

Genetische Defekte im renalen
Cystintransport und
ihre Bedeutung für die Cystinurie

DISSERTATION

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

vorgelegt von
Christa Schmidt
aus Ebern

2004

Tag der mündlichen Prüfung: 27.02.2004
Dekan: Prof. Dr. Hans-Ulrich Schnitzler
1. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Thomas Eggermann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Nikolaus Blin

Abkürzungsverzeichnis
Tabellenverzeichnis
Abbildungsverzeichnis

I.	Einleitung	1
II.	Grundlagen	3
1.	Krankheitsbild und Genetik der Cystinurie	3
1.1	Häufigkeit	3
1.2	Klinik	4
1.3	Diagnose	4
1.4	Metaphylaxe und Therapie	5
1.5	Klassifizierung	6
1.6	Manifestationsalter	9
2.	Molekularbiologie des renalen Cystintransports	9
2.1	Genetik des Cystintransporters rBAT/b ^{0,+} AT	12
2.1.1	SLC3A1-Gen	12
2.1.2	SLC7A9-Gen	14
2.2	Funktionsweise des Transporters rBAT/b ^{0,+} AT	15
2.3	Weitere Kandidatengene	17
2.3.1	SLC7A10-Gen	19
2.3.2	SLC7A8-Gen	20
2.3.3	SLC1A1-Gen	20
III.	Material und Methoden	21
1.	Arbeitsmaterial	21
1.1	Kollektive	21
1.1.1	Patientenkollektiv	21
1.1.2	Kontrollkollektive	22
1.2	Geräte und Arbeitsutensilien	23
1.3	Reagenzien und Materialien	24
1.3.1	Chemikalien	24
1.3.2	Feinchemikalien und Enzyme	24
1.3.3	Oligonukleotide	25
1.3.4	Materialien und Reagenzien zur Zellkultur	26
2.	Methoden	26
2.1	DNA-Isolation	26
2.2	Mutationsnachweis in den Genen SLC3A1 und SLC7A9	27
2.2.1	Unspezifischer Mutationsnachweis mittels SSCP (Single strand conformation polymorphism)	27
2.2.2	Direkter Mutationsnachweis	27
2.2.2.1	Sequenzierung	28
2.2.2.2	Restriktionsanalysen	28
2.2.2.3	Real-time PCR und Detektion eines Junctionfragments im SLC3A1-Gen	29
2.2.2.3.1	Quantitative Restriktionsanalysen	29
2.2.2.3.2	Kopplungsanalysen der Loci D2S2298 und D2S2291 unter Duplikationsträgern und Kontrollen	30
2.3	Kopplungsanalyse	30
2.3.1	Short tandem repeats (STRs)	31

2.3.2	Sequenzierung	32
2.4	Detektion und statistische Analyse der Polymorphismen im SLC7A9-Gen	32
2.5	Spleißanalysen	33
2.5.1	Erzeugung des Inserts	35
2.5.2	Klonierung und Transformation	36
2.5.3	Plasmid-Isolation	37
2.5.4	Zellkultur	38
2.5.5	Transfektion	38
2.5.6	RNA-Isolation	39
2.5.7	RT-PCR und cDNA-Analysen	39
2.5.8	Analyse der <i>Aceview</i> -Datenbank der NCBI	40
2.5.8.1	Untersuchung möglicher Spleiß-Enhancer mittels der ESEfinder Software	40
IV.	Ergebnisse	42
1.	Mutationsnachweis in den Genen SLC3A1 und SLC7A9	42
1.1	Unspezifischer Mutationsnachweis mittels SSCP	42
1.2	Direkter Mutationsnachweis	43
1.3	Ergebnisse des Mutationsscreenings	43
1.4	Untersuchung der Promoter-Region des SLC3A1-Gens	46
1.5	Quantitative Analysen der Gene SLC3A1 und SLC7A9	46
1.5.1	Quantitative Analysen mittels real-time PCR	46
1.5.2	Quantitative Restriktionsanalysen	49
1.5.3	Kopplungsanalysen der Loci D2S2298 und D2S2291 unter Duplikationsträgern und Kontrollen	50
1.6	Diagnostisches Schema	52
1.7	Gesamtmutationsdetektionsraten in den Genen SLC3A1 und SLC7A9	54
2.	Populationsspezifische Mutationsverteilung und Detektionsraten	54
3.	Kopplungsanalysen	56
3.1	Ergebnisse der Kopplungsanalysen	56
3.2	Analyse der Kandidatengene SLC7A10 und SLC7A8 mittels Sequenzierung	57
4.	Molekulare Charakterisierung von Polymorphismen im SLC7A9-Gen	57
4.1	Allelverteilungen und statistische Analysen	58
5.	Spliceuntersuchungen in Säugerzellen	58
5.1	Klonierung von <i>Minigene</i> -Fragmenten und Detektion unterschiedlicher Spleißvarianten	59
5.2	Analyse der <i>Aceview</i> -Datenbank der NCBI	62
5.3	Untersuchung möglicher Spleiß-Enhancer mittels der ESEfinder Software	64
V.	Diskussion	66
1.	Patientenkollektiv	66
2.	Mutationsspektrum in den Genen SLC3A1 und SLC7A9	68
2.1	Analyse der Promoter-Region des SLC3A1-Gens	68
2.2	Detektion genomischer Rearrangements in den Genen SLC3A1	

	und SLC7A9	69
2.2.1	Duplikation im SLC3A1-Gen	69
2.2.2	Analyse des SLC7A9-Gens mittels real-time PCR	72
2.2.3	Mutationsdetektionsrate mittels real-time PCR	72
2.3	Neu identifizierte Punktmutationen	72
2.4	Gesamtmutationsdetektionsraten in den Genen SLC3A1 und SLC7A9	73
2.5	Diskussion zur Rolle weiterer Faktoren in der Pathogenese der Cystinurie	74
3	Populationspezifische Mutationsverteilung	75
3.1	Mutationsverteilung im SLC3A1-Gen	75
3.2	Mutationsverteilung im SLC7A9-Gen	76
4.	Anwendung des diagnostischen Schemas	76
5.	Typisierung und Mutationen in den Genen SLC3A1 und SLC7A9	77
6.	Weitere Kandidatengene der Cystinurie	78
7.	Isolierte Cystinurie	79
8.	Polymorphismen im SLC7A9-Gen	79
8.1	Allelverteilung der Varianten unter Patienten und Kontrollen	80
8.2	Spleißanalysen zu Varianten im SLC7A9-Gen	80
8.2.1	Durchführung der Klonierungsexperimente	81
8.2.2	Detektion verschiedener Splicevarianten	81
8.2.2.1	Spleißvarianten der Konstrukte B und B2	82
8.2.2.2	Spleißvarianten des Konstrukts C	83
VI.	Zusammenfassung	85
VII.	Literaturverzeichnis	87
1.	Zitierte Literatur	87
2.	Eigene Publikationen	96
2.1	Manuskripte	96
2.2	Kongressbeiträge	97
3.	Verwendete Datenbanken	98
VIII.	Anhang	99
1.	Tabellen	99
2.	Abbildungen	119
Danksagung		
Lebenslauf		
Erklärung		

Abkürzungsverzeichnis

<i>4F2hc</i>	<i>4F2 heavy chain</i>
ASC1	<i>asc-type amino acid transporter 1</i>
<i>b^{0,+}AT</i>	<i>b^{0,+} amino acid transporter</i>
bp	Basenpaare
CMV	Cytomegalie-Virus
EAAC1	<i>Excitatory amino acid carrier 1</i>
EAAT	<i>Excitatory amino acid transport</i>
EDTA	<i>Ethyldiamintetracitrat</i>
ESE	<i>Exonic splicing enhancer</i>
ESWL	<i>Extrakorporale Stoßwellen-Lithotripsie</i>
FKS	Fötale Kälberserum
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
ICC	<i>International cystinuria consortium</i>
kb	Kilobasenpaare
LAT2	<i>L-type amino acid transporter 2</i>
LB	Luria und Bertani
MEM	<i>Modified Eagle medium</i>
MIM	<i>Mendelian inheritance in man</i>
NCBI	<i>National center for biotechnology information</i>
OMIM	<i>Online mendelian inheritance in man</i>
p.a.	per analysis
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
<i>rBAT</i>	related to <i>b^{0,+}</i> amino acid transport
RT-PCR	<i>Reverse transcription PCR</i>
SLC1A1	<i>Solute carrier family 1, member 1</i>
<i>SLC3A1</i>	<i>Solute carrier family 3, member 1</i>
<i>SLC7A8</i>	<i>Solute carrier family 7, member 8</i>
<i>SLC7A9</i>	<i>Solute carrier family 7, member 9</i>
<i>SLC7A10</i>	<i>Solute carrier family 7, member 10</i>
<i>SR-Proteine</i>	serine/arginine-rich <i>RNA</i> -binding proteins
SSCP	Single strand conformation polymorphism analysis
STR	<i>Short tandem repeat</i>
T _A	Annealing-Temperatur
TE	Tris-EDTA
y ⁺ LAT1	<i>y⁺L amino acid transporter 1</i>
y ⁺ L	<i>amino acid transporter exchanging dibasic (+) amino acids (sodium-indepentent) against large neutral amino acids cotransportes with sodium</i>

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Seite 7
Tabelle 2	Seite 19
Tabelle 3	Seite 31
Tabelle 4	Seite 33
Tabelle 5	Seite 35
Tabelle 6	Seite 36
Tabelle 7	Seite 36
Tabelle 8	Seite 39
Tabelle 9	Seite 40
Tabelle 10	Seite 44
Tabelle 11	Seite 44
Tabelle 12	Seite 50
Tabelle 13	Seite 51
Tabelle 14	Seite 51
Tabelle 15	Seite 52
Tabelle 16	Seite 53
Tabelle 17	Seite 53
Tabelle 18	Seite 55
Tabelle 19	Seite 59
Tabelle 20	Seite 65
Tabelle 21	Seite 66

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Seite 10
Abbildung 2	Seite 11
Abbildung 3	Seite 13
Abbildung 4	Seite 14
Abbildung 5	Seite 47
Abbildung 6	Seite 47
Abbildung 7	Seite 34
Abbildung 8	Seite 63
Abbildung 9	Seite 48
Abbildung 10	Seite 49
Abbildung 11	Seite 60
Abbildung 12	Seite 61
Abbildung 13	Seite 61
Abbildung 14	Seite 62
Abbildung 15	Seite 62
Abbildung 16	Seite 64
Abbildung 17	Seite 64
Abbildung 18	Seite 67
Abbildung 19	Seite 71

I. Einleitung

Die Cystinurie beruht auf einer Störung des transepithelialen Transports von Cystin und den dibasischen Aminosäuren Ornithin, Lysin und Arginin im proximalen Nierentubulus. Die verminderte renale Rückresorption der Aminosäuren sowie die geringe Löslichkeit des Cystins im Urin resultieren in der rezidivierenden Bildung von Nierensteinen verbunden mit verschiedenen Komplikationen.

Die Cystinurie ist eine der häufigsten genetischen Erkrankungen weltweit, die Prävalenz liegt bei ca. 1:7.000 (Levy 1973). Unter allen Nierensteinerkrankungen macht die Cystinurie ca. 1-2 % aus, unter Kindern ca. 4-5 % (Stapleton et al. 1987).

Derzeit wird die Cystinurie anhand der Cystin-Konzentrationen im Urin heterozygoter Anlageträger in zwei Typen unterteilt. Die Typ I-Cystinurie wird hauptsächlich durch Mutationen im SLC3A1-Gen verursacht, während die nicht-Typ I-Cystinurie durch Mutationen im SLC7A9-Gen bedingt ist. Beide Gene kodieren für jeweils eine Untereinheit des heterodimeren Aminosäuretransporters rBAT/b^{0,+}AT, der in der apikalen Membran der Nierenepithelzellen lokalisiert ist. Aufgrund der unterschiedlichen Expression beider Gene entlang des proximalen Tubulus wird vermutet, dass weitere Bindungspartner der Proteine existieren (Chairoungdua et al. 1999).

In den Genen SLC3A1 und SLC7A9 ist bereits eine Vielzahl von Mutationen bekannt. Dennoch schwanken die Detektionsraten für Mutationen in beiden Genen je nach verwendeter Methodik sowie ethnischer Herkunft und Klassifizierung der Patienten. Darüber hinaus deuten die wenig ausgeprägte Genotyp-Phänotyp-Korrelation sowie physiologische Daten auf eine Beteiligung weiterer Faktoren an der Pathogenese der Cystinurie hin.

Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit lautete, inwieweit verschiedene Mutationstypen in den bekannten Genen (Deletionen, Duplikationen, Mutationen in der Promoter-Region) und weiteren Kandidatengenen an der Entstehung der Erkrankung beteiligt sind.

Um das Patientenkollektiv auf Deletionen und Duplikationen in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 hin untersuchen zu können, die mittels der gebräuchlichen Methoden

des Mutationsscreenings nicht detektiert werden können, wurde hier das Verfahren der quantitativen real-time PCR etabliert.

Darüber hinaus wurde die Promoter-Region des SLC3A1-Gens auf Mutationen hin untersucht.

Mittels Kopplungsstudien sollte geklärt werden, ob weitere Gene an der Erkrankung beteiligt sind. Hierzu wurden Familien analysiert, bei denen bisher keine Mutationen in bekannten Genen detektiert werden konnten. Ausgesuchte Kandidatengene wurden mittels direkter Sequenzierung analysiert.

Um die klinische Diagnose der Cystinurie molekulargenetisch zu sichern, sollte ausgehend von der Häufigkeit einzelner Mutationen ein diagnostisches Schema erstellt werden, anhand dessen, ähnlich wie bei der Cystischen Fibrose, die Vielzahl der häufigen Mutationen schnell und kostengünstig bestimmt werden kann. Weiterhin wurde die populationsspezifische Mutationsverteilung in beiden Genen analysiert.

Im weiteren Teil der Arbeit wurde die Auswirkung einzelner Polymorphismen im SLC7A9-Gen auf die Ätiologie der Erkrankung untersucht. Zunächst wurden die Frequenzen der Varianten bestimmt und mit einem einheitlichen Kontrollkollektiv verglichen. Ausgehend von der statistisch signifikant unterschiedlichen Verteilung einzelner Polymorphismen unter Patienten und Kontrollpersonen sollte die Konsequenz einzelner Varianten auf das Spleißen untersucht werden.

II. Grundlagen

1. Krankheitsbild und Genetik der Cystinurie

Die Cystinurie (MIM 220100) ist eine erblich bedingte Störung des transepithelialen Aminosäuretransports in Niere und Dünndarm. Aufgrund eines Transporterdefekts ist die Reabsorption der Aminosäuren Cystin, Arginin, Lysin und Ornithin gestört. Durch die geringe Löslichkeit des Cystins im Urin kommt es zur Bildung von Nierensteinen. Bei der Erkrankung steht die Resistenz und Rekurrenz der Steine im Vordergrund, deren Auswirkungen zur Nephrolithiasis führen und unbehandelt letal enden können. Die Cystinurie ist eine Erkrankung, deren genetische Ursachen im Vergleich zu anderen Nierensteinerkrankungen zu einem relativ großen Teil bekannt sind. Bisher konnten Defekte des renalen Aminosäuretransporters rBAT/b^{0,+}AT als Krankheit verursachend ermittelt werden. Der Transporter ist ein Heterodimer und wird von den Genen SLC3A1 und SLC7A9 kodiert. Das SLC3A1-Gen kodiert die schwere Untereinheit rBAT, das SLC7A9-Gen die leichte Untereinheit b^{0,+}AT. Mutationen in beiden Genen verursachen die Erkrankung.

1.1 Häufigkeit

Mit einer Frequenz von 1:7.000 weltweit ist die Cystinurie eine der häufigsten genetischen Erkrankungen (Levy 1973). Abhängig von der ethnischen Herkunft der Patienten weist die Erkrankung eine erhebliche Spannbreite in ihrer Häufigkeit auf: Diese reicht von 1:2.500 unter israelischen Juden libyschen Ursprungs bis 1:100.000 in Schweden (Bostrom und Hambræus 1964, Weinberger et al. 1974).

Die Cystinurie macht unter den bei ca. 15 % der Erwachsenen auftretenden Nierensteinerkrankungen ca. 1-2 % aus. Etwa 4-5 % aller Kinder mit Nierensteinen leiden unter Cystinurie (Stapleton et al. 1987). Die Erkrankung tritt in beiden Geschlechtern mit gleicher Frequenz auf, männliche Patienten sind aufgrund der Anatomie des Harntraktes schwerer betroffen (Dahlberg et al. 1977, Segal und Thier 1995).

1.2 Klinik

Die Ursache der Erkrankung ist die defekte Rückresorption von Cystin und den dibasischen Aminosäuren Ornithin, Alanin und Lysin durch die Bürsteneithelzellen im proximalen Nierentubulus (Yeh et al. 1947, Dent und Rose 1951, Harris et al. 1955). Das Disulfid Cystin ist die oxidierte extrazelluläre Form der freien Aminosäure Cystein (Baumann 1883, Crawhall und Segal 1967). Aufgrund der geringen Löslichkeit des Cystins bei pH-Werten unter 8,0, wie sie im Urin vorliegen, kommt es zur Präzipitation und Steinbildung im distalen Tubulus bei Cystinkonzentrationen von >300mg/g Kreatinin (Dahlberg et al. 1977, Segal und Thier 1995).

Bei Patienten mit Cystinurie liegt die Cystinkonzentration im Urin bei einem pH-Wert von 7,5 bei >500mg/g Kreatinin. Die der Steinbildung nachfolgenden Symptome schließen Koliken, Harntrakt-Infektionen, obstruktive Uropathien und Pyelonephritiden ein, die letztendlich bei 17 % der Patienten zur Niereninsuffizienz führen (Dahlberg et al. 1977, dello Strologo et al. 2002). Bei ca. 70 % der Patienten ist die Nierenfunktion herabgesetzt (Lindell et al. 1997). Unbehandelt ist die Lebenserwartung herabgesetzt (zur Übersicht: Albers et al. 2001).

Etwa die Hälfte der Steine besteht aus reinem Cystin, die übrigen enthalten variierende Mengen an Kalziumsalzen (Stephens 1989).

Zu den möglicherweise modulierenden Faktoren zählen die Hypocitraturie, Hyperurikämie, Hyperurikosurie und Hypercalcurie (zur Übersicht: Botzenhart et al. 2002). Der Einfluss dieser Faktoren ist derzeit unklar.

Der intestinale Defekt der Absorption von Cystin und den dibasischen Aminosäuren verursacht keine Pathologie, da die Oligopeptid-Absorption im Dünndarm die Versorgung mit essentiellen Aminosäuren gewährleistet (Hellier et al. 1970, Silk 1974).

1.3 Diagnose

Brodehl (1975) berichtete, dass Neugeborene eine herabgesetzte Resorption von Cystin und den dibasischen Aminosäuren aufweisen und postulierte, dass die Resorptionskapazität später heranreift. Scriver et al. (1985) beobachteten, dass 730 von 339.868 Neugeborenen erhöhte Aminosäurewerte aufwiesen, die sich aber später in nur 191 Fällen bestätigten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass bei im

Alter von sechs Monaten als nicht-Typ I-heterozygot typisierten Kindern die Aminosäure-Exkretion mit zunehmendem Alter abnahm und die Werte der Eltern erreichte.

Somit sollte sowohl die endgültige Diagnose der Cystinurie als auch die Differenzierung zwischen heterozygot und homozygot erst nach Beendigung des ersten Lebensjahres durchgeführt werden.

Das einfachste Verfahren zur Cystinurie-Diagnostik ist die mikroskopische Beurteilung des Harnsediments. Präzipitiertes Cystin ist in Form hexagonaler Kristalle sichtbar. Liegen bereits Steine vor, können auch eine Röntgendiffraktometrie oder eine Steinanalyse zur Diagnosesicherung beitragen.

Häufig findet der Cyanid-Nitroprussid-Test in der Diagnostik Anwendung (Brand et al. 1930, Lewis 1932). Das im Urin enthaltene Cystin wird qualitativ nachgewiesen, indem es mittels Cyanid zu Cystein reduziert wird und sich die Lösung in Anwesenheit von Nitroprussid rot verfärbt. Aufgrund verschiedener Interpretationsschwierigkeiten des Tests ist aber die Erstellung eines Aminosäureprofils bei Verdacht auf Cystinurie vorzuziehen. Hierbei wird die Konzentration von Cystin und den dibasischen Aminosäuren Ornithin, Lysin und Arginin im Urin der Patienten bestimmt. Am gebräuchlichsten unter den chromatographischen Verfahren ist die HPLC-Analyse aus 24-Stunden-Sammelurin (Birwe und Hesse 1991).

1.4 Metaphylaxe und Therapie

Aufgrund der hohen Rekurrenz der Steine steht die Metaphylaxe im Vordergrund der Therapie. Ziel ist es, die Exkretion des Cystins zu verringern und dessen Löslichkeit zu verbessern. Dies soll erreicht werden, indem die relative Konzentration des Cystins im Urin gesenkt wird. Die Metaphylaxe setzt sich aus diätetischen und medikamentösen Maßnahmen zusammen (Dent und Senior 1955).

Da Cystin aus der essentiellen Aminosäure Methionin gebildet wird, wird Cystinurikern empfohlen, die Aufnahme von tierischem Eiweiß zu verringern. Außerdem wird vorgeschlagen, auf salzarme Kost zu achten. Die diätetischen Maßnahmen zeigten bisher lediglich begrenzt Erfolg.

Im Vordergrund der Therapie steht, die Löslichkeit des Cystins zu verbessern. Dies wird durch ein tägliches Harnvolumen von mindestens 3l angestrebt (Dent und Senior 1955, Barbey et al. 2000). Damit wird die relative Konzentration des Cystins im Harn herabgesetzt, es kommt seltener zur Präzipitation. Dent et al. (1965) konnten in einer follow-up-Studie zeigen, dass die Therapie mittels regelmäßiger und hoher Flüssigkeitszufuhr in über 80 % der Patienten erfolgreich ist.

Durch Gabe harn-alkalisierender Mittel wie Kaliumcitrat wird der pH-Wert des Urins auf >7,5 erhöht, um eine verbesserte Löslichkeit des Cystins zu gewährleisten (Dent und Senior 1955).

Um bereits bestehende Kristalle und Steine bei Patienten mit hohen Cystinwerten aufzulösen, werden Thiolderivate (z.B. D-Penicillamin, Tiopronin oder α -Mercaptopropionylglycin) eingesetzt (Pak et al. 1986). Diese spalten Cystin in zwei Cystein-Moleküle und binden mit einem Cystein-Molekül ein leicht lösliches Disulfid. So wird die Konzentration des freien Cystins im Urin um ca. 30 % gesenkt (Crawhall et al. 1963, Barbey et al. 2000).

Der Erfolg der Thioltherapie ist stark von der Compliance der Patienten abhängig (Parks et al. 2001). In Anbetracht der zahlreichen Nebenwirkungen, die bei 40-50 % der Patienten auftreten, ist die Therapie mittels Thiolderivaten für viele Patienten nicht akzeptabel. Viele Patienten brechen die Behandlung trotz Therapieerfolg ab (Dahlberg et al. 1977, Barbey et al. 2000, Pietrow et al. 2003).

Cystinsteine lassen sich nur schlecht mittels extrakorporaler Stoßwellen-Lithotripsie (ESWL) zertrümmern. Da die Rezidivrate sehr hoch ist (50-80 % der Patienten) und die Steine oft groß sind, sind häufig invasive Eingriffe zur Steinentfernung notwendig (Kelly und Nolan 1980, Hernandez-Graulau et al. 1989, Barbey et al. 2000).

1.5 Klassifizierung

Anhand von Aminosäureprofilen aus dem Urin obligat Heterozygoter können drei verschiedene Typen der Cystinurie abgegrenzt werden (Rosenberg et al. 1966a). Die Typen II und III werden aufgrund biochemischer und genetischer Befunde zur nicht-Typ I-Cystinurie zusammengefasst.

Die Typ I-Cystinurie folgt einem autosomal-rezessivem Erbgang, Heterozygote zeigen eine normal Aminoazidurie (0-100µmol Cystin/g Kreatinin, Tabelle 1) (Harris et al. 1955, Goodyer et al. 1998). Etwa 2/3 aller Patienten fallen in diese Gruppe (Harris et al. 1955).

Im Gegensatz dazu weisen die nicht-Typ I- Heterozygote eine moderate bis hohe Exkretion von Cystin und Lysin auf (Rosenberg 1966c). Heterozygote für Typ II weisen stark erhöhte Cystinwerte auf (>990µmol Cystin/g Kreatinin), während die Werte bei Typ III-Heterozygoten lediglich moderat erhöht sind (100-600µmol Cystin/g Kreatinin, Tabelle 1) (Rosenberg et al. 1966a). Bereits Harris et al. (1955) postulierten für diesen Typ einen inkomplett rezessiven Erbgang für Familien, in denen Heterozygote erhöhte Cystinwerte aufwiesen und Steine ausbildeten. Pras et al. (1998a) zeigten, dass 10 % der nicht-Typ I-Patienten mit Steinbildung als heterozygot klassifiziert sind. Unter den als heterozygot klassifizierten zeigen 13 % Steinbildung. Nur bei Heterozygotie für Typ II ist die Cystinexkretion hoch genug, um eine Steinbildung hervorzurufen. Da alle nicht-Typ I-Anlageträger den biochemischen Phänotyp entwickeln, wurde für diese Form ein autosomal-dominanter Erbgang mit inkompletter Penetranz formuliert.

Klassifizierung	Typ I/-	Typ II/-	TypIII/-
Cystin [µmol/g Kreatinin]	0-100	990-1740	100-600
Cystin-Plasma-Spiegel	niedrig	niedrig	normal

Tabelle 1: Cystinwerte im Urin Heterozygoter sowie Plasma-Cystin-Spiegel zur Klassifizierung nach Rosenberg et al. 1966b und Goodyer et al. 1998.

Homozygote Patienten für beide Typen sowie gemischt Heterozygote (Typ I/nicht-TypI) können anhand der Aminosäureprofile aus Urin nicht unterschieden werden (Rosenberg 1966c). Diese Unterscheidung ist erst nach oralen Belastungstests mit Cystin und Lysin möglich (Pras et al. 1998a):

Typ III-Homozygote unterscheiden sich von Typ I- und Typ II-Homozygoten, indem sie erhöhte Cystin-Plasma-Spiegel aufweisen, die fast den normalen Werten entsprechen (Rosenberg et al. 1966b, Tabelle 1).

Bei Typ I- und Typ II-Homozygoten scheint der intestinale Transportmechanismus für die dibasischen Aminosäuren zu fehlen bzw. defekt zu sein, die Plasma-Cystin-Werte sind nicht erhöht. Bei Typ III-Homozygoten ist der intestinale Transportmechanismus

intakt. Die quantitative Analyse der dibasischen Aminosäuren untermauert diese Unterteilung (Crawhall et al. 1966).

Klinisch sind die verschiedenen Typen nicht zu unterscheiden.

Aufgrund der neueren molekulargenetischen Befunde wurde die Unterteilung der Cystinurie in Typ I und nicht-Typ I verifiziert: Mutationen im SLC3A1-Gen sind mit Typ I assoziiert, Mutationen im zweiten bekannten Gen SLC7A9 wurden bisher mit dem dominanten nicht-Typ I assoziiert (Calonge et al. 1994, Bisceglia et al. 1997). Hierbei können die gleichen Mutationen in SLC7A9 sowohl Typ II als auch Typ III verursachen (Bisceglia et al. 1997, ICC 1999). Dello Strologo et al. (2002) identifizierten kürzlich jedoch auch Mutationen in SLC7A9, die mit dem Typ I-Allel der Patienten in Verbindung stehen. Auch Leclerc et al. (2002) detektierten in einer Genotyp-Phänotyp-Studie Mutationen im SLC7A9-Gen in allen drei Typen der Cystinurie. Mutationen in SLC7A9 scheinen somit ein sehr breites Spektrum an Cystin-Werten im Urin zu verursachen; der gebräuchlichen Klassifizierung nach wären die Anlageträger dieser Mutationen als heterozygot für die Typ I-Cystinurie eingestuft worden.

Dello Strologo et al. (2002) stellten fest, dass 14 % der molekulargenetisch nachgewiesenen Anlageträger für nicht-Typ I mit einer Mutation im SLC7A9-Gen eine Cystinausscheidung im Normbereich aufweisen. Diese Patienten werden nach der traditionellen Klassifizierung dem Typ I zugeordnet. Infolge dieser Diskrepanzen zwischen Mutationen in SLC3A1 und SLC7A9 sowie der jeweiligen Typisierung wurde eine Modifizierung der biochemischen Klassifizierung in die Typen A und B vorgeschlagen. Typ A umfasst demnach Patienten mit zwei Mutationen im SLC3A1-Gen, Typ B Patienten mit zwei Mutationen im SLC7A9-Gen. Typ AB stellt die gemischt heterozygote Form der Cystinurie dar, bedingt durch jeweils eine Mutation in SLC3A1 und SLC7A9. 45,2 % aller molekulargenetisch klassifizierten Patienten sind als Typ A eingeordnet, 53,2 % als B. Nur 1,6 % sind gemischt heterozygot Typ AB (dello Strologo et al. 2002).

Wird bei einem Patienten molekulargenetisch keine Mutation detektiert, kann diese rein genetische Typisierung allerdings nicht durchgeführt werden.

1.6 Manifestationsalter

Als Manifestationsalter der Cystinurie gilt allgemein das Alter, in dem die ersten Steine auftreten. Während 25 % der Betroffenen bereits in der ersten Lebensdekade Steine aufweisen, werden die meisten in der zweiten oder dritten Lebensdekade auffällig (Halperin und Thier 1980, Stephens et al. 1989). Nur ca. 10 % zeigen nach dem 30. Lebensjahr erste Symptome. Eine umfangreiche Studie von dello Strologo et al. (2002) zeigt, dass 82,9 % der Patienten bereits vor dem 30. Lebensjahr Steine bilden.

Es wurde angenommen, dass Patienten mit Typ I Cystinurie gegenüber nicht-Typ I-Patienten einen schwereren Phänotyp mit einem früheren Manifestationsalter aufweisen. Goodyer et al. (1998) zeigten, dass 50 % der homozygoten Typ I-Patienten bereits in ihrer ersten Lebensdekade Steine bilden, während Patienten, die homozygot für nicht-Typ I bzw. gemischt heterozygot für Typ I/nicht-Typ I sind, in diesem Stadium lediglich erhöhte Cystinwerte im Urin aufweisen. Pras et al. (1998a) beschrieben, dass als heterozygot nicht-Typ I klassifizierte Patienten mit Steinbildung ein späteres Manifestationsalter aufwiesen. Dello Strologo et al. (2002) konnten keinen Unterschied im Manifestationsalter und Schweregrad zwischen Typ I und nicht-Typ I feststellen. Auch zwischen männlichen und weiblichen Patienten gab es das Manifestationsalter betreffend keinen Unterschied, allerdings sind männliche Patienten stärker betroffen als weibliche. Dies ist vermutlich unter anderem durch die anatomischen Gegebenheiten zu erklären.

Da der Phänotyp bei gleichen Mutationen stark variiert, ist die Bestimmung des tatsächlichen Manifestationsalters in Abhängigkeit der vorliegenden Mutationen allerdings schwierig.

2. Molekularbiologie des renalen Cystintransports

Aus dem Primärharn werden mehr als 98 % der Aminosäuren durch aktive Transportmechanismen während der Passage durch das proximale Nephron reabsorbiert. Die Mehrzahl der Aminoacidurien entsteht dadurch, dass ein extrarenaler metabolischer Defekt zur Akkumulation von Aminosäuren im Plasma führt. Von dort aus werden sie im Nephron resorbiert, die vorliegenden Mengen überschreiten aber die Resorptionskapazität des Nephrons.

Die Cystinurie stellt im Gegensatz dazu eine Erkrankung des tubulären Transports dar. Hierbei sind die Plasmaspiegel der Aminosäuren nicht oder nur leicht erhöht, die Filtrationsraten der Aminosäuren sind herabgesetzt (Dent et al. 1954). Bei der Cystinurie ist die Rückresorption der Aminosäuren Cystin, Ornithin, Lysin und Arginin defekt (Fox et al. 1964).

Für den renalen Cystintransport sind bisher zwei Mechanismen beschrieben worden (Segal et al. 1977, Foreman et al. 1980):

Funktionelle Studien zeigen, dass der Cystintransport im *pars convoluta* des proximalen Tubulus (S1- und S2-Segment) mit geringer Affinität und hoher Kapazität (80-90 %) stattfindet (Völkl und Silbernagl 1982, Schafer und Watkins 1984) (Abbildung 1). In der apikalen Membran der Epithelzellen im *pars recta* des proximalen Tubulus (S3-Segment) erfolgt ein Na^+ -unabhängiger Transport von Cystin und den dibasischen Aminosäuren mit hoher Affinität und geringer Kapazität (10-20 %) (Segal et al. 1977, Völkl und Silbernagl 1982, Schafer und Watkins 1984) (Abbildung 1).

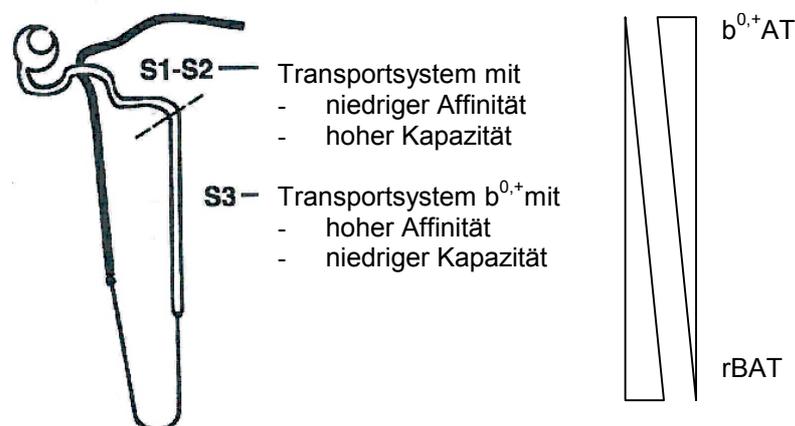


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Nierentubulus. Lokalisation der Cystin-Reabsorptionssysteme und Veranschaulichung des Expressionsgradienten der Proteine $b^{0,+}$ AT und rBAT entlang des Tubulus (nach: Palacin et al. 2001).

Bei dem Transporter im S3-Segment, der bei der Cystinurie defekt ist, handelt es sich um $r\text{BAT}/b^{0,+}\text{AT}$. Cystin und die dibasischen Aminosäuren werden im Austausch zu neutralen Aminosäuren in die Nierenepithelzellen transportiert (Abbildung 2). Der Transport wird elektrophysiologisch durch das negative Membranpotential begünstigt (Pfeiffer et al. 1999). Eine weitere treibende Kraft des Cystintransports liegt in der intrazellulären Reduktion des Cystins zu Cystein mittels der Glutathion-Cystein-Transhydrogenase (States und Segal 1969). Das reduzierte Cystein verlässt die

Epithelzellen auf der basolateralen Seite mittels des LAT2-Transporters (Silbernagl 1988, Chillaron et al. 1996). Die dibasischen Aminosäuren werden auf der basolateralen Seite durch den γ^+ LAT1-Transporter aus der Zelle heraus ins Blut transportiert (Abbildung 2; Pfeiffer et al. 1999). Ein Defekt des zuletzt genannten Transportsystems γ^+ L führt zur lysinurischen Proteinintoleranz (Borsani et al. 1999).

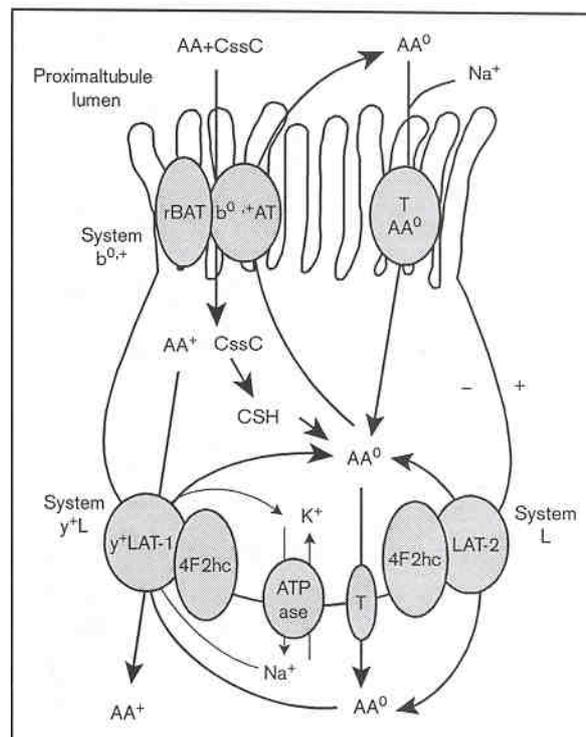


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Nierenepithelzelle. Lokalisation der Aminosäuretransporter rBAT/ $b^{0,+}$ AT, 4F2hc/LAT2 und 4F2hc/ γ^+ LAT1 (aus: Chillaron et al. 2001).

Das System mit hoher Kapazität im *pars convoluta* konnte auf molekularer Ebene bisher nicht identifiziert werden (Silbernagl 1988, Abbildung 1).

Brodehl et al. (1967) beschrieben einen Fall mit isolierter Cystinurie, die Werte für die dibasischen Aminosäuren im Urin lagen im Normbereich. Stephens und Perrett (1976) berichteten über einen Patienten mit Cystinsteinen, der lediglich eine minimale Acidurie der dibasischen Aminosäuren zeigte. Auch über eine Aminoacidurie der dibasischen Aminosäuren ohne Beteiligung des Cystins wurde bereits berichtet (Whelan und Scriver 1968, Oyangi et al. 1970). Diese Daten weisen darauf hin, dass noch weitere Systeme am Transport der genannten Aminosäuren beteiligt sind.

2.1 Genetik des Cystintransporters rBAT/b^{0,+}AT

Bisher konnten Mutationen in zwei Genen identifiziert werden, die für die Ausprägung der Cystinurie verantwortlich sind (Calonge et al. 1994, ICC 1999). Beide Gene, SLC3A1 und SLC7A9, kodieren für die Untereinheiten des bei der Erkrankung defekten Aminosäuretransporters b^{0,+} im S3-Segment des Nierentubulus (ICC 1999; Abbildung 1, Abschnitt 2).

2.1.1 SLC3A1-Gen

Das SLC3A1-Gen (MIM 604614) ist in der Region 2p21-2p16.3 lokalisiert und kodiert für die schwere Untereinheit des Transporters rBAT (Yan et al. 1992, Lee et al. 1993, Zhang et al. 1994, Calonge et al. 1995a) (Abbildung 3). Das Gen wird in die Familie 3 der „solute carrier“ eingeordnet, welche die Transporter für neutrale Aminosäuren beinhaltet. Bevor das SLC3A1-Gen als eine Ursache der Cystinurie bekannt war, zeigten Expressionsstudien in *Xenopus*-Oozyten, dass die cDNA des Gens für ein Protein kodiert, welches die Na⁺-unabhängige, hoch-affine Aufnahme von Cystin, dibasischen und neutralen Aminosäuren induziert (Bertran et al. 1992, Tate et al. 1992, Wells und Hediger 1992). Das Gen erstreckt sich über 45kb, die cDNA ist 2284bp lang (Wells und Hediger 1992, Lee et al. 1993, Purroy et al. 1996). Die mRNA kodiert in 10 Exons für ein aus 663 Aminosäuren bestehendes Protein, welches im Bürstensaum des renalen *pars recta* (S3-Segment, Abbildungen 1 und 2, Abschnitt 2) und im Dünndarmepithel exprimiert wird (Bertran et al. 1992, Wells und Hediger 1992, Furriols et al. 1993, Lee et al. 1993, Calonge et al. 1994). Geringere Expression wurde in Pankreas, Leber, Nebenniere und Rückenmark nachgewiesen (Bertran et al. 1992, Yan et al. 1992, Pickel et al. 1993, Nirenberg et al. 1995). Calonge et al. wiesen 1994 erste Mutationen in SLC3A1 bei Patienten mit klassischer Typ I Cystinurie nach und bestätigten so dessen Rolle in der Ätiologie der Erkrankung (Calonge et al. 1994). Aufgrund von Kopplungsstudien wurden Mutationen in SLC3A1 als krankheitsverursachend für die nicht-Typ I-Cystinurie ausgeschlossen (Calonge et al. 1995b).

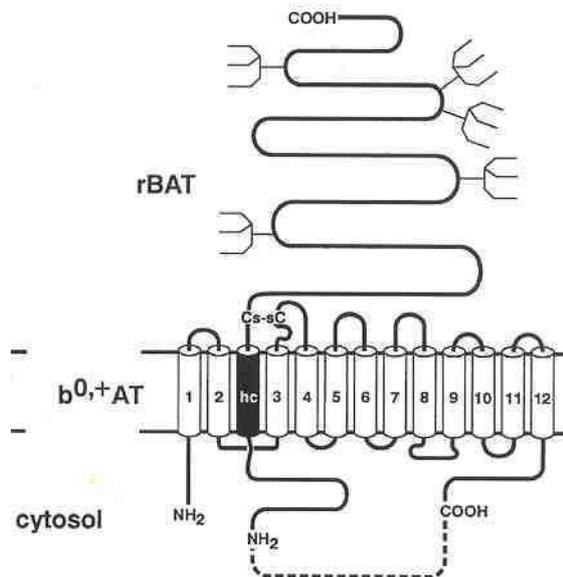


Abbildung 3: Schematische Darstellung des heterodimeren Transporters rBAT/b^{0,+}AT sowie dessen Lokalisation in der Membran (aus: Verrey et al. 1999).

Das Genprodukt rBAT ist wenig hydrophob und wird in die Kategorie der Typ II Membran-Glykoproteine eingeordnet (Lee et al. 1993). Es besteht aus einer Transmembrandomäne nahe dem N-Terminus und einer extrazellulären Domäne (Bertran et al. 1992, Wells und Hediger 1992) (Abbildung 4).

Der N-Terminus liegt im Cytoplasma, der C-Terminus extrazellulär (Bertran et al. 1992) (Abbildung 3). Bisher ist nicht klar, ob die konservierte Aminosäure C114 oder das Leucin-Zipper-Motiv am C-Terminus des Proteins für die Ausbildung einer kovalenten Disulfid-Brücke bzw. einer nicht-kovalenten Bindung mit einem zweiten Protein verantwortlich ist (Wells und Hediger 1992, Pfeiffer et al. 1999, Wagner et al. 2001). Das Protein besitzt sechs bis sieben potentielle Glykosylierungsstellen (Bertran et al. 1992, Lee et al. 1993).

Die extrazelluläre Domäne enthält zwei funktionelle Domänen (Bröer und Wagner 2002): Der C-terminale Teil (Aminosäuren 460-529) ist vermutlich in Transportprozesse involviert (Miyamoto et al. 1996), der andere Teil (Aminosäuren 100-460) zeigt starke Ähnlichkeit zu α -Amylase-Domänen (Zentraldomänen von Glykosidasen) (Bröer und Wagner 2002). Die Kernstruktur dieser Domäne setzt sich aus abwechselnden α -Helices und β -Faltblättern zusammen, die einen inneren Hohlraum aus acht β -Faltblättern umgeben von acht α -Helices formen.

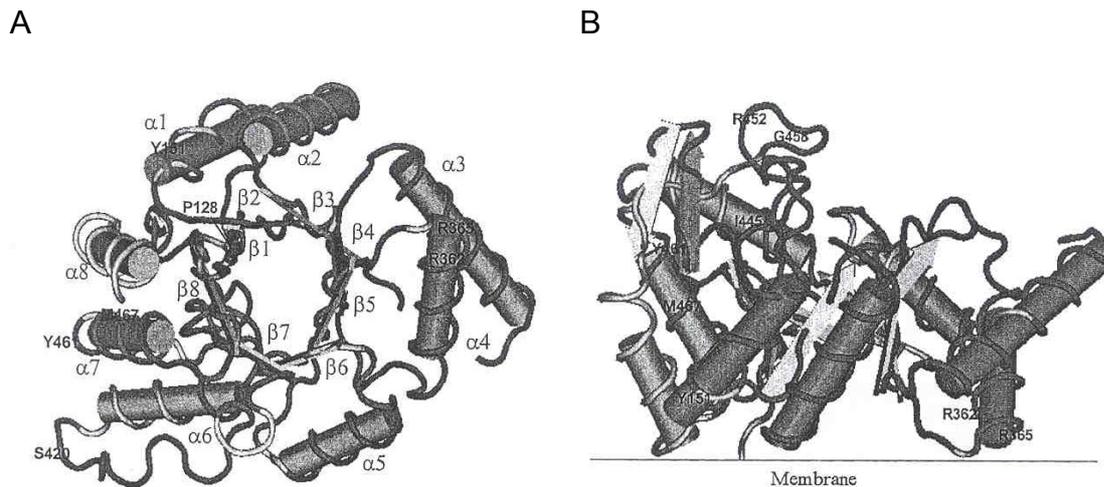


Abbildung 4: Modell der extrazellulären Domäne des rBAT-Proteins. (A): Aufsicht, (B): Seitenansicht (aus: Bröer und Wagner 2000).

Die starke Sequenzhomologie zwischen rBAT und der schweren Untereinheit des heterodimeren 4F2 Oberflächenantigens (4F2hc), welches einen y^+L -ähnlichen Aminosäuretransport in Oozyten induziert, wies darauf hin, dass sich rBAT als Transport-Aktivator verhält, oder ein konstitutives Element des $b^{0,+}$ -ähnlichen Transportsystems darstellt (Bertran et al. 1992, Wells und Hediger 1992). Die Ergebnisse von Calonge et al. (1994) deuteten ebenfalls darauf hin, dass bei der Cystinurie das $b^{0,+}$ -ähnliche System defekt ist, welches neben Cystin und den dibasischen Aminosäuren auch neutrale Aminosäuren transportiert. Bei der Erkrankung wird der Transport der neutralen Aminosäuren komplett von anderen Systemen übernommen, während für die Aminosäuren Cystin, Ornithin, Lysin und Arginin im Bürstensaum kein alternatives System vorliegt (Silbernagl 1988).

Im SLC3A1-Gen konnte ein Vielzahl an Mutationen nachgewiesen werden (Tabelle 1, Anhang). Hierbei handelt es sich um missense-, nonsense- und Splice-Mutationen sowie Deletionen und Insertionen. Einige Mutationen zeigen eine populationsspezifische Verteilung, die Mehrzahl ist aber privater Natur.

2.1.2 SLC7A9-Gen

Bereits die Studie von Calonge et al. 1994 deutete an, dass neben rBAT ein weiteres Gen an der Pathogenese der Cystinurie beteiligt ist: Kopplungsstudien zeigten, dass nur die Typ I-Cystinurie mit dem SLC3A1-Lokus in der Region 2p16.3 assoziiert ist

(Calonge et al. 1995b). Das zweite Cystinurie-Gen, das für die nicht-Typ I-Cystinurie verantwortlich ist, wurde in der Region 19q13.1 lokalisiert (Bisceglia et al. 1997, Wartenfeld et al. 1997). 1999 wurden vom International Cystinuria Consortium im SLC7A9-Gen Mutationen bei nicht-Typ I-Patienten (MIM 604144) identifiziert (ICC 1999).

SLC7A9 wird in die Familie 7 der „solute carrier“ eingeordnet und kodiert für die leichte Untereinheit $b^{0,+}$ AT des bei der Cystinurie betroffenen Aminosäuretransporters (ICC 1999, Pfeiffer et al. 1999, Verrey et al. 1999) (Abbildung 3, Abschnitt 2.1.1). Das Protein besteht aus 487 Aminosäuren, die cDNA mit einer Länge von 1814bp ist von 13 Exons kodiert und polyadenyliert (ICC 1999). Es wird in Niere und Dünndarm, vermindert auch in Herz, Leber, Plazenta und Lunge exprimiert (Chairoungdua et al. 1999, ICC 1999, Pfeiffer et al. 1999). Das Protein besteht aus mehreren Transmembrandomänen sowie extra- und intrazellulären Schleifen. N- und C-Terminus sind intrazellulär lokalisiert (Chairoungdua et al. 1999) (Abbildung 3, Abschnitt 2.1.1), das Protein ist nicht glykosyliert. Der für die Ausbildung der Disulfidbrücke mit rBAT verantwortliche Cystein-Rest ist zwischen der 3. und 4. Transmembranhelix an Position C144 lokalisiert (Chairoungdua et al. 1999, Pfeiffer et al. 1999). Pfeiffer et al. (1999) beschrieben das Protein als permease-ähnliche katalytische Untereinheit.

Mutationen im SLC7A9-Gen wurden bei nicht-Typ I-Patienten sowie bei einigen Typ I-Allelen detektiert (ICC 1999, Leclerc et al. 2002, s.o.). Demnach können Mutationen im SLC7A9-Gen ein sehr breites Spektrum der Cystinexkretion verursachen, die Mehrzahl der Mutationen ist jedoch mit der nicht-Typ I-Cystinurie assoziiert.

Im SLC7A9-Gen wurde eine Vielzahl an Mutationen detektiert (Tabelle 2, Anhang). Ähnlich wie im SLC3A1-Gen treten die meisten Mutationen privat auf. Eine populationsspezifische Verteilung liegt bisher nicht vor.

2.2 Funktionsweise des Transporters rBAT/ $b^{0,+}$ AT

Der Cystintransporter rBAT/ $b^{0,+}$ AT ist ein Heterodimer bestehend aus einer schweren Untereinheit rBAT (ein Typ II Membranprotein) sowie einer leichten Untereinheit $b^{0,+}$ AT (ein polytopes Membranprotein) (Palacin et al. 1998, Pfeiffer et al. 1999,

Fernandez et al. 2002) (Abbildung 3, Abschnitt 2.1.1). Die Untereinheiten sind entweder durch eine kovalente Disulfidbrücke oder eine nicht-kovalente Bindung über den C-Terminus des rBAT-Proteins zusammengesetzt (Wagner et al. 2001). Beide Untereinheiten bilden das renale Aminosäuretransportsystem $b^{0,+}$ an der apikalen Membran der Nierenepithelzellen (Mora et al. 1996).

Die Transfektion von rBAT allein konnte in den meisten Zelllinien keine Transportaktivität hervorrufen. Wird die rBAT-cDNA dagegen in *Xenopus*-Oozyten eingebracht, ruft sie über ein $b^{0,+}$ -ähnliches System den Transport von Cystin, den dibasischen Aminosäuren sowie einigen neutralen Aminosäuren hervor, da in den Oozyten eine endogene Expression von $b^{0,+}$ AT vorliegt (Bertran et al. 1992, Lee et al. 1993).

Auch in COS7-Zellen wurde die Koexpression beider Gene untersucht und führte dort ebenfalls zur $b^{0,+}$ -Transportaktivität (Chairoungdua et al. 1999). Bauch und Verrey (2002) zeigten, dass $b^{0,+}$ AT in der Abwesenheit von rBAT stabil ist, während rBAT ohne $b^{0,+}$ AT schnell degradiert. Erst wenn beide koexprimiert werden, wird rBAT voll glykosyliert und stabiler. rBAT und auch $b^{0,+}$ AT verbleiben intrazellulär, wenn sie nicht koexprimiert werden (Bauch und Verrey 2002). Nach der intrazellulären Assoziation wandert das Heterodimer aus dem endoplasmatischen Retikulum zur apikalen Zellmembran.

Die Mehrzahl der Mutationen in SLC3A1 führen zu einem Trafficking-Defekt des Transporters zur apikalen Membran, einige setzen aber auch die Aktivität des Transporters herab (Palacin et al. 1998, Saadi et al. 1998). Dabei beeinträchtigen Mutationen im extrazellulären C-Terminus vorwiegend das Trafficking, während Mutationen in der intrazellulären Region hauptsächlich die Aminosäuretransportaktivität betreffen.

Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass Mutationen im SLC7A9-Gen in den Transmembrandomänen oder cytosolisch liegen, während Mutationen in den extrazellulären Schleifen eine weniger große Rolle für die Transportaktivität spielen (Wagner et al. 2001).

Demnach wird rBAT zugeschrieben, dass es einerseits als *guidance*-Molekül für den Transport der leichten Untereinheit zur Zellmembran zuständig ist, andererseits aber

auch an der Transportaktivität des Komplexes beteiligt ist. Die leichte Untereinheit $b^{0,+}AT$ ist für die Ausbildung der für Membrantransportproteine typischen Helix-Bündel-Struktur verantwortlich und katalysiert den Aminosäuretransport (Pfeiffer et al. 1999). Weiterhin erhöht $b^{0,+}AT$ die Stabilität des rBAT-Proteins (Pfeiffer et al. 1999, Reig et al. 2002)

Der Transport von Cystin und den dibasischen Aminosäuren in die Zellen des Nierenepithels erfolgt bei gleichzeitigem Transport von neutralen Aminosäuren in das Lumen des Nierentubulus (Furriols et al. 1993, Chillaron et al. 1996, Mora et al. 1996) (Abbildung 2, Abschnitt 2).

Die Expression von rBAT und $b^{0,+}AT$ in den Epithelzellen entlang des proximalen Nierentubulus ist gegenläufig: Während rBAT im S3-Segment stärker als im S1-Segment exprimiert wird, ist $b^{0,+}AT$ stärker im S1-Segment als im S3-Segment nachweisbar (Kanai et al. 1992, Chairoungdua et al. 1999) (Abbildung 1, Abschnitt 2). Der bei der Cystinurie defekte Transporter ist im S3-Segment lokalisiert. Welche Rolle die verstärkte Expression von $b^{0,+}AT$ im S1-Segment spielt, ist derzeit unklar. Fernandez et al. (2002) demonstrierten, dass alle $b^{0,+}AT$ -Moleküle ausschließlich mit rBAT dimerisieren. Für den dimeren Transporter besteht ein abnehmender Expressionsgradient entlang des Tubulus. Ob neben $b^{0,+}AT$ ein weiterer Bindungspartner von rBAT im S3-Segment existiert, konnte bisher nicht gezeigt werden.

Die zu rBAT homologe schwere Untereinheit 4F2hc bildet mit verschiedenen leichten Untereinheiten heterodimere Aminosäuretransporter. Diese leichten Untereinheiten sind zur $b^{0,+}AT$ -Untereinheit homolog und werden in die SLC7-Familie eingeordnet. Bisher ist nicht klar, ob rBAT oder $b^{0,+}AT$ in vivo mit einer der anderen Untereinheiten dimerisieren (Wagner et al. 2001).

2.3 Weitere Kandidatengene

Werden unterschiedliche Patientenkollektive auf Mutationen in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 hin untersucht, zeigt je nach Klassifizierung und ethnischer Herkunft nur eine bestimmter Prozentsatz der Patienten Mutationen. Für das SLC3A1-Gen liegt diese zwischen 58 und 94 % (Bisceglia et al. 1996, Horsford et al. 1996, Goodyer et

al. 1998, Saadi et al. 1998), im SLC7A9-Gen bei 79 %. Die im SLC3A1-Gen stark schwankenden Mutationsdetektionsraten sowie immunhistochemische Untersuchungen lassen vermuten, dass weitere, bisher noch nicht identifizierte Gene und/oder Faktoren in die Pathogenese der Cystinurie involviert sind (Pfeiffer et al. 1999).

In den bisher durchgeführten molekulargenetischen Studien zur Mutationsdetektion wurden die kompletten kodierenden Regionen der Gene SLC3A1 und SLC7A9 untersucht. Daher besteht die Möglichkeit, dass nicht detektierte Mutationen in nicht analysierten Regionen wie dem Promotor oder den Introns lokalisiert sind (Leclerc et al. 2002). Im SLC3A1-Gen wurden bisher einige größere Deletionen beschrieben. Daten zu Duplikationen oder Deletionen im SLC7A9-Gen, die mittels üblicher molekulargenetischer Methoden nur schlecht detektierbar sind, liegen bisher allerdings nicht vor.

Zu den Faktoren, die eine Ausprägung der Cystinurie hemmen oder verstärken können, zählen Hypocitraturie, Hyperurikämie, Hyperurikosurie und Hypercalcurie (zur Übersicht: Botzenhart et al. 2002). Pras et al. (1998a) beschrieben, dass 15 % der nicht-Typ I-Homozygoten asymptomatisch sind. Homozygotie für die gleiche Mutation in SLC3A1 kann zu einem stark diskrepanten Manifestationsalter führen. Gleiche Mutationen im SLC7A9-Gen können sowohl im Typ II als auch Typ III resultieren (ICC 2001). Auch die Feststellung von Leclerc et al. (2002), dass die gleiche Mutation unterschiedlich hohe Cystin-Spiegel bei Heterozygoten verursacht, unterstreicht die Bedeutung weiterer Faktoren. Somit könnten einerseits Mutationen in weiteren Genen, die zusätzliche Transporter-Untereinheiten kodieren, zum Krankheitsbild der Cystinurie beitragen, andererseits auch andere Faktoren den variablen Phänotyp begründen (ICC 2001).

Die gegenläufige Expression der Gene SLC3A1 und SLC7A9 entlang des proximalen Nierentubulus unterstützt zusätzlich die Hypothese der Beteiligung weiterer Gene an der Entstehung der Cystinurie, da beide Untereinheiten mit einem anderen Partner heterodimerisieren könnten (Chillaron et al. 2001).

2.3.1 SLC7A10-Gen

Kopplungsstudien in Familien mit Cystinurie weisen nicht auf das Vorhandensein eines weiteren Lokus neben den Regionen 2p16-p21 und 19q13 hin (Pras et al. 1994, Bisceglia et al. 1997, Wartenfeld et al. 1997). Das SLC7A10-Gen liegt in enger Nachbarschaft zum SLC7A9-Gen in der Region 19q13.1. Da eines der Gene wahrscheinlich aufgrund einer Duplikation des anderen entstanden ist, besteht zwischen beiden eine hohe Homologie (ICC 1999). Aus diesen Gründen ist es vorstellbar, dass Mutationen im SLC7A10-Gen an der Entstehung der Cystinurie beteiligt sind.

Das SLC7A10-Gen besteht aus 11 Exons. Das Genprodukt ASC1 wird auf der basolateralen Seite der Epithelzellen im proximalen Nierentubulus sowie im Dünndarm exprimiert. Das Protein interagiert mit der schweren Untereinheit 4F2hc, beide bilden einen Transporter für kleine neutrale Aminosäuren aus. Damit hat das Protein als leichte Untereinheit eines Na⁺-unabhängigen Transporters eine ähnliche Funktion wie b^{0,+}AT (Fukasawa et al. 2000, Nakauchi et al. 2000, Wagner et al. 2001).

Leclerc et al. (2001) postulierten aufgrund der genomischen Lage, der Homologie zwischen SLC7A10 und SLC7A9, sowie der Expression des Genprodukts eine Beteiligung von SLC7A10 an der Pathogenese der Cystinurie. Die Arbeitsgruppe identifizierte eine missense-Mutation, die für die Ausprägung der Cystinurie in einer Familie verantwortlich sein könnte, bisher fehlt hierfür aber der funktionelle Nachweis. Weiterhin wurden unter Cystinurie-Patienten ein intronischer Austausch sowie eine Variante detektiert, welche nicht unter Kontrollen nachgewiesen werden konnten (Tabelle 2).

Aufgrund dieser Beobachtungen gilt SLC7A10 als Kandidatengen für die Cystinurie.

Variante	Patienten (n=10)	Kontrollen (n=50)
c.267G>A, S56S	+	-
c.435G>C, E112D	+	-
IVS6-11T>C	+	+
IVS7+20G>T	+	-
c.1473G>T	+	+

Tabelle 2: Nachweis von Sequenzvarianten im SLC7A10-Gen (nach: Leclerc et al. 2001).

2.3.2 SLC7A8-Gen

Das Genprodukt des SLC7A8-Gens, LAT2, stellt eine weitere leichte Untereinheit des 4F2hc-Proteins dar (Abbildung 2, Abschnitt 2). Das Gen ist in der chromosomalen Region 14q11.2 lokalisiert. Ein Heterodimer beider Proteine ruft den Na⁺-unabhängigen Transport von Aminosäuren hervor (Wagner et al. 2001). Die Expression ist ubiquitär, hierbei aber auf basolaterale Epithelzellen beschränkt (proximaler Nierentubulus, Dünndarm, Plazenta, Gehirn, Skelettmuskeln, Ovarien). Der Transporter besitzt eine hohe Affinität und eine breite Spezifität für große und kleine neutrale und kationische Aminosäuren. Wie bei b^{0,+}AT befindet sich der konservierte Cysteinrest zur Ausbildung der Disulfidbrücke mit der schweren Untereinheit in der zweiten extrazellulären Schleife.

Da LAT2 auch Cystein an der basolateralen Seite des Tubulus transportiert, ist es denkbar, dass ein Defekt dieses Systems zu einem Rückstau von Cystein in der Zelle induziert. Dies wiederum könnte durch positive Rückkopplung die Transportrate von rBAT/b^{0,+}AT reduzieren und so zur Cystinurie führen.

2.3.3 SLC1A1-Gen

Das SLC1A1-Gen kodiert für das Protein EAAC1, welches Na⁺-abhängigen Aminosäuretransport des Typ EAAT induziert. Dabei handelt es sich um einen neuronalen und epithelialen Glutamat-Aspartat-Transporter, der auch die Aufnahme von Cystin induziert. Das Gen ist in der Region 9q24 lokalisiert und wird im renalen Tubulus exprimiert (Kanai und Hediger 2003). Aufgrund der essentiellen protektiven Rolle von Glutamat im zentralen Nervensystem ist eine Beteiligung des Transporters an der Cystinurie zwar eher unwahrscheinlich, aber nicht ausgeschlossen.

III. Material und Methoden

1. Arbeitsmaterial

1.1 Kollektive

1.1.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv setzte sich aus insgesamt 80 unverwandten Cystinurie-Patienten sowie deren Angehörigen zusammen (Tabelle 3, Anhang). Betroffene und nicht betroffene Angehörige wurden je nach Verfügbarkeit sowie Fragestellung mit untersucht. Weiterhin befanden sich vier Probanden im Kollektiv, die in einem Neugeborenen Screening auffällige Aminosäurewerte im Urin zeigten, aber noch keine Steine bildeten.

Im folgenden Text sowie im Anhang sind die bereits in den vorhergehenden Arbeiten (Albers, 1998, Schmidt, 2000, Albers, 2001, Botzenhart, 2003) beschriebenen Untersuchungen kursiv dargestellt.

Für die Patienten und Probanden Cys 2-Cys 112 (n=59) wurde bereits ein unspezifisches Mutationsscreening der kodierenden Region der Gene SLC3A1 und SLC7A9 auf SSCP-Basis durchgeführt (Albers, 1998, Schmidt, 2000, Albers, 2001, Botzenhart, 2003). Diese standen für weiterführende Analysen zur Verfügung. Die neuen Patienten und Probanden (Cys 113-Cys 164) (n=25) wurden von folgenden Einrichtungen eingesandt:

- Allgemeines Krankenhaus Celle
- Gemeinschaftspraxis für Kinderheilkunde, Pforzheim
- Praxis Dr. Morlot, Hannover
- Institut für Humangenetik, Erlangen
- Kinderklinik Ludwigsburg
- Kinderklinik Universität Heidelberg
- Kinderspital Salzburg
- Klinik und Poliklinik für Urologie, Universität Bonn
- Klinik und Poliklinik für Urologie, Universität Tübingen
- Pädiatrische Nephrologie Münster
- Pädiatrische Nephrologie, Universität Essen
- Städtische Kinderklinik Braunschweig
- Universitäts-Kinderklinik Würzburg

Die Patienten unterschieden sich hinsichtlich ihrer ethnischen Herkunft, der biochemischen Klassifizierung sowie dem Schweregrad der Erkrankung. Bei allen Patienten wurde die Cystinurie durch eine Steinanalyse und/oder einer Aminosäureanalyse des Urins diagnostiziert.

Die Betroffenen und Heterozygoten stammten aus acht Populationen:

Deutschland (inklusive deutschstämmige Russen), Frankreich, Italien, Griechenland, Jugoslawien, Türkei und Israel. Die Mutter eines heterozygoten Probanden stammte aus der Dominikanischen Republik, der Vater aus Deutschland (Tabelle 3, Anhang).

Die Populationen wurden wie folgt zusammengefasst:

- | | | |
|----------------|-------------------------------------|--------|
| - Mitteleuropa | (Deutschland, Frankreich) | (n=48) |
| - Südeuropa | (Italien) | (n=12) |
| - Südosteuropa | (Griechenland, Jugoslawien, Türkei) | (n=22) |
| - Sonstige | (Israel, Dominikanische Republik) | (n=2) |

Während der Mutationsanalysen erfolgte für einen Teil der Patienten und Probanden (n=28) die biochemische Klassifizierung anhand der Aminosäurewerte im Urin (Kinderklinik, Universität Essen) (Tabelle 4, Anhang). Ein Großteil der Patienten war unklassifiziert (n=55), 13 waren als homozygot für Typ I, drei als homozygot für nicht-Typ I eingeordnet (Botzenhart, 2003). Bei neun Patienten wurde biochemisch lediglich eine „klassische“ Cystinurie diagnostiziert (Typ I oder nicht-Typ I), da die zur Typisierung notwendigen Angehörigen nicht verfügbar waren oder die Analyse keine eindeutigen Ergebnisse lieferte. Die vier Probanden, die im Neugeborenen screening auffällig waren, wurden als heterozygot für nicht-Typ I eingeordnet.

Weiterhin wurde eine deutsche Patientin mit isolierter Cystinurie untersucht.

1.1.2 Kontrollkollektive

Die Kontrollkollektive bestanden aus anonymisierten DNA-Proben nicht betroffener deutscher Probanden sowie einem Blutspender-Kollektiv unbekannter Ethnie. Die Kontrollen wurden sowohl benutzt, um das Vorliegen neuer Mutationen und Varianten unter gesunden Probanden auszuschließen als auch um die Allel- und Genotypfrequenzen einzelner Varianten im Vergleich zur Patientengruppe abzuschätzen.

1.2 Geräte und Arbeitsutensilien

Autoklav	HV-85, HD-Tek, Süßen, D
Brutschrank	Kendro, Heraeus, Osterode, D
Elektrophoresegeräte	Multigel-Long-Gelkammer, Biometra, Göttingen, D Amersham Pharmacia Gel Elektrophoresis Apparatus GNA-200, Freiburg, D
Elektrophoresezubehör	Gelträger 20x20cm, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D 22-Zahn-Kämme, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D Sequenzierzubehör, Applied Biosystems, Darmstadt, D
Geldokumentation	Imaging-System Gel Doc 2000, Bio-Rad, München, D
Geltrockner	Model 583, Bio-Rad, München, D
Heizblock	Unitek™ HBS-130/E, Peqlab, Erlangen, D Dry-Block® DB3D, Techne, Wertheim, D
Magnetrührer	Ikamag RCT basic, IKA Labortechnik, Staufen, D
Mikrowelle	Bosch, D
pH-Meter	MP 220, Mettler Toledo AG, Schwerzenbach, CH
Photometer	Bio Photometer, Eppendorf, Köln, D
Pipetten	Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson, Villiers- le-Bel, F
Real-time Thermocycler	TaqMan™-Instrument, ABI Prism® 7000, Applied Biosystems, Darmstadt, D
Real-time Zubehör	MicroAmp® Optical 96-well reaction plate with barcode, Applied Biosystems, Darmstadt, D MicroAmp® Optical caps, Applied Biosystems, Darmstadt, D Starseal Advanced Polyolefin Film, Microplate Sealing Film, Starlab, Ahrensburg, D
Schüttelapparat	GFL 3015 und 3005, Burgwedel, D
Schüttelwasserbad	GFL 1086, Burgwedel, D
Sequenziergerät	ABI Prism 377®, Applied Biosystems, Darmstadt, D
Spannungsgeräte	Elektrophoresis Power Supply PS 304, Gibco BRL, Groningen, NL Elektrophoresis Power Supply EPS 300, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D
SSCP-Zubehör	Glasplatten mit fixierten 1,0mm Spacern, Biometra, Göttingen, D Glasplatten ausgeschnitten mit geradem Schliff, Biometra, Göttingen, D Kämme 24-zählig, 1,0mm, Biometra, Göttingen, D Silikonabdichtung 1,0mm, Biometra, Göttingen, D Klammern, Biometra, Göttingen, D
Thermocycler	PTC 100, MJ Research, Biozym, Hess. Oldendorf, D PTC 200 DNA Engine, MJ Research, Biozym, Hess. Oldendorf, D Biometra Personal Cycler, Göttingen, D
Thermomixer	Primus MWG-Biotech, München, D Comfort 1,5ml, Eppendorf, Hamburg, D

Waagen	BP 2100, BP 615, Sartorius AG, Göttingen, D
Wasserbad	GFL 1002-1013, GFL 1086, Burgwedel, D Lauda E200 ecoline R206, Lauda-Königshofen, D
Whatmanpapier	Whatman Gb002, Schleicher und Schüll, Dassel, D
Vakuumpumpe	Hydrotech, Bio-Rad, München, D Membran-Vakuumpumpe, Vacuubrand, Wertheim, D
Zentrifugen	Centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg, D Megafuge 1.0R, Sorvall Heraeus, Kendro, Osterode, D Biofuge fresco, Kendro, Osterode, D

1.3 Reagenzien und Materialien

1.3.1 Chemikalien

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

Bio-Rad, München, D
Dianova, Hamburg, D
ICN Biomedicals, Ohio, USA
Invitrogen, Karlsruhe, D
Merck, Darmstadt, D
Riedel-de Haen, Seelze, D
Roche, Mannheim, D
Roth, Karlsruhe, D
Serva, Heidelberg, D
Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D

1.3.2 Feinchemikalien und Enzyme

DNase	RNase-Free DNase Set (50), QIAGEN, Hilden, D
Expressionvektor	pcDNA3.1 Directional TOPO [®] Expression Kit, pcDNA3.1D/V5-His-TOPO [®] Vector, Invitrogen, Karlsruhe, D
Gelextraktionskit	QIAquick [®] Gel Extraction Kit (250), QIAGEN, Hilden, D
Längenstandard	50bp-Leiter, 1µg/µl, Invitrogen, Karlsruhe, D 100bp-Leiter, 1µg/µl, Invitrogen, Karlsruhe, D 1kb-Leiter, 0,5µg DNA/µl, MBI Fermentas, St.Leon- Rot, D TAMRA [™] Size Standard, Applied Biosystems, Darmstadt, D
Nukleotide	(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), je 100mM, Invitrogen, Karlsruhe, D

PCR-Reinigungskit	QIAquick [®] PCR Purification Kit (250), QIAGEN, Hilden, D
Plasmidisolationskit	QIAprep [®] Spin Miniprep Kit (50)
Polymerasen	Expand High Fidelity PCR System, 3,5U/μl, Roche, Mannheim, D Platinum [®] Taq DNA Polymerase Recombinant, 5U/μl, Invitrogen, Karlsruhe, D Taq-DNA Polymerase Recombinant, 5U/μl, Invitrogen, Karlsruhe, D
Real-time PCR	Platinum [®] qPCR SuperMix-UDG, Invitrogen, Karlsruhe, D qPCR [™] Core Kit for SYBR [®] Green I, Eurogentec, Seraing, B
Restriktionsendonukleasen	Invitrogen, Karlsruhe, D MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D New England Biolabs, Frankfurt/Main, D Promega, Mannheim, D Roche, Mannheim, D
RNA	Human Kidney Total RNA, Clontech, Heidelberg, D Human Universal Reference Total RNA, Clontech, Heidelberg, D (wurde vom Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Aachen, zur Verfügung gestellt)
RNA-Isolationskit	QIAamp [®] RNA Blood Mini Kit (50), QIAGEN, Hilden, D
ROX Reference Dye Reverse Transkription	Invitrogen, Karlsruhe, D Reverse Transcription System, Promega, Mannheim, D
Sequenzier-Kit	BigDye [®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit Applied Biosystems, Darmstadt, D

1.3.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotidprimer wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) synthetisiert.

Die Sequenzen für das SLC3A1-Gen wurden aus der Literatur übernommen oder wurden anhand der veröffentlichten Sequenz erstellt (Calonge et al. 1994, Pras et al. 1995, Bisceglia et al. 1996, Endsley et al. 1997, Albers et al. 1999).

Die Primersequenzen für das SLC7A9-Gen wurden vom International Cystinuria Consortium zur Verfügung gestellt. War eine Amplifikation mit bekannten Primern nicht möglich oder kein Primerpaar vorhanden, wurden anhand der veröffentlichten Sequenzen eigene Primer konstruiert.

Die Primer zur Amplifikation der Gene SLC7A8 und SLC7A10 wurden aus der Literatur übernommen (Leclerc et al 2001) oder wurden anhand bekannter Sequenzen erstellt.

Die Primersequenzen können den Tabellen 5-8 im Anhang entnommen werden. Die Primer und Sonden zur Amplifikation und Detektion der Fragmente bei der real-time PCR an den Genen SLC3A1 und SLC7A9 wurden von den Firmen QIAGEN (Hilden), Applied Biosystems (Darmstadt), MWG-Biotech AG (Ebersberg) sowie Sigma (Deisenhofen) synthetisiert (Schmidt et al. 2003b).

1.3.4 Materialien und Reagenzien zur Zellkultur

COS7-Zellen	Die COS7-Zellen wurden vom Institut für Biochemie, Universitätsklinikum Aachen, zur Verfügung gestellt
Fötale Kälberserum	Invitrogen, Karlsruhe, D
Kulturflaschen	50ml, 25cm ² , Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Kulturmedium	Dulbecco's MEM with Glutamax-I, Invitrogen, Karlsruhe, D
Kulturplatten	Multiwell™ 24 well, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, F
PBS-Puffer	Roche, Mannheim, D
Pipetten	2ml, 5ml, 10ml, 20ml, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Transfektionsreagenz	Lipofectamine™ 2000, Invitrogen, Karlsruhe, D
Trypsin/EDTA (1:250)	Biozym, Hess. Oldendorf, D

2. Methoden

2.1 DNA-Isolation

Die DNA der Probanden wurde nach Miller et al. (1988) aus frischen sowie gefrorenen Blutproben mittels Salzfällung extrahiert.

Zur DNA-Reinigung wurde in einigen Fällen die Phenol-Chloroform-Fällung angewandt. Anschließend wurde die DNA in einem angemessenen Volumen TE⁻⁴ gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gelöst. Die Konzentration der isolierten DNA wurde photometrisch bestimmt. Ausgehend von den gemessenen Konzentrationen wurden Verdünnungen in einer Konzentration von 20ng/μl hergestellt. Im Falle der quantitativen real-time PCR-Analysen wurden diese mindestens drei Tage bei Raumtemperatur gelagert, um eine ausreichende und gleichmäßige Lösung der DNA zu gewährleisten.

2.2 Mutationsnachweis in den Genen SLC3A1 und SLC7A9

Den meisten durchgeführten Analysen ging eine Polymerasekettenreaktion (PCR) voran, die nach Standard-Protokollen durchgeführt wurde (Schmidt et al. 2002). Je nach Fragestellung und Fragment-Eigenschaften wurden verschiedene DNA-Polymerasen verwendet. Die PCR-Bedingungen für die verschiedenen Fragmente können den Tabellen 9 und 10 im Anhang entnommen werden.

Mutationen und Varianten, die bereits in früheren Arbeiten (Albers, 1998, Schmidt, 2000, Albers, 2001, Botzenhart, 2003) beschrieben wurden, sind im Folgenden sowie in den Tabellen im Anhang kursiv markiert.

2.2.1 Unspezifischer Mutationsnachweis mittels SSCP (Single strand conformation polymorphism)

Die Methode der SSCP-Analyse, deren Detektionsrate bei ca. 70 % liegt (Schmidt, 2000), wurde sowohl im unspezifischen Mutationsscreening (Cys 2-Cys 112) als auch in der Etablierung des diagnostischen Schemas (Cys 113-Cys 164) angewandt. Dabei wurden die PCR-Produkte der zu untersuchenden Fragmente der Gene SLC3A1 und SLC7A9 elektrophoretisch in Polyacrylamid-Gelen unter SSCP-Bedingungen aufgetrennt (Orita et al. 1989, Schmidt et al. 2002). Die Detektion der Fragmente erfolgte durch Silberfärbung. Auffälligkeiten wurden mittels Restriktionsanalysen bzw. direkter Sequenzierung untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei den Patienten Cys 2-Cys 105 (n=53) sowie zwei als heterozygot für die nicht-Typ I-Cystinurie eingeordneten Probanden die Promoter-Region des SLC3A1-Gens untersucht.

Für die Untersuchung der Patienten Cys 113-Cys 164 wurde die SSCP für die Exons 5, 7 und 10 des SLC7A9-Gens angewandt. Waren aus dem bereits durchgeführten Screening Patienten mit Auffälligkeiten bekannt, wurden diese als interne Kontrollen verwendet. Aufgetretene Varianten wurden mittels Sequenzierung weiter untersucht.

2.2.2 Direkter Mutationsnachweis

Fragmente, die in der SSCP Auffälligkeiten zeigten, wurden mittels Methoden der direkten Mutationsanalyse weiter untersucht. Dazu zählen in der vorliegenden Arbeit die direkte Sequenzierung und der Restriktionsverdau von PCR-Produkten. Aufgrund

des Vorhandenseins zahlreicher Polymorphismen und Mutationen im Exon 4 des SLC7A9-Gens wurde dieses Fragment sowohl im Mutationsscreening als auch in der diagnostischen Anwendung für jeden Patienten sequenziert (Schmidt et al. 2002).

Die Restriktionsanalysen wurden unter anderem zusätzlich zur SSCP-Untersuchung eingesetzt. So konnte untersucht werden, ob bekannte Mutationen in den einzelnen Fragmenten vorliegen. Weiterhin wurden die Restriktionsanalysen im diagnostischen Vorgehen angewendet, um das Vorhandensein häufiger Mutationen in der Routinediagnostik zu überprüfen.

Mittels real-time PCR wurden die Gene SLC3A1 und SLC7A9 auf größere Deletionen und Duplikationen hin untersucht.

2.2.2.1 Sequenzierung

Die direkte Sequenzierung nach Sanger wurde eingesetzt, um die Basenabfolge eines generierten Fragmentes zu bestimmen. Das methodische Vorgehen wurde bereits beschrieben (Schmidt, 2000). Die Fragmente wurden im Sequenziergel aufgetrennt, die Analyse erfolgte computergestützt mittels der ABI Prism™ Collection Software sowie des Sequencing Analysis-Programms (Applied Biosystems, Darmstadt, D).

2.2.2.2 Restriktionsanalysen

Aufbauend auf mittels Sequenzierung detektierten Sequenzvarianten wurden Restriktionsassays entwickelt. Lag in der untersuchten Region keine Schnittstelle vor, wurden mittels Mutageneseprimern Basenaustausche hervorgerufen (Tabellen 5 und 6, Anhang). Die verwendeten Restriktionsendonukleasen sind in Tabelle 11 zusammengestellt (Anhang). Die durch den Verdau von PCR-Fragmenten entstandenen Produkte wurden elektrophoretisch aufgetrennt (Schmidt, 2000).

2.2.2.3 Real-time PCR und Detektion eines Junctionfragments im SLC3A1-Gen

Um größere Deletionen oder Duplikationen in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 zu detektieren, wurden bei den Patienten Cys 2-Cys 110 mittels real-time PCR die Kopienzahl einzelner Fragmente beider Gene bestimmt (Schmidt et al. 2003b). Basierend auf der 5' Nuklease-Chemie wurden Ansätze zur Quantifizierung etabliert (Livak 1999). Für SLC3A1 und SLC7A9 wurden Fragmente gewählt, die gleich über die genomische Region beider Gene verteilt waren (Abbildung 5, Kapitel IV.1.5.1). Um die Kopienzahl dieser Testfragmente zu bestimmen wurde ein externes Referenzfragment parallel im gleichen Lauf amplifiziert. Die real-time PCR wurde mittels des ABI® Prism sequence detection system (Applied Biosystems, Darmstadt, D) durchgeführt. Die Angaben zu den Oligonukleotiden, den Reaktionsbedingungen sowie der Datenauswertung wurden kürzlich beschrieben (Schmidt et al. 2003b). Nach der Detektion erhöhter Kopienzahlen, die einer Duplikation im SLC3A1-Gen entsprachen, wurden quantitative PCR-Ansätze mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR green eingesetzt, um die duplizierte Region einzugrenzen. Nachdem die Duplikation auf einen Bereich von Intron 4 bis Intron 9 eingeeengt werden konnte, wurde auf PCR-Basis ein Junctionfragment etabliert, welches den Übergang von Intron 9 zu Intron 4 umfasste (Abbildung 6, Kapitel IV.1.5.1). Hiermit wurde nachgewiesen, dass die Duplikation in Schwanz-Kopf-Orientierung stattgefunden hatte. Mittels der Primerkombination DCF/YAR wurde ein Junctionfragment generiert, welches direkt sequenziert wurde. Ein Junctionfragment konnte auch auf RNA-Ebene mittels der cDNA-Primerkombination C5D/C3R an aus früheren Untersuchungen vorhandener RNA der Patienten Cys 10 und Cys 16 nachgewiesen werden (Schmidt et al. 2003b).

2.2.2.3.1 Quantitative Restriktionsanalysen

Bevor die Duplikation im SLC3A1-Gen durch ein spezifisches Junctionfragment dargestellt werden konnte, wurde ein quantitativer Fluoreszenz-Test entwickelt, der auf einem Restriktionsverdau für den Polymorphismus c.1332+7C>T (Bisceglia et al. 1996) in Intron 7 basiert. Dieser Ansatz diente der Bestätigung der Befunde aus der real-time PCR. Die Genotypen der Patienten für die Variante wurden bereits in früheren Studien bestimmt (Schmidt, 2000).

Es wurden zwei Patienten untersucht, die für die Variante heterozygot waren und den quantitativen real-time PCR-Ergebnissen zufolge jeweils Träger von drei bzw. vier Kopien für Exon 7 waren. Als Kontrollen wurden heterozygote Probanden mit normalen quantitativen Werten analysiert, sowie Probanden, die für jedes Allel des Polymorphismus homozygot waren.

Die PCR für Intron 7 wurde mit FAM-markierten Primern durchgeführt (Tabellen 5 und 9, Anhang), die Produkte wurden mit dem Restriktionsenzym *MnII* verdaut. Die entstandenen Fragmente wurden mittels Elektrophorese in einem 4,5 % Polyacrylamidgel auf dem ABI Prism 377[®]-Sequenzierer aufgetrennt. Die Peak-Höhen der Fluoreszenzsignale wurden für die unterschiedlichen Genotypen verglichen. Die Daten wurden mittels der Genescan- und Genotyper-Software analysiert (Applied Biosystems, Darmstadt, D).

2.2.2.3.2 Kopplungsanalysen der Loci D2S2298 und D2S2291 unter Duplikationsträgern und Kontrollen

Die detektierte Duplikation im SLC3A1-Gen konnte nur unter deutschen Patienten nachgewiesen werden. Um zu überprüfen, ob die Mutation aus einem Founder-Allel hervorgegangen ist, wurden Kopplungsanalysen durchgeführt. Dazu wurden die Allele der Marker D2S2298 und D2S2291 unter den sieben deutschen Duplikationsträgern sowie unter 71 bzw. 72 deutschen Kontrollen untersucht. Der Marker D2S2298 liegt 360kb distal des Genlokus 2p21. D2S2291 ist 1280kb proximal des Genortes lokalisiert. Ein näherer für die Analyse geeigneter Marker war nicht verfügbar. Die Marker wurden ebenfalls für die in Abschnitt III.2.3 beschriebene Kopplungsanalyse verwendet, die Methodik ist dort beschrieben.

Für die Daten zum Marker D2S2298 wurde anschließend ein *exact Fisher test* durchgeführt, um eine Kopplung des Markers mit dem Genort zu überprüfen.

2.3 Kopplungsanalyse

Für fünf Familien, in denen keine Mutationen in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 (Chromosom 2p21 und 19q13.1) detektiert werden konnten, wurden mittels Mikrosatelliten-Analyse Kopplungsuntersuchungen für die Gene SLC3A1 und SLC7A9 sowie die Kandidatengenen SLC1A1, SLC7A8 und SLC7A10 (Chromosom

9p24.2, 14q11.2 und 19q13.1) durchgeführt. Zeigten die Marker mögliche Kopplung, wurden die Kandidatengene mittels direkter Sequenzierung untersucht.

Vier der getesteten Patienten bzw. Familien waren biochemisch als nicht-Typ I-Patienten klassifiziert, eine Familie war für die Typ I-Cystinurie eingeordnet (Tabelle 4, Anhang).

2.3.1 Short tandem repeats (STRs)

Die Kopplungsuntersuchungen erfolgten mittels der in Tabelle 3 zusammengefassten Marker. Die Primer zur Amplifikation der Marker wurden der *Genome Data Base* entnommen. An das Standardprogramm der PCR wurde nach der finalen Elongation ein weiterer Schritt zur Reduzierung der Stotterbanden angeschlossen (30' 60°C). Die Annealingtemperaturen sowie die Fragmentgrößen sind in Tabelle 3 dargestellt. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen nach der Elektrophorese der Fragmente auf dem ABI Prism[®] 377 genetic analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt, D) waren die Vorwärtsprimer der Amplikons am 5'-Ende mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert (Tabelle 3). Die anschließende Auswertung erfolgte mittels der Genotyper-Software (Applied Biosystems, Darmstadt, D).

Marker	Fluoreszenz-Farbstoff	Annealing [°C]	Größe [bp]	Het.-Wert
D2S2298	FAM	58	182-236	0,88
D2S2291	FAM	59	233-247	0,76
D19S882	FAM	53	269-283	0,75
D19S414	HEX	57	163-187	0,78
D19S225	FAM	58	170-180	0,73
D19S416	TET	57	173	0,80
D19S425	FAM	53	255	0,87
D14S990	FAM	58	155	0,85
D14S64	FAM	59	126-136	0,77
D9S1813	TET	57	226-264	0,84
D9S1810	HEX	59	202-214	0,78

Tabelle 3: Verwendete Mikrosatellitenmarker für die Kopplungsanalysen. Het.-Wert: Heterozygotie-Wert.

2.3.2 Sequenzierung

Die Sequenzierung der kodierenden Regionen der Gene SLC7A8 und SLC7A10 wurde wie bereits beschrieben durchgeführt. Primer und PCR-Bedingungen sind in den Tabellen 7 und 8 sowie 12 und 13 zusammengefasst (Anhang). Für beide Gene wurden jeweils elf Exons analysiert. Die Sequenzierung beider Gene bei Patientin Cys 47 mit isolierter Cystinurie wurde ohne vorhergehende Kopplungsanalyse durchgeführt.

2.4 Detektion und statistische Analyse der Polymorphismen im SLC7A9-Gen

Im Rahmen des Mutationsscreenings (Schmidt, 2000, Botzenhart, 2003) wurden im SLC7A9-Gen 15 verschiedene Polymorphismen identifiziert (Tabelle 4). Die Allelverteilung der Polymorphismen wurde nun für 59 unverwandte Cystinurie-Patienten (Cys 2-Cys 110) und 58 gesunde deutsche Kontrollen bestimmt (Schmidt et al. 2002, Schmidt et al. 2003a). Die Patientengruppe setzte sich aus 56 Patienten aus dem Mutationsscreening sowie den zwei als heterozygot für die nicht-Typ I-Cystinurie klassifizierten Probanden zusammen. Weiterhin wurde die Probandin Cys 27 analysiert, die sich im Nachhinein allerdings als nicht betroffen herausstellte. Die Patientin Cys 9 wurde nicht berücksichtigt, da zu diesem Zeitpunkt angenommen wurde, dass sie die Schwester der Patientin Cys 13 ist. Die Geschwister der Patienten wurden nicht berücksichtigt. Unter den Patienten befanden sich 32 Deutsche sowie 27 Patienten unterschiedlichen ethnischen Ursprungs.

Für die meisten der im SLC7A9-Gen identifizierten Polymorphismen wurden zur Bestimmung des Genotyps Restriktionsverdauungen durchgeführt (Exon 2.1, Exon 3, Intron 3, Exon 5, Exon 9, Exon 11) (Tabelle 4). Die Varianten in Exon und Intron 4 wurden mittels direkter Sequenzierung bestimmt, die Polymorphismen in Exon 6 und Intron 9 konnten mittels SSCP dargestellt werden. Die Nachweisverfahren für die einzelnen Varianten sind in Tabelle 4 zusammengestellt (siehe auch Schmidt et al. 2002, Schmidt et al. 2003a).

Die statistischen Analysen zu den identifizierten Polymorphismen im SLC7A9-Gen wurden von Herrn Prof. Dr. J. Tomiuk, Institut für Anthropologie und Humangenetik Tübingen, durchgeführt (Schmidt et al. 2002, Schmidt et al. 2003a).

Exon / Intron	Polymorphismus	Nachweis
Exon 2	c.147C>T	<i>Hha</i> I-Verdau
Exon 3	c.386C>T	<i>Nde</i> I-Verdau
Intron 3	IVS3+22T>G	<i>Sac</i> RI-Verdau
Exon 4	c.584C/T	Sequenzierung
Exon 4	c.596T>C	Sequenzierung
Exon 4	c.610T>C	Sequenzierung
Intron 4	IVS4+10T>C	Sequenzierung
Exon 5	c.692C>T	<i>Mbo</i> II-Verdau
Intron 5	IVS5+10G>A	<i>Btg</i> I-Verdau
Intron 5	IVS5+24T>C	<i>Hpy</i> CH4V-Verdau
Exon 6	c.852C>A	SSCP
Exon 6	c.872C>T	SSCP
Exon 9	c.1157G>A	<i>Hha</i> I-Verdau
Intron 9	IVS9+51A>G	SSCP
Exon 11	c.1382C>T	<i>Acc</i> I-Verdau

Tabelle 4: Nachweismethoden zu den detektierten Polymorphismen im SLC7A9-Gen.

Die genotypischen Daten (Allelfrequenzen) wurden mittels des Computer-Programms GENEPOP (Raymond und Rousset 1995) analysiert. Dieses Programm liefert auch bei kleinen Datensätzen exakte Ergebnisse.

Die Homogenität der genetischen Strukturen in der Patientengruppe gegenüber der Kontrollgruppe wurde mit der Programmoption *exact tests of population differentiation* getestet.

Die Programmoption *Hardy-Weinberg exact tests* wurde verwendet, um statistische Abweichungen der beobachteten Genotypfrequenzen von den entsprechenden Hardy-Weinberg-Proportionen zu untersuchen

2.5 Spleißanalysen

Einige der oben genannten Polymorphismen zeigten in der statistischen Analyse ein unterschiedliches Verteilungsmuster zwischen Patienten und Kontrollen (Tabelle 5; Tabelle 14, Anhang) (Schmidt et al. 2002, Schmidt et al. 2003a). Um den Einfluss dieser Varianten auf Spleiß-Vorgänge zu untersuchen, wurden *Minigene*-Assays konstruiert, mittels derer in vitro-Studien möglich waren. Abbildung 7 zeigt den Versuchsablauf.

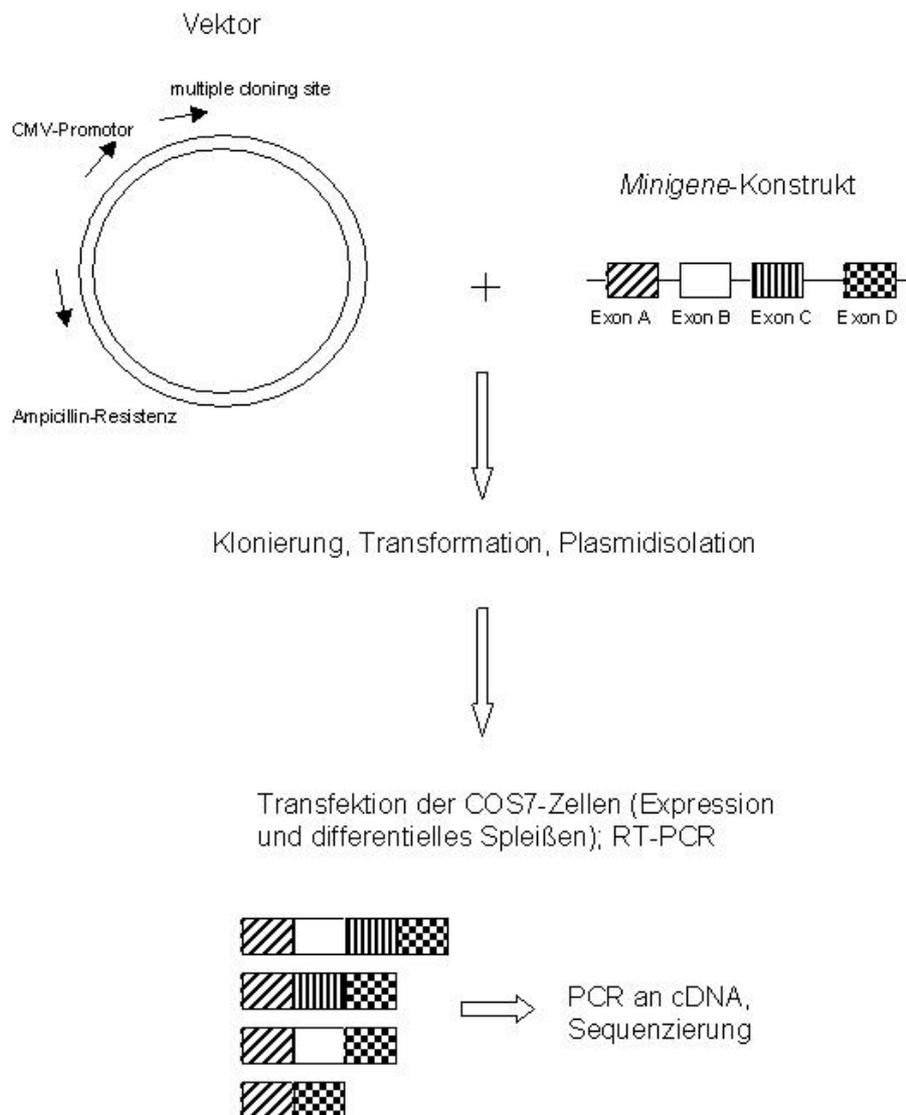


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs.

Durch PCR wurde ein Fragment genomischer Patienten-DNA amplifiziert, das mindestens drei Exons sowie die dazwischenliegenden Introns enthielt. Die Genotypen der Patienten wurden in den zuvor beschriebenen Analysen zu Varianten im SLC7A9-Gen bereits ermittelt und sind in Tabelle 5 dargestellt. Die in den PCR-Produkten jeweils mittig gelegenen Exone enthielten die zu untersuchenden Varianten (Tabelle 5). Die Konstrukte wurden in einen Expressionsvektor inkliniert und in *E.coli*-Bakterien transformiert. Die Plasmide der Kolonien wurden mittels Restriktionsanalysen sowie PCR getestet. Klone, die das Insert in der zur Expression korrekten Richtung enthielten, wurden angereichert; die Plasmide wurden isoliert und aufgereinigt. Die Plasmid-Konstrukte wurden in COS7-Zellen transfiziert, in denen das Spleißen stattfindet. Nach zwei Tagen wurde die RNA der Zellen isoliert und eine

RT-PCR durchgeführt. Die so erhaltene cDNA wurde mittels PCR untersucht, die generierten Fragmente wurden sequenziert.

Konstrukt	untersuchte Varianten	Patient	Genotyp des Patienten
A	c.147C>T	Cys 3	c.147C/C
		Cys 25	c.147T/T
B	c.386C>T, IVS3+22T>G, c.584C>T, c.610T>C	Cys 15	c.386C/C, IVS3+22G/G, c.584T/T, c.610C/C
		Cys 63	c.386T/T, IVS3+22T/T, c.584C/C, c.610T/T
B1	c.386C>T, IVS3+22T>G	Cys 15	c.386C/C, IVS3+22G/G
		Cys 63	c.584C/C, c.610T/T
B2	c.584C>T, c.610T>C	Cys 15	c.584T/T, c.610C/C
		Cys 63	c.584C/C, c.610T/T
C	c.692C>T, c.852C>A, c.872C/T	Cys 3	c.692C/C, c.852C/C, c.872C/C
		Cys 15	c.692T/T, c.851A/A, c.872T/T

Tabelle 5: Übersicht über die analysierten Varianten im SLC7A9-Gen und Genotypen der untersuchten Patienten; alle Polymorphismen zeigten eine statistisch signifikante unterschiedliche Verteilung unter Patienten und Kontrollen.

2.5.1 Erzeugung des Inserts

Zunächst wurde das zu klonierende DNA-Fragment mittels einer PCR amplifiziert. Es wurden fünf unterschiedliche *Minigene*-Konstrukte hergestellt (Tabelle 6). Da es sich um große Fragmente handelte, die für die anschließende Klonierung keine Überhänge haben dürfen (*blunt-end*), wurde mit der High-Fidelity-Polymerase der Firma Roche gearbeitet. Diese Polymerase amplifiziert ein Gemisch von *sticky*- und *blunt-end* und besitzt zudem eine Korrektur-Aktivität. Als Template diente die DNA verschiedener Patienten, die für die zu untersuchenden Varianten homozygot waren (Tabelle 5, Abschnitt 2.5). Die Primer wurden so gewählt, dass für die spätere gerichtete Klonierung am 5'-Terminus des PCR-Produktes ein CACC-Ende vorlag (Tabelle 6).

Die PCR-Reaktionen wurde in einem Volumen von 50µl angesetzt und enthielten final jeweils 1x Reaktionspuffer, 200µM dNTPs, 300nM Primer (F und R) und 3 U Enzym. Die MgCl₂-Konzentration lag bei Fragment C bei 1,5mM, bei Fragment B bei 1,75mM und bei den Fragmenten A, B1 und B2 bei 2mM.

Konstrukt	Fragmentgröße	enthaltene Exone	Primer	Primersequenz (5'-3')
A	5,3kb	1, 2, 3	SLC7A9-1Fz SLC7A9-3Rz	cacc -atttctagggttggaccgtg ctgtttgccatacatgtgcc
B	6,5kb	2, 3, 4, 5	SLC7A9-2Fz SLC7A9-5Rz	cacc -tggacaatgtaatgactgactttgac tctttgtgttctgtaatgaagcc
B1	4,7kb	2, 3, 4	SLC7A9-2Fz SLC7A9-DR	cacc -tggacaatgtaatgactgactttgac gagtccccagacaccctctg
B2	2,4kb	3, 4, 5	SLC7A9-3Fz SLC7A9-5R	cacc -ccgggctggcactaac agtggaagggcgtttggtgtgtg
C	4,7kb	4, 5, 6, 7	SLC7A9-4Fz SLC7A9-7Rz	cacc -atgtatggcaaacagggtgaaatca aacttaagcgtgcatagtgtgctc

Tabelle 6: Übersicht über die untersuchten *Minigene*-Konstrukte.

Die Programme der einzelnen PCR-Reaktionen setzten sich folgendermaßen zusammen:

Schritt	A	B	B1	B2	C
1. Initiale Denaturierung	94°C 3'	95°C 5'	94°C 5'	94°C 5'	94°C 2'
2. Denaturierung	94°C 20"	94°C 15"	94°C 30"	94°C 30"	94°C 15"
3. Annealing	60°C 40"	58°C 30"	60°C 30"	57°C 30"	61°C 30"
4. Extension	68°C 5,5'	68°C 5,5'	68°C 3,5'	72°C 2'	68°C 5'
5. Zyklen (2.-4.)	15x	17x	12x	12x	10x
6. Denaturierung	94°C 20"	94°C 15"	94°C 30"	94°C 30"	94°C 15"
7. Annealing	60°C 40"	58°C 30"	60°C 30"	57°C 30"	61°C 30"
8. Extension +6"/Zyklus	72°C 5,5'	72°C 5,5'	72°C 3,5'	72°C 2'	72°C 5'
9. Zyklen (6.-8.)	25x	27x	25x	25x	20x
10. Finale Extension	72°C 30'	72°C 30'	72°C 30'	72°C 30'	72°C 30'

Tabelle 7: PCR-Bedingungen zur Erzeugung der *Minigene*-Konstrukte.

Um eine hohe Reinheit des Produktes zur späteren Klonierung zu erzielen, wurde eine Gelextraktion mit dem QIAquick-Gelextraction-Kit durchgeführt.

2.5.2 Klonierung und Transformation

Nach den Klonierungen wurden die PCR-Fragmente in den Expressionvektor pcDNA3.1D/V5-His-TOPO[®] eingebracht. Durch Anzucht einer Bakterienkultur konnte anschließend eine große Menge des gewünschten Plasmids in reiner Form isoliert werden. Die Zusammensetzung der zur Bakterienkultur verwendeten Medien wurde bereits beschrieben (Schmidt, 2000). Mittels Sequenzierung der kodierenden

Abschnitte wurde bestätigt, dass die zu untersuchenden Varianten vorlagen und keine weiteren Sequenzvarianten vorhanden waren (Tabelle 5, Abschnitt 2.5). Es wurde mit dem TOPO-Directional-pcDNA-Cloning-Kit gearbeitet. Der in dem Kit enthaltene Vektor ist bereits linearisiert und besitzt am 3'-Ende des zur Expressionsrichtung komplementären Stranges einen GTGG-Überhang. Dieser Überhang rekombiniert mit dem CACC-Ende des PCR-Produktes und ermöglicht so eine gerichtete Klonierung. Weiterhin ist an den Enden des Vektors kovalent Topoisomerase I gebunden, die gewährleisten soll, dass der lineare Vektor nicht religiert.

Ligation und Klonierung erfolgten laut Protokoll des Herstellers. Für die Transformation wurden die im Kit enthaltenen chemisch kompetenten TOP10-*E.coli*-Zellen verwendet. Die Plasmide wurden durch Hitzeschock in die Bakterien eingeschleust. In Ergänzung zu den Angaben des Herstellers wurde eine zweistündige Regenerationszeit der Bakterien angewandt. Die Bakterien wurden auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert, über Nacht kultiviert und mittels PCR und Restriktionsverdauen auf den Erfolg der Klonierung hin überprüft:

Die gewachsenen Kolonien wurden in 15µl A.dest gelöst und 10' bei 94°C denaturiert. Mit dem Lysat wurde eine PCR durchgeführt. Dabei wurden die Primer so gewählt, dass ein Primer im Vektor bindet, der andere im Insert. So konnte direkt überprüft werden, ob das Insert im Vektor in der richtigen Orientierung enthalten war. Zur Bestätigung dessen wurde das PCR-Produkt sequenziert.

2.5.3 Plasmid-Isolation

Positive Kolonien wurden in einer Übernachtskultur hochgezogen, anschließend wurde eine Plasmid-Mini-Prep nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Am gereinigten Plasmid wurde mittels Sequenzierung überprüft, ob die korrekte Sequenz des Inserts vorhanden war. Anhand eines den Vektor linearisierenden Restriktionsenzym wurde zusätzlich die Größe des Vektors mit Insert überprüft. Alle Plasmide konnten mit dem Restriktionsenzym *HindIII* linearisiert werden. Die aufgereinigten Plasmide konnten direkt zur Transfektion verwendet werden (Abschnitt 2.5.5)

2.5.4 Zellkultur

Die COS7-Zellen wurden vom Institut für Biochemie, Universitätsklinikum Aachen, zur Verfügung gestellt. Die Kultur erfolgte in antibiotikumfreiem *Dulbecco's Modified Eagle* Medium mit Glutamax-I mit 10 % FKS in einem Volumen von 10ml, bei einer Temperatur von 37°C sowie einem CO₂-Gehalt von 5 %. Hatten die Zellen nach ca. drei Tagen eine hohe Konfluenz (>90 %) erreicht, wurde ein Mediumwechsel (Subkultivierung) durchgeführt. Dabei wurde das Wachstumsmedium entfernt und verwahrt. Die adhärenen Zellen wurden 2x mit 5ml 1x PBS gewaschen und anschließend mittels 2ml Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Um die Trypsinierung abzustoppen, wurden die Zellen im konditionierten Medium aufgenommen, 10' bei 500rpm abzentrifugiert und in 5ml frischem Medium aufgenommen. Davon wurde 1ml in eine neue Kulturflasche mit 9ml Medium überführt.

Sollte mit den Zellen eine Transfektion durchgeführt werden, wurden die Zellen in einem Volumen von 500µl/well in 24-well-Platten kultiviert.

2.5.5 Transfektion

Die Zellen sollten bei der Transfektion eine Konfluenz von >90 % aufweisen. Die Transfektion der Zellen erfolgte mittels des Reagenz LipofectamineTM 2000. Dabei wird die Transfektionslösung mit der zu transfizierenden DNA zusammengebracht. Die kationischen Lipide lagern sich um die anionische DNA. Wird der Lipid-DNA-Komplex zu den Zellen gegeben, vereinigen sich die lipophilen Komplexe mit den hydrophoben anionischen Membranen der COS7-Zellen. Die DNA wird in die Zellen aufgenommen und in den Zellen aufgrund des CMV-Promoters des Vektors überexprimiert.

Die Transfektion erfolgte nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden jeweils 800ng Plasmid-DNA sowie 2µl LipofectamineTM 2000 in 50µl OPTI-MEM-Medium ohne Zusätze gelöst und anschließend vermischt und zu den Zellen gegeben. Das Kultur- und Transfektionsvolumen betrug somit 600µl.

2.5.6 RNA-Isolation

Nach zwei Tagen Expression der *Minigene*-Konstrukte in COS7-Zellen wurde die RNA isoliert. Zunächst wurden die Zellen mittels 300µl Trypsin/EDTA vom Boden der *Wells* abgelöst, die RNA-Isolation erfolgte mittels des QIAamp® RNA Blood Mini Kits nach dem Protokoll für kultivierte Zellen. Die RNA wurde in einem Volumen von 30µl in RNase-freiem Wasser eluiert und 10' bei 65°C denaturiert, um die Bildung von Sekundärstrukturen zu unterbinden. Konzentration und Reinheit der RNA wurden photometrisch bestimmt.

2.5.7 RT-PCR und cDNA-Analysen

Im Anschluss an die Isolation wurde die RNA mittels einer RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Die RT-PCR wurde mit für das SLC7A9-Gen spezifischen exonischen Primern (Tabelle 8) für das jeweilige Fragment durchgeführt und erfolgte nach Angaben des Herstellers durch das Reverse Transcription System in einem Volumen von 20µl. Dazu wurde 1µg der isolierten RNA eingesetzt.

Fragment	cDNA-Primer	Sequenz (5'-3')	Annealing
B	SLC7A9-c2F SLC7A9-c5R	ggatactggcctgagaaagcg atcaccagcttgccgc	60°C
B2	SLC7A9-3Fmis SLC7A9-c5R	ttccccaagtctgtgctct atcaccagcttgccgc	61°C
C	SLC7A9-c4F SLC7A9-c7R	gtgccctgtgctttgcg ctaagttcttctgtgatgtaattgagttga	57°C

Tabelle 8: Übersicht über die cDNA-Primer, mittels derer die RT-PCR und die anschließenden PCR-Ansätze durchgeführt wurden.

Die auf diese Weise erhaltene cDNA wurde durch verschiedene Amplifikationen weiter untersucht. Die PCR-Reaktionen mit der cDNA als Template erfolgten nach folgendem Standard-Programm:

94°C	5'	} 35x
94°C	30"	
T _A	1'	
72°C	1,5'	
72°C	10'	

Die Amplifikationen wurden in einem Volumen von 50µl durchgeführt und enthielten folgende Reagenzien: 1x RT-Puffer, 200µM dNTPs, 1µM Primer (F und R), 2mM MgCl₂, 2,5U Platinum® *Taq* DNA Polymerase sowie jeweils 10µl cDNA. Die erhaltenen Fragmente wurden sequenziert. Die verwendeten Primer und Annealing-Temperaturen sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

2.5.8 Analyse der Aceview-Datenbank der NCBI

Eine Analyse der *Aceview*-Datenbank der NCBI zeigte, dass mehrere Isoformen des SLC7A9-Gens existieren, die durch differentielles Spleißen entstehen.

Um das Vorhandensein sowohl dieser beschriebenen Spleißvarianten als auch der bei den eigenen Analysen detektierten Varianten *in vivo* zu überprüfen, wurde kommerziell erhältliche RNA aus Niere sowie Universal-RNA aus einem Gewebegemisch untersucht. Abbildung 8 in Kapitel IV.5.2 gibt eine Übersicht über die bisher bekannten Isoformen.

Für die RT-PCR an der kommerziellen RNA wurden die Primer SLC7A9-c2F/SLC7A9-c12R verwendet, für die anschließenden PCR-Ansätze verschiedene exonische Primer (Tabelle 9).

cDNA-Primer	Sequenz (5'-3')	Annealing
SLC7A9-c2F SLC7A9-c12R	ggatactggcctgagaaagcg ggccgcttaataaacagcacacag	58-62°C
SLC7A9-c4F SLC7A9-c7R	gtgccctgtgctttgcg ctaagttcttctgtgatgtaattgagttga	57°C
SLC7A9-c4F SLC7A9-c9R	gtgccctgtgctttgcg ctgcccgtgtgaagca	56°C
SLC7A9-c7F SLC7A9-c9R	gaagaacttagaaacccttacag ctgcccgtgtgaagca	60°C
SLC7A9-c7F SLC7A9-c12R	gaagaacttagaaacccttacag ggccgcttaataaacagcacacag	57°C

Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten exonischen Primer zur Amplifikation bestimmter Fragmente an cDNA aus Niere sowie Universal-Gewebe.

2.5.9 Untersuchung möglicher Spleiß-Enhancer mittels der ESEfinder-Software

Der Spleißvorgang wird nicht nur durch das Konsensusmotiv an den Intron-Exon-Übergängen geregelt, sondern ist darüber hinaus von weiteren Faktoren abhängig

(Spleißfaktoren). Dazu gehören die SR-Proteine, die an bestimmte exonische Erkennungssequenzen (ESEs, = *exonic splicing enhancer*) binden. So kann das Spleißen an „schwachen“ Spleißstellen verstärkt werden.

Die Spleißfaktoren können sich in verschiedenen Geweben unterscheiden. Mutationen, die ein Konsensusmotiv für die Spleißfaktoren zerstören oder erzeugen, können so das Spleißen hemmen oder verstärken. Demnach ist es denkbar, dass Varianten, im Zusammenspiel mit anderen Faktoren oder allein, das Spleißverhalten einer Sequenz verändern. Werden beim modifizierten Spleißen ein oder mehrere Exons entfernt, deren Abwesenheit nicht zu einer Leserasterverschiebung führt, muss die Veränderung keine pathogenen Auswirkungen haben.

Mittels der ESEfinder Software ist es möglich, die Sequenz eines Gens auf das Vorhandensein einer Erkennungssequenz für die SR-Proteine SF2/ASF, SC35, SRp40 und SRp55 hin zu untersuchen. Diese Proteine binden an verschiedene Sequenzmotive und fördern so das Spleißen. Liegen die Bindemotive für die genannten Proteine vor, wird ein *score* ermittelt, der angibt, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass das Motiv von dem Bindeprotein genutzt wird.

In der vorliegenden Studie wurde die kodierende Sequenz des SLC7A9-Gens auf die Existenz der Erkennungsmotive hin analysiert. Anschließend wurde ermittelt, ob einzelne Polymorphismen im SLC7A9-Gen, welche eine statistisch signifikant unterschiedliche Verteilung unter Patienten und Kontrollen zeigten, in derartigen Erkennungssequenzen lokalisiert sind.

IV. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden 23 Patienten mit Cystinurie (Cys 113-Cys 164) sowie zwei für nicht-Typ I Cystinurie heterozygote Probanden untersucht. Die bereits in vorherigen Arbeiten beschriebenen Patienten Cys 2-Cys 112, (n=57) sowie zwei für nicht-Typ I Cystinurie heterozygote Probanden standen für weitere Analysen zur Verfügung und bildeten zusammen mit den neuen Patienten das Gesamtkollektiv (Albers, 1998, Schmidt, 2000, Albers, 2001, Botzenhart, 2003). Die Einzelergebnisse des bereits durchgeführten Mutationsscreenings für die Patienten *Cys 2-Cys 112* werden im Folgenden sowie in den Tabellen im Anhang kursiv geschrieben.

Das Gesamtkollektiv bestand somit aus 80 unverwandten Cystinurie-Patienten. Betroffene Geschwister wurden nicht berücksichtigt. 13 der Patienten waren biochemisch als homozygot für Cystinurie Typ I, drei als homozygot für Cystinurie nicht-Typ I eingeordnet (Tabelle 4, Anhang). Bei neun Patienten wurde biochemisch eine „klassische“ Cystinurie diagnostiziert, da die Eltern zur genaueren Typisierung fehlten. 55 Patienten waren unklassifiziert, hier erfolgte keine biochemische Typisierung. Vier weitere Probanden waren als heterozygot für nicht-Typ klassifiziert (*Cys 84*, *Cys 93*, *Cys 129* und *Cys 140*). Die Patienten stammten aus acht verschiedenen Populationen (Tabelle 3, Anhang).

Von 73 Patienten war eine Steinbildung bekannt (91,25 %), bei 59 lag eine Altersangabe vor (Tabelle 3, Anhang). Die Übrigen waren bislang steinfrei, oder es fehlten Angaben zur Steinbildung.

Weiterhin wurde die DNA einer Patientin mit isolierter Cystinurie untersucht.

1. Mutationsnachweis in den Genen SLC3A1 und SLC7A9

1.1 Unspezifischer Mutationsnachweis mittels SSCP

Für die bereits beschriebenen Patienten *Cys 2-Cys 112* wurden mittels eines SSCP-Screenings die gesamten kodierenden Regionen sowie die Intron-Exon-Übergänge der Gene SLC3A1 und SLC7A9 untersucht (Albers et al. 1999, Botzenhart et al. 2002, Schmidt et al. 2002). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Promoter-Region des SLC3A1-Gens bei den Patienten *Cys 2-Cys 105* (n=53) sowie zwei als

heterozygot für die nicht-Typ I-Cystinurie eingeordneten Probanden mittels SSCP auf Mutationen hin analysiert (siehe IV.1.4). Die Etablierung der PCR-Bedingungen war problematisch und erforderte erneute Primerwahl.

Bei der Untersuchung der Patienten Cys 113-Cys 164 wurde die SSCP für die Exons 5, 7 und 10 des SLC7A9-Gens angewandt. Waren aus dem bereits durchgeführten Screening Patienten mit Auffälligkeiten bekannt, wurden diese als interne Kontrollen verwendet. Drei der neu untersuchten Patienten und Probanden zeigten ein auffälliges SSCP-Muster in den Exons 5 und 7 des SLC7A9-Gens (Cys 129, Cys 130, Cys 140). Aufgetretene Varianten wurden mittels Sequenzierung weiter untersucht.

1.2 Direkter Mutationsnachweis

Produkte, die in der SSCP auffällig waren, wurden mittels der direkten Sequenzierung untersucht. Für bereits bekannte Mutationen wurden Restriktionsanalysen durchgeführt (Tabelle 11, Anhang). Bei 12 der 25 neu untersuchten Patienten und Probanden konnten so Mutationen im SLC3A1-Gen, bei fünf Mutationen im SLC7A9-Gen detektiert werden.

1.3 Ergebnisse des Mutationsscreenings

Es wurden insgesamt 80 unverwandte Cystinurie-Patienten unterschiedlichen ethnischen Ursprungs auf Mutationen in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 hin untersucht. Vier weitere Probanden waren als heterozygot für nicht-Typ I klassifiziert. Somit liegt die gesamte Allelzahl bei 164.

Die Ergebnisse des Mutationsscreenings in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 sind in Tabelle 4 (Anhang) sowie in den Tabellen 10 und 11 dargestellt. Die durchgeführte real-time PCR wird in Kapitel IV.1.5 im einzelnen beschrieben, die Ergebnisse dazu werden hier schon erwähnt.

Insgesamt konnte bei 63 der 80 Patienten eine oder zwei Mutationen in den Genen SLC3A1 und/oder SLC7A9 nachgewiesen werden (=78,75 %) (Tabelle 10). Bei den vier als heterozygot für nicht-Typ I klassifizierten Probanden wurden drei Mutationen

detektiert (Tabelle 10). Bezogen auf die Chromosomen konnten 104 der 164 Allele erklärt werden (=63,41 %) (Tabelle 11).

Gen	Anzahl der detektierten Mutationen	unklassifiziert	klassisch	homozygot Typ I	homozygot nicht-Typ I	Gesamtzahl Probanden		heterozygot nicht-Typ I
		[n=55]	[n=9]	[n=13]	[n=3]	[n=80]	[n=4]	
SLC3A1	2	36,36 % (20)	33,33 % (3)	61,54 % (8)	-	38,75 % (31)	56,25 % (45)	-
	1	21,82 % (12)	11,11 % (1)	7,69 % (1)	-	17,5 % (14)		-
SLC7A9	2	7,27 % (4)	11,11 % (1)	-	33,33 % (1)	7,5 % (6)	21,25 % (17)	-
	1	16,36 % (9)	22,22 % (2)	-	-	13,75 % (11)		75 % (3)
SLC3A1/ SLC7A9	je 1	1,82 % (1)	-	-	-	1,25 % (1)		-
keine	-	16,36 % (9)	22,22 % (2)	30,77 % (4)	66,67 % (2)	21,25 % (17)		25 % (1)
	1 oder 2	83,64 % (46)	77,78 % (7)	69,23 % (9)	33,33 % (1)	78,75 % (63)		75 % (3)

Tabelle 10: Übersicht über die prozentualen und absoluten Zahlen der in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 homo- oder (compound-) heterozygot detektierten Mutationen unter unklassifizierten und klassifizierten Patienten. Von den unklassifizierten Patienten lagen keine Urinproben zur Typisierung vor, bei den Patienten mit klassischer Cystinurie wurde eine biochemische Untersuchung durchgeführt. Da keine Proben der Eltern vorlagen, konnten die einzelnen Typen aber nicht bestimmt werden.

Allelzahl	unklassifiziert	klassisch	homozygot Typ I	homozygot nicht-Typ I	heterozygot nicht-Typ I	Gesamtzahl Probanden
	[n=110]	[n=18]	[n=26]	[n=6]	[n=4]	
Mutationen in SLC3A1	48,18 % (53)	38,89 % (7)	65,38 % (17)	-	-	46,95 % (77)
Mutationen in SLC7A9	16,36 % (18)	22,22 % (4)	-	33,33 % (2)	75 % (3)	16,46 % (27)
gesamt	64,55 % (71)	61,11 % (11)	65,38 % (17)	33,33 % (2)	75 % (3)	63,41 % (104)

Tabelle 11: Prozentuale und absolute Zahlen der durch Mutationen erklärten Allele in den Genen SLC3A1 und SLC7A9. Von den unklassifizierten Patienten lagen keine Urinproben zur Typisierung vor, bei den Patienten mit klassischer Cystinurie wurde eine biochemische Untersuchung durchgeführt. Da keine Proben der Eltern vorlagen, konnten die einzelnen Typen nicht bestimmt werden.

Im SLC3A1-Gen konnten insgesamt 77 Mutationen nachgewiesen werden (Tabelle 11). Insgesamt traten zwölf unterschiedliche Mutationen auf. Neun waren Punktmutationen, die übrigen jeweils eine Nonsense-Mutation, eine Deletion sowie eine große Duplikation (Kapitel IV.1.5). Unter den 25 neuen Patienten und Probanden wurden 23 Mutationen im SLC3A1-Gen nachgewiesen. Der Aminosäureaustausch R356Q sowie die Duplikation wurden erstmals in dieser Arbeit beschrieben, die übrigen waren aus der Literatur bekannt (Tabelle 1, Anhang).

Im SLC7A9-Gen wurden 27 Mutationen detektiert (Tabelle 11), davon 13 unterschiedliche: Sechs der Mutationen stellten Punktmutationen dar, sechs weitere waren größere und kleinere Deletionen. Eine Mutation (IVS4-1G>A) führte zu aberrantem Spleißen. Unter den 25 neuen Patienten und Probanden wurden sechs Mutationen detektiert, die Spleißmutation IVS4-1G>A wurde erstmalig hier dargestellt.

In 58,18 % der unklassifizierten Patienten (32/55) wurden 53 Mutationen im SLC3A1-Gen detektiert (Tabellen 10 und 11). Dabei trugen 20 Patienten zwei Mutationen (homozygot oder compound-heterozygot), zwölf trugen eine Mutation (Tabelle 10). Ein Patient war gemischt heterozygot für jeweils eine Mutation im SLC3A1-Gen und eine Mutation im SLC7A9-Gen (Tabelle 10). Im SLC7A9-Gen wurden bei 23,63 % (13/55) der Patienten 18 Mutationen festgestellt (Tabellen 10 und 11). Vier Patienten waren homozygot bzw. compound-heterozygot für zwei Mutationen, neun heterozygot (eine Mutation) (Tabelle 10). In neun Fällen konnte keine Mutation detektiert werden (Tabelle 10).

Bei den neun Patienten mit „klassischer“ Cystinurie (Aminosäureprofil erstellt, aber keine Unterscheidung zwischen Typ I oder nicht-Typ I) wurden bei vier Patienten Mutationen im SLC3A1-Gen sowie bei dreien Mutationen im SLC7A9-Gen detektiert (Tabelle 10). Bei zwei Patienten wurde keine Mutation nachgewiesen. Unter den 13 Typ I-Homozygoten wurden 17 Mutationen im SLC3A1-Gen nachgewiesen, bei vier Patienten wurde keine Mutation detektiert (Tabellen 10 und 11).

Bei den drei Patienten, die als homozygot für nicht-Typ I klassifiziert wurden, konnte nur eine Mutation im homozygoten Zustand im SLC7A9-Gen bei einem Patienten nachgewiesen werden (Tabellen 10 und 11).

Unter den als Typ I-klassifizierten Patienten wurden nur Mutationen im SLC3A1-Gen detektiert. Bei Patienten, die als nicht-Typ I typisiert waren, wurden Mutationen im SLC7A9-Gen identifiziert.

1.4 Untersuchung der Promoter-Region des SLC3A1-Gens

Der Promoter-Bereich des SLC3A1-Gens wurde bisher erst in einer Studie untersucht (Boutros et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit wurden PCR-Fragmente für die Promoter-Region etabliert und für die Patienten Cys 2-Cys 105 mittels der SSCP-Analyse untersucht. Im Promoter-Bereich konnten jedoch keine Sequenzveränderungen detektiert werden.

1.5 Quantitative Analysen der Gene SLC3A1 und SLC7A9

1.5.1 Quantitative Analysen mittels real-time PCR

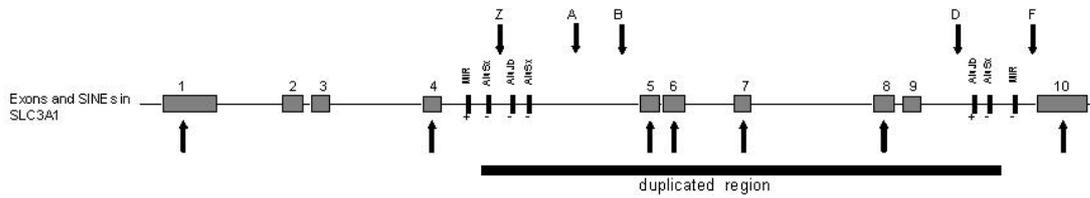
Die Patienten Cys 2-Cys 112 des Kollektivs wurden mittels quantitativer real-time PCR auf Deletionen und Duplikationen in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 hin untersucht (n=49, Schmidt et al. 2003b). Die neuen Probanden Cys 133-Cys 164 wurden in Hinblick auf das Vorliegen der Duplikation im SLC3A1-Gen analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst (Anhang).

Bei neun der untersuchten Patienten und Probanden wurde eine Duplikation der Exons 5 bis 9 im SLC3A1-Gen nachgewiesen, drei trugen eine Deletion im SLC7A9-Gen (Schmidt et al. 2003b).

Mittels quantitativer SYBR green PCRs wurde die duplizierte Region zwischen den Fragmenten D in Intron 9 und Z in Intron 4 eingegrenzt (Abbildung 5A). Durch PCR mit den Primern DCF/YAR wurde ein Junctionfragment amplifiziert, das die Übergangsregion umfasste und nur bei Duplikationsträgern nachweisbar war (Abbildung 6). Die Sequenzierung dieses Fragmentes auf DNA-Ebene zeigte ein komplexes Rearrangement der Region (Abbildung 9A). Bei den Patienten Cys 10 und Cys 16 konnte auch auf RNA-Ebene ein Junctionfragment nachgewiesen

werden, welches den Übergang von Exon 9 zu Exon 5 beinhaltet (Abbildung 6 und 9B) (Schmidt et al. 2003b).

A



B

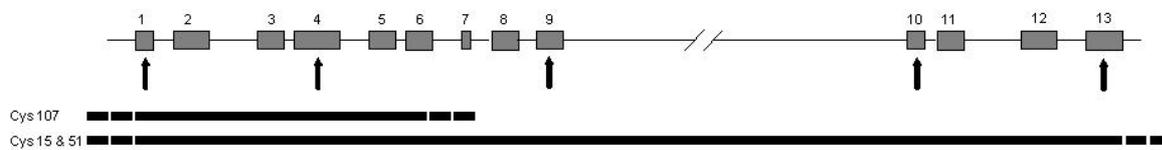


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Gene SLC3A1 (A) und SLC7A9 (B). Die Pfeile unterhalb der Grundlinie zeigen die Lage der sieben bzw. fünf ausgewählten Sonden. Das Ausmaß der Duplikation im SLC3A1-Gen und der Deletionen im SLC7A9-Gen ist durch die schwarzen horizontalen Balken unterhalb der Grundlinie dargestellt. (A): Alu-Elemente, die möglicherweise in die Entstehung des Rearrangements involviert sind, sind durch schwarze vertikale Balken auf der Grundlinie symbolisiert. Ihre Orientierung ist durch + / - angegeben. Die Pfeile oberhalb der Grundlinie zeigen die Lage der mittels SYBR green quantifizierten Fragmente zur Eingrenzung der Duplikation. (B): Das Ausmaß der Deletionen wurde nicht genauer bestimmt, dies wird durch die unterbrochenen Kästchen dargestellt.

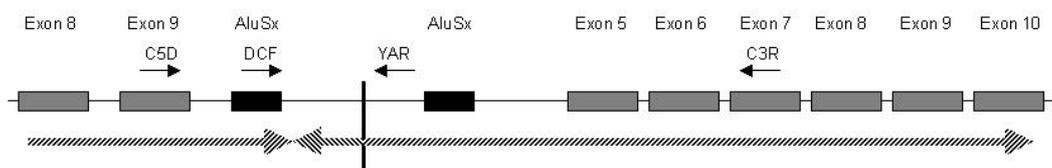
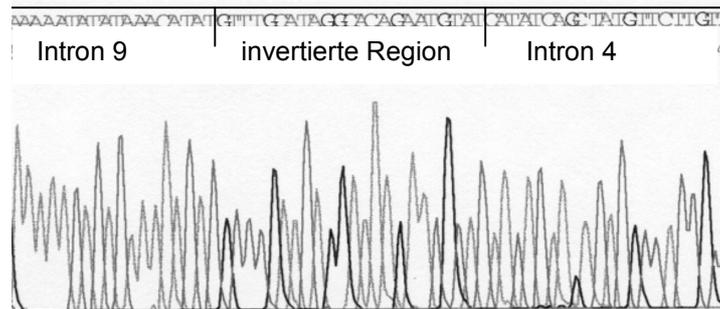


Abbildung 6: Schematische Darstellung der veränderten Region im SLC3A1-Gen. Lokalisierung der Primer zur Identifizierung des Junctionfragmentes (DCF/YAR) sowie Lage der exonischen Primer zur Darstellung der Duplikation auf cDNA-Ebene (C5D/C3R). Die schwarzen Kästchen symbolisieren die direkt benachbarten AluSx-Elemente. Der schwarze vertikale Balken zeigt den Bruchpunkt. Die Orientierung der beteiligten genomischen Sequenzen ist durch die Pfeile unterhalb der Grundlinie dargestellt.

A



B

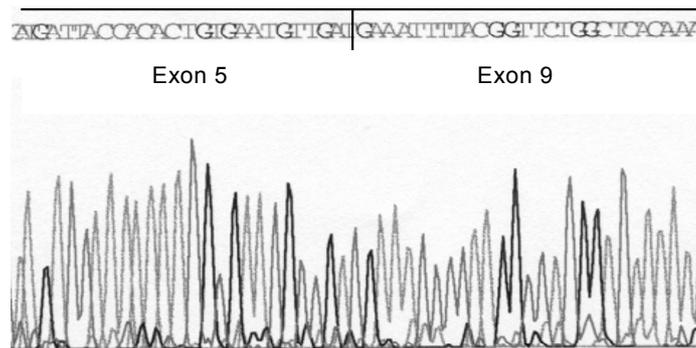


Abbildung 9: Darstellung der Übergangsregion der Duplikation mittels direkter Sequenzierung. (A): auf DNA-Ebene, (B): auf RNA-Ebene.

Die detektierte Duplikation war bei den neun Patienten mit diesem Umbau identisch. Fünf Patienten zeigten in den duplizierten Fragmenten jeweils drei Kopien, vier zeigten vier Kopien. Diese Werte entsprechen Heterozygotie bzw. Homozygotie für die Duplikation (Tabelle 4, Anhang).

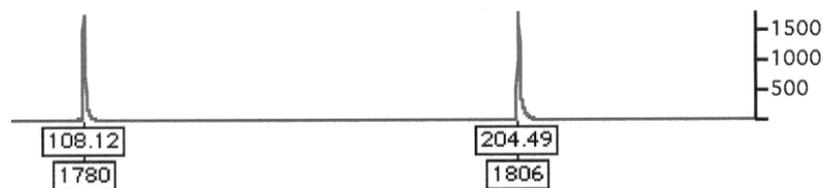
Im SLC7A9-Gen konnten mittels real-time PCR bei drei Patienten größere Deletionen nachgewiesen werden (Abbildung 5B). Bei der Patientin Cys 107 umfasste die Deletion die Exons 1 bis 4 und konnte auch bei der betroffenen Schwester Cys 108 nachgewiesen werden. Bei zwei weiteren Patienten (Cys 15 und Cys 51) war die gesamt kodierende Region des SLC7A9-Gens deletiert. Die genaue Größe der Deletionen wurde nicht untersucht.

Um die Reproduzierbarkeit der quantitativen Ansätze zu überprüfen, wurden für jede beobachtete Kopienzahl ($n = 1, 2, 3$ oder 4) fünf unabhängige real-time PCR-Ansätze für die jeweiligen Fragmente durchgeführt. Für die Durchschnittswerte der verschiedenen Kopienzahlen gab es keine Überlappungen (Schmidt et al. 2003b).

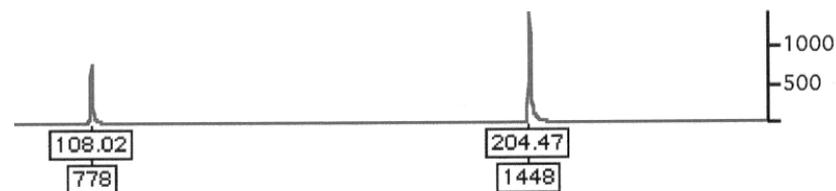
1.5.2 Quantitative Restriktionsanalysen

Um die Ergebnisse der quantitativen real-time PCR für die Duplikation im SLC3A1-Gen zu bestätigen, wurde ein Fluoreszenz-Test entwickelt, der auf einem Restriktionsverdau für den Polymorphismus c.1332+7T>C im Intron 7 des SLC3A1-Gens basiert. Die Quotienten der Fluoreszenz für die Allele 204bp und 108bp wurden in drei unabhängigen PCR-Ansätzen bestimmt und ein durchschnittlicher Quotient berechnet (Abbildung 10).

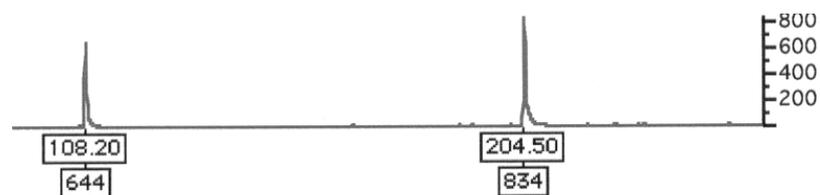
A



B



C



D

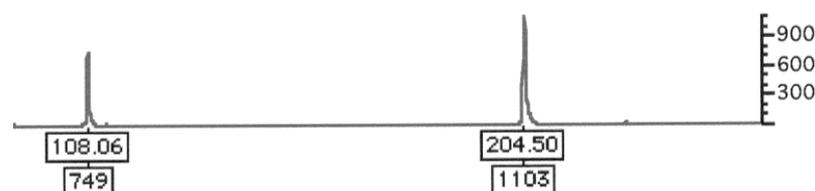


Abbildung 10: Darstellung der quantitativen Restriktionsanalysen für die Variante c.1332+7T>C im SLC3A1-Gen. Die oberen Zahlen stehen jeweils für die Größe des Fragments [bp], die unteren für die Intensität des Fluoreszenzsignals, anhand dessen die Quotienten für die Peaks gebildet wurden. (A): Homozygote Kontrolle für den Genotyp c.1332+7T/T, (B): Heterozygote Kontrolle mit dem Genotyp c.1332+7T/C, (C): Patient Cys 41 mit vier Kopien für Exon 7, (D): Patient Cys 42 mit drei Kopien.

Die Restriktionsanalyse für Proben, die homozygot für die Variante c.1332+7T waren, zeigt in der Fluoreszenzanalyse zwei Peaks, die ungefähr gleich hoch waren (Abbildung 10A). Das Verhältnis der Peakhöhen lag bei 1,1. DNA-Proben, welche homozygot für das Wildtyp-Allel c.1332+7C waren, zeigten nur das 204bp-Allel (nicht dargestellt). Für die heterozygoten Proben lag der Quotient bei 1,74 (Abbildung 10B). Für den Patienten Cys 41, der Träger von vier Fragmentkopien ist, wurde ein Quotient von 1,33 gemessen (Abbildung 10C). Dieser Wert stimmt mit dem Vorhandensein von einem Wildtyp-Allel C und drei Allelen T überein. Für den Patienten Cys 42 wurden drei Fragmentkopien vermutet, der gemessene Quotient lag bei 1,51 (Abbildung 10D). Diese Beobachtung stimmt mit dem Vorliegen von einem Wildtyp-Allel C und zwei Allelen T überein.

1.5.3 Kopplungsanalysen der Loci D2S2298 und D2S2291 unter Duplikationsträgern und Kontrollen

Um zu überprüfen, ob die detektierte Duplikation im SLC3A1-Gen auf einen Founder zurückzuführen ist, wurden Kopplungsanalysen durchgeführt. Dazu wurden die Allele der Marker D2S2298 und D2S2291 unter sieben deutschen Duplikationsträgern, soweit verfügbar unter deren Eltern, sowie unter 71 bzw. 72 deutschen Kontrollen untersucht. Die Patienten Cys 10, Cys 16, Cys 29 und Cys 42 sind heterozygot für die Duplikation, Cys 41, Cys 60 und Cys 87 sind homozygot für die Duplikation. Die Chromosomenzahl für die Duplikationsallele liegt demnach bei zehn. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 12 - 15 dargestellt.

Patient	sicher gekoppelte Allele [bp]	nicht gekoppelte Allele [bp]	Allele mit unklarer Kopplung [bp]
Cys 10	-	-	194/226
Cys 16	212	212	-
Cys 29	226	204	-
Cys 41	220/220	-	-
Cys 42	-	-	212/226
Cys 60	226/226	-	-
Cys 87	226/226	-	-

Tabelle 12: Übersicht über die detektierten Allele des Markers D2S2298 unter Duplikationsträgern sowie deren Kopplungsstatus.

Allel [bp]	Häufigkeit unter Chromosomen	
	deutscher Kontrollen (n=142)	der Patienten (n=14)
184	1,41 %	-
194	24,65 %	7,14 %
196	11,27 %	-
198	0,7 %	-
200	2,11 %	-
202	2,82 %	-
204	2,11 %	7,14 %
206	2,11 %	-
208	2,82 %	-
210	2,11 %	-
212	6,34 %	14,29 %
214	2,11 %	-
216	4,93 %	-
218	4,23 %	-
220	11,97 %	14,29 %
222	3,52 %	-
224	8,45 %	-
226	4,23 %	57,14 %
228	0,7 %	-
232	0,7 %	-
236	0,7 %	-

Tabelle 13: Übersicht über die Häufigkeiten der einzelnen Allele des Markers D2S2298 unter deutschen Kontrollpersonen.

Patient	sicher gekoppelte Allel [bp]	nicht gekoppelte Allele [bp]	Allele mit unklarer Kopplung [bp]
Cys 10	233	233	-
Cys 16	-	-	239/243
Cys 29	233	239	-
Cys 41	-	-	237/243
Cys 42	-	-	241/247
Cys 60	243	241	-
Cys 87	245	237	-

Tabelle 14: Übersicht über die detektierten Allele des Markers D2S2291 unter Duplikationsträgern sowie deren Kopplungsstatus.

Für den Marker D2S2298 konnte dargestellt werden, dass das Allel 226bp sicher mit 50 % der Duplikationschromosomen gekoppelt ist. Unter Kontrollen macht das Allel nur 4,23 % der Chromosomen aus. Die statistische Analyse zeigte, dass die Verteilung des Allels 226bp in Patienten und Kontrollen signifikant unterschiedlich ist ($p=0,010$). Für den Marker D2S2291 konnte für kein Allel eine gehäufte sichere Kopplung mit den Duplikationschromosomen festgestellt werden.

Allel [bp]	Häufigkeit unter Chromosomen	
	deutscher Kontrollen (n=144)	der Patienten (n=14)
233	18,06 %	21,43 %
235	2,08 %	-
237	-	14,29 %
239	19,44 %	14,29 %
241	4,17 %	14,29 %
243	26,39 %	21,43 %
245	6,25 %	7,14 %
247	2,78 %	7,14 %

Tabelle 15: Übersicht über die Häufigkeiten der einzelnen Allele des Markers D2S2291 unter deutschen Kontrollpersonen.

1.6 Diagnostisches Schema

Im Rahmen der Arbeit wurde ein diagnostisches Schema erstellt, anhand dessen die häufigsten Mutationen in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 schnell und kostengünstig untersucht werden sollten. Erste Ergebnisse zur Anwendung wurden bereits publiziert (Eggermann et al. 2003). Zwar tritt die Mehrzahl der ca. 130 bisher beschriebenen Mutationen in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 familienspezifisch auf, dennoch sind einige Mutationen mehrfach beschrieben und sind in Abhängigkeit der ethnischen Herkunft der Patienten gehäuft zu finden. Anhand des geplanten diagnostischen Schemas wurden die in Tabelle 16 dargestellten Mutationen in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 untersucht.

Die in dieser Arbeit neu untersuchten Patienten wurden ausschließlich nach diesem Vorgehen analysiert, auf das Gesamtkollektiv wurde das Schema retrospektiv angewandt.

Bei den neuen Patienten Cys 113-Cys 164 (n=23) sowie zwei als heterozygot für die nicht-Typ I Cystinurie klassifizierten Probanden konnten anhand des Schemas in 60,42 % der Allele Mutationen identifiziert werden (29/48). Bei 73,91 % der Patienten konnte mindestens eine Mutation nachgewiesen werden (17/23).

Retrospektiv konnten mittels dieser schrittweisen Analyse im Gesamtkollektiv 58,54 % (96/164) der Allele durch Mutationen in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 erklärt werden (Tabelle 17). Dabei konnte in 73,75 % (59/80) der Patienten mindestens eine Mutation nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu lag die Gesamtdetektionsrate für das komplette Mutationsscreening bei 78,75 % der Patienten sowie 63,41 % der Allele (siehe IV.1.6).

Gen	Exon	Mutation	Nachweismethode
SLC3A1	3	T216M	<i>NlaIII</i>
	4	R270X , R270L	<i>TaqI</i>
	6	R362C, R362H	<i>AccI</i>
	6	R365W , R365L , R365Q	<i>MspI</i>
	6	L346P	<i>AluI</i>
	8	M467T , M467K	<i>NlaIII</i> , <i>AluI</i>
	8	c.1500+1G>T	<i>MseI</i>
	8	E483X	<i>MbolI</i>
	5 bis 9	Duplikation	Junctionfragment, real-time-PCR
SLC7A9	4	G105R , T123M, F140S, c.553delGC	Sequenzierung
	5	A182T , c747delG, IVS4-1G>A	SSCP
	7	E244del	SSCP
	10	A331V, R333W	SSCP

Tabelle 16: Nachweismethoden für die häufigsten Mutationen in den Genen SLC3A1 und SLC7A9. Die fett unterlegten Mutationen treten häufig auf, die übrigen werden aufgrund der verwendeten Analyseverfahren mit untersucht.

	Mutation*	Detektionsrate im Gesamtkollektiv Chromosomenzahl = 164**
Frequenz der Mutationen in SLC3A1	T216M	17,07 % (28/164)
	M467T	9,76 % (16/164)
	Duplikation	7,93 % (13/164)
	R365W	3,05 % (5/164)
	R365L	2,44 % (4/164)
	R270X	1,83 % (3/164)
	M467K	1,22 % (2/164)
	R365Q	1,22 % (2/164)
	R362C	0,61 % (1/164)
Frequenz der Mutationen in SLC7A9	G105R	6,11 % (10/164)
	delE244	1,22 % (2/164)
	R333W	1,22 % (2/164)
	A182T	1,22 % (2/164)
	A331V	1,22 % (2/164)
	c.747delG	0,61 % (1/164)
	F140S	0,61 % (1/164)
	IVS4-1G>A	0,61 % (1/164)
c.553delGC	0,61 % (1/164)	
Gesamtfrequenz der detektierten Mutationen		58,54 % (96/164)

Tabelle 17: Zusammenstellung der Frequenzen einzelner Mutationen (bezogen auf die Chromosomenzahl) nach der Anwendung des diagnostischen Schemas.

*geordnet nach Häufigkeit. **Inklusive der vier als heterozygot für nicht-Typ I-Cystinurie klassifizierten Probanden.

1.7 Gesamtmutationsdetektionsraten in den Genen SLC3A1 und SLC7A9

Die Gesamtdetektionsrate für Mutationen inklusive der Ergebnisse der real-time PCR lag im SLC3A1-Gen bei 56,25 % (45/80 Patienten), im SLC7A9-Gen bei 21,25 % (17/80 Patienten) (Tabelle 10, Abschnitt 1.3). Ein Patient war gemischt heterozygot für jeweils eine Mutation im SLC3A1-Gen sowie im SLC7A9-Gen (Tabelle 10, Abschnitt 1.3). Im Falle des SLC3A1-Gens konnten 46,95 % der Allele (77/164) inklusive der als heterozygot für nicht-Typ I klassifizierten Probanden durch Mutationen erklärt werden, für das SLC7A9-Gen 16,46 % (27/164) (Tabelle 11, Abschnitt 1.3).

Dabei muss berücksichtigt werden, dass nur bei den Patienten Cys 2-Cys 112 die komplette kodierende Region der Gene SLC3A1 und SLC7A9 mittels SSCP untersucht wurde, sowie für beide Gene ein Screening mittels real-time-PCR auf Deletionen und Duplikationen hin durchgeführt wurde. Für die Patienten Cys 113-Cys 164 wurde das in dieser Arbeit erstellte diagnostische Schema angewandt (siehe IV.2.).

Damit liegt die Gesamtdetektionsrate bei 78,75 % der 80 Patienten (63/80) sowie 63,41 % der Allele (104/164) inklusive der als heterozygot für nicht-Typ I klassifizierten Probanden (Tabellen 10 und 11, Abschnitt 1.3). Bei 21,25 % der Patienten (17/80) konnte keine Mutation nachgewiesen werden (Tabelle 10, Abschnitt 1.3).

2. Populationsspezifische Mutationsverteilung und Detektionsraten

Die 80 unverwandten Patienten und 4 als heterozygot für die nicht-Typ I Cystinurie klassifizierten Probanden wurden je nach ihrer geographischen Herkunft in vier Populationen eingeteilt: Mitteleuropa, Südeuropa, Südosteuropa sowie Sonstige (siehe Kapitel III.1.1.1).

Das Auftreten der einzelnen Mutationen je nach ethnischer Herkunft ist in Tabelle 18 zusammengestellt.

Insgesamt konnten in 63,41 % der Chromosomen Mutationen detektiert werden.

Im Gesamtkollektiv sind die Mutationen T216M (17,07 %), M467T (9,76 %), die Duplikation der Exons 5 bis 9 (7,93 %) im SLC3A1-Gen sowie G105R (6,1 %) im SLC7A9-Gen am häufigsten.

Population	Allelzahl	Mittel-europa	Süd-europa	Südost-europa	Gesamtkollektiv
		n=93	n=24	n=44	n=164*
Frequenz der Mutationen in SLC3A1	T216M	3,23 %	4,17 %	54,55 %	17,07 %
	M467T	15,05 %	4,17 %	2,27 %	9,76 %
	Duplikation	13,98 %	-	-	7,93 %
	R365W	4,4 %	4,17 %	-	3,05 %
	R365L	-	-	9,09 %	2,44 %
	M467K	-	8,33 %	-	1,22 %
	sonstige	7,53 %	-	-	5,49 %
Frequenz der Mutationen in SLC7A9	G105R	6,45 %	8,33 %	4,55 %	6,1 %
	delE244	-	4,17 %	-	1,22 %
	R333W	1,08 %	4,17 %	-	1,22 %
	Del1-13	1,08 %	4,17 %	-	1,22 %
	A182T	2,15 %	-	-	1,22 %
	A331V	-	-	4,55 %	1,22 %
	sonstige	6,45 %	4,17 %	-	4,27 %
Gesamtfrequenz der detektierten Mutationen		61,29 %	45,83 %	75 %	63,41 %

Tabelle 18: Zusammenstellung der Frequenzen einzelner Mutationen in den jeweiligen Populationen bezogen auf die Chromosomenzahl. *Das Kollektiv „Sonstige“ (n=3, ein Proband ist als heterozygot für die nicht-Typ I-Cystinurie klassifiziert) ist nicht gesondert aufgeführt, die detektierten Mutationen sind aber in das Gesamtkollektiv mit einberechnet.

M467T tritt mit einer Frequenz von 2,27-15,05 % in allen Kollektiven auf. Die Mutation wurde auch in einem mitteleuropäischen Kontrollkollektiv auf einem von 100 Allelen detektiert.

In der mitteleuropäischen Population (Deutschland, Frankreich) treten die Mutationen M467T (15,05 %) und die Duplikation (13,98 %) im SLC3A1-Gen sowie G105R (6,45 %) im SLC7A9-Gen gehäuft auf. Die kürzlich beschriebene Duplikation der Exons 5-8 des SLC3A1-Gens ist auf mitteleuropäische Patienten beschränkt (Schmidt et al. 2003b). Sie wurde bisher nur unter deutschen Patienten detektiert und konnte hier in 13,98 % der Chromosomen nachgewiesen werden.

Im südeuropäischen Kollektiv (Italien) konnte keine Mutation gehäuft detektiert werden.

T216M ist die häufigste Mutation unter südosteuropäischen Patienten (Griechenland, Jugoslawien, Türkei) (54,55 %). Weiterhin tritt hier R365L (9,09 %) mehrfach auf. Die Daten des Kollektivs „Sonstige“ (n=2) wurden hierbei nicht berücksichtigt, da diese Gruppe lediglich zwei Patienten umfasst, die sich in keine der anderen Populationen einordnen lassen.

Für die Mutationen T216M, M467T, die Duplikation sowie R356L im SLC3A1-Gen kann eine populationsspezifische Verteilung abgeleitet werden. Für Mutationen im SLC7A9-Gen im eigenen Kollektiv ist dies nicht der Fall. Alle übrigen Mutationen in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 sind nur selten vertreten.

3. Kopplungsanalysen

Kopplungsanalysen für weitere Kandidatengenregionen mittels Mikrosatellitenmarkern wurden an Familien durchgeführt, in denen keine bzw. nur eine Mutation in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 detektiert werden konnte. Um die elterliche Herkunft der Haplotypen ableiten zu können, war DNA von mindestens einem Elternteil notwendig. Im einzelnen wurde auf Kopplung mit den Loci 2p21 (SLC3A1), 19q13.1 (SLC7A9 und SLC7A10), 14q11.2 (SLC7A8) und 9p24.2 (SLC1A1) hin analysiert. Bei positiver Kopplung wurde teilweise die kodierende Region der Kandidatengene sequenziert.

3.1 Ergebnisse der Kopplungsanalysen

Die Kopplungsanalysen wurden unter Annahme eines rezessiven Erbgangs und in Übereinstimmung mit der biochemischen Klassifizierung der Patienten ausgewertet. Die Stammbäume sind im Anhang abgebildet.

In vier Fällen konnte Kopplung mit der chromosomalen Region 19q13 demonstriert werden (Familien A, B, C und E, Abbildungen 1, 2, 3 und 5, Anhang). Familie B koppelte in Übereinstimmung mit der Biochemie mit 2p21 (Abbildung 4, Anhang). Für die weiteren Loci ergab sich kein eindeutiger Hinweis auf Kopplung.

3.2 Analyse der Kandidatengene SLC7A10 und SLC7A8 mittels Sequenzierung

Patienten aus Familien, die Kopplung mit der Region 19q13.1 zeigten (siehe IV.4.1), in denen aber keine Mutation im SLC7A9-Gen nachgewiesen werden konnte, wurden für das Kandidatengen SLC7A10 sequenziert, das ebenfalls in dieser Region lokalisiert ist (Cys 64, Cys 98). Weiterhin wurde die Patientin mit isolierter Cystinurie (Cys 47) auf Mutationen im SLC7A10-Gen hin analysiert, um dessen Beteiligung an der Ätiologie der Erkrankung einzuschätzen. Bei letzterer wurde außerdem die kodierende Region des SLC7A8-Gens in der chromosomalen Region 14q11.2 sequenziert.

Im SLC7A10-Gen konnte bei den drei untersuchten Patienten keine Mutation detektiert werden. Bei den Patienten Cys 64 und Cys 98 konnte die bekannte Variante g.16476G>T detektiert werden.

Bei der Patientin Cys 47 wurden drei Varianten im SLC7A8-Gen detektiert. g.152A>T ist 585 Basen vor dem Startkodon im Promoterbereich lokalisiert und wurde heterozygot nachgewiesen. Im Intron 9 wurde eine neue Variante heterozygot detektiert, die auch unter Kontrollen nachgewiesen werden konnte (g.54011+9A>C). Der bekannte Polymorphismus g.56540C>T wurde im heterozygoten Zustand im 3'UTR-Bereich detektiert.

Somit konnten keine Sequenzveränderungen nachgewiesen werden, die auf eine Rolle in der Ätiologie bei der Cystinurie hinweisen (Schmidt et al. 2004).

4. Molekulare Charakterisierung von Polymorphismen im SLC7A9-Gen

Im SLC7A9-Gen wurden insgesamt 15 Polymorphismen detektiert. Die Polymorphismen c.147C>T, c.386C>T, IVS3+22T>G, c.584C>T, c.596T>C, c.610T>C, IVS4+10T>C, c.692C>T, c.852C>A, c.872C>T, c.1157G>A, IVS9+51A>G und c.1382C>T wurden bereits in vorherigen Arbeiten beschrieben (Schmidt, 2000, Botzenhart, 2003). Die Variante IVS5+10G>A wurde von Leclerc et al. (2002) detektiert und in der vorliegenden Studie mit der neu identifizierten Variante IVS5+24T>C analysiert.

4.1 Allelverteilungen und statistische Analysen

Die Allelverteilung der detektierten Varianten im SLC7A9-Gen wurde bei Patienten, deutschen Patienten sowie gesunden deutschen Kontrollen untersucht. In Ergänzung zu den bereits durchgeführten Analysen wurde ein vergrößertes Patientenkollektiv sowie ein einheitliches Kontrollkollektiv untersucht. Die Frequenzen der Genotypen können der Tabelle 14 (Anhang) entnommen werden.

Bis auf die Daten zu den kürzlich detektierten Varianten IVS5+10G>A und IVS5+24T>C in Intron 5 wurden die Ergebnisse der 13 übrigen Varianten bereits publiziert (Schmidt et al. 2003a).

Die Häufigkeit aller Varianten unter Patienten, deutschen Patienten sowie deutschen Kontrollen wurde bestimmt und untereinander verglichen. Dazu wurden alle Allele der Patienten für die einzelnen Polymorphismen für eine Kontrollkollektiv von 58 Personen untersucht.

Die statistische Analyse der Varianten ergab, dass für die Polymorphismen c.147C>T (Exon 2), c.386C>T (Exon 3), IVS3+22T>G, c.584C>T (Exon 4), c.610T>C (Exon 4), c.692C>T (Exon 5), c.852C>A (Exon 6) und c.872C>T (Exon 6) signifikante Unterschiede in der Allel- und Genotypverteilung einzelner Polymorphismen zwischen Patienten und Kontrollen existieren. Die genauen statistischen Daten wurden bereits publiziert (Schmidt et al. 2002, Schmidt et al. 2003a).

Für die neu analysierten Varianten IVS5+10G>A und IVS5+24T>C in Intron 5 besteht keine strikte Assoziation zu den gekoppelt vorliegenden Polymorphismen in den Exons 5 und 6. Es bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen.

5. Spliceuntersuchungen in Säugerzellen

Wie in Abschnitt IV.4.1 beschrieben, wurden in der Verteilung bestimmter Varianten in den Exons 2, 3, 4, 5, und 6 sowie in Intron 3 des SLC7A9-Gens statistisch signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen nachgewiesen. Um zu analysieren, ob diese Varianten eine funktionelle Bedeutung im Hinblick auf das Spleißverhalten haben, wurden Spleißanalysen in COS7-Zellen durchgeführt.

5.1 Klonierung von *Minigene*-Fragmenten und Detektion unterschiedlicher Spleißvarianten

Ursprünglich sollten Polymorphismen in den Fragmenten A, B und C auf eine Modifikation des Spleißverhaltens hin untersucht werden (Abbildung 8, Abschnitt 5.2; Tabelle 6, Kapitel III.2.5.1; Tabelle 19). Für das Fragment B gelang die Klonierung des Fragments in den Expressionsvektor pcDNA3.1D/V5-His-TOPO[®] trotz mehrfacher Modifikationen lediglich für das PCR-Produkt des Patienten Cys 15. Aus diesem Grund wurde das Fragment in zwei kleinere Abschnitte, B1 und B2, unterteilt. Fragment B2 und C konnten problemlos in den Vektor eingebracht werden. Die Klonierung des Fragment A sowie der Fragmente B (Cys 63) und B1 in den Expressionsvektor war aufgrund der Größe der Konstrukte trotz mehrfach veränderter Versuchsbedingungen nicht möglich. Um das Vorhandensein der Fragmente A, B (Cys 63) und B1 im Vektor zu überprüfen, wurden für jeden Ansatz bis zu 150 Klone gepickt und analysiert, alle waren negativ.

Fragment	enthaltene Exons	Konstrukt von Patient	Genotyp des Patienten	detektierte cDNA-Fragmente
B	2, 3, 4, 5	Cys 15	c.386C/C IVS3+22G/G c.584T/T c.610C/C	2+3+4+5 2+4+5 2+5
B2	3, 4, 5	Cys 15	c.584T/T c.610C/C	3+4+5
		Cys 63	c.584C/C c.610T/T	3+4+5
C	4, 5, 6, 7	Cys 3	c.692C/C c.852C/C c.872C/C	4+5+6+7 4+5+7 4+7
		Cys 15	c.692T/T c.852A/A c.872T/T	4+5+7 4+7

Tabelle 19: Übersicht über die analysierten genomischen Fragmente und Genotypen sowie die detektierten Spleißvarianten. Alle analysierten Genotypen zeigten statistisch signifikante Unterschiede in der Allelverteilung zwischen Patienten und Kontrollen.

Isolierte Klone, die das Insert in der korrekten Orientierung enthielten, wurden in COS7-Zellen transfiziert. Nach der RNA-Isolation und RT-PCR wurde die cDNA mittels PCR untersucht. Die Produkte wurden auf 1%ige Agarosegele aufgetragen

und analysiert. Die PCR-Produkte der einzelnen Fragmente sowie die Sequenzierungen der Produkte sind in den Abbildungen 11-15 dargestellt. Zur Kontrolle wurde jeweils auch RNA aus untransfizierten COS7-Zellen isoliert und eine cDNA-Synthese durchgeführt.

Für die PCR mit den Primern c2F/c5R an cDNA des Konstrukts B aus DNA des Patienten Cys 15 waren auf dem Agarosegel drei spezifische Banden sichtbar (Abbildung 11). Die Sequenzierung zeigte, dass die 530bp-Bande das Wildtyp-Fragment darstellt, welches die Exons 2, 3, 4 und 5 enthält (nicht abgebildet). Die Banden 400bp und 190bp entsprechen jeweils Fragmenten, denen Exon 3 bzw. Exons 3 und 4 fehlen (Abbildung 12). cDNA, die aus untransfizierten COS7-Zellen isoliert wurde, zeigte eine Bande bei 200bp. In der Sequenzierung war aber kein spezifisches Produkt darstellbar.

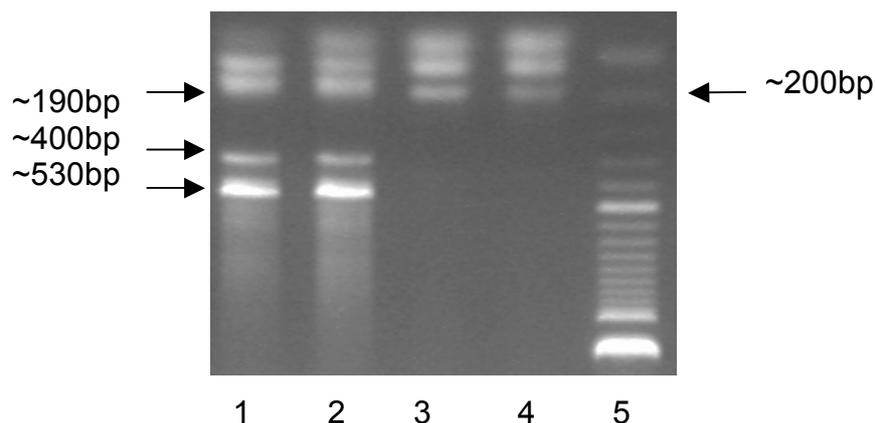


Abbildung 11: Produkte der PCR mit den Primern c2F und c5R an cDNA des Konstrukts B des Patienten Cys 15 (Bahn 1 und 2) sowie an cDNA aus untransfizierten Zellen (Bahn 3 und 4). In Bahn 5 ist die 100bp-Leiter aufgetragen.

Im Falle der PCR an der cDNA aus Konstrukt B2 der Patienten Cys 15 und Cys 63 mit den Primern 3Fmis/c5R war nur eine Bande bei ~480bp sichtbar (Abbildung 13). Die Sequenzierung zeigte, dass das Produkt den Wildtyp darstellt, es sind die Exons 3, 4 und 5 enthalten. Das identische Produkt an cDNA aus Konstrukt B2 des Patienten Cys 63 sowie die Sequenzierungen sind nicht dargestellt. Mittels der PCR an cDNA aus untransfizierten Zellen war nur ein Primerdimer nachweisbar (Abbildung 13).

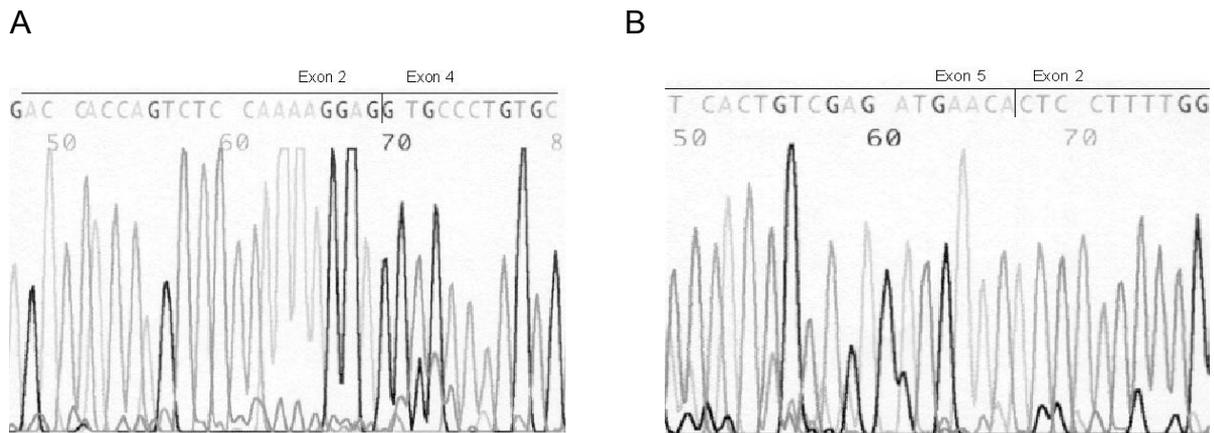


Abbildung 12: Sequenzierungen der in Abbildung 11 markierten PCR-Produkte. A: Produkt der Größe ~400bp, Übergang von Exon 2 zu Exon 4. B: Produkt der Größe ~190bp, Übergang von Exon 2 zu Exon 5 bzw. Exon 5 zu Exon 2, die Sequenzierung wurde mit dem Rückwärtsprimer durchgeführt.

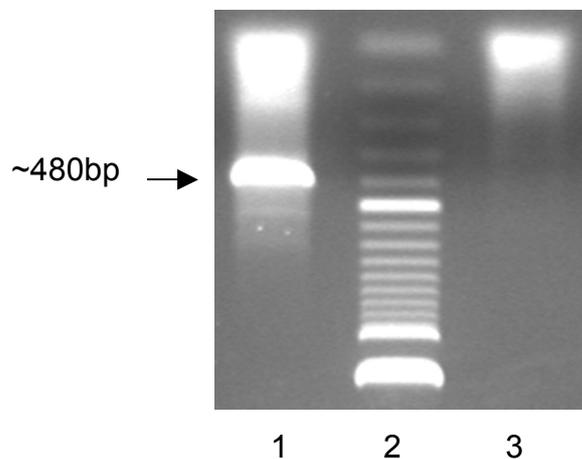


Abbildung 13: Produkt der PCR an cDNA aus Konstrukt B2 des Patienten Cys 15 mit den Primern 3Fmis und c5R (Bahn 1) sowie an cDNA aus untransfizierten Zellen (Bahn 3). In Bahn 2 wurde die 100bp-Leiter aufgetragen.

PCR-Produkte an der cDNA aus Konstrukt C der Patienten Cys 3 und Cys 15 mit den Primern c4F/c7R zeigten unterschiedliche Ergebnisse. Nach der PCR an cDNA aus Konstrukt C des Patienten Cys 3 waren drei Banden sichtbar: ~490bp, ~400bp sowie ~290bp (Abbildung 14A). An cDNA aus Konstrukt C des Patienten Cys 15 waren zwei Banden zu sehen, bei ~400bp sowie ~290bp (Abbildung 14B). Die Sequenzierung der Fragmente zeigte, dass die Bande 490bp dem Wildtyp-Fragment mit den Exons 4, 5, 6 und 7 entsprach. Die Banden der Größe ~400bp stimmte in beiden Fällen mit Fragmenten überein, welchen Exon 6 fehlt (Abbildung 15A), den Fragmenten der Größe ~290bp fehlten die Exons 5 und 6 (Abbildung 15B). An cDNA untransfizierter Zellen konnte kein spezifisches Produkt dargestellt werden (Abbildung 14).

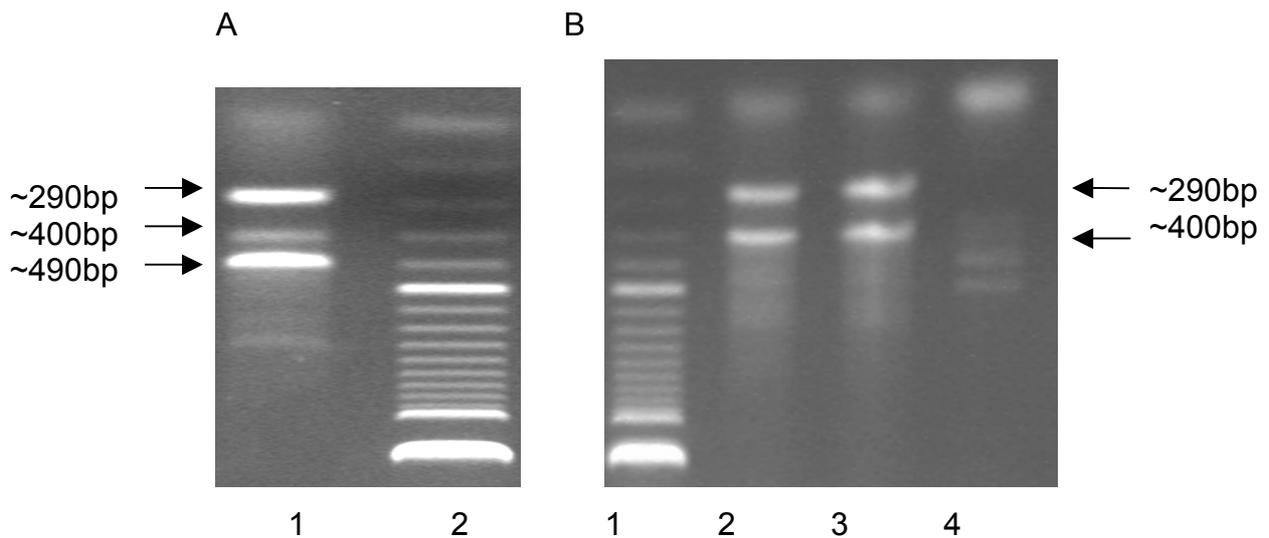


Abbildung 14: Produkte der PCR an cDNA aus Konstrukt C mit den Primern c4F und c7R. A: PCR an cDNA aus Kontrukts C des Patienten Cys 3 (Bahn 1), B: PCR an cDNA aus Konstrukt C des Patienten Cys 15 (Bahn 2 und 3) sowie aus untransfiziertem Zellen (Bahn 4).

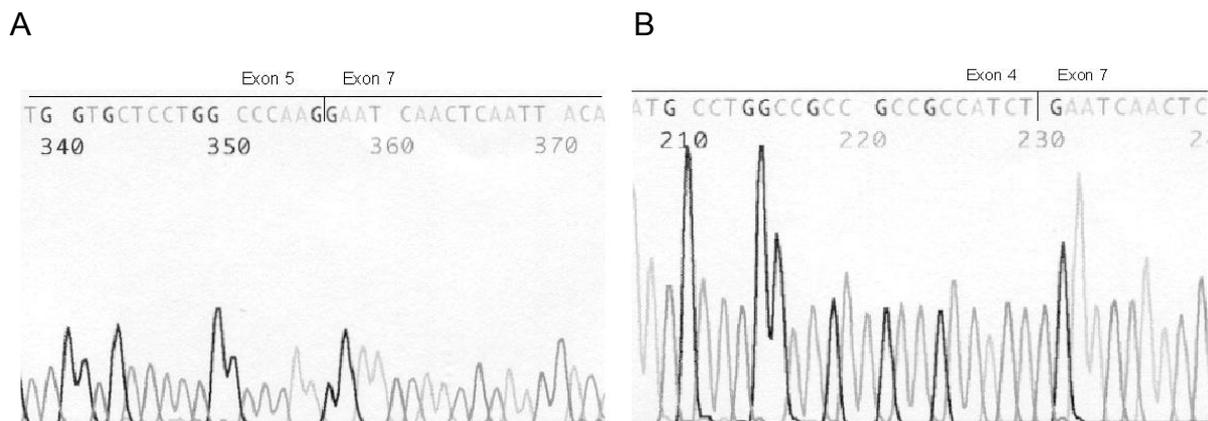


Abbildung 15: Sequenzierungen der in Abbildung 14 markierten PCR-Produkte. A: Produkt der Größe ~400bp, Übergang von Exon 5 zu Exon 7. B: Produkt der Größe ~290bp, Übergang von Exon 4 zu Exon 7.

Tabelle 19 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Spleißanalysen.

5.2 Analyse der Aceview-Datenbank der NCBI

Eine Analyse der Aceview-Datenbank der NCBI zeigte, dass sieben unterschiedliche Transkripte des SLC7A9-Gens (a-g, Abbildung 8) existieren, die durch alternatives Spleißen entstehen, und für sieben unterschiedliche Isoformen des Genprodukts kodieren. Weiterhin existieren vier mögliche alternative Promotoren. Die Transkripte scheinen sich durch die Trunkierung des N-Terminus und dem Vorhandensein oder

Fehlen von bis zu vier Exons zu unterscheiden. Dabei sind die Exons in allen Konstrukten gleich, lediglich in einer Variante ist ein Intron enthalten (Variante e, Abbildung 8).

Die Isoformen a-c enthalten ein Permease-Motiv und stellen somit die eigentlichen integralen Membranproteine dar, die in den Aminosäuretransport in die Zelle involviert sind. Die Introns der sieben beschriebenen Varianten folgen der Konsensus-Regel (gt-ag).

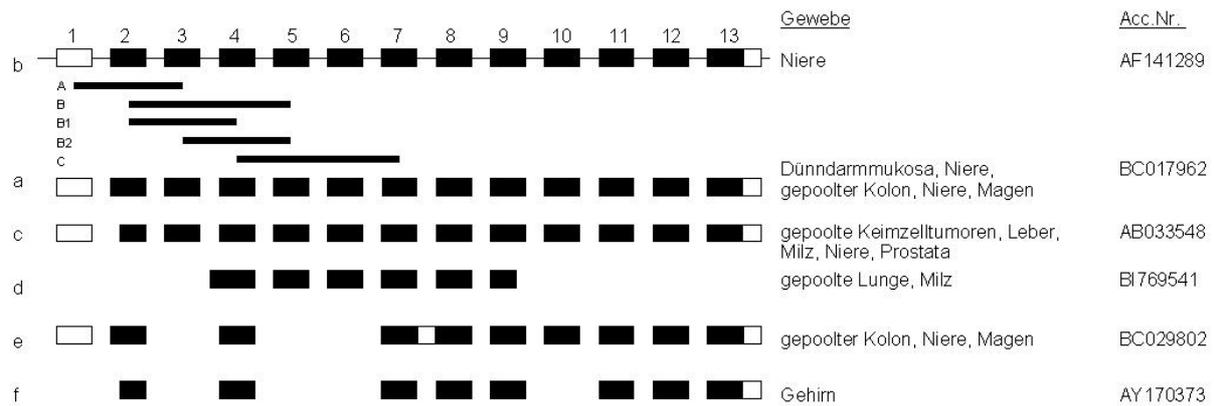


Abbildung 8: Übersicht über die nachgewiesenen Spleißvarianten des SLC7A9-Gens in den jeweiligen Geweben. Acc.Nr. steht für die Zugansnummer in der NCBI-Datenbank. Isoform b stellt die Wildtyp-Variante dar. Weiterhin sind die Konstrukte zur Analyse des differentiellen Spleißens eingezeichnet.

Um die Existenz dieser Spleißvarianten sowie die der in den eigenen Versuchen detektierten Varianten zu überprüfen, wurde kommerziell erhältliche humane Nieren-RNA sowie Universal-RNA analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass nur das Fehlen der Exons 5 und 6 (vgl. Tabelle 19, Abschnitt 5.1, Abbildungen 16 und 17) in Nieren-RNA sowie humaner Universal-RNA nachweisbar ist. Die anderen in der Datenbank beschriebenen Charakteristika der Varianten (Fehlen weiterer Exons, Einschluß eines Introns; vgl. Abbildung 8) konnten nicht dargestellt werden, deren Bedeutung ist derzeit unklar.

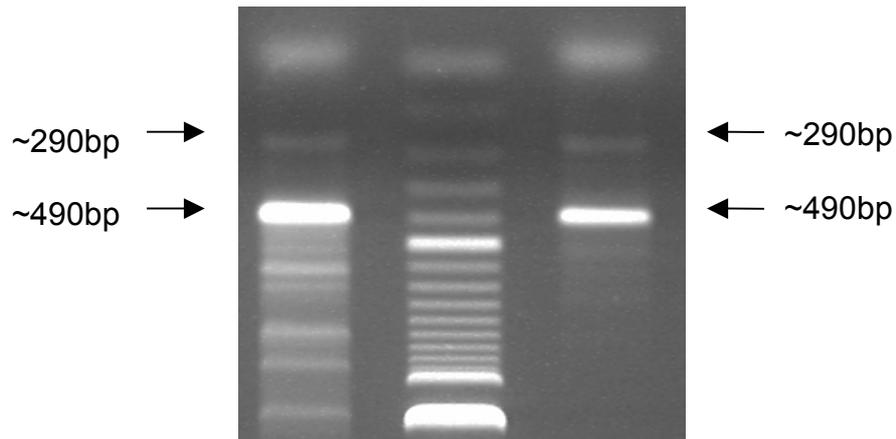


Abbildung 16: Produkte einer PCR an cDNA aus kommerzieller Niere (Bahn 1) und Universalgewebe (Bahn 3) mit den Primern c4F/c7R.

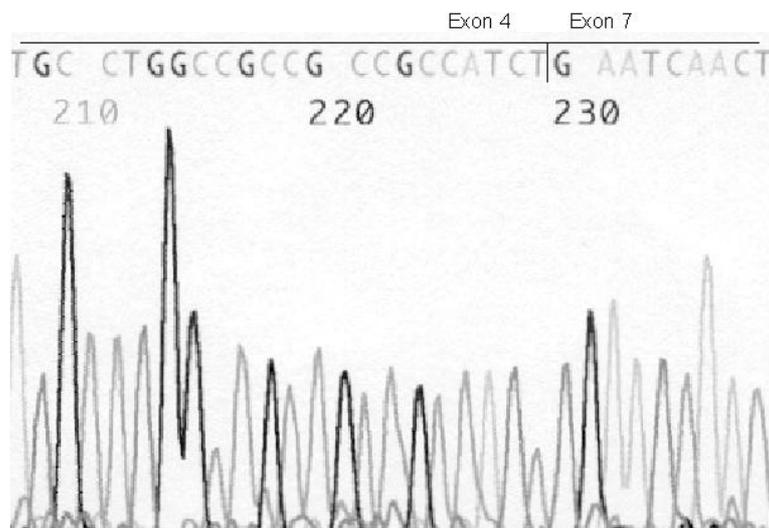


Abbildung 17: Sequenzierung des Produktes der Größe ~290bp aus Abbildung 16, Übergang von Exon 4 zu Exon 7.

5.3 Untersuchung möglicher Spleiß-Enhancer mittels der ESEfinder-Software

Mittels der ESEfinder-Software wurde analysiert, ob in der kodierenden Sequenz des SLC7A9-Gens Bindemotive für exonische Spleiß-Enhancer vorhanden sind. Anhand eines ermittelten scores kann die Wahrscheinlichkeit abgeschätzt werden, mit der dieses Motiv von einem Bindeprotein genutzt wird. Tabelle 20 gibt eine Übersicht über die scores der statistisch signifikant unterschiedlichen Polymorphismen im SLC7A9-Gen.

Polymorphismus	Exon/ Intron	Score für Homozygotie Wildtyp*	Score für Homozygotie nicht-Wildtyp*
c.147C>T	2	3,53 (SRp55)	
c.386C>T	3	-	-
c.584C>T	4	- - 3,21 (SRp40) 2,8 (SRp55)	2,5 (SF2/ASF) 2,45 (SC35) - 3,63
c.596T>C	4	2,82 (SRp55)	
c.610T>C	4	-	3,56 (SRp55)
c.692C>T	5	-	-
c.852C>A	6	2,5 (SF2/ASF) 1,96 (SF2/ASF)	- -
c.872C>T	6	4,68 (SC35) 3,98 (SRp40)	2,95 -

Tabelle 20: Übersicht über die scores für die Bindung einzelner SR-Proteine an Motive, in denen die Polymorphismen lokalisiert sind. *Bezogen auf die publizierte Sequenz.

V. Diskussion

1. Patientenkollektiv

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Kollektiv von 80 Patienten mit Cystinurie untersucht. Von diesen waren 37 Personen weiblich und 43 männlich (Tabellen 3 und 4, Anhang).

Die Patienten, bei denen das Alter der ersten Steinbildung bekannt war (n=59), wurden in sechs Gruppen unterteilt (Tabelle 21, Abbildung 18). So konnte festgestellt werden, dass 38,98 % der Patienten bereits im Alter bis zu fünf Jahren Steine bildeten, in der ersten Lebensdekade zeigten insgesamt 45,76 % der Patienten Steinbildung. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bis zu einem Alter von 20 Jahren weitere 27,12 % der Patienten erkrankten. 13,56 % der Patienten bildeten erst ab einem Alter von 26 Jahren Steine.

Beschränkt man die Analyse auf die Patienten, die nicht über die Kooperation mit pädiatrischen Zentren eingegangen sind (n=44) (Tabelle 21), kann man feststellen, dass 31,82 % der Patienten eine Manifestation der Steinbildung vor dem 5. Lebensjahr zeigen. In der ersten Lebensdekade bildeten insgesamt 34,09 % der Patienten Steine, weiter 31,82 % in der zweiten Lebensdekade.

Manifestationsalter [Jahre]	0-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-x
alle Patienten mit Steinbildung (n=59)	38,98 %	6,78 %	10,17 %	16,95 %	13,56 %	13,56 %
Patienten mit Steinbildung ohne pädiatrische Patienten (n=44)	31,82 %	2,27 %	9,09 %	22,73 %	15,91 %	18,18 %

Tabelle 21: Übersicht zum Manifestationsalter der Patienten.

Die Abbildung 18 gibt einen graphischen Überblick über das Manifestationsalter der Patienten:

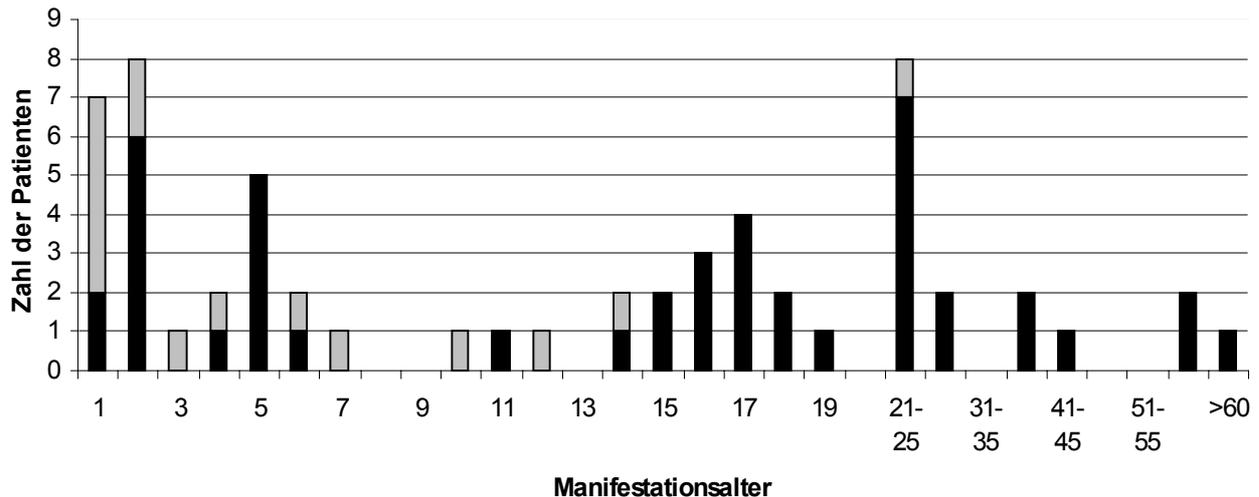


Abbildung 18: Diagramm zum Manifestationsalter der Patienten. Die Gesamthöhe der Balken stellt die Zahl aller Patienten dar, die in dem jeweiligen Alter erstmals Steinbildung zeigten (n=59), die schwarzen Balken zeigen die Daten für die Patientengruppe ohne die pädiatrischen Patienten (n=44).

Stephens (1989) postulierte, dass 25 % der Cystinurie-Patienten in der ersten Lebensdekade Steine bilden. Im eigenen großteils unklassifizierten Kollektiv bildeten zu diesem Zeitpunkt bereits 45 % der Patienten Steine. Schließt man die Patienten aus den einsendenden pädiatrischen Zentren aus, liegt die Rate der Steinbildner in der ersten Lebensdekade bei 34,09 %. Die Rate ist somit höher als von Stephens postuliert. Dabei ist zu berücksichtigen, dass das von Stephens untersuchte Kollektiv nur 38 Patienten umfasste.

Die Rate des Manifestationsalters in der zweiten und dritten Lebensdekade liegt im eigenen Kollektiv bei 44,07 %, ohne pädiatrische Patienten bei 52,27 %. Stephens (1989) postulierte 50 %. Diese Daten stimmen überein.

Dello Strologo et al. (2002) zeigten, dass bei 83 % der Patienten die Steinbildung in den ersten beiden Lebensdekaden beginnt. Die Rate im eigenen Kollektiv ist sowohl ein- als auch ausschließlich pädiatrischer Patienten etwas niedriger (72,88 % und 65,91 %).

In Abhängigkeit von der Klassifizierung lässt sich im eigenen Kollektiv kein unterschiedliches Manifestationsalter in den Gruppen der Typ I-Cystinurie und der nicht-Typ I-Cystinurie ausmachen. Zwar liegt das Manifestationsalter bei nicht-Typ I-Patienten zwischen einem und sechs Jahren, für einen Großteil der Patienten wurde allerdings keine Klassifizierung durchgeführt. Betrachtet man die detektierten

Mutationen in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 im Vergleich zum Manifestationsalter, lässt sich kein unterschiedliches Manifestationsalter bei Patienten mit Mutationen in den Genen SLC3A1 oder SLC7A9 feststellen: Das durchschnittliche Manifestationsalter bei 34 Patienten mit Mutationen im SLC3A1-Gen liegt bei 17,18 Jahren, bei 13 Patienten mit Mutationen im SLC7A9-Gen bei 13,46 Jahren. Bei den übrigen Patienten konnten keine Mutationen detektiert werden.

Auch für einzelne Mutationen in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 lässt sich kein Zusammenhang mit dem Alter bei der Steinbildung ableiten. Die mehrfach detektierten Mutationen T216M, M467T, M467K, R270X und R365W im SLC3A1-Gen sowie G105R im SLC7A9-Gen treten in allen Altersgruppen auf. Lediglich die neu identifizierte Duplikation im SLC3A1-Gen tritt bei Patienten auf, die erst ab einem Alter von zwölf Jahren Steine bildeten.

Das Geschlecht der Patienten hat keinen Einfluss auf das Manifestationsalter: Das durchschnittliche Manifestationsalter bei männlichen Patienten lag bei 14,25 Jahren, bei weiblichen bei 15,88 Jahren. Dies stimmt mit der Beobachtung von dello Strologo et al. (2002) überein.

Der Schweregrad der Erkrankung (Steine pro Lebensjahr) wurde nicht bestimmt.

2. Mutationsspektrum in den Genen SLC3A1 und SLC7A9

In den Genen SLC3A1 und SLC7A9 wurden zahlreiche Mutationen detektiert. Mittels quantitativer PCR konnten eine häufige Duplikation im SLC3A1-Gen sowie große Deletionen des SLC7A9-Gens nachgewiesen werden. Zwei der Punktmutationen wurden erstmalig hier dargestellt.

2.1 Analyse der Promoter-Region des SLC3A1-Gens

Die Promoter-Region des SLC3A1-Gens wurde bisher erst in einer Studie analysiert. Es wurden zwei Mutationen detektiert, deren Pathogenität bisher nicht nachgewiesen ist (Tabelle 1, Anhang) (Boutros et al. 1999, Kongressbeitrag).

In der vorliegenden Studie konnten im Promoter-Bereich des SLC3A1-Gens bei 53 Patienten und zwei für die nicht-Typ I-Cystinurie heterozygoten Probanden keine Mutationen detektiert werden.

2.2 Detektion genomischer Rearrangements in den Genen SLC3A1 und SLC7A9

Die Mehrzahl der in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 beschriebenen Mutationen besteht aus einzelnen Basenaustauschen oder wenige Basenpaare umfassenden Insertionen oder Deletionen. Bisher wurden nur fünf größere Deletionen im SLC3A1-Gen beschrieben, der Nachweis war methodisch aufwendig (Pras et al. 1995, Bisceglia et al. 1996, Horsford et al. 1996, Gitomer et al. 1998a, Purroy et al. 2000). Für das SLC7A9-Gen lagen bisher keine Daten bezüglich größerer Deletionen oder Duplikationen vor.

2.2.1 Duplikation im SLC3A1-Gen

In der vorliegenden Studie konnte mittels real-time PCR eine Duplikation der Exons 5 bis 9 im SLC3A1-Gen nachgewiesen werden, die bei neun unverwandten deutschen Patienten auftrat (Schmidt et al. 2003b).

Das Vorhandensein der Duplikation wurde durch mehrere Ansätze bestätigt: Zum einen wurde die Reproduzierbarkeit der quantitativen Ansätze mittels TaqManTM-Sonden überprüft, indem für jede beobachtete Kopienzahl (n=1, 2, 3 oder 4) fünf unabhängige real-time PCR-Ansätze für die jeweiligen Fragmente durchgeführt wurden. So konnte gezeigt werden, dass keine Überlappungen der Durchschnittswerte für die verschiedenen Kopienzahlen vorlagen, und die Validität des Verfahrens demonstriert werden.

Weiterhin wurde der duplizierte Bereich mittels quantitativer PCR auf SYBR green-Basis eingegrenzt. Auf diese Weise wurden die mittels TaqManTM-Sonden ermittelten Werte für einzelne Fragmente bestätigt.

Parallel dazu bestätigten die quantitativen Restriktionsanalysen des Polymorphismus c.1332+7C>T in Intron 7 des SLC3A1-Gens die Ergebnisse für die entsprechenden Kopienzahlen aus der real-time PCR.

Nachdem der Übergangsbereich der Duplikation mittels quantitativer SYBR green Assays eingegrenzt wurde, konnte mittels PCR ein Junctionfragment dargestellt

werden, das nur bei Trägern der Duplikation nachweisbar war. Das etablierte Junctionfragment stellt einen guten Test zur schnellen und kostengünstigen Identifizierung der Duplikation dar.

Letztendlich wurde das Rearrangement durch die direkte Sequenzierung der Übergangsregion von Intron 9 zu Intron 4 auf genomischer Ebene sowie von Exon 9 zu Exon 5 auf RNA-Ebene bestätigt.

Die Sequenzierung des Junctionfragments zeigte, dass dem Rearrangement ein komplexer Entstehungsmechanismus zugrunde liegt (Abbildung 9, Kapitel IV.1.5.1): Möglicherweise induziert die 21bp-Inversion in Intron 9 eine Chromatinstruktur, welche die gesamte Struktur für eine Rekombination prädisponiert (Abbildung 19). In Nachbarschaft zur Bruchstelle liegen verschiedene Alu-Elemente, die das Ereignis zwar nicht direkt verursachen, aber die beiden Regionen wahrscheinlich in räumliche Nähe bringen.

Die nachgewiesene Duplikation ruft keine Leserasterverschiebung hervor, betrifft aber die Glykosidase-ähnliche extrazelluläre Domäne des rBAT-Proteins. Diese Domäne ist an den Transportereigenschaften des Transporters beteiligt sowie vermutlich für das intrazelluläre *Trafficking* des Heterodimers rBAT/b^{0,+}AT zur Zellmembran verantwortlich.

Während die bisher publizierten Deletionen im SLC3A1-Gen unterschiedliche Bereiche des Gens umfassen, ist die in der vorliegenden Arbeit detektierte Duplikation unter allen Patienten gleich. Weiterhin wurde sie im eigenen Kollektiv nur unter deutschen Patienten nachgewiesen. Um zu überprüfen, ob diese Mutation auf ein Founder-Allel zurückzuführen ist, wurden für die Träger der Duplikation sowie für deutsche Kontrollpersonen Typisierungen der Mikrosatellitenmarker D2S2298 und D2S2291 durchgeführt.

Die Analyse des Markers D2S2298 zeigte, dass bei 50 % der Chromosomen das Allel 226bp sicher mit der Duplikation gekoppelt ist. Dieses Allel tritt dagegen bei 71 deutschen Kontrollen mit einer Frequenz von 4,23 % auf. Mittels des *exact Fisher tests* konnte gezeigt werden, dass die Allelverteilung in Patienten und Kontrollen signifikant unterschiedlich ist. Trotz der geringen Größe der Patientengruppe deutet dieses Ergebnis auf ein Founder-Ereignis hin. Je nach Zeitpunkt des Ereignisses ist es möglich, dass die physikalische Kopplung beider Allele von Generation zu Generation durch Rekombination aufgelöst wurde.

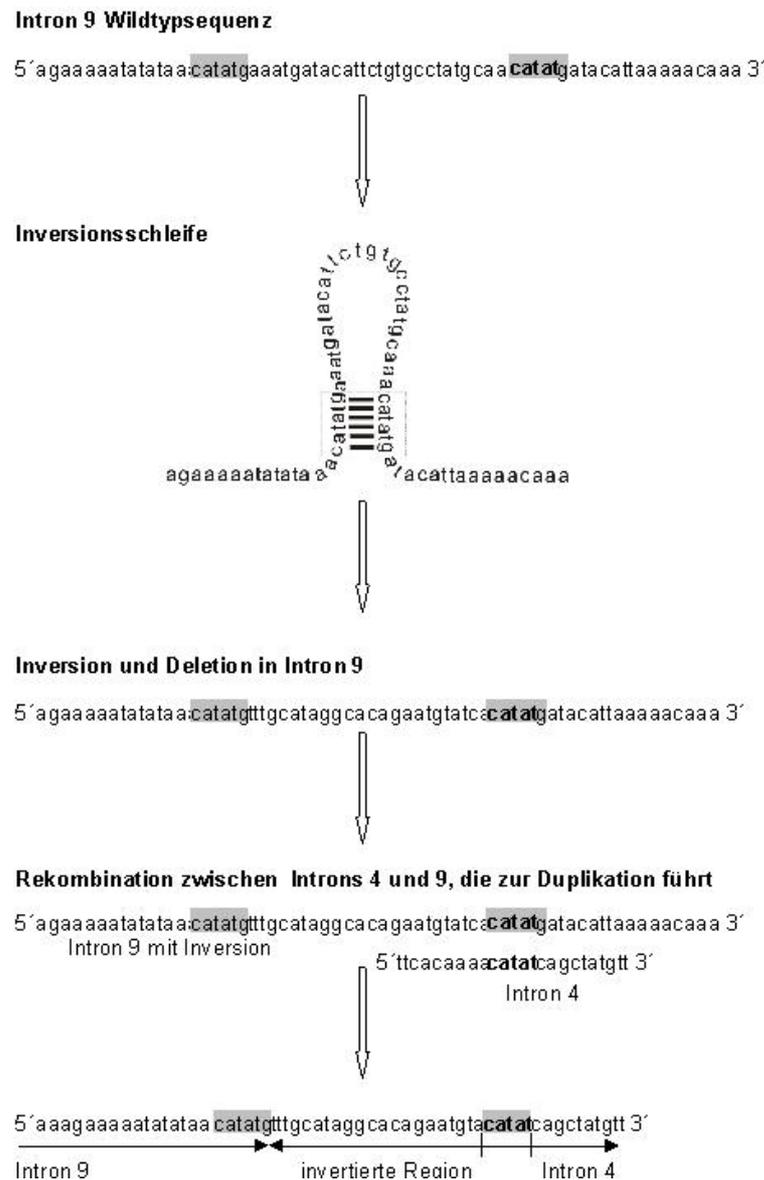


Abbildung 19: Postulierter Entstehungsmechanismus der Duplikation im SLC3A1-Gen.

Für den Marker D2S2291 konnte ein solcher Zusammenhang nicht dargestellt werden. Zum einen ist der Marker physikalisch sehr viel weiter vom Genort entfernt als D2S2298 (1280kb gegenüber 360kb). Zum anderen ist die Allelverteilung und damit der Informationsgehalt des Markers D2S2291 geringer als bei D2S2298. Weitere Studien, auch in anderen ethnischen Kollektiven, sind notwendig, um das ausschließliche Vorkommen der Duplikation unter deutschen Patienten und damit den Founder-Effekt zu bestätigen sowie um eine Assoziation des Genorts mit dem Allel 226bp des Mikrosatellitenmarkers D2S2298 zu belegen.

2.2.2 Analyse des SLC7A9-Gens mittels real-time PCR

Mittels real-time PCR konnten im SLC7A9-Gen bei drei Patienten größere Deletionen detektiert werden (Schmidt et al. 2003b).

Bei zwei Patienten wurde eine Deletion detektiert, welche die komplette kodierende Sequenz umfasst und so zur Haploinsuffizienz führt. Bei einer weiteren Patientin umspannte die Deletion mindestens die Exons 1-4. Eine genauere Charakterisierung der Deletionen wurde nicht durchgeführt: Da der Transkriptionsstart fehlt, wird in allen Fällen kein Protein gebildet werden. Bei den Deletionen handelt es sich um familiäre Mutationen.

2.2.3 Mutationsdetektionsrate mittels real-time PCR

Durch die Anwendung des oben genannten quantitativen PCR-Verfahrens sowie des Duplikationsnachweises mittels Junctionfragment konnten in 16 der 164 Cystinurie-Allele (9,76 %) Mutationen detektiert werden. Diese tragen signifikant zum Mutationsspektrum der Cystinurie bei. Die Detektionsrate für Mutationen in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 konnte retrospektiv von 53,66 % (88/164) auf 63,41 % (104/164) der Allele erhöht werden.

Diese Ergebnisse sowie die Validität der Methode zeigen, dass die real-time PCR geeignet ist, Genregionen schnell und zuverlässig auf Veränderungen der Kopienzahlen einzelner Fragmente hin zu untersuchen.

2.3 Neu identifizierte Punktmutationen

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei bisher nicht beschriebene Punktmutationen nachgewiesen.

R365Q im SLC3A1-Gen wurde im Rahmen des im erstellten diagnostischen Schemas durchgeführten *MspI*-Verdau und nachfolgender Sequenzierung identifiziert. Die Mutation ist bereits die dritte Variante, die das Triplet R365 betrifft. Die Spleißmutation IVS4-1G>A im SLC7A9-Gen wurde ebenfalls während des diagnostischen Screenings mittels SSCP für Exon 5 identifiziert. Die Trägerinnen der Mutation (Cys 139 und Cys 140) wurden biochemisch als heterozygot für die nicht-Typ I-Cystinurie klassifiziert.

2.4 Gesamtmutationsdetektionsraten in den Genen SLC3A1 und SLC7A9

Die molekulargenetische Mutationssuche in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 bestätigte die klinische Diagnose der Cystinurie in 78,75 % aller klassifizierten und unklassifizierten Patienten (Tabelle 10, Kapitel IV.1.3). Bei 47,5 % der Patienten wurden zwei, bei 31,25 % eine und bei 21,25 % keine Mutation nachgewiesen (Tabellen 10, Kapitel IV.1.3, Tabelle 4, Anhang).

Insgesamt konnten 63,41 % der Allele durch Mutationen in einem der beiden Gene erklärt werden (Tabelle 11, Kapitel IV.1.3). Bei 56,52 % der Patienten wurden Mutationen im SLC3A1-Gen detektiert (46,95 % der Allele), bei 21,25 % im SLC7A9-Gen (16,46 % der Allele) (Tabellen 10 und 11, Kapitel IV.1.3). Ein Patient war gemischt heterozygot für jeweils eine Mutation in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 (Tabelle 10, Kapitel IV.1.3, Tabelle 4, Anhang).

Die Detektionsrate für Mutationen im SLC3A1-Gen unter als Typ I-klassifizierten Chromosomen unterschiedlichen ethnischen Ursprungs wird in der Literatur zwischen 58 und 94 % angegeben (Bisceglia et al. 1996, Horsford et al. 1996, Goodyer et al. 1998, Saadi et al. 1998, dello Strologo et al. 2002). Im eigenen Kollektiv lag sie unter Typ I-Patienten bei 65,38 % (Tabelle 11, Kapitel IV.1.3). Bei keinem der für Typ I-Cystinurie klassifizierten Patienten wurde eine Mutation im SLC7A9-Gen detektiert.

Die Detektionsrate für Mutationen im SLC7A9-Gen liegt bei 79-84 % der nicht-Typ I-Allele (ICC 2001, dello Strologo et al. 2002). Die häufigsten Missense-Mutationen sind G105R, V170M, A182T und R333W (ICC 1999, ICC 2001). Das eigene Kollektiv umfasst nur drei nicht-Typ I-Patienten, die Detektionsrate lag hier bei 33,33 % (2/6 Allele) (Tabelle 11, Kapitel IV.1.3). Inklusiv der vier nicht-Typ I heterozygoten Patienten (3/4 Allele) lag die Detektionsrate bei 50 % der Allele (5/10).

Bemerkenswerterweise konnten Goodyer et al. (1998) unter neun gemischt heterozygoten Patienten (Typ I/nicht-Typ I) lediglich eine Mutation im SLC3A1-Gen identifizieren (11 %). Im hier beschriebenen Kollektiv ist nur ein Geschwisterpaar als gemischt heterozygot klassifiziert. Hier wurde die Mutation G105R im SLC7A9-Gen im heterozygoten Zustand detektiert (Botzenhart et al. 2002). Bei einem weiteren

unklassifizierten Patienten wurde je eine Mutation in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 beschrieben (Schmidt, 2000) (Tabelle 11, Kapitel IV.1.3, Tabelle 4, Anhang).

Bei nicht-typisierten US-amerikanischen Patienten konnten trotz Sequenzierung des *open reading frames* (ORF) von SLC3A1 und SLC7A9 nur in 78 % der Patienten eine Mutation in einem der beiden Gene detektiert werden. Es konnten lediglich 56 % der Allele durch Mutationen erklärt werden (ICC 2001). Gitomer et al. (1998a) detektierten Mutationen in 52 % der Cystinurie-Allele in US-amerikanischen Patienten. Harnevik et al. (2001) konnten bei großteils schwedischen unklassifizierten Patienten (n=53) in 76 % der Allele Mutationen im SLC3A1-Gen nachweisen; zehn Patienten dieser Studie waren allerdings miteinander verwandt. In einer weiteren Studie von Harnevik et al. (2003) wurden trotz direkter Sequenzierung des SLC7A9-Gens in 29 unklassifizierten Cystinurie-Allelen lediglich vier Mutationen nachgewiesen.

Im eigenen Kollektiv konnte bei 83,64 % der unklassifizierten Patienten mindestens eine Mutation in einem der beiden Gene detektiert werden, es konnten 64,55 % der Allele durch Mutationen erklärt werden. Die Detektionsraten unter unklassifizierten Patienten stimmen somit für beide Gene mit den Daten anderer Studien überein.

2.5 Diskussion zur Rolle weiterer Faktoren in der Pathogenese der Cystinurie

Die stark schwankenden Detektionraten in einzelnen Studien können unterschiedliche Ursachen haben:

- Bedingt durch die angewandten Methoden des herkömmlichen Mutationsscreenings (wie SSCP) ist eine Detektionsrate von 100 % nicht zu erwarten (Hayashi und Yandell 1993). Lediglich die Sequenzierung der kodierenden Bereiche würde eine Detektionsrate von 100 % gewährleisten.
- Deletionen, Insertionen oder Duplikationen, die in Bereichen lokalisiert sind, die mit dem hier beschriebenen Screening mittels real-time PCR nicht erfasst werden, könnten an der Pathogenese beteiligt sein.

- Es ist denkbar, dass nicht analysierte Bereiche wie die Promoter-Region des SLC7A9-Gens oder die nicht-kodierenden intronischen Bereiche Mutationen bergen (Harnevik et al. 2003).
- Wahrscheinlich sind weitere (modifizierende) Gene in der Entstehung der Cystinurie involviert (Harnevik et al. 2003, dello Strologo et al. 2002).
- Die Existenz modulierender Faktoren, welche die Expression der beteiligten Gene steuern, wird postuliert (Saadi et al. 1998, Harnevik et al. 2003).

3. Populationsspezifische Mutationsverteilung

3.1 Mutationsverteilung im SLC3A1-Gen

Zwar sind die meisten Mutationen im SLC3A1-Gen private Varianten, dennoch treten einige Mutationen gehäuft auf und zeigen eine populationsspezifische Verteilung. Bereits die Studie von Bisceglia et al. (1996) deutete an, dass in verschiedenen Kollektiven unterschiedliche Frequenzen in der Mutationsverteilung vorliegen.

Die häufigste Mutation im in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gesamtkollektiv ist T216M (17,07 % der Chromosomen). Da T216M mit einer Frequenz von 54,55 % unter südosteuropäischen Patienten auftritt und sich im eigenen Kollektiv von 80 Patienten 22 Patienten aus dieser Region befinden, erklärt dies die hohe Rate. Auch in anderen Studien wurde T216M vorwiegend unter Südosteuropäern detektiert (Saadi et al. 1998, Langen et al. 2000).

In anderen Studien wird der Aminosäureaustausch M467T mit einer Frequenz von 17-26 % als die häufigste Mutation in nahezu allen Populationen beschrieben (Gasparini et al. 1995, Bisceglia et al. 1996, de Sanctis et al. 1996, Endsley et al. 1997, Gitomer et al. 1998a, Saadi et al. 1998, Guillen et al. 2000, Langen et al. 2000). Dabei zeigt sich, dass diese Veränderung in Nord-, Mittel- und Südwesteuropa bevorzugt auftritt (Bisceglia et al. 1996, Botzenhart et al. 2002). Harnevik et al. (2001) detektierten M467T in 41 % großteils schwedischer Patienten (n=53). Zehn der Patienten waren allerdings verwandt. Im eigenen Kollektiv macht M467T 9,76 % aller Allele aus und tritt mit einer Frequenz von 15,05 % am häufigsten im mitteleuropäischen Kollektiv auf.

Im eigenen Kollektiv scheint die kürzlich beschriebene Duplikation der Exons 5 bis 9 des SLC3A1-Gens auf deutsche Patienten beschränkt zu sein (Schmidt et al. 2003b). Im Gesamtkollektiv macht diese Mutation 7,93 % aller Mutationen aus, unter deutschen Patienten (mitteleuropäisches Kollektiv) 13,98 %.

Weiterhin wurden die Mutationen R365W, R365L und M467K mehrfach beobachtet. Für die Mutation R365L konnte das gehäufte Auftreten unter Südosteuropäern bestätigt werden (Albers et al. 1999). Die Mutation ist nur in dieser Bevölkerungsgruppe zu finden und tritt dort mit einer Häufigkeit von 9,09 % auf.

Für japanische Cystinurie-Patienten hingegen wurden Mutationen beschrieben, die in anderen Populationen bisher unbekannt sind, umgekehrt konnten in westlichen Kollektiven detektierte Mutationen unter japanischen Patienten nicht nachgewiesen werden (Egoshi et al. 2000). Auch Horsford et al. (1996) und Harnevik et al. (2001) beschrieben Mutationen, die bislang nur unter Franko-Kanadiern bzw. Schweden detektiert wurden.

Ausgehend von diesen Beobachtung ist es sinnvoll, den ethnischen Ursprung der Patienten bei der molekulagenetischen Diagnostik zu berücksichtigen (siehe VI.6).

3.2 Mutationsverteilung im SLC7A9-Gen

Der Aminosäureaustausch G105R im variantenreichen Exon 4 stellt die häufigste Mutation im SLC7A9-Gen dar. Sie macht im eigenen Kollektiv 6,1 % der Mutationen aus. Das International Cystinuria Consortium (2001) beschrieb G105R in 25,4 % aller nicht-Typ I-Allele sowie in 5,6 % der untypisierten Allele.

Nur wenige weitere Mutationen in diesem Gen sind ebenfalls mehrfach berichtet. Für das SLC7A9-Gen zeichnet sich, abgesehen von der Mutation V170M bei libyschen Juden, kein ethnischer Zusammenhang ab (ICC 1999).

4. Anwendung des diagnostischen Schemas

Mit der Identifizierung von Mutationen in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 unter Cystinurie-Patienten sowie der Etablierung geeigneter Nachweismethoden ist es möglich, die Erkrankung molekulargenetisch zu diagnostizieren. Aufgrund der

populationsspezifischen Verteilung von Mutationen im SLC3A1-Gen sowie des gehäuft Auftretens von Mutationen in bestimmten Regionen des SLC7A9-Gens konnte ein diagnostisches Schema erstellt werden, ähnlich dem der Cystischen Fibrose. Eine erste Darstellung der Anwendung des Schemas wurde bereits publiziert (Eggermann et al. 2003). Je nach geographischer Herkunft des Patienten werden die in der jeweiligen Population häufigsten Mutationen schrittweise untersucht.

Unter den 25 in der vorliegenden Arbeit neu untersuchten Patienten und Probanden konnten so in 60,42 % der Allele Mutationen identifiziert werden. Die klinische Diagnose einer Cystinurie konnte so bei 73,91 % der Patienten molekulargenetisch bestätigt werden. Hierbei ist bei klinischen Symptomen einer Cystinurie auch bei Nachweis lediglich einer Mutation von einem ursächlichen Zusammenhang auszugehen.

Auf das Gesamtkollektiv bezogen konnten auf diese Weise retrospektiv 58,54 % der Allele durch Mutationen erklärt und bei 73,75 % der Patienten mindestens eine Mutation detektiert werden. Die Detektionsrate für das gesamte Mutationsscreening liegt bei 63,41 % der Allele und 78,75 % der Patienten.

Die Mutationsdetektionsrate für die Analyse ausgewählter Fragmente ist somit nur wenig niedriger als bei der Untersuchung der gesamten kodierenden Regionen beider Gene.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Kombination verschiedener molekulargenetischer Techniken (SSCP, Restriktionsverdau, direkte Sequenzierung, real-time PCR) bei einem Großteil der Patienten die klinische Diagnose der Cystinurie bestätigt.

Weiterhin konnten auf diese Weise zwei neue Mutationen (R365Q im SLC3A1-Gen und IVS4-1G>A im SLC7A9-Gen) detektiert werden. Dies bestätigt, dass die im Rahmen des Schemas untersuchten Exons zu den variableren Bereichen beider Gene gehören.

5. Typisierung und Mutationen in den Genen SLC3A1 und SLC7A9

Die biochemische Typisierung der Patienten bestätigte, dass Mutationen im SLC3A1-Gen nur unter Typ I-Patienten detektiert werden können. Unter nicht-Typ I-Patienten wurden in dieser Studie nur Mutationen im SLC7A9-Gen identifiziert.

Ausgehend von der Annahme dass Mutationen im SLC3A1-Gen nur unter Typ I-Patienten detektiert werden und Mutationen im SLC7A9-Gen hauptsächlich bei nicht-Typ I-Patienten, zeigt die vorliegende Studie, dass die Typ I Cystinurie häufiger als die nicht-Typ I-Cystinurie vorkommt: Bei 56,52 % der Patienten wurden Mutationen im SLC3A1-Gen detektiert (46,95 % der Allele), bei 21,25 % im SLC7A9-Gen (16,46 % der Allele). Bei 21,25 % der Patienten wurden keine Mutationen nachgewiesen. Das Verhältnis nicht-Typ I-Cystinurie zu Typ I-Cystinurie liegt etwa bei 1:2,7.

6. Weitere Kandidatengene der Cystinurie

Um die Rolle weiterer Kandidatengene an der Pathogenese der Cystinurie zu erfassen, wurden für die bereits nachgewiesenen Loci SLC3A1 und SLC7A9 (Chromosom 2p21 und 19q13.1) sowie die Kandidatengene SLC1A1, SLC7A8 und SLC7A10 (Chromosom 9p24.2, 14q11.2 und 19q13.1) Kopplungsanalysen durchgeführt. So konnte einerseits nachgewiesen werden, ob die Familien mit einem der beiden bekannten Genorte koppeln und ob das Vorhandensein nicht detektierter Mutationen möglich ist. Andererseits konnte beurteilt werden, ob Mutationen an einem anderer Locus wahrscheinlich sind, und ob eine Sequenzierung des Gens SLC7A10, welches in direkter Nachbarschaft zu SLC7A9 liegt, sinnvoll ist. Für vier der fünf Familien (A, B, C und D) wurde Kopplung mit der Region 19q13.1 demonstriert. Da im SLC7A9-Gen im Rahmen des Screenings keine Mutationen detektiert werden konnten, wurden für die Patienten Cys 64 und Cys 98 der Familien A und C das SLC7A10-Gen sequenziert. Mittels Sequenzierung konnten keine Mutationen im SLC7A10-Gen nachgewiesen werden (Schmidt et al. 2004). Auch Leclerc et al. (2001) konnten keine pathogenen Varianten in diesem Gen detektieren. Möglicherweise liegen bei den untersuchten Patienten doch Mutationen im SLC7A9-Gen vor, die mit den verwendeten Methoden nicht nachgewiesen werden konnten. Im Anschluss an die Kopplungsanalysen wurden keine weiteren Loci mittels Sequenzierung untersucht, da nur in Einzelfällen Kopplung mit einem dieser Loci gezeigt werden konnte. Sollten in zukünftigen Studien weitere Familien in diesen Regionen koppeln und sich die funktionellen Hinweise auf eine Beteiligung dieser Gene verstärken, werden auch diese analysiert.

7. Isolierte Cystinurie

Brodehl et al. beschrieben 1967 eine Patientin mit isolierter Cystinurie. Die Pathogenese dieser Form ist bisher unklar. DNA der Patientin stand für molekulargenetische Analysen zur Verfügung. In einer vorhergehenden Arbeit (Schmidt, 2000) wurden bei der Patientin Cys 47 zwei Mutationen im SLC7A9-Gen identifiziert. Die Mutation T123M lag auch bei den Nichten der Patienten im heterozygoten Zustand vor. Diese Mutation wurde sowohl bei Typ I-Chromosomen als auch bei nicht-Typ I-Chromosomen nachgewiesen und scheint somit ein breites klinisches Spektrum zu verursachen (ICC 2001). Die zweite Mutation, die bei der Patientin detektiert wurde, I260M, wurde damals erstmalig beschrieben. I260M wurde bei Patient Cys 5 als dritte Mutation neben $\Delta E244$ und G105R im SLC7A9-Gen identifiziert. Während sowohl $\Delta E244$ als auch G105R Mutationen sind, deren Rolle an der Ätiologie der Cystinurie weitestgehend gesichert ist, ist der pathogene Charakter der Mutation I260M derzeit noch unklar. Funktionelle Untersuchungen wurden bisher nicht durchgeführt.

Aufgrund des denkbaren funktionellen Zusammenhangs wurden nun die Gene SLC7A10 und SLC7A8 bei der Patientin Cys 47 sequenziert. In keinem der beiden Gene konnten pathogene Varianten identifiziert werden.

Funktionelle Untersuchungen beider bisher bekannten Mutationen im SLC7A9-Gen werden zeigen, ob diese die isolierte Cystinurie verursachen. Auch die Beteiligung weiterer Gene an der Pathogenese ist denkbar.

8. Polymorphismen im SLC7A9-Gen

Während die funktionellen Auswirkungen von Mutationen meist relativ gut bekannt sind, ist die Rolle von Polymorphismen an der Pathogenese einzelner Erkrankung schwer nachzuweisen.

Liu et al. (1997) zeigten, dass stille Mutationen, die nicht zu einem Aminosäureaustausch führen, durchaus ein sogenanntes Exonskipping verursachen können und damit eine Rolle beim Spleißen und der Expression des Genprodukts spielen.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob bestimmte Varianten im SLC7A9-Gen mit dem Phänotyp der Erkrankung in Zusammenhang stehen, indem sie die Proteinstruktur des Genprodukts verändern.

8.1 Allelverteilung der Varianten unter Patienten und Kontrollen

In der vorliegenden Arbeit wurden die bisherigen Ergebnisse zur Allel- und Genotypverteilung einzelner Polymorphismen im SLC7A9-Gen an einem größeren und einheitlichen Patienten- und Kontrollkollektiv bestätigt (Schmidt et al. 2002, Schmidt et al. 2003a). Die durchgeführten statistischen Analysen der 15 detektierten Polymorphismen zeigten, dass für die Varianten c.147C>T (Exon 2), c.386C>T (Exon 3), IVS3+22T>G, c.584C>T (Exon 4), c.610T>C (Exon 4), c.692C>T (Exon 5), c.852C>A (Exon 6) und c.872C>T (Exon 6) signifikante Unterschiede in der Allel- und Genotypverteilung unter Patienten und Kontrollen bestehen (Tabelle 14, Anhang) (Schmidt et al. 2002, Schmidt et al. 2003a). Dies deutet darauf hin, dass Allele einiger Polymorphismen des SLC7A9-Gens mit der Cystinurie assoziiert sind und eventuell eine funktionelle Bedeutung haben.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass ein Kopplungsungleichgewicht zwischen den Polymorphismen und anderen funktionellen Varianten in SLC3A1, SLC7A9 oder anderen bisher nicht identifizierten Genen existiert.

Für die Varianten c.610T>C und c.852C>A im SLC7A9-Gen, die zu einem Aminosäureaustausch führen (V142A und L223M), ist zusätzlich eine Assoziation mit der Erkrankung denkbar, indem sie die Eigenschaften des Aminosäuretransporters beeinflussen. V142A ist in der zweiten extrazellulären Schleife lokalisiert, in enger Nachbarschaft zu dem Cysteinrest, der an der Ausbildung der Disulfidbrücke mit rBAT beteiligt ist. L223M liegt in der sechsten Transmembrandomäne.

8.2 Spleißanalysen zu Varianten im SLC7A9-Gen

Die *Minigene*-Analysen zu Varianten im SLC7A9-Gen sollten klären, inwieweit prädisponierende und modifizierende Haplotypen mit funktioneller Relevanz existieren. Dazu wurde analysiert, ob Allele verschiedener Polymorphismen eine funktionelle Bedeutung im Hinblick auf das Spleißverhalten haben.

8.2.1 Durchführung der Klonierungsexperimente

Anfangs sollten drei Fragmente (A, B und C), welche je einen Haplotyp der zu untersuchenden Polymorphismen enthielten, mittels Klonierung in den Expressionsvektor pcDNA3.1D/V5-His-TOPO[®] eingebracht werden (Tabelle 6, Kapitel III.2.5.1, Abbildung 8, Kapitel IV.5.2).

Für das ursprüngliche kleinste Fragment C gelang die Klonierung beim ersten Ansatz.

Im Falle des Fragments B war die Klonierung nur für das Fragment des Patienten Cys 15 erfolgreich. Das Fragment des Patienten Cys 63 konnte auch nach mehreren Versuchen nicht in den Vektor eingebracht werden. Aus diesem Grund wurde das Fragment in zwei kleinere Abschnitte (B1 und B2) unterteilt (Tabelle 6, Kapitel III, 2.5.1). Die Klonierung des Fragments B2 in den Vektor gelang für die Fragmente der Patienten Cys 15 und Cys 63 problemlos. Die Klonierung des Fragments B1 war auch nach mehrfachen Wiederholungen sowie der Analyse von bis zu 150 Klonen je Ansatz nicht erfolgreich, obwohl die Größe des Fragments B1 mit 4,7kb der des Fragments C entsprach, welches problemlos kloniert werden konnte.

Das Fragment A ließ sich ebenfalls nicht in den Vektor einbringen. In diesem Fall, sowie auch für Fragment B, ist die misslungene Klonierung durch die Größe des Fragments zu erklären (5,3kb), welches wahrscheinlich die Kapazität des Vektors überschreitet. Die erfolgreiche Klonierung mit Fragment B für das PCR-Produkt des Patienten Cys 15 mit einer Größe von 6,5kb war wahrscheinlich ein Zufallsereignis. Auch Modifikationen der Klonierungs- und Transformationsreaktionen wie längere Regenerationszeit oder eine niedrigere Wachstumstemperatur brachten keinen Erfolg.

8.2.2 Detektion verschiedener Spleißvarianten

Für die Fragmente B (Cys 15), B2 und C waren die Klonierungen erfolgreich. Die im Expressionsvektor enthaltenen Fragmente wurden in COS7-Zellen transfiziert. Nach einer 48-stündigen Expression wurde die gebildete RNA isoliert und eine RT-PCR mit fragmentspezifischen Primern durchgeführt. An der so erhaltenen cDNA wurde mittels spezifischer Primer eine PCR durchgeführt, die Produkte wurden auf Agarosegelen aufgetrennt und anschließend einer direkten Sequenzierung zugeführt.

Die RT-PCR und PCR an RNA aus untransfizierten COS7-Zellen zeigte, dass hier keine Produkte vorlagen, die der Sequenz des SLC7A9-Gens entsprachen. Damit wurde ein Hintergrund von Affen-RNA ausgeschlossen.

8.2.2.1 Spleißvarianten der Konstrukte B und B2

Die Spleißanalyse für das Fragment B2, welches die unterschiedlichen Genotypen für die Polymorphismen c.584T>C und c.610C>T in Exon 4 enthält, zeigte, dass die beiden verschiedenen Haplotypen keine unterschiedlichen Spleißvarianten im Zellkulturexperiment hervorrufen (Abbildung 13, Kapitel IV.5.1, Tabelle 19, Kapitel IV.5.1).

Für das größere Fragment B, welches das Fragment B2 beinhaltet, war nur eine Spleißanalyse für den Genotyp c.386C, IVS3+22G, c.584T und c.610C des Patienten Cys 15 möglich (siehe V.8.2.1). Bei der Spleißanalyse konnten drei Spleißvarianten nachgewiesen werden: Die *full-length*-Variante enthielt die Exons 2, 3, 4 und 5, den beiden anderen Varianten fehlten das Exon 3 bzw. die Exons 3 und 4 (Abbildungen 11 und 12, Kapitel IV.5.1, Tabelle 19, Kapitel IV.5.1). Aufgrund der Analyse für das Fragment B2 ist eine Beteiligung der Polymorphismen in Exon 4 an der Entstehung dieser Varianten nicht wahrscheinlich. Da die Klonierung der Fragmente B (Cys 63) und B1 in den Expressionsvektor nicht möglich war, ist derzeit nicht eindeutig nachzuweisen, ob die Polymorphismen c.368C>T und IVS3+22G>T in Exon und Intron 3 in Zusammenhang mit den detektierten Spleißvarianten stehen.

Das Allel c.386T ist eine sehr seltene Variante, die unter Kontrollen bisher nicht nachgewiesen werden konnte (Tabelle 14, Anhang). Dagegen tritt die homozygote Form der Variante unter Patienten mit einer Frequenz von 3,4 % auf. Somit ist das Allel c.386T eventuell als Mutation zu bewerten. Die Variante ist in keinem Bindemotiv für ein SR-Protein (ESE, = *exonic splicing enhancer*) lokalisiert (Tabelle 20, Kapitel IV.5.3). Weitere Analysen sind notwendig, um zu klären, welche Rolle diese Variante beim Spleißen spielt.

Die Aceview-Datenbank der NCBI verzeichnet eine Spleißvariante, der Exon 3 fehlt (Abbildung 8, Kapitel IV.5.2). Die Spleißvariante des Patienten Cys 15 stellt somit kein Artefakt dar. Diese Variante konnte zwar mittels Untersuchungen an

kommerzieller Nieren- und Universal-RNA nicht dargestellt werden, möglicherweise ist aber die Sensitivität der RT-PCR an diesem Material herabgesetzt oder die mRNA wurde dem *nonsense mediated mRNA decay* zugeführt und ist nicht mehr nachweisbar.

8.2.2.2 Spleißvarianten des Konstrukts C

Das Konstrukt C umfasste die Polymorphismen c.692C>T, c.852C>A und c.872C>T in den Exons 5 und 6 im homozygoten Wildtypzustand (CCC, Cys 3) sowie homozygot für den nicht-Wildtypzustand (TAT, Cys 15) (Tabelle 19, Kapitel IV.5.1). Die Analyse der PCR-Produkte zeigte, dass beim Konstrukt des Wildtyp-Haplotyps (CCC) drei Spleißvarianten vorliegen: Zum einen das Produkt der vollständigen mRNA mit den Exons 4, 5, 6 und 7, zum anderen zwei Spleißvarianten, denen Exon 6 bzw. die Exons 5 und 6 fehlten (Abbildungen 14A und 15A, Kapitel IV.5.1, Tabelle 19, Kapitel IV.5.1). Beim Konstrukt für den nicht-Wildtyp-Haplotyp (TAT) waren zwei Spleißvarianten detektierbar. Einer dieser Varianten fehlte Exon 6, der anderen die Exons 5 und 6. Die *full-length* RNA war nicht detektierbar (Abbildungen 14B und 15B, Kapitel IV.5.1, Tabelle 19, Kapitel IV.5.1).

Untersuchungen an kommerzieller RNA zeigen, dass die Spleißvariante, der die Exons 5 und 6 fehlen, auch *in vivo* vorkommt (Abbildungen 16 und 17, Kapitel IV.5.2). Der biologische Sinn diese Spleißvariante ist bisher unklar. Das Fehlen beider Exons führt auf cDNA-Ebene zu einer Verschiebung des Leserahmens. Durch ein vorzeitiges Stopkodon wird die gebildete mRNA wahrscheinlich über den *nonsense mediated mRNA decay* frühzeitig abgebaut, es entsteht kein Genprodukt (Hentze und Kulozik, 1999). Diese Variante hat demnach keine Funktion für die Transporteigenschaft des eigentlichen Proteins.

Betrachtet man die *scores* für Bindemotive (ESEs) von vier SR-Proteinen (SF2/ASF, SC35, SRp40 und SRp55), zeigt sich, dass für das Wildtyp-Allel der beiden Polymorphismen in Exon 6 jeweils zwei Bindemotive vorliegen. Im Falle des nicht-Wildtyp-Allels gehen drei Motive verloren. Der *score* für das Erkennungsmotiv des SC35-Proteins ist geringer als im Falle des Wildtyp-Allels (Tabelle 20, Kapitel IV.5.3).

Dies deutet darauf hin, dass die ESEs für die Unterschiede im Spleißen verantwortlich sind.

Es ist denkbar, dass die Expression und Wirkung der SR-Proteine gewebsspezifisch sind und somit in verschiedenen Geweben unterschiedliche Spleißmuster vorliegen. Dies schließt auch ein, dass wahrscheinlich in COS7-Zellen andere SR-Proteine aktiv sind als in humanen Nierenzellen, und so das abweichende Exonskipping in COS7-Zellen erklären würde.

Die Allelverteilung der Polymorphismen unter Patienten und Kontrollen zeigt, dass der nicht-Wildtyp-Haplotyp unter Kontrollen häufiger vorkommt als unter Patienten (Tabelle 14, Anhang). Somit stellt sich die Frage, inwieweit die Polymorphismen in Exon 5 und 6 einen Einfluss auf die Entstehung der Cystinurie besitzen. Die signifikanten Unterschiede in der Allelverteilung der Polymorphismen in Exon 5 und 6 konnten somit auch experimentell untermauert werden. Die *Minigene*-Untersuchungen zeigen, dass die Polymorphismen für unterschiedliche Spleißvarianten verantwortlich sind und demzufolge eine funktionelle Bedeutung haben.

Möglicherweise erklären die verschiedenen Spleißvarianten die unterschiedliche Penetranz von Mutationen und den variablen Schweregrad der Cystinurie. So ist denkbar, dass die Polymorphismen in Exon 5 und 6 auf diese Weise die Spleißeffizienz oder die Genauigkeit des Spleißens herabsetzen und so die Expression des Genprodukts regulieren. Somit würden die Polymorphismen im SLC7A9-Gen die Expression des $b^{0,+}$ AT-Proteins im Nierentubulus beeinflussen und die stöchiometrischen Verhältnisse des $b^{0,+}$ AT-Proteins gegenüber rBAT regulieren.

VI. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Auswirkung spezifischer genetischer Faktoren auf die Pathogenese der Cystinurie zu untersuchen. Zum einen sollte dargestellt werden, welche Rolle verschiedene Mutationstypen in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 bei der Entstehung der Erkrankung spielen. Weiterhin sollte die Analyse ausgesuchter Kandidatengene zeigen, inwieweit diese an der Pathogenese der Erkrankung beteiligt sind.

Für die vorliegenden Studien standen 25 neu eingesandte Patienten und Probanden zur Verfügung. Ausgewählte Analysen wurden auf das ethnisch gemischte Gesamtkollektiv von 84 Patienten und Probanden ausgeweitet. Ein Teil dieses Kollektivs wurde bereits in vorhergehenden Arbeiten beschrieben.

Zu Deletionen und Duplikationen in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 lagen bisher kaum Daten vor. Daher wurde ein Screening beider Gene mittels real-time PCR etabliert und an einem Kollektiv von 59 Patienten durchgeführt (Schmidt et al. 2003b). Im SLC3A1-Gen konnte so erstmals bei neun Patienten eine große Duplikation detektiert werden. Der Umbau wurde durch weitere Analysen charakterisiert, u.a. durch Eingrenzung der duplizierten Region mithilfe quantitativer Analysen auf SYBR green-Basis, Etablierung eines Junctionfragments und Sequenzierung des Übergangsbereiches auf DNA- und RNA-Ebene. Im quantitativ bisher nicht untersuchten SLC7A9-Gen lagen bei drei Patienten größere Deletionen vor.

Ausgehend von der Verteilung der Mutationen im Kollektiv wurde ein diagnostisches Schema erstellt, durch das ein hoher Prozentsatz der Mutationen detektiert werden kann, ohne ein aufwendiges komplettes Screeningverfahren beider Gene durchzuführen.

Insgesamt konnten mittels der in dieser Studie etablierten und angewandten Methoden bei 78,75 % aller Patienten Mutationen detektiert werden, es konnten 63,41 % der Allele erklärt werden. Die Detektionsrate für Mutationen in den Genen

SLC3A1 und SLC7A9 konnte so retrospektiv von 53,66 % (88/164) auf 63,41 % (104/164) der Allele erhöht werden (Eggermann et al. 2003).

Um die Beteiligung weiterer Gene an der Pathogenese der Cystinurie abzuschätzen, wurde bei einigen Familien, in denen keine oder nur eine Mutation in den bekannten Genen detektiert worden war, eine Kopplungsanalyse für verschiedene Kandidatengenregionen durchgeführt. Im Anschluss daran wurde bei zwei Patienten sowie einer Patientin mit isolierter Cystinurie (Cys 47) das Kandidatengen SLC7A10 sequenziert (Schmidt et al. 2004). Es konnten keine Mutationen identifiziert werden. Auch im SLC7A8-Gen wurde bei der letztgenannten Patientin keine Mutation gefunden.

Im SLC7A9-Gen wurden im eigenen Kollektiv 15 Polymorphismen detektiert (Schmidt et al. 2002, Schmidt et al. 2003a). In Ergänzung zu bereits durchgeführten Analysen wurden in der vorliegenden Arbeit die Allel- und Genotypfrequenzen in einem einheitlichen Patienten- und Kontrollkollektiv analysiert. Die statistischen Analysen bestätigten die zuvor erhobenen Daten (Schmidt et al. 2003a): Bei einzelnen Polymorphismen wurde ein statistisch signifikant unterschiedliches Verteilungsmuster der Allele und Genotypen unter Patienten und Kontrollen festgestellt. Um den möglichen funktionellen Charakter dieser Varianten zu untersuchen, wurden Spleißanalysen in COS7-Zellen durchgeführt. Dazu wurden *Minigene*-Konstrukte hergestellt, die in den Zellen exprimiert und anschließend auf cDNA-Ebene untersucht wurden.

Dabei zeigte sich, dass einzelne Varianten unterschiedliche Spleißvarianten hervorrufen, die möglicherweise eine regulatorische Funktion im Hinblick auf die Expression des Genprodukt besitzen und so zu einem variablen klinischen Erscheinungsbild führen könnten.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass verschiedene Mutationstypen und Varianten in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 eine grundlegende Bedeutung für die Ätiologie der Cystinurie haben. Im eigenen Kollektiv ergab sich kein Hinweis auf die Beteiligung spezifischer genetischer Faktoren auf die Pathogenese der Erkrankung, inwieweit modifizierende Faktoren eine Rolle spielen bleibt abzuwarten.

VII. Literaturverzeichnis

Literatur und eigene Beiträge, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entstanden sind, sind kursiv hervorgehoben.

1. Zitierte Literatur

Albers A: Detektion und funktionelle Analyse von Mutationen im SLC3A1-Gen bei Cystinurie-Patienten. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Universität Tübingen, 1998

Albers A, Lahme S, Wagner C, Kaiser P, Zerres K, Capasso G, Pica A, Palacin M, Lang F, Bichler KH, Eggermann T: Mutations in the SLC3A1 gene in cystinuric patients: Frequencies and identification of a novel mutation. *Genet Test* 3:227-231, 1999

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

Albers A, Wagner C, Schmidt C, Lahme S, Bichler KH, Lang F, Zerres K, Eggermann T: Molekularbiologie der Zystinurie. *Fortschr Med Orig*: 19:49-50, 2001

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

Bauch C, Verrey F: Apical heterodimeric cystine and cationic amino acid transporter expressed in MDCK cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F181-189, 2002

Baumann E: Über Cystin und Cystein. *Z Physiol Chemie* 8:299, 1883

Bertran J, Werner A, Moore ML, Stange G, Markovich D, Biber J, Testar X, Zorzano A, Palacin M, Murer H: Expression cloning of a cDNA from rabbit cortex that induces a single transport system for cystine and dibasic and neutral amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA*: 89:5601-5605, 1992

Birwe H, Hesse A: High-performance liquid chromatographic determination of urinary cysteine and cystine. *Clin Chim Acta* 199:33-42, 1991

Bisceglia L, Calonge MJ, dello Strologo L, Rizzoni G, de Sanctis L, Gallucci M, Beccia E, Testar X, Zorzano A, Estivill X, Zelante L, Palacin M, Gasparini P, Nunes V: Molecular analysis of the cystinuria disease gene: identification of four new mutations, one large deletion, and one polymorphism. *Hum Genet* 98:447-451, 1996

Bisceglia L, Calonge MJ, Totaro A, Feliubadalo L, Melchionda S, Garcia J, Testar X, Gallucci M, Ponzzone A, Zelante L, Zorzano A, Estivill X, Gasparini P, Nunes V, Palacin M: Localization, by linkage analysis, of the cystinuria Typ III gene to chromosome 19q13.1. *Am J Hum Genet* 60:611-616, 1997

Bisceglia L, Purroy J, Jimenez-Vidal M, d'Adamo AP, Rousaud F, Beccia E, Penza R, Rizzoni G, Gallucci M, Palacin M, Gasparini P, Nunes V, Zelante L: Cystinuria type I: identification of eight new mutations in SLC3A1. *Kidney Int* 59:1250-1256, 2001

Borsani G, Bassi MT, Sperandeo MP, de Grandi A, Buoninconti A, Riboni M, Manzoni M, Incerti B, Pepe A, Andria G, Ballabio A, Sebastio G: SLC7A7, encoding a putative permease-related protein, is mutated in patients with lysinuric protein intolerance. *Nat Gene* 21:297-301, 1999

Bostrom H, Hambræus L: Cystinuria in Sweden. VII. Clinical histopathological and medio-social aspect of the disease. *Acta Med Scand Suppl* 411:1-61, 1964

Botzenhart E, Vester U, Schmidt C, Hesse A, Halber M, Wagner C, Lang F, Hoyer P, Zerres K, Eggemann T, and members of the APN: Cystinuria in children: Distribution and frequencies of mutations in the SLC3A1 and SLC7A9 genes. Kidney Int 62:1136-1142, 2002

Botzenhart E: Mutationsspektrum in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 bei jugendlichen Cystinurienpatienten. Doktorarbeit, Fakultät für Medizin, RWTH Aachen, 2003

Boutros M, Ong P, Saadi J, Hiou-Tim F, Vicanek C, Rozen R, Goodyer P: The human rBAT promotor and mutations in cystinuria. *A J Hum Genet* 65:491 (Kongressband), 1999

Brand E, Harris MM, Biloon S: Cystinuria. *J Biol Chem* 86:315-331, 1930

Brodehl J, Gellissen K, Kowalewski S: Isolierter Defekt der tubulären Cystin-Rückresorption in einer Familie mit idiopathischem Hypoparathyroidismus. *Klin Wschr* 45:39-40, 1967

Brodehl J: Tubular disorders following kidney transplantations. *Monatsschr Kinderheilkd* 123:757-758, 1975

Bröer S, Wagner CA: Structure-function relationships of heterodimeric amino acid transporters. *Cell Biochem Biophys* 36:155-168, 2002

Calonge MJ, Gasparini P, Chillarón J, Chillón M, Gallucci M, Rousaud F, Zelante L, Testar X, Dallapiccola B, Di Silverio F, Barceló P, Estivill X, Zorzano A, Nunes V, Palacín M: Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine. *Nat Genet* 6:420-425, 1994

Calonge MJ, Nadal M, Calvano S, Testar X, Zelante L, Zorzano A, Estivill X, Gasparini P, Palacin M, Nunes V: Assignment of the gene responsible for cystinuria (rBAT) and of markers D2S119 and D2S177 to 2p16 by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 95:633-636, 1995a

Calonge MJ, Volpini V, Bisceglia L, Rousaud F, de Sanctis L, Beccia E, Zelante L, Testar X, Zorzano A, Estivill X, Gasparini P, Nunes V, Palacin M: Genetic heterogeneity in cystinuria: The SLC3A1 gene is linked to type I but not to type III cystinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:9667-9671, 1995b

- Chairoungdua A, Segawa H, Kim JY, Miyamoto KI, Haga H, Fukui Y, Mizoguchi KI, Ito H, Takeda E, Endou H, Kanai Y: Identifikation of an amino acid transporter associated with the cystinuria-related type II membrane glycoprotein. *J Biol Chem* 274:28845-28848, 1999
- Chillaron J, Estevez R, Mora C, Wagner CA, Süssbrich H, Lang F, Gelpi JL, Testar X, Busch AE, Zorzano A, Palacin M: Obligatory amino acid exchange via systems b^{0,+}-like and y^{+L}-like. *J Biol Chem* 271:17761-17770, 1996
- Chillaron J, Roca R, Valencia A, Zorzano A, Palacin M: Heteromeric amino acid transporters: biochemistry, genetics, and physiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F995-1018, 2001
- Crawhall JC, Scowen EF, Watts RWE: Effect of penicillamine on cystinuria. *Br Med J* 1:588-590, 1963
- Crawhall JC, Saunders EP, Thompson CJ: Heterozygotes for cystinuria. *Ann Hum Genet* 29:257-269, 1966
- Crawhall JC, Segal S: The intracellular ration of cysteine and cystine in various tissues. *Biochem J* 105:891-896, 1967
- Dahlberg PJ, van den Berg CJ, Kurtz SB, Wilson DM, Smith LH: Clinical features and management of cystinuria. *Mayo Clin Proc* 52:533-542, 1977
- dello Strologo L, Pras E, Pontesilli C, Beccia E, Ricci-Barbini V, de Sanctis L, Ponzzone A, Gallucci M, Bisceglia L, Zelante L, Jimenez-Vidal M, Font M, Zorzano A, Rousaud F, Nunes V, Gasparini P, Palacin M, Rizzoni G: Comparison between SLC3A1 and SLC7A9 cystinuria patients and carriers: A need for a new classification. *J Am Soc Nephrol* 13:2547-2553, 2002
- Dent CE, Rose GA: Amino acid metabolism in cystinuria. *Quart J Med* 20:205-219, 1951
- Dent CE, Senior B, Walshe JM: The pathogenesis of cystinuria. II. Polarographic studies of the metabolism of sulphur-containing amino-acids. *J Clin Invest* 33:1216-1226, 1954
- Dent CE, Senior B: Studies on the treatment of cystinuria. *Br J Urol* 27: 317-332, 1955
- Dent CE, Friedmann M, Green H, Watson LCA: Treatment of cystinuria. *Br Med J* 1:403-408, 1965
- De Sanctis L, Bruno M, Bonetti G, Cosseddu D, Bisceglia L, Ponzzone A, Dianzani I: Phenotype characterization and prevalence of rBAT M467T mutation in Italian cystinuric patients. *J Inherit Metab Dis* 19:243-245, 1996

Eggermann T, Schmidt C, Lahme S, Hesse A, Lang F, Zerres K: Molekulargenetik der Cystinurie: Stand der Forschung und Anwendung in der Diagnostik. Nieren- und Hochdruckkrankheiten 32:448-455, 2003

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

Endsley JK, Philipps JA 3rd, Hruska KA, Denneberg T, Carlson J, George AL Jr: Genomic organization of a human cystine transporter gene (SLC3A1) and identification of novel mutations causing cystinuria. *Kidney Int* 51:1893-1899, 1997

Fernandez E, Carrascal M, Rousaud F, Abian J, Zorzano A, Palacin M, Chillaron J: rBAT-b⁰⁺AT heterodimer is the main apical reabsorption system for cystine in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F540-548, 2002

Foreman JW, Hwang SM, Segal S: Transport interactions of cystine and dibasic amino acids in isolated rat renal tubules. *Metabolism* 28:53-61, 1980

Fox M, Thier S, Rosenberg LE, Kiser W, Segal S: Evidence against a single renal transport defect in cystinuria. *N Eng J Med* 270:556-561, 1964

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

Furriols M, Chillaron J, Mora C, Castello A, Bertran J, Camps M, Testar X, Vilaro S, Zorzano A, Palacin M: rBAT, related to L-cystine transport, is located to the microvilli of proximal straight tubules, and its expression is regulated in kidney by development. *J Biol Chem* 268:27060-27068, 1993

Gasparini P, Calonge MJ, Bisceglia L, Purroy J, Dianzani I, Notarangelo A, Rousaud F, Gallucci M, Testar X, Ponzzone A, Estivill X, Zorzano A, Palacin M, Nunes V, Zelante L: Molecular genetics of cystinuria: Identification of four new mutations and seven polymorphisms, and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet*: 57:781-788, 1995

Gitomer WL, Reed BY, Ruml LA, Sakhaee K, Pak CY: Mutations in the genomic deoxyribonucleic acid for SLC3A1 in patients with cystinuria. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3699-3694, 1998a

Gitomer WL, Reed BY, Ruml LA, Pak CY: 335-base deletion in the mRNA coding for a dibasic amino acid transporter-like protein (SLC3A1) isolated from a patient with cystinuria. *Hum Mutat* S1:S69-71, 1998b

Gitomer WL, Reed BY, Pak CY: Identification of two novel mutations [P122S (364C>T) and 1601delAC] in the SLC3A1 gene in type I cystinurics. *Hum Mutat* 15:390, 2000

- Goodyer P, Saadi I, Ong P, Elkas G, Rozen R: Cystinuria subtype and the risk of nephrolithiasis. *Kidney Int* 54:56-61, 1998
- Guillen M, Corella D, Cabello ML, Garcia AM, Portoles O, Hernandez-Yago J: Association between M467T and 114 C-->A variants within the SLC3A1 gene and some phenotypical traits in cystinuria patients from Spain. *Hum Genet* 106:314-320, 2000
- Halperin EC, Thier SO: Cystinuria. In: *Nephrolithiasis*. Edited by FL Coe, BM Brenner, JH Stein. New York: Churchill Livingstone, pp. 208-230, 1980
- Harnevik L, Fjellstedt E, Molbaek A, Tiselius HG, Denneberg T, Söderkvist P: Identification of 12 novel mutations in the SLC3A1 gene in swedish cystinuria patients. *Hum Mut* 18:516-525, 2001
- Harnevik L, Fjellstedt E, Molbaek A, Denneberg T, Söderkvist P: Mutation analysis of SLC7A9 in cystinuria patients in Sweden. *Genet Test* 7:13-20, 2003
- Harris H, Mittwoch U, Robson EB, Warren FL: Phenotypes and genotypes in cystinuria. *Ann Hum Genet* 20:57-91, 1955
- Hayashi K, Yandell DW: How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat* 2:338-346, 1993
- Hellier MD, Perrett D, Holdsworth CD: Dipeptide absorption in cystinuria. *Br Med J* 4:782, 1970
- Hentze MW, Kulozik AE: A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* 96:307-310, 1999
- Hernandez-Graulau JM, Castaneda-Zuniga W, Hunter D, Hulbert JC: Management of cystine nephrolithiasis by endourologic methods and shock-wave lithotripsy. *Urology* 34:139-143, 1989
- Horsford J, Saadi I, Raelson J, Goodyer PR, Rozen R: Molecular genetics of cystinuria in French Canadians: Identification of four novel mutations in Type I patients. *Kidney Int* 49:1401-1406, 1996
- ICC (=International Cystinuria Consortium) (Feliubadalo L, Font M, Purroy J, Roussaud F, Estivill X, Nunes V, Golomb E, Centola M, Aksentijevich I, Kreiss Y et al.): Non-type I cystinuria caused by mutations in SLC7A9, encoding a subunit (b^{0,+}AT) of rBAT. *Nat Genet* 23:52-57, 1999
- ICC (=International Cystinuria Consortium) (Font M, Feliubadalo L, Estivill X, Nunes V, Golomb E, Kreiss Y, Pras E, Bisceglia L, d'Adamo AP, Zelante L et al.): Functional analysis of mutations in SLC7A9, and genotype-phenotype correlation in non-Type I cystinuria. *Hum Mol Genet* 10:305-316, 2001
- Kanai Y, Stelzner MG, Lee WS, Wells RG, Brown D, Hediger MA: Expression of mRNA (D2) encoding a protein involved in amino acid transport in S3 tubule. *Am J Physiol* 263:F1087-1092, 1992

- Kanai Y, Hediger MA: The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications. *Eur J Pharmacol* 479:237-247, 2003
- Kelly S, Nolan EP: Postscript on excretion rates in posttransplant cystinuric patients. *JAMA* 16:1897, 1980
- Langen H, v Kietzell D, Byrd D, Arslan-Kirchner M, Vester U, Stuhmann M, Dörk T, Saar K, Reis A, Schmidtke J, Brodehl J: Renal polyamine excretion, tubular amino acid reabsorption and molecular genetics in cystinuria. *Pediatr Nephrol* 14:376-384, 2000
- Leclerc D, Boutros M, Suh D, Wu Q, Palacin M, Goodyer P, Rozen R: SLC7A9 mutations in type II and type III cystinuria. *Am J Hum Genet* 67S:2169 (Poster), 2000
- Leclerc D, Wu Q, Ellis JR, Goodyer P, Rozen R: Is the SLC7A10 gene on chromosome 19 a candidate locus for cystinuria? *Mol Genet Metab* 73:333-339, 2001
- Leclerc D, Boutros M, Suh D, Wu Q, Palacin M, Ellis JR, Goodyer P, Rozen R: SLC7A9 mutations in all three cystinuria subtypes. *Kidney Int* 62:1550-1559, 2002
- Lee W, Wells RG, Sabbag RV, Mohandas TK, Hediger MA: Cloning and chromosomal localization of a human kidney cDNA involved in cystine, dibasic, and neutral amino acid transport. *J Clin Invest* 91:1959-1963, 1993
- Levy HL: Genetic screening. *Adv Hum Genet* 4:1-104, 1973
- Lewis HD: Cystinuria. A review of some recent investigations. *Yale J Biol* 4:437-499, 1932
- Lindell A, Denneberg T, Granerus G: Studies on renal function in patients with cystinuria. *Nephron* 77:76-85, 1997
- Liu W, Qian C, Francke U: Silent mutation induces exon skipping of fibrillin-1 gene in Marfan syndrome. *Nat Genet* 16:328-329, 1997
- Livak KJ: Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal* 14:143-149, 1999
- Miyamoto KI, Katai K, Tatsumi S, Sone K, Segawa H, Yamamoto H, Taketani Y, Takada K, Morita K, Kanayama H, Kagawa S, Takeda E: Mutations of the basic amino acid transporter gene associated with cystinuria. *Biochem J* 310:951-955, 1995
- Miyamoto K, Segawa H, Tatsumi S, Katai K, Yamamoto H, Taketani Y, Haga H, Morita K, Takeda E: Effects of truncation of the COOH-terminal region of a Na⁺-independent neutral and basic amino acid transporter on amino acid transport in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 271:16758-16763, 1996
- Mora C, Chillaron J, Calonge MJ, Forgo J, Testar X, Nunes V, Murer H, Zorzano A, Palacin M: The rBAT gene is responsible for L-cystine uptake via the b^{0,+}-like amino

acid transport system in a „renal proximal tubular“ cell line (OK cells). *J Biol Chem* 271: 10569-10576, 1996

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

Nirenberg MJ, Tate SS, Mosckovitz R, Udenfriend S, Pickel VM: Immunocytochemical localization of the renal neutral and basic amino acid transporter in rat adrenal gland, brainstem, and spinal cord. *J Comp Neurol* 12:505-522, 1995

Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using polymerase chain reaction. *Genomics* 5:874-879, 1989

Oyangi K, Miura R, Yamanouchi T: Congenital lysinuria: a new inherited transport disorder of dibasic amino acids. *J Pediatr* 77:259-266, 1970

Pak CY, Fuller C, Sakhaee K, Zerwekh FE, Adams BV: Management of cystine nephrolithiasis with alpha-mercaptopyronylglycine. *J Urol* 136:1003-1008, 1986

Palacin M, Estevez R, Zorzano A: Cystinuria calls for heteromultimeric amino acid transporters. *Curr Opin Cell Biol* 10:455-461, 1998

Palacin M, Goodyer P, Nunes V, Gasparini P: Cystinuria. In: *The metabolic and molecular bases of inherited diseases*, 8th edition, edited by Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, New York, McGraw-Hill, Chapter 191, pp4909-4932, 2001

Parks JH, Asplin JR, Coe FL: Patients adherence to long-term medical treatment of kidney stones. *J Urol* 166:2057-2060, 2001

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

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

Pietrow PK, Auge BK, Weizer AZ, Delvecchio FC, Silverstein AD, Mathias B, Albala DM, Preminger GM: Durability of the medical management of cystinuria. *J Urology* 169:68-70, 2003

Pras E, Arber N, Aksentijevich I, Katz G, Schapiro JM, Prosen L, Gruberg L, Harel D, Liberman U, Weissenbach J, Pras M, Kastner DL: Localization of a gene causing cystinuria to chromosome 2p. *Nat Genet* 6:415-418, 1994

- Pras E, Raben N, Golomb E, Arber N, Aksentijevich I, Schapiro JM, Harel D, Katz G, Liberman U, Pras M, Kastner DL: Mutations in the SLC3A1 transporter gene in cystinuria. *Am J Hum Genet* 56:1297-1303, 1995
- Pras E, Kochba I, Lubetzky A, Pras M, Sidi Y, Kastner DL: Biochemical and clinical studies in Libyan Jewish cystinuria patients and their relatives. *Am J Med Genet* 80:173-176, 1998a
- Pras E, Golomb E, Drake C, Aksentijevich I, Katz G, Kastner DL: A splicing mutation (891+4A-->G) in SLC3A1 leads to exon 4 skipping and causes cystinuria in a Moslem Arab family. *Hum Mutat* S1:S28-30, 1998b
- Purroy J, Bisceglia L, Calonge MJ, Zelante L, Testar X, Zorzano A, Estivill X, Palacin M, Nunes V, Gasparini P: Genomic structure and organization of the human rBAT gene (SLC3A1). *Genomics* 37:249-252, 1996
- Purroy J, Bisceglia L, Feliubadalo L, Rousaud F, Zelante L, Zorzano A, Estivill X, Palacin M, Gasparini P, Nunes V: Cystinuria type I: identification of nine new mutations by RNA-SSCP and two large deletions by multiplex QF-PCR in SLC3A1. *Am J Hum Genet* 65S:2427 (Poster), 1999
- Purroy J, Bisceglia L, Jaeken J, Gasparini P, Palacin M, Nunes V: Detection of two novel large deletions in SLC3A1 by semi-quantitative fluorescent multiplex PCR. *Hum Mutat* 15:373-379, 2000
- Raymond and Rousset: GENEPOP (version 1.2): A population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 86:485-486, 1995
- Reig N, Chillaron J, Bartoccioni P, Fernandez E, Bendahan A, Zorzano A, Kanner B, Palacin M, Bertran J: The light subunit of system b⁰⁺ is fully functional in the absence of the heavy subunit. *EMBO J* 21:4906-4914, 2002
- Rosenberg LE, Durant JL, Albrecht I: Genetic heterogeneity in cystinuria: evidence for allelism. *Trans Assoc Am Physicians* 79:284-296, 1966a
- Rosenberg LE, Downing S, Durant JL, Segal S: Cystinuria: Biochemical evidence for three genetically distinct diseases. *J Clin Invest* 45:365-371, 1966b
- Rosenberg LE: Cystinuria: genetic heterogeneity and allelism. *Science* 154:1341-1343, 1966c
- Saadi I, Chen XZ, Hediger M, Ong P, Pereira P, Goodyer P, Rozen R: Molecular genetics of cystinuria. Mutation analysis of SLC3A1 and evidence for another gene in the Type I (silent) phenotype. *Kidney Int* 54:48-55, 1998.
- Schafer JA, Watkins ML: Transport of L-cystine in isolated perfused proximal straight tubules. *Pflügers Arch* 401: 143-151, 1984
- Schmidt C: Einfluss genomischer Varianten in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 auf die Entstehung einzelner Formen der Cystinurie. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Universität Tübingen, 2000

Schmidt C, Albers A, Tomiuk J, Eggermann K, Wagner C, Capasso G, Lahme S, Hesse A, Lang F, Zerres K, Eggermann T: Analysis of the genes SLC7A9 and SLC3A1 in unclassified cystinurics: Mutation detection rates and association between variants in SLC7A9 and the disease. *Clin Nephrol* 57:342-348, 2002

Schmidt C, Tomiuk J, Botzenhart E, Vester U, Halber M, Hesse A, Wagner C, Lahme S, Lang F, Zerres K, Eggermann T (and members of the APN): Genetic variations of the SLC7A9 gene: allele distribution of 13 polymorphic sites in German cystinuria patients and controls. Clin Nephrol 59:353-359, 2003a

Schmidt C, Vester U, Wagner CA, Lahme S, Hesse A, Hoyer P, Lang F, Zerres K, Eggermann T (and members of the APN): Significant distribution of genomic rearrangements in SLC3A1 and SLC7A9 to the etiology of cystinuria. Kidney Int 64:1564-1572, 2003b

Schmidt C, Vester U, Zerres K, Eggermann T: No evidence for a role of SLC7A10 in 19q13 in the aetiology of cystinuria. Clin Nephrol 2004: in press

Scriver CR, Clow CL, Reade TM, Goodyer P, Auray-Blais C, Giguere R, Lemieux B: Ontogeny modifies manifestation of cystinuria genes: implication for genetic counseling. *J Pediatr* 106:411-416, 1985

Segal S, McNamara PD, Pepe LM: Transport interactions of cystine and dibasic amino acids in renal brush border vesicles. *Science* 197:169-171, 1977

Segal S, Thier SO: Cystinuria. In: *The metabolic and molecular bases of inherited diseases*, 7th edition, edited by Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, New York, McGraw-Hill, Chapter 117, pp3581-3601, 1995

Silbernagl S: The renal handling of amino acids and oligopeptides. *Physiol Rev* 68:911-1007, 1988

Silk DBA: Progress report – peptide absorption in man. *Gut* 15:494, 1974

Stapleton FB, McKay CP, Noe HN: Urolithiasis in children: the role of hypercalcuria. *Pediatr Ann* 16:980-992, 1987

States B, Segal S: Distribution of glutathione-cystine transhydrogenase activity in subcellular fractions of rat intestinal mucosa. *Biochem J* 113:443-444, 1969

Stephens AD, Perrett D: Cystinuria: a new genetic variant. *Clin Sci Mol Med* 51:27-32, 1976

Stephens AD: Cystinuria and its treatment: 25 years experience at St. Bartholomew's hospital. *J Inher Metab Dis* 12:197-209, 1989

Tate SS, Yan N, Udenfriend S: Expression cloning of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter from rat kidney. *Proc Anatl Acad Sci USA* 89:1-5, 1992

Verrey F, Jack DL, Paulsen IT, Saier MH Jr, Pfeiffer R: New glycoprotein-associated amino acid transporters. *J Membr Biol* 172:181-192, 1999

Völkl H, Silbernagl S: Reexamination of the interplay between dibasic amino acids and L-cystine/L-cysteine during tubular reabsorption. *Pflügers Arch* 395:196-200, 1982

Wagner CA, Lang F, Bröer S: Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C1077-1093, 2001

Wartenfeld R, Golomb E, Katz G, Bale SJ, Goldman B, Pras M, Kastner DL, Pras E: Molecular analysis of cystinuria in Libyan Jews: exclusion of the SLC3A1 gene and mapping of a new locus on 19p. *Am J Hum Genet* 60:617-624, 1997

Wells RG, Hediger MA: Cloning of a rat kidney cDNA that stimulates dibasic and neutral amino acid transport and has sequence similarity to glucosidases. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5596-5600, 1992

Whelan DT, Scriver CR: Hyperdibasicaminoaciduria: an inherited disorder of amino acid transport. *Pediatr Res* 2:525-534, 1968

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

Yeh HL, Frankl W, Dunn MS, Parker P, Hughes B, Gyorgy P: The urinary excretion of amino acids by a cystinuric subject. *Am J Med Sci* 214:507-512, 1947

Zhang XX, Rozen R, Hediger MA, Goodyer P, Eydoux P: Assignment of the gene for cystinuria (SLC3A1) to human chromosome 2p21 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 24:413-414, 1994

2. Eigene Beiträge

2.1 Manuskripte

Albers A, Wagner C, Schmidt C, Bröer S, Lahme S, Bichler KH, Lang F, Zerres K, Eggermann T: Molekularbiologie der Zystinurie. *Fortschr Med Orig*: 119:49-50, 2001

Schmidt C, Albers A, Tomiuk J, Eggermann K, Wagner C, Capasso G, Lahme S, Hesse A, Lang F, Zerres K, Eggermann T: Analysis of the genes SLC7A9 and SLC3A1 in unclassified cystinurics: mutation detection rates and association between variants in SLC7A9 and the disease. *Clin Nephrol* 57:342-348, 2002

Botzenhart E, Vester U, Schmidt C, Hesse A, Halber M, Wagner C, Lang F, Hoyer P, Zerres K, Eggermann T and members of the APN: Cystinuria in children: Distribution and frequencies of mutations in the SLC3A1 and SLC7A9 genes. Kidney Int 62:1136-1142, 2002

Schmidt C, Tomiuk J, Botzenhart E, Vester U, Halber M, Hesse A, Wagner C, Lahme S, Lang F, Zerres K, Eggermann T and members of the APN: Genetic variations of the SLC7A9 gene: allele distribution of 13 polymorphic sites in German cystinuria patients and controls. *Clin Nephrol* 59:353-359, 2003

Schmidt C, Vester U, Wagner C, A, Lahme S, Hesse A, Hoyer P, Lang F, Zerres K, Eggermann T and members of the APN: Significant contribution of genomic rearrangements in SLC3A1 and SLC7A9 to the etiology of cystinuria. *Kidney Int* 64:1564-1572, 2003

Eggermann T, Schmidt C, Lahme S, Hesse A, Lang F, Zerres K: Molekulargenetik der Cystinurie: Stand der Forschung und Anwendung in der Diagnostik. *Nieren- und Hochdruckkrankheiten* 32:448-455, 2003

Schmidt C, Vester U, Zerres K, Eggermann T: No evidence for a role of SLC7A10 in 19q13 in the aetiology of cystinuria. *Clin Nephrol* 2004: in press

Schmidt C, Vester U, Hesse A, Lahme S, Wagner C, A, Lang F, Zerres K, Eggermann T and members of the APN: Population-specific distribution and frequencies of genomic variants in the SLC3A1 and SLC7A9 genes and application in molecular genetic testing of cystinuria. *Urol Res*: revised version submitted

2.2 Kongressbeiträge

Albers A, Wagner C, Schmidt C, Lahme S, Capasso G, Bröer S, Palacin M, Bichler KH, Hesse A, Kaiser P, Zerres K, Lang F, Eggermann T, 2000: Molecular genetic studies on the hrBAT/SLC3A1 gene and the gene for its light subunit, b0,+AT/SLC7A9, in cystinuric patients. *Medgen* 12:P-I-1.18 (Poster)

Eggermann T, Schmidt C, Albers A, Wagner C, Capasso G, Lahme S, Hesse A, Lang F, Zerres K, 2000: Frequencies of Mutations in the SLC7A9 and the SLC3A1 genes in unclassified cystinuric patients. *Am J Hum Genet*: 2231/W (Poster)

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

Eggermann T, Schmidt C, Tomiuk J, Lahme S, Hesse A, Albers A, Lang F, Zerres K, 2001: Rolle genomischer Varianten in den Genen SLC3A1 und SLC7A9 in der Ätiologie der Cystinurie. *Nieren- und Hochdruckkrankheiten* 30/3:128 (Poster)

Schmidt C, Albers A, Tomiuk J, Wagner C, Lahme S, Hesse A, Lang F, Zerres K, Eggermann T, 2001: Towards molecular genetic cystinuria diagnosis: results of SLC7A9 and SLC3A1 mutation testing in unclassified patients. *EJHG* P1560 (Poster)

Schmidt C, Botzenhart E, Vester U, Hoyer P, Zerres K, Eggermann T and members of the APN, 2001: Mutational spectrum in the genes SLC3A1 and SLC7A9 in early manifesting cystinuria. *Am J Hum Genet* 69S:785 (Poster)

Eggermann T, Schmidt C, Botzenhart E, Wagner C, Zerres K, 2002: Cystinuria in children: Distribution of mutations in SLC3A1 and in SLC7A9. Medgen 14:P2-20-05 (Poster)

Schmidt C, Tomiuk J, Botzenhart E, Vester U, Zerres K, Eggermann T and members of the APN, 2002: Genetic variations of the SLC7A9 gene: Allele distribution of 13 polymorphic sites in German cystinuria patients and controls. Medgen 14:P2-20-03 (Poster)

Schmidt C, Vester U, Lahme S, Hesse A, Zerres K, Eggermann T, 2003: Unusual genomic rearrangement in SLC3A1 in cystinuria patients. EJHG 11S:P609 (Poster)

Schmidt C, Lahme S, Vester U, Hesse A, Zerres K, Eggermann T, 2003: Population specific distribution of mutations in the cystinuria genes SLC3A1 and SLC7A9. Medgen 15:P022 (Poster)

3. Verwendete Datenbanken

Homepage der NCBI
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

OMIM-Datenbank der NCBI:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>

Aceview-Datenbank der NCBI
<http://www.ncbi.nih.gov/IEB/Research/Acembly/>

Genome Database:
<http://www.gdb.org>

ESEfinder-Software
<http://exon.cshl.edu/ESE/>

VIII. Anhang

Daten, die aus vorherigen Studien hervorgegangen sind, werden im Folgenden kursiv markiert.

1. Tabellen

Aminosäure-austausch	Lokalisation der Mutation	Exon/Intron	Literatur
G(-265)A	Promoter	P	Boutros et al. 1999
G(-194)C	Promoter	P	Boutros et al. 1999
	del c.114-c.1306	1-7	Pras et al. 1995
	c.163delC	1	Gitomer et al. 1998a
P122S	c.364C>T	1	Gitomer et al. 2000
P128Q	c.383C>A	1	Pras et al. 1995
	del c.431-765	2-3	Gitomer et al. 1998b
Δ145-204	del c.431-3C-463Tdel + dupl ins c.468T-474A	2	Gitomer et al. 1998a
	del Exon 2-10	2-10	Purroy et al. 2000
Y151N	c.451T>A	2	Bisceglia et al. 1996
Y151C	c.452A>G	2	Harnevik et al. 2001
S168X	c.503C>A	2	Purroy et al. 1999
R181Q	c.542G>A	2	Calonge et al. 1994
M190T	c.569T>C	2	Purroy et al. 1999
A198T	c.592G>A	2	Miyamoto et al. 1995
G204A	6.611G>C	2/3	Miyamoto et al. 1995
T216M	c.647C>T	3	Bisceglia et al. 1996
S217R	c.649A>C	3	Saadi et al. 1998
R227W	c.678C>T	3	Harnevik et al. 2003
N253K	c.759C>G	3	Harnevik et al. 2001
	c.765+1G>T	l3	Purroy et al. 1999
	c.766-2A>G	l3	Bisceglia et al. 2001
	del782A-804A	4	Gitomer et al. 1998a
F266S	c.797T>C	4	Purroy et al. 1999
E268K	c.802G>A	4	Miyamoto et al. 1995
R270X	c.808C>T	4	Pras et al. 1995
R270L	c.809G>T	4	Saadi et al. 1998
	c.891+4A>G (Exonskipping)	l4	Pras et al. 1998b
	c.974delGA	5	Horsford et al. 1996
P337P	c.1011G/A (Spleißmutation)	5	Saadi et al. 1998
	del Exon 5-ter	5-ter	Bisceglia et al. 1996
T341A	c.1021A>G	6	Miyamoto et al. 1995
L346P	c.1037T>C	6	Egoshi et al. 2000
R362C	c.1084C>T	6	Bisceglia et al. 1996
R362H	c.1085G>A	6	Harnevik et al. 2001
R365W	c.1093C>T	6	Gasparini et al. 1995
R365L	c.1094G>T	6	Albers et al. 1999
R365Q	c.1094G>A	6	Schmidt et al. 2002

	c.1136+2T>C	16	Harnevik et al 2001
	c.1136+2/3delT	16	Botzenhart et al. 2002
G398R	c.1192G/C	7	Harnevik et al. 2001
S420C	c.1259C>G	7	Gitomer et al. 1998a
	c.1306insC	7	Pras et al. 1995
I445T	c.1334T>C	8	Egoshi et al. 2000
R452W	c.1354C>T	8	Endsley et al. 1997
R452Q	c.1355G>A	8	Purroy et al. 1999
G458E	c.1373G>A	8	Gitomer et al. 1998a
Y461H	c.1381C>T	8	Endsley et al. 1997
Y461X		8	Purroy et al. 1999
M467K	c.1400T>A	8	Calonge et al. 1994
M467T	c.1400T>C	8	Calonge et al. 1994
G481V	c.1442G>T	8	Harnevik et al. 2001
E482K	c.1444G>A	8	Harnevik et al. 2001
E483X	c.1447G>T	8	Bisceglia et al. 1996
	c.1500+1G>T	18	Horsford et al. 1996
P508A	c.1523C>G	9	Botzenhart et al. 2002
Q510R	c.1529A>G	9	Harnevik et al. 2001
	c.1601delAC	9	Gitomer et al. 2000
V536G	c.1607T>G	9	Gitomer et al. 1998a
	del Exon 10	10	Purroy et al. 2000
S547W	c.1640C>G	10	Purroy et al. 1999
S547L	c.1640C>T	10	Harnevik et al. 2003
L564F	c.1690C>T	10	Purroy et al. 1999
R584T	c.1691G>C	10	Harnevik et al. 2001
Y582H??	c.1744T>C	10	Gasparini et al. 1995
	c.1749delA	10	Gasparini et al. 1995
	c.1767delA	10	Botzenhart et al. 2002
F599S	c.1796T>C	10	Harnevik et al. 2001
G600E	c.1799G>A	10	Harnevik et al. 2001
	c.1810delTG	10	Saadi et al. 1998
	c.1820delT	10	Egoshi et al. 2000
P615T	c.1843C>A	10	Calonge et al. 1994
	c.1898insTA	10	Egoshi et al. 2000
G645A	c.1934G>C	10	Gitomer et al. 1998a
F648S	c.1943T>C	10	Gasparini et al. 1995
T652R	c.1932G>C	10	Calonge et al. 1994
	c.1999-2000delTT, zerstört Stopcodon	10	Harnevik et al. 2001
C673R	c.2017T/C	10	Egoshi et al. 2000
C673W	c.2019	10	Purroy et al. 1999
	c.2022insT	10	Gitomer et al. 1998a
L678P	c.2033T/C	10	Calonge et al. 1994

Tabelle 1: Übersicht zu den bisher detektierten Mutationen im SLC3A1-Gen. c. entspricht der Nukleotidposition des Basenaustausches nach der veröffentlichten kodierenden Sequenz (GI 23308570, hier liegt das Startkodon an Position c.77).

Aminosäure-austausch	Lokalisation der Mutation	Exon/Intron	Literatur
ΔR10	c.213delAGA	2	ICC 1999
I44T	c.316T>C	3	Leclerc et al. 2002
P52L	c.340C>T	3	ICC 1999
G63R	c.372G>A	3	ICC 1999
W69L	c.391G>T	3	ICC 1999
W69X	c.391G>A	3	ICC 1999
A70V	c.394C>T	3	ICC 1999
G105R	c.498G>A	4	ICC 1999
	c.520insT	4	ICC 1999
I114T		4	Leclerc et al. 2000
T123M	c.553C>T	4	ICC 1999
	c.553delICG	4	ICC 1999
A126T	c.561G>A	4	ICC 1999
	c.596delITG	4	ICC 1999
F140S	c.604T>C	4	Schmidt et al. 2002
insA158	c.660insGCC	4	ICC 1999
	c.686delACTG	5	ICC 1999
V170M	c.693G>A	5	ICC 1999
A182T	c.729G>A	5	ICC 1999
I187F	c.744A>T	5	ICC 1999
	c.747delG	5	Schmidt et al. 2002
insI193	c.764insCAT	5	ICC 1999
G195R	c.768G>A	5	ICC 1999
IVS5+1G/A	c.789+1G>A	I5	ICC 1999
IVS5+2T/C	c.789+2T>C	I5	ICC 1999
	c.799insA	6	Leclerc et al. 2002
	c.800insA	6	ICC 1999
	c.815delTTTC	6	ICC 1999
A224V	c.856C>T	6	Botzenhart et al. 2002
W230R	c.873T>C	6	ICC 2001
	c.897delCTCAA	7	ICC 2001
I241T	c.907T>C	7	ICC 2001
ΔE244	c.915delGAA	7	ICC 2001
G259R	c.960G>A	8	ICC 1999
I260M	c.965C>G	8	Schmidt, 2000
P261L	c.967C>T	8	Leclerc et al. 2002
	c.970delT	8	Botzenhart et al. 2002
	c.998delC	8	ICC 2001
IVS9-17G/A		I8	Leclerc et al. 2002
IVS9+3A/T	c.1162+3A>T	I9	ICC 2001
V330M	c.1173G>A	10	Harnevik et al. 2003
A331V	c.1177C>T	10	Botzenhart et al. 2002
R333W	c.1182C>T	10	ICC 2001
	c.1194delA	10	Harnevik et al. 2003
A354T	c.1245G>A	10	ICC 2001
S379R	c.1322C>G	11	ICC 2001
A382T	c.1329G>A	11	ICC 2001

T389M	c.1351C>T	11	ICC 2001
	c.1455delTT	12	ICC 2001
E436X	c.1491G>T	12	Leclerc et al. 2002
IVS12+3del AAGT	c.1584+3delAAGT	I12	ICC 2001
IVS12+4delAGTA		I12	Leclerc et al. 2002

Tabelle 2: Übersicht zu den bisher detektierten Mutationen im SLC7A9-Gen. c. entspricht der Nukleotidposition des Basenaustausches nach der veröffentlichten Sequenz (GI 7657590, hier liegt das Startkodon an Position c.186).

Cys-Nr.	Identifikation	Geschlecht	ethnische Herkunft	Erster Stein im Alter von	Zahl der Steine seitdem
2-P		W	Italien	37	<5
3-P		M	Italien	4m	5-10
4-P		W	Italien	5	?
5-P		M	Italien	28	>10
7-P		M	Griechenland	24	>10
8-P		M	Griechenland	25	>10
9-P		W	Griechenland	4	>10
10-P		M	Deutschland	67	<5
13-P		W	Griechenland	23	>10
14-P		M	Italien	?	?
15-P		M	Italien	?	?
16-P		W	Deutschland	17	>10
17-P		M	Jugoslawien	25	>10
18-P		M	Italien	5	<5
19-P		M	Italien	?	?
20-P		W	Italien	60	<5
21-P		W	Italien	23	-
22-P		M	Türkei	+	?
23	Mutter	W	Türkei	-	-
23-P	Kind	W	Türkei	+	?
24-P		M	Deutschland	17	5-10
25-P		M	Deutschland	+	?
26-P		M	Deutschland	+	?
28-P		M	Deutschland	28	<5
31	Vater	M	Deutschland	?	?
30-P*	Kind 1	M	Deutschland	+	?
29-P	Kind 2	W	Deutschland	+	?
32-P	Mutter	W	Deutschland	31	5-10
33-P*	Kind	W	Deutschland	-	-
34-P		M	Deutschland	5	<5
35-P		M	Deutschland	41	<5
38	Vater	M	Deutschland	-	-
37	Mutter	W	Deutschland	-	-
36-P*	Kind 1	W	Deutschland	13m	-
131-P	Kind 2	W	Deutschland	-	-
40-P	Vater	M	Jugoslawien	?	?
39-P*	Kind	M	Jugoslawien	5	>10
41-P		W	Deutschland	+	?
42-P		M	Deutschland	17	>10
43-P		W	Deutschland	19	>10
101	Vater	M	Deutschland	-	-
44	Mutter	W	Deutschland	12	-
45-P	Kind 1	W	Deutschland	?	-
46-P*	Kind 2	W	Deutschland	2	-
48-P		M	Deutschland	16	>10
49-P		W	Deutschland	18	5-10
50-P		W	Deutschland	11	>10
51-P		W	Deutschland	14	>10
52	Mutter	W	Israel	-	-
53-P	Kind	M	Israel	6	-
54	Vater	M	Frankreich	-	-
55	Mutter	W	Frankreich	-	-
56-P	Kind	M	Frankreich	9m	<5
57	Mutter	W	Türkei	-	-
58-P	Kind	M	Türkei	2,5	<5
59	Mutter	W	Deutschland	-	-

60-P	Kind	M	Deutschland	12	-
61	Vater	M	Deutschland	-	
62	Mutter	W	Deutschland	-	
63-P	Kind 1	M	Deutschland	-	-
64-P*	Kind 2	M	Deutschland	13m	5-10
100	Kind 3	F	Deutschland	-	
65-P	Mutter	W	Deutschland	21	>10
66	Kind 1	W	Deutschland	-	
67	Kind 2	W	Deutschland	-	
68	Mutter	W	Türkei	-	
69	Kind 1	M	Türkei	-	
70-P	Kind 2	W	Türkei	6	<5
71	Kind 3	M	Türkei	-	
72	Kind 4	M	Türkei	-	
73	Vater	M	Türkei	-	
74	Mutter	W	Türkei	-	
75	Kind 1	W	Türkei	-	
76	Kind 2	W	Türkei	-	
77-P	Kind 3	M	Türkei	9m	-
78	Vater	M	Deutschland	-	
79	Mutter	W	Deutschland	-	
80-P	Kind 1	W	Deutschland	7	-
81	Kind 2	M	Deutschland	-	
82-H	Vater	M	Deutschland	-	
83	Mutter	W	Deutschland	-	
84-H	Kind 1	M	Deutschland	-	-
85-H	Kind 2	M	Deutschland	-	-
86	Vater	M	Deutschland	-	
87-P	Kind	M	Deutschland	14	<5
88-P		M	Deutschland	23	>10
89-P	Mutter	W	Deutschland	16	<5
90	Kind 1	M	Deutschland	-	-
91	Vater	M	Deutschland	-	
92-H	Mutter	W	Deutschland	-	
93-H	Kind 1	M	Deutschland	-	-
103-H	Kind 2	M	Deutschland	-	
94-H	Kind 3	W	Deutschland	-	-
95-P		W	Deutschland	15	>10
96	Vater	M	Deutschland	-	
97	Mutter	W	Deutschland	-	
98-P	Kind 1	W	Deutschland	3,5	-
99	Kind 2	W	Deutschland	-	
102-P		W	Deutschland	24	>10
104	Vater	M	Deutschland	-	-
149	Mutter	W	Deutschland	-	-
105-P	Kind 1	M	Deutschland	1,5	5-10
150	Kind 2	M	Deutschland	-	-
151	Kind 3	W	Deutschland	-	-
106-P		M	Deutschland	9m	-
107-P*	Kind 1	W	Deutschland	10	-
108-P	Kind 2	W	Deutschland	5	-
109-P		W	Deutschland	1	5-10
122	Vater	M	Italien	-	
111	Mutter	W	Italien	-	-
112-P	Kind 1	W	Italien	2	>10
110-P*	Kind 2	W	Italien	1	>10
113-P		M	Deutschland	18	>10
114	Vater	M	Türkei	-	
115	Mutter	W	Türkei	-	

116-P	Kind	M	Türkei	14m	5-10
117-P	Großmutter	W	Jugoslawien	+	?
118	Vater	M	Jugoslawien	-	
119	Mutter	W	Jugoslawien	-	
120-P	Kind 1	W	Jugoslawien	-	-
121-P*	Kind 2	M	Jugoslawien	9m	<5
123-P		W	Jugoslawien	-	-
124-P*	Vater	M	Türkei	5	>10
125	Mutter	W	Türkei	22	-
126-P	Kind 1	M	Türkei	3	-
127	Kind 2	M	Türkei	-	-
128-P		M	Türkei	17	>10
129-H		M	Dom.Rep/ Deutschland	-	-
130-P		M	Deutschland	40	<5
132	Vater	M	Jugoslawien	-	
133-P	Mutter	W	Jugoslawien	+	?
134	Kind 1	W	Jugoslawien	-	
135	Kind 2	M	Jugoslawien	-	
136-P		M	Deutschland	?	?
137-P		W	Türkei	16	>10
138	Vater	M	Deutschland	-	-
139-H	Mutter	W	Deutschland	-	-
140-H	Kind	W	Deutschland	-	-
141-P		W	Deutschland	+	?
142-P		W	Italien	+	?
143-P		M	Jugoslawien	2	5-10
144	Vater	M	Jugoslawien	-	-
145	Mutter	W	Jugoslawien	-	-
146-P	Kind	W	Jugoslawien	2	5-10
147-P		W	Deutschland	15	>10
148-P		W	Deutschland	56	<5
152-P		W	Deutschland	+	?
153	Vater	M	Jugoslawien	-	
154	Mutter	W	Jugoslawien	-	
155-P	Kind	M	Jugoslawien	2	?
156	Vater	M	Deutschland	-	-
157	Mutter	W	Deutschland	-	-
158-P	Kind	W	Deutschland	-	-
159	Vater	M	Türkei	-	-
160	Mutter	W	Türkei	-	-
161-P	Kind	M	Türkei	+	?
162-P		M	Deutschland	+	?
163-P		M	Deutschland	+	?
164-P		W	Deutschland	+	?
47-P	<i>Tante</i>	<i>W</i>	<i>Deutschland</i>	-	
11	<i>Kind 1</i>	<i>W</i>	<i>Deutschland</i>	-	
12	<i>Kind 2</i>	<i>M</i>	<i>Deutschland</i>	-	

Tabelle 3: Übersicht zu den Patienten sowie deren Angehörigen. P: Patient, W: weiblich, M: männlich, H: heterozygot (heterozygot nicht-Typ I, siehe auch Tabelle 4, Anhang), +: Steinbildung liegt vor, m: Monat. Für jede Familie wurde nur ein Patient untersucht (gekennzeichnet mit *) somit liegt die Patientenzahl bei 80. Bei der Probandin Cys 47 handelt es sich um die Patientin mit isolierter Cystinurie.

Cys	Typ	Geschlecht	Mutationen in SLC3A1	Mutationen in SLC7A9
2-P	4/	W	T216M/-	
3-P	I/I	M		
4-P	I/I	W		
5-P	-	M	-	$\Delta E244/G105R/(I260M)$
7-P	I/I	M	T216M/T216M	-
8-P	I/I	M	T216M/T216M	-
9-P	I/I	W	T216M/T216M	-
10-P	-	M	M467T/Duplikation	
13-P	I/I	W	T216M/T216M	-
14-P	-	M		R333W/-
15-P	-	M		Deletion Exon 1-13/-
16-P	-	W	M467T/Duplikation	
17-P	-	M	R365L/R356L	-
18-P	-	M	M467K/R365W	-
19-P	-	M	M467T/-	
20-P	-	W	M467K/-	
21-P	-	W		
22-P	-	M	M467T/-	G105R/-
23-M	-	W		
23-P	-	W		
24-P	-	M		c.747delG/-
25-P	-	M	M467T/-	
26-P	-	M	-	A182T/G105R
28-P	-	M		
31-V	-	M	Duplikation/-	
30-P*	-	M	Duplikation/-	
29-P	-	W	Duplikation/-	
32-MP	-	W		
33-P*	-	W	M467T/-	
34-P	-	M	M467T/M467T	-
35-P	-	M		R333W/-
38-V	-	M		
37-M	-	W		F140S/-
36-P*	-	W		F140S/-
131-P	-	W		F140S/-
40-VP	-	M	T216M/T216M	-
39-P*	-	M	T216M/T216M	-
41-P	-	W	Duplikation/Duplikation	
42-P	-	M	T216M/Duplikation	
43-P	-	W		
101-V	-	M		
44-M	-	W		G105R/-
45-P	-	W		G105R/-
46-P*	-	W		G105R/-
48-P	-	M	M467T/-	
49-P	-	W	R270X/M467T	-
50-P	-	W		G105R/-
51-P	-	W	-	Deletion Exon 1-13/c.969_971del
52-M	-	W	R270X/-	-
53-P	-	M	R270X/R270X	-
54-V	I/-	M	R356W/-	-
55-M	I/-	W	M467T/-	-
56-P	I/I	M	R365W/M467T	-
57-M	III/-	W		
58-P	III/+	M		
59-M	I/-	W	Duplikation/-	
60-P	I/I	M	Duplikation/Duplikation	

61-V	III/-	M		
62-M	III/-	W		
63-P	III/III	M		
64-P*	III/III	M		
100-K	-	?		
65-P	+/+	W	P508A/-	
66-K	?	W		
67-K	?	W		
68-M	III/-	W	-	A331V/-
69-K	III/-	M		A331V/-
70-P	III/III	W		A331V/A331V
71-K	-/-	M		
72-K	-/-	M		
73-V	I/-	M	T216M/-	
74-M	I/-	W	T216M/-	
75-K	?	W	?	
76-K	?	W	?	
77-P	I/I	M	T216M/T216M	-
78-V	I/-	M	S547W/-	-
79-M	I/-	W	M467T/-	-
80-P	I/I	W	M467T/S547W	-
81-K	?	M	?	-
82-VH	III/-	M		
83-M	?	W		
84-K1H	III/-	M		
85-K2H	III/-	M		
86-V	I/-	M	Duplikation/-	
87-P	I/+	M	Duplikation/Duplikation	
88-P	-	M	M467T/-	
89-P	-	W		
90-K	-	M		
91-V	?	M		
92-MH	III/-	W		A224V/-
93-K1H	III/-	M		A224V/-
103-K2H	III/-	M		A224V/-
94-K3H	III/-	W		A224V/-
95-P	-	W	M467T/R365W	-
96-V	III/-	M		
97-M	III/-	W		
98-P	III/III	W		
99-K	?	W		
102-P	-	W	R362C/R365W	-
104-V	I/-	M		
149-M	I/-	W		
105-P	I/I	M		
150-K	?	M		
151-K	?	W		
106-P	+/+	M	-	G105R/G105R
107-P*	+/+	W		Deletion Exon 1-4/-
108-P	+/+	W		Deletion Exon 1-4/-
109-P	+/+	W	c1766_1768del/R365W	-
122-V	III/-	M		G105R/-
111-M	I/-?	W		
112-P	III/+	W		G105R/-
110-P*	III/+	W		G105R/-
113-P	-	M	M467T/R365Q	
114-V	-	V		
115-M	-	M		
116-P	-	M		

117-GMP	-	W	T216M/T216M	-
118-V	-	M	T216M/-	
119-M	-	W	T216M/-	
120-P	-	W	T216M/T216M	-
121-P*	-	M	T216M/T216M	-
123-P	-	W	T216M/T216M	-
124-VP*	-	M	T216M/T216M	-
125-M	-	W	T216M/-	
126-P	-	M	T216M/T216M	-
127-P?	-	M		
128-P	-	M		
129-H	III/-	M		Δ E244/-
130-P	-	M		G105R/A182T
132-V	-	M	?	
133-MP	+/+	W	R365L/R365L	
134-K	?	W	?	
135-K	?	?	?	
136-P	+/+	M		
137-P	-	W	T216M/T216M	-
138-V	?	M		
139-MH	III/-	W		IVS4-1G/A/-
140-KH	III/-	W		IVS4-1G/A/-
141-P	-	W	Duplikation/-	
142-P	-	W		c553delCG/-
143-P	-	M		G105R/-
144-V	-	M	T216M/-	
145-M	-	W	T216M/-	
146-P	-	W	T216M/T216M	
147-P	-	W	R365Q/-	
148-P	-	W	Duplikation/Duplikation	
152-P	-	W		
153-V	-	M	?	
154-M	-	W	?	
155-P	-	M	T216M/T216M	
156-V	-	M		
157-M	-	W		
158-P	-	W		
159-V	I/-	M		
160-M	I/-	W		
161-P	I/I	M		
162-P	-	M	M467T/-	
163-P	-	M	T216M/-	
164-P	-	W	T216M/-	
47-P		W		T123M/I260M
11	III/-	W		T123M/-
12	III/-	W		T123M/-

Tabelle 4: Übersicht zur Klassifizierung der Patienten sowie den detektierten Mutationen. Der Verwandtschaftsgrad und die Nationalität der Patienten können der Tabelle 3 entnommen werden. P: Patient, W: weiblich, M: männlich, V: Vater, M: Mutter, GM: Großmutter, K: Kind, H: heterozygot nicht-Typ I, +/+ : klassische Cystinurie, biochemisch bestimmt aber keine Klassifizierung möglich. Bei den durchgeführten Analysen wurden zunächst nur die Patienten untersucht, wobei wurde nur ein Patient pro Familie (gekennzeichnet mit #) berücksichtigt wurde. Bei der Probandin Cys 47 handelt es sich um die Patientin mit isolierter Cystinurie.

Exon	Exongrösse [bp]	Produktgrösse [bp]	Primer	Primersequenz 5'-3'
P1	-	197	P1F P1R	tggctcgatgtcagctcactgcaa tcttggctcacacctgtaatcccagcagtttg
P2	-	199	P2F P2R	tggtcttaaactcttgacctcggg aatcgtttgaccccgaaga
P3	-	215	P3F P3R	gatggattctcgctcttgctg caagggcaggagtttgagactag
P4	-	180	P4F P4R	ggctaattttataccttttagtagagacgg ggaagaaagggtaaaagtacagaggttt
P5	-	211	P5F P5R	tacaggcatgaaccaccgc tcagccatgtctcaccgactt
P6	-	183	P6F P6R	ttactgcaggaaggcactccgaa tgctgtgcttcaggtgtctg
1	430	500	1F 1R	gaaggcactccgaagacataa atctggcaccaccctaaatg
1A	-	295	1F 1.1R	s.o atctcccgaggatgcggtta
1B	-	225	1.1F 1R	taccgcatacctcgggagat s.o
2	180	248	2F 2R	gggttattcatgactttgact tcatccccatcttggccact
3	155	240	3F 3R	ccctagcattgaaatgtctt tactacatatctgccttttacc
4	126	178	4EF 4ER	atgtgctgtttcttggttt gaagtctgtggtgatcta
4mis	-	152	4Fmis [#] 4ER	ccagttggcactttgacgaagtt s.o.
5	120	247	5F 5R	cgtagttaatgtaaccaagca taactggtatctcaggctgag
6	125	235	6F 6R	acattcatatagagcgagctg agcctgggaagaaargagagc
7	196	334	7F 7R	cctacatctgtacatgcaag aggcaacagcaggacattatg
8	168	246	8F 8R	ctgtgtatacagctgtgttc atagctgtgatgaatagtc
9	117	190	9F 9R	ctgtttcccttctggtc tcttgtttctagaatcaacata
10	441	574	10F 10R	ggagcaagtgtttgggtaaat gccagtgcttcatctcttc
10A	-	343	10F 10.1R	s.o. tctcattttagcgggaaggcc
10B	-	252	10.1F 10R	ggccttcccgctaaaatgaga s.o.

Tabelle 5: Primersequenzen für das SLC3A1-Gen. P: Promoter. [#]Mutageneseprimer. Die Exons 1 und 10 wurden zur SSCP-Analyse in kleinere Fragmente (1A, 1B, 10A, 10B) unterteilt.

Exon	Exon-grösse [bp]	Produkt-grösse [bp]	Primer	Primersequenz 5'-3'
1	66	127	5UTR-F 5UTR-R	atttctaggggttgaccgtg ggccaggagagccatgag
2	198	400	PF PR	atgactgactttgactctggg tcttctgccgtgtcaatagg
2.1	-	228	PF 2R	s.o. tttctcagggccagtatccccatggt
2.2	-	228	2F PR	ccttgacgtctcctggaaccagca s.o.
3	148	224	CF 3Rmis*	cgccctctccttctcc cgtgccctgcatgctccggggt
4	243	396	DF DR	agcctccgggtgggaggaag gagtcccagacaccctctg
4.1	-	242	DF 4R	s.o. aagctgaggcagatgatggcgaa
4.2	-	199	4F DR	gccagcctgatcgtcattaa s.o.
5	126	245	5F 5R	aaaggagactctccaggg agtggaagggcgtttggtgtgtg
6	100	232	6F ER	tcccgtaggatacactcaagat tggagttaaagtcacctggag
7	45	141	GF GR	agtcaaggtgtgtgacgcttg aggagaagagaaatcaggctg
8	124	196	BF2 BR1	ctgcctttggccattatcctc acctccagtgtgacacctg
9	104	216	AF AR	gacctcaggactcatctcg tagctgtgtgtcttctcggg
10	97	210	HF 10R	ggagcacaagtctcagtg gcctgaagataggctgtag
11	150	252	LF LR	ttcggcttctgtgacatgag agccactcgtgactctggg
12	177	370	QF1 QR	atgattgaaattggaggagg tggagttaggacagggtgagg
12.1	-	237	Q1F 12R	s.o. ggccgcttaataaacagcacacag
12.2	-	191	12F QR	atcatcagcaagcccacctgggagta s.o.
13	65	178	TF 6R	cctcaccacaacaactcc aaattcagctgactggctac

Tabelle 6: Primersequenzen für das SLC7A9-Gen. *Mutageneseprimer. Die Exons 2, 4 und 12 wurden zur SSCP-Analyse in kleinere Fragmente (2.1, 2.2, 4.1, 4.2, 12.1, 12.2) unterteilt.

Exon	Exongröße [bp]	Produktgröße [bp]	Primer	Primersequenz 5'-3'
1	151	909	1F 1R	cagtagaacgggatcgaaa aagatctcacaggaggacca
1.1	-	509	1F 1.1R	s.o. ctggcactcgcggttaca
2	205	302	2F 2R	aaccgtcctgtcttactgt tcctcctttcccctagacc
3	152	279	3F 3R	aagagatgcatgacttgccc aaaagaggctgtcttgctac
4	126	180	4F 4R	atcatgcagccagatacagc tacatgcaagggaggaaag
5	154	305	5F 5R	agttggtgtcattgccacag cctcaagggagaggggaata
6	124	252	6F 6R	aaagacagaagacaccccct gtctgcattcctggtatgag
7	104	239	7F 7R	ttcccagagtgaagtggga agcaaagtgcacagcagagt
8	97	128	8F 8R	taggcaaggatgaaggagct gagggtgtggagagttaca
9	150	273	9F 9R	ggacagcccctaactctgtaa ctagaaccatagaggaaggg
9	-	253	9F 9Rmis*	s.o. aggggaccccaaagggaa
10	178	285	10F 10R	acgtggcctacacagttcat tcactgaccactgcattcca
11	164	871	11F 11R	tggtaggatactcagcattg tatgttccttggcgtcctga
11.1	-	243	11F 11.1R	s.o. atgtgtggcaggaccaag

Tabelle 7: Primersequenzen für das SLC7A8-Gen. *Mutageneseprimer zum Nachweis der Variante c.56540C>T mittels *Tsp509I*-Verdau.

Exon	Exongröße [bp]	Produktgröße [bp]	Primer	Primersequenz 5'-3'
1	151	258	1F 1R	tgtggcgctgtcccg ggcatagcgctctctgaggc
2	215	314	2F 2R	acagaaggccgggctgcgaa ccattccaagaggggtgtcc
3	152	241	3F 3R	aagggtctgggagcag cagtgggccaaggg
4	126	258	4F 4R	actggccatgtccactgtg ctggaggcccagaagt
5	154	271	5F 5R	gtagggccgagtcggggtaa accagagggcctgggtgctt
6	124	247	6F 6R	tgcaccctcaggagctgacg cacagtagagaggccatgtgta
7	104	219	7F 7R	tgccccggccttacacatgg cccacggcatgactggtgca
8	97	205	8F 8R	agaccaggatgtggccagt aaggtcctgcattgccgggta
9	150	277	9F 9R	ggccagggtcatcctgca gcaggggtggctctggcag
10	178	294	10F 10R	tacagacagctggaggcct aggaggtctggtctccagg
11	131	246	11F 11R	aggtgtccggagctggg caaacacctctcaataacaacat

Tabelle 8: Primersequenzen für das SLC7A10-Gen (nach: Leclerc et al. 2001).

Exon	Primer	Exon-grösse [bp]	Produkt-grösse [bp]	PCR-Programm	Zy-klen-zahl
P1	P1F/P1R	-	197	94°C 30'', 70°C 1', 72°C 1,5'	35
P2	P2F/P2R	-	199	94°C 30'', 62°C 1', 72°C 1,5'	35
P3	P3F/P3R*	-	215	94°C 30'', 64°C 1', 72°C 1,5'	35
P4	P4F/P4R	-	180	94°C 30'', 63°C 1', 72°C 1,5'	35
P5	P5F/P5R	-	211	94°C 30'', 60°C 1', 72°C 1,5'	35
P6	P6F/P6R	-	183	94°C 30'', 62°C 1', 72°C 1,5'	35
1	1F/1R	430	500	94°C 30'', 60°C 1', 72°C 1,5'	35
1A	1F/1.1R	-	295	94°C 30'', 55°C 1', 72°C 1'	30
1B	1.1/1R	-	225	94°C 30'', 58°C 1', 72°C 1,5'	35
2	2F/2R	180	248	94°C 30'', 55°C 1', 72°C 2'	30
3	3F/3R	155	240	94°C 30'', 56°C 1', 72°C 2'	35
4	4EF/4ER	126	178	94°C 30'', 57°C 1', 72°C 1,5'	35
4mis	4Fmis [#] /4ER	-	152	94°C 30'', 61°C 1', 72°C 1,5'	35
5	5F/5R	120	247	94°C 30'', 53°C 1', 72°C 1'	30
6	6F/6R	125	235	94°C 30'', 57°C 1', 72°C 2'	30
7	7F/7R	196	334	94°C 30'', 56°C 1', 72°C 1'	30
8	8F/8R	168	246	94°C 30'', 55,5°C 1', 72°C 2'	35
9	9F/9R	117	190	94°C 30'', 56,5°C 1', 72°C 2'	40
10	10F/10R	441	574	94°C 30'', 56°C 1', 72°C 2'	35
10A	10F/10.1R	-	343	94°C 30'', 56,5°C 1', 72°C 2'	35
10B	10.1F/10R	-	252	94°C 30'', 55°C 1', 72°C 2'	30

Tabelle 9: PCR-Bedingungen für das SLC3A1-Gen. *zum PCR-Mix wird 0,5x PCR_x Enhancer Solution (Invitrogen, Karlsruhe, D) zugesetzt. [#]Mutageneseprimer.

Exon	Primer	Exon- grösse [bp]	Produkt- grösse [bp]	PCR-Programm	Zy- klen- zahl
1	5'UTF/5'UTR	66	127	94°C 1', 63°C 1,5', 72°C 2'	35
2	PF/PR	198	400	94°C 25'', 57°C 30'', 72°C 1'	35
2.1	PF/2R	-	228	94°C 30'', 64,5°C 1', 72°C 1,5'	35
2.2	2F/PR	-	228	94°C 30'', 66°C 1', 72°C 1,5'	35
3	CF/3Rmis*	148	224	94°C 1,5', 68,5°C 2', 72°C 2'	40
4	DF/DR	243	396	94°C 25'', 68°C 45'', 72°C 1'	35
4.1	DF/4R	-	242	94°C 30'', 66°C 1', 72°C 1,5'	35
4.2	4F/DR	-	199	94°C 45'', 65°C 1,5', 72°C 2'	35
5	5F/5R	126	245	94°C 30'', 66,5°C 1', 72°C 1,5'	35
6	6F/ER	100	232	94°C 30'', 63°C 1', 72°C 1,5'	35
7	GF/GR	45	141	94°C 30'', 56,5°C 30'', 72°C 1,5'	35
8	BF/BR	124	196	94°C 30'', 60°C 45'', 72°C 1,5'	35
9	AF/AR	104	216	94°C 30'', 56,5°C 30', 72°C 1,5'	35
10	HF/HR	97	210	94°C 30'', 59,5°C 30'', 72°C 1,5'	35
11	LF/LR	150	252	94°C 30'', 62°C 1', 72°C 2'	40
12	QF1/QR	177	370	94°C 30'', 60,5°C 30'', 72°C 1,5'	35
12.1	QF1/12R	-	237	94°C 30'', 63°C 1', 72°C 1,5'	35
12.2	12F/QR [#]	-	191	94°C 30'', 65°C 1', 72°C 2'	40
13	TF/6R	65	178	94°C 30'', 57°C 1', 72°C 1,5'	35

Tabelle 10: PCR-Bedingungen für das SLC7A9-Gen. *Mismatchprimer, #Zugabe von 5 % DMSO zum PCR-Mix.

Gen	Exon/Intron	Mutation	Enzym	Wildtyp [bp]	Mutation [bp]
SLC3A1	3	T216M	<i>NlaIII</i>	143-12-85	70-73-12-85
	4*	R270X, R270L	<i>TaqI</i>	23-129	152
	6	R362C, R362H	<i>AcI</i>	148-87	235
	6	R365W, R365L, R365Q	<i>MspI</i>	154-32-49	186-49
	8	M467T, M467K	<i>NlaIII</i>	110-136	246
	8	M467K	<i>AluI</i>	12-187-43-4	12-98-89-43-4
	8	E483X	<i>MboII</i>	157-89	246
	8	c.1500+1G>T	<i>MseI</i>	21-225	21-189-36
SLC7A9	8	I260M	<i>MboI</i>	23-173	196

Tabelle 11: Übersicht über die zum Mutationsnachweis verwendeten Restriktionsenzyme für die Gene SLC3A1 und SLC7A9. * Mutageneseprimer erforderlich. Die Restriktionsverdauung wurden vorwiegend im erstellten diagnostischen Schema angewandt.

Exon	Primer	Exon-grösse [bp]	Produkt-grösse [bp]	PCR-Programm	Zy-klen-zahl
1	1F/1R	151	909	94°C 30“, 59°C 1’, 72°C 1,5’	35
1.1	1F/1.1R	-	509	94°C 30“, 57°C 1’, 72°C 1,5’	40
2	2F/2R	205	302	94°C 30“, 57°C 1’, 72°C 1,5’	35
3	3F/3R	152	279	94°C 30“, 64°C 1’, 72°C 1,5’	35
4	4F/4R	126	180	94°C 30“, 57°C 1’, 72°C 1,5’	35
5	5F/5R	154	305	94°C 30“, 57°C 1’, 72°C 1,5’	35
6	6F/6R	124	252	94°C 30“, 59°C 1’, 72°C 1,5’	35
7	7F/7R	104	239	94°C 30“, 57°C 1’, 72°C 1,5’	35
8	8F/8R	97	128	94°C 30“, 57°C 1’, 72°C 1,5’	35
9	9F/9R	150	273	94°C 30“, 57°C 1’, 72°C 1,5’	35
9	9F/9Rmis*	-	253	94°C 30“, 53,5°C 1’, 72°C 1,5’	35
10	10F/10R	178	285	94°C 30“, 60°C 1’, 72°C 1,5’	35
11	11F/11R	164	871	94°C 30“, 57°C 1’, 72°C 1,5’	35
11.1	11F/11.1R	-	243	94°C 30“, 59°C 1’, 72°C 1,5’	35

Tabelle 12: PCR-Bedingungen für das SLC7A8-Gen.*Amplifikation mit einer *Taq*-Polymerase von Qiagen mit Zusatz von 5 % Q-Solution.

Exon	Primer	Exon-grösse [bp]	Produkt-grösse [bp]	PCR-Programm	Zy-klen-zahl
1	1F/1R [#]	151	258	94°C 30“, 63°C 1’, 72°C 1,5’	35
2	2F/2R [*]	215	314	94°C 1’, 62°C 1’, 72°C 2’	35
3	3F/3R [*]	152	241	94°C 30“, 62°C 1’, 72°C 1,5’	35
4	4F/4R [*]	126	258	94°C 30“, 63°C 1’, 72°C 1,5’	35
5	5F/5R [#]	154	271	94°C 1’, 62°C 1’, 72°C 2’	35
6	6F/6R [*]	124	247	94°C 1’, 62°C 1’, 72°C 2’	35
7	7F/7R [*]	104	219	94°C 1’, 62°C 1’, 72°C 2’	35
8	8F/8R [*]	97	205	94°C 1’, 62°C 1’, 72°C 2’	35
9	9F/9R [°]	150	277	94°C 1’, 62°C 1’, 72°C 2’	35
10	10F/10R [°]	178	294	94°C 1’, 62°C 1’, 72°C 2’	35
11	11F/11R	131	246	94°C 30“, 58,5°C 1’, 72°C 1,5’	35

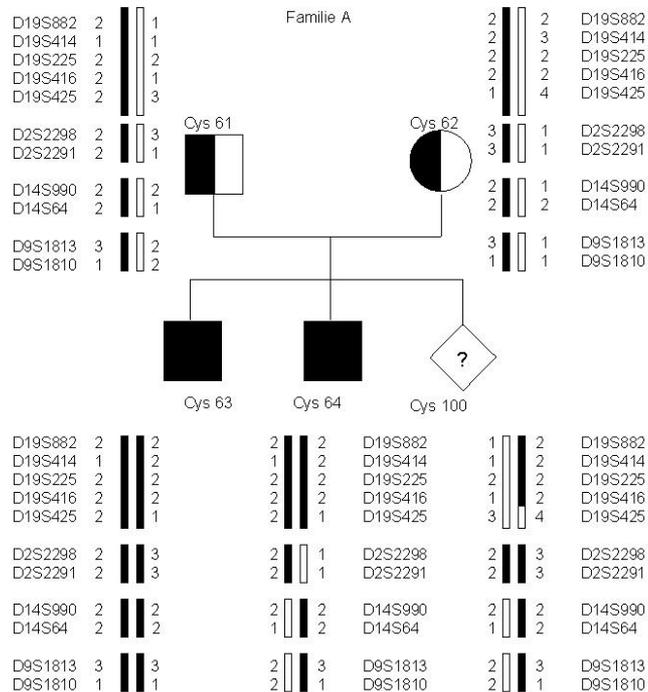
Tabelle 13: PCR-Bedingungen für das SLC7A10-Gen. *zum PCR-Mix wird 1x PCR_x Enhancer Solution (Invitrogen, Karlsruhe, D) zugesetzt. #zum PCR-Mix wird 2x PCR_x Enhancer Solution (Invitrogen, Karlsruhe, D) zugesetzt. °zum PCR-Mix wird 4x PCR_x Enhancer Solution (Invitrogen, Karlsruhe, D) zugesetzt.

Exon/Intron	Nucleotid- austausch	Frequenz unter allen Patienten [%] (n=59)	Frequenz unter deutschen Patienten[%] (n=32)	Frequenz unter deutschen Kontrollen [%] (n=58)
Exon 2#	c.147C/C	79,7	71,9	91,4
	c.147C/T	18,6	25,0	8,6
	c.147T/T	1,7	3,1	0
Exon 3#	c.386C/C	93,2	90,6	100
	c.386C/T	3,4	6,3	0
	c.386T/T	3,4	3,1	0
Intron 3#	IVS3+22T/T	54,2	65,6	34,5
	IVS3+22T/G	37,3	34,4	51,7
	IVS3+22G/G	8,5	0	13,8
Exon 4#	c.584C/C	79,7	84,4	93,1
	c.584C/T	15,3	15,6	3,4
	c.584T/T	5,1	0	3,4
Exon 4	c.596T/T	76,3	81,3	58,6
	c.596T/C	22,0	18,8	37,9
	c.596C/C	1,7	0	3,4
Exon 4#	c.610T/T	52,5	62,5	34,5
	c.610T/C	40,7	37,5	50,0
	c.610C/C	6,8	0	15,5
Intron 4	IVS4+10T/T	72,9	78,1	58,6
	IVS4+10T/C	24,4	21,9	37,9
	IVS4+10C/C	1,7	0	3,4
Exon 5#	c.692C/C	54,2	62,5	34,5
	c.692C/T	39,0	37,5	50,0
	c.692T/T	6,8	0	15,5
Intron 5*	c.789+10G/G	82,1	n.a.	54,9
	c.789+10G/A	17,9		45,1
	c.789+10A/A	0		0
Intron 5*	c.789+24T/T	49,1	n.a.	24,0
	c.789+24T/C	45,3		56,0
	c.879+24C/C	5,7		20,0
Exon 6#	c.852C/C	54,2	62,5	34,5
	c.852C/A	39,0	37,5	50,0
	c.852A/A	6,8	0	15,5
Exon 6#	c.872C/C	54,2	62,5	34,5
	c.872C/T	39,0	37,5	50,0
	c.872T/T	6,8	0	15,5
Exon 9	c.1157G/G	93,2	90,6	98,3
	c.1157G/A	6,8	9,4	1,7
	c.1157A/A	0	0	0
Intron 9	IVS9+51A/A	72,9	78,1	60,3
	IVS9+51A/G	23,7	21,9	36,2
	IVS9+51G/G	3,4	0	3,4
Exon 11	c.1182C/C	78,0	78,1	58,6
	c.1182C/T	20,3	21,9	39,7
	c.1182T/T	1,7	0	1,7

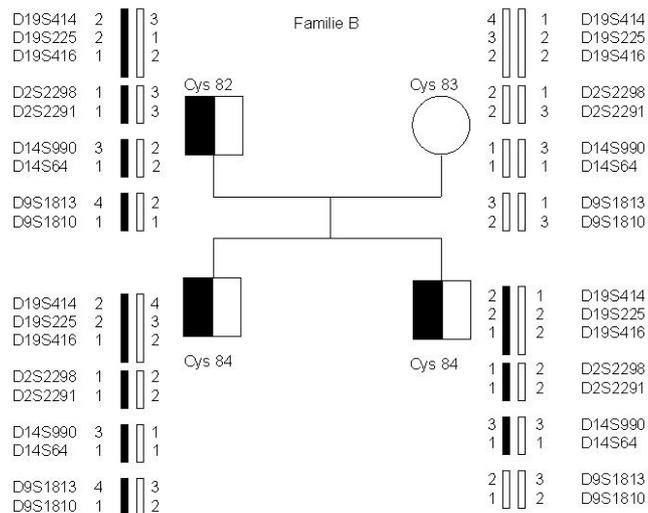
Tabelle 14: Übersicht über die Frequenzen der detektierten Genotypen im SLC7A9-Gen unter allen Patienten, deutschen Patienten sowie deutschen Kontrollen (Schmidt et al. 2003a).

Polymorphismen mit statistisch signifikant unterschiedlicher Verteilung unter Patienten und Kontrollen. *die Polymorphismen in Intron 5 wurden unter 56 und 53 Patienten sowie unter 51 und 50 Kontrollen analysiert, es erfolgte keine ausführliche statistische Analyse. n.a.: nicht analysiert.

2. Abbildungen

**Abbildung 1:** Stammbaum der Familie A.

Schwarz ausgefüllte Symbole: Patienten mit Steinbildung bzw. biochemisch als homozygot für Typ I oder nicht-Typ I Klassifizierte. Halb ausgefüllte Symbole: biochemisch als heterozygot für nicht-Typ I Klassifizierte. Symbole mit Punkt: Probanden, die als heterozygot für Typ I klassifiziert sind. Symbole mit Fragezeichen: Probanden, die biochemisch unauffällig sind (heterozygot für Typ I oder normal). Leere Symbole: Unauffällig (In diesem Stammbaum ist ebenfalls die Legende für die folgenden Stammbäume (Abbildungen 2-5) erläutert).

**Abbildung 2:** Stammbaum der Familie B. Legende siehe Abbildung 1.

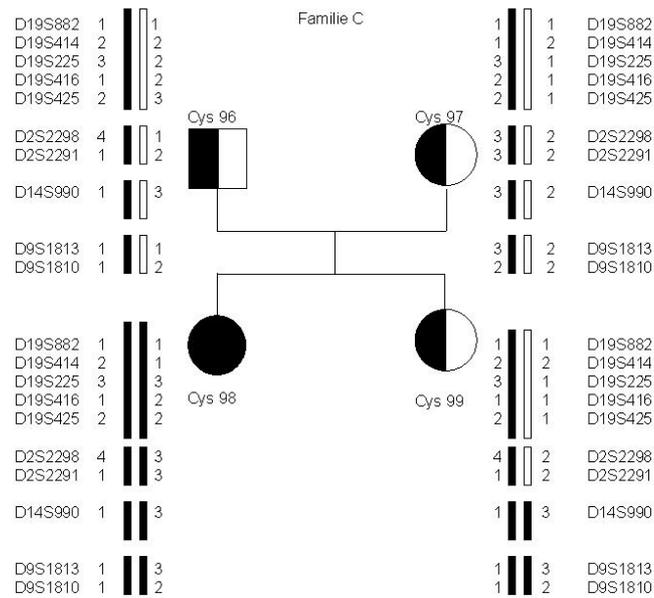


Abbildung 3: Stammbaum der Familie C. Legende siehe Abbildung 1.

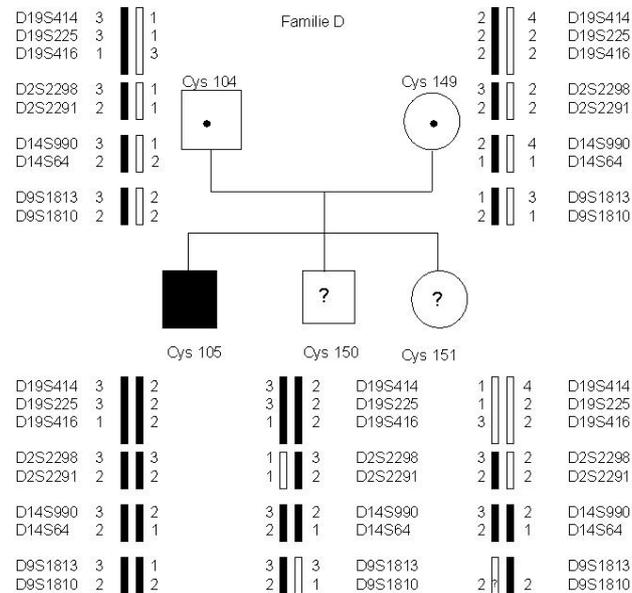


Abbildung 4: Stammbaum der Familie D. Legende siehe Abbildung 1.

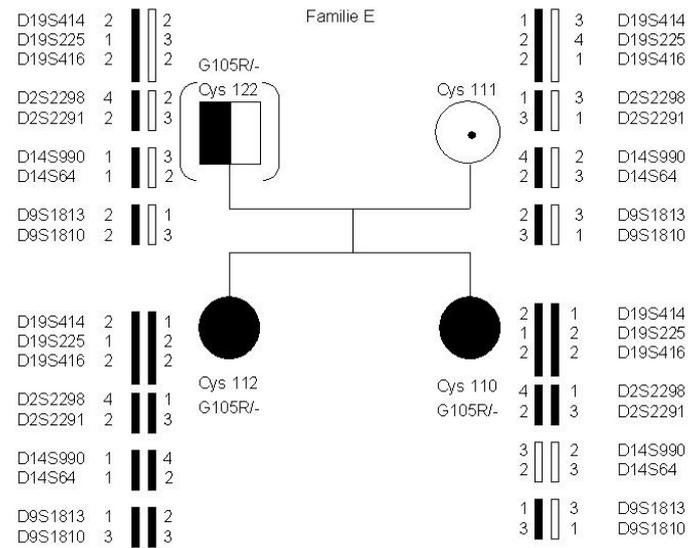


Abbildung 5: Stammbaum der Familie E. Legende siehe Abbildung 1.

Danksagung

Mein Dank gilt:

- hauptsächlich Herrn PD Dr. Thomas Eggermann für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, seine engagierte Betreuung, die stetige Diskussionsbereitschaft und die fortwährende und wertvolle Unterstützung meiner Arbeit.
- insbesondere Herrn Prof. Dr. Nikolaus Blin, Institut für Anthropologie und Humangenetik der Universität Tübingen, für die Übernahme des Koreferats.
- Herrn Prof. Dr. Klaus Zerres für seine Unterstützung und die Möglichkeit, die Arbeit am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Aachen durchzuführen.
- Herrn Prof. Dr. Albrecht Hesse, Abteilung für Experimentelle Urologie der Universität Bonn, für die stete Einsendung von Patientenmaterial.
- Herrn PD Dr. Sven Lahme, Abteilung für Urologie der Universität Tübingen, für die Erfassung der Patienten.
- Mitarbeitern der APN (Arbeitsgemeinschaft pädiatrischer Nephrologen) für die Überlassung von Untersuchungsmaterial.
- allen einsendenden Ärzten für die Zusammenarbeit und Hilfe bei der Erstellung des Patientenkollektivs.
- Herrn Prof. Dr. Jürgen Tomiuk, Institut für Anthropologie und Humangenetik der Universität Tübingen, für die statistische Auswertung einzelner Untersuchungsdaten.
- dem Institut für Biochemie des Universitätsklinikums Aachen für die Bereitstellung der COS7-Zellen.
- Mitarbeitern aller Abteilungen des Institutes für Humangenetik für das angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima.
- einzelnen Mitarbeitern der Abteilung für Molekulargenetik für ihre ständige Diskussionsbereitschaft und humorvolle Unterstützung.
- speziell meiner Familie für ihre uneingeschränkte Unterstützung, insbesondere meinem Vater, für die eindringliche Korrektur der Arbeit.
- allen Freunden, die mir während der Arbeit zur Seite standen.

CURRICULUM VITAE

Name: Christa Schmidt
Geburtsdatum: 01.05.1976
Geburtsort: Ebern
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung:

1982-1986 Grundschule Ebern
1986-1995 Friedrich-Rückert-Gymnasium Ebern
1995 Abitur am Friedrich-Rückert-Gymnasium Ebern

Hochschulstudium:

10/1995-01/2001 Studium der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen
Schwerpunkte: Humangenetik, Mikrobiologie,
Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
12/1999-01/2001 Diplomarbeit: „Einfluß genomischer Varianten in den
Genen SLC3A1 und SLC7A9 auf die Entstehung einzelner
Formen der Cystinurie“ am Institut für Humangenetik der
RWTH Aachen (Betreuer: Herr Prof. Dr. med. K. Zerres)
Abschluß: Diplombiologin
01/2001-02/2004 Promotion: „Molekulargenetische Untersuchungen zur
Cystinurie“ (vorläufiger Titel) am Institut für Humangenetik
der RWTH Aachen (Betreuer: PD Dr. rer. nat. T.
Eggermann)
Abschluß: Dr. rer. nat.

Berufstätigkeit:

03/1999-11/1999 Studentische Hilfskraft am Institut für Klinische Genetik
der Universität Tübingen
Bereiche: Durchführung der FISH-Diagnostik
01/2000-03/2001 Studentische Hilfskraft am Institut für Humangenetik der
RWTH Aachen
Durchführung von Literatur-Recherchen
seit 04/2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für
Humangenetik der RWTH Aachen zur Promotion

Berufliche Weiterbildung:

- 03/2002 Teilnahme am 15th course in medical genetics of the European School of Medical Genetics gefördert durch ein Stipendium der European School of Genetic Medicine
- 11/2001 Sprachkurs im Scientific Writing (Englisch)
- Teilnahme an Fachveranstaltungen und Kongressen

Im Selbstverlag herausgegeben von:

Christa Schmidt
Alexanderstr. 105
52062 Aachen