

**Beeinflussung des Na<sup>+</sup>-D-Glukose-Kotransporters SGLT1 und der Na<sup>+</sup>-Nukleosidtransporter  
CNT durch Peptidmotive des Regulatorproteins RS1 im Darm**

**Effects of RS1-derived peptides on Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransporter SGLT1 and Na<sup>+</sup>- nucleoside  
cotransporters CNTs in small intestine**



Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences,  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,

Klasse: Biomedizin

Vorgelegt von

Alexandra Friedrich

aus

Dieburg

Würzburg 2015

**Eingereicht am:** .....

Bürostempel

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

**Vorsitzende/r:** Prof. Dr. Michael Sendtner

**1. Betreuer:** Prof. Dr. Hermann Koepsell

**2. Betreuer:** Prof. Dr. Kai Schuh

**3. Betreuer:** Prof. Dr. Bernhard Nieswandt

**Tag des Promotionskolloquiums:** .....

**Doktorurkunden ausgehändigt am:** .....

# Inhaltsverzeichnis

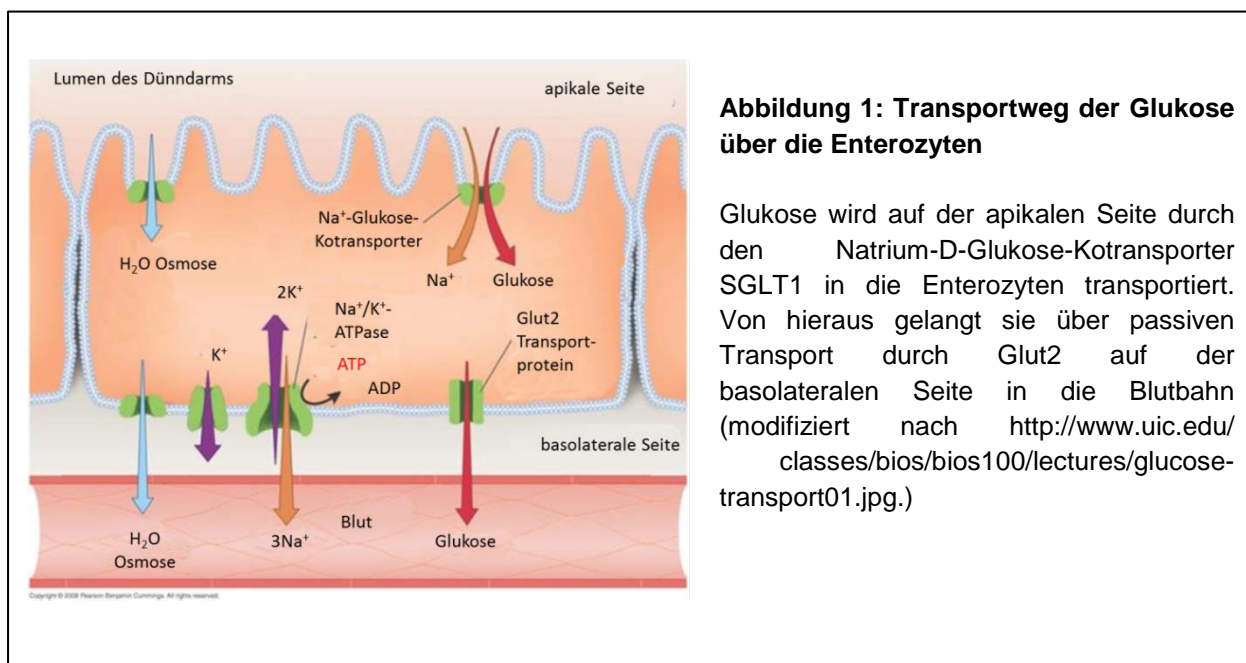
1. Einleitung.....	1
1.1. Der Zuckertransport .....	1
1.2. Der Natrium-D-Glukose Kotransporter SGLT1 .....	2
1.2.1. Regulation des SGLT1 .....	4
1.2.2. Der Einfluss von SGLT1 auf Krankheiten .....	7
1.3. Konzentrierende Nukleosid-Transporter (CNTs).....	8
1.3.1. Struktur des CNT-Proteins.....	10
1.3.2. Regulation der CNTs.....	10
1.3.3. Pharmakologische Relevanz.....	12
1.4. RS1 Protein .....	13
2. Ziel dieser Studie .....	18
3. Materialien und Methoden.....	19
4. Ergebnisse .....	27
4.1. Unterschiede in der AMG-Aufnahme zwischen Wildtyp- und RS1-Knockout-Mäusen (RS1KO-Mäuse).....	27
4.2. Effekte von RS1-Reg des Menschen (hRS1-Reg) und Mutanten von hRS1-Reg auf die Phlorizin-hemmbar Aufnahme von 10µM AMG in den Darm von RS1KO Mäusen .....	29
4.3. Effekte von RS1-Reg der Maus (mRS1-Reg) auf die SGLT1 vermittelte Aufnahme von 10 µM und 1mM AMG in den Darm von RS1KO Mäusen.....	32
4.4. Effekte von mRS1-Reg Mutanten bei denen die Phosphorylierung im QSP Motiv verhindert oder simuliert wurde auf die Regulation von SGLT1 im Darm.....	35
4.5. Effekte von mRS1-Reg Mutanten bei denen die Phosphorylierung im QSP Motiv verhindert oder simuliert wurde auf die Regulation der Nukleosidtransporter (CNTs) im Darm von RS1KO Mäusen.....	37
4.6. Untersuchung von Mutationen in einer weiteren putativen Phosphorylierungsstelle in mRS1-Reg auf die Regulation von SGLT1 im Darm von RS1KO Mäusen unter Niedrigzucker- und Hochzucker-Bedingungen und auf die Regulation von CNTs.....	39
4.7. Effekt der Phosphorylierung des Oktapeptidmotivs SDSDRIEP aus hRS1-Reg auf die Glukose- und Nukleosidaufnahme in den Darm von RS1KO-Mäusen.....	42
4.8. Effekte von RS1-abgeleiteten Tripeptiden auf die Glukoseaufnahme in RS1KO-Mäusen ....	44
4.9. Untersuchung der Position 19 von mRS1-Reg auf die Glukose- und Nukleosid-Aufnahme in Wildtyp- Mäusen.....	47
4.10. Effekt von QAP auf die SGLT1 vermittelte AMG Aufnahme bei Wildtyp-Mäusen unter Niedrigzucker-Bedingungen .....	50
4.11. Versuche, die SGLT1-vermittelte AMG Aufnahme unter Hochzucker-Bedingungen bei Wildtyp-Mäusen durch QEP zu hemmen.....	51
5. Diskussion.....	53

5.1. Phosphorylierungsabhängige Regulation des Na <sup>+</sup> -D-Glukose-Kotransporters (SGLT1) und der Natrium-abhängigen Nukleosidtransporter (CNTs) im Darm der Maus durch die regulatorische Domäne von mRS1 .....	53
5.2. Die regulatorische Domäne des humanen RS1 (hRS1) zeigt im Maussystem keinen regulatorischen Effekt auf den SGLT1 .....	59
5.3. Effekte der Peptidsequenzen QSP und SDSDRIEP auf die Transportaktivitäten von SGLT1 und CNTs .....	59
6. Zusammenfassung.....	62
7. Summary .....	63
8. Abkürzungsverzeichnis .....	64
9. Referenzen .....	68
10. Abbildungsverzeichnis .....	73
11. Lebenslauf .....	75
12. Danksagung .....	77

# 1. Einleitung

## 1.1. Der Zuckertransport

Zucker spielt im Körper eine wichtige Rolle für die Energiebereitstellung. Gelangt Glukose über die Nahrung in den Dünndarm, wird sie dort durch den Natrium-D-Glukose-Kotransporter SGLT1 in die Enterozyten der Bürstensaummembran der Darmwand aufgenommen. Hierbei handelt es sich um einen sekundär aktiven Transport, bei welchem der Natriumgradient die treibende Kraft für den Transport ist. Ein Konzentrationsgradient an Natrium –Ionen an der apikalen Membran sorgt dafür, dass über den Kotransport Glukose in Richtung dieses Konzentrationsgefälles transportiert wird. Natrium-Ionen, welche in die Zelle gelangen werden auf der basolateralen Seite von der Natrium-Kalium-ATPase unter Energieverbrauch in Form von ATP wieder aus der Zelle heraustransportiert wodurch das Konzentrationsgefälle zwischen dem Zytoplasma und dem Darmlumen aufrecht erhalten bleibt (Kimmich and Randles, 1984). Steigt die Konzentration an Glukose in der Zelle an, wird sie auf der basolateralen Seite durch den vereinfachenden Glukosetransporter 2 (Glut2) aus der Zelle in die Blutbahn transportiert (**Abb. 1**) (Cheeseman, 1993) .



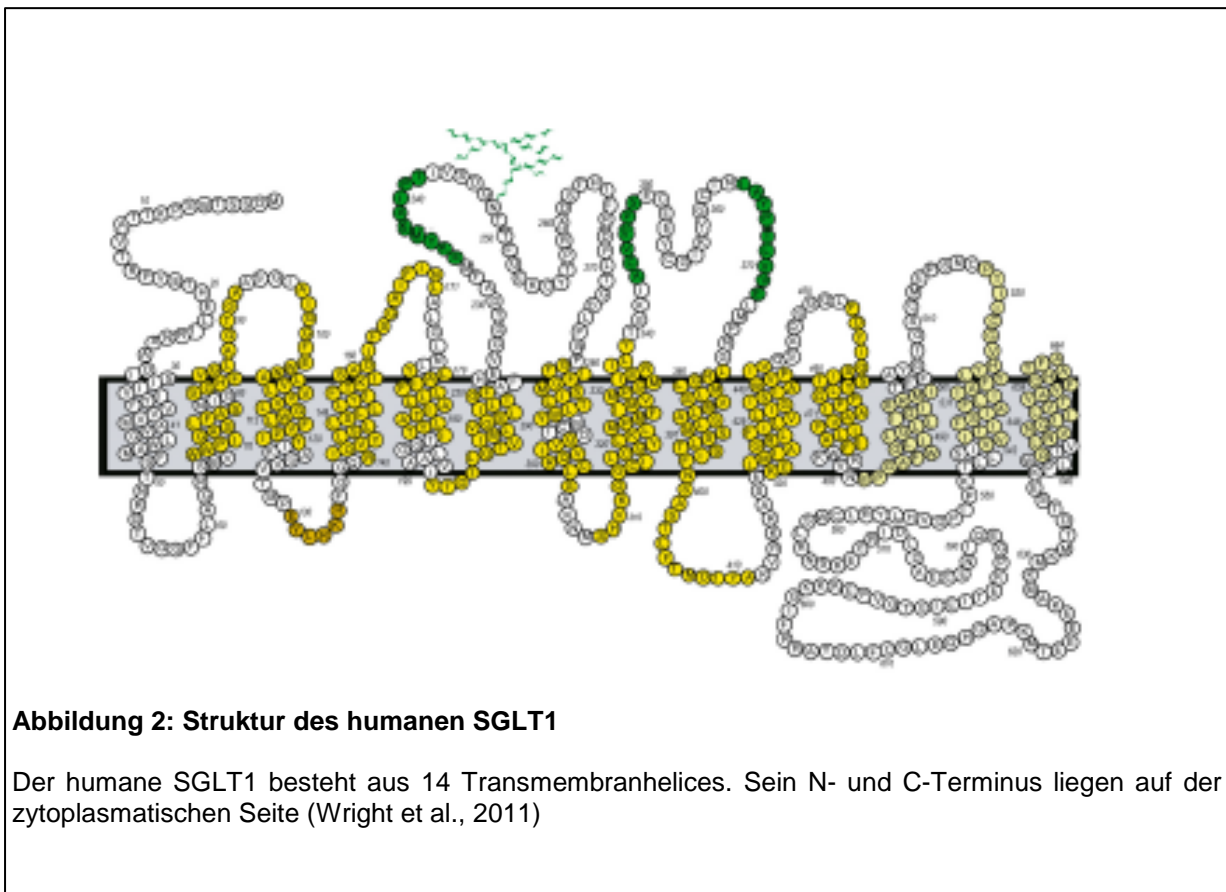
Durch diese Aufnahme über die Nahrung gelangen pro Tag im Durchschnitt 180g Glukose in den Körper und werden hier in Speichergeweben, welche sich hauptsächlich in der Leber und den Muskeln befinden, gespeichert oder für die Energiebereitstellung verwendet. Für den Transport der Glukose aus dem Darmlumen in die Enterozyten ist hauptsächlich SGLT1 verantwortlich (Gorboulev et al., 2012). In die Zellen der Speicherorgane gelangt Glukose über die Diffusion von Glukose erleichternden Glukosetransporter 4 (Glut4) welcher durch Insulin vermehrt eingebaut wird. Insulin bindet hierbei an einen Rezeptor, welcher daraufhin den Einbau von Glut4 in die Plasmamembran stimuliert. (Karnieli et al., 1981). Ein gewisser Teil der gespeicherten Glukose kann auch aus der Glukoneogenese stammen, bei welcher aus Stoffwechselprodukten, zum Beispiel des Fettsäure- oder Aminosäureabbaus aber auch der Milchsäuregärung, Glukose gebildet wird.

Anders als im Darm sieht die Rückresorption von Glukose aus dem filtrierten Harn aus. Hierbei spielt in den S1 und S2 Segmenten der Nieren der SGLT2 eine entscheidende Rolle. Bei SGLT2 handelt es sich um einen niedrig affinen Transporter, welcher eine hohe Transportkapazität aufweist. Durch ihn wird bereits in den S1 und S2 Segmenten der größte Teil der Glukose rückresorbiert. Der verbleibende Rest, welcher die S3 Segmente erreicht, wird hier von dem hoch affinen SGLT1 transportiert. SGLT1 besitzt im Gegensatz zu SGLT2 eine niedrige Transportkapazität (You et al., 1995).

## 1.2. Der Natrium-D-Glukose Kotransporter SGLT1

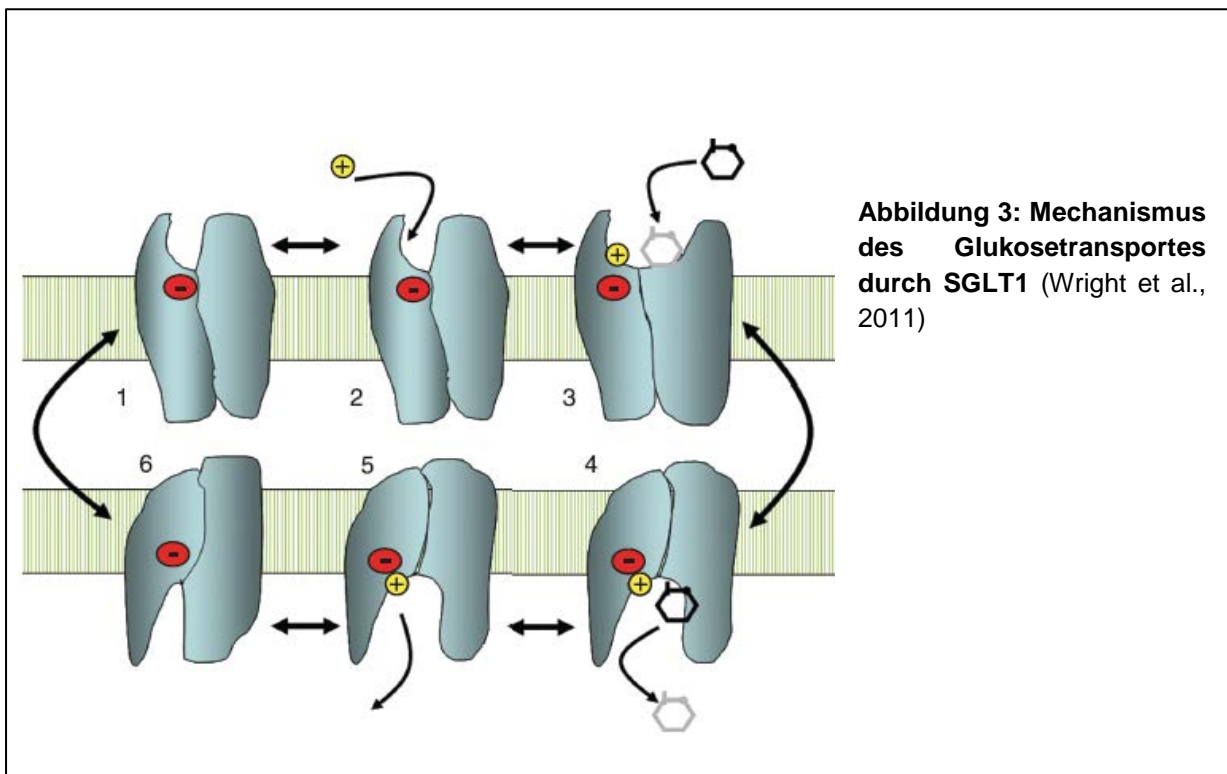
SGLT1 gehört der humanen  $\text{Na}^+$ -Glukose-Kotransporter Familie an, zu welcher noch 11 weitere Mitglieder gehören, unter welchen sich Transporter für Zucker, Myo-Inositol, Vitamine und Anionen befinden (Wright et al., 2011). Die Struktur der Mitglieder dieser Transporterfamilie zeichnet sich meist durch 14 Transmembranhelices aus (**Abb. 2**). Lediglich bei NIS und AIT fehlt die 14. Transmembranhelix. Das Molekulargewicht liegt zwischen 60-80kDa. SGLT1 war der erste Transporter dieser Familie der identifiziert werden konnte. Er transportiert als sekundär aktiver Transporter Glukose und Galaktose zusammen mit  $\text{Na}^+$  in einer Stöchiometrie von 2 Natrium-Ione pro Zuckermolekül. Der Transport der Glukose über die apikale Membran wurde im Rahmen eines 6 stufigen Modells beschrieben (**Abb. 3**). Nach diesem Modell wird zunächst ein Natrium-Ion vom Transporter gebunden, welches diesem ermöglicht durch Konformationsänderungen ein Glukosemolekül zu binden. Nach Bindung

des zweiten Natrium-Ions erfolgt eine weitere Konformationsänderung, durch welche die Glukose sowie die Natrium-Ionen die Membran passieren und dort freigesetzt werden. Anschließend geht der Transporter in seine Ausgangskonformation zurück und steht für einen erneuten Transport zur Verfügung (Watanabe et al., 2010). Der  $K_m$  des humanen SGLT1 für Glukose liegt bei  $400\mu\text{M}$ . Zusätzlich zu seiner Rolle als Zuckertransporter kann SGLT1 auch als  $\text{Na}^+$ -Uniporter, Wasserkanal oder Harnstoffkanal fungieren. Der Wassertransport durch SGLT1 ist unabhängig von dem osmotischen Gradienten. Da beim Transport von Glukose das Membranpotential verändert wird, erhöht der Glukosetransport auch die Wassertransportrate, da diese vom Membranpotential abhängt. (Loo et al., 1996; Meinild et al., 1998; Zeuthen and Zeuthen, 2007).



Neben dem Darm und den Nieren konnte SGLT1 auch im Gehirn und im Herzen nachgewiesen werden (Pope et al., 1997). Bei der Menge an SGLT1-Proteinen im Darm spielt die Region eine wichtige Rolle. Dabei folgt sie einem proximalen zu distalem

Konzentrationsgefälle (Vrhovac et al., 2015). Während Duodenum eine hohe SGLT1 Expression zu beobachten ist, nimmt sie fortschreitend über Jejunum zu Ileum ab. Dies ist physiologisch sinnvoll, da zu Beginn des Darms eine hohe Glukosekonzentration vorliegt, die während der Darmpassage abnimmt und somit weniger Transportermoleküle benötigt werden. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass im Colon immer noch eine gewisse Menge SGLT1 vorhanden ist (Yoshikawa et al., 2011).



### 1.2.1. Regulation des SGLT1

SGLT1 wird in komplexer Weise durch unterschiedliche Mechanismen reguliert. Hierbei unterscheidet man zwischen transkriptionellen Langzeit-Regulationen und posttranslationalen Kurzzeit-Regulationen. Die transkriptionelle Regulation erfolgt über einen längeren Zeitraum. Durch sie passt sich der Organismus zum Beispiel längerfristigen Veränderungen der Nährstoffzusammensetzung, der Entwicklungsperiode oder metabolischen Veränderungen während einer Erkrankung wie zum Beispiel Diabetes mellitus an. Diese Regulation erfolgt in der Regel über eine Veränderung der Promotoraktivität. Veränderungen der Expression von SGLT1 und/oder Veränderungen der



Synthese von Plasmamembran­komponenten können zu Veränderungen der Membranzusammensetzung sowie der resorbierenden Oberfläche führen (Azevedo et al., 2011; Martin et al., 2000; Thomson and Wild, 1997; Wild et al., 2007). Beispielsweise konnte für SGLT1 auch eine Tag-Nacht-abhängige Veränderung der SGLT1 Expression gezeigt werden (Balakrishnan et al., 2008; Pan et al., 2004). Der Tag-Nachtrhythmus ist den spe­ziesabhängigen Verhaltensmustern bezüglich der Nahrungsaufnahme angepasst. Bei Spezies, welche ihre Nahrung hauptsächlich tagsüber aufnehmen, wie zum Beispiel Rhesusaffen, ist SGLT1 auch am Tag stärker exprimiert (Rhoads et al., 1998), während bei Ratten, welche eine nokturne Nahrungsaufnahme zeigen, der Expressionspeak zwischen 20:00 Uhr und 21:00 Uhr liegt (Houghton et al., 2008). Die transkriptionelle Tag-Nacht-Regulation von SGLT1 ist in verschiedenen Darmabschnitten unterschiedlich. Zum Beispiel wurde im Duodenum der Ratte um 15 Uhr die höchste Expression gemessen, während in den Regionen distal vom Duodenum die höchste Expression um 21:00 Uhr beobachtet wurde (Fatima et al., 2009). Bei Ratten wurde gezeigt, dass der Tag-Nacht-Rhythmus durch Verschiebung der Fütterungszeit verändert werden konnte. Wurden die Ratten tagsüber gefüttert, so verschob sich die Zeit der höchsten SGLT1 Expression von der Nacht in die Morgenstunden (Pan et al., 2004). Der Einfluss der Nahrungsaufnahme auf den Tag-Nacht-Rhythmus ist gravierend. Wurde den Ratten 4 Tage lang die Nahrung entzogen, so kam es zu einer vollständigen Aufhebung des Tag-Nacht-Rhythmus. Zwei Tage nach erneuter Fütterung stellte sich der normale Tag-Nacht-Rhythmus wieder ein. Der Transkriptionsfaktor HNF-1 könnte eine wichtige Rolle bei diesem zirkadianen Rhythmus spielen. So konnte im SGLT1-Promotor ein Element für HNF-1 identifiziert werden (Rhoads et al., 1998).

Neben einem zirkadianem Rhythmus der SGLT1 Expression wurde auch eine veränderte Expression von SGLT1 in unterschiedlichen Entwicklungsstadien gezeigt. So nimmt in Ratten der Gehalt an SGLT 1 im Darm des Fötus während der Schwangerschaft zu und hat bei der Geburt seine höchste Expression erreicht. Nach der Geburt nimmt die Menge an SGLT1 wieder ab. Ein wichtiger Punkt der Langzeitregulation ist die Regulation über die Ernährung. Füttert man Ratten über mehrere Tage eine kohlenhydratreiche Diät, so wird die Transkription der SGLT1 mRNA hochreguliert und ist nach 5 Tagen auf das 3fache angestiegen. In weiterführenden Untersuchungen stellte sich heraus, dass nicht die mRNA in reifen Enterozyten der Villusspitzen ansteigt, sondern die mRNA in den unreifen Enterozyten

der Krypten. Wandern diese Zellen während des Reifungsprozesses in die Villusspitze nehmen sie das höhere mRNA-Level mit (Smith et al., 1992).

Neben den oben beschriebenen langfristigen Veränderungen der SGLT1 Expression kann SGLT1 in der Bürstensaummembran des Darms auch kurzfristig reguliert werden. Dadurch wird die Resorption von Glukose dem Glukosegehalt in der aufgenommenen Nahrung angepasst. Dieses kann über Veränderungen der Funktion von SGLT1 durch Phosphorylierung des Transporters, durch Veränderung der Endozytose und Rezirkulierung von SGLT1 und durch Beeinflussung des exozytotischen Einbaus von neu synthetisierten Transportern erfolgen. Diese Prozesse werden komplex gesteuert. Zum einen können Hormone regulatorisch aktiv werden. So wurde gezeigt, dass Insulin bei hohen Glukosekonzentrationen im Blut SGLT1 im Darm hochreguliert (Kurokawa et al., 1995), während andere Hormone wie Leptin oder Angiotensin II die Expression von SGLT1 im Darm erniedrigen (Fanjul et al., 2012; Inigo et al., 2007; Kawano et al., 2002; Wong et al., 2009). Die Regulation durch Hormone wird unter anderem über *second messenger* wie G-Protein oder cAMP vermittelt. Einige Kinasen wie zum Beispiel Proteinkinase C (PKC) oder Proteinkinase A (PKA) sind an diesen kurzfristigen Regulationen beteiligt. Aktiviert man PKA durch 8-BrucAMP kommt es zu einer Zunahme des Na<sup>+</sup>/Glukose-Kotransports um 30%, aktiviert man jedoch PKC mittels 1,2-Dioctanoylglycerol (DOG) führt dies zu einer 60% igen Hemmung von SGLT1 (Hirsch et al., 1996). Da bei diesen Versuchen neben der Transportrate keine Änderungen in der Substratkinetik von SGLT1 beobachtet wurden, ist diese Regulation auf einen Anstieg der Transportermenge in der Plasmamembran zurückzuführen. Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Protein RS1 ist maßgeblich an der posttranslationalen Regulation von SGLT1 im Darm beteiligt (Veyhl-Wichmann et al. 2015). Die Regulation wird durch Proteinkinasen moduliert (Veyhl et al., 2006). Sie ist für die Hochregulation der Glukoseabsorption im Darm verantwortlich.

### 1.2.2. Der Einfluss von SGLT1 auf Krankheiten

Der SGLT1 ist in einer Vielzahl von Krankheiten involviert. Bestimmte Mutationen können dazu führen, dass Transporter- enthaltende Vesikel des Transgolgi-Netzwerks (TGN) nicht zur Plasmamembran transportiert werden. Ist dies der Fall, kommt es zum sogenannten Glukose-Galaktose-Malabsorptionssyndrom (GGM). Bei dieser Erkrankung verursachen Glukose und Galaktose, welche nicht über den SGLT1 aus der Nahrung aufgenommen werden, Diarrhö und andere Probleme im Gastrointestinaltrakt die unter Umständen lebensbedrohlich sein können. Als Ursache wurden unterschiedlichste Mutationen wie Missense-, Nonsense, Frame shift- und Splice site-Mutationen beobachtet (Turk et al., 1994; Turk et al., 1991; Wright et al., 2002). In SGLT1 Knock-out Mäusen führt eine Glukose – und Galaktose-haltige Diät dazu, dass die Mäuse innerhalb weniger Tage sterben. Die einzige Therapie welche hilft ist hier eine Glukose-Galaktose freie Diät.

Des Weiteren spielt der SGLT1 auch in einigen Tumoren eine wichtige Rolle, so konnte gezeigt werden, dass er zum Beispiel in Kolonkarzinomen (Guo et al., 2011), Brustkrebs, Lungen- (Ishikawa et al., 2001) und Prostatakrebszellen hochreguliert ist um diese Zellen mit Energie zu versorgen (Scafoglio et al., 2015) .

Auch in Diabetes Typ 2 (T2DM) ist SGLT1 ein wichtiger Faktor und viele, vor allem neuere Medikamente, zielen auf dessen Regulation ab. Hierbei handelt es sich um eine Form der Diabetes, welche insbesondere durch eine kohlenhydrat- und fettreiche Ernährung und damit einhergehendem hohem Körpergewicht hervorgerufen wird (Shafir et al., 1999). Durch eine permanent erhöhte Insulinkonzentration im Blut, welche durch erhöhte Glukosekonzentration hervorgerufen wird, kommt es hier zu einer Erniedrigung der Insulinempfindlichkeit der Insulinrezeptoren. Mit fortschreitendem Krankheitsverlauf sterben immer mehr der Insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen im Pankreas ab (Shafir et al., 1999). Der eine erleichterte Glukosediffusion durch die Plasmamembran vermittelnde Glukosetransporter 4 (Glut4) ist hauptverantwortlich für den Transport der Glukose aus dem Blut in das Speichergewebe. Der Einbau von GLUT4 in die Plasmamembran wird durch Insulin stimuliert. Sind die Insulinrezeptoren gegenüber Insulin resistent so gelangt Glukose schlechter in Fett- und Muskelzellen und die Glukosekonzentration im Blut ist erhöht (Ezaki, 1997). Bei der Glukoseresorption im Darm ist SGLT1 geschwindigkeitsbestimmend und somit maßgeblich an dem drastischen Zuckeranstieg nach Aufnahme glukosereicher Nahrung beteiligt. Die hohen Zuckerkonzentrationen im Blut von Diabetikern verursachen

schwerwiegende Sekundärkrankheiten wie zum Beispiel Schlaganfall, Herzinfarkt und Erblindung (Swidan and Montgomery, 1998). Aus diesem Grund zielen viele in der Entwicklung befindliche Medikamente auf die Inhibition der SGLT-Transporter ab. Hierbei wird zum einen die Zuckeraufnahme aus der Nahrung, zum anderen aber auch die Rückresorption der Glukose aus dem filtrierten Harn verhindert und somit der Blutzuckerspiegel niedrig gehalten. Allerdings besitzen diese Blocker auch Nebenwirkungen, da sie ins Blut gelangen und somit diese Transporter auch in anderen Geweben und Organen wie in Herz und Gehirn inhibieren (Zambrowicz et al., 2012).

### **1.3. Konzentrierende Nukleosid-Transporter (CNTs)**

Bei den CNTs handelt es sich um Transporter der SLC28 Familie, welche Nukleoside zusammen mit Na-Ionen transportieren (Ritzel et al., 2001; Ritzel et al., 1997; Ritzel et al., 1998). Orthologe dieser Transporterfamilie findet man auch in Hefen, Nematoden, Insekten und Bakterien (Loewen et al., 2003; Xiao et al., 2001; Yao et al., 2002). Man unterscheidet in Säugetieren 3 Isoformen der CNTs, CNT1, CNT2 und CNT3 welche eine ähnliche Primärstruktur, jedoch unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen. Ihre Affinitäten für das jeweilige Substrat sind mit  $K_m$ -Werten zwischen 10-100 $\mu$ M sehr hoch. Dabei bevorzugt jedes CNT-Homolog unterschiedliche Substrate. CNT1 transportiert Pyrimidin-Nukleoside und bindet Adenosin, welches jedoch nicht transportiert wird. CNT2 transportiert Purin-Nukleoside, währende CNT3 keine Präferenz für eine Nukleosidgruppe aufweist und alle Nukleoside gleichermaßen transportiert. Uridin wird von allen drei Klassen transportiert. Der Transport der Nukleoside, welche Vorläufermoleküle für Nukleinsäuren sind, ist  $Na^+$ -abhängig und erfolgt unidirektional. Es handelt sich hierbei um einen sekundär aktiven Prozess, welcher, wie beim SGLT1 beschrieben wurde, von einem  $Na^+$ -Gradienten abhängig ist (Ritzel et al., 2001; Ritzel et al., 1997; Ritzel et al., 1998; Smith et al., 2005). Nukleoside sind neben der Vorläuferfunktion für Nukleinsäuren auch Energievorläufer, Regulatoren und dienen der Signalweiterleitung (Di Perri and Laghi-Pasini, 1991; Diaz-Munoz and Salin-Pascual, 2010; Savci and Wurtman, 1995; Schachter et al., 1995; Watson et al., 2011; Young et al., 1985; Zhang et al., 2011). So wirken CNT2 und CNT3 beispielsweise in der Niere als

Regulatoren, sodass der tubuläre Adenosinlevel, welcher für die Nierenfunktion wichtig ist, aufrechterhalten bleibt (Thomson et al., 2000; Yagil et al., 1994). Wie bei den SGLTs gibt es auch bei den CNTs Unterschiede in der Stöchiometrie des Transportes. Während CNT1 und CNT2 eine Stöchiometrie von 1 Na<sup>+</sup>-Ionen pro Nukleosid-Molekül aufweisen, liegt sie beim CNT3 bei 2Na<sup>+</sup>-Ionen pro Nukleosid-Molekül, wobei CNT3 neben Na<sup>+</sup>-Ionen auch Protonen akzeptiert (Smith et al., 2007). Sind nur Protonen vorhanden, ändert sich die Stöchiometrie in 1 Proton pro Nukleosid-Molekül. Sind sowohl Na<sup>+</sup> als auch Protonen vorhanden, kann die Stöchiometrie sich auch in 1 Proton + 1 Na<sup>+</sup>-Ion pro Nukleosid-Molekül ändern (Slugoski et al., 2008). Viele Nukleosidanaloga werden in der Krebstherapie und antiviral eingesetzt. Durch ihren hydrophilen Charakter diffundieren sie nur langsam passiv über die Zellmembran. Transporter sind für eine schnelle und regulierte Aufnahme von Nukleosiden in Zellen erforderlich (Pastor-Anglada et al., 2008).

Die meisten Säugetiere exprimieren unterschiedliche Nukleosidtransporter mit überlappenden Substratspezifitäten. In polarisierten Epithelzellen sind CNTs in der apikalen Membran von Epithelzellen und natriumunabhängige passive Nukleosidtransporter, die ENTs, in der basolateralen Membran zu finden. Hierdurch wird ein vektorieller Transport von Nukleoside ermöglicht. Die drei CNT Subtypen unterscheiden sich bezüglich ihrer Lokalisation. Der humane konzentrierende Nukleosidtransporter 1 (hCNT1) kommt hauptsächlich in der Leber und den Nieren vor und ist in anderen Geweben nur schwach exprimiert. hCNT2 besitzt hingegen eine breite Gewebeverteilung und wird in Herz, Leber, Skelettmuskeln, Nieren, Darm, Pankreas, Plazenta, Hirn, Lunge aber auch in Leukozyten, neoplastischem Gewebe und in einigen Tumoren exprimiert. hCNT3 wird stark in Brustgewebe, Pankreas, Knochenmark und Lunge exprimiert, in Darm, Leber, Lunge, Plazenta, Prostata, Hoden, Gehirn und Herz ist das Expressionsniveau von hCNT3 geringer (Govindarajan et al., 2007; Ritzel et al., 2001). Im Darm weisen die CNTs ähnlich wie SGLT1 eine von proximal nach distal abnehmende Expressionshöhe auf. (Ngo et al. 2001).

### 1.3.1. Struktur des CNT-Proteins

Alle CNTs besitzen 15 putative Transmembrandomänen (TMD) mit einem zytosolischen N-Terminus und einem extrazellulären C-Terminus. In ihrer Länge variieren sie zwischen 649 (hCNT1) und 691 (hCNT3) Aminosäuren (Ritzel et al., 2001; Ritzel et al., 1997; Ritzel et al., 1998; Smith et al., 2005). Durch Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, dass die ersten 174 Aminosäuren nicht für die Transportfunktion und Substratbindung verantwortlich sind, das Protein jedoch nach Deletion in diesem Bereich nicht mehr in die Zytoplasmamembran eingebaut werden kann. Diese Beobachtung wird dadurch gestützt, dass die Transporter bei Aminosäure 57-59 ein Exportsignal besitzen, welches für die Translokation der Transporter enthaltenen Vesikel zur Plasmamembran eine essentielle Rolle spielt (Errasti-Murugarren et al., 2010). Der für die Substratspezifität der einzelnen CNT-Homologe verantwortliche Bereich konnte auf die Transmembrandomänen 7 und 8 eingegrenzt werden. Hierbei wurde gezeigt, dass nach Austausch dieser Domänen bei CNT1 gegen die TMD 7 und 8 aus CNT2 die Substratspezifität in Richtung CNT2 verändert werden konnte. Der alleinige Austausch von TMD 8 führte zu einer Substratspezifität welche für hCNT3 zu beobachten war (Wang and Giacomini, 1997). Weitere Untersuchungen ergaben, dass insbesondere das Serin an Position 318 für die Substratspezifität verantwortlich ist. Wurde dieses Serin gegen ein Glutamat ausgetauscht, wie es in CNT1 vorkommt, verlor die Mutante ihre Selektivität für Pyrimidine und war in der Lage auch Purinnukleoside aufzunehmen (Wang and Giacomini, 1999).

### 1.3.2. Regulation der CNTs

Die Regulation der CNTs ist sehr komplex. Sie werden sowohl auf transkriptioneller Ebene, als auch auf posttranskriptioneller Ebene reguliert. Die Regulation ist in verschiedenen Geweben unterschiedlich und vom Differenzierungsgrad der Zellen abhängig. Ein Beispiel für die Gewebe-abhängige Regulation ist die nahrungsabhängige Regulation. Bei einer Nukleosidmangelernährung wird CNT1 im Jejunum der Ratte hochreguliert. Durch eine Nukleosid-reiche Ernährung wird CNT1 im Darm herunterreguliert, in der Niere jedoch hochreguliert (Lopez-Navarro et al., 1996). Anders als im Jejunum führt eine Nukleosidmangelernährung In der Leber zu einer Herunterregulation von CNT1 (Valdes et

al., 2000). Des Weiteren ist hier bei der Expression von CNTs eine Entwicklungsabhängigkeit zu beobachten. Die Uridinaufnahme war in 20 Tage alten Ratten vier Mal so hoch wie in neugeborenen. Bei der Analyse konnten CNT1 und CNT2 lediglich in erwachsenen Ratten auf Proteinebene nachgewiesen werden. Werden fötale Hepatozyten jedoch mit einem Stoff inkubiert, welcher die Differenzierung der Zellen hervorruft, wie es zum Beispiel bei Dexamethason in Kombination mit T3 der Fall ist, kommt es zu einer deutlichen Zunahme der Uridinaufnahme. Vergleicht man jedoch die Proteinmenge, ist zu erkennen, dass diese Zunahme lediglich auf eine Erhöhung an CNT2, nicht jedoch von CNT1 zurückzuführen ist (del Santo et al., 2001). In darauffolgenden Studien konnte gezeigt werden, dass der Anstieg an CNT1 erst zu einem späteren Zeitpunkt der Differenzierung erfolgt. Hierbei spielt der *Hepatocyte nuclear factor 4* (HNF4) eine wichtige Rolle. Für CNT2 konnte gezeigt werden, dass die Stimulation vom Zusammenspiel von C/EBP $\alpha$  und HNF3 $\gamma$  abhängt (Fernandez-Veledo et al., 2007). Wachstumsfaktoren wie der *epidermal growth factor* (EGF), der *hepatocyte growth factor* (HGF) und der *tumor growth factor- $\alpha$*  (TGF- $\alpha$ ) sind an der Regulation der Expression von CNT1 im Darm beteiligt. Cytokine wie der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-6 (IL-6) führen zu einem Anstieg von CNT1 in differenzierten Hepatomazellen. Sie wirken jedoch über unterschiedliche Signalwege. Während für IL-6 der p42/p22 MAPK-Weg ausgemacht wurde, wirkt TNF- $\alpha$  über den PI3 Kinase/Akt Stoffwechselweg (Aymerich et al., 2004; Fernandez-Veledo et al., 2004). In der Leber wurde gezeigt, dass Insulin und Glukagon die CNT-Aktivität erhöhen (Gomez-Angelats et al., 1996). Da beide Hormone an schnellen posttranslationalen Regulationen anderer Transporter beteiligt sind, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die CNTs auch posttranslational reguliert werden. Kürzlich wurde gezeigt, dass CNTs von RS1 reguliert werden und dass diese Regulation teilweise posttranslational und innerhalb kurzer Zeit erfolgt. In vergleichenden Aufnahmemessungen an Bürstensaummembranvesikeln (BBMV) aus Dünndarm und Niere von Wildtyp-Mäusen und Mäusen ohne RS1 (RS1KO-Mäuse) konnte gezeigt werden, dass die Uridinaufnahme bei den RS1KO Mäusen zweimal höher war als in Wildtyp-Mäusen. Hierbei waren alle CNT-Homologe betroffen. Die verringerte Aufnahme war mit geringeren Mengen an Transporterprotein in der Membran korreliert. (Gomez-Angelats et al., 1996). Eine schnell erfolgende posttranslationale Kurzzeitregulation der CNTs wurde durch Versuche an Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus*

*laevis* gezeigt, die offensichtlich durch Regulation der Abschnürung von Vesikeln von Transgolgi-Netzwerk erfolgt (Errasti-Murugarren et al., 2012).

### 1.3.3. Pharmakologische Relevanz

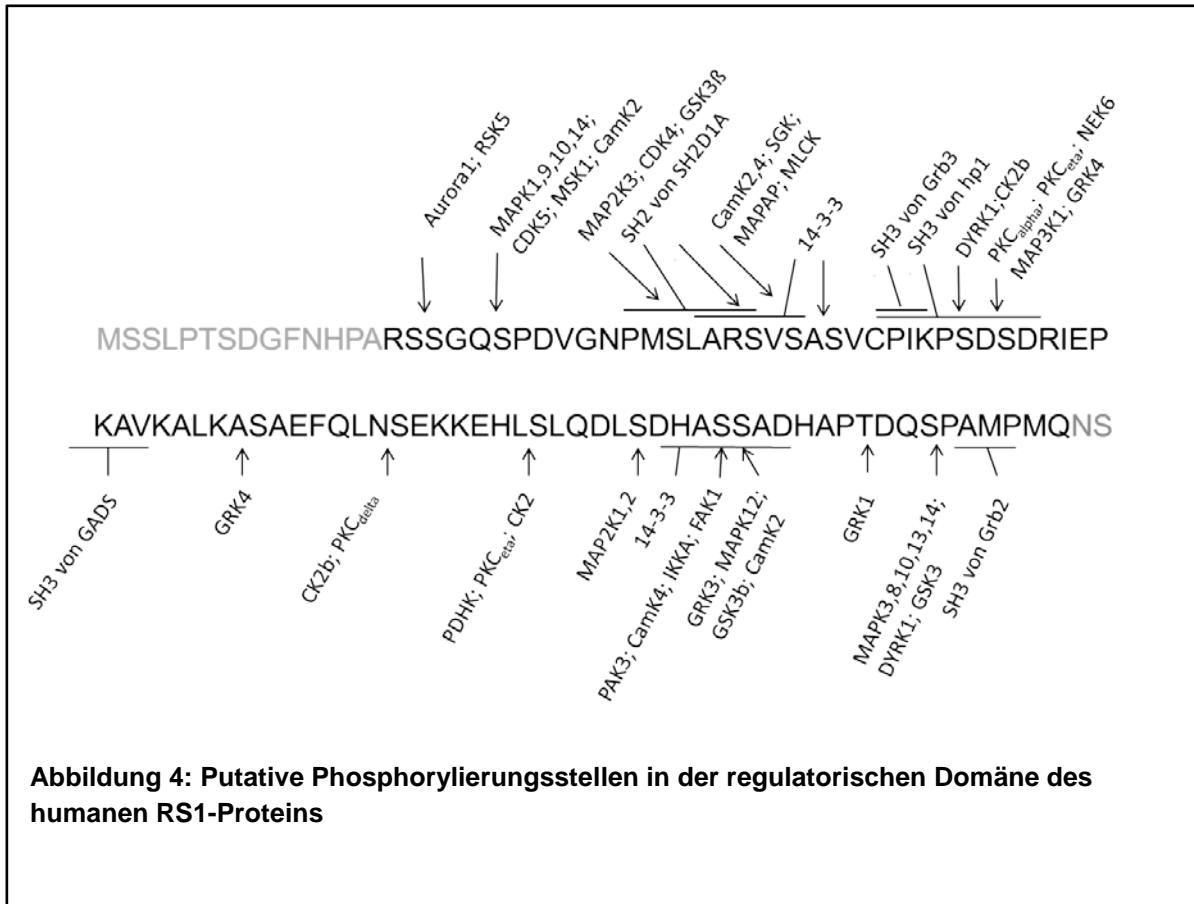
Neben natürlich vorkommenden Nukleosiden transportieren CNTs auch modifizierte Nukleoside, die erfolgreich als Medikamente gegen Tumoren (Zytostatika) oder Virusinfektionen (antivirale Medikamente) eingesetzt werden (Lostao et al., 2000). Der Wirkmechanismus dieser therapeutischen Nukleosid-Analoga besteht darin, dass sie in die DNA oder RNA eingebaut werden und hier zu einer Kettenabbruchreaktion führen, wodurch Krebszellen oder Viren abgetötet werden (Galmarini et al., 2001). Die therapeutisch eingesetzten Nukleosidanaloga werden häufig schlechter transportiert als die Nukleosidsubstrate (Cano-Soldado et al., 2004; Graham et al., 2000). Während Antikrebs-Medikamente von allen 3 CNT-Subtypen transportiert werden, erfolgt der Transport antiviraler Medikamente nur über CNT3. Diese Substanzen binden an CNT1 und CNT2, sie werden jedoch nicht transportiert (Smith et al., 2005). Eine Erklärung bietet die Beobachtung, dass bei den CNTs die (C3)-OH Gruppe des Zuckerrestes eine wichtige Rolle für die Substraterkennung spielt. Da antivirale Medikamente diese Hydroxylgruppe oft nicht besitzen, werden sie von CNT1 und CNT2, welche gegenüber Modifikationen des Uracils eher empfindlich sind, nicht transportiert. CNT3 ist gegenüber Modifikationen sehr tolerant und transportiert auch diese Analoga (Cano-Soldado et al., 2004; Zhang et al., 2005; Zhang et al., 2003). Weitere wichtige Positionen für die Interaktion von Uridin- und Adenosin-Analoga mit CNT1 und CNT2 sind die Position 6 und 8 des Uracil- Adeninrings (Patil et al., 2000)



## 1.4. RS1 Protein

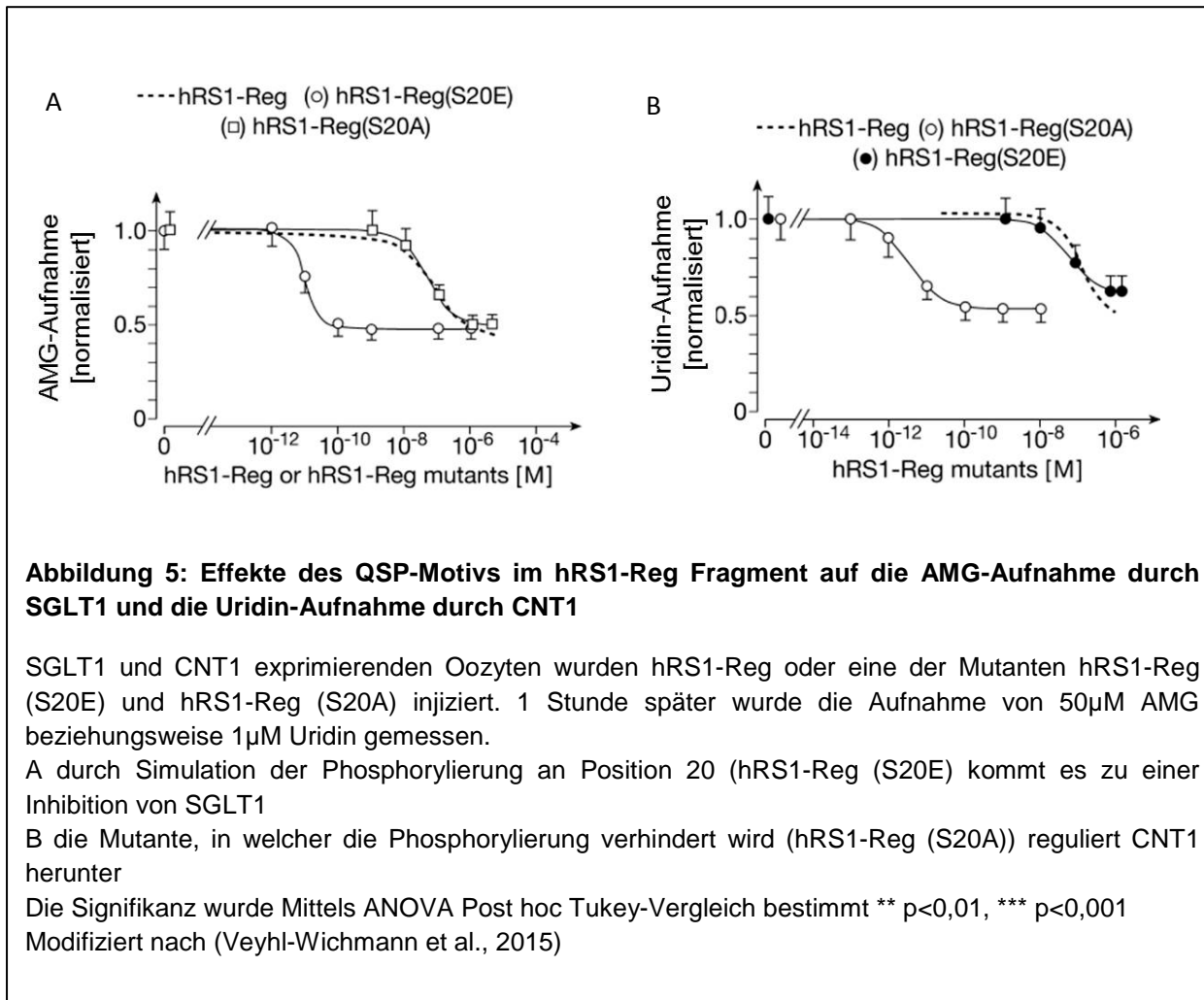
Das Protein RS1 (Gen RSC1A1), bei dem es sich um ein säugetierspezifisches Protein handelt, ist in der Lage verschiedene Transporter zu regulieren. Hierzu gehören der Natrium-D-Glukose-Kotransporter (SGLT1), die konzentrierenden Nukleosidtransporter (CNTs) und der organische Kationentransporter 2 (OCT 2) (Errasti-Murugarren et al., 2012; Veyhl et al., 2006). RS1 ist relativ ubiquitär und wird unter anderem auch in Zellen des Dünndarms, der Nieren und des Gehirns exprimiert. Er wird von dem intronlosen Einzelkopie-Gen RSC1A1 mit einer Länge von 2013 Nukleotiden kodiert. RS1 vom Menschen enthält 671 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 67kDa. Das RSC1A1 Gen enthält verschiedene regulatorische Elemente. Hierzu gehört eine TATA-Box, fünf CAAT-Boxen, zwei potentielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren sowie fünf Konsensussequenzen für TF AP-1, welcher durch PKC aktiviert werden kann (Lambotte et al., 1996; Veyhl et al., 1993). Im RS1-Protein wurde eine N-terminale Domäne von ca. 80 Aminosäuren (RS1-Reg) identifiziert, welche für die posttranslationale Kurzzeitregulation von Transportern verantwortlich ist (Veyhl-Wichmann et al., 2015). Innerhalb dieser RS1-Reg-Domäne konnten zwei funktionell aktive Sequenzmotive ermittelt werden. Es handelt sich im humanen Protein um das Tripeptid-Motiv QSP (AS 19-21 und 91-93) und das Oktapeptid Motiv S D S D R I E P (AS 43-50) (Vernaleken et al., 2007). RS1-Reg weist eine Vielzahl von putativen Phosphorylierungsstellen für verschiedene Kinasen auf (**Abb. 4**).

Unter anderem befindet sich im QSP-Motiv eine Phosphorylierungsstelle für die CamK2 und Erk-Kinase und im S D S D R I E P-Motiv eine Phosphorylierungsstelle für die Proteinkinase C (PKC). Für PKC konnte die  $\alpha$ -Untereinheit als die phosphorylierende Untereinheit identifiziert werden (Veyhl-Wichmann et al., 2015).



Die Phosphorylierungsabhängigkeit der Regulation konnte durch Injektion von Peptiden in Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis*, in welchen humaner SGLT1 überexprimiert worden war gezeigt werden. Um den Einfluss der Phosphorylierung zu ermitteln, wurden Hemmstoffe und Stimulatoren von Proteinkinasen benutzt und es wurden Mutanten von RS1-Reg, QSP und SSDRIEP eingesetzt, bei denen die Phosphorylierung des jeweiligen Serins in den vorausgesagten Phosphorylierungsstelle durch den Ersatz durch Alanin verhindert oder durch Ersatz von Glutamat nachgeahmt wurde (Veyhl-Wichmann et al. 2015). So wurde z.B. durch das Ersetzen des Serins im QSP-Motiv (Position 20 in hRS1) durch Glutamat die Phosphorylierung simuliert (QEP) oder durch Austausch des Serins gegen Alanin die Phosphorylierung verhindert (QAP). In Messungen mit dem SGLT1-spezifischen Substrat  $\alpha$ -Methyl-Glykopyranosid (AMG) zeigte sich, dass die Glutamatmutante eine höhere Affinität bezüglich der Herunterregulation von SGLT1 zeigte als die Alanin Mutante (**Abb 5A**). Beobachtete man jedoch den Einfluss der injizierten Peptide auf die Aktivität exprimierter CNTs wirkten sich die Mutationen in QSP umgekehrt aus. In diesem Fall führte die

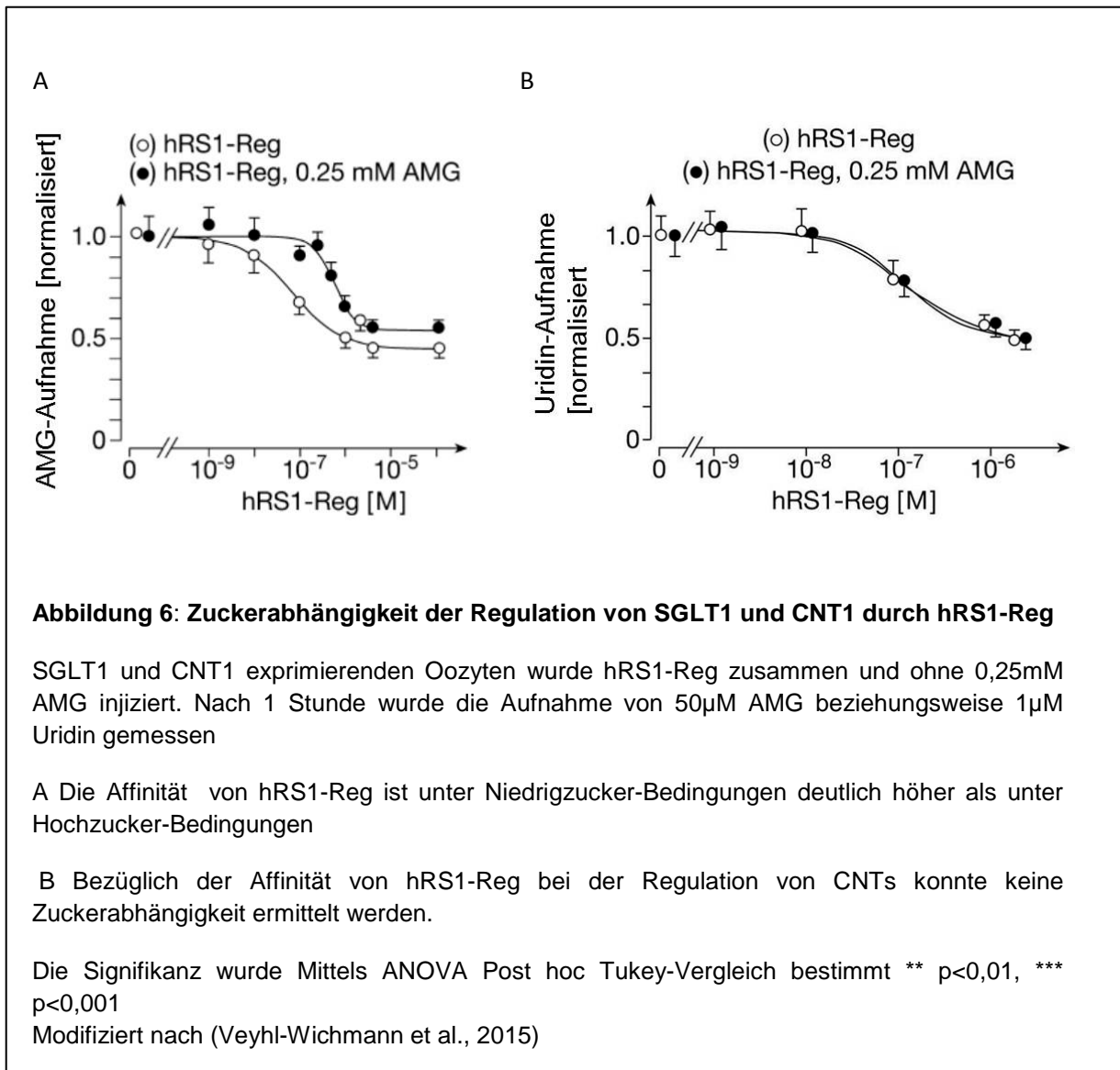
Verhinderung der Phosphorylierung durch den Austausch von Serin gegen Alanin zu einer Zunahme der Affinität der regulatorischen Domäne (**Abb.5 B**).



Neben der Phosphorylierungsabhängigkeit der regulatorischen Funktion zeigte sich auch, dass die AMG-Aufnahme auch vom intrazellulären Glukosegehalt der Oocyten abhing. Nach Ko-Injektion der Wildtyp-Form von hRS1-Reg zeigte sich, dass die AMG-Aufnahme deutlich anstieg. Somit führte eine Ko-Injektion mit AMG zu einer Erniedrigung der Affinität von hRS1-Reg (**Abb 6A**). Vergleicht man jedoch die Uridinaufnahme unter Hochzucker- und Niedrigzucker-Bedingungen nach Injektion von hRS1-Reg, so ist kein Effekt der Glukose zu beobachten (**Abb. 6B**) (Veyhl-Wichmann et al., 2015).

Bezüglich des Regulationsmechanismus konnte gezeigt werden, dass RS1 am Transgolgi-Netzwerk (TGN) mit Dynamin ko-lokalisiert ist. Hier verhindert es die Dynamin-abhängige

Abschnürung von Transporter enthaltenden Vesikeln vom TGN und somit eine Einlagerung der Transporter in der Zytoplasmamembran (Kroiss et al., 2006).



Die regulatorische Domäne ist unter den verschiedenen Spezies nicht komplett konserviert. Somit findet man zum Beispiel im RS1 Protein der Maus nur ein QSP Motiv (Aminosäuren 18-20) und kein SDSRIEP-Motiv. Wie in **Abb. 7** zu sehen ist, werden in verschiedenen Spezies putative Phosphorylierungsstellen in gleichen Sequenzmotiven wie zum Beispiel im QSP-Motiv durch unterschiedliche Kinasen phosphoryliert. Im Menschen wird das Serin im QSP Motiv durch CamK2 phosphoryliert, während im Maus-Ortholog an dieser Stelle eine Konsensussequenz für MAPK1 und CDK5 liegt. Diese Unterschiede in der Sequenz und den Phosphorylierungsstellen könnte zu einer unterschiedlichen Regulation der diversen Transporter durch die Mausdomäne und die humane Domäne führen.

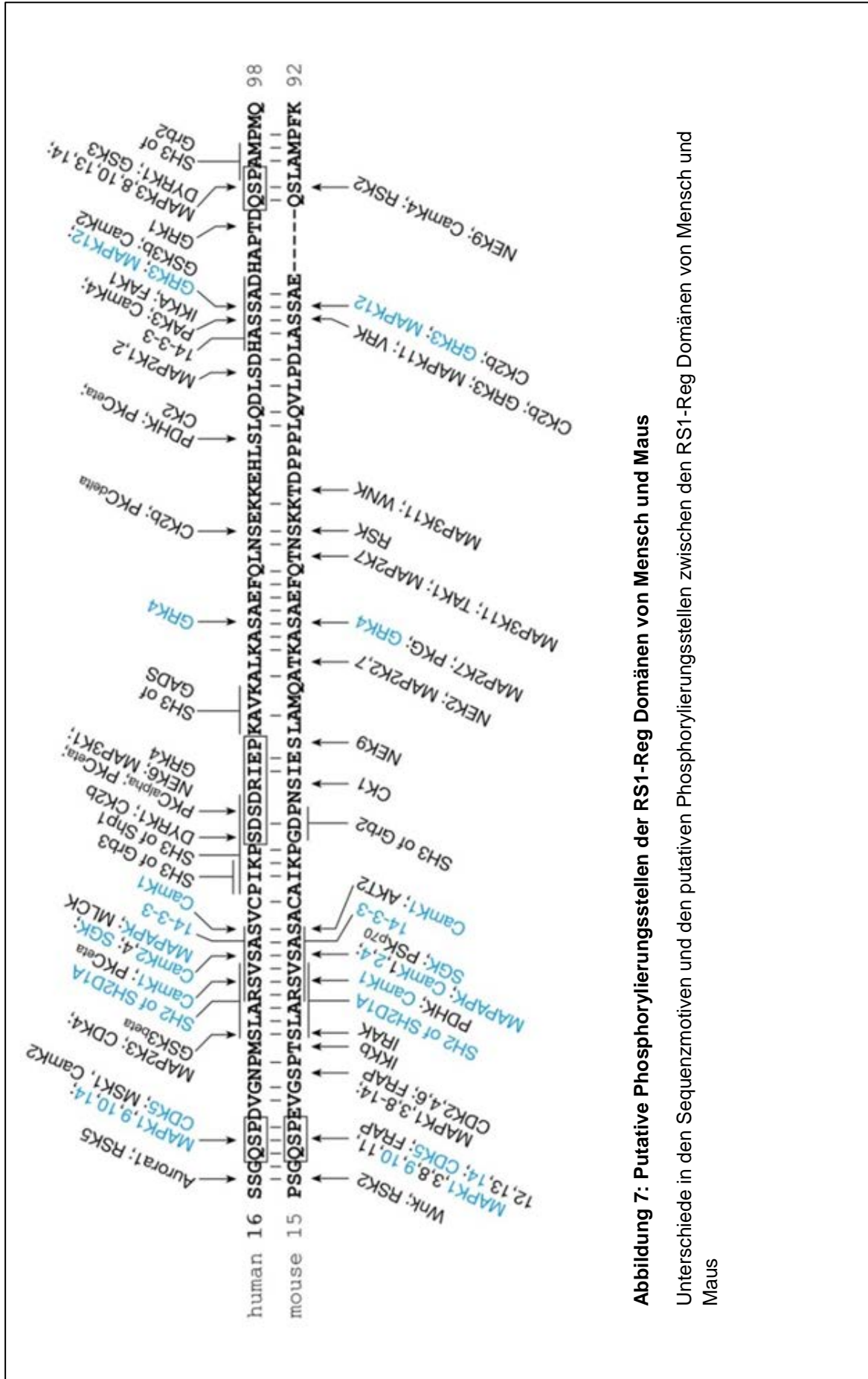


Abbildung 7: Putative Phosphorylierungsstellen der RS1-Reg Domänen von Mensch und Maus

Unterschiede in den Sequenzmotiven und den putativen Phosphorylierungsstellen zwischen den RS1-Reg Domänen von Mensch und Maus

## 2. Ziel dieser Studie

Das Hauptziel der vorliegenden Studie war es herauszufinden, ob der durch Versuche an Oozyten erhobene Befund, dass je nach Phosphorylierung der regulatorischen Domäne von RS1 (RS1-Reg) entweder der Na<sup>+</sup>-D-Glukosetransporter SGLT1 oder der Na<sup>+</sup>-Nukleosidtransporter CNT1 posttranslational herunterreguliert wird, *in vivo* bei einem Säugetier nachgewiesen werden kann. Da beide Transporter im Darm exprimiert sind und eine Beteiligung von RS1 an der glukoseabhängigen posttranslationalen Regulation im Darm in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen worden war, führte ich meine Untersuchungen am Darm von Mäusen durch. Die Untersuchungen wurden an Wildtyp-Mäusen und RS1KO-Mäusen durchgeführt, um zwischen der direkten Wirkung von RS1-Reg und einer Konkurrenz von RS1-Reg mit endogenem RS1 zu unterscheiden. Um die *in vivo* Untersuchungen durchführen zu können musste eine Methode gefunden werden, durch die RS1-Reg, RS1-Reg Mutanten oder länger Motive aus RS1-Reg, nach oraler Applikation in die Epithelzellen des Darms gelangen. Ein Ziel meiner Untersuchungen war, herauszufinden ob die Kopplung von Peptiden an Nanohydrogele, die von Prof. Jürgen Groll aus der Universitätsklinik Würzburg bereitgestellt wurden, für diesen Zweck geeignet sind.

### 3. Materialien und Methoden

#### Chemikalien

Alle für diese Arbeit verwendeten Basis-Chemikalien stammten von einer der folgenden Firmen: Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Perkin Elmer (Darmstadt, Deutschland) oder AppliChem (Darmstadt, Deutschland).

#### Tiere

Die für diese Arbeit verwendeten Tiere wurden nach Standard des deutschen Tierschutzgesetzes gehalten. Die Temperatur des Tierstalls betrug konstant 22°C und es herrschte ein Hell-Dunkel-Zyklus von 12 Stunden. Alle Tiere hatten bis zum Eintritt in den Versuch freien Zugang zu Futter und Wasser.

Wildtyp-Mäuse und RS1 Knockout-Mäuse (RS1KO) hatten als genetischen Hintergrund C57BL/6J. RS1KO Mäuse und Wildtyp-Mäuse, erhielten normale Standard-Diät (Altromin international, Lage, Deutschland).

Alle für die Versuche verwendeten Tiere hatten ein Alter von 2-3 Monaten um einen altersabhängigen Unterschied auszuschließen. Des Weiteren wurden alle Versuche um die gleiche Tageszeit durchgeführt um eine Beeinflussung der Aufnahmen durch eine tageszeitabhängige Regulation der Transporter zu vermeiden.

In die Versuche gingen ausschließlich männliche Mäuse ein, um eine Beeinflussung durch hormonelle Schwankungen auszuschließen.

## Peptide

Die in den folgenden Versuchen verwendeten Tripeptide QSP, QEP, QDP, QMP und QAP wurden von Dr. Rüdiger Pipkorn aus dem Deutschen Krebsforschungsinstitut in Heidelberg bezogen. Die Synthese erfolgte Mittels fmoc (N-(9-Fluorenyl)methoxycarbonyl) Methode (Pipkorn et al., 2002). Diese Methode basiert auf der Methode der Festphasen Proteinsynthese (Merrifield, 1969). Hierbei erfolgt die Kopplung einer durch fmoc geschützten Aminosäure an eine feste Matrix. Im Fall dieser Peptidsynthese war dies TentaGel S-RAM Harz (Rapp Polymere, Tübingen, Deutschland). Die Kopplung der Aminosäure-Derivate erfolgt über O-Benzotriazol-N,N,N',N'-Tetramethyluronium-Hexafluorophosphat (HBTU). Die fmoc-Gruppe wurde über 20% Piperidin in DMF entfernt. Zum Lösen der Peptide vom Polymer wurde eine Mischung aus Thioanisol, mCresol und Ethanedthiol in Trifluoressigsäure verwendet.

Die Klonierung der RS1-Reg Domäne und ihrer Mutanten erfolgte in unserem Labor durch Dr. Valentin Gorboulev und die Proteinsynthese und Aufreinigung wurden von Dr. Thorsten Keller ebenfalls in unserem Institut durchgeführt (Veyhl-Wichmann et al., 2015). Hierzu wurde für die Fragmente zunächst eine PCR zur Generierung geeigneter Schnittstellen durchgeführt. Für die humane Form wurde der forward-Primer 5'TATACATATGTGCTCTTCAGGACAGASTCCTG3' mit einer NdeI Erkennungsstelle und einem Initiationscodon sowie einem Codon für Cystein und der Revers-Primer 5'GTCTCGAGCTGCATAGGCATAGCTGG3' mit einer XhoI Erkennungsstelle eingesetzt. Im Fall der murinen RS1-Reg-Fragmente wurden als forward-Primer 5'GGTACATATGTGTCCTTCAGGGCAGAGTCCTG5' und der Revers-Primer 3'GTCTCGAGATGGAAAGGCATGGCTAGACTC5' mit den gleichen Schnittstellen und Codons wie für die humane Domäne beschrieben, verwendet. Die Amplifikationsprodukte wurden mit NdeI und XhoI geschnitten und in den open reading frame des pET21a Vektors mit C-terminalem His-Tag kloniert. Die Expression der Proteine erfolgte im *E.coli*-Stamm BL21. Nach der Transfektion wurden die Bakterien bis zur mittleren logarithmischen Phase herangezüchtet. Das Bakterienwachstum wurde Mittels Zugabe von 1mM Isoprpyl-1-thio-β-D-Galactopyranosid (IPTG) bei 30°C für 3 Minuten induziert. Anschließend wurden die Bakterienzellen für 15 Minuten bei 6000xg abzentrifugiert. Nach Resuspendierung der



Bakterien in 20mM Tris-HCl (pH 8,0) mit 500mM NaCl und 50mM Imidazol erfolgte die Lysierung durch Ultraschallbehandlung bei 4°C. Anschließend wurde die Suspension zum Entfernen der Zelltrümmer noch einmal für 60 Minuten bei 100000xg zentrifugiert. Um die Proteine aufzureinigen wurde der Überstand für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose inkubiert. Die Agarose wurde anschließend in eine Gravitationsfluss-Säule gefüllt. Nach ausgiebigem Waschen mit 20mM Tris-HCl (pH 8,0) mit 500mM NaCl und 50mM Imidazol wurden die gebundenen Peptide mit dem selben Puffer, welcher für diesen Schritt jedoch 500mM Imidazol enthielt eluiert und die Peptid-enthaltenden Fraktionen vereint. Um die Peptide in Versuchen einsetzen zu können wurde eine Dialyse gegen 20mM Hepes (pH 7,5) mit 150mM NaCl durchgeführt.

Die SDS-DRIE- Mutanten welche zur Kopplung an Nanohydrogele (siehe unten) ein N-terminales Cystein enthielten, stammten von der Firma xaia custom peptides (XCP) (Göteborg, Schweden).

### Radioaktive Substanzen

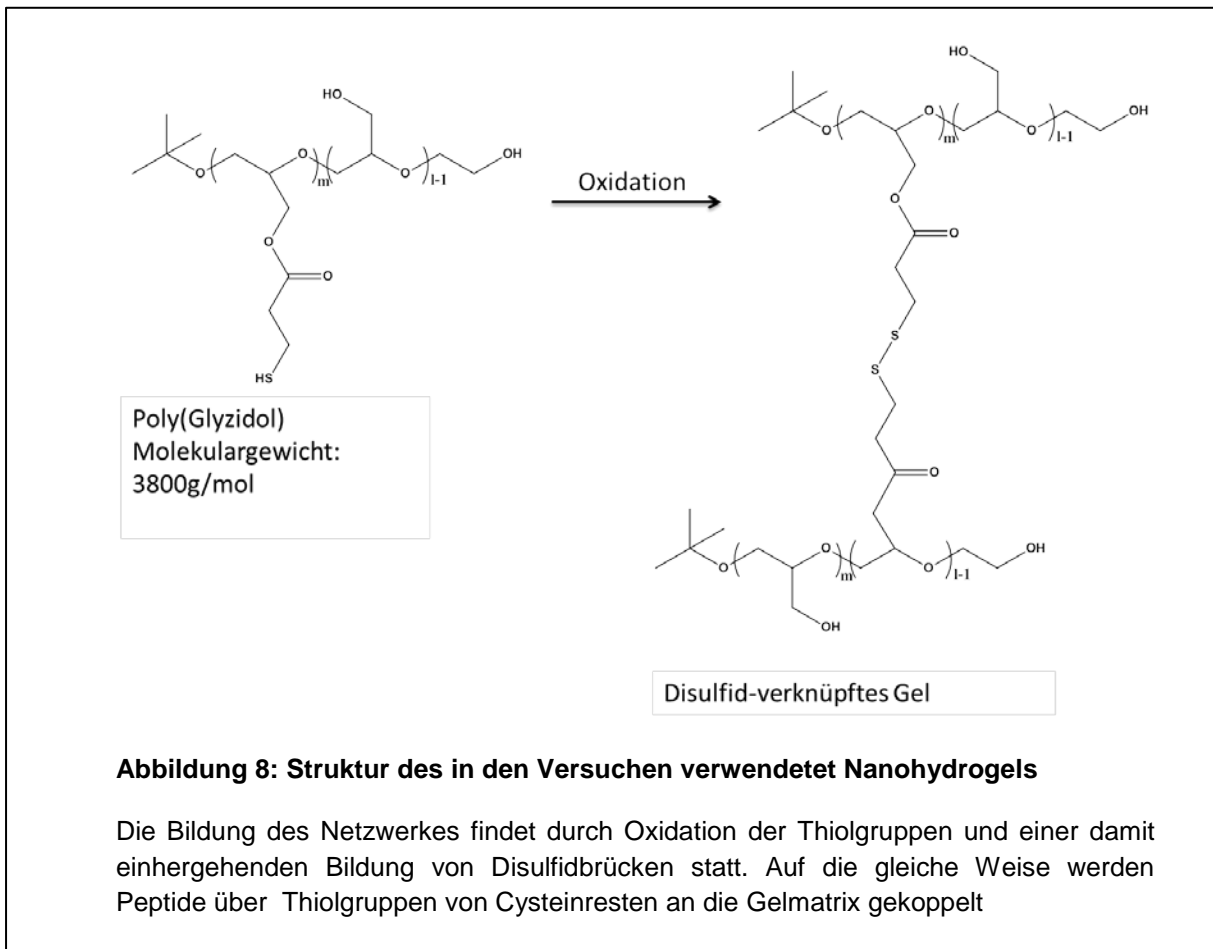
Die radioaktiven Substanzen ART 0154 Uridin [5-<sup>3</sup>H] (0,91TBq/mmol) und ARC 0131 Methyl- $\alpha$ -D-Glykopyranosid [glucose-<sup>14</sup>C(U)] (11,1 GBq/mmol) stammten von der Firma American radiolabeled Chemicals, Inc. (St. Louis, USA)

### Nanohydrogel

Die für die Aufnahmemessungen genutzten Nanohydrogele wurden von Frau Dr. Smriti Singh, Mitarbeiterin der Forschungsgruppe um Professor Jürgen Groll am Lehrstuhl für makromolekulare Materialien und Oberflächen an der RWTH Aachen synthetisiert. Ebenso wurde die Kopplung der Peptide an das Nanohydrogel von Frau Dr. Singh durchgeführt. Die Herstellung der inversen Miniemulsion erfolgte aus 2,5ml Hexan, welches 50,3mg Span80 (Sigma, Taufkirchen, Deutschland), 16,7mg Tween80 (Sigma), 0,4ml 20mM Hepes (pH 7,4) mit 100mg thiol-funktionalisiertes Polyglyzidol-Polymer und 0,28mg Cystein-terminiertem *transactivator of transkription* (TAT)-Peptide (Peptides international, Louisville, Kentucky, USA) enthielt. Für die Kopplung der Peptide wurden 0,28mg Cystein-terminiertes RS1-Reg oder 2mg SDS-DRIE, SDADRIE oder SDEDRIE hinzugegeben. Die Herstellung der

Miniemulsion erfolgte durch Mischen der organischen und der wässrigen Phase und anschließender Ultraschallbehandlung bei 0°C. Für die Ausbildung der Disulfid-Brücken wurden 60µl einer 0,1M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Lösung hinzugegeben. Nach der Ultraschallbehandlung für 60 Sekunden erfolgte eine Inkubation für 25 Minuten bei Raumtemperatur. Zum Quenchen der Oxidation wurde die Emulsion angesäuert und anschließend die Nanopartikel abzentrifugiert. Die wässrige Phase mit den Nanopartikeln wurde anschließend separiert und vier Mal mit einer Tetrahydrofuran/Wasser-Lösung (20%/80%) gewaschen um Rückstände zu beseitigen. Um verbliebenes organisches Lösungsmittel und Säure zu entfernen erfolgte eine Dialyse gegen Wasser. Die Lagerung erfolgte nicht länger als 2 Wochen bei 4°C (Groll Jürgen, 2009).

Struktur der Nanohydrogele:



Für die Transportmessungen wurden die zu untersuchenden Peptide über Disulfidbrücken zwischen der Polyglyzidol-Matrix und der Thiolgruppe eines Cysteinrestes im Peptid an die Nanohydrogele gekoppelt (**Abb. 8**). Nach Eindringen des Gels in die Zellen über Endozytose werden die Disulfidbrücken über reduziertes Glutathion reduziert und die Peptide auf diesem Weg freigesetzt. Zusätzlich wird auf die gleiche Weise das TAT-Peptid (*transactivator of transkription*, Sequenz: CGRLRRQRRR) gekoppelt, welches aus dem HI-Virus stammt und Endozytose verstärkt (Mann and Frankel, 1991). Dieses sorgt für eine verstärkte Aufnahme des Gels. In Peptidanalysen, welche außerhalb unseres Labors durchgeführt wurden, konnte eine Konzentration von 50µM an gebundenem Peptid gemessen werden.

### Alginatkapseln

Die in der Studie genutzten Alginatkapseln, welche zum Schutz des QEPs vor Abbau im Magen verwendet wurden, wurden von der Firma Brace GmbH (Alzenau, Deutschland) hergestellt. Die leeren Kontrollkapseln bestanden aus 56,66% Siliziumdioxid BR-360, 25,97% Polymaltotriose, 17,31% Alginat und 0,06% NaCl. Bei den mit QEP beladenen Kapseln wurden 50,74% Siliziumdioxid BR-360, 23,53% Polymaltotriose, 15,69% Alginat BR-GM, 9,98% QEP und 0,06% NaCl verwendet. Die Kapseln waren feste Mikrokugeln mit einem Durchmesser von 500µm und wiesen eine Magensaftresistenz auf.

### Puffer und Lösungen

Krebs-Ringer- Puffer mit Natrium: 25mM HEPES, 118mM NaCl, 4,8mM KCl, 1,2mM MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 1,2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,3-7,4

Krebs-Ringer-Puffer ohne Natrium: 25mM HEPES, 122,8mM KCl, 1,2mM MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 1,2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,3-7,4

Phosphat-gepufferte Saline (PBS): 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150mM NaCl, pH 7,4

Wichtige Geräte

Gerät	Firma
Blutzuckermessgerät (Contour)	Bayer
Knopfkanüle	Unimed
Szintillationscounter	PerkinElmer

Wichtiges Verbrauchsmaterial

Gegenstand	Firma
Bottle-top-Filter	Millipore
24-Well-Platten	Thermo

Als Software wurden Microsoft Word, Microsoft Excel und Graphpad Prism genutzt.

### Applikation per Schlundsonde

Um zu bestimmen, ob RS1-Reg, RS1-Reg Mutanten oder kürzere Peptide den Transport von SGLT1 oder CNT1 beeinflussen wurde RS1 knock-out Mäusen (RS1KO) und Wildtypmäusen (WT-Mäuse), welche zum Ausschluss einer futterabhängigen Transporterregulation für 16 Stunden gefastet hatten 200µl einer Nanohydrogelsuspension mit gekoppeltem RS1-Reg, RS1-Reg Mutanten, SDADRIEP oder SDEDRIEP oder einer wässrigen Lösung mit QEP, QAP, QMP, QTP oder QSP per Schlundsonde verabreicht. Als Kontrollen diente Nanohydrogel ohne gekoppelte Peptide oder Wasser.

Für die Blutzuckermessungen wurden den Mäusen 400µl einer 40%igen D-Glukose-Lösung verabreicht.

### Messung der Effekte von per Magensonde applizierten Peptiden auf die Transportaktivitäten im Dünndarm

Drei Stunden nach Verabreichung der Peptide per Schlundsonde wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und der Dünndarm entnommen und bei Raumtemperatur (RT) mit 20ml Krebs-Ringer-Puffer gewaschen. Anschließend wurde der Darm evertiert und in Segmente von 1cm Länge geschnitten. Diese wurden anschließend in Krebs-Ringer-Puffer mit dem jeweiligen Substrat inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 2 Minuten, in einigen Versuchen für 45 Sekunden. Der Inkubationspuffer wurde vor Versuchsbeginn mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) vorbegeat. Für die Analyse der transporterspezifischen Aufnahme wurden je 4 Segmente in einem Puffer inkubiert, bei welchem der jeweilige Transporter inhibiert war. Zur Bestimmung der Aufnahme durch SGLT1 wurden hierfür 10µM für Niedrigzucker- und 1mM für die Hochzucker-Bedingung an α-Methyl-Glykopyranosid (AMG), welches ein spezifisches Substrat für SGLT1 ist, eingesetzt. Es ist bekannt, dass SGLT1 innerhalb von Minuten hochreguliert wird, daher sollte die AMG-Aufnahme in unserer Messung innerhalb dieser 2-minütigen Messzeit ebenfalls hochreguliert werden (Gorboulev et al., 2012). Diese unterschiedlichen Glukosekonzentrationen wurden untersucht, da in Vorversuchen gezeigt wurde, dass die

Regulation des SGLT1 durch RS1 zuckerabhängig ist. Um die Aufnahme zu messen, wurde zusätzlich eine geringe Menge (0,12 $\mu$ Ci/ml) an radioaktiv markiertem AMG hinzugegeben ( $^{14}$ C-markiert). Als Inhibitionsbuffer diente der gleiche Puffer mit 200 $\mu$ M des SGLT1-spezifischen Inhibitors Phlorizin für die Niedrigzucker-Bedingungen und 1mM Phlorizin für die Hochzucker-Bedingungen. Die Aufnahme wurde durch Transfer der Darmsegmente für 5 Minuten in eiskalten Krebs-Ringer-Puffer mit 200 $\mu$ M Phlorizin gestoppt.

Im Fall der CNTs wurde als Substrat Uridin verwendet. Es wurden 1 $\mu$ M Uridin mit 0,2  $\mu$ Ci/ml radioaktiv markiertem Uridin (Tritium-markiert) eingesetzt. Da CNTs, genau wie SGLT1, Natrium-abhängige Transporter sind, diente in diesem Fall ein Natrium-freier Puffer als Inhibitionsbuffer. Die Inkubation erfolgte für 2 Minuten bei 37°C. Der Stopp der Aufnahme erfolgte durch Inkubation der Segmente für 5 Minuten in eiskaltem Krebs-Ringer-Puffer ohne Natrium.

Zum Schluss wurden die Segmente mit 50ml eiskaltem Krebs-Ringer-Puffer gewaschen und über Nacht mit 500 $\mu$ l Soluene 350© gelagert. Am nächsten Tag wurden die in Soluene 350© befindlichen Segmente zur vollständigen Lysierung weitere 1,5 Stunden bei 60°C inkubiert. Im Anschluss wurden jeweils 200 $\mu$ l der Probe in 2mL Szintillationslösung pipettiert und die Radioaktivität gemessen.

#### Analyse des Blutzuckeranstiegs nach Glukose-Bolus

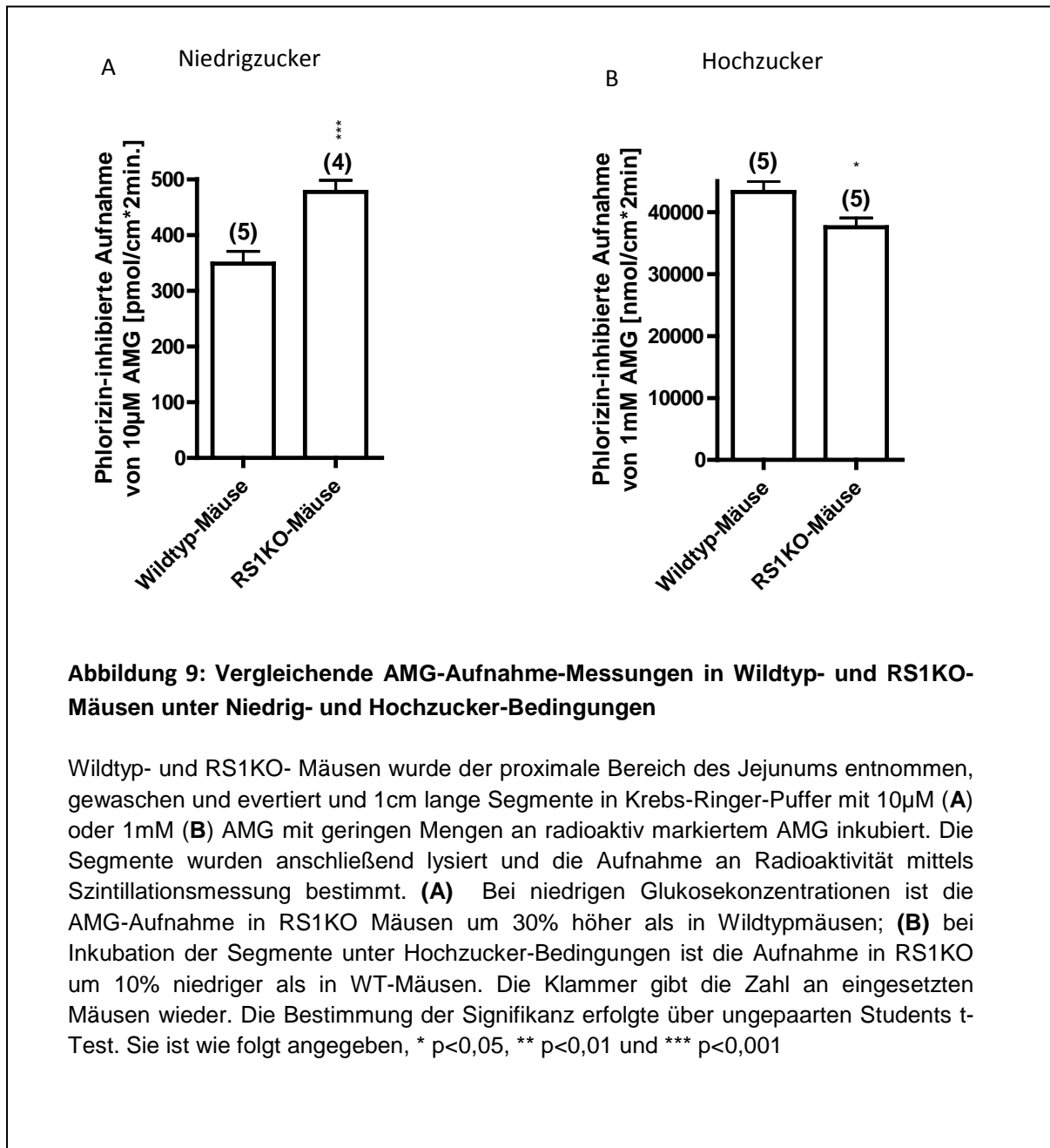
Mäusen wurden 2 Stunden vor dem Belastungstest 200 $\mu$ l einer 100mM QEP-Lösung per Magensonde verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt 200 $\mu$ l PBS. Nach diesen 2 Stunden bekamen die Mäuse einen weiteren Bolus mit 400 $\mu$ l einer 40%igen (w/v) Glukoselösung. Die Blutzuckermessung erfolgte 15 Minuten nach dem Glukosebolus mit einem Blutzuckermessgerät (Contour, Bayer, Germany).

## 4. Ergebnisse

In früheren Untersuchungen mit diversen Mutanten der humanen regulatorischen Domäne und kürzeren regulatorisch aktiven Motiven von hRS1 in *Xenopus laevis*-Oozyten konnte gezeigt werden, dass bestimmte Sequenzen für die Regulation unterschiedlichster Transporter verantwortlich sind und das hierbei die Phosphorylierung bestimmter Phosphorylierungsstellen maßgeblich ist. In der folgenden Studie wurde die regulatorische Aktivität dieser Peptide auf den Na<sup>+</sup>-D-Glukose-Kotransporter SGLT1 und die konzentrierenden Nukleosidtransporter (CNTs) im Dünndarm der Maus untersucht um zu zeigen, ob die Regulation, welche bisher nur im Oocytenystem gezeigt wurde, auch *in vivo* zu beobachten ist.

### 4.1. Unterschiede in der AMG-Aufnahme zwischen Wildtyp- und RS1-Knockout-Mäusen (RS1KO-Mäuse)

Für die folgende Studie wurde in unserem Labor die Methode der "kleinen evertierten Darmsegmente" eingeführt. Hierbei werden Darmsegmente in Puffer inkubiert, welcher das Substrat für den jeweiligen Transporter mit geringen Mengen an radioaktiv markiertem Substrat enthält und anschließend die Aufnahme an radioaktiv markiertem Substrat in den Zellen bestimmt. Um zu untersuchen, ob sich die Glukoseaufnahme mit und ohne aktivem RS1-Protein unterscheidet, wurden zunächst Messungen an Wildtyp-Mäusen (WT-Mäuse) und Mäusen, bei welchen das regulatorische Protein RS1 durch Entfernen eines Exons ausgeschaltet wurde (RS1KO-Mäuse), unter Niedrigzucker-Bedingungen durchgeführt. Es ist aus Oozytenmessungen bekannt, dass bei niedrigen Zuckerkonzentrationen die SGLT1-vermittelte Glukoseaufnahme durch RS1 inhibiert wird (Veyhl et al., 1993). Daher wurden Segmente des proximalen Dünndarms von WT-Mäusen und RS1KO-Mäusen in Puffer mit 10µM des SGLT1-spezifischen Substrats α-Methyl-D-Glykopyranosid (AMG) mit geringen Mengen radioaktiv markiertem AMG für 2 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend die Aufnahme an radioaktivem AMG nach Lyse des Darmgewebes gemessen.



Wie in **Abb. 9A** gezeigt ist, konnte für RS1KO-Mäuse unter niedrigen Zuckerkonzentrationen eine 30% höhere AMG-Aufnahme gezeigt werden als für Wildtyp-Mäuse. Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung an isolierten Bürstensaummembranen (BBM), bei welchen in RS1KO-Mäusen eine 15fach höhere AMG Aufnahme gezeigt werden konnte als in den BBMs von WT-Mäusen (Veyhl-Wichmann et al., 2015). Aus früheren Versuchen, welche in unserem Labor durchgeführt wurden, ist bekannt, dass SGLT1 in Anwesenheit hoher

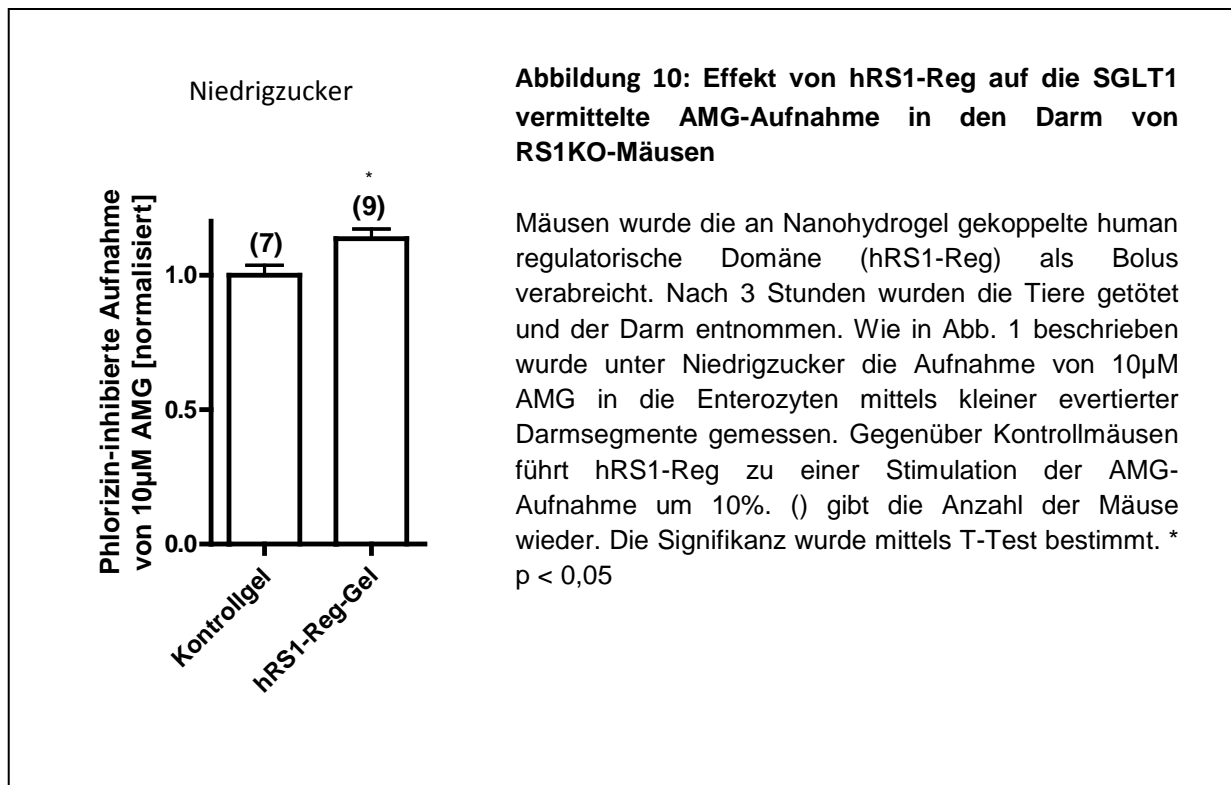


Zuckerkonzentrationen nicht mehr durch hRS1-Reg inhibiert wird (Veyhl-Wichmann et al., 2015). Daher sollte untersucht werden, ob WT- und RS1KO-Mäuse unter Hochzucker-Bedingung die gleiche Aufnahme zeigen. Dies würde bestätigen, dass RS1 in diesem Fall in den WT-Mäusen nicht mehr aktiv ist. Hierzu wurden die oben beschriebenen Messungen an WT-Mäusen und RS1KO-Mäusen mit Inkubationspuffer, in dem diesmal 1mM AMG eingesetzt wurde, durchgeführt. In **Abb. 9B** ist zu sehen, dass in den RS1KO-Mäusen unter diesen Bedingungen die Aufnahme nicht mehr höher als in den WT-Mäusen war. Im Vergleich dazu war sie in Anwesenheit von 1mM AMG in WT-Mäusen mit einer schwachen Signifikanz um ca. 10% höher als in den RS1KO-Mäusen. Dieses Ergebnis ist anders als erwartet, könnte jedoch darauf zurückzuführen sein, dass in RS1KO Mäusen auch andere Proteine verändert sind, welche in diesem Fall hineinspielen könnten. Dieses Ergebnis ist im Verlauf meiner Doktorarbeit immer wieder zu beobachten.

#### **4.2. Effekte von RS1-Reg des Menschen (hRS1-Reg) und Mutanten von hRS1-Reg auf die Phlorizin-hemmbar Aufnahme von 10 $\mu$ M AMG in den Darm von RS1KO Mäusen**

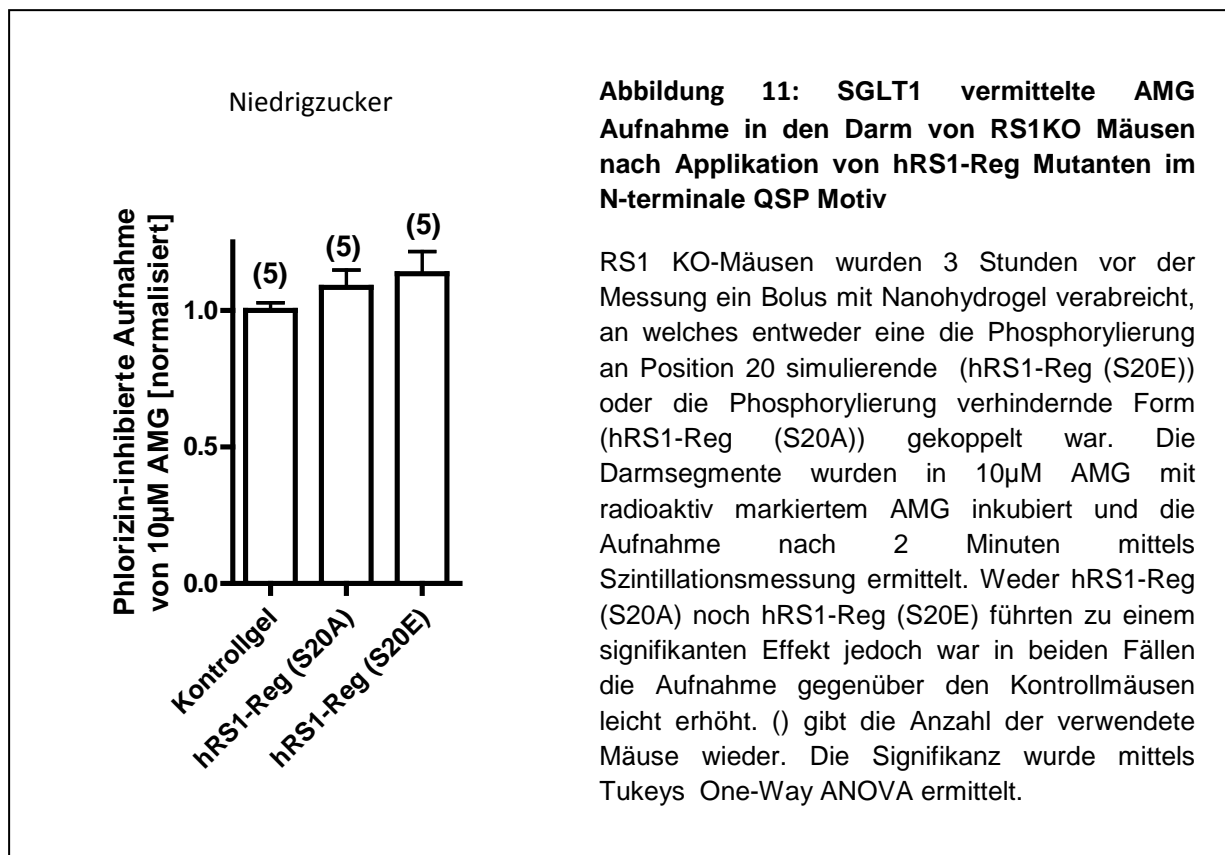
Im Weiteren Verlauf wurde untersucht, ob Beobachtungen aus Oozytenmessungen mit regulatorisch aktiven Sequenzen von RS1 auch im *in vivo*- System Maus erreicht werden. Im Mausmodell wurde hierzu wiederum die oben beschriebene Methode der kleinen evertierten Darmsegmente angewandt. Zunächst wurde die zuerst in Oocyten charakterisierte humane regulatorische Domäne von RS1 (hRS1-Reg) untersucht. Da diese Region aus ca. 80 Aminosäuren besteht und sie somit nicht einfach per Diffusion oder über einen Transporter in die Zelle hinein gelangen kann, musste ein anderer Weg gefunden werden. Wir koppelten deshalb hRS1-Reg an ein Nanohydrogel. Das Nanohydrogel besteht aus einer Matrix aus einem Polyglyzidol. An diese Matrix werden Peptide über die Thiolgruppe eines Cysteins per Disulfidbrücken kovalent mit einer Thiolgruppe der Matrix gebunden. Durch das ebenfalls an die Matrix gekoppelte *transactivator of transcription* (TAT)-Protein, welches aus dem HI-Virus stammt und Clathrin-abhängige Endozytose vermittelt, wird das Peptid zusammen mit dem Nanohydrogel per Endozytose in die Zelle transportiert und durch Reduktion der Disulfidbrücken durch reduziertes Glutathion freigesetzt. Die Versuche wurden mit RS1KO-Mäusen durchgeführt, um eine Beeinflussung

durch endogenes RS1 zu vermeiden. Den Mäusen wurde 3 Stunden vor Versuchsbeginn über eine Schlundsonde 200µl Nanohydrogel, an welches hRS1-Reg gekoppelt war, verabreicht. Als Kontrolltiere dienten Mäuse, welche ein Nanohydrogel verabreicht bekamen, an welches lediglich das TAT-Peptid gekoppelt war. Nach 3 Stunden wurde der proximale Bereich des Jejunums entnommen, und mittels kleiner evertierter Darmringe die Aufnahme von AMG unter niedrigen AMG-Konzentrationen (10 µM) mit geringen Mengen an radioaktiv markiertem AMG gemessen. Wie in **Abbildung 10** zu erkennen ist, beobachteten wir mit hRS1-Reg anstelle der erwarteten Hemmung der Phlorizin-hemmbarer AMG Aufnahme (Veyhl-Wichmann et al., 2015) eine ca. 10%ige Stimulation.



Die bei RS1KO-Mäusen beobachtete Stimulation der AMG-Aufnahme im Mäusedarm durch hRS1-Reg zeigt, dass hRS1-Reg die Expression von SGLT1 der Maus (mSGLT1) im Mäusedarm in anderer Weise beeinflusst als den in Oozyten exprimierten hSGLT1 Transporter. Neben speziesbedingten Unterschieden der an der Regulation von SGLT1 beteiligten Proteine zwischen Mäusedarm und Oozyten, kann dies auch durch Speziesunterschiede zwischen RS1-Reg des Menschen (hRS1-Reg) und der Maus (mRS1-Reg) bedingt sein. **Abb. 13** zeigt, dass nur 60% der Aminosäuresequenz zwischen hRS1-Reg und mRS1-Reg identisch und nur

11 der 16 Konsensussequenzen für die Phosphorylierung in hRS1-Reg in mRS1-Reg erhalten sind während mRS1-Reg 7 zusätzliche Konsensussequenzen für die Phosphorylierung enthält. Da in Oozyten gezeigt wurde, dass sich Mutationen im ersten QSP Motiv von mRS1-Reg auf die Affinität, mit der der durch hSGLT1 exprimierte Transport gehemmt wurde, auswirkt (Veyhl-Wichmann et al., 2015), untersuchten wir, ob Mutationen in dieser Position den Effekt von hRS1-Reg auf die Phlorizin-hemmbar AMG Aufnahme im Dünndarm der Maus verändern.



Zur Simulation der Phosphorylierung wurde das Serin an Position 20, welches in der regulatorischen Tripeptidsequenz QSP liegt, gegen ein Glutamat substituiert (RS1-Reg (S20E)). Für die Mutante, welche die Phosphorylierung verhindert, wurde das Serin gegen ein Alanin ausgetauscht (RS1-Reg (S20A)). Auch diese Peptide wurden an Nanohydrogel gekoppelt und RS1-KO Mäusen per Schlundsonde verabreicht. Nach 3 Stunden wurde mit den Mäusen, wie oben beschrieben, verfahren. Die Segmente wurden für 2 Minuten in Krebs-Ringer-Lösung mit 10 $\mu$ M AMG inkubiert und anschließend die Aufnahme an radioaktiv markiertem AMG bestimmt. Die beiden hRS1-Reg Mutanten zeigten eine ähnliche Wirkung

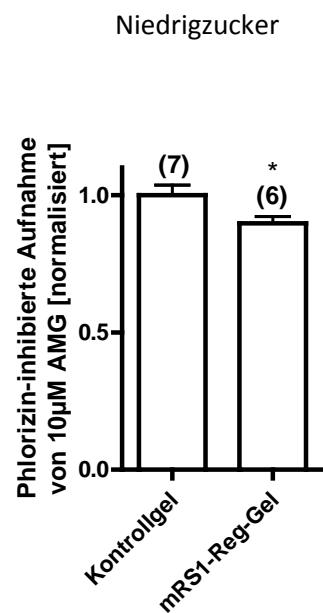
wie der hRS1-Reg-Wildtyp (**Abbildung 11**). Die Phlorizin-hemmbarere Aufnahme war leicht erhöht, allerdings war dieser Effekt nicht signifikant. Die Daten zeigen, dass sich die Mutationen von hRS1-Reg in Position Ser20 auf die Expression von mSGLT1 im Mäusedarm anders auswirken als auf die Expression von hSGLT1 in Oozyten.

### **4.3. Effekte von RS1-Reg der Maus (mRS1-Reg) auf die SGLT1 vermittelte Aufnahme von 10 $\mu$ M und 1mM AMG in den Darm von RS1KO Mäusen**

Die DNA-Sequenz des RS1-Proteins ist zwischen verschiedenen Spezies zu etwa 70% konserviert. Die Aminosäuresequenz von hRS1-Reg und mRS1-Reg ist zu 60% identisch (**Abb. 13**). Das in hRS1-Reg identifizierte regulatorisch aktive Oktapeptidmotiv SDDRIEP kommt in mRS1-Reg nicht vor (Veyhl-Wichmann et al., 2015). Das regulatorisch aktive Tripeptid QSP findet sich in hRS1-Reg zweimal, kommt dagegen in mRS1-Reg nur einmal vor. Um zu testen ob mRS1-Reg, im Gegensatz zu hRS1-Reg, SGLT1 im Darm der Maus herunterreguliert, führte ich Versuche mit mRS1-Reg bei RS1KO Mäusen unter Niedrigzucker- und Hochzucker-Bedingungen durch. mRS1-Reg wurde wie in den Methoden beschrieben an Nanohydrogel gekoppelt und den Mäusen per Schlundsonde verabreicht. Das Protein war mit einer Konzentration von 50 $\mu$ M an das Nanohydrogel gebunden. Nach 3 Stunden Boluszeit wurde die Phlorizin-hemmbarere Aufnahme von 10 $\mu$ M AMG an evertierten Darmsegmenten gemessen (**Abbildung 12**). Im Gegensatz zu hRS1-Reg bewirkte mRS1-Reg keine leichte Stimulierung sondern eine ca. 10% Hemmung der Phlorizin-hemmbaren AMG-Aufnahme.

**Abbildung 12: Effekt von mRS1-Reg auf die SGLT1-vermittelte AMG Aufnahme in den Darm von RS1KO-Mäusen unter Niedrigzucker-Bedingungen**

RS1KO Mäusen wurde ein Bolus mit der regulatorischen Domäne des mRS1 Proteins gegeben. Nach 3 Stunden wurde die AMG-Aufnahme unter Niedrigzucker-Bedingungen in kleinen evertierten Darmsegmenten wie in **Abb. 2** beschrieben gemessen. Es war ein leicht signifikanter Effekt auf die AMG-Aufnahme zu beobachten. mRS1-Reg führte zu einer schwach signifikanten Inhibition der AMG-Aufnahme um 10%. ( ) gibt die Anzahl der Mäuse wieder. Die Signifikanz wurde mittels T-Test bestimmt \*  $p < 0.05$

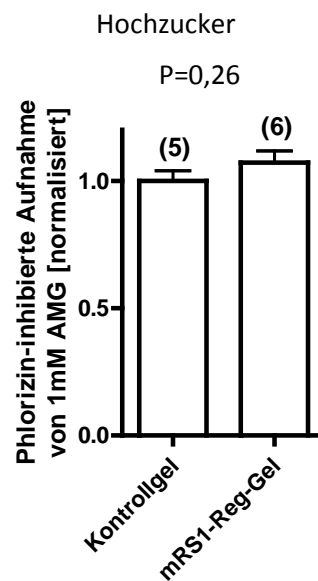


Da Versuche an Oozyten gezeigt hatten, dass die Herunterregulation von hSGLT1 durch hRS1-Reg in Gegenwart von 0.25mM intrazellulärem AMG aufgehoben war (Veyhl-Wichmann et al. 2015), überprüfte ich, ob dieser Effekt auch im Darm von RS1KO Mäusen mit mRS1-Reg zu beobachten ist. In der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die glukoseabhängige Regulation im Darm innerhalb von zwei Minuten erfolgt, aus diesem Grund wählte ich eine Bedingung bei der die Regulation durch intrazelluläres AMG während der 2 Minuten langen Transportmessung erfolgen kann. Hierzu wurden die Phlorizin-hemmbar Aufnahme von 1mM AMG in die evertierten Darmsegmente gemessen. Wie zu erwarten war, konnte unter Hochzucker-Bedingungen keine signifikante Inhibition der AMG-Aufnahme durch mRS1-Reg beobachtet werden (**Abb. 14**).



**Abbildung 14: Effekt von mRS1-Reg auf die Transportaktivität von SGLT1 im Darm von RS1KO-Mäusen unter Hochzucker-Bedingungen**

Die unter **Abb. 12** beschriebenen Messungen wurden mit einem Inkubationspuffer durchgeführt, welcher 1mM AMG enthielt um eine Hochzuckersituation zu erzeugen. Bei hohen Glukose-Konzentrationen war keine Inhibition der AMG-Aufnahme durch mRS1-Reg zu beobachten. ( ) gibt die Anzahl der Mäuse wieder. Die Signifikanz wurde Mittels Student t-Test bestimmt.

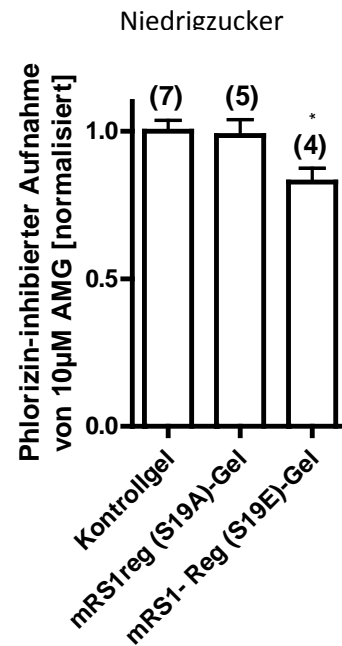


**4.4. Effekte von mRS1-Reg Mutanten bei denen die Phosphorylierung im QSP Motiv verhindert oder simuliert wurde auf die Regulation von SGLT1 im Darm.**

Die regulatorische Sequenz mRS1-Reg besitzt nur ein QSP Motiv (Aminosäure 18-20). Um herauszufinden, ob die Phosphorylierung in diesem Motiv die Regulation von SGLT1 im Darm beeinflusst, führte ich Untersuchungen mit mRS1-Reg Mutanten durch, bei denen die Phosphorylierung simuliert (mRS1-Reg(S19E)) oder verhindert wurde (mRS1-Reg(S19A)). Diese Mutanten wurden wie oben beschrieben an Nanohydrogel gekoppelt und Mäuse, wie oben beschrieben, mit den an Nanohydrogel gekoppelten Peptiden und nicht mit Peptid beladenen Nanohydrogel als Kontrolle behandelt. Anschließend wurde die Aufnahme von 10µM AMG in die Zellen von evertierten Darmringen untersucht. Unter diesen Bedingungen verursachte RS1-Reg(S19E) eine 20%ige Erniedrigung der AMG-Aufnahme während mRS1-Reg(S19A) die AMG Aufnahme nicht veränderte (**Abb. 15**).

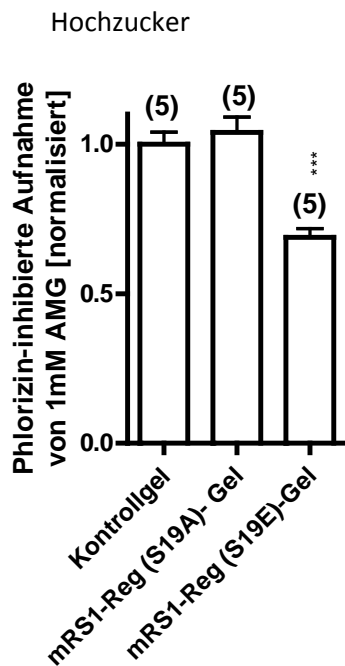
**Abbildung 15: Einfluss von Mutationen im QSP Motiv von mRS1-Reg auf die SGLT1 vermittelte AMG Aufnahme in den Darm von RS1KO Mäusen unter Niedrigzucker-Bedingungen**

In RS1KO-Mäusen, welche die phosphorylierungs-simulierende und die phosphorylierungs-verhindernde Mutante von mRS1-Reg als Bolus verabreicht bekamen, wurden unter Niedrigzucker-Bedingungen AMG-Aufnahmemessungen in kleinen evertierten Darmsegmenten wie oben beschrieben durchgeführt. Die Aufnahme innerhalb von 2 Minuten wurde mittels Szintillationsmessung bestimmt. Die phosphorylierte Form mRS1-Reg (S19E) führt zu einer Inhibition der AMG-Aufnahme um 20%. Die dephosphorylierte Form mRS1-Reg (S19A) zeigte keine inhibitorische Wirkung. ( ) gibt die Anzahl an verwendeten Mäusen wieder. Die Signifikanz wurde Mittels Tukeys One-way ANOVA bestimmt und ist auf die Kontrollgruppe bezogen; \*  $p < 0,05$ .



Als nächstes testete ich den Einfluss der Mutationen unter Hochzuckerbedingungen. RS1KO-Mäusen wurde Nanohydrogel, Nanohydrogel mit gekoppeltem mRS1-Reg(S19A) oder Nanohydrogel mit gekoppeltem mRS1-Reg (S19E) per Magensonde verabreicht. Drei Stunden später wurde die Phlorizin-hemmbar Aufnahme von 1mM AMG gemessen (**Abb.16**). Unter Hochzucker-Bedingungen wurde qualitativ das gleiche Ergebnis erzielt wie unter Niedrigzucker-Bedingungen. Die Transportaktivität von SGLT1 wurde durch mRS1-Reg(S19E) gehemmt während sie durch mRS1-Reg(S19A) nicht beeinflusst wurde. Interessanterweise betrug die Hemmung durch mRS1-Reg(S19E) unter Hochzuckerbedingungen 40% und war damit deutlich höher als unter Niedrigzucker-Bedingungen. Die wahrscheinlichste Erklärung für diesen Effekt ist eine Affinitäts-erhöhung von mRS1-Reg(S19E) in Bezug auf die Herunterregulation von SGLT1 im Mäusedarm. In humanen SGLT1 exprimierenden Oozyten wurde in unserem Labor gezeigt, dass die Affinität von mRS1-Reg(S19E) nach Injektion von AMG leicht jedoch nicht signifikant erhöht war (Veyhl-Wichmann et al., 2015).



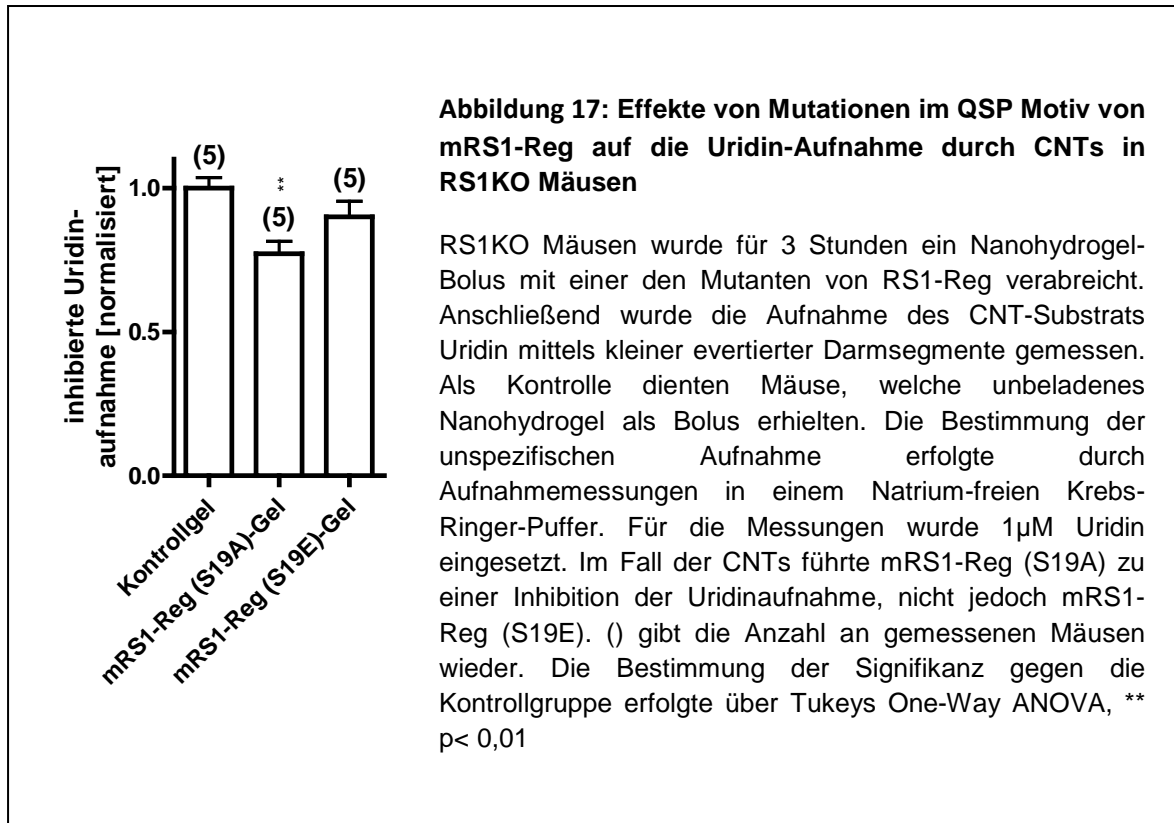


**Abbildung 16: Einfluss von Mutationen im QSP Motiv von mRS1-Reg auf die SGLT1 vermittelte AMG Aufnahme in den Darm von RS1KO Mäusen unter Hochzucker-Bedingungen**

RS1KO-Mäusen wurde ein Bolus mit Nanohydrogel verabreicht, an welches eine der beiden Mutanten gekoppelt war. Nach drei Stunden wurde die AMG-Aufnahme für 2 Minuten in evertierter Darmsegmenten unter Hochzucker-Bedingungen gemessen. Hierzu wurden im Puffer 1mM AMG eingesetzt. Die Messung erfolgte wie oben beschrieben, über Szintillationsmessungen. Unter Hochzucker-Bedingungen führte mRS1-Reg (S19E) zu einer stärkeren Inhibition der AMG-Aufnahme als bei niedrigen Glukose-Konzentrationen. mRS1-Reg (S19A) führte auch in diesem Fall zu keiner Inhibition. ( ) gibt die Anzahl an eingesetzten Mäusen wieder. Die Auswertung der Signifikanz erfolgte Mittels Tukeys One Way ANOVA und ist auf die Kontrollgruppe bezogen; \*\*\*  $p < 0,001$

#### 4.5. Effekte von mRS1-Reg Mutanten bei denen die Phosphorylierung im QSP Motiv verhindert oder simuliert wurde auf die Regulation der Nukleosidtransporter (CNTs) im Darm von RS1KO Mäusen.

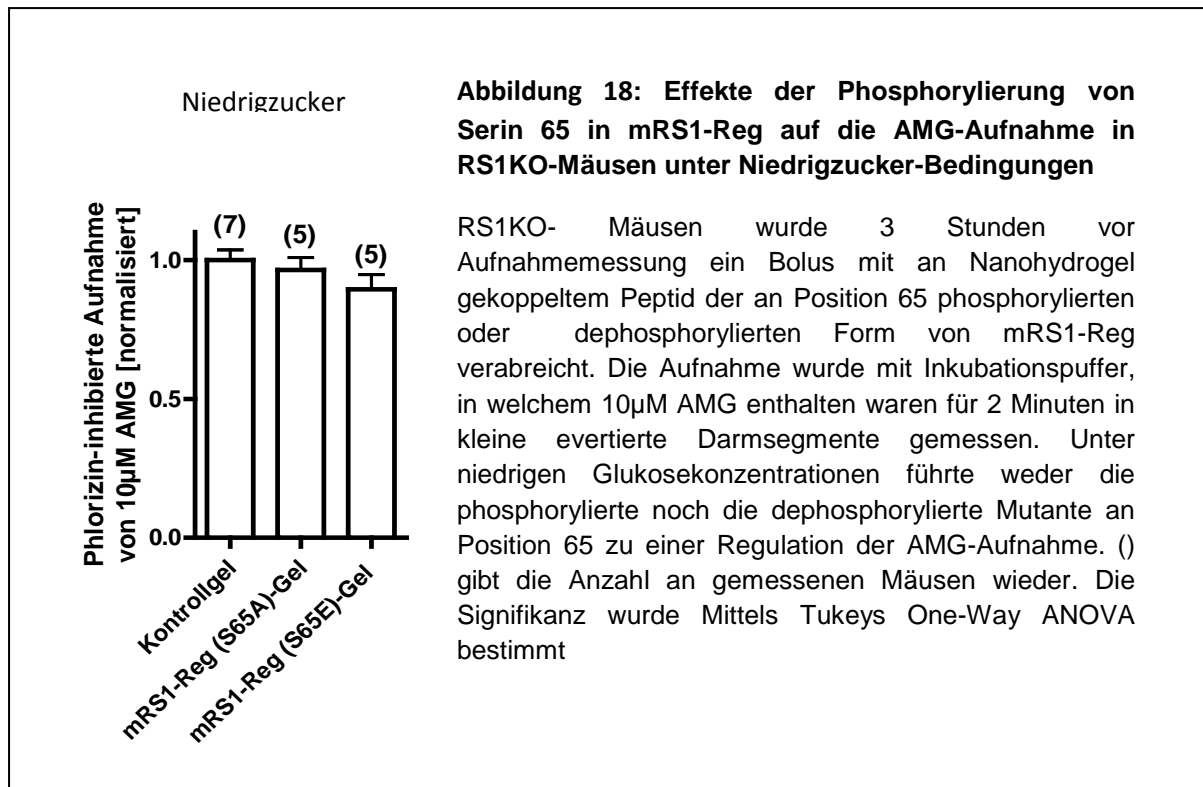
Da die Mutation des N-terminalen QSP Motives von hRS1-Reg und mRS1-Reg in Oozytenexperimenten mit exprimiertem humanen SGLT1 oder humanen CNT1 die Regulation beider Transporter in unterschiedlicher Weise beeinflusst (Veyhl-Wichmann et al. 2015), untersuchte ich, ob dieser Effekt auch im Mäusedarm *in vivo* nachzuweisen ist. Hierzu wurden die für die AMG-Messungen beschriebenen Mutanten der murinen Domäne mRS1-Reg (S19A) und mRS1-Reg (S19E) verwendet, welche an Nanohydrogel gekoppelt waren und den Mäusen per Schlundsonde verabreicht wurden. Als Substrat diente hierbei Uridin. Für die Bestimmung der unspezifischen Aufnahme wurden Segmente in Krebs-Ringer-Puffer inkubiert, bei welchem der Gehalt an Natrium durch Kalium ersetzt wurde. Die Aufnahmemessung erfolgte für 2 Minuten.



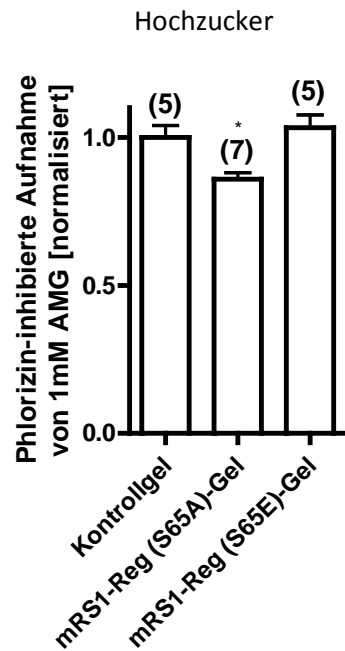
Durch die RS1-Reg (S19A) Mutante bei welcher die Phosphorylierung verhindert wird, wurde die Uridinaufnahme um 20-30% verringert. Für die mRS1-Reg (S19E) Mutante, bei der eine Phosphorylierung simuliert war, konnte kein signifikanter Effekt beobachtet werden. (**Abb. 17**). Da in Oocyten-Experimenten für CNTs keine Zuckerabhängigkeit der Regulation durch RS1-Reg gezeigt werden konnte (Veyhl-Wichmann et al., 2015), wurde auf Hochzucker-Bedingungen verzichtet.

#### 4.6. Untersuchung von Mutationen in einer weiteren putativen Phosphorylierungsstelle in mRS1-Reg auf die Regulation von SGLT1 im Darm von RS1KO Mäusen unter Niedrigzucker- und Hochzucker-Bedingungen und auf die Regulation von CNTs

Anhand der vorherigen Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung im QSP Motiv von RS1-Reg die Regulation des durch SGLT1 vermittelten Glukosetransportes und des durch Nukleosidtransporter vermittelten Transports von Nukleosiden unterschiedlich beeinflusst. Da RS1-Reg Konsensussequenzen für die Phosphorylierung vieler Serinreste enthält, liegt die Vermutung nahe, dass die Regulation von SGLT1 und CNTs *in vivo* durch unterschiedliche Phosphorylierungsmuster von RS1-Reg gesteuert wird. Da diese Muster bisher nicht bekannt sind, untersuchte ich beispielhaft ob Mutationen in einer zweiten Phosphorylierungskonsensussequenz die Regulation von SGLT1 unter Niedrigzucker- und Hochzucker-Bedingungen und die Regulation des Nukleosidtransporters unter Niedrigzucker-Bedingungen beeinflusst. Ich wählte die putative Phosphorylierungsstelle von Serin in Position 65 von mRS1-Reg (**Abb.20**). Serin 65 befindet sich sowohl bei hRS1-Reg als auch bei mRS1-Reg innerhalb von Konsensussequenzen für die Phosphorylierung, bei hRS1-Reg in Konsensussequenzen für Camkinase 2b und Proteinkinase C delta, in mRS1-Reg in der Konsensussequenz für die Ribosomale S6 Kinase (RSK). An Nanohydrogel gekoppeltes mRS1-Reg(S65A) oder mRS1-Reg(S65E) wurde wie oben für die anderen mRS1-Reg Mutanten beschrieben per Magensonde verabreicht und die Phlorizin-hemmbar durch SGLT1 vermittelte Aufnahme von 10 $\mu$ M AMG (Niedrigzucker-Bedingungen, **Abb. 18**) oder 1mM AMG (Hochzuckerbedingung, **Abb. 19**) wurde 3h Stunden später gemessen. Außerdem wurde auch die natriumabhängige Aufnahme von 1 $\mu$ M Uridin, welche durch Nukleosidtransporter vermittelt wird bestimmt (**Abb. 20**). Unbeladenes Nanohydrogel wurde als Kontrolle für unspezifische Effekte eingesetzt.

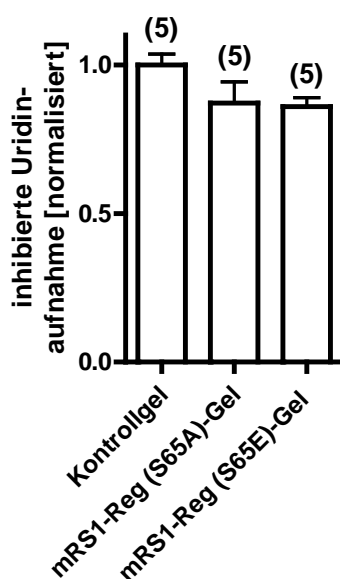


Unter Niedrigzucker-Bedingungen beobachtete ich weder für die die Phosphorylierung simulierende Mutante (mRS1-Reg (S65E)) noch für die eine Phosphorylierung verhindernde Mutante (RS1-Reg (S65A)) einen signifikanten Effekt auf die AMG- Aufnahme (**Abb. 18**). Im Gegensatz dazu wurde der Phlorizin-hemmbarer Transport von 1mM AMG durch mRS1-Reg (S65A) um 15-20% gehemmt während er durch mRS1-Reg (S65E) nicht beeinflusst wurde (**Abb. 19**). Beide Mutanten zeigten eine leichte Hemmung des natriumabhängigen durch CNTs vermittelten Transport von 1µM Uridin, die allerdings kein ausreichendes Signifikanzniveau erreichte (**Abb. 20**). Zwischen beiden Mutanten wurde kein Unterschied beobachtet. Die Daten zeigen, dass die glukoseabhängige Regulation von SGLT1 im Darm durch Phosphorylierung von Serin 65 beeinflusst wird während die Phosphorylierung in dieser Position keinen Effekt auf die Regulation der Nukleosidtransporter hat.



**Abbildung 19: Effekte der Mutationen von Serin 65 in mRS1-Reg auf die AMG-Aufnahme in RS1KO-Mäusen unter Hochzucker-Bedingungen**

Die Aufnahmemessung in kleine evertierte Darmsegmente wurde unter Hochzucker-Bedingungen durchgeführt. Die Mäuse erhielten 3 Stunden vor Messbeginn einen Bolus mit Nanohydrogel mit der jeweiligen Domäne. Anschließend wurden kleine evertierte Darmsegmente für 2 Minuten in dem Inkubationspuffer inkubiert, und anschließend die Aufnahme mittels Szintillationsmessung analysiert. Hohe Zuckerkonzentrationen führten zu einer Inhibition der AMG-Aufnahme durch mRS1-Reg (S65A) nicht jedoch durch mRS1-Reg (S65E). ( ) gibt die Anzahl gemessener Mäuse wieder. Die Bestimmung der Signifikanz gegen die Kontrollgruppe erfolgte über Tukeys One-Way ANOVA; \*  $p < 0,05$



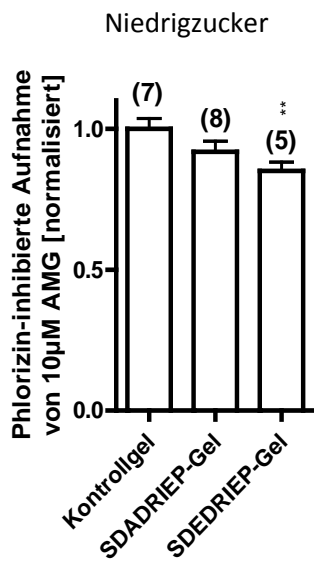
**Abbildung 20: Effekte der Mutationen von Serin 65 in mRS1-Reg auf den Uridintransport durch CNTs in RS1KO-Mäusen**

RS1KO Mäusen wurde ein Bolus mit Nanohydrogel, welches mit einer der beiden Mutanten beladen war verabreicht. 3 Stunden nach dem Bolus wurde die Aufnahme von  $1\mu\text{M}$  Uridin in kleine evertierte Darmsegmente für 2 Minuten gemessen. Als Kontrolle diente unbeladenes Gel. Beide Mutanten zeigten einen schwachen jedoch nicht signifikanten inhibitorischen Effekt auf die Uridinaufnahme. In der Abbildung bitte die berechneten P-Werte für die Hemmung angeben. ( ) gibt die Anzahl an gemessenen Mäusen wieder. Die Bestimmung der Signifikanz erfolgte über Tukeys One-Way-ANOVA

#### 4.7. Effekt der Phosphorylierung des Oktapeptidmotivs SDSDRIEP aus hRS1-Reg auf die Glukose- und Nukleosidaufnahme in den Darm von RS1KO-Mäusen

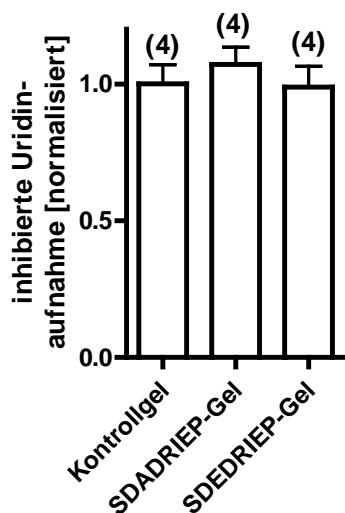
In hRS1-Reg wurde mit Hilfe von Versuchen im Oozytenexpressionssystem neben QSP ein zweites regulatorisch aktives Peptidmotiv mit der Sequenz SDSDRIEP entdeckt, welches die Expression von hSGLT1 glukoseabhängig und die Expression von hCNT1 glukoseunabhängig herunterreguliert (Veyhl-Wichmann et al. 2015). SDSDRIEP enthält eine Konsensussequenz für die Phosphorylierung des 2. Serins (Serin 45 in hRS1-Reg). Im unserem Labor wurde im Oozytensystem gezeigt, dass die Mutante hRS1-Reg(S45E) die Expression von hSGLT1 mit sehr viel höherer Affinität herunterregulierte als die Mutante hRS1-Reg(S45A) (Veyhl-Wichmann et al. 2015). Bezüglich der Herunterregulation von CNTs wirken sich beide Mutanten in entgegengesetzter Weise aus. hRS1-Reg(S45A) regulierte die Expression von hCNT1 mit höherer Affinität herunter als hRS1-Reg(S45E). Um herauszufinden ob die Mutante von SDSDRIEP, bei welcher die Phosphorylierung simuliert wurde auch im Darm der Maus wirkt und eine ähnliche Wirkung aufweist wie hRS1-Reg (S45E) im Oozytensystem, untersuchte ich den Effekt der Mutanten SDADRIEP und SDEDRIEP auf den Phlorizin-hemmbareren AMG Transport und den natriumabhängigen Uridintransport. Die Untersuchungen wurden an RS1KO Mäusen durchgeführt. Die Oktapeptide waren mit einer Konzentration von 1mM an Nanohydrogel gekoppelt, und wurden den Mäusen per Magensonde appliziert und der Transport an evertierten Darmsegmenten gemessen.

Wie in **Abbildung 21** zu erkennen ist, wurde eine signifikante Reduktion der AMG-Aufnahme um 15- 20 % durch SDEDRIEP beobachtet. Die Gabe von SDADRIEP führte zu einer geringen nicht signifikanten Erniedrigung der AMG-Aufnahme um weniger als 10%. Die Natrium-abhängige Aufnahme von 1µM Uridin wurde weder durch SDEDRIEP noch durch SDADRIEP beeinflusst (**Abb. 22**). Die Daten deuten drauf hin, dass das aus hRS1-Reg stammende Motiv SDSDRIEP SGLT1 im Mäusedarm herunterreguliert falls das zweite Serin im Oktapeptid phosphoryliert ist.



**Abbildung 21: Effekte von Mutanten des Oktapeptids SDDRIEP auf die AMG-Aufnahme in RS1KO-Mäusen unter Niedrigzucker-Bedingungen**

RS1KO Mäusen wurde ein Bolus mit Nanohydrogel, gegeben, an welches eines der Oktapeptide gekoppelt war. Als Kontrollgel diente unbeladenes Gel. Nach 3 Stunden wurde die Aufnahme von 10  $\mu$ M AMG in kleinen evertierten Darmsegmenten für 2 Minuten gemessen. Während die dephosphorylierte Form SDADRIEP lediglich eine leichte jedoch nicht signifikante Inhibition zeigte, führte SDEDRIEP zu einer stärkeren und stark signifikanten Herunterregulation des SGLT1. ( ) gibt die Anzahl an gemessenen Mäusen wieder. Die Signifikanz wurde über Tukeys One-Way ANOVA bestimmt und ist auf die Kontrollgruppe bezogen; \*\*  $p < 0,01$



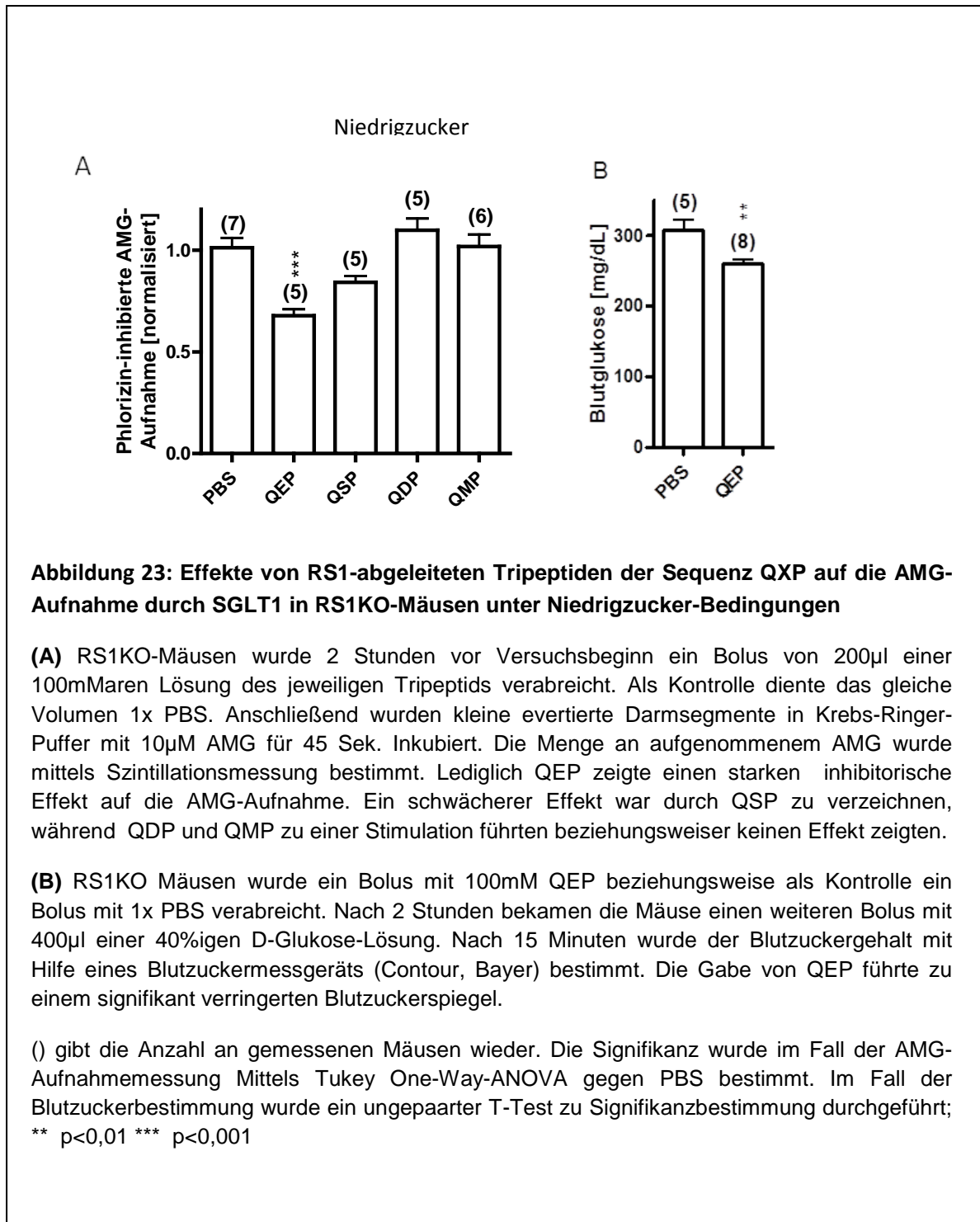
**Abbildung 22: Effekte von Mutanten des Oktapeptids SDDRIEP auf die Uridinaufnahme in RS1KO-Mäusen**

RS1KO Mäuse bekamen einen Bolus mit Nanohydrogel mit einer der Mutanten. Nach 3 Stunden wurde die Aufnahme von 1  $\mu$ M Uridin für 2 Minuten in kleine Darmsegmente gemessen. Auf CNTs zeigte keine der beiden Mutanten eine signifikante regulatorische Wirkung. ( ) gibt die Anzahl an eingesetzten Mäusen wieder. Die Signifikanzbestimmung erfolgte über Tukey One-Way ANOVA

#### **4.8. Effekte von RS1-abgeleiteten Tripeptiden auf die Glukoseaufnahme in RS1KO-Mäusen**

Da in den vorangegangenen Experimenten ein deutlicher Effekt der Phosphorylierung an Position 19 auf den SGLT1 beobachtet werden konnte, wurde im Folgenden der regulatorische Einfluss von Mutanten des im RS1-Protein enthaltenen Tripeptids QSP auf die Regulation des SGLT1 untersucht. Wie schon in der Einleitung beschrieben, handelt es sich hierbei um eine der in Oocyten als regulatorisch aktiv identifizierte Sequenzen. Das Serin dieses Tripeptids entspricht dem Serin an Position 19 der regulatorischen Domäne, welche in den mRS1-Reg-Sequenzen mutiert wurde. In Oozytenexperimenten konnte gezeigt werden, dass schon dieses Tripeptid allein in der Lage ist, den Transporter SGLT1 lediglich unter Niedrigzucker-Bedingungen zu inhibieren. Jedoch konnte auch für dieses Tripeptid in Oocyten eine Aktivität auf die AMG-Aufnahme unter Hochzucker-Bedingungen gezeigt werden, wenn das Serin gegen ein Glutamat ausgetauscht wurde (Vernaleken et al., 2007; Veyhl-Wichmann et al., 2015). Um die Wirksamkeit *in vivo* zu verifizieren, wurde RS1KO Mäusen ein Bolus mit 200µl einer 100mM Lösung dieses Tripeptids verabreicht. Die Kontrollmäuse bekamen 200µl Phosphat-gepufferte Saline (PBS). Da es sich bei diesen Messungen um Tripeptide handelt, sollten sie von dem in Enterozyten enthaltenen H<sup>+</sup>-abhängigen Peptidtransporter PepT1 in die Zellen aufgenommen werden, wodurch eine Kopplung an Nanohydrogele nicht nötig war. Aus diesem Grund wurde der Bolus auch nur 2 Stunden gegeben, da eine Spaltung von der Nanohydrogel-Matrix entfiel. Um die Spezifität der Phosphorylierung auf die regulatorische Aktivität zu untersuchen wurden unterschiedliche Aminosäuresubstitutionen untersucht. Zusätzlich zu Glutamat (E) wurde Aspartat (D) untersucht, welches neben Glutamat die zweite saure Aminosäure darstellt und sich lediglich durch das Fehlen einer Methylengruppe von diesem unterscheidet. Zusätzlich wurde Methionin (M) als Vertreter der unpolaren Aminosäuren untersucht. Nach 2 Stunden wurde wiederum die Aufnahme von AMG in kleine evertierte Darmsegmente gemessen. Auch hier wurden 10µM AMG im Inkubationspuffer eingesetzt. Die Aufnahme wurde diesmal jedoch nur für 45 Sekunden gemessen. Ein signifikanter Effekt von 35% Inhibition war hier nur bei der phosphorylierungssimulierenden Mutante QEP zu erkennen.



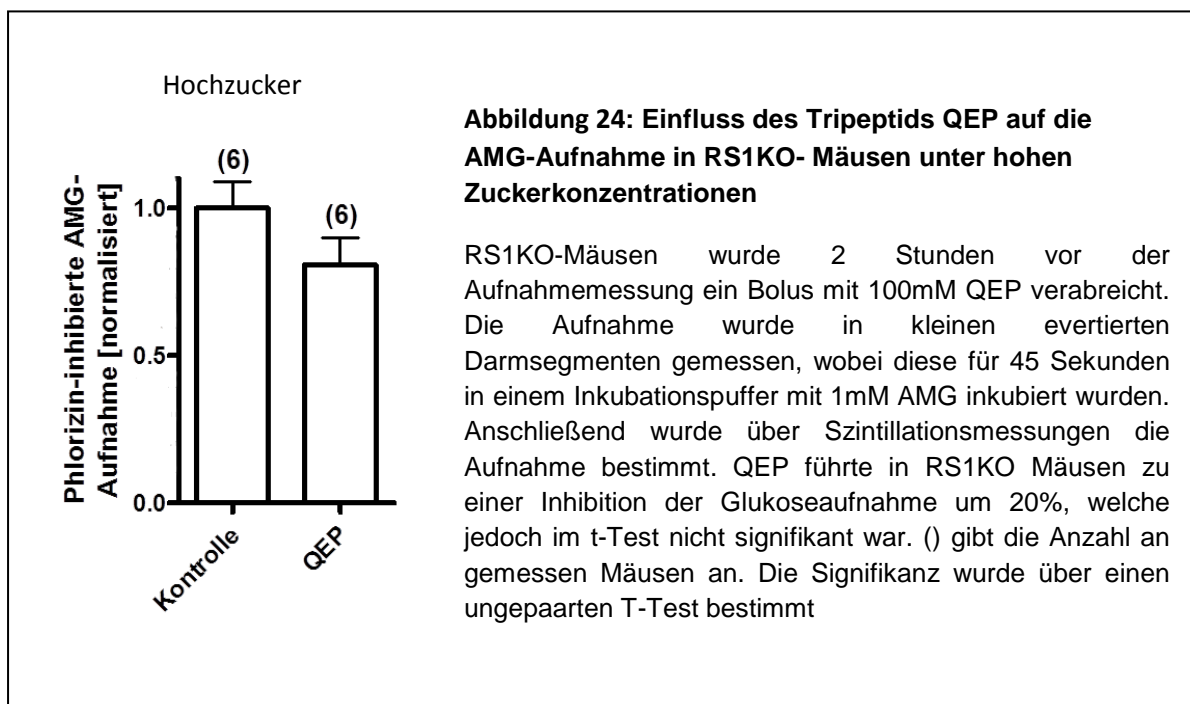


QDP und QMP zeigten keinen Effekt während mit QSP eine leichte Hemmung um 10-15%, beobachtet wurde, welche jedoch nicht signifikant war (**Abb. 23A**).

In **Abbildung 23B** ist das Ergebnis aus Versuchen gezeigt, durch die ich feststellen wollte, ob die Herunterregulation von SGLT1 durch QEP zu einem geringeren Anstieg der Blutzuckerkonzentration nach oraler Aufnahme von Glukose führt. Um dies zu untersuchen wurden RS1KO-Mäusen 200µl Wasser mit 100mM QEP per Magensonde verabreicht. Als

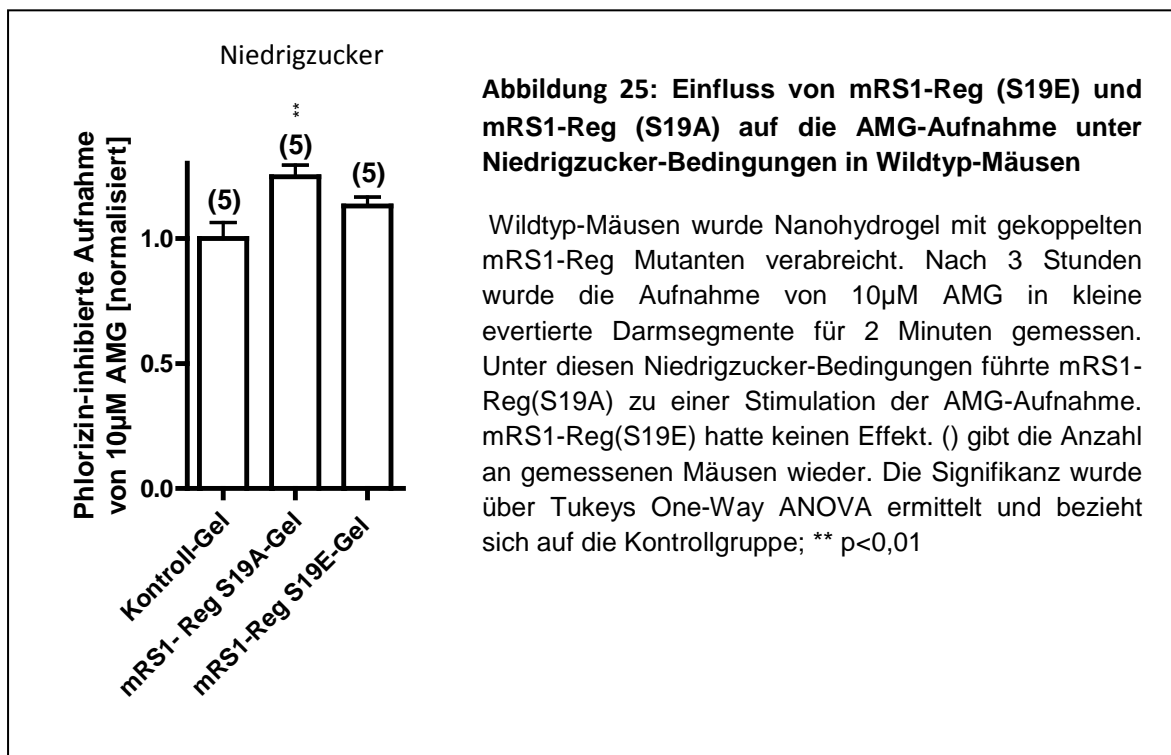
Kontrolle diente hier wieder das gleiche Volumen an Phosphat-gepufferter Saline (PBS). Nach 2 Stunden bekamen die Mäuse einen Bolus mit 400µl 40%iger D-Glukose-Lösung. 15 Minuten später wurde der Blutzuckergehalt in der Schwanzvene mit Hilfe eines Blutzuckermessgerätes (Contour, Bayer) gemessen. Bei den mit QEP behandelten Mäusen war der Blutzuckerspiegel ca. 50mg/dL niedriger als bei den Mäusen, die PBS-Puffer erhalten hatten (**Abb. 23B**).

Da für die gesamte regulatorische Domäne bei höherer Glukosekonzentration eine stärkere Inhibition zu beobachten war und in Oozytenexperimenten für das Tripeptid QEP bei hohen intrazellulären Konzentrationen auch eine höhere Affinität erzielt wurde (M. Veyhl-Wichmann, unpublizierte Daten), wurden die Messungen an kleinen evertierten Darmsegmenten auch unter Hochzucker-Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurde wie unter Niedrigzucker-Bedingungen ein Bolus mit 100mM QEP verabreicht und 2 Stunden später die Aufnahme in evertierte Darmsegmente gemessen. Die Inkubation erfolgte für 45 Sekunden mit 1mM AMG. Unter Hochzucker-Bedingungen hat sich für QEP in RS1KO Mäusen, anders als im Oozytensystem kein signifikanter Einfluss erkennen lassen, jedoch zeigt auch in diesem Fall der Graph eine nicht signifikante Inhibition des Transporters, die jedoch mit 20% schwächer war als unter niedrigen Zuckerkonzentrationen (**Abb. 24**).



#### 4.9. Untersuchung der Position 19 von mRS1-Reg auf die Glukose- und Nukleosid-Aufnahme in Wildtyp- Mäusen

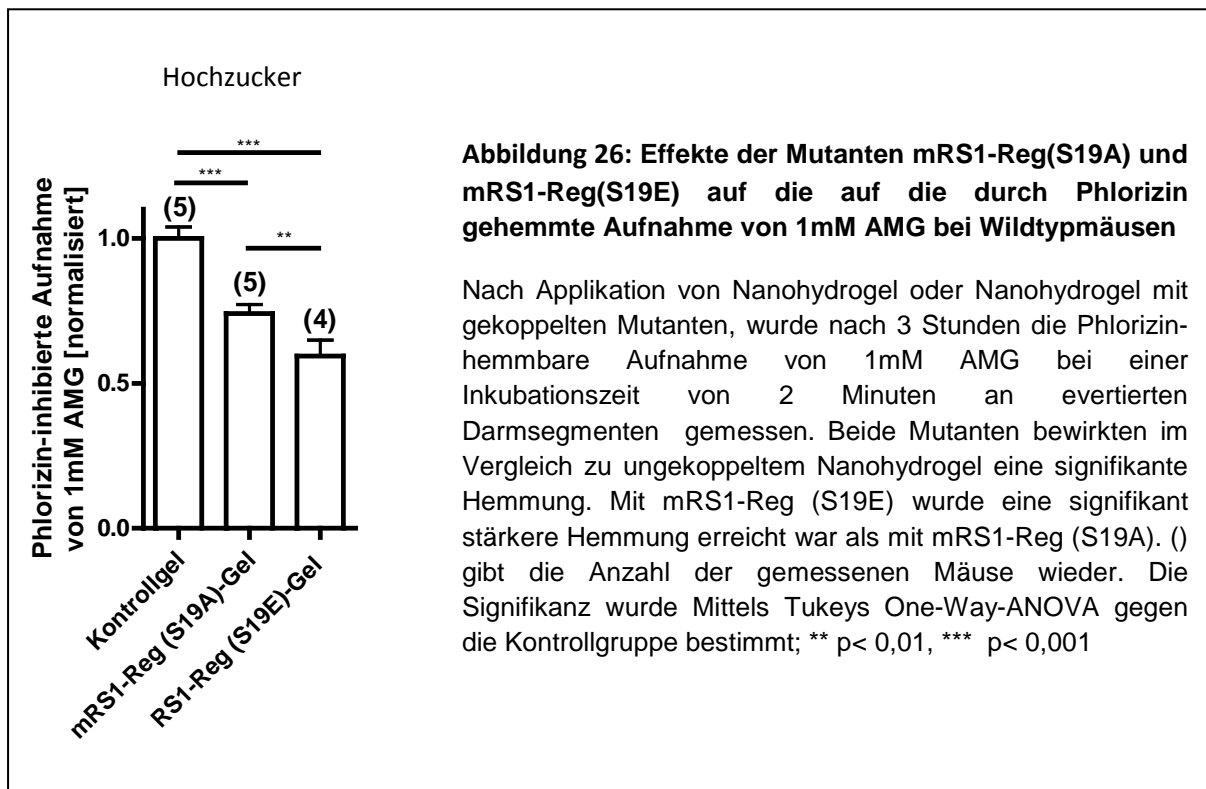
Nachdem die Mutationen der mRS1-Reg Domäne an Position 19 in RS1KO-Mäusen die stärkste inhibitorische Wirkung auf die Aufnahme von AMG und Uridin aufwiesen, untersuchte ich die Effekte dieser Mutationen bei Wildtyp-Mäusen, welche endogenes RS1 besitzen. Zunächst untersuchte ich den Einfluss von RS1-Reg (S19E) und RS1-Reg (S19A) auf die AMG-Aufnahme unter Niedrigzucker-Bedingungen. Unter dieser Bedingung sollte das endogene mRS1 aktiv sein und die AMG-Aufnahme inhibieren, sodass eine weitere Inhibition durch RS1-Reg (S19E) nicht zu erwarten ist. Wildtyp-Mäusen wurde ein Bolus mit Nanohydrogel verabreicht, an welches entweder RS1-Reg (S19A) oder RS1-Reg (S19E) gekoppelt war. Nach 3 Stunden wurde die Aufnahme von 10 $\mu$ M AMG in evertierte Darmsegmente gemessen.



Unter niedrigen Zuckerkonzentrationen bewirkte mRS1-Reg (S19A), bei der keine Phosphorylierung in Position 19 möglich war eine Stimulation der SGLT1 vermittelten AMG-Aufnahme um ca. 30%, mRS1-Reg(S19E) zeigte keinen signifikanten Effekt. Die beobachtete Stimulation könnte durch Kompetition der mRS1-Reg(S19A) Mutante mit, unter Niedrigzucker-Bedingungen inhibitorisch wirksamen, endogenem mRS1 erklärt werden, falls

man annimmt, dass mRS1-Reg(S19A) unter Niedrigzuckerbedingungen zwar bindet, jedoch nicht zu einer Herunterregulation von SGLT1 führt.

Da dieses Ergebnis darauf schließen ließ, dass in Position 19 phosphoryliertes mRS1-Reg bei unter Niedrigzucker-Bedingungen aktivem endogenen RS1 keinen zusätzlichen Effekt erzielt, führte ich die Messungen auch unter Hochzucker-Bedingungen durch (**Abb. 26**). In diesem Fall ist das endogene mRS1 nicht aktiv und eine, auch unter hohen Zuckerkonzentrationen wirksame Mutante, sollte eine sichtbare Inhibition zeigen.

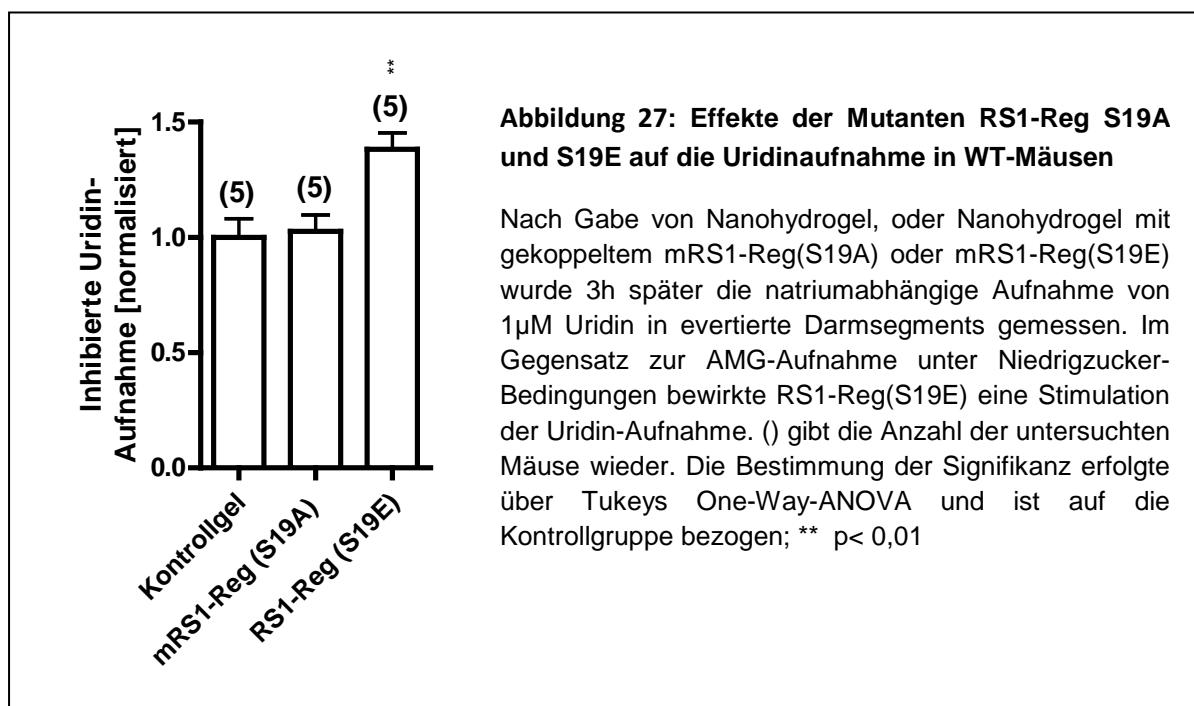


Die Hochzuckerbedingung wurde durch Messung der Aufnahme von 1mM AMG während der Messzeit von 2 Minuten erzeugt, da die zuckerabhängige Regulation innerhalb dieser Zeitspanne erfolgt (siehe Methode).

Unter Hochzucker-Bedingungen wurde mit beiden Mutanten eine Inhibition der durch SGLT1 vermittelten AMG-Aufnahme beobachtet. Die Hemmung durch mRS1-Reg (S19E) betrug 40-45%, die mit mRS1-Reg(S19A) 25-30%. Der Unterschied der Inhibitionen zwischen mRS1-Reg (S19E) und mRS1-Reg (S19A) war signifikant. Die Daten zeigen, dass die externe Gabe beider Mutanten eine signifikante Herunterregulation von SGLT1 verursacht. Offensichtlich reicht

die intrazelluläre Konzentration des endogenen RS1 nicht aus, um unter Hochzuckerbedingungen, bei denen die Affinität von RS1 erniedrigt ist (Veyhl-Wichmann et al., 2015), zu hemmen. Die Konzentration der nach Kopplung an Nanohydrogel in die Zellen aufgenommenen RS1-Reg-Mutanten ist offensichtlich deutlich höher als die Konzentration des endogenen mRS1, sodass mRS1-Reg(S19A) wirksam ist obwohl es in Gegenwart von hoher intrazellulärer Glukose eine ähnliche Affinität bezüglich der Herunterregulation von SGLT1 hat wie das endogene mRS1 (Veyhl-Wichmann et al., 2015).

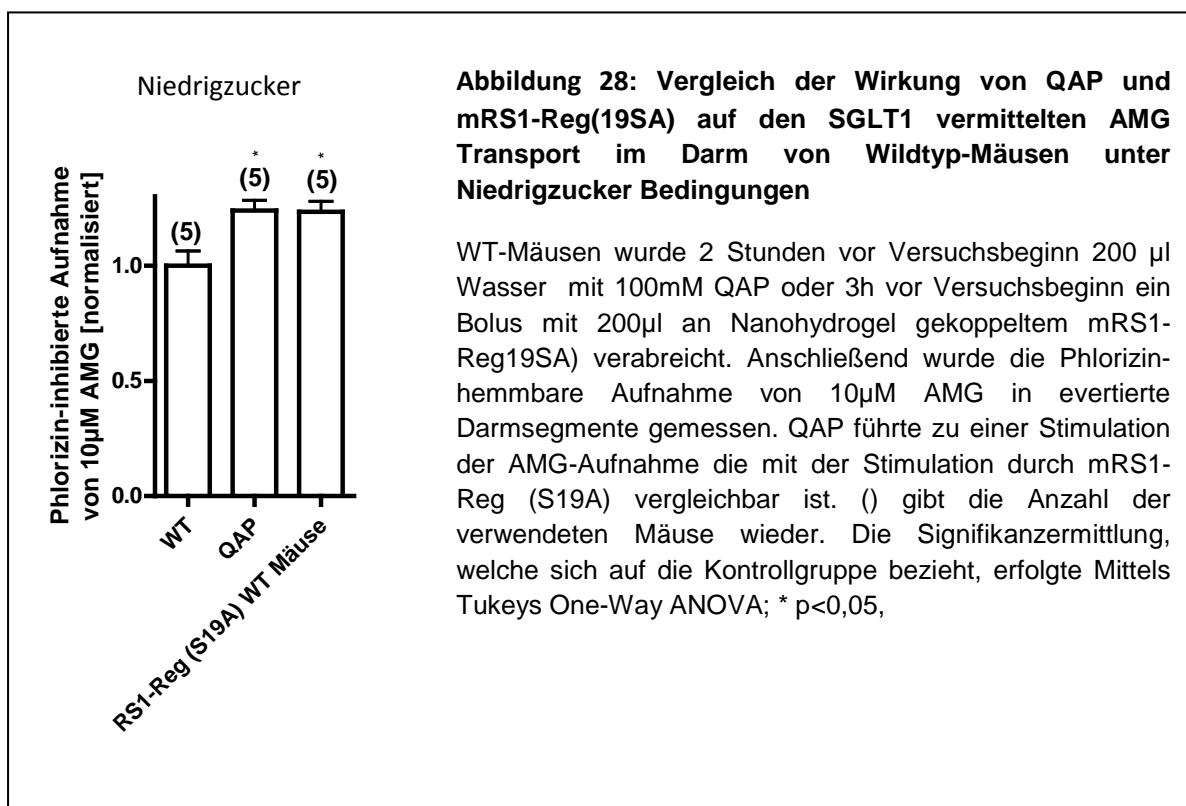
Da sowohl in Oozyten-Experimenten (Veyhl-Wichmann et al., 2015) wie auch in RS1KO Mäusen eine Inhibition der natriumabhängigen Uridin-Aufnahme mit mRS1-Reg(S19A) beobachtet wurde, untersuchte ich im folgenden Experiment, ob mRS1-Reg(S19A) im Gegensatz zu mRS1-Reg(S19E) den Uridintransport auch bei Wildtypmäusen herunterreguliert. Ich verabreichte Wildtypmäusen die an Nanohydrogel gekoppelten Mutanten oder ungekoppeltes Nanohydrogel und analysierte 3 Stunden später die natriumabhängige Aufnahme von 1µM Uridin in evertierte Darmsegmente. Während die natriumabhängige Uridinaufnahme nicht durch RS1-Reg (S19A) beeinflusst wurde, bewirkte RS1-Reg (S19E) eine Stimulation der Uridinaufnahme um ca. 30% (**Abb. 27**).



#### 4.10. Effekt von QAP auf die SGLT1 vermittelte AMG Aufnahme bei Wildtyp-Mäusen unter Niedrigzucker-Bedingungen

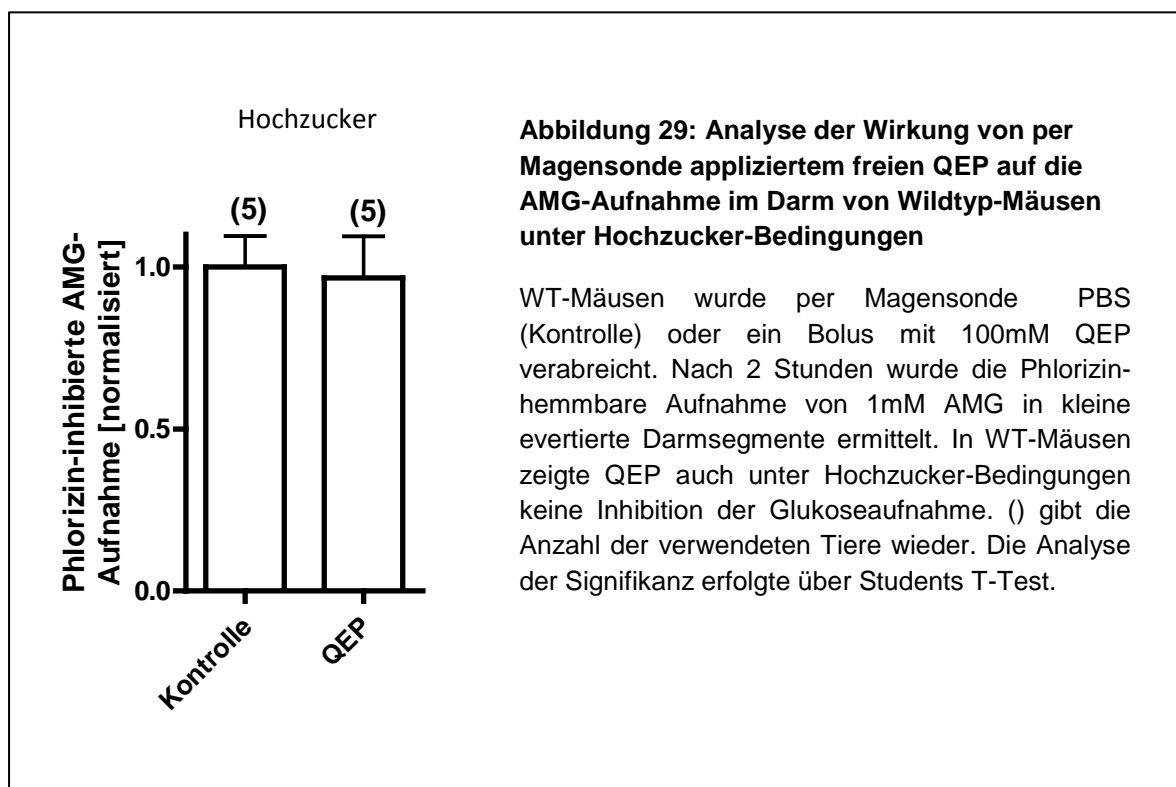
Bei Wildtypmäusen wurde gezeigt dass die AMG-Aufnahme unter Niedrigzucker-Bedingungen durch mRS1-Reg(S19A) und die Uridinaufnahme durch mRS1-Reg(S19E) stimuliert wurde. Diese Mutanten zeichnen sich durch eine niedrige Affinität gegenüber der Hemmung des AMG- bzw. Uridintransportes aus (Veyhl-Wichmann et al., 2015).

Um herauszufinden, ob Stimulationseffekte durch Mutanten im Tripeptidmotiv um Ser19 (QSP) zu erzielen sind, untersuchte ich exemplarisch den Effekt von QAP auf die SGLT1 vermittelte Aufnahme von 10 $\mu$ M AMG in Wildtyp-Mäusen. Den Mäusen wurde, wie oben für Versuche mit RS1KO Mäusen beschrieben QAP per Magensonde verabreicht, 2 Stunden danach wurde die Phlorizin-hemmbar Aufnahme von 10 $\mu$ M AMG in evertierte Darmsegmente gemessen. QAP stimuliert die AMG Aufnahme in gleicher Weise wie mRS1-Reg(19SA) um 20-25% (**Abb. 28**).



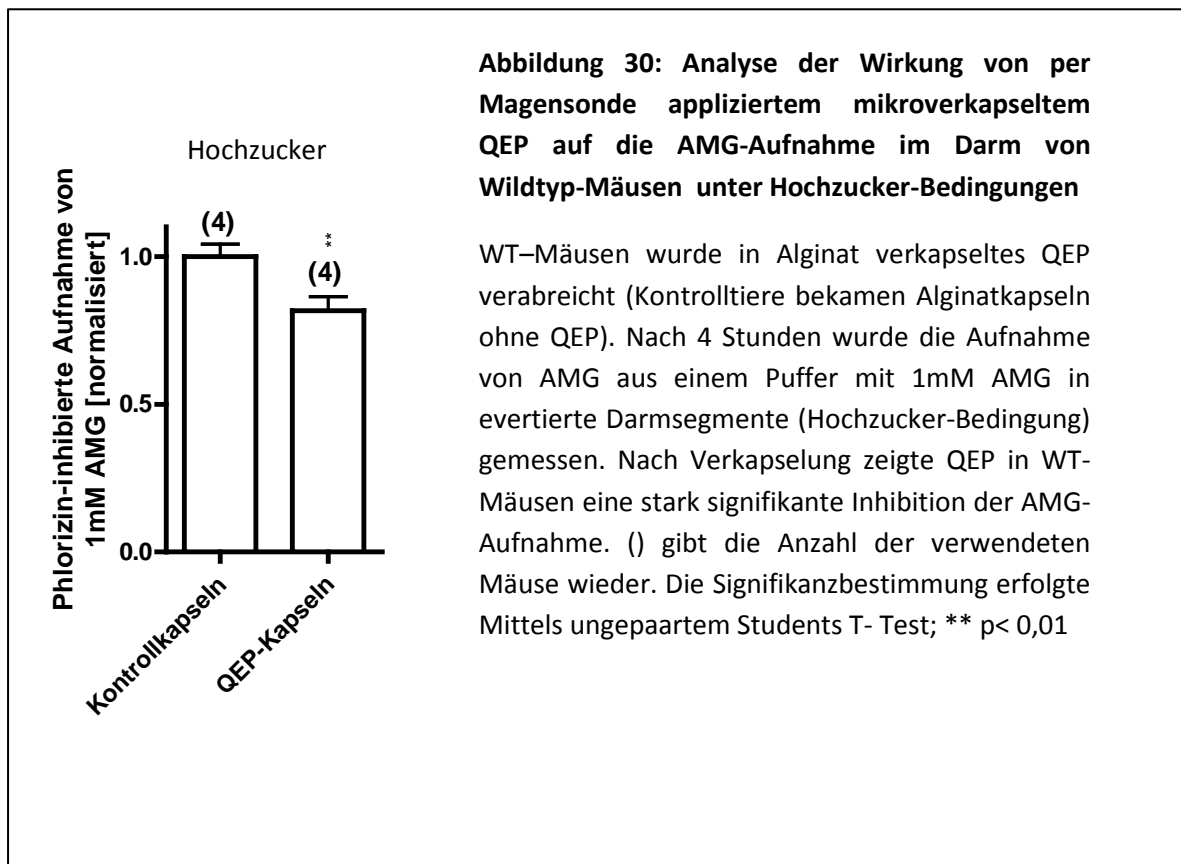
#### 4.11. Versuche, die SGLT1-vermittelte AMG Aufnahme unter Hochzucker-Bedingungen bei Wildtyp-Mäusen durch QEP zu hemmen

Da die Mutante mRS1-Reg(S19E) bei Wildtypmäusen unter Hochzucker Bedingungen zu einer deutlichen Herunterregulation von SGLT1 im Darm führt, untersuchte ich, ob mit QEP eine ähnliche Hemmwirkung zu erzielen ist. Ich verabreichte Wildtyp-Mäusen 200µl PBS oder einer 100mM QEP Lösung per Magensonde und bestimmte 2 Stunden später die Phlorizin-hemmbar Aufnahme von 1mM AMG in evertierte Darmsegments.



Wie in der **Abbildung 29** zu sehen ist, konnte auch unter Hochzucker-Bedingungen, anders als in den RS1KO-Mäusen und mRS1-Reg(S19E) in RS1KO und in Wildtypmäusen, keine Inhibition der AMG-Aufnahme durch QEP gezeigt werden. Dies könnte daran liegen, dass per Magensonde appliziertes freies QEP nicht intakt im Dünndarm ankommt bzw. zu wenig QEP in die Enterozyten aufgenommen wird, um seine Wirkung in der Zelle zu entfalten. Daher wurde nach einer Möglichkeit gesucht, wie man größere Mengen an QEP ohne Verluste durch den Magen hindurch transportieren kann. Um dies zu erreichen wurde QEP in

Mikrokugeln aus Alginat verpackt, welche erst im Darm lysiert werden und somit auch erst dort lokal das QEP freisetzen. In einem weiteren Experiment wurde Mäusen ein Bolus von 400µl Wasser mit 500µM in Alginatkapseln verpacktes QEP verabreicht. Der Kontrollgruppe bekam die gleiche Menge an Alginatkapseln ohne QEP. Da die Alginatkapseln im Darm zunächst aufgelöst werden mussten, bevor das QEP aufgenommen werden konnte, wurde die Messung an evertierten Darmsegmenten 4 Stunden nach Bolusgabe durchgeführt.



Die Phlorizin-hemmbar Aufnahme von 1mM AMG wurde unter diesen Bedingungen signifikant um 20% gehemmt. Die Daten deuten darauf hin, dass per Magensonde appliziertes freies QEP im Laufe der Darmpassage abgebaut wird und dass es durch einbetten in Alginat vor diesem Abbau geschützt werden kann.



## 5. Diskussion

### 5.1. Phosphorylierungsabhängige Regulation des Na<sup>+</sup>-D-Glukose-Kotransporters (SGLT1) und der Natrium-abhängigen Nukleosidtransporter (CNTs) im Darm der Maus durch die regulatorische Domäne von mRS1

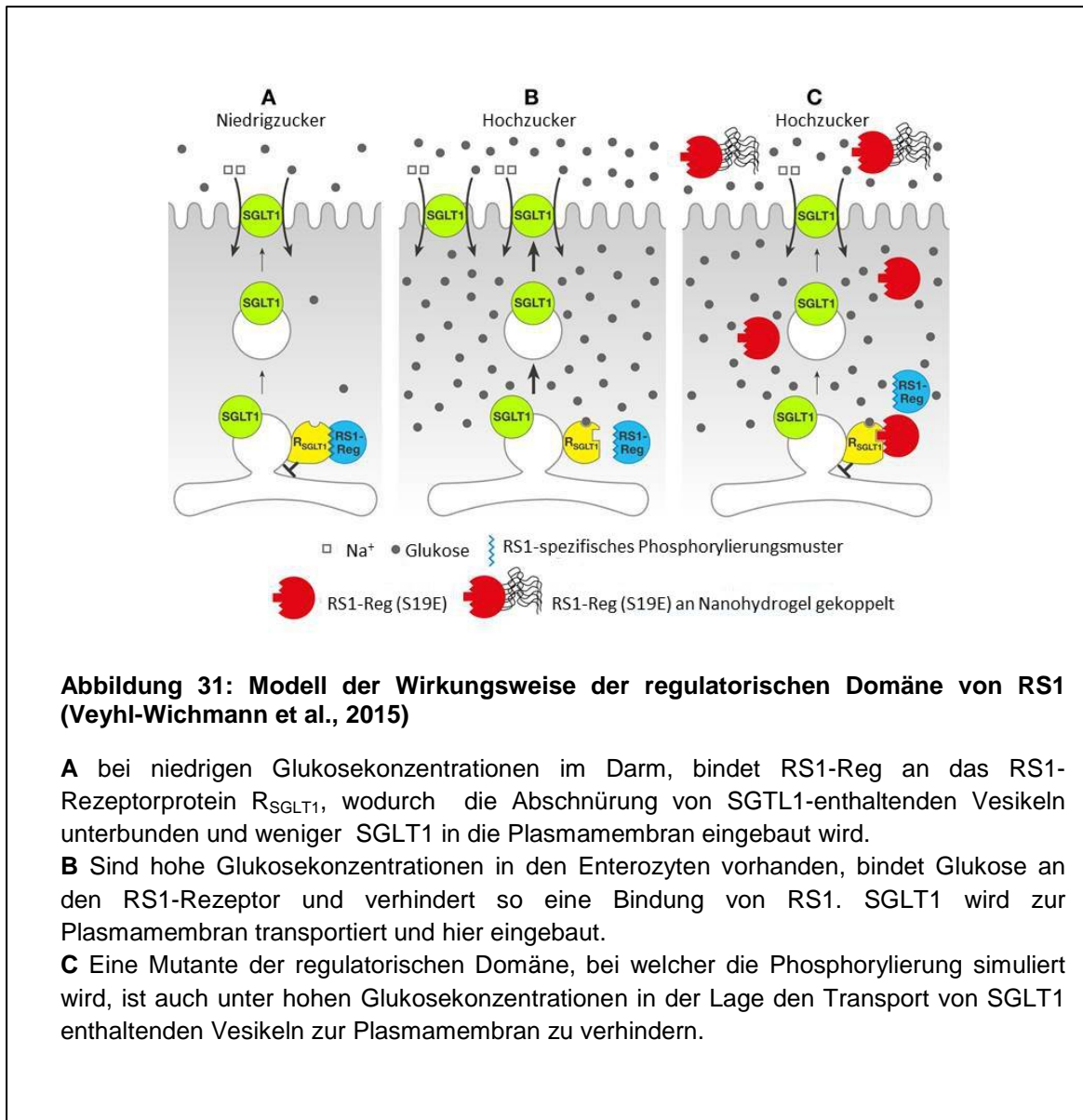
In Oozyten von *Xenopus laevis* konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Transporter phosphorylierungsabhängig durch das Regulatorprotein RS1 reguliert werden. Ziel meiner Untersuchungen war es, herauszufinden, ob die an Oozyten erhobenen Ergebnisse auch bei Säugetieren relevant sind.

Vergleicht man die Aufnahme von AMG zwischen WT-Mäusen und RS1KO-Mäusen in evertierte Darmsegmente unter Niedrigzucker-Bedingungen, so ist zu erkennen, dass die Aufnahme in RS1KO-Mäusen um 40% höher ist, als in WT-Mäusen. Unter Hochzucker-Bedingungen ist dieser Effekt nicht mehr zu beobachten. Auch in *Xenopus-laevis*-Oozyten war beobachtet worden, dass bei niedrigen Zuckerkonzentrationen in den Oozyten eine Ko-Injektion der regulatorischen Domäne von RS1 (RS1-Reg) von Mensch und Maus eine inhibitorische Wirkung auf die Glukoseaufnahme hatte und dass bei hohen intrazellulären Glukosekonzentrationen keine Hemmung mehr zu beobachten war. (Vernaleken et al., 2007; Veyhl-Wichmann et al., 2015; Veyhl et al., 2006). Somit scheint RS1 den SGLT1 nur bei niedrigen Glukosekonzentrationen posttranslational herunter zu regulieren. Meine Beobachtung, dass die Aufnahme von AMG unter Hochzucker-Bedingungen in WT-Mäusen höher ist als in RS1KO-Mäusen, steht in Widerspruch zu den Messungen in BBMVs, bei denen in beiden Mauslinien die gleiche Aufnahme gemessen wurde. Ein Unterschied in den beiden Versuchen liegt im Testsystem. So könnte es in Mäusedärmen, in denen die Aufnahme in intakte Zellen gemessen wird, zu einem Efflux von AMG kommen, welcher in Bürstensaummembranvesikeln nicht zu beobachten ist. Dieser Efflux könnte in den beiden Mauslinien unterschiedlich sein. Die Beobachtung, dass beim Fehlen von RS1 die Glukoseaufnahme unter Hochzucker-Bedingungen niedriger ist als in WT-Mäusen wurde durch Transportmessungen an Zellmembranen und BBMVs bestätigt (Osswald et al. 2005, Veyhl-Wichmann et al. 2015). Proteomanalysen, welche in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt wurden zeigen, dass in RS1KO-

Mäusen die Konzentrationen vieler zelluläre Proteine inklusive des passiven Glukosetransporters Glut2 verändert sind (Wisniewski et al., 2014). Über diese veränderten Proteine könnte sich auch der Efflux für AMG verändern.

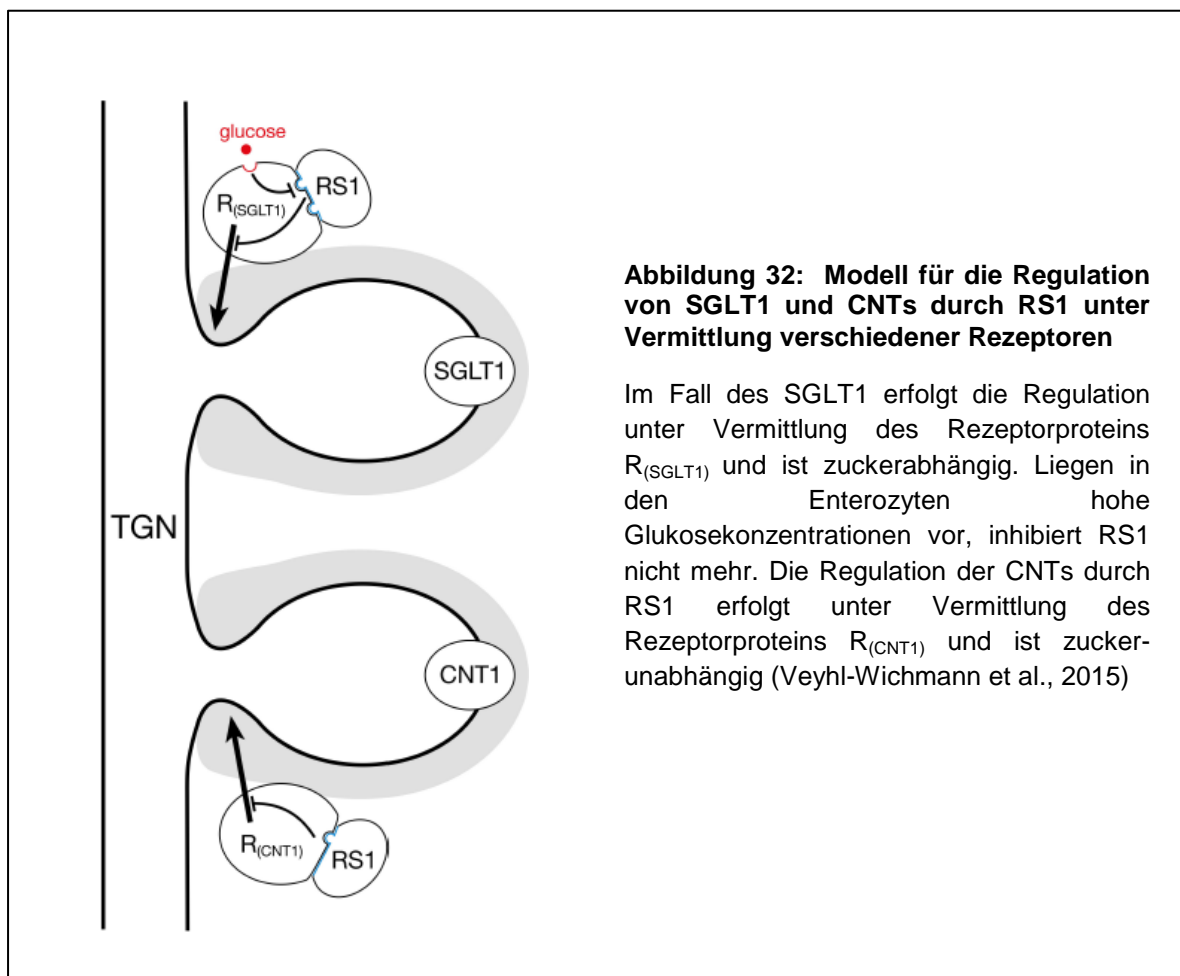
Um die genaue Wirkungsweise der transporterspezifischen posttranslationalen Regulation von RS1 zu untersuchen, wurden unterschiedliche Mutanten der regulatorischen Domäne eingesetzt und ihre Wirkung auf die AMG-Aufnahme durch SGLT1 und die Uridin-Aufnahme durch CNTs im Darm untersucht. Wie schon in Kapitel 1.4. beschrieben, wurde im Oozytensystem gefunden, dass die regulatorische Aktivität von RS1 von dessen Phosphorylierungszustand abhängt. Meine Messungen zeigen, dass die regulatorische Domäne des murinen RS1 (mRS1-Reg) in RS1KO-Mäusen regulatorisch aktiv war, bei dem das Serin an Position 19 gegen ein Glutamat substituiert (mRS1-Reg (S19E)) und somit eine Phosphorylierung in dieser Position simuliert wurde. Unter diesen Bedingungen kam es zu einer Herunterregulation des SGLT1 um ca. 30%. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Befunde aus Oozytenexperimenten, in welchen ebenfalls eine Herunterregulation der AMG-Aufnahme durch diese Mutante gezeigt werden konnte, sich auch auf den Dünndarm eines Säugetiers übertragen lassen.

Auch unter Hochzucker-Bedingungen, unter welchen die Wildtypform von RS1 nicht wirksam ist, war mRS1-Reg (S19E) in der Lage, den AMG-Transport in RS1KO-Mäusen zu inhibieren. Die Inhibition ist unter diesen Bedingungen stärker als unter Niedrigzucker-Bedingungen. Auch dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Messungen aus *Xenopus laevis*-Oozyten, in welchen sowohl die Herunterregulation unter Hoch- und Niedrigzucker-Bedingungen, als auch die erhöhte Affinität von RS1-Reg (S19E) unter Hochzucker gezeigt werden konnte. In allen Fällen zeigte eine Mutante, bei der durch Substitution des Serins an Position 19 durch Alanin (mRS1-Reg (S19A)) die Phosphorylierung verhindert wurde, keinen inhibitorischen Effekt auf SGLT1. Diese Beobachtungen führen zu dem in **Abbildung 31** gezeigten Modell. Während die Wildtypform von RS1 lediglich unter niedrigen Glukosekonzentrationen in der Lage ist, die Abschnürung von Transporter-enthaltenden Vesikeln vom Transgolgi-Netzwerk zu blockieren, nicht jedoch bei hohen Glukosekonzentrationen (**Abb. 31 A und B**), ist die Mutante RS1-Reg (S19E) auch unter hohen Zuckerkonzentrationen in der Lage, den Vesikeltransport zur Zytoplasmamembran zu inhibieren (**Abb. 31 C**).



Bei Untersuchungen der Uridinaufnahme durch CNTs zeigte sich, dass in diesem Fall die Aufnahme durch mRS1-Reg (S19A), nicht jedoch durch mRS1-Reg (S19E) inhibiert wurde. Auch dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Messungen an Oozyten und zeigt, dass die regulatorischen Eigenschaften von RS1 phosphorylierungsabhängig sind und dass im Maussystem die Phosphorylierung an Position S19 eine wichtige Rolle spielt. Dass unterschiedliche Phosphorylierungszustände zu unterschiedlichen Regulationen der Transporter führen, legt die Vermutung nahe, dass SGLT1 und CNTs auf unterschiedlichen Wegen reguliert werden. Gestützt wird diese Vermutung zusätzlich dadurch, dass nur die Regulation von SGLT1 eine Glukose-Abhängigkeit aufweist, nicht jedoch die der CNTs. Dass

auch das regulatorisch aktive Tripeptid QSP in Oozyten eine Regulation des SGLT1 nur unter niedrigen Zuckerkonzentrationen zeigte, nicht jedoch unter hohen, legt die Vermutung nahe, dass die Regulation durch Rezeptoren vermittelt wird, da das Tripeptid keine Glukose-Bindestelle besitzen kann. Da CNTs keine zuckerabhängige Regulation zeigen, scheint es für die Transporter unterschiedliche Rezeptoren zu geben. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass für SGLT1 die Ornithin-Decarboxylase (ODC) der Rezeptor zu sein scheint (C. Chintalapati, T. Keller unpublizierte Daten). Der Rezeptor für CNTs konnte bisher nicht ermittelt werden. **Abbildung 32** zeigt eine schematische Darstellung der möglichen Funktionsweise der unterschiedlichen Rezeptoren.



Vermittelt durch ODC wird SGLT1 nur herunterreguliert, wenn RS1-Reg am Serin in Position 19 phosphoryliert ist und wenn keine Glukose an den Rezeptor bindet. Die Erniedrigung von

SGLT1 in der Bürstensaummembran erfolgt durch Hemmung der Abschnürung von SGLT1-enthaltenden Vesikeln vom Transgolgi-Netzwerk. Die Herunterregulation von CNT1 in der Plasmamembran erfolgt unter Vermittlung eines anderen noch nicht identifizierten Rezeptorproteins ( $R_{(CNT1)}$ ), welches durch RS1-Reg aktiviert wird, wenn Serin 19 nicht phosphoryliert ist. Da diese Regulation nicht durch Glukose beeinflusst wird, enthält  $R_{(CNT1)}$  vermutlich keine Glukosebindungsstelle.

Bei Aufnahmemessungen in WT-Mäusen zeigte sich, dass bei niedrigen intrazellulären Glukosekonzentrationen, bei denen das endogene RS1-Protein posttranslational aktiv ist, keine zusätzliche Herunterregulation durch mRS1-Reg (S19E) erzielt wurde. Dies liegt vermutlich daran, dass das endogene RS1-Protein unter diesen Bedingungen eine maximale Wirkung hat. Verabreichte ich WT-Mäusen mRS1Reg (S19A) so beobachtete ich bei niedrigen Glukosekonzentrationen eine deutliche Stimulation der AMG-Aufnahme. Eine Erklärung für dieses Ergebnis könnte sein, dass die inaktive Form von RS1-Reg zwar bindet jedoch die Funktion von ODC nicht blockieren kann. Durch Verdrängung von endogenem RS1-Protein an ODC könnte die Hemmung von ODC durch endogenes RS1-Protein aufgehoben werden. Der Versuch mit dem Tripeptid QAP auf den SGLT1 in WT-Mäusen zeigt, dass schon das Tripeptid in der Lage ist das endogene Protein zu blockieren. Die Blockierung durch QAP zeigt das gleiche Niveau wie die gesamte regulatorische Domäne. Dies beweist, dass schon die Blockierung der regulatorisch aktiven Sequenz an Position 19 zu einer Inhibition der gesamten Wirkung von RS1-Reg führt. Unter Hochzucker-Bedingungen, bei welchen das endogene RS1 inaktiv ist konnte RS1-Reg (S19E) inhibieren, was zeigt, dass diese Mutante auch in WT-Mäusen bei hohen Zuckerkonzentrationen wirksam ist. Das unter diesen Umständen auch die regulatorisch inaktive Form mRS1-Reg (S19A) die AMG-Aufnahme herunterreguliert, könnte darauf beruhen, dass sich die Konformation von ODC durch die Bindung von Glukose ändert und dadurch auch mRS1-Reg (S19A) inhibitorisch wirksam wird. Bei Messungen in Oozyten wurde eine Herunterregulation von SGLT1 durch mRS1-Reg(S19A) beobachtet, allerdings war die Affinität von mRS1-Reg (S19A) deutlich geringer als die von mRS1-Reg (S19E) (Veyhl-Wichmann et al., 2015). In WT-Mäusen liegt neben dem exogenen mRS1-Reg (S19A) auch endogenes RS1 in seiner dephosphorylierten Form vor. Vermutlich ist die Konzentration dieser beiden dephosphorylierten Formen zusammen hoch genug, um eine Verringerung der Aufnahme zu bewirken. Dies könnte erklären, dass bei RS1KO-Mäusen durch mRS1-Reg (S19A) keine Herunterregulation der AMG Aufnahme beobachtet wurde.

Da in diesem Fall kein endogenes dephosphoryliertes RS1-Protein vorhanden ist, könnte die Konzentration an dephosphoryliertem RS1 zu niedrig sein, um einen Hemmeffekt zu beobachten.

Bei WT-Mäusen beobachtete ich mit mRS1-Reg (S19E) eine Stimulation der Uridin-Aufnahme. RS1-Reg (S19A) zeigte keine zusätzliche Herunterregulation. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Ergebnissen für die AMG-Aufnahme, scheint in diesem Fall, wie auch schon für RS1KO-Mäuse gezeigt wurde, die phosphorylierungssimulierende Mutante keine regulatorische Aktivität zu besitzen und endogenes RS1 zu blockieren, während die Mutante, bei welcher die Phosphorylierung verhindert wurde, regulatorisch aktiv ist.

Die posttranslationalen regulatorischen Effekte von RS1-Reg auf Transporter sind aller Wahrscheinlichkeit nach von dem Phosphorylierungsmuster von RS1-Reg abhängig, wobei nicht alle potentiellen Phosphorylierungsstellen in RS1-Reg relevant zu sein scheinen. So konnte ich bei Messungen an RS1KO-Mäusen mit Mutanten von mRS1-Reg, bei welchen das Serin in Position 65 von mRS1-Reg gegen Glutamat oder Alanin ausgetauscht wurde, unter Niedrigzucker-Bedingungen keinen regulatorischen Einfluss auf die AMG oder Uridinaufnahme beobachten. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Phosphorylierung in dieser Position die Regulation eines anderen Transporters durch RS1-Reg beeinflusst.

Die Tatsache, dass ich nach oraler Gabe von RS1-Reg-Mutanten transporterspezifische Effekte in Dünndarmepithelzellen über einen intrazellulären Mechanismus beobachten konnte, zeigt dass es möglich ist, längere Peptide mittels Kopplung an Nanohydrogele in die Enterozyten zu transportieren und dass die Peptide intrazellulär in einer aktiven Form freigesetzt werden. Es erscheint mir wichtig, dass der genaue Mechanismus für die durch Nanohydrogele vermittelte Aufnahme von Peptiden untersucht wird und dass die Bedingungen für den Nanohydrogel vermittelten Transfer von Peptiden optimiert werden.

## 5.2. Die regulatorische Domäne des humanen RS1 (hRS1) zeigt im Maussystem keinen regulatorischen Effekt auf den SGLT1

Neben Messungen mit der murinen regulatorischen Domäne habe ich auch Versuche mit der humanen Form (hRS1-Reg) durchgeführt. In RS1KO-Mäusen konnte ich keinen regulatorischen Effekt von hRS1-Reg beobachten. Auch Mutanten von hRS1-Reg, bei welchen die Phosphorylierung des Serins im QSP Motiv in Position 20 verhindert oder eine Phosphorylierung simuliert wurde, zeigten keinen Einfluss auf die AMG-Aufnahme. Anscheinend ist die humane Form nicht in der Lage, den murinen Transporter herunter zu regulieren. Im Oozytensystem konnte gezeigt werden, dass hRS1-Reg und hRS1-Reg Mutanten nicht nur den humanen sondern auch den murinen SGLT1 herunterregulieren. hRS1-Reg bindet also offensichtlich auch an ODC in Oozyten. Möglicherweise unterscheidet sich die RS1-Reg Bindungsstelle in ODC aus Oozyten von der aus Mäusen, sodass ODC aus Oozyten hRS1 und mRS1 mit hoher Affinität binden kann, während ODC von Mäusen nur mRS1 mit hoher Affinität bindet. Speziesunterschiede von ODC zwischen Oozyten und Maus könnten auch die bindungsinduzierte Hemmwirkung auf die Vesikelabschnürung vom TGN betreffen. Die unterschiedlichen Aminosäuresequenzen der RS1-Reg Domänen von Maus und Mensch (**Abb. 13**) lassen eine unterschiedliche Wirkung auf ODC von verschiedenen Spezies wahrscheinlich erscheinen.

## 5.3. Effekte der Peptidsequenzen QSP und SDSRIEP auf die Transportaktivitäten von SGLT1 und CNTs

In Oozyten konnte gezeigt werden, dass schon kürzere Sequenzen der regulatorischen Domäne wie das Tripeptid QSP und das Oktapeptid SDSRIEP regulatorisch aktiv sind. Für das Maussystem konnte die Wirksamkeit der phosphorylierungssimulierenden Mutante von QSP, QEP, bei niedrigen intrazellulären Glukosekonzentrationen in RS1KO Mäusen gezeigt werden. Beim Vergleich mit anderen Substitutionen des Serins, welche *in vivo* durchgeführt wurden, ergab sich, dass die Herunterregulation spezifisch für QEP war. Selbst die Substitution gegen Aspartat, die zweite saure Aminosäure neben Glutamat, welche sich lediglich durch das Fehlen einer Methylengruppe von diesem unterscheidet, konnte keine

Regulation bewirken. Dieses Ergebnis zeigt, dass das Tripeptid auch bei Säugetieren wirksam ist. Allerdings war mit QEP zu beobachten, dass es unter Hochzucker-Bedingungen in RS1KO-Mäusen nicht wirksam war. Dies steht im Widerspruch zu den Oozytenmessungen, in denen QEP bei hohen intrazellulären Glukosekonzentrationen sogar eine stärkere Wirksamkeit zeigte (M. Veyhl-Wichmann unpublizierte Daten). Die unterschiedlichen Effekte sind wahrscheinlich durch Speziesunterschiede von ODC zu erklären. Bei WT-Mäusen konnte mit QEP weder unter Hochzucker- noch unter Niedrigzucker-Bedingungen ein Effekt auf die AMG Aufnahme gezeigt werden. Bei Niedrigzucker-Bedingungen ist dies nicht verwunderlich, da hier der Transport bereits durch das endogene RS1 herunterreguliert ist, allerdings würde man unter Hochzucker-Bedingungen einen Effekt erwarten. Eine mögliche Erklärung wäre, dass QEP teilweise im Magen abgebaut wird und die Menge an intaktem QEP, welches die Darmzellen erreicht nicht, ausreicht, um bei WT-Mäusen eine regulatorische Aktivität zu entfalten. Zwar konnte in Stabilitätsmessungen mit Salzsäure und Pepsin gezeigt werden, dass QEP in diesen Substanzen mehr als 24 Stunden stabil ist, jedoch ist nicht auszuschließen, dass QEP im Magensaft von anderen Enzymen, wie zum Beispiel Trypsin abgebaut werden könnte. Die Hypothese, dass die Konzentration von QEP im Dünndarm durch teilweise Inaktivierung im Magen erniedrigt wird, wird durch das Ergebnis gestützt, dass die Gabe von in Alginat verkapseltem QEP zu einer 20%igen Erniedrigung der AMG-Aufnahme unter Hochzucker-Bedingungen führte. Neben diesem, auch im murinen RS1-Protein vorkommenden Tripeptid, wurde die Wirksamkeit des Oktapeptids SDSDRIEP auf SGLT1 im Mäusedarm untersucht. Unter Niedrigzucker-Bedingungen war in RS1KO Mäusen ein schwacher, jedoch signifikanter Effekt durch SDEDRIEP zu sehen. Die Tatsache, dass die gesamte RS1-Reg Domäne vom Menschen keine Wirkung auf den AMG Transport im Mäusedarm zeigte, könnte daran liegen, dass von dem an Nanohydrogel gekoppelten SDSDRIEP mehr eingesetzt wurde als von dem gekoppelten hRS1-Reg. Eine andere Erklärung könnte sein, dass es bei hRS1-Reg zu sterischen Hinderungen kommt, die bei dem Oktapeptid nicht auftreten.

Für CNTs konnte weder mit QSP noch mit SDSDRIEP eine Regulation erzielt werden. Eine Begründung hierfür könnte sein, dass der murine Rezeptor im Gegensatz zu dem humanen Rezeptor weder QSP noch SDSDRIEP bindet. In Oozyten wurde gezeigt, dass QSP keinen Einfluss auf die durch hCNT1 exprimierte Uridinaufnahme hat. Für die gesamte hRS1-Reg Domäne und das Oktapeptid SDSDRIEP konnte dagegen eine regulatorische Wirksamkeit auf



den durch hCNT1 exprimierten Uridintransport gezeigt werden (Veyhl-Wichmann et al., 2015).

## 6. Zusammenfassung

Der Natrium-D-Glukose Kotransporter 1 (SGLT1) spielt eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Glukose aus dem Darmlumen in die Enterozyten des Darms. Anhand von Untersuchungen an *Xenopus laevis*-Oozyten konnte in unserem Labor das Protein RS1 als posttranslationales Regulatorprotein für SGLT1 und diverse andere Transporter ermittelt werden. Es wurde eine regulatorische Domäne aus RS1 mit vielen potentiellen Phosphorylierungsstellen isoliert (RS1-Reg) und gezeigt dass RS1-Reg die Abschnürung von Transporter enthaltenen Vesikeln vom Transgolgi-Netzwerk hemmt. Neben SGLT1 reguliert RS1 auch die konzentrierenden Nukleosidtransporter (CNTs) am TGN. Die Regulation der Transporter ist vom Phosphorylierungszustand von RS1-Reg abhängig. So wurde durch Versuche an Oozyten von *Xenopus laevis* und Injektion von RS1-Reg Mutanten gezeigt, dass die Phosphorylierung von RS1-Reg an einigen Stellen zu einer Inhibition von SGLT1 führte, während der Nukleosidtransporter CNT1 durch die dephosphorylierte Mutante herunterreguliert wurden. Neben der phosphorylierungsabhängigen Regulation konnte für SGLT1 auch gezeigt werden, dass die Herunterregulation nur unter Niedrigzucker-Bedingungen erfolgte, nicht jedoch bei hohen Glukosekonzentrationen. Für die CNTs war eine derartige Zuckerabhängigkeit nicht zu beobachten.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob die Ergebnisse aus den Oozytenmessungen auch *in vivo* in einem Säugetier gezeigt werden können. Hierzu wurden Mutanten der regulatorischen Domäne (RS1-Reg) des Maus-Proteins, welche den phosphorylierten Zustand simulierten (RS1-Reg (S19E)), oder die Phosphorylierung verhinderten (RS1-Reg (S19A)) eingesetzt. Diese wurden an ein Nanohydrogel gekoppelt, um eine Aufnahme in die Enterozyten im Darm zu gewährleisten. Es wurde in der RS1KO-Mausohne funktionelles RS1 gezeigt, dass auch im *in vivo*-System eine Herunterregulation von SGLT1 durch mRS1-Reg (S19E), nicht jedoch durch mRS1-Reg (S19A) erfolgte, während die CNTs nur durch mRS1-Reg (S19A) inhibiert wurden. Des Weiteren führte mRS1-Reg (S19A) in der Wildtypmaus bei niedrigen Zuckerkonzentrationen zu einer Stimulation von SGLT1, was für eine Konkurrenz mit dem endogenen RS1-Proteins spricht. Es konnte indirekt der Beweis erbracht werden, dass über Nanohydrogele längere Proteine in die Zelle gebracht werden können und dort funktionell freigesetzt werden.

## 7. Summary

The Sodium-D-glucose cotransporter 1 (SGLT1) is important for the uptake of glucose from the intestinal lumen into the enterocytes. In experiments with *Xenopus-laevis* oocytes, which were performed in our laboratory, we identified protein RS1 as a regulatory protein for SGLT1. A sequence of 80 aminoacids was identified to be the regulatory domain of RS1 (RS1-Reg) and prevents the constriction of transporter-containing vesicles from the transgolgi-network (TGN). Besides SGLT1, RS1 is able to regulate concentrative nucleoside transporters (CNTs) and the organic cation transporter 2 (OCT2). The regulation of the transporters depends on the phosphorylation-state of RS1-Reg. While SGLT1 is inhibited by the phosphorylated form of the regulatory domain, CNTs are regulated by the dephosphorylated form. In addition, the regulation of SGLT1 depends on the glucose concentration of the cells. RS1 only inhibits SGLT1 under low glucose conditions, while the regulation of CNTs is independent of glucose.

In the following study we analyzed whether the results of the oocyte measurements could be reproduced *in vivo*. For this, we used mutants of the mouse regulatory domain (mRS1-Reg). In one mutant, the phosphorylation was mimicked (mRS1-Reg (S19E)), in a second mutant, phosphorylation was prevented (mRS1-Reg (S19A)). The mutants were coupled to nanohydrogels, to enable the uptake into enterocytes. By usage of a mouse-strain without functional RS1 and a wildtype-mouse-strain, I was able to discriminate between direct effects of the mutant and competition of mutants with endogenous RS1. Only mRS1-Reg (S19E) down regulates SGLT1, but not mRS1-Reg (S19A), while CNTs were downregulated by mRS1-Reg (S19A) but not by mRS1-Reg (S19E). In the wildtype-mouse mRS1-Reg (S19A) leads to an increase of SGLT1-activity which could be due to a competition with the endogenous RS1. The fact, that some peptides were able to regulate transporters leads to the conclusion, that longer proteins can be transported into cells by nanohydrogels and that these proteins are released in the cells in a functional active state.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	alpha
A	Alanin
Abb.	Abbildung
AIT	Apikale Iodid Transporter
AMG	$\alpha$ -Methyl-D-Glycopyranosid
ANOVA	Analyse der Varianz
ATP	Adenosintriphosphat
BBMV	Bürstensaummembranvesikel
8BrcAMP	8-Bromoadenosin 3',5'-cyclisches Monophosphat
C	Cystein
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CamK2	Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase 2
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CDK5	Cyklin-abhängige Kinase 5
C/EBP $\alpha$	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
cm	Centimeter
CNT	<i>concentrativ nucleosid transporter</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
D	Aspartat
dL	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOG	sn-1,2-Dioctanoyl Glycerol
E	Glutamat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>

ENT	<i>equilibrative nucleoside transporter</i>
et. al	und weitere
Glut2	vereinfachender Glukosetransporter 2
GGM	Glukose-Galaktose-Malabsorptionssyndrom
GIP	Glukoseabhängiges insulinotropes Peptid
GLP-2	Glukagon-like peptide 2
GSK3β	Glykogen Synthase Kinase 3β
h	human
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HNF	<i>Hepatocyte nuclear factor</i>
I	Isoleucin
IL-6	Interleukin-6
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KRB	Krebs-Ringer-Puffer
PBS	Phosphatgepufferte Saline
M	Methionin
m	murin
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
μCi	Microcurie
mg	Milligramm
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Magnesiumsulfat-Heptahydrat
min	Minute
mL	Milliliter

μM	Micromolar
mRNA	Messenger RNA
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Di-Natriumhydrogenphosphat
NIS	Natrium-Iodid-Symporter
OCT	organische Kation-Transporter
ODC	Ornithindecaboxylase
O <sub>2</sub>	elementarer Sauerstoff
P	Prolin
p	Signifikanzwert ( <i>propability value</i> )
PepT1	Peptidtransporter 1
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PI3	Phosphoinositid-3-Kinasen
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
pmol	Picomol
Q	Glutamin
R	Arginin
RS1	Regulatorischen Protein RS1
RS1KO	RS1-Knockout
RSK	ribosomal s6 <i>kinase</i>
RS1-Reg	regulatorische Domäne von RS1
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SGLT1	Natrium-D-Glukose-Cotransporter 1
SGLT1KO	SGT1-Knockout

SLC	<i>solute carrier</i>
TAT	<i>transactivator of transcription</i>
T2DM	Typ 2 Diabetes mellitus
TF AP-1	Transkriptionsfaktor activator protein 1
TGF- $\alpha$	<i>transforming Growth Factor</i>
TGN	Transgolgi-Netzwerk
TMD	Transmembrandomäne
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
T1R2+T1R3	Untereinheiten der Sweettaste-Rezeptoren
WT	Wildtyp
X	beliebige Aminosäure
x	fach
$^{14}\text{C}$	radioaktives Kohlenstoffisotop
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
$^3\text{H}$	Tritium (radioaktives Wasserstoffisotop)
w/v	weight/volume
%	Prozent
*	Schwache Signifikanz
**	starke Signifikanz
***	sehr starke Signifikanz

## 9. Referenzen

- Aymerich, I., Pastor-Anglada, M. and Casado, F. J.** (2004). Long term endocrine regulation of nucleoside transporters in rat intestinal epithelial cells. *J Gen Physiol* **124**, 505-12.
- Azevedo, M. F., Lima, C. F., Fernandes-Ferreira, M., Almeida, M. J., Wilson, J. M. and Pereira-Wilson, C.** (2011). Rosmarinic acid, major phenolic constituent of Greek sage herbal tea, modulates rat intestinal SGLT1 levels with effects on blood glucose. *Mol Nutr Food Res* **55 Suppl 1**, S15-25.
- Balakrishnan, A., Stearns, A. T., Rounds, J., Irani, J., Giuffrida, M., Rhoads, D. B., Ashley, S. W. and Tavakkolizadeh, A.** (2008). Diurnal rhythmicity in glucose uptake is mediated by temporal periodicity in the expression of the sodium-glucose cotransporter (SGLT1). *Surgery* **143**, 813-8.
- Cano-Soldado, P., Llorayoz, I. M., Molina-Arcas, M., Casado, F. J., Martinez-Picado, J., Lostao, M. P. and Pastor-Anglada, M.** (2004). Interaction of nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase with the concentrative nucleoside transporter-1 (SLC28A1). *Antivir Ther* **9**, 993-1002.
- Cheeseman, C. I.** (1993). GLUT2 is the transporter for fructose across the rat intestinal basolateral membrane. *Gastroenterology* **105**, 1050-6.
- del Santo, B., Tarafa, G., Felipe, A., Casado, F. J. and Pastor-Anglada, M.** (2001). Developmental regulation of the concentrative nucleoside transporters CNT1 and CNT2 in rat liver. *J Hepatol* **34**, 873-80.
- Di Perri, T. and Laghi-Pasini, F.** (1991). Pathophysiology and pharmacology of the adenosine system. *Ann Ital Med Int* **6**, 442-7.
- Diaz-Munoz, M. and Salin-Pascual, R.** (2010). Purine molecules as hypnogenic factors role of adenosine, ATP, and caffeine. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* **10**, 259-68.
- Errasti-Murugarren, E., Casado, F. J. and Pastor-Anglada, M.** (2010). Different N-terminal motifs determine plasma membrane targeting of the human concentrative nucleoside transporter 3 in polarized and nonpolarized cells. *Mol Pharmacol* **78**, 795-803.
- Errasti-Murugarren, E., Fernandez-Calotti, P., Veyhl-Wichmann, M., Diepold, M., Pinilla-Macua, I., Perez-Torras, S., Kipp, H., Koepsell, H. and Pastor-Anglada, M.** (2012). Role of the transporter regulator protein (RS1) in the modulation of concentrative nucleoside transporters (CNTs) in epithelia. *Mol Pharmacol* **82**, 59-67.
- Ezaki, O.** (1997). Regulatory elements in the insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) gene. *Biochem Biophys Res Commun* **241**, 1-6.
- Fanjul, C., Barrenetxe, J., Inigo, C., Sakar, Y., Ducroc, R., Barber, A. and Lostao, M. P.** (2012). Leptin regulates sugar and amino acids transport in the human intestinal cell line Caco-2. *Acta Physiol (Oxf)* **205**, 82-91.
- Fatima, J., Iqbal, C. W., Houghton, S. G., Kasperek, M. S., Duenes, J. A., Zheng, Y. and Sarr, M. G.** (2009). Hexose transporter expression and function in mouse small intestine: role of diurnal rhythm. *J Gastrointest Surg* **13**, 634-41.
- Fernandez-Veledo, S., Jover, R., Casado, F. J., Gomez-Lechon, M. J. and Pastor-Anglada, M.** (2007). Transcription factors involved in the expression of SLC28 genes in human liver parenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun* **353**, 381-8.
- Fernandez-Veledo, S., Valdes, R., Wallenius, V., Casado, F. J. and Pastor-Anglada, M.** (2004). Up-regulation of the high-affinity pyrimidine-preferring nucleoside transporter concentrative nucleoside transporter 1 by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in liver parenchymal cells. *J Hepatol* **41**, 538-44.
- Galmarini, C. M., Mackey, J. R. and Dumontet, C.** (2001). Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. *Leukemia* **15**, 875-90.
- Gomez-Angelats, M., del Santo, B., Mercader, J., Ferrer-Martinez, A., Felipe, A., Casado, J. and Pastor-Anglada, M.** (1996). Hormonal regulation of concentrative nucleoside transport in liver parenchymal cells. *Biochem J* **313 ( Pt 3)**, 915-20.



- Gorboulev, V., Schurmann, A., Vallon, V., Kipp, H., Jaschke, A., Klessen, D., Friedrich, A., Scherneck, S., Rieg, T., Cunard, R. et al.** (2012). Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransporter SGLT1 is pivotal for intestinal glucose absorption and glucose-dependent incretin secretion. *Diabetes* **61**, 187-96.
- Govindarajan, R., Bakken, A. H., Hudkins, K. L., Lai, Y., Casado, F. J., Pastor-Anglada, M., Tse, C. M., Hayashi, J. and Unadkat, J. D.** (2007). In situ hybridization and immunolocalization of concentrative and equilibrative nucleoside transporters in the human intestine, liver, kidneys, and placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **293**, R1809-22.
- Graham, K. A., Leithoff, J., Coe, I. R., Mowles, D., Mackey, J. R., Young, J. D. and Cass, C. E.** (2000). Differential transport of cytosine-containing nucleosides by recombinant human concentrative nucleoside transporter protein hCNT1. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **19**, 415-34.
- Groll Jürgen, S. S., Krystyna Albrecht, Martin Moeller.** (2009). Biocompatible and degradable nanogels via oxidation reactions of synthetic thiomers in inverse miniemulsion. In *Journal of polymer science*, vol. 47, pp. 5543-5549.
- Guo, G. F., Cai, Y. C., Zhang, B., Xu, R. H., Qiu, H. J., Xia, L. P., Jiang, W. Q., Hu, P. L., Chen, X. X., Zhou, F. F. et al.** (2011). Overexpression of SGLT1 and EGFR in colorectal cancer showing a correlation with the prognosis. *Med Oncol* **28 Suppl 1**, S197-203.
- Hirsch, J. R., Loo, D. D. and Wright, E. M.** (1996). Regulation of Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter expression by protein kinases in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* **271**, 14740-6.
- Houghton, S. G., Iqbal, C. W., Duenes, J. A., Fatima, J., Kasperek, M. S. and Sarr, M. G.** (2008). Coordinated, diurnal hexose transporter expression in rat small bowel: implications for small bowel resection. *Surgery* **143**, 79-93.
- Inigo, C., Patel, N., Kellett, G. L., Barber, A. and Lostao, M. P.** (2007). Luminal leptin inhibits intestinal sugar absorption in vivo. *Acta Physiol (Oxf)* **190**, 303-10.
- Ishikawa, N., Oguri, T., Isobe, T., Fujitaka, K. and Kohno, N.** (2001). SGLT gene expression in primary lung cancers and their metastatic lesions. *Jpn J Cancer Res* **92**, 874-9.
- Karnieli, E., Zarnowski, M. J., Hissin, P. J., Simpson, I. A., Salans, L. B. and Cushman, S. W.** (1981). Insulin-stimulated translocation of glucose transport systems in the isolated rat adipose cell. Time course, reversal, insulin concentration dependency, and relationship to glucose transport activity. *J Biol Chem* **256**, 4772-7.
- Kawano, K., Ikari, A., Nakano, M. and Suketa, Y.** (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase mediates inhibitory effect of angiotensin II on sodium/glucose cotransporter in renal epithelial cells. *Life Sci* **71**, 1-13.
- Kimmich, G. A. and Randles, J.** (1984). Sodium-sugar coupling stoichiometry in chick intestinal cells. *Am J Physiol* **247**, C74-82.
- Kroiss, M., Leyerer, M., Gorboulev, V., Kuhlkamp, T., Kipp, H. and Koepsell, H.** (2006). Transporter regulator RS1 (RSC1A1) coats the trans-Golgi network and migrates into the nucleus. *Am J Physiol Renal Physiol* **291**, F1201-12.
- Kurokawa, T., Hashida, F., Kawabata, S. and Ishibashi, S.** (1995). Evidence for the regulation of small intestinal Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter by insulin. *Biochem Mol Biol Int* **37**, 33-8.
- Lambotte, S., Veyhl, M., Kohler, M., Morrison-Shetlar, A. I., Kinne, R. K., Schmid, M. and Koepsell, H.** (1996). The human gene of a protein that modifies Na<sup>+</sup>-D-glucose co-transport. *DNA Cell Biol* **15**, 769-77.
- Loewen, S. K., Ng, A. M., Mohabir, N. N., Baldwin, S. A., Cass, C. E. and Young, J. D.** (2003). Functional characterization of a H<sup>+</sup>/nucleoside co-transporter (CaCNT) from *Candida albicans*, a fungal member of the concentrative nucleoside transporter (CNT) family of membrane proteins. *Yeast* **20**, 661-75.
- Loo, D. D., Zeuthen, T., Chandy, G. and Wright, E. M.** (1996). Cotransport of water by the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13367-70.

- Lopez-Navarro, A. T., Ortega, M. A., Peragon, J., Bueno, J. D., Gil, A. and Sanchez-Pozo, A.** (1996). Deprivation of dietary nucleotides decreases protein synthesis in the liver and small intestine in rats. *Gastroenterology* **110**, 1760-9.
- Lostao, M. P., Mata, J. F., Larrayoz, I. M., Inzillo, S. M., Casado, F. J. and Pastor-Anglada, M.** (2000). Electrogenic uptake of nucleosides and nucleoside-derived drugs by the human nucleoside transporter 1 (hCNT1) expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS Lett* **481**, 137-40.
- Mann, D. A. and Frankel, A. D.** (1991). Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein. *EMBO J* **10**, 1733-9.
- Martin, M. G., Wang, J., Solorzano-Vargas, R. S., Lam, J. T., Turk, E. and Wright, E. M.** (2000). Regulation of the human Na<sup>(+)</sup>-glucose cotransporter gene, SGLT1, by HNF-1 and Sp1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **278**, G591-603.
- Meinild, A., Klaerke, D. A., Loo, D. D., Wright, E. M. and Zeuthen, T.** (1998). The human Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter is a molecular water pump. *J Physiol* **508 ( Pt 1)**, 15-21.
- Merrifield, R. B.** (1969). Solid-phase peptide synthesis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **32**, 221-96.
- Pan, X., Terada, T., Okuda, M. and Inui, K.** (2004). The diurnal rhythm of the intestinal transporters SGLT1 and PEPT1 is regulated by the feeding conditions in rats. *J Nutr* **134**, 2211-5.
- Pastor-Anglada, M., Cano-Soldado, P., Errasti-Murugarren, E. and Casado, F. J.** (2008). SLC28 genes and concentrative nucleoside transporter (CNT) proteins. *Xenobiotica* **38**, 972-94.
- Pipkorn, R., Boenke, C., Gehrke, M. and Hoffmann, R.** (2002). High-throughput peptide synthesis and peptide purification strategy at the low micromol-scale using the 96-well format. *J Pept Res* **59**, 105-14.
- Poppe, R., Karbach, U., Gambaryan, S., Wiesinger, H., Lutzenburg, M., Kraemer, M., Witte, O. W. and Koepsell, H.** (1997). Expression of the Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransporter SGLT1 in neurons. *J Neurochem* **69**, 84-94.
- Rhoads, D. B., Rosenbaum, D. H., Unsal, H., Isselbacher, K. J. and Levitsky, L. L.** (1998). Circadian periodicity of intestinal Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter 1 mRNA levels is transcriptionally regulated. *J Biol Chem* **273**, 9510-6.
- Ritzel, M. W., Ng, A. M., Yao, S. Y., Graham, K., Loewen, S. K., Smith, K. M., Ritzel, R. G., Mowles, D. A., Carpenter, P., Chen, X. Z. et al.** (2001). Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative Na<sup>+</sup>-nucleoside cotransporter proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). *J Biol Chem* **276**, 2914-27.
- Ritzel, M. W., Yao, S. Y., Huang, M. Y., Elliott, J. F., Cass, C. E. and Young, J. D.** (1997). Molecular cloning and functional expression of cDNAs encoding a human Na<sup>+</sup>-nucleoside cotransporter (hCNT1). *Am J Physiol* **272**, C707-14.
- Ritzel, M. W., Yao, S. Y., Ng, A. M., Mackey, J. R., Cass, C. E. and Young, J. D.** (1998). Molecular cloning, functional expression and chromosomal localization of a cDNA encoding a human Na<sup>+</sup>/nucleoside cotransporter (hCNT2) selective for purine nucleosides and uridine. *Mol Membr Biol* **15**, 203-11.
- Savci, V. and Wurtman, R. J.** (1995). Effect of cytidine on membrane phospholipid synthesis in rat striatal slices. *J Neurochem* **64**, 378-84.
- Scafoglio, C., Hirayama, B. A., Kepe, V., Liu, J., Ghezzi, C., Satyamurthy, N., Moatamed, N. A., Huang, J., Koepsell, H., Barrio, J. R. et al.** (2015). Functional expression of sodium-glucose transporters in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E4111-9.
- Schachter, J. B., Yasuda, R. P. and Wolfe, B. B.** (1995). Adenosine receptor activation potentiates phosphoinositide hydrolysis and arachidonic acid release in DDT1-MF2 cells: putative interrelations. *Cell Signal* **7**, 659-68.
- Shafir, E., Ziv, E. and Mosthaf, L.** (1999). Nutritionally induced insulin resistance and receptor defect leading to beta-cell failure in animal models. *Ann N Y Acad Sci* **892**, 223-46.
- Slugoski, M. D., Smith, K. M., Mulinta, R., Ng, A. M., Yao, S. Y., Morrison, E. L., Lee, Q. O., Zhang, J., Karpinski, E., Cass, C. E. et al.** (2008). A conformationally mobile cysteine residue (Cys-561) modulates Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> activation of human CNT3. *J Biol Chem* **283**, 24922-34.

- Smith, K. M., Slugoski, M. D., Cass, C. E., Baldwin, S. A., Karpinski, E. and Young, J. D.** (2007). Cation coupling properties of human concentrative nucleoside transporters hCNT1, hCNT2 and hCNT3. *Mol Membr Biol* **24**, 53-64.
- Smith, K. M., Slugoski, M. D., Loewen, S. K., Ng, A. M., Yao, S. Y., Chen, X. Z., Karpinski, E., Cass, C. E., Baldwin, S. A. and Young, J. D.** (2005). The broadly selective human Na<sup>+</sup>/nucleoside cotransporter (hCNT3) exhibits novel cation-coupled nucleoside transport characteristics. *J Biol Chem* **280**, 25436-49.
- Smith, M. W., Turvey, A. and Freeman, T. C.** (1992). Appearance of phloridzin-sensitive glucose transport is not controlled at mRNA level in rabbit jejunal enterocytes. *Exp Physiol* **77**, 525-8.
- Swidan, S. Z. and Montgomery, P. A.** (1998). Effect of blood glucose concentrations on the development of chronic complications of diabetes mellitus. *Pharmacotherapy* **18**, 961-72.
- Thomson, A. B. and Wild, G.** (1997). Adaptation of intestinal nutrient transport in health and disease. Part I. *Dig Dis Sci* **42**, 453-69.
- Thomson, S., Bao, D., Deng, A. and Vallon, V.** (2000). Adenosine formed by 5'-nucleotidase mediates tubuloglomerular feedback. *J Clin Invest* **106**, 289-98.
- Turk, E., Martin, M. G. and Wright, E. M.** (1994). Structure of the human Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter gene SGLT1. *J Biol Chem* **269**, 15204-9.
- Turk, E., Zabel, B., Mundlos, S., Dyer, J. and Wright, E. M.** (1991). Glucose/galactose malabsorption caused by a defect in the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *Nature* **350**, 354-6.
- Valdes, R., Ortega, M. A., Casado, F. J., Felipe, A., Gil, A., Sanchez-Pozo, A. and Pastor-Anglada, M.** (2000). Nutritional regulation of nucleoside transporter expression in rat small intestine. *Gastroenterology* **119**, 1623-30.
- Vernaleken, A., Veyhl, M., Gorboulev, V., Kottra, G., Palm, D., Burckhardt, B. C., Burckhardt, G., Pipkorn, R., Beier, N., van Amsterdam, C. et al.** (2007). Tripeptides of RS1 (RSC1A1) inhibit a monosaccharide-dependent exocytotic pathway of Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransporter SGLT1 with high affinity. *J Biol Chem* **282**, 28501-13.
- Veyhl-Wichmann, M., Friedrich, A., Vernaleken, A., Singh, S., Kipp, H., Gorboulev, V., Keller, T., Chintalapati, C., Pipkorn, R., Pastor-Anglada, M. et al.** (2015). Phosphorylation of RS1 (RSC1A1) Steers Inhibition of Different Exocytotic Pathways for Glucose Transporter SGLT1 and Nucleoside Transporter CNT1 and a RS1 Derived Peptide Inhibits Glucose Absorption. *Mol Pharmacol*.
- Veyhl, M., Keller, T., Gorboulev, V., Vernaleken, A. and Koepsell, H.** (2006). RS1 (RSC1A1) regulates the exocytotic pathway of Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransporter SGLT1. *Am J Physiol Renal Physiol* **291**, F1213-23.
- Veyhl, M., Spangenberg, J., Puschel, B., Poppe, R., Dekel, C., Fritzsich, G., Haase, W. and Koepsell, H.** (1993). Cloning of a membrane-associated protein which modifies activity and properties of the Na<sup>(+)</sup>-D-glucose cotransporter. *J Biol Chem* **268**, 25041-53.
- Vrhovac, I., Balen Eror, D., Klessen, D., Burger, C., Breljak, D., Kraus, O., Radovic, N., Jadrijevic, S., Aleksic, I., Walles, T. et al.** (2015). Localizations of Na<sup>(+)</sup>-D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2 in human kidney and of SGLT1 in human small intestine, liver, lung, and heart. *Pflugers Arch* **467**, 1881-98.
- Wang, J. and Giacomini, K. M.** (1997). Molecular determinants of substrate selectivity in Na<sup>+</sup>-dependent nucleoside transporters. *J Biol Chem* **272**, 28845-8.
- Wang, J. and Giacomini, K. M.** (1999). Serine 318 is essential for the pyrimidine selectivity of the N2 Na<sup>+</sup>-nucleoside transporter. *J Biol Chem* **274**, 2298-302.
- Watanabe, A., Choe, S., Chaptal, V., Rosenberg, J. M., Wright, E. M., Grabe, M. and Abramson, J.** (2010). The mechanism of sodium and substrate release from the binding pocket of vSGLT. *Nature* **468**, 988-91.
- Watson, M. J., Worthington, E. N., Clunes, L. A., Rasmussen, J. E., Jones, L. and Tarran, R.** (2011). Defective adenosine-stimulated cAMP production in cystic fibrosis airway epithelia: a novel role for CFTR in cell signaling. *FASEB J* **25**, 2996-3003.
- Wild, G. E., Searles, L. E., Koski, K. G., Drozdowski, L. A., Begum-Hasan, J. and Thomson, A. B.** (2007). Oral polyamine administration modifies the ontogeny of hexose transporter gene expression in the postnatal rat intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**, G453-60.

- Wisniewski, J. R., Friedrich, A., Keller, T., Mann, M. and Koepsell, H.** (2014). The Impact of High-Fat Diet on Metabolism and Immune Defense in Small Intestine Mucosa. *J Proteome Res.*
- Wong, T. P., Debnam, E. S. and Leung, P. S.** (2009). Diabetes mellitus and expression of the enterocyte renin-angiotensin system: implications for control of glucose transport across the brush border membrane. *Am J Physiol Cell Physiol* **297**, C601-10.
- Wright, E. M., Loo, D. D. and Hirayama, B. A.** (2011). Biology of human sodium glucose transporters. *Physiol Rev* **91**, 733-94.
- Wright, E. M., Turk, E. and Martin, M. G.** (2002). Molecular basis for glucose-galactose malabsorption. *Cell Biochem Biophys* **36**, 115-21.
- Xiao, G., Wang, J., Tangen, T. and Giacomini, K. M.** (2001). A novel proton-dependent nucleoside transporter, CeCNT3, from *Caenorhabditis elegans*. *Mol Pharmacol* **59**, 339-48.
- Yagil, C., Katni, G. and Yagil, Y.** (1994). The effects of adenosine on transepithelial resistance and sodium uptake in the inner medullary collecting duct. *Pflugers Arch* **427**, 225-32.
- Yao, S. Y., Ng, A. M., Loewen, S. K., Cass, C. E., Baldwin, S. A. and Young, J. D.** (2002). An ancient prevertebrate Na<sup>+</sup>-nucleoside cotransporter (hfCNT) from the Pacific hagfish (*Eptatretus stouti*). *Am J Physiol Cell Physiol* **283**, C155-68.
- Yoshikawa, T., Inoue, R., Matsumoto, M., Yajima, T., Ushida, K. and Iwanaga, T.** (2011). Comparative expression of hexose transporters (SGLT1, GLUT1, GLUT2 and GLUT5) throughout the mouse gastrointestinal tract. *Histochem Cell Biol* **135**, 183-94.
- You, G., Lee, W. S., Barros, E. J., Kanai, Y., Huo, T. L., Khawaja, S., Wells, R. G., Nigam, S. K. and Hediger, M. A.** (1995). Molecular characteristics of Na<sup>+</sup>-coupled glucose transporters in adult and embryonic rat kidney. *J Biol Chem* **270**, 29365-71.
- Young, J. D., Paterson, A. R. and Henderson, J. F.** (1985). Nucleoside transport and metabolism in erythrocytes from the Yucatan miniature pig. Evidence that inosine functions as an in vivo energy substrate. *Biochim Biophys Acta* **842**, 214-24.
- Zambrowicz, B., Freiman, J., Brown, P. M., Frazier, K. S., Turnage, A., Bronner, J., Ruff, D., Shadoan, M., Banks, P., Mseeh, F. et al.** (2012). LX4211, a dual SGLT1/SGLT2 inhibitor, improved glycemic control in patients with type 2 diabetes in a randomized, placebo-controlled trial. *Clin Pharmacol Ther* **92**, 158-69.
- Zeuthen, T. and Zeuthen, E.** (2007). The mechanism of water transport in Na<sup>+</sup>-coupled glucose transporters expressed in *Xenopus* oocytes. *Biophys J* **93**, 1413-6; discussion 1417-9.
- Zhang, J., Smith, K. M., Tackaberry, T., Visser, F., Robins, M. J., Nielsen, L. P., Nowak, I., Karpinski, E., Baldwin, S. A., Young, J. D. et al.** (2005). Uridine binding and transportability determinants of human concentrative nucleoside transporters. *Mol Pharmacol* **68**, 830-9.
- Zhang, J., Visser, F., Vickers, M. F., Lang, T., Robins, M. J., Nielsen, L. P., Nowak, I., Baldwin, S. A., Young, J. D. and Cass, C. E.** (2003). Uridine binding motifs of human concentrative nucleoside transporters 1 and 3 produced in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Pharmacol* **64**, 1512-20.
- Zhang, N., Li, Q. Z., Gao, X. J. and Yan, H. B.** (2011). Potential role of adenosine monophosphate-activated protein kinase in regulation of energy metabolism in dairy goat mammary epithelial cells. *J Dairy Sci* **94**, 218-22.

## 10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Transportweg der Glukose über die Enterozyten.....	1
Abbildung 2: Struktur des humanen SGLT1 .....	3
Abbildung 3: Mechanismus des Glukosetransportes durch SGLT1 (Wright et al., 2011) .....	4
Abbildung 4: Putative Phosphorylierungsstellen in der regulatorischen Domäne des humanen RS1-Proteins .....	14
Abbildung 5: Effekte des QSP-Motivs im hRS1-Reg Fragment auf die AMG-Aufnahme durch SGLT1 und die Uridin-Aufnahme durch CNT1.....	15
Abbildung 6: Zuckerabhängigkeit der Regulation von SGLT1 und CNT1 durch hRS1-Reg .....	16
Abbildung 7: Putative Phosphorylierungsstellen der RS1-Reg Domänen von Mensch und Maus .....	17
Abbildung 8: Struktur des in den Versuchen verwendetet Nanohydrogels .....	22
Abbildung 9: Vergleichende AMG-Aufnahme-Messungen in Wildtyp- und RS1KO- Mäusen unter Niedrig- und Hochzucker-Bedingungen .....	28
Abbildung 10: Effekt von hRS1-Reg auf die SGLT1 vermittelte AMG-Aufnahme in den Darm von RS1KO-Mäusen.....	30
Abbildung 11: SGLT1 vermittelte AMG Aufnahme in den Darm von RS1KO Mäusen nach Applikation von hRS1-Reg Mutanten im N-terminale QSP Motiv .....	31
Abbildung 12: Effekt von mRS1-Reg auf die SGLT1-vermittelte AMG Aufnahme in den Darm von RS1KO-Mäusen unter Niedrigzucker-Bedingungen .....	33
Abbildung. 13: Vergleichendes Alignment der Sequenz der regulatorischen Domänen der humanen und des murinen RS1-Proteins.....	34
Abbildung 14: Effekt von mRS1-Reg auf die Transportaktivität von SGLT1 im Darm von RS1KO-Mäusen unter Hochzucker-Bedingungen.....	35
Abbildung 15: Einfluss von Mutationen im QSP Motiv von mRS1-Reg auf die SGLT1 vermittelte AMG Aufnahme in den Darm von RS1KO Mäusen unter Niedrigzucke-Bedingungen .....	36
Abbildung 16: Einfluss von Mutationen im QSP Motiv von mRS1-Reg auf die SGLT1 vermittelte AMG Aufnahme in den Darm von RS1KO Mäusen unter Hochzucker-Bedingungen .....	37
Abbildung 17: Effekte von Mutationen im QSP Motiv von mRS1-Reg auf die Uridin-Aufnahme durch CNTs in RS1KO Mäusen.....	38
Abbildung 18: Effekte der Phosphorylierung von Serin 65 in mRS1-Reg auf die AMG-Aufnahme in RS1KO-Mäusen unter Niedrigzucker-Bedingungen .....	40

Abbildung 19: Effekte der Mutation von Serin 65 in mRS1-Reg auf die AMG-Aufnahme in RS1KO-Mäusen unter Hochzucker-Bedingungen.....41

Abbildung 20: Effekte der Mutation von Serin 65 in mRS1-Reg auf den Uridintransport durch CNTs in RS1KO-Mäusen.....41

Abbildung 21: Effekte von Mutanten des Oktapeptids SDSRIEP auf die AMG-Aufnahme in RS1KO-Mäusen unter Niedrigzucker-Bedingungen.....43

Abbildung 22: Effekte von Mutanten des Oktapeptids SDSRIEP auf die Uridinaufnahme in RS1KO-Mäusen.....43

Abbildung 23: Effekte von RS1-abgeleiteten Tripeptiden der Sequenz QXP auf die AMG-Aufnahme durch SGLT1 in RS1KO-Mäusen unter Niedrigzucker-Bedingungen .....45

Abbildung 24: Einfluss des Tripeptids QEP auf die AMG-Aufnahme in RS1KO- Mäusen unter hohen Zuckerkonzentrationen.....46

Abbildung 25: Einfluss von mRS1-Reg (S19E) und mRS1-Reg (S19A) auf die AMG-Aufnahme unter Niedrigzucker-Bedingungen in Wildtyp-Mäusen.....47

Abbildung 26: Effekte der Mutanten mRS1-Reg(S19A) und mRS1-Reg(S19E) auf die durch Phlorizin gehemmte Aufnahme von 1mM AMG bei Wildtypmäusen.....48

Abbildung 27: Effekte der Mutanten RS1-Reg S19A und S19E auf die Uridinaufnahme in WT-Mäusen.....49

Abbildung 28: Vergleich der Wirkung von QAP und mRS1-Reg(19SA) auf den SGLT1 vermittelten AMG Transport im Darm von Wildtyp-Mäusen unter Niedrigzucker Bedingungen.....50

Abbildung 29: Analyse der Wirkung von per Magensonde appliziertem freien QEP auf die AMG-Aufnahme im Darm von Wildtyp-Mäusen unter Hochzucker-Bedingungen.....51

Abbildung 30: Analyse der Wirkung von per Magensonde appliziertem mikroverkapseltem QEP auf die AMG-Aufnahme im Darm von Wildtyp-Mäusen unter Hochzucker-Bedingungen.....52

Abbildung 31: Modell der Wirkungsweise der regulatorischen Domäne von RS1.....55

Abbildung 32: Modell für die Regulation von SGLT1 und CNTs durch RS1 unter Vermittlung verschiedener Rezeptoren.....56

## 11. Lebenslauf

### Alexandra Friedrich

Gieshügeler Straße 46  
97218 Gerbrunn  
Tel. 01733017388  
E-Mail: [alexandra.friedrich@uni-wuerzburg.de](mailto:alexandra.friedrich@uni-wuerzburg.de)

Geboren am 05.09.1983 in Dieburg  
Familienstand: ledig

### Beruflicher Werdegang

2003: Abitur am Max-Planck-Gymnasium Groß-Umstadt

Oktober 2003- November 2009: Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt; Abschluss als Diplombiologin

September 2006 bis Juni 2007: Auslandsstudium an der Università degli studi di Milano (Italien)

Fremdsprachen: Englisch und Italienisch

Januar 2010-Dezember 2013: Doktorarbeit am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Julius-Maximilians Universität Würzburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Koepsell; Besoldung nach E13/2

Januar 2014 bis Ende 2015: Mitleiterin und Verwalterin der im Rahmen des für Januar 2014 bis Dezember 2015 bewilligten M4-Awards (Bewilligungsnummer: 1330/68362/29/2013; Besoldung nach E13

#### Im Rahme dieser Tätigkeit geleistete Arbeiten:

Selbstständig durchgeführte Transportmessungen  
Orale Glukosebelastungstests  
Bestimmung von Enterohormonen

Koordination der Versuche mit den Kooperationspartnern Prof. Christoph Otto und Prof. Jürgen Groll  
Verwaltung der bewilligten Mittel/SAP  
Verwaltung von Labortieren  
Schreiben von Tierversuchsanträgen

## Qualifikationen

### **Weiterbildungen in den Bereichen:**

Qualitätsmanagement  
Businessplanerstellung,  
Marketingstrategien  
Good clinical practice

Tierschutzkurs nach FELASA-B



## **12. Danksagung**

Ich bedanke mich bei Professor Hermann Koepsell, der mir die Möglichkeit für die Anfertigung dieser Doktorarbeit gegeben hat und mich über die Jahre betreut, gefördert und mir immer mit seinem fachlichen Rat zur Seite gestanden hat.

Dr. Valentin Gorboulev danke ich für die Clonierung der Peptide und Dr. Thorsten Keller für ihre Expression und Aufreinigung.

Ursula Roth, Ferdinand Bauer und Lina Kötzner danke ich für die Betreuung und Bereitstellung der Mäuse, welche in den Versuchen verwendet wurden.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Professor Jürgen Groll und Frau Dr. Smriti Singh für die gute und zuverlässige Kooperation bei meinen Versuchen mit Nanohydrogelen.

Bei Frau Prof. Heike Walles und Prof. Rainer Hedrich möchte ich mich für die Bereitstellung von Labor und Büroräume nach der Emeritierung von Prof. Koepsell bedanken.

Professor Kai Schuh und Professor Bernhard Nieswandt möchte ich für die Übernahme des Zweit- und Drittgutachtens und für ihr Interesse an meiner Arbeit und die interessanten Fachgespräche bezüglich meiner Doktorarbeit danken.