

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
des Zentrums für Geburtshilfe, Kinder- und Jugendmedizin
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor Prof. Dr. med. K. Ullrich

**MOLEKULARGENETISCHE GRUNDLAGEN DER
FAMILIÄREN RENALEN GLUKOSURIE**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Christoph Lassen
aus Braunschweig

Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 18.05.2009

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. R. Santer

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. M. Kemper

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. A. Gal

INHALTSVERZEICHNIS

1. Arbeitshypothese und Fragestellung	7
2. Einleitung	8
2.1. Familiäre Renale Glukosurie (FRG).....	8
2.2. Glukosetransport im menschlichen Körper	9
2.2.1. Allgemeine Grundlagen.....	9
2.2.2. Glukosetransport in der Niere.....	11
2.3. Regulation, Struktur und Funktion von SGLT2	13
2.4. Pharmakologische Bedeutung von SGLT2	16
3. Methoden	17
3.1. Prinzipielle Vorgehensweise	17
3.2. Patienten.....	17
3.2.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs.....	17
3.3. DNA-Isolierung.....	19
3.4. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	19
3.5. Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	20
3.6. Silberfärbung	21
3.7. Aufreinigung der PCR-Produkte	21
3.8. Sequenzierung.....	23
3.9. Restriktionsenzymverdau.....	24
3.10. Restriktionsenzymverdau nach ortsspezifischer Mutagenese	25
3.11. Heteroduplexbildung	26
3.12. Klonierung.....	27
3.13. Minipräparation	27
3.14. Mutationsbezeichnungen	28
4. Ergebnisse	29
4.1. Allgemeiner Teil	29
4.1.1. Patienten	29
4.1.2. Mutationen	32
4.2. Spezieller Teil	32
4.2.1. Familie 01.....	32
4.2.2. Familie 02.....	34

4.2.3. Familie 03.....	34
4.2.4. Familie 04.....	34
4.2.5. Familie 05.....	34
4.2.6. Familie 06.....	34
4.2.7. Familie 07.....	35
4.2.8. Familie 08.....	35
4.2.9. Familie 09.....	35
4.2.10. Familie 10.....	35
4.2.11. Familie 11.....	35
4.2.12. Familie 12.....	36
4.2.13. Familie 13.....	36
4.2.14. Familie 14.....	36
4.2.15. Familie 15.....	36
4.2.16. Familie 16.....	37
4.2.17. Familie 17.....	37
4.2.18. Familie 18.....	37
4.2.19. Familie 19.....	37
4.2.20. Familie 20.....	37
4.2.21. Familie 21.....	38
4.2.22. Familie 22.....	38
4.2.23. Familie 23.....	38
5. Diskussion	39
5.1. Bedeutung von SGLT2 für die Glukoserückresorption.....	39
5.2. Pathogenität der gefundenen <i>SGLT2</i> -Sequenzveränderungen	39
5.3. Genotyp-Phänotyp Korrelation.....	42
5.3.1. Homozygote oder compound-heterozygote Patienten	42
5.3.2. Heterozygote Patienten.....	42
5.3.3. Typen der familiären renalen Glukosurie.....	43
5.4. Polymorphismus p.Asn654Ser.....	44
5.5. Unklare Ergebnisse.....	44
5.6. Vererbungsmodus der familiären renalen Glukosurie	45
6. Zusammenfassung.....	47

7. Anhang	48
7.1. Material- und Geräteliste.....	48
7.2. Rezepte	49
7.2.1. DNA-Isolierung.....	49
7.2.2. PCR.....	50
7.2.3. Polyacrylamidgel	50
7.2.4. Elektrophorese	51
7.2.5. Silberfärbung.....	51
7.2.6. Agarose-Gel	51
7.2.7. DNA-Reinigung	52
7.2.8. Sequenzierung	52
7.2.9. Klonierung	53
7.2.10. Minipräparation.....	53
7.3. Restriktionsenzyme.....	55
7.4. SGLT2 cDNA	56
7.5. SGLT2 Aminosäuresequenz.....	57
7.6. Sequenz-Vergleiche (mit dem Programm ClustalW 2.0.8)	58
7.6.1. SGLT1-SGLT6	58
7.6.2. SGLT2 bei verschiedenen Spezies	60
8. Literaturverzeichnis	63
9. Abkürzungsverzeichnis	71
<i>Danksagung</i>	73
<i>Lebenslauf</i>	75
<i>Eidesstattliche Versicherung</i>	76

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Zu Beginn dieser Arbeit waren noch keine Mutationen im *SGLT2*-Gen beschrieben. Auch der Zusammenhang zur familiären renalen Glukosurie wurde nur vermutet. Ziel dieser Untersuchung war es, bei Patienten mit familiärer renaler Glukosurie Mutationen im Kandidatengen *SGLT2* nachzuweisen. Die folgenden Fragen wurden formuliert:

- 1) Zeigen sich bei Patienten mit familiärer renaler Glukosurie Mutationen im *SGLT2*-Gen?
- 2) Lässt sich eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation zwischen Art der eventuell gefundenen Mutationen und der Höhe der Glukosurie aufweisen?
- 3) Ergeben sich aus den molekulargenetischen Untersuchungen Erklärungen hinsichtlich der unterschiedlichen Beschreibungen des Erbgangs der familiären renalen Glukosurie?

2. Einleitung

2.1. Familiäre Renale Glukosurie (FRG)

Glukose wird in der Niere an der Glomerulusmembran frei aus dem Blut filtriert. Fast die gesamte Glukose wird dann aus dem Primärharn im Tubulussystem rückresorbiert. Als Glukosurie wird die vermehrte Ausscheidung von Glukose im Urin bezeichnet. Häufige Ursache ist ein Diabetes mellitus bei dem die filtrierte Glukosemenge das Transportmaximum des Tubulussystems überschreitet. Liegt eine Glukosurie ohne Erhöhung der Blutzuckerkonzentration vor, liegt die Ursache also in der eingeschränkten Rückresorption, spricht man von einer renalen Glukosurie. Ursachen hierfür sind vielfältig (Brodehl et al. 1987), hierzu gehören genetische und erworbene Formen *generalisierter* Tubulusfunktionsstörungen. Thema dieser Arbeit ist die familiär auftretende, *isolierte* Störung der Glukoserückresorption am Tubulussystem. Die Kriterien hierfür sind eine konstante Glukosurie in Tag- und Nachturin, normale Blutglukosekonzentrationen auch nach einem oralen Glukosetoleranztest, ein normaler Kohlenhydratumsatz und der Ausschluss der Ausscheidung anderer Kohlenhydrate (Marble 1971).

Es werden mehrere Typen der renalen Glukosurie unterschieden (siehe Abb.1) (Reubi 1954). Bei Typ A ist das Transportmaximum für Glukose (Tm_G) des Rückresorptionssystems erniedrigt, bei Typ B ist die Affinität des Transportsystems für den Zucker verringert, das Transportmaximum wird erst bei höherer filtrierter Glukosemenge erreicht. Eine besondere Stellung nimmt Typ 0 ein, er stellt die Extremvariante des Typs A dar, hier fehlt die Rückresorption von Glukose praktisch komplett (Oemar et al. 1987).

Im allgemeinen gilt die familiäre renale Glukosurie als benigne Störung, bei der andere Symptome wie zum Beispiel Hypoglykämien nicht auftreten. Bei massiver Glukosurie kann es jedoch zu Symptomen wie Polyurie, Polydipsie und Enuresis kommen (Oemar et al. 1987). Es kann sich eine Wachstumsretardierung und Verzögerung der Pubertätsentwicklung zeigen (Scholl-Bürgi et al. 2004). Zusätzlich wurde eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems beschrieben (Calado et al. 2006, Calado et al. 2008).

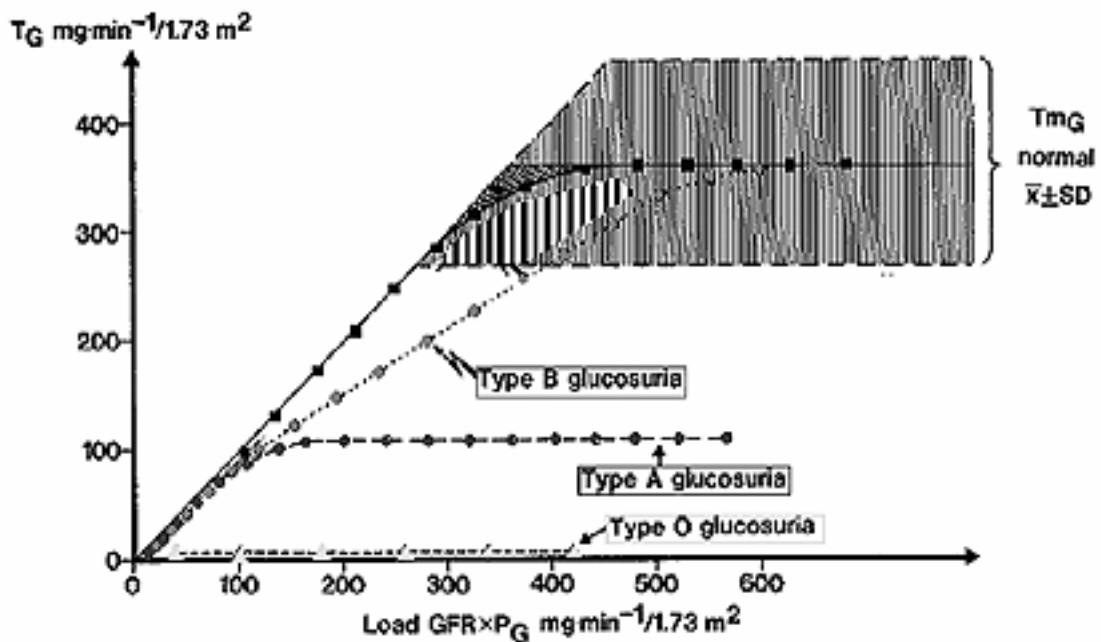


Abb. 1. Schematische Darstellung der Glukoserückresorption (T_G) in Abhängigkeit von der Menge filtrierter Glukose (erreichbar aus glomerulärer Filtrationsrate (GFR) und Plasma-Glukosekonzentration (P_G)) bei verschiedenen Formen der renalen Glukosurie. Erläuterungen siehe Text (Brodehl et al. 1987)

In den 1920er Jahren wurde erstmals ein Vererbungsmodus der familiären renalen Glukosurie beschrieben. Damals ging man von einer dominanten Störung aus (Hjärne 1927). In den späten 1960er Jahren wurde im Rahmen der Beschreibung von Titrationstudien postuliert, dass es sich eher um ein autosomal rezessives Vererbungsmuster handelt (Elsas und Rosenberg 1969).

2.2. Glukosetransport im menschlichen Körper

2.2.1. Allgemeine Grundlagen

Glukose dient als primäre Energiequelle für Gehirn, Muskulatur und andere Organe. Da die Lipiddoppelschicht der Zellmembranen impermeabel für die hydrophile Glukose ist, erfolgt der Transport über spezielle Transportproteine (Übersichten bei Brown 2000, Wright et al. 2007). Dabei unterscheidet man zwei verschiedene Familien von Transportern.

Die Mitglieder der GLUT-Familie vermitteln einen „passiven“ Transport der Glukose entlang ihres Konzentrationsgefälles. Bei den zur SGLT-Familie gehörenden Proteinen spricht man dagegen von sekundär „aktiven“

Transportern. Hier ist der Glukosetransport an den durch die Na⁺-K⁺-ATPase erzeugten elektrochemischen Gradienten von Natriumionen gekoppelt. Zusätzlich zu Glukose können oft andere Zucker transportiert werden. Die Transportkinetik ist je nach Transportertyp unterschiedlich. SGLT-Transporter finden sich in unterschiedlichen Geweben. Einen Überblick über ihre Charakteristika bietet Tabelle 1.

Tabelle 1. Mitglieder der SGLT-Familie

Transporter	Hauptsubstrate	K _m (für Glukose) ^a	Gewebeverteilung
SGLT1	Glukose, Galaktose	0,5	Dünndarm, Trachea, Niere, Herz
SGLT2	Glukose	2	Niere
SGLT3	Natrium (durch Glukose aktiviert)	> 30	Dünndarm, Muskulatur, Niere, Uterus, Hoden
SGLT4	Mannose, Glukose ^b	2,4	Dünndarm, Niere, Leber, Lunge, Gehirn
SGLT5	unbekannt	unbekannt	Niere
SGLT6	Myoinositol, Glukose	35	Dünndarm, Gehirn, Niere, Leber, Herz, Lunge

Modifiziert nach Wright und Turk 2004

^a (You et al. 1995, Diez-Sampedro et al. 2001a, Tazawa et al. 2005, Aouameur et al. 2007)

^b (Tazawa et al. 2005)

Die einzelnen Vertreter der SGLT-Transporterfamilie weisen untereinander eine hohe Homologie auf. Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz im Vergleich zu SGLT1 ist für SGLT2 59%, für SGLT3 70%, für SGLT4 56%, für SGLT5 57% und für SGLT6 50% (siehe Anhang S. 58; Wright und Turk 2004).

Angeborene Defekte in Genen von Zuckertransportern können zu verschiedenen Krankheiten führen. Genetische Defekte sowohl in der Familie der GLUT- als auch der SGLT-Proteine sind bekannt. So führen Mutationen des *GLUT1*-Gens zu vermindertem Glukosetransport über die Blut-Hirn-Schranke und einem Krankheitsbild mit zerebralen Anfällen und Bewegungsstörungen (Seidner et al. 1998). Mutationen des *GLUT2*-Gens verursachen das Fanconi-Bickel Syndrom mit Glykogenspeicherung in der Leber, renaler Tubulusfunktionsstörung und gestörtem Glukose- und Galaktose-Umsatz (Santer et al. 1997). Mutationen des *SGLT1*-Gens führen zur familiären Glukose-Galaktose-Malabsorption, die zu schwerer osmotischer Diarrhöe führt, wenn auf die enterale Zufuhr dieser Zucker nicht verzichtet wird (Turk et al. 1991). Mit der Lokalisation des *SGLT2*-Genprodukts in der Niere wurde vermutet, dass Defekte des *SGLT2*-Gens zur renalen Glukosurie führen (Kanai et al. 1994).

2.2.2. Glukosetransport in der Niere

Aktuelle Modelle der Rückresorption der Glukose aus dem Primärharn in das Blut gehen davon aus, dass mehrere Transportproteine an diesem Prozess beteiligt sind. Der Hauptanteil der Glukoseresorption findet im frühproximalen Tubulussystem (Segment S1) statt. Dort befindet sich der SGLT2-Transporter mit niedriger Substrataffinität in der apikalen Membran der Tubulusepithelzelle (siehe Abb. 2). Der von SGLT2 nicht resorbierte Rest an Glukose wird im spätproximalen Tubulus (Segment S3) von SGLT1 mit hoher Substrataffinität aufgenommen (Wright 2001). SGLT2 besitzt dabei eine deutlich höhere Transportkapazität für Glukose als SGLT1 (Turner und Moran 1982). Beide Transporter nutzen den elektrochemischen Gradienten, der von der basolateral liegenden Na^+/K^+ -ATPase erzeugt wird. Der Übertritt von Glukose aus der Zelle in das Blut erfolgt nach dem Prinzip der erleichterten Diffusion („passiver“ Transport) und wird durch GLUT2 vermittelt.

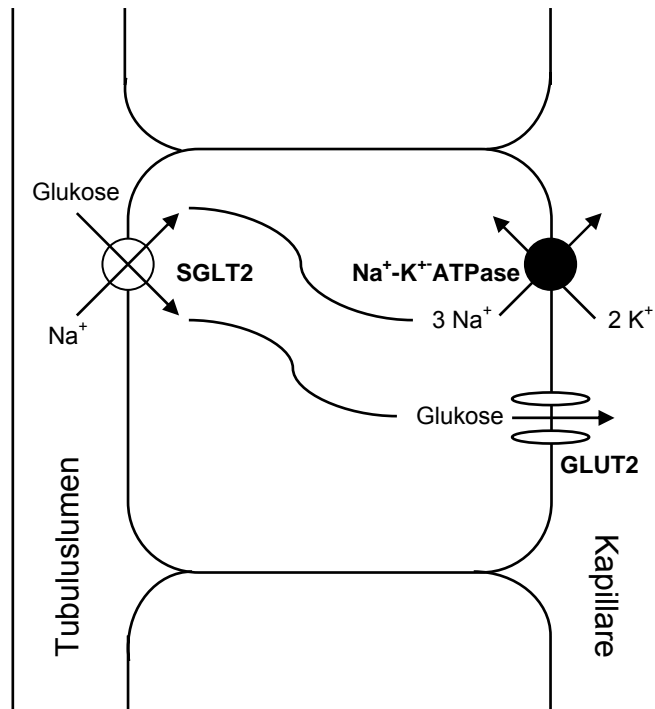


Abb. 2. Modell der Glukoserückresorption durch eine Tubulusepithelzelle im Segment S1 der Niere.

Auch beim Gesunden kommt es zu einer Glukoseausscheidung im Urin. Diese ist gering, als Grenzwert gelten $0,32 \text{ g}/1,73\text{m}^2/\text{d}$ (Elsas und Rosenberg 1969). Das Transportsystem ist jedoch ab einer bestimmten Glukoselast im Tubulussystem und damit ab einem gewissen Blutglukosespiegel gesättigt (siehe auch Abb. 1). Dieser Schwellenwert ist individuell unterschiedlich. Er wird in der Literatur im allgemeinen im Bereich von Blutzuckerkonzentrationen zwischen 150 und 180 mg/dl angegeben, wobei das Konzept eines fixierten Schwellenwertes schon seit vielen Jahren umstritten ist (Mackay 1927).

Entscheidend für die Höhe der renalen Ausscheidung von Glukose ist das Angebot im Tubulussystem. Glukose wird an der glomerulären Membran frei filtriert und nicht in den Tubulus sezerniert. Die Menge an Glukose ist also abhängig von der Menge des filtrierten Plasmas in einer gewissen Zeiteinheit (glomeruläre Filtrationsrate, GFR) und der Konzentration der Glukose im Plasma. Im allgemeinen gelten 120 ml/min und 60-160 mg/dl als Normwert der GFR beziehungsweise als Bereich des Blutglukosespiegel beim durch-

schnittlichen großen und schweren Erwachsenen (mit 1,73 m² Körperoberfläche). Rechnet man dies auf die Glukosemenge im Urin um, erhält man:

$$\begin{aligned}
 & 60 \text{ bis } 160 \text{ mg/dl} \quad \times \quad 120 \text{ ml/min} / 1,73 \text{ m}^2 \\
 = & \quad 0,6 \text{ bis } 1,6 \text{ g/l} \quad \times \quad 172,8 \text{ l/d} / 1,73 \text{ m}^2 \\
 = & \quad 103,7 \text{ bis } 276,5 \text{ g/d} / 1,73 \text{ m}^2
 \end{aligned}$$

Dies ist lediglich eine Abschätzung. Aus dem oben angegebenen experimentell bestimmten Normwert der Glukose-Ausscheidung errechnet sich aber, dass beim Gesunden über 99 % der filtrierten Glukose tubulär resorbiert werden.

2.3. Regulation, Struktur und Funktion von *SGLT2*

Das Gen für den *SGLT2*-Transporter liegt auf Chromosom 16p11.2 nahe des Zentromers (Wells et al. 1993). Es wird auch als *SLC5A2*-Gen bezeichnet (solute carrier family 5 member 2). Die Sequenz der cDNA und die Aminosäurenabfolge des Transportproteins sind im Anhang aufgeführt.

An der Regulation von *SGLT2* sind verschiedene Systeme beteiligt. In einem Rattenmodell wurde gezeigt, dass der *hepatocyte nuclear factor 1α* (HNF1α), der bei Diabetes mellitus vermehrt gebildet wird (Pontoglio et al. 2000), die Transkription von *SGLT2* erhöht (Freitas et al. 2008). Die Expression von *SGLT2* wird unter anderem von *atrial natriuretic peptide* (ANP) und Endothelin-3 gehemmt (Majowicz et al. 2003). In einem Mausmodell für experimentelle Sepsis konnte eine Herunterregulation von *SGLT2* durch proinflammatorische Zytokine wie *tumor necrosis factor α* (TNF-α) und verschiedene Interleukine gezeigt werden (Schmidt et al. 2007).

Die genomische Sequenz der DNA von *SGLT2* wurde 2000 in unserem Labor erarbeitet und an GenBank mitgeteilt (accession number AF 307340), (Santer et al. 2000, Santer et al. 2003). Das fertige *SGLT2*-Protein besteht aus 672 Aminosäuren, die codierende DNA dementsprechend aus 2019 Basenpaaren (Wells et al. 1992). Das gesamte Gen ist ca. 8000 Basenpaare groß, es umfasst 14 Exons und 13 Introns (siehe Abb. 3), (Santer et al. 2003).

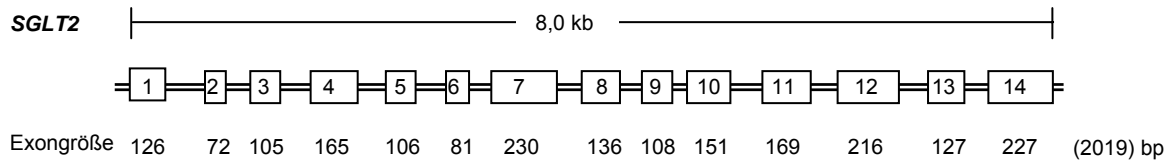


Abb. 3. Darstellung der genomischen Struktur von *SGLT2*. Die Intronabstände sind nicht maßstabsgetreu (aus Santer et al. 2003).

Die Tertiärstruktur und Membrantopologie von *SGLT2* sind nicht genau bekannt, sie konnten bis heute nur für *SGLT1* bestimmt werden (siehe Abb. 4). Es wird aber davon ausgegangen, dass sie für *SGLT2* aufgrund der gemeinsamen Abstammung, der vergleichbaren Funktion und hoher Homologie der Primärsequenz sehr ähnlich sind (Turk und Wright 1997).

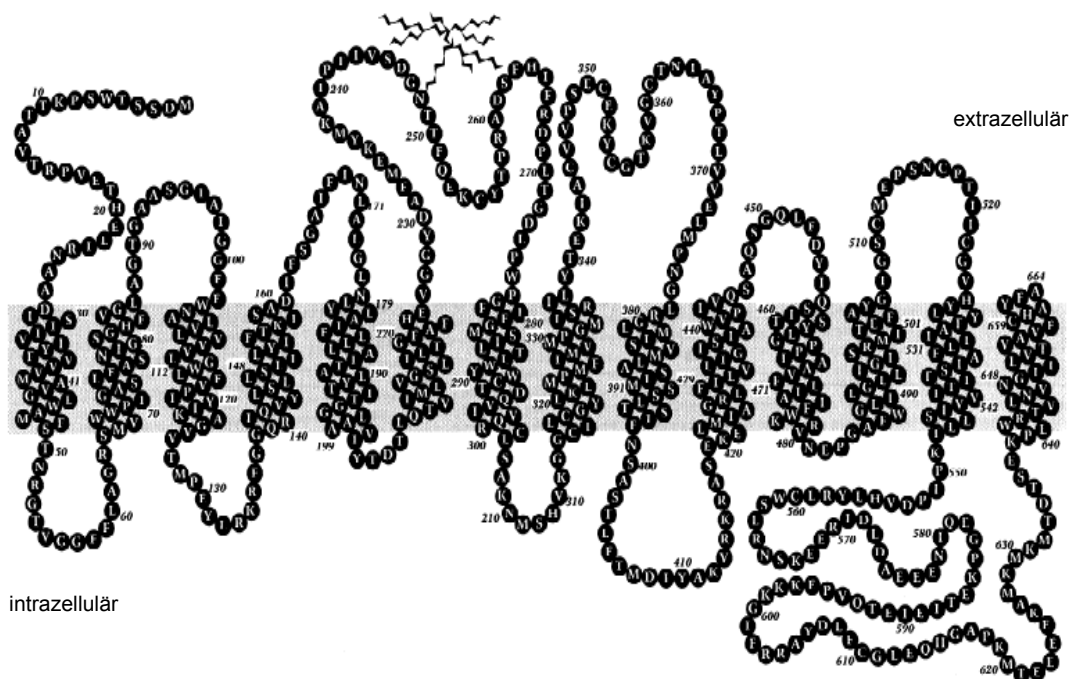


Abb. 4. Modell der Membrantopologie von *SGLT1* mit 14 transmembranösen Abschnitten. Extrazellulär liegt die glykolisierte Aminosäure Asparagin an Position 248 (aus Turk und Wright 1997).

SGLT2 besitzt wie *SGLT1* 14 transmembranöse Helices, wobei sowohl das N-terminale als auch das C-terminale Ende extrazellulär liegen. Zwischen den transmembranösen Bereichen 6 und 7 liegt in einer extrazellulären Schleife eine glykolisierte Aminosäure (Asn 248 bei *SGLT1*, Asn 250 bei *SGLT2*), für die

angenommen wird, dass sie auch bei den anderen Mitgliedern der Transporterfamilie eine wichtige Rolle spielt (Wright 2001). SGLT1 und SGLT2 weisen jedoch auch einige Unterschiede auf. Transportkinetik und Substrate sind verschieden (siehe Tabelle 1), und auch das Transportverhältnis von Na^+ /Glukose ist anders. Bei SGLT1 ist das Verhältnis 2:1 (Diez-Sampedro et al. 2001a), bei SGLT2 1:1 (You et al. 1995).

Nach dem aktuellen Modell der Funktionsweise der Natrium/Glukose-Transporter induziert die Bindung von Natrium am N-terminalen Ende des Proteins eine Änderung der Konformation und die Freigabe einer Bindungsstelle für Glukose. Diese befindet sich im C-terminalen Bereich des Proteins in den transmembranösen Domänen 10-13 (Panayotova-Heiermann et al. 1996), mit einer besonderen Rolle von Position 457 (Hirayama et al. 2007). Durch den einwärts gerichteten Natrium-Gradienten wird die Glukose mit nach intrazellulär geleitet. Nach der Dissoziation der Glukose löst sich auch das Natrium, und der Transporter kehrt zurück in die Ausgangskonfiguration (siehe Abb. 5), (Wright 2001).

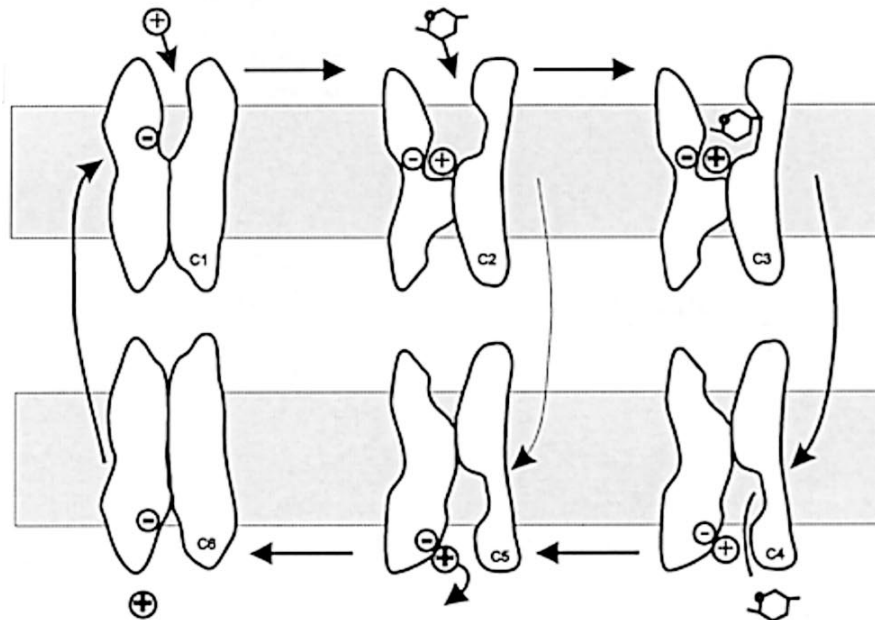


Abb. 5. Modell der Funktionsweise des Natrium/Glukose-Transporters (Wright 2001). Die Bindung von positivgeladenen Natrium-Ionen führt zu einer Konformationsänderung des Transporters und zur Bindung von Glukose (bei Abwesenheit von Glukose kommt es nur zu einem Natriumtransport). Aufgrund des einwärts gerichteten Natriumgradienten kommt es zum gekoppelten Einwärtstransport der Glukose. Nach Dissoziation der Glukose und des Natriums kehrt der Transporter in seine Ausgangskonformation zurück.

2.4. Pharmakologische Bedeutung von SGLT2

In den letzten Jahren wurde einer pharmakologischen Bedeutung von SGLT2 vermehrt Aufmerksamkeit gewidmet. Es wurde im Tiermodell bei an Typ 2 Diabetes erkrankten Ratten gezeigt, dass durch eine Blockade von SGLT2 die Glukoseausscheidung im Urin erhöht und die Glukosespiegel im Blut gesenkt werden konnten (Oku et al. 2000, Ueta et al. 2005). Aktuell werden mehrere Studien an Menschen mit selektiven SGLT2-Blockern durchgeführt (Isaji 2007).

3. Methoden

3.1. Prinzipielle Vorgehensweise

Da noch keine Beschreibungen von Mutationen im *SGLT2*-Gen vorlagen, wurde in dieser Arbeit bei Patienten mit renaler Glukosurie der kodierende Bereich des *SGLT2*-Gens untersucht.

Dafür wurde die DNA von Individuen mit renaler Glukosurie aus peripheren Leukozyten isoliert, und die DNA-Abschnitte, die einzelne Exons und umgebende Intron-Abschnitte enthielten, mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) vermehrt. Es folgte die Sequenzierung der generierten PCR-Produkte. Die gefundenen Mutationen wurden, wenn möglich, durch Restriktionsenzymverdau bestätigt. Danach wurden verfügbare DNA-Proben von Familienmitgliedern mit und ohne Glukosurie ebenfalls auf das Vorhandensein der Mutationen untersucht.

Die Rezepturen, die im folgenden genannten Reagenzien, sowie die verwendeten Geräte werden im Anhang aufgeführt.

3.2. Patienten

Die Blutproben der Patienten stammten zum einen aus den Universitäts-Kinderkliniken Kiel und Hamburg, häufig aber aus verschiedenen in- und ausländischen Instituten. Bei allen Indexpatienten war durch den behandelnden Arzt auf Grund der obengenannten Kriterien der Verdacht auf eine familiäre renale Glukosurie geäußert worden. Die Glukoseausscheidung wurde im 24-Stunden Urin bestimmt und in $\text{g}/1,73\text{m}^2/\text{d}$ angegeben. Eine Übersicht über die Patienten einschließlich deren ethnischer Abstammung und der gemessenen Glukoseausscheidung bietet Tabelle 3.

3.2.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Im folgenden sollen einige klinische Details ausgesuchter Familien exemplarisch dargestellt werden.

- *Familie 01*: Beim Indexpatienten dieser Familie handelt es sich um den ersten beschriebenen Patienten mit Glukosurie Typ 0 (Oemar et al. 1987). Er wurde bei deutscher Abstammung in Rumänien geboren. Die Eltern sind

entfernt verwandt, der mütterliche Großvater war der Zwillingenbruder des väterlichen Urgroßvaters. Bei dem Indexpatienten lässt sich eine ausgeprägte Glukosurie nachweisen, bei den Eltern jeweils eine milde Glukoseausscheidung (siehe hierzu auch Tabelle 3). Bei ihm handelt es sich um den in der Literatur am ausführlichsten beschriebenen Patienten mit renaler Glukosurie mit der längsten Nachbeobachtungsperiode (Scholl-Bürgi et al. 2004).

- *Familie 03*: Diese Familie ist beispielhaft für eine wiederholt quantifizierte Glukosurie beim Indexpatienten, bei fehlender Glukosurie bei den Eltern. Diese Konstellation zeigte sich bei mehreren Familien in dieser Untersuchung.

- *Familie 06*: Hier liegt ein ähnlicher Fall, wie bei Familie 03 vor. Auch hier ließ sich keine Glukosurie bei den Eltern des Indexpatienten nachweisen aber eines der vier Geschwisterkinder zeigte eine leicht erhöhte Glukosekonzentration im Urin.

- *Familien 08 und 10*: In diesen Familien besteht bei den Indexpatienten eine milde Glukosurie. Jeweils ein Familienmitglied wies eine deutlich höhere Glukosurie auf, bei diesen besteht jedoch ein Diabetes mellitus Typ 2.

- *Familie 12*: In dieser Familie besteht beim Indexpatienten eine Glukosurie $>10 \text{ g}/1,73\text{m}^2/\text{d}$, bei den anderen quantitativ untersuchten Familienmitgliedern besteht eine über den Normwert erhöhte Glukoseausscheidung, aber $<10 \text{ g}/1,73\text{m}^2/\text{d}$.

- *Familie 15*: Bei den beiden Indexpatienten dieser Familie handelt es sich um Zwillinge. Anhand einer Analyse von hochvariablen Genorten konnte deren Eineiigkeit nachgewiesen werden*. Die Höhe der Glukosurie bei den beiden Geschwistern ist jedoch unterschiedlich.

* Frau Prof. Dr. rer. nat. Nicole von Wurmb-Schwark vom rechtsmedizinischen Institut der Universität Kiel möchte ich an dieser Stelle herzlich für die Durchführung dieser Untersuchung danken.

3.3. DNA-Isolierung

Um das *SGLT2*-Gen untersuchen zu können, wurde genomische DNA aus Leukozyten extrahiert und konzentriert. Hierfür wurde ein Standardprotokoll verwendet (Sambrook et al. 1989).

Zur Gewinnung der Leukozyten wurde den eingesandten EDTA-Blutproben (5-10ml) *red cell lysis buffer* (RCLB) zugesetzt. Nach Lyse der Erythrozyten konnten die Leukozyten durch Zentrifugation isoliert werden. Zur Lyse der Leukozytenmembran und zum Verdau der Proteine wurde den Leukozyten SDS-haltiger TNE-Puffer und Proteinase K beigefügt. Die Proteine konnten nun mittels Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt werden. Die DNA wurde durch Zusatz von Lithiumchlorid und eiskaltem Äthanol (98%) ausgefällt. Die an einem Glashaken präzipitierte DNA wurde in TE-Puffer gelöst, in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

3.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein Verfahren zur *in-vitro*-Amplifikation einzelner Abschnitte aus einem heterogenen Gemisch von DNA-Sequenzen (Saiki et al. 1985). Durch Erhitzen der DNA und die folgende Denaturierung des Doppelstranges wird ein Anlagern zweier spezifischer Oligonukleotidprimer ermöglicht. Diese Anlagerung erfolgt bei einer für den jeweiligen Primer von seiner Basenabfolge abhängigen Temperatur, der sogenannten *annealing*-Temperatur. Die beiden Primer begrenzen einen bestimmten DNA-Abschnitt, der dann unter der Katalyse des Enzyms DNA-Polymerase kopiert wird. Das Kopieren erfolgt dabei in Leserichtung, also vom 5'-Ende in Richtung 3'-Ende des *sense* (*forward*)-DNA-Stranges, als auch auf dem *antisense* (*reverse*)-Strang. Die neu entstandenen Kopien dienen im nächsten Zyklus als Matrizen für die erneute DNA-Synthese. So erreicht man nach 30-40 Zyklen eine Anzahl von 10^6 bis 10^7 Kopien.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Exons 1-14 mitsamt den angrenzenden Intronregionen des *SGLT2*-Gens mittels PCR amplifiziert. Die Primersequenzen wurden dementsprechend gewählt, und es wurden optimierte PCR-Bedingungen experimentell erarbeitet. Bei einzelnen Proben musste die *annealing*-Temperatur im Vergleich zur theoretisch ermittelten Temperatur

geringfügig verändert werden, um einen optimalen Reinheitsgrad des PCR-Produkts zu erzielen. Exon 2 stellte eine Besonderheit dar, da bei diesem eine sogenannte *touchdown*-PCR verwendet wurde. Bei dieser Modifikation der PCR wird die *annealing*-Temperatur im ersten Zyklus relativ hoch gewählt, um die Spezifität der Reaktion zu erhöhen. Sie wird in den nächsten Zyklen um jeweils eine bestimmte Temperaturdifferenz verringert. Die letzten Zyklen werden dann in der Regel bei einer konstanten Temperatur durchgeführt.

Für das Herstellen von 95 µl Reaktionslösung wurde 1 µl Patienten-DNA mit 94 µl eines Reagenziengemisches in einem Eppendorf-Röhrchen gemischt. Zum Luftabschluss wurde die Lösung mit 3 Tropfen Mineralöl überlagert. Nach der PCR in einem TRIO Thermocycler wurde die Probe bei -20°C gelagert.

Die genauen Temperaturen sowie die Primersequenzen sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2. Primersequenzen für die PCR

Exon	sn-Primer	asn-Primer	Temperatur	Produktgröße (bp)
1	5'-cagtgcccctgaggttaaccattaatc-3'	5'-ccagcagccaccagcagcaca-3'	77°C	244
2	5'-ccctaaaccaggctcccccg-3'	5'-tccaggccccctcccgttccc-3'	78-73°C (td) ^a	145
3	5'-ccctgctcactccctcctct-3'	5'-cccctttctggagttcccc-3'	77°C	219
4	5'-cctcagggatgaggcacaagcc-3'	5'-acccacttgagccccacc-3'	79°C	272
5	5'-cctggaaaaatggaggaagcttga-3'	5'-cactcccttctaagcccc-3'	75°C	244
6	5'-cccacaagacgcctattgctaaggcc-3'	5'-gacctccttaggacctcagacc-3'	69°C	266
7	5'-gagggtcccctgacggccttgccc-3'	5'-ctccgcccctcggctccgcc-3'	75°C	316
8	5'-cgcaagcggcagctgaacgccc-3'	5'-gacggcgcccgggtgctggc-3'	73°C	218
9	5'-ccagtccccacctcctggattccc-3'	5'-cagcgagctgcccctggccc-3'	79°C	214
10	5'-ctcgcgagctgcagccgccc-3'	5'-cccctgaggctgcaagcccc-3'	79°C	284
11	5'-cccagggtccgggttcatcc-3'	5'-cccagccctgcccaccacgc-3'	79°C	242
12	5'-cctcagcaggctgacctgttcc-3'	5'-cacagtgtcctggggcac-3'	75°C	279
13/14 ^b	5'-tgtgcaagagacttagggcca-3'	5'-ggctgtggcttatggtgcc-3'	75°C	537

^a (td) = *touchdown*-PCR (-0,5 Grad/Zyklus)

^b für Exon 14 wurde ein zusätzlicher Sequenzier-Primer eingesetzt: 5'-aggctcctcactccctgtac-3'

3.5. Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die PCR-Produkte wurden zur Kontrolle auf ein 6%-iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Dieses Gel wurde selber hergestellt (Budowie et al. 1991). Hierzu wurde der Rand einer Trägerfolie an drei Seiten mit einem 6 mm breitem Platzhalter belegt und zwischen zwei Glasplatten gespannt, wobei auf einer Platte Plastikstreifen aufgebracht waren, um Vertiefungen im zuzubereitenden

Gel zu verursachen. Die Acrylamid-Lösung wurde nach Rezept vorbereitet und zwischen die beiden Glasplatten pipettiert. Eventuell entstandene Blasen wurden entfernt. Nach 20 Minuten wurde das ausgehärtete Gel zusammen mit der Trägerfolie entnommen und auf eine gekühlte Elektrophoreseplatte gelegt. Kathodennah wurden je 2 μ l der PCR-Produkt-haltigen Lösung zusammen mit einem Marker BPL (base pair ladder) in die entstandenen Vertiefungen aufgetragen. Die Ränder des Gels wurden mit Tris-Borat-Puffer getränkten Filterpapierstreifen belegt, über die der Kontakt zur Elektrodenplatte gewährleistet wurde. Die PCR-Produkte wurden bei einer konstanten Leistung von 14 Watt im elektrischen Feld innerhalb von 25 Minuten aufgetrennt.

3.6. Silberfärbung

Durch eine Silberfärbung wurden die PCR-Produkte auf dem Gel dargestellt (Budowie et al. 1991). Hierfür wurde das PCR-Produkt unter konstantem Schwenken des Gels zuerst mittels Ethanol 10% für 5 Minuten fixiert. Danach erfolgte die Oxidierung mit Salpetersäure für 3 Minuten und die Inkubation mit Silbernitrat für 30 Minuten. Durch eine Reduktionslösung wurden die Banden sichtbar gemacht (siehe z.B. Abb. 6). Die Reduktionsreaktion wurde durch Essigsäure 10% gestoppt. Danach wurde das Gel getrocknet.

3.7. Aufreinigung der PCR-Produkte

Für die Sequenzierungsreaktion müssen die amplifizierten DNA-Abschnitte gereinigt und von den Primern getrennt werden. Dafür wurde ein Agarose-Gel nach Rezept hergestellt. Unter Kühlung auf 4°C erstarrte das Gel innerhalb von 30 Minuten, dabei wurden durch einen Platzhalter kleine Spalten freigehalten. In diese wurden dann 50 μ l PCR-Probe und 5 μ l *Gel Loading Buffer* gefüllt. Nach ca. 1 Stunde bei 110 Volt waren die wesentlich kleineren Primer von den größeren PCR-Produkten getrennt (siehe z.B. Abb. 7). Beide konnten durch Ethidiumbromid-Färbung unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die PCR-Produkte wurden dann in ungefähr 200 μ g schweren Blöcken mit einem Skalpell ausgestanzt. Aus diesen Blöcken wurde die gereinigte DNA mit einem

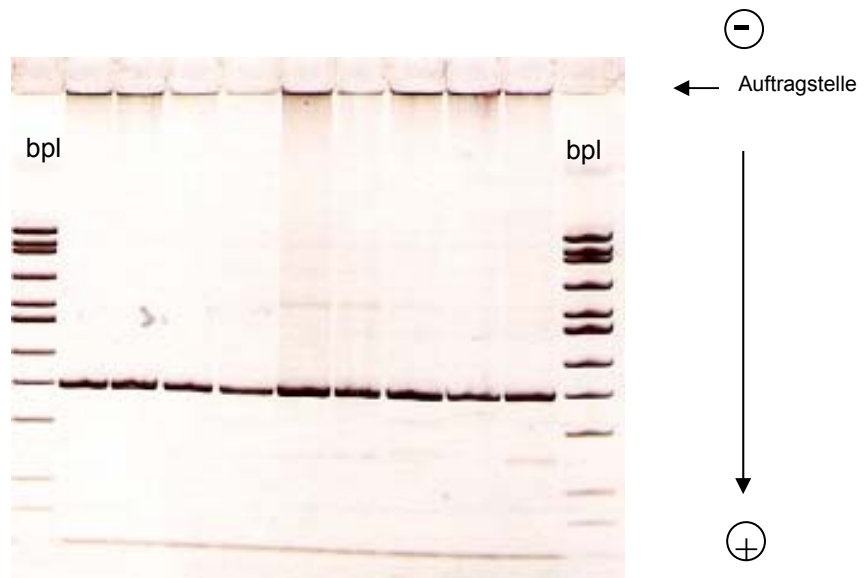


Abb. 6. Silberfärbung einer PAGE.
 Zu sehen sind an den Rändern die Banden des Größenmarkers (bpl, *base pair ladder*), der die Größe der Fragmente anzeigt. In diesem Beispiel wurde das 316-bp-große PCR-Produkt mit Exon 7 des *SGLT2*-Gens dargestellt. Bei keinem der 9 untersuchten Patienten zeigte sich ein auffälliges Laufmuster.

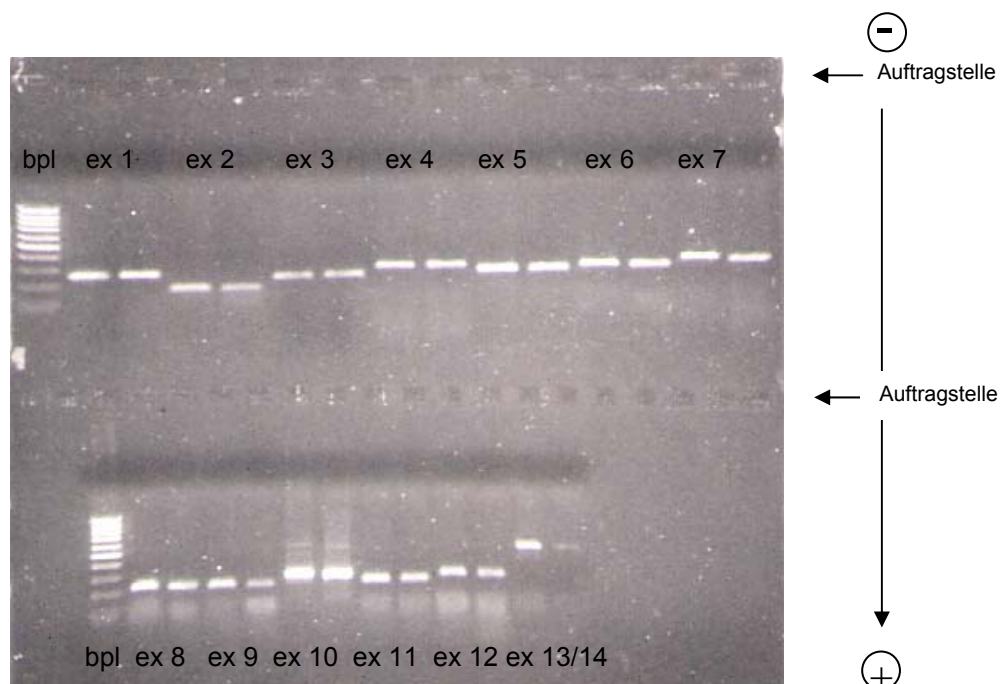


Abb. 7. Agarose-Gel unter UV-Licht.
 Neben dem Größenmarker (bpl) am linken Rand sind fluoreszierende Banden zu sehen. Sie entsprechen jeweils den PCR-Produkten der Exons 1-7 des *SGLT2*-Gens in der oberen Reihe und 8-14 in der unteren von jeweils zwei Patienten. Exon 13 und 14 wurde in einem PCR-Produkt amplifiziert.

kommerziell erhältlichen Kit (EasyPure DNA Purification Kit, Biozym) nach den Angaben des Herstellers gelöst, an Glasmilch gebunden und nach zwei Waschschritten getrocknet. Das getrocknete Endprodukt wurde dann resuspendiert und vor der weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

3.8. Sequenzierung

Durch die Sequenzierung eines DNA-Abschnittes kann man die Abfolge der Nukleotide dieses Abschnittes darstellen. In dieser Arbeit wurde für die darzustellenden Bereiche das Sequenzierverfahren nach der Kettenabbruchmethode angewendet (Sanger et al. 1977). Bei diesem Verfahren wird der Reaktionsansatz nach Zugabe eines jeweils spezifischen Primers zyklisch erwärmt und wieder abgekühlt. Dem Ansatz wird DNA-Polymerase zugesetzt. Diese verlängert den DNA-Abschnitt unter Verwendung zugesetzter Nukleotide (dNTPs) und einzelner radioaktiv markierter didesoxy-Nukleotide (ddNTPs), die nach ihrem Einbau einen Kettenabbruch verursachen. Die unterschiedlich langen DNA-Stränge, die in vier parallelen Reaktionen mit den vier unterschiedlichen ddNTPs erzeugt werden, können dann nach elektrophoretischer Auftrennung in einem Gel auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden. Die entstehenden Banden entsprechen jeweils Positionen im PCR-Produkt, an denen es zum Kettenabbruch gekommen ist.

Als Primer für die Sequenzierung dienten die gleichen Primer wie für die PCR. Je nach Abstand zum Exon wurde der sn- oder asn-Primer gewählt. Bei Exon 7 musste wegen der Größe der Exons mit dem sn- und asn-Primer gearbeitet werden, bei Exon 13/14 wurde noch ein zusätzlicher Primer, der etwa in der Mitte des Exons lag, verwendet. Zum Ansetzen der Reaktion wurde ein kommerzieller Kit (ThermoSequenase, Amersham) benutzt, wobei nach den Vorgaben des Herstellers gearbeitet wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 μl *Stop Solution* gestoppt. Danach wurden die Proben bei -20°C eingefroren.

Die erhaltenen Produkte wurden in einem selbst hergestellten Polyacrylamidgel bei 50 Watt für ca. 90 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend über 60 Minuten in einem Vakuumtrockner getrocknet und dann auf einen handelsüblichen Röntgenfilm aufgelegt. Dieser wurde für 18-36

Stunden belichtet und dann entwickelt. Auf dem entwickelten Film konnte dann die Nukleotidsequenz abgelesen werden (siehe z.B. Abb. 8).

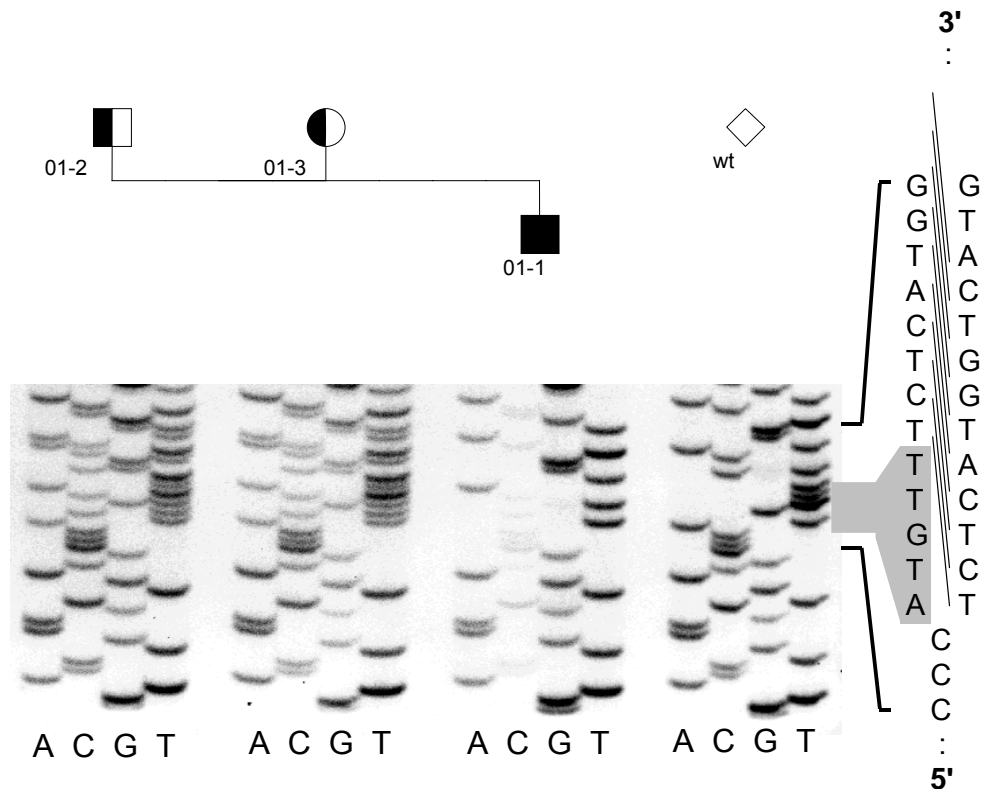


Abb. 8. Sequenzierung eines Bereichs in Exon 8 des *SGLT2*-Gens von Familie 01. Beim Patienten sieht man im Vergleich zu einer Kontrolle (wt, Wildtyp) eine 5-bp-Deletion (c.973_977del ATGTT). Bei beiden Eltern beginnt an der Position der Deletion ein komplexes Bandenmuster, da sich parallel sowohl der Wild-Typ als auch das mutierte Allel bei den heterozygoten Trägern darstellen.

3.9. Restriktionsenzymverdau

Ein Verdau von DNA mittels Restriktionsenzymen dient dem indirekten Nachweis einer geänderten Basensequenz. Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die an eine spezifische Basenabfolge eines DNA-Abschnittes binden und diesen dort zerteilen. Je nachdem wie viele dieser Erkennungssequenzen ein DNA-Abschnitt aufweist, entsteht eine bestimmte Anzahl von Fragmenten, die sich dann in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch auftrennen und durch Silberfärbung darstellen lassen. Durch eine Mutation kann eine Erkennungssequenz neu entstehen oder wegfallen. Da das Produkt des väterlichen und mütterlichen Allels durch das Enzym geschnitten wird, ergeben sich für Homozygotie und Heterozygotie unterschiedliche

Bandenmuster (siehe z.B. Abb. 9). Je nach gewähltem Enzym muss dem Reaktionsansatz ein bestimmter Puffer zugefügt werden (siehe Anhang).

In dieser Arbeit ließen sich die meisten gefundenen Punktmutationen durch ein passendes Restriktionsenzym bestätigen. So konnten Mutationsträger in der Familie der Indexpatienten durch einen Enzymverdau auf vereinfachte Weise identifiziert werden.

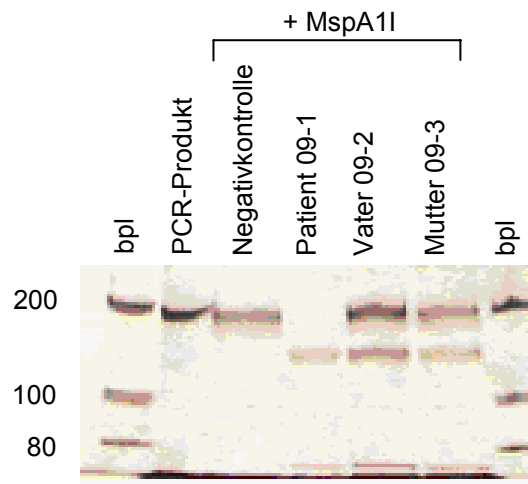


Abb. 9. Restriktionsenzymverdau eines Exon 9 des *SGLT2*-Gens enthaltenden PCR-Produktes mit *MspA1I* bei Familie 09 mit der Mutation c.1102C>T (p.R368W). Dargestellt von links nach rechts sind mit der Größe von 200 bp zuerst unverdautes PCR-Produkt und ungeschnittene Negativkontrolle. Beim homozygoten Patienten werden PCR-Produkte beider Chromosomen geschnitten, es kommen nur Banden der Größe 160 und 40bp zur Darstellung. Die Eltern sind beide heterozygot, man sieht sowohl Banden bei 200bp, als auch bei 160 und 40bp.

3.10. Restriktionsenzymverdau nach ortsspezifischer Mutagenese

Erzeugt eine Mutation keine Änderung des Schnittmusters eines Restriktionsenzym, so kann eine PCR zur ortsspezifischen Mutagenese durchgeführt werden (Hutchinson et al. 1978). Hierzu wird ein sogenannter *mismatch*-Primer konstruiert, der sich von der eigentlichen Basenabfolge um 1(-4) Basenpaare unterscheidet. Trotz seiner nicht vollständig komplementären Sequenz kann dieser Primer an den Strang binden und eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym im PCR-Produkt erzeugen. Der Primer wird so gewählt, dass die neue Erkennungssequenz für dieses Restriktionsenzym nahe an der Mutation liegt. Die mutierte Position soll ebenfalls Teil der Erkennungssequenz sein, so dass auf diese Weise zwischen Wildtyp und mutierter Sequenz unterschieden

werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Verfahren bei fünf Mutationen eingesetzt.

3.11. Heteroduplexbildung

Heteroduplexe sind doppelsträngige DNA-Abschnitte, deren Einzelstränge nicht 100% komplementär zueinander sind, sich aber unter Änderung der Struktur, z.B. bei Insertion oder Deletion durch Schleifenbildung, dennoch aneinander lagern. Heteroduplexe Formationen zeigen ein anderes elektrophoretisches Laufverhalten, das sich nach der PCR im PAGE darstellen lässt (siehe z.B. Abb. 10).

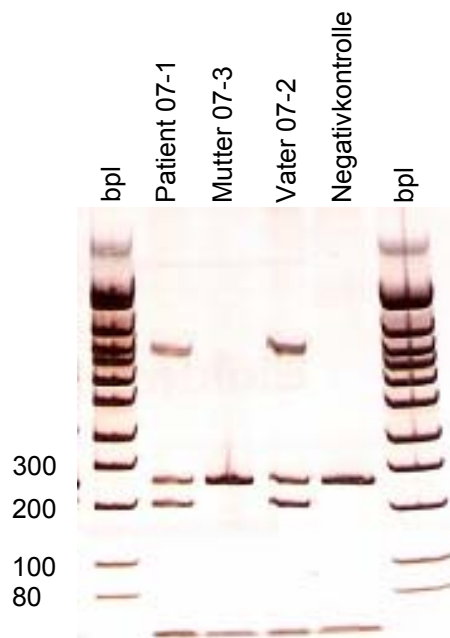


Abb. 10. Heteroduplexbildung des PCR-Produkts von Exon 12 des *SGLT2*-Gens bei Familie 07. Durch eine in heterozygoter Form vorliegende Deletion von 57 Basenpaaren in Exon 12 fällt der Größenunterschied der Allele auf (222 vs. 279 bp). Zudem stellt sich eine abnorme Bande vermutlich durch ein abnormes Laufverhalten bei Heteroduplexbildung dar. Aufgetragen sind von links nach rechts Patient, Mutter, Vater und Negativkontrolle. Die Mutation wurde also vom Vater übertragen.

Bei den Indexpatienten ließ sich in vier Fällen eine solche Heteroduplexbildung beobachten, zum Teil auch wenn das Laufverhalten der Homoduplexe nicht auffällig war. Zur genauen Mutationsbestimmung wurden DNA-Proben dieser Patienten sequenziert. Wurde die identische Heteroduplexbildung bei Familien-

angehörigen gesehen, reichte uns dies als Nachweis des Mutations-trägerstatus.

3.12. Klonierung

Bei zwei Patienten (07-1, 08-1) ließ sich aufgrund der Heterozygotie für eine langstreckige Deletionen die Mutation im Rahmen der direkten Sequenzierung nicht genau bestimmen. In diesen Fällen war es nötig, die Allele einzeln zu amplifizieren und zu sequenzieren. Diese allelspezifische Amplifikation geschieht durch Klonierung. Dabei wird die zu untersuchende Gensequenz in Plasmide eingebracht und in Bakterien transformiert. Jedes Plasmid nimmt dabei nur ein Allel auf, so dass pro Bakterienkolonie auch nur ein Allel integriert wird.

Es wurde der PCR-Script® Amp Cloning Kit (Stratagene) benutzt. Dabei wurden zuerst die überstehenden Nukleotide am Ende des PCR-Produkts mit Hilfe der *Pfu* DNA-Polymerase aufgefüllt, um danach durch die Enzyme *SrfI* und T4 DNA Ligase in den Plasmidvektor eingefügt zu werden. Dieser Vektor wurde dann in *E.coli* (Epikurian coli XL10-Gold® Kan ultracompetent cells) eingebracht. Die Bakterien wurden auf Ampicillin-, X-Gal -und IPTG-haltigen Nährplatten aufgebracht und für 17 Stunden bei 37°C inkubiert. Aufgrund einer Farbreaktion mit der X-Gal des Nährmediums konnten die Kolonien identifiziert werden, die kein Plasmid enthielten. Die beimpften Kolonien behielten ihre weiße Farbe. Jeweils 20 potentiell beimpfte Kolonien wurden selektiert und mit plasmidspezifischen Primern behandelt, um das erfolgreiche Beimpfen zu kontrollieren (siehe Abb. 11).

Anschließend wurden die entsprechenden Kolonien gewählt und die DNA ihrer Plasmide durch eine Minipräparation isoliert, um für die Sequenzierungsreaktion zur Verfügung zu stehen.

3.13. Minipräparation

Die Minipräparation ist das Verfahren der Wahl zur Gewinnung von DNA aus Plasmiden zur Sequenzierung. Hier wurde die Alkali-Lysis Methode eingesetzt (Birnboim und Doly 1979, modifiziert Sambrook et al. 1989).

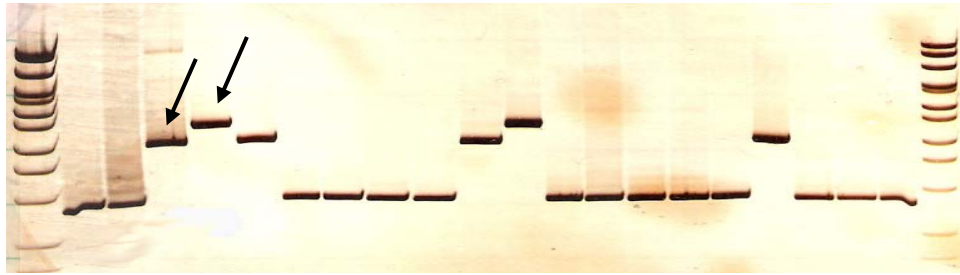


Abb. 11. Elektrophorese der Produkte einer Kontroll-PCR vor Auswahl der für eine Sequenzierung zu präparierenden Kolonien. Das Polyacrylamidgel zeigt Banden, die PCR-Produkte von aus Bakterienkolonien extrahierter DNA unterschiedlicher Größe darstellen. Die Bakterien wurden mit Plasmiden beimpft, die Exon 12 des Patienten 07-01 enthielten. Von 20 Kolonien haben 6 das Plasmid eingebaut, dabei 3 das wild-Typ-Allel und 3 das Allel mit der Deletion. Wegen der Größenunterschiede wurden die Kolonien 3 und 4 (Pfeile) zur weiteren Präparation und zur Sequenzierung ausgewählt.

Dabei wurden die Kolonien zuerst in GETL-Lösung resuspendiert, um dann in Natronlauge/SDS und Kaliumazetat lysiert zu werden. Die Plasmid-DNA wurde dann mittels Phenol/Chloroform extrahiert und durch Ethanol ausgefällt. Nach Entfernen des Überstandes wurde das DNA-Pellet in TE-Puffer/RNase resuspendiert. Die DNA wurde dann bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

3.14. Mutationsbezeichnungen

Die benutzte Nomenklatur beschreibt die Sequenzveränderungen zum einen hinsichtlich der Nukleotidfolge des *SGLT2*-Gens und zum anderen bezüglich der sich daraus ableitenden Aminosäuresequenz (den Dunnen und Antonarakis 2001).

Die Nukleotide der cDNA sind von 1 bis 2019 durchnummeriert. Dabei wird dem ersten Nukleotid des Initiatorcodons ATG die Position 1 zugeordnet. Die Nummerierung endet mit dem letzten Nukleotid des Terminator-Codons TAA an Position 2019. Die Aminosäuren werden von 1 bis 672 durchnummeriert, beginnend mit Methionin, endend mit Alanin.

Den Empfehlungen der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) folgend (IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature 1984), wurde für die Abkürzung der Aminosäuren bis auf längere Abfolgen der Drei-Buchstaben-Code verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Allgemeiner Teil

4.1.1. Patienten

In dieser Arbeit wurden 25 Indexpatienten mit renaler Glukosurie aus 23 Familien und insgesamt 59 Familienmitglieder untersucht. Kriterium für die Untersuchung der Patienten war eine Glukoseausscheidung $>0,32 \text{ g}/1,73\text{m}^2/\text{d}$, für die andere Ursachen ausgeschlossen waren.

Bei 23 der 25 Patienten konnte mindestens eine Mutation im *SGLT2*-Gen gefunden werden, davon waren bei 13 Patienten beide Allele (6 homozygot, 7 *compound*-heterozygot) und bei 10 Patienten nur ein Allel mutiert (Tabelle 3). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Glukosurie in eine schwere Form ($>10\text{g}/1,73\text{m}^2/\text{d}$) und eine milde Form ($<10 \text{ g}/1,73\text{m}^2/\text{d}$) unterteilt. Es zeigte sich, dass fast alle Indexpatienten mit zwei mutierten Allelen eine schwere Form der Glukosurie aufwiesen (14,6 - 202 $\text{g}/1,73\text{m}^2/\text{d}$). Die einzige Ausnahme bildete Indexpatient 21-1 mit einer *compound*-Heterozygotie und einer Glukoseausscheidung von 1,2 $\text{g}/1,73\text{m}^2/\text{d}$. Außerdem gab es ein Familienmitglied mit zwei Mutationen (12-4) und einer Glukosurie von 4,4 $\text{g}/1,73\text{m}^2/\text{d}$. Die Patienten mit nur einer Mutation dagegen zeigten bis auf eine Ausnahme (Patient 07-1) eine milde Form (0,6 - 5,9 $\text{g}/1,73\text{m}^2/\text{d}$). Bei 47 Familienangehörigen fand sich eine in heterozygoter Form vorliegende Mutation, 21 von ihnen hatten eine erhöhte Glukoseausscheidung (0,38 - 4,8 $\text{g}/1,73\text{m}^2/\text{d}$, bis 12,3 $\text{g}/1,73\text{m}^2/\text{d}$ wenn gleichzeitig ein Diabetes mellitus Typ 2 vorlag). Bei den untersuchten Familienangehörigen, die keine der Mutationen des jeweiligen Indexpatienten aufwiesen, fand sich in keinem Fall eine über den Grenzwert erhöhte Glukoseausscheidung.

Tabelle 3. Übersicht der untersuchten Familien mit renaler Glukosurie und gefundene Sequenzaberrationen des *SGLT2*-Gens

Familienmitglieder	Ethnische Herkunft	Glukose- ausscheidung (g/1,73m ² /d)	Allel 1	Allel 2
01 -1 Indexpatient -2 Vater -3 Mutter -4 Schwester -5 Bruder -6 Schwester	Deutschland	126 – 162,2 1,1 2,7 0,4 0,31 0,05	c.973_7delATGTT c.973_7delATGTT wt n.b. n.b. n.b.	c.973_7delATGTT wt c.973_7delATGTT n.b. n.b. n.b.
02 -1 Indexpatient -2 Vater -3 Mutter -4 Bruder	England	73,6 0,8 0 0,11	c.500delA c.500delA wt c.500delA	c.814G>A wt c.814G>A wt
03 -1 Indexpatient -2 Vater -3 Mutter -4 Geschwisterkind -5 Geschwisterkind -6 Geschwisterkind	Pakistan	50,6 – 51,3 0,15 0,02 0,03 0 0,09	IVS7+5G>A IVS7+5G>A wt IVS7+5G>A IVS7+5G>A IVS7+5G>A	IVS7+5G>A wt IVS7+5G>A wt wt wt
04 -1 Indexpatient ^a -2 Indexpatient ^a -3 Vater -4 Mutter	ehemaliges Jugoslawien	21,3 28,5 ∅ ∅	IVS7+5G>A IVS7+5G>A wt IVS7+5G>A	c.920T>C c.920T>C c.920T>C wt
05 -1 Indexpatient -2 Mutter -3 Geschwisterkind	Türkei	43,0 0,24 0,07	c.1346G>A c.1346G>A c.1346G>A	c.1346G>A wt wt
06 -1 Indexpatient -2 Vater -3 Mutter -4 Geschwisterkind -5 Geschwisterkind -6 Geschwisterkind	Türkei	68,7 0,21 0,12 0,19 0,61 0,27	c.1320G>A c.1320G>A wt c.1320G>A c.1320G>A c.1320G>A	c.1320G>A wt c.1320G>A wt wt wt
07 -1 Indexpatient -2 Vater -3 Mutter	Deutschland	20,8 0,38 0,29	c.1461_517del57 c.1461_517del57 wt	wt wt wt
08 -1 Indexpatient -2 Vater -3 Mutter -4 Geschwisterkind	Türkei	0,6 10,4 ^b 0,03 0,04	c.1951_92del42 c.1951_92del42 wt wt	wt wt wt wt
09 -1 Indexpatient -2 Vater -3 Mutter -4 Geschwisterkind	Türkei	38,8 0,99 0,15 0	c.1102C>T c.1102C>T wt wt	c.1102C>T wt c.1102C>T wt

10	-1 Indexpatient -2 Vater -3 Mutter -4 Geschwisterkind -5 Großvater (p) -6 Großmutter (p)	Italien	2,3 – 4,5 0,17 n.b. n.b. 12,3 ^b n.b.	c.506delC c.506delC wt wt c.506delC wt	wt wt wt wt wt wt
11	-1 Indexpatient -2 Vater -3 Mutter -4 Großmutter (m)	Italien	0,75 ∅ 0,4 ∅	IVS7+5G>A wt IVS7+5G>A IVS7+5G>A	wt wt wt wt
12	-1 Indexpatient -2 Vater -3 Mutter -4 Geschwisterkind -5 Schwester des Großvaters (m)	Italien	14,6 ∅ 3,7 4,4 1,7	IVS7+5G>A wt IVS7+5G>A IVS7+5G>A IVS7+5G>A	c.932A>G c.932 A>G wt c.932 A>G wt
13	-1 Indexpatient -2 Ehemann -3 Mutter -4 Sohn -5 Cousin	Italien	5,9 ∅ 0,23 1,3 3,5	c.216C>A^c wt c.216C>A ^c c.216C>A ^c c.216C>A ^c	wt wt wt wt wt
14	-1 Indexpatient -2 Vater -3 Mutter -4 Schwester -5 Großmutter (p) -6 Großvater (m) -7 Großmutter (m)	Italien	2,8 0,07 0,04 0,01 0,01 0,04 0,01	wt n.b. n.b. n.b. n.b. n.b. n.b.	wt n.b. n.b. n.b. n.b. n.b. n.b.
15	-1 Indexpatient ^d -2 Indexpatient ^d -3 Vater -4 Mutter	Deutschland	202 79,8 0,24 – 0,36 0,15 – 0,47	c.410G>A c.410G>A c.410G>A wt	c.1153_63del12 c.1153_63del12 wt c.1153_63del12
16	-1 Indexpatient -2 Vater -3 Mutter	Italien	1,8 0,07 1,4	c.151A>C wt c.151A>C	wt wt wt
17	-1 Indexpatient -2 Vater -3 Mutter	Türkei	30,1 – 92,4 n.b. n.b.	c.1627A>C c.1627A>C wt	c.1627A>C wt c.1627A>C
18	-1 Indexpatient -2 Vater	Italien	1,6 – 5,0 4,8	c.313G>A c.313G>A	wt wt
19	-1 Indexpatient	Deutschland	8,0 – 16,7	wt	wt
20	-1 Indexpatient -2 Vater -3 Mutter	Schweiz	31,7 0,16 ^e 0,05	c.448T>C wt c.448T>C	c.1495C>T c.1495C>T wt
21	-1 Indexpatient -2 Vater -3 Mutter	Schweiz	1,2 0,13 0,04	c.1359C>A c.1359C>A wt	wt^c wt wt ^c

22	-1 Indexpatient -2 Vater -3 Mutter	Deutschland	1,9 0 0	c.1153_63del12 c.1153_63del12 wt	wt wt wt
23	-1 Indexpatient -2 Vater -3 Mutter -4 Geschwisterkind -5 Geschwisterkind	Schweiz	0,75 0,23 0,87 1,5 0,82	IVS7+5G>A wt IVS7+5G>A IVS7+5G>A IVS7+5G>A	wt wt wt wt wt

Ø keine Glukose im Urin mit Teststreifenmethode, n.b. nicht bestimmt, wt Wildtyp, (m) mütterlicherseits, (p) väterlicherseits

^a Geschwister

^b Diabetes mellitus Typ 2

^c assoziiert mit c.1961A>G, Polymorphismus, siehe Diskussion

^d eineiige Zwillinge

^e positiv nach Teststreifenmethode zu anderen Zeitpunkten

4.1.2. Mutationen

Es wurden insgesamt 22 Sequenzveränderungen gefunden, 16 davon waren Substitutionen und sechs Deletionen (Tabelle 4).

Bei den Substitutionen handelte es sich in vier Fällen um Transversionen (Austausch einer Pyrimidin- durch eine Purinbase oder einer Purin- durch eine Pyrimidinbase) und in zwölf Fällen um eine Transition (Austausch einer Purin- durch eine Purinbase oder einer Pyrimidin- durch eine Pyrimidinbase).

Zwei Deletionen betrafen ein Basenpaar, eine fünf Basenpaare. Diese Deletionen verursachten eine Verschiebung des Leserasters und damit die vorzeitige Bildung eines Stop-Codons im weiteren Verlauf. Die restlichen drei Deletionen betrafen längere Strecken (12, 42 und 57 Basenpaare), führten aber zu keiner Verschiebung des Leserasters.

4.2. Spezieller Teil

4.2.1. Familie 01

Der Indexpatient der Familie 01 ist der erste in der Literatur beschriebene Patient mit Glukosurie Typ 0 (Oemar et al. 1987). Die Eltern sind entfernt verwandt, der mütterliche Großvater war der Zwillingbruder des väterlichen Urgroßvaters. An klinischen Auffälligkeiten zeigte der Patient in der Kindheit

Tabelle 4. Übersicht gefundener Veränderungen der Aminosäuresequenzen des *SGLT2*-Gens

	Gensequenzaberration	Veränderung der Aminosäuresequenz ^a	Bestätigung ^b	Familien ^c
ex 02	c.151A>C	p.Thr 51 Pro	(+) Bgl I	16
ex 03	c.216C>A	p.Phe 72 Leu	(+) Dde I	13
ex 04	c.313G>A	p.Val 105 Met	(+) Nla III	18
	c.410G>A	p.Arg 137 His	mm (-) Not I	15
	c.448T>C	p.Tyr 150 His	(-) Rsa I	20
ex 05	c.500delA	p.Gln 167 His fs X20	HD	2
	c.506delC	p.Ala 169 Val fs X18	(-) Alw N I	10
ex 07	c.814G>A	p.Gly 272 Arg	(+) Bst N I	2
IVS 7	+5 G>A	abnormes splicing	mm (-) Bst U I	3,4,11,12,23
ex 08	c.920T>C	p.Leu 307 Pro	(+) Ban II	4
	c.932 A>G	p.Lys 311 Arg	mm (-) Mse I	12
	c.973_7delATGTT	p.Met 325 Ser fs X23	mm (+) Mnl I	1
ex 09	c.1102C>T	p.Arg 368 Trp	(-) Msp A1 I	9
ex 10	c.1153_63del12	p.Δ385-388	HD	15,22
ex 11	c.1320G>A	p.Trp 440 X	(-) Bst N I	6
	c.1346G>A	p.Gly 449 Asp	mm (-) Nae I	5
	c.1359C>A	p.Phe 453 Leu	(-) Taq I	21
ex 12	c.1495C>T	p.Arg 499 Cys	(-) Sph I	20
	c.1461_517del57	p.Trp 487 Cys Δ488-506	HD	7
	c.1627A>C	p.Thr 543 Pro	(+) Msp I	17
ex 14	c.1951_92del42	p.Δ651-664	HD	8
	c.1961 A>G ^d	p.Asn 654 Ser	(-) Hind II	13,21

^a fs, frameshift Mutation, die dazu führt, dass das Leseraster verschoben wird und es zu der Bildung eines Stop-Codons (X) kommt

^b mm bedeutet, dass ein mismatch-Primer eingesetzt wurde; (+) markiert eine durch die Mutation hinzugekommene, (-) den Wegfall einer Schnittstelle; HD steht für Heteroduplexbildung im PAGE

^c Familiennummern beziehen sich auf Tabelle 3

^d Polymorphismus, siehe Diskussion

eine Polyurie, Enuresis und Polydipsie sowie in der Pubertät eine Wachstumsverzögerung. Es ergab sich in mehreren Nachuntersuchungen kein Hinweis auf eine chronische Veränderung der Nierenfunktion (Scholl-Bürgi et al. 2004).

Wir konnten bei diesem Indexpatienten die Mutation **c.973_7delATGTT** im *SGLT2*-Gen in homozygoter Form nachweisen. Beide Eltern waren heterozygot, bei ihnen war ihre milde Glukosurie vor der Diagnosestellung bei ihrem Sohn nicht aufgefallen. Die Geschwister standen für genetische Untersuchungen nicht zu Verfügung.

4.2.2. Familie 02

In dieser Familie zeigte sich beim Indexpatient eine *compound*-Heterozygotie. Die Mutation **c.500delA**, vom Vater vererbt, zeigte sich auch beim Bruder, die Mutation **c.814G>A** der Mutter nur beim Indexpatienten.

4.2.3. Familie 03

Bei Konsanguinität der Eltern lag bei diesem Patienten eine Homozygotie für die Mutation **IVS7+5G>A** vor. Die Mutation ließ sich bei allen untersuchten Familienmitgliedern auf einem Allel nachweisen. Es bestand jedoch bei keinem eine erhöhte Glukoseausscheidung.

4.2.4. Familie 04

In Familie 04 wurden zwei Geschwisterkinder als Indexpatienten untersucht. Beide waren bei ähnlich ausgeprägter Glukosurie *compound*-heterozygot für *SGLT2*-Mutationen. Das Allel vom Vater zeigte die Mutation **c.920T>C**, das Allel der Mutter **IVS7+5G>A**. Bei beiden Elternteilen ließ sich mittels Teststreifen keine Glukose im Urin nachweisen.

4.2.5. Familie 05

Indexpatient 05-1 war homozygot für die Mutation **c.1346G>A**. Die Eltern waren als Cousin und Cousine ersten Grades eng verwandt. Vom Vater konnte kein Blut untersucht werden, da er bereits verstorben war. Sowohl Mutter als auch ein Geschwisterkind waren heterozygot, bei beiden wurde keine erhöhte Glukoseausscheidung gemessen.

4.2.6. Familie 06

In Familie 06 fanden wir beim Indexpatienten die Mutation **c.1320G>A** im homozygoten Zustand. Auch hier waren die Eltern konsanguin und jeweils heterozygot für die Mutation. Die drei Geschwisterkinder des Indexpatienten waren ebenfalls heterozygot. Als einziges der heterozygoten Familienmitglieder zeigte eines dieser Geschwister eine milde Glukosurie.

4.2.7. Familie 07

Bei dem Indexpatienten 07-1 ließ sich trotz einer nach unseren Kriterien schweren Glukosurie nur eine Mutation im *SGLT2*-Gen nachweisen. Diese Mutation, **c.1461_517del57**, wurde vom Vater vererbt. Zur genauen Bestimmung dieser langstreckigen Deletion musste das betroffene Exon 12 kloniert werden. Die Sequenzierung des *SGLT2*-Gens der Mutter als auch die Untersuchung einer zweiten DNA-Probe des Indexpatienten lieferte keine zweite Sequenzveränderung im kodierenden Bereich dieses Gens.

4.2.8. Familie 08

In dieser Familie wiesen wir die Mutation **c.1951_92del42** beim Indexpatienten und beim Vater nach, beide waren heterozygot. Hier war wie bei Patient 07-1 eine Klonierung des Exons zur genauen Beschreibung der Mutation notwendig. Auffällig war eine deutlich höhere Glukosurie beim Vater, der jedoch zusätzlich an einem Diabetes mellitus Typ 2 mit erhöhten Blutglukosespiegeln litt.

4.2.9. Familie 09

Der Indexpatient 09-1 war homozygot für die Mutation **c.1102C>T**. Die Eltern waren verwandt, beide waren heterozygot für diese Mutation. Beim Vater lag eine milde Glukosurie vor, bei der Mutter war die Glukoseausscheidung normwertig.

4.2.10. Familie 10

Hier konnten wir beim Indexpatienten die Mutation **c.506del1C** nachweisen. Der Patient war heterozygot, die Mutation wurde vom Großvater auf den Vater und dann auf den Patienten weitergegeben. Bei deutlicher Glukosurie des Großvaters lag zusätzlich ein Diabetes mellitus Typ 2 vor. Die Glukoseausscheidung des Vaters war nicht erhöht.

4.2.11. Familie 11

In Familie 11 lag die Mutation **IVS7+5G>A** in heterozygoter Form beim Indexpatienten, bei der Mutter und der Großmutter mütterlicherseits vor. Indexpatient und Mutter hatten eine gering erhöhte Glukoseausscheidung, bei

der Großmutter ließ sich mit der Teststreifenmethode keine Glukose im Urin nachweisen.

4.2.12. Familie 12

Bei Indexpatient 12-01 konnte eine *compound*-Heterozygotie für Mutationen des *SGLT2*-Gens nachgewiesen werden. Die Mutation **IVS7+5G>A** wurde mütterlicherseits übertragen. Vom Vater kam das Allel **c.932A>G**. Das Geschwisterkind (12-4) des Indexpatienten wies die gleiche *compound*-Heterozygotie auf, zeigte jedoch nur eine milde Glukosurie (4,4 g/1,73m²/d) im Gegensatz zur schweren Glukosurie des Indexpatienten (14,6 g/1,73m²/d). Bei anderen Trägern der mütterlichen Mutation kam es auch zu einer milden Glukosurie, beim heterozygoten Vater lieferte die Teststreifenmethode ein negatives Ergebnis.

4.2.13. Familie 13

Der Indexpatient 13-1 wies zwei Abweichungen von der Wild-Typ Sequenz des *SGLT2*-Gens, **c.216C>A** und **c.1961A>G**, auf. Da beide auch bei Mutter und Sohn nachzuweisen waren, lagen sie auf einem Allel. Bis auf die Mutter des Indexpatienten hatten die anderen heterozygoten Träger dieser beiden Sequenzaberrationen eine milde Glukosurie.

4.2.14. Familie 14

In der Familie 14 zeigte nur der Indexpatient 14-1 eine milde Glukosurie, alle anderen Familienmitglieder hatten auch bei quantitativer Bestimmung eine sehr geringe Glukoseausscheidung. Bei Patient 14-1 konnte keine Mutation im *SGLT2*-Gen gefunden werden.

4.2.15. Familie 15

Die Indexpatienten 15-1 und 15-2 waren Zwillinge. Beide hatten nach unserer Definition eine schwere Glukosurie, allerdings in durchaus unterschiedlicher Höhe. Während Patient 15-2 mit einem Wert von 202 g/1,73m²/d keine tubuläre Rückresorption erwarten lässt (im Sinne einer familiär renalen Glukosurie Typ 0), so spricht der Wert bei der Schwester von 79,8 g/1,73m²/d für eine gewisse

Restfunktion. Patient 15-2 hatte mit $202 \text{ g}/1,73\text{m}^2/\text{d}$ die höchste Glukoseausscheidung, die im Rahmen dieser Untersuchung gemessen wurde. Beide Indexpatienten wurden auf mehrere hochvariable Genorte untersucht. Bei beiden waren diese in jedem Fall identisch. Deshalb wurde die Eineiigkeit der Zwillinge für höchst wahrscheinlich gehalten. Es wurde die gleiche *compound*-Heterozygotie festgestellt, **c.410G>A** und **c.1153_63del12**. Die Transition kam dabei vom Vater, die Deletion von der Mutter. Beide Eltern zeigten eine leicht über dem Normwert liegende Glukoseausscheidung.

4.2.16. Familie 16

Bei Indexpatient 16-1 fand sich die Mutation **c.151A>C** in heterozygoter Form, die von der Mutter vererbt wurde. Mutter und Indexpatient wiesen eine milde Glukosurie auf.

4.2.17. Familie 17

Die Eltern des Indexpatienten 17-1 waren verwandt. Es fand sich bei ihm eine Homozygotie für die *SGLT2*-Mutation **c.1627A>C** bei schwerer Glukosurie bis $92,4 \text{ g}/1,73\text{m}^2/\text{d}$. Bei den Eltern lagen keine Ergebnisse für Glukosewerte im Urin vor.

4.2.18. Familie 18

In Familie 18 wiesen Indexpatient und Vater eine milde Glukosurie mit Werten bis $5,0 \text{ g}/1,73\text{m}^2/\text{d}$ auf. Bei beiden wurde die Mutation **c.313G>A** gefunden, sie waren jeweils heterozygot.

4.2.19. Familie 19

Indexpatient 19-1 zeigte eine wechselnd schwere Glukosurie mit Werten an der Grenze zwischen milder und schwerer Form ($8,0\text{-}16,7 \text{ g}/1,73\text{m}^2/\text{d}$). Es konnte keine Mutation des *SGLT2*-Gens nachgewiesen werden.

4.2.20. Familie 20

Bei Patient 20-1 bestand eine schwere Glukosurie bei einer *compound*-Heterozygotie für die Mutationen **c.1495C>T** und **c.448T>C**. Die Mutation

c.1495C>T kam vom Vater, **c.448T>C** von der Mutter. Beide Elternteile hatten bei quantitativer Bestimmung eine Glukoseausscheidung unterhalb des oberen Normwertes, wobei die Messung der Glukosekonzentration im Urin beim Vater mit der Teststreifenmethode ein positives Ergebnis gezeigt hatte.

4.2.21. Familie 21

Indexpatient 21-1 wies eine milde Glukosurie von 1,2 g/1,73m²/d auf. Bei ihm konnte eine *compound*-Heterozygotie mit den Sequenzveränderungen **c.1359C>A** und **c.1961 A>G** gefunden werden. **c.1359C>A** wurde von dem Vater, **c.1961 A>G** von der Mutter übertragen. Beide Elternteile hatten keine erhöhte Glukoseausscheidung.

4.2.22. Familie 22

In Familie 22 war der Indexpatient heterozygot für **c.1153_63del12**. Die Mutation wurde vom Vater vererbt. Der Indexpatient zeigte eine milde Glukosurie, beim Vater wurde keine Glukose im Urin nachgewiesen.

4.2.23. Familie 23

Bei Indexpatient 23-1 bestand eine milde Glukosurie. Es wurde die Mutation **IVS7+5G>A** auf einem Allel, also im heterozygoten Zustand, nachgewiesen. Die Mutation war von der Mutter auch an die beiden Geschwister übertragen worden. Alle untersuchten Familienmitglieder, die diese Mutation in heterozygoter Form trugen, hatten eine milde Glukosurie mit Werten von 0,75-1,5 g/1,73m²/d.

5. Diskussion

5.1. Bedeutung von SGLT2 auf die Glukoserückresorption

Nachdem die genomische Struktur und Sequenz des menschlichen SGLT2-Transporters beschrieben wurde (Santer et al. 2000), konnten Patienten mit familiärer renaler Glukosurie auf *SGLT2*-Mutationen untersucht werden.

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit insgesamt 21 Sequenzveränderungen des *SGLT2*-Gens bei 23 untersuchten Familien gefunden. Dieser erstmals geführte Mutationsnachweis unterstreicht die wesentliche Bedeutung des SGLT2-Proteins für die renale Glukoserückresorption. Die Ergebnisse bestätigen die Lehrmeinung, dass der Hauptteil der filtrierte Glukose in den Segmenten S1 und S2 des proximalen renalen Tubulussystem vom SGLT2-Transporter reabsorbiert wird (Wright 2001). Zusätzlich zeigen sie, dass andere Natrium-abhängige Transporter nicht soweit hochreguliert werden können, um in der Lage zu sein, ein nicht funktionierendes SGLT2-Protein zu ersetzen.

5.2. Pathogenität der gefundenen *SGLT2*-Sequenzveränderungen

Sequenzveränderungen müssen keinen Einfluss auf die Struktur oder Funktion des Genproduktes haben. Es kann sich bei Sequenzveränderungen aber um Mutationen handeln, die das Genprodukt so verändern, dass es zu einer klinischen Ausprägung von Symptomen kommt.

Idealerweise lässt sich die Aktivität eines veränderten Genprodukts direkt bestimmen, indem das mutierte Gen in eine Zelle eingeschleust und dort transkribiert wird. Kann keine oder nur eine herabgesetzte Enzym- oder Transporteraktivität gemessen werden, ist von einem kausalen Zusammenhang zwischen verändertem Gen und Krankheit auszugehen. Dieses Verfahren wurde bei *SGLT1*-Mutationen erfolgreich angewandt (Wright 1998). Es konnte gezeigt werden, dass auch für einen großen Teil der *missense*-Mutationen von *SGLT1* eher ein verminderter Einbau des Transportproteins in die Zellmembran den wesentlichen pathogenetischen Mechanismus darstellt als die gestörte Transportfunktion des Proteins (Martin et al. 1996). Im Rahmen dieser Untersuchung wurde durch eine Kooperation mit einer anderen

Forschergruppe* versucht *SGLT2* in heterologe Expressionssysteme, nämlich in Frosch-Oozyten (*Xenopus laevis*) und in isolierte Zellmembran-Vesikel einzubringen und die Transportaktivität für Glukose von durch uns identifizierten *SGLT2*-Mutanten zu bestimmen. Dieses gelang jedoch nicht. Es ist vorbeschrieben und bis heute anerkannt, dass diese Methode bei *SGLT2* komplizierter als bei *SGLT1* ist (Kanai et al. 1994, Wright 2001). Es ist unklar, ob zusätzliche posttranslationale Modifikationen benötigt werden, bevor sich *SGLT2* in Oozyten exprimieren lässt. Es wurde gezeigt, dass für *SGLT1* Proteinkinasen für den Membrantransport eine wichtige Rolle spielen (Hirsch et al. 1996), wie diese den Transport von *SGLT2* beeinflussen ist nicht bekannt. Aus diesen Gründen muss die Kausalität der gefundenen *SGLT2*-Mutationen anhand von theoretischen Überlegungen erörtert werden.

Unter anderem wird dafür die Sequenzhomologie eines Gens zu verwandten Genen oder zu dem gleichen Gen bei anderen Spezies betrachtet. Für das *SGLT2*-Gen sind die verwandten Gene *SGLT1* und *SGLT3-SGLT6* bekannt, sowie die *SGLT2* Primärstruktur bei verschiedenen Spezies. Das Computerprogramm Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) reiht Aminosäuresequenzen aneinander und kennzeichnet durch Symbole den Grad der Ähnlichkeit (siehe Anhang 7.6.). Es ist davon auszugehen, dass Veränderungen der Aminosäureabfolge durch eine *missense*-Mutation in einem konservierten, also bei den verschiedenen Genen gleichen Bereich, eine höhere Wirkung erzielen als in einem Bereich, der bei den unterschiedlichen Genen auch unterschiedlich aufgebaut ist.

Viele der in dieser Arbeit gefundenen *SGLT2 missense*-Mutationen liegen in solch einem hoch konservierten Bereich (p.Thr51Pro, p.Arg137His, p.Gly272Arg, p.Lys311Arg und p.Arg499Cys).

Da sich die Genstruktur von *SGLT1* und *SGLT2* sehr ähnelt, können auch Mutationen bei *SGLT1* zum Vergleich herangezogen werden. Bei *SGLT1* sind mehrere Mutationen beschrieben, für die ein direkter Nachweis mittels Messung der Transporteraktivität geführt werden konnte. Liegt nun eine *SGLT2*-

* Prof. Dr. Dan Klaerke, Panum Institut, Universität Kopenhagen, Kopenhagen, Dänemark

Veränderung an einer Stelle für die schon eine *SGLT1*-Mutation beschrieben ist, so kann man auf einen kausalen Zusammenhang schließen.

Homologe Positionen, an denen Mutationen für *SGLT1* als auch für *SGLT2* beschrieben sind, sind *SGLT2* p.Arg137 und p.Arg499 (entsprechend p.Arg140 bzw. p.Arg499 bei *SGLT1*). p.Arg140 wurde in homozygoter Form bei einem Patienten mit Glukose-Galaktose-Malabsorption in unserem Labor nachgewiesen. Die *SGLT1*-Mutation p.Arg499H wurde bei einem klinisch stark beeinträchtigten Patienten mit Glukose-Galaktose-Malabsorption gefunden und es konnte gezeigt werden, dass sowohl Zuckeraffinität als auch Membrantransport stark beeinträchtigt sind (Wright 1998).

Für *SGLT1* wurden mehrere Positionen beschrieben, die für Glukosebindung und -transport entscheidend sind (Diez-Sampedro et al. 2001b, Hirayama et al. 2007). *Missense*-Mutationen von *SGLT2* an solchen Positionen sind p.Gly449Asp, p.Phe453Leu, p.Arg499Cys. In diesem Bereich liegt auch die Mutation p.Trp487Cys Δ 488-506.

Alle *nonsense*-Mutationen und alle Mutationen mit Leserasterverschiebung, aus denen sich ein vorzeitiger Abbruch der Translation ergibt, die im Rahmen dieser Arbeit gefunden wurden (p.Trp440X, p.Gln167HisfsX20, p.Ala169ValfsX18 und p.Met325SerfsX23), betreffen ebenfalls diesen Bereich. Der Abbruch der Proteinsynthese erfolgt spätestens an Position 440. Sollte das unvollständige Genprodukt überhaupt zur Zellmembran transportiert werden, ist mit einer ausgeprägten Funktionseinschränkung zu rechnen.

Auch Veränderungen in Intronbereichen können zu einer Beeinflussung des Genprodukts führen. Mutationen in den für das *splicing* wichtigen Bereichen (*donor*- und *acceptor splice site*) führen zu einem fehlerhaften *splice*-Vorgang. Es kann dazu kommen, dass das *splicen* der Prä-mRNA an einer bestimmten Stelle überhaupt nicht stattfindet (was die Funktion des Genproduktes schwer beeinträchtigen kann, aber nicht muss) oder dass sowohl richtig als auch falsch geschnittene mRNA entsteht, mit der Folge einer verringerten Kopienzahl normaler mRNA und einer verminderten Menge des normalen Genprodukts (Shapiro und Senapathy 1987). Solche Mutationen sind für viele Krankheiten

beschrieben (Krawczak et al. 1992). Für *SGLT2* wurde hier die Mutation IVS7+5G>A gefunden, die zu einem abnormalen *splicing* von Exon 7 führt. Die relativ geringe Glukosurie auch bei homozygoten Patienten wäre gut damit vereinbar, dass eine gewisse Menge normalen Genproduktes noch produziert wird.

5.3. Genotyp-Phänotyp Korrelation

5.3.1. Homozygote oder *compound*-heterozygote Patienten

Alle homozygoten und *compound*-heterozygoten Indexpatienten in dieser Untersuchung wiesen nach unseren Kriterien eine schwere Glukosurie von $> 10 \text{ g}/1,73\text{m}^2/\text{d}$ auf.

Am Beispiel von Indexpatient 01-1, dem ersten beschriebenen Patienten mit renaler Glukosurie Typ 0 (Oemar et al. 1987) zeigt sich, dass eine *nonsense*-Mutation in homozygoter Form dazu führen kann, dass so gut wie keine Glukose rückresorbiert wird. Interessanterweise liegt auch bei Patient 06-1 eine *nonsense*-Mutation homozygot vor. Bei einer im Vergleich zu Patient 01-1 deutlich niedrigeren Glukoseausscheidung muss wohl von einem unbekanntem Glukosereabsorptionsmechanismus ausgegangen werden.

Die homozygoten und *compound*-heterozygoten Patienten mit einer Glukoseausscheidung im Bereich von $10\text{-}50 \text{ g}/1,73\text{m}^2/\text{d}$ trugen zumindest eine Mutation, die eine gewisse Restaktivität von *SGLT2* erklären konnte. Es handelte sich entweder um *missense*-Mutationen oder um die in insgesamt fünf nichtverwandten Familien gefundene *splice-site* Mutation IVS7+5G>A, die wie oben erwähnt, wahrscheinlich die Bildung einer gewissen Menge normaler mRNA erlaubt.

5.3.2 Heterozygote Patienten

Die in dieser Untersuchung identifizierten heterozygoten Patienten und die obligat heterozygoten Familienmitglieder von homozygoten Patienten zeigten bis auf eine Ausnahme (07-1) eine, nach unseren Kriterien, milde Glukosurie von $< 10 \text{ g}/1,73\text{m}^2/\text{d}$.

Auffällig ist aber, dass nicht alle heterozygoten Mitglieder einer Familie mit gleicher Mutation auch zwangsläufig eine erhöhte Glukoseausscheidung

aufwiesen. Es scheint also Faktoren zu geben, die die Glukoseausscheidung in einem nicht unerheblichen Maße zusätzlich beeinflussen können. Hierbei könnte es sich um genetische und nicht-genetische Faktoren handeln.

Trotz der wichtigen Rolle von *SGLT2* sind diese Beobachtungen Hinweise, dass noch andere Gene direkt oder indirekt an der Glukosereabsorption in der Niere beteiligt sein könnten und bei Patienten mit familiärer renaler Glukosurie, für die keine *SGLT2* Mutationen gefunden werden, mutiert sein könnten.

Für die *SGLT*-Genfamilie lässt sich sagen, dass bei unseren Patienten eine Mutation von *SGLT1* ausgeschlossen scheint. *SGLT1* wird zwar auch in der Niere exprimiert, bei keinem der untersuchten Patienten bestanden aber auffällige intestinale Symptome. *SGLT3* fungiert nicht als Glukosetransporter, sondern als Glukose gekoppelter Natriumkanal (Diez-Sampedro et al. 2003). *SGLT4-SGLT6* sind noch nicht soweit untersucht, dass ihre Bedeutung für die renale Glukosereabsorption endgültig geklärt ist.

Ein weiteres Gen für die renale Glukosurie wird als Ergebnis von *linkage* Untersuchungen nahe dem HLA-Lokus auf Chromosom 6 vermutet. Es wurde *GLYS1* genannt (De Marchi et al. 1984), konnte aber nicht näher charakterisiert werden, so dass auch sein Einfluss ungeklärt bleibt.

Es wurden mehrere andere Gene gefunden, bei denen Mutationen zu einer Glukosurie führen können. So sind Patienten beschrieben, die heterozygot für eine *missense*-Mutation im *GLUT2*-Gen sind und eine milde Glukosurie aufweisen (Sakamoto et al. 2000). Ein anderes Beispiel sind Mutationen im *SLC16A12*-Gen, die zu erhöhter Glukoseausscheidung und einer juvenilen Katarakt mit Mikrokornea führen (Kloekener-Gruissem et al. 2008).

5.3.3. Typen der familiären renalen Glukosurie

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit bieten sich auch Erklärungen für die verschiedenen Typen der renalen Glukosurie an, die in den 1950er Jahren des letzten Jahrhunderts definiert wurden (Bradley et al. 1950, Reubi 1954).

Eine verringerte Anzahl von normal funktionierenden *SGLT2*-Transportern sollte zu einer renalen Glukosurie Typ A führen, bei der das Transportmaximum (Tm_G) vermindert ist. Bestimmte *missense*-Mutationen, die eine erniedrigte Affinität des Transporters zum Substrat bedingen, sollten zu einem Typ B der

renalen Glukosurie führen, bei dem das Transportmaximum erst bei höherer Glukose-Konzentration erreicht wird. Um eine genaue Typenzugehörigkeit der jeweils gefundenen Mutation zu bestimmen, müssten jedoch Titrationsstudien durchgeführt werden, die im Rahmen der jetzigen Studie nicht möglich waren und vor dem Hintergrund der Invasivität kaum vertretbar erscheinen. Ohnehin konnten in der Vergangenheit viele Patienten nicht eindeutig einem Typ zugerechnet werden (Brodehl et al. 1987), was zum Beispiel durch eine *compound*-Heterozygotie für verschiedene Mutationstypen bei diesen Patienten verursacht sein könnte.

Relativ klar scheint jedoch die Zuordnung von Patienten mit trunkierenden Mutationen auf beiden Allelen zur renalen Glukosurie Typ 0, bei der so gut wie keine Glukoserückresorption stattfindet. Als typisches Beispiel dafür dient Indexpatient 01-1 (siehe auch Scholl-Bürgi et al. 2004).

5.4. Polymorphismus p.Asn654Ser

Auf eine in dieser Arbeit gefundene Sequenzveränderung soll kurz näher eingegangen werden. Aus der Schwere der Glukosurie in den Familien 13 und 21 lässt sich folgern, dass der Wechsel von Asparagin zu Serin an Position 654 von *SGLT2* zu keiner wesentlichen Funktionseinschränkung im Glukosetransport führt. Hierfür spricht auch, dass er in einer Region des Proteins liegt, die für *SGLT1* keine essentielle Funktion besitzt; ein Fehlen der transmembranen Region 14 am C-terminalen Ende des Transportproteins hat bei verschiedenen Proteinen zu keinen Änderungen der Transporteigenschaften geführt (Turk und Wright 1997). Außerdem konnte p.Asn654Ser in unserem Labor bei einem von 80 Chromosomen aus anonymen Blutproben nachgewiesen werden (*Ergebnisse nicht gezeigt*), wobei wir allerdings keine Information über eine eventuell Glukosurie haben. Aus diesen Gründen gehen wir davon aus, dass es sich bei p.Asn654Ser um einen Polymorphismus handelt.

5.5. Unklare Ergebnisse

Nicht alle Patienten lassen sich in die unter 5.3. diskutierte Einteilung fassen. Bei Indexpatient 07-1 konnte bei einer Glukoseausscheidung von

20,8 g/1,73m²/d nur eine Mutation im *SGLT2*-Gen nachgewiesen werden, bei den Indexpatienten 14-1 und 19-1 wurde trotz einer Glukosurie von 2,8 bzw. 8,0 - 16,7 g/1,73m²/d keine Mutation gefunden. Dies kann eine Folge von technischen Problemen sein, wogegen allerdings spräche, dass bei beiden die Sequenzierung der gesamten kodierenden Sequenz in einem unabhängigen PCR-Produkt wiederholt wurde und keine weiteren Mutationen zeigte. Allerdings gibt es *SGLT2*-Mutationen, die mit der hier angewandten PCR-basierten Technik nicht nachgewiesen werden können. Dies gilt zum Beispiel für Veränderungen in der Promoterregion oder tief in Introns, für längerstreckige Deletionen oder für Punktmutationen im Bereich der Primeranbindung. Es ist auch möglich, dass bei den Patienten, bei denen keine *SGLT2*-Mutation zu finden war, eine Mutation eines anderen Gens vorliegt, wie unter 5.3.2. diskutiert.

5.6. Vererbungsmodus der familiären renalen Glukosurie

Aufgrund der Ergebnisse dieser Untersuchung lassen sich mehrere Aussagen über den Vererbungsmodus der familiären renalen Glukosurie treffen. Da *SGLT2* auf Chromosom 16 liegt, handelt es sich um einen autosomalen Erbgang.

Bei den Indexpatienten mit einer Glukoseausscheidung >10 g/1,73m²/d sind entsprechend unserer Untersuchungen in der Regel jeweils beide Allele von *SGLT2* mutiert. Diese Individuen zeigen eine hohe Variabilität ihrer biochemischen Merkmale, so dass man von unterschiedlicher Expressivität sprechen kann. Die jeweiligen Eltern mit nur einem veränderten Allel zeigen phänotypisch keine schwere Form der renalen Glukosurie; keiner hat eine Glukosurie >10 g/1,73m²/d. Damit liegt für die schwere Form der familiären renalen Glukosurie ein autosomal rezessiver Erbgang vor. Dies entspricht den Einordnungen vorangegangener Arbeiten (Khachadurian und Khachadurian 1964, Elsas und Rosenberg 1969).

Bei der milden Form findet sich dagegen bei den Indexpatienten in den allermeisten Fällen nur ein mutiertes Allel. Bei einem rein dominanten Erbgang würde man eine Glukoseausscheidung >0,32 g/1,73m²/d bei jedem heterozygotem Individuum fordern. Da die klinische Ausprägung der heterozygot

Betroffenen aber, wie unter 5.3.2. diskutiert, sehr variabel ist und einzelne Individuen auch gar nicht betroffen sind, muss man für die milde Form der familiären renalen Glukosurie von einem autosomal-dominanten Erbgang mit variabler Penetranz sprechen. Da in der ersten Arbeit über die Vererbung der familiären renalen Glukosurie nur Patienten mit milder Glukosurie untersucht wurden (Hjärne 1927), erklärt dies auch die damalige Einordnung als angeborene Störung mit dominantem Erbgang .

In Fällen, in denen sowohl Heterozygote und Homozygote sich phänotypisch vom Wildtyp unterscheiden und untereinander auch eine Differenz im klinischen Erscheinungsbild besteht, kann man von einer kodominanten Vererbung sprechen. Für die familiäre renale Glukosurie als Gesamtgruppe besteht also ein autosomal-kodominanter Vererbungsmodus mit variabler Penetranz.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden 25 Indexpatienten aus 23 Familien mit familiärer renaler Glukosurie auf Mutationen des *SGLT2*-Gens untersucht. Dafür wurden alle Exons und die jeweils flankierenden Intronregionen von *SGLT2* mittels PCR amplifiziert und dann nach der Kettenabbruchsmethode sequenziert. Gefundene Sequenzveränderungen wurden über eine Heteroduplexbildung oder durch Restriktionsenzymverdau bestätigt.

Ein Zusammenhang zwischen familiärer renaler Glukosurie und dem tubulären Transporter SGLT2 wurde erstmals gezeigt. Bei 23 Indexpatienten wurden insgesamt 21 verschiedene Mutationen gefunden. Davon traten die meisten nur in einzelnen Familien auf. Ausnahmen waren eine *splice-site* Mutation, die in fünf verschiedenen Familien, und eine 12 Basenpaare betreffende Deletion, die in zwei Familien, nachgewiesen wurden. Dreizehn Indexpatienten waren homozygot oder *compound*-heterozygot für eine *SGLT2*-Mutation. Dies war assoziiert mit einer schweren Glukosurie mit einer Ausscheidung von 14,6 - 202 g/1,73m²/d. Bei den Indexpatienten mit einer milden Glukosurie <10 g/1,73m²/d fand sich jeweils nur ein mutiertes Allel. Die heterozygoten Familienmitglieder von FRG-Patienten zeigten eine maximale renale Glukoseausscheidung von 4,8 g/1,73m²/d. Bei mehreren von ihnen lag die Glukoseausscheidung aber im Normbereich.

Zusammenfassend können wir feststellen, dass durch die Ergebnisse dieser Arbeit erstmals gezeigt werden konnte, dass SGLT2 eine wesentliche Rolle bei der tubulären Rückresorption filtrierter Glukose spielt. Hinsichtlich der gefundenen *SGLT2* Mutationen fand sich eine deutliche Genotyp-Phänotyp-Korrelation, die Schweregrad der Glukosurie und vermutlich auch den in Titrationsstudien bestimmten Subtyp einer familiären renalen Glukosurie gut erklären kann. Es fanden sich allerdings einzelne Patienten mit familiärer renaler Glukosurie, bei denen der gefundene *SGLT2*-Genotyp nicht alle Phänomene erklärt, so dass die Rolle anderer Glukosetransporter am Nierentubulussystem offen bleibt. Die gefundenen Ergebnisse beschreiben die familiäre renale Glukosurie als angeborene autosomal-kodominante Störung mit unterschiedlicher Penetranz.

7. Anhang

7.1. Material- und Geräteliste

Gerät/Material	Typ	Hersteller	Ort
Agarose (Abdichtung)	Agarose Typ I	Sigma	Steinheim
BPL	100bp DNA Ladder	MBI Fermentas	Wilna, Litauen
Brutschrank	NUAIRE U AUTOFLOW	Zapf	Sarstedt
Elektrophoresekammer	Model S2	Gibco BRL	Eggenstein
Elektrophoresekammer	Multiphor II	Pharmacia Biotech	Freiburg
Entwicklungsmaschine	Agfa Crurix 60	Agfa Gevaert	Hamburg
Eppendorf-Cups	1,5 ml	Eppendorf	Hamburg
Filterpapier	3 mm Chr 58x68 cm	Whatman	Maidstone, England
Glasplatten für PAGE	26 x 12 x 0,5 cm	Hampe	Kiel
Glasplatten für Sequenzierung	35 X 40 X 1,0 cm	Hampe	Kiel
Kämme	0,4 mm Sharktooth	Gibco-BRL	Eggenstein
Kühlgerät	Kryo Thermostat WK 5	COLORA Messtechnik	Lorch
Pipetten	Eppendorf Reference	Eppendorf	Hamburg
Pipettenspitzen	1 µl – 1 ml	Eppendorf	Hamburg
Power Supply	PS 9009	Gibco BRL	Eggenstein
Röntgenfilme	X-Omat AR	Kodak	New York, USA
Schüttler	KL 2	Bühler	Tübingen
Platzhalter	0,4 mm	Gibco-BRL	Eggenstein
Spannungswandler	EPS 3500	Pharmacia	Freiburg
Sterilfilter	0,22 µm	Millipore	Eschborn
Thermocycler	Trio	Biometra	Göttingen
Trägerfolie	Gelbond PAG	FMC	Rockland, USA
Wasserbad	Lauda CS 20	mgw	Lauda
Zentrifuge	Rotanta/K	Hettich	Tuttlingen

7.2. Rezepte

7.2.1. DNA-Isolierung

RCLB

Tris 2 M pH 7,5	10,00 mM	Merck
NaCl 3 M	12,45 mM	Merck
MgCl ₂ 1 M	0,50 mM	Merck

TNE 10x pH 7,6

Tris	0,10 M	Merck
NaCl	0,15 M	Merck
EDTA	0,01 M	Merck
SDS 20%	0,01% (w/v)	BioRad

Lithiumchlorid

LiCl	4 M	Merck
------	-----	-------

Proteinase K

Proteinase K		Sigma
--------------	--	-------

TE pH 7,6

Tris	10 mM	Sigma
EDTA	0,01 M	Merck

7.2.2. PCR

10x Cetus

Tris 1 M	100 mM	Sigma
MgCl ₂ 100 mM	15 mM	Merck
KCl 1 M	500 mM	Merck
Gelatine 2%	0,01% (v/v)	BioRad
pH 8,3 mit 1n HCl	ad 100ml	Merck
Sterifiltration durch 0,2 µm		Millipore

PCR-Ansatz

10x Cetus	10% (v/v)	s. oben
MgCl ₂	1,0 mM	Gibco
dNTPs	0,2 mM	Pharmacia
Primer Sn	2 ng/µl	Eurogentec
Primer Asn	2 ng/µl	Eurogentec
Taq-Polymerase	2 U	Gibco
Aqua dest.	ad 100 µl	
Mineralöl	3 Tropfen	Sigma

7.2.3. Polyacrylamidgel

PA Gel 6%

Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lsg. 30%	6,00 % (v/v)	Roth
Glycerin	7,00 % (v/v)	Sigma
Tris/Sulfat-Puffer 1 M pH 9,0	3,33 % (v/v)	Sigma
APS	2,00 % (v/v)	Sigma
TEMED	0,05 % (v/v)	Sigma
Aqua dest.	ad 20 ml	

7.2.4. Elektrophorese

TrisBorat pH 9,0

Tris	0,14 M	Merck
Borsäure	0,07 M	Merck

7.2.5. Silberfärbung

Ethanol

Ethanol absolut p.a.	10% (v/v)	Merck
----------------------	-----------	-------

Salpetersäure

HNO ₃	1% (v/v)	Merck
------------------	----------	-------

Silbernitrat

AgNO ₃	10 mM	Merck
-------------------	-------	-------

Reduktionslösung

Na ₂ CO ₃ wasserfrei	280 mM	Merck
Formalin 37%	0,02% (v/v)	Merck

Essigsäure

Essigsäure 100% p.a.	10% (v/v)	Merck
----------------------	-----------	-------

7.2.6. Agarose-Gel

TBE-Puffer pH 8,0

Tris	89 mM	Sigma
Borsäure	89 mM	Merck
EDTA	2 mM	Merck

Agarose-Gel

Agarose	2,4 g	Sigma
TBE-Puffer	300 ml	siehe oben
Ethidiumbromid	12 µl	Merck

7.2.7. DNA-Reinigung

TE pH 7,6

Tris	10 mM	Sigma
EDTA	0,01 M	Merck

Purification Kit

EasyPure DNA Purification Kit	Biozym
-------------------------------	--------

7.2.8. Sequenzierung

TTE 20x

Tris	1,78 M	Sigma
Taurin	0,58 M	Merck
EDTA	0,01 M	Merck

Sequenziergel

Urea	7,0 M	FMC
LongRanger 50%	6,0% (v/v)	FMC
Stock-Lösung		
20x TTE	1,2% (v/v)	s. oben
DMSO	1,0% (v/v)	Merck
TEMED	0,07% (v/v)	Sigma
APS 10%	0,07% (v/v)	Sigma
Aqua dest.	ad 75 ml	

Sequenzieransatz

PCR-Produkt	2-4 µl	
Primer	1 µl (1:7)	
Aqua dest.	10-12 µl	
ThermoSequenase Kit		Amersham

Stop solution

Stop solution		New England Biolabs
---------------	--	---------------------

7.2.9. Klonierung

Nährlösung

Bactotryptone	1% (w/v)	Merck
Hefe	0,5% (w/v)	Merck
Ampicillin		Roth
X-Gal	20 mg/ml	Fermentas
IPTG	100 mM	Fermentas
NaCl ad 1000ml pH 7,5	0,17 M	Sigma

Klonierkit

Cloning Kit	PCR-Script® Amp SK(+)	Stratagene
-------------	-----------------------	------------

7.2.10. Minipräparation

GETL-Lösung

Glukose	50 mM	Roth
EDTA	10 mM	Merck
Tris	25 mM	Sigma
Lysozym	0,4% (w/v)	Merck

Natronlauge/SDS

0,2 N NaOH		Merck
SDS 20%	5,00% (w/v)	BioRad

Kaliumazetatlösung

Kaliumazetat	3 M	Sigma
Eisessig	5 M	Sigma

Phenol/Chloroform-Extrakt pH 8,0

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	25:24:1 % (v/v/v)	Sigma
Tris	10 mM	Sigma
EDTA	1 mM	Sigma

Ethanol

Ethanol absolut p.a.	96% (v/v)	Merck
Ethanol absolut p.a.	70% (v/v)	Merck

TE pH 7,6

Tris	10 mM	Sigma
EDTA	0,01 M	Merck

7.3. Restriktionsenzyme

Enzym	Puffer	Temp.	Hersteller
<i>Alw</i> N I	NEB 4	37°C	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Ban</i> II	NEB 4	37°C	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Bgl</i> I	NEB 2	37°C	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Bst</i> N I	NEB 3 / BSA	60°C	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Bst</i> U I	NEB 2	60°C	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Dde</i> I	NEB 3	37°C	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Hind</i> II	SuRE/Cut Buffer M	37°C	Roche, Mannheim
<i>Mnl</i> I	NEB 2 / BSA	37°C	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Mse</i> I	NEB 2 / BSA	37°C	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Msp</i> A1 I	NEB 4 / BSA	37°C	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Msp</i> I	Tango	37°C	Fermentas, St.-Leon-Rot
<i>Nae</i> I	NEB 1	37°C	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Nla</i> III	NEB 4 / BSA	37°C	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Not</i> I	Incubation Buffer H	37°C	Roche, Mannheim
<i>Rsa</i> I	NEB 1	37°C	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Sph</i> I	NEB 2	37°C	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Taq</i> I	NEB 3 / BSA	65°C	New England Biolabs, Frankfurt

7.4. SGLT2 cDNA

GenBank accession no. AF307340 (Start- und Stopcodon sind **fett** und unterstrichen)

```
1      ATGGAGGAGC ACACAGAGGC AGGCTCGGCA CCAGAGATGG GGGCCCAGAA
51     GGCCCTGATT GACAATCCTG CTGACATCCT AGTCATTGCT GCATATTTCC
101    TGCTGGTCAT TGGCGTTGGC TTGTGGTCCA TGTGCAGAAC CAACAGAGGC
151    ACTGTGGGCG GCTACTTCCT GGCAGGACGC AGCATGGTGT GGTGGCCGGT
201    TGGGGCCTCT CTCTTCGCCA GCAACATCGG CAGTGGCCAC TTTGTGGGCC
251    TGGCAGGGAC TGGCGCTGCA AGTGGCTTGG CTGTTGCTGG ATTCGAGTGG
301    AATGCGCTCT TCGTGGTGCT GCTACTGGGC TGGCTGTTTG CACCCGTGTA
351    CCTGACAGCG GGGGTCATCA CGATGCCACA GTACCTGCGC AAGCGCTTCG
401    GCGGCCGCCG CATCCGCCTC TACCTGTCTG TGCTCTCCCT TTTCTGTAC
451    ATCTTCACCA AGATCTCAGT GGACATGTTC TCCGGAGCTG TATTCATCCA
501    GCAGGCTCTG GGCTGGAACA TCTATGCCTC CGTCATCGCG CTTCTGGGCA
551    TCACCATGAT TTACACGGTG ACAGGAGGGC TGGCCGCGCT GATGTACACG
601    GACACGTAC  AGACCTTCGT CATTCTGGGG GCGCCTGCA  TCCTCATGGG
651    TTACGCCTTC CACGAGGTGG GCGGGTATTC GGTCTCTTC  GACAAATACC
701    TGGGAGCAGC GACTTCGCTG ACGGTGTCCG AGGATCCAGC CGTGGGAAAC
751    ATCTCCAGCT TCTGCTATCG ACCCCGGCCC GACTCCTACC ACCTGCTCCG
801    GCACCCCGTG ACCGGGGATC TGCCGTGGCC CGCGCTGCTC CTCGGACTCA
851    CAATCGTCTC GGGCTGGTAC TGGTGCAGCG ACCAGGTCAT CGTGCAGCGC
901    TGCCTGGCCG GGAAGAGCCT GACCCACATC AAGGCGGGCT GCATCCTGTG
951    TGGGTACCTG AAGCTGACGC CCATGTTTCT CATGGTCATG CCAGGCATGA
1001   TCAGCCGCAT TCTGTACCCA GACGAGGTGG CGTGCGTGGT GCCTGAGGTG
1051   TGCAGGCGCG TGTGCGGCAC GGAGGTGGGC TGCTCCAACA TCGCCTACCC
1101   GCGGCTCGTC GTGAAGCTCA TGCCCAACGG TCTGCGCGGA CTCATGCTGG
1151   CGGTCATGCT GGCCGCGCTC ATGTCCTCGC TGGCCTCCAT CTTCAACAGC
1201   AGCAGCACGC TCTTCACCAT GGACATCTAC ACGCGCCTGC GGCCACGCGC
1251   CGGCGACCGC GAGCTGCTGC TGGTGGGACG GCTCTGGGTG GTGTTCATCG
1301   TGGTAGTGTC GGTGGCCTGG CTTCCCCTGG TGCAGGCGGC ACAGGGCGGG
1351   CAGCTCTTCG ATTACATCCA GGCAGTCTCT AGCTACCTGG CACCGCCCGT
1401   GTCCGCCGTC TTCGTGCTGG CGCTCTTCGT GCCGCGCGTT AATGAGCAGG
1451   GCGCCTTCTG GGGACTCATC GGGGGCCTGC TGATGGGCCT GGCACGCCTG
1501   ATTCCCAGAGT TCTCCTTCGG CTCGGGCAGC TGTGTGCAGC CCTCGGCGTG
1551   CCCAGCTTTC CTCTGCGGCG TGC ACTACCT CTACTTCGCC ATTGTGCTGT
1601   TCTTCTGCTC TGGCCTCCTC ACCCTCACGG TCTCCCTGTG CACCGCGCCC
1651   ATCCCCAGAA AGCACCTCCA CCGCCTGGTC TTCAGTCTCC GGCATAGCAA
1701   GGAGGAACGG GAGGACCTGG ATGCTGATGA GCAGCAAGGC TCCTCACTCC
1751   CTGTACAGAA TGGGTGCCCA GAGAGTGCCA TGAGATGAA  TGAGCCCCAG
1801   GCCCCGGCAC CAAGCCTCTT CCGCCAGTGC CTGCTCTGGT TTTGTGGAAT
1851   GAGCAGAGGT GGGGTGGGCA GTCCTCCGCC CTTACCCAG  GAGGAGGCAG
1901   CGGCAGCAGC CAGGCGGCTG GAGGACATCA GCGAGGACCC GAGCTGGGCC
1951   CGTGTGGTCA ACCTCAATGC CCTGCTCATG ATGGCAGTGG CCGTGTTCCT
2001   CTGGGGCTTC TATGCCTAA
```


7.5. SGLT2 Aminosäuresequenz

GenBank accession no. AF307340

```
1   MEEHTEAGSA PEMGAQKALI DNPADILVIA AYFLLVIGVG LWSMCRITNRG
51  TVGGYFLAGR SMVWWPVGAS LFASNIGSGH FVGLAGTGAA SGLAVAGFEW
101 NALFVVLLLG WLFAPVYLTA GVITMPQYLR KRFGGRRIRL YLSVLSLFLY
151 IFTKISVDMF SGAVFIQQAL GWNIYASVIA LLGITMIYTV TGGLAALMYT
201 DTVQTFVILG GACILMGYAF HEVGGYSGLF DKYLGAATSL TVSEDPVGN
251 ISSFCYRPRP DSYHLLRHPV TGDLPWPALL LGLTIVSGWY WCDQVIVQR
301 CLAGKSLTHI KAGCILCGYL KLTPMFLMVM PGMISRILYP DEVACVVPEV
351 CRRVCGTEVG CSNIAYPRLV VKLMPNGLRG LMLAVMLAAL MSSLASIFNS
401 SSTLFTMDIY TRLRPRAGDR ELLLVGRLWV VFIVVSVAV LPVVQAAQGG
451 QLFDYIQAVS SYLAPPVSAV FVLALFVPRV NEQGAFWGLI GLLMGLARL
501 IPEFSFGSGS CVQPSACPAF LCGVHYLYFA IVLFFCSGLL TLTVSLCTAP
551 IPRKHLHRLV FSLRHSKEER EDLDADEQQG SSLPVQNGCP ESAMEMNEPQ
601 APAPSLFRQC LLWFCGMSRG GVGSPPLTQ EEAAAAARRL EDISEDPSWA
651 RVVNLNALLM MAVAVFLWGF YA
```

7.6. Sequenz-Vergleiche mit dem Programm ClustalW 2.0.8.

(Thompson et al. 1994, Larkin et al. 2007)

Die jeweiligen Aminosäuresequenzen sind der Aminosäurendatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, Maryland, USA entnommen. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Protein>)

Legende:

- * Identische Aminosäuren
- : Hohe Ähnlichkeit der physiko-chemikalischen Eigenschaften der korrespondierenden Aminosäuren
- . Geringere Ähnlichkeit der physiko-chemikalischen Eigenschaften der korrespondierenden Aminosäuren

7.6.1. SGLT1-SGLT6

```
SGLT2 -MEEHTEAGSAPEMG----AQKALIDNPADILVIAAYFLLVIGVGLWSMCRNTNRGTVGGY 55
SGLT1 MDSSTWSPKTTAVTR--PVETHELIRNAADISIIIVYFVVVMAVGLWAMFSTNRGTVGGF 58
SGLT3 -MASTVSPSTIAETPE-PPPLSDHIRNAADISVIVYFVFLVMAVGLWAMLKTNRGTIGGF 58
SGLT4 MGPASGDGVRTEAPHIALDSRVGLHAYDISVVVIYFVFIYAVGIWSSIRASRGTIGGY 60
SGLT5 MAANSTSDLHTPGTQ-----LSVADIIIVITVYFALNVAVGIWSSCRASRNTVNGY 50
SGLT6 -MESGTSPPQPPQLDP-LDAFPQKGLEPGDIAVLVLYFLFVLAAGLWSTVKTKRDTVKGY 58
      .                               ** :. ** . :.***: :. :.*:*: *:
```



```
SGLT2 FLAGRSMVWVWVPGASLFASNIGSGHFVGLAGTGAASGLAVAGFEWN----- 101
SGLT1 FLAGRSMVWVWVPGASLFASNIGSGHFVGLAGTGAASGLAIGGFEWN----- 104
SGLT3 FLAGRDMAWWVWVPGASLFASNIGSNHYVGLAGTGAASGVATVTFEWT----- 104
SGLT4 FLAGRSMVWVWVPGASLMSSNVGSGFLVGLAGTGAAGGLAVGGFEWNMRKSRSGGDRGIHP 120
SGLT5 FLAGRDMTWWVWVPGASLFASSEGSGFLVGLAGSGAAGGLAVAGFEWN----- 96
SGLT6 FLAGGDMVWVWVPGASLFASNVGSGHFVGLAGSGAATGISVSAYELN----- 104
      **** . * ***:****:.*. **. :****:*** *:: :* .
```



```
SGLT2 -----ALFVVLLLGWLFAPVYLTAGVITMPQYLKRFRGGRRIRLYSVLSLFLY 150
SGLT1 -----ALVLVVVLGWLFVPIYIKAGVVTMPEYLRKRFGGQRIQVYLSLLSLLLY 153
SGLT3 -----SSVMLLILGWIFVPIYIKSGVMTMPEYLRKRFGGERLQVYLSILSLFIC 153
SGLT4 RSHGRTGVRSQATWLLLALGWVFPVYIAAGVVTMPQYLKRFRGGQRIQVYMSVLSLILY 180
SGLT5 -----ATYVLLALAWVFPVPIYISSEIVTLPEYIQKRYGGQIRIMYLSVLSLILY 145
SGLT6 -----GLFSVLMMLAWIFLPIYIAGQVTTMPEYLRKRFGGIRIPIILAVLYLFIY 153
      . :. :.*:* *:*: . : *****:*** ** : : : : * *:
```



```
SGLT2 IFTKISVDMFSGAVFIQQALGWNIIYASVIALLGITMIYTVTGGLAALMYTDTVQTFVILG 210
SGLT1 IFTKISADIFSGAIFINLALGLNLYLAI FLLLAITALY TITGGLAAVIYTDLTQTVIMLV 213
SGLT3 VVLLISADIFAGAI FIKLALGLDLYLAI FILLAMTAVYTTGGLASVIYTDLTQTIIMLI 213
SGLT4 IFTKISTDIFSGALFIQMALGWNLYLSTGILLVVTAVYTIAGGLMAVIYTDALQTVIMVG 240
SGLT5 VFTKISLDLYAGALFVHICLGNFYLSITLITGITALYTIAGGLAAVIYTDALQTLIMVV 205
SGLT6 IFTKISVDMYAGAI FIIQQSLHLDLYLAI VGLLAI TAVYTVAGGLAAVIYTDALQTLIMLI 213
      :. ** * : : : : : : . * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : :
```


7.6.2. SGLT2 bei verschiedenen Spezies

MENSCH	MEEHTEAGSAPEMGAQKALIDNPADILVIAAYFLLVIGVGLWSMCRNRTNRGTVGGYFLAGR	60
RHESUSAFFE	MEEHTEAGSAPELGAQRALIDNPADILVIAAYFLLVIGVGLWSMCRNRTNRGTVGGYFLAGR	60
MAUS	MEQHVEAGSE--LGEQKVLIDNPADILVIAAYFLLVIGVGLWSMFRNRTNRGTVGGYFLAGR	58
RATTE	MEGHVEEGSE--LGEQKVLIDNPADILVIAAYFLLVIGVGLWSMFRNRTNRGTVGGYFLAGR	58
HUND	MEEHTEAGSVPGPNQKVLINNSADILVIAAYFLLVIGVGLWSMCRNRTNRGTVGGYFLAGR	60
KANINCHEN	MEEHMEAGSRLGLGDHGALIDNPADIAVIAAYFLLVIGVGLWSMCRNRTNRGTVGGYFLAGR	60
STIER	MEEHTEAGSAPVLGEQKALIDNPADILVIAAYFLLVIGVGLWSMCRNRTNRGTVGGYFLAGR	60
ZEBRAFISCH	-----MEN-----TTAKHVTINNAADISV I IYFLVVIAGVWSTFRNRTNRGTVGGYFLAGR	51
FORELLE	-----MENHTSETTPATRTINNLADILV I IGYFILVIGVWVSMFRNRTNRGTVGGYFLAGR	55
DORNHAI	-MKASVSPSTSTSPSQTVAINNAADISV I IYFVFLVIAVGLWSMHRNTRATVGGYFLAGR	59
	: *** ** **:*** **:* ** **	
MENSCH	SMVWVPGASL FASNIGSGHFVGLAGTGAASGLAVAGFEWNALFVVLGWLFPVYLTA	120
RHESUSAFFE	SMMWVPGASL FASNIGSGHFVGLAGTGAASGLAVAGFEWNALFVVLGWLFPVYLTA	120
MAUS	SMVWVPGASL FASNIGSGHFVGLAGTGAASGLAVAGFEWNALFVVLGWLFPVYLTA	118
RATTE	SMVWVPGASL FASNIGSGHFVGLAGTGAASGLAVAGFEWNALFVVLGWLFPVYLTA	118
HUND	SMVWVPGASL FASNIGSGHFVGLAGTGAASGLAVAGFEWNALFVVLGWLFPVYLTA	120
KANINCHEN	SMVWVPGASL FASNIGSGHFVGLAGTGAANGLAVAGFEWNALFVVLGWLFPVYLTA	120
STIER	NMVWVPGASL FASNIGSGHFVGLAGTGAASGLAVAGFEWNALFVVLGWLFPVYLTA	120
ZEBRAFISCH	TMVWVPGTSL FASNIGSGHFVGLAGTAAASGIAVGGFEWNALFIVLLGWVFPVYLTA	111
FORELLE	TMTWVPGASL FASNIGSGHFVGLAGTGAASGIAVGGFEWNALFIVLLGWVFPVYLTA	115
DORNHAI	DMRWVTVGASL FASNIGSGHFVGLAGTGAANGLAVGGFEWNALFVVLGWLFPVYLTA	119
	* * : ** :***** ** * : ** :***** :***** : * .*****	
MENSCH	GVITMPQYLKRKRFGGRRIRLYLSVLSFLY IFTKISVDMFSGAVFIQQALGWN IYASVIA	180
RHESUSAFFE	GVITMPQYLKRKRFGGRRIRLYLSVLSFLY IFTKISVDMFSGAVFIQQALGWN IYASVIA	180
MAUS	GVITMPQYLKRKRFGGHRIRLYLSVLSFLY IFTKISVDMFSGAVFIQQALGWN IYASVIA	178
RATTE	GVITMPQYLKRKRFGGRRIRLYLSVLSFLY IFTKISVDMFSGAVFIQQALGWN IYASVIA	178
HUND	GVITMPQYLKRKRFGGHRIRLYLSVLSFLY IFTKISVDMFSGAVFIQQALGWN IYASVIA	180
KANINCHEN	GVITMPQYLKRKRFGGHRIRLYLSVLSFLY IFTKISVDMFSGAVFIQQALGWN IYASVIA	180
STIER	GVITMPQYLKRKRFGGHRIRLYLSVLSFLY IFTKISVDMFSGAVFIQQALGWN IYASVIA	180
ZEBRAFISCH	GVITMPQYLKRRFGGSRISLYLS I I SFLY IFTKISVDMFSGAVFIQQALGWN IYAVAVIA	171
FORELLE	GVITMPQYLKRRFGGTRISLYLSV I SFLY IFTKISVDMFSGAVFIQQALGWN IYAVAVIA	175
DORNHAI	GVITMPQYLMKRFGGNRIRLYLSL I SLLY IFTKISVDMFSGAIFIQQALGWN IYAVAVIA	179
	***** ** * : ** :***** :***** :***** : * .*****	
MENSCH	LLGITMIYTVTGGLAALMYTDTVQTFVILGGACILMGYAFHEVGGYSGLFDKYLGAATSL	240
RHESUSAFFE	LLGITMIYTVTGGLAALMYTDTVQTFVILGGSCILMGYAFHEVGGYSGLFDKYLRAATSL	240
MAUS	LLGITMIYTVTGGLAALMYTDTVQTFVILAGAFILTYAFHEVGGYSGLFDKYLGAATSL	238
RATTE	LLGITMIYTVTGGLAALMYTDTVQTFVILAGAFILTYAFHEVGGYSGLFDKYLGAATSL	238
HUND	LLGITMIYTVTGGLAALMYTDTVQTFVILGGAFILMGYAFHEVGGYSGLFDKYLGAATSL	240
KANINCHEN	LLGITMIVTVTGGLAALMYTDTVQTFV I IAGAFILTYAFHEVGGYSGLFDKYLGAATSL	240
STIER	LLGITMIYTVTGGLAALMYTDTVQTFV I IAGAFVLMGYAFHEVGGYSGLFDKYLRAVTSL	240
ZEBRAFISCH	LLCITALYTVTGGLAALMYTDTVQTFV I IAGAFVLMGFSFYEVGGYSALLEKYKNSLPSQ	231
FORELLE	LLSITALYTVTGGLAALMYTDTVQTFV I IAGAFSLTGFAFFEVGGYNALLEKYKLALPST	235
DORNHAI	LLIITCIYITITGGLAALMYTDTVQTFV I IAGAFVLMGYSFHEIGGYQALFTKYKDAVPTL	239
	** * * : ** :***** ** * : ** :***** :***** : * .*****	
MENSCH	TVSEDPVGNISSSCYRPRPDSYHLLRHPVTGDLWPALLLGLTIVSGWYWCSDQVIVQR	300
RHESUSAFFE	TVSEDPVGNISSSCYRPRPDSYHLLRHPVTGDLWPALLLGLTIVSGWYWCSDQVIVQR	300
MAUS	TVSKDPVGNISSTCYQPRPDSYHLLRDPVTGDLWPALLLGLTIVSGWYWCSDQVIVQR	298
RATTE	TVSKDPVGNISSTCYQPRPDSYHLLRDPVTGGLPWPALLLGLTIVSGWHWCSQVIVQR	298
HUND	TVSEDPVGNISSSCYRPRPDSYHLLRDPVTGDLWPALLLGLTIVSGWYWCSDQVIVQR	300
KANINCHEN	TVSEDPVGNISSSCYRPRPDSYHLLRDPVTGDLWPALLLGLTIVSGWYWCSDQVIVQR	300
STIER	TVSEDPVGNISSSCYRPRPDSYHLLRDPVTGDLWPALLLGLTIVSSWYWCSDQVIVQR	300
ZEBRAFISCH	TLSLNPNEYNISQHCYMPREDAFHLLRDPVTGDLWPVGFVIFGIAIIGSWYWCSDQVIVQR	291
FORELLE	YQSLEPQRYNISPCFTPREDAFQLLRDPVTGDLWPVGVLFVIFGIAIVGGWYWCSDQVIVQR	295
DORNHAI	HDSLPLRYNISDKCYLPRADSYNLLRDAVTDGLPWPGLIFGITIIGIWFWCSDQVIVQR	299
	* * *** * : ** * :***** ** * :***** :***** : * .*****	

MENSCH CLAGKSLTHIKAGCILCGYLKLTMPFLMVMVPMISRILYPDEVACVVPEVCCRVCGEV 360
RHESUSAFFE CLAGKSLTHIKAGCILCGYLKLTMPFLMVMVPMISRILYPDEVACVVPEVCCRVCGEV 360
MAUS CLAGKNLTHIKAGCILCGYLKLMFPMFLMVMVPMISRILYPDEVACVVPEVCCRVCGEV 358
RATTE CLAGKNLTHIKAGCILCGYLKLMFPMFLMVMVPMISRILYPDEVACVVPEVCCRVCGEV 358
HUND CLAGKNLTHIKAGCILCGYLKLMFPMFLMVMVPMISRILYPDEVACVVPEVCCRVCGEV 360
KANINCHEN CLAGRNLTTHIKAGCILCGYLKLTMPFLMVMVPMISRILYPDEVACVAPEVCCRVCGEV 360
STIER CLAGKNLTHIKAGCILCGYLKLMFPMFLMVMVPMISRVLYPDEVACVVPEVCCRVCGEV 360
ZEBRAFISCH CLAARSLTHVKAGCILCGYLKLLPMFLMVFPGMISRVLYPDDVGCVEKSVCKNVCGEV 351
FORELLE CLAARSLTHVKAGCIMCGYLKLLPMFLMVFPGMISRVLPNEVGCVVPEVCKQVCGEV 355
DORNHAI CLAAKNLTHVKAGCVLCGYIKLLPMYLMVLPGMISRVLYPNEVACVVPEDCKKICGTPV 359
.::****:****:*** **:*:****:*****:***:*** ** .:**** **

MENSCH CSNIAYPRLVVKLMPNGLRGLMLAVMLAALMSSLASIFNSSSTLFTMDIYTRLRPRAGDR 420
RHESUSAFFE CSNIAYPRLVVKLMPNGLRGLMLAVMLAALMSSLASIFNSSSTLFTMDIYTRLRPSAGDR 420
MAUS CSNIAYPRLVVKLMPNGLRGLMLAVMLAALMSSLASIFNSSSTLFTMDIYTRLRPRAGDK 418
RATTE CSNIAYPRLVVKLMPNGLRGLMLAVMLAALMSSLASIFNSSSTLFTMDIYTRLRPRAGDR 418
HUND CSNIAYPRLVVKLMPNGLRGLMLAVMLAALMSSLASIFNSSSTLFTMDIYTRLRPCAGDR 420
KANINCHEN CSNIAYPRLVVKLMPNGLRGLMLAVMLAALMSSLASIFNSSSTLFTMDIYT-LRPRAGEG 419
STIER CSNIAYPRLVVKLMPNGLRGLMLAVMLAALMSSLASIFNSSSTLFTMDIYTRLRPRAGDR 420
ZEBRAFISCH CSNIAYPKLVVSVMPNGLRGLMLAVMLAALMSSLASIFNSSSTLFTMDIWRIRPQARDK 411
FORELLE CSNIAYPKLVVSVMPNGLRGLMLAVMLAALMSSLASIFNSSSTLFTMDIWRFRPQARES 415
DORNHAI CSNIAYPRLVVAMPNGLRGLMLAVMLAALMSSLASIFNSSSTLFTMDIWAIRKASNK 419
*****:*** :**.*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*** :

MENSCH ELLLVGRLWVVFIVVSVAWLPVVQAAQGGQLFDYIQAVSSYLAPPVSAVFLALFVPRV 480
RHESUSAFFE ELLLVGRLWVVFIVVSVAWLPVVQAAQGGQLFDYIQAVSSYLAPPVSAVFLALFVPRV 480
MAUS ELLLVGRLWVVFIVAVSVAWLPVVQAAQGGQLFDYIQSVSSYLAPPVSAVFLALFVPRV 478
RATTE ELLLVGRLWVVFIVAVSVAWLPVVQAAQGGQLFDYIQSVSSYLAPPVSAVFLALFVPRV 478
HUND ELLLVGRLWVVFIVAVSVAWLPVQAAQGGQLFDYIQAVSSYLAPPVSAVFLALFVPRV 480
KANINCHEN ELLLVGRLWVVFIVAVSVAWLPVVQAAQGGQLFDYIQSVSSYLAPPVSAVFLALFVPRV 479
STIER ELLLVGRLWVVFIVAVSVAWLPVVQAAQGGQLFDYIQSVSSYLAPPVSAVFLALFVPRV 480
ZEBRAFISCH ELMVVGRVWILCIVGISTCWIPIVVQAAQSGQLFDYIQSVTSLAPPVIAAVFFLAIFVKRV 471
FORELLE ELMVVGRVWLVIVVAISICWIPVVQAAQSGQLFDYIQSVTSLAPPVIAAVFFLAIFVKRV 475
DORNHAI ELMIVGRVWILCIVVAISIGWIPVVQAAQSGQLFDYIQSITSYLAPPVIAAVVLLGVFVRRV 479
::*** :**.*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*** :

MENSCH NEQGAFWGLIGLLMGLARLIPEFSFGSGSCVQPSACPAFLCGVHYLYFAIVLFFCSGGL 540
RHESUSAFFE NEQGAFWGLIGLLMGLARLIPEFSFGSGSCVQPSACPAFLCGVHYLYFAIVLFLCSGGL 540
MAUS NEKGAFWGLVGGLLMGLARLIPEFFFGSGSCVQPSACPAFLCRVHYLYFAIILFFCSGIL 538
RATTE NEKGAFWGLIGLLMGLARLIPEFFFGSGSCVQPSACPAFLCRVHYLYFAIILFFCSGFL 538
HUND NEKGAFWGLIGLLMGLARLIPEFSYSGSGSCVQPSVCPALLCGMHYLYFAIVLFFCSGGL 540
KANINCHEN NEKGAFWGLIGLLMGLARLIPEFSFGTGSVQPSACPAFLCRVHYLYFAIVLFFCSGGL 539
STIER NEKGAFWGLIGLLMGLARLVPEFSFGSGSCVQPSVCPALLCRVHYLYFAIILFFCSGGL 540
ZEBRAFISCH NESGAFWGLMGGLMGLCRMVPEFVFGSGSCLKPSNCPKVICGVHYLYFAIILFFCTAIL 531
FORELLE NEQGAFWGLMGGLMGLCRMVPEFVFGSGSCLFSDCPTLVCGVHYLYFAVLLFFCTSIL 535
DORNHAI NEPGAFWGLIGGLAMGLCRMIAEFVYGTGSCIFPSSCPFIFCGIHYLHFALFFSCTCLL 539
** *****:*** **.*:*** :***:***:*** ** ** .* :***:***:*** ** :

MENSCH TLTVSLCTAPIPRKHLHRLVFSLRHSKEEREDLDADEQQG-----SSLPVQNGCPESAME 595
RHESUSAFFE TLLVSLCTAPIPRKHLHRLVFSLRHSKEEREDLDADEQEG-----SSLPVQNGCPERAME 595
MAUS TLGISLCTAPIQKHLHRLVFSLRHSKEEREDLDADELEGP-----APAPVQNGGQECAME 594
RATTE TLAISRCTAPIQKHLHRLVFSLRHSKEEREDLDAEELEGP-----APPPVQNGQECAMG 594
HUND TLVISLCTAPIPRKHLHRLVFSLRHSKEEREDLDADEQQG-----SSLPVQNGCPESAME 595
KANINCHEN I IIVSLCTAPIPRKHLHRLVFSLRHSKEEREDLDADELEAP-----ASPPVQNGRPEHAVE 595
STIER TLVVSCTPPAPIPRKHLHRLVFSLRHSKEEREDLDAEELEGP-----TAAPVQNGRPEHAVE 596
ZEBRAFISCH VLFVSYNTPPIDKHLHRLVFTLRHSTEERVDLDWEEERGRKARREADEKRRAKND--E 589
FORELLE VLLVSYCTPAIDDIHLHRLVFSLRHSKEERDDLDWKQEVKGRARREAEKSRDKSE--D 593
DORNHAI VLIISFCTPQIDEKHLHRLVYSLRYSRDERIDL DIVEEAKPKIKTQEEPENGTDDKHPVI 599
: :* * . * **:*:***:***:*** ** ** :

MENSCH MNEPQAPAPSLFRQCLLWFCGMSRGGVGSPPPLTQEEAAAAARRLEDISEDPSWARVVNL 655
RHESUSAFFE MDEPQAPAPSFRRQCLLWFCGMSRGGVGSPPPLTQEEAATAARRLEDISEDPSWARVVNL 655
MAUS MEEVQSPAPGLLRQCLLWFCGMSKSGSGSPPP-TTEEVAATRRLEDISEDPRWARVVNL 653
RATTE IEEVQSPAPGLLRQCLLWFCGMSKSGSGSPPP-TTEEVAATRRLEDISEDPSWARVVNL 653
HUND MNEPQAPAPSLFRQCLLWFCGMSRGGVGSPPPLTQEEAAAAARRLEDISEDPSWARVVNL 655
KANINCHEN MEEPQAPGPGLFRQCLLWFCGMNRGRAGGPAPTQEEAAAAARRLEDINEDPRWSRVVNL 655
STIER MEAPPPRPGLLRQCLLWFCVSRGGVGSPPRPTQEETTAARRLEDISEDPRWARVVNL 656
ZEBRAFISCH DQIERGE-QSIMMKIIGWFCGISDT---QAPEPTEEEVTEASKQLPDISENPLWKNIVNV 645
FORELLE SPVDAEEPKSGICRLIGWFCVSGA---QVPELTEEEVTEASKELPDISEEPFWKHVVDA 650
DORNHAI TVAEPKRKRNVFIRCCSWFCGISSE---PVPEPTEEKVDAMRKMEDISENTFWSTVVNI 656
. : : ****: . * * * . : : : * * . * : * * : * :

MENSCH NALLMMAVAVFLWGFYA 672
RHESUSAFFE NALLMMAVAVFLWGFYA 672
MAUS NALLMMTVAVFLWGFYA 670
RATTE NALLMMTVAVFLWGFYA 670
HUND NALLMMAVAVFLWGFYA 672
KANINCHEN NALLMMAVAMFFWGFYA 672
STIER NALLMMAVATFLWGFYA 673
ZEBRAFISCH NALIMMTVAVYFWGFYA 662
FORELLE NALVMMMAVAVFLWGYA 667
DORNHAI NAIIMCVAIFLWGFYA 673
* * : * * * * : * * : * *

8. Literaturverzeichnis

Aouameur R, Da Cal S, Bissonette P, Coady MJ, Lapointe JY (2007) SMIT2 mediates all myo-inositol uptake in apical membranes of rat small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293:G1300-G1307

Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523

Bradley SE, Bradley GP, Tyson CJ, Curry JJ, Blake WD (1950) Renal function in renal disease. *Am J Med* 9:766-798

Brodehl J, Oemar BS, Hoyer PF (1987) Renal glucosuria. *Pediatr Nephrol* 1:502-508

Brown GK (2000) Glucose transporters: Structure, function and consequences of deficiency. *J Inherit Metab Dis* 23:237-246

Budowie B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC (1991) Analysis of the VNTR locus DIS80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 48:137-144

Calado J, Loeffler J, Sakallioglu O, Gok F, Lhotta K, Barata J, Rueff J (2006) Familial renal glucosuria: SLC5A2 mutation analysis and evidence of salt-wasting. *Kidney Int* 69:852-855

Calado J., Sznajer Y., Metzger D., Rita A, Hogan MC, Kattamis A, Scharf M, Tasic V, Greil J, Brinkert F, Kemper MJ, Santer R (2008) Twenty-one additional cases of familial renal glucosuria: absence of genetic heterogeneity, high prevalence of private mutations and further evidence of volume depletion. *Nephrol Dial Transplant* 23: 3874-3879

Diez-Sampredo A, Eskandari S, Wright EM, Hirayama BA (2001a) Na⁺-to-sugar stoichiometry of SGLT3. *Am J Physiol Renal Physiol* 49:F278-F282

Diez-Sampredo A, Wright EM, Hirayama BA (2001b) Residue 457 controls sugar binding and transport in the Na⁺/Glucose cotransporter. *J Biol Chem* 276:49188-49194

Diez-Sampredo A, Hirayama BA, Osswald C, Gorboulev V, Baumgarten K, Volk C, Wright EM, Koepsell H (2003) A glucose sensor hiding in a family of transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:11753-11758

Dunnen JT den, Antonarakis SE (2001) Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* 109:121-124

Elsas LJ, Rosenberg LE (1969) Familial renal glycosuria: a genetic reappraisal of hexose transport by kidney and intestine. *J Clin Invest* 48:1845-1854

Freitas HS, Anhê GF, Melo KFS, Okamoto MM, Oliveira-Souza M, Bordin S, Machado UF (2008) Na⁺-Glucose transporter-2 messenger ribonucleic acid expression in kidney of diabetic rats correlates with glycemic levels: Involvement of hepatocyte nuclear factor-1 α expression and activity. *Endocrinology* 149:717-724

Hirayama BA, Loo DD, Díez-Sampedro A, Leung DW, Meinild AK, Lai-Bing M, Turk E, Wright EM (2007) Sodium-dependent reorganization of the sugar-binding site of SGLT1. *Biochemistry* 46:13391-13406

Hirsch JR, Loo DDF, Wright EM (1996) Regulation of Na⁺/glucose cotransporter expression by protein kinases in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* 271:14740-14746

Hjärne V (1927) Study of orthoglycaemic glycosuria with particular reference to its hereditability. *Acta Med Scand* 67:422-571

Hutchinson CA, Phillips S, Marshall HE, Giliam S, Jahnke P, Smith M (1978) Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *J Biol Chem* 253:6551-6560

Isaji M (2007) Sodium-glucose cotransporter inhibitors for diabetes. *Curr Opin Investig Drugs* 8:285-292

IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) (1984) Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983. *Biochem J* 219:345-373

Kanai Y, Lee WS, You G, Brown D, Hediger MA (1994) The human kidney low affinity Na⁺/glucose cotransporter SGLT2. Delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose. *J Clin Invest* 93:397-404

Khachadurian AK, Khachadurian LA (1964) The inheritance of renal glycosuria. *Am J Hum Genet* 16:189-194

Kloeckener-Gruissem B, Vandekerckhove K, Nürnberg G, Neidhardt J, Zeitz C, Nürnberg P, Schipper I, Berger W (2008) Mutation of solute carrier SLC16A12 associates with a syndrome combining juvenile cataract with microcornea and renal glucosuria. *Am J Hum Genet* 82:772-779

Krawczak M, Reiss J, Cooper DN (1992) The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* 90:41-54

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948

Mackay RL (1927) Observations on the Renal Threshold for Glucose. *Biochem J* 21:760-764

Majowicz MP, Gonzalez Bosc LV, Albertoni Borghese MF, Delgado MF, Ortiz MC, Sterin Speziale N, Vidal NA (2003) Atrial natriuretic peptide and endothelin-3 target renal sodium-glucose cotransporter. *Peptides* 24:1971–1976

Marble A (1971) Nondiabetic melituria. In: Marble A, White P, Bradley RF, Krall LP (ed) *Joslin's diabetes mellitus*, 11th edition. Lea and Febiger, Philadelphia, pp 818-819

Marchi S de, Cecchin E, Basile A, Proto G, Donadon W, Jengo A, Schinella A, Jus A, Villalta D, Paoli P de, Santini G, Tesio F (1984) Close genetic linkage between HLA and renal glycosuria. *Am J Nephrol* 4:280-286

Martin MG, Turk E, Lostao MP, Kerner C, Wright EM (1996) Defects in Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) trafficking and function cause glucose-galactose malabsorption. *Nat Genet* 12: 216–220

Oemar BS, Byrd DJ, Brodehl J (1987) Complete absence of tubular glucose reabsorption: a new type of renal glucosuria (type 0). *Clin Nephrol* 27:156-160

Oku A, Ueta K, Arakawa K, Kano-Ishihara T, Matsumoto T, Adachi T, Yasuda K, Tsuda K, Ikezawa K, Saito A (2000) Correction of hyperglycemia and insulin sensitivity by T-1095, an inhibitor of renal Na⁺-glucose cotransporters, in Streptozotocin-induced diabetic rats. *Jpn J Pharmacol* 84:351-354

Panayotova-Heiermann M, Loo DDF, Cheng-Te K, Levers JE, Wright EM (1996) Sugar binding to Na⁺/glucose cotransporters is determined by the carboxyl-terminal half of the protein. *J Biol Chem* 271:10029-10034

Pontoglio M, Prié D, Cheret C, Doyen A, Leroy C, Froguel P, Velho G, Yaniv M, Friedlander G (2000) HNF1 α controls renal glucose reabsorption in mouse and man. *EMBO Rep* 1:359-365

Reubi FC (1954) Glucose titration in renal glycosuria. In: Lewis AAG, Wolstenholme GEW (ed) Ciba Foundation Symposium on the Kidney. Little, Brown and Company, Boston, p. 96

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354

Sakamoto O, Ogawa E, Ohura T, Igarashi Y, Matsubara Y, Narisawa K, Inuma K (2000) Mutation Analysis of the GLUT2 Gene in Patients with Fanconi-Bickel Syndrome. *Pediatr Res* 48:586-589

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467

Santer R, Schneppenheim R, Dombrowski A, Götze H, Steinmann B, Schaub J (1997) Mutations in GLUT2, the gene for the liver-type glucose transporter, in patients with Fanconi-Bickel syndrome. *Nat Genet* 17:324-326

Santer R, Kinner M, Schneppenheim R, Hillebrand G, Kemper M, Ehrich J, Swift P, Skovby F, Schaub J (2000) The molecular basis of renal glucosuria: mutations in the gene for a renal glucose transporter (SGLT2). *J Inherit Metab Dis* 23:178 (Abstract)

Santer R, Kinner M, Lassen CL, Schneppenheim R, Eggert P, Bald M, Brodehl J, Daschner M, Ehrich JHH, Kemper M, Li Volti S, Neuhaus T, Skovby F, Swift PGF, Schaub J, Klaerke D (2003) Molecular analysis of the SGLT2 gene in patients with renal glucosuria. *J Am Soc Nephrol* 14:2873-2882

Schmidt C, Höcherl K, Bucher M (2007) Regulation of renal glucose transporters during severe inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol* 292:F804-F811

Scholl-Bürgi S, Santer R, Ehrich JHH (2004) Long-term outcome of renal glucosuria type 0: the original patient and his natural history. *Nephrol Dial Transplant* 19:2394-2396

Seidner G, Alvarez MG, Yeh JI, O'Driscoll KR, Klepper J, Stump TS, Wang D, Spinner NB, Birnbaum MJ, De Vivo DC (1998) GLUT-1 deficiency syndrome caused by haploinsufficiency of the blood-brain barrier hexose carrier. *Nat Genet* 18:188-91

Shapiro MB, Senapathy P (1987) RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: Sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res* 15:7155-7174

Tazawa S, Yamato T, Fujikura H, Hiratochi M, Itoh F, Tomae M, Takemura Y, Maruyama H, Sugiyama T, Wakamatsu A, Isogai T, Isaji M (2005) SLC5A9/SGLT4, a new Na⁺-dependent glucose transporter, is an essential transporter for mannose, 1,5-anhydro-D-glucitol, and fructose. *Life Sci* 76:1039-1050

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680

Turk E, Zabel B, Mundlos S, Dyer J, Wright EM (1991) Glucose/galactose malabsorption caused by a defect in the Na⁺/glucose cotransporter. *Nature* 350:354-356

Turk E, Wright EM (1997) Membrane topology motifs in the SGLT cotransporter family. *J Membrane Biol* 159:1-20

Turner RJ, Moran A (1982) Heterogeneity of sodium-dependent D-glucose transport sites along the proximal tubule: evidence from vesicle studies. *Am J Physiol Renal Physiol* 242:F406-F414

Ueta K, Ishihara T, Matsumoto Y, Oku A, Nawano M, Fujita T, Saito A, Arakawa K (2005) Long-term treatment with the Na⁺-glucose cotransporter inhibitor T-1095 causes sustained improvement in hyperglycemia and prevents diabetic neuropathy in Goto-Kakizaki Rats. *Life Sci* 76:2655-2668

Wells RG, Pajor AM, Kanai Y, Wright EM, Hediger MA (1992) Cloning of a human kidney cDNA with similarity to the sodium-glucose cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol* 263:F459-F465

Wells RG, Mohandas TK, Hediger MA (1993) Localization of the Na⁺/Glucose cotransporter gene SGLT2 to human chromosome 16 close to the centromere. *Genomics* 17:787-789

Wright EM (1998) Genetic disorders of membrane transport I. Glucose galactose malabsorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 275:879-882

Wright EM (2001) Renal Na⁺-glucose cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F10-F18

Wright EM, Turk E (2004) The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch – Eur J Physiol* 447:510-518

Wright EM, Hirayama BA, Loo DF (2007) Active sugar transport in health and disease. *J Intern Med* 261:32-43

You G, Lee WS, Barros EJG, Kanai Y, Huo TL, Khawaja S, Wells RG, Higan SK, Hediger MA (1995) Molecular characteristics of Na⁺-coupled glucose transporters in adult and embryonic rat kidney. J Biol Chem 270: 29365-29371

9. Abkürzungsverzeichnis

ANP	atrial natriuretic peptide
APS	Ammoniumperoxodisulfat
asn	antisense
bp	base pairs
BPL	base pair ladder
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
FRG	Familiäre renale Glukosurie
GETL	Glukose-EDTA-Tris-Lysozym
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GLUT	glucose transporter
HNF1 α	hepatocyte nuclear factor 1 α
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IVS	intervening sequence
kb	Kilobasen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
RCLB	red cell lysis buffer
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	sodium dodecyl sulfate
SGLT	sodium-glucose transporter
SLC16A12	solute carrier family 16 member 12
SLC5A2	solute carrier family 5 member 2
Sn	sense
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin

TNE	Tris-NaCl-EDTA
TNF α	tumor necrosis factor α
TTE	Tris-Taurin-EDTA
UV	Ultraviolett
wt	Wildtyp
X-GAL	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- beta-D-galactopyranoside

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. René Santer für die Überlassung des Themas dieser Dissertation und für seine ausgezeichnete Anleitung und Unterstützung während der gesamten Arbeit.

Dank gilt auch Herrn Professor Dr. med. Schaub und Herrn Professor Dr. med. Schrappe, den Direktoren der Klinik für allgemeine Pädiatrie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel für die Bereitstellung der Arbeitsräume und der Materialien.

Ebenso danken möchte ich allen Mitarbeitern des molekularbiologischen Labors, darunter insbesondere Frau Martina Kaehler, die mir stets eine große Hilfe war.

Vielen Dank auch den Patienten für die Teilnahme an den Untersuchungen und den Einsendern der Proben.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung, die mir mein Studium erst ermöglicht hat.

Meiner Frau und meinen Kindern danke ich für die moralische Hilfe, den Beistand und die gelegentliche Gewährung ruhiger Stunden während der schriftlichen Ausarbeitung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Christoph Lorenz Lassen
Geburtsdatum: 08.10.1976
Geburtsort: Braunschweig
Familienstand: Verheiratet, zwei Kinder

Schulbildung

1983-1989 Grundschole und Orientierungsstufe in Braunschweig
1989-1996 Hoffmann-von-Fallersleben Gymnasium, Braunschweig
08/1993-07/1994 Sam Rayburn High School, Pasadena, Texas, USA
23.05.1996 Abitur

Hochschulbildung

1998-2005 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrecht-Universität zu Kiel
08/2003-04/2004 Auslandsaufenthalt an der University of Utah, Salt Lake City, USA, Vollstipendium des DAAD
04/2005-03/2006 Praktisches Jahr in den Bereichen Chirurgie (Universitätsklinik Kiel), Anästhesie (Universitätsklinik Kiel und Concord Hospital Sydney, Australien), Innere Medizin (Evangelische Diakonissenanstalt Flensburg)

Berufliche Tätigkeit

Seit 08/2005 Assistenzarzt an der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin des Universitätsklinikums Regensburg

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: