

**Bedeutung der extrazellulär lokalisierten Cysteine für  
die Funktion des Natrium/D-Glucose-Cotransporters  
(SGLT1)**

**Inaugural-Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Myriam Kasch**

aus Düsseldorf

November 2000

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1998 bis November 2000 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund in der Abteilung Epithelphysiologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Rolf Karl-Heinz Kinne durchgeführt.

### **Danken möchte ich**

Herrn Prof. Dr. Dr. Rolf Karl-Heinz Kinne, der mir das interessante Thema zur Verfügung stellte, meine Arbeit stets mit großem Interesse begleitete und mich immer engagiert unterstützte

Herrn Prof. Dr. Hans-Dieter Höltje, der mir die pharmazeutische Chemie auf überzeugende Weise nahe brachte und sich freundlicherweise bereit erklärte, diese externe Arbeit zu betreuen

Frau Dr. Dagmar Homerová und Frau Dr. Renata Nováková für ihre stete Hilfsbereitschaft in molekularbiologischen Fragen

Frau Christiane Pfaff, Frau Petra Glitz und Frau Sabine Hellwig für das Heranziehen der Zellen

Frau Prof. Dr. Evamaria Kinne für die Präparation der Zellfraktionen und die Beantwortung aller Arten von Fragen

Frau Kirsten Rosenthal und Frau Petra Lordieck für Tips und Tricks bei der Anfertigung der Western-Blots

Herrn Dr. Chiann-Tso Lin für die interessanten Diskussionen

Herrn Mark Gnoth für die Bewältigung der Tücken der modernen Text- und Bildverarbeitung

sowie allen anderen Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts für molekulare Physiologie in Dortmund für die freundliche Zusammenarbeit.

**Meinen Eltern**

# INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung .....	1
2. Material .....	9
<b>2.1. Chemikalien</b> .....	<b>9</b>
<b>2.2. Enzyme</b> .....	<b>9</b>
<b>2.3. Oligonukleotide</b> .....	<b>10</b>
<b>2.4. Plasmide</b> .....	<b>10</b>
<b>2.5. Säugerzellen</b> .....	<b>10</b>
3. Methoden .....	11
<b>3.1. Molekulargenetische Techniken</b> .....	<b>11</b>
3.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA .....	11
3.1.2. Isolierung von totaler RNA.....	11
3.1.3. Mutagenese – doppelsträngig und ortsgerichtet .....	11
3.1.3.1. Schnellaufschluß.....	12
3.1.4. Transformation von E.coli .....	13
3.1.5. Klonierungstechniken.....	13
3.1.6. Reverse Transkription.....	13
3.1.7. Quantitative PCR .....	13
3.1.8. Sequenzierung.....	14

<b>3.2. Expressionssystem COS-7 Zellen .....</b>	<b>15</b>
3.2.1. Zellaufzucht und Zellkultur .....	15
3.2.2. Transfektion .....	15
3.2.3. Bestimmung der Transfektionseffizienz .....	16
<b>3.3. Untersuchungssystem CHO G6D3 Zellen.....</b>	<b>16</b>
<b>3.4. Transportstudien .....</b>	<b>17</b>
3.4.1. Bestimmung der natriumabhängigen $\alpha$ -Methylglucoseaufnahme .....	17
3.4.2. Berechnung .....	17
<b>3.5. Statistik.....</b>	<b>19</b>
<b>3.6. Biochemische Arbeitsmethoden .....</b>	<b>19</b>
3.6.1. Membranpräparation.....	19
3.6.2. Proteinbestimmung .....	21
3.6.3. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese .....	21
3.6.4. Western Blot .....	22
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1. Konstruktion und Expression des mutierten SGLT1 .....</b>	<b>24</b>
4.1.1. Substitution der Cysteine .....	24
4.1.2. Expression der Mutanten in COS-7 Zellen.....	25
4.1.3. Nachweis der Mutanten auf RNA-Ebene .....	26
4.1.3.1. Quantifizierung der Transkription .....	27
4.1.4. Nachweis der Mutanten auf Proteinebene .....	28
<b>4.2. Funktionelle Charakterisierung der SGLT1-Mutanten in der C-terminalen extrazellulären Schleife (S13).....</b>	<b>29</b>
4.2.1. Bestimmung der Transportaktivität .....	29
4.2.2. Bestimmung der Substrataffinitäten .....	30
4.2.2.1. $\alpha$ -Methylglucose.....	31

4.2.2.2. Natrium .....	35
4.2.3. Bestimmung der Stöchiometrie .....	39
4.2.4. Bestimmung der Affinität für Phlorizin .....	42
4.2.5. Bestimmung der Hemmwirkung von Arbutin .....	45
4.2.5.1. Bestimmung der Affinität für Arbutin .....	46
<b>4.3. Erreichbarkeit von C560 und C608 für SH-Gruppenreagenzien .....</b>	<b>47</b>
4.3.1. Allgemeine Hemmstudien .....	48
4.3.2. Hemmstudien mit MTSET an transfizierten COS-7 Zellen.....	49
4.3.3. Bestimmung der Affinitäten für AMG und Phlorizin nach Vorinkubation mit MTSET.....	51
<b>4.4. Untersuchungen an den Cysteinen in S5 und S7 .....</b>	<b>51</b>
4.4.1. Bestimmung der Transportaktivität .....	52
4.4.2. Bestimmung der Affinität für AMG .....	53
4.4.3. Bestimmung der Affinität für Phlorizin .....	54
<b>4.5. Lokalisation einer Disulfidbrücke.....</b>	<b>56</b>
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>58</b>
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>71</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>72</b>
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>74</b>
<b>9. Anhang.....</b>	<b>82</b>

## 1. Einleitung

Jede lebende Zelle ist darauf angewiesen, die Rohstoffe für Biosynthese und Energieproduktion aufzunehmen und die Nebenprodukte des Stoffwechsels wieder an die Umgebung abzugeben. Dabei spielt die Niere eine existentielle Rolle. Sie ist verantwortlich für die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen, aber auch für die Produktion lebensnotwendiger Hormone. Zudem reguliert sie den Elektrolyt- und Wasserhaushalt, der somit die Sicherung der Säure-Basen-Gleichgewichts, die Konstanz der Osmolalität im Plasma sowie die Homöostase des extrazellulären Ionenmilieus gewährleistet.

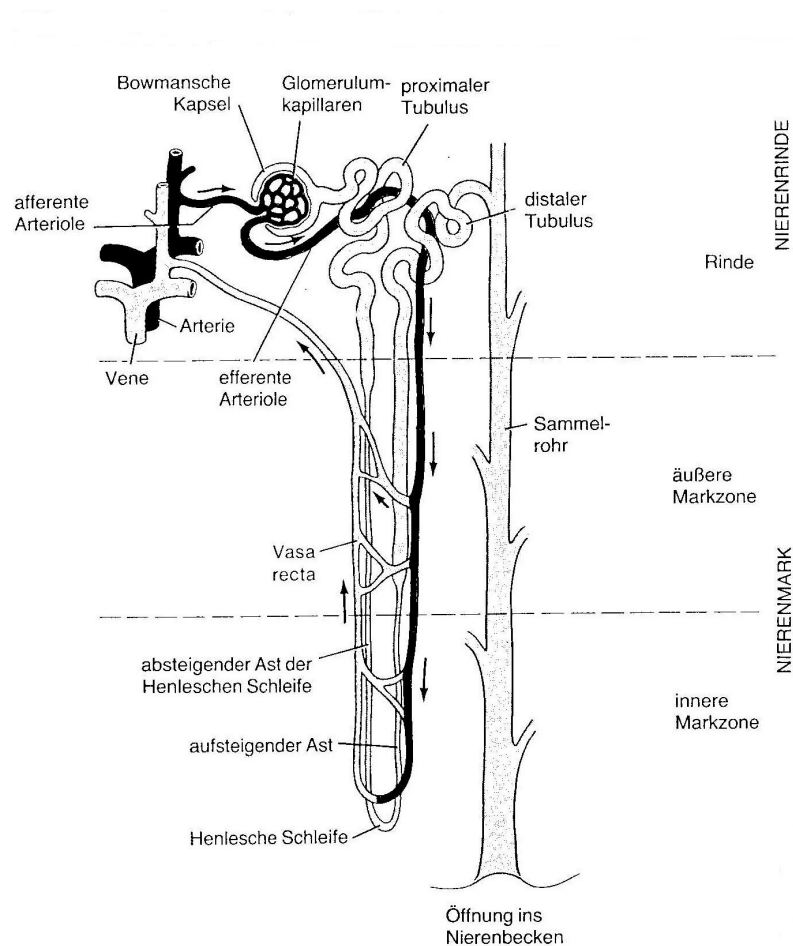


Abb. 1: Form und Gliederung eines Nephrons und dessen Blutversorgung in schematischer Darstellung (nach Eckert, 1993)

In der Niere erfolgt die Resorption über die Nephrone (Abb. 1), die die morphologischen und funktionellen Einheiten darstellen. Im Glomerulus, am Anfang des Nephrons, bildet sich der Primärharn, wobei ein Filtrat aus dem durchfließenden Blutplasma abgepreßt wird. Dieses gelangt dann aus der Bowman'schen Kapsel in den Tubulusapparat und wird während seiner Passage durch die verschiedenen Tubulusabschnitte in seiner Zusammensetzung grundlegend verändert. Der größte Teil der gelösten Bestandteile und 99 % des Wassers werden rückresorbiert und dem Blutkreislauf wieder zugeführt. Der Rest wird als Urin ausgeschieden. Der proximale Teil des Tubulus ist von einem kubischen Epithel mit einem Bürstensaum ausgekleidet (Abb. 2). Hier wird D-Glucose nahezu vollständig resorbiert.

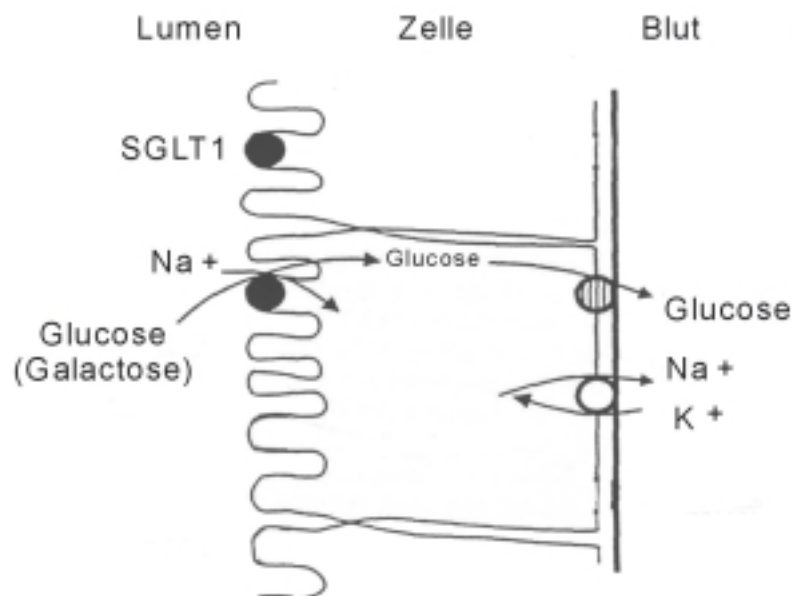


Abb. 2: Mechanismus des sekundär aktiven Transports von D-Glucose mittels des SGLT1 durch Epithelzellen (nach Wright, 1993)

Dies erfolgt in zwei Schritten. Zunächst wird D-Glucose über die luminale Membran in den Epithelzellen akkumuliert. Die dafür benötigte Energie wird durch Natrium-Kalium-ATPasen auf der basalen Seite der Zellen bereitgestellt, die verbunden mit ATP-Hydrolyse einen Natriumgradienten über die Plasmamembranen des Epithels aufrechterhalten. Verantwortlich für diesen sekundär aktiven Transport ist der Natrium/D-Glucose-Cotransporter (SGLT1). In einem zweiten Schritt wird die D-Glucose



passiv, d.h. natriumunabhängig durch erleichterte Diffusion über die basolaterale Membran in das Blut abgegeben. Das Natrium/D-Glucose-Cotransportsystem kommt auch im Epithel des Dünndarms vor, wo es für die Absorption von Glucose und Galactose, die als Bestandteile der Nahrung vorkommen, verantwortlich ist. Defekte im SGLT1 Gen haben zwei verschiedene funktionelle Störungen zur Folge (Desjeux, 1989). Ist das renale Cotransportsystem betroffen, kommt es infolge der Abnahme der maximalen tubulären Resorptionsfähigkeit, bei normalen Blutzuckerspiegeln, zu einer Ausscheidung von Glucose im Urin. Diese renale Glucosurie verläuft gewöhnlich ohne Symptome oder physiologische Konsequenzen. Anders verhält es sich im Falle der Glucose-Galactose Malabsorption (GGM). Hier liegt eine Störung im intestinalen Cotransportsystem vor, die außerdem meist mit renaler Glucosurie einhergeht, was umgekehrt nicht der Fall ist. Die GGM ist eine seltene, autosomal-rezessive Erbkrankheit. Die hohe Zuckerkonzentration im Darmlumen führt zu einer schweren Diarrhö des Neugeborenen und erfordert eine komplette Entfernung der Zucker aus der Nahrung. Im Rahmen der klinischen Forschung an dieser Fehlfunktion wurden verschiedenartige Mutationen an Patienten identifiziert (Martin et al., 1996). Bisher gelang es jedoch nicht, definitive Aussagen über die Lokalisation der Substratbindungsstelle zu machen sowie die an der Bindung beteiligten Aminosäuren zu identifizieren.

In Substratschutzexperimenten wurde gezeigt, daß Sulfhydrylgruppen an der Bindung von D-Glucose und Phlorizin, einem kompetitiven Inhibitor, beteiligt sind (Thomas et al., 1972). Diese Annahme basierte auf der Tatsache, daß sowohl Phlorizin als auch D-Glucose den Transporter vor einer Bindung von radioaktiv markiertem NEM (N-Ethylmaleinimid) schützen, das mit Sulfhydrylgruppen von Polypeptidketten reagiert. Als Untersuchungssystem dienten hier isolierte Plasmamembranen aus der Nierenrinde der Ratte, die in Form von Bürstensaummembranvesikeln (BBMV) vorlagen. In Transportstudien an aus Schweinenierencortex präparierten BBMV wurden die kinetischen Eigenschaften dieses Transportsystems charakterisiert. Es ergab sich eine Affinitätskonstante von 1,3 mM für das Substrat D-Glucose. Außerdem wurde die Affinität für Phlorizin bestimmt (Lin et al., 1981), sie lag um den Faktor 1000 höher ( $K_i = 1,2 \mu\text{M}$ ). Phlorizin ist ein aus der Rinde des Apfelbaums gewonnenes  $\beta$ -Glucosid und in Abb. 3 dargestellt. Eine Hemmwirkung auf den Zuckertransport wurde erstmals von Lotspeich beschrieben (Lotspeich, 1961).

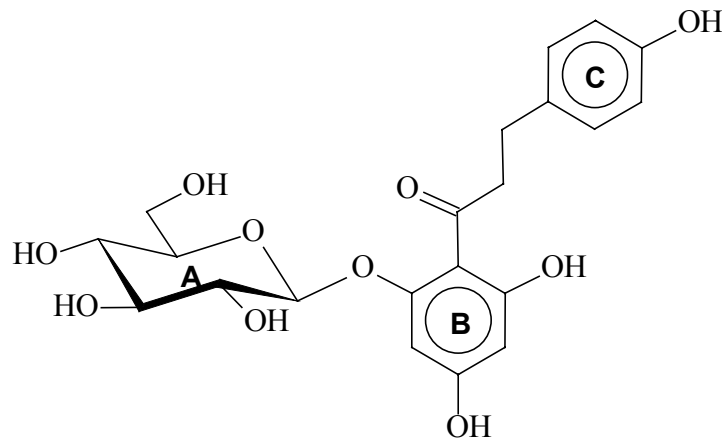


Abb. 3: Strukturformel von Phlorizin mit Bezeichnung der Partialstrukturen

Hinweise auf die Existenz von Disulfidbrücken mit Bedeutung für die Funktion des Natrium/D-Glucose-Cotransporters geben die Studien von Turner und George. Hier wurde an BBMV aus der äußeren Cortex der Kaninchenniere, was dem frühen Teil des proximalen Tubulus eines Nephrons entspricht, gearbeitet. Dabei wurde DTT (Dithiothreitol), ein Reagenz, welches Disulfidbrücken reduziert, verwendet. Es konnte bewiesen werden, daß das Substrat den Transporter vor einer Inaktivierung durch DTT schützt, wohingegen nicht transportierte Zucker diesen Effekt nicht zeigten (Turner und George, 1983, 1984).

Die Klonierung des Natrium/D-Glucose-Cotransporters eröffnete neue Möglichkeiten der Aufklärung des molekularen Mechanismus des Cotransportes. Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden wurde aus dem Kaninchendünndarm ein DNA-Abschnitt isoliert. Nach Injektion der entsprechenden m-RNA in *Xenopus laevis* (Südafrikanischer Krallenfrosch) Oocyten zeigte sich ein im Gegensatz zu Wasserinjizierten Oocyten 1000-fach erhöhter natriumabhängiger D-Glucose-Transport. Es wurde ein Protein bestehend aus 662 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 73 kDa identifiziert (Hediger et al., 1987). Da in BBMV Präparationen der Anteil des Natrium/D-Glucose-Cotransporters auf 0,1 % des Gesamtproteins geschätzt wird, bot diese Art der Überexpression konkretere Untersuchungsmöglichkeiten, vor allem durch das Einbringen des Proteins in Systeme, die kein natives Natrium/D-Glucose-Cotransport Systems besitzen. Die Expression und Charakterisierung wurde neben in

*Xenopus laevis* Oocyten (Hediger et al., 1987) unter anderem auch in COS-7 Zellen (Birnie et al., 1990), CHO Zellen (Lin et al., 1998) und in Sf9 Zellen (Smith et al., 1992) durchgeführt.

In Folge dienten Teile der durch Expressionsklonierung gewonnenen cDNA als Sonde zur Identifizierung weiterer Natrium/D-Glucose-Cotransport Systeme. So konnten neben dem hochaffinen Natrium/D-Glucose-Cotransporter aus dem Kaninchendünndarm und der Niere (Coady et al., 1990) die entsprechenden Systeme aus der Niere des Menschen (Hediger et al., 1989), des Schweins (Ohta et al., 1990), und der Ratte (Lee et al., 1994) sowie das niederaffine System aus der Niere des Menschen (Wells et al., 1992, Kanai et al., 1994) identifiziert werden. Das hochaffine System wurde als SGLT1 und das niederaffine als SGLT2 bezeichnet. Neben Unterschieden in der Substrataffinität und Stöchiometrie transportiert der SGLT2 keine D-Galactose.

Turk entwickelte mit Hilfe des Hydrophibizitätsplots (Eisenberg et al., 1984) eine Sekundärstruktur, die in Abb. 4 dargestellt ist.

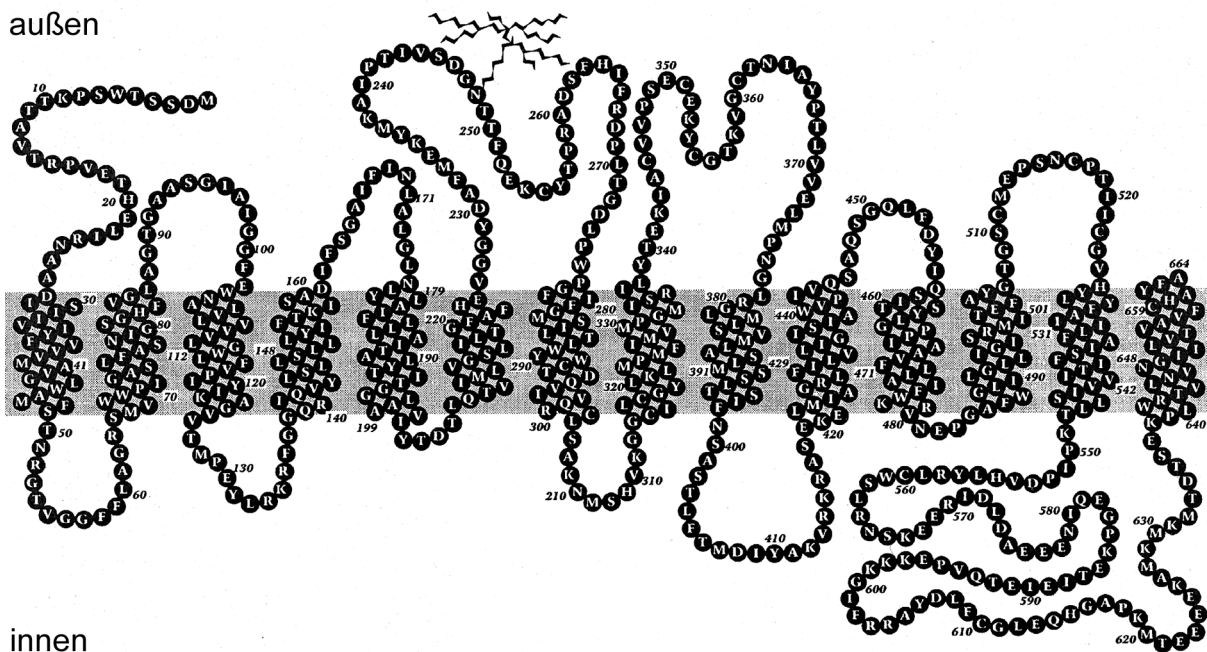


Abb. 4: Membran Topologie Modell des SGLT1 aus dem Menschen (nach Turk und Wright, 1997)

Das Protein besteht demnach aus 14 Transmembrandomänen (TM). Es wird postuliert, daß der N-Terminus extrazellulär liegt. Die große, hauptsächlich aus geladenen Aminosäuren bestehende, C-terminale Domäne liegt intrazellulär und der hydrophobe C-Terminus formt die vierzehnte Transmembrandomäne (Turk und Wright 1997). Daraus ergibt sich, daß die Cysteine 560 und 608 im Cytoplasma lokalisiert sind.

Die Tertiärstruktur ist noch nicht endgültig aufgeklärt. Es wird ein asymmetrisches Monomer diskutiert, das mit Hilfe der Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie in Oocyten ermittelt wurde (Wright et al. 1998).

Chimären, bestehend aus den Aminosäuren 1-380 des SGLT2 und Aminosäuren 381-662 des SGLT1 aus der Niere des Schweins zeigten Transporteigenschaften entsprechend denen des hochaffinen Systems. Es wurde postuliert, daß die Erkennung und der Transport des Substrates über Interaktionen nahe der Aminosäure 380 vermittelt wird (Panayotova-Heiermann et al. 1995). In weiterführenden Studien wurde ein cDNA-Konstrukt codierend für die Aminosäuren 407-662 (TM10-14) des SGLT1 aus der Kaninchenniere in Oocyten exprimiert (Panayotova-Heiermann et al 1997). Die Autoren vermuteten, daß der Zuckertransportweg von der TM 10-13 geformt wird.

Das oben genannte Modell wird allerdings konträr diskutiert. Dem gegenüber steht das in Abb. 5 gezeigte Modell nach Lin (unveröffentlicht).

Als markanter Unterschied sei die Lage der C-terminalen Schleife erwähnt, die hiernach im Periplasma zu finden ist. Es konnte gezeigt werden, daß ein epitop-spezifischer Antikörper namens PAN-3 (Lin et al., 1998), der gegen die Aminosäuren 606-630 gerichtet ist, an die Zelloberfläche von transfizierten COS-7 Zellen bindet (Lin et al., 1999). Im Gegensatz zu dem Modell nach Turk positioniert dieser Befund die Cysteine 560 und 608 somit in der Außenseite der Membran.

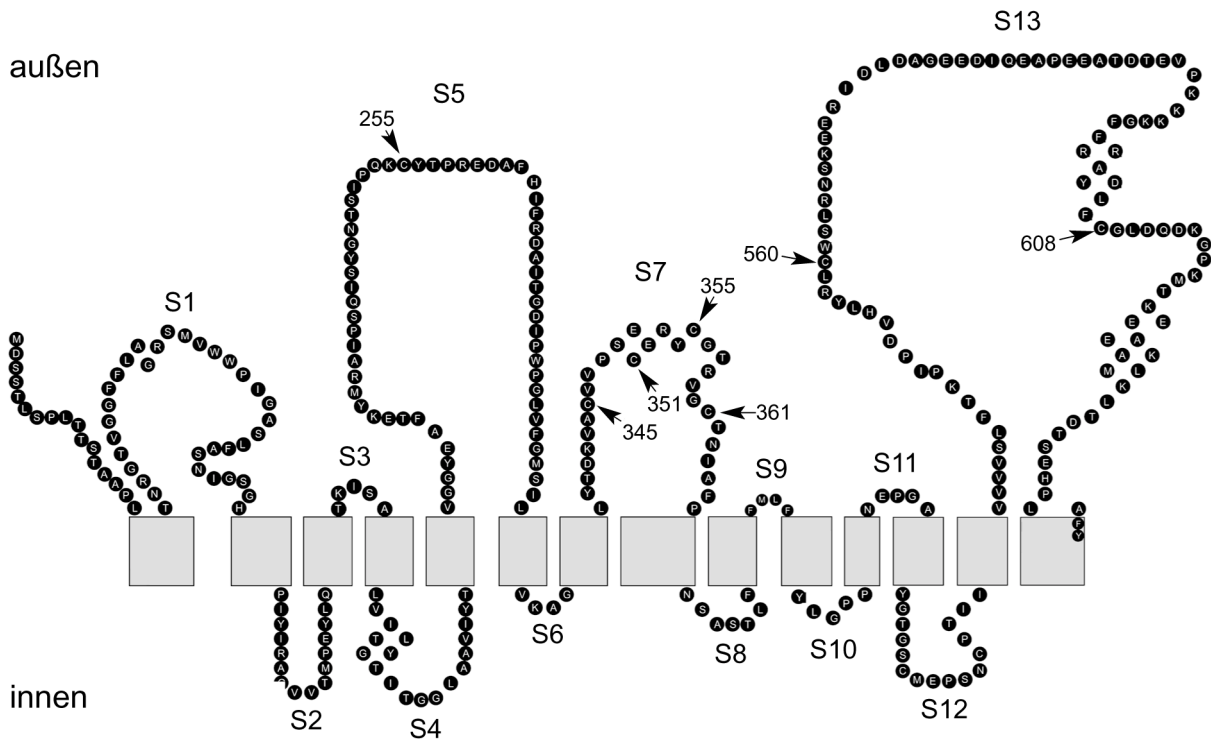


Abb. 5: *Membran Topologie Modell des SGLT1 aus dem Kaninchen (nach Lin, unveröffentlicht)*

Die Position aller extrazellulären Cysteine ist herausgestellt. S= Segmente, die nicht in der Lipiddoppelschicht der Membran lokalisiert sind.

Ein weiterer Beweis, der für das Resultat von Lin spricht, wurde in Studien zur Affinitätsmarkierung des gereinigten, solubilisierten SGLT1-Proteins erbracht (Wielert-Badt, 1998). Durch Markierung mit dem irreversiblen Hemmstoff 3'-Iod-3-iodacetamidophlorizin konnte einerseits die Beteiligung von SH-Gruppen aus Cystein-Resten an der Bindungstasche bestätigt werden und andererseits auf eine C-terminale Lokalisation selbiger geschlossen werden.

Daher ist es eine Intention dieser Arbeit, durch gezielten Austausch der extrazellulär lokalisierten Cysteine ihre Relevanz für die Funktion des Natrium/D-Glucose-Cotransporters darzustellen. Dies beinhaltet zunächst eine ausführliche Charakterisierung des Wildtyps und dem anschließenden Vergleich mit den Mutanten. Ein weiteres Ziel ist es, die konträr diskutierte Lokalisation der Cysteine aufzuklären und somit einen Beitrag zur Bestimmung der Topologie des SGLT1 zu leisten. Eine Rolle spielen dabei die sogenannten MTS (Methanthiosulfonat)-Reagenzien. Diese Substanzen zeichnen sich dadurch aus, daß sie im Gegensatz zu den bis dato

herkömmlichen Sulfhydrylreagenzien, wie Maleinimide, Iodacetat oder organische Quecksilberverbindungen, eine nur kurze Reaktionszeit sowie hohe Selektivität für SH-Gruppen von Cysteinen besitzen (Kenyon und Bruice, 1977). Sie wurden bereits erfolgreich zur Aufklärung struktureller und funktioneller Aspekte bei einer Reihe von ligandengesteuerten Ionenkanälen angewandt. Zusätzlich soll den Hinweisen auf Existenz einer Disulfidbrücke nachgegangen und diese wenn möglich identifiziert werden. Anhand der ermittelten Daten soll abschließend ein Modell erstellt werden, welches die Wechselwirkungen und Konformationsänderungen bei Bindung des Substrats und des Inhibitors an den SGLT1 wiedergibt.

## **2. Material**

### **2.1. Chemikalien**

Kits für die Präparation und Aufreinigung von totaler RNA, Plasmid-DNA, für die Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen und für die Transfektion von COS-7 Zellen wurden von Qiagen (Hilden) bezogen.

Das Zellkulturmedium Dulbecco's Modifiziertes Eagle's Medium, sowie die Zusätze Glutamin und fötales Kälberserum (FKS) stammten von Pan Systems (Nürnberg). Opti-MEM und Trypsin-EDTA-Lösung wurden von der Firma Life Technologies (Karlsruhe) verwendet. Das  $\beta$ -Gal Färbekit lieferte die Firma Invitrogen (De Schelp, NL).

Der SYBR Green PCR MasterMix wurde von der Firma PE Biosystems (Weiterstadt) bezogen.

Die  $^{14}\text{C}$ - $\alpha$ -Methylglucose ( $^{14}\text{C}$ -AMG) wurde von der Firma NEN Life Science Products (Köln) erhalten.

MTSET ist ein Produkt der Firma Toronto Research Chemicals (North York, Kanada).

Das ECL Western Blot Detektionsreagenz sowie der ECL-Hyperfilm stammten von Amersham Pharmacia (Freiburg). Die 8-16 %igen Tris-Glycin Gele wurden von Novex (Frankfurt) verwendet.

Alle anderen Chemikalien wurden in der höchst möglichen Reinheit von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

### **2.2. Enzyme**

Die Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen New England Biolabs (Schwalbach), Amersham Pharmacia (Freiburg) und Promega (Mannheim) bezogen.

Die Alkalische Phosphatase, T4 DNA-Ligase und T4 Polynukleotid-Kinase stammen von New England Biolabs. Die Reverse Transkriptase II wurde von der Firma Life Technologies erhalten.

Die Einführung von Mutationen wurde unter Verwendung des Chameleon Double-Stranded, Site-Directed Mutagenesis Kits der Firma Stratagene Europe (Amsterdam, NL) durchgeführt.

### **2.3. Oligonukleotide**

Alle Oligonukleotide wurden auf einem Beckmann Oligo 1000 im 0,02 µmol-Maßstab synthetisiert und nach NAP-10 Gelfiltration direkt für Mutagenesen und zur Sequenzierung eingesetzt.

### **2.4. Plasmide**

Als Klonierungsvektor wurde pBluescript SK+ der Firma Stratagene Europe eingesetzt. Zur Transformation der eukaryotischen Zellen wurde der Expressionsvektor pHook-2 der Firma Invitrogen (Groningen, NL) verwendet.

### **2.5. Säugierzellen**

Zellen aus der Niere des Afrikanischen Grünaffens (COS-7, CV1 Origin SV40) wurden von European Collection of Cell Culture (ECACC, Salisbury, GB) mit einer Passagenzahl von 5 bezogen. Ebenfalls von ECACC stammten Eierstockzellen des chinesischen Hamsters (CHO).



### **3. Methoden**

#### **3.1. Molekulargenetische Techniken**

Wenn nicht anders erwähnt wurden molekulargenetische Methoden nach Ausubel (1995) und Sambrook (1989) angewandt.

##### **3.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA**

Hochaufgereinigte Plasmid-DNA für die Sequenzierung wurde mit Hilfe des Qiagen Plasmid Kits isoliert. Endotoxinfreie Plasmid-DNA zum Zweck der Transfektion von Säugerzellen wurde unter Verwendung des EndoFree Plasmid Kits ebenfalls von der Firma Qiagen präpariert.

##### **3.1.2. Isolierung von totaler RNA**

Die Isolation hochaufgereinigter totaler RNA aus transfizierten Säugerzellen für die cDNA-Synthese wurde mittels des Qiagen RNeasy Kits durchgeführt.

##### **3.1.3. Mutagenese – doppelsträngig und ortsgerichtet**

Die Durchführung dieser Methode erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zunächst wurden sowohl der Selektionsprimer als auch der mutagene Primer (Tab. 1) unter Behandlung mit T4 Polynukleotid-Kinase am 5'-Ende phosphoryliert. Nach Hitze-Denaturierung der doppelsträngigen Plasmid-DNA wurde diese mit den beiden Primern hybridisiert. Mit Hilfe eines Nukleotid-Gemisches, T7 DNA Polymerase und T4 DNA Ligase wurde der neue Strang synthetisiert. Es folgte ein selektiver Restriktionsverdau, so daß alle ursprünglichen, unmutierten Plasmide linearisiert wurden. Danach wurde die DNA in den E.coli-Stamm XL*mutS* transformiert, der nicht in der Lage ist Fehlpaarungen zu reparieren. Das heißt, es wurde willkürlich der elterliche oder der mutierte Strang als korrekt ausgewählt. Demzufolge enthielt die Hälfte der Plasmide die erwünschte Mutation, während die andere Hälfte als ursprüngliche Plasmide vorlag. Die DNA wurde

isoliert und erneut ein selektiver Restriktionsverdau durchgeführt, um alle unmutierten Plasmide zu linearisieren. Danach erfolgte die Transformation in kompetente E.coli XL1-Blue Zellen.

Tab. 1: Auflistung der für die Mutagenese verwendeten Primer

Primer (5'→3')	Effekt
CCTCCATCCCACAGAAG <b>GC</b> CTACACCCCAAGGGAAGACGCC	C255A
CCTGTACACAGACAAAGTTGCC <b>GC</b> CGTCGTGCCCTCGG	C345A
GCCTGCGTCGTGCCCTCGGA <b>AGCT</b> GAGAGATACTGTGGCACC	C351A
GCCCTCGGAATGTGAGAGATAC <b>GC</b> TGGCACCAGGGTTGGC	C355A
GGCACCAGGGTTGGCT <b>CC</b> ACCAACATTGCCTTCCC	C361S
GCATCTCTATCGTCTG <b>GC</b> CTGGAGCCTACGTAATAGC	C560A
GGCGGGCCTATGACCTGTTT <b>GCT</b> GGGCTGGACCAGGATAAGGG	C608A
CTGTGACTGGTG <b>ACGCGT</b> CAACCAAGTC	Sca I→Mlu I

Oben sind die mutagenen Primer dargestellt, während es sich bei dem letzten Primer unten, um den Selektionsprimer handelt. Die fettgedruckten Basen kennzeichnen die Veränderungen gegenüber der Originalsequenz.

### 3.1.3.1. Schnellaufschluß

Zur Überprüfung auf positive Klone wurden Aliquots des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten ausgebracht und jeweils 6 der resultierenden Kolonien in LB-Medium über Nacht kultiviert. Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte mittels alkalischer Lyse nach Birnboim und Doly (1979). Diejenigen Klone, die nach Restriktionsverdau mit MluI auf dem Agarose-Gel zwei DNA-Fragmente, d.h. zwei Schnittstellen aufwiesen, wurden sequenziert. Die Schnittstellen für MluI lagen zum einen im ursprünglichen Selektionsprimer und zum anderen im zu mutierenden Gen selbst.

#### **3.1.4. Transformation von E.coli**

Die nach der Methode von Simanis (Simanis, 1985) transformierten Zellen wurden sofort in 700 µl SOC-Medium suspendiert und 1 h bei 37°C regeneriert. Aliquots des Transformationsansatzes wurden auf LB-Agarplatten ausgebracht.

#### **3.1.5. Klonierungstechniken**

Der Verdau von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die resultierenden DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch über Agarose-Gele getrennt, die DNA-Banden ausgeschnitten und die DNA unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits der Firma Qiagen eluiert. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4°C. Anschließend wurden Aliquots des Ligationsansatzes zur Transformation eingesetzt.

#### **3.1.6. Reverse Transkription**

Es wurden Aliquots der aus COS-7 Zellen isolierten RNA zunächst mit 0,25 µl Oligo dT-Primer (500 µg/ml) versetzt, mit Wasser auf 5,0 µl aufgefüllt und 10 min bei 70°C inkubiert. Dem Ansatz wurden 2,0 µl 5 x Reverse Transkriptase-Puffer (mit 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 1,0 µl d-NTP (10 mM), 1,0 µl RNasin (40 U/l) und 0,5 µl DTT (0,1 M) hinzugefügt und 3 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde 1,0 µl Reverse Transkriptase II (20 U/l) hinzugegeben und 8 min erneut bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurde für eine Stunde bei 40°C inkubiert und die Reaktion für 5 min bei 95°C gestoppt.

#### **3.1.7. Quantitative PCR**

Der Nachweis der mRNA in COS-7 Zellen erfolgte mittels der Methode der Quantitativen Real-Time PCR. Diese wurde mit Hilfe des GeneAmp 5700 Sequence Detection System der Firma PE Biosystems (Weiterstadt) durchgeführt. Eingesetzt wurden die Produkte aus der Reversen Transkription, die 10 ng totaler RNA entsprachen. Die RNA wurde präpariert aus COS-7 Zellen, die transient mit dem Leervektor pHook-2 als Kontrolle,

dem SGLT1 sowie den Mutanten C560A und C608A transfiziert wurden. Als Primer für die Amplifikation der cDNAs wurden 5'-CGTCATCTACTTCTTGGTGGTG-3' und 5'-CTCGTCTTTGGAATGAGCATCC-3' verwendet, woraus ein Produkt von 760 Basenpaaren resultierte. Um die Qualität der RNA zu bestätigen und die Menge der verwendeten RNA zu standardisieren, wurde aus der jeweils gleichen Probe  $\beta$ -Actin mRNA amplifiziert. Dies geschah unter Verwendung folgender Primer: 5'-ACCTTCACCCCA-CCATGTACG-3' und 5'-CTAATCCACATCTGCTGGAAGGTGG-3', die ein Produkt von 700 Basenpaaren lieferten. Zusätzlich wurden die PCR-Produkte nach 40 Zyklen elektrophoretisch auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid visuell nachgewiesen. Die PCR wurde mit Hilfe des SYBR Green PCR MasterMix nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 3.1.8. Sequenzierung

Die Sequenzierung der positiven Klone wurde mit dem ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit der Firma Perkin Elmer (Weiterstadt) durchgeführt. Die Sequenzierungszyklen wurden wie folgt ausgeführt: 10 s bei 96°C, 5 s bei 50°C und 4 min bei 60°C für 25 Zyklen. Anschließend wurden die Reaktionsprodukte mit Ethanol gefällt und das Pellet gewaschen. Die verwendeten Primer sind in Tab. 2 dargestellt.

Tab. 2: Auflistung der zur Sequenzierung verwendeten Primer

Sequenzprimer (5'→3')	für
GGGCTCTACACCATCACAGGGGG	C255A
GGAATGAGCATCCTCACCC	C345A, C351A, C355A, C361S
GCAGTCAGCCCAGAGTGGGC	C560A
CCCTCTTCACCAAGCCCATTCC	C608A

### **3.2. Expressionssystem COS-7 Zellen**

Die Zellkultur betreffenden Arbeiten sowie die Membranpräparation von COS-7 Zellen wurden mit freundlicher Unterstützung der Arbeitsgruppe Prof. E. Kinne durchgeführt.

#### **3.2.1. Zellaufzucht und Zellkultur**

Die COS-7 Zellen wurden in Kulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) in 10 ml Dulbecco's Modifiziertes Eagle's Medium (DMEM) unter Zusatz von 10 % Fötalem Kälberserum (FKS) und 1 % Glutamin bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> aufgezogen. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage. Alle 7 Tage wurden die Zellen von den Kulturgefäßen mit Trypsin-EDTA-Lösung (0,5 g Trypsin und 0,2 g EDTA pro Liter modifizierter Puck's Salzlösung) abgelöst und mit einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen / Kulturflasche weiter kultiviert. Wenn für Transportstudien transfiziert wurde, wurden sie mit einer Dichte von  $3 \times 10^5$  Zellen / Loch in 6-Loch-Platten ausgepflanzt. Im Falle einer Transfektion zur Membranpräparation wurden die Zellen in Petrischalen (10 cm Durchmesser) mit einer Dichte von  $2,1 \times 10^6$  Zellen / Petrischale ausgesät.

#### **3.2.2. Transfektion**

Die Transfektion der Zellen wurde mit dem Superfect Transfektionsreagenz, einem aktivierten Dendrimer-System der Firma Qiagen durchgeführt.

Dafür wurden die Zellen wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben am Vortag der Transfektion ausgepflanzt, so daß sie zu ca. 70 % konfluent waren. Für Petrischalen mit 10 cm Durchmesser wurden 10 µg Plasmid-DNA, 300 µl Opti-MEM und 60 µl Superfect gemischt und für 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für 6-Loch-Platten wurden pro Loch 2 µg Plasmid-DNA, 100 µl Opti-MEM und 15 µl Superfect gemischt und ebenfalls 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 3 ml bzw. 600 µl Kulturmedium hinzugefügt und dieser Transfektionsansatz auf die zuvor mit PBS (Phosphat-gepufferte Natriumchlorid-Lösung) gewaschenen Zellen gegeben. Nach einer dreistündigen Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde die Transfektion gestoppt, indem der Transfektionsansatz abgenommen und durch Kulturmedium ersetzt wurde. Die Zellen

wurden ausschließlich 48 Stunden nach der Transfektion sowohl für Transportstudien als auch für Membranpräparationen verwendet.

### **3.2.3. Bestimmung der Transfektionseffizienz**

Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers des  $\beta$ -Gal Färbekits.

Für diese Analysen wurden COS-7 Zellen unter den gleichen Bedingungen wie die mit dem zu untersuchenden Transporter transfizierten Zellen kultiviert und mit dem lacZ-Gen transfiziert. Mit Hilfe einer Enzymreaktion wurde die Expression des Genprodukts  $\beta$ -Galactosidase untersucht. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen 10 min bei Raumtemperatur mit einer Fixierlösung behandelt. Anschließend wurde die Färbelösung zugegeben und für 60 min bei 37°C inkubiert. Eine Blaufärbung wies auf  $\beta$ -Galactosidase exprimierende Zellen hin.

### **3.3. Untersuchungssystem CHO G6D3 Zellen**

CHO (Chinese Hamster Ovary) Zellen sind Eierstockzellen des chinesischen Hamsters. G6D3 bezeichnet eine Zelllinie, die stabil mit dem SGLT1-Plasmid transfiziert ist.

Die CHO G6D3 Zellen wurden in Kulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) in 10 ml Dulbecco's Modifiziertes Eagle's Medium (DMEM) unter Zusatz von 5 % Fötalem Kälberserum (FKS), 1 % Glutamin, 1 % Na-Pyruvat, 1 % NEAA, 0,1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol und 0,04 % G418-Sulfat bei 37°C und 7,5 % CO<sub>2</sub> aufgezogen. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage. Alle 7 Tage wurden die Zellen von den Kulturgefäßen mit Trypsin-EDTA-Lösung (0,5 g Trypsin und 0,2 g EDTA pro Liter modifizierter Puck's Salzlösung) abgelöst und mit einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen / Kulturflasche weiter kultiviert. Für die Transportstudien wurden  $3 \times 10^5$  Zellen / Loch in 6-Loch-Platten ausgepflanzt und 48 h nach der Aussaat verwendet.

### 3.4. Transportstudien

#### 3.4.1. Bestimmung der natriumabhängigen $\alpha$ -Methylglucoseaufnahme

Die bis zur Konfluenz in 6-Loch-Kulturplatten gezüchteten Zellen wurden eine Stunde vor Versuchsbeginn in Glucose-freiem Kulturmedium gehalten. Dadurch wurde die intrazelluläre Glucosekonzentration auf einen zu vernachlässigenden Wert reduziert, um die AMG-Aufnahme nicht entscheidend zu beeinflussen. Die Zellen wurden einmal mit Natrium-freiem Krebs-Ringer-HEPES-Puffer bei 37°C gewaschen. Anschließend wurde das Transportmedium (KRH-Na oder KRH-N-Methylglucamin) mit 0,02 mM AMG sowie 2  $\mu$ Ci/ml  $^{14}$ C-AMG hinzugegeben und 15 min bei 37°C inkubiert. Bei geringer Signalstärke wurde die Radioaktivität auf 10  $\mu$ Ci/ml erhöht und der daraus resultierende Anstieg der absoluten AMG-Konzentration bei der Auswertung berücksichtigt. In einigen Experimenten wurde 0,1 mM, 0,2 mM oder 0,6 mM AMG verwendet. Die AMG-Aufnahme wurde durch rasches Absaugen des Transportmediums und dreimaligem Waschen mit eiskalter Stop-Lösung beendet. Danach wurden die Zellen in 2 % SDS solubilisiert und Aliquots zur Zählung der Radioaktivität entnommen.

<b>KRH-Natrium:</b>	120 mM NaCl	<b>Stop-Lösung:</b>	KRH-Natrium
	4,7 mM KCl		0,5 mM Phlorizin
	2,2 mM CaCl <sub>2</sub>		60 mM N-Methylglucamin
	1,2 mM MgCl <sub>2</sub>		
	10 mM HEPES/Tris pH 7,4		

Natrium-freier KRH-Puffer (KRH-N-Methylglucamin) wurde durch Austausch von NaCl durch N-Methylglucamin hergestellt.

#### 3.4.2. Berechnung

Zur Ermittlung der Affinitätskonstanten anhand zweier Substrat- bzw. Inhibitorkonzentrationen wurde folgende Berechnung angestellt. Als Grundlage diente die Michaelis-Menten-Gleichung:

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S_0]}{K_m + [S_0]}$$

Nach Wahl zweier geeigneter Substratkonzentrationen  $S_1$  (0,1 mM) und  $S_2$  (3 mM) wurden die beiden resultierenden Gleichungen zueinander ins Verhältnis gesetzt:

$$\frac{V_1}{V_2} = \frac{\frac{V_{\max} \cdot [S_1]}{K_m + [S_1]}}{\frac{V_{\max} \cdot [S_2]}{K_m + [S_2]}}$$

und die resultierende Formel nach Kürzen von  $V_{\max}$ :

$$\frac{V_1}{V_2} = \frac{[S_1] \cdot ([S_2] + K_m)}{[S_2] \cdot ([S_1] + K_m)}$$

im weiteren Verlauf nach  $K_m$  aufgelöst:

$$\begin{aligned} V_1 \cdot ([S_2] \cdot [S_1] + [S_2] \cdot K_m) &= V_2 \cdot ([S_1] \cdot [S_2] + [S_1] \cdot K_m) \\ V_1 \cdot [S_2] \cdot [S_1] + V_1 \cdot [S_2] \cdot K_m &= V_2 \cdot [S_1] \cdot [S_2] + V_2 \cdot [S_1] \cdot K_m \\ V_1 \cdot [S_2] \cdot K_m - V_2 \cdot [S_1] \cdot K_m &= V_2 \cdot [S_1] \cdot [S_2] - V_1 \cdot [S_2] \cdot [S_1] \\ K_m &= \frac{V_2 \cdot [S_1] \cdot [S_2] - V_1 \cdot [S_2] \cdot [S_1]}{V_1 \cdot [S_2] - V_2 \cdot [S_1]} \\ K_m &= \frac{V_2 - V_1 \cdot ([S_1] \cdot [S_2])}{V_1 \cdot [S_2] - V_2 \cdot [S_1]} \end{aligned}$$

Im Falle der Berechnung des  $K_i$  wurde folgende Formel zugrundegelegt, die die Eigenschaft des Phlorizins als kompetitiven Inhibitor berücksichtigt:

$$V = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m}{[S]} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

Auch hier wurde mit zwei verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen  $I_1$  (0,5  $\mu$ M) und  $I_2$  (10  $\mu$ M) bei 0,1 mM AMG gearbeitet und die beiden Gleichungen wie oben zueinander ins Verhältnis gesetzt:

$$\frac{V_1}{V_2} = \frac{\frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m}{S} \cdot \left(1 + \frac{I_1}{K_i}\right)}}{\frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m}{S} \cdot \left(1 + \frac{I_2}{K_i}\right)}}$$



Nach Kürzen von  $V_{\max}$  erhält man folgende Formel:

$$\frac{V_1}{V_2} = \frac{1 + \frac{K_m}{S} \cdot \left(1 + \frac{I_2}{K_i}\right)}{1 + \frac{K_m}{S} \cdot \left(1 + \frac{I_1}{K_i}\right)}$$

die entsprechend nach  $K_i$  aufgelöst wird:

$$K_i = \frac{(S \cdot K_m) \cdot (V_2 \cdot I_2 - V_1 \cdot I_1)}{(S + K_m) \cdot (V_1 \cdot S - V_2 \cdot S)}$$

### 3.5. Statistik

Die aus den Transportstudien dargestellten Ergebnisse sind arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung vom Mittelwert (SD) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen, die jeweils als Doppel- oder Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Zum statistischen Vergleich der Versuchsergebnisse wurde der Studentent-Test angewendet, p-Werte von  $< 0,05$  (\*),  $< 0,01$  (\*\*) und  $< 0,005$  (\*\*\*) wurden zur Anzeige von signifikanten Unterschieden betrachtet.

### 3.6. Biochemische Arbeitsmethoden

#### 3.6.1. Membranpräparation

Die Membranpräparation orientierte sich an der Methode von Joost (Joost und Weber, 1989).

Die COS-7 Zellen wurden wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben in Petrischalen (PS) von 10 cm Durchmesser transfiziert. Für eine Membranpräparation waren 6 PS pro Transporter nötig. Nach 48 Stunden wurde das Kulturmedium abgezogen, die PS auf Eis gesetzt und je zweimal mit 5 ml Homogenisationspuffer gewaschen. Die Zellen wurden in je zweimal 4 ml desselben Puffers abgelöst und die Volumina vereinigt. Danach erfolgte eine Homogenisation per Hand mit Hilfe eines „tight-fitting“ Teflon Homogenisators. Die Zentrifugation erfolgte gemäß des unten aufgeführten Flußschemas (Abb. 6). Nachdem den einzelnen Fraktionen Aliquots zur

Proteinbestimmung entnommen wurden, wurden sie zur weiteren Verwendung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

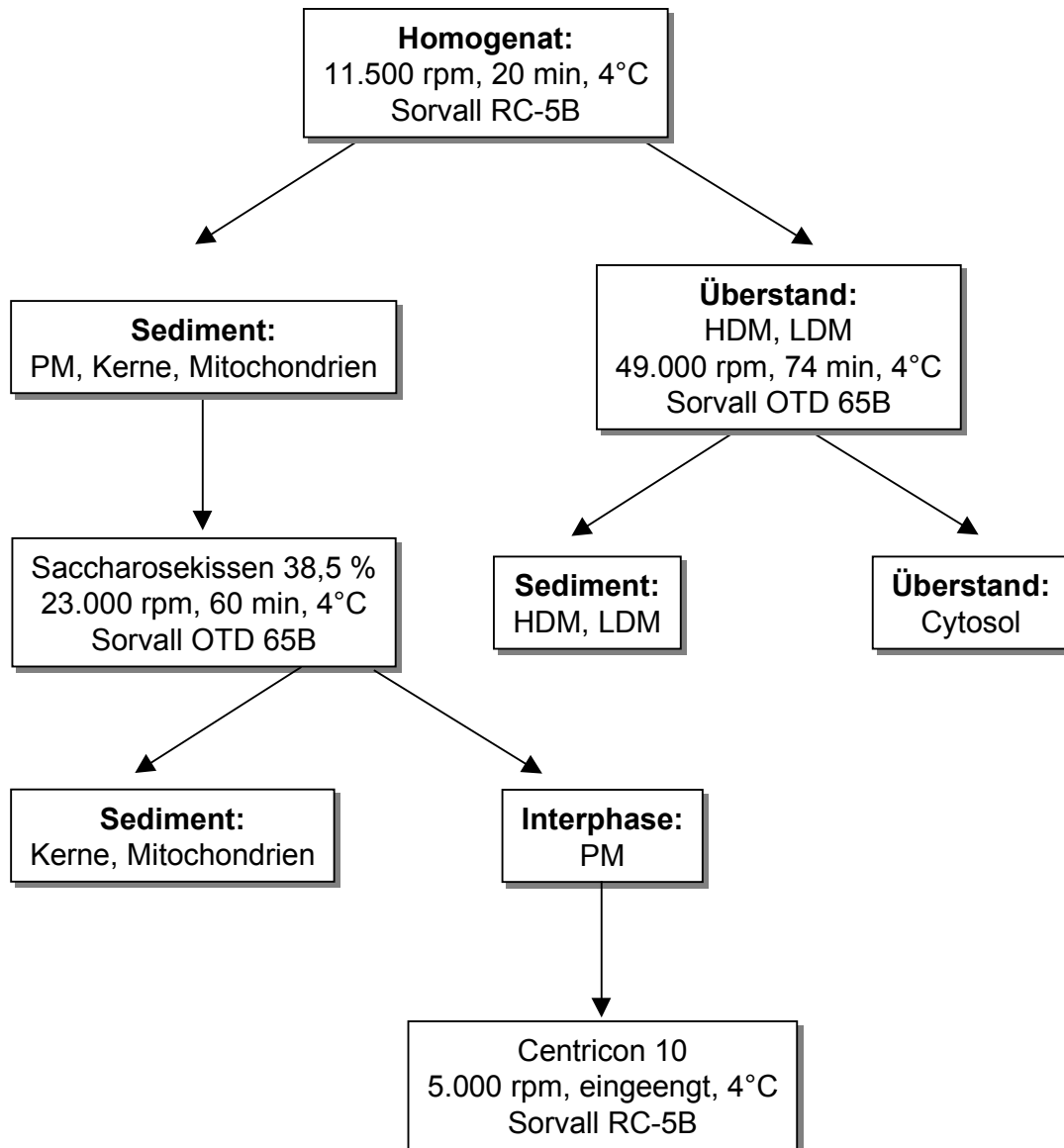


Abb. 6: Flußschema zur Zentrifugation des Zellhomogenats präpariert aus transfizierten COS-7 Zellen

HDM = mikrosomale Elemente mit hoher Dichte  
 LDM = mikrosomale Elemente mit niedriger Dichte  
 PM = Plasmamembranen

<b>Homogenisations-</b>		<b>„Saccharose-</b>	
<b>puffer:</b>	20 mM Hepes, pH 7,4	<b>kissen“:</b>	20 mM Hepes, pH 7,4
	1 mM EDTA		1 mM EDTA
	250 mM Saccharose		38,5 % Saccharose
	50 µg/ml PMSF		
	10 µg/ml Aprotinin		
	2 µg/ml Pepstatin		
	5 µg/ml Leupeptin		
	5 µg/ml Chymostatin		

### 3.6.2. Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte nach der Methode von Lowry (Lowry et al., 1951). In Abwandlung von der Originalvorschrift wurden die zu Transportstudien verwendeten Zellen nach Abstoppen des Transports eine halbe Stunde in 2 % SDS solubilisiert. Entsprechende Aliquots wurden mit Lowry-Reagenz versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl 1N Folin-Reagenz entstand eine Blaufärbung, die nach 30 min photometrisch bei 750 nm vermessen wurde.

Die nach der Membranpräparation in Homogenisationspuffer gelösten Proteine wurden mit 10 % Trichloressigsäure (TCA) gefällt, in 1 N NaOH gelöst und analog behandelt. Als Standard diente Rinderserumalbumin (BSA).

### 3.6.3. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die aus der Membranpräparation gewonnenen Fraktionen wurden mit Probenpuffer auf eine Konzentration von 0,5 mg / ml gebracht und bei 94°C 5 min denaturisiert. Nach Abkühlen wurden die Proben auf vorgefertigte 8-16 % Polyacrylamid-Gradientengele aufgetragen und in einer Elektrophoresekammer des EP-Systems (Schleicher & Schüll) in Lauffpuffer mit einer konstanten Stromstärke von 30 mA pro Gel entwickelt. Zur Kalibrierung der Proteinbanden diente ein vorgefärbter Molekulargewichtsstandard.

<b>Probenpuffer:</b>	10 mM Tris / HCl pH 6,5	<b>Laufpuffer:</b>	25 mM Tris pH 7,8-8,4
	2 % SDS		193 mM Glycin
	0,002 % Bromphenolblau		0,1 % SDS
	10 % Glycerol		
	5 % Mercaptoethanol		

#### 3.6.4. Western Blot

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit einem konstanten Strom von 180 mA in einer Blotkammer auf Nitrocellulose geblottet. Die dafür benötigten Membranen und Filterpapiere wurden zuvor in Transferpuffer equilibriert. Nach dem Blotten wurde der Blot mit TBS 200 mit 0,3 % Tween-20 und anschließend zweimal mit TBS 200 mit 0,05 % Tween-20 gewaschen. Dann folgte eine Inkubation mit Blockierungspuffer B1 bei 4°C über Nacht. Ebenfalls über Nacht wurde der primäre polyklonale Antikörper PAN 3-2 in der Konzentration 1:750 in B1 mit dem Antipeptid A606 (1:200) bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde dem Blot PAN 3-2 mit und ohne A606 in B1 für 40 min hinzugegeben. Vor Zugabe des zweiten Antikörpers wurde zweimal mit TBS 500 mit 0,05 % Tween-20 und einmal mit CBS 500 mit 0,05 % Tween-20 gewaschen und mit Blockierungspuffer B2 30 min inkubiert. Mit dem zweiten Antikörper, einem Anti-Schaf Immunglobulin-Myerrettichperoxidase-Konjugat, wurde in der Konzentration 1:2000 in B2 für 1 h inkubiert. Anschließend wurde der Blot zweimal mit CBS 500 mit 0,05 % Tween-20 und einmal mit TBS 500 mit 0,05 % Tween-20 gewaschen. Die Lösung zur Entwicklung der Chemilumineszenz wurde für 2 min zugegeben und danach ein ECL-Hyperfilm aufgelegt.

<b>Transferpuffer:</b>	12 mM Tris	<b>TBS 200:</b>	50 mM Tris / HCl pH 7,5
	96 mM Glycin		200 mM NaCl
	20 % Methanol		0,01 % Thimerosal
<b>CBS 500:</b>	500 mM NaCl	<b>TBS 500:</b>	20 mM Tris / HCl pH 7,5
	20 mM Citrat		500 mM NaCl
	HCl pH 5,5		0,01 % Thimerosal

**B1:**

TBS 200  
0,3 % Tween-20  
1 % BSA  
5 % Milchpulver

**B2:**

CBS 500  
0,05 % Tween-20  
1 % BSA  
5 % Milchpulver

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Konstruktion und Expression des mutierten SGLT1

#### 4.1.1. Substitution der Cysteine

Zur Einführung der Punktmutationen war es zunächst erforderlich zwei geeignete Oligonukleotide als Primer zu konzipieren. Bei diesem Verfahren zur gezielten Mutation ändert ausgehend von dem Plasmid pBluescript (Abb. 7) ein Primer, der sogenannte Selektionsprimer, eine unwesentliche Schnittstelle der Restriktions - Endonuklease Sca I (siehe Abb. 7) außerhalb des Gens in eine neue Schnittstelle für Mlu I. Der zweite Primer, der sogenannte mutagene Primer, trägt die gewünschte Sequenzänderung an einer einzigen Stelle.

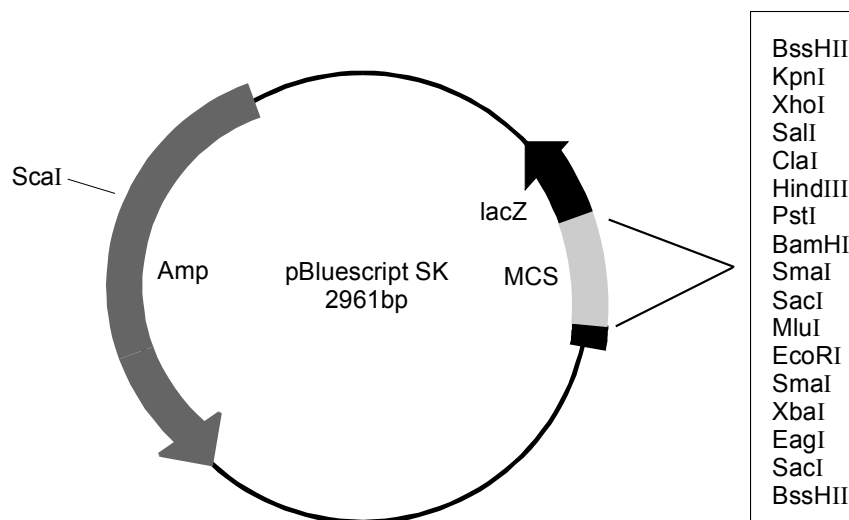


Abb. 7: Schematische Darstellung des Natrium/D-Glucose-Cotransporter-cDNA-Klons integriert über die Restriktionsschnittstellen XhoI/XbaI in das Plasmid pBluescript

Die multiple Klonierungsstelle (MCS) mit den zur Verfügung stehenden Restriktionsendonukleasen ist herausgestellt. Das Reportergen *lacZ* und das Resistenzgen für Ampicillin sind unterlegt.

Durch selektiven Restriktionsverdau mit ScaI und anschließender Transformation der DNA in E.coli erhielt man bevorzugt nur solche Plasmide, die die gewünschte Mutation tragen. Der Erfolg der Mutagenese wurde mittels einer DNA-Sequenzierung bestätigt.

#### 4.1.2. Expression der Mutanten in COS-7 Zellen

Für die transiente Expression des SGLT1 hat sich die COS-7 Zelllinie bewährt (Birnie et al., 1990). Dabei handelt es sich um eine Nierenzelllinie des Afrikanischen Grünaffens. Das Kürzel COS steht für CV1 Ori SV40, wobei SV 40 der gängigste Vektor zum Einschleusen fremder Gene in tierische Zellen ist (Gluzman, 1981). Als Expressionsvektor wurde der unten dargestellte pHook-2 gewählt (Abb. 8). Die veränderte DNA-Sequenz des Natrium/D-Glucose-Cotransporters wurde mit den Endonukleasen HindIII und XbaI aus dem Vektor pBluescript herausgeschnitten. Das Fragment wurde in den mit denselben Enzymen linearisierten Vektor pHook-2 integriert.

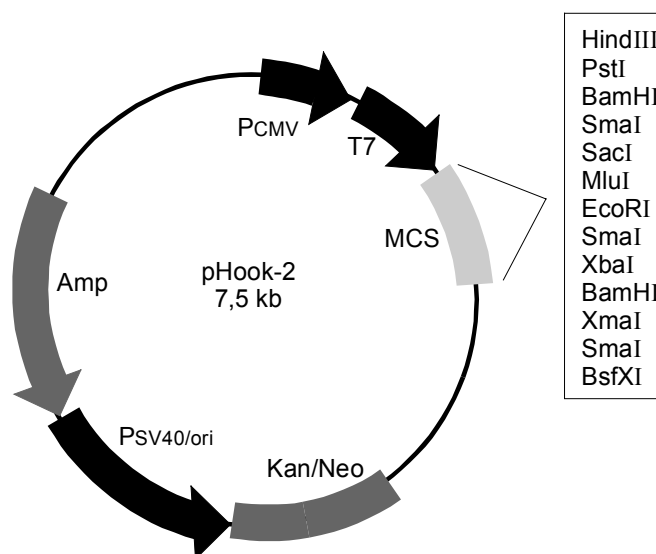


Abb. 8: Eukaryotischer Expressionsvektor pHook-2

In der schematischen Darstellung sind die Promotorelemente schwarz und die Resistenzgene grau unterlegt. Die multiple Klonierungsstelle ist hervorgehoben.

#### 4.1.3. Nachweis der Mutanten auf RNA-Ebene

Der Erfolg der transienten Expression der Mutanten und des Wildtyps konnte mit Hilfe der Quantitativen Real-Time PCR nachgewiesen werden. Dazu wurde die jeweilige RNA aus transfizierten COS-7 Zellen, die unter gleichen Bedingungen wie zu Transportzwecken herangezogen wurden, präpariert. Nach der PCR wurde mittels elektrophoretischer Auftrennung auf einem 1,2 %igem Agarose-Gel das Vorliegen spezifischer Produkte bestätigt (Abb. 9). Beispielhaft ist hier die Expression der Mutanten C560A und C608A dargestellt.

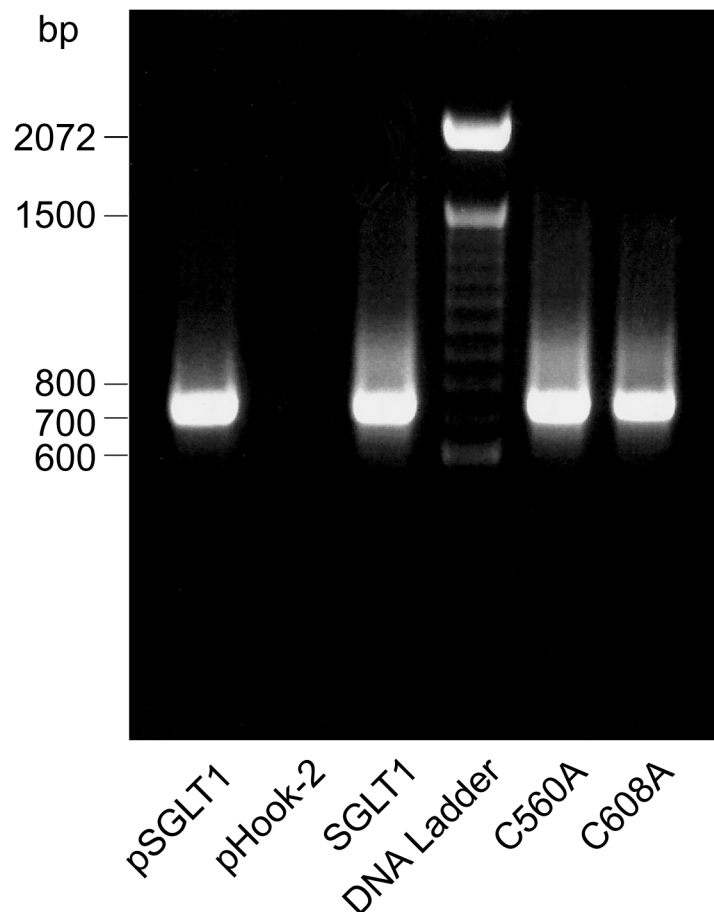


Abb. 9: Agarose-Gel der PCR-Produkte

Aus der Amplifikation mit SGLT1-spezifischen Primern resultierten Produkte mit einer Länge von 760 bp. Als Positiv-Kontrolle wurde das Plasmid des SGLT1 (pSGLT1) gewählt. RNA aus Zellen, die mit dem Leervektor pHook-2 transfiziert wurden, diente als



Negativ-Kontrolle (pHook-2) und ergab nach Amplifikation mit oben genannten Primern kein Signal. Die anderen Bahnen zeigen RNA bzw. cDNA aus Zellen, die entsprechend mit SGLT1 und den beiden Mutanten transfiziert wurden. Unspezifische Produkte konnten nicht detektiert werden.

#### 4.1.3.1. Quantifizierung der Transkription

Die in Abb. 10 dargestellte Quantifizierung wurde über  $\beta$ -Actin als endogene Kontrolle normalisiert. Dazu wurden Standardkurven sowohl für die endogene Referenz als auch für die Zielsequenz erstellt. Als Standards dienten exakte Verdünnungen der jeweiligen Gesamt-RNA Isolation. Dann wurden von diesen für die einzelnen Proben die Menge an Zielsequenz und endogener Referenz berechnet. Anschließend wurden die Zielsequenzwerte normalisiert, indem sie durch die Menge an endogener Referenz dividiert wurden. Das Probenmaterial des Wildtyps wiederum wurde als Kalibrator definiert, d.h. auf 1 gesetzt. Schließlich wurden die normalisierten Zielsequenzwerte noch durch den normalisierten Zielsequenzwert des Kalibrators dividiert, um so ein relatives Expressionsniveau auszudrücken.

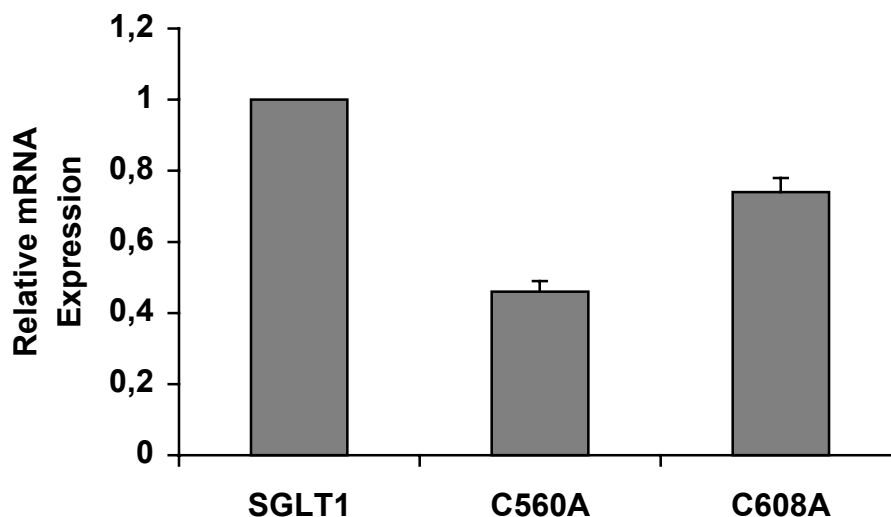


Abb. 10: *Relative Menge an exprimierter mRNA in transfizierten COS-7 Zellen*

Die Grafik zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SD aus 3 voneinander unabhängigen Zellpräparationen, wobei das Einzelexperiment als Sechsfachbestimmung durchgeführt wurde.

Die RNAs der drei verschiedenen Transporter wurden nach der Transfektion in einem Verhältnis von  $1 : 0,5 \pm 0,03 : 0,7 \pm 0,04$  in COS-7 Zellen exprimiert. Ob diese Unterschiede methodisch bedingt sind oder tatsächlich bestehen, muß in weiteren Versuchen geklärt werden.

#### 4.1.4. Nachweis der Mutanten auf Proteinebene

Zur Klärung der subzellulären Verteilung der mutierten Proteine wurden die transfizierten COS-7 Zellen nach der in Kapitel 3.6.1 beschriebenen Präparation in verschiedene Fraktionen aufgetrennt. Da primär von Interesse war, ob die Mutanten des SGLT1 zur Plasmamembran transloziert werden, wurde auch nur diese Fraktion untersucht.

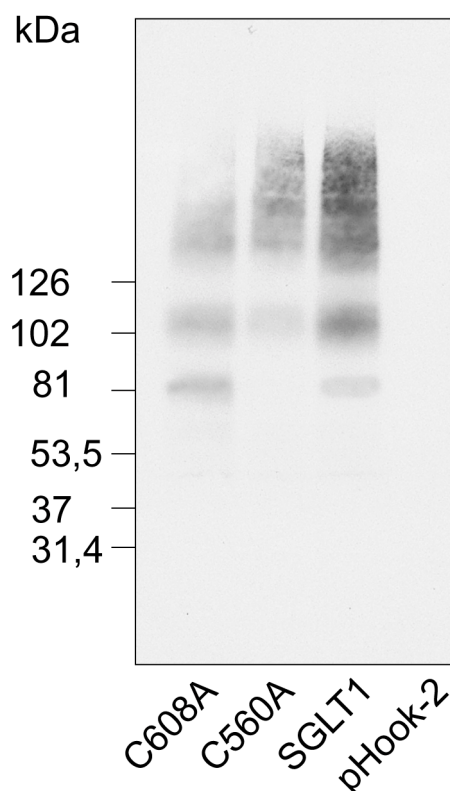


Abb. 11: Immunreaktion von transfizierten COS-7 Zellen mit dem polyklonalen Antikörper PAN-3

Nach Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE und Elektroblob resultierte der in Abb. 11 dargestellte Western-Blot. Demnach konnten alle drei Transporter in der Membran nachgewiesen werden. Die mit dem Leervektor pHook-2 transfizierten Zellen zeigten mit dem polyklonalen Antikörper PAN-3 eine negative Reaktion. Dieser Antikörper ist gegen ein Polypeptid im Bereich von Aminosäure 606 bis 630 in der C-terminalen extrazellulären Schleife des SGLT1 gerichtet. Sowohl die Banden im Bereich von 81 und 102 kDa als auch im hochmolekularen Bereich oberhalb von 126 kDa ließen sich nach Vorinkubation des Antikörpers mit dem entsprechenden Peptid vollständig verdrängen. Dies galt für alle drei Transporter und weist die Spezifität der Reaktion nach. Rein visuell könnte man sagen, daß die Färbung der Banden beim SGLT1 am stärksten ausgeprägt war, gefolgt von Mutante C608A. Die schwächste Intensität zeigte sich für C560A. Aufgrund der zahlreichen Aggregationen läßt sich die Expression der Proteine jedoch nicht eindeutig quantifizieren und es wurde auf die Analyse weiterer Mutanten verzichtet.

#### **4.2. Funktionelle Charakterisierung der SGLT1-Mutanten in der C-terminalen extrazellulären Schleife (S13)**

Bedingt durch vorangegangene Studien (Wielert-Badt, 1998), die Hinweise auf die Beteiligung C-terminal lokalisierter Cysteine an der Substratbindungstasche gaben, wurde zunächst die Bedeutung dieser SH-Gruppen in S13 (Abb. 5.) untersucht.

Die verschiedenen Parameter der Charakterisierung wurden im folgenden mit  $\alpha$ -Methylglucose (AMG) als Substrat des Natrium/D-Glucose-Cotransporters untersucht. Dieses Glucosid wird im Gegensatz zur Glucose nicht natriumunabhängig transportiert (Kimmich und Randles, 1981) und die beobachtete Aufnahme in die Zelle läßt direkte Rückschlüsse auf die Aktivität des SGLT1 zu.

##### **4.2.1. Bestimmung der Transportaktivität**

Zunächst wurden transient mit den beiden Mutanten in S13, bezeichnet als C560A und C608A, transfizierte COS-7 Zellen auf ihre Fähigkeit natriumabhängig AMG aufzunehmen untersucht. Dafür wurde nach der in Kapitel 3.4.1 beschriebenen Methode gearbeitet. Gleichzeitig wurde getestet, ob die für den SGLT1 typische Hemmbarkeit

durch den kompetitiven Inhibitor Phlorizin nach den Mutationen beeinflusst wurde. Wie Abb. 12 zeigt, änderte sich bedingt durch die Mutationen qualitativ weder die Natriumabhängigkeit noch die Phlorizinhemmbarkeit. Allerdings zeigte sich eine deutliche Reduktion der Transportaktivität. Für den SGLT1 wurde ein Wert von  $2,8 \pm 0,3$  nmol / mg Protein / 15 min ermittelt, während sich für Mutante C560A  $0,6 \pm 0,2$  nmol / mg Protein / 15 min und für Mutante C608A  $1,6 \pm 0,1$  nmol / mg Protein / 15 min ergab. Im Vergleich zum Wildtyp lag also die Transportaktivität für C560A bei 20 % und für C608A bei 54 %.

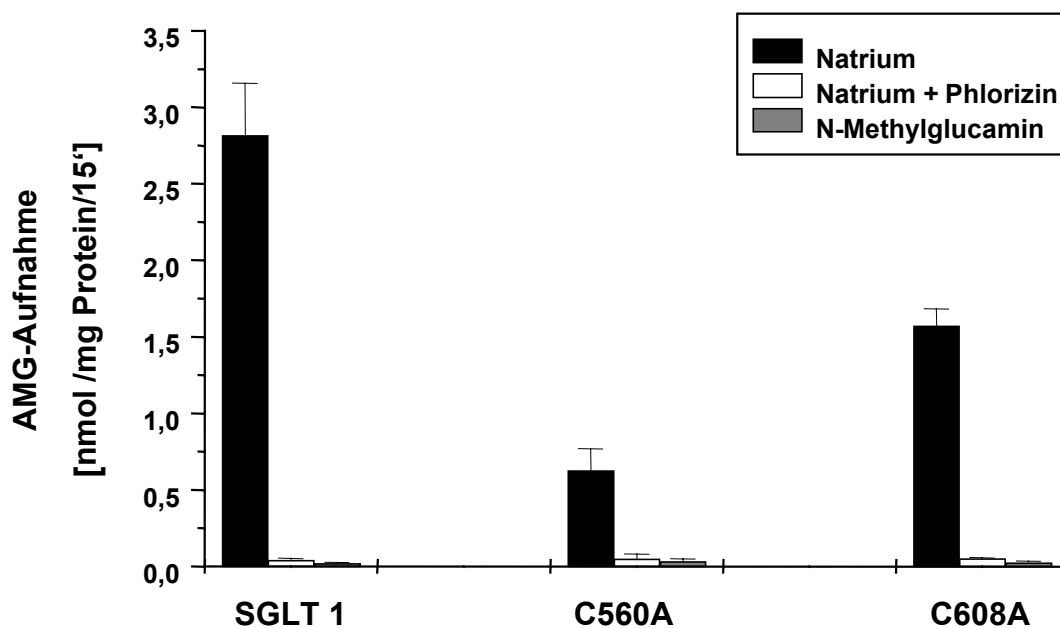


Abb. 12: Transportaktivität von COS-7 Zellen, die mit dem Wildtyp, C560A oder C608A transient transfiziert wurden

Das Transportmedium enthielt 0,02 mM AMG und 120 mM NaCl.

Die Phlorizinkonzentration betrug 0,5 mM.

In natriumfreien Medien wurde Natrium isoton durch N-Methylglucamin ersetzt.

Die Grafik zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SD von 4 Experimenten, wobei das Einzelexperiment als Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

#### 4.2.2. Bestimmung der Substrataffinitäten

Im folgenden stellte sich die Frage, ob die reduzierte Gesamttransportaktivität auch mit einer Veränderung der Affinitäten der Substrate einhergeht. Die dafür nötigen

kinetischen Untersuchungen wurden anhand von Transportstudien mit den in COS-7 Zellen exprimierten Proteinen durchgeführt.

#### 4.2.2.1. $\alpha$ -Methylglucose

Zur Ermittlung der Affinitäten für dieses Substrat wurde dem Transportmedium AMG in Konzentrationen von 0,2 bis 10 mM zugesetzt und die Natriumkonzentration konstant auf 120 mM gehalten. Zur graphischen Darstellung der Resultate wurde sowohl der Michaelis-Menten- (Michaelis und Menten, 1913) als auch der Lineweaver-Burk-Plot (Lineweaver und Burk, 1934) herangezogen. Bei der Michaelis-Menten-Gleichung:

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S_0]}{K_m + [S_0]}$$

entspricht  $V$  der bei der Substratkonzentration  $S_0$  gemessenen Aufnahme in die Zelle,  $V_{\max}$  der maximalen Aufnahme,  $K_m$  der scheinbaren Affinität des SGLT1 für AMG und  $S_0$  der Anfangskonzentration des Substrats. Nach dieser Formel erreicht die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Substratkonzentration, die dem Wert der Affinitätskonstanten entspricht, die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit. Die aus einer hyperbolen Geschwindigkeits / Konzentrationskurve über den Wert  $V_{\max}/2$  ermittelten  $K_m$ -Werte sind jedoch relativ ungenau, da die Asymptotenbildung bei einer Hyperbelfunktion, die aus experimentellen Meßdaten mit entsprechenden Fehlerschwankungen konstruiert werden muß, schwierig ist. Zum anderen läßt sich der  $K_m$ -Wert nach dieser Methode nur dann bestimmen, wenn die Maximalgeschwindigkeit meßbar ist, wenn also Bedingungen erfüllt sind, die Messungen im Substratsättigungsbereich ermöglichen. Wie Abb. 13, Abb. 14 und Abb. 15 zeigen, kann man rein graphisch gesehen in keinem der drei Fälle sicher eine Sättigung voraussetzen. Eine allgemein anwendbare Methode zur Bestimmung des  $K_m$ -Wertes ist die Methode nach Lineweaver und Burk. Hiernach wird die Michaelis-Menten-Gleichung wie folgt umgestellt und in der reziproken Form geschrieben:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S_0]}$$

Dieses Linearisierungsverfahren gestattet,  $K_m$ -Wert und Maximalgeschwindigkeit auch dann zu bestimmen, wenn keine Messungen im Substratsättigungsbereich vorliegen. Darüber hinaus erlaubt diese Methode, das Vorliegen einer hyperbolen V/S-Charakteristik zu überprüfen.

### Wildtyp

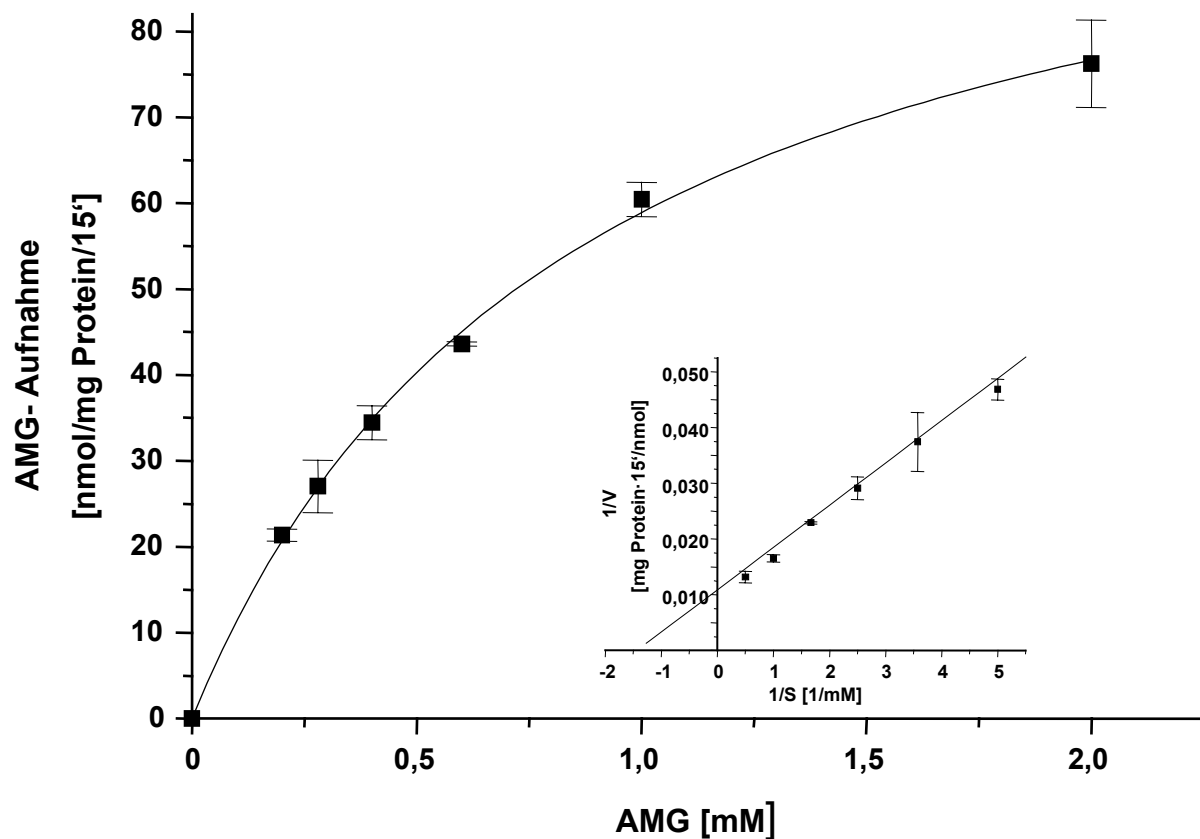


Abb. 13: Kinetik der AMG-Aufnahme von COS-7 Zellen, transfiziert mit SGLT1

Das Transportmedium enthielt AMG in Konzentrationen von 0,2 bis 2 mM. Jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert  $\pm$  SD aus drei Messungen eines repräsentativen Experiments aus  $n=3$ .

Im Insert ist die Darstellung nach Lineweaver und Burk gezeigt.

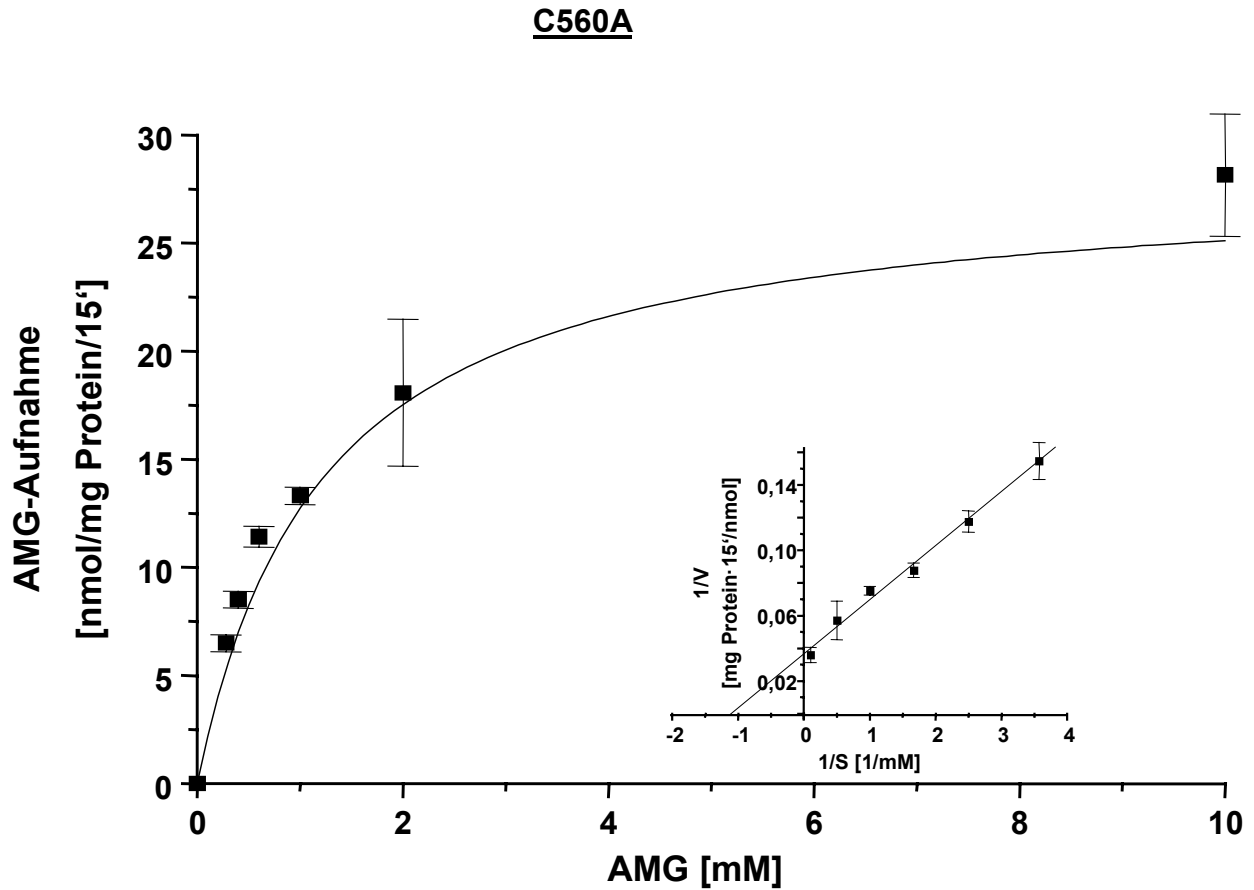


Abb. 14: Kinetik der AMG-Aufnahme von COS-7 Zellen, transfiziert mit C560A

Das Transportmedium enthielt AMG in Konzentrationen von 0,2 bis 10 mM. Jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert  $\pm$  SD aus drei Messungen eines repräsentativen Experiments aus  $n=3$ .

Im Insert ist die Darstellung nach Lineweaver und Burk gezeigt.

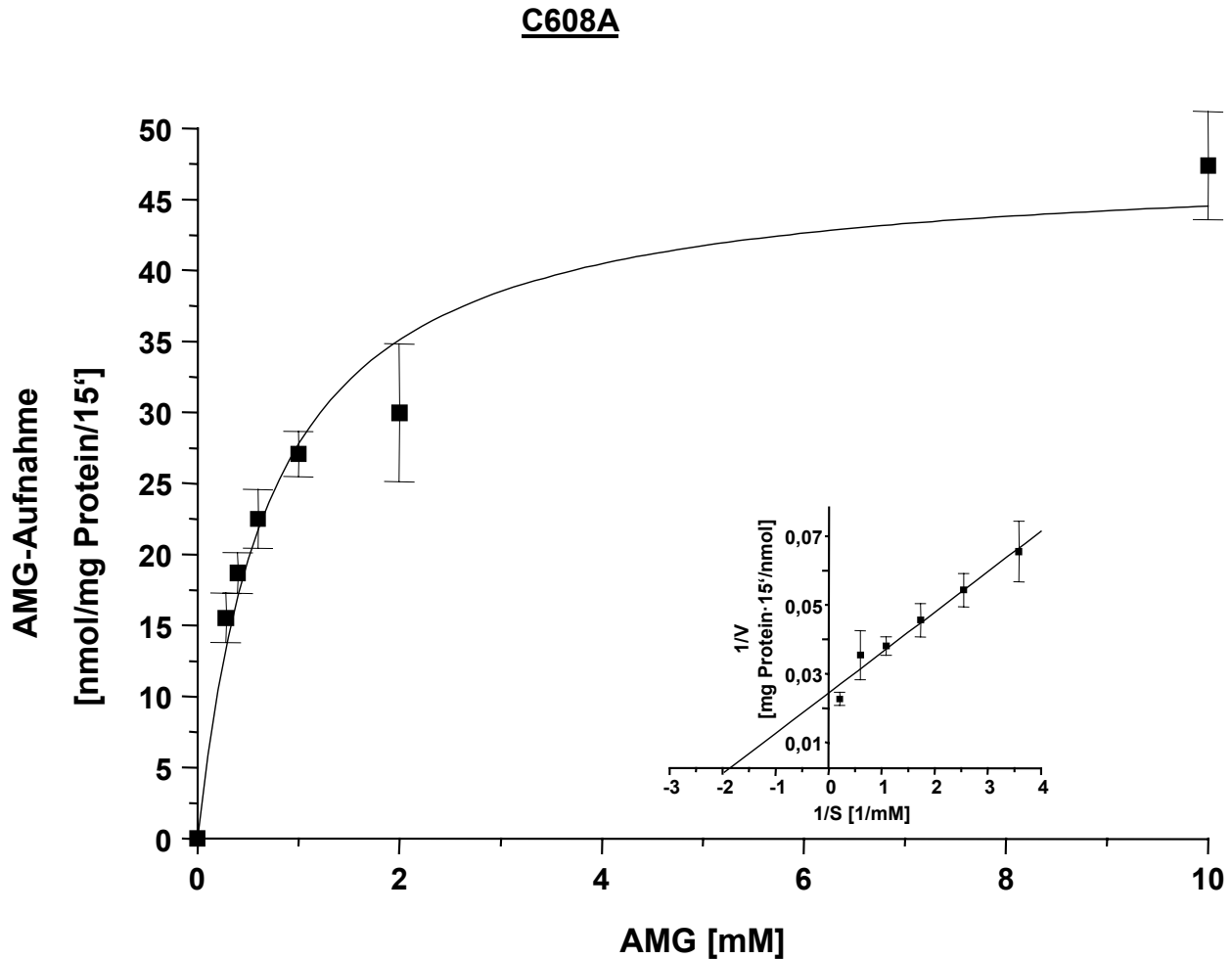


Abb. 15: Kinetik der AMG-Aufnahme von COS-7 Zellen, transfiziert mit C560A

Das Transportmedium enthielt AMG in Konzentrationen von 0,2 bis 10 mM. Jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert  $\pm$  SD aus drei Messungen eines repräsentativen Experiments aus  $n=3$ .

Im Insert ist die Darstellung nach Lineweaver und Burk gezeigt.

Die nach der Methode von Lineweaver und Burk ermittelten Affinitätskonstanten und Maximalgeschwindigkeiten des Wildtyps und der Mutanten sind in Tab. 3 aufgeführt. Im Verhältnis zum Wildtyp zeigten die beiden Mutanten keine bedeutende Veränderung in der Affinität des Substrats. Die maximalen Transportraten hingegen sanken analog der Transportaktivität bei 0,02 mM AMG, die in Abb. 12 dargestellt wurde. Demnach lag die maximale Transportrate der Mutante C560A bei 27 % und die der Mutante C608A bei 39 % vom Wildtyp.



Tab. 3: *Affinitäten der mutierten Transporter für AMG und die maximalen Aufnahmegeschwindigkeiten im Vergleich zum Wildtyp*

<b>Transporter</b>	<b>K<sub>m</sub> [mM]</b>	<b>V<sub>max</sub> [nmol mg Protein/15 min]</b>
SGLT1	1,0 ± 0,2	105,9 ± 3,5
C560A	0,8 ± 0,1	28,0 ± 3,7
C608A	0,7 ± 0,2	41,2 ± 10,1

Alle Werte sind Mittelwerte ± SD aus 3 Experimenten, wobei jedes Experiment als Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

#### 4.2.2.2. Natrium

Als nächster Parameter wurde die Affinität der mutierten Transporter für das zweite Substrat, Natrium, im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Dazu wurde dem Transportmedium Natrium in Konzentrationen von 0 bis 150 mM zugesetzt und die AMG-Konzentration konstant auf 0,6 mM gehalten. Abb. 16, Abb. 17 und Abb. 18 zeigen die graphische Auswertung dieser Messungen.

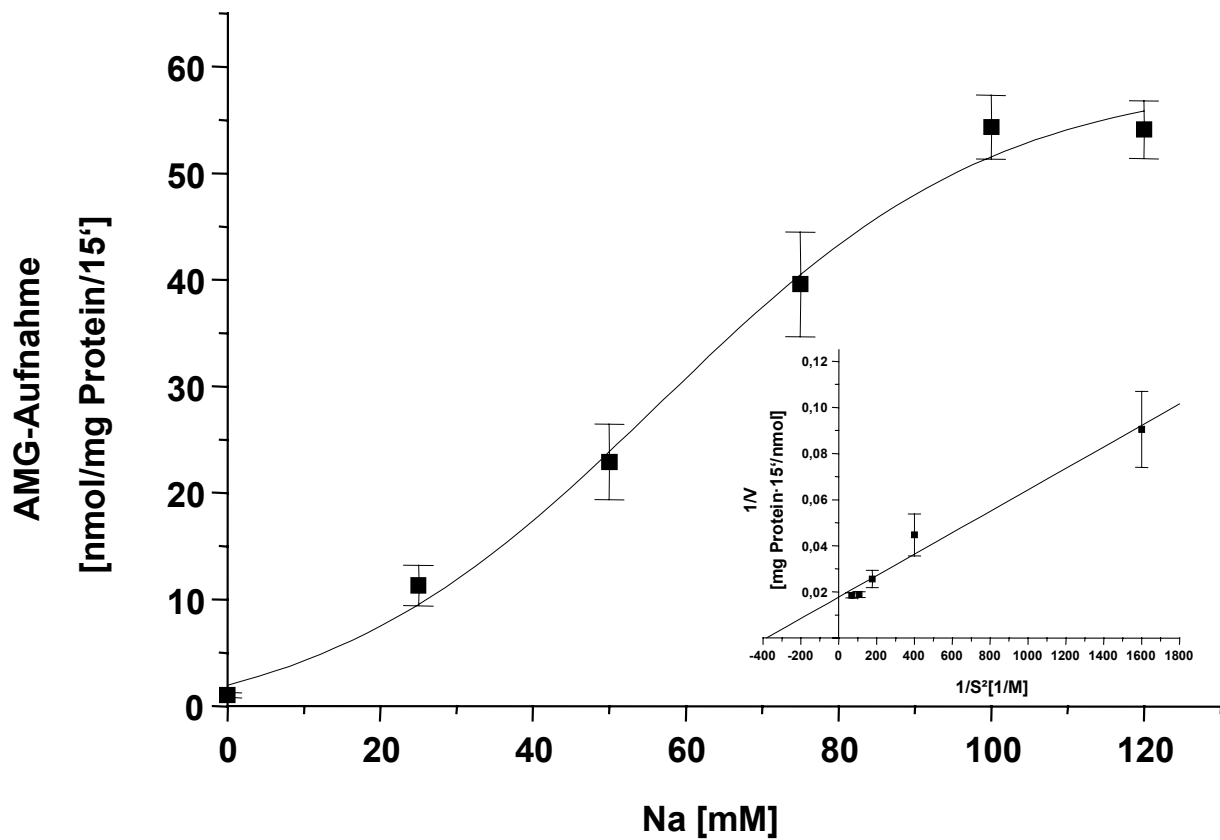
Wildtyp

Abb. 16: Kinetik der AMG-Aufnahme von mit SGLT1 transfizierten COS-7 Zellen in Abhängigkeit von Natrium

Das Transportmedium enthielt Natrium in Konzentrationen von 0 bis 120 mM. Natrium wurde isoton durch N-Methylglucamin ausgetauscht. Jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert  $\pm$  SD aus drei Messungen eines repräsentativen Experiments aus  $n=3$ .

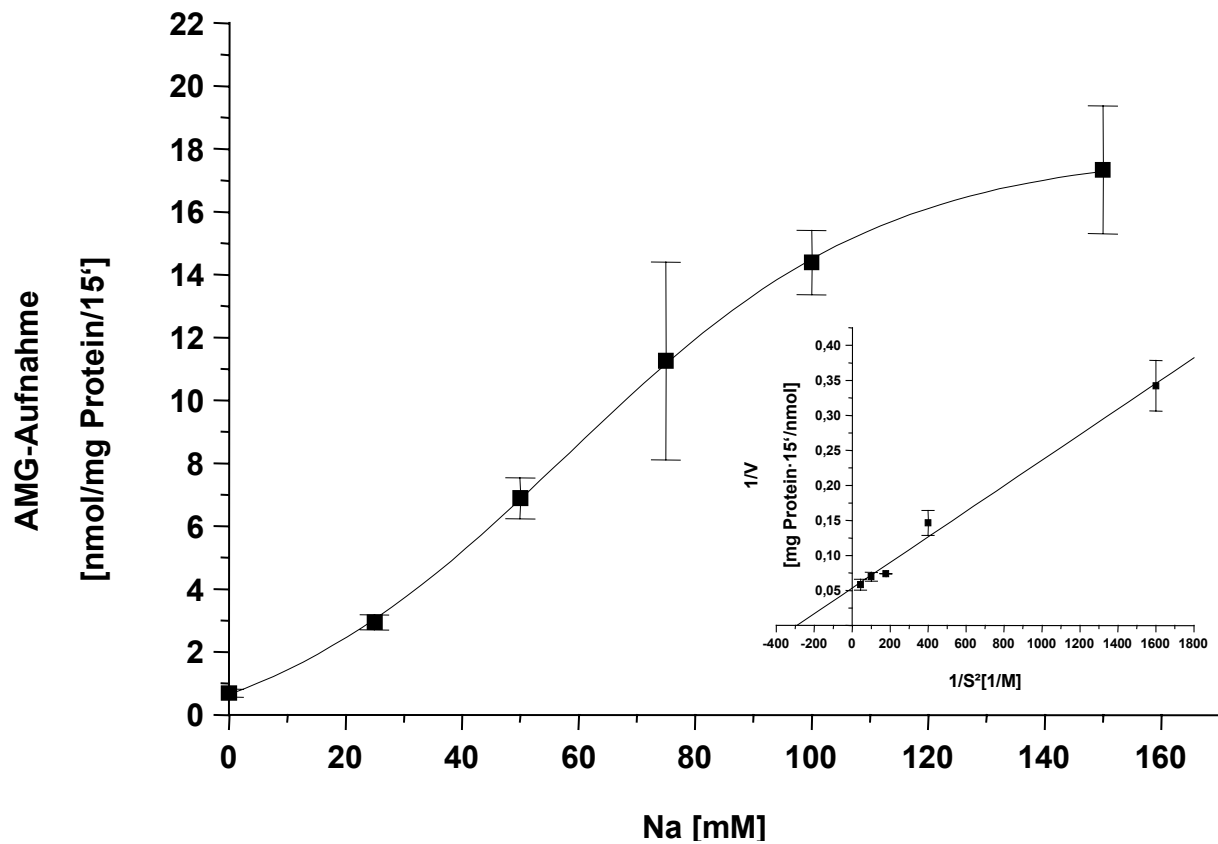
**C560A**

Abb. 17: Kinetik der AMG-Aufnahme von mit C560A transfizierten COS-7 Zellen in Abhängigkeit von Natrium

Das Transportmedium enthielt Natrium in Konzentrationen von 0 bis 150 mM. Natrium wurde isoton durch N-Methylglucamin ausgetauscht. Jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert  $\pm$  SD aus drei Messungen eines repräsentativen Experiments aus  $n=3$ .

## C608A

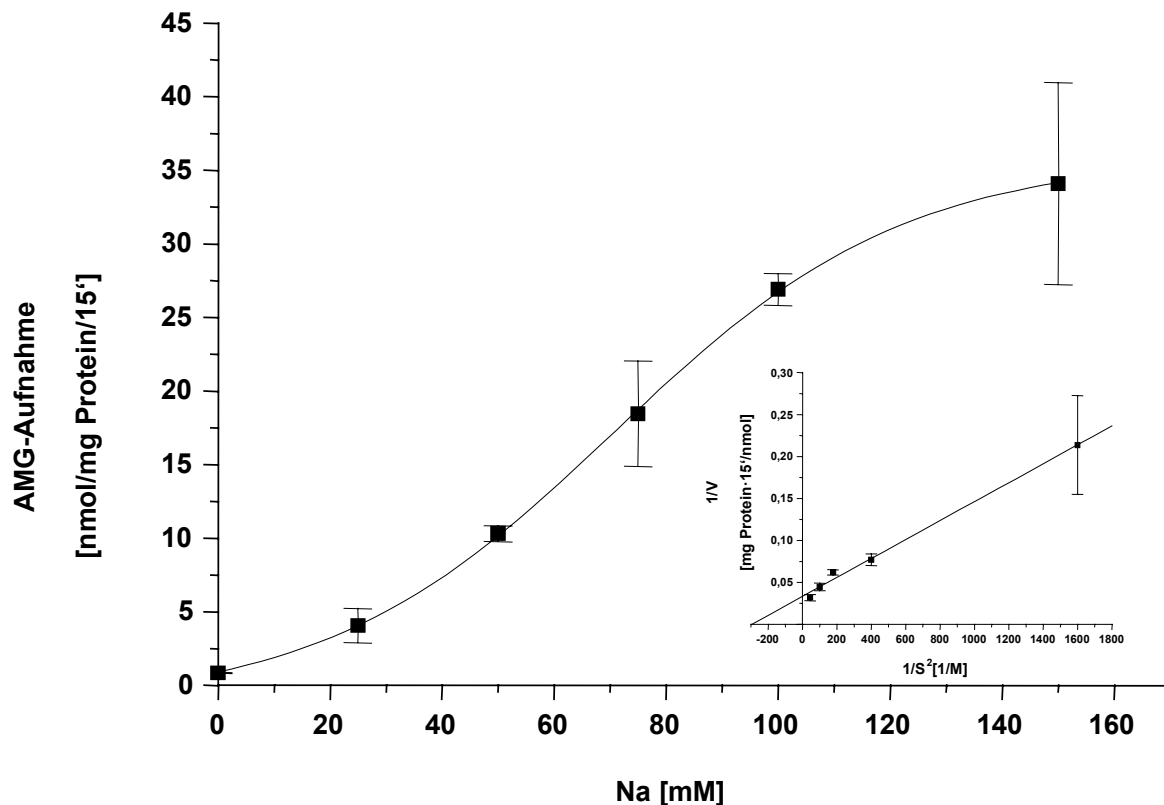


Abb. 18: Kinetik der AMG-Aufnahme von mit C608A transfizierten COS-7 Zellen in Abhängigkeit von Natrium

Das Transportmedium enthielt Natrium in Konzentrationen von 0 bis 150 mM. Natrium wurde isoton durch N-Methylglucamin ausgetauscht. Jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert  $\pm$  SD aus drei Messungen eines repräsentativen Experiments aus  $n=3$ .

In Tab. 4 sind die Affinitäten für Natrium und die in den hier durchgeführten Natriumsubstitutionsversuchen erhaltenen maximalen Aufnahmegeschwindigkeiten zusammengefaßt. Wie auch im Falle des anderen Substrats, der AMG, zeigte sich nach der Mutation keine bedeutende Veränderung der Natriumaffinität im Vergleich zum Wildtyp, für den ein  $K_m$  von  $44,1 \pm 3,4$  mM ermittelt wurde. Die maximalen Transportraten sanken wiederum analog der Transportaktivität.

Tab. 4: *Affinitäten der mutierten Transporter für Natrium und die maximalen Aufnahmegeschwindigkeiten im Vergleich zum Wildtyp*

<b>Transporter</b>	<b>K<sub>m</sub> [mM]</b>	<b>V<sub>max</sub> [nmol mg Protein/15 min]</b>
SGLT1	44,1 ± 3,4	57,9 ± 2,3
C560A	58,6 ± 3,1	18,3 ± 0,6
C608A	64,2 ± 6,4	31,6 ± 2,3

Alle Werte sind Mittelwerte ± SD aus n=3 Experimenten, wobei jedes Experiment als Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

Zur Ermittlung der Werte wurde eine modifizierte Auftragung nach Lineweaver und Burk verwendet ( $1/V$  gegen  $1/Na^2$ ), die den Hill Koeffizienten von 2 berücksichtigt (siehe unten).

#### 4.2.3. Bestimmung der Stöchiometrie

Als nächstes stellte sich die Frage in welchem Verhältnis zueinander die beiden Substrate vom mutierten Natrium/D-Glucose-Cotransporter transportiert werden. Die für den SGLT1 gültige Stöchiometrie von Natrium und D-Glucose entspricht 2:1. Die Ermittlung erfolgte graphisch nach Hill. Die dafür verwendeten V<sub>max</sub>-Werte wurden nach Lineweaver und Burk ermittelt und sind in Tab. 4 dargestellt.

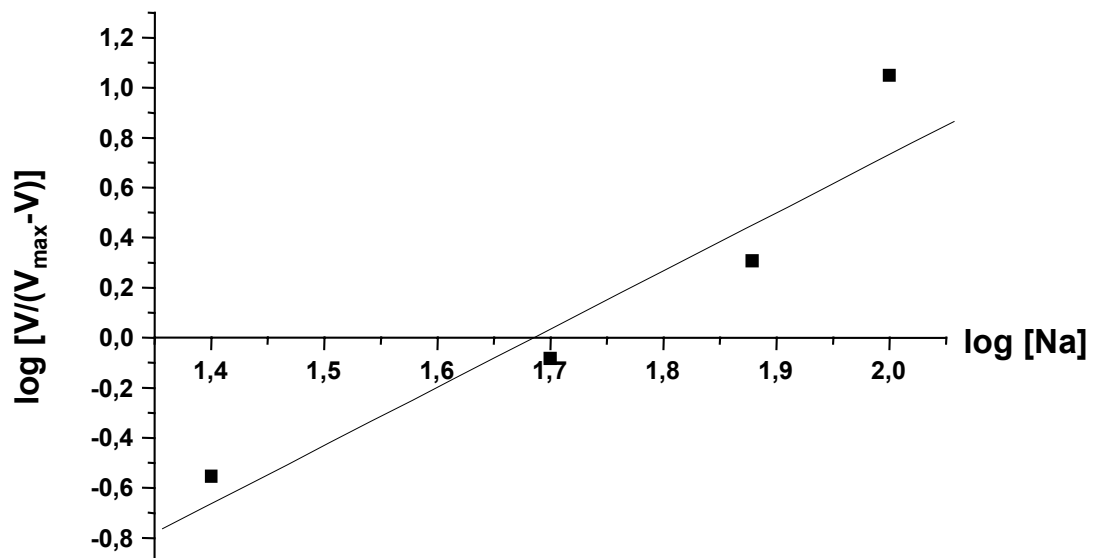
**Wildtyp**

Abb. 19: *Hill-Plot für die Natriumabhängigkeit der AMG-Aufnahme*  
Die Werte zeigen Mittelwerte eines repräsentativen Experiments aus  $n=3$ .

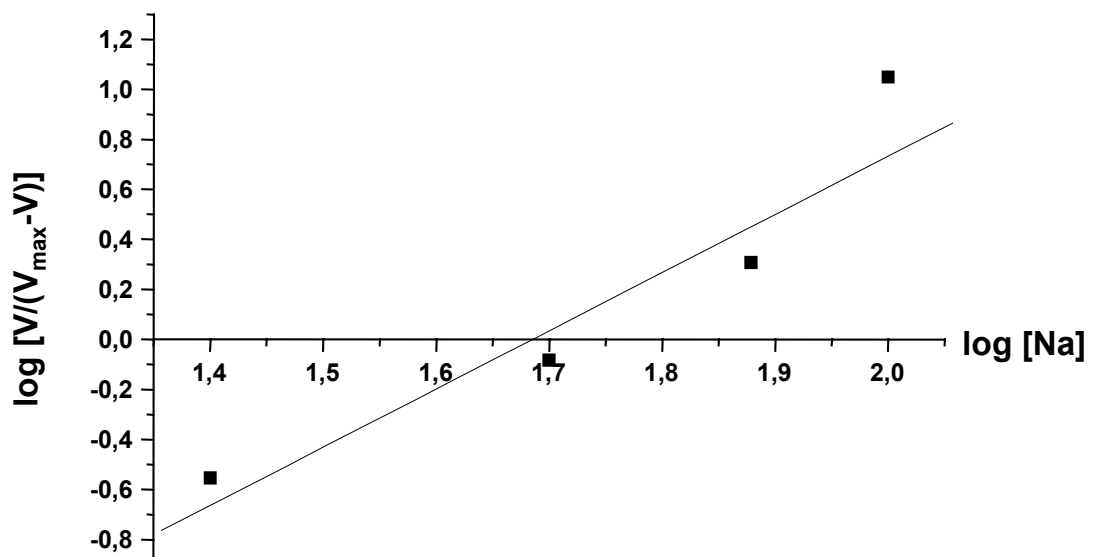
**C560A**

Abb. 20: *Hill-Plot für die Natriumabhängigkeit der AMG-Aufnahme*  
Die Werte zeigen Mittelwerte eines repräsentativen Experiments aus  $n=3$ .

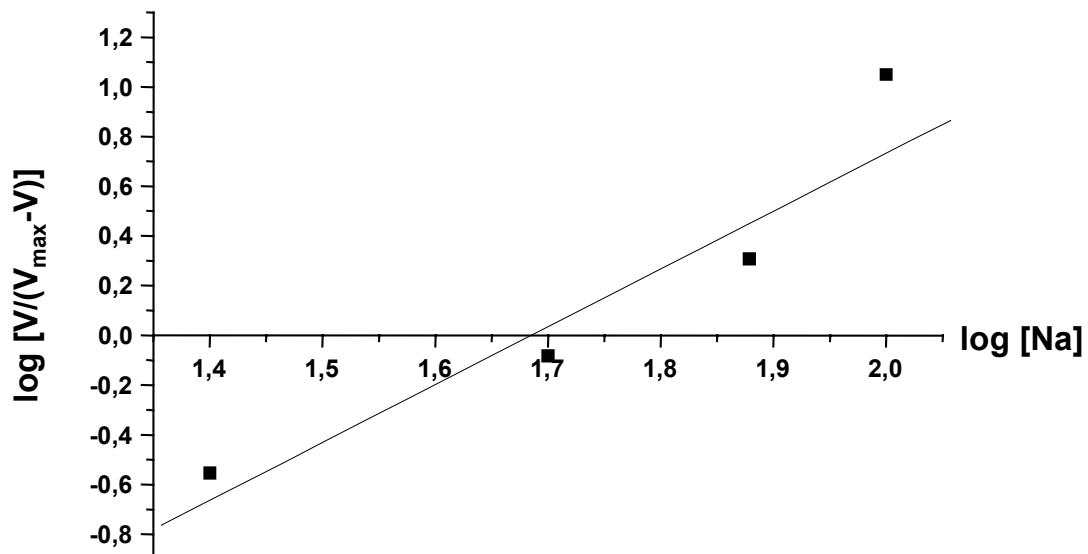
**C608A**

Abb. 21: Hill-Plot für die Natriumabhängigkeit der AMG-Aufnahme

Die Werte zeigen Mittelwerte eines repräsentativen Experiments aus n=3.

Aus den oben gezeigten Grafiken wurde jeweils die Steigung der Geraden ermittelt. Diese sogenannten Hill Koeffizienten (Tab. 5) geben Auskunft über die Anzahl der transportierten Moleküle. In allen drei Fällen lag der Wert bei ca. 2, so daß sich eine Stöchiometrie von 2 Natrium : 1 AMG ergab.

Tab. 5: Hill Koeffizienten für Natrium der mutierten Transporter im Vergleich zum Wildtyp

Transporter	Hill Koeffizient
SGLT1	2,2 ± 0,2
C560A	2,0 ± 0,4
C608A	2,0 ± 0,4

Alle Werte sind Mittelwerte ± SD aus 3 Experimenten, wobei jedes Experiment als Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

#### 4.2.4. Bestimmung der Affinität für Phlorizin

Ein weiteres Charakteristikum des SGLT1 ist seine Hemmbarkeit durch Phlorizin. Anhand weiterer Transportstudien an transfizierten COS-7 Zellen wurde im folgenden getestet, ob die Mutationen diese Eigenschaft beeinflusst. Wie die Abb. 22, Abb. 23 und Abb. 24 zeigen wurde die Hemmung bei zwei verschiedenen AMG- und vier Phlorizinkonzentrationen gemessen und die Affinitätskonstante graphisch nach Dixon ermittelt.

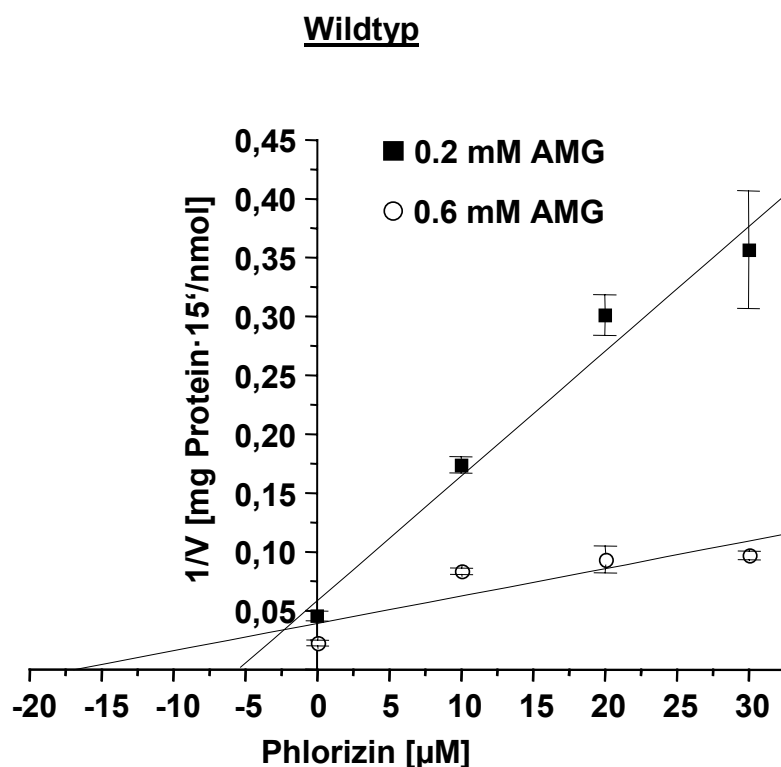


Abb. 22: Dixon-Plot der natriumabhängigen AMG-Aufnahme von mit dem Wildtyp transfizierten COS-7 Zellen zur Bestimmung der Affinitätskonstanten für Phlorizin

Das Transportmedium enthielt Phlorizin in den Konzentrationen von 0, 10, 20 und 30  $\mu\text{M}$ . Jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert aus drei Messungen eines repräsentativen Experiments aus 3 Experimenten.



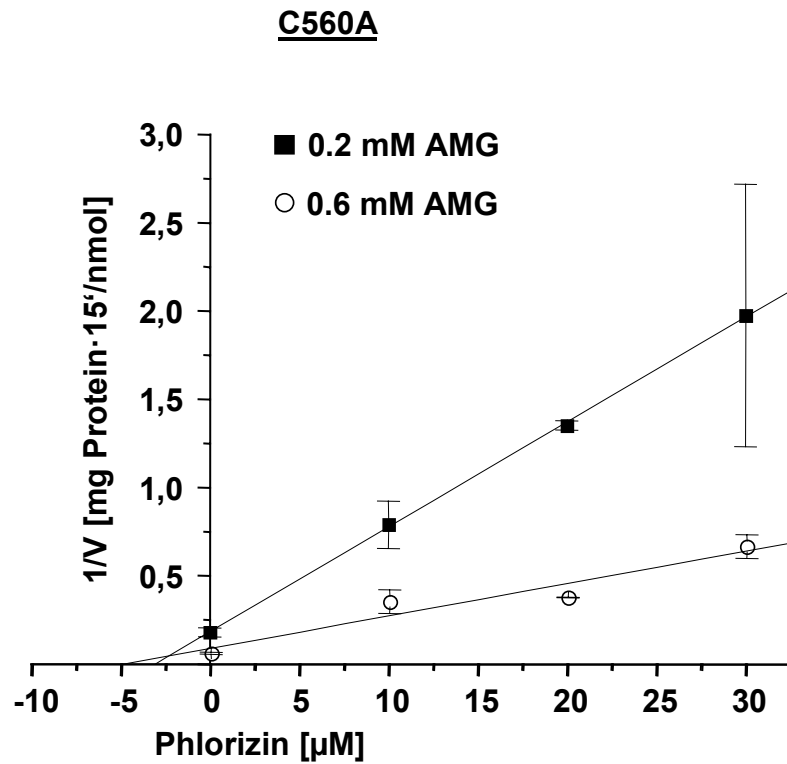


Abb. 23: Dixon-Plot der natriumabhängigen AMG-Aufnahme von mit C560A transfizierten COS-7 Zellen zur Bestimmung der Affinitätskonstanten für Phlorizin

Das Transportmedium enthielt Phlorizin in den Konzentrationen von 0, 10, 20 und 30  $\mu\text{M}$ . Jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert aus drei Messungen eines repräsentativen Experiments aus 3 Experimenten.

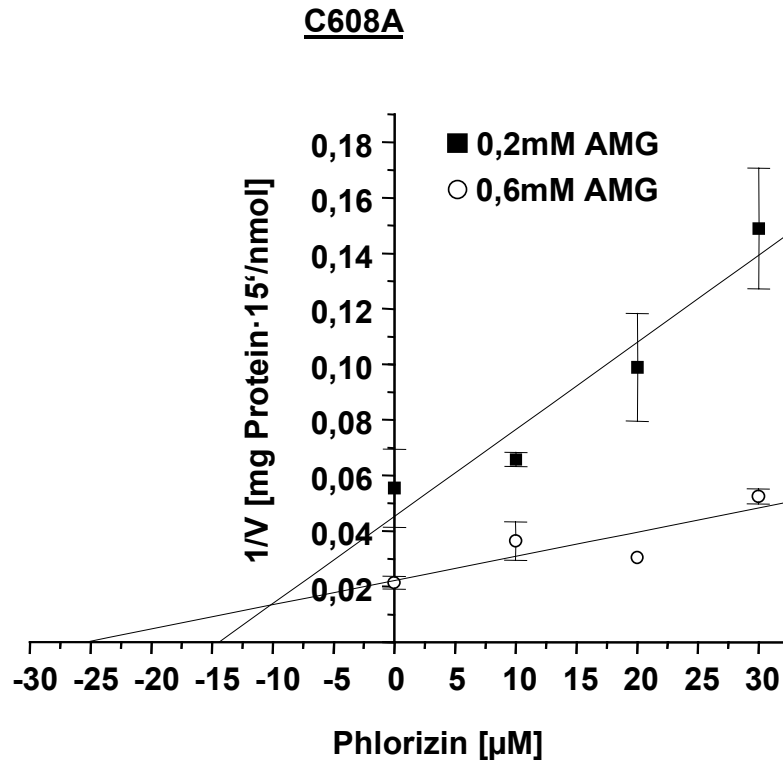


Abb. 24: Dixon-Plot der natriumabhängigen AMG-Aufnahme von mit C608A transfizierten COS-7 Zellen unter der Hemmung von Phlorizin

Das Transportmedium enthielt Phlorizin in Konzentrationen von 0, 10, 20 und 30  $\mu\text{M}$ . Jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert aus drei Messungen eines repräsentativen Experiments aus 3 Experimenten.

Somit ergab sich für den SGLT1 ein  $K_i$  von  $1,5 \pm 0,9 \mu\text{M}$ , für C560A von  $2,5 \pm 0,7 \mu\text{M}$ , während die Mutante C608A mit einem Wert von  $10,2 \pm 2,5 \mu\text{M}$  eine deutlich geringere Affinität für Phlorizin besaß (Tab. 6). Dies wurde ersichtlich an dem weiter in den negativen Bereich verschobenen Schnittpunkt der Geraden. Wie in Kapitel 4.2.2.1 ermittelt, änderte sich die Affinität für AMG jedoch nicht. Dieses Ergebnis kann darauf hinweisen, daß die Region um Cystein 608 im SGLT1 für die Bindung des Aglukons (siehe Strukturformel Abb. 3) des Phlorizinmoleküls verantwortlich ist.

Tab. 6: *Inhibitionskonstanten der mutierten Transporter für Phlorizin im Vergleich zum Wildtyp*

Transporter	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]
SGLT1	$1,5 \pm 0,9$
C560A	$2,5 \pm 0,7$
C608A	$10,2 \pm 2,5, p < 0,01$

Alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD aus 3 Experimenten, wobei jedes Experiment als Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.  
Die Angabe der Signifikanz basiert auf Vergleich zum SGLT1.

#### 4.2.5. Bestimmung der Hemmwirkung von Arbutin

Wie in Kapitel 4.2.4 dargestellt, führte die Mutation des Cysteins in Position 608 zu einer deutlich verringerten Affinität für Phlorizin, während sich die Affinität für AMG nicht veränderte. Dies ließ den Schluß zu, daß diese Region für die Aglukonbindung, jedoch nicht für die Bindung des Zuckers verantwortlich ist.

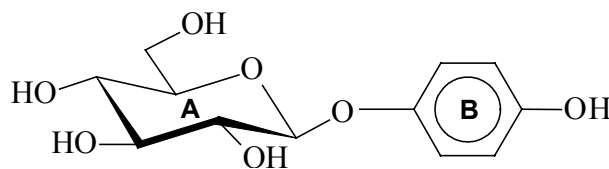


Abb. 25: *Strukturformel von Arbutin mit Bezeichnung der Partialstrukturen*

Im Arbutin (Abb. 25) fehlt im Vergleich zum Phlorizin (Abb. 3) Ring C. In Ring B stehen die Hydroxyl-Gruppen in para-Stellung zum Glykosid und nicht in meta-Stellung wie es im Phlorizin der Fall ist. Untersuchungen mit dieser Substanz könnten weitere Hinweise auf die Bindung des Aglukons geben. Zunächst wurde die Hemmwirkung von Arbutin in einer Konzentration von 0,2 mM auf die zu untersuchenden Transporter getestet. Wie in Abb. 26 ersichtlich, lagen keine statistisch signifikanten Unterschiede vor. Der Wildtyp zeigte eine Reduktion der Transportaktivität auf  $82,1 \pm 3,9 \%$ , während die Mutante C560A auf  $82,1 \pm 3,7 \%$  und C608 auf  $74,0 \pm 4,7 \%$  gehemmt wurde.

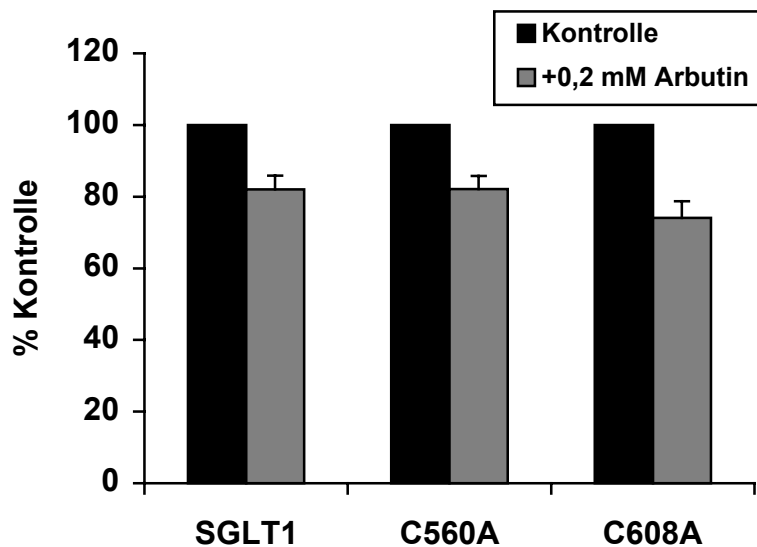


Abb. 26: *Einfluß von Arbutin auf COS-7 Zellen, transfiziert mit SGLT1, C560A oder C608A*

Das Transportmedium enthielt 0,02 mM AMG und 120 mM Natrium.

Alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD aus 3 Experimenten, wobei jedes Experiment als Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

Die Kontrolle betrug für den SGLT1  $1,4 \pm 0,1$ , für C560A  $0,5 \pm 0,1$  und für C608A  $0,8 \pm 0,1$  nmol / mg Protein / 15 min.

#### 4.2.5.1. Bestimmung der Affinität für Arbutin

Im folgenden wurde die Inhibitionskonstante für Arbutin bestimmt. Dabei ergaben sich ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede. Wie in Tab. 7 gezeigt, lag der  $K_i$ -Wert für den Wildtyp bei  $1,0 \pm 0,1$  mM, während er nach Substitution des Cysteins in Position 560  $1,5 \pm 0,2$  mM und bei der Mutante C608A  $1,0 \pm 0,2$  mM betrug.

Tab. 7: *Affinitäten für Arbutin*

<b>Transporter</b>	<b>K<sub>i</sub> [mM]</b>
SGLT1	1,0 ± 0,1
C560A	1,5 ± 0,2
C608A	1,0 ± 0,2

Die Affinitäten wurden nach der in Kapitel 3.4.2 beschriebenen Methode ermittelt. Das Transportmedium enthielt 0,2 mM und 2 mM Arbutin. Alle Werte sind Mittelwerte ± SD aus 3 Experimenten, wobei jedes Experiment als Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Cysteinmutanten in S13 bei verringerter Transportaktivität in gleichem Maß wie der Wildtyp in der Plasmamembran exprimiert werden. Die Substrataffinitäten ändern sich nicht. Die im Falle von C608A deutlich erhöhte Inhibitionskonstante für Phlorizin gibt allerdings einen Hinweis auf die Beteiligung dieser Region an der Substratbindungstasche des SGLT1. Eine mögliche Aglukonbindung des Phlorizinmoleküls läßt den Schluß zu, daß dieser Teil der Schleife S13 in der Nähe der Bindungsdomäne für den Zucker liegt.

### 4.3. Erreichbarkeit von C560 und C608 für SH-Gruppenreagenzien

In diesem Kapitel sollte die Zugänglichkeit der Cysteine durch spezifische SH-Reagenzien, die unterschiedliche Permeabilitäten durch die Zellmembran besitzen, untersucht werden. Die hier zum Einsatz gekommenen Substanzen waren zum einen NEM (membranpermeierend) und zum anderen zwei Stoffe aus der Gruppe der sogenannten MTS-Reagenzien. Dabei handelte es sich um Derivate von Methanthiosulfonaten. Gemäß Abb. 27 reagieren die MTS-Reagenzien mit einer freien SH-Gruppe unter Abspaltung einer Sulfinsäure zu einem Disulfid.

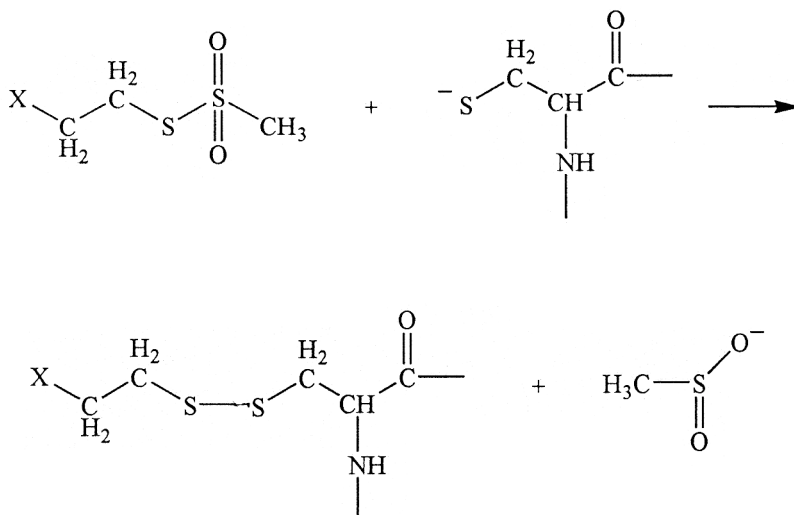


Abb. 27: Reaktion von Methanthiosulfonaten mit Cystein-Resten

MTSET: X =  $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$

MTSES: X =  $-\text{SO}_3^-$

Dieser Vorgang ist unter dem Einfluß von Thiolen, wie z.B.  $\beta$ -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) reversibel. Von diesen Substanzen ist bekannt, daß sie nicht durch die Plasmamembran in die Zellen eindringen. Die Reaktion von NEM (Abb. 28 ) ist in der nächsten Abbildung gezeigt.

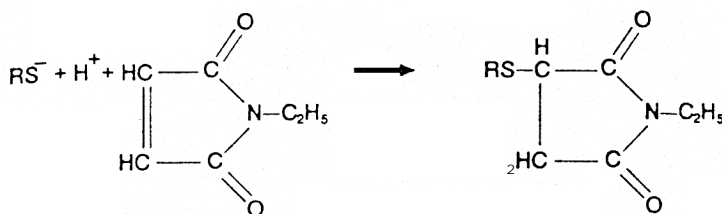


Abb. 28: Reaktion von N-Ethylmaleinimid mit Sulfhydrylgruppen

#### 4.3.1. Allgemeine Hemmstudien

Zur Kontrolle, inwiefern verschiedene SH-Reagenzien auf den Natrium/D-Glucose-Cotransporter wirken, wurden zunächst einige Reagenzien unter bestimmten Bedingungen an einer Zell-Linie getestet, die stabil mit dem SGLT1 transfiziert war

(Abb. 29). Nach einer 30minütigen Vorinkubation mit NEM ergab sich eine Hemmung der AMG-Aufnahme von  $79,6 \pm 4,4$  %, während eine 12minütige Vorinkubation mit MTSET bzw. MTSES in einer Reduktion von  $26,3 \pm 0,4$  % bzw.  $12,1 \pm 4,5$  % resultierte. Demzufolge wurde für die Studien an WT und den in COS-7 Zellen transfizierten Mutanten eine 12minütigen Vorinkubation mit MTSET gewählt.

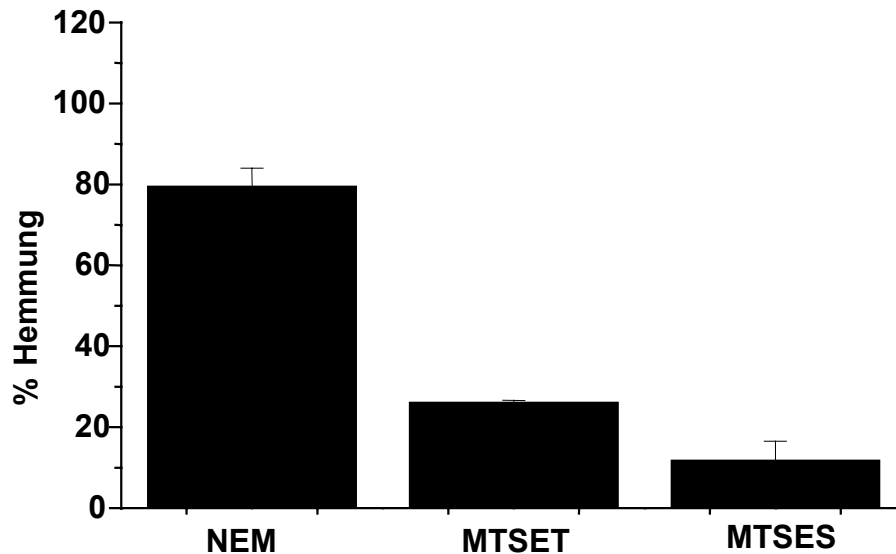


Abb. 29: Hemmstudien mit SH-Reagenzien an stabil mit SGLT1 transfizierten CHO G6D3 Zellen

Die Zellen wurden mit 1 mM NEM, MTSET und MTSES für 30 bzw. 12 min vorinkubiert. Die gleichen Konzentrationen an Inhibitoren befanden sich im Transportmedium.

Das Transportmedium enthielt 0,02 mM AMG und 120 mM Natrium.

Alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD aus 3 Experimenten, wobei jedes Experiment als Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

#### 4.3.2. Hemmstudien mit MTSET an transfizierten COS-7 Zellen

In Abb. 30 sind die Ergebnisse zusammengefaßt, die nach Inkubation der Zellen mit 1 mM MTSET erhalten wurden. Die AMG-Aufnahme von mit dem WT transfizierten COS-7 Zellen wurde durch MTSET auf  $49,2 \pm 12,1$  % der Kontrolle reduziert. Nach Substitution des Cysteins in Position 560 war diese Hemmung vollständig aufgehoben, während C608A die gleiche Reduktion wie der Wildtyp zeigte. Die hier beobachtete

fehlende Hemmung des Natrium/D-Glucose-Cotransporter bei Ersatz des Cysteins in Position 560 identifiziert diese Aminosäure als diejenige, an die MTSET bindet. Zusätzlich lieferte dieser Befund einen deutlichen Hinweis auf die extrazelluläre Lokalisation der C-terminalen Schleife S13, da MTSET nur mit an Oberflächen gelegenen SH-Gruppen reagiert.

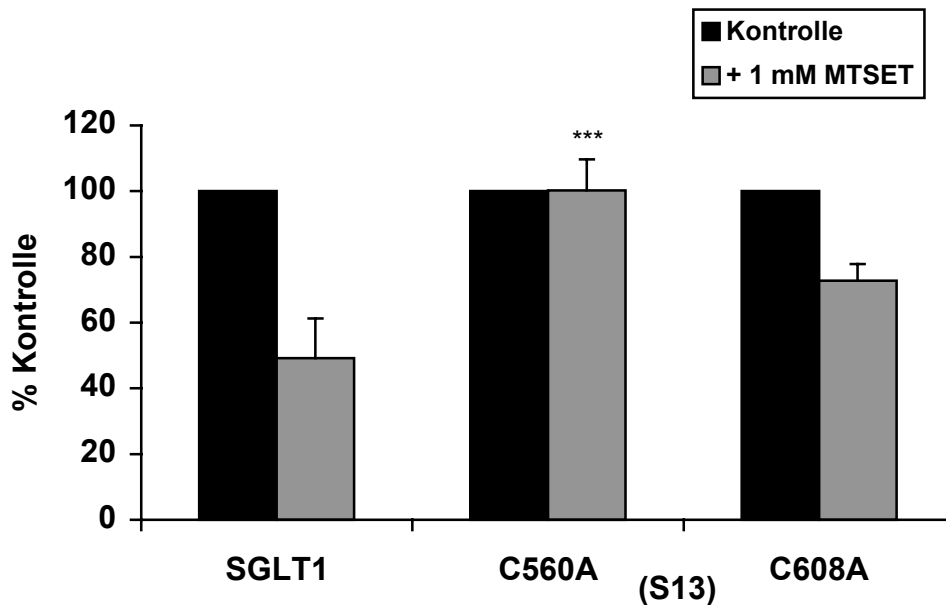


Abb. 30: Sensitivität von COS-7 Zellen, die mit SGLT1, C560A oder C608A transfiziert wurden, gegenüber SH-Reagenzien

Die Zellen wurden mit 1 mM MTSET für 12 min vorinkubiert. Die gleiche Konzentration an Inhibitor befand sich auch im Transportmedium.

Die Grafik zeigt die Mittelwerte von 4 Experimenten, wobei das Einzelexperiment als Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

Die Kontrolle betrug für den SGLT1  $2,8 \pm 0,3$ , für C560A  $0,6 \pm 0,2$  und für C608A  $1,6 \pm 0,1$  nmol / mg Protein / 15 min.

Die Angabe der Signifikanz bei den Mutanten basiert auf Vergleich zum SGLT1,  $p < 0,005$ .



### 4.3.3. Bestimmung der Affinitäten für AMG und Phlorizin nach Vorinkubation mit MTSET

Die Bindung von MTSET an den Cysteinrest in Position 560 warf die Frage auf, welche funktionellen Konsequenzen nebst einer Transporthemmung zu erwarten waren. Wie aus Tab. 8 ersichtlich, beeinflusste die Vorinkubation mit MTSET und damit die Ausbildung eines Disulfids an C560 im wesentlichen die AMG-Affinität des Transporters.

Tab. 8: Affinitäten für AMG und Phlorizin nach und ohne Vorinkubation mit MTSET im Vergleich

Transporter	$K_m$ [mM]	$K_m$ [mM]	$K_i$ [ $\mu$ M]	$K_i$ [ $\mu$ M]
	MTSET	Kontrolle	MTSET	Kontrolle
SGLT1	8,1 $\pm$ 2,2	1,0 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,9
	$p < 0,005$			

Alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD aus 3 Experimenten, wobei jedes Experiment als Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

Die Angabe der Signifikanz basiert auf Vergleich zur Kontrolle.

Diese Resultate demonstrierten somit, daß C560 die Bindungsstelle für MTSET im SGLT1 ist. Der signifikante Affinitätsverlust für AMG nach Modifikation mit dem MTS-Reagenz wies auf eine Lokalisation dieses Cysteinrestes in der Nähe der Substratbindungsstelle hin.

### 4.4. Untersuchungen an den Cysteinen in S5 und S7

Die Gesamtverteilung der Cysteine im Carrier zeigt eine besonders cysteinreiche, extrazelluläre Domäne (S7) in direkter Nachbarschaft zur C-terminalen Schleife S13. Außerdem befindet sich noch ein weiteres luminal lokalisiertes Cystein im Bereich von S5. Da Substratschutzexperimente die Beteiligung von drei SH-Gruppen an der Bindungsstelle des Transporters postulieren, wurden noch weitere Cystein-Mutanten im Hinblick auf ihre Rolle für die Funktion des SGLT1 untersucht.

#### 4.4.1. Bestimmung der Transportaktivität

Zunächst wurde getestet, ob die Substitution eines Cysteins in Position 255, 345, 351, 355 und 361 die Transportaktivität des Natrium/D-Glucose-Cotransporters beeinflusst. Gemäß Abb. 31 trat bei allen fünf Mutanten eine deutlich reduzierte Transportaktivität auf. Sie lag für C345A bei  $27,4 \pm 4,8 \%$  und für C355A bei  $27,5 \pm 4,5 \%$ . Die Mutanten C255A und C351A zeigten ein ausgesprochen geringes Transportvermögen ( $4,3 \pm 1,4 \%$  bzw.  $3,9 \pm 1,7 \%$  des Wildtyps), während das der Mutante C361S bei  $37,3 \pm 5,7 \%$  lag.

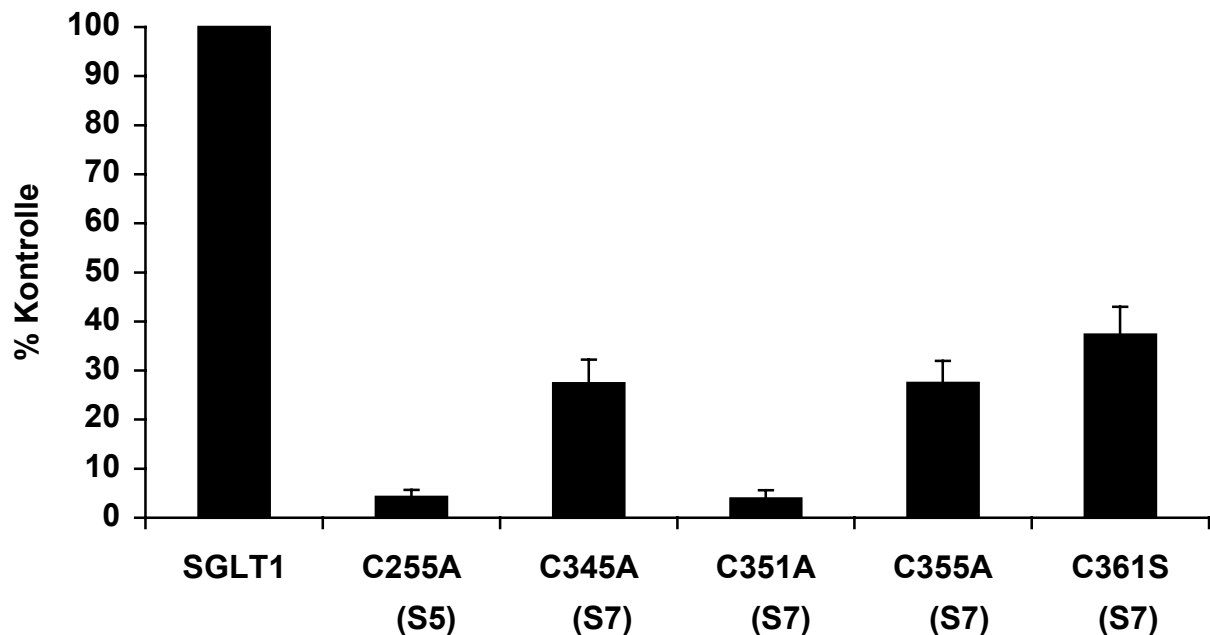


Abb. 31: Transportaktivität von COS-7 Zellen, die mit dem Wildtyp, C255A, C345A, C351A, C355A oder C361S transfiziert wurden

Das Transportmedium enthielt 0,02 mM AMG und 120 mM Natrium.

Die Grafik zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SD von mindestens 6 Experimenten, wobei das Einzelexperiment als Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

Die Kontrolle betrug  $2,8 \pm 0,3$  nmol / mg Protein / 15 min.

#### 4.4.2. Bestimmung der Affinität für AMG

Zur Ermittlung der Affinitäten der Mutanten (Tab. 9) aus S7 wurde eine Transportmessung bei zwei AMG-Konzentrationen durchgeführt. Der AMG-Gehalt in den Ausgangslösungen betrug 0,1 und 3 mM. Betrachtet man die natriumabhängige AMG-Aufnahme gemäß Abb. 32, so sieht man, daß das Verhältnis der transportierten Menge bei den verschiedenen Konzentrationen für zwei Mutanten große Unterschiede zeigt.

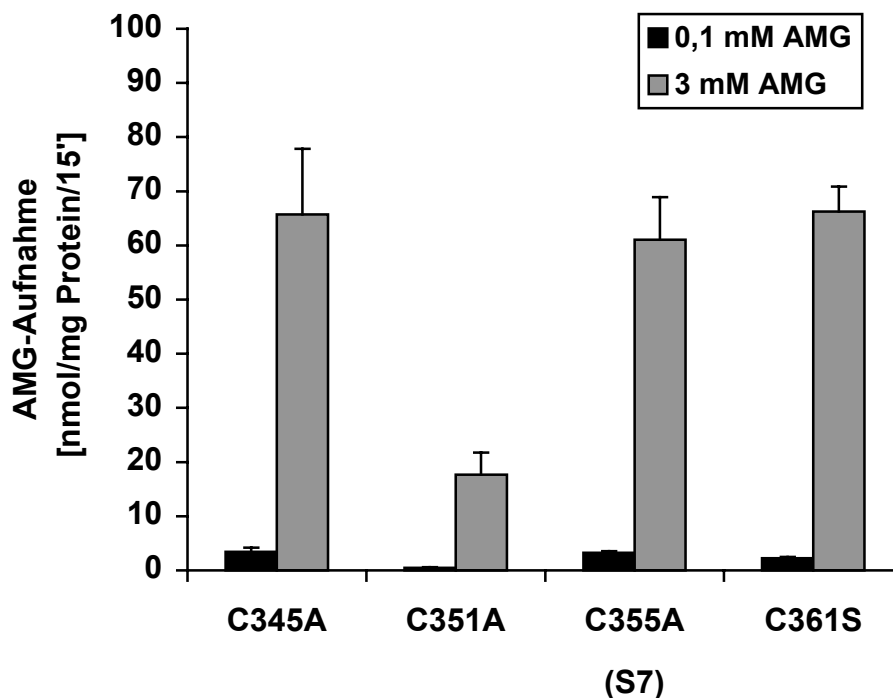


Abb. 32: AMG-Aufnahme von COS-7 Zellen, die transient mit verschiedenen Mutanten transfiziert wurden

Das Transportmedium enthielt 0,1 mM bzw. 3 mM AMG und Natrium in einer Konzentration von 120 mM.

Die Grafik zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SD von 3 Experimenten, wobei das Einzelexperiment als Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

C345A und C355A nahmen bei 3 mM AMG rund zwanzig mal so viel Substrat auf als bei der niedrigeren Konzentration. Daraus ergab sich ein  $K_m$ -Wert (Tab. 9), der im Bereich des Wildtyps lag. C351A und C361S hingegen zeigten bei der erhöhten AMG-

Konzentration einen um den Faktor 30 bzw. 40 gesteigerten Transport von AMG. Die daraus resultierenden Affinitätskonstanten ließen sich mit der Methode nicht genau bestimmen, aber sie sprechen für  $K_m$ -Werte von weit über 20 mM. Insofern bewirkte die Substitution des Cysteins sowohl in Position 351 als auch 361 einen eindeutigen Affinitätsverlust für den Zucker.

Tab. 9: Affinitäten für AMG

Transporter	$K_m$ [mM]
SGLT1	$1,0 \pm 0,2$
C345A	$3,3 \pm 1,5$
C351A	> 20
C355A	$5,1 \pm 1,6$
C361S	> 20

Die Tabelle zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SD von 3 Experimenten, wobei das Einzelexperiment als Doppelbestimmung durchgeführt wurde. Die Ermittlung der Werte erfolgte gemäß Kapitel 3.4.2.

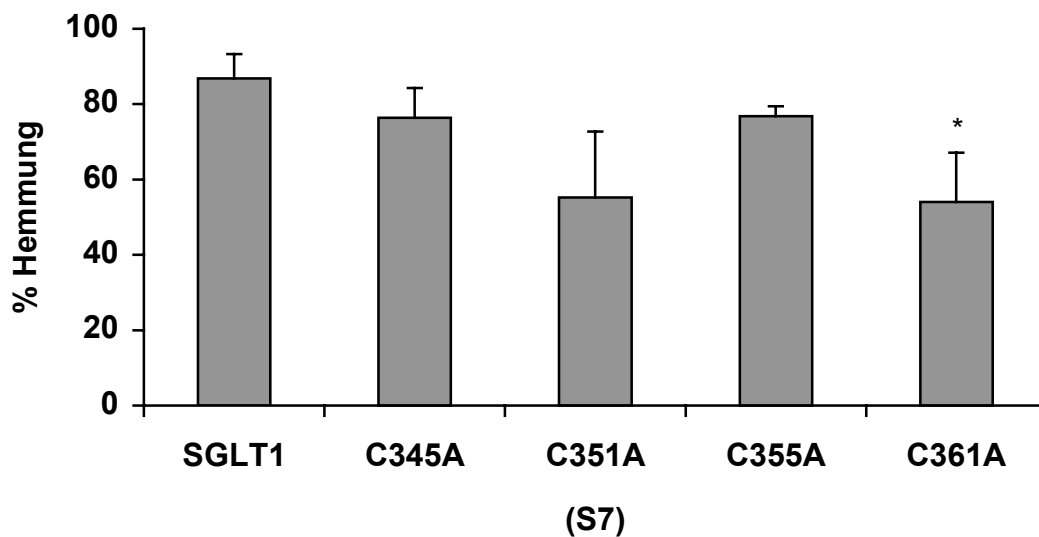
#### 4.4.3. Bestimmung der Affinität für Phlorizin

Die Inhibitionskonstante für Phlorizin wurde gemäß der Methode in Kapitel 3.4.2 ermittelt. Die Konzentration des kompetitiven Inhibitors im Transportmedium beliefen sich auf 0,5 und 10  $\mu$ M. Unter Verwendung der in Kapitel 4.4.2 ermittelten Affinitätskonstanten konnten die in Tab. 10 dargestellten  $K_i$ -Werte berechnet werden. Für C345A und C355A resultierte eine dem Wildtyp entsprechende Phlorizin-Affinität. Bei Mutante C351A und C361 konnte man auf eine reduzierte Affinität schließen, die sich auch durch die geringe Hemmung in Abb. 33 bemerkbar machte. Diese Reduktion ist sehr wahrscheinlich auf die starke Abnahme der Affinität des Glucoseanteils zurückzuführen.

Tab. 10: Affinitäten für Phlorizin

Transporter	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]
C345A	$3,1 \pm 1,4$
C351A	$\sim 10$
C355A	$3,2 \pm 0,7$
C361S	$\sim 10$

Die Grafik zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n=3$  Experimenten, wobei das Einzelexperiment als Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

Abb. 33: Prozentuale Hemmung der AMG-Aufnahme durch  $10 \mu\text{M}$  Phlorizin

Das Transportmedium enthielt  $0,1 \text{ mM}$  AMG und Natrium in einer Konzentration von  $120 \text{ mM}$ .

Die Grafik zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SD von 3 Experimenten, wobei das Einzelexperiment als Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

Die Angabe der Signifikanz basiert auf Vergleich zum SGLT1,  $p < 0,05$ .

#### 4.5. Lokalisation einer Disulfidbrücke

Die Kenntnisse über das Vorhandensein einer Disulfidbrücke (Turner und George, 1983, 1984) wurden zum Anlaß genommen folgende Transportstudien durchzuführen. Es wurden COS-7 Zellen mit sämtlichen extrazellulär lokalisierten Cystein-Mutanten und dem Wildtyp SGLT1 transfiziert. Dem Transportmedium wurde zusätzlich 20 mM DTT, das intramolekulare Disulfidbrücken spaltet, zugefügt und dann die Aufnahme von radioaktiv markierter AMG gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 34 als Prozent der Kontrolle, d.h. des ungehemmten Transports (100 %) der jeweiligen Mutante dargestellt.

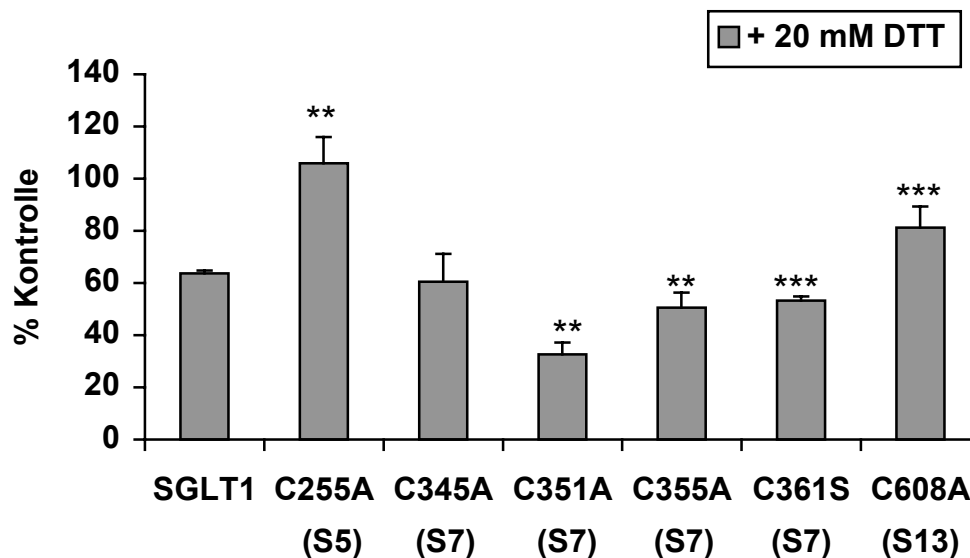


Abb. 34: Einfluß von 20 mM DTT auf COS-7 Zellen, die mit dem SGLT1 und verschiedenen Mutanten transfiziert wurden

Das Transportmedium enthielt 0,1 mM AMG und 120 mM Natrium.

Die Grafik zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SD von 6 Experimenten, wobei das Einzelexperiment als Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

Die Kontrolle betrug für den SGLT1  $10,2 \pm 1,1$ , für C255A  $0,5 \pm 0,2$ , für C345A  $3,0 \pm 0,7$ , für C351A  $0,4 \pm 0,1$ , für C355A  $2,6 \pm 0,1$ , für C361S  $4,0 \pm 0,4$  und für C608A  $5,5 \pm 0,7$  nmol / mg Protein / 15 min.

Die Angabe der Signifikanzen basiert auf Vergleich zum SGLT1,  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,005$  (\*\*\*)

Im unveränderten Transporter führt DTT zu einer Hemmung auf  $63,6 \pm 1,4$  % der Kontrolle. Durch den Austausch des Cysteins in Position 255 und 608 kommt es zu einer signifikanten Veränderung der DTT-Empfindlichkeit. Während es bei den meisten Mutationen zu einer ähnlichen oder stärkeren Hemmung wie beim Wildtyp kam, war bei C255A keine Sensitivität gegenüber DTT und bei C608A eine deutlich abgeschwächte, auf  $81,2 \pm 8,1$  %, zu beobachten. Dies läßt den Schluß zu, daß DTT eine im Wildtyp vorhandene Disulfidbrücke spaltet und somit die Inhibition des Transports verursacht. Wird diese Bindung durch Mutation des jeweiligen Bindungspartners aufgehoben, so bleibt die Hemmung aus bzw. ist nicht mehr in gleichem Maße vorhanden. Somit kommen als möglicherweise an einer Disulfidbrücke beteiligte Aminosäuren C255 und C608 in Frage.

## 5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Struktur-Wirkungsbeziehungen des Natrium/D-Glucose-Cotransporters nach Einführung verschiedener Mutationen untersucht. Die Mutagenese mit anschließender Expression und Charakterisierung ist eine Methode, die bereits häufig bei Proteinen angewandt wurde.

In dieser Arbeit wurde als Expressionssystem der zu untersuchenden Mutanten COS-7 Zellen gewählt. Diese Zellen sind mit einer SV40-DNA transformiert worden und dadurch in der Lage, solche Plasmide in einer hohen Kopienzahl zu replizieren, die einen SV40 Replikationsursprung besitzen (Gluzman, 1981). Diese Zell-Linie wurde bereits erfolgreich zur Expression des Natrium/D-Glucose-Cotransporters verwendet (Birnie et al., 1990, Vayro et al., 1998, Lin et al., 1999). Mit dem Leervektor exprimierte Zellen zeigen kaum eine natriumabhängige AMG-Aufnahme, was darauf hinweist, daß diese Zelllinie keine endogenen natriumabhängigen Glucosetransporter besitzt und somit ein besonders geeignetes Untersuchungssystem darstellt.

Als eukaryotischer Expressionsvektor fand pHook-2 Anwendung (Chesnut et al., 1996). Nach der Transfektion wird neben dem erwünschten Protein auch ein spezieller Antikörper an der Zelloberfläche exprimiert. Mit Hilfe von antigen-beschichteten, magnetischen Glasperlen ließen sich dann die erfolgreich transfizierten Zellen selektieren. Da die Transfektionsrate jedoch bei 40-60 % lag, war es nicht nötig, diesen Vorteil von pHook-2 zu nutzen. Normalerweise wäre es sinnvoll, einen Vektor zu wählen, der gleichzeitig ein Reportergen exprimiert. Reportergene werden in der Gentechnologie zum indirekten Nachweis anderer Gene verwendet, deren Expression nicht mit einfachen Tests nachgewiesen werden können. Das Vorhandensein und die Expression des zu untersuchenden Gens wird dann durch die Aktivität des vom Reportergen codierten Genprodukts bestimmt. Allerdings steigt bei Überexpression eines zweiten Gens auch die Proteinmenge pro Zelle an. Dies hätte zur Folge, daß die Transportrate des SGLT1 bezogen auf die Menge an Protein abnimmt. Deshalb wurde hier zum indirekten Nachweis der Transfektion das Reportergen *lacZ* getrennt von dem zu untersuchenden Gen in die Zelle eingeschleust. Damit ist nur bewiesen, daß die



Zellen generell in der Lage sind ein Gen zu exprimieren, nicht aber, ob sie das Vermögen besitzen, das gewünschte Protein zu bilden.

Infolgedessen war es nötig, die Expression auf anderem Wege zu bestätigen. Mittels der Real-Time Quantitativen PCR wurde die RNA des Wildtyps und zwei exemplarischer Mutanten in COS-7 Zellen detektiert und somit die Translation bestätigt. Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green hat den Nachteil, daß er an jeder doppelsträngigen DNA bindet (Schneeberger et al., 1995). Der Einsatz einer sequenzspezifischen, fluorogenen Sonde war hier allerdings nicht nötig, da die DNAs der verschiedenen Transporter in getrennten PCR-Gefäßen untersucht wurden und somit das Vorliegen von unspezifischen Produkten eindeutig ausgeschlossen werden konnte. Im Western-Blot wurde ein Beweis zur erfolgreichen Transkription des Wildtyps sowie der Mutanten C560A und C608A erbracht. Eine quantitative Aussage bezüglich des zur Plasmamembran translozierten Proteins war aufgrund der aufgetretenen Aggregate nicht möglich. Solche hochmolekularen Banden, die sich ebenfalls durch das Antipeptid verdrängen ließen, wurden auch in immunochemischen Analysen des SGLT1 in CHO G6D3-Zellen beobachtet (Lin et al., 1998). Hier wurde eine mögliche Oligomerenbildung des Natrium/D-Glucose-Cotransporters diskutiert. Im Gegensatz dazu wurde ein asymmetrisches Monomer postuliert (Wright et al., 1998).

Auf weitere Western-Blots mit den anderen Cystein-Mutanten wurde verzichtet, da sich ein quantitativer Vergleich als nicht möglich erwies. Aufgrund der Transportstudien lagen aber verlässliche Beweise zur Expression der Proteine vor, da COS-7 Zellen den natriumabhängigen Transporter nativ nicht exprimieren (Birnie et al., 1990). Also beweist die Hemmung des Transports durch Phlorizin auf einen zu vernachlässigenden Wert das Vorhandensein des SGLT1, da Phlorizin nicht in der Lage ist, den natriumunabhängigen Transport zu inhibieren.

Zur Charakterisierung der neu geschaffenen Transporter im Vergleich zum Wildtyp wurden Aufnahmestudien mit radioaktiv markiertem Substrat durchgeführt. Dazu wurde nicht D-Glucose, das eigentliche Substrat, sondern  $\alpha$ -Methylglucose verwendet. Dieser Zucker hat den Vorteil nicht auch durch natriumunabhängige Carrier transportiert und in der Zelle nicht metabolisiert zu werden (Kimmich et al., 1981).

Zuerst wurden die Cysteinmutanten in der C-terminalen Schleife S13 untersucht. Diese Überlegung berief sich auf vorangegangene Studien. Einmal wurde gezeigt, welche Art

Aminosäuren überhaupt in der Bindungstasche liegen. Es konnte in Substratschutzexperimenten die Beteiligung von Cysteinen an der Substratbindung postuliert werden (Thomas et al., 1972). Später wurde unter Einbeziehung experimenteller und theoretischer Daten eine Bindungsstelle hypothetisiert, die auf den Aminosäurenbereich 550-638, also der Schleife S13 hinwies (Wielert-Badt, 1998). Dort sind in Position 560 und 608 insgesamt zwei Cysteine lokalisiert. An dieser Stelle werden zunächst die kinetischen Daten des Wildtyps mit den bisher in diversen Expressionssystemen gemessenen verglichen, bevor der Einfluß der Mutationen diskutiert wird.

### **Wildtyp**

Eine ausführliche Charakterisierung des SGLT1 in COS-7 Zellen in der Form wie sie in dem vorliegenden Beitrag durchgeführt wurde, ist bisher noch nicht beschrieben worden. Insbesondere die Affinität für Natrium wurde in COS-7 Zellen bis dato nicht geklärt. Tab. 11 liefert eine Zusammenfassung der ermittelten Daten sowie ein Auszug aus anderen Untersuchungssystemen.

Die in dieser Arbeit gemessenen Parameter liegen im Bereich der bereits in der Literatur beschriebenen. Wichtig ist, daß sie stets in direktem Vergleich zu den Mutanten, also in gepaarten Versuchen ermittelt wurden und somit eine verlässliche Aussage liefern.

Tab. 11: Kinetische Parameter des SGLT1 in verschiedenen Untersuchungssystemen

System	$K_m$ AMG [mM]	$K_m$ Na [mM]	$K_i$ Pz [ $\mu$ M]	Hill Koeffizient	Literatur
COS-7	$1,0 \pm 0,2$ (120 mM Na)	$44,1 \pm 3,14$ (0,6 mM AMG)	$1,5 \pm 0,9$	$2,2 \pm 0,2$	eigene Ergebnisse
COS-7	0,15 (140 mM Na)		11		Birnir et al., 1990
COS-7	$0,36 \pm 0,16$ (140 mM Na)				Vayro et al., 1998
COS-7	$0,40 \pm 0,1$ (140 mM Na)				Vayro und Silverman, 1999
Oocyten	0,11 (100 mM Na)	32 (0,05 mM AMG)	6	1,5	Ikeda et al., 1989
Oocyten	0,2 (100 mM Na)	$4 \pm 0,6$ (5 mM AMG)	0,012	$1,8 \pm 0,3$	Panayotova-Heiermann et al., 1995
Oocyten	0,15 (100 mM Na)				Loo et al., 1998
Oocyten	0,2 (100 mM Na)		5		Panayotova-Heiermann et al., 1998
BBMV		29 (1 mM D-Glc)			Kinne et al., 1975
BBMV		14 (0,1 mM D-Glc)			Lin et al., 1982
BBMV			1,2		Lin und Hahn, 1983
BBMV	$1,0 \pm 0,2$ [D-Glc] (100 mM Na)				Centelles et al., 1991
BBMV	0,099 [D-Glc] (150 mM Na)		$15,3 \pm 3,0$		Oulianova und Berteloot, 1996

## Mutante C608A

Unterschiede zwischen SGLT1 und den Mutanten der Schleife S13 ergaben sich nur im Hinblick auf die Phlorizin-Affinität, die bei C608A markant reduziert war. Aufgrund des ähnlichen  $K_m$ -Wertes für das Substrat AMG von Mutante C608A und dem Wildtyp, kann man annehmen, daß dieser Cysteinrest in einer Region lokalisiert ist, die nur in Wechselwirkung mit dem Aglukon tritt. Entweder beeinflusst die Mutation die Affinität direkt über Substitution des essentiellen Bindungspartners oder es kommt zu Konformationsänderungen im SGLT1, die eine Bindung über den Aglukonteil erschweren und für die reduzierte Affinität verantwortlich sind. Vorangegangene Studien belegen die oben postulierten Wechselwirkungen zwischen Phlorizin und Protein über 2 oder mehrere Domänen im Carrier, von denen eine die Glucosebindungsstelle sein soll (Diedrich, 1963). Somit ist die verringerte Phlorizin-Affinität ohne gleichzeitige Änderung der Substrataffinität über eine separate Bindungsstelle zu erklären.

Die generell höhere Affinität des Phlorizins im Verhältnis zum Substrat kann plausibel nicht durch den Molekülteil der Glucose erklärt werden. Somit muß die Struktur des Aglukons über die sehr gute Hemmwirkung entscheiden. Diedrich nimmt an, daß die äquatoriale Orientierung der Hydroxylgruppen im Glucosemolekül in Position C3 und C4 zur optimalen Erkennung erforderlich sind. Zusätzlich wird die Aglukonbindung über die 4-Hydroxyphenyl-Gruppe (Ring C) diskutiert. Diese zweite Wechselwirkung soll einerseits über eine Wasserstoffbrücke und andererseits über  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit einem anderen aromatischen Ringsystem realisiert werden. In direkter Nachbarschaft der Cysteinmutante, d.h. in Position 607 befindet sich die Aminosäure Phenylalanin mit einer aromatischen Seitenkette, die somit  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit Ring C ermöglicht. Weitere potentielle Bindungspartner, die diese Hypothese unterstützen, finden sich in F599, F600 und Y604. Also erscheint diese Region als Domäne zur Bindung des Aglukons durchaus plausibel.

Im Gegensatz dazu wird in molekularen Modellierungsversuchen, die gleichermaßen eine essentielle Beteiligung des Phlorizin-Aglukons an der Bindung an das Protein voraussetzen, Ring C als nicht an der Bindung beteiligtes Element des Moleküls diskutiert (Wielert-Badt et al., 2000a). Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß sich statische Modellierungen kaum mit Ergebnissen aus dynamischen Meßvorgängen

vergleichen lassen. Der Zustand geringster Energie ist nicht grundsätzlich der, der im Moment der Bindung an den Carrier vorliegt.

Weiterhin geben Studien mittels der Atomkraftmikroskopie (Wielert-Badt et al, 2000b) einen Hinweis auf eine Konformationsänderung im Wildtyp des SGLT1, die durch Interaktion mit Phlorizin induziert wird. Daraus ergibt sich auch die Möglichkeit, daß die hier vorliegende reduzierte Phlorizin-Affinität auf eine fehlende Konformationsänderung aufgrund einer durch Mutation nicht möglichen Bindung an den Transporter zurückzuführen ist.

In Studien mit MTSET ergaben sich für Mutante C608A keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp. Wie später ausgeführt, wird angenommen, daß C608 durch eine Disulfidbrücke mit C255 verbunden ist und damit eine bestimmte Konformation der beiden Schleifen vorgegeben wird, die durch Wegfall dieses Cysteins erheblich gestört sein kann.

Daß der Glucosemolekülteil zwar wichtig, aber nicht essentiell für die Hemmwirkung ist, zeigt sich an der Inhibitionskonstanten des Phloretins, dem Phlorizin-Aglukon. Diese liegt bei 0,5 mM (Panayotova-Heiermann et al., 1997) und damit sogar noch in der Größenordnung der Substrataffinität. Die noch vorhandene Hemmwirkung eines Moleküls, dem der Glucoseteil fehlt, bestätigt die Theorie der Inhibitorbindung über eine zusätzliche Domäne im Carrier, die gleichzeitig nicht auch Substratbindungsstelle ist.

Dieser Befund war der Anlaß zu Studien mit Arbutin, einer Substanz, die im Aglukonteil variiert, aber keinen Ring C besitzt. Als Vergleich diente C560A, die die Phlorizinaffinität nicht beeinflusst. Ein  $K_i$  von 1 mM für sowohl den Wildtyp als auch die beiden Mutanten geht mit den Untersuchungen von Diedrich konform. Einerseits findet die Affinitätsniedrigung gegenüber Phlorizin in Bezug auf den Wildtyp ihre Erklärung im Verlust des Rings C. Andererseits wird deutlich, daß nach Substitution des Cysteins wohl noch Wechselwirkungen zu Ring B möglich sind, da C608A keine Änderung hinsichtlich der Arbutinaffinität zeigte. Dies macht deutlich, wie wichtig diese Region in der Schleife S13 für die Aglukonbindung über Ring C ist.

Arbutin gehört im Gegensatz zu Phlorizin und Phloretin zu den transportierten Phenylglucosiden (Lostao et al., 1994). Prinzipiell werden nur Hexosen mit einer äquatorialen Orientierung der Hydroxylgruppen in Position C2 effektiv transportiert (Kimmich und Randles, 1981; Hopfer, 1987). Außerdem entscheidet das Aglukon, ob ein Glucosid transportiert wird, den Transport blockiert oder keine Interaktionen eingeht.

Beim Übergang vom Phenylglucosid zum Arbutin erhöht sich die Affinität um den Faktor 5, vermutlich aufgrund von Wasserstoffbrücken der para-Hydroxylgruppe mit benachbarten polaren Resten. Einer davon könnte ein Lysin-Rest sein, da Isothiocyanat-Analoga den SGLT1 irreversibel hemmen können (Lostao et al., 1994).

### **Mutante C560A**

Die kinetischen Untersuchungen ergaben sowohl für die Substrate als auch den Inhibitor keine Affinitätserniedrigung. In Hemmstudien erwies sich die Mutante C560A als nicht hemmbar durch MTSET. Diese sogenannten MTS-Reagenzien zeichnen sich durch eine schnelle, unter milden Bedingungen ablaufende Reaktion aus, die das Protein nicht angreift. Zusätzlich besitzen sie eine hohe Selektivität für Cysteinsulfhydrylgruppen und reagieren quantitativ ohne großen Konzentrationsüberschuß. Auch sollen sie spezifischer mit Cysteinen reagieren, die im Wasser frei zugänglich sind (Kenyon und Bruice, 1977; Akabas et al., 1992; Xu und Akabas, 1993). Die hier verwendeten Derivate MTSET und MTSES sind nicht in der Lage, die Zellmembran zu permeieren und mit Cysteinen auf der cytoplasmatischen Seite zu reagieren. Während MTSET permanent positiv geladen vorliegt, ist MTSES bei neutralem pH-Wert deprotoniert und negativ geladen (Karlin und Akabas, 1998). Da der SGLT1 und auch die Mutante C608A durch MTSET gehemmt wurde, dieser Effekt aber durch Substitution des Cysteins in Position 560 eliminiert wurde, ist es wahrscheinlich, daß MTSET im Wildtyp mit genau dieser Aminosäure reagiert. Andere Cysteine können ausgeschlossen werden, denn sonst müßte C560A zumindest eine gewisse Sensitivität aufweisen. Aus diesem Grund wurde darauf verzichtet, andere Mutanten dahingehend zu untersuchen. Die Substrataffinität für C560A veränderte sich gegenüber der des Wildtyps nicht. Allerdings führte die Vorinkubation mit MTSET und somit die Einführung sowohl einer positiven Ladung als auch einer Kettenverlängerung an C560 zu einer markanten Affinitätserniedrigung für AMG. Einerseits liefert dieser Befund einen deutlichen Hinweis auf die extrazelluläre Lokalisation dieser Region, andererseits wird die funktionelle Rolle des Cysteins hervorgehoben. Eher unwahrscheinlich ist es, daß C560 direkt in der Substratbindungstasche liegt, denn dann müßte es nach der Mutation zu einer signifikanten Änderung der Affinität kommen. Möglicherweise ist diese Aminosäure in

der Nähe der Bindungsstelle lokalisiert, so daß MTSET durch sterische Hinderung den Zugang des Liganden zum Rezeptor erschwert. Weiterhin ist nicht auszuschließen, daß dieses Reagenz die normalerweise bei Rezeptoraktivierung auftretenden Konformationsänderungen stört und auf diese Weise die Bindung des Substrats beeinflusst. In Untersuchungen des  $\gamma$ -Aminobuttersäure Transporters GAT-1 mit MTSEA, einem membranpermeablen Derivat, wurde ebenfalls eine Cysteinmutante identifiziert, die im Gegensatz zum Wildtyp nicht gehemmt wurde (Golovanewsky und Kanner, 1999). Die Autoren schließen auch auf diese Aminosäure als Bindungspartner des MTS-Reagenzes und eine in diesem Fall intrazelluläre Lokalisation. Für den D<sub>2</sub> Dopamin Rezeptor wird als Grund für eine Reaktion mit dem positiv geladenen MTSET eine in Nähe des Cysteins gelegene negativ geladene Aminosäure diskutiert (Javitch et al., 1994). Studien an der Acetylcholinesterase weisen auf die Aminosäure Tryptophan als idealer Bindungspartner für quartäre Amine hin (Ordentlich et al., 1993). Diese sogenannte Kation- $\pi$  Wechselwirkung (Dougherty, 1996) kann im SGLT1 über W559 realisiert werden, die sich in direkter Nachbarschaft zu C560 befindet. Andere aromatische Systeme, die solche Wechselwirkungen eingehen können, sind unter anderem in Position 339, 354 (Tyrosin), 366 und 367 (Phenylalanin) in S7 zu finden. In dieser Schleife sind vier Cysteine lokalisiert, die ebenfalls substituiert und untersucht wurden. Dabei zeigte sich, daß C351A und C361S eine deutlich niedrigere Substrataffinität aufwiesen als der Wildtyp. Dies läßt den Schluß zu, daß C351 und C361 Teil der Substratbindungstasche sind, die unter Umständen eine Art Pore bilden. Diese Pore wird wie unten aufgeführt von den Schleifen S5 und S13 umgeben, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind.

### **Identifizierung der eine Disulfidbrücke bildenden Cysteine**

Die Studien zur Identifizierung einer Disulfidbrücke beriefen sich auf Hinweise früherer Untersuchungen an BBMV aus der äußeren Cortex der Kaninchenniere (Turner und George, 1983, 1984). Mutante C255A und C608A zeigten eine im Vergleich zum Wildtyp fehlende bzw. signifikant reduzierte Empfindlichkeit gegenüber DTT. Daraus kann man schließen, daß DTT eine im SGLT1 vorhandene Disulfidbrücke spaltet und somit den Transport inhibiert. Wenn man davon ausgeht, diese Bindung durch Mutation

des jeweiligen Bindungspartners aufzuheben, so muß es sich bei C255 und C608 um die Aminosäuren handeln, die diese Disulfidbrücke ausbilden. C560 kommt dafür nicht in Frage, da die Reaktion mit MTSET auf das Vorliegen einer freien SH-Gruppe in dieser Position hinweist. Die vier anderen Cysteine (C345, C351, C355 und C361) in der Schleife S7 sind ebenfalls von der Beteiligung an einer Disulfidbrücke auszuschließen, da sie aufgrund ihrer Lokalisation in einer Pore nur begrenzt erreichbar sind. Im Serotonin Transporter SERT wurde ebenfalls mit dieser Methode eine Mutante identifiziert, die bei unverändertem  $K_m$ , aber deutlich reduziertem  $V_{max}$ , unempfindlich gegen disulfidreduzierende Reagenzien war (Sur et al., 1997). Interessant ist die Tatsache, daß C608A und auch C255A (Daten hier nicht gezeigt) genau diese kinetischen Parameter ebenfalls zeigen. Da für Mutante C608A auch die gleiche Expression in der Plasmamembran wie für den Wildtyp gezeigt werden konnte, kann man vermuten, daß die Disulfidbrücke in den Transportmechanismus involviert ist und dort eine entscheidende Rolle spielt. Darauf weisen auch die Untersuchungen mittels der Atomkraftmikroskopie (Wielert-Badt et al., 2000b) hin. Hier tritt der Antikörper PAN-3, der gegen die Region um C608 (Aminosäuren 606-627) gerichtet ist, in Wechselwirkung mit dem Carrier, wenn D-Glucose und Natrium im Puffer vorhanden sind, also im aktiven Transportzustand. Aufgrund der Annahme, daß ein Monomer des SGLT1 zum Transport befähigt ist (Wright et al., 1998), ist es wahrscheinlich, daß es sich bei der identifizierten Disulfidbrücke um eine intramolekulare handelt. Interessanterweise wurde im GLUT1 von einer einzigen externen, intramolekularen Disulfidbrücke angenommen, eine Tetramerisierung zu begünstigen (Zottola et al., 1995). Dieses Tetramer wird über nichtkovalente Interaktionen zweier Dimere stabilisiert und dissoziiert nach Reduktion der Disulfidbrücke in seine nicht funktionsfähigen Untereinheiten. Im Falle des SGLT1 wurde auch schon eine Oligomerenbildung diskutiert (Lin et al., 1984), allerdings unterstützt die uneingeschränkte Funktion des Monomeres im Gegensatz zum GLUT1, die in dieser Arbeit postulierte intramolekulare Disulfidbrücke bzw. das Vorliegen des SGLT1 als Monomer. Für den Dopamin Transporter DAT konnte gezeigt werden, daß zwei an einer Disulfidbrücke beteiligten Cysteine auch notwendig für die korrekte Insertion des Proteins in die Membran waren (Wang et al., 1995). Die Abwesenheit zweier Cysteine im Kalium Kanal Kir2.1 ließ zwar eine Expression zu, aber keine Funktion, woraus geschlossen wurde, daß die Disulfidbrücke essentiell für die korrekte Faltung des Proteins war. Darüber hinaus hatte



DTT keinen Effekt auf den Wildtyp, so daß die Disulfidbrücke nach korrekt erfolgter Insertion nicht länger notwendig für die Funktion war.

### Bedeutung der extrazellulären Cysteine im SGLT1

Zusammenfassend ist in Tab. 12 die Bedeutung der untersuchten Cysteine dargestellt. Dazu zeigen Abb. 35-38 die resultierende Konformation bei Annahme der ermittelten Disulfidbrücke sowie ein hypothetisches Modell der Vorgänge bei Substrat- bzw. Inhibitorbindung, das aus den hier vorliegenden Ergebnissen erstellt wurde.

Tab. 12: Funktionelle Rolle der verschiedenen Cysteine im SGLT1

Schleife	Position	Funktion	konserviert in allen SGLT1/2
S5	C255	Ausbildung einer Disulfidbrücke mit C608 (Beteiligung am Translokationsprozeß)	ja
S7	C345-C361	Erkennung und Bindung des Substrats (Beteiligung am Translokationsprozeß)	ja
S13	C560	bisher unbekannt	nein
	C608	Ausbildung einer Disulfidbrücke mit C255 Aglukonbindung des Inhibitors Phlorizin (Beteiligung am Translokationsprozeß)	ja

Somit bilden C255 und C608 eine intramolekulare Disulfidbrücke aus, wodurch sich die dazwischen liegenden Transmembrandomänen zusammenrollen und eine Pore formen. Dabei legt sich die Schleife S7 in die Pore. C560 ist weiterhin extrazellulär positioniert und frei zugänglich.

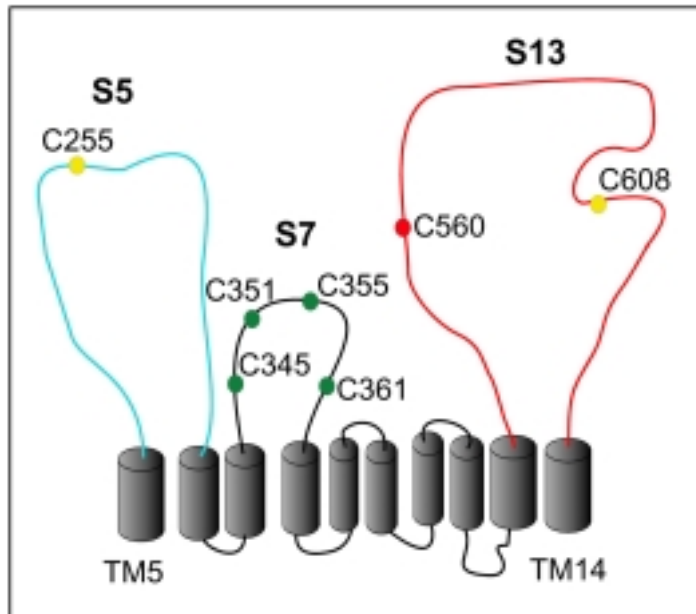


Abb. 35: *Hypothetisches Modell des SGLT1*

Dargestellt sind die Transmembrandomänen 5-14. Die extrazellulären Cysteine sind hervorgehoben.

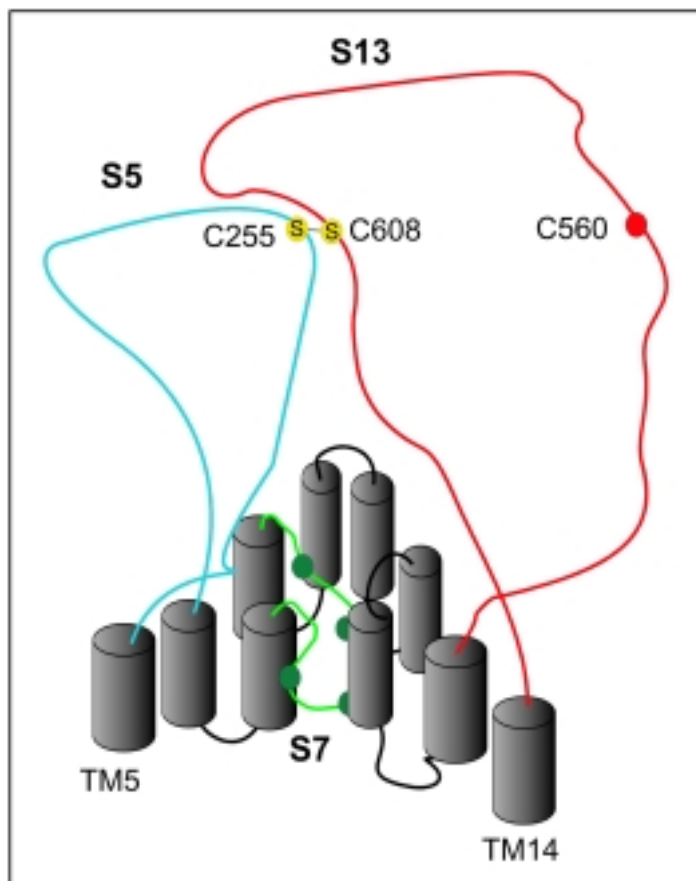


Abb. 36: *Hypothetisches Modell der Lokalisation der Disulfidbrücke im SGLT1*

Dargestellt sind die Transmembrandomänen 5-14. Die extrazellulären Cysteine sind hervorgehoben.

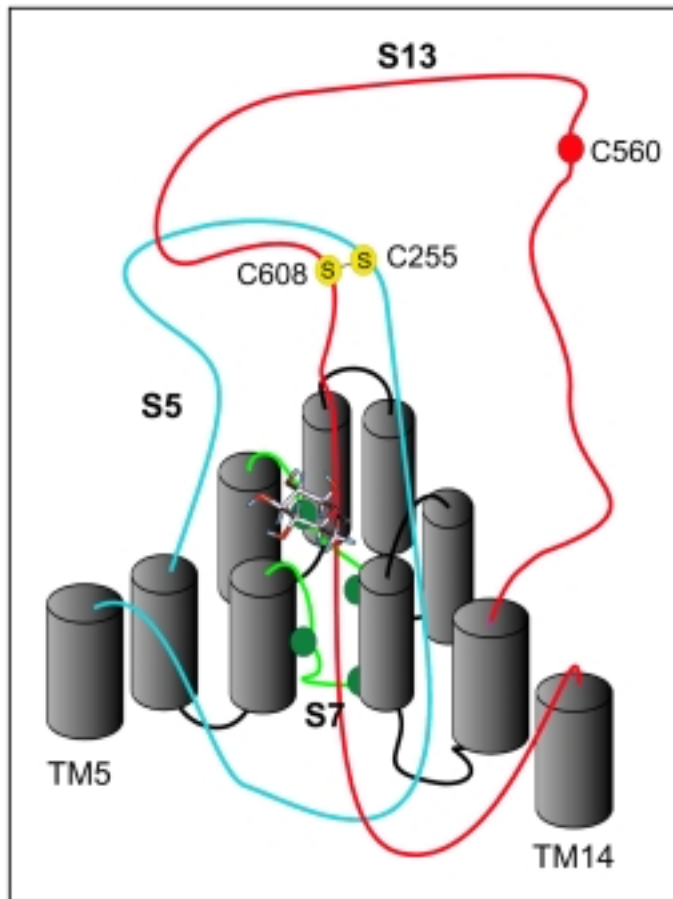


Abb. 37: Hypothetisches Modell der Bindung des Substrats an den SGLT1

Dargestellt sind die Transmembrandomänen 5-14. Die extrazellulären Cysteine sind hervorgehoben.

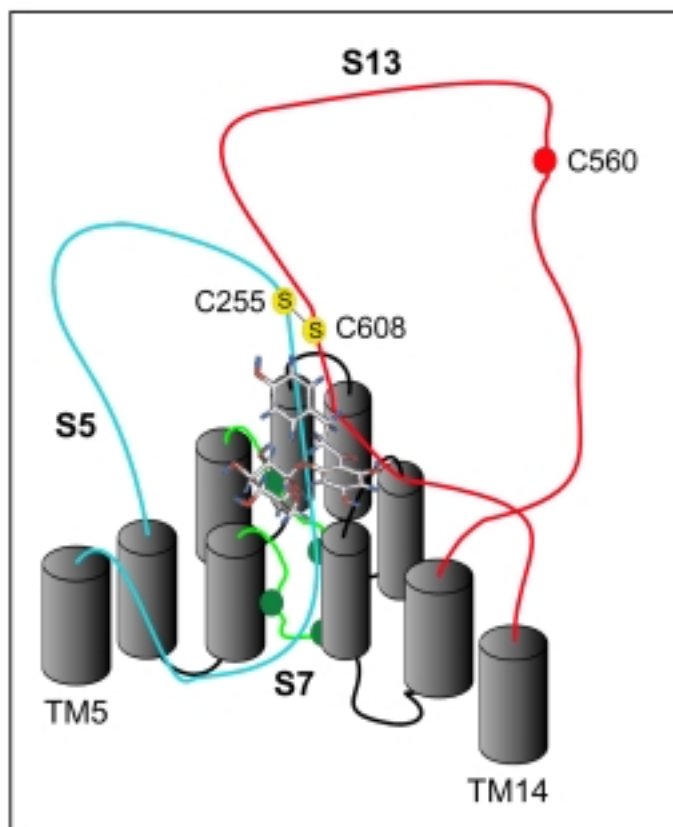


Abb. 38: Hypothetisches Modell der Bindung des Inhibitors an den SGLT1

Dargestellt sind die Transmembrandomänen 5-14. Die extrazellulären Cysteine sind hervorgehoben.

Nach diesem hypothetischen Modell erfolgt bei Anwesenheit des Substrats die Erkennung und Bindung des Zuckers über die in der Pore liegenden Cysteine der Schleife S7. Die Schleifen S5 und S13 lagern sich dabei über die Pore, so daß die Diffusion in die andere Richtung verhindert und gleichzeitig die Translokation durch die Membran begünstigt wird (eingeschlossener Zustand). Dieser Vorgang erklärt die in den Substratschutzexperimenten beobachtete Unerreichbarkeit der SH-Gruppen für NEM in Anwesenheit von Glucose. Am Translokationsprozeß beteiligt sind infolgedessen alle drei Schleifen, wobei C560 in S13 dahingehend keine Rolle spielt. Betrachtet man die Konservierung der untersuchten Cysteine im hoch- und niederaffinen Natrium/D-Glucose-Cotransporter der verschiedenen Spezies, so fällt auf, daß bis auf C560 alle hochkonserviert sind. Dies unterstützt die essentielle Rolle sowohl der in der Pore liegenden als auch die die Disulfidbrücke bildenden und somit die Pore schließenden Cysteine.

Im Fall des kompetitiven Inhibitors Phlorizin erfolgt die Erkennung und Bindung des Glucoseteils ebenfalls über die Cysteine in der Schleife S7. Zusätzliche Interaktionen des Aglukons mit der Region um C608 können zu einer Konformationsänderung führen, so daß die Schleife S13 nicht in der Lage ist, sich vollständig über die Pore zu lagern und somit ein anderer Zustand des Carriers vorliegt als bei der Substratbindung. Dies geht konform mit den Beobachtungen mittels der Atomkraftmikroskopie, wo aufgrund unterschiedlicher Bindungswahrscheinlichkeiten von Glucose und Phlorizin auch jeweils unterschiedliche Konformationen des SGLT1 postuliert werden. Außerdem liefert das Fehlen des sogenannten eingeschlossenen Zustands auch eine Erklärung dafür, daß Phlorizin nicht transportiert wird, sondern nur kompetitiv die Bindungsstelle blockiert.

Durch diese räumliche Vorstellung ergeben sich interessante Experimente. Einerseits kann man biophysikalische Messungen von Bewegungen anstreben, die in dem Bereich der Bindungstasche besonders stark sein sollen. Andererseits wäre die biochemische Affinitätsmarkierung der hier postulierten Substratbindungsdomäne eine aussichtsreiche Methode zur experimentellen Bestätigung des in dieser Arbeit hypothetisierten Modells.

## 6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein Beitrag geleistet, die Bindungstasche des Natrium/D-Glucose-Cotransporters zu lokalisieren und die Vorgänge im Moment der Substratbindung zu modellieren. Dafür wurden zunächst zwei Cysteine (C560 und C608) in der extrazellulären Schleife S13 substituiert. Nach Expression dieser Mutanten in COS-7 Zellen wurde zu Vergleichszwecken auch der Wildtyp in diesem Untersuchungssystem erstmalig ausführlich funktionell charakterisiert. In Transportstudien mit radioaktiv markiertem Substrat zeigten die beiden Mutanten eine deutliche Reduktion der Transportaktivität sowie der maximalen Aufnahmegeschwindigkeit. Sowohl die Affinitäten für die beiden Substrate D-Glucose und Natrium als auch der Hill Koeffizient unterschieden sich nicht von denen des Wildtyps. Bei Mutante C608A zeigte sich eine signifikant reduzierte Affinität für den kompetitiven Inhibitor Phlorizin. Aufgrund der unveränderten Substrataffinität konnte die Aglukonbindung in der Region um C608 postuliert werden. Untersuchungen mit SH-Gruppenreagenzien ergaben, daß C560A im Gegensatz zum Wildtyp und C608A unempfindlich gegenüber MTSET und somit das einzig frei zugängliche Cystein im SGLT1 war. Auch die übrigen extern lokalisierten Cysteinmutanten in S5 und S7 besaßen eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduzierte Transportaktivität. Für C351A und C361S wurde zusätzlich eine deutlich geringere Zuckeraffinität ermittelt. Dies ließ den Schluß zu, daß diese Region der Schleife S7 in Wechselwirkung mit dem Substrat tritt. Um eine mögliche Disulfidbrücke im SGLT1 zu lokalisieren, wurden Hemmstudien mittels DTT durchgeführt. Dabei zeigten C255A (S5) und C608A als einzige der Mutanten eine geringere Sensitivität als der Wildtyp und konnten somit als Partner dieser Bindung identifiziert werden.

Anhand dieser Ergebnisse ließ sich ein Modell über die möglichen Vorgänge am Carrier während der Substratbindung erstellen. Dieses postuliert, daß durch die Disulfidbrücke zwischen den Schleifen S5 und S13 die dazwischenliegenden Transmembrandomänen eine Pore bilden und die Schleife S7 in diese Öffnung hineinklappt. Bei Substratbindung in der Pore kommt es zu Konformationsänderungen, die ein Klappen der Schleifen S5 und S13 über die Pore bewirken. Durch diesen sogenannten eingeschlossenen Zustand ist die Translokation des Substrats durch die Membran begünstigt.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

AMG	$\alpha$ -Methylglucose
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BBMV	Bürstensaummembranvesikel
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CBS	Citrat-gepufferte Natriumchlorid-Lösung
cDNA	klonierte Desoxyribonukleinsäure
CHO	Zelllinie der Eierstockzellen des chinesischen Hamsters
COS	Nierenzelllinie des Afrikanischen Grünaffens
DMEM	Dulbeccos Modifiziertes Adler Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
ECL	verstärkte Chemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
G6D3	mit SGLT1 stabil transfizierte CHO Zellen
Glc	D-Glucose
HDM	mikrosomale Elemente mit hoher Dichte
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]-1-piperazin-N'-ethansulfonsäure
kDa	Kilodalton
$K_i$	Inhibitionskonstante
$K_m$	Affinitätskonstante
KRH	Krebs-Ringer-HEPES
LB-Medium	Nährmedium nach Luria-Bertani
LDM	mikrosomale Elemente mit niedriger Dichte
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MTS	Methanthiosulfonat
MTSEA	2-Aminoethyl-methanthiosulfonat-hydrobromid

MTSES	Natrium-(2-sulfonatethyl)-methanthiosulfonat
MTSET	[2-(Trimethylammonium)ethyl]-methanthiosulfonatbromid
NEAA	Nichtessentielle Aminosäuren
NEM	N-Ethylmaleinimid
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
PAN-3	Antikörper gegen den Carboxyterminus des SGLT1
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchlorid-Lösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PM	Plasmamembranen
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
PS	Petrischale
Pz	Phlorizin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	Substratkonzentration
Sf9	Insektenzelllinie
SGLT1	Natrium/D-Glucose-Cotransporter
TBS	Tris-gepufferte Natriumchlorid-Lösung
TCA	Trichloressigsäure
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
V	Aufnahme in die Zelle
$V_{\max}$	maximale Aufnahme in die Zelle

## 8. Literaturverzeichnis

- Akabas, M. H., Stauffer, D. A., Xu, M., und Karlin, A.** (1992). Acetylcholine receptor channel structure probed in cysteine-substitution mutants. *Science* **258**, 307-310.
- Ausubel, F.M., Brent R., Kingston R.R., Moore, O.D., Smith, J.A., Seidmann, J.G. und Struhl, K.** (1995). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons: New York.
- Birnboim, H. C. und Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**, 1513-1523.
- Birnir, B., Lee, H. S., Hediger, M. A., und Wright, E. M.** (1990). Expression und characterization of the intestinal Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter in COS-7 cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1048**, 100-104.
- Centelles, J. J., Kinne, R. K., und Heinz, E.** (1991). Energetic coupling of Na-glucose cotransport. *Biochimica et Biophysica Acta* **1065**, 239-249.
- Chesnut, J. D., Baytan, A. R., Russell, M., Chang, M. P., Bernard, A., Maxwell, I. H., und Hoeffler, J. P.** (1996). Selective isolation of transiently transfected cells from a mammalian cell population with vectors expressing a membrane anchored single-chain antibody. *Journal of Immunological Methods* **193**, 17-27.
- Coady, M. J., Pajor, A. M., und Wright, E. M.** (1990). Sequence homologies among intestinal und renal Na<sup>+</sup>/glucose cotransporters. *American Journal of Physiology* **259**, C605-C610.
- Desjeux, J.-F.** (1989). *The Metabolic Basis of Inherited Disease: Congenital selective Na<sup>+</sup>, D-glucose cotransport defects leading to renal glycosuria and congenital selective intestinal malabsorption of glucose and galactose*. Band 2., 6. Auflage, McGraw-Hill Verlag: New York, 2463ff.
- Diedrich, D.F.** (1963). The comparative effects of some phlorizin analogs on the renal reabsorption of glucose. *Biochimica et Biophysica Acta* **71**, 688-700.



- Dougherty, D. A.** (1996). Cation- $\pi$  interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. [Review] [66 refs]. *Science* **271**, 163-168.
- Eckert, R.** (1993). Tierphysiologie. 2. Auflage, Thieme Verlag: Stuttgart, 442.
- Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M., und Wall, R.** (1984). Analysis of membrane und surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *Journal of Molecular Biology* **179**, 125-142.
- Gluzman, Y.** (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**, 175-182.
- Golovanevsky, V. und Kanner, B. I.** (1999). The reactivity of the gamma-aminobutyric acid transporter GAT-1 toward sulfhydryl reagents is conformationally sensitive. Identification of a major target residue. *Journal of Biological Chemistry* **274** , 23020-23026.
- Hediger, M. A., Coady, M. J., Ikeda, T. S., und Wright, E. M.** (1987). Expression cloning und cDNA sequencing of the Na<sup>+</sup>/glucose co-transporter. *Nature* **330**, 379-381.
- Hediger, M. A., Turk, E., und Wright, E. M.** (1989). Homology of the human intestinal Na<sup>+</sup>/glucose und Escherichia coli Na<sup>+</sup>/proline cotransporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 5748-5752.
- Hopfer, U.** (1987). Physiology of the Gastrointestinal Tract: Membrane transport mechanisms for hexoses and amino acids in the small intestine. Raven: New York, 1499-1526.
- Ikeda, T. S., Hwang, E. S., Coady, M. J., Hirayama, B. A., Hediger, M. A., und Wright, E. M.** (1989). Characterization of a Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter cloned from rabbit small intestine. *Journal of Membrane Biology* **110**, 87-95.

- Javitch, J. A., Li, X., Kaback, J., und Karlin, A.** (1994). A cysteine residue in the third membrane-spanning segment of the human D2 dopamine receptor is exposed in the binding-site crevice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 10355-10359.
- Joost, H. G. und Weber, T. M.** (1989). The regulation of glucose transport in insulin-sensitive cells. [Review] [102 refs]. *Diabetologia* **32**, 831-838.
- Kanai, Y., Lee, W. S., You, G., Brown, D., und Hediger, M. A.** (1994). The human kidney low affinity Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter SGLT2. Delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose. *Journal of Clinical Investigation* **93**, 397-404.
- Karlin, A. und Akabas, M. H.** (1998). Substituted-cysteine accessibility method. *Methods in Enzymology* **293**, 123-145.
- Kenyon, G. L. und Bruice, T. W.** (1977). Novel sulfhydryl reagents. *Methods in Enzymology* **47**, 407-430.
- Kimmich, G. A. und Randles, J.** (1981). alpha-Methylglucoside satisfies only Na<sup>+</sup>-dependent transport system of intestinal epithelium. *American Journal of Physiology* **241**, C227-C232.
- Kinne, R., Murer, H., Kinne-Saffran, E., Thees, und Sachs, G.** (1975). Sugar transport by renal plasma membrane vesicles. Characterization of the systems in the brush-border microvilli und basal-lateral plasma membranes. *Journal of Membrane Biology* **21**, 375-395.
- Kitlar, T., Doring, F., Diedrich, D. F., Frank, R., Wallmeier, H., Kinne, R. K., und Deutscher, J.** (1994). Interaction of phlorizin, a potent inhibitor of the Na<sup>+</sup>/D-glucose cotransporter, with the NADPH-binding site of mammalian catalases. *Protein Science* **3**, 696-700.
- Lee, W. S., Kanai, Y., Wells, R. G., und Hediger, M. A.** (1994). The high affinity Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. Re-evaluation of function und distribution of expression. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 12032-12039.

- Leyland, M. L., Dart, C., Spencer, P. J., Sutcliffe, M. J. und Stanfield, PR** (1999). The possible role of a disulphide bond in forming functional Kir2.1 potassium channels. *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology* **438**, 778-781.
- Lin, J., Kormanec, J., Homerova, D., und Kinne, R. K.** (1999). Probing transmembrane topology of the high-affinity Sodium/Glucose cotransporter (SGLT1) with histidine-tagged mutants. *Journal of Membrane Biology* **170**, 243-252.
- Lin, J. T., Da Cruz, M. E., Riedel, S., und Kinne, R.** (1981). Partial purification of hog kidney sodium-D-glucose cotransport system by affinity chromatography on a phlorizin polymer. *Biochimica et Biophysica Acta* **640**, 43-54.
- Lin, J. T. und Hahn, K. D.** (1983). Synthesis of [3H]phlorizin und its binding behavior to renal brush-border membranes. *Analytical Biochemistry* **129**, 337-344.
- Lin, J. T., Kormanec, J., Wehner, F., Wielert-Badt, S., und Kinne, R. K.** (1998). High-level expression of Na<sup>+</sup>/D-glucose cotransporter (SGLT1) in a stably transfected Chinese hamster ovary cell line. *Biochimica et Biophysica Acta* **1373**, 309-320.
- Lin, J. T., Stroh, A., und Kinne, R.** (1982). Renal sodium-D-glucose cotransport system. Involvement of tyrosine residues in sodium-transporter interaction. *Biochimica et Biophysica Acta* **692**, 210-217.
- Lin, J. T., Szwarc, K., Kinne, R., und Jung, C. Y.** (1984). Structural state of the Na<sup>+</sup>/D-glucose cotransporter in calf kidney brush-border membranes. Target size analysis of Na<sup>+</sup>-dependent phlorizin binding and Na<sup>+</sup>-dependent D-glucose transport. *Biochimica et Biophysica Acta* **777**, 201-208.
- Lineweaver, H. und Burk, D.** (1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J.Am.Chem.Soc.* **56**, 658-660.
- Loo, D. D., Hirayama, B. A., Gallardo, E. M., Lam, J. T., Turk, E., und Wright, E. M.** (1998). Conformational changes couple Na<sup>+</sup> und glucose transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 7789-7794.

- Lostao, M. P., Hirayama, B. A., Loo, D. D., und Wright, E. M.** (1994). Phenylglucosides und the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter (SGLT1): analysis of interactions. *Journal of Membrane Biology* **142**, 161-170.
- Lotspeich, W. D.** (1961). Phlorizin und the cellular transport of glucose. *Harvey Lect.* **56**, 63-91.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., und Randall, R. J.** (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193** , 265-275.
- Martin, M. G., Turk, E., Lostao, M. P., Kerner, C., und Wright, E. M.** (1996). Defects in Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter (SGLT1) trafficking und function cause glucose-galactose malabsorption. *Nature Genetics* **12**, 216-220.
- Michaelis, L. und Menten, M. L.** (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem.Z.* **49**, 333-369.
- Ohta, T., Isselbacher, K. J., und Rhoads, D. B.** (1990). Regulation of glucose transporters in LLC-PK1 cells: effects of D-glucose und monosaccharides. *Molecular & Cellular Biology* **10**, 6491-6499.
- Ordentlich, A., Barak, D., Kronman, C., Flashner, Y., Leitner, M., Segall, Y., Ariel, N., Cohen, S., Velan, B., und Shafferman, A.** (1993). Dissection of the human acetylcholinesterase active center determinants of substrate specificity. Identification of residues constituting the anionic site, the hydrophobic site, and the acyl pocket. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 17083-17095.
- Oulianova, N. und Berteloot, A.** (1996). Sugar transport heterogeneity in the kidney: two independent transporters or different transport modes through an oligomeric Protein? 1. Glucose transport studies. *Journal of Membrane Biology* **153**, 181-194.
- Panayotova-Heiermann, M., Eskandari, S., Turk, E., Zampighi, G. A., und Wright, E. M.** (1997). Five transmembrane helices form the sugar pathway through the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 20324-20327.

- Panayotova-Heiermann, M., Loo, D. D., und Wright, E. M.** (1995). Kinetics of steady-state currents and charge movements associated with the rat Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 27099-27105.
- Panayotova-Heiermann, M., Loo, D. D. F., Lam, J. T., und Wright, E. M.** (1998). Neutralization of conservative charged transmembrane residues in the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter SGLT1. *Biochemistry* **37**, 10522-10528.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.
- Schneeberger, C., Speiser, P., Kury, F., und Zeillinger, R.** (1995). Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *PCR Methods & Applications* **4**, 234-238.
- Simanis, R.** (1985). *DNA Cloning I: Techniques for Transformation of E.coli*. IRL Press: Oxford, 109-135.
- Smith, C. D., Hirayama, B. A., und Wright, E. M.** (1992). Baculovirus-mediated expression of the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter in Sf9 cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1104**, 151-159.
- Sur, C., Schloss, P., und Betz, H.** (1997). The rat serotonin transporter: identification of cysteine residues important for substrate transport. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **241**, 68-72.
- Thomas, L., Kinne, R., und Frohnert, P. P.** (1972). N-Ethylmaleimide labeling of a phlorizin-sensitive D-glucose binding site of brush border membrane from the rat kidney. *Biochimica et Biophysica Acta* **290**, 125-133.
- Turk, E. und Wright, E. M.** (1997). Membrane topology motifs in the SGLT cotransporter family. [Review] [75 refs]. *Journal of Membrane Biology* **159**, 1-20.
- Turner, R. J. und George, J. N.** (1983). Evidence for two disulfide bonds important to the functioning of the renal outer cortical brush-border membrane D-glucose transporter. *Journal of Biological Chemistry* **258**, 3565-3570.

- Turner, R. J. und George, J. N.** (1984). Characterization of an essential disulfide bond associated with the active site of the renal brush-border membrane D-glucose transporter. *Biochimica et Biophysica Acta* **769**, 23-32.
- Vayro, S., Lo, B., und Silverman, M.** (1998). Functional studies of the rabbit intestinal Na<sup>+</sup>/glucose carrier (SGLT1) expressed in COS-7 cells: evaluation of the mutant A166C indicates this region is important for Na<sup>+</sup>-activation of the carrier. *Biochemical Journal* **332**, 119-125.
- Vayro, S. und Silverman, M.** (1999). PKC regulates turnover rate of rabbit intestinal Na<sup>+</sup>-glucose transporter expressed in COS-7 cells. *American Journal of Physiology* **276**, C1053-C1060.
- Wang, J. B., Moriwaki, A., und Uhl, G. R.** (1995). Dopamine transporter cysteine mutants: second extracellular loop cysteines are required for transporter expression. *Journal of Neurochemistry* **64**, 1416-1419.
- Wells, R. G., Pajor, A. M., Kanai, Y., Turk, E., Wright, E. M., Hediger, und MA.** (1992). Cloning of a human kidney cDNA with similarity to the sodium-glucose cotransporter. *American Journal of Physiology* **263**, F459-F465.
- Wielert-Badt, S.** (1998). Beitrag zur Strukturaufklärung der Substratbindungstasche des Na<sup>+</sup>/D-Glucose-Kotransporters (SGLT1). Dissertation, Universität Dortmund.
- Wielert-Badt, S., Hinterdorfer, P., Gruber, H.J., Lin, J. T., Badt, D., Schindler, H. und Kinne, R. K.-H.** (2000b). Epitope mapping of the Na<sup>+</sup>/D-glucose cotransporter in brush border membranes by recognition force microscopy. *Biophysical Journal*, (eingereicht).
- Wielert-Badt, S., Lin, J. T., Lorenz, M., Fritz, S. und Kinne, R. K.** (2000a). Probing the conformation of the sugar transport inhibitor phlorizin by 2D-NMR, molecular dynamics studies, und pharmacophore analysis. *Journal of Medicinal Chemistry* **43**, 1692-1698.
- Wright, E. M.** (1993). The intestinal Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. [Review] [38 refs]. *Annual Review of Physiology* **55**, 575-589.

- Wright, E. M., Loo, D. D., Panayotova-Heiermann, M., Hirayama, B. A., Turk, E., Eskandari, S., und Lam, J. T.** (1998). Structure und function of the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. [Review] [25 refs]. *Acta Physiologica Scandinavica Supplementum*. **643**, 257-264.
- Xu, M. und Akabas, M. H.** (1993). Amino acids lining the channel of the gamma-aminobutyric acid type A receptor identified by cysteine substitution. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 21505-21508.
- Zottola, R. J., Cloherty, E. K., Coderre, P. E., Hansen, A., Hebert, DN, und Carruthers, A.** (1995). Glucose transporter function is controlled by transporter oligomeric structure. A single, intramolecular disulfide promotes GLUT1 tetramerization. *Biochemistry* **34**, 9734-9747.

## 9. Anhang

```

TGTCGTCGCCGCCGACGCCGCCATGGACAGCAGCACTTTGAGCCCCCTGACCACCTCC
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
          M D S S T L S P L T T S -

ACCGCGCCCCCCTTGAGTCCTATGAGCGCATCCGCAATGCGGCCGACATCTCCGTCATC
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
          T A A P L E S Y E R I R N A A D I S V I -

GTCATCTACTTCTTGGTGGTGATGGCCGTCGGGCTGTGGGCTATGTTTTCCACCAATCGG
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
          V I Y F L V V M A V G L W A M F S T N R -

GGGACGGTCGGAGGCTTCTTCTTGGCGGGTCGGAGTATGGTGTGGTGGCCGATCGGAGCC
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
          G T V G G F F L A G R S M V W W P I G A -

TCTCTGTTTGCCAGTAACATTGGAAGTGGCCACTTTGTGGGGCTGGCCGGGACGGGAGCT
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
          S L F A S N I G S G H F V G L A G T G A -

GCTTCAGGCATTGCCACTGGGGGCTTTGAGTGGAACGCCCTGATCATGGTGGTCGTGCTG
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
          A S G I A T G G F E W N A L I M V V V L -

GGCTGGGTGTTTGTCCCCATTTACATCAGGGCTGGGGTGGTGACGATGCCAGAGTATCTG
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
          G W V F V P I Y I R A G V V T M P E Y L -

CAGAAGCGGTTTGGAGGCAAGAGGATCCAGATCTACCTTTCATTCTGTCCCTGTTGCTC
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
          Q K R F G G K R I Q I Y L S I L S L L L

```



TACATTTTTACCAAGATCTCGGCAGACATCTTTTCCGGAGCCATCTTCATCCAGCTGACC  
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540  
Y I F T K I S A D I F S G A I F I Q L T -  
TTGGGCCTGGATATCTATGTGGCCATCATTATCTTATTGGTCATCACTGGGCTCTACACC  
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600  
L G L D I Y V A I I I L L V I T G L Y T -  
ATCACAGGGGGCTTGGCCGCTGTGATCTACACGGATACCTTGCAGACTGCCATCATGATG  
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660  
I T G G L A A V I Y T D T L Q T A I M M -  
GTGGGCTCTGTGATCCTGACTGGGTTCGCTTTTCCACGAAGTAGGAGGGTACGAGGCCTTC  
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720  
V G S V I L T G F A F H E V G G Y E A F -  
ACGGAGAAGTACATGCGAGCCATTTCCAGCCAGATCTCCTACGAAACACCTCCATCCCA  
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780  
T E K Y M R A I P S Q I S Y G N T S I P -  
CAGAAGTGCTACACCCCAAGGGAAGACGCCTTCCACATCTTCCGAGATGCCATCACTGGG  
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840  
Q K C Y T P R E D A F H I F R D A I T G -  
GACATCCCCTGGCCCGGGCTCGTCTTTGGAATGAGCATCCTCACCTTTGGTACTGGTGC  
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900  
D I P W P G L V F G M S I L T L W Y W C -  
ACTGATCAGGTCAATGTGCAGCGTTGCCTGTCAGCCAAGAAGTGTCCCACGTGAAGGCC  
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960  
T D Q V I V Q R C L S A K N L S H V K A -  
GGCTGCATTCTGTGTGGGTACCTGAAGGTGATGCCTATGTTCCCTCATAGTGATGATGGGG  
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020  
G C I L C G Y L K V M P M F L I V M M G -

ATGGTGAGCCGTATCCTGTACACAGACAAAGTTGCCTGCGTCGTGCCCTCGGAATGTGAG  
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080  
M V S R I L Y T D K V A C V V P S E C E -

AGATACTGTGGCACCAGGGTTGGCTGCACCAACATTGCCTTCCCAACCTTGGTGGTGGAG  
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140  
R Y C G T R V G C T N I A F P T L V V E -

CTGATGCCCAATGGGCTGCGGGGCCTGATGCTGTCCGTCATGATGGCGTCTCTTATGAGC  
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200  
L M P N G L R G L M L S V M M A S L M S -

TCCCTGACCTCCATCTTCAACAGCGCCAGCACCCCTCTTCACCATGGACATCTACACCAAG  
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260  
S L T S I F N S A S T L F T M D I Y T K -

ATCCGGAAGAAAGCATCTGAGAAGGAGCTCATGATCGCAGGAAGTTGTTTCATGCTGTTC  
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320  
I R K K A S E K E L M I A G R L F M L F -

CTGATTGGCATCAGCATCGCCTGGGTGCCCATTTGTGCAGTCAGCCCAGAGTGGGCAGCTC  
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380  
L I G I S I A W V P I V Q S A Q S G Q L -

TTTGATTACATCCAGTCCATCACCAGTTACTTGGGGCCGCCATTGCTGCTGTCTTCTCTG  
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440  
F D Y I Q S I T S Y L G P P I A A V F L -

CTTGCTATTTTCTGGAAGAGAGTCAACGAGCCTGGAGCCTTTTGGGGGCTGGTCCTCGGA  
1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500  
L A I F W K R V N E P G A F W G L V L G -

TTTCTGATTGGGATTTCCCGTATGATTACCGAGTTTGCCTATGGAACCGGGAGCTGCATG  
1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560  
F L I G I S R M I T E F A Y G T G S C M -  
GAACCCAGCAACTGCCCCACGATTATTTGTGGTGTGCACTACTTGTACTTTGCCATCATC  
1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620  
E P S N C P T I I C G V H Y L Y F A I I -  
CTCTTTGTCATTAGTATCATCACCGTTGTGGTTGTCTCCCTCTTCACCAAGCCCATTCCA  
1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680  
L F V I S I I T V V V V S L F T K P I P -  
GATGTGCATCTCTATCGTCTGTGCTGGAGCCTACGTAATAGCAAAGAGGAGCGCATTGAC  
1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740  
D V H L Y R L C W S L R N S K E E R I D -  
TTGGATGCAGGAGAGGAAGACATTCAAGAAGCTCCAGAGGAGGCCACTGACACAGAAGTT  
1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800  
L D A G E E D I Q E A P E E A T D T E V -  
CCTAAGAAGAAGAAAGGATTCTTCAGGCGGGCCTATGACCTGTTTTGTGGGCTGGACCAG  
1801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1860  
P K K K K G F F R R A Y D L F C G L D Q -  
GATAAGGGACCCAAGATGACCAAGGAGGAGGAGGCTGCCATGAAGCTGAAGCTCACAGAC  
1861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1920  
D K G P K M T K E E E A A M K L K L T D -  
ACCTCCGAGCACCTCTGTGGAGGACCGTGGTGAACATCAACGGTGTGCATCTTGCTGGCC  
1921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1980  
T S E H P L W R T V V N I N G V I L L A -  
GTGGCTGTCTTCTGCTACGCGTACTTTGCCTGAGTCCCGGCCGCTGCTGCCACTCGGCAA  
1981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2040  
V A V F C Y A Y F A

---

GGCTGGCGTGTGTACTCTCTGCCTGCCTTTCATCCCATGCTGCGGTGGCGAAGGGGAATC  
2041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2100

AATCCCTTGCAAAGTTTGCCCCATTTGGATAAATGTCTATATGTAAATTACAGGCTGGTT  
2101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2160

GGAGGAA  
2161 -----+-----+-----+-----+----- 2207

*Abb. 39: Sequenz des renalen Natrium/D-Glucose-Cotransporters*

## Lebenslauf

Name: Myriam Kasch

Geburtsdatum: 7. November 1971

Geburtsort: Düsseldorf

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung: Kartause-Hain-Grundschule, Düsseldorf  
1978 bis 1982  
Suitbertus-Gymnasium, Düsseldorf  
1982 bis 1991, Abitur

Studium: Pharmazie an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf  
Oktober 1991 bis September 1996  
(Abschluß: 2. Staatsexamen)

Ausbildung: Mozart Apotheke, Düsseldorf  
November 1996 bis April 1997

Apotheke der Krankenhaus Mörsenbroich-Rath GmbH,  
Düsseldorf  
Mai 1997 bis Oktober 1997

Abschluß: 3. Staatsexamen, November 1997  
Erhalt der Approbation zur Apothekerin, Dezember 1997

Dissertation: Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund  
Abteilung Epithelphysiologie, seit 01. Januar 1998