et al. (1994) vorgeschlagene Struktur des Proteins mit vier Transmembrandomänen ließ sich durch weitere Untersuchungen nicht bestätigen. Stattdessen konnte die bereits durch Bertran et al. (1992) und Wells und Hediger (1992) durch Hydrophobizitätsstudien postulierte Topologie des Proteins mit einer Transmembrandomäne, einem hydrophilen, intrazellulär gelegenen N-Terminus und extrazellulär gelegenen C-Terminus verifiziert werden [Pfeiffer et al. 1999].

Beide Arbeitsgruppen äußerten schon zum damaligen Zeitpunkt die Hypothese, daß das Protein aufgrund der Struktur mit großer Ähnlichkeit zu Typ II-Membranproteinen lediglich eine Untereinheit eines heterooligomeren Transporters darstelle. Ein am C-Terminus gelegenes Leucin-Zipper-Motiv könne dabei zur Dimerisation mit bisher unidentifizierten Untereinheiten führen [Wells und Hediger 1992].

2.1.3 SLC7A9/b^{0,+}AT (OMIM 604144)

Durch Kopplungs-Analysen konnte 1995 gezeigt werden, daß die nicht-Typ I-Cystinurie keine Kosegregation mit dem bereits für rBAT beschriebenen Genort auf Chromosom 2 zeigt [Calonge et al. 1995^a].

Weitere Analysen führten zur Lokalisation des Genortes auf dem langen Arm des Chromosoms 19 in der Region 19q12-13.1 [Bisceglia et al. 1997, Wartenfeld et al. 1997].

1999 gelang die Isolation der zugehörigen cDNA [Chairoungdua et al. 1999, International Cystinuria Consortium 1999, Pfeiffer et al. 1999] sowie erste Mutationsnachweise im SLC7A9-Gen, durch die bestätigt werden konnte, daß

Sequenzabweichungen in diesem Gen zum Krankheitsbild der nicht-Typ I-Cystinurie führen [International Cystinuria Consortium 1999].

Die Aufklärung der genomischen Struktur erfolgte wenig später [International Cystinuria Consortium 2001]: Das SLC7A9-Gen setzt sich aus 13 Exons zusammen, deren Größe zwischen 45 und 245bp liegt. Das Startcodon liegt an Position c186 in Exon 2, das Stopcodon an Position c1647 in Exon 13. Die polyadenylierte cDNA ist 1814bp lang und kodiert für ein 487 Aminosäuren großes Protein [International Cystinuria Consortium 1999]. Die Sequenz ist in der Genbank des *National Center for Biotechnology Information* unter der Nummer 7657590 abrufbar.

Das durch das SLC7A9-Gen kodierte Protein ist etwa 40-50kD schwer [Pfeiffer et al. 1999]. Die Expression erfolgt in Niere, Leber, Dünndarm und Plazenta [International Cystinuria Consortium 1999], in der Niere dabei vor allem in der pars convoluta des proximalen Tubulus. Es läßt sich jedoch auch eine schwache Expression in der pars recta nachweisen [Pfeiffer et al. 1999].

Das Protein gehört zur kürzlich entdeckten Familie der Glykoprotein-assoziierten Aminosäuretransporter, die eine mehr als 40%ige Übereinstimmung in der Primärstruktur aufweisen [Verrey et al. 2000]. Es besitzt zwölf Transmembrandomänen, die innerhalb einer hochkonservierten hydrophoben Domäne liegen. N- und C-Terminus liegen intrazellulär [Verrey et al. 2000].

Die Assoziation mit dem zugehörigen Typ II-Glykoprotein rBAT erfolgt über eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinresten. Der an der Ausbildung dieser Disulfidbrücke beteiligte Cysteinrest liegt in der extrazellulären Schleife zwischen der dritten und vierten Transmembrandomäne [Pfeiffer et al. 1999].

2.2 Bekannte Sequenzabweichungen in SLC3A1 und SLC7A9

Bei den bisher in SLC3A1 und SLC7A9 beschriebenen Mutationen handelt es sich um Substitutionen, Deletionen und Insertionen, die zum Aminosäureaustausch, Kettenabbruch oder Verschiebung des Leserahmens führen. Es wurden auch Mutationen in den Consensus-Sequenzen beschrieben, die ein inkorrektes Spleißen der hn-RNA zur Folge haben. In beiden Genen wurden weiterhin Polymorphismen detektiert.

2.2.1 SLC3A1-Gen

Die 62 bisher detektierten Mutationen sind Tabelle 2 zu entnehmen

Aminosäure-austausch	Nucleotidaustausch	Exon/Intron	Literaturangabe
G (-265) A	Promotor	-	Boutros et al. 1999
G (-194) C	Promotor	-	Boutros et al. 1999
	del (ex 1-9)	1	Horsford et al. 1996
	del (ex 1-7)	1	Saadi et al. 1998
	del nt114-nt1306	1	Pras et al. 1995
	c163 del C	1	Gitomer et al. 1998 ^a
P122S	c364C/T, Prolin/Serin	1	Gitomer et al. 2000
P128R	c383C/A, Prolin/Arginin	1	Pras et al. 1995
	del c431-765	2-3	Gitomer et al. 1998 ^b
Δ145-204	del 431-3C-463 T del+dupl ins 468 T-474A	2	Gitomer et al. 1998 ^a
	del (ex 2-10)	2-10	Saadi et al. 1998
Y151N	c451T/A, Tyrosin/Asparagin	2	Bisceglia et al. 1996
S168X	c503C/A, Serin/Stop	2	Purroy et al. 1999
R181Q	c542G/A, Arginin/Glutamin	2	Calonge et al. 1994
T216M	c647C/T, Threonin/Methionin	3	Bisceglia et al. 1996
S217R	c649A/C, Serin/Arginin	3	Saadi et al. 1998
	c765+1G/T	3	Purroy et al. 1999
	c766-2A/G (splice-mutation)	Intron3/Exon4	Bisceglia et al. 2001
	del 782A-804A	4	Gitomer et al. 1998 ^a
F266S	c797T/C, Phenylalanin/Serin	4	Purroy et al. 1999
E268K	c802G/A, Glutaminsäure/Lysin	4	Miyamoto et al. 1995
R270X	c808C/T, Arginin/Stop	4	Pras et al. 1995
R270L	c809G/T, Arginin/Leucin	4	Saadi et al. 1998
	c891+4A/G, Exon-Skipping	4	Pras et al. 1998 ^b
	c974 del GA	5	Horsford et al. 1996
	c1011G/A (splice-mutation)	5	Saadi et al. 1998
	del ex 5-ter	5-ter	Bisceglia et al. 1996
T341A	c1021A/G, Threonin/Alanin	6	Miyamoto et al. 1995
L346P	c1037T/C, Leucin/Prolin	6	Egoshi et al. 2000
R362C	c1084C/T, Arginin/Cystein	6	Bisceglia et al. 1996
R365W	c1093C/T, Arginin/Tryptophan	6	Gasparini et al. 1995
R365L	c1094G/T, Arginin/Leucin	6	Albers et al. 1999
S420C	c1259C/G, Serin/Cystein	7	Gitomer et al. 1998 ^a
	c1306 ins C	7	Pras et al. 1995
I445T	c1334T/C, Isoleucin/Threonin	8	Egoshi et al. 2000
R452W	c1353C/T, Arginin/Tryptophan	8	Endsley et al. 1997
R452Q	c1355G/A, Arginin/Glutamin	8	Purroy et al. 1999
G458E	c1373G/A, Glycin/Glutaminsäure	8	Gitomer et al. 1998 ^a
Y461H	c1381T/C, Tyrosin/Histidin	8	Endsley et al. 1997
Y461X	c1383T/G, Tyrosin/Stop	8	Purroy et al. 1999
M467K	c1400T/A, Methionin/Lysin	8	Calonge et al. 1994
M467T	c1400T/C, Methionin/Threonin	8	Calonge et al. 1994
E483X	c1447G/T, Glutaminsäure/Stop	8	Bisceglia et al. 1996
	c1500+1G/T	8	Horsford et al. 1996
	c1601 del AC	9	Gitomer et al. 2000
V536G	c1607T/G, Valin/Glycin	9	Gitomer et al. 1998 ^a
S547W	c1640C/G, Serin/Tryptophan	10	Bisceglia et al. 2000
L564F	c1690C/T, Leucin/Phenylalanin	10	Bisceglia et al. 2000
	del ex 10	10	Purroy et al. 2000

Y582H	c1744T/C, Tyrosin/Histidin	10	Gasparini et al. 1996
	c1749 del A	10	Gasparini et al. 1996
	c1810 del TG	10	Saadi et al. 1998
	c1820 del T	10	Egoshi et al. 2000
P615T	c1843C/A, Prolin/Threonin	10	Calonge et al. 1994
	c1898 ins TA	10	Egoshi et al. 2000
G645A	c1934G/C, Glycin/Alanin	10	Gitomer et al. 1998 ^a
F648S	c1943T/C, Phenylalanin/Serin	10	Gasparini et al. 1996
T652R	c1932C/G, Threonin/Arginin	10	Calonge et al. 1994
C673R	c2017T/C, Cystein/Arginin	10	Egoshi et al. 2000
C673W	c2019C/G, Cystein/Tryptophan	10	Purroy et al. 1999
	c2022 ins T	10	Gitomer et al. 1998 ^a
L678P	c2033T/C, Leucin/Prolin	10	Calonge et al. 1994

c entspricht der Nucleotidposition des Basenaustausches nach der veröffentlichten Sequenz

Tab.2: Mutationen im SLC3A1-Gen

Bereits Horsford et al. (1996) beschrieben eine geographische und ethnische Diversität von Mutationen im SLC3A1-Gen. Palacín et al. (2000) führten dieses populationsspezifische Auftreten von rBAT-Mutationen auf deren kürzliche Entstehung bzw. das Vorliegen eines Founder-Effektes zurück. So wurde die Mutation M467T als die häufigste in spanischen und italienischen Populationen beschrieben [Calonge et al. 1994, Gasparini et al. 1995]. Für die Mutation T216M wurde ein gehäuftes Auftreten unter griechischen Patienten beschrieben [Albers et al. 1999].

Die Literaturangaben zur Mutationsdetektionsrate weisen eine große Streubreite auf und liegen für als Typ I klassifizierte Allele zwischen 57 und 94% [Bisceglia et al. 1996, Saadi et al. 1998]. Die Erklärung hierzu ist unter anderem in der Wahl der Screeningmethode sowie der Selektion des Patientenkollektives zu suchen, da die phänotypische Ausprägung der Erkrankung sehr variabel (siehe II 1.4) und eine genaue Klassifikation der Patienten ohne die Einbeziehung von Anverwandten unmöglich ist.

Bislang wurden acht Polymorphismen detektiert. Lediglich einer dieser Polymorphismen (M618I) führt zu einem Aminosäureaustausch. Da dieser jedoch mit gleicher Häufigkeit unter Kontrollpersonen auftritt, ist ein Zusammenhang mit der Erkrankung nicht anzunehmen.

cDNA-Position	Exon/Intron	Frequenz unter Kontrollen	Literaturangabe
nt114C/A	1	27/100	Gasparini et al. 1995
nt231T/A	1	0/160	Gasparini et al. 1995
nt1136+3 del T	Intron 6	5/50	Gasparini et al. 1995
nt1332+7 T/C	Intron 7	28/88	Bisceglia et al. 1996
nt1398C/T	8	0/100	Gasparini et al. 1995
nt1473C/T	8	0/102	Gasparini et al. 1995
nt1854A/G, M618I	10	34/100	Gasparini et al. 1995
nt2189C/T	3-UTR	34/100	Gasparini et al. 1995

nt entspricht der Nucleotidposition nach der veröffentlichten Sequenz

Tab.3: Polymorphismen im SLC3A1-Gen

2.2.2 SLC7A9-Gen

Im SLC7A9-Gen wurden bisher 38 Mutationen beschrieben (siehe Tabelle 4, S.21).

Durch die beschriebenen Mutationen konnte in einem Kollektiv von 61 homo- bzw. heterozygot betroffenen Nicht-Typ I Patienten eine Detektionsrate von 79% erzielt werden [International Cystinuria Consortium 2001].

Bei den bisher am häufigsten beschriebenen Mutationen handelt es sich um G105R, V170M, A182T und R333W. Die vermutlich auf einen Founder-Effekt zurückzuführende Mutation V170M tritt nur bei libyschen Juden auf und deutet darauf hin, daß auch für das SLC7A9-Gen eine populationsspezifische Mutationsverteilung vorliegt.

Im SLC7A9-Gen wurden kürzlich zwölf neue Polymorphismen beschrieben (siehe Tabelle 5, S.21) [Schmidt, Diplomarbeit 2000], wobei die Polymorphismen c582C/A und c872C/T gekoppelt vorliegen.

Durch statistische Analysen konnte für vier dieser Polymorphismen (c147T, c420T, c692T und c852A/c872T) ein Zusammenhang mit dem Auftreten der Erkrankung nachgewiesen werden [Schmidt et al. 2002]. Funktionelle Studien zur Bestätigung dieses Zusammenhanges stehen noch aus.

Die Tatsache, daß in einem Kollektiv von 27 untypisierten Patienten durch das Screenen beider bislang für die Erkrankung bekannter Gene lediglich eine Detektionsrate von 56% erreicht wurde [International Cystinuria Consortium 2001], legt den Schluß nahe, daß weitere Gene an der Genese der Erkrankung beteiligt sind.

II Grundlagen

Aminosäure-austausch	Nucleotidaustausch	Exon/Intron	Literaturangabe
ΔR10	c231 del AGA	2	International Cystinuria Consortium 2001
P52L	c340C/T	3	International Cystinuria Consortium 2001
G63R	c372G/A	3	International Cystinuria Consortium 2001
W69L	c391G/T	3	International Cystinuria Consortium 2001
W69X	c391G/A	3	International Cystinuria Consortium 2001
A70V	c394C/T	3	International Cystinuria Consortium 2001
G105R	c498G/A	4	International Cystinuria Consortium 1999
	c520 ins T	4	International Cystinuria Consortium 1999
T123M	c553C/T	4	International Cystinuria Consortium 2001
	c553 del CG	4	International Cystinuria Consortium 2001
A126T	c561G/A	4	International Cystinuria Consortium 2001
	c596 del TG	4	International Cystinuria Consortium 1999
ins A158	c660 ins GCC	4	International Cystinuria Consortium 2001
F140S	c604T/C	4	Schmidt et al. 2002
	c686 del ACTG	5	International Cystinuria Consortium 2001
V170M	c693G/A	5	International Cystinuria Consortium 1999
A182T	c729G/A	5	International Cystinuria Consortium 1999
I187F	c744A/T	5	International Cystinuria Consortium 2001
	c747 del G	5	Schmidt et al. 2002
ins I 193	c764 ins CAT	5	International Cystinuria Consortium 2001
G195R	c768G/A	5	International Cystinuria Consortium 1999
IVS 5+1G/A	c789+1G/A	Intron 5	International Cystinuria Consortium 2001
	c800 ins A	6	International Cystinuria Consortium 2001
	c815 del TTTC	6	International Cystinuria Consortium 2001
W230R	c873T/C	6	International Cystinuria Consortium 2001
	c897 del CTCAA	7	International Cystinuria Consortium 2001
I241T	c907T/C	7	International Cystinuria Consortium 2001
ΔE244	c916 del GAA	7	International Cystinuria Consortium 2001
G259R	c960G/A	8	International Cystinuria Consortium 1999
I260M	c965C/G	8	Schmidt, 2000
	c998 del C	8	International Cystinuria Consortium 2001
IVS 9+3A/T	c1162+3A/T	Intron 9	International Cystinuria Consortium 2001
R333W	c1182C/T	10	International Cystinuria Consortium 2001
A354T	c1245G/A	10	International Cystinuria Consortium 2001
S397R	c1322C/G	11	International Cystinuria Consortium 2001
A382T	c1329G/A	11	International Cystinuria Consortium 2001
	c1455 del TT	12	International Cystinuria Consortium 2001
IVS 12+3 del AAGT	c1854+3 del AAGT	Intron 12	International Cystinuria Consortium 2001

c entspricht der Nucleotidposition nach der veröffentlichten Sequenz

Tab.4: Mutationen im SLC7A9-Gen

cDNA-Position	Exon/Intron	Frequenz unter Kontrollen	Literaturangabe
c147C/T	2	6/70	Schmidt, 2000
c386C/T	3	-	Schmidt, 2000
c420+22T/G	Intron 3	29/54	Schmidt, 2000
c584C/T	4	-	Schmidt, 2000
c596T/C	4	-	Schmidt, 2000
c610T/C, V170M	4	-	Schmidt, 2000
c663+10T/C	Intron 4	-	Schmidt, 2000
c692C/T	5	22/28	Schmidt, 2000
c852C/A	6	29/50	Schmidt, 2000
c872C/T	6	29/50	Schmidt, 2000
c1157G/A	9	-	Schmidt, 2000
c1162+51A/G	9	12/39	Schmidt, 2000

c entspricht der Nucleotidposition nach der veröffentlichten Sequenz

Tab.5: Polymorphismen im SLC7A9-Gen

2.2.3 Expressionsstudien - funktionelle Charakterisierung

Sowohl für das SLC3A1- als auch für das SLC7A9-Gen erfolgte die physiologische Untersuchung einiger, durch die beschriebenen Mutationen hervorgerufener Proteinvarianten, um die Auswirkung auf die Transportaktivität bzw. -kapazität näher zu charakterisieren.

Bei den hierbei verwendeten Expressionssystemen handelte es sich um COS-Zellen, HeLa-Zellen und die Expression in *Xenopus*-Oozyten.

Letztgenannte stellt aufgrund der einfachen Haltung der Tiere und der leichten Präparation der Oozyten [Dascal et al. 1987, Wu et al. 1991] die am häufigsten angewandte Methode dar.

Die Injektion mutanter mRNA führt zur Expression der entsprechenden Proteinvariante in der Oozytenmembran, die im folgenden physiologisch untersucht werden kann.

Für die meisten der bisher untersuchten Mutationen im SLC3A1-Gen (M467T, M467K, T216M, S217R, E268K und T314A) konnte ein durch fehlende bzw. verminderte Glykosylierung hervorgerufener "trafficking"-Defekt beschrieben werden, der zum Verbleib der mutanten Proteine im Endoplasmatischen Retikulum bzw. zur Reduktion der die Plasmamembran erreichenden Proteinzahl führt [Miyamoto et al. 1995, Chillarón et al. 1997, Saadi et al. 1998]. Für einige Mutationen konnte neben der Reduktion der Transportaktivität auch eine Abhängigkeit der Transportraten von der Menge der injizierten mRNA und dem Zeitpunkt der Messung festgestellt werden [Chillarón et al. 1997].

Trotz der z.T. stark verminderten Transportraten konnte rBAT bisher keine katalytische Aktivität zugeordnet werden [Verrey et al. 2000]. Die variablen Transportraten werden hierbei auf eine Selektivität der Assoziation mutanter rBAT-Proteine mit verschiedenen endogen in der Oozyte exprimierten katalytischen Untereinheiten zurückgeführt [Verrey et al. 2000].

Durch Untersuchung der R365W-Mutante konnte kürzlich eine Veränderung in der Stöchiometrie des Transporters nachgewiesen werden [Albers, Dissertation 2001] die erneut die Frage nach der Beteiligung der schweren Untereinheit am Transportmechanismus aufwirft.

Aufgrund der o.g. endogen exprimierten katalytischen Untereinheiten in der Oocyte ist eine Untersuchung heterolog induzierter leichter Untereinheiten nur dann möglich, wenn diese in der Oozyte überexprimiert werden.

Die bisher in HeLa-Zellen untersuchten Mutationen des SLC7A9-Gens, V170M, A354T, G105R und R333W, führen zu einem kompletten bzw. beinahe kompletten Verlust der Transportaktivität, wobei zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar ist, ob dies ebenfalls auf einem "trafficking"-Defekt beruht, oder auf Faktoren, die die Proteinbiosynthese betreffen (instabile mRNA oder Protein, verminderte Translation) [International Cystinuria Consortium 2001].

III Material und Methoden

1. Patientenkollektiv

Es wurden insgesamt 31 Patienten untersucht. Dabei handelte es sich um 21 betroffene Kinder aus 16 Familien sowie 10 weitere Patienten mit Cystin-Nierensteinen. Die Klassifizierung der Patienten erfolgte aufgrund des Aminosäureprofils der Eltern im Harn. Waren keine Urinproben der Angehörigen erhältlich, mußte die Typisierung ausbleiben.

Der ethnische Hintergrund der Patienten war verschieden. So waren 22 Patienten deutscher, 1 französischer, 2 italienischer, 3 russischer und 3 türkischer Herkunft.

Proband	Biochemische Typisierung	Ethnischer Ursprung	Verwandschaftsgrad	Patient
Cys 48	unkl./unkl.	Deutschland		+
Cys 49	unkl./unkl.	Deutschland		+
Cys 50	unkl./unkl.	Deutschland		+
Cys 51	unkl./unkl.	Deutschland		+
Cys 52	unkl./unkl.	Israel	Mutter von Cys 53	-
Cys 53	unkl./unkl.	Israel	Sohn von Cys 52	+
Cys 54	I/unkl.	Frankreich	Vater von Cys 56	-
Cys 55	I/unkl.	Frankreich	Mutter von Cys 56	-
Cys 56	I/I	Frankreich	Sohn von Cys 54 u. 55	+
Cys 57	nicht I/-	Türkei	Mutter von Cys 58	-
Cys 58	nicht I/unkl.	Türkei	Tochter von Cys 57	+
Cys 59	I/-	Deutschland	Mutter von Cys 60	-
Cys 60	I/unkl.	Deutschland	Sohn von Cys 59	+
Cys 61	nicht I/-	Deutschland	Vater von Cys 63 u. 64	-
Cys 62	nicht I/-	Deutschland	Mutter von Cys 63 u. 64	-
Cys 63	nicht I/nicht I	Deutschland	Sohn von Cys 61 u. 62	+
Cys 64	nicht I/nicht I	Deutschland	Sohn von Cys 61 u. 62	+
Cys 65	unkl./unkl.	Deutschland	Mutter von Cys 66 u. 67	+
Cys 66	unkl./unkl.	Deutschland	Tochter von Cys 65	-
Cys 67	unkl./unkl.	Deutschland	Tochter von Cys 65	-
Cys 68	nicht I/-	Türkei	Mutter von Cys 69, 70, 71 u. 72	-
Cys 69	nicht I/unkl.	Türkei	Sohn von Cys 68	-
Cys 70	nicht I/unkl.	Türkei	Sohn von Cys 68	+
Cys 71	-/-	Türkei	Sohn von Cys 68	-
Cys 72	-/-	Türkei	Sohn von Cys 68	-
Cys 73	I/-	Türkei	Vater von Cys 75, 76 u. 77	-
Cys 74	I/-	Türkei	Mutter von Cys 75, 76 u. 77	-
Cys 75	-/-	Türkei	Tochter von Cys 73 u. 74	-
Cys 76	-/-	Türkei	Sohn von Cys 73 u. 74	-
Cys 77	I/I	Türkei	Sohn von Cys 73 u. 74	+
Cys 78	I/-	Deutschland	Vater von Cys 80 u. 81	-
Cys 79	I/-	Deutschland	Mutter von Cys 80 u. 81	-
Cys 80	I/I	Deutschland	Tochter von Cys 78 u. 79	+
Cys 81	-/-	Deutschland	Sohn von Cys 78 u. 79	-
Cys 82	nicht I/-	Deutschland	Vater von Cys 84 u. 85	-
Cys 83	nicht I/-	Deutschland	Mutter von Cys 84 u. 85	-
Cys 84	nicht I/nicht I	Deutschland	Sohn von Cys 82 u. 83	+
Cys 85	nicht I/nicht I	Deutschland	Sohn von Cys 82 u. 83	+

Cys 86	I/-	Rußland	Vater von Cys 87	-
Cys 87	I/unkl.	Rußland	Sohn von Cys 86	+
Cys 88	unkl./unkl.	Deutschland		+
Cys 89	unkl./unkl.	Rußland	Mutter von Cys 90	+
Cys 90	unkl./unkl.	Rußland	Sohn von Cys 89	-
Cys 91	-/-	Deutschland	Vater von Cys 93 u. 94	-
Cys 92	nicht I/-	Deutschland	Mutter von Cys 93 u. 94	-
Cys 93	nicht I/-	Deutschland	Sohn von Cys 91 u. 92	+
Cys 94	nicht I/-	Deutschland	Tochter von Cys 91 u. 92	+
Cys 95	unkl./unkl.	Deutschland		+
Cys 96	nicht I/-	Deutschland	Vater von Cys 98 u. 99	-
Cys 97	nicht I/-	Deutschland	Mutter von Cys 98 u. 99	-
Cys 98	nicht I/nicht I	Deutschland	Tochter von Cys 96 u. 97	+
Cys 99	nicht I/-	Deutschland	Tochter von Cys 96 u. 97	-
Cys 102	unkl./unkl.	Deutschland		+
Cys 104	I/-	Rußland	Vater von Cys 105	-
Cys 125	I/-	Rußland	Mutter von Cys 105	-
Cys 105	I/I	Rußland	Sohn von Cys 104	+
Cys 106	unkl./unkl.	Deutschland		+
Cys 107	unkl./unkl.	Deutschland	Schwester von Cys 108	+
Cys 108	unkl./unkl.	Deutschland	Schwester von Cys 107	+
Cys 109	unkl./unkl.	Deutschland		+
Cys 110	I/unkl.	Italien	Tochter von Cys 111 u. 113	+
Cys 111	I/unkl.	Italien	Mutter von Cys 110 u. 112	-
Cys 112	I/unkl.	Italien	Tochter von Cys 111 u. 113	+
Cys 113	unkl./unkl.	Italien	Vater von Cys 110 u. 112	-

I: Allelträger für die Typ I-Cystinurie; nicht I: Allelträger für die nicht-Typ I-Cystinurie; -: Unbetroffenes Allel; unkl.: Unklassifiziertes Allel

Tab.6: Untersuchtes Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv wurde mit Hilfe der Arbeitsgemeinschaft pädiatrischer Nephrologen (Dr. med. H. Bachmann, Dr. med. A. Bökenkamp, Dr. med. M. Fischbach, Dr. S. Fründ, Prof. Dr. med. K.G. Pistor und Dr. med. H.F. Zappel) sowie Prof. Dr. Albrecht Hesse, Abteilung Experimentelle Urologie der Universität Bonn zusammengestellt. Bei dem Kontrollkollektiv handelte es sich um DNA-Proben nicht betroffener anonymisierter deutscher Probanden.

2. Arbeitsmaterialien

2.1 Geräte und Arbeitsutensilien

Elektrophoresegeräte	Multigel-Long-Gelkammer, Biometra, Göttingen, D Pharmacia Gel Elektrophoresis Apparatus GNA-200, Cambridge, GB
Elektrophoresezubehör	Gelträger 20x20cm, Pharmacia, Cambridge, GB 22-Zahn-Kämme, Pharmacia, Cambridge, GB Sequenzierzubehör, Perkin Elmer Biosystems,

	Weiterstadt, D
Geldokumentation	Imaging-System Gel Doc 2000, Bio-Rad, Hercules, USA
Geltrockner	Modell 583, Bio-Rad, Hercules, USA
Heizblock	Unitek HBS-130/E, Peqlab, Erlangen, D
Magnetrührer	Ikamag RTC basic, IKA Labortechnik, Staufen, D
Photometer	Gene Quant II, Pharmacia Biotech, Cambridge, GB
Pipetten	Gilson P10, P20, P100, P1000
Schüttelapparat	GFI 3005 u. 30015, Burgwedel, D
Sequenzierer	ABI Prism 377, Perkin Elmer Biosystems, Weiterstadt, D
Spannungsgeräte	Electrophoresis Power Supply PS 304, Gibco BRL, Eggenstein, D Electrophoresis Power Supply EPS 300, Pharmacia, Cambridge, GB
SSCP-Zubehör	Glasplatten mit fixierten 1.0mm Spacern, Biometra, Göttingen, D Glasplatten ausgeschnitten mit geradem Schliff, Biometra, Göttingen, D Kämme 24-zählig 1.0mm, Biometra, Göttingen, D Silikonabdichtung 1.0mm, Biometra, Göttingen, D Klammern, Biometra, Göttingen, D
Thermocycler	PTC 100, MJ Research, Biozym, Hess. Oldendorf, D
Waagen	Sartorius AG, Göttingen, D
Wasserbad	GFL 1002-1013, Burgwedel, D Lauda E200 ecoline RE206, Lauda-Königshofen, D
Whatmanpapier	Whatman Gb002, Schleicher und Schüll, Dassel, D
Vakuumpumpe	Hydrotech, Bio-Rad, Hercules USA Membran-Vakuumpumpe, Vacuubrand, Wertheim, D
Zentrifugen	Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg, D Megafuge 1,0R, Sorvall Heraeus, Kendro, Osterode, D

2.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien trugen die Qualitätsbezeichnung p.a. und wurden von folgenden Firmen bezogen:

- Biorad, Hercules, USA
- Boehringer, Mannheim, D
- Gibco BRL, Eggenstein, D
- Merck, Darmstadt, D
- Riedel-de Haen, Seelze, D
- Roth, Karlsruhe, D
- Serva, Heidelberg, D
- Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D

2.3 Oligonukleotidprimer

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG Ebersberg synthetisiert.

Die Sequenzen für das SLC3A1-Gen entstammen der Literatur [Calonge et al. 1994, Gasparini et al. 1995, Pras et al. 1995, Bisceglia et al. 1996, Endsley et al. 1997, Albers et al. 1999, Schmidt, Diplomarbeit 2000]

Exon	Primerbezeichnung	Exongröße [bp]	Produktgröße [bp]	Primersequenz 5'→3'
1		471		
1A	1F 1.1R		225	gaaggcactccgaagacataa atctcccagggtatcggtta
1B	1.1F 1R		294	taccgcatacctcgggagat atcctggcaccacccctaaatg
2	2F 2R	226	268	gggtttattcatgactttgact tcaccccatcttgccact
3a	3F 3R	196	241	ccctagcatttgaatgtctt tcactacatatctgccttttacc
3b	216s 3DR	196	127	attaatcatcgatttcatac ttcatgggtacagtcatgcc
4	4FE 4RE	168	249	atgtgctgttttcttgttt gaagtctgtgtgggtatcta
5	5F 5R	162	289	cgtagttaatgtaaccaagca taactggtatctcaggctgag
6	6F 6R	167	277	acattcatatagagcgagctg acgctgggaagaaatgagagc
7	7F 7R	239	328	cctacatctgtacatgaag aggcaacagcaggacattatg
8	8F 8R	206	284	ctgtgtatacagctgtgttc atagctgtgatgaatagtc
9	9F 9R	164	200	ctgtttcccttctggtc tcatttgttctagaatcaacata

III Material und Methoden

10		480		
10A	10F 10.1R		348	ggatcgagtgttttgggtaa tcttatttagcggaaggcc
10B	10.1F 10R		241	ggcctcccgcctaaaata gccagtgtctcatctctc
nt 114 C/A	1F nt 114 mut*		150	gaaggcactccgaagacata cttcaggtgtctgttaagct
nt 1854 A/G	M 618 I - F M 618 I -R*		150	cagccactatgtgtgtactc gaattggtacttaacctgtct
nt 2189 C/T	3'UTR - F 3'UTR - R*		170	gtatacctcgtgttaggcac catttgagaaccttcttaacgc
R 270 X	4 Fmis 4RE		200	ccagtggcactttgacgaagt gaagtctgtgtgggtatcta

* Mutageneseprimer

Tab.7: Primersequenzen für das SLC3A1-Gen (Ac. Nr. M95548)

Die Primersequenzen für das SLC7A9-Gen wurden vom International Cystinuria Consortium zur Verfügung gestellt, bzw. der Literatur entnommen [Schmidt, Diplomarbeit 2000]. Geling die Amplifikation mit den genannten Sequenzen nicht, wurden anhand der bekannten DNA-Sequenz neue Primer erstellt.

Exon	Primerbezeichnung	Exongröße [bp]	Produktgröße [bp]	Primersequenz 5'→3'
1	5 UTF 5 UTR		126	atttctagggttgaccg ggccaggagagccatgag
2		198		
2.1	PF 2R		228	atgactgactttgactctggg tttctcaggccagtatccccatgtt
2.2	2F PR		228	cctgcagtcctcctgaaccagca tcttctgccgtgtcaataggg
3	CF 3Rmis	148	224	cgccctctccttctcc cgtgccccctcatgctccgggggt
4	4DF 4DR	243	388	agcctccggtgggaggaag gagtcccagacaccctctg
5	5F 5R	126	249	aaagaaaggagactctccaggg agtggaggcggttggtgtgtg
6	6F ER	100	232	tcccgtagagatacactcaagat tggagttaaagtcacctggag
7	GF GR	45	141	agtcaagggtgtgtgacgttg aggagaagagaaatcaggctg
8	BF2 BR	124	196	ctgcctttggccattatcctc acctccagtgtgacacctg
9	AF AR	104	216	gaccctcaggactcatctcg tagctgtgtgtcttctcctggg
10	HF 10R	97	210	ggagcacaagtcctcagtg gcctgaagataggctggtag
11	LF LR	150	252	ttcggctctctgtgacatgag agccactcgtgactctggg
12		175	370	
12.1	QF1 12R		237	atgattgaaattggaggagg ggccgcttaataataaacagcacag
12.2	12F QR		191	attcatcagcaagcccactgggagta tggagtcaggacagggtgagg
13	TF 6R		178	cctcaccacaacaactcc aaattcagctgacttggtac

c692 C/T	5Fmis* 5R		200	tcatctcgacagtgaactcactgat agtggaggggcggttggtgtgtg
V170M	V170M - F V170M -R*		84	catctgttcacatctcgacagtgaactc ccagcttgccgcggtgaagatgttct - ggacgtagcttcccagccgta
c1157G/A	AF 9Rmis*		120	gaccctcaggactcatctcg gtgacggtgggggtcccctacctgcg

*Mutageneseprimer

Tab.8: Primersequenzen für das SLC7A9-Gen (Ac. Nr. 141289)

2.4 Feinchemikalien und Enzyme

Längenstandard	50bp-Leiter, 1µg/µl, Gibco BRL, Eggenstein, D 100bp-Leiter, 1µg/µl, Gibco BRL, Eggenstein, D
Nukleotide	(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), je 100mM, Gibco BRL, Eggenstein, D
Restriktions- endonukleasen	Boehringer, Mannheim, D Gibco BRL, Eggenstein, D MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D New England Biolabs, Frankfurt/Main, D
Sequenzierkit	Perkin Elmer Biosystems, Weiterstadt, D
Taq-Polymerase	5U/µl, Gibco BRL, Eggenstein, D

3. Methoden

3.1 Isolation menschlicher genomischer DNA

Die Extraktion der genomischen DNA erfolgte mittels Salzfällung aus Leukozyten des peripheren Blutes [Miller et al. 1988]. Diese Methode wird bei hoher Ausgangsmaterialmenge und hoher zu erwartender DNA-Konzentration der Phenol-Chloroform-Fällung vorgezogen, da sie weniger toxisch ist. Die so gewonnene hochreine und unfractionierte DNA kann zu molekulargenetischen Zwecken verwendet werden.

REAGENZIEN:

Lysispuffer für ein- gefrorenes Blut	10mM Tris pH 7,5 5mM MgCl ₂ 1% Triton x 100
---	--

	0,32M Saccharose
Kernlysispuffer	10mM Tris HCl (pH 8,0)
	400mM NaCl
	2mM EDTA (pH 8,0)
Pronase	20mg/ml
SDS	10% in Aqua dest.
NaCl-Lösung	gesättigt (> 6M)
Isopropanol	absolut
Ethanol	70%
TE ⁻⁴	10mM Tris pH 8,0
	0,1mM EDTA pH 8,0
	(autoklaviert)

Bei dem zur DNA-Extraktion verwandten Material handelte es sich um 5-8ml mit EDTA als Antikoagulans versetztes Blut, das auf Trockeneis verschickt wurde und bis zur Aufarbeitung bei -70°C gelagert wurde. Am Tag der Aufarbeitung wurde das Blut (5ml) auf Eis aufgetaut und in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 45ml Lysispuffer für eingefrorenes Blut zur Lyse der Leukozytenmembran erfolgte eine 20minütige Inkubation auf Eis, bis die Lösung klar war. Bei der darauffolgenden 20minütigen Zentrifugation bei 4°C und 5500 Umdrehungen/min erfolgte eine Trennung der Leukozytenkerne von den übrigen Blutbestandteilen. Nach Abkippen des Überstandes und vorsichtigem Abspülen der Röhrchenwandung mit Kernlysispuffer wurde das Pellet in 5ml Kernlysispuffer resuspendiert. Anschließend wurden 330µl SDS zur Lyse der Leukozytenkernmembran und 500µl Pronase zum Abbau Proteine zugegeben. Der Verdau der Proben erfolgte bei 37°C über Nacht im Wasserbad.

War der Verdau nicht klar, erfolgte die erneute Zugabe von Pronase (250 - 500µl) mit nachfolgender variabler Inkubationszeit. War der Verdau klar, wurde 1,6ml gesättigte NaCl-Lösung zum Ausfällen der Proteine zugegeben, kräftig geschüttelt und zweimal 10min bei 4000 Umdrehungen/min zentrifugiert mit einmaligem leichten Aufschütteln der Proben zwischen den Zentrifugationsschritten. Der die DNA enthaltende Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt.

Durch Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol und leichtes Schwenken des Röhrchens wurde die DNA gefällt und anschließend mit einer umgebogenen Pasteurpipette gefischt.

Nach Reinigung der gefischten DNA durch kurzes Eintauchen in 70% Ethanol wurde sie in einem angemessenen Volumen TE^{-4} (200 - 400 μ l) über Nacht bei Raumtemperatur gelöst.

3.1.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der gelösten DNA wurde mit Hilfe der Spektroskopie bestimmt. Dabei wird die Eigenschaft der Nukleinsäuren, ultraviolettes Licht der Wellenlängen zwischen 250 und 270nm mit einem Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260nm zu absorbieren ausgenutzt. Die Messung der optischen Dichte der 1:70 mit Aqua dest. verdünnten DNA erfolgte gegen den Leerwert von Aqua dest.

Die Konzentration der DNA konnte daraufhin durch das Lambert-Beer'sche-Gesetz ermittelt werden:

$$\text{Konzentration } C \text{ [} \mu\text{g/ml} \text{]} = \frac{\text{Optische Dichte } A_{260} \times \text{Verdünnung (Faktor 70)}}{\text{Extinktionskoeffizient für DNA (Faktor 50)}}$$

Durch Bildung des Quotienten der bei 260 und 280nm gemessenen Absorptionskoeffizienten kann zusätzlich die Bestimmung des Reinheitsgrades der DNA erfolgen, da das Absorptionsmaximum für Proteine bei 280nm liegt.

Bei reinen DNA-Lösungen liegt der Quotient zwischen 1,8 und 1,95 [Ibelgauf, 1993]. Werte größer 2,0 deuten auf die Anwesenheit von RNA hin, wohingegen Werte größer 1,9 ein Hinweis auf Verunreinigung mit Proteinen oder Salzen sind. Liegt eine solche vor, sollte die DNA mittels Phenol-Chloroformfällung gereinigt werden.

3.2 Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Mit Hilfe der PCR können selektiv einzelne Abschnitte aus einem heterogenen Gemisch von DNA-Sequenzen in vitro amplifiziert werden. Dies beruht auf der Fähigkeit des DNA-Doppelstranges unter bestimmten Bedingungen zu de- bzw. renaturieren. Durch Erhitzen des DNA-Doppelstranges erfolgt zunächst eine Denatu-

rierung, die die Anlagerung spezifischer, die Zielsequenz flankierender Oligonukleotidprimer ermöglicht. Die zum Anfang- und Endbereich der Sequenz komplementären Primer haben eine Länge von etwa 20 - 30 Basenpaaren. Ihre Anlagerung erfolgt bei für den jeweiligen Primer spezifischen Annealing-Temperaturen, die aufgrund der Primerlänge und der Basenzusammensetzung nach folgender Formel errechnet werden können:

$$T_A = \text{Anzahl (A+T)} \times 2^\circ\text{C} + \text{Anzahl (G+C)} \times 4^\circ\text{C}$$

Im sich anschließenden Extensionsschritt erfolgt die Synthese des gewünschten Fragmentes. Diese wird durch eine DNA-Polymerase, meist Taq-Polymerase katalysiert. Dabei handelt es sich um ein aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnenes, hitzeresistentes Enzym, das ein Temperaturoptimum bei 72°C besitzt. Die neu synthetisierten DNA-Stränge dienen im nächsten Reaktionszyklus erneut als Matrizen für die DNA-Synthese.

Die Abfolge von Denaturierung, Annealing und Extension wird etwa 30 - 40 mal wiederholt. Da die Taq-Polymerase nach 40 Zyklen ihre Aktivität verliert und ein vermehrtes Auftreten von Nebenprodukten beobachtet wird, sollte diese Zyklenzahl nicht überschritten werden.

Schon nach etwa 30 Zyklen enthält das Reaktionsgemisch neben der ursprünglichen DNA die gewünschte Sequenz in einer Kopienzahl von 10^6 bis 10^7 fach.

Die Reaktion wird durch eine finale Extension von 10min beendet.

REAGENZIEN (Ausgangskonzentration):

10x PCR - Puffer	500mM KCl
	200mM Tris - HCl, pH 8,4
MgCl ₂	50mM
Desoxyribonukleotid - triphosphate	100mM dATP
	100mM dCTP
	100mM dGTP
	100mM dTTP
Primer	100µM
Taq-Polymerase	5Units/µl
DNA	20ng/µl

Aqua dest. sterilfiltriert

Die Reagenzien wurden in den unten genannten Endkonzentrationen in die PCR eingesetzt. Die Konzentrationen wurden dem Reaktionsvolumen von 25 bzw. 50µl angepasst.

REAGENZIEN: (Endkonzentration)

PCR - Puffer	1x
MgCl ₂	1,5mM
Desoxyribonukleotid - triphosphate	200µM dATP 200µM dCTP 200µM dGTP 200µM dTTP
Forward - Primer	20pmol
Reverse - Primer	20pmol
DNA	80ng
Aqua dest.	ad 25 bzw. 50µl

Die Zyklenzahl der PCR lag zwischen 30 und 40 Zyklen. Die Amplifikation erfolgte mit Hilfe eines Thermocyclers nach dem unten genannten Standard PCR-Programm. Dabei wurden die spezifischen Bedingungen für die verschiedenen Exons der Literatur entnommen [Schmidt, Diplomarbeit 2000]. Beim Auftreten von Schwierigkeiten bei der Amplifikation einzelner Exons oder der Auswahl neuer Primer wurden die PCR-Bedingungen neu etabliert. Zum Ausschluß einer Kontamination des Reaktionsansatzes mit Fremd-DNA wurde jeweils eine Wasserprobe als Leerwert mituntersucht.

STANDARD PCR-PROGRAMM:

1. Initiale Denaturierung	5'	94°C
2. Folgende Denaturierungen	30"	94°C
3. Primerannealing	1'	T _A
4. Extension	1,5'	72°C
5. Abschließende Extension	10'	72°C

Exon/ Fragment	Primerbe- zeichnung	Exon- größe [bp]	Produkt- größe [bp]	PCR-Bedingungen	Zyklen- zahl
1A	1F/1.1R	471	225	94°C 30", 55°C 1', 72°C 1'	30
1B	1.1F/1R	471	294	94°C 30", 57°C 1', 72°C 1'	30
2	2F/2R	226	268	94°C 30", 55,5°C 1', 72°C 2'	30
3a	3F/3R	196	241	94°C 30", 56°C 1', 72°C 2'	35
3b	216s/3DR	196	127	94°C 30", 55°C 1', 72°C 2'	30
4	4FE/4RE	168	249	94°C 30", 57°C 1', 72°C 1,5'	35
5	5F/5R	162	289	94°C 30", 53°C 1', 72°C 1'	30
6	6F/6R	167	277	94°C 30", 55,5°C 1', 72°C 2'	30
7	7F/7R	239	328	94°C 30", 56°C 1', 72°C 1'	30
8	8F/8R	206	284	94°C 30", 55°C 1', 72°C 1,5'	35
9	9F/9R	164	200	94°C 30", 56,5°C 1', 72°C 2'	40
10A	10F/10.1R	480	348	94°C 30", 58,5°C 1', 72°C 2'	35
10B	10.1F/10R	480	241	94°C 30", 56,5°C 1', 72°C 2'	30
nt 114 mut	1F/nt114mut		150	94°C 30", 60°C 1', 72°C 1,5'	35
c1854 A/G	M618I- F/M618I-R		149	94°C 30", 54,5°C 1', 72°C 2'	40
c2189 C/T	3'UTR-F/ 3'UTR-R		169	94°C 30", 57°C 1', 72°C 1,5'	35
R270X	4Fmis/4R			94°C 30", 61°C 1', 72°C 1,5'	35

Tab.9: PCR-Bedingungen für das SLC3A1-Gen

Exon/ Fragment	Primerbe- zeichnung	Exon- größe [bp]	Produkt- größe [bp]	PCR-Bedingungen	Zyklen- zahl
1	5 UTF/5UTR		126	94°C 1', 63°C 1,5', 72°C 1'	35
2	PF/PR	198		94°C 25", 57°C 30", 72°C 1'	35
2.1	PF/2R		228	94°C 30", 64,5°C 1', 72°C 1,5'	35
2.2	2F/PR		228	94°C 30", 66°C 1', 72°C 2'	40
3	CF/3Rmis	148	224	94°C 1,5', 68°C 2', 72°C 2'	40
4	4DF/4DR	243	388	94°C 25", 68°C 45", 72°C 1'	35
5	5F/5R	126	249	94°C 30", 67°C 1', 72°C 1,5'	35
6	6F/ER	100	232	94°C 30", 62,5°C 1', 72°C 1,5'	35
7	GF/GR	45	141	94°C 30", 56,5°C 30", 72°C 1,5'	35
8	BF2/BR	124	196	94°C 30", 60°C 45", 72°C 2'	40
9	AF/AR	104	216	94°C 30", 56,5°C 30", 72°C 1,5'	35
10	HF/10R	97	210	94°C 30", 59,5°C 30", 72°C 1,5'	35
11	LF/LR	150	252	94°C 30", 62°C 1', 72°C 2'	40
12	QF1/QR	175	370	94°C 30", 60,5°C 30", 72°C 1,5'	35
12.1	QF1/12R		237	94°C 30", 63°C 1', 72°C 1,5'	35
12.2	12F/QR		191	94°C 30", 65°C 1', 72°C 2'	40
13	TF/6R		178	94°C 30", 57°C 30", 72°C 1,5'	35
c692 C/T	5Fmis/5R		200	94°C 30", 65,5°C 1', 72°C 1,5'	35
V170M	V170M - F/ V170M - R		84	94°C 45", 66°C 1', 72°C 2'	35
c1157 G/A	9F/9Rmis		120	94°C 30", 63°C 1', 72°C 2'	40

Tab.10: PCR-Bedingungen für das SLC7A9-Gen

3.3 Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte

Um Kontaminationen und unerwünschte Nebenprodukte auszuschließen und eine quantitative Abschätzung der vorhandenen Produktmenge vorzunehmen, wurden die PCR-Produkte vor dem Einsatz in weitere Analysen gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Auftrennung kann in Agarose- oder Polyacrylamidgelen erfolgen. Die DNA-Moleküle wandern dabei aufgrund der negativen Ladung des Zucker-Phosphat-Rückgrats zur Anode [Ibelgauf, 1993]. Weiterhin sind auch die Größe der aufzutrennenden Produkte sowie die Porengröße des verwendeten Geles von entscheidender Bedeutung: Größere PCR-Produkte wandern langsamer als kleinere. Die Genauigkeit der Auftrennung kann durch Verringern der Porengröße erhöht werden. Dies geschieht sowohl bei Agarose- als auch bei Polyacrylamidgelen durch Erhöhung der Agarose- bzw. Acrylamidkonzentration. Bei Polyacrylamidgelen wird die Porengröße zudem zusätzlich vom Vernetzungsgrad bestimmt, der je nach Mischungsverhältnis von Acrylamid und Bisacrylamid variiert.

3.3.1 Auftrennung im Agarosegel

Zur Beurteilung des PCR-Produktes wurde dieses auf einem 1%igen Agarosegel aufgetragen. Um die DNA-Banden nach dem Gellauf sichtbar zu machen, wurde dem Gel Ethidiumbromid zugesetzt, das als sequenzunspezifische Substanz zwischen die Basenpaare der DNA interkaliert und so die DNA bei Bestrahlung mit UV-Licht einer Wellenlänge von 254 oder 300nm fluoreszieren lässt [Ibelgauf, 1993]. Auf diese Weise lässt sich DNA bis zu einer Konzentration von 10ng/µl nachweisen.

REAGENZIEN:

Agarose

Ethidiumbromid	10mg/ml
10x TBE	1,0M TRIS
	0,9M Borsäure
	0,01M EDTA
	pH 8,4

1% Gel-Zusammensetzung:

Agarose	1%
Ethidiumbromid	1µg/ml
TBE	1x

Der verwendete Gelträger faßt ein Volumen von 300ml. Zur Vorbereitung des Gels wurden 3g Agarose in einem Erlenmeyerkolben abgewogen. Es wurden 300ml 1x TBE zugegeben und die Agarose bis zum vollständigen Auflösen in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Erkalten der Gellösung auf ca. 65°C wurden 30µl Ethidiumbromid zugegeben. Hatte sich die Gellösung auf 45°C abgekühlt, konnte das Gel in den vorbereiteten Gelträger gegossen und nach einer Polymerisationszeit von ca. 30min verwendet werden.

Zum Testen der PCR-Produkte wurde ein Aliquot von 5µl mit 5µl Agaroseblaupuffer versetzt und aufgetragen. Zusätzlich wurden eine Wasserkontrolle und ein Längensstandard (100 bp) zur Bestimmung der Produktgröße mitaufgetragen. Die Zugabe des Agaroseblaupuffers ermöglichte durch die Erhöhung des spezifischen Gewichtes des DNA-Puffer-Gemisches ein leichteres Auftragen der Proben in die Geltaschen, zum anderen ließ sich so die Laufrichtung der Proben im Gel verfolgen. Die Elektrophorese erfolgte bei 120V etwa 40-45min. Danach erfolgte die Auswertung und Dokumentation unter UV-Licht.

3.3.2 Single-Strand-Conformation-Polymorphism-Analysis (SSCP)

Die SSCP ist eine unspezifische, auf PCR basierende Mutationsscreeningmethode für kurze DNA-Fragmente [Orita et al. 1989]. Einzelsträngige DNA bildet in Abhängigkeit von der jeweiligen Sequenz Sekundärstrukturen aus. Dabei kann bereits die Änderung eines einzelnen Nukleotids in der Basenabfolge zur Ausbildung einer von der Ausgangssequenz abweichenden Konformation führen: Auf diesem Prinzip beruht die SSCP. Die PCR-Proben werden durch Zugabe eines formamidhaltigen Probenpuffers und anschließendes Erhitzen denaturiert, so daß sie einzelsträngig vorliegen. Der Probenpuffer verhindert dabei die Rückkehr in die doppelsträngige Position.

Die SSCP kann in Abhängigkeit von Variablen wie Umgebungstemperatur, Glycerolgehalt und Vernetzungsgrad des Polyacrylamidgeles unterschiedliche Ergebnisse liefern. Dies wurde bei der gelelektrophoretischen Auftrennung berücksichtigt, indem

die zwei Parameter Glycerolgehalt und Umgebungstemperatur variiert wurden, so daß insgesamt vier Bedingungen vorlagen (Gel mit Glycerol bei Raumtemperatur/4°C und Gel ohne Glycerol bei Raumtemperatur/4°C).

Überschreitet die Länge der untersuchten Fragmente die Größe von 200-300bp nicht, liegt die Detektion von Sequenzabweichungen bei bis zu 90% [Sheffield et al, 1993].

Da die SSCP lediglich eine Differenzierung zwischen der Ausgangssequenz und von dieser abweichenden Sequenzvarianten ermöglicht, sind zur weiteren Charakterisierung, d.h. Art und Position der Abweichung, Methoden des direkten Mutationsscreenings erforderlich.

REAGENZIEN: (Endkonzentration)

Acrylamid/Bisacrylamid (49:1)	10%
(Acrylamid 40%/Bisacrylamid 2%)	
10x TBE	0,5x
10% APS	
(Ammoniumpersulfat)	
TEMED	0,05%
Glycerol	5%
Aqua dest.	
Ethanol	70%

Blaupuffer für SSCP:

TBE	1x
Ficoll 400	8x
Bromphenolblau	0,01%

SSCP-Probenpuffer:

(Agaroseblaupuffer/Formamid 1:20)	
deion. Formamid	95%
Bromphenolblau	0,0005%
Ficoll 400	0,4%

Die für die SSCP verwendeten Glasplatten (11cm x 12cm) waren mit 1mm dicken Spacern versehen. Nach Reinigung der Platten mit 70%igem Ethanol und Abdichtung mit 1mm dicken Dichtungsgummis wurden die Platten zusammengefügt und mit Klammern fixiert.

Aus den oben genannten Reagentien wurde eine Polyacrylamid-Gelstocklösung hergestellt, von der entsprechend dem Fassungsvermögen der Gelplatten je 20ml pro Gel verwendet wurden. Zwei der vier pro Lauf gegossenen Gele enthielten 5% Glycerol. Durch Zugabe von APS als Radikalbildner wurde die Polymerisationsreaktion gestartet, die Gele sofort im Anschluß gegossen und die Kämme zur Taschenbildung eingesetzt. Nach etwa 30-40min waren die Gele vollständig auspolymerisiert und die Proben konnten aufgetragen werden.

Zur Probenvorbereitung wurden 3µl des PCR-Produktes mit 5µl SSCP-Probenpuffer versetzt, 5min bei 94°C denaturiert und bis zum Auftragen auf Eis gelagert, um ein Renaturieren der Einzelstränge zu verhindern.

Die Gele wurden in eine mit 0,5x TBE gefüllte Elektrophoresekammer eingespannt und die Kämme entfernt. Jeweils 8µl des Probengemisches sowie 5µl einer 100 bpl (20ng/µl) als Kontrolle des Elektrophoresevorganges wurden aufgetragen. Die Laufzeit der Gele betrug drei Stunden, wobei ein Gelpaar (mit und ohne Glycerol) bei Raumtemperatur und 180V, das andere bei 4°C und 200V lief.

3.3.3 Detektion der SSCP-Fragmente durch Silberfärbung

Der Nachweis der PCR-Fragmente kann durch verschiedene Färbetechniken erfolgen, wobei insbesondere die Silberfärbung und die Färbung mit Ethidiumbromid zu nennen sind. In der vorliegenden Arbeit wurde die Silberfärbung der Ethidiumbromidfärbung vorgezogen, da sie weniger toxisch ist und bereits einen Nachweis von DNA-Mengen kleiner $0,03\text{ng/mm}^2$ ermöglicht. Die der Färbung zugrundeliegende Redoxreaktion findet zwischen den an die DNA gebundenen freien Silberkationen und einem Natriumcarbonat-Formaldehyd-Gemisch statt und führt zu einer Reduktion zu metallischem schwarzem Silber.

REAGENZIEN:

Ethanol	10%
HNO ₃	1%

AgNO ₃	0,2%
Na ₂ CO ₃	3%
Formaldehyd	0,05% in Na ₂ CO ₃
Essigsäure	10%

Nach Ablauf der Elektrophorese wurden die Glasplatten entfernt und das Gel in eine 10%iges Ethanol enthaltende Färbeschale überführt. In der darauf folgenden 10minütigen Inkubationszeit in Ethanol wurde die DNA im Gel fixiert. Anschließend wurde das Gel für 10min mit HNO₃ angesäuert. Die Anlagerung der Silberkationen erfolgte durch Zugabe von 0,2%igem AgNO₃, das 30min in der Färbeschale belassen wurde. Um eine starke Hintergrundfärbung zu vermeiden wurde durch dreimaliges kurzes Spülen mit Aqua dest. (3x1min) überschüssiges Silber aus dem Gel entfernt. Die Redoxreaktion wurde durch Zugabe des Natriumcarbonat-Formaldehyd-Gemisches gestartet, das bis zum Sichtbarwerden der Banden mehrmals gewechselt wurde, da trotz der vorangegangenen Waschschrte immer noch überschüssige, unspezifisch im Gel gebundene Silberkationen vorhanden waren, die die Entwicklerlösung dunkel färbten. Nach Sichtbarwerden der Banden im Gel wurde der Färbevorgang durch Zugabe von Essigsäure gestoppt.

Die das Gel enthaltende Färbeschale befand sich während des gesamten Färbevorganges auf einem Schüttelgerät, um einen gleichbleibenden Kontakt aller Gelbereiche mit den Färbelösungen zu gewährleisten.

Die Gele wurden zur Archivierung auf Whatman-Papier aufgezogen und auf einem Vakuumtrockner zwei Stunden bei 80°C getrocknet.

3.4 Direkter Mutationsnachweis

Der direkte Mutationsnachweis beruht auf Methoden, die die Identifikation bekannter und unbekannter Mutationen ermöglichen. Dazu gehören u.a. die Hybridisierung der DNA mit spezifischen Oligonukleotiden, der Verdau mit Restriktionsendonukleasen und die direkte Sequenzierung. Während bei der Oligonukleotidhybridisierung und dem Verdau mit Restriktionsendonukleasen die zu untersuchende Ausgangssequenz zur Charakterisierung von Mutationen bekannt sein muß, ist dies bei der direkten Sequenzierung nicht erforderlich.

3.4.1 Mutationsnachweis durch Restriktionsspaltung

Restriktionsendonukleasen stellen eine Klasse von bakteriellen Enzymen dar, die spezifisch an bestimmte Erkennungssequenzen der DNA binden und dort schneiden. Zur molekulargenetischen Untersuchung werden hauptsächlich Typ II Restriktionsendonukleasen verwendet, bei deren palindromartigen Erkennungssequenzen es sich um kurze Tetra-, Penta- oder Hexanukleotide handelt [Ibelgauf, 1993]. Durch Spaltung einer Phosphodiesterbindung der Erkennungssequenz entstehen Fragmente definierter Größe mit glatten oder einander komplementären, überhängenden 5'- bzw. 3'-Enden. Liegt in einem bekannten DNA-Bereich eine Mutation vor, kann durch diese eine Restriktionsschnittstelle geschaffen oder zerstört werden. Wird durch das Vorhandensein einer Mutation eine Schnittstelle zerstört, ist zur genauen Lagebestimmung allerdings die weitere Untersuchung durch direktes Sequenzieren erforderlich, da sich die Mutation an beliebiger Stelle der Erkennungssequenz befinden kann.

Durch gezieltes Einführen einer Basenänderung in ein DNA-Fragment kann in diesem eine Restriktionsschnittstelle geschaffen werden. Dies wird durch Mutageneseprimer bewerkstelligt, an deren Ende sich die zu ändernde, nicht zum Wildtypstrang komplementäre Base befindet. Mit Hilfe der Primer lassen sich Austausche von bis zu vier Basenpaaren einführen. Dabei wird die Etablierung der PCR jedoch mit zunehmender Zahl der Austausche erschwert, weshalb eine Änderung von mehr als zwei Basen nicht empfehlenswert ist. Durch das Vorliegen der Mutation wird die eingeführte Schnittstelle wieder zerstört.

Die folgenden Verdaue (siehe Tabellen 11 und 12, S.41) wurden zum Nachweis bekannter Mutationen und Polymorphismen in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 durchgeführt. Für im Rahmen der Arbeit nachgewiesene, bisher unbekannte Mutationen und Polymorphismen wurden Verdaue mit entsprechenden Restriktionsenzymen etabliert.

III Material und Methoden

Exon	Mutation bzw. Polymorphismus	Enzym	Wildtyp [bp]	Mutation bzw. Polymorphismus [bp]
3	T216M	<i>NlaIII</i>	144 - 85 - 12	77 - 67 - 85 - 12
3	S217R	<i>AflIII</i>	241	-
4	R270X	<i>TaqI</i> *	100 - 100	200
6	R362C	<i>AcI</i>	100 - 135	235
6	R365W/R365L	<i>MspI</i>	154 - 31 - 50	185 - 50
6	L346P	<i>AluI</i>	85 - 75 - 50	85 - 125
8	M467T	<i>NlaIII</i>	187 - 10 - 87	197 - 87
8	M467K	<i>AluI</i>	189 - 85 - 10	98 - 91 - 85 - 10
8	E483X	<i>DdeI</i> <i>MboII</i>	-	284
9	P508A	<i>BsmI</i>	200	125 - 75
10	S547W	<i>MboI</i>	200 - 148	348
1	nt 114C/A	<i>HindIII</i> *	150	130 - 120
1	nt 231T/A	<i>DdeI</i>	293	260 - 33
8	c1500 + 1G/T	<i>MseI</i> <i>TruI</i>	284	-
10	c1854A/G	<i>BsmI</i> *	150	137 - 13
10	c2189C/T	<i>AccII</i> * <i>Bsh1236I</i> *	148 - 22	170

*Mutageneseprimer erforderlich

Tab.11: Zum Nachweis von Mutationen und Polymorphismen verwendete Restriktionsenzyme und Fragmentgrößen für das SLC3A1-Gen

Exon	Mutation bzw. Polymorphismus	Enzym	Wildtyp [bp]	Mutation bzw. Polymorphismus [bp]
3	G63R	<i>ApaI</i>	110 - 100	210
3	W69X/W69L	<i>NdeI</i>	130 - 80	210
3	A70V	<i>Fnu4HI</i>	150 - 60	210
4	G105R	<i>ApaI</i>	220 - 100 - 70 - 15	320 - 70 - 15
5	V170M	<i>RsaI</i> *	50 - 30	80
5	A182T	<i>KspI</i>	120 - 100	220
5	G195R	<i>AcI</i>	101 - 32 - 39 - 77	101 - 32 - 116
8	I260M	<i>MboI</i>	210 - 25	235
10	R333W	<i>NciI</i>	120 - 90	210
10	A331V	<i>AcI</i>	50 - 40 - 67 - 53	50 - 107 - 53
10	A354T	<i>AcI</i>	50 - 40 - 67 - 53	50 - 40 - 120
11	S379R	<i>AluI</i>	132 - 70 - 50	202 - 50
2.1	c147C/T	<i>HhaI</i>	140 - 50	190
Intron 3	c420+ 22T/G	<i>ScrFI</i>	200 - 10	180 - 20 - 10
5	c692C/T	<i>MboI</i> *	99 - 53 - 25	99 - 78
6	c852C/A	<i>NlaIII</i>	140 - 100	240
9	c1157G/A	<i>HhaI</i> *	100	120
11	c1328T/C	<i>AcI</i>	252	138 - 114

* Mutageneseprimer erforderlich

Tab.12: Zum Nachweis von Mutationen und Polymorphismen verwendete Restriktionsenzyme und Fragmentgrößen für das SLC7A9-Gen

REAGENZIEN:

PCR - Produkt 10µl
 10x Enzympuffer 1x

BSA 100%	0,8µl
(falls notwendig)	
Restriktionsenzym	6U
Aqua dest.	ad 15µl

Die in einem Reaktionsvolumen von 15µl angesetzten Verdauungen fanden im Wasserbad bei der vom Hersteller angegebenen, für das Enzym spezifischen Reaktionstemperatur statt (zumeist 37°C). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 5µl des verdauten PCR-Produktes mit 5µl Agaroseblaupuffer versetzt und das gesamte Volumen auf ein 10%iges PAA-Gel mit 5% Glycerol aufgetragen. Zur Abschätzung der Fragmentgrößen und Beurteilung des Verdauungsergebnisses wurden außerdem 10µl einer 50 bpl (20ng/µl) und eine 1:1 Verdünnung des unverdauten PCR-Produktes mit Agaroseblaupuffer mitaufgetragen.

Die Laufzeit betrug bei Raumtemperatur eine Stunde bei 250V. Die entstandenen Fragmente konnten nach Silberfärbung beurteilt werden. Über das homo- bzw. heterozygote Vorliegen einer Mutation konnte nun anhand der Fragmentgrößen, der entstandenen Anzahl der Fragmente sowie der Intensität der Banden eine Aussage getroffen werden.

3.4.2 Mutationsnachweis durch direktes Sequenzieren nach Sanger

Die Basenabfolge in einem DNA-Molekül kann durch die direkte Sequenzieretechnik nach Sanger (Kettenabbruch-Verfahren) bestimmt werden. Dabei enthält der Sequenzierungsansatz neben den normalen Desoxy-Nukleotid-Triphosphaten als Substrat für die DNA-Polymerase auch 2', 3'-Dideoxy-Nukleotid-Triphosphate, bei deren Einbau in den DNA-Einzelstrang ein Kettenabbruch erfolgt. Auf diese Weise entstehen Fragmente verschiedener Länge, die nach elektrophoretischer Auftrennung auf unterschiedliche Weise detektiert werden können: Zum einen kann die Detektion durch Zugabe eines mit ^{32}P oder ^{35}S markierten Desoxy-Nukleotid-Triphosphates zum Reaktionsansatz und anschließende Autoradiographie erfolgen oder zum anderen - wie in dieser Arbeit - durch die Zugabe von fluoreszenzmarkierten 2', 3'-Dideoxynucleotiden. Der Vorteil dieser Methode liegt in dem - im Vergleich zur Autoradiographie - geringeren Zeitaufwand, der fehlenden Strahlenbelastung und der höheren Kapazität, da die Vorbereitung von vier Einzelansätzen entfällt und somit pro Probe nur eine Spur des Sequenzierergebnisses belegt werden muß.

Die zum Ansatz gegebenen 2', 3' - Didesoxynukleotide sind jeweils mit einem für die entsprechende Base spezifischen Fluoreszenzfarbstoff markiert, der nach Anregung mit einem Laser entsprechend seinem Absorptionsspektrum fluoresziert und eine Aufzeichnung des Signals ermöglicht. Die Auswertung der so erhaltenen Signale erfolgt computergestützt.

Zur Vorbereitung des als Template in die Sequenzierreaktion einzusetzenden Fragments diente ein 100µl PCR-Ansatz. Dieser wurde mittels des QIAquick-PCR-Purification Kits (Cat. No. 28106) aufgereinigt. Durch die Aufreinigung wurden Primerreste und niedermolekulare Substanzen entfernt. Das aufgereinigte Produkt wurde in 30µl HPLC-Wasser eluiert. Zur visuellen Bestimmung des DNA-Gehaltes und als Kontrolle des Aufreinigungserfolges wurden 3µl des Produktes auf ein Agarose-Testgel aufgetragen. In die anschließend erfolgende Sequenzier-PCR wurden 80ng des Templates eingesetzt.

Bei der sogenannten asymmetrischen PCR wird nur ein Primer des für die normale PCR verwendeten Primerpaares eingesetzt. Dadurch wird ein Überschuß an Einzelsträngen gebildet, die in der folgenden Sequenzierung analysiert werden.

Sequenzier-Reaktion:

Template	80ng
Primer (Forward oder Reverse)	3,2pmol
Terminator Ready Reaction Mix	4µl
HPLC-Wasser	ad 20µl

PCR-Programm (Cycle-Sequencing):

96°C	10"
T _A	5"
60°C	4'

25 Zyklen

Die Annealing-Temperatur orientiert sich an der für die normale PCR verwendeten Temperatur. Dabei sollen jedoch 60°C nicht überschritten werden.

Der Reaktionsansatz erfolgte in farblosen Gefäßen, um störende Hintergrundfluoreszenzen zu vermeiden.

Die anschließende Fällung und das Lösen der Sequenzierprodukte erfolgte, um Primerreste und Reste der im Terminator Ready Reaction Mix enthaltenen Reagenzien zu entfernen und somit einen möglichst hohen Reinheitsgrad der Produkte zu gewährleisten.

REAGENZIEN:

Template

HPLC - Wasser

Natriumacetat pH 4,8, 3M

Ethanol 70%

Ethanol 100%

Sequenzierpuffer:

Formamid deion./EDTA 25mM (1:5)

Zur Fällung des Sequenzierproduktes wurden der 20µl Sequenzierreaktion 80µl Aqua dest., 10µl Natriumacetat und 250µl Ethanol absolut zugesetzt und diese 30min bei Raumtemperatur und 14000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstandes wurde das Pellet mit 250µl 70%igem Ethanol versetzt und 10min bei 14000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abpipettiert und das Pellet getrocknet. Das Produkt wurde in 4µl Sequenzierpuffer gelöst. Auf das Sequenziergel aufgetragen wurde 1µl des 1:1 mit Sequenzierpuffer verdünnten Produktes das 2min bei 90°C denaturiert und bis zum Auftragen auf Eis gelagert wurde.

REAGENZIEN:

Harnstoff 7M

30% Acrylamidlösung (29:1) 5%

10x TBE 1,2x TBE

HPLC - Wasser	ad 50ml
TEMED	0,04%
APS	0,7%
Alconox	
Aqua dest.	

Zur Vorbereitung des Sequenziergeles wurde zunächst das zu verwendende Plattenpaar gereinigt um Hintergrundfluoreszenzen zu vermeiden. Zu diesem Zweck wurden die Platten zusätzlich zur vorangegangenen Reinigung mit Alconox nochmals mit Aqua dest. gespült. Dann wurden die 0,2mm dicken Spacer seitlich angelegt, das Plattenpaar zusammengefügt und durch Klammern fixiert.

Die Herstellung eines 5%igen denaturierenden PAA-Geles erfolgte aus den oben genannten Reagenzien. Die Gellösung wurde vor Zugabe von APS und dem Gießen durch einen 0,2µm Porenfilter über eine Vakuumpumpe entgast.

Nach dem Gießen des Geles und einer Auspolymerisationszeit von etwa 1h wurden die Platten nochmals von äußerlich anhaftenden Gelresten gereinigt und ein 30minütiger Vorlauf zur Erwärmung des Geles auf 50°C gestartet. Nach dem Auftragen der Proben betrug die Laufzeit 7h bei 2500V und 50mA. Durch den Harnstoffanteil, das im Sequenzierpuffer enthaltene Formamid und die hohe angelegte Spannung und Stromstärke wurde die Renaturierung bzw. Ausbildung von Sekundärstrukturen der Einzelstränge verhindert.

Die computergestützte Auswertung nach dem Lauf erfolgte mit Hilfe der ABI PRISM™ Collection Software und dem Sequencing Analysis-Program.

IV Ergebnisse

Bei den untersuchten Probanden handelte es sich um 21 betroffene Kinder aus 16 Familien. Zusätzlich wurden 10 weitere Patienten untersucht, die aufgrund des rezidivierenden Auftretens von Nierensteinen und erhöhten Werten von Cystin im Harn auffällig geworden waren. Die Gesamtzahl der Patienten betrug somit 31, von denen 26 unverwandt waren.

Die Zuordnung der 21 pädiatrischen Patienten zu den einzelnen Cystinurie-Subtypen erfolgte durch die Erstellung eines Aminosäureprofils aus dem Urin der Eltern.

Aufgrund dieser biochemischen Untersuchung konnten vier Patienten als Typ I, drei als nicht-Typ I und weitere vier als heterozygot für die nicht-Typ I Cystinurie klassifiziert werden. Bei sechs Patienten war eine Zuordnung des Homo- bzw. Heterozygotenstatus für die Typ I (vier Patienten) oder nicht-Typ I (zwei Patienten) Cystinurie nicht möglich, da lediglich die Urinproben eines Elternteiles vorlagen.

Für vierzehn Patienten mußte aufgrund des vollständigen Fehlens der Urinproben von Anverwandten die Typisierung ausbleiben.

Bis auf sechs Patienten zeigten alle Patienten eine Steinbildung. Der Zeitpunkt bis zum Eintritt der Steinbildung war dabei sehr variabel und reichte vom Alter von 9 Monaten bis zu 24 Jahren. Vier der sechs bislang nicht Betroffenen wurden im Rahmen eines Neugeborenen-Neuroblastom-Screening-Programmes erfaßt (Cys 84/85 und Cys 94/95).

Chirurgische Maßnahmen zur Steinsanierung waren bei 23 Patienten notwendig. Dabei wurden bei drei Betroffenen offen operative Eingriffe wie Nephropyelostomie, Pyelotomie und in einem Fall die Nephrektomie erforderlich.

Einen Überblick über das Manifestationsalter sowie die Anzahl der seither aufgetretenen Steine gibt Tabelle 13 (S.47).

Die zur Typisierung der Probanden herangezogenen biochemischen Daten sind Tabelle 1 im Anhang zu entnehmen.

Proband	Geschlecht	Ethnischer Ursprung	Alter zum Untersuchungszeitpunkt	Alter zu Beginn der Steinbildung	Zahl der seither aufgetretenen Steine	betroffene Verwandte
Cys 48	w	deutsch	52	16	>10	-
Cys 49	w	deutsch	34	18	5-10	-
Cys 50	w	deutsch	30	11	>10	Vater/ Großvater
Cys 51	w	deutsch	42	14	>10	-
Cys 53	m	israelisch	9	6	-	-
Cys 56	m	französisch	14 Monate	9 Monate	<5	-
Cys 58	w	türkisch	8	2,5	<5	-
Cys 60	m	deutsch	15	12	-	Tante
Cys 63	m	deutsch	6	-	-	Bruder
Cys 64	m	deutsch	3	13 Monate	5-10	Bruder
Cys 65	w	deutsch	43	21	>10	-
Cys 70	m	türkisch	16	6	<5	-
Cys 77	m	türkisch	8	9 Monate	-	-
Cys 80	w	deutsch	8	7	-	-
Cys 84	m	deutsch	7	-	-	Bruder
Cys 85	m	deutsch	4	-	-	Bruder
Cys 87	m	russisch	17	14	<5	-
Cys 88	m	deutsch	37	23	>10	-
Cys 89	w	russisch	40	16	<5	-
Cys 93	m	deutsch	13	-	-	Schwester
Cys 94	w	deutsch	5	-	-	Bruder
Cys 95	w	deutsch	35	15	>10	-
Cys 98	w	deutsch	5	3,5	-	-
Cys 102	w	deutsch	47	24	>10	-
Cys 105	m	russisch	12	1,5	5-10	-
Cys 106	m	deutsch	7	9 Monate	-	-
Cys 107	w	deutsch	17	10	-	Schwester
Cys 108	w	deutsch	12	5	-	Schwester
Cys 109	w	deutsch	9	1	-	-
Cys 110	w	italienisch	7	1	>10	Schwester
Cys 112	w	italienisch	20	2	>10	Schwester

Tab.13: Klinische und anamnestische Charakterisierung der Patienten

1. Isolation genomischer DNA aus gefrorenem Blut

Die DNA-Extraktion erfolgte für alle Patienten durch die nicht-toxische Salzfällung nach Miller et al. (1988). Für neun der Patienten (Cys 48, 49, 50, 51, 53, 88, 89, 95 und 102) lag die DNA bereits isoliert vor und wurde bei -70°C gelagert.

Die Extraktion der übrigen DNA erfolgte aus den bis zum Zeitpunkt der Aufarbeitung bei -70°C gelagerten Blutproben mit einem Volumen von durchschnittlich 8ml.

Nach der Fällung konnte die DNA in einem Volumen von 200-400µl TE⁻⁴ über Nacht gelöst werden. Eine Aufreinigung durch die Phenol-Chloroform-Fällung war nicht erforderlich.

2. Etablierung der PCR-Bedingungen für das SLC3A1- und SLC7A9-Gen

Die PCR-Bedingungen für das SLC3A1- und das SLC7A9-Gen lagen zu Beginn der Arbeit bereits vor (Tabelle 9 und 10, Kap. III, 3.2, S.34), waren jedoch für einige Exons nicht reproduzierbar, so daß Modifikationen der bekannten Bedingungen erforderlich waren. Für das Exon 9 des SLC3A1-Gens und Exon 5 des SLC7A9-Gens war trotz Modifikation eine Amplifikation mit den bekannten Primerpaaren nicht möglich, so daß die Auswahl neuer Primer anhand der DNA-Sequenz und deren Etablierung notwendig wurde. Der der Etablierung zugrundeliegende Ausgangswert für die Annealingtemperatur wurde hierbei anhand der vom Hersteller angegebenen Schmelztemperatur T_m mit Hilfe der in Kap. III, 3.2 genannten Formel berechnet. Ausgehend von diesem Ausgangswert erfolgte eine schrittweise Anpassung der Bedingungen.

Die Sequenz der Mutageneseprimer zur Detektion der Polymorphismen nt1854 A/G und nt2189C/T des SLC3A1-Gens wurde der Literatur entnommen [Gasparini et al. 1995]. Da in dem vorliegenden Artikel keine Angaben zu den verwendeten PCR-Bedingungen gemacht wurden, war auch hier eine Etablierung erforderlich.

Die verwendeten Annealingtemperaturen lagen für das SLC3A1-Gen zwischen 53 und 61°C, für das SLC7A9-Gen zwischen 56,5 und 68°C.

3. Mutationsscreening mittels SSCP-Analyse

Das Screening des Patientenkollektives auf Mutationen erfolgte zunächst unspezifisch mit Hilfe der SSCP-Analyse. Dabei wurden die kodierenden Abschnitte, sowie die Exon/Intron-Übergänge der Gene SLC3A1 und SLC7A9 erfaßt.

Für einige der in diesen Genen beschriebenen Mutationen lagen DNA-Proben betroffener Probanden vor, die dem bereits durch Schmidt et al. (2002) untersuchten Patientenkollektiv entstammten. Diese wurden bei der Analyse des jeweiligen Fragmentes als interne Kontrollen zur Beurteilung der Validität der Screening-Methode eingesetzt.

Da aufgrund der Patientenzahl sowie der unterschiedlichen ethnischen Herkunft der Patienten nicht mit dem gehäuften Auftreten der gleichen Mutation in einem Fragment zu rechnen war, wurden keine gesunden Kontrollpersonen in die Analyse miteinbezogen.

Die Sensitivität der SSCP als Screeningmethode wird durch die Verkürzung der Fragmentgröße erhöht [Hayashi et al. 1992]. Daher fand eine Unterteilung der Exons 1 und 10 des SLC3A1-Gens sowie der Exons 2 und 12 des SLC7A9-Gens durch im Exon gelegene Primer statt, um die Größe der amplifizierten Produkte zu verringern. Exon 4 des SLC7A9-Gens wurde von der SSCP-Analyse ausgeschlossen, da aufgrund der bereits in diesem Exon beschriebenen Polymorphismen und der damit verbundenen Variabilität der zu erwartenden Bandenmuster [Schmidt, Diplomarbeit 2000] nicht mit einem aussagekräftigen Ergebnis zu rechnen war.

Die Analyse dieses Exons erfolgte daher durch direkte Sequenzierung (siehe auch Kap. IV, 4.2).

Die SSCP-Analyse erfolgte unter vier verschiedenen Bedingungen (Gel mit Glycerol bei Raumtemperatur und 4°C/Gel ohne Glycerol bei Raumtemperatur und 4°C) (siehe hierzu auch Kap. II, 3.3.2).

Die durch die Silberfärbung sichtbar gewordenen Bandenmuster wurden untereinander sowie im Falle des Vorliegens von internen Kontrollen mit diesen verglichen. Dabei zeigte sich im Falle des SLC3A1-Gens bei 17 Patienten ein auffälliges Bandenmuster in den Fragmenten der Exons 3, 4, 6, 7, 8, 9, und 10. Im SLC7A9-Gen wurde bei 18 Patienten ein auffälliges Muster in den Exons 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 und 13 detektiert. Die Ergebnisse des Screenings sind den Tabellen 14 und 15 (S.50) zu entnehmen.

Wie bereits in einer vorausgehenden Studie beschrieben [Schmidt, Diplomarbeit 2000], ließen sich die Mutation T216M in Exon 3 des SLC3A1-Gens sowie der Polymorphismus c420+22T/G in Exon 3 des SLC7A9-Gens nicht durch SSCP darstellen. In beiden Fällen war eine Untersuchung aller Probanden mittels Restriktionsverdau bzw. Sequenzierung erforderlich.

Für die in den Exons 5, 6 und 9 des SLC7A9-Gens beschriebenen Polymorphismen war eine Zuordnung der Patienten zu den einzelnen Haplotypen z.T. schon nach der SSCP-Analyse durch den Vergleich mit internen Kontrollen möglich. Um jedoch durch die SSCP entstandene Artefakte sicher auszuschließen und eine exakte Zuordnung zu treffen, wurden diese Ergebnisse durch nachfolgende Restriktionsverdau bestätigt.

IV Ergebnisse

Exon	Proband	Abweichendes Bandenmuster in der SSCP-Analyse	Bestätigung im Restriktionsverdau	Bestätigung durch Sequenzierung	Mutation/ Polymorphismus
3	Cys 77	-	+	+	T216M/T216M
4	Cys 49	+	+	+	R270X
	Cys 53	+	+	+	R270X/R270X
	Cys105	+	-	-	-
6	Cys 56	+	+	+	R365W
	Cys 84	+	-	+	nt1035G/A
	Cys 85	+	-	+	nt1035G/A
	Cys 95	+	+	+	R365W
	Cys 98	+	-	-	-
	Cys 102	+	+	+	R362C/R365W
	Cys 107	+	-	+	IVS6del2/3T
	Cys 109	+	+	+	R365W
7	Cys 50	+	#	-	-
8	Cys 48	+	+	+	M467T
	Cys 49	+	+	+	M467T
	Cys 56	+	+	+	M467T
	Cys 80	+	+	+	M467T
	Cys 88	+	+	+	M467T
	Cys 95	+	+	+	M467T
9	Cys 48	+	#	-	-
	Cys 65	+	#	+	P508A
10	Cys 80	+	#	+	S547W
	Cys 109	+	#	+	c1749_175del

Für diese Exons lagen zunächst keine Restriktionsverdaue vor.

Tab.14: Ergebnisse der SSCP-Analyse für das SLC3A1-Gen

Exon	Proband	Abweichendes Bandenmuster in der SSCP-Analyse	Bestätigung im Restriktionsverdau	Bestätigung durch Sequenzierung	Mutation/ Polymorphismus
2	Cys 107	+	#	-	-
3	Cys 63	-	+	+	c386T/T
	Cys 64	-	+	+	c386T/T
	Cys 89	-	+	+	c386T/T
	Cys 98	-	+	+	c386C/T
5	Cys 56	-	+	-	-
	Cys 58	-	+	-	-
6	Cys 93	+	-	+	A224V
	Cys 94	+	-	+	A224V
7	Cys 84	+	#	-	-
	Cys 85	+	#	-	-
8	Cys 51	+	-	+	c969_971 del
9	Cys 51	+	-	-	-
	Cys 89	+	-	-	-
10	Cys 70	+	+	+	A331V
	Cys 106	+	-	-	-
11	Cys 105	+	-	+	c1328C/C
	Cys 107	+	-	+	c1328C/T
	Cys 108	+	-	+	c1328C/T
12	Cys 51	+	#	-	-
	Cys 94	+	#	-	-
13	Cys 64	+	#	-	-

Für diese Exons lagen zunächst keine Restriktionsverdaue vor

Tab.15: Ergebnisse der SSCP-Analyse für das SLC7A9-Gen

Die in einigen Exons aufgetretenen Auffälligkeiten in der SSCP ließen sich auch durch mehrmaliges Sequenzieren nicht bestätigen. Dies legt zum einen nahe, daß es sich bei diesen Auffälligkeiten um Artefakte handelt, andererseits besteht jedoch auch die Möglichkeit, daß der die Konformationsänderung und somit das abweichende Bandenmuster auslösende Basenaustausch soweit außerhalb des Exons lag, daß eine sichere Erfassung mittels Sequenzierung nicht möglich war.

In Exon 11 des SLC7A9-Gens konnte ein Bandenmuster dargestellt werden, daß auf das Vorliegen eines Polymorphismus schließen ließ.

Durch direkte Sequenzierung von Proben der in der SSCP-Analyse auffällig gewordenen Probanden ließen sich verschiedene Haplotypen bestätigen.

Nach Bestimmung der Lage des Basenaustausches wurde mit Hilfe der cDNA-Sequenz ermittelt, ob durch den Austausch eine Änderung der Aminosäuresequenz hervorgerufen wird. Anschließend wurde ein Restriktionsverdau etabliert, um die Häufigkeitsverteilung der Variante unter Patienten und Kontrollen zu untersuchen.

4. Direkter Mutationsnachweis

Da mit Hilfe der SSCP lediglich eine Abweichung der Basenabfolge von der Ausgangssequenz festgestellt werden kann, über deren Art, Ausmaß sowie die Position jedoch keine Aussagen getroffen werden können, ist die weitere Analyse der auf diese Weise auffällig gewordenen Fragmente erforderlich (siehe auch Kap. II, 3.3.2).

4.1 Mutationsnachweis durch Restriktionsverdau

Die in Kap. III in den Tabellen 11 und 12 (S.41) aufgeführten Restriktionsverdaue zum Nachweis von Mutationen und Polymorphismen wurden unabhängig vom Auftreten von auffälligen Bandenmustern in der SSCP für alle Patienten durchgeführt.

Da - wie bereits oben erwähnt - die Darstellung einzelner Mutationen und Polymorphismen durch SSCP-Analyse nicht möglich bzw. nicht reproduzierbar war, konnte das Vorhandensein einzelner Mutationen auf diese Weise sicher ausgeschlossen werden und im Falle der untersuchten Polymorphismen eine genaue Zuordnung der Patienten zu den einzelnen Haplotypen erfolgen.

Für neu detektierte Mutationen und den in Exon 11 des SLC7A9-Gens beschriebenen Polymorphismus wurden Restriktionsverdau etabliert um das Screenen weiterer Patienten sowie von gesunden Kontrollen zu vereinfachen.

Wurde durch das Vorliegen einer Mutation eine Restriktionsschnittstelle zerstört (siehe Kap. II Tabellen 11 und 12), war zu deren Bestätigung die weitere Analyse durch Sequenzierung erforderlich, da der Basenaustausch an verschiedenen Stellen der Erkennungssequenz des Enzyms liegen kann.

Dies war u.a. bei den Patienten Cys 63, 64, 70, 89 und 98 der Fall. So wies Cys 70 hierbei eine Auffälligkeit in Exon 10 des SLC7A9-Gens auf. Durch den mit Hilfe des Enzyms *Acil* durchgeführten Restriktionsverdau sollte die Mutation A354T nachgewiesen werden. Bereits im Vergleich der entstandenen Fragmentgrößen mit den für diese Mutation zu erwartenden Größen zeigte sich keine Übereinstimmung.

Durch Sequenzierung ließ sich die bisher nicht beschriebene Mutation A331V nachweisen, die zur Zerstörung einer zweiten Schnittstelle des Enzyms in diesem Exon führt.

Die Patienten Cys 63, 64, 89 und 98 wiesen eine Auffälligkeit in dem mit dem Restriktionsenzym *NdeI* durchgeführten Verdau des Exons 3 im SLC7A9-Gen auf.

Hierbei war die Sequenzierung erforderlich um zwischen dem Vorliegen der Mutation W69L und dem bereits zuvor in diesem Exon beschriebenen Polymorphismus c386C/T [Schmidt, Diplomarbeit 2000] zu unterscheiden, der ebenfalls zur Zerstörung der Schnittstelle führt.

4.2 Mutationsnachweis durch Sequenzierung

Zeigten sich in der SSCP Auffälligkeiten, die durch die beschriebenen Restriktionsverdau nicht weiter zu charakterisieren waren, erfolgte deren weitere Analyse durch direkte Sequenzierung.

Im Falle des Exons 4 des SLC7A9-Gens wurden alle Probanden auf diese Weise untersucht, da aufgrund der auf die in diesem Exon im Vorfeld beschriebenen Polymorphismen zurückzuführenden komplexen Bandenmuster eine adäquate Beurteilung mittels SSCP-Analyse nicht zu erwarten war [Schmidt, Diplomarbeit 2000].

Wie bereits dargelegt ließen sich trotz mehrmaliges Sequenzieren die in einigen Exons aufgetretenen SSCP-Auffälligkeiten nicht auf eine im Exon gelegene Sequenzabweichung zurückführen. Die Intronsequenzen wurden soweit dies möglich

war mit den veröffentlichten (SLC3A1-Gen) bzw. den im Internet unter der Gen-Datenbank Adresse des *National Center for Biotechnology Information* abrufbaren (SLC7A9-Gen) Sequenzen verglichen. Hierbei ließ sich jedoch ebenfalls keine Abweichung von der angegebenen Nukleotidabfolge nachweisen, so daß es sich entweder um Artefakte der SSCP handelt, oder die Sequenzabweichungen in den nicht durch die Sequenzierung erfaßten Intronabschnitten liegen.

Für den Patienten Cys 94 wurde in Exon 12 des SLC7A9-Gens ein Basenaustausch detektiert, der zunächst für einen Polymorphismus gehalten wurde, da anhand des Vergleichs mit der cDNA-Sequenz keine Abweichung von der bekannten Aminosäuresequenz ermittelt werden konnte. In weiteren Analysen, die die Etablierung eines Mutagenesprimers sowie den Verdau des Fragmentes mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen einschlossen, konnte dies jedoch nicht bestätigt werden. Die aufgetretene Sequenzabweichung ist in diesem Fall am ehesten auf einen Fehler der Taq-Polymerase in der vorangegangenen PCR zurückzuführen.

5. Ergebnisse des Mutationsscreenings

Die Gesamtzahl der untersuchten Patienten betrug 31. Dabei handelte es sich um 21 Patienten aus 16 Familien sowie 10 Patienten, die aufgrund eines anamnestisch bekannten Nierensteinleidens in die Studie miteinbezogen wurden.

Vier Patienten waren als Typ I klassifiziert, drei als nicht-Typ I und vier als heterozygot für die nicht-Typ I Cystinurie.

Von den verbleibenden 20 Patienten konnte bei 14 keine Zuordnung zu einem der beiden Subtypen erfolgen, da keine Urinproben von Anverwandten erhältlich waren.

Sechs Patienten konnten nicht sicher als heterozygot, homozygot oder gemischt-heterozygot eingestuft werden, da nur die Urinproben eines Elternteiles vorlagen (vier Patienten Typ I/untypisiert, zwei Patienten nicht-Typ I/untypisiert).

Somit betrug die Gesamtzahl der im Vorfeld klassifizierten Allele 12 für die Typ I und 12 für die nicht-Typ I Cystinurie. 4 Allele konnten als nicht von der Erkrankung betroffen identifiziert werden und 34 Allele blieben unklassifiziert (siehe hierzu auch Kap. III, 1., Tab. 6).

Beim Screenen des SLC3A1-Gens konnten innerhalb des pädiatrischen Kollektivs bei drei der als Typ I klassifizierten Patienten Mutationen nachgewiesen werden. Dabei war ein Patient homozygot, die beiden anderen compound-heterozygot für

eine Mutation. Bei einem der aufgrund fehlender elterlicher Urinproben unklassifizierten Patienten konnte eine compound-Heterozygotie nachgewiesen werden.

Bei den nicht sicher zu typisierenden Patienten war kein Mutationsnachweis im SLC3A1-Gen möglich.

Bei sieben der unklassifizierten Patienten konnten Mutationen detektiert werden. Dabei war ein Patient homozygot, drei waren compound-heterozygot und drei heterozygot für Mutationen im SLC3A1-Gen. Die Zahl der insgesamt im SLC3A1-Gen nachgewiesenen Mutationen lag somit bei neunzehn.

Proband/Familienangehörige	Klassifikation	SLC3A1-Mutation	SLC7A9-Mutation
Cys 48 P	unkl./unkl.	M467T	-
Cys 49 P	unkl./unkl.	R270X/M467T	-
Cys 50 P	unkl./unkl.	-	G105R/-
Cys 51 P	unkl./unkl.	-	c969_971del/-
Cys 52 M	unkl./unkl.	R270X/-	-
Cys 53 P	unkl./unkl.	R270X/R270X	-
Cys 54 V	I/unkl.	R365W/-	-
Cys 55 M	I/unkl.	M467T/-	-
Cys 56 P	I/I	R365W/M467T	-
Cys 57 M	nicht I/-	-	-
Cys 58 P	nicht I/unkl.	-	-
Cys 59.M	I/unkl.	-	-
Cys 60 P	I/unkl.	-	-
Cys 61 V	nicht I/-	-	-
Cys 62.M	nicht I/-	-	-
Cys 63 P*	nichtI/nicht I	-	-
Cys 64 P*	nichtI/nicht I	-	-
Cys 65 P	unkl./unkl.	P508A/-	-
Cys 66 T	unkl./unkl.	-	-
Cys 67 T	unkl./unkl.	-	-
Cys 68 M	nichtI/-	-	A331V/-
Cys 69 S	nichtI/unkl.	-	A331V/-
Cys 70 P	nichtI/unkl.	-	A331V/-
Cys 71 S	-/-	-	-
Cys 72 S	-/-	-	-
Cys 73 V	I/-	T216M/-	-
Cys 74 M	I/-	T216M/-	-
Cys 75 S	-/-	T216M/-	-
Cys 76 S	-/-	-	-
Cys 77 P	I/I	T216M/T216M	-
Cys 78 V	I/-	S547W/-	-
Cys 79 M	I/-	M467T/-	-
Cys 80 P	I/I	M467T/S547W	-
Cys 81 S	-/-	-	-
Cys 82 V	nicht I/-	-	-
Cys 83 M	nicht I/-	-	-
Cys 84 P*	nichtI/-	-	-
Cys 85 P*	nichtI/-	-	-
Cys 86 V	I/-	-	-
Cys 87 P	I/unkl.	-	-
Cys 88 P	unkl./unkl.	M467T/-	-

IV Ergebnisse

Cys 89 P	unkl./unkl.	-	-
Cys 90 S	unkl./unkl.	-	-
Cys 91 V	-/-	-	-
Cys 92 M	nicht I/-	-	A224V/-
Cys 93 P*	nicht I/-	-	A224V/-
Cys 94 P*	nicht I/-	-	A224V/-
Cys 95 P	unkl./unkl.	M467T/R365W	-
Cys 96 V	nicht I/-	-	-
Cys 97 M	nicht I/-	-	-
Cys 98 P	nicht I/nicht I	-	-
Cys 99 T	nicht I/-	-	-
Cys 102 P	unkl./unkl.	R362C/R365W	-
Cys 104 V	I/-	-	-
Cys 125 M	I/-	-	-
Cys 105 P	I/I	-	-
Cys 106 P	unkl./unkl.	-	G105R/-
Cys 107 P*	unkl./unkl.	-	-
Cys 108 P*	unkl./unkl.	-	-
Cys 109 P	unkl./unkl.	R365W/c1749_1751del	-
Cys 110 P*	I/unkl.	-	G105R/-
Cys 111 M	I/unkl.	-	-
Cys 112 P*	I/unkl.	-	G105R/-
Cys 113 V	unkl./unkl.	-	G105R/-

*betroffene Geschwister, V=Vater, M=Mutter, S=Sohn, T=Tochter

Tab.16: Ergebnisse des Mutationsscreenings unter Berücksichtigung der Familienmitglieder

Innerhalb des pädiatrischen Kollektivs konnten bei den drei in der vorangegangenen biochemischen Untersuchung als nicht-Typ I klassifizierten Patienten keine Mutationen im SLC7A9-Gen nachgewiesen werden. Zwei der als heterozygot eingestuft Patienten wiesen eine Mutation auf. Bei den nicht sicher zu typisierenden Patienten wurden im SLC7A9-Gen eine Mutation bei den nicht Typ I/untypisierten sowie jeweils eine Mutation für zwei der Typ I/untypisierten Patienten identifiziert. Von den untypisierten Patienten des pädiatrischen Kollektivs wies einer, von den verbleibenden untypisierten Patienten zwei eine Mutation im SLC7A9-Gen in heterozygoter Form auf.

Die Gesamtzahl der detektierten Mutationen lag bei acht.

Die Zahl der im SLC3A1- und SLC7A9-Gen untersuchten Polymorphismen betrug siebzehn. Die vier im SLC3A1-Gen untersuchten Polymorphismen waren dabei bereits zuvor bekannt. Zwölf der im SLC7A9-Gen untersuchten Polymorphismen wurden kürzlich beschrieben [Schmidt, Diplomarbeit 2000]. Der Polymorphismus c1328C/T in Exon 11 des SLC7A9-Gens wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmalig mit Hilfe eines Restriktionsverdaues (siehe hierzu auch Kap. III, 3.4.1, Tab.12) nachgewiesen.

Proband	Polymorphismen im SLC3A1-Gen			
	nt 114C/A	nt 231T/A	nt1854A/G	nt2189C/T
Cys 48	C/C	T/A	A/G	C/T
Cys 49	C/A	T/A	A/G	C/T
Cys 50	C/C	T/T	G/G	T/T
Cys 51	C/A	T/T	A/G	C/T
Cys 53	A/A	T/T	G/G	T/T
Cys 56	C/C	T/T	A/A	C/C
Cys 58	C/C	T/T	A/A	C/C
Cys 60	C/C	T/T	A/A	C/C
Cys 63	C/A	T/T	A/A	C/C
Cys 64	C/C	T/T	A/A	C/C
Cys 65	C/C	T/T	A/G	C/T
Cys 70	C/A	T/T	A/G	C/T
Cys 77	C/C	T/T	A/A	C/C
Cys 80	C/C	T/A	A/A	C/C
Cys 84	C/C	T/T	A/A	C/C
Cys 85	C/C	T/T	A/A	C/C
Cys 87	C/C	T/T	A/A	C/C
Cys 88	C/C	T/A	A/A	C/C
Cys 89	C/A	T/T	A/G	C/T
Cys 93	C/C	T/T	A/G	C/T
Cys 94	C/C	T/T	A/G	C/T
Cys 95	C/C	T/A	A/A	C/C
Cys 98	C/C	T/T	A/A	C/C
Cys 102	C/C	T/T	A/A	C/C
Cys 105	C/C	T/T	G/G	T/T
Cys 106	C/A	T/T	G/G	T/T
Cys 107	C/A	T/T	G/G	T/T
Cys 108	C/C	T/T	A/A	C/C
Cys 109	C/C	T/T	A/G	C/T
Cys 110	C/C	T/T	A/A	C/C
Cys 112	C/C	T/T	A/A	C/C

Tab.17: Untersuchte Polymorphismen im SLC3A1-Gen

Proband	Polymorphismen im SLC7A9-Gen										
	c147 C/T	c386 C/T	c420 +22 T/G	c584 C/T	c596 T/C	c610 T/C	c663 +10 T/C	c692 C/T c852 C/A c872 C/T	c1157 G/A	c1162 +51 A/G	c1328 C/T
Cys 48	C/T	C/C	T/T	C/C	T/T	T/T	T/T	wt	G/G	A/A	T/C
Cys 49	C/C	C/C	T/T	C/C	T/T	T/T	T/T	wt	G/G	A/A	T/C
Cys 50	C/C	C/C	T/T	C/C	T/T	T/T	T/T	wt	G/G	A/A	C/C
Cys 51	C/C	C/C	T/T	C/C	T/T	T/T	T/T	wt	G/G	A/A	C/C
Cys 53	C/C	C/C	T/T	C/C	T/T	T/T	T/T	wt	G/G	A/A	C/C
Cys 56	C/C	C/C	G/G	T/T	T/T	C/C	T/T	hom	G/G	A/A	T/C
Cys 58	C/C	C/C	G/G	T/T	T/T	C/C	T/T	hom	G/G	A/A	C/C
Cys 60	C/C	C/C	T/G	C/T	T/T	C/T	T/T	het	G/G	A/A	T/C
Cys 63	C/C	T/T	T/T	C/C	T/T	T/T	T/T	wt	G/G	A/A	C/C
Cys 64	C/C	T/T	T/T	C/C	T/T	T/T	T/T	wt	G/G	A/A	C/C
Cys 65	C/C	C/C	T/G	C/T	T/T	C/T	T/T	het	G/G	A/A	T/C
Cys 70	C/C	C/C	T/T	C/C	T/T	T/T	T/T	wt	G/G	A/A	C/C
Cys 77	C/C	C/C	T/G	C/T	T/T	C/T	T/T	het	G/G	A/A	T/C
Cys 80	C/C	C/C	T/T	C/C	T/T	T/T	T/T	wt	G/G	A/A	C/C
Cys 84	C/C	C/C	T/T	C/C	T/T	T/T	T/T	wt	G/A	A/A	C/C
Cys 85	C/C	C/C	T/G	C/C	T/C	C/T	T/C	het	G/G	A/G	C/C
Cys 87	C/C	C/C	T/G	C/C	T/C	C/T	T/C	het	G/G	A/G	C/C
Cys 88	C/T	C/C	T/G	C/C	T/C	C/T	T/C	het	G/G	A/G	C/C
Cys 89	C/C	T/T	T/T	C/C	T/T	T/T	T/T	wt	G/G	A/A	C/C
Cys 93	C/C	C/C	T/G	C/T	T/T	C/T	T/T	het	G/G	A/A	T/C
Cys 94	C/C	C/C	T/T	C/C	T/T	T/T	T/T	wt	G/G	A/A	C/C
Cys 95	C/C	C/C	T/G	C/T	T/T	C/T	T/T	het	G/G	A/A	C/C
Cys 98	C/C	T/C	T/G	C/C	T/C	C/T	T/C	het	G/G	A/G	C/C
Cys 102	C/C	C/C	T/T	C/C	T/T	T/T	T/T	wt	G/G	A/A	C/C
Cys 105	C/C	C/C	T/T	C/C	T/T	T/T	T/T	wt	G/G	A/A	C/C
Cys 106	C/C	C/C	T/T	C/C	T/T	T/T	T/T	wt	G/G	A/A	C/C
Cys 107	C/C	C/C	T/T	C/C	T/T	T/T	T/T	het	G/G	A/A	T/C
Cys 108	C/C	C/C	T/T	C/C	T/T	T/T	T/T	het	G/G	A/A	T/C
Cys 109	C/C	C/C	T/T	C/C	T/T	T/T	T/T	wt	G/G	A/A	C/C
Cys 110	C/C	C/C	T/G	C/T	T/T	C/T	T/T	het	G/G	A/A	C/C
Cys 112	C/C	C/C	T/G	C/T	T/T	C/T	T/T	het	G/G	A/A	C/C

Tab.18: Untersuchte Polymorphismen im SLC7A9-Gen

5.1 Mutationen im SLC3A1-Gen

Bislang sind 62 Mutationen im SLC3A1-Gen bekannt (siehe hierzu auch Kap. II, 2.2.1, Tab.2). Von den im Rahmen dieser Arbeit detektierten Mutationen waren die Mutation T216M, R270X, R362C, R365W, M467T sowie S547W bereits im Vorfeld beschrieben [Calonge et al. 1994, Gasparini et al. 1995, Pras et al.1995, Bisceglia et al. 1996, Albers et al. 1999 und Bisceglia et al. 2001].

Erstmals nachgewiesen werden konnten die Deletion IVS6del2/3T in Exon 6, der Basenaustausch P508A in Exon 9 sowie die Deletion c1749_1751del in Exon 10 des SLC3A1-Gens.

5.1.1 T216M (c647C/T), Exon 3

Wie bereits in einer vorausgehenden Studie beschrieben [Schmidt, Diplomarbeit 2000] zeigten die als interne Kontrollen mituntersuchten Patienten Cys 2 und 13, die die Mutation in hetero- bzw. homozygoter Form aufwiesen, keine Auffälligkeit in der SSCP-Analyse. Somit konnte das Auftreten der Mutation in dem untersuchten Kollektiv nicht sicher ausgeschlossen werden.

Hierzu erfolgte ein Restriktionsverdau mit dem Enzym *Nla*III. Das Enzym besitzt zwei Schnittstellen in der Wildtypsequenz. Es entstehen Fragmente der Größen 144, 85 und 12 Basenpaare (bp). Bei Vorliegen der Mutation entsteht eine zusätzliche Schnittstelle, die das 144bp-Fragment in zwei Fragmente der Längen 77 und 67bp unterteilt.

Durch den Restriktionsverdau konnte die Mutation bei dem Patienten Cys 77 in homozygoter Form nachgewiesen werden. Beide Elternteile (Cys 73 und 74) tragen die Mutation in heterozygoter Form.

Von den Geschwistern des Patienten ist ein Bruder (Cys 75) heterozygoter Anlage-träger für die Mutation, der andere Bruder (Cys 76) trägt das mutierte Allel nicht.

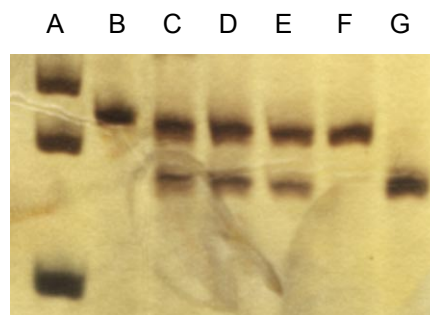


Abb.3: Darstellung der Mutation T216M durch Restriktionsverdau mit dem Enzym *Nla*III ; Bahn A: 100bpl, Bahn B: unverdautes Produkt, Bahn C: Cys 73 (Vater), Bahn D: Cys 74 (Mutter), Bahn E: Cys 75 (Bruder), Bahn F: Cys 76 (Bruder), Bahn G: Cys 77 (Patient)

5.1.2 R270X (c808C/T), Exon 4

Die SSCP-Analyse des Exons 4 zeigte ein auffälliges Muster für die Patienten Cys 49, 53 und 105. Zur weiteren Abklärung wurde zunächst ein Restriktionsverdau mit dem Enzym *Taq*I durchgeführt. Mit Hilfe eines Mutageneseprimers wird in der

Wildtypsequenz eine Schnittstelle für das Enzym geschaffen, die zur Spaltung des PCR-Produktes in zwei 100bp große Fragmente führt. Liegt die Mutation vor, entfällt die Schnittstelle und es kann nur das 200bp große PCR-Produkt detektiert werden.

Die Patienten Cys 49 und 53 wiesen die Mutation in hetero- bzw. homozygoter Form auf. Cys 105 zeigte keine Auffälligkeit im Restriktionsverdau.

Da das Vorliegen der Mutation die Zerstörung der Schnittstelle nach sich zieht, wurden die Ergebnisse für Cys 49 und 53 durch direktes Sequenzieren bestätigt. Zudem erfolgte auch eine Sequenzierung für den Patienten Cys 105. Dabei ließ sich kein Nukleotidaustausch im Exon oder in den Exon/Intron-Übergängen nachweisen. Somit ist davon auszugehen, daß es sich hierbei entweder um ein Artefakt der SSCP-Analyse, oder um eine nicht durch die Sequenzierung erfasste, im Intron gelegene Sequenzabweichung handelt. Die Mutter des Patienten Cys 53 (Cys 52) konnte als heterozygote Anlageträgerin für die Mutation identifiziert werden.

5.1.3 R362C (c1084C/T) und R365W (c1093C/T), Exon 6

Die Analyse des Exons 6 zeigte auffällige Bandenmuster für die Patienten Cys 56, 84, 85, 95, 98, 102, 107 und 109. Zunächst wurde für diese Patienten ein Restriktionsverdau mit dem Enzym *MspI* durchgeführt. Dieses Enzym ermöglicht den Nachweis der Mutationen R365W und R365L. Das Enzym schneidet die Wildtypsequenz in drei Fragmente der Größen 154, 31 und 50bp. Durch das Vorliegen einer der beiden Mutationen wird die erste Schnittstelle zerstört und es entstehen zwei Fragmente der Größen 185 und 50bp. Die Patienten Cys 56, 95, 102 und 109 zeigten einen Verlust der Schnittstelle. Die übrigen Patienten waren für diesen Verdau unauffällig.

Die Sequenzierung der im Restriktionsverdau auffälligen Patienten zeigte das Vorliegen der Mutation R365W in heterozygoter Form bei den Patienten Cys 56, 95, 102 und 109. Durch die Sequenzierung konnte bei Cys 102 zusätzlich die ebenfalls in Exon 6 gelegene Mutation R362C nachgewiesen werden. Für Cys 56 konnte die elterliche Herkunft der Mutation geklärt werden. Der Vater des Patienten (Cys 54) ist hierbei heterozygoter Anlageträger. Der Patient Cys 98 zeigte keine Sequenzabweichungen im Exon oder in den Exon/Intron-Übergängen. Die Ergebnisse der Sequenzierung für die Patienten Cys 84 und 85 werden unter 5.2.3 (S.64), das Ergebnis für Cys 107 unter 5.1.4 (S.60) besprochen.

5.1.4 IVS6del2/3T

Das bereits oben beschriebene abweichende SSCP-Bandenmuster für die Patientin Cys 107 ließ sich nach der Sequenzierung auf die heterozygot vorliegende Deletion eines Basenpaares am Exon/Intron-Übergang zurückführen. Aufgrund der in der Wildtypsequenz an dieser Stelle vorliegenden Basenabfolge war jedoch nicht feststellbar, ob es sich bei dem vorliegenden Basenverlust um die Deletion des zweiten oder dritten Thymidinnukleotides handelt. Somit ist keine genaue Aussage darüber möglich, inwiefern die beschriebene Deletion Auswirkungen auf das Genprodukt und damit den Charakter einer Mutation hat. Für den Fall einer Deletion des zweiten Thymidinnukleotides könnte ein fehlerhaftes Spleißen der mRNA angenommen werden, da sich das am Spleißvorgang beteiligte, zur Consensus-Sequenz komplementäre snRNP-Molekül (small nuclear ribonucleoprotein particle) nicht regelrecht anlagern kann.

Die Deletion ließ sich bei der ebenfalls von der Erkrankung betroffenen Schwester der Patientin Cys 108 nicht nachweisen.

Da keine DNA-Proben der Eltern vorhanden waren, konnte nicht geklärt werden, von welchem Elternteil die Deletion stammt.

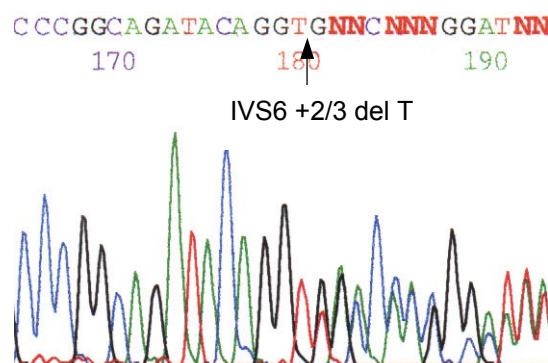


Abb.4: Darstellung der Deletion IVS6del2/3T durch Sequenzierung

5.1.5 M467T (c1400T/C), Exon 8

Abweichende Bandenmuster in der SSCP wurden für die Patienten Cys 48, 49, 56, 80, 88 und 95 detektiert. Die weitere Abklärung erfolgte durch Restriktionsverdaue mit den Enzymen *Nla*III und *A*IuI. Das Enzym *Nla*III dient dem Nachweis der Mutation M467T. Die Wildtypsequenz wird in drei Fragmente der Längen 189, 85 und 10bp gespalten. Liegt die Mutation M467T vor, entfällt eine Schnittstelle und es entstehen Fragmente der Längen 197 und 87bp. Da der Wegfall der Schnittstelle auch durch

das Vorliegen der Mutation M467K bedingt sein kann, ist zur weiteren Abklärung ein zweiter Restriktionsverdau mit dem Enzym *AluI* notwendig. Die Wildtypsequenz wird von diesem Enzym zweimal geschnitten. Es entstehen 189, 85 und 10bp lange Fragmente. Die Mutation M467K schafft eine weitere Restriktions-schnittstelle, so daß Fragmente der Längen 98, 91, 85 und 10bp entstehen.

Alle Patienten zeigten den Verlust einer Schnittstelle beim Restriktionsverdau mit *NlaIII*. Der Verdau mit dem Enzym *AluI* war unauffällig.

Die Sequenzierung bestätigte das heterozygote Auftreten der Mutation bei allen oben genannten Patienten. Bei dem Patienten Cys 56 stammt das die Mutation tragende Allel hierbei von der Mutter (Cys 55), bei Cys 80 konnte ebenfalls die mütterliche Herkunft des Allels (Cys 79) nachgewiesen werden.

5.1.6 P508A (c1523C/G), Exon 9

Auffälligkeiten in der SSCP zeigten sich bei den Patienten Cys 48 und 65. In der Sequenzierung der Patientin Cys 48 ließen sich keine Änderungen in der Nukleotidabfolge des Exons sowie der Exon/Intron-Übergänge feststellen.

Die Patientin Cys 65 wies den Basenaustausch c1523C/G auf, der zum Austausch eines Prolins durch Arginin führt. Dieser Basenaustausch lag bei der Patientin in heterozygoter Form vor. Um ein adäquates Screenen zukünftiger Patientenkollektive, sowie von Kontrollpersonen zu ermöglichen, wurde ein Restriktionsverdau mit dem Enzym *BsmI* etabliert. Durch das Vorliegen der Mutation wird eine Restriktions-schnittstelle geschaffen, die zur Spaltung des 200bp umfassenden PCR-Produktes in Fragmente der Längen 125 und 75bp führt.

Die Mutation ließ sich in einem Kollektiv von 50 Kontrollpersonen nicht nachweisen.

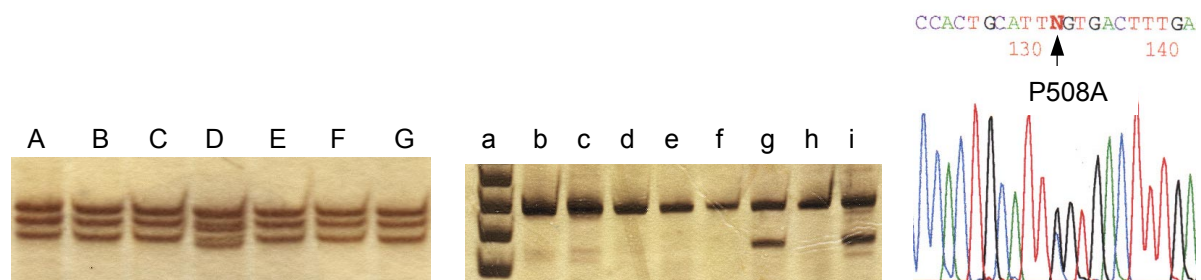


Abb.5: Darstellung der Mutation P508A durch SSCP, *BsmI*-Restriktionsverdau und durch Sequenzierung; Bahn A, B, C, E, F und G: für diese Mutation unauffällige Probanden, Bahn D: Cys 65, Bahn a: 50 bpl, Bahn b: unverdautes Produkt, Bahn c, d, e und f: für die Mutation unauffällige Probanden, Bahn g: Cys 65, Bahn h: Cys 66 (Tochter nicht betroffen), Bahn i: Cys 67 (Tochter und Trägerin des betroffenen Allels)

5.1.7 S547W (c1640C/G), Exon 10

Bei beiden in der SSCP-Analyse des Exons 10 auffällig gewordenen Patienten, Cys 80 und 109 fand eine weitere Analyse durch die direkte Sequenzierung statt. Das Ergebnis der Sequenzierung für die Patientin Cys 109 wird in 5.1.8 besprochen.

Die Patientin Cys 80 zeigte die Mutation S547W in heterozygoter Form. Die in der Sequenz an der Stelle c1640C/G gelegene Nukleotidabweichung bewirkt den Austausch eines Serins gegen Tryptophan in der Aminosäuresequenz.

Der Vater der Patientin (Cys 78) konnte als heterozygoter Anlageträger für die Mutation identifiziert werden.

5.1.8 c1749_1751del, Exon 10

Die Sequenzierung der Patientin Cys 109 zeigte die Deletion eines Adenin-nukleotides an Position c1750 in Exon 10. Diese Sequenzabweichung lag bei der Patientin in heterozygoter Form vor. Die Deletion führt zu einer Leserasterverschiebung, die eine Veränderung der Proteinstruktur bis zum Erreichen eines Stop-Codons mit Kettenabbruch nach sich zieht (R584fsX596).

Eine Abklärung der elterlichen Herkunft der Deletion war nicht möglich.

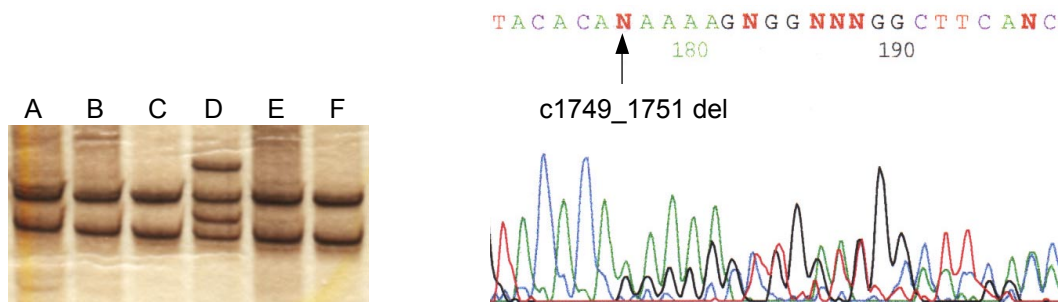


Abb.6: Darstellung der Mutation c1749_1751del mittels SSCP und Sequenzierung; Bahn A, B, C, E und F: für die Mutation unauffällige Probanden, Bahn D: Cys 109

5.2 Polymorphismen in SLC3A1

Im SLC3A1-Gen wurde die Untersuchung von vier bereits beschriebenen Polymorphismen durchgeführt. Die bisher beschriebenen Häufigkeiten dieser Polymorphismen unter Patienten und Kontrollen können Tabelle 19 (S.63) entnommen werden. Geschwisterpaare wurden hierbei nur einfach in die Wertung einbezogen.

Bei zwei Patienten (Cys 84 und 85), bei denen es sich zudem um Geschwister handelt, konnte ein Basenaustausch in Exon 6 beschrieben werden (siehe 5.2.3). Es zeigte sich jedoch, daß dieser Basenaustausch keinen Aminosäureaustausch zur Folge hat und es sich daher um einen Polymorphismus handelt. Da dieser Polymorphismus bislang nicht beschrieben wurde und im vorliegenden Patientenkollektiv nur unter den oben genannten Geschwistern auftrat, handelt es sich vermutlich um eine sehr seltene Sequenzvariante. Zur weiteren Abklärung der Häufigkeit dieser Variante ist die Untersuchung eines größeren Kontrollkollektives erforderlich.

Polymorphismus	Frequenz unter Patienten	Frequenz unter Patienten [Gasparini et al. 1995]	Frequenz unter Kontrollpersonen [Gasparini et al. 1995]
nt114C/A (Exon 1)	7/52	20/94	27/100
nt231T/A (Exon 1)	5/52	12/102	0/160
nt1854A/G (Exon 10)	8/52	29/94	34/100
nt2189C/T (3'UTR)	8/52	29/94	34/100

Tab.19: Häufigkeitsverteilung der untersuchten Polymorphismen im SLC3A1-Gen

5.2.1 nt114C/A, Exon 1

Der Nachweis des Polymorphismus nt114C/A erfolgte durch Restriktionsverdau mit dem Enzym *HindIII*. Mit Hilfe eines Mutageneseprimers wird eine Schnittstelle für das Enzym eingeführt, wenn der Haplotyp nt114A/A vorliegt. Es entstehen ca. 130 und 20bp große Fragmente. Bei Vorliegen der Wildtypsequenz bleibt das ursprüngliche Produkt mit einer Länge von 150bp erhalten.

5.2.2 nt231T/A, Exon 1

Die Zuordnung der Haplotypen für den Polymorphismus nt231T/A war bereits anhand interner Kontrollen in der SSCP-Analyse möglich. Um jedoch auf den ebenfalls in diesem Exon lokalisierten Polymorphismus nt114C/A oder in diesem Exon auftretende Mutationen zurückzuführende Fehlinterpretationen zu vermeiden, erfolgte ein Restriktionsverdau mit dem Enzym *DdeI*.

Das Enzym schneidet die Sequenz bei Auftreten des Haplotyps nt231A/A in zwei Fragmente der Größen 260 und 33bp.

5.2.3 nt1035G/A, Exon 6

Die beiden diese seltene Sequenzabweichung aufweisenden Geschwister Cys 84 und 85 wiesen ein auffälliges Bandenmuster in der SSCP-Analyse auf. Durch Sequenzierung konnte die Nukleotidabweichung nt1035G/A nachgewiesen werden, die keinen Aminosäureaustausch zur Folge hat (E345E).

Die beschriebene Sequenzvariante konnte bisher in keinem der in anderen Studien untersuchten Patientenkollektive nachgewiesen werden. Dies legt den Schluß nahe, daß es sich um einen sehr seltenen Polymorphismus handelt. Bei beiden Geschwistern konnten sowohl im SLC3A1- als auch im SLC7A9-Gen keine weiteren Abweichungen von der bekannten Sequenz detektiert werden.

Zur Abklärung der Häufigkeit des Polymorphismus ist aufgrund des zu erwartenden geringen Auftretens das Screenen eines größeren Kontrollkollektives erforderlich.

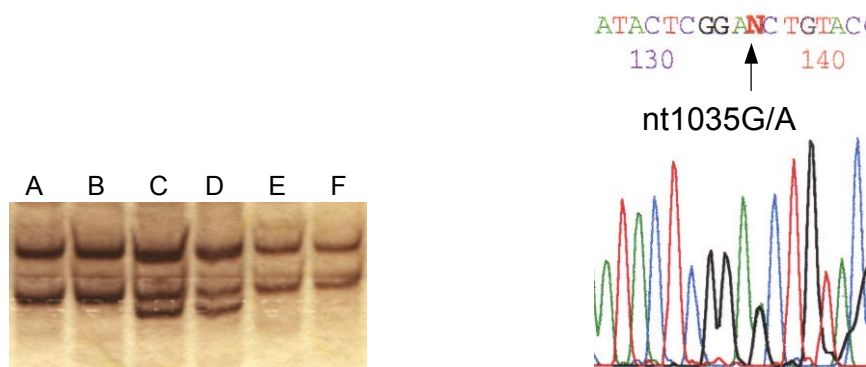


Abb.7: Darstellung des Polymorphismus nt1035G/A mittels SSCP und Sequenzierung; Bahn A, B, E und F: unauffällige Probanden, Bahn C und D: Cys 84 und 85

5.2.4 nt1854A/G (M618I), Exon 10

Der Nachweis des in Exon 10 gelegenen Polymorphismus nt1854A/G erfolgte durch Verdau des mit einem Mutageneseprimer erzeugten PCR-Produktes durch das Enzym *BsmI* [Gasparini et al. 1995]. Das Enzym schneidet bei Vorliegen des Genotyps c1854G/G, so daß zwei Fragmente der Längen 137 und 13bp entstehen. Zusätzlich zu den in dieser Studie untersuchten Patienten, wurde auch das bereits im Rahmen einer Studie von Schmidt et al. (2002) untersuchte Patientenkollektiv gescreent. Die hierbei beobachtete Häufigkeit des Polymorphismus betrug 13/68 für das Vorliegen des Genotyps c1854A/G.

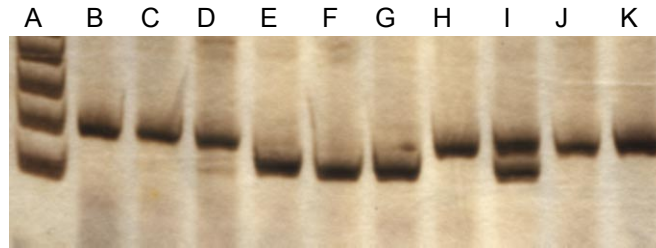


Abb.8: Darstellung des Polymorphismus M618I durch *BsmI*-Restriktionsverdau; Bahn A: 50bpl, Bahn B: unverdautes Produkt, Bahn C, D, H, J und K: Träger der Wildtypsequenz, Bahn I: heterozygoter Anlageträger, Bahn E, F, und G: homozygote Anlageträger

5.2.5 nt2189C/T, 3'untranslatierte Region

Für die Detektion des im Intron 10 gelegenen Polymorphismus nt2189C/T war wie bereits für den oben beschriebenen im Exon gelegenen Polymorphismus die Etablierung eines Mutageneseprimers erforderlich. Das auf diese Weise erzeugte PCR-Produkt wird bei Vorliegen der Wildtypsequenz in zwei Fragmente der Größen 148 und 22bp geschnitten. Liegt der Genotyp c2189T/T vor, entfällt die Schnittstelle und es kann lediglich das 150bp umfassende Ausgangsfragment detektiert werden. Auch hier fand die Untersuchung des im Vorfeld von Schmidt et al. (2002) beschriebenen Patientenkollektives statt. Der Genotyp c2189C/T trat hierbei mit einer Häufigkeit von 12/68 auf.

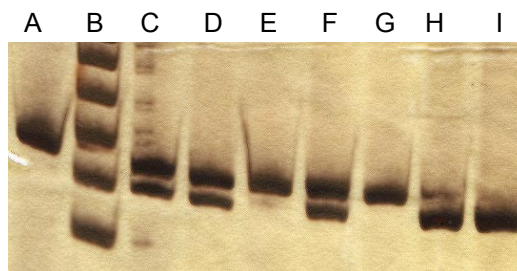


Abb.9: Darstellung des Polymorphismus nt2189 C/T durch *AccII*-Restriktions-Verdau; Bahn A: unverdautes Produkt, Bahn B: 50bpl, Bahn I: Träger der Wildtypsequenz, Bahn C, D, F und H: heterozygote Anlageträger, Bahn E und G: homozygote Anlageträger

5.3 Mutationen in SLC7A9

Bisher sind 38 Mutationen im SLC7A9-Gen beschrieben (siehe hierzu auch Kap. II, 2.2.2, Tab.4, S.21). Die Punktmutation G105R gehört hierbei zu den häufigsten vorbeschriebenen Mutationen und konnte bei vier Patienten nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Studie erstmalig nachgewiesen werden konnten die

Punktmutation A224V in Exon 6, die Deletion c969_971del in Exon 8, sowie die Punktmutation A331V in Exon 10 des SLC7A9-Gens.

5.3.1 G105R (c496G/A), Exon 4

Wie bereits mehrfach dargelegt (siehe 3 und 4.2) erfolgte die Analyse des Exons 4 bei allen Patienten durch direkte Sequenzierung. Hierbei konnte bei den Patienten Cys 50, 110 und 112 die Mutation G105R heterozygot nachgewiesen werden. Bei den Patienten Cys 110 und 112 handelt es sich um Geschwister. Um die Herkunft des die Mutation tragenden Allels zu klären erfolgte die Untersuchung der Eltern mittels *Apal*-Restriktionsverdau. Liegt die Mutation vor, wird eine Restriktionschnittstelle für das Enzym zerstört. Durch den Restriktionsverdau konnte die väterliche Herkunft des die Mutation tragenden Allels nachgewiesen werden. Die Patientin Cys 106 trägt die Mutation vermutlich in homozygoter Form. Aufgrund des Fehlens elterlicher DNA-Proben konnte jedoch eine Deletion des zweiten Allels in SLC7A9 nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden. Da die Patientin ebenfalls für alle in Exon 4 beschriebenen Polymorphismen homozygot war, konnte auch auf diese Weise kein Ausschluß größerer Deletionen erfolgen.

5.3.2 A224V (c856C/T), Exon 6

In der SSCP-Analyse des Exons 6 zeigte sich bei den Geschwistern Cys 93 und 94 ein von dem der restlichen Patienten abweichendes Bandenmuster.

In der Sequenzierung trat bei beiden Geschwistern der Basenaustausch c856C/T auf, der einen Aminosäureaustausch von Alanin zu Valin zur Folge hat. Die Untersuchung der Eltern ergab, daß die Mutter (Cys 92) heterozygote Anlageträgerin für diese Mutation ist. Keine der mittels SSCP-Analyse untersuchten 50 Kontrollpersonen war für die beschriebene Mutation auffällig.

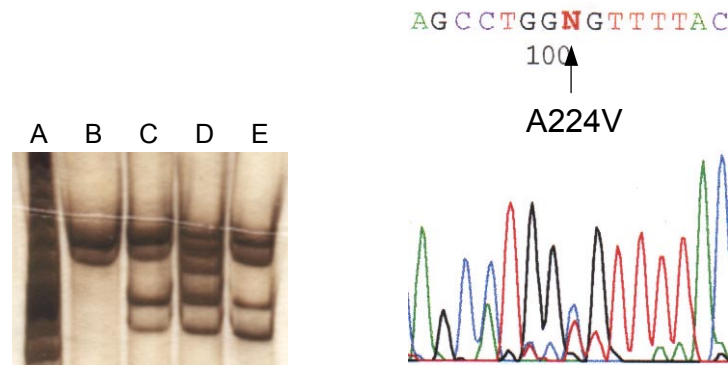


Abb.10: Darstellung der Mutation A224V durch SSCP und Sequenzierung; Bahn A: 100bpl, Bahn B: Cys 91 (Vater), Bahn C: Cys 92 (Mutter) Bahn D: Cys 93, Bahn E: Cys 94

5.3.3 c969_971del, Exon 8

Bei dem in der SSCP für Exon 8 auffällig gewordenen Patienten Cys 51 konnte durch Sequenzierung die Deletion einer Thymidinbase an Position c970 nachgewiesen werden. Die Differenzierung des Homo- oder Heterozygotenstatus war bei diesem Patienten nicht eindeutig möglich, da auch hier elterliche DNA-Proben fehlen und die Deletion des zweiten Allels nicht sicher ausgeschlossen werden konnte. Die Deletion resultiert in einer Verschiebung des Leserahmens, die die Änderung der Aminosäuresequenz bis zum Auftreten eines Stop-Codons nach sich zieht (L262fsX263).

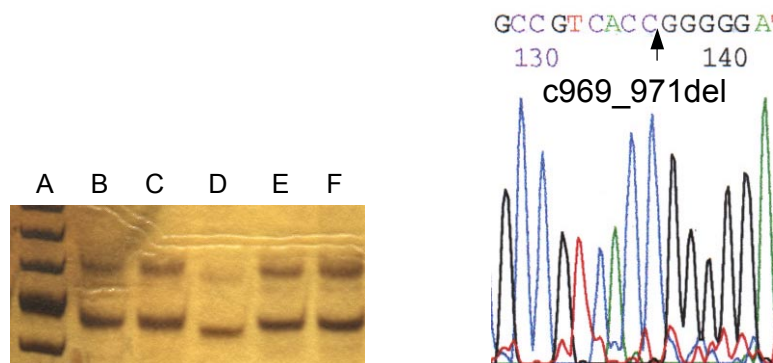


Abb.11: Darstellung der Deletion c969_971del mittels SSCP und Sequenzierung; Bahn A: 100bpl, Bahn B, C, E und F: unauffällige Probanden, Bahn D: Cys 51

5.3.4 A331V (c1177C/T), Exon 10

Der in der SSCP des Exons 10 auffällige Patient Cys 70 zeigte in dem mit dem Enzym *Acil* durchgeführten Restriktionsverdau den Verlust einer Schnittstelle. Das Enzym schneidet die Wildtypsequenz dreimal, so daß vier Fragmente der Längen 50,

40, 67 und 53bp entstehen. Liegt die Mutation A354T vor, wie dies nach der SSCP-Analyse zunächst vermutet wurde, wird die dritte Schnittstelle zerstört und es liegen Fragmentlängen von 50, 40 und 120bp vor. Beim Vergleich der durch den Verdau entstandenen Fragmentgrößen mit den für die Mutation A354T zu erwartenden Größen zeigte sich jedoch keine Übereinstimmung. Stattdessen wurden Fragmente einer Länge von 50, 107 und 53bp nachgewiesen, die auf den Verlust der zweiten in Exon 10 gelegenen Schnittstelle für das Enzym *Acil* hindeuteten.

Dies konnte in der Sequenzierung bestätigt werden. Es zeigte sich ein Basenaustausch von C->T an Nukleotidposition c1177. Dieser Basenaustausch lag bei Cys 70 homozygot vor und hat einen Aminosäureaustausch von Alanin zu Valin zur Folge. Die Untersuchung der restlichen Familienmitglieder zeigte, daß die Mutter (Cys 68) sowie einer der Brüder (Cys 69) heterozygote Anlageträger sind. Die beiden anderen Brüder sind nicht betroffen. Da keine DNA-Probe des Vaters erhältlich war, konnte eine Deletion des zweiten Allels und die daraus resultierende Heterozygotie des Patienten Cys 70 nicht sicher ausgeschlossen werden.

Die Mutation A331V konnte in einem Kollektiv von 50 Kontrollpersonen durch Restriktionsverdau mit dem Enzym *Acil* nicht nachgewiesen werden.

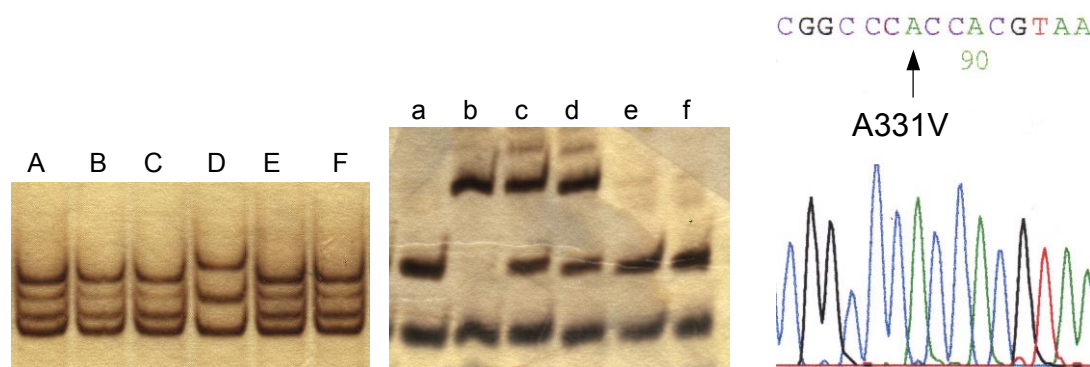


Abb.12: Darstellung der Mutation A331V durch SSCP, *Acil*-Restriktionsverdau und Sequenzierung; Bahn A, B, C, E und F: für diese Mutation unauffällige Probanden, Bahn a: für die Mutation unauffällige Kontrollperson, Bahn b: Cys 70, Bahn c: Cys 68 (Mutter), Bahn d: Cys 69 (Bruder), Bahn e: Cys 71 (Bruder), Bahn f: Cys 72 (Bruder)

5.4 Polymorphismen in SLC7A9

Im SLC7A9-Gen wurden zwölf bereits beschriebene Polymorphismen untersucht [Schmidt, Diplomarbeit 2000]. Die Häufigkeiten dieser Polymorphismen unter Patienten und Kontrollen sind der Tabelle 20 (S.69) zu entnehmen. Auch hier wurde bei Geschwisterpaaren der Genotyp nur einfach gewertet.

Zusätzlich zu den bereits bekannten Polymorphismen wurde ein Polymorphismus an Nukleotidposition c1328 in Exon 11 des SLC7A9-Gens nachgewiesen (siehe 5.4.9).

Polymorphismen	Frequenz unter Patienten	Frequenz unter Patienten [Schmidt, 2000]	Frequenz unter Kontrollpersonen [Schmidt, 2000]
c147C/T	2/32	8/33	6/70
c386C/T	1/32	1/68	-
c420+22T/G	9/32	12/33	29/54
c584C/T	6/32	3/28	-
c596T/C	3/32	6/28	-
c610C/T	9/32	11/28	-
c663+10C/T	3/32	8/28	-
c692C/T	10/32	13/33	22/28
c852C/A	10/32	13/33	29/50
c872C/T	10/32	13/33	29/50
c1157G/A	1/32	2/68	-
c1162+51G/A	3/32	12/34	12/39

Tab.20: Häufigkeitsverteilung der untersuchten Polymorphismen im SLC7A9-Gen

5.4.1 c147C/T, Exon 2.1

Der Polymorphismus c147C/T liegt im Fragment 2.1 des zur Erhöhung der Sensitivität der SSCP durch interne Primer unterteilten Exons 2. Der Polymorphismus befindet sich im 5'untranslatierten Bereich des Exons.

Das Screening des Patientenkollektives erfolgte mit Hilfe des Restriktionsverdaues durch das Enzym *HhaI*. Die Schnittstelle die in der Wildtypsequenz eine Unterteilung des PCR-Fragmentes in Fragmente der Größen 140 und 50bp bewirkt, entfällt bei Vorliegen des Genotyps c147T/T.

5.4.2 c386C/T, Exon 3

Der im Exon 3 gelegene Polymorphismus c386C/T war erstmalig im Rahmen eines Screenings für die Mutationen W69X/W69L, die einen Nukleotidaustausch von G->A bzw. G->T zur Folge haben, beschrieben worden [Schmidt, Diplomarbeit 2000].

Bei der durch Restriktionsverdau mit dem Enzym *NdeI* durchgeführten Untersuchung entfällt bei Vorliegen einer der beiden Mutationen die Schnittstelle für das Enzym und statt zwei Fragmenten der Größen 130 und 80bp liegt das unverdaute PCR-Produkt mit einer Größe von 210bp vor. Durch das Vorliegen des Genotyps c386C/T bzw. c386T/T kommt es ebenfalls zum Verlust der Restriktionsschnittstelle für das Enzym, so daß die genaue Lokalisation des Nukleotidaustausches durch direkte Sequenzierung bestimmt werden muß.

Bei den Patienten, die im Restriktionsverdau einen Verlust dieser Schnittstelle zeigten, handelte es sich um Cys 63, 64, 89 und 98. Die darauf folgende Sequenzierung zeigte für die Patienten Cys 63, 64 und 89 den Genotyp c386T/T, der Patient Cys 98 ist für die beschriebene Sequenzvariante heterozygot.

5.4.3 c420+22T/G, Intron 3

Sowohl die als interne Kontrollen aufgetragenen Patienten, als auch das zu untersuchende Patientenkollektiv zeigten in der SSCP-Analyse kein Bandenmuster, daß die Zuordnung der Patienten zu den einzelnen Haplotypen ermöglichte.

Daher war zum Nachweis des Polymorphismus der Verdau mit dem Enzym *ScrfI* notwendig. Das Enzym schneidet das Fragment, wenn der Genotyp c420+22T/T vorliegt in drei Fragmente der Größen 180, 20 und 10bp.

5.4.4 c584C/T, c596T/C, c610C/T, c663+10C/T, Exon 4

Die Analyse der in diesem Exon beschriebenen Polymorphismen [Schmidt, Diplomarbeit 2000] erfolgte aufgrund der bereits im Vorfeld genannten Interpretationsschwierigkeiten in der SSCP-Analyse durch direkte Sequenzierung.

5.4.5 c692C/T, Exon 5

Eine Zuordnung der Patienten zu den einzelnen Haplotypen des in Exon 5 gelegenen Polymorphismus c692C/T konnte z.T. bereits anhand interner Kontrollen in der SSCP-Analyse erfolgen.

Zur exakten Bestimmung der Haplotypen wurde jedoch ein Restriktionsverdau mit dem Enzym *MboI* durchgeführt. Durch einen Mutageneseprimer wird zunächst eine Schnittstelle für das Enzym in der Wildtypsequenz geschaffen, die entfällt, wenn der Patient Träger des Genotyps c692T/T ist. Auf diese Weise entstehen statt der durch den Verdau der Wildtypsequenz entstehenden Fragmente der Größen 99, 53 und 25bp zwei Fragmente der Größen 99 und 78bp.

5.4.6 c852C/A und c872C/T, Exon 6

Die Polymorphismen c852C/A und c872C/T im Exon 6 liegen gekoppelt vor. Die Bestimmung der Haplotypen des Patientenkollektives konnte durch den Vergleich mit internen Kontrollen getroffen werden. Traten Schwierigkeiten bei der Haplotypbestimmung auf, erfolgte die weitere Analyse durch den Verdau mit dem Enzym *NlaIII*. Das Enzym bewirkt eine Spaltung des Ausgangsfragmentes in 140 und 100bp, wenn die Wildtypsequenz vorliegt. Liegt der Genotyp c852A/A vor, entfällt die Schnittstelle und es läßt sich das unverdaute Fragment einer Größe von 240bp nachweisen.

5.4.7 c1157G/A, Exon 9 und c1162+51G/A, Intron 9

Beide in Exon bzw. Intron 9 gelegenen Polymorphismen ließen sich in der SSCP-Analyse gut darstellen, so daß die Zuordnung der Patienten zu den jeweiligen Haplotypen durch den Vergleich mit internen Kontrollen getroffen werden konnte. Die Bestätigung dieser Zuordnung erfolgte für den im Exon gelegenen Polymorphismus c1157G/A mit Hilfe des Restriktionsverdaues durch das Enzym *HhaI*. Mittels eines Mutageneseprimers wird eine Schnittstelle in die Wildtypsequenz eingeführt, die eine Spaltung des PCR-Produktes in zwei Fragmente der Längen 100 und 20bp bewirkt. Liegt der Genotyp c1157A/A vor, entfällt diese Schnittstelle und das Ausgangsprodukt einer Größe von 120bp bleibt erhalten.

5.4.8 c1328C/T, Exon 11

In der SSCP-Analyse des Exons 11 zeigte sich ein polymorphes Muster, das sich in der anschließenden Sequenzierung auf die Sequenzvariante c1328C/T zurückführen ließ. Um das Screening zukünftiger Patientenkollektive und von Kontrollpersonen zu erleichtern wurde ein Restriktionsverdau mit dem Enzym *Acil* etabliert. Das Enzym schneidet das 252bp große Ausgangsfragment bei Vorliegen des Genotyps c1328T/T. Mit Hilfe dieses Restriktionsverdaues wurden das gesamte Patientenkollektiv sowie 50 Kontrollpersonen gescreent. Die Ergebnisse sind der Tabelle 21 zu entnehmen.

IV Ergebnisse

c1328C/T	Patienten	deutsche Patienten	Kontrollen
C/C	18/26	11/17	29/50
C/T	8/26	6/17	19/50
T/T	0/26	0/17	2/50

Tab.21: Häufigkeiten des Polymorphismus c1328C/T unter Patienten und Kontrollen

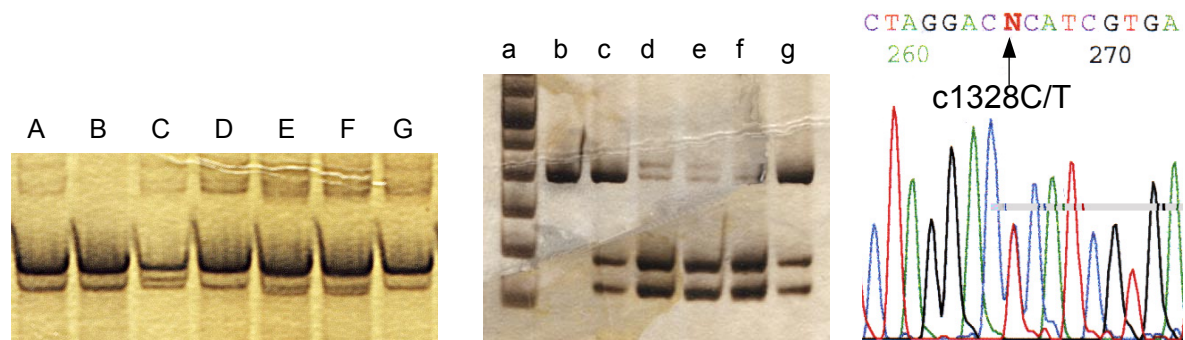


Abb.13: Darstellung des Polymorphismus c1328C/T mittels SSCP, *Aci I*-Verdau und Sequenzierung; Bahn A, B, C, D und G: Träger der Wildtypsequenz, Bahn E und F: heterozygote Anlageträger, Bahn a: 50bpl, Bahn b: unverdautes Produkt, Bahn c und g: heterozygote Anlageträger, Bahn d, e und f: Träger der Wildtypsequenz

V Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bestimmung des Anteiles der beiden bisher bekannten Gene SLC3A1 und SLC7A9 an der Ausprägung frühmanifester Cystinurieformen. Zu diesem Zweck wurde ein Kollektiv von 21 pädiatrischen Patienten aus 16 Familien auf Mutationen in beiden Genen untersucht. Zusätzlich fand die Untersuchung von 10 weiteren, unklassifizierten Patienten statt, die sich aufgrund der rezidivierenden Bildung von Cystin-Nierensteinen in Behandlung befanden. Die Häufigkeitsverteilung der Mutationen in beiden Patientengruppen sollte Aufschluß über mögliche Genotyp-Phänotyp-Korrelationen v.a. bezüglich des Manifestationsalters sowie der Zahl der seither aufgetretenen Steine geben. Zudem sollte die Detektionsrate im Gesamtkollektiv im Hinblick auf die angewandten Screeningmethoden und die mögliche Beteiligung weiterer bislang unidentifizierter Gene am Krankheitsbild untersucht werden.

1. Sensitivität der angewandten Screeningmethoden

1.1 Polymerasekettenreaktion

Die PCR-Bedingungen für die zur weiteren molekulargenetischen Untersuchung erforderliche Amplifikation der einzelnen Exons lagen für alle Fragmente bis auf die zur Untersuchung der in Exon 10 des SLC3A1-Gens gelegenen Polymorphismen zu Beginn der Arbeit vor. Es zeigte sich jedoch, daß die Amplifikation bestimmter Fragmente mit Hilfe der angegebenen Bedingungen nicht reproduzierbar war. Dies erforderte Modifikationen, die die Optimierung der Annealingtemperatur, die Anpassung der Zyklenzahl sowie die Dauer einzelner PCR-Schritte betrafen. In Einzelfällen war auch eine Änderung der Konzentration der in die PCR eingesetzten Reagentien abweichend von den in Kap III unter Punkt 3.2 genannten Konzentrationen sowie die Zugabe von DMSO (= Dimethylsulfoxid) notwendig. Für Exon 9 des SLC3A1-Gens und Exon 5 des SLC7A9-Gens war eine Amplifikation trotz der oben genannten Änderungen der PCR-Bedingungen nicht möglich, so daß die Auswahl neuer Primer und anschließende Neuetaблиerung erfolgte.

Die Sequenz der zur Untersuchung der Polymorphismen in Exon 10 des SLC3A1-Gens verwendeten Primerpaare wurde der Literatur entnommen [Gasparini et al. 1995]. Hierbei handelte es sich in beiden Fällen um Mutageneseprimer. Da in dem

Artikel keine näheren Angaben zur Amplifikation der Fragmente gemacht wurden, war auch hier eine Etablierung der PCR-Bedingungen erforderlich.

1.2 SSCP

Das Mutationsscreening des Patientenkollektives erfolgte zunächst unspezifisch durch die SSCP-Analyse. Bei einer Größenordnung der auf diese Weise untersuchten PCR-Fragmente von 200 bis 300bp ist mit Hilfe dieser Methodik eine Detektionsrate von bis zu 90% möglich [Sheffield et al. 1993]. Aufgrund der Abhängigkeit der Detektionsrate von verschiedenen die Gelelektrophorese der Fragmente betreffenden Parametern wurde die Untersuchung unter vier unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt (siehe hierzu auch Kap III, 3.3.2). Dies sollte zu einer Erhöhung der Detektionsrate führen.

Des Weiteren besteht ebenfalls eine Abhängigkeit der Detektionsrate von der Lage der Mutation in dem zu untersuchenden Fragment. Liegt die Mutation nur wenige Basenpaare von Fragmentanfang oder -ende entfernt, kommt es seltener zu einer Konformationsänderung bzw. die sich ergebenden Abweichungen von der Ausgangskonformation sind gering. Infolgedessen ist es möglich, daß das Laufverhalten nicht in einem solchen Ausmaß beeinflusst wird, daß ein von der Ausgangssequenz abweichendes Bandenmuster nachweisbar ist. Eine mögliche Lösung des Problems besteht darin, die Amplifikation eines Fragmentes weit über den zu untersuchenden Bereich hinaus vorzunehmen, wie dies im Rahmen dieser Arbeit durch die Wahl intronisch gelegener Primer erfolgte. Dies ist jedoch im Falle von unbekannten Sequenzen sowie durch die oben genannten Fragmentgrößen limitiert.

Im gesamten Patientenkollektiv wurden 12 verschiedene Mutationen detektiert. 9 dieser Mutationen waren zunächst durch ein abweichendes Bandenmuster in der SSCP-Analyse auffällig geworden (Die Mutation R362C wurde nicht in die folgende Wertung miteinbezogen, da sie bei dem betroffenen Patienten zusammen mit der im selben Exon gelegenen Mutation R365W auftrat. Daher war nicht mit Sicherheit feststellbar, ob das abweichende Bandenmuster nur auf eine der beiden Mutationen zurückzuführen war oder erst durch das gemeinsame Vorliegen beider Mutationen zustande kam).

Die Mutation T216M ließ sich wie bereits im Vorfeld beschrieben [Schmidt, Diplomarbeit 2000] nicht durch die SSCP-Analyse darstellen. Ein Nachweis dieser Mutation war erst durch Restriktionsverdau möglich.

Der Nachweis der Mutation G105R in Exon 4 des SLC7A9-Gens erfolgte bei allen vier betroffenen Patienten durch die direkte Sequenzierung, die zur Identifikation der in diesem Exon beschriebenen Polymorphismen erforderlich war. Die Mutationsdetektionsrate für die SSCP lag somit im untersuchten Kollektiv bei 82%.

Von den 17 im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen ließen sich 7 durch SSCP-Analyse nachweisen (da die Polymorphismen c852C/A und c872C/T in Exon 6 des SLC7A9-Gens gekoppelt vorliegen wurden diese nur einfach gewertet).

Von den 10 Polymorphismen, die nicht durch SSCP untersucht werden konnten wurden 5 mittels Restriktionsverdau und einer durch direkte Sequenzierung nachgewiesen. Die verbleibenden 4 Polymorphismen lagen in Exon 4 des SLC7A9-Genes und wurden durch direkte Sequenzierung untersucht.

1.3 Restriktionsverdaue

Unabhängig vom Auftreten auffälliger Bandenmuster in der SSCP wurden alle Patienten mit Hilfe der in den Tabellen 11 und 12 (Kap. III, 3.4.1) genannten Restriktionsendonukleasen auf das Vorliegen einzelner Mutationen untersucht.

Wurde durch den Nukleotidaustausch eine Restriktionsschnittstelle zerstört, war zur Lagebestimmung innerhalb des Exons (bei Vorliegen mehrerer Schnittstellen) sowie innerhalb der Schnittstelle selber die weitere Untersuchung durch direkte Sequenzierung erforderlich.

Auf diese Weise konnte die in dieser Arbeit erstmals beschriebene Mutation A331V bei dem Patienten Cys 70 detektiert werden. Im Verdau des PCR-Fragmentes von Exon 10 des SLC7A9-Gens mit dem Enzym *Acil* war bei diesem Patienten der Verlust einer Schnittstelle aufgefallen. Die entstandenen Fragmente entsprachen allerdings nicht denjenigen, die bei Auftreten der ebenfalls in Exon 10 lokalisierten Mutation A354T zu erwarten gewesen wären.

Die Sequenzierung bestätigte die Mutation A331V, die den Verlust der zweiten in Exon 10 gelegenen Schnittstelle für das Enzym *Acil* zur Folge hat.

Im Restriktionsverdau des PCR-Produktes von Exon 5 des SLC7A9-Gens zeigte sich ein vermutlich auf den Verlust einer Schnittstelle zurückzuführendes aberrantes Bandenmuster bei den Patienten Cys 56 und Cys 58. Der mit dem Enzym *Acil* durchgeführte Verdau sollte dem Nachweis der Mutation G195R dienen. Es zeigte sich jedoch bereits im Vorfeld, daß die entstandenen Fragmente nicht mit den für diese Mutation beschriebenen übereinstimmten. Beide Patienten hatten in der SSCP-Analyse für dieses Exon keine Auffälligkeiten gezeigt.

Trotz mehrmaliges Sequenzieren konnte bei beiden Patienten weder eine Nukleotidabweichung in der Sequenz der in diesem Exon beschriebenen Restriktionsschnittstellen für das Enzym *Acil* noch ein in der verbleibenden Sequenz einschließlich der Exon/Intron-Übergänge gelegener Basenaustausch beschrieben werden, der das abweichende Bandenmuster hätte erklären können.

Die erneute Durchführung des Restriktionsverdaues erbrachte nochmals die oben genannten Ergebnisse.

Die Klärung dieses Phänomens bedarf weiterer Untersuchungen.

2. Ergebnisse des Mutationsscreenings

In der vorliegenden Arbeit wurden die kodierenden Bereiche des SLC3A1- und SLC7A9-Gens, sowie die Exon/Intron-Übergänge untersucht.

Durch das Mutationsscreening konnten im gesamten Patientenkollektiv 19 Mutationen im SLC3A1- und 8 Mutationen im SLC7A9-Gen nachgewiesen werden (siehe hierzu auch Kap. IV, 5., Tab.16, S.54/55).

Bei den 21 pädiatrischen Patienten, bei denen zuvor z.T. eine Typisierung erfolgt war, konnten hierbei bei vier Patienten Mutationen im SLC3A1- und bei sieben Patienten Mutationen im SLC7A9-Gen detektiert werden. Von den vier als Typ I klassifizierten Patienten wiesen drei Mutationen im SLC3A1-Gen auf. Ein Patient (Cys 77) war homozygot für die Mutation T216M, die zwei anderen (Cys 56 und Cys 80) compound-heterozygot für die Mutationen R365W/M467T bzw. M467T/S547W. Bei den drei als nicht-Typ I klassifizierten Patienten (Cys 63, 64 und 98) konnte kein Mutationsnachweis erbracht werden. Bei zwei der vier als heterozygot für die nicht-Typ I Cystinurie typisierten Patienten (Cys 93/94), bei denen es sich zudem um Geschwister handelt, konnte der Nachweis der bisher unbekannten Punktmutation A224V erbracht werden. Von den Patienten, bei denen eine sichere Bestimmung des Subtyps nicht getroffen werden konnte (Cys 58, 60, 70, 87, 110 und 112), da lediglich die Urinproben eines Elternteiles vorlagen (siehe Kap. IV) konnte in einem Fall (Cys 70) der Mutationsnachweis der im SLC7A9-Gen bislang nicht beschriebenen Mutation A331V erbracht werden. Die Geschwister Cys 110 und Cys 112 wiesen beide die Mutation G105R im Exon 4 des SLC7A9-Gens auf.

Von den verbleibenden vier untypisierten Patienten konnten für Cys 109 zwei Mutationen(R365W/c1749_1751del) im SLC3A1-Gen nachgewiesen werden. Der Patient Cys 106 zeigte Heterozygotie für die Mutation G105R im SLC7A9-Gen.

Unter den 10 untypisierten Patienten wurden auf 11 von 20 Allelen Mutationen im SLC3A1- und auf 2 von 20 Allelen Mutationen im SLC7A9-Gen nachgewiesen. Ein Patient (Cys 53) war homozygot für die Mutation R270X in SLC3A1, drei weitere (Cys 49, 95 und 102) compound-heterozygot für die Mutationen R270X/M467T, R365W/M467T und R362C/R365W. Desweiteren konnte bei drei Patienten (Cys 48/88 und 65) Heterozygotie für die im SLC3A1-Gen gelegenen Mutationen M467T bzw. P508A nachgewiesen werden. Im SLC7A9-Gen zeigte ein Patient Heterozygotie für die Mutation G105R ein weiterer wies die Deletion c969_971del auf. Somit konnten nachträglich molekulargenetisch vier Patienten als Typ I, drei als heterozygot für die Typ I und weitere zwei als heterozygot für die nicht-Typ I Cystinurie klassifiziert werden.

Unter Berücksichtigung der fünf Geschwisterpaare innerhalb des Kollektives der pädiatrischen Patienten und abzüglich der zwei nicht betroffenen Allele verbleiben im Gesamtkollektiv eine Anzahl von 50 Allelen, für die die erzielten Detektionsraten zu diskutieren sind.

2.1 Interpretation der erzielten Mutationsdetektionsraten

Innerhalb der Gruppe der pädiatrischen Patienten konnten 12 der insgesamt 30 Allele charakterisiert werden. Dies entspricht einer Mutationsdetektionsrate von 40% für beide untersuchten Gene. Dabei wurden in 6 von 11 als Typ I eingestuften Allelen Mutationen beschrieben mit einer daraus resultierenden Detektionsrate von 54% für das SLC3A1-Gen. Die Detektionsrate für die im Vorfeld als nicht-Typ I eingestuften Allele im SLC7A9-Gen lag bei 25% (2/8).

In den verbleibenden 11 untypisierten Allelen wurden 2 Mutationen im SLC3A1-Gen und zwei Mutationen im SLC7A9-Gen gefunden.

Die Detektionsrate für Mutationen in beiden Genen für die 10 unklassifizierten Patienten lag mit 70% deutlich über der vorgenannten für die pädiatrischen Patienten. Dabei wurden in 55% der Fälle Mutationen im SLC3A1- (11/20) und in 10% der Fälle Mutationen im SLC7A9-Gen (2/20) festgestellt.

Nimmt man die Detektionsraten für beide Gruppen zusammen ergibt sich für das gesamte Kollektiv ein Wert von 50% (25/50).

Die Angaben über die Detektionsraten für bereits im Vorfeld als Typ I klassifizierte Allele liegen zwischen 41,1% [Horsford et al. 1996] und 94% [Saadi et al. 1998].

Hierbei ist anzumerken, daß die gleiche Arbeitsgruppe [Saadi et al. 1998] Mutationen im SLC3A1-Gen bei Typ II/nicht-Typ I Patienten nur mit einer Detektionsrate von 11% nachweisen konnte. Die Tatsache, daß unter den bereits als Typ I klassifizierten Allelen des pädiatrischen Kollektives lediglich eine Detektionsrate von 54% erzielt werden konnte, ist u.a. darauf zurückzuführen, daß die Allele, bei denen kein Mutationsnachweis möglich war, von den nicht sicher klassifizierten Patienten stammten. Somit sollte die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß der bei diesen Patienten vorliegende Phänotyp auch durch Mutationen in anderen, bislang unidentifizierten Genen verursacht werden könnte.

Die Mutationsdetektionsrate im SLC3A1-Gen unter den im Rahmen dieser Studie untersuchten unklassifizierten Patienten liegt mit 55% zwischen den Werten, die hierzu in der Literatur angegeben werden. So geben Albers et al. (1999) eine Detektionsrate von 80% und Schmidt et al. (2002) einen Wert von 50% unter nicht typisierten Patienten an.

Auffällig in beiden hier untersuchten Gruppen sind die mit 25 bzw. 10% sehr niedrigen Detektionsraten für Mutationen im SLC7A9-Gen.

Dies könnte zum einen durch die Sensitivität der Screeningmethode (in diesem Fall SSCP) bedingt sein. Wie bereits in Kap. III 3.3.2 geschildert, liefert diese Methode in Abhängigkeit von die gelelektrophoretische Auftrennung betreffenden Parametern unterschiedliche Ergebnisse und wie schon für die Mutation T216M im SLC3A1-Gen beschrieben ist es durchaus möglich, daß manche Mutationen mit Hilfe dieser Methodik allein nicht erfaßt werden können.

Zum anderen wurden sowohl für das SLC3A1- als auch für das SLC7A9-Gen nicht alle Genregionen untersucht, so daß in der Promotorregion oder in den Introns gelegene Mutationen übersehen worden sein könnten.

Bei den Patienten, die Heterozygotie für die untersuchten Polymorphismen aufwiesen, konnten größere Deletionen ausgeschlossen werden. Dies war jedoch bei einigen Patienten nicht möglich. Somit könnten bei diesen Patienten Deletionen oder Insertionen vorliegen, die mit Hilfe der SSCP-Analyse nicht detektiert wurden.

Um dieser Frage nachzugehen sind quantitative Analysen notwendig.

Ein weiterer Grund für variable Detektionsraten könnte die ethnische Zusammensetzung des Patientenkollektives sein. Ist - wie dies im Vorfeld von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben wurde [Bisceglia et al. 1996, Saadi et al. 1998, Albers et al. 1999] - mit einem gehäuftem Auftreten bestimmter Mutationen innerhalb einer

bestimmten Bevölkerungsgruppe zu rechnen, sinkt bei einem heterogen zusammengesetzten Patientenkollektiv die Nachweiswahrscheinlichkeit für einzelne Mutationen deutlich.

Die in dieser Arbeit für das Gesamtkollektiv erzielte Detektionsrate für Mutationen in beiden Genen liegt bei 50%.

Ein vergleichbarer Wert (56%) wurde vom International Cystinuria Consortium (2001) für ein aus 27 untypisierten nordamerikanischen Patienten bestehendes Kollektiv für SLC7A9 beschrieben.

2.2 Mutationen im SLC3A1-Gen

Im SLC3A1-Gen wurden neun verschiedene Mutationen in den Exons 3, 4, 6, 8, und 10 detektiert. Dabei handelte es sich um sechs bereits bekannte Mutationen (T216M, R270X, R362C, R365W, M467T und S547W) sowie drei bisher nicht beschriebene Mutationen. Bei den im Rahmen dieser Arbeit neu beschriebenen Mutationen handelt es sich um eine Missense-Mutation (P508A), eine Deletion, die einen Frameshift zur Folge hat (c1749_1751 del) sowie um eine innerhalb einer 5'-Spleißstelle gelegenen Basenverlust (IVS6del2/3T), dessen Auswirkungen auf das Genprodukt zunächst unklar bleiben.

Die einzelnen Mutationen sollen im folgenden näher beschrieben werden.

T216M, Exon 3

Für die erstmals von Bisceglia et al. (1996) bei einem italienischen Patienten beschriebene Mutation wurde von Albers et al. (1999) ein populationsspezifisches Auftreten vor allem unter griechischen Patienten beschrieben. Die Mutation trat innerhalb des hier untersuchten Kollektives nur bei einem der Probanden auf (Cys 77). Hierbei handelt es sich um einen türkischen Patienten.

R270X, Exon 4

Das gehäufte homozygote Auftreten der durch einen Austausch von C->T an Nukleotidposition c808 ausgelösten Mutation R270X unter Betroffenen wurde von Pras et al. (1995) innerhalb eines Patientenkollektives von Ashkenasim-Juden berichtet und auf einen Founder Effekt in dieser Population zurückgeführt.

Darauffolgend wurde die Mutation in heterozygoter Form bei einem aus einem italienisch-spanischen Kollektiv stammenden Patienten [Bisceglia et al. 1996], homozygot bei einem amerikanischen Patienten [Endsley et al. 1997] und homo- bzw. heterozygot bei zwei aus einem überwiegend aus Kaukasiern bestehenden Kollektiv stammenden Patienten [Gitomer et al. 1998^a] beschrieben.

Bisceglia et al. (2001) detektierten diese Mutation in ihrem aus italienischen und spanischen Patienten bestehenden Kollektiv einmal.

Von den untersuchten Patienten wiesen zwei die Mutation R270X auf. Bei beiden handelte es sich um unklassifizierte Patienten. Ein deutscher Patient (Cys 49) trägt die Mutation zusammen mit der in Exon 8 gelegenen Mutation M467T, bei dem anderen aus Israel stammenden Patienten (Cys 53) liegt die Mutation homozygot vor.

R362C und R365W, Exon 6

Die Mutation R362C wurde nur bei einem Patienten detektiert (Cys 102). Dieser ist compound-heterozygot und trägt auf dem anderen Allel die Mutation R365W.

Bei der in Exon 6 des SLC3A1-Gens gelegenen Mutation R365W handelt es sich um die zweithäufigste im untersuchten Kollektiv aufgetretene Mutation.

Die durch einen Nukleotidaustausch von C->T an Position c1093 hervorgerufene Mutation wurde von Gasparini et al. (1995) in einem aus italienischen und spanischen Patienten bestehenden Kollektiv beschrieben.

Einer der im hiesigen Kollektiv als Typ I klassifizierten Patienten wies die Mutation gemeinsam mit der in Exon 8 des SLC3A1-Gens gelegenen Mutation M467T auf. Das Allel stammt hierbei vom Vater (Cys 54) des Patienten. Der Patient sowie die Eltern kommen aus Frankreich. Des weiteren konnte die Mutation bei drei untypisierten deutschen Patienten (Cys 95, 102 und 109) nachgewiesen werden von denen Cys 109 ein Patient aus dem pädiatrischen Kollektiv ist.

Alle drei Patienten sind compound-heterozygot. Cys 102 trägt dabei auf dem anderen Allel wie bereits oben genannt die Mutation R362C, Cys 95 die Mutation M467T und Cys 109 die im folgenden näher beschriebene Deletion c1749_1751del.

M467T, Exon 8

Hierbei handelte es sich um die häufigste im vorliegenden Kollektiv detektierte Mutation. Diese trat bei vier Patienten (Cys 56, 80, 49 und 95) in compound-heterozygoter Form auf. Dabei handelte es sich bei zwei Patienten um im Vorfeld als Typ I klassifizierte Cystinuriker. Die beiden anderen Patienten waren untypisiert. Zwei weitere untypisierte Patienten sind heterozygot für die Mutation. Bis auf Cys 56 sind die vorgenannten Patienten deutscher Herkunft. Sowohl bei Cys 56 als auch bei Cys 80 konnte die mütterliche Herkunft des die Mutation tragenden Allels nachgewiesen werden. Aufgrund der Häufigkeit der Mutation im untersuchten Kollektiv sowie den beschriebenen Häufigkeiten von 26% in dem von Bisceglia et al. (1996), 20% in dem von Endsley et al. (1997) und 23,3% in dem von Schmidt (Diplomarbeit 2000) beschriebenen Kollektiv ist davon auszugehen, daß es sich bei M467T um eine der häufigsten im SLC3A1-Gen auftretenden Mutationen handelt. Der unterschiedliche ethnische Hintergrund aller drei in den vorgenannten Studien untersuchten Probanden stützt diese These.

Für M467T liegen auch physiologische Untersuchungen der Transportaktivität durch Expression des mutanten rBAT-Moleküls in *Xenopus*-Oocyten vor [Chillarón et al. 1997]. Bei den durchgeführten Untersuchungen konnte kein Verlust der Transportaktivität im Vergleich zu dem von Wildtypprotein ausgelösten Transport festgestellt werden. Weitere Analysen ergaben, daß die Mutation vermutlich einen "trafficking"-Defekt hervorruft, der zum Verbleib eines Großteils des mutanten Proteins im Endoplasmatischen Retikulum führt.

P508A, Exon 9 und S547W, Exon 10

Bei der erstgenannten Mutation P508A in Exon 9 des SLC3A1-Gens handelt es sich um eine innerhalb des untersuchten Kollektivs erstmalig beschriebene Mutation.

Diese trat bei einem der deutschen, unklassifizierten Patienten in heterozygoter Form auf. Die Mutation, der ein Basenaustausch von C->G an Nukleotidposition c1523 zugrunde liegt, bewirkt einen Aminosäureaustausch von Prolin zu Alanin. Die betroffene Aminosäure liegt in der glykosidaseähnlichen extrazellulären Domäne des Proteins. Um Aussagen über eine durch diese Mutation hervorgerufene Beeinflussung der Transportaktivität bzw. das Auftreten eines "trafficking"-Defektes

machen zu können sind weitere physiologische Untersuchungen dieser Variante erforderlich.

Die Mutation S547W in Exon 10 wurde von Bisceglia et al. (2001) bei einem italienischen Patienten beschrieben. Dieser trug die Mutation heterozygot. Im vorliegenden Kollektiv trat die Mutation bei einem als Typ I klassifizierten, deutschen Patienten (Cys 80) gemeinsam mit der Mutation M467T auf. Der Vater des Patienten (Cys 78) konnte als heterozygoter Anlageträger identifiziert werden.

IVS6del2/3T und c1749_1751del, Exon 10

Der erste, die 5'-Spleißstelle am Exon/Intron-Übergang des Exons 6 betreffende Basenverlust wurde heterozygot bei einer deutschen nicht vortypisierten Patientin aus dem pädiatrischen Kollektiv (Cys 107) detektiert. Für die ebenfalls erkrankte Schwester der Patientin konnte die Deletion nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der am Exon/Intron-Übergang vorliegenden Basenabfolge ließ sich nicht ermitteln, ob es sich bei dem deletierten Nukleotid um die zweite oder dritte Thymidinbase im Intron handelt. Die Deletion könnte ein fehlerhaftes Spleißen des Transkriptes zur Folge haben, da im Falle von IVS6del2T die Consensus-Sequenz zerstört wird. Aber auch im Falle des Vorliegens von IVS6del3T sind Auswirkungen auf das Spleißen denkbar. So wurde von Pras et al. (1998^b) eine Spleißmutation (c891+4 A/G) beschrieben, die ein "exon-skipping" des Exons 4 zur Folge hat. Der Nachweis eines solchen "exon-skippings" bei der hier genannten Patientin erfordert eine Northern-Blot Analyse oder wie im Falle des bei Pras et al. (1998) beschriebenen Patienten die Sequenzierung der cDNA.

Bei der zweiten beschriebenen Mutation handelt es sich um die Deletion eines Adenin-Nukleotides an Position c1767 des Exons 10. Die Mutation wurde bei einer deutschen nicht typisierten Patientin in heterozygoter Form nachgewiesen und hat eine Verschiebung des Leserahmens zur Folge.

2.3 Mutationen im SLC7A9-Gen

Bei den im SLC7A9-Gen detektierten Mutationen handelte es sich um die bekannte Mutation G105R und die bislang nicht beschriebenen Mutationen A224V, A331V und

c969_971del. Somit konnten insgesamt 4 Mutationen nachgewiesen werden, deren weitere Charakterisierung im folgenden stattfinden soll.

G105R, Exon 4

Diese Mutation trat für das untersuchte Patientenkollektiv im SLC7A9-Gen am häufigsten auf. Sie wurde bei insgesamt vier Patienten detektiert. Dabei waren drei Patienten heterozygot für die Mutation (Cys 50, 110 und 112), bei dem Patienten Cys 106 konnte eine genaue Festlegung des Homo- bzw. Heterozygotenstatus für die Mutation nicht erfolgen, da keine DNA-Proben der Eltern vorlagen und somit eine Deletion des zweiten Allels nicht ausgeschlossen werden konnte.

Bei den Patienten Cys 110 und 112 handelte es sich um Geschwister. Der Vater (Cys 113) konnte als heterozygoter Anlageträger für die Mutation ermittelt werden.

Die Häufigkeit der Mutation wird vom International Cystinuria Consortium (2001) bei sicher als nicht-Typ I klassifizierten Patienten mit 25,4% angegeben. In einem Kollektiv von unklassifizierten Patienten lag die Häufigkeit dagegen nur bei 5,6% [International Cystinuria Consortium 2001].

Das hier untersuchte Kollektiv beinhaltet nicht-Typ I, nicht-Typ I/untypisierte und untypisierte Patienten. Berücksichtigt man, daß es sich bei einigen Probanden um Geschwister handelt, beträgt die Summe aller nicht-Typ I und untypisierten Allele 39. Die Detektionsrate für die Mutation beträgt somit 8% (3/39).

Dies entspricht in etwa dem oben genannten Wert für untypisierte Patienten. Dabei sollte jedoch berücksichtigt werden, das die in dieser Studie untersuchte Zahl von Probanden deutlich unter der für die vorgenannte Studie liegt.

A224V, Exon 6

Der an Nukleotidposition c856 liegende Basenaustausch von C->T wurde bei zwei deutschen Geschwistern (Cys 93 und 94) detektiert. Beide tragen die Mutation heterozygot und waren im Vorfeld als heterozygot für die nicht-Typ I Cystinurie klassifiziert worden. Die Mutter (Cys 92) ist ebenfalls heterozygot für die Mutation und war gleichfalls als nicht-Typ I heterozygot eingestuft worden. Der Basenaustausch bewirkt einen Aminosäureaustausch von Alanin zu Valin an Position 224 des Proteins. Hierbei handelt es sich um einen hochkonservierten Aminosäurerest in der

sechsten Transmembrandomäne des $b^{0,+}$ -Transportproteins. Fünfzig mittels SSCP untersuchte Kontrollpersonen wiesen die Mutation nicht auf. Nähere Aussagen über die Beeinträchtigung der katalytischen Aktivität des Proteins sind erst im Rahmen physiologischer Untersuchungen dieser Variante möglich.

A331V, Exon 10

Diese Mutation, die einen Aminosäureaustausch von Alanin zu Valin nach sich zieht wurde bei einem türkischen Patienten detektiert. Die Mutter des Patienten (Cys 68) ist heterozygote Anlageträgerin für die Mutation. Ein Bruder des Patienten (Cys 69) trägt die Mutation ebenfalls heterozygot. Bei dem Patienten selbst war es nicht möglich zwischen dem homo- oder heterozygoten Auftreten der Mutation zu differenzieren, da die Deletion des zweiten Allels nicht sicher ausgeschlossen werden konnte. Die Mutation befindet sich innerhalb der vierten intrazellulären Schleife des $b^{0,+}$ -AT-Moleküls. Auch für diese Mutation können Aussagen bezüglich der Auswirkung auf die Transportaktivität erst im Zuge physiologischer Untersuchungen getroffen werden.

c969_971del, Exon 8

Diese Frameshift-Mutation wurde bei einem der deutschen, untypisierten Patienten detektiert (Cys 51). Auch bei diesem Patienten war eine Deletion des zweiten Allels nicht sicher auszuschließen, so daß unklar ist, ob die Mutation homo- oder heterozygot vorliegt.

Die Deletion des Thymidinnukleotides in Codon 262 des Exons 8 führt zu dem vorzeitigen Auftreten eines Stopcodons nach Nukleotidposition c295 und damit zum Auftreten eines verkürzten Proteins.

3. Polymorphismen in SLC3A1 und SLC7A9

Polymorphismen sind überwiegend das Ergebnis einzelner Basenaustausche innerhalb eines Exons oder Introns, können jedoch auch durch Umlagerungen von DNA-Bereichen oder durch Deletionen und Insertionen entstehen [Ibelgauf, 1993]. Meistens ist hierbei die dritte Base (=Wobblebase) im Triplet betroffen. Der Austausch hat auf Proteinebene keine Änderung der Aminosäuresequenz zur Folge.

Es sind aber auch sogenannte Aminosäurepolymorphismen bekannt, die zwar einen Aminosäureaustausch nach sich ziehen, von denen aber - da der Austausch Aminosäuren mit einer ähnlichen funktionellen Seitenkette betrifft - angenommen wird, daß sie keine gravierende strukturelle Änderung des Proteins bewirken.

Die strukturelle und funktionelle Beeinflussung des Genproduktes durch Polymorphismen ist Gegenstand einer kontroversen Diskussion. Hierbei konnte unter anderem der Nachweis erbracht werden, daß exonisch gelegene Polymorphismen durch Veränderung eines sogenannten "exonic-splicing-enhancers" (ESE) einen fehlerhaften Spleißvorgang mit "exon-skipping" zur Folge haben [Liu et al. 1997, Lorson et al. 1999]. Ähnliche Mechanismen sind auch für Polymorphismen innerhalb eines Introns denkbar, die die Spleiß-Donor oder -Akzeptor-Stelle betreffen oder innerhalb der ebenfalls am Spleißvorgang beteiligten Verzweigungsstelle liegen.

Auch für das im Rahmen dieser Studie untersuchte Krankheitsbild der Cystinurie wurde bereits ein solcher Polymorphismus in Exon 5 des SLC3A1-Gens beschrieben (c1011 G/A, P337P), der vermutlich ein fehlerhaftes Spleißen der m-RNA nach sich zieht [Saadi et al. 1998].

3.1 Polymorphismen in SLC3A1

Im SLC3A1-Gen wurden vier bekannte Polymorphismen für das Gesamtkollektiv untersucht. Zudem wurde im Rahmen des Mutationsscreenings ein bisher nicht beschriebener Polymorphismus in Exon 6 des Genes bei einem Geschwisterpaar nachgewiesen. Da kein weiterer der 29 Patienten diese Sequenzabweichung aufwies und die Sequenzabweichung in keinem der bisher untersuchten Patientenkollektive auftrat, handelt es sich vermutlich um einen sehr seltenen Polymorphismus über dessen Konsequenzen in Bezug auf den Krankheitsverlauf zur Zeit keine Aussagen gemacht werden können.

Bei den Angaben zur Häufigkeit der Genotypen wurden Geschwisterpaare nur einfach in die Wertung einbezogen. Die Ergebnisse sind der Tabelle 19 (S.63) in Kapitel IV zu entnehmen.

nt114C/A, Exon 1

Die bisher für diesen Polymorphismus in verschiedenen Studien beschriebenen Häufigkeiten für Probanden unterschiedlicher ethnischer Herkunft sind in Tabelle 22

zusammengefaßt. Die im eigenen Kollektiv für diesen Polymorphismus ermittelte Häufigkeit liegt mit 17,3% (9/52) deutlich unter den hierfür in der Literatur angegebenen Werten. Dies könnte zum Teil durch die ethnisch heterogene Zusammensetzung des Patientenkollektives bedingt sein. Eine Bewertung der Häufigkeit nur für deutsche Patienten (die die Mehrzahl des hier untersuchten Kollektivs darstellen) ergibt allerdings eine ähnlich niedrige Frequenz von 14,7% (5/34).

Betrachtet man jedoch die Differenzen der Häufigkeiten, die unter den Patientengruppen verschiedener ethnischer Herkunft auftreten (21,3% - 35%, Tabelle 22) so ist eine populationsspezifische Häufigkeitsverteilung der Haplotypen unter Patienten mit dem oben genannten Wert für die deutschen Patienten des eigenen Kollektivs durchaus denkbar.

nt114C/A Allelhäufigkeiten: Allel A		Ethnische Herkunft des Patientenkollektivs	Literaturangabe
Patienten	Kontrollen		
21,3%	27%	Italiener und Spanier	Gasparini et al. 1995
35%	24%	Frankokanadier	Horsford et al. 1996
21,6%	29,6%	Spanier	Guillen et al. 2000
22,1%	-	Mischkollektiv	Schmidt, 2000
17,3%	-	Mischkollektiv	eigenes Kollektiv

Tab.22: Häufigkeit des Polymorphismus nt114C/A in bisher untersuchten Patienten-kollektiven verschiedener ethnischer Herkunft

nt231T/A, Exon 1

Die Häufigkeit für das Allel A wurde sowohl in dem von Gasparini et al. (1995) als auch von Schmidt (Diplomarbeit, 2000) beschriebenen Patientenkollektiv mit 11,8% angegeben. Bei den Trägern dieses Haplotyps im untersuchten Kollektiv handelt es sich nur um deutsche Patienten. Der Wert für diese Patienten liegt bei 14,7% (5/34). Im Gesamtkollektiv ergibt sich ein Wert von 9,6% (5/52). Dies ist mit den vorgenannten Werten vergleichbar. Der Polymorphismus konnte bisher nicht unter gesunden Probanden nachgewiesen werden. Somit bleiben die Auswirkungen dieses Basenaustausches auf die Struktur und Funktion des Genproduktes und damit auf die Krankheitsgenese letztlich unklar.

nt1854A/G, Exon 10

Auch für diesen Polymorphismus liegen Häufigkeitsangaben innerhalb ethnisch verschiedener Patientenkollektive vor (Tabelle 23). Zusätzlich zu den eigenen Probanden wurden auch die Patienten des von Schmidt et al. (2002) bereits beschriebenen Kollektivs auf das Vorliegen des Polymorphismus untersucht.

Der Wert für die Häufigkeit des Allels G für die eigenen Probanden liegt bei 34,6% (18/52). Zusammen mit den im Kollektiv von Schmidt et al. (2002) untersuchten 34 Patienten liegt der Wert bei 35,8% (43/120). Für die deutschen Patienten beider Kollektive wird ein Wert von 30,3% (20/66) erzielt.

Die Ergebnisse stimmen somit mit den von Gasparini et al. (1995) und Horsford et al. (1996) genannten Werten überein.

nt1854A/G Allelhäufigkeiten: Allel G		Ethnische Herkunft des Patientenkollektives	Literaturangabe
Patienten	Kontrollen		
30,9%	34%	Italiener und Spanier	Gasparini et al. 1995
35%	33%	Frankokanadier	Horsford et al. 1996
34,6%	-	Mischkollektiv	eigenes Kollektiv

Tab.23: Häufigkeit des Polymorphismus nt1854A/G in bisher untersuchten Patienten-kollektiven verschiedener ethnischer Herkunft

nt2189C/T, 3'untranslatierte Region

Für diesen Polymorphismus liegen nur die von Gasparini et al. (1995) ermittelten Häufigkeitsangaben für das Allel T vor. Diese liegen für Patienten bei 31% und für Kontrollen bei 34%. Auch hier wurde zusätzlich zu den eigenen Patienten das Kollektiv von Schmidt et al. (2002) mituntersucht. Die ermittelten Häufigkeiten liegen bei den eigenen Patienten bei 34,6% (18/52). Im Kollektiv von Schmidt et al. (2002) beträgt der Wert 35,3% (24/68). Die Häufigkeit unter deutschen Patienten beider Kollektive beträgt 28,7% (19/66). Bis auf den in Exon 1 gelegenen Polymorphismus nt114C/A stimmt somit die Häufigkeit aller im SLC3A1-Gen innerhalb dieser Studie untersuchten Polymorphismen unter deutschen Patienten in etwa mit den in der Literatur genannten Werten überein. Ob die Abweichung bezüglich des in Exon 1 gelegenen Polymorphismus nt114 C/A lediglich auf den Einfluß der ethnischen Herkunft der Patienten zurückzuführen ist, wie bereits für die Häufigkeiten einiger

Mutationen postuliert, oder auf andere Faktoren wie z.B. die Größe des untersuchten Probandenkollektivs zurückgeführt werden kann bleibt abzuwarten.

3.2 Polymorphismen in SLC7A9

Im SLC7A9-Gen wurden zwölf bereits bekannte Polymorphismen bezüglich des Auftretens unter Patienten untersucht. Die für diese Polymorphismen angegebenen Häufigkeiten unter Patienten des eigenen Kollektivs, des Kollektivs von Schmidt (Diplomarbeit 2000) und Kontrollen können der Tabelle 20 (Kap. IV, 5.4, S.69) entnommen werden. Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Polymorphismus an Nukleotidposition c1328 des Exons 11 des SLC7A9-Genes beschrieben (siehe hierzu auch Kap.IV, 5.4.8, Tab.21, S.72). Ein Vergleich der Häufigkeiten der beschriebenen Polymorphismen mit denen der bisher hierfür untersuchten Patienten des Kollektivs von Schmidt (Diplomarbeit 2000) erscheint nicht sinnvoll. Dies ist in der Patientenzahl sowie in der ethnisch inhomogenen Zusammensetzung beider Kollektive begründet. Aussagen über mögliche Assoziationen bestimmter Haplotypen mit dem Krankheitsbild können erst im Zuge statistischer Analysen größerer Patientenkollektive getroffen werden.

3.3 Diskussion der Bedeutung einzelner Polymorphismen im Hinblick auf den klinischen Schweregrad der Erkrankung

Im folgenden sollen die bisherigen Ergebnisse der Untersuchungen über den Zusammenhang einzelner Polymorphismen mit dem Krankheitsbild der Cystinurie dargelegt werden.

3.3.1 SLC3A1-Gen

In einer Studie von Guillén et al. (2000) in der die Assoziation zwischen den häufigsten molekulargenetischen Varianten im SLC3A1-Gen und einzelnen phänotypischen Merkmalen der Erkrankung wie z.B. Aminosäurekonzentrationen im Harn, Cystinkristalle im Urinsediment und renale Koliken in einer spanischen Patientengruppe untersucht wurde, wurde unter anderem auch der in Exon 1 gelegene Polymorphismus nt114C/A berücksichtigt.

Hierbei wird eine Assoziation zwischen dem Auftreten des Haplotyps nt114C/C und der Cystinexkretion im Urin Betroffener postuliert. Der genannte Haplotyp soll im Gegensatz zu den Haplotypen nt114C/A oder nt114A/A mit einer erhöhten Exkretion von Cystin in Zusammenhang stehen.

In einer Studie von Horsford et al. (1996) wurde neben dem Polymorphismus nt114C/A in Exon 1 auch die Häufigkeit des in Exon 10 gelegenen Polymorphismus nt 1854A/G untersucht. In dieser Studie wird der Versuch unternommen durch den Vergleich der Haplotypen der genannten Polymorphismen bei Patienten, die die gleiche Mutation aufweisen, Rückschlüsse auf den Entstehungszeitpunkt derselben sowie auf mögliche gemeinsame Vorfahren zu treffen. Dieser Ansatz könnte sich im Hinblick auf populationsgenetische Analysen als hilfreich erweisen. Mögliche Zusammenhänge sollten hierbei jedoch in größeren Kollektiven untersucht werden.

Für die durch Guillén et al. (2000) aufgestellte These über den Zusammenhang zwischen dem Auftreten bestimmter Haplotypen und der Höhe der Cystinexkretion sind weitergehende Untersuchungen auch unter Patienten anderer ethnischer Herkunft erforderlich. Dabei sollte vor allem berücksichtigt werden, daß die Cystinexkretion im Harn Betroffener z.T. einer sehr starken Variabilität unterliegt und nicht als alleiniger Indikator für die Entstehung von Cystinkristallen oder -steinen und somit den Schweregrad der Erkrankung gewertet werden kann. Da zudem keine näheren Angaben darüber gemacht wurden, ob die bei Patienten gefundene Erhöhung der Cystinkonzentration auf einen in direktem Zusammenhang mit dem Polymorphismus stehenden Mechanismus zurückzuführen ist oder bestimmte Haplotypen mit anderen Merkmalen gekoppelt sind, die zu der beschriebenen Erhöhung führen, sind auch in dieser Richtung weiterführende Studien notwendig.

3.3.2 SLC7A9-Gen

Für die Polymorphismen c147C/T in Exon 2, c420+22G/T in Intron 3 und die gekoppelt vorliegenden Polymorphismen c692C/T in Exon 5 und c852C/A+c872T/C in Exon 6 wurde eine statistisch signifikante Abweichung im Auftreten der einzelnen Haplotypen unter Patienten und Kontrollpersonen festgestellt, die mit einer erhöhten Formation von Cystinsteinen bei Betroffenen in Zusammenhang gebracht wurde [Schmidt et al. 2002]. Die Ursache hierfür wird einerseits in einem durch die Kopplung mit bestimmten Haplotypen resultierenden Verteilungsungleichgewicht funktioneller Varianten in den beiden bisher beschriebenen bzw. bislang

unbekannten Genen gesehen. Eine weitere Möglichkeit, die in diesem Zusammenhang in Betracht gezogen wird ist, daß das Vorliegen einzelner Haplotypen selbst durch Auswirkungen auf regulatorische Elemente wie z.B. Enhancer oder den Spleißvorgang zu der beschriebenen Steinbildung führt.

Inwiefern diese Zusammenhänge durch in vitro Studien bestätigt werden können bleibt abzuwarten.

4. Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Das Manifestationsalter gemessen am Auftreten des ersten Steines lag innerhalb der Gruppe der pädiatrischen Patienten zwischen neun Monaten und vierzehn Jahren.

Von den sechzehn Patienten, die eine Steinbildung aufwiesen, zeigten bis zum Beginn der Studie acht keine weitere Steinbildung, vier Patienten hatten weniger als fünf Steine und weitere vier mehr als fünf Steine gebildet. In der Gruppe der unklassifizierten Patienten lag das Manifestationsalter zwischen sechs und vierundzwanzig Jahren. Bis auf zwei Probanden zeigten alle ein gehäuftes Auftreten von bis zu zehn Steinen oder mehr.

Von acht Patienten, bei denen in einem Fall Homozygotie für eine Mutation (Cys 77) in den anderen Fällen Heterozygotie für zwei Mutationen im SLC3A1-Gen festgestellt werden konnte, zeigten bis auf drei Patienten (Cys 49, 95 und 102) alle eine Steinformation innerhalb der ersten Lebensdekade. Dies entspricht mit einem Prozentsatz von 62,5% den Angaben von Goodyer et al. (1998), der postulierte, daß mindestens 50% der Patienten, die zwei Mutationen im SLC3A1-Gen aufweisen, innerhalb der ersten zehn Lebensjahre einen oder mehrere Steine bilden.

Für die im Rahmen dieser Studie bei vier Patienten heterozygot nachgewiesene Mutation G105R im SLC7A9-Gen wurde vom International Cystinuria Consortium (2001) basierend auf physiologischen Untersuchungen in HeLa-Zellen ein in Bezug auf die Exkretion von Cystin und der dibasischen Aminosäuren schwererer Phänotyp als für andere in diesem Zusammenhang untersuchte Sequenzvarianten postuliert.

Tatsächlich erweist es sich jedoch als äußerst schwierig, ausgehend vom Vorliegen bestimmter Mutationen auf das Manifestationsalter bzw. den Schweregrad der Erkrankung zu schließen. So erfolgte z.B. bei zwei Patienten des untersuchten Kollektivs, die compound-heterozygot für dieselben Mutationen im SLC3A1-Gen (R365W/M467T) sind, die erste Steinbildung bei einem der Patienten (Cys 56) bereits im Alter von neun Monaten, wohingegen der andere Patient (Cys 95) erst im

Alter von fünfzehn Jahren den ersten Stein ausbildete. Auch für die Patienten, die die Mutation G105R im SLC7A9-Gen aufweisen, liegt das Manifestationsalter zwischen neun Monaten und elf Jahren. Da es sich bei dieser Mutation um die einzige bisher bereits beschriebene Mutation im SLC7A9-Gen handelte, die unter den Patienten dieses Kollektives auftrat, ist ein Vergleich des Manifestationsalters oder der Exkretionswerte für Cystin und die dibasischen Aminosäuren mit denen für andere Mutationen nicht möglich. Der Einfluß der zwei detektierten Mutationen A224V und A331V auf den Phänotyp ist zur Zeit unklar. Bei dem Geschwisterpaar, daß die Mutation A224V trägt ist bislang keine Steinbildung aufgetreten. Bei der Patientin, die die Mutation A331V trägt, kann bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht sicher ausgeschlossen werden daß der Phänotyp zumindest teilweise durch eine Deletion des zweiten Allels hervorgerufen wird.

Palacín et al. (2000) beschrieben, daß selbst unter homozygot betroffenen Geschwistern die Steinbildung einer starken Variabilität unterliegt, so daß es zusätzlich zu den vorliegenden genetischen Aberrationen andere Einflußfaktoren auf die Steinbildung geben muß, die starke Auswirkungen auf den klinischen Schweregrad der Erkrankung haben. Bei diesen Faktoren könnte es sich z.B. um die Trinkmenge, Infektionen der ableitenden Harnwege und das Vorliegen von Steininhibitoren handeln [Pras et al. 1998^a].

Zusätzlich zu diesen Faktoren sollte auch der therapeutische Zustand des Patienten in Betracht gezogen werden. Ist die Erkrankung in der Familie des Patienten bereits bekannt oder wird durch biochemische Untersuchungen vor der Bildung erster Steine diagnostiziert, so kann die Steinbildung bei guter Compliance des Patienten in vielen Fällen vermieden werden [Barbey et al. 2000].

Abschließend ist zu sagen, daß anhand der in den beiden Genen SLC3A1 sowie SLC7A9 identifizierten Mutationen bei vielen Patienten eine orientierende Einschätzung des Manifestationsalters sowie des Schweregrades der Erkrankung möglich ist. Diese unterliegen jedoch zusätzlich einer Modifikation durch bislang noch unbekannte Einflussfaktoren. Zudem kann der Krankheitsverlauf durch therapeutische Maßnahmen beeinflusst werden.

5. Modellvorstellungen zur Funktion der Untereinheiten-Interpretation in Bezug auf den Erbgang

Die beiden bisher beschriebenen, an der Bildung des Cystintransporters beteiligten Untereinheiten rBAT und b^{0,+}AT weisen ein unterschiedliches Expressionsmuster in den Epithelzellen des proximalen Tubulus auf. Die schwere Untereinheit rBAT wird hierbei vorwiegend im S3-Segment exprimiert mit schwächerer Expression in den S1- und S2-Segmenten, wohingegen die leichte Untereinheit b^{0,+}AT überwiegend in den S1- und S2-Segmenten und schwächer im S3-Segment exprimiert wird.

Trotz der zumindest partiell überlappenden Expression beider Untereinheiten stellt sich auch im Hinblick der in diesen Tubulusabschnitten beschriebenen Transporter mit differierenden Reabsorptionsraten für Cystin die Frage, inwiefern sich die für die Erkrankung postulierten Vererbungsformen vor diesem Hintergrund erklären lassen.

Bisher wird davon ausgegangen, daß die autosomal rezessive Typ I-Cystinurie durch Mutationen in rBAT und die autosomal dominant vererbte nicht-Typ I-Cystinurie mit variabler Penetranz durch Mutationen in b^{0,+}AT hervorgerufen wird. Hierzu existiert folgende Hypothese: Setzt sich der aktive Cystintransporter aus mehr als jeweils einer der beiden Untereinheiten zusammen, so würde dies im Falle von rBAT ausgehend von bisher für Mutationen in dieser Untereinheit durchgeführte Expressionsstudien zu einem "trafficking"-Defekt mit einer verzögerten Expression der veränderten Proteine an der Zelloberfläche führen. Die katalytische Funktion des b^{0,+}AT-Moleküles ist nach bisheriger Ansicht hiervon unbeeinflusst. Das Bild einer autosomal rezessiven Erkrankung ließe sich hiermit gut in Einklang bringen, da erst die Mutation von zwei Allelen im SLC3A1-Gen zum mehr oder minder vollständigen Erliegen der Proteinexpression an der Zelloberfläche führen würde. Ebenso ist der autosomal dominante Erbgang mit variabler Penetranz für die nicht-Typ I-Cystinurie dadurch zu erklären, daß eine strukturelle Schädigung der katalytischen Untereinheit ungeachtet der Anwesenheit eines intakten rBAT-Moleküles zum partiellen oder völligen Verlust der Transportaktivität führt [International Cystinuria Consortium 1999].

6. Einfluß weiterer Gene auf die Erkrankung

Vor dem Hintergrund der für die beiden bisher mit dem Krankheitsbild der Cystinurie in Verbindung gebrachten Gene SLC3A1 und SLC7A9 erzielten Mutationsdetektionsraten stellt sich die Frage, inwiefern das Krankheitsbild der Cystinurie durch weitere

bislang unbekannte Gene beeinflusst wird. Diese Frage gewinnt auch im Hinblick auf das unterschiedliche Expressionsmuster der von diesen Genen kodierten Proteine rBAT und b^{0,+}AT im proximalen Tubulus des Nephrons an Bedeutung.

Geht man davon aus, daß rBAT und b^{0,+}AT obligatorisch zu dem in Kap. II 2.1 genannten Cystintransporter assoziieren, so folgt daraus, daß durch diesen betreffende Defekte sowohl das Krankheitsbild der Typ I- als auch das Bild der nicht-Typ I-Cystinurie verursacht werden können [International Cystinuria Consortium 2001]. Die Möglichkeit, daß andere Gene als das bereits bekannte SLC3A1-Gen ebenfalls zum Typ I Phänotyp führen können, wurde bereits vor Kenntnis der Struktur des SLC7A9-Genes durch Saadi et al. (1998) postuliert.

Ist die Assoziation zwischen den beiden Untereinheiten nicht obligatorisch, besteht die Frage, welche weiteren leichten und schweren Untereinheiten für beide Moleküle existieren und durch welche Gene diese kodiert werden. Erkenntnisse, die diese Frage beantworten könnten, liegen jedoch zur Zeit nicht vor.

Betrachtet man das komplexe Zusammenwirken der in Kap. II 2.1 genannten, indirekt an der Cystinreabsorption beteiligten zellulären Transportsysteme, so könnten auch Mutationen in einem der für diese Transporter kodierenden Gene an der Ausprägung des Krankheitsbildes der Cystinurie beteiligt sein. Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang die in der basolateralen Membran der Epithelzellen gelegenen Transporter 4F2/LAT2 und 4F2/y⁺LAT1. Trotz dieser potentiell betroffenen Transportsysteme sollte jedoch die Beteiligung eines bislang gänzlich unbekannten Mechanismus nicht ausgeschlossen werden. So wird z.B. in einer Studie von Rajan et al. (1999) ein mit der schweren Untereinheit 4F2 assoziierendes Protein (4F2-lc6), das eine dem rBAT/b^{0,+}AT-Komplex vergleichbare b^{0,+}-Aktivität hervorruft und vorrangig intestinal und renal exprimiert wird, als weiteres Kandidatengen für das Krankheitsbild der Cystinurie in Betracht gezogen.

7. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe der geschilderten Methoden die bei einigen Patienten im Vorfeld getroffene Typisierung bestätigt werden, bei den untypisierten Patienten wurde in der Mehrzahl der Fälle eine molekulargenetische Klassifikation möglich.

Insgesamt stellen sich die angewandten Screeningmethoden als geeignetes Mittel zur Erfassung eines Großteils der in beiden Genen bislang beschriebenen Mutationen dar. Im Hinblick auf eine molekulargenetische Diagnostik der Erkrankung sollte das Mutationsscreening zukünftig unter Berücksichtigung der Häufigkeit und der populationsspezifischen Verteilung einzelner Mutationen erfolgen.

Die physiologische und molekulargenetische Untersuchung der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Sequenzvarianten wird zum weiteren Verständnis der bisher bekannten renalen Cystinreabsorptionsmechanismen beitragen und auf diese Weise eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation ermöglichen.

Des Weiteren kann aus den innerhalb dieser Studie erzielten Ergebnissen abgeleitet werden, daß zusätzlich zu den bereits beschriebenen molekulargenetischen Varianten weitere die Steinbildung beeinflussende Faktoren vorliegen, die den Ausbruch und Schweregrad der Erkrankung beeinflussen. Diese gilt es zu identifizieren.

Die ermittelten Detektionsraten für beide bisher bekannten Gene im Gesamtkollektiv deuten auf die Beteiligung weiterer Gene an der Pathogenese der Erkrankung hin.

Die Identifikation dieser Gene sollte das vorrangige Ziel zukünftiger Studien darstellen, um eine adäquate Therapie und Beratung Betroffener sowie deren Angehöriger zu ermöglichen.

VI Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Anteil der beiden bisher bekannten Cystinuriegene SLC3A1 und SLC7A9 an der Ausprägung frühmanifester Erkrankungsformen zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurden ein Kollektiv von 21 pädiatrischen klassifizierten Patienten aus 16 Familien sowie 10 unklassifizierte Patienten mit rezidivierenden Cystin-Nierensteinen untersucht.

Die erzielten Mutationsdetektionsraten für die als Typ I bzw. nicht-Typ I typisierten Allele lagen bei den unverwandten Patienten des pädiatrischen Kollektivs bei 54% (6/11) für das SLC3A1- und bei 25% (2/8) für das SLC7A9-Gen. In den verbleibenden 11 unklassifizierten Allelen wurden 2 Mutationen im SLC3A1- und 2 Mutationen im SLC7A9-Gen nachgewiesen. Bei den 10 unklassifizierten Patienten lagen die Detektionsraten bei 55% (11/20) für das SLC3A1- und bei 10% (2/20) für das SLC7A9-Gen. Dies entspricht einer Detektionsrate von 50 % für das Gesamtkollektiv.

Im Rahmen dieser Studie konnten erstmalig die bisher unbekannte Deletion c1749_1750del in Exon 10 des SLC3A1-Gens sowie zwei Punktmutationen (A224V und A331V), die Deletion c969_971del in Exon 8 sowie der Polymorphismus c1328C/T in Exon 11 des SLC7A9-Gens beschrieben werden. Aussagen über die aus diesen Mutationen resultierenden funktionellen Auswirkungen können erst im Rahmen physiologischer Studien getroffen werden.

Die im Gesamtkollektiv erzielte Mutationsdetektionsrate von 50% für beide Gene kann zum einen darauf zurückgeführt werden, daß nicht alle Genregionen untersucht wurden, zum anderen könnten durch die angewandte Untersuchungsmethode größere Umbauten wie Deletionen und Insertionen übersehen worden sein. Diese können erst durch Southern-Blot-, quantitative Analysen oder durch direkte Sequenzierung aller Abschnitte des Gens ausgeschlossen werden. Die trotz der Vortypisierung niedrigen Detektionsraten für beide Gene im pädiatrischen Kollektiv lassen zudem darauf schließen, daß Patienten mit frühmanifesten Cystinurieformen ein anderes Mutationsspektrum als Patienten mit Spätmanifestation aufweisen.

Ein Vergleich des Manifestationsalters in der pädiatrischen Gruppe mit dem innerhalb der Gruppe der untypisierten Patienten zeigt, daß die Erkrankung in Form der ersten Steinbildung bei letzteren im Mittel später eintritt. Selbst Patienten beider Gruppen, die Träger derselben Mutation sind sowie Geschwister, zeigen erhebliche Abweichungen für das Erkrankungsalter. Dies deutet auf die Beteiligung weiterer

exogener und endogener Faktoren wie z.B. das Vorliegen von Steininhibitoren oder die erhöhte Ausscheidung anderer Stoffwechselprodukte hin.

Abschließend läßt sich feststellen, daß durch die Ergebnisse dieser Studie der entscheidende Einfluß der beiden bisher bekannten Gene SLC3A1 und SLC7A9 in der Pathogenese der Erkrankung bestätigt werden konnte. Die Identifikation neuer Sequenzvarianten in beiden Genen zeigt, daß die weitere Untersuchung der kodierenden Bereiche sowie der Promotor- und Intronsequenzen in Zukunft das Spektrum der bisher identifizierten Mutationen erweitern wird. Ein Vergleich populationsspezifischer Häufigkeiten der bekannten Polymorphismen könnte die Kopplung bestimmter Haplotypen mit weiteren, die Krankheitsgenese betreffenden Faktoren enthüllen. Die im Gesamtkollektiv erzielten Mutationsdetektionsraten in beiden Genen deuten v.a. im Hinblick auf die pädiatrischen Patienten mit Frühmanifestation der Erkrankung auf die Beteiligung weiterer Gene an Entstehung und insbesondere Verlauf des Krankheitsbildes hin.

VII Literaturverzeichnis

Albers A., Lahme S., Wagner C., Kaiser P., Zerres K., Capasso G., Pica A., Palacín M., Lang F., Bichler K.-H., Eggermann T., 1999
Mutations in the SLC3A1 gene in cystinuric patients: frequencies and identification of a novel mutation
Genet Test 3:227-31

Albers A., 2001
Detektion von Mutationen in den Genen SLC3A1/rBAT und SLC7A9/b^{0,+}AT bei Cystinurie Patienten und funktionelle Untersuchung von sieben Mutanten des SLC3A1/rBAT-Gens
Dissertation, Fakultät für Biologie, Universität Tübingen

Barbey F., Joly D., Rieu P., Méjean A., Daudon M., Jungers P., 2000
Medical treatment of cystinuria: Critical reappraisal of long-term results
The Journal of Urology, Vol 163, 1419-1423, May 2000

Bertran J., Werner A., Moore M.L., Stange G., Markovich D., Biber J., Testar X., Zorzano A., Palacín M., 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 USA 89: 5601-5

Bertran J., Werner A., Chillarón J., Nunes V., Biber J., Testar X., Zorzano A., Estivill X., Murer H., Palacín 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: 14842-9

Bisceglia L., Calonge M.J., Strogolo L.D., Rizzoni G., De Sanctis L., Gallucci M., Beccia E., Testar X., Zorzano A., Estivill X., Zelante L., Palacín M., Gasparini P., 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

Bisceglia L., Calonge J.M., Totaro A., Feliubadaló L., Melchionda S., Garcia J., Testar X., Gallucci M., Ponzzone A., Zelante L., Zorzano A., Estivill X., Gasparini P., Nunes V., Palacín M., 1997
Localization, by linkage analysis, of the cystinuria type III gene to chromosome 19q13.1
Am J Hum Genet 60: 611-6

Bisceglia L., Purroy J., Jiménez-Vidal M., Adamo P., D'Adamo A.P., Rousaud F., Beccia E., Penza R., Rizzoni G., Gallucci M., Palacín M., Gasparini P., Nunes V., Zelante L., 2001
Cystinuria type I: identification of eight new mutations in SLC3A1
Kidn Internat 59: 1250-6

Borsani G., Bassi M.T., Sperandeo M.P., De Grandi A., Buoninconti A., Riboni M., Manzoni M., Incerti B., Pepe A., Andria G., Ballabio A., Sebastio G., 1999
SLC7A7, encoding a putative permease-related protein, is mutated in patients with lysinuric protein intolerance
Nature Genet 21: 297-301

Boutros M., Ong P., Saadi J., Hiou-Tim F., Vicanek C., Rozen R., Goodyer P., 1999
The human rbat promotor and promotor mutations in cystinuria
Kongressband: A j hum genet 1999, Vol 65 S: 491

Bostrom H., Hambræus L., 1964
Cystinuria in Sweden: VII Clinical, histopathological and medical-social aspects of the disease
Acta Med Scand Suppl 411: 1

Brodehl J., Gellissen K., Kowalewski S., 1967
Isolierter Defekt der tubulären Cystin-Rückresorption in einer Familie mit idiopathischem Hypoparathyroidismus
Klin Wochenschr 45:38-40

Brodehl J., Gellissen K., 1968
Endogenous renal transport of free amino acids in infancy and childhood
Pediatrics 42: 395-404

Buehler B.A., 1981
Inherited disorders of amino acid transport in relation to the kidney
Ann Clin Lab Sci 11: 274-78

Calonge M.J., Gasparini P., Chillarón J. Chillón M., Gallucci M., Rousaud F., Zelante L., Testar X., Dallapiccola B., Di Silverio F., Barceló P., Estivill X., Zorzano A., Nunes V., Palacín M., 1994
Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine.
Nat Genet 6: 420-5

Calonge M.J., Volpini V., Bisceglia L., Rousaud F., De Sanctis L., Brescia E., Zelante L., Testar X., Zorzano A., Estivill X., Gasparini P., Nunes V., Palacín M., 1995^a
Genetic heterogeneity in cystinuria: the rBAT gene is linked to type I but not to type II cystinuria
Proc Natl Acad Sci USA 92: 9667-71

Calonge M.J., Nadal M., Calvano S., Testar X., Zelante L., Zorzano A., Estivill X., Gasparini P., Palacín M., Nunes V., 1995^b
Assignment of the gene responsible for cystinuria (rBAT) and of markers D2S119 and D2S177 to 2p16 by FISH
Hum Genet 95: 633

Chairoungdua A., Segawa H., Kim J.Y., Miyamoto K., Haga H., Fukui Y., Mizoguchi K., Ito H., Takeda E., Endou H., Kanai Y., 1999
Identification of an amino acid transporter associated with the cystinuria-related type II membrane glycoprotein
J Biol Chem 274: 28845-8

Chillarón J., Estévez R., Samarzija I., Waldegger S., Testar X., Lang F., Zorzano A., Busch A.E., Palacín M., 1997
An intracellular trafficking defect in type I cystinuria mutants M467T and M467K
J Biol Chem 272: 9543-9

Chow G.K., Streem S.B., 1998
Contemporary urological intervention for cystinuric patients: Immediate and long term impact and implications
The Journal of Urology, Vol 160, 341-345, 1998

Dascal N., 1987
The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels
CRC Critical Reviews in Biochemistry 22: 317-86

Daudon M., Reveillaud R.J., 1985
Techniques d'examen des calculs urinaires
Gaz Med 92: 31-7

Dent C.E., Rose G.A., 1951
Amino acid metabolism in cystinuria
Q J Med 20: 205-211

Dent C., Senior B., 1955
Studies on the treatment of cystinuria
Brit J Urol 27: 317-332

Dörner K., 1998
Klinische Chemie und Hämatologie
Enke Verlag Stuttgart, 3. Auflage, 437

Dretler S.P., 1988
Stone fragility - a new therapeutic distinction
J Urol 139: 1124-7

Egoshi K.I., Akakura K., Kodama T., Ito H., 2000
Identification of five novel SLC3A1 (rbat) gene mutations in Japanese cystinuria
Kidney Int 57: 25-32, 2000

Eisenbach G.M., Weise M., Stolte H., 1975
Amino acid reabsorption in the rat nephron. Free flow micropuncture study
Pfluegers Arch 357: 63

Endsley J.K., Phillips J.A., Hruska K.A., Denneberg T., Carlson J., George Jr. A-L, 1997
Genomic organization of a human cystine transporter gene (SLC3A1) and identification of novel mutations causing cystinuria
Kidn Internat 51: 1893-9

Feliubadaló L., Bisceglia L., Font M., Dello Strangolo L., Beccia E., Arslan-Kirchner M., Steinmann B., Zellante L., Estivill X., Zorzano A., Palacín M., Gasparini P., Nunes V.

Recombinant families locate the gene for non-type I cystinuria between markers C13 and D19S587 on chromosome 19q13.1
Genomics 60, 362-365 (1999)

Font M.A., Feliubadalo L., Estivill X., Nunes V., Golomb E., Kreis Y., Pras E., Bisceglia L., D'Adamo A.P., Zelante L., Gasparini P., Bassi M.T., Gorge A.L. Jr., Manzoni M., Riboni M., Ballabio A., Borsani G., Reig N., Fernandez E., Zorzano A., Bertran J., Palacín M., 2001

Functional analysis of mutations in SLC7A9, and genotype-phenotype correlation in non-Type I cystinuria
Hum Mol Genet. 2001, Feb15, 10(4), 305-16

Furriols M., Chillarón J., Mora C., Castelló A., Bertran J., Camps M., Testar X., Vialro S., Zorzano A., Palacín M., 1993

rBAT, related to L-cystine transport is localized to the microvilli of proximal straight tubules and its expression is regulated in kidney by development
J Biol Chem 268: 27060-8

Gasparini P., Calonge M.J., Bisceglia L., Purroy J., Dianzani I., Notarangelo A., Rousaud F., Gallucci M., Testar X., Ponzzone A., Estivill X., Zorzano A., Palacín M., Nunes V., Zelante L., 1995

Molecular Genetics of Cystinuria: Identification of Four New Mutations and Seven Polymorphisms, and Evidence for Genetic Heterogeneity
Am J Hum Genet 57: 781-8

Gitomer W.L., Reed B.Y., Ruml L.A., Sakhaee K., Pak C.Y.C., 1998^a

Mutations in the genomic desoxyribonucleic acid for SLC3A1 in patients with cystinuria
J Clin Endo Metab 83: 3688-3694

Gitomer W.L., Reed B.Y., Ruml L.A., Pak C.Y.C., 1998^b

335-base deletion in the mRNA coding for a dibasic amino acid transporterlike protein (SLC3A1) isolated from a patient with cystinuria
Hum Mutat Suppl. 1: 69-71

Gitomer W.L., Reed B.Y., Pak C.Y.C., 2000

Identification of two novel mutations [P122S (364C>T) and 1601 del AC] in the SLC3A1 gene in type I cystinurics
Mutation and polymorphism report.
Hum Mutat online # 106, 2000

Goodyer P., Saadi I., Ong P., Elkas G., Rozen R., 1998

Cystinuria subtype and the risk of nephrolithiasis
Kidn Internat 54: 56-61

Goodyer P., Boutros M., Rozen R., 2000

The molecular basis of cystinuria: an update
Exp Nephrol 8: 123-7

- Guillén M., Corella D., Cabello M.L., García A.M., Portolís O., Hernández-Yago J., 2000
Association between M467T and 114C->A variants within the SLC3A1 gene and some phenotypical traits in cystinuria patients from Spain
Hum Genet 106: 314-320, 2000
- Gupta M., Bolton D.M., Marshall I., Stoller M.D., 1995
Etiology and management of cystine lithiasis
Urology 45: 344-55
- Hayashi K., 1992
PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA
PCR Methods Appl 1:34-38
- Horsford J., Saadi I., Raelson J., Goodyer P.R., Rozen R., 1996
Molecular genetics of cystinuria in French Canadians: Identification of four novel mutations in type I patients
Kidn Internat 49: 1401-6
- Ibelgaufts H., 1993
Gentechnologie von A-Z, VCH Weinheim
- International Cystinuria Consortium, 1999
Non-type I cystinuria caused by mutations in SLC7A9, encoding a subunit (b^{0,+}AT) of rBAT
Nature Genetics 23: 52-7
- International Cystinuria Consortium 2001
Functional analysis of mutations in SLC7A9 and genotype-phenotype correlation in non-type I cystinuria
Hum Mol Genet 10 No 4: 305-16
- Jaeger P., Portmann L., Saunders A., Leon E., Rosenberg L.E., Thier S.O., 1986
Anticystinuric effects of glutamine and of dietary sodium restriction
N Engl J Med 315: 1120-23
- Kanai Y., Stelzner M.G., Lee W.S., Wells R.G., Brown D., Hediger M.A., 1992
Expression of mRNA (D2) encoding a protein involved in amino acid transport in S3 proximal tubule
Am J Physiol 263: 1087
- Kelly S., Nolan E.P., 1980
Postscript on excretion rates in posttransplant cystinuric patient
JAMA 243: 1897
- Krizek V., Erben J., Lazne M., Navratil P., Svab J., 1983
Disappearance of cystinuria after kidney transplantation
Br J Urol 55: 575

Langen H., von Kietzell D., Byrd D., Arslan-Kirchner M., Vester U., Stuhmann M., Dörk T., Saar K., Reis A., Schmidtke J., Brodehl J., 2000
Renal polyamine excretion, tubular amino acid reabsorption and molecular genetics in cystinuria
Pediatr Nephrol 14: 376-84

Lee W., Wells R.G., Sabbag R.V., Mohandas T.K., Hediger M.A., 1993
Cloning and chromosomal localization of a human kidney cDNA involved in cystine, dibasic and neutral amino acid transport
J Clin Invest 91: 1959-1963

Levy H.L., Shih V.E., Madigan P.M., 1972
Massachusetts metabolic disorders screening program.
Technics and results of urine screening
Pediatrics 49: 825

Linari F., Marangella M., Fruttero B., Bruno M., 1981
The natural history of cystinuria: a 15 year followup in 106 patients,
In: Smith L.H., Robertson W.G., and Finlayson B. (Eds):
Urolithiasis: Clinical and Basic Research, New York, Plenum Press: 145-58

Lingeman J.E., Coury T.A., Newman D.M., Kahnoski R.J., Mertz J.H., Mosbaugh P.G., Steele R.E., Woods J.R., 1987
Comparison of results and morbidity of percutaneous nephrostolithotomy and extracorporeal shock wave lithotripsy
J Urol 138: 485-90

Liu W., Qian C., Francke U., 1997
Silent mutation induces exon skipping of fibrillin-1 gene in Marfan syndrome
Nature Genet 16: 328-329

Lorson C.L., Hahnen E., Androphy E.J., Wirth B., 1999
A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy
Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol 96, pp6307-6311, May 1999

Lumadue J.A., Glick A.B., Ruddle F.H., 1987
Sequence analysis and expression of the large subunit of the human lymphocyte activation antigen 4F2
Proc Natl Acad Sci USA 84: 9204

Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F., 1988
A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells
Nucleic Acids Res 16: 215

Milliner D.S., 1990
Cystinuria
Endocr Metab Clin N Amer 19: 889

Miyamoto K., Katai K., Tatsumi S., Sone K., Segawa H., Yamamoto H., Taketani Y., Takada K., Morita K., Kanayama H., Kagawa S., Takeda E., 1995
Mutations of the basic amino acid transporter gene associated with cystinuria
Biochem J 310: 951-5

Mizoguchi K., Cha S.H., Chairoungdua A., Kim D.K., Shigeta Y., Matsuo H., Fukushima J., Awa Y., Akakura K., Goya T., Ito H., Endou H., Kanai Y., 2001
Human cystinuria-related transporter: Localization and functional characterization
Kidn Internat 59: 1821-33

Moschkovitz R., Udenfriend S., Felix A., Heimer E., Tate S., 1994
Membrane topology of the rat kidney neutral and basic amino acid transporter
FASEB J 8: 1069-74

National Center for Biotechnology Information
GenBank-Internetadresse: www.ncbi.nlm.nih.gov

Newman D.M., Lingeman J.E., Mertz J.H., Mosbaugh P.G., Steele R.E., Knapp P.M. Jr., 1987
Extracorporeal shock wave lithotripsy
Urol Clin North Am 14: 63-71

Orita M., Suzuki Y., Sekiya T., Hayashi K., 1989
Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using polymerase chain reaction
Genomics 5: 874-9

Pahira J.J., 1987
Management of the patient with cystinuria
Urol Clin North Am 14: 339-46

Pak K., Sakhaee K., Fuller C., 1986
Successful management of uric acid nephrolithiasis with potassium citrate
Kidn Internat 30: 422-28

Palacín M., Chillarón J., Mora C., 1996
Role of b^{0,+}-like amino acid transport system in the renal reabsorption of cystine and dibasic amino acids
Biochemical Society Transactions 24: 856-63

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

Palacín M., Goodyer P., Nunes V., Gasparini P., 2000
Cystinuria.
In: "The metabolic and molecular basis of inherited diseases" 8th ed by
Scriver C.H., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D., Mc Graw Hill, New York, Chapter 191

- Parmacek M.S., Karpinski B.A., Gottesdiener K.M., Thompson C.B., Leiden J.M., 1989
Structure, expression and regulation of the murine 4F2 heavy chain
Nucleic acids Res 17: 1915
- Pfeiffer R., Loffing J., Rossier G., Bauch C., Meier C., Eggermann T., Loffing-Cueni D., Kühn L.C., Verrey F., 1999
Luminal heterodimeric amino acid transporter defective in cystinuria
Mol Biol Cell 10: 4135-47
- Pickel V.M., Nirenberg M.J., Chan J., Moschkovitz R., Udenfriend S., Tate S.S., 1993
Ultrastructural localization of a neutral and basic amino acid transporter in rat kidney and intestine
Proc Natl Acad Sci USA 90: 7779-83
- Pineda M., Fernandez E., Torrents D., Estevez R.C.L., Camps M., Lloberas J., Zorzano A., Palacín 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: 19738-44
- Pras E., Arber N., Aksentijevitch I., Katz G., Schapiro J.M., Prosen L., Gruberg L., Harel D., Liberman U., Weissenbach J., Pras M., Kastner D.L., 1994
Localization of a gene causing cystinuria to chromosome 2p
Nature Genetics 6: 415
- Pras E., Raben N., Golomb E., Arber N., Aksentijevich I., Schapiro J.M., Harel D., Katz G., Liberman U., Pras M., Kastner D.L., 1995
Mutations in SLC3A1 transporter gene in cystinuria.
Am J Hum Genet 56: 1297-303
- Pras E., Sood R., Raben N., Aksentijevich I., Chen X., Kastner D.L., 1996
Genomic organization of SLC3A1, a transporter gene mutated in cystinuria
Genomics 36: 163-7
- Pras E., Kochba J., Lubetzky A., Pras M., Sidi Y., Kastner D.L., 1998^a
Biochemical and Clinical studies in Libyan Jewish cystinuria patients and their relatives
Am J Med Genet 80: 173-76
- Pras E., Golomb E., Drake C., Aksentijevich L., Katz G., Kastner D., 1998^b
A splicing mutation 8891+4A->G) in SLC3A1 leads to exon 4 skipping and causes cystinuria in a moslem arab family
Hum Mutat suppl. 1: S.28-30
- Purroy J., Bisceglia L., Calonge M.J., Zelante L., Testar X., Zorzano A., Estivill X., Palacín M., Nunes V., Gasparini P., 1996
Genomic structure and organization of the human rBAT gene (SLC3A1)
Genomics 37: 249-52

Purroy J., Bisceglia L., Feliubadalo L., Rousand F., Zelante L., Zorzano A., Estivill X., Palacín M., Gasparini P., Nunes V., 1999
Cystinuria type I: Identification of nine new mutations by RNA-SSCP and two large deletions by multiplex QF-PCR in SLC3A1
Am J Hum Genet 65 S:2427 (Poster)

Purroy J., Bisceglia L., Jacken J., Gasparini P., Palacín M., Nunes V., 2000
Detection of two novel large deletions in SLC3A1 by semi-quantitative fluorescent multiplex PCR
Hum Mutat 15: S.373-379

Quackenbush E.J., Gougos A., Bauml R., Letarte M., 1986
Differential localization within human kidney of five membrane proteins expressed on acute lymphoblastic leukemia cells
J Immunol 136: 118-24

Rajan D.P., Kekuda R., Huang W., Wang H., Devoe L.D., Leibach F.H., Prasad P.D., Ganapathy V., 1999
Cloning and expression of a b^{0,+}-like amino acid transporter functioning as a heterodimer with 4F2hc instead of rbat
The Journal of Biological Chemistry Vol 274, No 41 29005-29010, 1999

Riehle R.A. Jr., 1987
Extracorporeal shock wave lithotripsy: patient selection and results
Probl Urol 1: 608

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

Saadi I., Chen X.Z., Hediger M., Ong P., Pereira P., Goodyer P., 1998
Molecular genetics of cystinuria: mutation analysis of SLC3A1 and evidence for another gene in the type I (silent) phenotype
Kidn Internat 54: 48-55

Sakhaee K., Nicar M., Hill K., Pak C.Y., 1983
Contrasting effects of potassium citrate and sodium citrate therapies on urinary chemistries and crystallization of stone-forming salt
Kidn Internat 24: 348-52

Schmidt C., 2000
Einfluß genomischer Varianten in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 auf die Entstehung einzelner Formen der Cystinurie
Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Universität Tübingen

Schmidt C., Albers A., Tomiuk J., Eggermann K., Wagner C., Capasso G., Lahme S., Hesse A., Lang F., Zerres K., Eggermann T., 2002
Searching for variants in the SLC7A9 and the SLC3A1 gene in unclassified cystinuria patients : Mutation detection rates and association between variants in SLC7A9 and the disease
Cli Nephrol May, 57 (5): 342-348, 2002

Scriver C.R., Clow C.L., Reade T., Goodyer P., Auray-Blais C., Giguere R., Lemieux B., 1985

Ontogeny modifies expression of cystinuria genes: implications for counseling
J Peds 106: 411

Segal S., Thier S.O., 1995

Cystinuria.

In: "The metabolic and molecular bases of inherited diseases", 7thed. by
Scriver C.H., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D., Mc Graw-Hill, New York, Chapter 117:
3581-3601

Sheffield V.C., Beck J.S., Kwitek A.E., Sandstorm D.W., Stone E.M., 1993

The sensitivity of single-strand-conformation-polymorphism analysis for the detection
of single base substitutions
Genomics 16: 325-32

Silbernagl S., 1988

The renal handling of amino acids and oligopeptides
Physiol Rev 68: 911-1007

Stapleton F.B., Mc Kay C.P., Noe H.N., 1987

Urolithiasis in children: The role of hypercalciuria
Pediatr. Ann. 16, 980-992, 1987

Stephens A.D., 1989

Cystinuria and it's treatment: 25 years of experience at St. Bartholomew's hospital
J Inher Metab Dis 12: 197-209

Tate S.S., Yan N., Udenfriend S., 1992

Expression cloning of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter from rat
kidney
Proc Natl Acad Sci USA 89: 1-5

Torrents D., Mykkanen J., Pineda M., Filiubadalo L., Estevez R., De Cid R., Sanjurjo
P., Zorzano A., Nunes V., Huoponen K., Reinikainen A., Sinnell O., Savontaus M.L.,
Aula P., Palacín M., 1999

Identification of SLC7A7, encoding y⁺LAT-1, as the lysinuric protein intolerance gene
Nature Genet 21: 293-6

Turner B., Brown D.A., 1972

Amino acid excretion in infancy and early childhood: A survey of 200.000 infants
Med J Aust 1:62

Ullrich K.J., Rumrich G., Klos S., 1974

Sodium dependence on the amino acid transport in the proximal convolution of the
rat kidney
Pfluegers Arch 351: 49

Van Winkle L.J., 1988

Amino acid transport in developing animal oocytes and early conceptuses
Biochim Biophys Acta 947: 173-208

- Verrey F., Meier C., Rossier G., Kuhn L.C., 2000
Glycoprotein-associated amino acid exchangers: broadening the range of transport specificity
Pfluegers Arch 440: 503-12
- Wartenfeld R., Golomb E., Katz G., Bale S.J., Goldman B., Pras M., Kastner D.L., Pras E., 1997
Molecular analysis of cystinuria in Libyan Jews: exclusion of the SLC3A1 gene and mapping of a new locus on 19q
Am J Hum Genet 60: 617-24
- Weinberg S.R., Tabenkin P.A., 1952
Observations on therapy of cystine calculus disease
Arch Intern Med 90: 850-7
- Weinberg S.R. and Tabenkin P.A., 1952
Observations on therapy of cystin calculus disease
Arch intern Med 90: 850-857, 1952
- Weinberger A., Sperling O., Rabinovitch M., Brosh S., Adam A., de Vries A., 1974
High frequency of cystinuria among Jews of Libyan origin
Hum Hered 24: 568
- Wells R.G., Hediger M.A., 1992
Cloning of a rat kidney cDNA that stimulates dibasic and neutral amino acid transport and has sequence similarity to glucosidases
Proc Natl Acad Sci USA 89: 5596-5600
- Wells R.G., Lee W., Kanai Y., Leiden J.M., Hediger M.A., 1992
The 4F2 antigen heavy chain induces uptake of neutral and dibasic amino acids in *Xenopus* oocytes
J Biol Chem 267: 15285-8
- Wu M., Gerhart J., 1991
Raising *Xenopus* oocytes in the laboratory
Methods in Cell Biology 36: 3-18
- Yan N., Moschkovitz R., Gerber L.D., Mathew S., Murty V.S., Tate SS. Udenfriend S., 1994
Characterization of the promotor region of the gene for the rat neutral and basic amino acid transporter and chromosomal location of the human gene
Proc Natl Acad Sci USA 91: 7548-52
- Zhang X., Rozen R., Hediger M.A., Goodyer P.R., Eydoux P., 1994
Assignment of the gene for cystinuria (SLC3A1) to human chromosome 2p21 by fluorescence in situ hybridization
Genomics 24: 413-14

VIII Abbildungsverzeichnis

Abb.1:	Aufbau des Transporters rBat/b ^{0,+} AT	12
Abb.2:	Resorptionsmechanismus für neutrale Aminosäuren im Tubuluslumen [nach Verrey et al. 2000]	14
Abb.3:	Darstellung der Mutation T216M durch Restriktionsverdau mit dem Enzym <i>NlaIII</i> ; Bahn A: 100bpl, Bahn B: Unverdautes Produkt, Bahn C: Cys 73 (Vater), Bahn D: Cys 74 (Mutter), Bahn E: Cys 75 (Bruder), Bahn F: Cys 76 (Bruder), Bahn G: Cys 77 (Patient)	58
Abb.4:	Darstellung der Deletion IVS6del2/3T durch Sequenzierung	60
Abb.5:	Darstellung der Mutation P508A durch SSCP, <i>BsmI</i> -Restriktionsverdau und durch Sequenzierung; Bahn A, B, C, E, F und G: Für diese Mutation unauffällige Probanden, Bahn D: Cys 65, Bahn a: 50bpl, Bahn b: unverdautes Produkt, Bahn c, d, e und f: für die Mutation unauffällige Probanden, Bahn g: Cys 65, Bahn h: Cys 66 (Tochter nicht betroffen), Bahn i: Cys 67 (Tochter und Trägerin des betroffenen Allels)	61
Abb.6:	Darstellung der Mutation c1749_1750 del mittels SSCP und Sequenzierung; Bahn A, B, C, E und F: für die Mutation unauffällige Probanden, Bahn D: Cys 109	62
Abb.7:	Darstellung des Polymorphismus nt1035G/A mittels SSCP und Sequenzierung; Bahn A, B, E und F: unauffällige Probanden, Bahn C und D: Cys 84 und 85	64
Abb.8:	Darstellung des Polymorphismus M618I durch <i>BsmI</i> -Restriktionsverdau; Bahn A: 50bpl, Bahn B: unverdautes Produkt, Bahn C, D, H, J und K: Träger der Wildtypsequenz, Bahn I: heterozygoter Anlageträger, Bahn E, F, und G: homozygote Anlageträger	65
Abb.9:	Darstellung des Polymorphismus nt2189 C/T durch <i>AccII</i> -Restriktionsverdau; Bahn A: unverdautes Produkt; Bahn B: 50 bpl, Bahn I: Träger der Wildtypsequenz, Bahn C, D, F und H: heterozygote Anlageträger, Bahn E und G: homozygote Anlageträger	65
Abb.10:	Darstellung der Mutation A224V durch SSCP und Sequenzierung; Bahn A: 100bpl, Bahn B: Cys 91 (Vater), Bahn C: Cys 92 (Mutter), Bahn D: Cys 93, Bahn E: Cys 94	67
Abb.11:	Darstellung der Deletion c969_971 del mittels SSCP und Sequenzierung; Bahn A: 100bpl, Bahn B, C, E und F: unauffällige Probanden, Bahn D: Cys 51	67
Abb.12:	Darstellung der Mutation A331V durch SSCP, <i>AcI</i> -Restriktionsverdau und Sequenzierung; Bahn A, B, C, E und F: für diese Mutation unauffällige Probanden, Bahn a: für die Mutation unauffällige Kontrollperson, Bahn b: Cys 70., Bahn c: Cys 68 (Mutter), Bahn d: Cys 69 (Bruder), Bahn e: Cys 71 (Bruder), Bahn f: Cys 72 (Bruder)	68
Abb.13:	Darstellung des Polymorphismus c1328C/T mittels SSCP, <i>AcI</i> -Verdau und Sequenzierung; Bahn A, B, C, D und G: Träger der Wildtypsequenz, Bahn E und F: heterozygote Anlageträger, Bahn a: 50bpl, Bahn b: unverdautes Produkt, Bahn c und g: heterozygote Anlageträger, Bahn d, e und f: Träger der Wildtypsequenz	72

IX Tabellenverzeichnis

Tab.1:	Aminosäureprofil im Harn obligat heterozygoter Anlageträger sowie homozygot Betroffener nach Langen et al. 2000	5
Tab.2:	Mutationen im SLC3A1-Gen	19
Tab.3:	Polymorphismen im SLC3A1-Gen	20
Tab.4:	Mutationen im SLC7A9-Gen	21
Tab.5:	Polymorphismen im SLC7A9-Gen	21
Tab.6:	Untersuchtes Patientenkollektiv	25
Tab.7:	Primersequenzen für das SLC3A1-Gen (Ac. Nr. M95548)	28
Tab.8:	Primersequenzen für das SLC7A9-Gen (Ac. Nr. 141289)	29
Tab.9:	PCR-Bedingungen für das SLC3A1-Gen	34
Tab.10:	PCR-Bedingungen für das SLC7A9-Gen	34
Tab.11:	Zum Nachweis von Mutationen und Polymorphismen verwendete Restriktionsenzyme und Fragmentgrößen für das SLC3A1-Gen	41
Tab.12:	Zum Nachweis von Mutationen und Polymorphismen verwendete Restriktionsenzyme und Fragmentgrößen für das SLC7A9-Gen	41
Tab.13:	Klinische und anamnestische Charakterisierung der Patienten	47
Tab.14:	Ergebnisse der SSCP-Analyse für das SLC3A1-Gen	50
Tab.15:	Ergebnisse der SSCP-Analyse für das SLC7A9-Gen	50
Tab.16:	Ergebnisse des Mutationsscreenings unter Berücksichtigung der Familienmitglieder	55
Tab.17:	Untersuchte Polymorphismen im SLC3A1-Gen	56
Tab.18:	Untersuchte Polymorphismen im SLC7A9-Gen	57
Tab.19:	Häufigkeitsverteilung der untersuchten Polymorphismen im SLC3A1-Gen	63
Tab.20:	Häufigkeitsverteilung der untersuchten Polymorphismen im SLC7A9-Gen	69
Tab.21:	Häufigkeiten des Polymorphismus c1328C/T unter Patienten und Kontrollen	72
Tab.22:	Häufigkeiten des Polymorphismus nt114C/A in bisher untersuchten Patientenkollektiven verschiedener ethnischer Herkunft	86
Tab.23:	Häufigkeit des Polymorphismus nt1854A/G in bisher untersuchten Patientenkollektiven verschiedener ethnischer Herkunft	87

X Anhang

Patient und Angehörige	Ethnischer Ursprung	Alter zum Zeitpunkt der ersten Steinbildung	Alter zum Untersuchungszeitpunkt	Seither aufgetretene Steine	Mutationen in SLC3A1	Mutationen in SLC7A9	Ausscheidung im Urin µmol/g Kreatinin			Typisierung ^c
							Cys	Om	Lys	Arg
Cys 56	französisch	9 Monate	14 Monate	<5	R365W/M467T	-	3635	1483.2	9748	941.1
Vater					R365W/-	-	36.1	23	138	20.2
Mutter					M467T/-	-	78.5	34.6	135.5	54.5
Cys 58	türkisch	2½ Jahre	8 Jahre	<5	-	-	4999.1	3911.2	16711.3	14361.5
Mutter					-	-	187.9	41.8	717.5	36.1
Cys 60	deutsch	12 Jahre	15 Jahre	-	-	-	1894.3	1100.2	5396.7	3023.7
Mutter					-	-	29	17.6	58	11.6
Cys 63	deutsch	-	6 Jahre	-	-	-	2809.3	1408	7319.2	1730.9
Cys 64	deutsch	13 Monate	3 Jahre	5-10	-	-	1830.9	3691.5	13911.7	3061.4
Mutter					-	-	662.3	126.3	2243.1	47.4
Vater					-	-	151.7	18.3	326.9	38.1
Cys 70	türkisch	6 Jahre	16 Jahre	<5	-	A331V ^a	2320.1	994.8	5382	898.1
Mutter					-	A331V	236.7	52.7	1142.2	69.7
Cys 77	türkisch	9 Monate	8 Jahre	-	T216M/T216M	-	1977.6	2770	7104.4	6348.3
Vater					T216M/-	-	38.5	26.7	94.5	15
Mutter					T216M/-	-	238.1	57.9	891.3	59.5
Cys 80	deutsch	7 Jahre	8 Jahre	-	M467T/S547W	-	2184.3	1898.7	575.9	2108.4
Vater					S547W/-	-	32.6	15.5	95.9	17.4
Mutter					M467T/-	-	36.2	13.1	63.9	12.2
Cys 84 ^b	deutsch	-	7 Jahre	-	-	-	1014.7	855.8	5920.3	474.9
Cys 85 ^b	deutsch	-	4 Jahre	-	-	-	888	359.4	3514.5	220.1
Vater					-	-	333.9	85.9	1075.7	25.5
Mutter					-	-	69	104.4	592.9	16.3
Cys 87	russisch	14 Jahre	17 Jahre	<5	-	-	1499.8	1543.1	10400	3157.1
Vater					-	-	53.2	26.4	153.6	18.5
Cys 93 ^b	deutsch	-	13 Jahre	-	-	A224V/-	943.6	270.1	2396	100.6
Cys 94 ^b		-	5 Jahre	-	-	A224V/-	164.5	77.2	964	68.7
Vater					-	-	26.2	21.8	33.3	16.1
Mutter					-	A224V/-	110.4	33.9	3170.8	18.5
Cys 98	deutsch	3½ Jahre	5 Jahre	-	-	-	3026.7	2834.9	7834	4339
Vater					-	-	599.4	261.4	2444.5	133.8
Mutter					-	-	170.7	67.1	486.1	35
Cys 105	russisch	1½ Jahre	12 Jahre	5-10	-	-	1003.3	1779.9	9624.9	4292.8
Vater					-	-	47.7	44.7	310.7	38.9
Mutter					-	-	31.4	39.1	190.3	17.6
Cys 106	deutsch	9 Monate	7 Jahre	-	-	G105R ^a	1994.3	1658.5	7438.6	2281
Cys 107	deutsch	10 Jahre	17 Jahre	-	(IVS+del2T/-)	-	1167.9	1481.8	6126.9	4823.2
Cys 108	deutsch	5 Jahre	12 Jahre	-	-	-	1395.9	1505.6	5652.7	4300.9
Cys 109	deutsch	1 Jahr	9 Jahre	-	c1749_1751del/R365W	-	2613.2	3621.9	12596.5	5361.5
Cys 110	italienisch	1 Jahr	7 Jahre	>10	-	G105R/-	3222.9	3960.1	8402.7	6106.9
Cys 112		2 Jahre	20 Jahre	>10	-	G105R/-	1057.3	1492.7	6201.6	2471.2
Vater					-	G105R/-	66.8	32.4	214.6	12.3
Mutter					-	-				unkl./unkl.

Cys: Cystin; Orn: Ornithin; Lys: Lysin; Arg: Arginin
 I: Allelträger für die Typ I-Cystinurie; nicht I: Allelträger für die nicht-Typ I-Cystinurie; - : Unbetroffenes Allel; unkl.: Unklassifiziertes Allel

^aHomo- bzw. Heterozygotenstatus kann nicht zugeordnet werden

^bPatienten wurden im Rahmen eines Neuroblastom-Screening-Programmes erfasst

^cBasierend auf der Aminosäureausscheidung im Harn der Eltern

XI Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Klaus Zerres möchte ich für die Bereitstellung des Dissertationsthemas sowie die Möglichkeit, die Dissertation am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums der RWTH Aachen durchzuführen, danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Floege Direktor der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums der RWTH Aachen, für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Thomas Eggermann möchte ich für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die gute Betreuung während meiner Arbeit am Institut für Humangenetik danken, sowie für die Hilfe bei der Korrektur der Dissertation.

Den Mitgliedern der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Nephrologie, Dr. med. H. Bachmann, Dr. med. A. Bökenkamp, Prof. Dr. med. M. Fischbach, Dr. S. Fründ, Prof. Dr. med. K. G. Pistor und Dr. med. H. F. Zappel sowie Prof. Dr. Albrecht Hesse, Abteilung Experimentelle Urologie der Universität Bonn, danke ich für die Bereitstellung des Patientenkollektivs.

Für die Durchführung der biochemischen Typisierung des pädiatrischen Patientenkollektivs danke ich Herrn Dr. med. Udo Vester und Herrn Prof. Dr. med. P. Hoyer, Universitätskinderklinik Essen.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik für die gute Zusammenarbeit und Hilfe während der Durchführung des experimentellen Teils meiner Dissertation.

Meinen Eltern danke ich für die fortwährende Unterstützung während meines Studiums, die mir die Durchführung der Dissertation erst ermöglichte.

Danken möchte ich außerdem allen denjenigen, die an dieser Stelle nicht erwähnt wurden, die aber durch ihre Mithilfe zum Gelingen der Dissertation beigetragen haben.

XII Publikationen

Botzenhart E., Vester U., Schmidt C., Hesse A., Halber M., Wagner C., Lang F., Hoyer P., Zerres K., Eggermann T., 2002: Cystinuria in children: distribution and frequencies of mutations in the SLC3A1 and SLC7A9 genes
Kidney international Vol 62, 2002

Schmidt C., Tomiuk J., Botzenhart E., Vester U., Hesse A., Zerres K., Eggermann T., 2002: Genetic variations in the SLC7A9 gene: distribution of 13 polymorphic sites in German cystinuria patients and controls.
J. Clin Endocrin Metabol: submitted

Schmidt C., Botzenhart E., Vester U., Hoyer P., Zerres K., Eggermann T., 2001: Mutational spectrum in the genes SLC3A1 and SLC7A9 in early manifesting cystinuria
Am J Hum Genet: 1709 (Poster)

Botzenhart E., Vester U., Schmidt C., Hoyer P., Zerres K., Eggermann T., 2001: Mutationsspektrum in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 bei jugendlichen Cystinurie-Patienten
Monatsschrift Kinderhkd. 149: 118 (Vortrag)

Eggermann T., Schmidt C., Vester U., Botzenhart E., Wagner C., Zerres K., 2002: Cystinuria in children: distribution of mutations in SLC3A1 and in SLC7A9.
Medgen: im Druck (Poster)

XIII Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Botzenhart
Vorname	Elke Maria
Geburtsdatum	21.11.1976
Geburtsort	Aachen
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	römisch-katholisch

Schulbildung

1983-1987	Katholische Grundschule Ratheim (NRW)
1987-1996	Cornelius-Burgh-Gymnasium Erkelenz
10.06.1996	Abitur

Studium

1996-2003	Studium der Humanmedizin an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
08/1998	Ärztliche Vorprüfung
08/1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

04/2002-03/2003	Luisenhospital Aachen, Wahlfach: Gynäkologie
-----------------	--

Berufstätigkeit

seit 01.07.2003	Ärztin im Praktikum am Institut für Humangenetik der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
-----------------	--