

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Würzburg, Lehrstuhl I
Vorstand: Professor Dr. med H. Koepsell

**Immunologischer Nachweis
des Natrium-Glukose-Kotransporters SGLT1
im mikrovaskulären System des Gehirns, des
Herzens und des Skelettmuskels**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Katrin Elfeber

aus Regensburg

Würzburg, Dezember 2005

Referent: Prof. Dr. med. H. Koepsell

Koreferentin: Prof. Dr. med. M. Kuhn

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 8. September 2006

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1. Glucosetransporterfamilien im Säugetierkörper	1
1.1. Erleichterte Diffusion durch die GLUT-Familie	1
1.2. Sekundär aktiver Natrium gekoppelter Kotransport durch Proteine der SGLT-Familie	4
2. Ziel dieser Arbeit	6
Material und Methoden	7
1. Allgemeine Methoden	7
1.1. Allgemeine Hinweise	7
1.2. Allgemeine Lösungen	7
1.3. Sterilisation und Desinfektion	7
1.4. Beschichtung von Objektträgern	7
1.4.1. Silanisierung	8
1.4.2. Beschichtung mit Chromalaungelatine	8
2. Erzeugung polyklonaler Antikörper	8
2.1. Herstellung des antigenen Peptids	8
2.2. Kopplung des Peptids an Ovalbumin	9
2.3. Immunisierung und Blutentnahme	9
2.4. Serumaufbereitung und Lagerung	10
2.5. Affinitätsreinigung der polyklonalen Antikörper	10
2.5.1. Kopplung des Peptids an die Säule	11
2.5.2. Aufreinigung über die Sulfolinksäule	12
2.6. Lagerung der affinitätsgereinigten Antikörper	12
4. Enzyme linked immunoassay (ELISA)	12
5. Fraktionierung von kultivierten Rattenendothelzellen	14
6. Präparation von Darmgesamtmukosa	14
7. Proteinbestimmung	15
7.1. Methode nach Bradford	15
7.2. DC-Proteinassay, eine Methode modifiziert nach Lowry	15
8. Deglykolisierung vom Membranproteinen	16
9. Proteinnachweis durch SDS-PAGE/ Western blot	16
9.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	16
9.2. Western blot	17

10. Immunhistologie	18
10.1. Immunfluoreszenz an primär unfixiertem Gewebe	18
10.1.1. Gewebegewinnung	18
10.1.2. Einfachmarkierung mit anti r-SGLT-1- Antikörper	19
10.1.3. Doppelmarkierung rSGLT1/ vWF	20
10.2. Immunfluoreszenz an perfusionsfixiertem Gewebe	20
10.2.1. Perfusion der Ratten	20
10.2.2. Gewebeaufbereitung	20
10.2.3. Immunfluoreszenz an perfundiertem Gewebe	21
11. Lichtmikroskopie und Photographie	21
12. Konfokale Laserscanmikroskopie	22
13. Weiterbearbeitung der Bilder	22
Ergebnisse	23
1. Erzeugung und Validierung eines anti-rSGLT1-Antikörpers	23
1.1. Immunisierung und Serumgewinnung	23
1.3. Spezifitätstest	25
1.3.1. Western blot an Darmpräparationen	25
1.3.2. Immunhistologie am Rattenjejunum	27
1.3.3. Immunhistologie an der Rattenniere	29
2. Immunhistologischer Nachweis von rSGLT1 in der Glandula submaxillaris	30
3. Immunhistologischer Nachweis von rSGLT1 in der Blut-Hirn-Schranke	31
4. rSGLT1 in den Kapillaren des Skelettmuskels und des Herzens	33
4.1. Immunhistologischer Nachweis von rSGLT1 im Kapillarsystem des Skelettmuskels	33
4.2. Immunhistologischer Nachweis von rSGLT1 in Herzkapillaren	36
4.3. Nachweis von rSGLT1 in isolierten Herzkapillarendothelzellen	38
Diskussion	41
1. Spezifität des Antikörpers	41
2. Erstbeschreibung des SGLT1 in einer Speicheldrüse der Ratte	41
3. Expression des rSGLT1 in den Kapillaren der Blut-Hirnschranke	42
4. rSGLT1 in Herz und Skelettmuskel	44
Zusammenfassung	47
Literaturverzeichnis	48

Einleitung

1. Glukosetransporterfamilien im Säugetierkörper

1. 1. Erleichterte Diffusion durch die GLUT- Familie

Glukose ist einer der Hauptenergielieferanten des Körpers. Um die Bereitstellung dieses wichtigen Substrates für die einzelne Zelle sicherzustellen, müssen Mechanismen für den Transport auch über die Zellgrenzen hinweg bereitstehen. Für die Beförderung von Glukose sind zwei verschiedene Arten von Transportern bekannt: Zu nennen wäre hier als erstes die große Familie der GLUT- Transporter. Sie ist verantwortlich für die so genannte erleichterte Diffusion. Im Säugetierkörper weit verbreitet ist die Isoform des GLUT1, erstmals 1985 aus Hepatomzellen kloniert (70). Er ist in fast allen Zellen für den Basistransport dieses Nährstoffes zuständig ist (67). In fetalem Gewebe ist er in hohem Maße vorhanden (40), die Expression im adulten Gewebe ist demgegenüber jedoch deutlich eingeschränkt (5). Ebenfalls nachzuweisen ist er in Erythrozyten (50), einer Zellart, welche ausschließlich auf die Energieversorgung mittels Glykolyse angewiesen ist. Neben der allgemeinen Expression in Endothelzellen verschiedener Mikrogefäße (65), findet er sich auch verstärkt in der Blut-Hirnschranke (77), hier ist die kontinuierliche Versorgung des Gewebes mit Glukose von allerhöchster Wichtigkeit für die ungestörte Organfunktion. Eine Mutation dieses Transporters führt bereits in frühester Kindheit zu einer erheblichen Gehirmpathologie im Sinne eines schweren Anfallsleidens kombiniert mit ausgeprägter geistiger Retardierung (5,17).

Drei Jahre nach GLUT1 wurde ein ihm verwandtes Protein kloniert (28). Dieser, nun GLUT2 genannte Transporter, arbeitet in enger Beziehung mit den sekundär aktiven Transportern der SGLT- Familie sowohl in Niere (12, 98), als auch im Darm (53, 98) und der Leber (98). Bei Nagetieren wird er darüber hinaus auch in den Betazellen des Pankreas exprimiert, in dieser Lokalisation findet man beim Menschen hingegen GLUT1. Hier, wie auch bei seiner Lokalisation in den Astrozyten, wird vermutet, dass eine der Hauptaufgaben des Proteins im Glukosesensing besteht (106). Hingegen besagt die Modellvorstellung des Glukosetransportes in Dünndarm (99) und Niere (12), dass Glukose aus dem Lumen von sekundär aktiven Transportern aus der SGLT-Familie absorbiert wird, um anschließend basolateral durch GLUT2 wieder ausgeschleust zu werden. In der Leber soll GLUT2 am Ein- und Ausschleusen der für den organspezifischen Stoffwechsel benötigten Glucose beteiligt sein (98).

Ein Defekt dieses Gens führt zum Fanconi-Bickel-Syndrom (80). Kinder mit dieser Erkrankung erinnern in ihrem Phänotyp stark an die Glykogenose Typ I mit Kleinwuchs, Puppengesicht, sowie Hepato- und Renomegalie. Des Weiteren sind renale Glukosurie, Aminoazidurie, renal tubuläre Azidose, postprandiale Hyperglykämie und Hungerhypoglykämie bei diesen Kindern auffällig (5).

GLUT3, kloniert aus einer Zelllinie fetalem Muskelgewebes (51), ist der Hauptglukosetransporter in den Neuronen des Gehirns (71, 106). Er wurde allerdings auch in anderen Geweben, wie zum Beispiel dem humanen Myokard (74), dem Plazentagewebe (43, 113), Thrombozyten (11) und Spermatozyten (87) gefunden. Trotz dieser mannigfaltigen Expression liegt der Schwerpunkt seiner Bedeutung eindeutig in der Glukoseversorgung der von diesem Substrat für ihre ungestörte Funktion abhängigen Neuronen.

Der Glukosehaushalt wird auch durch GLUT4 als insulinsensitiven Transporter reguliert. Dieser steht des weiteren unter dem Einfluss diverser anderer, die Glukosehomöostase regulierender Hormone, wie zum Beispiel der des Schilddrüsenregelkreises (69). In Herz- und Skelettmuskel, dem weißen und dem braunen Fettgewebe (45) sowie in niedriger Konzentration in bestimmten Neuronen des Gehirns (54) wurde dieser Transporter gefunden. Ohne hormonelle Stimulation befindet sich GLUT4 kaum in der Zellmembran dieser Gewebe. Unter dem Einfluss von Insulin fusionieren mit Glukosetransporter bestückte intrazellulär gelegene Vesikel schließlich mit der Zellmembran (13, 91). Umfangreiche Untersuchungen zeigten die Abhängigkeit der Expression von GLUT4 vom metabolischen Zustand; der genaue Zusammenhang dieses Transporters mit Erkrankungen wie Diabetes mellitus sind jedoch bis heute nicht vollständig geklärt (5).

Hauptsächlich im Dünndarm (15, 82) lokalisiert ist GLUT5. Dieses weitere Mitglied dieser Familie ist für die Absorption des Monosaccharides Fruktose zuständig, er ist nicht in der Lage effizient Glukose zu transportieren (6, 44). Dieser Transporter wurde auch im S3 Segment der Niere gefunden, wo er möglicherweise für die Resorption von Fruktose aus dem Urin zuständig ist (90). Ein weiterer Ort für die Expression dieses Transporters sind auch andere Zellen, welche physiologischerweise Fruktose verstoffwechseln, wie zum Beispiel Fettzellen, Muskelzellen (14, 88) oder Spermatozyten (6). Darüber hinaus wurde dieser Transporter auch in Zellen des retikuloendothelialen Systems, in neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Mikroglia (78, 88, 106) entdeckt.

Nur zur Vollständigkeit und aus historischen Gründen möchte ich hier auch den vormals so genannten GLUT6 erwähnen. Es handelt sich hierbei um ein 1990 entdecktes Pseudogen mit vielen Stop-Codons und Frameshifts. Man geht davon aus, dass

es kein funktionsfähiges Protein kodiert (51). In neueren Klassifizierungen wird dieses Gen bereits nicht mehr als eigenständiges Mitglied der GLUT-Familie angesehen (46).

Neu geordnet wurden in diesen Klassifikationen vor allen die im Folgenden genannten Mitglieder der GLUT-Familie, welche erst vor relativ kurzer Zeit kloniert wurden. Die Erforschung dieser Proteine befindet sich aus diesem Grunde noch im Fluss. So wurde der erstmals als GLUT9 charakterisierte Transporter in GLUT6 umbenannt. Eine hohe Konzentration von m-RNA dieses Proteins findet sich peripheren Leukozyten, der Milz und dem Gehirn des Menschen (20).

Über GLUT7, welcher bereits 1992 erstmals beschrieben wurde (107), ist relativ wenig veröffentlicht worden. Es existiert jedoch die Vorstellung eines intrazellulären Proteins, lokalisiert im endoplasmatischen Retikulum der Leber (107) und der Astrozyten (3). Er bildet dort einen Komplex mit dem Enzym Glucose-6-Phosphatase bildet. Möglicherweise könnte dieser Transporter zuständig sein für die Ausschleusung der durch Glukoneogenese neu gebildeten Glukose. Da dieses Protein noch zu den am wenigsten erforschten der ganzen GLUT-Familie gehört, sind diese Thesen nicht unumstritten (5).

Auf die erst kürzlich klonierten GLUT8 bis GLUT12 soll hier nur cursorisch eingegangen werden. GLUT8, der vormals auch unter dem Namen GLUTX1 beschrieben wurde, wird stark im adulten Hodengewebe, dem Gehirn, den insulin sensitiven Geweben und in fetalen Blastozyten exprimiert (19, 41). Man geht davon aus, dass dieser Transporter auch Funktionen des GLUT4 übernehmen kann, falls dieser beschädigt ist (20).

GLUT9 (80), erstmalig beschrieben unter dem Namen GLUTX (97), wird in der Leber und der Niere exprimiert. GLUT10 findet man unter anderem in Leber, Pankreas, Herz, Lunge und Skelettmuskel. Er ist wegen seiner Lage auf dem humanen Chromosom 20, welches in Verbindung mit der Entstehung des Typ 2 Diabetes gebracht wird, ein neues interessantes Feld für die Diabetesforschung (16). Nahe verwandt mit GLUT5 und aus diesem Grund auch ein möglicher Fructosetransporter ist GLUT11 (21). Von diesem Transporter wurden bis jetzt zwei verschiedene Splicevarianten gefunden. Die kürzere Variante findet sich in Herz- und Skelettmuskelzellen, während die längere in Trachea, Lunge, Gehirn und Leber exprimiert wird. GLUT12 ist einer der neusten Vertreter der Familie, ein naher Verwandter seines insulinabhängigen Verwandten GLUT4 und des weiter oben beschriebenen GLUT10. Er wurde erstmalig in Zellkulturen einer Mammakarzinomzelllinie nachgewiesen. Aufgrund seiner Lokalisation im Herzen, Skelettmuskel, Fettgewebe und dem Dünndarm sowie seiner Homologien zu oben genannten Transportern wird derzeit über

seine Bedeutung in der insulinsteuerten Glukosehämöostase spekuliert (83).

1.2. Sekundär aktiver Natrium gekoppelter Kotransport durch Proteine der SGLT-Familie

Eine weitere Möglichkeit, Glukose in die Zelle aufzunehmen, ist der sekundär aktive Transport. Über die ATP getriebene Natrium-Kalium -ATP-ase wird intrazellulär zu extrazellulär ein Natriumgradient geschaffen. Dieser Gradient gilt als Treibkraft für verschiedene sekundär aktive Transporter der SGLT-Familie (1), auch SLC5-Familie genannt, zu der neben den drei nahe verwandten Proteinen SGLT1, SGLT2 und SGLT3 andere natriumabhängige Transportsysteme gehören (111). Für den Glukosemetabolismus von Bedeutung sind jedoch nur die im Folgenden kurz charakterisierten drei SGLTs. Eine Ausweitung der bisher charakterisierten Transporter der SGLT-Familie um weitere Mitglieder ist in nächster Zukunft noch zu erwarten (108).

Das älteste Mitglied dieser Transportergruppe ist SGLT1 (SLC5A1). Er ist ein hochaffiner Glukosetransporter mit relativ niedriger Transportkapazität und wurde im Jahr 1987 erstmals aus dem Dünndarm des Kaninchens kloniert(33). Schon bald darauf konnte sein humaner Verwandter hSGLT1 (102) sowie die entsprechende Isoform in der Ratte (59) beschrieben werden. Die am besten charakterisierte Lokalisation des SGLT1 ist sicherlich die Verteilung in den Bürstensaummembranen der Dünndarmmukosa; dort ist er für die Resorption von Glukose und Galaktose zusammen mit einer nicht unbeträchtlichen Menge an Wasser (62) verantwortlich. Im klinischen Alltag wird diese Funktion zum Beispiel bei der von der Weltgesundheitsorganisation empfohlenen Rezeptur für die orale Rehydrierung schwer exsikkierter Patienten ausgenutzt (102). Durch das Angebot von Glukose und Elektrolyten in der Rehydratationsflüssigkeit wird die intestinale Aufnahme von Flüssigkeit durch die von SGLT1 zusätzlich geschaffene Wasseraufnahme optimiert. Eine weitere wichtige Lokalisation ist die im S3-Segment des proximalen Tubulus der Niere. Dort resorbiert der hochaffine Transporter die restlichen Glukosemoleküle, welche trotz massiven Angebots an Glukosetransportern in den weiter proximal gelegenen S1 und S2- Segmenten diese passiert haben (110). Dieses System ist jedoch von limitierter Kapazität. Das zeigt sich beispielsweise beim Diabetes mellitus, hier wird ab einem Plasmaglukosespiegel von 10 mmol/l (36) die Resorptionskapazität der Niere für filtrierte Glukose überschritten und es kommt zu einer relevanten Glukosurie. Viele andere Lokalisationen sind für diesen Transporter in Folgearbeiten beschrieben worden, jedoch ist die physiologische und klinische Relevanz in den meisten

Fällen noch nicht eindeutig geklärt. In der Glandula parotis des Schafs beispielsweise konnte dieses Protein 1994 (95,96) in großer Menge an der basolateralen Membran von Azinuszellen festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung für diese Lokalisation ist die Notwendigkeit der Verfügbarkeit von großen Mengen von Glukose als Rohstoff für die Synthese von Sialoproteinen. Auch in der laktierenden Mamma konnte SGLT1 (86) nachgewiesen werden. Hier ist eine physiologische Funktion zur Aufnahme von Nährstoffen, welche in die Milch ausgeschieden werden, durchaus plausibel. Sehr interessant ist die von Herrn Dr. R. Poppe aus unserer Arbeitsgruppe beschriebene Lokalisation in den Neuronen des Schweinegehirns (81). Funktionelle Daten (Autoradiographie) legten unter anderem nahe, dass dieser Transporter, und nicht oben beschriebene aus der GLUT-Familie für metabolische Änderungen in pathologischen Zuständen wie z.B. iktal oder postiktal verantwortlich ist (81). Bereits in dieser Arbeit zeigten sich erste Hinweise (positive RT-PCR) auf eine Expression von SGLT1 in der Blut-Hirnschranke. Andere Forschungsgruppen beschrieben SGLT1 in arteriellen Endothelzellen des Gehirns (72), in Cholangiozyten (58), Mundschleimhautzellen (76) oder im Lungengewebe (42). Die funktionelle Bedeutung dieser Expressionen ist bis heute nicht vollständig geklärt. Hier ist SGLT1 vielleicht ein ergänzendes Transportsystem für Glukose, welches bei Bedarf den GLUT-Systemen zugeschaltet wird.

Vor allem im Gastrointestinaltrakt scheint SGLT1 eine lebensnotwendige Funktion zu erfüllen und kaum durch andere Transporter ersetzbar zu sein. Ein Ausfall dieses Transporters durch Mutation führt bereits in frühester Kindheit zur potenziell lebensbedrohlichen Glukose-Galaktose-Malabsorption (109). Die jungen Patienten leiden unter stärksten wässrigen Diarrhöen und in manchen Fällen auch unter Glukosurie. Die einzige Therapie besteht in einer möglichst glukose- und galaktosefreien Diät und dem Ersatz dieser Zucker durch Fruktose.

SGLT2 (SLC5A2), ein dem SGLT1 verwandter Transporter, ist für die Rückresorption des Großteils der Glucose aus den proximalen Segmenten S1 und S2 der Nierentubuli verantwortlich. 1994 wurde der humane Subtyp erstmalig beschrieben (48). Im Gegensatz zu SGLT1 ist dieser Transporter niedrig affin, besitzt eine hohe Transportkapazität und kann Galaktose nicht transportieren (109). Ein Ausfall dieses Transporters führt zur renalen Glukosurie, einer relativ benignen Erkrankung mit Glukosurie ohne Hyperglykämie (5).

Ein weiterer Transporter dieser Familie, SGLT3 (SLC5A4) vom Schwein, wurde zunächst als Natrium-Aminosäuretransporter SAAT1 (55) beschrieben. Im Jahr 1994 wurde er als Glukosetransporter reklassifiziert (64) und umbenannt. Während die schon seit längerem bekannte Schweineisoform dieses Transporters wohl am

Glukosetransport aus dem Dünndarm beteiligt ist, findet sich die humane Isoform vor allem in Nervenzellen des Plexus myentericus im Dünndarms, sowie in den cholinergen neuromuskulären Endplatten der quergestreiften Skelettmuskulatur. Funktionelle Daten legen nahe, dass SGLT3 vom Menschen kein Glukosetransporter, sondern eher eine Art Glukosesensor ist. Glukose konnte experimentell in hSGLT3 exprimierenden Oozyten eine Zelldepolarisation hervorrufen, die durch den für SGLT spezifischen Hemmstoff Phlorizin geblockt wurde. So könnte beispielsweise über eine erhöhte Glukosekonzentration im Plexus myentericus die glatte Darmmuskulatur zur Kontraktion angeregt werden (18).

An weiteren Exemplaren aus dieser Familie (SGLT4-6) wird derzeit intensiv geforscht (108). Es ist hier wie bei der GLUT-Familie zu erwarten, dass die Funktion weiterer Mitglieder in den nächsten Jahren entdeckt werden.

2. Ziel dieser Arbeit

Wie oben dargestellt, wird der Glukosetransport im Säugetierkörper durch ein komplexes System von Transportproteinen geregelt. In der Forschungsgruppe um Herrn Professor Dr. H. Koepsell wird seit Jahren im Rahmen des Sonderforschungsbereich 487/ C1 die Funktion und Regulation des Natrium abhängigen Glukose/Galaktosetransporters SGLT1 erforscht. Vorversuche von Herrn Dr. R. Poppe und Herrn A. Köhler, der zwei Jahre lang in unserer Arbeitsgruppe mitgearbeitet hat, legten auf m-RNA-Ebene das Vorhandensein dieses Transporters in der Bluthirnschranke nahe. Ziel meiner Arbeit war, nach Herstellung eines möglichst spezifischen polyklonalen Antikörpers gegen rSGLT1 die Lokalisation von SGLT1 im Gehirn der Ratte und in Geweben mit hohem Glukosestoffwechsel auf Proteinebene zu untersuchen

Material und Methoden

1. Allgemeine Methoden

1. 1. Allgemeine Hinweise

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Versuche bei Raumtemperatur durchgeführt. Auch die Lagerung der Chemikalien fand in der Regel bei Raumtemperatur statt. Allgemeine Chemikalien, auf deren Herkunft im Folgenden nicht näher eingegangen wird, wurden in pro analysi Qualität von den Firmen Fluka (Buchs, Schweiz), Sigma (Seelze) und ICN (Eschwege) bezogen. Als Lösungsmittel diente, sofern nicht anders angegeben, doppelt destilliertes Wasser.

1.2. Allgemeine Lösungen

PBS (phosphate buffered saline):

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄; 1,4 mM KH₂PO₄, pH 7,4

PBST (phosphate buffered saline /tween):

PBS; 0,05% Tween 20 (Sigma Nr. P 1379)

TBS (tris buffered saline):

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 50 mM TrisHCl; pH 8,0

TBST (tris buffered saline/tween):

TBS; 0,05% Tween 20

1. 3. Sterilisation und Desinfektion

Plastikeinwegsreaktionsgefäße, Pipettenspitzen und Lösungen wurden im Autoklaven (Varikoklav H+P Labortechnik, Oberschleißheim) für 20 Minuten bei 3 bar und 121 °C sterilisiert. Glasware wurde, soweit nötig, bei 200 °C für zwei Stunden gebacken. Der Kryostat (CM 3000, Jung, Nussloch) wurde nach jedem Gebrauch mit 70% Ethanol ausgewischt oder mit Cryofect (Leica, Bensheim) desinfiziert.

1. 4. Beschichtung von Objektträgern

Für die Standardhistologie wurden silanisierte Objektträger verwendet, als schneller Ersatz wurde auch des Öfteren auf fertig beschichtete SuperfrostPlus (Menzel Gläser, Braunschweig) Objektträger zurückgegriffen. Im Labor von Frau Prof. B. Kaissling

arbeitete ich mit Chromalaungelatine beschichteten Objektträgern, welche bei bereits perfusionsfixiertem Gewebe für eine bessere Haftung der Schnitte sorgten.

1. 4. 1. Silanisierung

Zur Silanbeschichtung wurden die gereinigten Objektträger für 20 Sekunden in 2% (v/v) Aminopropyltrioxysilan (Sigma Nr. A 3648) in Azeton getaucht. Anschließend wurden sie noch zwei Mal kurz in Azeton gewaschen und in einer staubfreien Atmosphäre getrocknet. Sie konnten sodann für die Histologie eingesetzt werden.

1. 4. 2. Beschichtung mit Chromalaungelatine

Die einzelnen Objektträger wurden für 10 Minuten in absolutem Alkohol entfettet und danach im Wärmeschrank bei circa 60°C getrocknet. Währenddessen erhitze ich 1,5 Gramm Gelatine (Fluka Nr. 48723), welche in 300 ml doppelt destilliertem Wasser gelöst wurde, auf etwa 60°C und fügte sodann 0,3 Gramm Chromalaun (Chrom-II-Kaliumsulfat, Sigma Nr. C 5926) hinzu. Die fertige Lösung filtrierte ich in eine vorgewärmte Küvette und tauchte die warmen Objektträger für 10 Sekunden hinein. Dabei war darauf zu achten, dass die Temperatur der Lösung wenigstens 50° C betrug. Die fertigen Objektträger wurden bei 40°C für mindestens eine Stunde getrocknet und konnten sogleich für die Histologie verwendet werden.

2. Erzeugung polyklonaler Antikörper

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurde zunächst ein polyklonaler Antikörper gegen ein für rSGLT1 spezifisches Peptid durch die Immunisierung von Kaninchen hergestellt (23).

2. 1. Herstellung des antigenen Peptids

Die Synthese des antigenen Peptides, welches die Aminosäuresequenz 580 bis 600 (104) des SGLT1 - Proteins der Ratte repräsentiert, sowie zusätzlich ein terminales Cystein erhielt, wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Herrn Professor Dieter Palm, Theo-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Am Hubland, Würzburg durchgeführt.

2. 2. Kopplung des Peptids an Ovalbumin

Um die Antigenität des Peptides zu verbessern, wurde es über eine MBS- (m-Maleimidobenzoyl-N-Hydroxysuccinimidester, Sigma Nr. M 2786) Brücke an Ovalbumin gekoppelt. Dafür wurden 9 mg Ovalbumin (Sigma Nr. A 5378) in 9 ml Phosphatpuffer 1 aufgelöst. Dazu pipettierte ich langsam (über 30 min) und unter ständigem Rühren 10 mg MBS, welches ich vorher in 1 ml Dimethylformamid (Sigma Nr. D 158550) aufgenommen hatte. Um das ungekoppelte MBS zu entfernen, wurde eine Auftrennung mittels einer vorgefertigten Sepharosesäule (BioRad München 732-2010) vorgenommen. Die Säule wurde zunächst mit 9 ml des Phosphatpuffers 1 äquilibriert, daraufhin trug ich 3,3 ml des Proteingemisches auf, eluierte dieses mit 6 ml des Phosphatpuffers 2 und fing es in Fraktionen von je einem Milliliter auf. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, bis das MBS-Albumingemisch vollständig aufgetrennt war. Anschließend entnahm ich jeder Fraktion 10 µl, um daran eine Proteinbestimmung nach Bradford (siehe unten) vorzunehmen. Die proteinreichsten Fraktionen wurden zusammengeführt und die Gesamtproteinmenge berechnet. Das synthetisierte SGLT1-Peptid wurde in einem Mengenverhältnis von 1:1 hinzugefügt. Nachdem diese Lösung über drei Stunden im Schüttler gemischt worden war, konnte ich von einer Kopplungseffizienz von circa 50 Prozent ausgehen. Das antigene Protein wurde aliquotiert und bei -70°C gelagert (23).

Phosphatpuffer 1:

46,4 mM Na_2HPO_4 ; 3,4 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0

Phosphatpuffer 2:

6,0 mM Na_2HPO_4 ; 44,0 mM NaH_2PO_4 , pH 6,0

2. 3. Immunisierung und Blutentnahme

Zur Immunisierung wurden zwei Kaninchen ausgewählt. Nach Abnahme der Nullseren an noch nicht mit dem Antigen in Berührung gekommenen Tieren wurde die Grundimmunisierung wie folgt durchgeführt: Zu dem in PBS gelösten, gekoppelten Peptid wurde im Verhältnis 4:1 PAO (Polyalphaolefine)- Adjuvans hinzugegeben. Hierauf emulgierte ich dieses Gemisch durch mehrmaliges Durchziehen der Flüssigkeiten durch eine feine Kanüle ($27^{3/4}$ G). Diese Emulsion wurde dem Kaninchen langsam subskapulär injiziert. Die erste Injektion erfolgte mit 500 µg antigenen Protein in PAO-Adjuvans, welchem zur Verbesserung der Immunogenität 100 µg Muramyl-dipeptid (Sigma Nr. A 9519) beigemischt worden war. Die nächsten drei

Immunisierungen erfolgten im Abstand von je drei Wochen subskapulär mit je 250 µg Protein in PAO-Adjuvans, jedoch ohne den Zusatz von Muramyldipeptid. Um den Immunisierungserfolg zu kontrollieren, wurde dem Kaninchen zehn Tage nach der letzten Injektion Blut aus der Ohrarterie entnommen. Dafür musste das Ohr des Tieres vorübergehend hyperämisiert werden. Von der Methode, dies durch Aufbringen von Xylol zu erreichen, wurde Abstand genommen, da sich gängige hyperämisierende Salben wie z.B. Finalgon-Salbe (Thomae, Boehringer Ingelheim) als ausreichend effektiv erwiesen. Der Immunisierungserfolg wurde mittels ELISA überprüft. Stellte sich so bei einem Tier ein sehr hoher Antikörpertiter heraus, wurde auf eine weitere intravenöse Immunisierung verzichtet. Stattdessen wurden zur Aufrechterhaltung der Antikörperkonzentration die subskapulären Injektionen im Monatsabstand wiederholt und jeweils etwa zehn Tage später Antikörper durch Blutentnahme gewonnen. Bei geringem Antikörpertiter wurde ein i.v.-Immunisierungszyklus mit der insgesamt dreimaligen Injektion von je 100 µg antigenem Protein in PBS in die Ohrvene im Abstand von 2-3 Tagen durchgeführt.

PAO-Adjuvans:

77% (v/v) Polyalphaolefine (JET), 17% (v/v) Tween 81 (Sigma Nr. P 2815), 6% Tween 80 (Sigma Nr. P 1754)

2.4. Serumaufbereitung und Lagerung

Das gewonnene Blut wurde in 50 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen. Das Blut wurde für eine Stunde bei 4°C inkubiert, bis es vollständig geronnen war. Anschließend wurde der Blutkuchen bei einer Temperatur von 4°C bei 7000 g (RC 2-B, Rotor HS4, Sorvall, Bad Homburg) für 20 Minuten abzentrifugiert. Das Serum wurde abgenommen und eventuell, falls noch feste Bestandteile zu erkennen waren, einem kurzen zweiten Zentrifugationsschritt unterzogen. Nun konnte es in Portionen zu 500 µl oder 1 ml aliquotiert, bei -70°C gelagert und jederzeit für die Affinitätsreinigung verwendet werden.

2.5 . Affinitätsreinigung der polyklonalen Antikörper

Für die Affinitätsreinigung der Antikörper verwendete ich das Sulffolinksystem von Pierce (Rockford ,USA, Nr. 44895). Nach einmaliger Koppelung des antigenen Peptides an eine Jodacetylagarosesäule kann diese bei hygienischen Arbeitsbedingungen über mehrere Monate gelagert und immer wieder reaktiviert werden.

Die Affinitätsreinigungen konnten so unter gleichen Bedingungen mit reproduzierbar ähnlich hoher Effizienz wiederholt werden.

2.5.1. Kopplung des Peptides an die Säule

Zunächst musste das Peptid in eine reaktionsfähige Zustandsform gebracht werden. Um auszuschließen, dass viele SH-Gruppen bereits oxidiert waren, musste das Peptid, das terminal mit einem Cysteinrest versehen war, zunächst reduziert werden. Dazu wurde zuerst 10 mg Reduktacryl (Dithiotreitol, Calbiochem, Bad Soden, Nr. 233157) in 500 µl doppelt destilliertem Wasser gelöst und 20 µl einer 10% (w/v) NaBH₄-Lösung hinzugegeben. Nach Ablauf der Reaktion über 15 Minuten wurde, um das NaBH₄ zu entfernen, 100 µl 1 M Essigsäure hineinpipettiert. Daraufhin wurde das Reduktacryl kurz abzentrifugiert, den Überstand verwarf man und spülte den am Reaktionsgefäß adhärenen Rest kurz mit doppelt destilliertem Wasser, um letzte Überreste aus dem Reductacryl zu entfernen. Hierauf wurden das Reduktacryl und 5 mg des zu reduzierenden Peptides in 1 ml Aqua bidest gelöst, der pH-Wert dieser Lösung überprüft und, wenn nötig, auf pH 7,5 titriert. Nach einer Wartezeit von 15 Minuten konnte das Reduktacryl wieder abzentrifugiert werden. Im Überstand befand sich dann das reduzierte Peptid.

Währenddessen wurde die in dem Sulfolinkkit vorhandene Säule für die Kopplung vorbereitet. Bei der zuvor in Raumtemperatur verbrachten Säule ließ man zunächst die Lagerungsflüssigkeit ab und spülte sie mit 12 ml des Kopplungspuffers. Daraufhin wurde die Säule unten verschlossen und das reduzierte Peptid sowie 2 ml des Kopplungspuffers hinzugegeben. Nachdem alles dicht verschlossen wurde, schüttelte man die Säule bei Raumtemperatur über 15 Minuten intensiv, danach wurde sie für weitere 30 Minuten ruhen gelassen. Anschließend ließ ich die Säule wieder leer laufen, spülte sie mit 6 ml Kopplungspuffer, verschloss sie von unten und gab, um ungebundene Bindungsstellen auf dem Gel zu blockieren, 15,8 mg L-Cystein gelöst in 2 ml Kopplungspuffer hinein. Es wurde wieder für 15 Minuten gemischt und für 30 Minuten inkubiert, die Säule wieder geleert und nun mit 16 ml 1 M NaCl gespült. Um eine bakterielle Kontamination möglichst gering zu halten, wurde daraufhin die Säule mit 12 ml 0,05% Natriumazid gespült. Die dem Kitt zugefügte Scheibe gab man nun von oben auf das Gel, um es formstabil zu halten. Es folgte eine erneute Spülung mit 4 ml der Azidlösung. Die Säule wurde daraufhin wieder von unten verschlossen und schließlich 2 ml der Azidlösung als Aufbewahrungslösung auf das Gel gegeben. Die Säule konnte nun vollständig verschlossen mit Parafilm (Serva, Heidelberg) abgedichtet, und bei 4°C aufrecht über mehrere Wochen gelagert wer-

den.

Kopplungspuffer:

50 mM Tris-HCl, 5 mM Na-EDTA, pH 8,5.

2.5. 2. Aufreinigung über die Sulfolinksäule

Für die Aufreinigung wurden Säule und Serumprobe in Raumtemperatur gebracht. Ich öffnete die Säule, ließ sie leer laufen, und spülte sie mit 16 ml PBS. Sodann konnte 1 ml der Serumprobe aufgetragen werden. Ich ließ diese in das Gelbett diffundieren, gab 200 µl PBS darauf und verschloss das untere Ende. 1 ml PBS wurde weiter hinzugegeben und die Säule darauf komplett verschlossen. Nach einer Stunde öffnete ich die Säule wieder und wusch nicht gebundene Serumproteine mit 16 ml PBS aus. Die Antikörper wurden durch 8 ml eines 100 mM Glycinpuffers, pH 2,5 ausgewaschen und in 16 500 µl Einheiten in Reaktionsgefäßen, in welche schon zuvor 25 µl 1M Tris-HCl, pH 9,5 zur Neutralisation gegeben wurden, aufgefangen. Die Fraktion mit dem höchsten Antikörperanteil wurde sodann mittels ELISA bestimmt.

Die Säule wurde mit 16 ml PBS regeneriert, mit 6 ml 0.05% NaN₃ gespült und, wie oben beschrieben, gelagert. Anschließend konnte die Säule über mehrere Monate immer wieder zur Affinitätsreinigung verwandt und regeneriert werden.

2.6. Lagerung der affinitätsgereinigten Antikörper

Die so aufgereinigten Antikörper konnten nach Zugabe von Natriumazid in einer Endkonzentration von 0.01% mehrere Wochen bei 4°C, oder, 1:2 mit Glycerol (Fluka Nr. 49780) gemischt, bei -20°C über mehrere Monate gelagert werden.

4. Enzyme linked immunoassay (ELISA)

Um die Höhe des Antikörpertiters der gewonnenen Seren zu bestimmen, wurde ein für das antigene Peptid spezifischer ELISA (9) durchgeführt. Dafür wurde das gereinigte, ungekoppelte Peptid in einer Konzentration von 10 µg/ml in Kopplungspuffer gelöst. Diese Beschichtungslösung gab ich zu je 100 µl je Vertiefung auf eine Polystyrenmicrotiterplatte (MaxiSorb, Nunc, Roskilde, Dänemark). Die Platte wurde sodann mit selbstklebender Abdeckfolie sorgfältig verschlossen und über Nacht (circa 16 Stunden) bei 4°C aufbewahrt. Am nächsten Tag brachte man die Platte wieder in

Raumtemperatur und leerte sie aus. Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, wurden 200 µl Blockierungslösung auf jede Vertiefung gebracht. Die Platte wurde daraufhin für zwei Stunden bei Raumtemperatur belassen, sodann ausgeleert und für 3 mal 5 Minuten in einer größeren Plastikschaale mit reichlich Waschpuffer ausgewaschen. Währenddessen wurden das zu bestimmende Serum bzw. die einzelnen Fraktionen des zu bestimmenden affinitätsgereinigten Antikörpers in einer Verdünnung von 1:400 (bei erwartetem hohem Titer auch höher) in Blockpuffer gegeben. Nach den Waschschriften pipettierte ich je 100 µl des Blockpuffers in jede Vertiefung der Reihe 2 bis 12, in Reihe 1 füllte ich je 200 µl der zu untersuchenden Antikörperverdünnung. Indem ich von Reihe eins ausgehend in jeder Zeile 100 µl in die nächste Reihe pipettierte, kurz durchmischte und wieder 100 µl in die nächste Reihe brachte, stellte ich eine Reihenverdünnung her. Unter Aussparung der Reihe 12 wurde die letzte Fraktion verworfen. Mit Klarsichtfolie als Verschmutzungs- und Austrocknungsschutz bedeckt, wurde die Platte bei 4°C über Nacht aufbewahrt. Nach dieser Zeit wurden die Platte ausgeleert und die Waschvorgänge wie oben beschrieben ausgeführt. Danach wurde in jede Vertiefung 100 µl 1:250 in Blockpuffer verdünnten Sekundärantikörpers (anti-Kaninchen IgG F(ab)₂-Fragmente der Ziege, mit alkalische Phosphatase konjugiert, Sigma Nr. A 3937) gegeben. Die Inkubationszeit betrug 4 Stunden bei Raumtemperatur. Danach wurde die Platte wieder entleert und 3 mal 5 Minuten mit Waschpuffer ausgewaschen. Um die Platte auf den für die Substratlösung passenden pH einzustellen, wurden je 100 µl Äquilibriumspuffer für 5 Minuten auf die Vertiefung gegeben. Nach Entleerung der Platte gab man je 100 µl Substratlösung in jede Vertiefung und beendete die Farbreaktion nach einer Stunde durch Zugabe von je 100 µl 100 mM EDTA pH 8,0. Nun konnte die optische Dichte im ELISA Lesegerät (Titertek multiscan plus, Flow, Irvine, UK) bei 405/450 nm Wellenlänge gemessen werden. Als Referenztiter wurde diejenige Verdünnungsstufe extrapoliert, bei der der Quotient der optischen Dichte bei 405/450 nm genau 1,0 betrug.

Kopplungspuffer:

0.1 M Na₂CO₃/ NaHCO₃, pH 9,6

Blockierungslösung:

PBS, 0,2M NaCl, 0,5% (w/v) BSA, 0,1 % NaN₃

Waschpuffer:

PBS, 0,2 M NaCl, 0,05% (w/v) Tween 20

Äquilibriumspuffer:

100 µl 150 mMol NaCl, 100 mMol Tris-HCl pH 9,8

Substratlösung:

150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl pH 9,8, 1 mg/ml Sigma Nr. 104
Substratlösung für alkalische Phosphatase

5. Fraktionierung von kultivierten Rattenendothelzellen

Aus Rattenherz isolierte Endothelzellkulturen wurden mir von Frau Dr. Sabine Mattig aus dem Physiologischen Institut der Technischen Universität Dresden zur Verfügung gestellt. Sie wurden in einer Dimethylsulfoxidlösung gefroren geliefert. Nach dem Auftauen im Wasserbad bei 37°C wurden sie in eiskaltem PBS, welchem Proteinaseinhibitoren hinzugefügt worden waren, aufgenommen und bei 600 g (Sorvall RC 2-B, Rotor HS4) für 5 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde zweimal wiederholt, wobei der Überstand jeweils einer weiteren Zentrifugation unterzogen wurde, um so wenig Zellen wie möglich zu verlieren. Abschließend wurde das Pellet in möglichst wenig Proteaseinhibitorlösung mit 1% SDS (Sodiumdodecylsulfat ICN Nr. 811030) gelöst und für 30 Minuten bei 37°C denaturiert.

100x Proteinaseinhibitor:

5 µg/µl Aprotinin (Fluka Nr. 10820), 5 µg/ml Leupeptin (Fluka Nr. 62070), 1 mM Benzamidin (Sigma Nr. B 6506)

Proteinaseinhibitorlösung:

1% v/v 100x Proteinaseinhibitor in PBS

6. Präparation von Darmgesamtmukosa

Zur Herstellung eines Gesamtmukosapräparates aus Rattendünndarm wurde der zuvor gespülte und in Isopentan in flüssigem Stickstoff schockgefrorene Darm in Proteinaseinhibitorlösung rasch aufgetaut. Er wurde daraufhin über einem Glasstab gewendet, so dass die Mukosa nun leicht abzustreifen war. Diese gab man nun in eiskalte Proteinaseinhibitorlösung und zentrifugierte sie anschließend wieder ab. Das Pellet wurde nun in einer möglichst geringen Menge des Puffers A gelöst. Hierauf wurde SDS zu einer Endkonzentration von einem Prozent gegeben und all dies, um eine möglichst vollständige Lyse der Zellmembranen zu erreichen, bei 37°C für 30 Minuten denaturiert. Anschließend wurde der Proteingehalt mittels modifizierter Methode nach Lowry (genaue Beschreibung siehe unten) abgeschätzt und das Gemisch aus Mukosaproteinen aliquotiert bei -70°C gelagert.

Puffer A:

10 mM Kaliumazetat, 15 mM Magnesiumazetat, 1 mM DTT, 20 mM HEPES (4-(2-Hydroxyethyl) Piperazin-1-Ethansulfonsäure, Fluka Nr. 54461) pH 7,5
vor Präparationsbeginn zugesetzt: 100xProteinaseinhibitor zu 1% v/v, 1mM AEBSF (4-(2-Aminoethylbenzensulfonylfluoridhydrochlorid, Sigma Nr. A 8456)

7. Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehalts der Immunisierungslösung wurde die Methode nach Bradford (4) für die Bestimmung bei den isolierten Membranvesikel und den lysierten Endothelzellen eine modifizierte Methode nach Lowry (60, 78, 83) verwendet.

7.1. Methode nach Bradford

Diese Proteinbestimmung wurde wegen seiner relativ großen Ungenauigkeiten nur selten verwendet. Je 900 µl des 1:5 verdünnten Farbstoffreagenz-Konzentrats (BioRad, München, Nr. 500-0006) wurden zu je 100 µl der Proben und einer BSA- (bovines Serumalbumin) Verdünnungsreihe gegeben. Nach frühestens 5 Minuten konnte man die Extinktion bei 595 nm bestimmen und die Konzentration mittels einer Eichkurve, welche durch Messungen verschiedener festgelegter Mengen BSA erstellt wurde, extrapolieren

7.2. DC- Proteinassay, eine Methode modifiziert nach Lowry

Neben den Chemikalien zur Proteinbestimmung nach Bradford bietet die Firma BioRad auch einen der Methode nach Lowry angelehnten modifizierten Proteinassay (Katalog Nr. 500-116) an, der den Vorteil hat, durch Detergentien nicht so sehr beeinflussbar zu sein wie das Originalprotokoll. Ein weiterer Vorteil ist die relativ hohe Stabilität des Farbendproduktes sowie die leichte Handhabung. Das Vorgehen entsprach der von der Firma herausgegebenen Bedienungsanleitung. Dazu wurde zu jeder Analyse ein Standard aus bovinen Serumalbumin in verschiedener, genau abgewogener Menge in denselben Medien gelöst, in welchen sich auch die zu analysierenden Proben befanden. Die Proben wurden auf ein Volumen von 100 µl gebracht. Dann wurde, falls die Probe ein Detergenz enthielt, auf jeden benötigten Milliliter der Lösung A (eine alkalische Kupferartratlösung) 20 µl der Lösung S hinzupipettiert. 100 µl dieser neuen Lösung gab man nun in jedes Reaktionsgefäß.

Wenn kein Detergenz verwendet wurde, konnte man auch nur die Lösung A alleinig benutzen. Sodann gab man 800 µl der Lösung B, einer verdünnten Folins Reagenzlösung hinzu, mischte gründlich und maß die Absorption bei 750 nm im Vergleich zu einem Nullwert. Parallel erstellte man eine Eichkurve mit Lösungen mit festgelegten Konzentrationen an bovinem Serumalbumin, welches in dasselbe Medium aufgenommen wurde wie die zu untersuchende Probe. Anhand dieser Werte bestimmte man die Proteinkonzentration in den Proben.

8. Deglykosilierung von Membranproteinen

Um das Laufverhalten von Proteinen aus verschiedenen Organen im Western blot besser vergleichen zu können, wurden einige der Proben zuvor deglykosiliert (60, 75, 94) zuzuführen. Dazu wurde die zu analysierende Probe in einen geeigneten Deglykosilierungspuffer gebracht und bei einer Probengröße von insgesamt 15 µl 4 I.E. N-Glykosidase F (Roche, Mannheim, Nr. 1365169) hinzupipettiert. Um einen Verdunstungsschutz zu bieten, überschichtete ich alles mit 20 µl Öl für PCR (Polymerase chain reaction), bevor ich den Glykosilierungsprozess für 18 Stunden bei 37°C ablaufen ließ. Nach der Zeit konnte ich die wässrige Phase mit einer feinen Spritze aufsaugen und dann weiterbearbeiten.

9. Proteinnachweis durch SDS-PAGE/ Western blot

9. 1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für den Nachweis von Membranproteinen aus isolierten Membranen des Rattenherzens wurden diese durch eine Gelelektrophorese (10) nach Molekulargewicht aufgetrennt. Dafür wurde eine Kombination aus Sammel- und Trenngelen benutzt. Diese Minigele wurden in einem Formsystem, bestehend aus zwei speziell hierfür gefertigten Glasplatten, hergestellt. Sie hatten eine Dicke von 1 mm. Zunächst gab ich 5 ml des Trenngels in die Gelkammer und ließ es für etwa 45 Minuten auspolymerisieren. Um einen homogenen Übergang zwischen Sammel- und Trenngel zu erreichen, überschichtete ich die Grenzfläche des Trenngels sofort nach dem Gießen mit 1 ml Isopropanol. Dieses wurde nach Auspolymerisation des Geles abgegossen. Sodann konnte das Sammelgel auf das Trenngel gegossen werden. Unverzüglich wurde ein Taschenkamm mit 10 präformierten Taschen in das Sammelgel gedrückt, das Gel konnte circa eine Stunde bei Raumluft auspolymerisieren. Alternativ konnte dies auch über Nacht bei 4°C geschehen. Nach dieser Zeit wurde den

Taschenkamm entfernt, das Gel kurz mit Elektrophoresepuffer gespült und in die bereits mit diesem Puffer gefüllte Laufkammer gestellt. Das Gel konnte ich nun mit den zu analysierenden Proteinproben, die im Verhältnis 1:2 mit 2x modifiziertem Laemmlipuffer (109) verdünnt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert wurden, beladen. Zur Orientierung wurden in eine Tasche 5 ml eines käuflich erworbenen Markerprotein-gemisches (Bench Mark, Gibco, Eggenstein, Nr. 10748 – 010) mit definierten Molekulargewichten gegeben. Hierauf konnte ich die Elektrophorese bei zunächst 80 V starten. Sobald die Proteine durch das Sammelgel aufkonzentriert wurden und die Lauffront sich am unteren Rand desselben befand, wurde mit der Auftrennung bei nunmehr 120 V fortgefahren. Nach etwa 2 Stunden war die Lauffront am unteren Ende des Trenngels angekommen, die Elektrophorese konnte beendet und das Gel für den Western blot weiterverwendet werden.

Trenngel:

10% (v/v) Polyacrylamid (verdünnt aus dem 30 % Rotiphorese Gel 30, Roth, Karlsruhe Nr. 3029), 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1% (v/v) TEMED (N',N',N',N'- Tetramethylethylendiamin, BioRad Nr. 161-0800), 0,1% (w/v) APS (Ammoniumpersulfat; Sigma Nr. A 7460) ;

Sammelgel:

5% (v/v) Polyacrylamid, 125 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,2% (v/v) TEMED, 0,2% (w/v) APS;

Elektrophoresepuffer 10x:

250 mM Tris-HCl, 1,92 mM Glycin, 1% (w/v) SDS

2x Probenpuffer modifiziert nach Laemmli:

8 M Harnstoff, 0,5 M 2- Mercaptoethanol, 200 mM Dithiotreitol (Sigma Nr. 9163), 120 mM Tris, 2% (w/v) SDS, 0,001% Bromphenolblau (Serva, Heidelberg, Nr. 15375), 46,3 mM Na₂HPO₄,

9. 2. Western blot

Der Western blot (100) diente zum spezifischen immunologischen Nachweis von zuvor im SDS- Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteinen. Dafür wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond ECL, Amersham) transferiert.

Auf eine später als Anode dienende Graphitplatte legte ich zunächst drei Lagen von in Blotpuffer getränktem Whatman-Filterpapier (Hartenstein, Würzburg), welches ich zuvor auf eine geeignete Größe zurechtgeschnitten hatte. Darauf gab man die Nitrozellulosemembran und das zu untersuchende Trenngel, das zuvor vom

Sammelgel getrennt wurde, so dass die Ränder des Filterpapiers die des Gels leicht überragten. Dieses wurde sodann mit weiteren 3 Lagen feuchtem Filterpapiers bedeckt, das System durch die zweite, als Kathode dienende Platte geschlossen und der Transfer bei $1,3 \text{ mA/cm}^2$ für 2 Stunden ausgeführt.

Nach Beendigung dieses Vorgangs wurde die Membran eine Stunde lang bei Raumtemperatur in Blockpuffer gelegt um sie mit Proteinen abzusättigen und so ein unspezifisches Binden des Primärantikörpers zu verhindern. Anschließend wurde sie mit 1:100 in Blockpuffer verdünntem Anti-rSGLT1 Antikörper für 16 Stunden bei 4°C inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde am nächsten Tag bei Raumtemperatur für 3 mal 15 Minuten mit Blockpuffer abgewaschen. Daraufhin wurde der Sekundärantikörper (Peroxidase gekoppelte anti-Kaninchen IgG aus der Ziege, Sigma Nr. H 4831) in einer Verdünnung von 1:5000 in Blockpuffer auf die Membran gegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 4°C wurde wieder 3 mal 15 Minuten lang bei Raumtemperatur gewaschen. Daraufhin nahm ich die Membran heraus, ließ sie kurz abtropfen und führte die Chemoluminiszenzreaktion aus. Hierfür gab ich die Reaktionslösung auf die Membran und ließ sie eine Minute in Klarsichtfolie (Saran-Folie, Carl Roth, Karlsruhe) eingewickelt reagieren. Schließlich wurde damit in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm (RX Nif, Fuji Photo, Düsseldorf) für 10 Minuten belichtet, dieser eine Minute in Entwicklerlösung (LX4, Kodak, Stuttgart) gegeben, eine Minute in Wasser gewaschen und für eine Minute fixiert. (Kodak AL24). Daraufhin wurde bevor ein letzter Waschschrift abgeschlossen und die Bilder konnten etrocknet werden. Je nach Ergebnis konnte auch ein zweiter Röntgenfilm für eine kürzere oder längere Periode aufgelegt werden.

Blotpuffer:

50 mM Tris, 192 mM Glycin, 10% v/v Methanol

Blockpuffer:

TBST; 2% (w/v) Magermilchpulver

10. Immunhistologie

10. 1. Immunfluoreszenz an primär unfixiertem Gewebe

10. 1. 1. Gewebegewinnung

Für die Immunfluoreszenz an primär unfixierten Gewebe wurden zuvor betäubten und durch Genickbruch getöteten männlichen Wistar-Ratten Gehirn, Herz, Skelett-

muskelgewebe aus der Adduktorengruppe sowie die Glandula submaxillaris zügig entnommen und sofort in eisgekühlte Ringerlösung gegeben. Das Gewebe wurde mit einer Rasierklinge zurechtgeschnitten und in Isopentan, das in flüssigem Stickstoff vorgekühlt wurde schockgefroren. Es konnte dann in 15 bzw. 50 ml Kunststoffreaktionsgefäßen bei -70°C fast unbegrenzt gelagert werden.

10. 1. 2. Einfachmarkierung mit anti rSGLT-1 Antikörper 76/I-V (49)

Die gefrorenen Gewebestückchen wurden mit TissueTek (Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande) aufgebockt und im Kryostat bei -20°C 4 bis 5 μm dick geschnitten. Die Schnitte nahm man mit mit Silan beschichteten oder käuflich erworbenen SuperfrostPlus Objektträgern auf. Das Gewebe wurde daraufhin in 4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS für 10 Minuten fixiert, alternativ konnte dafür auch eisgekühltes Azeton verwendet werden (Fixierung des Dünndarms). Überschüssiges Fixans wurde für 15 Minuten in der Waschlösung abgewaschen. Der Primärantikörper wurde 1:200 in Blockpuffer verdünnt und nun auf die in einer feuchten Kammer aufgereihten Objektträger gegeben. Die Inkubationszeit betrug ca. 16 Stunden (über Nacht) bei 4°C . Es schlossen sich 3 Waschschrte zu je fünf Minuten in Waschpuffer an. Der Sekundärantikörper, ein mit Indocarbocyanin (Cy3) konjugierter F(ab)₂-Antikörper aus der Ziege (Dianova, Hamburg, Nr. 111-116-003), wurde 1:2000 in Blockpuffer verdünnt auf die Objektträger gebracht. Ab diesem Zeitpunkt liefen alle Schritte im Dunkeln ab. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur schloss sich ein weiterer Waschschrte zu drei mal fünf Minuten an. Die Objekte konnten nun eingedeckt werden und im Fluoreszenzmikroskop begutachtet werden. Für eine längere Haltbarkeit wurden die Schnitte mit Nagellack versiegelt und bei 4°C aufbewahrt.

Um unspezifische Autofluoreszenz des Gewebes auszuschließen, wurden Parallelversuche, in denen der Primärantikörper zur Kontrolle weggelassen wurde, durchgeführt. Um die Spezifität des Antikörpers zu kontrollieren, wurde der Antikörper in der normalen Arbeitsendkonzentration mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ungekoppeltem Peptid für 32 Stunden bei 4°C präabsorbiert und parallel zu nicht präabsorbiertem Material verwendet. In Präparaten, welche später für die konfokale Laserscanmikroskopie verwendet wurden, färbte man die Kern-DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4,6 Diamidino-2-Phenylindol, Sigma Nr. D 9542), der Primärantikörperlösung in einer Konzentration von 500 ng/ml zugegeben.

Waschlösung:

PBST

Blocklösung:

PBS, 0,1% Triton X-100, 2% Magermilchpulver

10. 1. 3. Doppelmarkierung rSGLT1/vWF

Für eine genaue Einordnung des Signals im Hirngewebe war es notwendig, die Hirnkapillaren mit einem Kapillarmarker zu färben. Es wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das Faktor- VIII- assoziierte Antigen, dem von-Willebrandfaktor (Roche Nr.1284 924), verwandt. Die Arbeitskonzentration betrug 12,5 µg/ml. Der Antikörper wurde dem mit dem Primärantikörper gegen rSGLT-1 gemischt und auf das Gewebe aufgetragen. Als Sekundärantikörper dienten ein Carbocyanin (cy2) gekoppelter anti-Maus F(ab')₂ Antikörper aus der Ziege (Dianova Nr. 115-226-062) in einer Konzentration von 1:200 und der bereits beschriebene cy3- gekoppelte Antikörper im oben genannter Konzentration. Die Inkubationszeit der Sekundärantikörper verlängerte sich auf zwei Stunden. Alle anderen Schritte entsprechen den oben genannten (2,30).

10. 2. Immunfluoreszenz an perfusionsfixiertem Gewebe

10. 2. 1. Perfusion der Ratten

Die Perfusionsfixierung zweier weiblicher und dreier männlicher Wistar-Ratten erfolgte im Anatomischen Institut der Universität Zürich, durch Frau Prof. B. Kaissling und Frau Dr. H. Langer.

Die Ratten wurden durch die intraperitoneale Injektion von 5% Penthotal narkotisiert, sodann wurde der Bauchraum eröffnet und das Tier für 5 Minuten retrograd über einen in die Bauchorta gelegten Katheter perfundiert. Der Perfusionsdruck lag hierbei bei 0,4 bar. Daraufhin wurde das Fixans etwa 10 Minuten durch CaCO₃ Sucrosepuffer ausgespült.

10. 2. 2. Gewebeaufbereitung

Den so fixierten Ratten wurden Gehirn, Speicheldrüsen, M. masseter und Herz entnommen. Eine Gewebeprobe aus fixierter Niere wurde mir freundlicherweise von Frau Prof. B. Kaissling zur Verfügung gestellt. Das Gewebe wurde mit Rasierklingen in ca. 2 mm dünne Scheiben geschnitten, schließlich in in flüssigem Stickstoff gekühltem Propan schockgefroren und bei -70°C gelagert.

10. 2. 3. Immunfluoreszenz an perfundiertem Gewebe

Das Gewebe wurde wie oben beschrieben im Kryostaten geschnitten. Die Schnitte wurden anschließend in PBS gewässert. Die starke Fixation erforderte eine zehnminütige Vorbehandlung mit 0,25 M NaOH in Blockierungslösung (PBS, 2% (w/v) BSA, 0,02% NaN₃). Es wurde kurz mit PBS gespült, anschließend der 1:100 in Blockierungslösung verdünnte Primärantikörper auf den Schnitt gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht. Währenddessen wurde der Sekundärantikörper 1:2000 in Blockierungslösung mit 1% (v/v) Rattennormalserum verdünnt, zur Kern-Gegenfärbung 500 ng/ml DAPI hinzugegeben und bei Raumtemperatur gelagert. Am nächsten Tag wurde diese Lösung für 10 Minuten bei 1300 Umdrehungen pro Minute (Biofuge A, Haereus, Hanau) abzentrifugiert. So sollte sichergestellt werden, dass eventuell mit Rattenserum kreuzreagierende Antikörper sedimentiert und verworfen werden konnten. Währenddessen wurden die Schnitte gründlich mit PBS gespült, dann der Überstand auf die Objekte gegeben und für eine halbe Stunde inkubiert.

Es folgte ein weiterer gründlicher Waschschrift mit PBS, die Präparate konnten nun eingedeckt werden, wobei in diesem Institut mit 1,4 Diazabicyclo (2.2.2.)Octan (350 mg/15 ml; Sigma Nr. D 2522) als Ausbleichschutz versetztes Glycergel verwendet wurde.

11. Lichtmikroskopie und Photographie

Die Fluoreszenzmikroskopie der Präparate erfolgte über das Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss, Jena). Die Betrachtung der mit Cy3 gekoppelten Sekundärantikörper behandelten Präparate erfolgte unter Einsatz des Fluoreszenzfilters Nummer 15 (Zeiss) bei einem Exzitationsmaximum von 546 nm, bei mit Cy2 gekoppelten Antikörpern mittels des Filters Nummer 9 (Zeiss) bei einem Exzitationsspektrum von 250 bis 490 nm. Sollten mit DAPI gefärbte Präparate betrachtet werden, so geschah dies unter Verwendung des Dreifachfilters Nummer 25 von Zeiss, welcher Exzitationsmaxima von 400, 495 und 570 nm aufweist.

Photographiert wurde mit einer Axiophot 2 Kamera auf Kodak-T-max-400 Filmen. Alternativ wurden Farbphotographien auf Fujichrome-400-Filmen erstellt. Die Entwicklung der Schwarz-Weiß-Photographien erfolgte im Photolabor unseres Institu-

tes, die der Farbphotographien durch die Firma Foto Weber, Würzburg. Während meines Aufenthalts am Anatomischen Institut der Universität Zürich wurden digitale Photographien mittels einer Visicam-Kamera (Visitron, Puchheims) über das Mikroskop Polyvar2 (Leica, Bensheim) erstellt. Sämtliche Photographien wurden hier mit Hilfe des Programms Image Pro Plus 3.0.00.00 für Windows 95/NT (Media Cybernetics, Silver Spring, USA) weiterbearbeitet.

12. Konfokale Laserscanmikroskopie

Zur genaueren Bestimmung der Lokalisation des Fluoreszenzsignals wurden ausgewählte Präparate mit Hilfe des konfokalen Laserscanmikroskopes untersucht. Während meines Aufenthalts im Anatomischen Institut der Universität Zürich wurden Bilder unter Anleitung und Mithilfe von Herrn Dr. Urs Ziegler, einem Mitarbeiter dieses Hauses, angefertigt. Hier wurde das Laserscangerät TCS SP (Leica) mit an einem Leica DM IRB/E- Mikroskop verwendet. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte über Argon/Krypton-Laser mit einer Wellenlänge von 568 nm für die Anregung des Indocarbocyanins, über einen Argon-UV-Laser bei 362 nm für die DAPI-Kernfärbung. Spätere konfokale Mikroskopuntersuchungen wurden am Institut für molekulare Infektionsbiologie der Universität unter Mithilfe von Frau Hilde Merkert durchgeführt. Dort wurde mit einem Zeiss LSM 510 Laserscangerät an einem Zeiss Axiovert 100 gearbeitet. Die Anregung des DAPI- Farbstoffes bei 364 nm erfolgte mittels eines UV-Lasers, die Anregung der Indocarbocyaninfluoreszenz bei 543 nm mittels eines Helium-Neonlasers.

13. Weiterbearbeitung der Bilder

Entwickelte Bilder sowie Western blots wurden an einem Snapscan-Scanner mit Hilfe des Programms Scan-wise (Agfa, Köln) an einem Apple Imac Computer bei einer Auflösung von 300 dpi eingescannt. Deren weitere Bearbeitung, inklusive einer Farbgebung der Schwarz-Weiß-Photographien sowie der digitalen Photographien und der Bilder des Laserscanmikroskopes erfolgte an einem Packard Bell Pentium MMX 166 MHz Computer mittels des Programms Photoimpact 4.2 (Ulead Systems, Kaarst).

Ergebnisse

1. Erzeugung und Validierung eines anti- rSGLT1-Antikörpers

1.1. Immunisierung und Serumgewinnung

Um einen optimalen Immunisierungseffekt zu erzielen und einen möglichst für rSGLT1 spezifischen Antikörper zu gewinnen, musste eine Aminosäuresequenz ausgewählt werden, welche charakteristisch für den Natrium/Glukosetransporter SGLT1 der Ratte ist. Dessen letzte intrazelluläre Schleife (Abbildung 1) zeigt eine hohe Variabilität zwischen den einzelnen Spezies (60). Ebenfalls finden sich auf dieser in ihrer Primärstruktur so variablen Schleife kaum Homologien zu anderen Proteinen aus der SGLT- Familie (104). Die durchgeführte Internetrecherche in öffentlich zugänglichen Datenbasen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) zeigten zwar eine 75-prozentige Übereinstimmung mit der murinen Version des SGLT1-Proteins, signifikante Übereinstimmung der Sequenzen anderer bekannter Proteine insbesondere der Ratte konnte ich jedoch nicht feststellen. Ein Antikörper gegen ein Peptid aus dieser Stelle sollte somit hochspezifisch mit dem SGLT1-Protein der Ratte reagieren und auch keine Kreuzreaktionen zu verwandten Proteinen zeigen. Deswegen wurde aus diesem Bezirk die Aminosäuresequenz der Stellen 580 bis 600 ausgewählt. Dies versprach höchstmögliche Antigenität für das Immunsystem des zu immunisierenden Tieres und so optimale Erfolgsaussichten für die Antikörpergewinnung.

Da die Immunogenität eines Peptides dieser Größe sehr gering ist, musste es vor der Immunisierung an ein Makromolekül gekoppelt werden. Um eine solche Bindung an Ovalbumin über eine m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidesterbrücke zu ermöglichen, war es nötig, dieser Aminosäuresequenz bei der Synthese ein terminales Cystein hinzuzufügen. Dies ermöglichte später auch die Kopplung des Peptides an das Gel der Säule des Sulfolinkkits und somit eine hocheffektive Affinitätsreinigung nach Immunisierung.

Die Erzeugung des Peptides wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Professor D. Palm, Theodor Boveri Institut der Universität Würzburg, übernommen. Das Peptid wurde, wie oben beschrieben, an Ovalbumin gekoppelt, die Menge des gekoppelten Proteins mittels Bradfordverfahren bestimmt.



Abbildung 1: Darstellung der vermuteten Topologie des humanen SGLT1 in der Plasmamembran (103). Da SGLT1 der Ratte insgesamt eine hohe Homologie mit den humanen Transporter aufweist, kann dieses Modell auch auf rSGLT1 übertragen werden (39). Das antigene Peptid (der entsprechende Bereich des humanen SGLT ist grün unterlegt) befindet sich nach diesem Modell auf der letzten intrazellulären Schleife.

Zur Immunisierung wurden Kaninchen ausgewählt, deren Nullseren im ELISA keine Reaktion mit dem antigenen Peptid zeigten. Die Grundimmunisierung begann mit einer subskapulären Injektion einer öligen Emulsion, welche 500 µg gekoppeltes Peptid und 100 µg Muramyldipeptid als Adjuvans enthielt. Es folgten im Abstand von je drei Wochen drei weitere subskapuläre Injektionen von je 250 µg antigenem Peptid in Öl emulgiert, jedoch ohne den Zusatz von Muramyldipeptid. Eine Woche nach der letzten Injektion erfolgte die erste Blutentnahme sowie eine Titerkontrolle mittels ELISA. Im Abstand von zwei Wochen fanden zwei weitere Blutentnahmen statt, nach zwei weiteren Wochen wurden, wie oben beschrieben, die subskapulären Injektionen im vierzehntägigem Abstand fortgesetzt, um den Antikörpertiter konstant hoch zu halten. Je zwei Wochen nach der letzten Injektion erfolgte eine erneute Blutentnahme aus der Ohrvene. Bei einem der Tiere zeigte sich eine besonders gute Immunreaktion. Ich habe deshalb nur dieses Serum für meine weitere Arbeit verwendet. Die immunhistologischen Untersuchungen ergaben für die Blutungen 1 und 2 dieses Tieres bereits hervorragende Ergebnisse, so dass beide in größerem Maße affinitätsgereinigt und für meine Experimente verwendet wurden. Eine einmalige Auswertung der letzten Blutung Nummer 5 dieses Tieres an Großhirnschnitten zeigte dieselben Reaktionsmuster wie die ersten beiden Blutungen, so dass man wohl bei

allen Seren dieses Kaninchens davon ausgehen kann, dass diese für die Immunfluoreszenz geeignet sind.

1.2. Spezifitätstest

Um die Spezifität des Antikörpers zu bestimmen, wurde versucht, durch dessen Einsatz bereits beschriebene Lokalisationen im Western blot und in der Immunhistologie zu reproduzieren. Um festzustellen, ob dieses Ergebnis auch durch eine Reaktion des Antikörpers mit dem Zielpeptid zustande kam, wurde überprüft, ob die Reaktion durch Präabsorption des Antikörpers mit dem ungekoppelten antigenen Peptid verhindert werden konnte.

1.2.1. Western blot an Darmpräparationen

Um das Verhalten des Antikörpers im Western blot auszutesten, wurden zunächst Versuche an gereinigten Bürstensaummembranen aus dem Rattenjejunum (Gabe von Herrn Professor G. Kellett, Department of Biology, University of York, Großbritannien (53)), sowie an von mir hergestellten Darmmukosapräparation (siehe Methoden) vorgenommen. Dabei zeigte sich bei einer Antikörperverdünnung von 1:100 und einem Gesamtproteineinsatz von 500 ng pro Spur eine deutliche Bande bei einem Molekulargewicht von etwa 70 kD (Abbildung 2a). Dies entspricht auch in etwa dem Laufmuster, welches für den Ratten-SGLT 1 bekannt ist (32, 47, 112). Des Weiteren wurde oft eine Bande unterschiedlicher Stärke bei 40 kD gesehen. Diese entspricht meiner Meinung nach einem Abbauprodukt des SGLT1, da beschrieben wurde, dass ein derartiges Spaltprodukt durch Papainspaltung des SGLT1 vom Schwein erzeugt werden kann (29). Da dieses Spaltprodukt in verschiedenen Versuchen in unterschiedlicher Stärke auftrat, habe ich in Folgendem aus Gründen der Übersichtlichkeit auf eine Darstellung dieses niedrigmolekularen Abschnittes des Gels verzichtet. Bei höherem Proteineinsatz zeigte sich noch eine weitere Bande bei ca. 160 kD. Auch derartige hochmolekulare Banden wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen gesehen (27, 29, 61) und von diesen als Oligomere oder Heterodimere des SGLT1-Proteins gedeutet (Abbildung 2b).

Bei Betrachtung des Gesamtdarmlysats (hier war wegen des geringeren Anteils an Bürstensaummembranen ein weitaus höherer Proteineinsatz nötig) zeigte sich, wie erwartet, ein ähnliches Bild, jedoch in der Signalintensität deutlich abgeschwächt (Abbildung 2c). Dies lässt sich durch den starken Verdünnungseffekt, welcher bei der Mukosapräparation im Vergleich zur reinen Bürstensaummembran aufgrund der

ausschließlichen Lokalisation des rSGLT1 an der apikalen Seite der Enterozyten auftritt, erklären. Trotz des hohen Proteineinsatzes zeigten sich hier keine unspezifischen Bindungen des Antikörpers. Nach Präabsorption mit 100 µg antigenem Peptid pro Milliliter ließen sich keinerlei Banden mehr detektieren. Damit wurde gezeigt, dass der Antikörper für das für rSGLT1 charakteristische Epitop spezifisch war. Da das Laufverhalten der mit diesem Antikörper detektierten Proteine mit dem in der Literatur für rSGLT1 beschriebenen übereinstimmt, sowie die Peptidsequenz keine größeren Ähnlichkeiten zu irgendeinem bereits klonierten Protein hat, war davon auszugehen, dass dieser Antikörper spezifisch für rSGLT1 ist.

Die Reaktion an den Bürstensaummembranpräparationen diente für sämtliche weitere Western blot- Untersuchungen als Positivkontrolle.

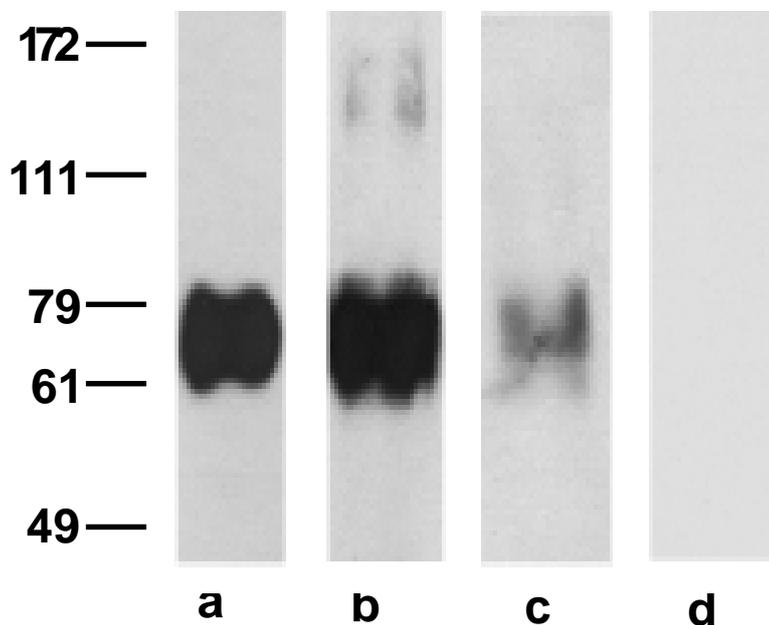


Abbildung 2: Beispiele für die Reaktion des Antikörpers an Dünndarmpräparationen im Western blot. Für Blot a betrug der Proteineinsatz 500 ng einer gereinigten Bürstensaummembranpräparation, auf Blot b wurden hiervon 2 µg aufgetragen. Deutlich sieht man eine starke Reaktion bei einem Molekulargewicht von etwa 70 kD, bei höherem Proteineinsatz in Blot b zeigt sich eine zweite Bande bei etwa 160 kD. Diese entspricht höchstwahrscheinlich einer Oligomerbildung des rSGLT1. Blot c zeigt nach Einsatz von 70 µg Protein aus dem Lysat der Dünndarmgesamtmembran trotz hohem Proteineinsatz ein deutlich schwächeres Signal. Obwohl hier eine sehr hohe Proteinmenge an antigenreichem Mischgewebe aufgetragen wurde, zeigt der Western Blot keine unerwarteten Kreuzreaktionen. Für Blot d wurde bei Einsatz von 1,5 µg Protein der gereinigten Bürstensaummembran der Antikörper zuvor mit 100 µg/ml antigenem Peptid abgesättigt. Hierauf war kein Signal nachweisbar, der Antikörper reagierte in diesen Versuchen also mit dem antigenen Peptid, ohne unerwünschte Kreuzreaktionen zu zeigen.

1.2.2. Immunhistologie am Rattenjejunum

Der Transporter rSGLT1 wurde im Dünndarm der Ratte immunhistologisch an der apikal gelegenen Bürstensaummembran der Enterozyten nachgewiesen (31,92). Diese Verteilung galt es im Rahmen der Spezifitätsuntersuchung meines Antikörpers zu reproduzieren.

Die Untersuchungen erfolgten an einer von Frau Dr. F. Meyer-Wentrup zur Verfügung gestellten Dünndarmpräparation. Das Jejunum war nach seiner Entnahme gespült, der Länge nach aufgeschnitten und um seine Querachse aufgerollt worden. Sodann war er in Isopropanol in flüssigem Stickstoff eingefroren worden. Auf diese Weise ließ er sich bei guter Gewebeerhaltung ohne Probleme im Kryostaten schneiden. Ich fertigte 4 µm dicke Schnitte an und fixierte sie anschließend. Da sich bei der oben beschriebenen Fixation mit 4% Paraformaldehyd unerwartete Reaktionen in der glatten Muskulatur der Zotten und großer Gefäße zeigte, wurde der Darm auch in kaltem Azeton fixiert. Hier zeigten sich diese Reaktionen nicht mehr. Aus diesem Grund wurde später bei den anderen untersuchten Organen (mit Ausnahme der Niere, die nur in perfusionsfixiertem Zustand untersucht wurde) mindestens ein Schnitt zur Kontrolle mit Azeton fixiert. Da die Gewebeerhaltung im Vergleich zur Fixierung mit Paraformaldehyd nur ungenügend war, wurde davon abgesehen, diese Methode als Standard zu wählen. In den Präparaten zeigte sich, wie erwartet, eine starke Fluoreszenz im Bereich der Bürstensaummembranen der Enterozyten (Abbildung 3 a). Kein spezifisches Signal lies sich hingegen im Zottenbindegewebe, welches reich an fenestrierten Kapillaren ist, nachweisen. Auch die glatte Muskulatur blieb hier frei von jeglicher Fluoreszenz. Untersuchung dieser Präparate mittels konfokaler Laserscanmikroskopie bestätigten das Fehlen eines spezifischen Signals in den Becherzellen des Darmepithels (Abbildung 3 b). Nach Präabsorption mit 100 µg antigenem Peptid pro Milliliter Antikörperlösung ließ sich dieses Reaktionsmuster nicht mehr darstellen (Abbildung 3 c).

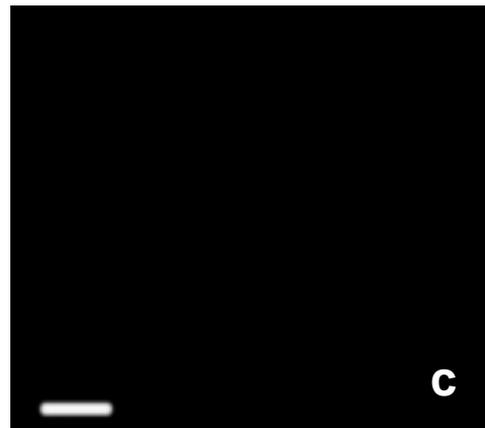
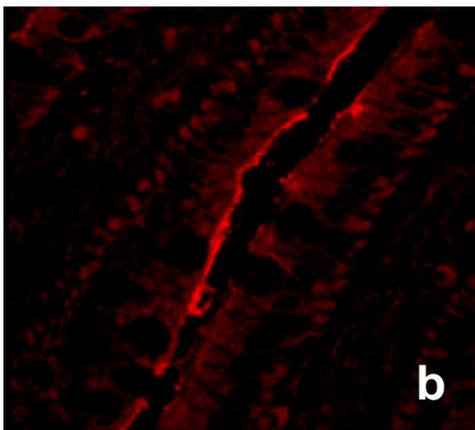
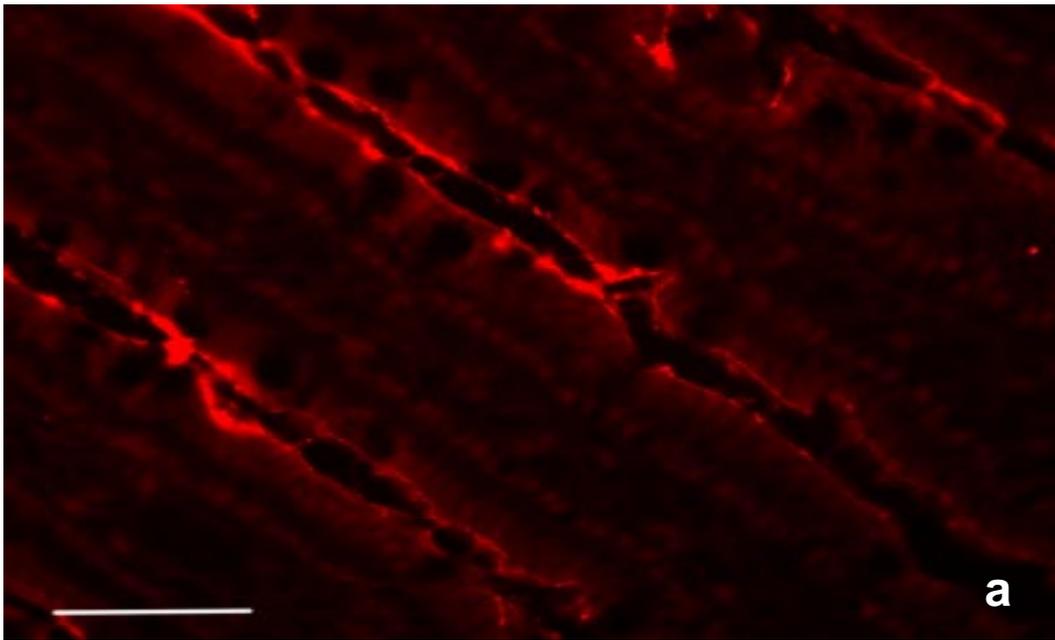


Abbildung 3: Immunfluoreszenzmikroskopie mittels anti-rSGLT1-Antikörper an azetonfixiertem Dünndarmgewebe der Ratte. Auf Bild a ist ein repräsentativer Schnitt durch jejunale Zotten abgebildet, das Signal beschränkt sich auf den Bürstensaum der luminalen Membran der Enterozyten. Keine Anfarbung findet sich dagegen in dem dicht mit fenestrierten Kapillaren durchsetzten Bindegewebe im Kern der Zotte (— entspricht 50 μm). Bild b zeigt ein Laserscanbild desselben Schnittes. Deutlich zu erkennen ist hier die rein luminalen Reaktion an den Enterozyten unter Aussparung der Becherzellen. Auf Bild c sieht man das Ergebnis nach Präabsorption des Primärantikörpers mit 100 $\mu\text{g/ml}$ des antigenen Peptid (— entspricht 100 μm). Die für SGLT1 bekannte Lokalisation lässt sich hier in nicht mehr nachweisen.

1.2.3. Immunhistologie an der Rattenniere

In Vorversuchen an Kryoschnitten von primär unfixierten Rattennieren zeigte sich, dass die strukturelle Erhaltung und somit die Qualität der Immunhistologie in diesem Verfahren nur ungenügend war. Aus diesem Grund wurden die Experimente an der Rattenniere ausschließlich an Nierengewebe, welches zuvor von Frau Professor B. Kaissling perfusionsfixiert worden war, durchgeführt. Auch hier konnte eine weitgehende Kongruenz mit früheren Befunden festgestellt werden. Diese zeigte eine Lokalisation des rSGLT1 an der Bürstensaummembran des proximalen Tubulus (12, 31, 92). Jedoch musste auch hier, wie in allen anderen formaldehydfixierten Organen eine starke Reaktion der glatten Muskulatur der Media größerer Gefäße notiert werden. Kapillaren wurden nicht angefärbt, das Glomerulum war frei von jeglicher Signalgebung. Insgesamt deckt sich also das Ergebnis der Immunhistologie an der Niere mit der in der Literatur beschriebenen Lokalisation des rSGLT (Abbildung 4).

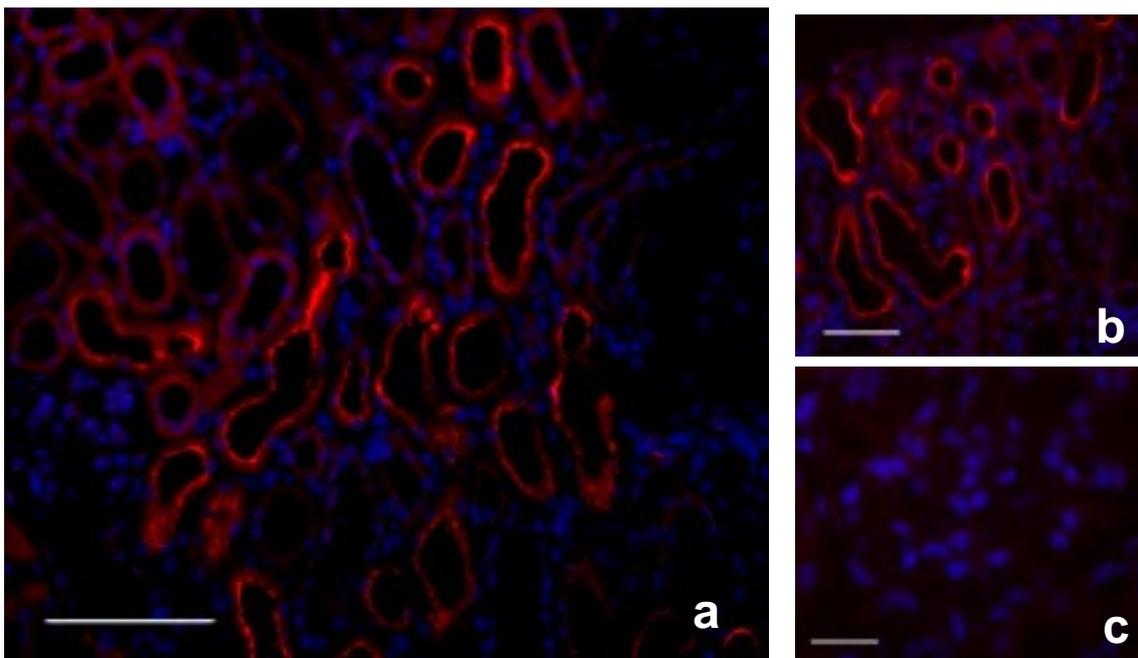


Abbildung 4: Immunhistologie an perfusionsfixierter Rattenniere. Zusätzlich zum Einsatz des anti-rSGLT1 Antikörpers wurde hier, um die Orientierung zu erleichtern, die DNA des Zellkerns mit DAPI angefärbt (blaue Fluoreszenz). Bild a (— entspricht 100 µm) zeigt einen Überblick über einen Ausschnitt der Rinde, Bild b (— entspricht 50 µm) eine Ausschnittsvergrößerung aus dem kortikalen Randbereich. An den Bürstensaummembranen des proximalen Tubulus lässt sich ein starkes spezifisches Signal detektieren. Peritubulär konnten sich keine Kapillaren dargestellt werden. Bild c (— entspricht 37,5 µm) zeigt eine Detailvergrößerung eines Glomerulums. Auch hier ließ sich rSGLT1 mit unserem Antikörper nicht nachweisen.

2. Immunhistologischer Nachweis von rSGLT1 in der Glandula submaxillaris

In der Glandula parotis des Schafes wurde die ovine Form des SGLT1 nachgewiesen (95, 96). Dabei wurde das Protein an der basolateralen Membran der Azinuszellen lokalisiert. Für diese Versuche wurden wegen der Größe und der leichten präparatorischen Zugänglichkeit des Organs die Glandula submaxillaris der Ratte gewählt. An Kryoschnitten konnte für dieses Organ und diese Spezies eine ähnliche Verteilung nachgewiesen werden (Abbildung 5). In allen Präparaten sah man eine dem in der Literatur beschriebenen Bild entsprechende starke Reaktion am basalen Pol aller Azinuszellen. Kein Signal zu detektieren war hingegen an Zellen von Schalt- und Streifenstücken sowie an größeren Ausführungsgängen. Auch in Kapillaren fand sich kein spezifisches Signal. Zur Verifizierung dieses Befundes wurde auch eine Doppelfärbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen den von Willebrandfaktor, welcher sich hauptsächlich intrazytoplasmatisch in Endothelzellen befindet, zusätzlich zu dem anti-rSGLT1 Antikörper vorgenommen. Dabei zeigte sich eine spezifische Färbung von kleinen Gefäßen durch diesen Endothelzellmarker, aber nicht durch den rSGLT1-Antikörper (Abbildung 6). Nach Präabsorption des anti-rSGLT1-Antikörpers mit dem antigenen Peptid fand sich kein spezifisches Signal mehr.

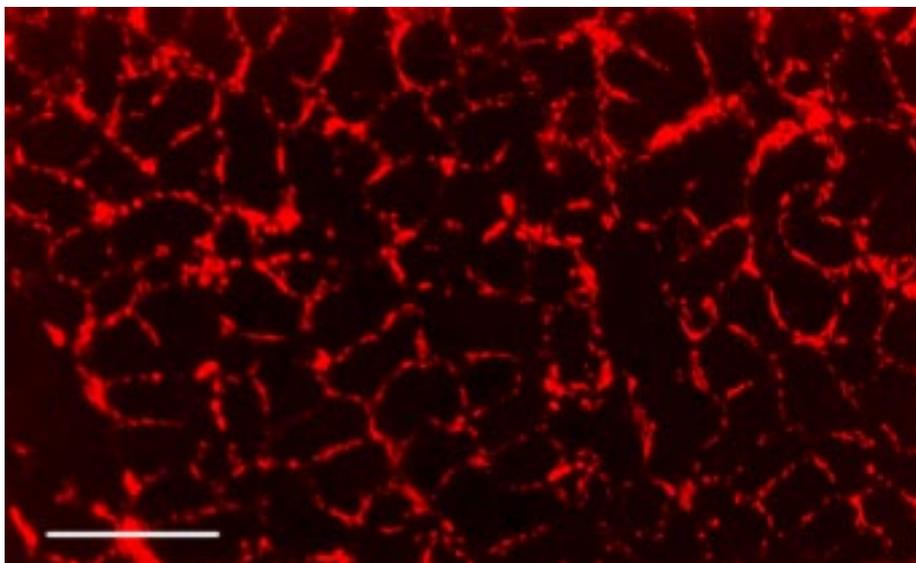


Abbildung 5: Immunfluoreszenzfärbung mittels anti-rSGLT1- Primärantikörper an der Glandula submaxillaris der Ratte. Man sieht hier eine starke Reaktion an der basalen Seite der Azini, wie sie auch bereits für die Glandula parotis des Schafes beschrieben worden ist (— entspricht 100 μ m)

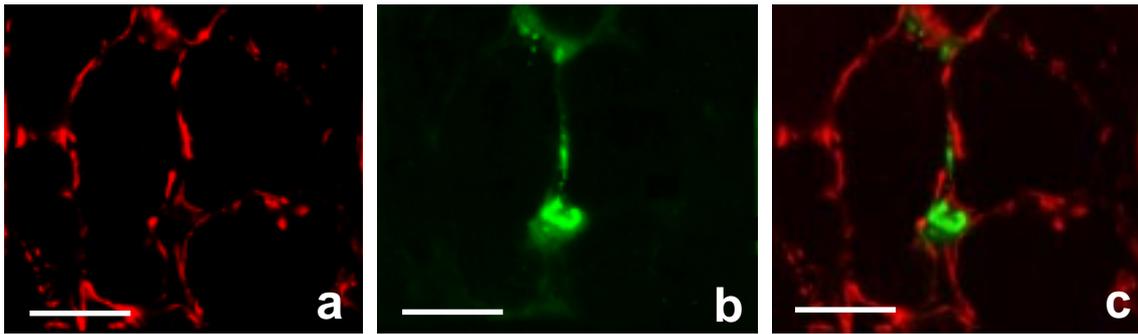


Abbildung 6: Detailvergrößerung eines immunhistologischen Präparates der Glandula submaxillaris der Ratte; Doppelfärbung durch den Antikörper gegen rSGLT1 (rot) sowie den monoklonalen Antikörper gegen den von Willebrandfaktor (vWF, Faktor-VIII-assoziertes Antigen, grün). Bild a zeigt die Darstellung der basalen Membran einiger Azini durch den Nachweis von rSGLT1. Auf Bild b ist der Verlauf eines kleinen Gefäßes zwischen zwei Azini nachzuvollziehen, angefärbt durch den immunologischen Nachweis von vWF. Eine Übereinanderprojektion beider Bilder in Abbildung c zeigt, dass es keine Überschneidungen im Bereich der beiden Färbungen gibt, in kleinen Gefäßen dieses Organs also kein SGLT1 nachzuweisen war (— entspricht 20 μm).

3. Immunhistologischer Nachweis von rSGLT1 in der Blut-Hirn-Schranke

In Endothelzellen des Schweins wurde die Transkription von pSGLT1 (81) in der RT-PCR durch Herrn Dr. Robert Poppe aus unserem Institut nachgewiesen. Darüber hinaus deuteten auch weitere Versuche in unserem Labor auf eine Transkription und Expression dieses Proteins im ischämisch geschädigten Rattengehirn (24 sowie nicht publizierte Daten) hin. Bei der immunhistologischen Untersuchung an Koronarschnitten durch das Großhirn der Ratte zeigte sich eine Anfärbung von Neuronen, ein ähnliches Bild wie in den von Herrn Dr. U. Karbach angefertigten immunhistologischen Präparaten des Schweins (81) (Abbildung 7 und 8). Dort Darüber hinaus fand sich rSGLT1 im Kapillarnetz aller Hirnareale (Abbildungen 7, 8 und 9). Eine Gegenfärbung durch die Immundetektion mit einem Antikörper gegen den von Willebrandfaktor zeigte eine Übereinstimmung des Expressionsmusters beider Proteine, d.h. bei jeder durch den Anti-von-Willebrandfaktor-Antikörper nachgewiesene Kapillare konnte auch rSGLT1 nachgewiesen werden (Abbildung 9). Des Weiteren fanden sich in der lichtmikroskopischen Betrachtung der Doppelfluoreszenz auch eindeutige Hinweise auf eine luminalen Lokalisation dieses Glucosetransporters (Abbildung 10). Die Antigenspezifität dieser Befunde wurde, wie üblich, durch einen Präabsorptionsversuch nachgewiesen (Abbildung 7).

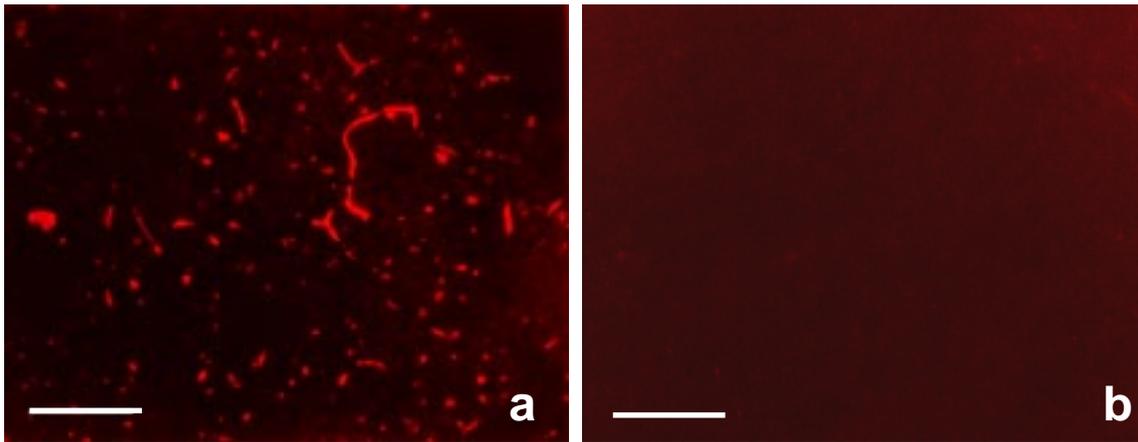


Abbildung 7: Immunreaktion des anti-rSGLT1-Antikörpers am Großhirn der Ratte: Bild a zeigt die Reaktion im Kortex des Parietallappens (— entspricht 100 µm), Bild b ein Präparat nach vorheriger Präabsorption des Primärantikörpers mit antigenem Peptid (— entspricht 100 µm).

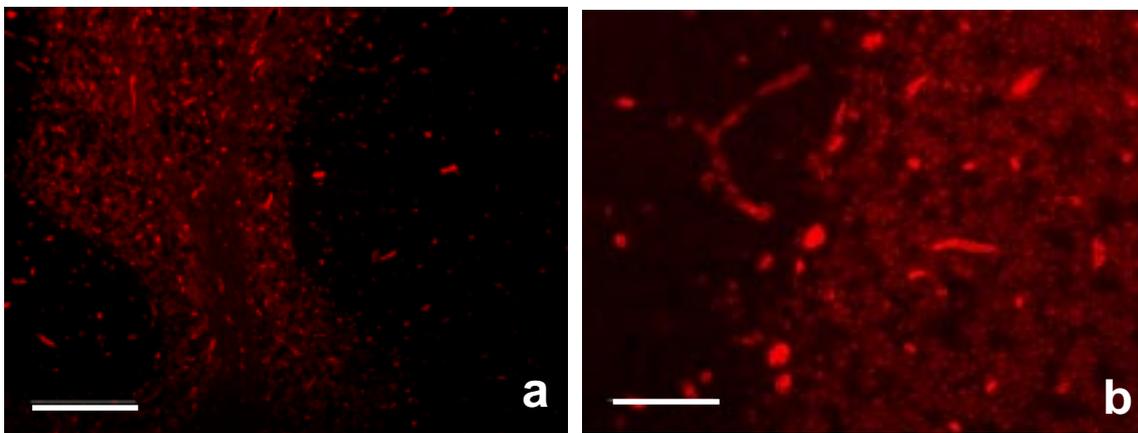


Abbildung 8: Immunhistologie mittels anti-rSGLT1-Antikörper am Kleinhirn der Ratte. Bild a gibt einen Überblick (— entspricht 125 µm), Bild b eine Detailvergrößerung (— entspricht 50 µm). Kapillaren zeigen sich deutlich neben dem bekannten Reaktionsmuster an den Neuronen.

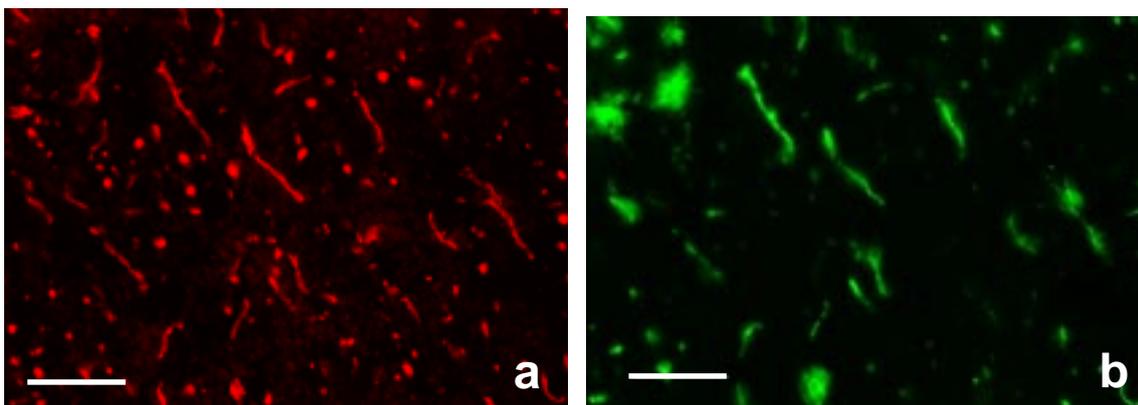


Abbildung 9: Ausschnitt aus dem Großhirn der Ratte: Doppelfärbung mit anti-rSGLT1 Antikörper (Bild a, rot) und einem monoklonalen Antikörper gegen den von Willebrandfaktor (Bild b, grün) durchgeführt. Alle Kapillaren, die sich durch den von Willebrandfaktor darstellen ließen, konnten auch durch den anti-rSGLT1 Antikörper nachgewiesen werden (— entspricht 100 µm).

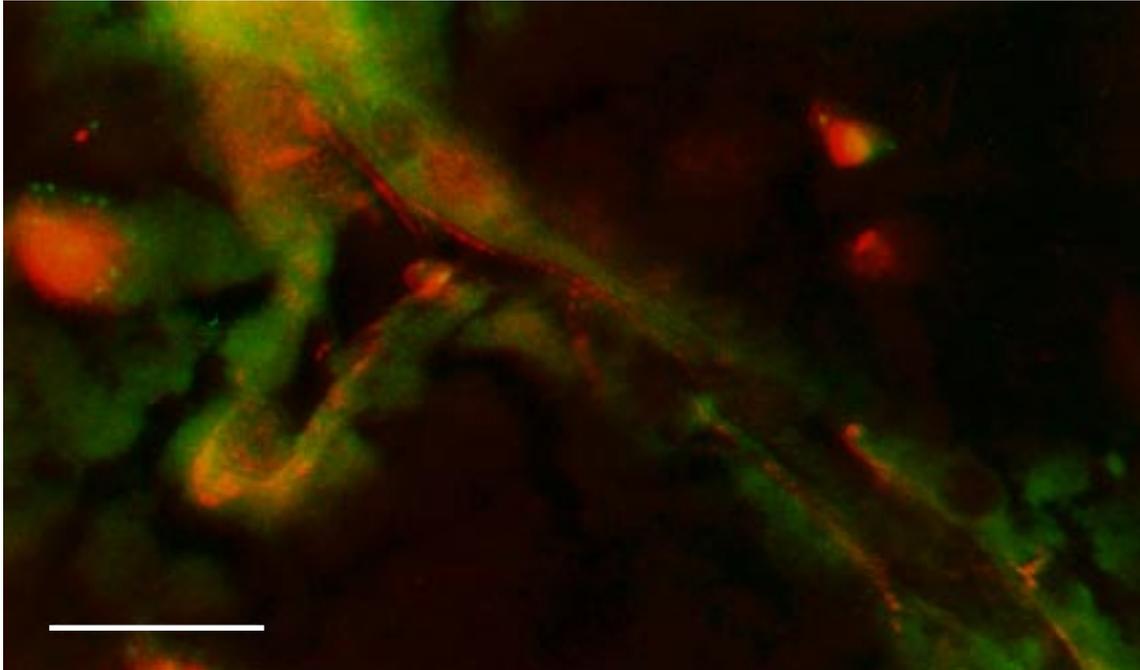


Abbildung 10: Immunhistologischer Nachweis des von Willebrand Faktors (grün) und des rSGLT1 (rot) in einer Doppelfärbung des Kortex der Ratte. rSGLT1 lässt sich hauptsächlich luminal darstellen, während vWF vor allem intrazellulär gelegen ist (— entspricht 15 μ m).

4. rSGLT1 in den Kapillaren des Skelettmuskels und Herzens

Nach dem Nachweis von rSGLT1 in der Blut- Hirnschranke stellte sich die Frage, ob SGLT1 noch in weiteren Kapillaren exprimiert ist. Da SGLT1 in den fenestrierten Kapillaren von Niere, Darm und Glandula submaxillaris nicht nachgewiesen werden konnte, untersuchte ich die Verteilung von SGLT1 in Skelettmuskel und Herz. Diese Gewebe haben ähnlich wie das Gehirn einen sehr hohen Glukoseverbrauch und besitzen ebenfalls ein Kapillarsystem mit Zonulae occludentes.

4.1. Immunhistologischer Nachweis von rSGLT1 im Kapillarsystem des Skelettmuskels

Für die histologischen Untersuchungen wurden Präparate aus Muskelgewebe des M. masseter sowie der Adduktorengruppe der Ratte erstellt. Bei den primär unfixierten Gefrierschnitten zeigte sich sowohl in der Azeton- als auch in der Paraformaldehydfixierung ein starkes Signal in allen Kapillaren, ohne dass es zu größeren Hintergrundreaktionen kam (Abbildung 11 a). Dieses Signal ließ sich durch den schon mehrfach beschriebenen Präabsorptionsversuch völlig auslöschen (Abbildung 11 b). Die Versuche mit dem perfundiertem Muskel zeigten ein vergleichba-

res Bild (Abbildung 12 und 13) bei etwas höherer Hintergrundaktivität. Bei Untersuchung dieser Schnitte im konfokalen Laserscanmikroskop konnte man in den meisten Fällen eine Lokalisation des Proteins auf der luminalen Seite der Zelle entdecken (Abbildung 14 a), dennoch zeigten einige Endothelzellen auch ein stärkeres Signal an der dem Lumen abgewandten Seite (Abbildung 14 b). Insgesamt lässt sich aufgrund dieser konfokalen Laserscanuntersuchung die Membranlokalisation des Proteins nicht mit letzter Gewissheit klären. Funktionelle Untersuchungen, welche zu einem späteren Zeitraum durchgeführt wurden, geben jedoch Hinweise auf eine bedeutsame Lokalisation des Proteins an der luminalen Seite (25).

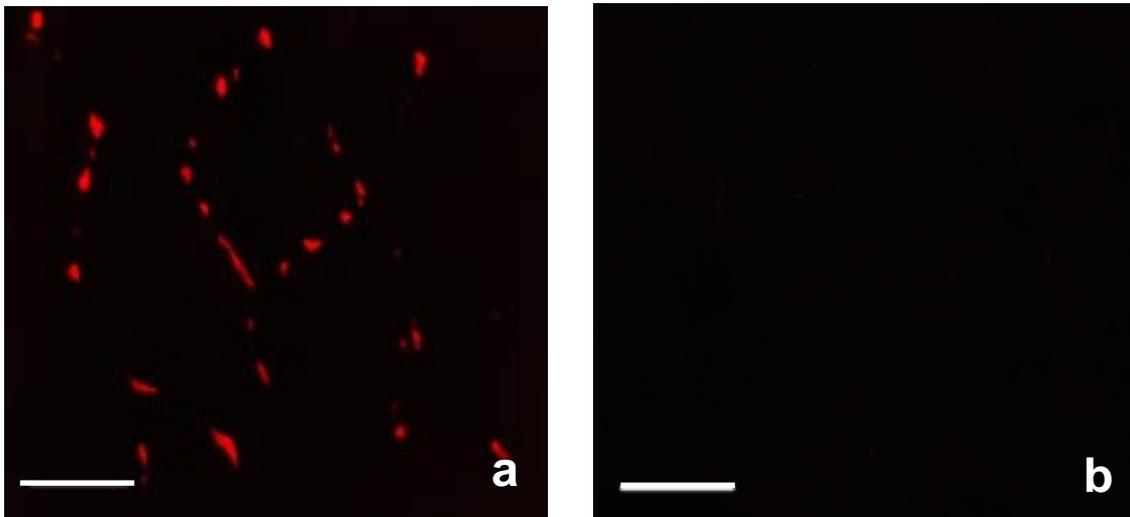


Abbildung 11: Immunhistologischer Nachweis von rSGLT1 im Skelettmuskel der Ratte. Bild a zeigt das Kapillarnetz um einzelne Muskelfaserbündel dargestellt durch den anti-rSGLT1 Antikörper. Bild b zeigt einen vergleichbaren Ausschnitt nach vorheriger Präabsorption des Antikörpers mit 100 µg/ml antigenem Peptid (— entspricht 50 µm). Hier ist das in Bild a in den Kapillaren gelegene Signal nicht mehr nachzuweisen.

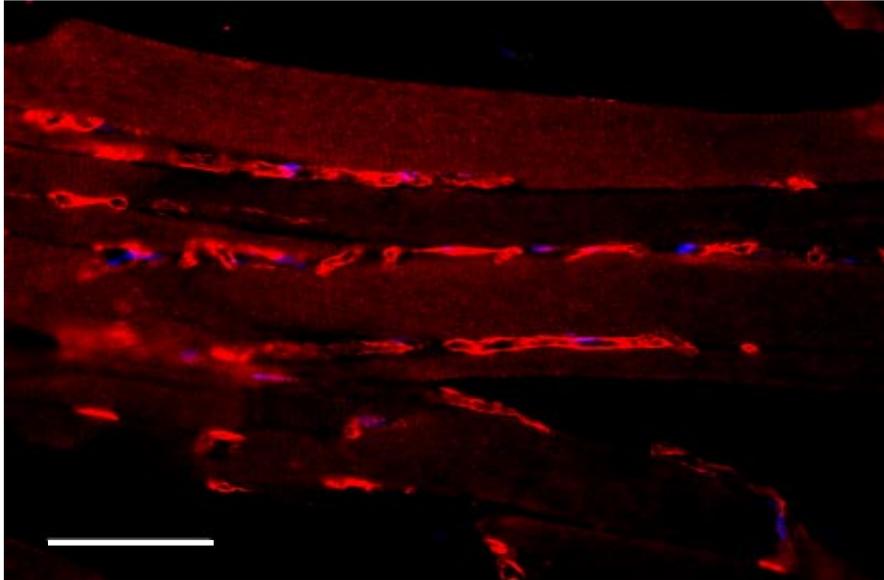


Abbildung 12: Immunhistologie mittels anti-rSGLT1-Antikörper und Kerngegenfärbung mit DAPI am perfusionsfixierten *M. masseter* der Ratte. Bei etwas erhöhtem Hintergrund zeigt sich hier an der noch gut sichtbaren Querstreifung die hervorragende Erhaltung der Feinstruktur des perfundierten Gewebes. Gut zu verfolgen ist hier im Längsschnitt auch das dichte Kapillargeflecht um die einzelnen Muskelfasern (— entspricht 100 μm).

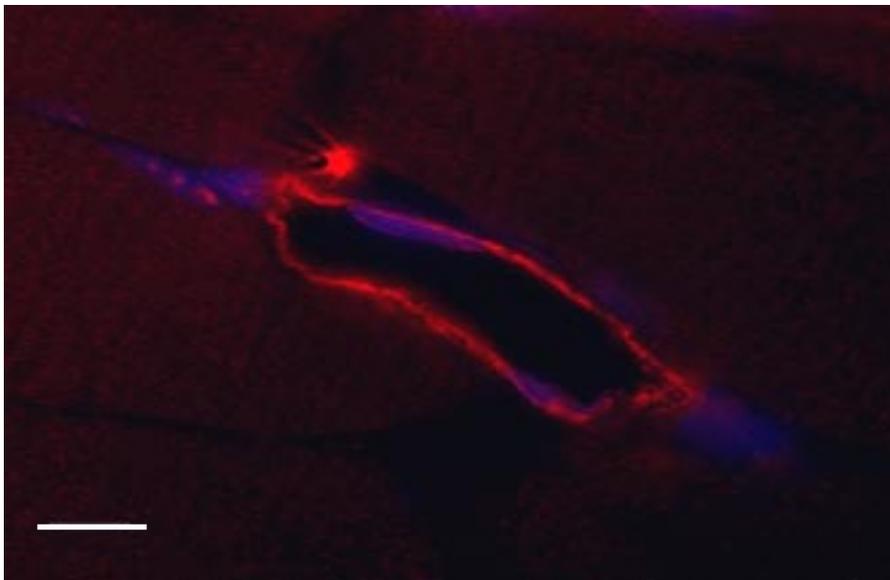


Abbildung 13: Detailvergrößerung einer Immunhistologie mittels anti-rSGLT1-Antikörper (Kerngegenfärbung mit DAPI) am *M. masseter*. Die Immunreaktion beschränkt sich auf das Endothel der hier dargestellten Kapillare (— entspricht 20 μm)

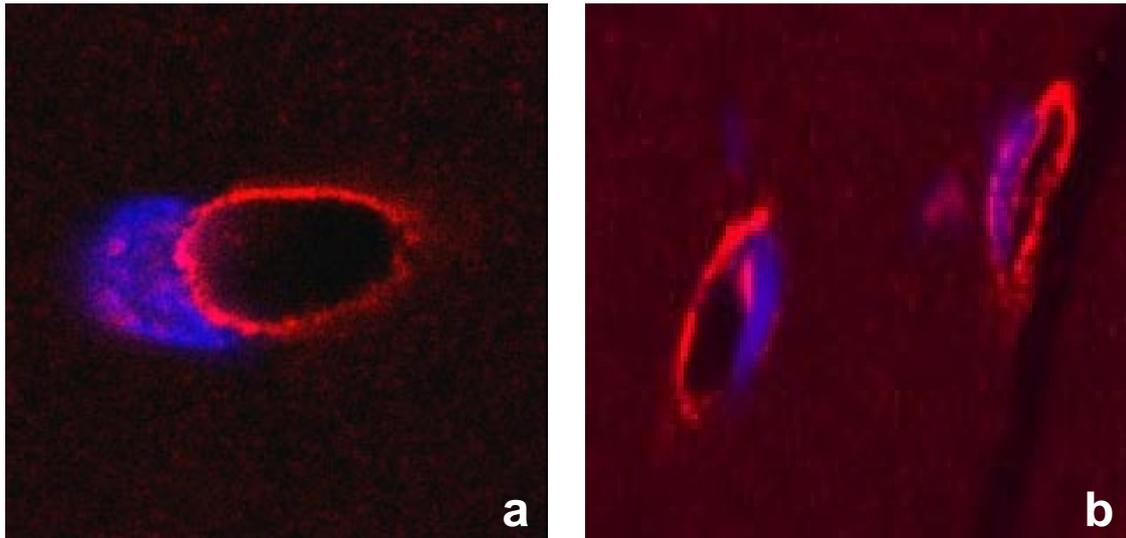


Abbildung 14: Konfokale Laserscanmikroskopie einer Immunreaktion mittels rSGLT1-Antikörper und Gegenfärbung mit DAPI. Bild a zeigt einen Querschnitt durch eine Kapillare. Aus der Lage des Zellkerns zu dem Signal lassen sich Schlüsse auf eine apikale Lokalisation des Proteins ziehen. Ein Großteil der Kapillaranschnitte zeigte ein vergleichbares Bild. Abweichend von diesem Befund wurden gelegentlich auch Ausschnitte gefunden, welche eine Lokalisation des Signals auf beiden Seiten des Kerns aufweisen (Bild b).

4.2. Immunhistologischer Nachweis von rSGLT1 in Herzkapillaren

Das Kapillarnetz des Myokards besitzt eine ähnliche Struktur wie das des Skelettmuskels. Hier zeigte sich eine starke Fluoreszenzreaktion in dem dichten Kapillargeflecht um die einzelnen Kardiomyozyten (Abbildung 15 a und b). In andere Bereiche des Herzens wurde keine nachweisbare Immunreaktion gefunden. Die vorherige Präabsorption des Antikörpers mit 100 µg antigenem Peptid bewirkt eine vollständige Auslöschung des Signals (Abbildung 15 c). Bei der näheren Untersuchung mittels konfokaler Laserscanmikroskopie (Abbildungen 16 und 17) sah man in vielen Gefäßen eine Reaktion luminal des Zellkerns (Abbildung 17 a). Andere Kapillaren hingegen zeigten jedoch eine deutliche Fluoreszenz auch an der abluminalen Seite des Zellkerns (Abbildung 17 b und c). Des Weiteren lässt sich hier ein paranukleär gelegenes, etwas körnig anmutendes Signal zu detektieren. Insgesamt lassen diese Ergebnisse den Verdacht zu, dass ein nicht zu vernachlässigender Teil des signalgebenden Proteins intrazellulär in Vesikeln vorliegt, beziehungsweise noch unreif im paranukleär gelegenen endoplasmatischen Retikulum liegt. Zur Membranlokalisation lässt sich hier, auch wegen der begrenzten Möglichkeit ultrastruktureller Feinuntersuchungen in der Lichtmikroskopie, keine hundertprozentig sichere Aussage machen. Funktionelle Untersuchungen an isolierten Rattenherzen, welche mit

Nährlösung und einem für SGLT spezifischen Inhibitor perfundiert wurden, legen jedoch auch hier eine luminal Reaktion nahe (Dr. Gögelein, Aventis Deutschland, nicht veröffentlichte Daten).

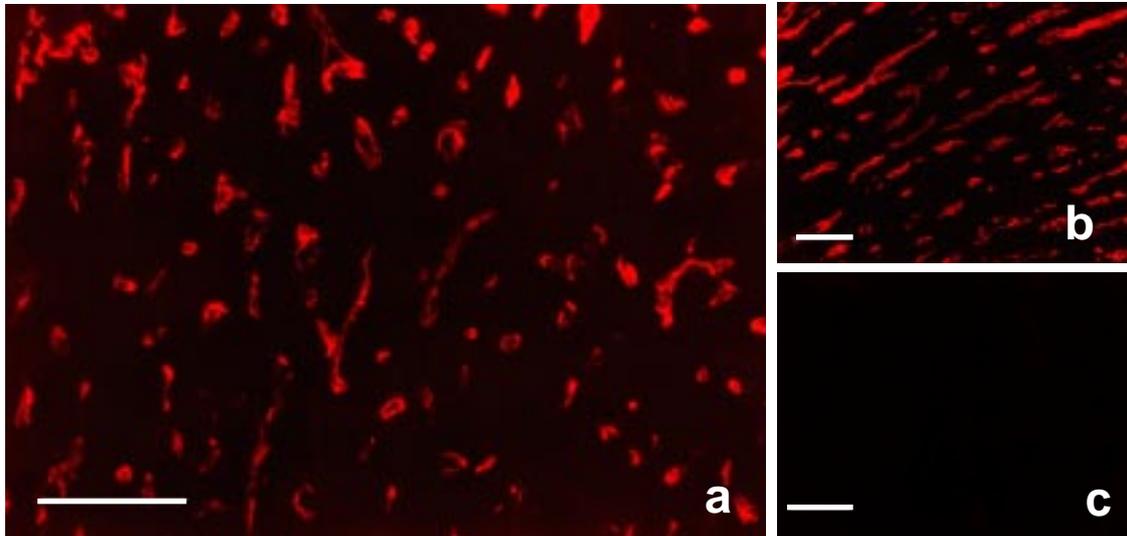


Abbildung 15: Immunhistologie mittels anti-rSGLT1-Antikörper an paraformaldehydfixiertem, nativ gefrorenen Gewebe des linken Ventrikels des Rattenherzens. Das dichte Kapillargeflecht lässt sich selektiv darstellen. Bild a zeigt einen Querschnitt, Bild b einen Längsschnitt durch den Herzmuskel. Bild c zeigt ein entsprechendes Bild mit vorher mit 100 µg/ml antigenem Peptid präabsorbiertem Antikörper (— entspricht jeweils 100 µm).

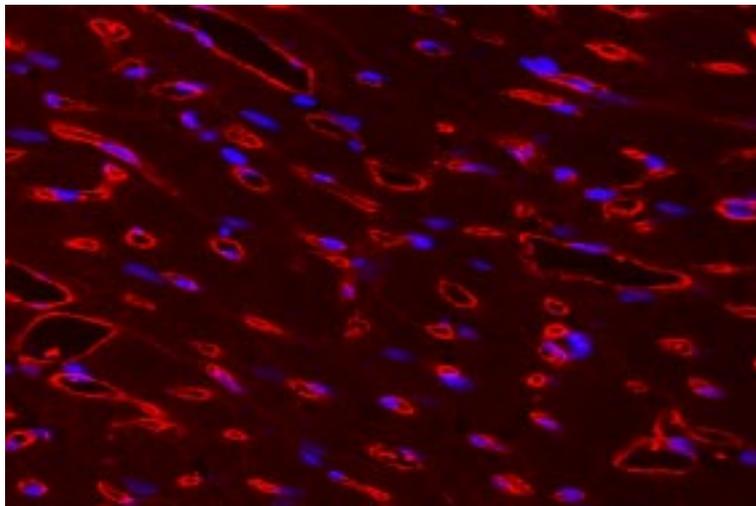


Abbildung 16: Konfokale Laserscanmikroskopie eines Gefrierschnittes aus der perfusionsfixierten Herzspitze der Ratte. Der immunhistologische Nachweis von rSGLT1 erfolgte durch anti-rSGLT1-Antikörper mittels cy3-konjugiertem Sekundärantikörper, eine Kerngegenfärbung durch DAPI. Es ist deutlich zu erkennen, dass sämtliches durch den Primärantikörper erkanntes Epitop sich ausschließlich im Gefäßsystem detektieren lässt.

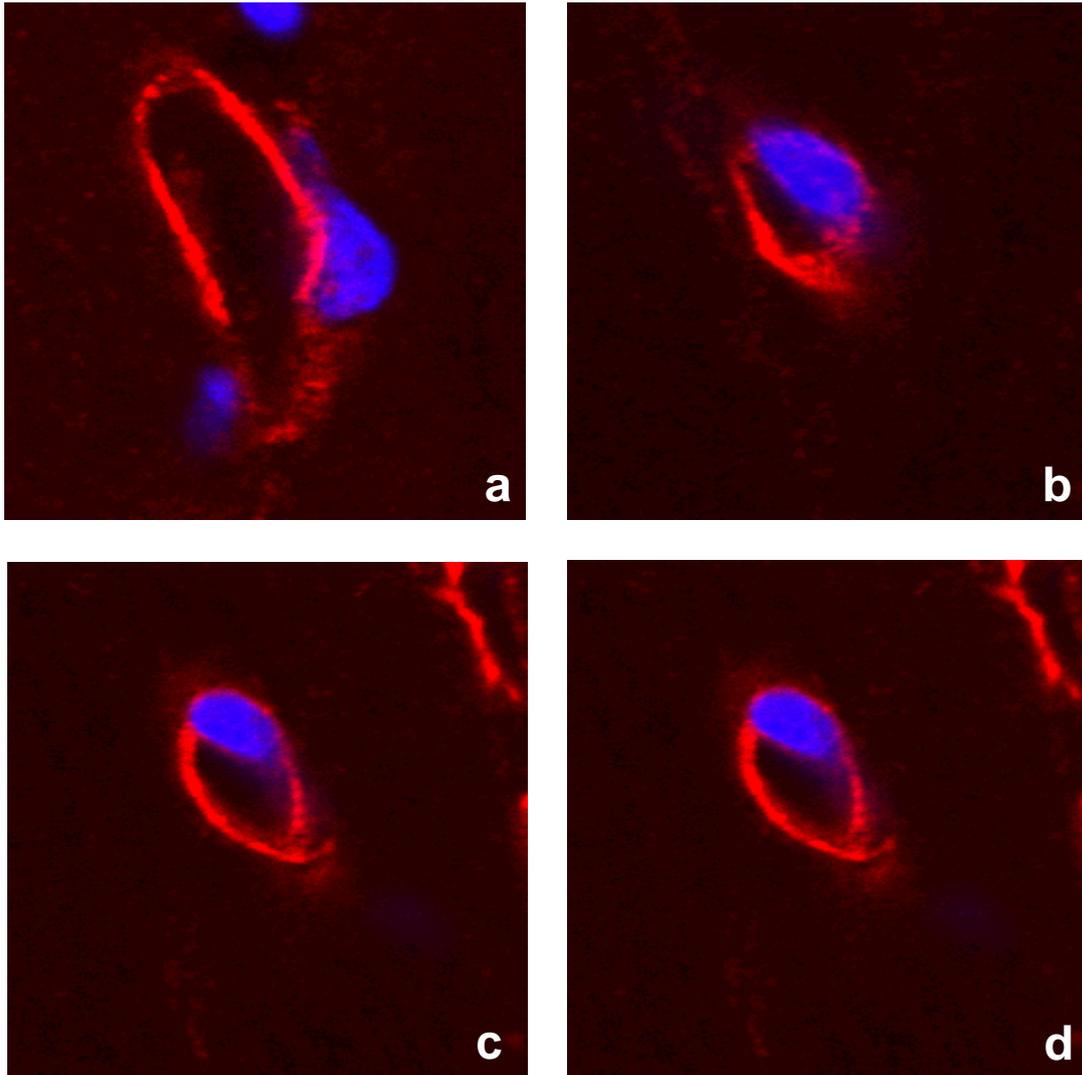


Abbildung 17: Konfokale Laserscanmikroskopie einer Immunhistologie mittels anti-rSGLT1-Antikörper und Kerngegenfärbung mit DAPI. Während bei Bild a eine eindeutig luminal Reaktion zu sehen ist, ist dieses bei Bild b nicht mehr auszumachen. Bild c zeigt eine deutliche Reaktion sowohl luminal wie auch abluminal des Kernes gelegen. Bild d zeigt dieselbe Kapillare wie Bild c in einer 5 µm tieferen Schicht. Das hier paranukleär gelegene etwas körnige Signal entspricht am ehesten im endoplasmatischen Retikulum und Golgiapparat gelegenen Vorstufen des rSGLT1.

4.3. Nachweis von rSGLT1 in isolierten Herzkapillarendothelzellen

Für den Nachweis von rSGLT1 im Western blot wurden uns freundlicherweise aus Rattenherz gewonnene native Endothelzellkulturen von Frau Dr. Sabine Mattig, Mitarbeiterin des physiologischen Institutes der Technischen Universität Dresden, überlassen. Da nur geringe Mengen an Material zur Verfügung standen, wurde auf eine Membranpräparation verzichtet und stattdessen die Gesamtzellen lysiert. Im We-

stern blot zeigte sich bei einem Einsatz von ca. 25 µg bei den meisten Versuchen eine deutliche Bande bei einem relativen Molekulargewicht von etwa 120 kD, eine schwache zweite Bande bei einem relativem Molekulargewicht von circa 85 kD (Abbildung 18 a) sowie die vorbeschriebene Bande aus Degradationsprodukten bei circa 40-45 kD. Nach Präabsorption des Primärantikörpers mit 100 µg/ml antigenem Peptid konnte keine dieser Banden mehr detektiert werden (Abbildung 18 b). Die mit dem Antikörper gegen rSGLT1 reagierenden Proteine aus diesen Endothelzellen zeigten ein etwas anderes Laufverhalten als parallel durchgeführte Western blots an Bürstensaummembranpräparation des Darmes. Um herauszufinden, ob dies an einer unterschiedlichen Glykosilierung des Proteins in den unterschiedlichen Geweben liegen kann, wurde ein Deglykosilierungsversuch bei beiden Präparationen mit PNGase F durchgeführt (Abbildung 19). Bei diesem Versuch kam es zu großen Verlusten von immunreaktiven Protein. Aus diesem Grund war die 85 kD-Bande (Abbildung 19 a) in den Kontrollreaktionen (Abbildung 19 b) kaum mehr zu detektieren, ihr Laufverhalten konnte deswegen nicht beurteilt werden. Das Laufverhalten der 120 kD- Bande änderte sich nicht (Abbildung 19 b), die zunächst bei 70 kD laufende Bande der Darmpräparation (Abbildung 19 c) war jedoch nach dem Abbau durch diese Glykosidase bei einem relativen Molekulargewicht von etwa 55 kD nachzuweisen (Abbildung 19 d). Dies entspricht auch dem in der Literatur angegebenen Laufverhalten für das deglykosilierte SGLT1-Monomer (37). Das zunächst bei 165 kD laufende Oligomer wurde nun bei einem relativen Molekulargewicht von 120 kD nachgewiesen. Das Laufverhalten der Endothelzellpräparation gleicht also dem des deglykosilierten Oligomers aus den Darmpräparationen. Diese Bande wurde von verschiedene Arbeitsgruppen beim Nachweis von SGLT1 aus Nierenpräparationen häufig an eben dieser Stelle oft beobachtet und als Oligomer des SGLT1 interpretiert (19, 29).

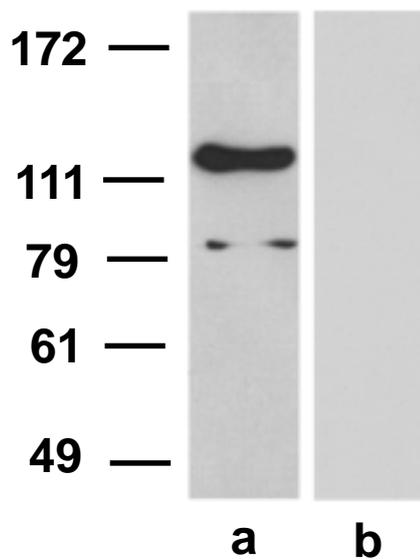


Abbildung 18: Western blot mittels anti-rSGLT1-Antikörper an lysierten Endothelzellen des Herzens der Ratte bei einem Proteineinsatz von 20µg: in Blot a zeigt sich eine kräftige Bande bei einem Molekulargewicht von 120 kD, eine sehr schwache bei einem Molekulargewicht von ca. 85 kD. Für Blot b wurde diesem Antikörper zuvor 100 µg/ml antigenes Peptid zugefügt. Beide Banden sind hier nicht mehr nachzuweisen.

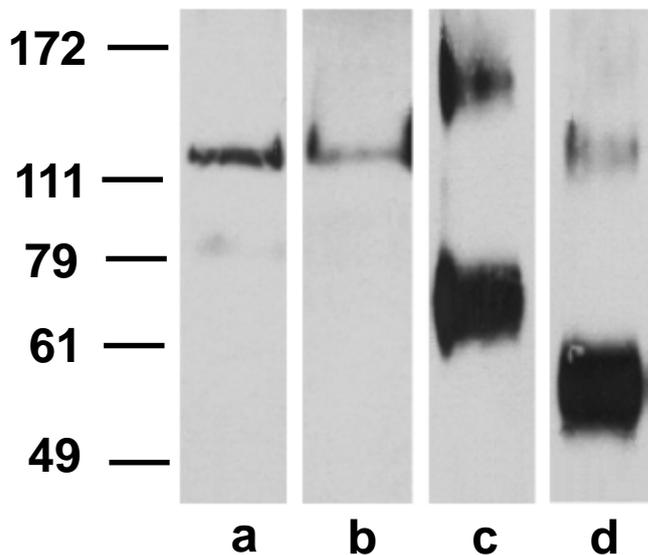


Abbildung 19: Western blot mittels anti-rSGLT1 -Antikörper an Endothelzellen des Rattenherzens (a und b) sowie an Bürstensaummembranen des Dünndarms (c und d). Die Bilder b und d zeigen die Reaktion nach Deglykosilierung durch PGNase F. Das in der Endothelzellfraktion nachweisbare-schwache Signal bei 85 kD ging durch Degradation völlig verloren, die starke Bande bei 120 kD bleibt bei der Endothelzellfraktion bestehen, die Laufhöhe entspricht exakt der deglykosilierten Form des rSGLT1 Oligomers aus der Dünndarmpräparation (d).

Diskussion

1. Spezifität des Antikörpers

In meiner Arbeit wurde ein polyklonaler Antikörper gegen ein für den Natrium-Glukosekotransporter rSGLT1 spezifisches Peptid erzeugt. In meinen Versuchen zur Rekapitulation vorbekannter Lokalisationen des SGLT1 konnten die bereits veröffentlichten Verteilungsmuster dieses Proteins problemlos dargestellt werden. Im Dünndarm zeigte sich eine starke Reaktion, welche sich auf die luminalen Seite der Enterozyten beschränkte, in der Niere wurde die apikale Membran von Zellen des proximalen Tubulus angefärbt. Auch das Ergebnis des Western blots an Dünndarmpräparaten zeigte das bereits bekannte Muster. Die sorgfältige Auswahl des antigenen Peptids, die spezifische Affinitätsreinigung an einer mit dem eben diesem Antigen gekoppelte Sepharosesäule, die Möglichkeit mit diesem Antikörper die klassischen Lokalisationen des rSGLT1 sowohl im Western blot als auch in der Immunhistologie nachzuvollziehen, die Tatsache, dass alle Ergebnisse durch das spezifische Peptid blockierbar sind, all dies sprach dafür, dass dieser Antikörper eine sehr hohe Spezifität für rSGLT1 aufweist und für weitere Forschung bestens geeignet ist.

2. Erstbeschreibung des SGLT1 in einer Speicheldrüse der Ratte

Mitte der 1990er Jahre wurde erstmalig in Versuchen an Gewebeproben der Glandula parotis des Schafes die ovine Form des vormals nur in Niere und Dünndarm bekannten SGLT1 nachgewiesen (96). Dies war, da man dieses Protein bisher nur aus resorptiven Epithelien kannte, ein unerwarteter Befund. Aus der Lokalisation an der basolateralen Membran der Azinuszellen und der Physiologie dieser exokrinen Drüsen lassen sich einige Schlüsse über die mögliche Funktion des Transporters ziehen. Die Hauptaufgabe dieser Zellen ist die Produktion von hochglykosilierten Mukoproteinen, welche für die gleitfähig machende Wirkung des Speichels von großer Wichtigkeit ist. Aus diesem Grund ist es für die Funktion der Speicheldrüsen unerlässlich, dass ihnen in den Azinuszellen ein äußerst potentes Glukosetransportsystem zu Verfügung steht. Mit SGLT1 würde sich diese Zelle eines hochaffinen Symporters bedienen, welcher in der Lage ist, Glukose gegen einen Konzentrationsgradienten zu transportieren. So könnte dieser Zelle dieser Grundbaustoff für ihre Syntheseprodukte im Überfluss zur Verfügung stehen.

Meine Untersuchungen an der Glandula submaxillaris, der größten Speicheldrüse der Ratte, zeigten ein Bild, welches sich mit dem, das Tarpey und seinen Kollegen 1995 am Schafe entdeckt haben, detailgenau deckt. Der nun erfolgte immunhistologische Nachweis dieses Proteins bei einem nicht wiederkäuenden Mammalier lässt vermuten, dass die Notwendigkeit eines durch Natrium getriebenen Glukosekotransporters an der basolateralen Membran von Speicheldrüsen ein speziessübergreifendes Phänomen ist.

Für die medizinische Forschung wäre die Lokalisation dieses Proteins in menschlichen exokrinen Drüsen wichtig, wobei neben den Speicheldrüsen auch das Pankreas ein lohnendes Forschungsobjekt wäre.

3. Expression des rSGLT1 in den Kapillaren der Blut-Hirnschranke

Bereits im Jahre 1997 wurde von Poppe (81) erstmalig die Lokalisation des Natrium-Glukosekotransporters SGLT1 in Neuronen des Gehirns beschrieben. Dies erfolgte durch In-situ-Hybridisierungen an Gehirnen des Schweins, des Kaninchens und der Ratte sowie durch immunhistologische Lokalisation am Gehirn des Schweins. Auch in meinen Versuchen zeigte sich eine starke Reaktion in Neuronen. Wie bei Poppe et al. (81) am Schweinegehirn beschrieben, war die Immunreaktion weniger in den synaptosomalen Membranen, sondern bevorzugt perinukleär und in intrazellulären Vesikeln lokalisiert. Viel interessanter als die erneute Bestätigung der Lokalisation in den Neuronen der Ratte ist jedoch der Nachweis des rSGLT1 in Kapillaren der Blut-Hirn-Schranke. Erste Hinweise auf die Möglichkeit der Expression dieses Glukosetransporters zeigten sich bereits bei Untersuchungen in unserem Labor zur Lokalisation des SGLT1 im Schweinegehirn (24,81). Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte mittels PCR mRNA dieses Proteins in isolierten Endothelien des Schweinehirns nachgewiesen werden. Bei den damaligen immunhistologischen Untersuchungen am Schweinegehirn wurde SGLT1 von Poppe et al. jedoch nicht in den Hirnkapillaren detektiert. Nach der immunhistologischen Detektion von SGLT1 in der Blut-Hirnschranke der Ratte in meiner Arbeit stellte sich natürlich die Frage, ob dies ein speziesspezifischer Befund war, oder ob die Nichtdarstellung des Proteins in den Gehirnkapillaren ein methodisches Problem der Sensitivität des Antikörpers darstellte. Für die Arbeit von Poppe et al. wurde der Antikörper mittels epoxyaktivierter Sepharosesäule aufgereinigt. Dies erforderte für jede Aufreinigung die Herstellung einer neuen Affinitätssäule mit daraus folgenden Qualitätsschwankungen. In Nachuntersuchungen in unserem Labor durch Frau Dr. Chr. Osswald wurde das selbe

Antiserum, welches bereits 1998 von Robert Poppe für seine Forschungsarbeit verwendet wurde, verwendet. Diesmal wurde der Antikörper jedoch nach oben beschriebener Methode mittels Sulfo Link Kit affinitätsgereinigt. Dies bewirkte einen zehnfach höheren Antikörpertiter als in der vorhergehenden Arbeit. Mit dieser konzentrierten Lösung gelang es auch im Schweinegehirn eine ähnliche Verteilung des pSGLT1 sowohl in Neuronen als auch in Kapillarendothelien nachzuweisen (24). In weiteren Versuchen konnte ein eindeutiger Nachweis von SGLT1 mittels Western blot aus gereinigten Kapillarendothelzellen des Schweinegehirns erbracht werden (24). Es stellt sich nun natürlich die Frage nach der physiologischen Bedeutung dieses Proteins in der Blut-Hirnschranke. Unsere Untersuchungen legen eine asymmetrische Verteilung dieses Proteins nahe. Es ist seit langem bekannt, dass zum Beispiel der Transporter GLUT1 in der Blut-Hirnschranke sowohl an der luminalen wie an der abluminalen Seite lokalisiert ist (77). Dieses Protein weist für die Glukoseaufnahme in die Zelle einen wesentlich niedrigeren K_m auf als für die Ausschleusung (100). SGLT1 als sekundär aktiver Transporter ist jedoch in der Lage, die intrazelluläre Glukosekonzentration gegenüber der extrazellulären um ein vielfaches zu steigern (34). Dies legt nahe, dass SGLT1 an seiner luminalen Lokalisation die treibende Kraft eines effizienten Glukosetransports in ein von diesem Nährstoff abhängiges Organ darstellt.

In unserem Labor durchgeführte Versuche zur Transkription des neuronalen SGLT1 an postapoplektischen Ratten (passagere Okklusion der A. cerebri media) zeigten interessante Ergebnisse. Im Gegensatz zur gesunden Ratte, hier zeigt sich eine nennenswerte Menge an mRNA für SGLT1 nur in Neuronen, konnte durch In-situ-Hybridisierung eine signifikante Transkription auch in den Kapillarzellen ischämischer Gehirne nachgewiesen werden (24). Möglicherweise liegt die Transkription dieses Proteins in den Kapillaren der Blut-Hirnschranke beim gesunden Tier unter der methodischen Nachweisgrenze der In-situ-Hybridisierung. Nach Apoplex würde sie signifikant hochreguliert und nun über der Nachweisgrenze der in situ Detektion der mRNA liegen. Der mögliche physiologische Nutzen dieser Hochregulierung liegt in einer effektiveren Glukoseaufnahme in ein von Ischämie, Nährstoff- und Sauerstoffmangel bedrohtes Gewebe. In der bereits oben erwähnten Arbeit Robert Poppes wurden auch Experimente bezüglich der Substrataufnahme in normales Hirngewebe und in Hirngewebe nach künstlich induziertem Krampfanfall mittels Autoradiographie nach intravenöser Bolusgabe von radioaktiv markierten Glukoseanaloga durchgeführt. Während sich die Aufnahme des GLUT-Substrats 2-Deoxy-d-(14C)-Glukose nicht signifikant änderte, steigerte sich die Aufnahme bei dem für SGLT1 spezifischen Substrat (14C)methyl- α -D-Glukopyranosid rund um den Focus beträchtlich

(81). Ob dies durch eine Hochregulierung des SGLT1 in den Kapillaren oder den Neuronen zustande gekommen ist, darüber kann derzeit nur spekuliert werden. Interessant wird diese Erkenntnis vor allem im Hinblick auf die in Zukunft immer bedeutsamer werdenden PET-Untersuchungen des Gehirns, die mit dem Tracersubstrat 5-Fuorodesoxyglukose arbeitet. Es ist bereits für den Herzmuskel bekannt, dass dieses Substrat die wahre Glucosaufnahme von reperfundiertem Gewebe deutlich unterschätzt (22). Dies könnte auch beim Gehirn möglich sein, da die möglicherweise funktionell wichtige Glucoseaufnahme über SGLT1 nicht wahrheitsgetreu durch dieses Markermolekül abgebildet wird (68).

Eine weitere interessante Tatsache lässt sich auch durch unsere Forschungsergebnisse leicht erklären: Vorwiegend auf westpazifischen Inseln tritt eine neurodegenerative Erkrankung mit den Zeichen der amyotrophen Lateralsklerose, des Parkinsonismus sowie der Demenz vom Alzheimertypus auf. Als Ursache dieser Erkrankung wird die schleichende Vergiftung mit dem mutagenen Neurotoxin Cycasin angesehen, welches in Pflanzen, die auf diesen Inseln traditionell verzehrt werden, natürlicherweise vorkommt (89). Cycasin ist Substrat des Natrium getriebenen Glukosetransporters SGLT1 (38). 1998 zeigte Matsuoku et al (66) den natrium-abhängigen und durch Phlorizin hemmbaren Transport von Glukose und Cycasin in der Blut-Hirn-Schranke des Rindes. Unsere Untersuchungen liefern nun das morphologische Korrelat für die von dieser Forschungsgruppe vermuteten Lokalisation von SGLT1 im mikrovaskulären System des Gehirns als Ursache der Permeation dieses Giftes in das ZNS und schließlich der Auslösung dieser neurodegenerativen Erkrankung.

4. rSGLT1 in Herz und Skelettmuskel

Ein unerwarteter Befund war der immunhistologische Nachweis dieses Proteins in Kapillaren ausserhalb der Blut-Hirn-Schranke. Obwohl der von mir hergestellte Antikörper nicht mit Zellen des Kapillarsystems von Niere, Darm und Speicheldrüse der Ratte reagierte, zeigten Gewebeproben des Skelettmuskels und des Myokards starke Antigen-Antkörperreaktionen. In der daraufhin durchgeführten Laserscanmikroskopie fand sich keine eindeutige Polarität zur luminalen oder abluminalen Seite der Endothelzellen. Dies könnte darauf hinweisen, dass ein großer Teil des Proteins unter physiologischen Bedingungen in Vesikeln vorgehalten wird und eventuell bei Bedarf in die Membran eingebaut wird. Ein ähnlicher Mechanismus ist auch für den Glucosetransporter GLUT1 in Herzmuskelzellen der Ratte bekannt. Bei Hypoglykämie wird dieser Transporter signifikant hochreguliert (57). Zur Bestätigung des histolo-

gischen Befundes wurde sodann versucht, dieses rSGLT1 mittels Western blot nachzuweisen. Als Kontrolle dienten uns isolierte Membranfraktionen aus Dünndarmpräparaten der Ratte. Hier ließen sich ohne Probleme die in früheren Veröffentlichungen beschriebenen Laufhöhen der Banden reproduzieren. In isolierten Membranfraktionen von Herzendothelzellen jedoch wurde eine schwache Bande etwas über der bei Dünndarmpräparation gesehenen Hauptbande bei etwa 80 kD nachgewiesen. Des weiteren zeigte sich eine starke Reaktion bei circa 120 kD, weit über der erwarteten Laufhöhe, noch etwas unterhalb der Höhe der in den Darmversuchen zu sehenden oligomerbedingten Bande bei circa 160 kD. Wir hielten es für möglich, dass dieser Unterschied in der Laufhöhe durch verschiedenartige posttranslationelle Modifikation des Proteins in den verschiedenen Organsystemen bedingt ist und führten deshalb Deglykosylierungsexperimente durch. Dabei zeigte sich, dass die bei den Endothelzellpräparationen nachzuweisende Bande durch diese Behandlung seine Laufhöhe nicht ändert, diese jedoch genau der Höhe des deglykosylierten Oligomers aus den Dünndarmpräparationen entspricht. Wir nehmen deshalb an, dass SGLT1 in gezüchteten Herzendothelzellen in Form eines nicht glykosylierten Oligomers vorliegt. Zu diesem Ergebnis passend ist der kürzlich in unserem Labor geglückte Nachweis von rSGLT1-mRNA in diesen Endothelzellen (25).

In Zusammenarbeit mit Herrn Professor F. Stümpel (Institut für Biochemie und Zellbiologie der Georg-August-Universität Göttingen) entstanden wichtige funktionelle Daten. So ist bekannt, dass Insulin durch Umverteilung des in den Muskelzellen in subzytolen Vesikeln gespeicherten Transporters GLUT4 die Glukoseaufnahme des Skelettmuskels erhöht (91). In diesen Versuchen wurde gezeigt, dass eben diese durch Insulin erhöhte Glukoseaufnahme im Skelettmuskel durch Gabe von Phlorizin, einem Inhibitor der SGLT-Transporter, der nicht mit Transportern der GLUT-Familie reagiert, blockierbar ist (25). Ähnliche Befunde konnte Herr Dr. H. Gögelein (Firma Aventis Deutschland) an mit Nährlösung perfundierten schlagenden Rattenherzen erheben. Hier zeigte sich, dass nach Zugabe von Phlorizin bei mit reduzierter Glukosekonzentration perfundiertem Herzen sich die Kontraktionskraft signifikant verschlechterte (nicht veröffentlichte Befunde). Dies ist als starker Hinweis darauf zu werten, dass der von uns in den Kapillaren nachgewiesene SGLT1 zusammen mit GLUT4 eine Schlüsselrolle in dem insulingesteuerten Glukosehaushalt der Myozyten/Kardiomyozyten spielt.

An dieser Stelle möchte ich jedoch darauf hinzuweisen, dass die momentane Datenlage nicht ausreicht, um die physiologische und pathophysiologische Bedeutung des SGLT1 in den Kapillaren wirklich zu verstehen.

Falls es sich im Laufe späterer Untersuchungen herausstellen sollte, dass der Beitrag des Natrium-Glukosekotrtransporters SGLT1 für die Passage von D-Glukose durch die Endothelzellen von Muskel und Gehirn nicht wichtig ist, könnte es sein, dass SGLT1 eine Sensorfunktion hat, wie man es sich für den Glukose-gesteuerten Natriumkanal SGLT3 vorstellt (18). Bei veränderten Glukosekonzentrationen in den Kapillaren könnte es durch den Natrium-gekoppelten Glukoseeinstrom über SGLT1 zu einer Depolarisierung der Plasmamembran der Endothelien kommen. Dadurch könnte die Aktivität von Kanälen oder anderen spannungsabhängigen Transportsystemen verändert werden.

Durch unsere Daten könnten bisher ungeklärte Auffälligkeiten bezüglich der Messung der Glukoseaufnahme mit Fluorodesoxyglucose im PET-Verfahren erklärt werden. Doenst und Tägtmeyer beschrieben 1998 (22) eine deutliche Diskrepanz zwischen der durch diese Substanz gemessenen und der tatsächlichen Glukoseaufnahme im reperfundierten postischämischen Herzmuskel der Ratte, vor allem bei realitätsnahen metabolischen Zuständen (Anwesenheit von Fettsäuren etc.). Dies könnte unter anderem dadurch erklärt werden, dass diese Substanz, welche in der heutigen Nuklearmedizin für den Vitalitätsnachweis von minderperfundierte Gewebe (hibernating myocardium) verwendet wird, kein Substrat für Natrium gekoppelte Glukosetransporter wie SGLT1 ist, und so die von diesem Transporter abhängige Glukoseaufnahme durch aktuelle Messmethoden nicht erfasst werden (68). Inwieweit dies von klinischer Relevanz ist, und ob für eine genauere Bestimmung der metabolischen Situation von ischämischen Herzmuskelzellen beim Menschen vielleicht ein anderes Glukosederivat als Nachweismolekül von Vorteil sein könnte, sollte in Zukunft geklärt werden.

Ebenso gilt es zu evaluieren, ob SGLT1, ähnlich wie bei postapoplektischen Tieren eine Bedeutung für die Substratversorgung ischämischer oder reperfundierter Herzmuskelzellen bei oder nach Myokardinfarkt hat, und ob sich hier eine Möglichkeit zur Verbesserung der Substratversorgung des Herzmuskels bei Koronarkranken durch Beeinflussung dieses Transporters ergibt.

In Erprobung befindliche Antidiabetika, welche den Natrium-Glukosekotransport spezifisch hemmen, könnten aufgrund der hier gezeigten Lokalisationen für die Gesundheit eher kontraproduktiv sein und sollten bezüglich möglicher unerwünschter Wirkungen auf das kardiovaskuläre System, die Muskel- und Gehirnfunktion genauer untersucht werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass diese in meiner Arbeit beschriebene Lokalisation von SGLT1 in Kapillaren viele spannende und klinisch relevante Fragen aufwirft, die in Zukunft durch weitere Forschung geklärt werden müssen.

Zusammenfassung

Glukose ist einer der grundlegenden Energielieferanten des Säugetierorganismus. Der Transport von Glukose wird in komplexer Weise reguliert. Zwei große Proteinfamilien mit Glukosetransportern sind bekannt: Die Mitglieder der GLUT-Familie, von denen bisher GLUT1 bis GLUT12 kloniert sind, transportieren Glukose und/oder andere Monosaccharide entlang eines Konzentrationsgradienten. Transporter der SGLT-Familie sind dagegen sekundär aktiv und natriumabhängig. Sie können ihre Substrate auch gegen ein Konzentrationsgefälle transportieren. SGLT1 ist der am besten erforschte Transporter dieser Familie.

In meiner Arbeit habe ich einen polyklonalen Antikörper gegen ein spezifisches Peptid für SGLT1 aus der Ratte gewonnen. Mit diesem Antikörper ließ sich die bekannte Verteilung von SGLT1 in luminalen Membranen von Epithelzellen des Dünndarms und der proximalen Tubuli der Niere immunhistologisch darstellen. Außerdem gelang es, SGLT1 an der basalen Membran von den Azinuszellen der Speicheldrüse nachzuweisen. Hier ist SGLT1 wahrscheinlich für die Substratversorgung bei der Herstellung von Sialoproteinen erforderlich. Interessanterweise konnte ich SGLT1 auch in Kapillaren des Gehirns immunhistologisch nachweisen. Hier scheint SGLT1 vorwiegend in der luminalen Membran lokalisiert zu sein. Zusammen mit GLUT1, der hauptsächlich in der basalen Membran lokalisiert ist, vermittelt SGLT1 offensichtlich den Glukosetransport über die Blut-Hirnschranke. In-situ-Hybridisierungen an Gehirnen nach temporärer Okklusion der Arteria cerebri media legten nahe, dass SGLT1 bei Sauerstoffmangel im Gehirn hochreguliert wird. SGLT1 scheint auch für die Entstehung der ALS-Parkinsonismus-Demenz wichtig zu sein. Diese auf Guam endemisch vorkommende Krankheit wird durch das von SGLT1 transportierte Toxin Cycasin ausgelöst.

Während SGLT1 in Kapillaren von Niere und Darm nicht nachzuweisen war, konnte ich diesen Transporter auch in den Kapillaren von Herz- und Skelettmuskel nachweisen. Allerdings ergaben Western blot Untersuchungen mit primär kultivierten Kapillarendothelzellen des Rattenherzens, dass SGLT1 im Herzen wahrscheinlich als nichtglykosiliertes Oligomer vorliegt. Obwohl vorläufige Daten darauf hindeuten, dass der Glukoseverbrauch im Skelettmuskel durch Hemmung von SGLT1 in den Kapillaren erniedrigt wird, ist die funktionelle Bedeutung von SGLT1 des Transporters unter physiologischen und pathologischen Bedingungen unklar. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Frage, ob Positron-Emissions-Tomographie (PET)-Untersuchungen mit dem Substrat Fluorodesoxyglukose, welches nicht durch SGLT1 transportiert wird, den Glukosemetabolismus in Herz und Gehirn realitätsgetreu abbilden können.

Literaturverzeichnis

1. **Aronson, PS:** Electrochemical driving forces for secondary active transport: energetics and kinetics of Na(+)-H(+)- exchange and Na⁺ glucose cotransport. Soc. Gen. Phys. Ser., 38, 49-70. 1984.
2. **Arrizabalaga, P,** Mirapeix, E, Darnell, A, Torras, A, and Revert, L: Cellular immunity analysis using monoclonal antibodies in human glomerulosclerosis. Nephron, 53, 41-49. 1989.
3. **Bell, JE,** Hume, R, Busutil,A, and Burchell, A: Immunocytochemical detection of the microsomal glucose-6-phosphatase in human brain astrocytes. Neuropath. Appl. Neurobiol., 19, 429-35. 1993.
4. **Bradford, MM:** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248-254. 1976.
5. **Brown, GK:** Glucose transporters: Structure, function and consequences of deficiency. J. Inherit. Metab. Dis., 23, 237-246. 2000.
6. **Burant, CF,** Takeda, J, Brot-Laroche, E, Bell, GI, and Davidson, NO: Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5. J. Biol. Chem., 267, 14523-14526. 1992.
7. **Carayannopoulos, MO,** Chi, MMY, Cui, Y, Pingsterhaus, JM, McKnight, RA, Mueckler, M, Devaskar, SU, and Moley, KH: GLUT8 is a glucose transporter responsible for insulin- stimulated glucose uptake in the blastocyst. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 7313-7318. 2000.
8. **Carlson, J,** Janson, J and Sparrman, M: Protein Purification. VCH Weinheim, 275-329. 1989.
9. **Catty, D,** Jassim, A, Hassan, K, and Raykundalia, C: IgG subclasses in parasitic infestations. Monogr. Allergy, 19, 144-155. 1986.
10. **Chrambach, A,** Rodbard, D: Polyacrylamide gel electrophoresis. Science, 172, 440-451. 1971.
11. **Craik, JD,** Stewart, M and Cheeseman, CI: GLUT-3 (brain type) glucose

- transporter polypeptides in human blood platelets. *Thrombosis Res.*, 79, 461-469. 1995.
12. **Cramer, SC**, Pardridge, WM, Hirayama, B, and Wright, EM: Colocalisation of GLUT2 glucose transporter, sodium/glucose cotransporter, and g-glutamyl transpeptidase in rat kidney with double peroxidase immunocytochemistry. *Diabetes*, 41, 766-770. 1992.
 13. **Cushman, SW**, Wardzala, LJ: Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *255*, 4758-4762. 1980.
 14. **Darakhshan, F**, Hajduch, E, Kristiansen, S, Richter, E, and Hundal, H: Biochemical and functional characterisation of the GLUT5 fructose transporter in rat skeletal muscle. *Biochem. J.*, 336, 361-366. 1998.
 15. **Davidson, NO**, Hausman, AM, Ifkovits, CA, Buse, JB, Gould, GW, Burant, CF, and Bell, GI: Human intestinal glucose transporter expression and localisation of GLUT5. *Am. J. Physiol.*, 262, C795-C800. 1992.
 16. **Dawson, PA**, Mychaleckyj, JC, Fossey, SC, Mihic, SJ, Craddock, AL, and Bowden, DW: Sequence and functional analysis of GLUT10: A glucose transporter in the type2 diabetes-linked region of chromosome 20q12-13.1. *Mol. Gen. Metab.*, 74, 186-199. 2001.
 17. **De Vivo, DC**, Trifiletti, RR, Jacobson, RI, Ronen, GM, Behmand, RA, and Harik, SI: Defective glucose transport across the blood-brain barrier as a cause of persistent hypoglycorrhachia, seizures and development delay. *N. Engl. J. Med.*, 325, 703-709. 1991.
 18. **Diez-Sampedro, A**, Hirayama, B, Osswald, C, Gorboulev, V, Baumgarten, K, Volk, C, Wright, EM, and Koepsell, H: A glucose sensor hiding in a family of transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 11753-11758. 2003.
 19. **Doege, H**, Schürmann, A, Bahrenberg, G, Brauers, A, and Joost, HG: GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *J. Biol. Chem.*, 276, 16275-16280. 2000.
 20. **Doege, H**, Bocianski, A, Joost, HG, and Schürmann, A: Activity and genomic organisation of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the

family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes. *Biochem. J.*, 350, 771-776. 2000.

21. **Doege, H**, Bocianski, A, Scheepers, A, Axer, H, Eckel, J, Joost, HG, and Schürmann, A: Characterisation of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle. *Biochem. J.*, 359, 443-449. 2001.
22. **Doenst, T**, Taegtmeyer, H: Profound underestimation of glucose uptake by [¹⁸F]2-Deoxy-2-fluoroglucose in reperfused heart muscle. *Circulation*, 97, 2454-2462. 1998.
23. **Drenckhahn, D**, Johns, T and Schmitz, F: Production of polyclonal antibodies against proteins and peptides. *Methods Cell Biol.*, 37, 7-56. 1993.
24. **Elfeber, K**, Köhler, A, Lutzenburg, M, Osswald, M, Galla, HJ, Witte, OW, and Koepsell, H: Localisation of the Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT1 in the blood-brain barrier. *Histochem Cell Biol*, 121, 201-207. 2004.
25. **Elfeber, K**, Stümpel, F, Gorboulev, V, Mattig, S, Deussen, A, Kaissling, B, and Koepsell, H: Na⁺-D-glucose cotransporter in muscle capillaries increases glucose permeability. *Bioch Biophys Res Com*, 314, 301-305. 2004.
26. **Farrell, CL**, Pardridge, WM: blood-brain-barrier glucose transporter is assymmetrically distributed on brain capillary endothelial luminal and abluminal membranes: an electron microscopic immunogold study. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88, 5779-5783. 1991.
27. **Firnges, MA**, Lin, JT and Kinne, RKH: Functional asymmetry of the sodium-D-glucose cotransporter expressed in yeast secretory vesicles. *J. Membrane Biol.*, 179, 143-153. 2001.
28. **Fukumoto, H**, Seino, S, Imura, H, Seino, Y, Eddy, RL, Fukushima, Y, Byers, MG, Shows, TB, and Bell, GI: Sequence, tissue distribution, and chromosomal localisation of mRNA encoding a human glucose transporter-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85, 5434-5438. 1988.
29. **Giudicelli, J**, Bertrand, MF, Bilski, S, Tran, TT, and Poiree, JC: Effect of cross-linkers on the structure and function of pig -renal sodium-glucose cotransporters after papain treatment. *Biochem.J*, 330, 733-736. 1998.

30. **Härtig, W**, Brückner, G, Brauer, K, Seeger, G, and Bigl, V: Triple immunofluorescence labelling of parvalbumin, calbindin-D_{28k} and calretinin in rat and monkey brain. *J. Neurosci. Methods*, 67, 89-95. 1996.
31. **Haase, W**, Koepsell, H: Electron microscopic immunohistochemical localisation of components of Na(+)-cotransporters along the rat nephron. *Eur. J. Cell Biol.*, 48, 360-374. 1989.
32. **Haase, W**, Heitmann, K, Friese, W, Ollig, D, and Koepsell, H: Characterisation and histochemical localisation of the rat intestinal Na(+)-D-glucose cotransporter by monoclonal antibodies. *Eur. J. Cell Biol.*, 52, 297-309. 1990.
33. **Hediger, MA**, Coady, MJ, Ikeda, TS, and Wright, EM: Expression cloning and cDNA sequencing of Na⁺/glucose co-transporter. *Nature*, 330, 379-381. 1987.
34. **Hediger, MA**, Rhoads, DB: Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters. *Physiol. Rev*, 74, 993-1026. 1994.
35. **Hermanson, GT**, Mallia, AK, and Smith, PK, Immobilized affinity ligand techniques. San Diego. 1992.
36. **Hierholzer, K** and Fromm, M, Funktion der Nieren. Schmidt, RF, Thews, G (Hrsg): *Physiologie des Menschen*, 26. Auflage, 737-777. 1996.
37. **Hirayama, B**, Wright, EM: Glycosylation of the rabbit intestinal brush border Na⁺/glucose cotransporter. *Biochim. Biophys. Acta*, 1103, 37-44. 1992.
38. **Hirayama, B**, Hazama, A, Loo, DF, Wright, EM, and Kisby, GE: Transport of Cycasin by the intestinal Na(+)-glucose cotransporter. *Biochim. Biophys. Acta*, 1193, 151-154. 1994.
39. **Hirayama, B**, Lostao, MP, Panayotova-Heiermann, M, Loo, DD, Turk, E, and Wright, EM: Kinetic and specificity differences between rat, human, and rabbit Na⁺-glucose cotransporters (SGLT-1). *Am. J. Phys.*, 270, G919-G929. 1996.
40. **Hogan, A**, Heyner, S, Charron, MJ, Copeland, SW, Gilbert, EJ, Jenkins, NA, Thorens, B, and Schultz, GA: Glucose transporter gene expression in early mouse embryos. *Development*, 113, 363-372. 1991.

41. **Ibberson, M**, Uldry, M and Thorens, B: GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissue. *J. Biol. Chem.*, 275, 4607-4612. 2000.
42. **Icard, P**, Saumon, G: Alveolar sodium and liquid transport in mice. *Am. J. Physiol.*, 277, L1232-L1238. 1999.
43. **Illsley, NP**: Glucose transporters in the human placenta. *Placenta*, 21, 14-22. 2000.
44. **Inukai, K**, Katagiri, H, Takata, K, Asano, T, Anai, M, Ishihara, H, Nakazaki, M, Kikuchi, M, Yazaki, Y, and Oka, Y: Characterisation of rat GLUT5 and functional analysis of chimeric proteins of GLUT1 glucose transporter and GLUT5 fructose transporter. *Endocrinology*, 136, 4850-4857. 1995.
45. **James, DE**, Strube, M and Mueckler, M: Molecular cloning and characterisation of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature*, 338, 83-87. 1989.
46. **Joost, HG**, Bell, GI, Best, JD, Birnbaum, MJ, Charron, MJ, Chen, YT, Doege, H, James, DE, Moley, KH, Moley, JF, Mueckler, M, Rogers, S, Schürmann, A, Seino, S, and Thorens, B: Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am. J. Physiol.*, 282, E974-E976. 2002.
47. **Khan, JM**, Wingertzahn, MA, Teichberg, S, Vancurova, I, Harper, RG, and Wapnir, RA: Development of the intestinal SGLT1 transporter in rats. *Mol. Gen. Metabol.*, 69, 233-239. 2000.
48. **Kanai, Y**, Lee, WS, You, G, Brown, D, and Hediger, MA: The human kidney low affinity Na(+)-glucose Cotransporter SGLT2. Delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose. *J. Clin. Invest.*, 93, 397-404. 1994.
49. **Karbach, U**, Kricke, J, Meyer-Wentrup, F, Gorboulev, V, Volk, C, Loffing-Cueni, D, Kaissling, B, Bachmann, S, and Koepsell, H: Localisation of organic cation transporters OCT1 and OCT2 in rat kidney. *Am. J. Physiol.*, 279, F679-F687. 2000.
50. **Kasahara, M**, Hinkle, PC: Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 252, 7384-7390. 1977.
51. **Kayano, T**, Fukumoto, H, Eddy, RL, Fan, YS, Byers, MG, Shows, TB, and

- Bell, GI: Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins: sequence and gene localisation of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues. *J. Biol. Chem.*, 263, 15245-15248. 1988.
52. **Kayano, T**, Burant, CF, Fukumoto, H, Gould, GW, Fan, YS, Eddy, RL, Byers, MG, Shows, TB, Seino, S, and Bell, GI: Human facilitative glucose transporters. Isolation, functional characterisation, and gene localisation of cDNAs encoding an isoform (GLUT5) expressed in small intestine, kidney, muscle, and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT6). *J. Biol. Chem.*, 265, 13276-13282. 1990.
53. **Kellett, GL**: The facilitated component of intestinal glucose absorption. *J. Physiol.*, 531, 585-595. 2001.
54. **Kobayashi, M**, Nikami, H, Morimatsu, M, and Saito, M: Expression and localisation of insulin-regulatable glucose transporter (GLUT4) in rat brain. *Neurosci Lett.*, 213, 103-106. 1996.
55. **Kong, CT**, Yet, SF and Lever, JE: Cloning and expression of a mammalian Na⁺/amino acid cotransporter with sequence similarity to Na⁺/glucose cotransporters. *J. Biol. Chem.*, 268, 1509-1512. 1993.
56. **Laemmli, UK**: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685. 1970.
57. **Laybutt, DR**, Thompson, AL, Cooney, GJ, and Kraegen, EW: Selective chronic regulation of GLUT1 and GLUT4 content by insulin, glucose, and lipid in rat cardiac muscle in vivo. *Am. J. Physiol.*, 273, H1309-H1316. 2001.
58. **Lazaridis, KN**, Pham, L, Vroman, B, de Groen, PC, and LaRusso, NF: Kinetic and molecular identification of Sodium dependent glucose transporter in normal rat cholangiocytes. *Am. J. Physiol.*, 272, G1168-G1174. 1997.
59. **Lee, WS**, Kanai, Y, Wells, RG, and Hediger, MA: The high affinity Na⁽⁺⁾-glucose cotransporter. Re-evaluation of function and distribution of expression. *J. Biol. Chem.*, 269, 12032-12039. 1994.
60. **Lemp, D**, Haselbeck, A and Klebl, F: Molecular cloning and heterologous expression of N-glycosidase F from *Flavobacterium meningosepticum*. *J. Biol. Chem.*, 265, 15606-15610. 1990.

61. **Lin, JT**, Kormanec, J, Wehner, F, Wielert-Badt, S, and Kinne, RKH: High-level expression of Na⁺/D-glucose cotransporter (SGLT1) in a stably transfected Chinese hamster ovary cell line. *Biochim. Biophys. Acta*, 1373, 309-320. 1998.
62. **Loo, DD**, Zeuthen, T, Chandy, G, and Wright, EM: Cotransport of Water by the Na⁺/glucose cotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 13367-13370. 1996.
63. **Lowry, OH**, Rosebrough, NJ, Farr, AL, and Randall, RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-276. 1951.
64. **Mackenzie, B**, Panayotova-Heiermann, M, Loo, DD, Lever, JE, and Wright, EM: SAAT1 is a low affinity Na⁺/glucose cotransporter and not an amino acid transporter. A reinterpretation. *J. Biol. Chem.*, 269, 22488-22491. 1994.
65. **Mann, GE**, Yudilevich, DL, and Sobrevia, L: Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiol. Rev.*, 183-252. 2003.
66. **Matsuoka, T**, Nishizaki, T and Kisby, GE: Na⁽⁺⁾-dependent and Phlorizin-Inhibitable Transport of Glucose and Cycasin in Brain Endothelial Cells. *J. Neurochem.* 70, 772-777. 1998.
67. **Medina, RA**, and Owen, GI: Glucose transporters: expression, regulation and cancer. *Biol. Res.*, 35. 2002.
68. Miller, JH, Mulin JM, McAvay, E, and Kleinzeller, A: Polarity of transport of 2-deoxy-D-glucose by cultured renal epithelia (LLC-PK 1). *Biochim. Biophys. Acta* 1110, 209-217. 1992
69. **Mooradian, AD**, Chehade, JM and Kim, J: Age-related changes in thyroid hormone effects on glucose transporter isoforms in rat heart. *Life Sci.*, 65(10), 981-989. 1999.
70. **Mueckler, M**, Caruso, C, Baldwin, SA, Panico, M, Blench, I, Morris, HR, Allard, WJ, Lienhard, GE, and Lodish, HF: Sequence and structure of a human glucose transporter. 4717. *Science*, 229, 941-945. 1985.
71. **Nagamatsu, S**, Sawa, H, Kamada, K, Nakamichi, Y, Yoshimoto, K, and

- Hoshino, T: Neuron-specific glucose transporter (NSGT), CNS distribution of GLUT3 rat glucose transporter (RGT3) in rat central neurons. *FEBS Lett.*, 334, 289-295. 1993.
72. **Nishizaki, T**, Kammesheit, A, Sumikawa, K, Asada, T, and Okada, Y: A sodium- and energy-dependent glucose transporter with similarities to SGLT1-2 is expressed in bovine cortical vessels. *Neurosci. Res.*, 22, 13-22. 1995.
73. **Nishizaki, T**, Matsuoka, T: Low glucose enhances Na⁺/glucose transport in bovine brain artery endothelial cells. *Stroke*, 29, 844-849. 1998.
74. **North, PE**, Waner, M, Mizeracki, A, and Mihm, MC: GLUT1: a newly discovered immunohistochemical marker for juvenile hemangiomas. *Hum. Pathol.*, 31, 11-22. 2000.
75. **Nuck, R**, Zimmermann, M, Sauvageot, D, Josi, D, and Reutter, W: Optimized deglycosilation of glycoproteins by the peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)-asparaginase amidase from *Flavobacterium meningosepticum*. *Glycoconj. J.*, 7, 279-286. 1990.
76. **Oyama, Y**, Yamano, H, Ohkuma, A, Ogawara, K, Higaki, K, and Kimura, T: Carrier-mediated transport systems for glucose in mucosal cells of the human oral cavity. *J. Pharm. Sci.*, 88, 830-834. 1999.
77. **Pardridge, WM**, Boado, RJ and Farrell, CJ: Brain-type glucose transporter (GLUT1) is selectively localised to blood brain barrier. Studies with quantitative western blotting and in situ hybridisation. *J. Biol. Chem.*, 265, 18035-18040. 1990.
78. **Payne, J**, Maher, F, Simpson, IA, Mattice, LA, and Davies, P: Glucose transporter GLUT 5 glucose transporter expression in microglial cells. *Glia*. 21, 327-331. 1996.
79. **Peterson, GL**, Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal. Biochem.*, 100, 201-220. 1979.
80. **Phay, JE**, Hussain, HB and Moley, JF: Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family, SLC2A9 (GLUT9). *Genomics*, 66, 217-220. 2000.

81. **Poppe, R**, Karbach, U, Gambaryan, S, Wiesinger, H, Lutzenburg, M, Kraemer, M, Witte, OW, and Koepsell, H: Expression of the Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT1 in neurons. *J. Neurochem.*, 69, 84-94. 1997.
82. **Rand, EB**, Depaoli, AM, Davidson, NO, Bell, GI, and Burant, CF: Sequence, tissue distribution, and functional characterisation of the rat fructose transporter GLUT5. *Am. J. Physiol.*, 264, G1169-G1176. 1993.
83. **Rogers, S**, Macheda, ML, Shiohama, A, Shintani, A, Henderson, MA, Soeller, WC, Gibbs, EM, James, DE, and Best, JD: Identification of a novel glucose transporter-like protein GLUT-12. *Am. J. Physiol.*, 282, E733-E738. 2002.
84. **Sandermann, H Jr**, Strominger, JL: Purification and properties of C 55 - isoprenoid alcohol phosphokinase from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, 247, 5123-5131. 1972.
85. **Santer, R**, Schneppenheim, R, Suter, D, Schaub, J, and Steinmann, B: Fanconi-Bickel syndrome - the original patient and his natural history, historical steps leading to the primary defect, and a review of the literature. *Eur. J. Pediatr.*, 157, 783-797. 1998.
86. **Shennan, DB**, Beechey, RB: Mechanisms involved in the uptake of D-glucose into the milk producing cells of rat mammary tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 211, 986-990. 26-5-1995.
87. **Shepherd, PR**, Gibbs, EM, Wesslau, C, Gould, GW, and Kahn, BB: Human small intestine facilitative fructose/glucose transporter (GLUT5) is also present in insulin responsive tissues and brain. Investigation of biochemical characteristics and translocation. *Diabetes*, 41, 1360-1365. 1992.
88. **Shepherd, PR**, Gould, GW, Collville, CA, McCoid, SC, Gibbs, EM, and Kahn, BB: Distribution of GLUT3 glucose transporter protein in human tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 188, 149-154. 1992.
89. **Spencer, PS**: Guam ALS/Parkinsonism-Dementia: A long latency neurotoxic disorder caused by "slow toxin(s)" in food? *Can. J. Neurol. Sci.*, 14, 347-357. 1987.
90. **Sugawara-Yokoo, M**, Suzuki, T, Matsuzaki, T, Naruse, T, and Takata, K: Presence of fructose transporter GLUT5 in the S3 proximal tubules in the

- rat kidney. *Kidney Int.*, 56, 1022-1028. 1999.
91. **Suzuki, K**, Kono, T: Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 2542-2545. 1980.
 92. **Takata, K**, Kasahara, T, Kasahara, M, Ezaki, O, and Hirano, H: Lokalisation of Na(+)-dependent active type and erythrocyte/HepG2-type glucose transporters in rat kidney: immunofluorescence and immunogold study. *J. Histochem. Cytochem.*, 39, 287-298. 3-1-1991.
 93. **Takata, K**, Kasahara, T, Kasahara, M, Ezaki, O, and Hirano, H: Immunohistochemical lokalisaation of Na⁺-dependent glucose transporter in rat jejunum. *Cell Tissue Res.*, 267, 3-9. 1992.
 94. **Tarentino, AL**, Gomez, CM and Plummer, TH Jr: Deglycosilation of asparagine-linked glykans by peptide:N-glykosidase F. *Biochemistry*, 24, 4665-4671. 1985.
 95. **Tarpey, PS**, Shirazi-Beechey, SP and Beechey, RB: Molecular characterisation of the Na⁺/glucose cotransporter from the sheep parotid gland acinar cell. *Biochem. Soc. Trans.*, 22, 264S. 1994.
 96. **Tarpey, PS**, Wood, IS, Shirazi-Beechey, SP, and Beechey, RB: Amino acid sequence and the cellular localisation of the Na(+)-dependent D-glucose symporter in the ovine enterocyte and the parotid acinar cell. *Biochem. J.*, 312, 293-300. 15-11-1995.
 97. **Tartaglia, LA**, Weng, X: Nucleic acid molecules encoding GLUTX and uses thereof. US Patent No. 5, 943, 398. 1999.
 98. **Thorens, B**, Sarkar, HK, Kaback, H, and Lodish, HF: Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. *Cell*, 55, 281-290. 1988.
 99. **Thorens, B**, Charron, MJ and Lodish, HF: Molecular physiology of glucose transporters. *Diabetes Care*, 13, 209-218. 1990.
 100. **Thorens, B**: Faciliated glucose transporters in epithelial cells. *Annu. Rev. Physiol.*, 55, 591-608. 1993.

101. **Towbin, H**, Staehelin, T and Gordon, J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Science*, 76, 4350-4354. 1979.
102. **Turk, E**, Martin, MG and Wright, EM: Structure of the human Na⁺/glucose cotransporter gene SGLT1. *J Biol Chem.*, 269, 15204-15209. 1994.
103. **Turk, E**, Kerner, CE, Lostao, MP, and Wright, EM: Membrane topology of the human Na⁺/glucose cotransporter cotransporter SGLT1. *J. Biol. Chem.*, 271, 1925-1934. 1996.
104. **Turk, E**, Wright, EM: Membrane topology motifs in the SGLT Cotransporter family. *J. Membr. Biol.*, 159, 1-20. 1997.
105. **Turner, JR**: Show me the pathway! Regulation of the paracellular permeability by Na⁽⁺⁾-glucose cotransport. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 41(3), 265-281. 2000.
106. **Vannucci, S**, Maher, F and Simpson, IA: Glucose transporters proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia*, 21(2), 2-21. 1997.
107. **Waddell, ID**, Zomerschoe, AG, Voice, MW, and Burchell, A: Cloning and expression of an intrahepatic microsomal transport protein: Comparison with liver plasma membrane transport protein GLUT2. *Biochem. J.*, 286, 173-177. 1992.
108. **Wood, IS**, Trayhurn, P: Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transporter proteins. *Br. J. Nutr.*, 89, 3-9. 2003.
109. **Wright, EM**: Genetic disorders of Membrane transport: I. Glucose galactose malabsorption. *Am. J. Physiol.*, 275, G879-G882. 1998.
110. **Wright, EM**: Renal Na⁽⁺⁾Glucose cotransporters. *Am. J. Physiol.*, 280, F10-F18. 2001.
111. **Wright, EM**, Turk, E: The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch*, 447, 813-815. 2004.
112. **Yoshida, A**, Takata, K, Kasahara, T, Aoyagi, T, Saito, S, and Hirano, H: Immunohistochemical localisation of Na⁽⁺⁾-dependent glucose transporter in the rat digestive tract. *Histochem. J.*, 27, 420-426. 1995.

113. **Zhou, J**, Bondy, C. A: Placental glucose transporter gene expression and metabolism in the rat. *J. Clin. Invest.*, 91, 845-852. 1993.
114. **Zhou, L**, Cryan, EV, D'Andrea, MR, Belkowski, S, Conway, BR, and Demarest, KT: Human cardiomyocytes express high level of Na⁺/glucose cotransporter 1 (SGLT1). *J Cell Biochem*, 90, 339-346. 2003.

Danksagung

Herrn Professor Dr. Hermann Koepsell gebührt mein besonderer Dank für die intensive Betreuung meiner Arbeit. Im Labor und beim Verfassen der Dissertation war er ein stets geduldiger Lehrer. Durch ihn erlangte ich einen hervorragenden Einblick in die Welt der wissenschaftlichen Grundlagenforschung.

Bei Frau Professor Dr. Michaela Kuhn möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferates bedanken.

Frau Professor Dr. Brigitte Kaissling und Ihre Mitarbeiter empfingen mich äusserst herzlich im Anatomischen Institut der Universität Zürich. Durch Ihre Hilfe lernte ich die Qualität der Immunhistologie wesentlich zu verbessern.

Herrn Dr. Ulrich Karbach möchte ich für seine umfangreiche Einführung in die Welt der Histologie herzlich danken.

In dankbarer Erinnerung werde ich Herrn Dr. Andreas Schmidlin behalten. Vor seinem viel zu frühen Tod lehrte er mir geduldig die Durchführung der proteinchemischen Methoden.

Frau Dr. Christina Osswald, Herr Dr. Valentin Gorboulev, Herr Dr. Thomas Kühlkamp, Frau Dr. Maike Vehyl, Herr Dr. Christopher Volk und Herr Dr. Bernhard Schmitt standen mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite. Dafür möchte ich mich herzlich bei ihnen bedanken.

Frau Irina Schatz verstand es auch in härteren Zeiten mir immer wieder Mut zu machen. Ihre warmherzige Art wird mir immer in Erinnerung bleiben.

Besonders danke ich meinem Mann, Dr. Marco Elfeber, er bekochte mich und ermunterte mich unermüdlich.

Ganz besonders herzlich möchte ich meiner Familie danken, insbesondere meinen Eltern Monika und Klaus Schwaiger, sowie meinem Großvater Hans Klingenschmidt. Ohne Ihre Unterstützung wäre mein Studium und diese Arbeit niemals möglich gewesen.

Lebenslauf

Name: Elfeber, geb. Schwaiger
Vorname: Katrin
Geburtsdatum: 04. Juli 1977
Geburtsort: Regensburg
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: verheiratet
Adresse: Ingolstädterstr. 78 B
85080 Gaimersheim
Telefonnummer: 08458-603564
E-mail: kschwaiger@web.de
Schulbildung: 1983 bis 1987: Grundschule in Ingolstadt
1987 bis 1996: Reuchlin- Gymnasium in Ingolstadt
Juli 1996: allgemeine Hochschulreife
Hochschulbildung: Wintersemester 1996/97 bis Wintersemester 2001/02:
Medizinstudium an der Bayerischen Julius Maximilians
Universität Würzburg
Sommersemester 2002 bis Sommersemester 2003:
Medizinstudium im Praktischen Jahr an der Ludwigs
Maximilians Universität München
September 1998: Ärztliche Vorprüfung
August 1999: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 2002: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 2003: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Studienförderung: Während des gesamten Studiums Förderung nach dem
bayerischen Begabtenförderungsgesetz
Beruflicher Werdegang: Juli 2003 bis September 2004 Ärztin im Praktikum,
seit Oktober 2004 Assistenzärztin an der Medizinischen
Klinik I des Klinikums Ingolstadt unter der Leitung von
Herrn Professor Dr . med. C. Pfafferott

Gaimersheim, den 12.Dezember 2005



Katrin Elfeber