

**Aus der Klinik und Poliklinik für
Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. J. Deckert

**Funktionelle Untersuchung zur Duplikation
des *SLC2A3*-Gens in Patienten mit
Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung**

Inaugural - Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät**

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Can-Florian Keleş

aus Egelsbach

Würzburg, (März) 2021

Referent: Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch

Korreferent: Prof. Dr. Ulrich Schlagenhaut

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: _____

Der Promovend ist Facharzt für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS)	2
1.1.1 Diagnose, Symptome, Entwicklung und Komorbidität	2
1.1.2 Ätiologie	4
1.2 Glukose und Glukosetransport	7
1.2.1 Glukose-Metabolismus	8
1.2.2 Glukose-Homöostase des Gehirns	12
1.2.3 Glukosetransportmechanismen und die Zellmembran.....	15
1.2.4 Die <i>SLC2A</i> -Familie der Glukose-Transporter (GLUTs).....	16
1.3 GLUT3 und das Nervengewebe.....	17
1.3.1 GLUT1 versus GLUT3	18
1.3.2 Expression in Nagern und im Menschen	19
1.3.3 Neuroinflammation und GLUT3-Expression in Nervengewebszellen	22
1.3.4 Aufbau und Transport	23
1.3.5 Das <i>SLC2A3</i> -Gen und seine Kopienanzahlvariationen (CNV)	25
1.4 Ziel dieser Thesis	28
2 Material und Methoden	29
2.1 Kultivierung und Lagerung von EBV-LCLs	29
2.2 Messung der Glukoseaufnahme	30
2.2.1 Produktangaben.....	31
2.2.2 Initiales Versuchsprotokoll	32
2.2.3 Modifizierung und Standardisierung des Protokolls.....	33
2.2.4 Varianzreduktion durch Protokollverbesserung	35
2.2.5 Versuch über vier Tage	36
2.3 Statistische Verfahren	37
2.3.1 Deskriptive Beschreibung des Datensatzes – grundlegende Eigenschaften	37
2.3.2 Eigenschaften der endogenen Variable (CPM).....	38
2.3.3 Lineares Gemischtes Model	41
3 Ergebnisse	44
3.1 Erster Messzeitpunkt (t1).....	45
3.2 Zweiter Messzeitpunkt (t2)	45
4 Diskussion	46
4.1 <i>SLC2A3</i> -Duplikation und der GLUT3	47
4.1.1 <i>Gain-of-Function-Mutation</i> durch Kofaktoren	47
4.1.2 RNA und Translation	48
4.2 Methodische Diskussion	50
4.2.1 Messung der Proteinexpression mit der Western blot-Methode	50
4.2.2 Modifizierung des Protokolls zur [3H]-2-Desoxyglukoseaufnahme.....	51
4.2.3 Zellintrinsische Eigenschaften der EBV-LCLs und deren Einflüsse auf Messergebnisse	52
4.3 Nervengewebe und ADHS	54
4.3.1 Histologie	54
4.3.2 Neuroplastizität durch Neuroinflammation	55
4.3.3 Zuckerkonsum.....	55
4.3.4 Epigenetik von ADHS	56
4.4 Ausblick	57
4.4.1 Variation der Untersuchung: Mögliche Kofaktoren auf die <i>SLC2A3</i> -Duplikation ...	57
4.4.2 Anmerkungen zu fortführenden Untersuchungen	58
4.4.3 Genetik und Therapie	59
4.4.4 Geschichtlicher Kontext.....	60
5 Zusammenfassung.....	62
5.1 Fragestellung und zentrale Untersuchung	62
5.2 Wichtigste Ergebnisse	62

6 Literaturverzeichnis	66
7 Abbildungsverzeichnis	
8 Tabellenverzeichnis	
9 Eidesstattliche Erklärung	
10 Abkürzungen	
11 Danksagung.....	
12 Tabellarischer Lebenslauf	
13 Anhang	

1 Einleitung

Die weltweite Prävalenz psychischer Erkrankungen unter Kindern und Jugendlichen vom 5. - 19. Lebensjahr beträgt in der westlichen Bevölkerung nach einer Metastudie von *Polanczyk et al.* (2015) 13,4%, was etwa 241 Millionen Menschen entspricht. Dabei fallen 63 Millionen unter den Symptomkomplex der „Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung“ (ADHS; unter den häufigsten Störungen mit etwa 26%). Die ADHS zeigt insgesamt eine Prävalenz von 2,6 - 4,5% [1].

Gemäß der „Global Burden of Disease“ Studie (2013) belegt die Kategorie „sonstige psychische Störung und sonstiger Substanzmissbrauch“ den 8. Platz unter den „Top 10 Gründen für verlorene Lebensjahre durch eine Behinderung“¹ mit einem mittleren Behinderungsindex zur Lebensqualität von 3,7%². – „Psychische Störungen und Substanzmissbrauch waren [außerdem] die führende Ursache [für verlorene Lebensjahre] für beide Geschlechter zwischen 10-24 Jahren“ [2]. Hierunter fällt auch die ADHS [3]. Anhand der negativen Auswirkungen von ADHS (siehe Kapitel 1.1.1) wird die Notwendigkeit der Untersuchung psychischer Störungen deutlich. „Das Gehirn [beziehungsweise dessen Nervengewebe] bleibt eines der wichtigsten, aber am wenigsten verstandenen Gewebe in unserem Körper [...]“ [4].

In der Regel sind das Gehirn und dessen Pathologien sowohl der Umwelt als auch genetischen Prädispositionen unterworfen und werden von diesen beeinflusst [5]. Infolge der engen Verknüpfung ist das Nervengewebe wohl in der Lage, Informationen über die Umwelt in die Keimbahn einfließen zu lassen [6].

¹ Depression (Platz 2 mit 12,1%), Migräne (Platz 4 mit 5,6%), Angststörungen (Platz 5 mit 5,4%), Drogenmissbrauch (Platz 7 mit 3,8%), Bipolare Störung (Platz 10 mit 2,4%); alle Angaben auf die Gruppe der 20-24-Jährigen bezogen

² mit Männern auf Platz 4 mit 4,9% im Mittel und für Frauen auf Platz 10 mit 2,5% im Mittel

1.1 Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS)

ADHS zählt zu den häufigsten psychischen Störungen bei Kindern und Jugendlichen [7]. Sie tritt in der Regel erstmalig vor der Pubertät auf, wobei Jungen häufiger diagnostiziert werden als Mädchen [8], da sich Ausprägungen geschlechterspezifisch zeigen [9]. Da die Symptome bei bis zu 65% der Betroffenen bis ins Erwachsenenalter persistieren [10] [11], sind etwa 2 - 4% der Erwachsenen von ADHS betroffen [12].

ADHS manifestiert sich in verschiedenen psychischen Bereichen wie der Aufmerksamkeitssteuerung, Impulskontrolle und Psychomotorik. Die Erkrankung gehört zur Gruppe der „Verhaltens- und emotionalen Störungen mit Beginn in der Kindheit und Jugend“ (ICD-10: F90-F98) [13]. *Pievsky et al.* (2017) zeigten in ihrem Metaanalysen-Review, dass die Gruppe der ADHS-Patienten in neurokognitiven Tests signifikant und konsistent schlechter abschneidet als die gesunde Kontrollgruppe. Dabei manifestiert sich dieser Effekt stärker bei jüngeren Testpersonen und nimmt mit dem Alter ab [14].

1.1.1 Diagnose, Symptome, Entwicklung und Komorbidität

Diagnose

Bislang existiert kein einheitlicher, simpler Test zur Diagnostik der ADHS [15]. Das Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5), das Klassifikationssystem der American Psychiatric Association (APA) [16], besagt, dass sich die Symptome der ADHS noch vor dem zwölften Lebensjahr in unterschiedlichen Lebensbereichen zeigen müssen (zum Beispiel in der Schule oder zu Hause, mit Freunden oder Verwandten) und zu deutlichen schulischen/beruflichen Minderleistungen oder sozialen Defiziten führen müssen. Für die Diagnose muss ausgeschlossen werden, dass die Symptome auf andere psychische Störungen zurückzuführen sind und dabei klar vom Reifegrad des Kindes abweichen (eine Ausnahme hiervon sind die Störungen des Autismus-Spektrums – jene Symptome sind kein Ausschluss mehr für eine komorbide ADHS-Diagnose) [17].

Symptome

Nach DSM-5 sind die Kernsymptome der ADHS eine beständige Unaufmerksamkeit und/oder Hyperaktivität/Impulsivität, welche das Funktionsniveau oder die Entwicklung des Leidenden beeinträchtigen. Die Unaufmerksamkeit zeigt sich bei der ADHS im Verhalten als Nichtbeachten von Einzelheiten, „Flüchtigkeitsfehlern“, unfokussiertes Verhalten (in Gedanken woanders sein, „verträumt sein“), vorzeitiges Abbrechen von Handlungen/Aufgaben, Desorganisation, negative Einstellung gegenüber längerer Arbeit, das Verlieren oder Verlegen von Gegenständen sowie leichte Ablenkbarkeit. Die Symptome sind dabei nicht der ausschließliche Ausdruck von oppositionellem Verhalten oder Verständigungsproblemen [16]. Die Hyperaktivität/Impulsivität bezieht sich auf einen gesteigerten Bewegungsdrang (auch beim Sprechen und der Interaktion mit Anderen), welcher nicht den sozialen Konventionen entspricht. Hierzu gehören Zappeln, das nicht still sitzenbleiben Können, Herumrennen, häufige Schwierigkeit, sich ruhig zu beschäftigen, Logorrhoe, Ruhelosigkeit und unüberlegtes Handeln.

Der Schweregrad wird nach DSM-5 in leicht, mittel und schwer eingeteilt, wobei sich dieser auf die quantitativen und qualitativen Symptome und auf die Beeinträchtigung des Leidenden bezieht [18].

Entwicklung

Die Symptome differieren bei Betroffenen meist abhängig vom Alter in ihrer Ausprägung: Während Kleinkinder oftmals ein hyperaktiv-impulsives Verhalten ohne sichtbare Aufmerksamkeitsstörung aufweisen, nimmt diese motorische Unruhe während der Adoleszenz ab, wobei die Aufmerksamkeitsdefizite hingegen immer deutlicher werden. Unter Erwachsenen ist die alleinige Aufmerksamkeitsstörung ohne deutliche Hyperaktivität schließlich die häufigste Form [7].

Komorbidität

Die ADHS wird sehr häufig von anderen psychischen Störungen begleitet. Es ist dabei wahrscheinlicher, dass ein ADHS-Patient unter mindestens einer weiteren psychischen Erkrankung leidet als ausschließlich unter ADHS [19] [20] [21]. Weitere Auffälligkeiten sind beispielsweise oppositionelles Trotzverhalten, andere Verhaltensstörungen, Stimmungsschwankungen, Angststörungen und Depressionen [22]. Weiterhin in Zusammenhang stehend sind Lernschwierigkeiten (häufig Dyslexie, diskutiert wird auch Dyskalkulie), das Tourette-Syndrom sowie Zwangs- und Tic-Störungen [19] [16]. ADHS scheint bemerkenswerterweise unter anderem mit einer negativen Korrelation des Intelligenzquotienten (IQ) einherzugehen [23]. Nach einer großen dänischen Geburtskohortenstudie haben ADHS-Patienten eine geringere Lebenserwartung, mit einer doppelt so hohen Mortalität³, als vergleichbar gesunde. Dieser Effekt verstärkt sich durch einige Komorbiditäten⁴ und ist bei weiblichen Leidenden stärker ausgeprägt [24].

1.1.2 Ätiologie

Der Ursprung der ADHS ist seit langem Gegenstand der Forschung. Ein vergleichbarer Phänotyp wurde bereits 1775 unter den „Geisteskrankheiten“ von dem deutschen Arzt Melchior Adam Weikard in seinem Buch „Der philosophische Arzt“ als „*attentio volubilis*“ beschrieben [25]. Jedoch ist auch über 200 Jahre später die Ätiologie noch nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass die Entstehung durch ein multifaktorielles Zusammenspiel von Umwelteinflüssen und Genetik bedingt ist [26] [27] [28]. Die komplexe Erbllichkeit dieser polygenetischen Pathologie wird dabei intensiv untersucht [29] [30] mit über 2.800 Veröffentlichungen zum Jahresbeginn 2014 [31].⁵ Evolutionsbiologische Hypothesen werden von *Thagaard et al.* (2016) in ihrem Review beleuchtet, wobei noch keine empirische Evidenz für diese aufgezeigt werden kann [32].

³ Bedeutung laut Duden: „Verhältnis der Zahl der Todesfälle zur Zahl der statistisch berücksichtigten Personen“

⁴ oppositionelles Trotzverhalten, Verhaltensstörungen und Substanzmissbrauch

⁵ Eine Pubmed-Suchanfrage mit den zwei Begriffen „ADHD“ und „genetics“ ließ zum Oktober 2019 über 4.500 Ergebnisse erscheinen.

Umwelteinflüsse und Zuckerkonsum

Diskutiert werden Einflüsse durch Umweltfaktoren wie Exposition gegenüber Metallen (Blei, Mangan) oder Chemikalien (Chlorkohlenwasserstoffe, Organophosphat-Pestizide, Phthalate) [33]. Unter den Risikofaktoren, welche pränatal ansetzen, zeigen Frühgeburtlichkeit und eine verringerte Größe des Fötus den größten Einfluss. Diskutiert werden auch ein geringes Geburtsgewicht, Schwangerschafts-, peri- oder postnatale Komplikationen, Missbrauch von Alkohol, Tabak (siehe Kapitel 4.4.2) oder anderen Drogen, die mütterliche Einnahme von Antidepressiva oder Paracetamol (siehe Kapitel 1.3.3), das maternale Alter während der Schwangerschaft sowie die körperliche und psychische Verfassung der Mutter [34].

Eine mögliche Assoziation von Zuckerkonsum und Ernährung mit der Manifestation der ADHS-Symptomatik wurde in zahlreichen Studien untersucht, ohne dass bisher ein eindeutiger Zusammenhang bewiesen werden konnte. Während die Metaanalyse von *Wolraich et al.* (1995) diesbezüglich ein negatives Ergebnis erbrachte [35], weisen einige spätere Studien dennoch auf einen Zusammenhang zwischen Ernährung und der ADHS-Symptomatik hin [36] [37] [38] [39] [40]. Andere stützen die Hypothese, dass die gesteigerte Zuckierzufuhr „eher eine Konsequenz der Pathologie darstellt, als einen bestimmenden krankheitsauslösenden Faktor“ [41] [42]. In einer Metaanalyse von *Pelsser et al.* (2017) wurde untersucht, ob sich die Einhaltung eines Ernährungsplans positiv auf die Symptome auswirkt, jedoch ohne eindeutiges Ergebnis [43]. Dennoch wird das Essverhalten immer wieder mit der ADHS und deren Symptomen in Verbindung gebracht. Eine signifikante Korrelation besteht nachweislich zu Essstörungen [44]. ADHS steht nach einer Metaanalyse von *Nigg et al.* (2016) in milder Korrelation zu Übergewicht. Dieser Effekt ist stärker unter Erwachsenen zu beobachten und dabei besonders ausgeprägt unter weiblichen Patienten [45].

Vererbung und Kopienanzahlvarianten (CNVs)

Neben dem Einfluss von Umweltfaktoren spielt die hereditäre Disposition eine wesentliche Rolle für die Ätiologie der ADHS: Unter Verwandten ersten Grades herrscht ein zwei- bis achtfach höheres Risiko, ebenfalls an ADHS zu leiden als in Familien, in denen kein Elternteil betroffen ist. Mit Zwillingsstudien lassen sich genetische Einflüsse arithmetisch ermitteln. So wurden ADHS-Übereinstimmungsraster zwischen

monozygotischen⁶ und dizygotischen⁷ Zwillingen verglichen. Berechnungen zufolge liegt die Vererbbarkeit demnach bei etwa 72% [28]. Somit ist die ADHS eine psychische Erkrankung mit einem vergleichsweise hohen Erblichkeitsgrad [46]. Untermuert wird dieser Befund außerdem durch Genkopplungsanalysen: Mit diesen können Regionen auf Chromosomen bestimmt werden, welche, verglichen mit einer Kontrollgruppe, gehäuft mit ADHS segregieren [46]. Vielversprechende ADHS-Kandidatengene nehmen Einfluss auf neurale Entwicklungsprozesse, das synaptische System und die neuronale Plastizität⁸ [47] [48] [46] [49] [50]. Es wird angenommen, dass das Zusammenspiel vieler Genvarianten mit jeweils kleinen bis moderaten Effekten unter Vermittlung von Umwelteinflüssen die Pathologie klinisch manifestieren lässt [48] [51]. Zusätzlich wurden zwischen der ADHS-Pathologie und ADHS-Komorbiditäten genetische Korrelationen gefunden [29]. Durch Array-basierte Analysen können Kopienanzahlvarianten⁹ (Copy number variations – CNVs) ermittelt werden, die ebenso mit ADHS assoziiert sind. Somit sind bestimmte CNV-Gene als ADHS-Kandidatengene interessant [52]. Genomweite CNV-Studien zu strukturellen Genvarianten, welche an der neuronalen Entwicklung beteiligt sind, zeigen ein erhöhtes Vorkommen bei ADHS-Patienten [53] [54].¹⁰ Lesch et al. (2011) identifizierten in einer familienbasierten genomweiten CNV-Analyse vier Deletionen und 13 Duplikationen als mögliche ADHS-Kandidatengene. Darunter eine Duplikation des *SLC2A3*-Gens auf dem kurzen Arm von Chromosom 12, welches für den Glukosetransporter GLUT3 kodiert (siehe Kapitel 1.3 und 1.3.5). Für diese Duplikation konnte in einer deutschen Fall-Kontrollstudie in der Tat eine Assoziation mit ADHS nachgewiesen werden [55] [56]. Duplikationen sind interessanterweise eher in Assoziation mit ADHS zu finden als Deletionen [57]. Funktionelle Auswirkungen der *SLC2A3*-Duplikationsvariante sind nun Gegenstand dieser Arbeit.

⁶ eineiig: das Erbgut stimmt annähernd komplett überein

⁷ zweieiig: das Erbgut stimmt nur zu etwa der Hälfte überein

⁸ Die Fähigkeit des Gehirns sich selbst zu reorganisieren, strukturell und funktionell, als Reaktion auf seine Umwelt.

⁹ Die CNVs weisen auf strukturelle Variationen in der DNS hin, wie Insertionen, Deletionen oder Duplikationen. Diese Varianten treten über das Genom verteilt häufig auf und differieren stark in der Bevölkerung.

¹⁰ Poelmans et al. (2011) weisen darauf hin, dass lediglich 3% der humanen Gene für die Neurogenese kodieren (576 von 18.589). Etwa die Hälfte der ADHS-assozierten Gene zeigen sich bemerkenswerterweise hier an der Neurogenese beteiligt.

1.2 Glukose und Glukosetransport

(D)-Glukose¹¹ gehört als Monosaccharid zu den Kohlenhydraten und stellt eines der wichtigsten Metabolite des Menschen zur Energiegewinnung dar. Der Stoffwechsel selbst ist an diverse Genregulations- und Signaltransduktionsprozesse gekoppelt [58] [59] [60]. Die Expression der verschiedenen GLUT-Isoformen beeinflusst wie die Zelle unter unterschiedlichen Bedingungen Glukose aufnimmt und verstoffwechselt [61].

Damit das hydrophile Glukosemolekül die Zellmembran überwinden kann, muss ein Transporter diesen Weg katalysieren. Hierzu sind 16 unterschiedliche Transportproteine bekannt, welche sich in zwei große Unterfamilien einteilen lassen: Einerseits 14 verschiedene GLUTs – Glukosetransporter (Genname: *SLC2A*) und andererseits zwei SGLTs – sodium glucose-linked transporters (Genname: *SLC5A*) [62]. Ihnen werden spezifische Funktionen und unterschiedliche Eigenschaften, wie eine substratspezifische Affinität (vor allem Hexosen, Pentosen, Disaccharide, Chinine und organische Kationen wie die Ascorbinsäure) sowie eine differenzierte Kinetik und ein individuelles Expressionsmuster in verschiedenen Gewebetypen zugeschrieben (siehe auch Tabelle 11 im Anhang). Sie werden in allen großen Domänen des Lebens gefunden – namentlich Archaeen, Bakterien und Eukaryoten [63] [64] [65].

GLUTs sind Membranproteine und Mitglieder der *Major-Facilitator-Superfamilie*, (MFS) zugehörig zur Unterfamilie der solute-carrier-transporter (SLC), welche aus circa 65 Familien besteht [66]. SLCs transportieren geladene und ungeladene organische Moleküle, sowie anorganische Ionen [67] [68]. Sie sind eine Klasse, die notwendig für physiologische, zelluläre Funktionen sind, da sie den Stoffaustausch lebenswichtiger Substrate über die Membran regulieren (siehe Kapitel 1.2.4) [69].

¹¹ auch Traubenzucker oder Dextrose genannt

1.2.1 Glukose-Metabolismus

Kohlenhydrate

Monosaccharide sind etwa Glukose, Galaktose, Mannose und Fruktose. Disaccharide Verbindungen bilden sich formal, allgemein als organisch-chemische Verbindung, durch Wasserabspaltung zwischen zwei Monosacchariden. Beispiele sind Saccharose (Glukose und Fruktose), Maltose (Glukose und Glukose) und Laktose (Glukose und Galaktose). Sie werden meist als Polysaccharide, wie etwa in Form von Stärke und Glykogen, über die Nahrung dem Gastrointestinaltrakt (GI) zugeführt (siehe Abbildung 1A), welcher regulierende Eigenschaften auf den systemischen Glukosespiegel ausübt und mit dem Gehirn in Kommunikation steht.

Spaltung und Absorption

Enzyme, wie unter anderem Amylasen und Disaccharidasen, spalten zur Verdauung die Polysaccharide/Disaccharide. Dies geschieht vorwiegend in Speichel, Darmsäften¹² und am Enterozyten-Bürstensaum, wobei schließlich einzelne absorbierbare Monosaccharide von der Kette freigesetzt werden. Diese Monosaccharide werden vorwiegend im Dünndarm aufgenommen, wie auch unter physiologischen Bedingungen der Rest des verwertbaren Chymus. Zwei Natriumionen werden zusammen mit Glukose/Galaktose im Dünndarmlumen vom SGLT-1 in die menschlichen Enterozyten absorbiert. Enterozyten exprimieren GLUT2 physiologisch basolateral, sodass die transportierten Monosaccharide Glukose, Galaktose und Fruktose hier in den systemischen Blutkreislauf abgegeben werden [70] [71]. Während der Nahrungsaufnahme können Enterozyten den GLUT2 auch apikal, zum Darmlumen hin, exprimieren [72] [73]. Fruktose wird vor allem über GLUT5 in die Enterozyten aufgenommen [74]. Das venöse System des Blutkreislaufes führt die Metabolite über das Pfortadersystem vom GI primär zur Leber [75] [76]. Im Menschen wird Glukose hauptsächlich von der Leber in Form von Glykogen gespeichert. Dieser Vorrat ist für den Körper im Schnitt erst nach etwa 30 Stunden des Fastens erschöpft [77].

¹² überwiegend aus dem exokrinen Pankreas

Blutzucker-Homöostase

Schlüsselfunktionen für die Regulation des Blutzuckerspiegels (BZ) nehmen das Pankreas und die Leber ein. Das Hormon Glukagon (aus den α -Zellen des Pankreas) lässt den BZ steigen, indem es in der Leber die Glykogenolyse und die Gluconeogenese fördert und die Glukose schließlich via GLUT2 ins Blut abgegeben wird. Das anabole Hormon Insulin (aus den β -Zellen des Pankreas, welche GLUT1 exprimieren) senkt den Blutzuckerspiegel, indem es überwiegend in Adipozyten und Myozyten den Einbau von GLUT4 bewirkt. Die um ein Vielfaches gesteigerte Transportrate in diese Zellen führt dann zur Senkung des systemischen BZ [78] [79] [77] [80] [81].

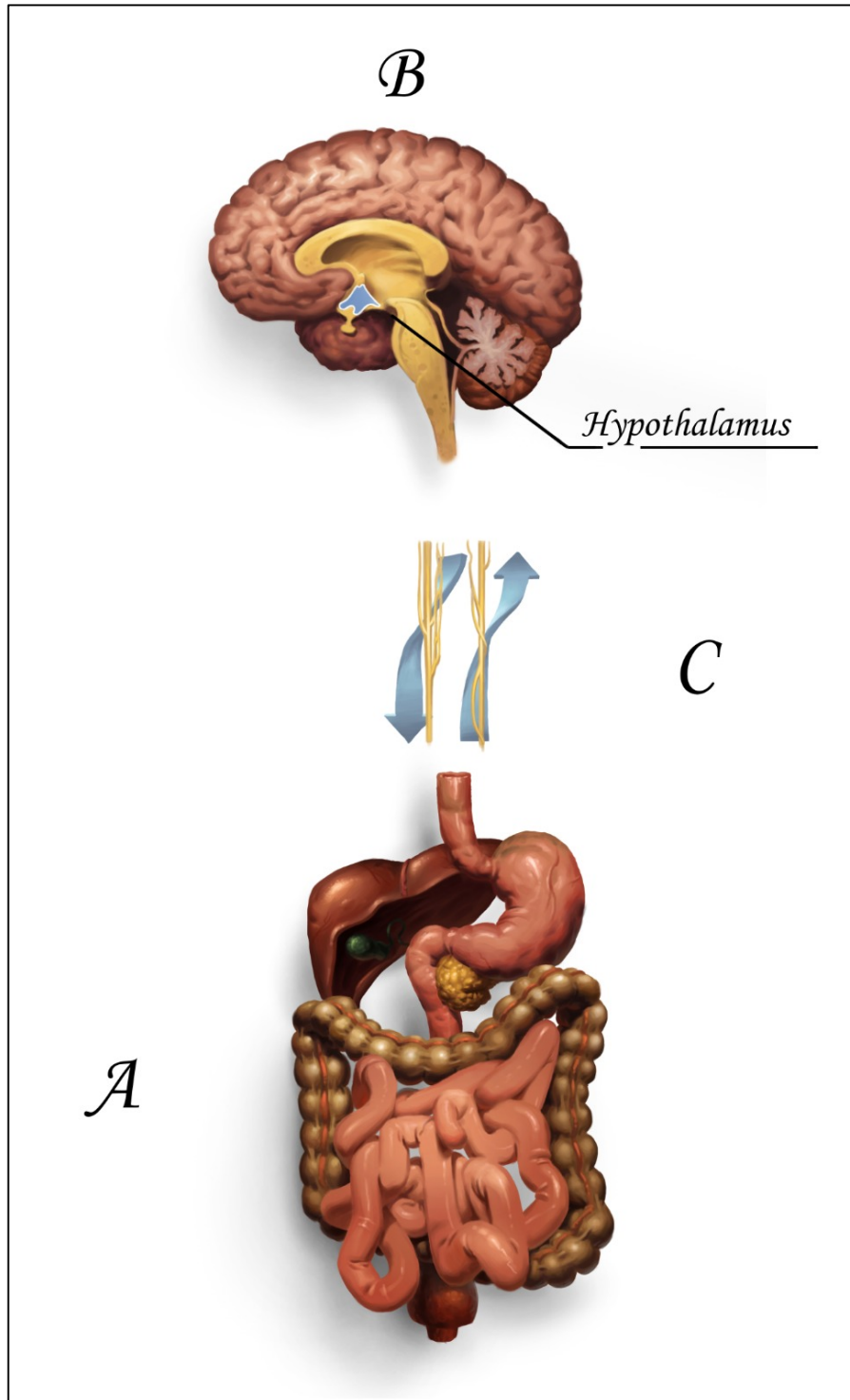


Abbildung 1: Glukosemetabolismus und -homöostase – Glukose ist die Haupt-Energiequelle des menschlichen Gehirns. Aufgenommen wird es vor allem über den Gastrointestinaltrakt (GI; A). Spezialisierte Zentren im Gehirn (B), unter anderem im **Hypothalamus** (hellblau), nehmen zentrale und periphere Glukosespiegel wahr und regulieren dabei über die Mikrobiom-Darm-Hirn-Achse (C) (unter anderem durch den Nervus vagus und neuroendokrine Signale im Blutkreislauf) die Glukosehomöostase. Quelle: eigene Darstellung, Größenverhältnisse nicht realistisch dargestellt, einige Zellen zur besseren Darstellung nicht abgebildet

Zentrale Regulation

Das Nahrungsaufnahmeverhalten der Säuger wird durch unterschiedliche Mechanismen beeinflusst. Im zentralen Nervensystem (ZNS) ist hier vor allem das vegetative Nervensystem betroffen und dann am aktivsten, wenn in der Peripherie eine Hyper- oder Hypoglykämie eintritt [76].

Zerebral zeigt in erster Linie der Hypothalamus (siehe Abbildung 1B und Abbildung 5) als eine Art Kontrollstation eine Glukose- und Lipid-wahrnehmende-Funktion, wohl unter anderem via GLUT2 [82] [83]. Dies geschieht in Verbindung mit lokalen, spezialisierten Gliazellen, welche Glukose als zusätzliches Signalmolekül nutzen, um ihre Aktivität zu modulieren [84]. Diese Gliazellen sind unter anderem im Bereich des medialen Orbitofrontalkortex zu finden [85]. Stoffwechselformone, wie etwa Insulin oder Leptin, liefern dem Gehirn Informationen über aktuelle Reserven.

Eine Dysregulation der Energiebilanz kann unter anderem zu einem veränderten Verhalten und zu Übergewicht führen. Die Glukoseaufnahme ist außerdem mit dem zentralen Dopamin-Belohnungssystem und dem zentralen Melanocortin-System verknüpft. Ein reziproker Einfluss von Gehirn, Essverhalten und dem GI ist hierbei unumstritten [76] – dieser wird unter anderem über die (Mikrobiom-)Darm-Hirn-Achse (siehe Kapitel 4.3.3; siehe Abbildung 1C) vermittelt.

1.2.2 Glukose-Homöostase des Gehirns

Zufuhr

Die zerebral benötigte Glukose gelangt über die Blut-Hirn-Schranke (BHS) (siehe Abbildung 2D) via GLUT1/GLUT3 der Endothelzellen¹³ in die Zerebrospinalflüssigkeit¹⁴ des Gehirns, was wahrscheinlich überwiegend durch Astrozyten und/oder neuronale Signale moduliert wird [86] [87] [88]. Das Endothel der BHS exprimiert GLUT1 in vergleichbarer Höhe wie die Gliazellen des Gehirns. GLUT1 kommt daher neben GLUT3 eine wichtige Rolle für die Glukose-Distribution von der Peripherie ins ZNS zu [89]. Die maximale Transportkapazität (Glukose über die BHS) ist etwa zweimal so hoch wie der maximale zerebrale Glukoseverbrauch. Dies deutet laut *Shestov et al.* (2011) darauf hin, dass während einer Blutserum-Hyperglykämie (>10mmol/l) der Glukoseverbrauch erst intrazerebral limitiert wird (gegebenenfalls auch erst auf enzymatischer, intrazellulärer Ebene), während bei einer Blutserum-Hypoglykämie (~3,5mmol/l) der Transport über die BHS wohl den limitierenden Faktor darstellt [90]. Unter euglykämischen Bedingungen überschreitet „der Glukosezufluss [dabei im Durchschnitt] die Glukoseverwertung um das 1,5-fache“ [91]. Erwähnenswert ist, dass das Milieu um Neuronen herum deutlich weniger Glukose enthält als Blutserum: 1-2 mM im Vergleich zu 5-6 mM [89]. Metabolische Dysfunktionen wurden bereits mit neuronalen Entwicklungsstörungen in Zusammenhang gesetzt [92].

¹³ Endothelzellgröße teils unter 0,25µm Dicke, stark polarisiert und mit verbindenden Tight junction-Poren von etwa 4nm Größe.

¹⁴ Gehirnliquor oder *Liquor cerebrospinalis*

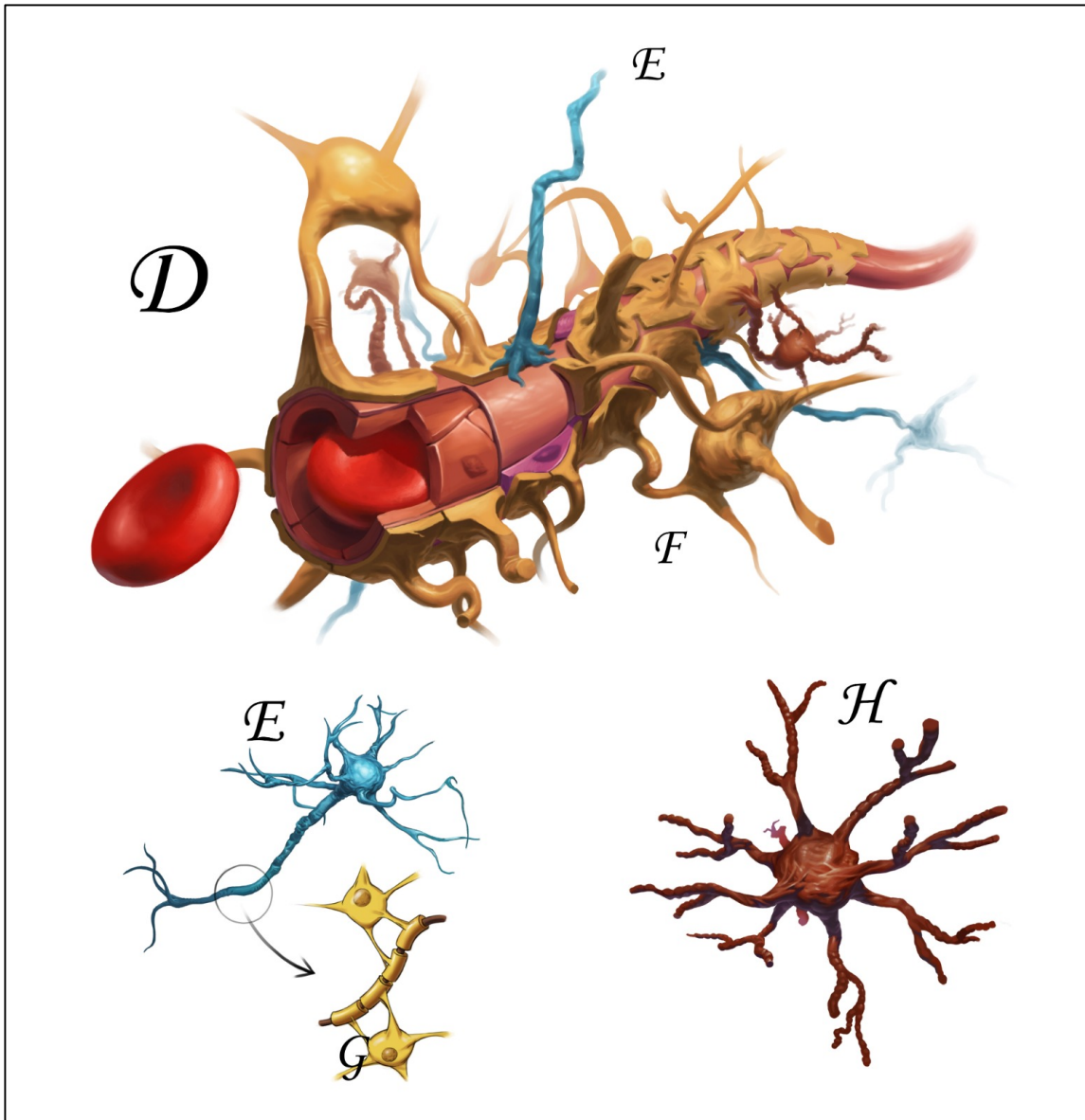


Abbildung 2: Glukosezufuhr zum Zentralen Nervengewebe – Glukose gelangt über die Blut-Hirn-Schranke (BHS; D) ins Gehirn mit seinem reich verknüpften Nervengewebe. Astrozyten (F) sind dabei sehr eng mit der BHS verknüpft. Im Gehirn wird die Energie vor allem zur Signaltransduktion an Neuronen (E) und zur Zytogenese genutzt. Oligodendrozyten (G) bilden die Myelinschicht der Neuronenfortsätze. Mikrogliazellen (H) sind Gewebemakrophagen im Gehirn.

Quelle: eigene Darstellung. Größenverhältnisse nicht unbedingt realistisch dargestellt; Perizyten, Basalmembran und Endothelzellen (je in D) zur Vollständigkeit ebenfalls dargestellt.

Utilisierung und Glykogen

Glukose stellt durch die obligatorische glykolytische Generierung von Adenosintriphosphat (ATP) unter physiologischen Bedingungen die primäre Energiequelle für Nervengewebe dar [93] und wird für die „Erregungsübertragung zwischen den Zellen, Energiespeicherung, Biosynthese und oxidative Abwehr“ benötigt [91]. Die Zusammensetzung und Verstoffwechslung der energiereichen Substrate im Gehirn ist alters- und anforderungsabhängig. Wobei Glykogen¹⁵ (~6-7µmol/g¹⁶ [94]) wohl die Haupt-Energiereserve im Gehirn darstellt und überwiegend in Astrozyten gespeichert wird [95]. Durch die Modulierung ihrer Glykogenolyse kann wohl potentiell die Glukose-Verfügbarkeit für Neuronen unterstützt werden [96]. Eine *in vivo* Untersuchung mittels Kernspinresonanz (NMR) und ¹³C-Glukose zeigte, dass auch nach einem Zeitintervall von 80h der Glykogen-Pool nicht vollständig umgesetzt wird, wahrscheinlich „durch die Unzugänglichkeit der inneren Glykogen-Schichten für die [Glykogen-Abbauenzyme]“ [94]. Glukose liefert mehr günstige Energie und Struktur-Kohlenstoffe als Ketone, deren alleinige Verstoffwechslung mit einer geminderten Neuronenerregung einhergeht [97]. Obgleich das Gehirn lediglich etwa 2% des Körpergewichts ausmacht, verbraucht es circa 20% des gesamten Energiebedarfs des menschlichen Körpers [98]. Den Hauptanteil der benötigten Energie verwendet das Gehirn für Reifungsprozesse, synaptische Plastizität und Signaltransduktionsprozesse [99]. Der hierfür benötigte Glukosemetabolismus lässt via Transkriptionsfaktor CREB das GLUT3-Protein exprimieren, dies konnte für Signaltransduktionsprozesse nachgewiesen werden [100].

Neuronen und Gliazellen

Gliazellen übertreffen Nervenzellen (siehe Abbildung 2E) quantitativ um das Zehnfache und machen dabei etwa die Hälfte der Gehirnmasse aus [101]. „Man unterscheidet 3 Typen von Gliazellen im Zentralen Nervensystem: Astrozyten¹⁷, Oligodendrozyten und Mikrogliazellen“ [siehe Abbildung 2F, G und H] [102]. Sie gelten als elektrisch inaktiv, modulieren aber den Informationsaustausch [103]. Der Verteilungsmechanismus von

¹⁵ Konzentration [nmol Glukose/mg Protein] von 60-200 in Astrozyten, 6 in Neuronen und 15-100 im Gehirn.

¹⁶ bezogen auf die physiologische, nasse Gehirnmasse

¹⁷ „Bisher gibt es keine eindeutige Definition von Astrozyten, [da sie eine sehr heterogene Population darstellen.]“

Glukose, Laktat und anderen Metaboliten zwischen Gliazellen, dem Interzellularraum und Neuronen ist noch nicht gänzlich aufgeklärt. So gehen Modelle davon aus, dass Neurone Glukose direkt aus dem interstitiellen Milieu aufnehmen können [104], während Gliazellen, insbesondere Astrozyten, Neuronen mit Laktat und anderen Metaboliten bedarfsabhängig versorgen und somit ebenfalls deren Stoffwechsel dynamisch modulieren [105]. Während Gliazellen von ihrem favorisierten Substrat bis zu 15% des zerebralen Energieverbrauchs auslasten, nehmen Neurone den größeren, komplementären Anteil von 85%, unter anderem durch Glykolyse, für sich in Anspruch. So benötigt folglich graue Substanz bis zum Fünffachen mehr Energie als weiße Substanz, in welcher vor allem die Gliazellen zu finden sind [99] [106] [91] (siehe Kapitel 1.3). Die neuro-glia-vaskuläre Einheit, „der Baustein des Neuropils“, benötigt etwa 90% der Glukose, welche in der grauen Substanz metabolisiert wird [107].

1.2.3 Glukosetransportmechanismen und die Zellmembran

Menschliche (eukaryotische) Zellmembranen sind etwa 6-10 nm dicke Barrieren. Allgemein besteht der Aufbau zum einen Teil aus einer zweilagigen Fettschicht, der Lipiddoppelschicht, und zum anderen Teil aus Proteinen. Schätzungen zufolge kodieren 20-30% aller menschlichen Gene für Membranproteine [108] und 10% des humanen Genoms für Funktionen, die mit dem transmembranären Transport in Verbindung stehen [69]. Die Expressionsmuster von Transportproteinen sind dabei gewebe- und zellspezifisch [109]. Die Zellmembran grenzt einen Raum ab, stellt also eine interagierende Barriere dar und reguliert den Stoffaustausch mit der Umgebung. Veränderungen in der Zusammensetzung der Zellmembran können den Grundstein für Pathologien legen [110].

Während kleine, lipophile Moleküle die amphiphile Membran relativ ungehindert durchqueren können, bedürfen größere, hydrophile Moleküle (wie zum Beispiel Glukose) spezielle Transportmechanismen für eine Überquerung [111]. Aktive Transporter sind energie- und damit ATP-abhängig. Sie können ihre Substrate gegen einen Gradienten transportieren. Primär-aktive Transporter benutzen Energie direkt aus der Hydrolyse von ATP. Sekundär-aktive-Transporter hingegen nutzen Energie über einen aktiv aufgebauten elektrochemischen Gradienten (SGLTs), zum Beispiel via Na^+ - K^+ -ATPase. Passive Transporter wiederum ermöglichen entlang eines elektrochemischen Gradienten eine erleichterte Diffusion (GLUTs) [112] [111].

1.2.4 Die SLC2A-Familie der Glukose-Transporter (GLUTs)

GLUTs fungieren nach dem Prinzip der „erleichterten Diffusion“ als Uniporter und werden von den SCL2A-Genen kodiert. Im Großteil des menschlichen Gewebes ist diese Familie für die Glukose-Diffusion verantwortlich. Der Transport ist konzentrationsabhängig, stereoselektiv¹⁸ und bidirektional [71].

Strukturaufbau der SLC2A-Familie – GLUTs

GLUTs weisen in ihrer Sekundärstruktur zwölf amphiphile Transmembransegmente (TM) mit einer oligosacchariden Seitenkette an der ersten oder fünften extrazellulären Schleife auf. Die hydrophoben Anteile durchstrecken die Zellmembran, die hydrophilen Anteile bilden dabei eine Pore (siehe auch Kapitel 1.3.4). Der jeweilige Amino- (NH₂) und Carboxyl-Terminus (COOH) liegt intrazellulär. Außerdem weisen GLUTs eine einzelne extrazelluläre N-glykolisierte Seite¹⁹ auf: Sie liegt entweder zwischen den Transmembransegmenten eins und zwei (zutreffend für die erste und zweite GLUT-Klasse) oder neun und zehn (zutreffend für die dritte Klasse der GLUTs). Diese sorgt für eine hohe Glukoseaffinität. Des Weiteren existiert auch eine große intrazelluläre Helix²⁰, welche die Transmembransegmente sechs und sieben verbindet [113] [114] [115] (siehe Abbildung 3).

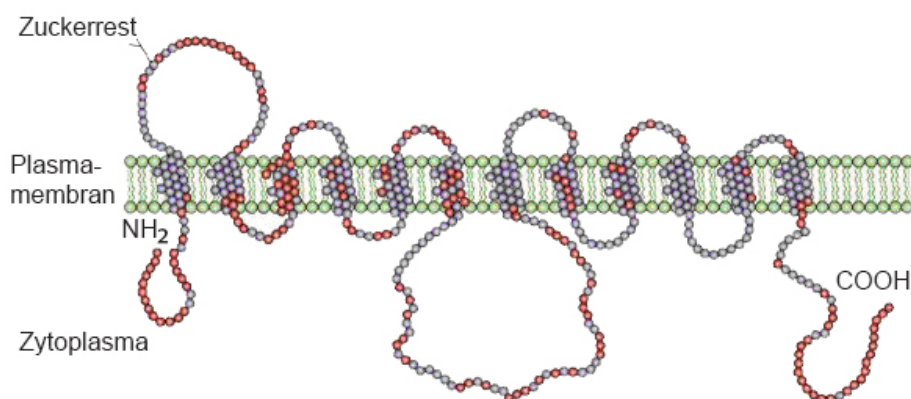


Abbildung 3: schematische Darstellung der GLUT-Sekundärstruktur anhand GLUT1 und GLUT4 (wobei die roten Aminosäuren einzigartig für GLUT4 sind.)
Quelle: in Anlehnung an [81]

¹⁸ ein Stereoisomer wird vor einem anderen Stereoisomer bevorzugt

¹⁹ Zuckerrest an einem Stickstoff

²⁰ Spirale

Aguilar et al. (2017) beschreiben in ihrem Review die Eigenschaften der GLUTs als „wandelbar“ und unter anderem abhängig von unterschiedlichsten, teils noch ungeklärten Kofaktoren (siehe Kapitel 4.4). So folgern sie, dass Informationen über den Einfluss von metabolischem Stress auf die Funktion von GLUTs noch knapp sind und intensiverer Erhellung bedürfen [116]. Neurologische Störungen sind dabei häufig Ausdruck defizitärer synaptischer Energiespeisung [117]. Eine Veränderung der Expression von GLUTs zeigt sich auch bei neurodegenerativen Prozessen, wie man sie zum Beispiel bei der Alzheimer-Erkrankung vorfindet [118].

1.3 GLUT3 und das Nervengewebe

GLUT3 ist ein 496 AS großes Protein, welches als dritter Zuckertransporter entdeckt und untersucht wurde. Er stimmt zu fast 95% in seiner Primärstruktur, mit GLUT14 [119], zu 64% mit GLUT1 und zu 51% mit GLUT2 überein (siehe Abbildung 15 im Anhang) und wird am stärksten im ZNS exprimiert [120] [121], weswegen er auch als „Glukosetransporter von neuronalen Zellen“ [122] oder als „neuronaler Glukosetransporter“ [89] bezeichnet wird. Intrazellulär ist GLUT3 teils in Mikrovesikeln und Stachelsaumbällchen²¹ zu finden [123] und unterliegt mutmaßlich einem Recycling-Zyklus [124]. Glukose, Galaktose, Xylose, Mannose, Maltose und Dehydroascorbinsäure stellen Substrate für den GLUT3 dar, Fruktose hingegen nicht [125] [126] [127] [128] [129]. GLUT3 hat mit etwa 3,44 mM eine sehr geringe K_m (Michaelis-Menten-Konstante²²), somit eine hohe Affinität zu Glukose und „die höchste, errechnete Umsatzrate der Glut-Isoformen“ [130].

Das Gehirn metabolisiert bevorzugt Glukose und weist dabei einen hohen Bedarf zur Grundversorgung auf, inklusive den Endothelzellen und Mikroglia [88] [131] (siehe Kapitel 1.2.2). Andere spezifische Gewebe, welche das GLUT3-Protein exprimieren und ebenfalls einen gesteigerten Bedarf an Glukose aufweisen, sind Spermien [132], Blastozysten [133], die Plazenta [134] [135], (aktivierte) Thrombozyten [136], Leukozyten sowie einige maligne Tumorarten [58].

²¹ clathrin-coated vesicles

²² gibt die Substratkonzentration an, bei welcher die halbe Maximalgeschwindigkeit eines Enzyms erreicht ist

1.3.1 GLUT1 versus GLUT3

GLUT1 und -3 sind die zwei am reichlichsten vertretenen Zuckertransporter im Gehirn [137]. Im Vergleich mit GLUT1 ist die GLUT3-Expression besonders abhängig von der metabolischen Aktivität. Während GLUT1 wohl eine Art Grundversorger ist, stellt GLUT3 eine zusätzliche bedarfsabhängige Versorgung sicher. Er wird verstärkt auf den Axonen und Dendriten im Neuropil exprimiert, weniger im Soma der Neurone „[...] und sein Expressionslevel korreliert in den unterschiedlichen Gehirnregionen mit der [entsprechenden] zerebralen Glukoseverwertung“ [60]. Es wird angenommen, dass GLUT3 vorwiegend an Zellprozessen wie der Heranreifung und Zellkommunikation des Nervengewebes beteiligt ist [89] [138] [139] [140] [141]. Es wird weiterführend davon ausgegangen, dass Zellen mit hoher GLUT3-Expression in einem hypoglykämischen Milieu oder bei hohem Energiebedarf gegebenenfalls einen Vorteil in der Glukoseaufnahme gegenüber Zellen mit bevorzugter GLUT1-Expression haben [142] [143] (siehe Abbildung 4). Um den speziellen Anforderungen des allosterischen²³ Gehirns dynamisch gerecht zu werden, arbeiten die unterschiedlichen Zellen des Nervengewebes synergetisch eng zusammen. So exprimieren Neurone in der Regel den „neuronalen“ Glukosetransporter GLUT3 (wohl auch stärker als GLUT1, zumindest *in vitro* [144]), welcher scheinbar eine besondere Sicherung bietet, um Nervenzellen mit ihrem stark bevorzugten Substrat, auch bei schwankendem Glukosespiegel und -bedarf zu versorgen. Das Milieu für Neuronen im Gehirn scheint stark durch Gliazellen bestimmt zu werden, welche Glukose überwiegend über GLUT1 aufnehmen [91] (siehe Kapitel 1.2.2).

²³ 2. Bedeutung laut Duden: „so beschaffen, dass ein Vorkommen in mehr als einer festen Konformation möglich ist“

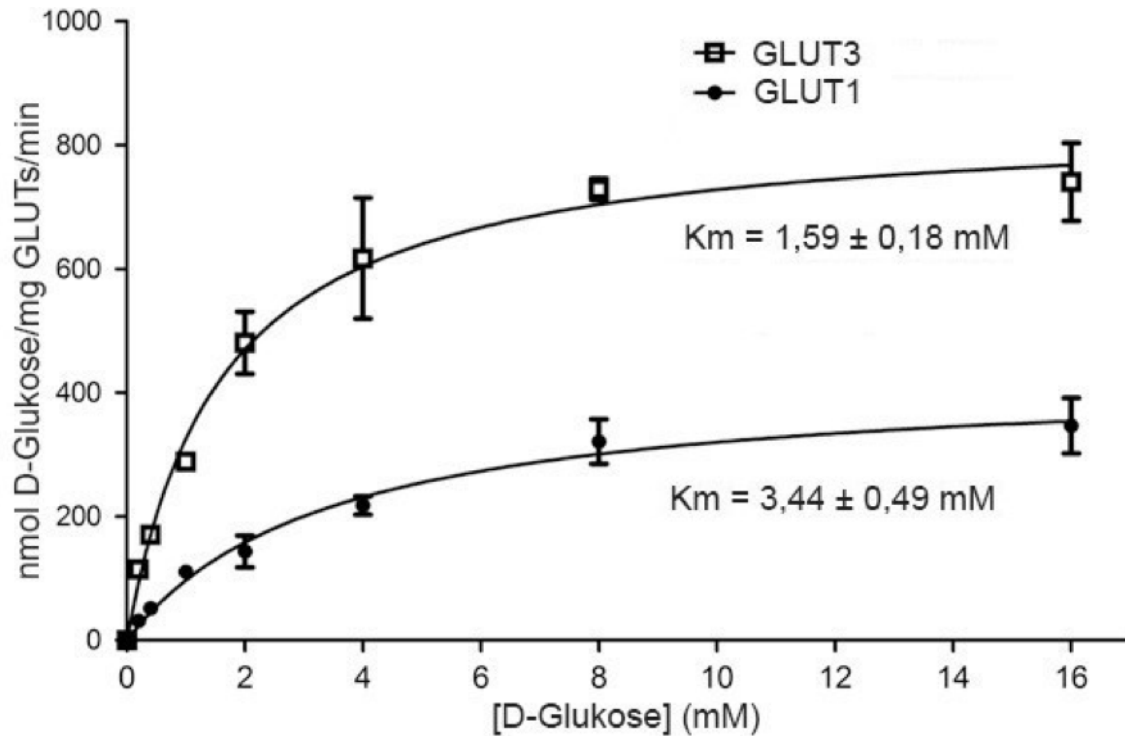


Abbildung 4: Glukoseaufnahme durch GLUT1 und GLUT3 in Abhängigkeit der Glukosekonzentration – in vitro (Assay auf Proteoliposom²⁴-Basis)
 Quelle: in Anlehnung an [145]

1.3.2 Expression in Nagern und im Menschen

Die Aminosäuresequenz des GLUT3-Proteins unterscheidet sich kaum zwischen Ratten und Mäusen (~94% Übereinstimmung) und konzentriert sich auf das Gehirn, wobei im Kleinhirn GLUT3-mRNA überwiegend in der Maus-Purkinje-Zellschicht observiert wurde und bei Ratten überwiegend in den Körnerzellen exprimiert wird.

Der Unterschied zum *Homo sapiens sapiens* ist etwas größer mit einer Sequenz-Übereinstimmung zur Ratte mit nur noch ~82%. Auch weist der Mensch zusätzlich eine verstärkte periphere Expression des humanen GLUT3 auf [146] (siehe Kapitel 1.3).

²⁴ Bezeichnung für ein künstlich hergestelltes Vesikel, welches Phospholipide, Proteine und Enzyme enthält und eine funktionstüchtige Einheit darstellt.

Expression in Nagern

Im Versuch an Rattenneuronen²⁵ zeigte sich, dass die AMP-abhängige Proteinkinase²⁶ das Expressionslevel und die Aktivität an der Plasmamembran reguliert [147]. GLUT3 wurde in Maus-Megakaryozyten [148] und in neuronalen Ratten-Stammzellen gefunden [149]. Zentral wird das GLUT3-Protein vor allem im Neuropil auf Axonen/Dendriten von Neuronen exprimiert und in den Pyramidenzellen/Moosfasern des Ratten-Hippocampus (siehe Abbildung 5), sowie stark im olfaktorischen Kortex – „eine Region der höchsten kortikalen Glukose-Ausnutzung“ [150]; in der Regel jedoch nicht in gesunden Gliazellen [144]. Astrozyten²⁷, „wenn kultiviert“ (*in vitro*), exprimieren bekanntlich GLUT3 [151]. Somit gleichen sie nicht mehr dem *in vivo*-Status, wie bereits kritisch durch *Zhao et al.* (2010)²⁸ erwähnt [152].

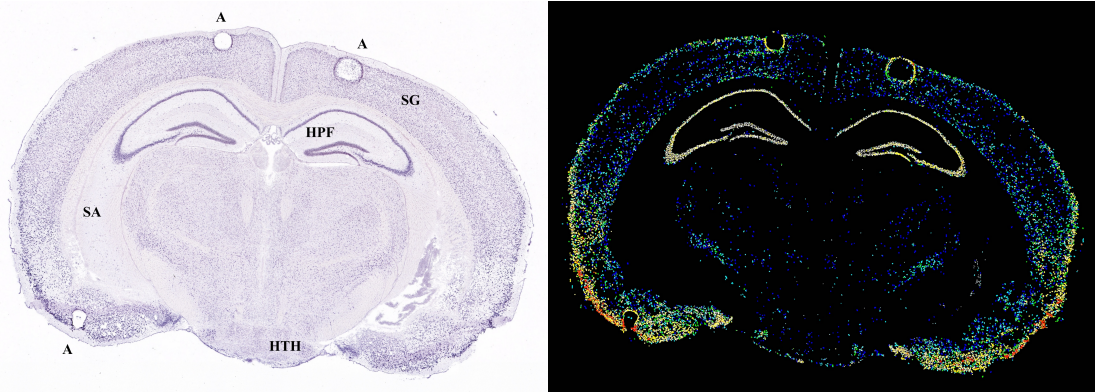


Abbildung 5: Mäusegehirn, Koronalschnitt. Rechts zu sehen ist der dargestellte Nachweis der SLC2A3-RNA-Expression, links eine In-situ-Hybridisierung (ISH). Eine hohe Expression zeigt sich zum Beispiel im Iso-kortex (SG) und im Hippocampus (HPF), Hypothalamus (HTH), Artefakt im histologischen Präparat (A), schwächer exprimiert wird SLC2A3 in der weißen Substanz (SA).

Quelle: in Anlehnung an "Image 31" <http://mouse.brain-map.org/experiment/siv?id=1840&imageId=101363071&initImage=ish&contrast=0.5,0.5,0,255,4> [153]

²⁵ Körnerzelle oder Granularzelle (*Neuronum granuliforme*)

²⁶ Das Enzym spielt eine große Rolle bei der Regulation von Enzymen, welche bei zellulärem Energiemangel in Säugern ihre Funktion ausüben.

²⁷ in Kaninchen („Weiße Neuseeländer“)

²⁸ Experimente an Mäusen

Im Rattengehirn *in situ* wurde das GLUT3-Protein zwar geringer in der äußersten Molekularschicht (*Lamina molecularis*) gefunden [154], allerdings eindeutig in den Körnerzellen (5-10x stärker vorhanden als GLUT1; *in vitro* [155]) der Körnerschicht (*Lamina granularis*). GLUT3 kommt somit verstärkt in der grauen Substanz (SG) des Kortex (siehe Abbildung 5), in der Neurohypophyse, dem *Gyrus dentatus* und dem restlichen Hippocampus, dem Striatum und dem Kleinhirn (hier ebenfalls verstärkt in Körnerzellen der Körnerschicht und auch verstärkt in der weißen Substanz, wo sich Axone/Dendriten befinden) vor. Starke GLUT3-Expression wurde in den lateralen *Habenulae*, der Amygdala, dem *Nucleus nervi oculomotorii* und dem *Nucleus ruber* observiert. Eine Verteilung im Gehirnstamm zeigte sich generell in unterschiedlichen Kerngebieten, mit stärkerer Konzentration in folgenden Strukturen: Pontinischer Raphekern, Kerngebiete der *Formatio reticularis* des Tegmentums, Trigeminskern, lateraler oberer Oliven-Kernkomplex, Kerngebiete des Trapezkörpers und *Nucleus mesencephalicus nervi trigemini* [146]. Niedrige Protein-Konzentrationen konnten auch in der weißen Substanz (SA; entgegen zur mRNA), der Adenohypophyse und der Epiphyse nachgewiesen werden [142] [156]. In der Maus wurde GLUT3-mRNA auch im Thalamus gefunden [157].

Expression im Menschen²⁹

Peripher gelang der Nachweis von GLUT3-mRNA in Geweben wie Herz, Leber, Plazenta und Niere im Menschen [134]. Das GLUT3-Protein konnte in Testikeln und Spermatozoen gefunden werden [156]. Stark wird es vor allem in mononukleären Zellen des Blutes (PBMCs) exprimiert – wobei Monozyten³⁰ eine stärkere Expression aufweisen als Lymphozyten [158] [159]. In humanen Blutplättchen stellt GLUT3 den überwiegend exprimierten GLUT dar [136], wobei Thrombin den GLUT3-Einbau aus intrazellulären α -Granula in die Thrombozytenmembran stimuliert [160]. Die Proteinexpression konzentriert sich topographisch gesehen sonst stark auf das Gehirn und die Neurone [134].

²⁹ siehe hierzu auch Abbildung 16 im Anhang

³⁰ Im Blut zirkulierende Zellen des Immunsystems und unter anderem Vorläufer von Gewebsmakrophagen.

1.3.3 Neuroinflammation und GLUT3-Expression in Nervengewebszellen

Neben Neuronen wird der GLUT3 beim Menschen zentral ebenfalls sowohl in physiologisch gesunden Mikroglia-Zellen³¹, in Endothelzellen und wahrscheinlich in Perizyten der BHS³² exprimiert als auch in entzündeten Astrozyten und in aktiven Makrophagen bei Multipler Sklerose [88] [161] [162] [163]. Zusätzlich zeigte sich, dass Monozyten während einer bakteriellen Infektion vermehrt GLUT3 exprimieren [124].³³ Mikrogliazellen zählen zu den Gewebsmakrophagen und immigrieren während der Embryogenese ins ZNS-Parenchym. Sie sind an der Gehirnentwicklung, der ordentlichen Gehirnfunktion und praktisch an allen Neuropathologien maßgeblich beteiligt. Sie spielen Schlüsselrollen sowohl bei der synaptischen Plastizität sowie als Bindeglied zwischen ZNS und dem Immunsystem (IS) [164] und werden „auch als pathologische Sensoren angesehen“ [102] (siehe Kapitel 4.3.2). Für Mikroglia wurden bereits geschlechterspezifische Unterschiede gefunden [165], unter anderem in der Immunreaktion bei frühkindlichen Entzündungen [166]. Auch bei der ADHS scheint es gewisse geschlechterspezifische Unterschiede zu geben [9] sowie in GLUT3-Deletions-Mäusen [167] (siehe Kapitel 4.4.3).

Akuter und chronischer Stress beeinflusst Immunreaktionen auch zentral und verstärkt oder ermöglicht erst Krankheiten [168]. So ließ sich im Rattenmodell zeigen, dass die SLC2A3-mRNA-Konzentration im Hippocampus mit dem Alter abnimmt. Im weiblichen Hypothalamus senkte sich die Konzentration durch chronischen Stress. Eine erhöhte Konzentration konnte in der erwachsenen männlichen Amygdala gefunden werden, chronischer Stress erhöhte diesen Effekt und war dann auch im Weibchen zu finden. Effekte auf den präfrontalen Kortex konnten hier nicht gezeigt werden, auch keinen anderen GLUT betreffend [169]. Viele Säuger-Zellen besitzen unter anderem die Möglichkeit auf Umwelt-Stress mit einer gesteigerten Glukose-Aufnahme zu reagieren [170]. Bemerkenswerterweise assoziiert eine große Kohortenstudie aus Norwegen eine kurzzeitige (<7 Tage), pränatale, maternale Einnahme von Paracetamol³⁴ negativ mit der ADHS-Ausprägung des Kindes und eine Langzeiteinnahme (>7 Tage) positiv [171]. So konnte auch in einer Zwillingsstudie an männlichen Jugendlichen beobachtet werden, dass der Speichel-Cortisol-Level bei ADHS-Patienten nach einem Stressor schneller

³¹ Sie exprimieren außerdem GLUT1, GLUT4 und GLUT5.

³² Die BHS stellt selbst auch eine immunologische Barriere dar.

³³ Via der Serin/Threonin Proteinkinase B und dem intrazellulären Rezeptor PPAR- γ .

³⁴ Nichtopioid-Analgetikum, welches wohl vor allem zentral wirkt.

abfiel als in der Kontrollgruppe. Die Forscher mutmaßten, dass dies eine endophänotypische Ausprägung von ADHS sein könne [172]. (Frühkindliches) Asthma³⁵ mit seiner allergischen Immunantwort scheint mit ADHS assoziiert zu sein [173] [174], wobei sich bei Komorbidität stärkere Probleme im Verhalten manifestieren³⁶ [175]. „Immunologische Mechanismen scheinen zur ADHS beizutragen“ [176] (siehe Kapitel 4.3.2). Einige ADHS-assoziierte CNVs scheinen auch eine Rolle in Signalwegen des Immunsystems einzunehmen [57]. Der zelluläre Glukosemetabolismus spielt außerdem beim programmierten Zelltod eine entscheidende Rolle [177]. Es bestehen kausale Zusammenhänge zwischen chronischer, metabolischer Glukose-Dysregulation und Neurodegeneration [178] (siehe Kapitel 4.3.3). Gegebenenfalls stellen gewisse „ADHS-Abnormalitäten das Ergebnis einer überschießenden ZNS-Immunantwort des Fötus dar“, ausgelöst durch maternale Inflammationsprozesse [179].

1.3.4 Aufbau und Transport

GLUT3 zeigt die typische Sekundärstruktur der Klasse I-GLUTs. In einem molekularen GLUT3-3D-Modell (siehe

Abbildung 6) wird angenommen, dass die 12 Transmembransegmente einer umschließenden, rechten Hand gleichen, welche einen hydrophilen Trichter formt. Ein Netzwerk von polaren und aromatischen Aminosäuren (AS) säumt die Porenregion und unterstützt die Glukosebewegung entlang des Gradienten. Molekular-dynamische Untersuchungen *in silico* zeigen, dass Neigung und Flexibilität der Schlüsselsegmente die Öffnung der Transportpore modulieren [180].

³⁵ Die physiologische und psychoaktive Wirkung von Methylphenidat wurde auf der Suche nach einem Asthma-Heilmittel entdeckt.

³⁶ ebenfalls differierend nach Geschlecht

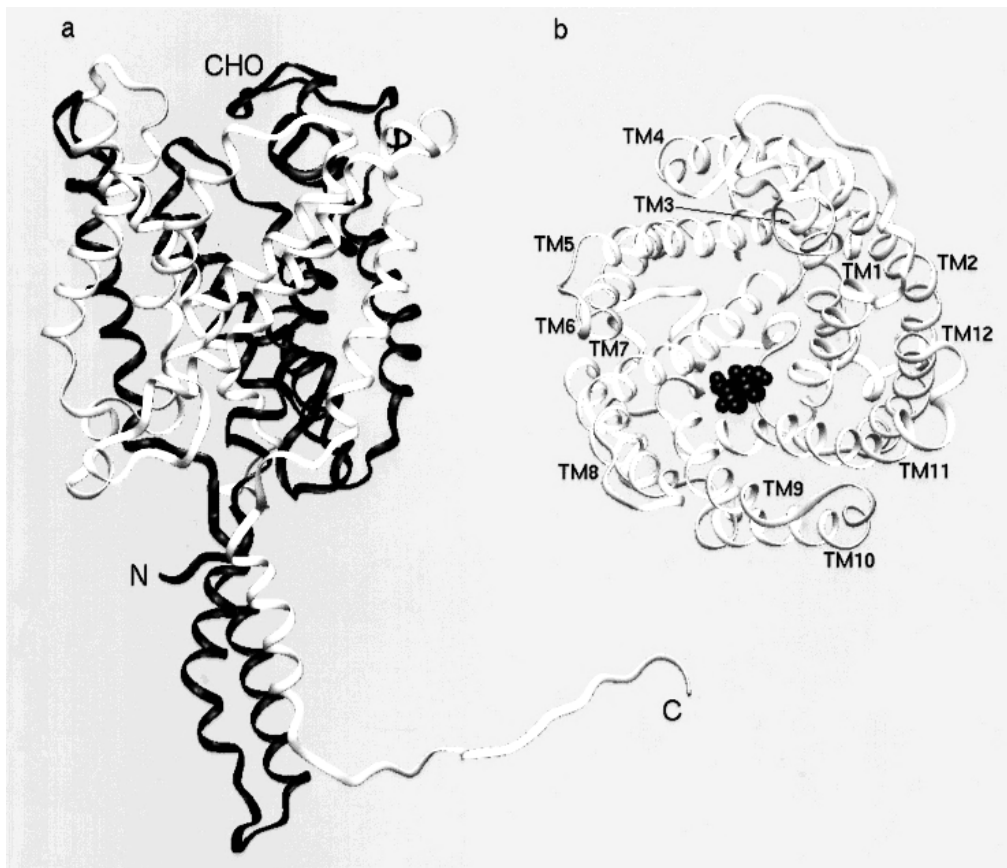


Abbildung 6: a) 3D-Modell der GLUT3-Struktur. Das Peptid- Rückgrat wird durch eine Schleifenstruktur dargestellt. Die Amino (N)- (**schwarz**) und Carboxyl (C)-Enden (weiß) wurden beschriftet, sowie die einzige extrazellulär glykolisierte Seite (CHO)
 b) Blick auf die Pore mit einem D-Glukosemolekül (**schwarz**) im Zentrum der Öffnung. Die 12 Transmembransegmente (TM) wurden nummeriert. Die intrazellulären Segmente wurden bei dieser Darstellung weggelassen
 Das Molekulargewicht des Proteins beträgt 53,9 kDa [181].

Quelle: [180]

Der Transport von Glukose über GLUT3

Initial lagert sich das Glukosemolekül an die extrazelluläre Bindungsstelle des Zuckertransporters. Die Wasserstoffatome des Glukosemoleküls werden an den hydrophilen Anteilen³⁷ überwiegend durch die C-Domäne stabilisiert. Der Kohlenstoffring der Hexose wird dabei zu gleichen Anteilen von beiden Domänen durch die

³⁷ über Wasserstoffbrückenbindungen (Nebervalenzbindungen)

hydrophoben Reste³⁸ gehalten. Darauf folgend führen beide Domänen des Glukose-Protein-Komplexes eine leichte Konformationsänderung um 15° durch, wobei zwei Aminosäurereste des TM 7 die offene Pore verschließen. Gleichzeitig vollzieht das TM 10 eine auswärtsgerichtete Schwenkbewegung um 60°, woraufhin sich die Substratbindungsstelle nach innen öffnet und die Glukose intrazellulär freigegeben wird. Zuletzt schließt vermutlich die große intrazelluläre Helix die nach innen geöffnete Pore, wobei das Transportprotein seine ursprüngliche Konformation wieder einnimmt [182] (siehe Abbildung 7).

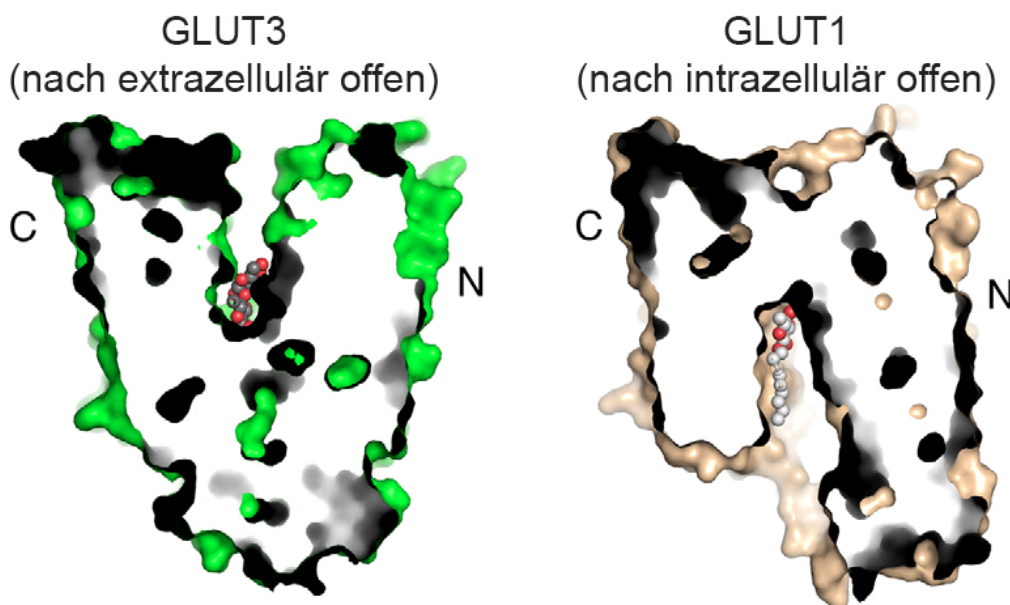


Abbildung 7: Transportmechanismus von Glukose (rot-graue Struktur, mittig) über die GLUTs; Die Öffnung des GLUT3 ist extrazellulär (links) und GLUT1 nach intrazellulär³⁹ gerichtet (rechts); C = C-Domäne, N = N-Domäne
Quelle: in Anlehnung an [182]

1.3.5 Das *SLC2A3*-Gen und seine Kopienanzahlvariationen (CNV)

Das *SLC2A3*-Gen weist eine Länge von etwa 17 kb auf und besteht aus zehn Exons [120]. Es ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 in der Region p13.31 zu finden (siehe Abbildung 8 rechts) [121].

³⁸ über van-der-Waals-Kräfte (nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen Atomen / Molekülen)

³⁹ Zum aktuellen Zeitpunkt wurde noch keine visuelle Darstellung von GLUT3 mit der Öffnung nach intrazellulär gerichtet veröffentlicht.

Duplikation

Die verbreitete Duplikation an Position 7.894681-8.009303 (hg17) umfasst eine Größe von etwa 130 kb, beinhaltet dabei das gesamte *SLC2A3*-Gen, das Pseudogen *NANOGP1* und die vorderen zwei Exons des *SLC2A14*-Gens [55] [56] [183] (siehe Abbildung 8 links).

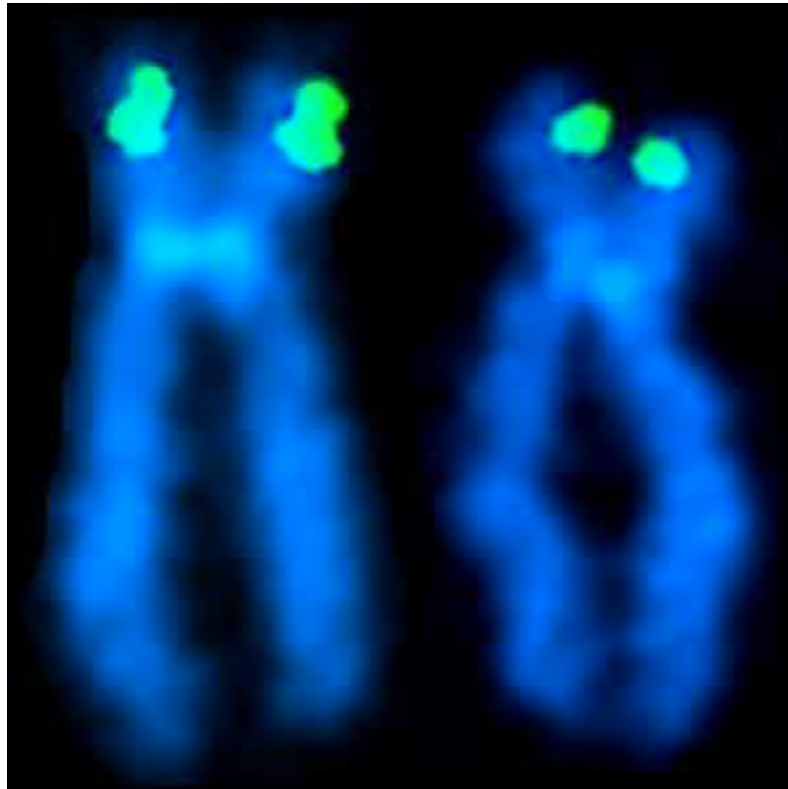


Abbildung 8: *SLC2A3* Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) des menschlichen Chromosoms 12. Zur Hybridisierung des Chromosoms 12 (p13.31) wurde das BAC RP11-277E18 benutzt. Es wird ein homologes Chromosomenpaar (blau) eines *SLC2A3*-Duplikationsträgers gezeigt. Das linke Homolog zeigt ein sichtbar größeres und helleres Signal (grün), was auf eine zusätzliche Kopie der BAC-Probe hinweist. Quelle: zur Verfügung gestellt von Dr. Indrajit Nanda, Institut für Humangenetik, Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Die Duplikation könnte unter anderem mit angeborenen Herzfehlern beim Turner-Syndrom [184] und 22q11-Mikrodeletionssyndrom assoziiert sein [185]. Auch ein Zusammenhang mit einer verzögerten Krankheitsmanifestation⁴⁰ bei der autosomal-dominant vererbten Chorea Huntington⁴¹ konnte gezeigt werden [186]. Wie

⁴⁰ Wobei ein protektiver Effekt durch die gesteigerte Kopienanzahl vermutet wird.

⁴¹ eine neurodegenerative Erkrankung

bereits erwähnt ist die Duplikation des *SLC2A3*-Gens mit ADHS assoziiert [55] [56]. „Strukturelle Varianten und Einzelbasen-Substitutionen des *SLC2A3*-Gens, die mit ADHS assoziiert sind, weisen auf transkriptionelle und funktionelle Veränderungen im Menschen hin“ [56].

Die Resultate von *Yang et al.* (2009) zu einer mRNA-Steigerung durch die *SLC2A3*-Duplikation [187] konnten bestätigt werden: Lymphoblastoide Zelllinien (LCLs) mit der *SLC2A3*-Duplikation weisen immortalisiert eine mRNA-Expressionssteigerung von knapp über 70%, PBMCs sogar von über 200% auf [181].

Deletion

Heterozygote⁴² [188] [189] *SLC3A3*-Knockout-Mäuse zeigen eine verminderte GLUT3-Protein-Konzentration und eine insgesamt verminderte zerebrale Glukose-Aufnahme, allerdings eine höhere GLUT1-Protein-Konzentration zerebral, eine höhere Gehirn-Laktat-Aufnahme und eine Neigung zu epilepsietypischen Potentialen im EEG ist zu beobachten. Des Weiteren erscheinen Veränderungen im Sozialverhalten, in ihrer kognitiven Flexibilität und Gedächtnisleistung sowie Abweichungen in Bewegungsmustern⁴³ und ein verändertes vokales Lautmuster. Auch Einschränkungen in der räumlichen Wahrnehmung wurden beobachtet⁴⁴ [152]. Dieser Phänotyp wird geschlechts- und altersabhängig beeinflusst und lässt sich durch eine ketogene Diät modulieren [167].

Homozygote *SLC2A3*-Knockout-Mäuse sind nur lebensfähig, wenn die versorgende Plazenta von dieser Deletion ausgenommen ist. Eine Untersuchung an der Reifung des Nervengewebes an postnatal-homozygoten Deletions-Mäusen resultierte in einer Mikrozephalie (>90% vermindertes Gehirngewicht; inklusive einer geringeren kortikalen Dicke und weniger dendritischen Dornen), einhergehend mit einer „Retardierung“ und einer verkürzten Lebensdauer⁴⁵, mit Terminierung dieser bereits vor der Geschlechtsreife [190].

⁴² Die heterozygote Deletion war mit einem reduzierten Risiko für rheumatoide Arthritis assoziiert. Als ursächlich wurde eine verminderte lokale Immunantwort diskutiert. Dieser Fund wurde jedoch durch eine Replikationsstudie wieder entkräftet.

⁴³ die mit dem Autismus-Spektrum in Verbindung gebracht werden

⁴⁴ während motorische und koordinative Fähigkeiten uneingeschränkt erscheinen

⁴⁵ Scheiternde Rettung auch durch eine ketogene Diät.

1.4 Ziel dieser Thesis

Ziel dieser Thesis ist die weiterführende Grundlagenerforschung des Effekts der *SLC2A3*-Duplikation auf die quantitative zelluläre Glukoseaufnahme. Forschungsfrage: Besitzt die Duplikationsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine gesteigerte Glukoseaufnahme? Welchen Effekt/Einfluss könnte dies in Patienten mit ADHS mit sich führen?

Um dies unter kontrollierten Bedingungen zu testen, werden humane, durch EBV immortalisierte lymphoblastoide Zelllinien (EBV-LCLs) in einem mit Tritium-markierter Glukose versetzten Nährmedium inkubiert und anschließend die zelluläre Glukoseaufnahme über 20 min mittels Szintillation bestimmt, um auf Unterschiede zwischen den zwei Gruppen (LCLs mit *SLC2A3*-Duplikation und Kontrollzelllinien) schließen zu können. Diese Messung vollzieht sich nach einer standardisierten Sammlung und Zählung der Zellkulturen (Anfangszeitpunkt: t_0 ; siehe Kapitel 2.2.2) zu zwei nachgeschalteten Messzeitpunkten ($t_1 = t_0 + 48h$ und $t_2 = t_0 + 96h$).

Hypothese (H): Die zelluläre Glukoseaufnahme ist abhängig von der *SLC2A3*-Kopienanzahl.

Nullhypothese (H_0): Die zwei Gruppen (Duplikationsgruppe mit drei Kopien und die Kontrollgruppe mit zwei Kopien) der EBV-LCLs weichen nicht signifikant in ihrer Glukoseaufnahme voneinander ab.

2 Material und Methoden

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde mit EBV-LCLs (nach *Caputo et al.* (1991)) [191] gearbeitet, welche durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Clemens Müller Reible (Institut für Humangenetik, Würzburg) und die Klinik für Psychiatrie Würzburg bereitgestellt wurden. Es wurden neun *SLC2A3*-Kontrollkulturen (das Gen ist in zwei Kopien vorhanden) gegen neun *SLC2A3*-Duplikationskulturen (das Gen ist in drei Kopien im Genom vorhanden) getestet.

2.1 Kultivierung und Lagerung von EBV-LCLs

Die EBV-LCLs wurden als Zellkultur-Stocks aus einem Stickstofftank (-180°C in 1 ml Einfriermedium; siehe Kapitel 2.2.1) entnommen, im Brutschrank (bei 37°C für 2 min) inkubiert, mit Waschmedium gewaschen, anschließend in der Zentrifuge (5min bei 167g) pelletiert und zur Rekultivierung wieder in 6 ml Nährmedium suspendiert. Dreimal wöchentlich wurde den Kulturen nach Farbumschlag des Phenolrotindikators etwa zwei Drittel des alten verbrauchten Mediums abpipettiert und frisches Nährmedium hinzugegeben. Sobald eine 15-25 ml Suspension in einer 25 ml-Zellkulturflasche ein stabiles Wachstum zeigte, wurden die Zellen in eine größere 75 ml-Zellkulturflasche überführt und weiter kultiviert. Parallel dazu wurden zusätzliche Kryostock-Vorräte der LCLs für zukünftige Untersuchungen eingefroren. Beim Erreichen von etwa 60 ml und einer augenscheinlich dichten Bewachsung der großen Zellkulturflasche wurden die Kulturen schließlich für die Tests verwendet. Nach jeder zehnten Passage wurde per Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf Kontaminationen durch Mykoplasmen-Spezies untersucht: Die Zellen wurden gewaschen, in circa 5 ml Nährmedium ohne Gentamycin⁴⁶ suspendiert und für eine Woche inkubiert, mit anschließendem PCR-Test.

⁴⁶ Aminoglycosidantibiotikum

2.2 Messung der Glukoseaufnahme

Die Messung der [³H]-2-Desoxyglukoseaufnahme dieser Arbeit basiert auf etablierten Methoden von *Daneman et al.* (1992) [192], *Kaliman et al.* (1995) [193], *Yamamoto et al.* (2011) [194] und insbesondere von *Pawel et al.* (2010) [195]. Über die im Flüssigszintillationszähler gemessenen Zählimpulse pro Minute (counts per minute – CPM), ausgelöst durch den radioaktiven Zerfall des Substrats, kann auf die quantitativ aufgenommene Menge der [³H]-2-Desoxyglukose einer Probe rückgeschlossen werden:

Tritium ist ein schweres Isotop des Wasserstoffs. Der Atomkern besteht aus einem Proton und zwei Neutronen. Tritium ist ein radioaktiver Betastrahler und sendet beim Zerfall ionisierende Strahlung⁴⁷ mit einer mittleren Energiestärke von 5,6 keV und maximal 18,6 keV, was einer Strahlungsreichweite von 0,56µm bis maximal 6µm im Wasser oder im menschlichen Gewebe entspricht. Es zerfällt mit einer Halbwertszeit von circa 12,26 Jahren [196]. Um die abgegebene Strahlung trotz geringer Strahlungsreichweite quantitativ zu messen, wandelt die Szintillationsflüssigkeit die abgegebene kinetische Energie in Lichtblitze um, welche vom System detektiert und gezählt werden. Der Szintillationszähler zählt über eine definierte Zeit (in dieser Arbeit 20 min) die ausgestrahlten Lichtblitze des Tritiumzerfalls und rechnet diese in Zählimpulse pro Minute – *counts per minute* (CPM) – um. Die gemessenen CPM einer Probe sind somit proportional zur enthaltenen Menge an Tritium. Durch die Tritium-Markierung von Glukose wird jener Effekt zur Messung der Glukoseaufnahme von den Zellkulturen genutzt [197] [198] [199].

⁴⁷ Betastrahler: emittieren Elektronen

2.2.1 Produktangaben

– alle Produkte von Thermo Fisher Scientific⁴⁸, wenn nichts Weiteres angegeben –

Tabelle 1: Materialien und Produktangabe

Material	Produktangaben
Zellkulturplatte	24-Well; „Flat Bottom Suspension Cells“; [Sarstedt Produktnummer: 83.1836.500]
Cellometer	Cellometer™ Auto T4 Cell Counters; (Nexcelom Bioscience; Auto T4 Software v3.3.3)
Chip	Cell Counting Chambers; Cexcelom Bioscience, Cenibra, [Artikelnummer: CETHT4SD100002]
Pipetten	Eppendorf Reference®
Zentrifuge	Hettich – Rotofix 32 A [Radius: 147mm: Drehzahl: 1.000 UpM ~ Beschleunigung: 164g; Drehzahl: 3.250 UpM ~ Beschleunigung: 1.739g]
Brutschrank	Einstellung (37°C und 5% CO ₂ -Atmosphäre)
Zellkulturflasche	Nunc Non-treated EasYFlask, Filter Cap (T25 & T75) für suspendierende Zellen
Vortexmischer	Vortex-Genie® 2
Tubes	Eppendorf Tube (Sarstedt) 1,5 ml und 15 ml
Wasserbad- Schwenker	37°C warmes Wasserbad
Szintillationszähler	Beckman LSC LS6500 (Messung/Probe: 20 min)
LS Vials	Injektionsfläschchen für LSC
Kryoröhrchen	1ml; Sarstedt

⁴⁸ Früher: Life Technologies

Tabelle 2: Mediumssuspensionen und Ingredienzen

<u>Medium</u>	<u>Ingredienzen</u>
Nährmedium	RPMI-1640, 15% HI-FBS, 1% L-Glutamin, 0,1% Gentamycin [11,11 mM D-Glukose; Artikelnummer: 31870074]
Uptake-Medium [300 µl / Replikat]	298,08 µl glukosefreies RPMI-1640 + 1% L-Glutamin + 0,42 µl DMSO + 1,5 µl [³ H]-Desoxy-Glukose ⁴⁹ [0,68 mM [³ H]-Glukose] ⁵⁰
Einfriermedium	RPMI-1640, 10% FBS, 10% DMSO
Myk-Test-Medium	RPMI-1640, 15% HI-FBS, 1% L-Glutamin
Szintillationsflüssigkeit	Rotiszint®
Trypanblau-Lösung	0,2% Trypanblau in PBS
Natriumhydroxid-Lösung	0,05M NaOH
Waschmedium	PBS

2.2.2 Initiales Versuchsprotokoll

Untersucht und verglichen wurden zwei Gruppen (Duplikations- und Kontrollgruppe; n=2)⁵¹ mit jeweils neun Zelllinien⁵² (N=9). Pro Versuchsdurchführung wurde eine Zellkultur der Kontrollgruppe und eine der Duplikationsgruppe herangezogen, jeweils mit sechs Replikaten. Der Vorgang wird hier aus Gründen der Übersicht anhand einer Kultur beschrieben: Aus einer augenscheinlich dicht bewachsenen Zellkulturflasche wurden geschätzt etwa 3×10^7 Zellen in circa 13 ml-Suspension entnommen. Die Suspension wurde in einem 15 ml-Tube zentrifugiert (5 min bei 167g), der Überstand dekantiert und die Zellen in 6 ml vorgewärmtem Waschmedium wieder suspendiert, um anschließend die Zellzahl mit dem automatisierten Cellometer zu bestimmen. Um beim Zählen Fehler zu vermeiden, sollte das Medium proteinfrei sein.

Daraufhin wurden jeweils 3×10^6 Zellen pro Kammer einer Tissue Culture Plate aliquotiert. Die Wells⁵³ der Tissue Culture Plate wurden im Anschluss mit 2 ml

⁴⁹ *Spezifische Aktivität: 5-10 Ci/mmol (~ 185-370 GBq/mmol), gelöst in 90% EtOH und 10% H₂O; 0,13 µmol/µl, 23,4 µg/µl; Perkin Elmer; Lagerung bei -20°C [Produktnummer: NET328250UC]*

⁵⁰ 10^{14} Glukosemoleküle pro Replikat

⁵¹ Die Kontrollgruppe besitzt zwei Kopien des *SLC2A3*-Gens, die Duplikationsgruppe drei Kopien.

⁵² EBV-LCLs

⁵³ auch „Vertiefung“ oder „Kammer“ genannt

vorgewärmtem Nährmedium aufgefüllt und die Platten zur Inkubation wieder zurück in den Brutschrank gestellt.

Nach zwei Tagen wurden die Zellen erneut in einem 15 ml-Tube⁵⁴ vereinigt, bei 164g zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Zellkultur in 6 ml vorgewärmtem Waschmedium abermals suspendiert. Mit dem Cellometer wurde die Zellkonzentration bestimmt und jeweils 3×10^6 Zellen in sechs 1,5 ml-Tubes aufgeteilt. Nach einer anschließenden Zentrifugation (5 min bei 167g) der Proben wurde der Überstand des Mediums dekantiert, sodass lediglich ein kaum sichtbares Zellpellet am Boden der Tubes übrig blieb.

Es wurden auf die Replikate 300 µl des radioaktiven Uptake-Mediums aliquotiert und die Zellen darin suspendiert, jeweils ein Triplikate mit und eines ohne Cytochalasin B⁵⁵ (0,1% Cytochalasin B in RPMI-Medium gelöst). Die zwei Triplikate wurden anschließend unter Bewegung in einem 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Nach 20 min wurden die Proben aus dem warmen Wasserbad entnommen und es folgten zwei Waschschrte: Proben bei 164g zentrifugieren, dann vorsichtig dekantieren, mit 1 ml Waschmedium versetzen, nochmals zentrifugieren und aufs Neue vorsichtig dekantieren (siehe Kapitel 2.2.3).

Das verbleibende Zellpellet in den Tubes wurde schließlich mit 400 µl 0,05M NaOH für etwa 30 min lysiert, bevor das Zelllysate mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit in ein LS Vial überführt und im Szintillationsdetektor gemessen wurde.

2.2.3 Modifizierung und Standardisierung des Protokolls

Das Protokoll wurde derartig modifiziert und standardisiert, dass die Standardabweichung unter den Replikaten geringgehalten wird, die Durchführung vereinfacht und das Ergebnis aussagekräftig ist. Hierzu wurden folgende Maßnahmen ergriffen:

Zunächst wurden die Triplet-Gegenproben mit Cytochalasin B aus dem Protokoll entfernt (siehe Kapitel 4.2). Zusätzlich wurde die Anzahl der zu testenden Zellkulturen auf vier Kulturen pro Durchgang verdoppelt. Auch die Replikatanzahl wurde, wenn möglich, auf

⁵⁴ „Reagiergefäß“

⁵⁵ Ein Mykotoxin, welches die Substrat-Bindungsstelle für Glukose blockiert.

vier pro Kultur angehoben. Die Zellzahl pro Replikat wurde ebenfalls von 3×10^6 auf 5×10^6 erhöht (sowohl während der Inkubation in den jeweiligen Wells, als auch in den zu testenden Replikaten), damit sich dies nach dem Gesetz der großen Zahlen positiv auf eine geringere Abweichung vom Erwartungswert auswirkt, da sich die Abweichungen vom Mittelwert auf diese große Anzahl im Schnitt aufheben. Hierbei nähert sich außerdem das Lösungsvolumen der Zellkulturen der Maximalfassung des Chips und beeinflusst die Wahl der Pipettengröße positiv: Bei kleinen Volumina in großen Pipetten steigt die systematische und zufällige Fehlerabweichung, weshalb möglichst kleine Pipetten bei konstanter Medium-Temperatur bevorzugt wurden [200].

Die Replikate wurden standardisiert je zweimal für 5 sec mit dem Vortexer heftig geschüttelt, sodass eine gute Durchmischung der Suspension gewährleistet werden konnte, ohne die Viabilität der Zellen zu kompromittieren. Auch die Umdrehungszahl der Zentrifuge – und somit die Beschleunigung – wurde angehoben, sodass das Zellpellet am Boden des Tubes länger stabilisiert ist. Die Beschleunigung sollte jedoch $1.739g$ für 5 min nicht überschreiten, da die LCLs höheren Belastungen nicht standhalten. Nach der Wasserbad-Inkubation wurden den Waschsritten zwei zusätzliche Zentrifugationsschritte hinzugefügt, um zusätzlich mit einer feinen $10 \mu\text{l}$ -Pipette noch residuales Uptake-Medium beziehungsweise residuales Waschmedium ordentlich aus den Proben zu eliminieren. Beim Abnehmen des Überstands wurde die Pipettengröße systematisch an das Volumen der Suspension angepasst. Zum Pipettieren wurde eine Eintauchtiefe von zwei bis vier Millimeter in der Mitte des Tubes gewählt [201]. Alleine für dieses Arbeitsintervall wurden im Schnitt 40 min benötigt (bei vier Zellkulturen mit je etwa vier Replikaten; von der Wasserbad-Entnahme bis zur Lysierung durch eine Natriumhypochlorid-Lösung).

Das Zählen der Zellen wurde standardisiert: $100 \mu\text{l}$ der Zell-Suspension wurde mit $100 \mu\text{l}$ der $0,2\%$ Trypanblau-Lösung in einem 1 ml -Kryoröhrchen gemischt, hieraus wurden $20 \mu\text{l}$ auf einen Chip gegeben und mit Hilfe des automatisierten Cellometers gezählt. Trypanblau wird nicht von lebenden Zellen mit intakter Zellmembran aufgenommen. So kann die Zellanzahl der lebenden Zellen (Viabilität) der Zellkulturprobe bestimmt werden (siehe Abbildung 9) [202].

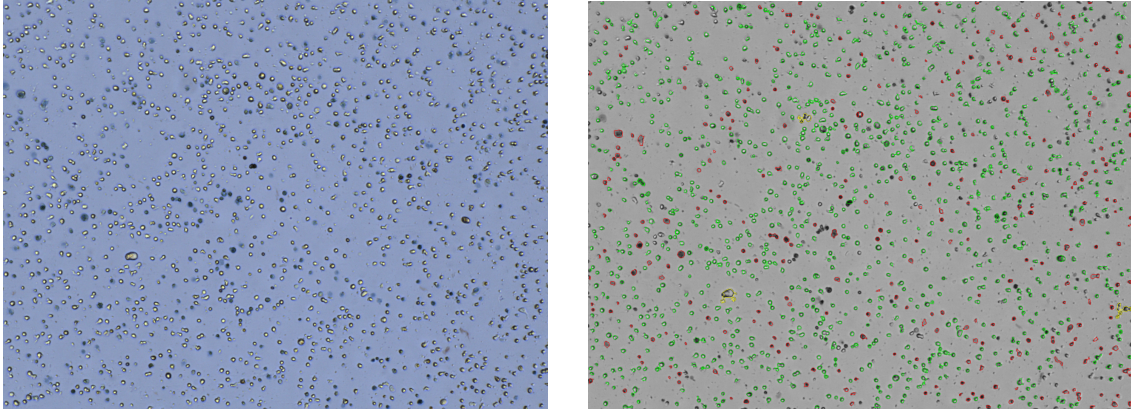


Abbildung 9: Scan einer Chip-Kammer mit Trypanblau (links) und derselbe Scan gezählt (rechts; grün: lebende Zellen, rot: Zellreste/tote Zellen, gelb: nicht zuordenbar)
Quelle: eigene Darstellung [Cellometer™ Auto T4 Cell Counters (Nexcelom Bioscience)]

2.2.4 Varianzreduktion durch Protokollverbesserung

Durch die im vorangegangenen Kapitel beschriebene Modifizierung etablierter Protokolle und die Standardisierung der Durchführungsschritte konnte der Variationskoeffizient, beziehungsweise die Standardabweichung über die Replikationen einer Kultur (in Kapitel 2.3 als „j“ benannt) deutlich gesenkt werden: Während der mittlere Variationskoeffizient nach einem initialen Durchgang noch durchschnittlich 84,4% betrug, reduzierte die Verfahrensmodifizierung den mittleren Variationskoeffizienten auf einen stabileren Durchschnittswert von 10,2% (siehe Abbildung 10): Dies entspricht einer Reduktion um 87,9%.

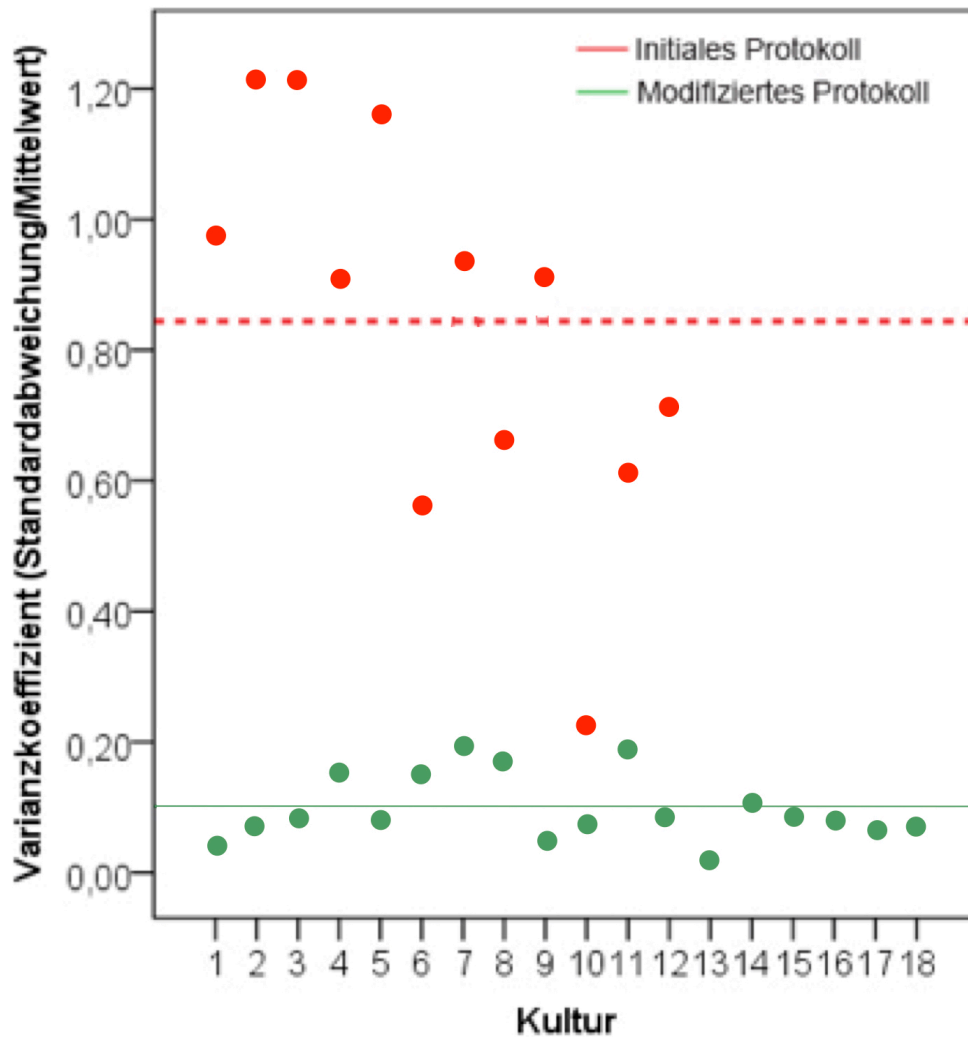


Abbildung 10: Variationskoeffizient der Replikate (Y-Achse), experimentelle Durchführung mit EBV-LCL-Kulturen (X-Achse), initiales Protokoll (rot; gestrichelte horizontale Linie = Mittelwert; 84,4%) und nach der Modifizierung (grün; durchgehende horizontale Linie = Mittelwert; 10,2%)

2.2.5 Versuch über vier Tage

Um einen Effekt über die Zeit zu untersuchen, wurde die Aussaat für die Untersuchung erhöht: Dabei wurde die Well-Anzahl für die Durchführung auf bis zu zwölf Kammern erhöht und mit jeweils 5×10^6 Zellen und je 2 ml frischem Nährmedium inkubiert. Von dieser Aussaat wurde jeweils eine Hälfte der Platte nach zwei, die andere nach vier Tagen geerntet und die Messung der Glukoseaufnahme nach dem modifizierten Protokoll durchgeführt. Dies ermöglicht eine Analyse im Verlauf (zwei Messungen: t_1 an Tag zwei und t_2 an Tag vier) und unter den Gruppen ($n=2$; siehe Kapitel 2.3.3 und 3.2).

2.3 Statistische Verfahren

Die Aufbereitung des Datensatzes (siehe Tabelle 12 im Anhang) erfolgt mit Microsoft-Excel 2016; die statistischen Analysen und graphischen Darstellungen hingegen mit R 3.52.⁵⁶

2.3.1 Deskriptive Beschreibung des Datensatzes

– grundlegende Eigenschaften

Der Datensatz besteht insgesamt aus 125 Einzelbeobachtungen (Messungen) über anfänglich 18 Kulturen ($j \in \{1, \dots, 18\}$). Diese verteilen sich auf zwei Gruppen ($n=2$) und zwei Zeitpunkte (Anfangszeitpunkt: t_0 ; $t_1 = t_0 + 48h$ und $t_2 = t_0 + 96h$). Im Mittel wurden zum ersten Zeitpunkt (t_1) 3,81 Messungen pro Kultur durchgeführt, für den zweiten Zeitpunkt (t_2) 3,11 Messungen (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Kontingenztabelle hinsichtlich der Anzahl der Beobachtungen

	t_1 (nach 48h)	t_2 (nach 96h)
Duplikation	32	31
Kontrollgruppe	32	30

Trotz des Versterbens von je einer Kultur pro Gruppe und der ungleichen Anzahl von Messungen pro Kultur und Zeitpunkt sind die Beobachtungen sehr gleichmäßig verteilt. Der Datensatz kann damit zwar nicht als vollständig ausgewogen, allerdings als nahezu ausgewogen angesehen werden. Der χ^2 -Test auf Unabhängigkeit (Teststatistik-Wert $< .0001$; $p = 1$; keine Signifikanz) findet hinsichtlich der Anzahl (Replikat, beziehungsweise Messungen) zwischen den beiden Zeitpunkten und den beiden Gruppen keine signifikanten Abhängigkeiten, so dass nicht mit Nebeneffekten aufgrund ungleicher Gruppenstärken zu rechnen ist.

⁵⁶ Unterstützer werden in der Danksagung aufgeführt.

Neben den reinen Messwerten beinhaltet der aufbereitete Datensatz Informationen zur Gruppenzugehörigkeit (i), dem Messzeitpunkt (t) sowie der Kultur-Identifikationsnummer (j): Somit liegt eine 125x4-Matrix als Inputdatensatz vor. Mit Ausnahme der CPM-Messwerte, welche die endogene Variable darstellen (siehe Kapitel 2.3.2), sind die übrigen drei Variablen kategorial (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Skalenniveau der Variablen

<u>Variable</u>	<u>Skalenniveau</u>	<u>Anzahl der Ausprägungen</u>
Messwert	Verhältnisskala	125
Gruppenzugehörigkeit	Nominalskala	2
Messzeitpunkt	Ordinalskala	2
Identifikationsnummer	Nominalskala	18

2.3.2 Eigenschaften der endogenen Variable (CPM)

Originäre Messwerte (siehe Tabelle 5)

Tabelle 5: deskriptive Kennzahlen der endogenen Variable „CPM“

Mittelwert	Median	Standardabweichung	Schiefe	Kurtosis	Minimum	Maximum
24.947	22.509	16.917	0,56	2,48	380	67.370

Die Kennzahlen über alle Einzelbeobachtungen, unabhängig von Gruppe und Messzeit, führen zu einem Variationskoeffizienten von 0,68. Er ist aufgrund der granulareren Datenbasis im Vergleich zu den in Kapitel 2.2.4 angegebenen Werten erhöht. Die Schiefe ist merklich positiv, eine rechtsschiefe Verteilung, (siehe Abbildung 11 links), wohl durch die niedrigeren Messwerte des zweiten Messzeitpunktes.

Ein Jarque-Bera-Test (Teststatistik-Wert = 8,01; $p = 0,02$; Signifikanz = *) lehnt die Normalverteilungshypothese signifikant ab. Dieses Ergebnis erscheint vor dem Hintergrund sinnig, dass bei einer angenommenen Normalverteilung – mit dem

Mittelwert $\mu = 24.947,25$ und einer Varianz $\sigma^2 = 16.917,14^2$ – mit einer Wahrscheinlichkeit von 7,02% ein negativer Wert entsteht. Dies ist jedoch bei CPM-Werten nicht möglich, da diese immer positiv sein müssen.

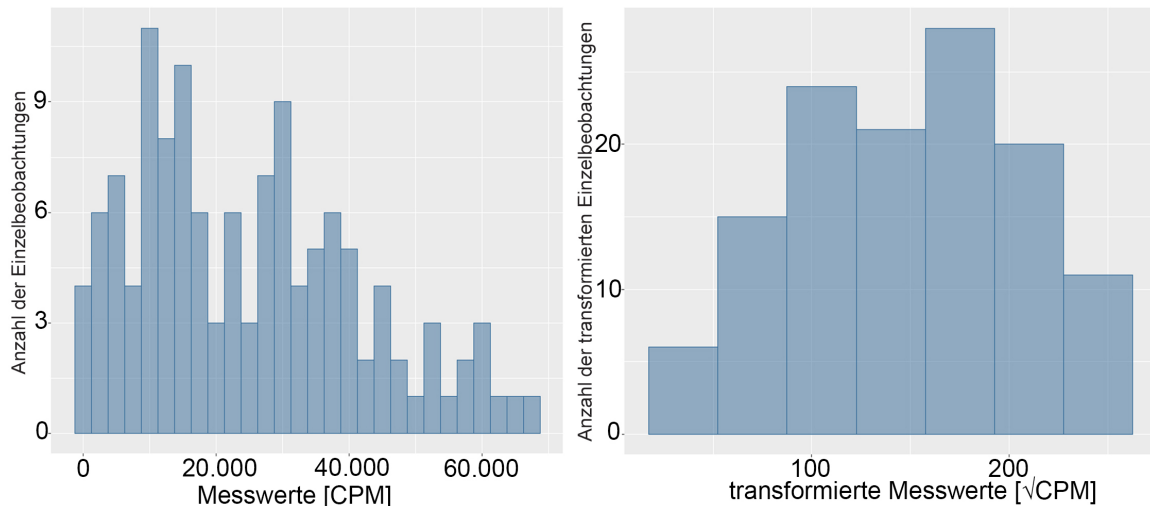


Abbildung 11: Histogramm der Messwerte (alle Gruppen und Zeitpunkte) – links (originäre Messwerte), rechts (transformierte Messwerte)

Quelle: eigene Darstellung

Wurzeltransformation

Damit die Residuen näherungsweise normalverteilt sind, wird die Wurzeltransformation ($Y = \sqrt{CPM}$) angewandt. Hierdurch wird erreicht, dass die extremen CPM-Werte geglättet werden und gleichzeitig die späteren Ergebnisse und Modellaussagen nicht verzerrt werden. Die Aussagekraft der Modelle und der Ergebnisse wird durch die strenge Monotonie der Wurzel erhalten.⁵⁷

Die transformierten Daten weisen eine geringere Streuung auf, was den Variationskoeffizienten auf 0,39 reduziert (siehe Tabelle 6 und Abbildung 11 rechts).

⁵⁷ Eine Rücktransformation, und damit verbundene Aussagen über die originären Messwerte, ist durch Anwendung der Umkehrfunktion (Y^2) leicht möglich. Folgend läuft die Auswertung mit den transformierten Daten ab.

Tabelle 6: deskriptive Kennzahlen der transformierten Messwerte (\sqrt{CPM})

Mittelwert	Median	Standardabweichung	Schiefe	Kurtosis	Minimum	Maximum
147	150,03	57,77	-0,15	2,3049	19,49	259,56

Nach der Werte-Transformation kann der Jarque-Bera-Test nun die Normalverteilungshypothese bestätigen (Teststatistik-Wert = 2,99; $p = 0,22$; keine Signifikanz).

Die empirische beziehungsweise mit dem Modell geschätzte Standardabweichung stellt das dargestellte Dispersionsmaß (Streubreite) dar. Die Varianzhomogenität (Gleichheit der Varianzen) zweier Gruppen wird mittels des robusten Brown–Forsythe-Tests begründet oder widerlegt (originäre Messwerte: Teststatistik-Wert = 0,85; $p = 0,36$; keine Signifikanz – transformierte Messwerte: Teststatistik-Wert = 0,79; $p = 0,38$; keine Signifikanz); eine Voraussetzung für die Durchführung von Varianzanalysen. Jener findet aber keine Anzeichen, dass sich die Varianz (σ^2) der beiden Gruppen signifikant unterscheidet.

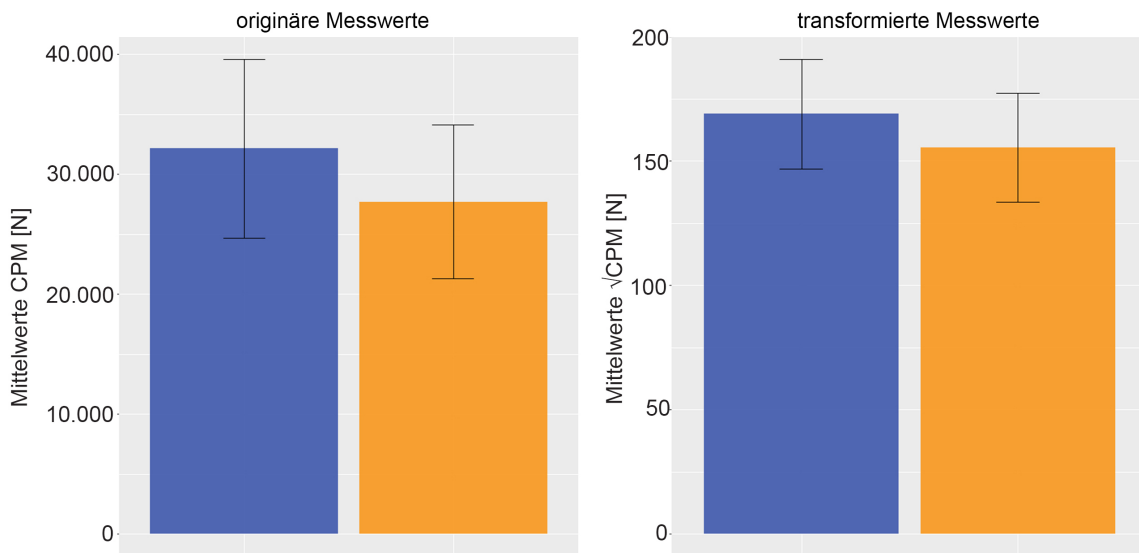


Abbildung 12: Mittelwerte von Duplikations- (blau) und Kontrollgruppe (gelb) zu t_1 ; Deutlich zu erkennen ist die Varianzreduktion bei den transformierten Daten innerhalb der jeweiligen Gruppe, anhand kürzerer Fehlerbalken (rechts) im Vergleich mit den originären Messwerten (links).

2.3.3 Lineares Gemischtes Model

Nach etwa 96 Stunden (t_2) zeigen sich deutlich erkennbare Unterschiede in beiden Gruppen (Duplikation und Kontrollgruppe; Abbildung 13). Die Verteilung der transformierten Daten zeigt, dass die Duplikationsgruppe zu t_2 tendenziell höhere Werte annimmt – was der Boxplot optisch verdeutlicht (siehe Abbildung 14 unten).

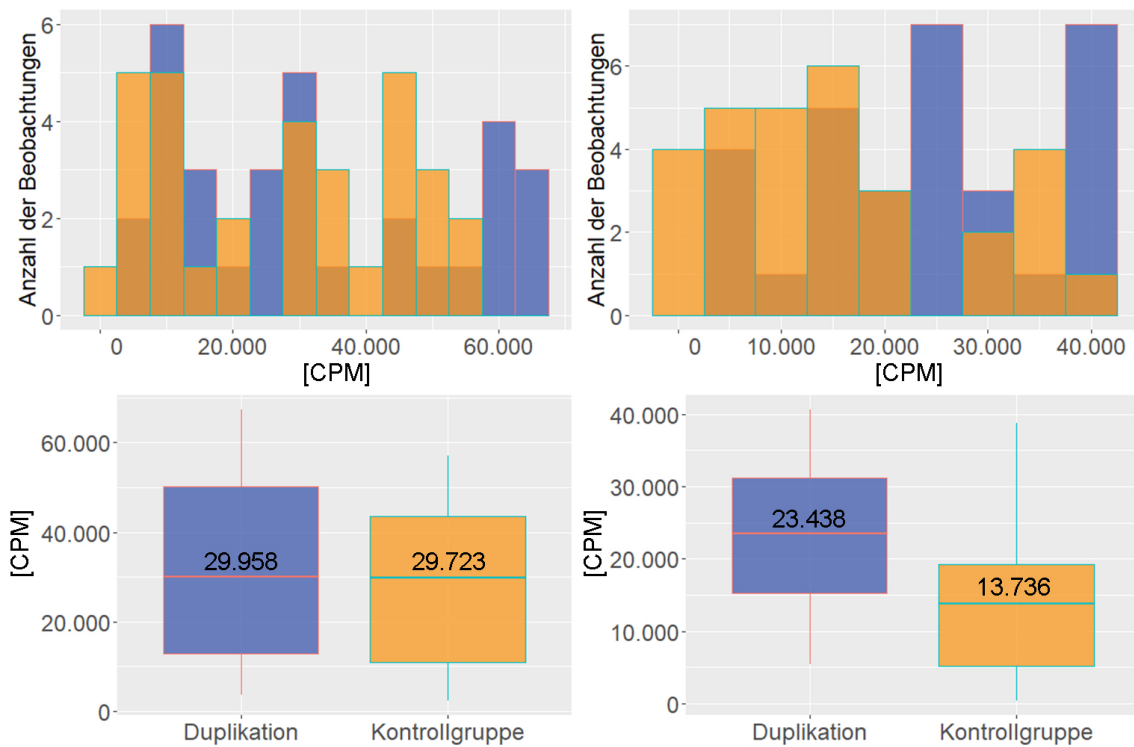


Abbildung 13: Mittelwerte der originären Werte von Duplikations- (blau) und Kontrollgruppe (gelb), vergleiche t_1 (links) und t_2 (rechts); oben Histogramme, unten Boxplots (mit Median)

Median zu t_1 für die Duplikations- (29.958 CPM) und Kontrollgruppe (29.723 CPM)
 Median zu t_2 für die Duplikations- (23.438 CPM) und Kontrollgruppe (13.736 CPM)

Tabelle 7: gerundete Mittelwerte (beide Gruppen) der originären Messwerte [CPM] zu beiden Zeitpunkten

originäre Messwerte	t_1	t_2
Duplikationsgruppe	32.155	23.838
Kontrollgruppe	27.713	15.455

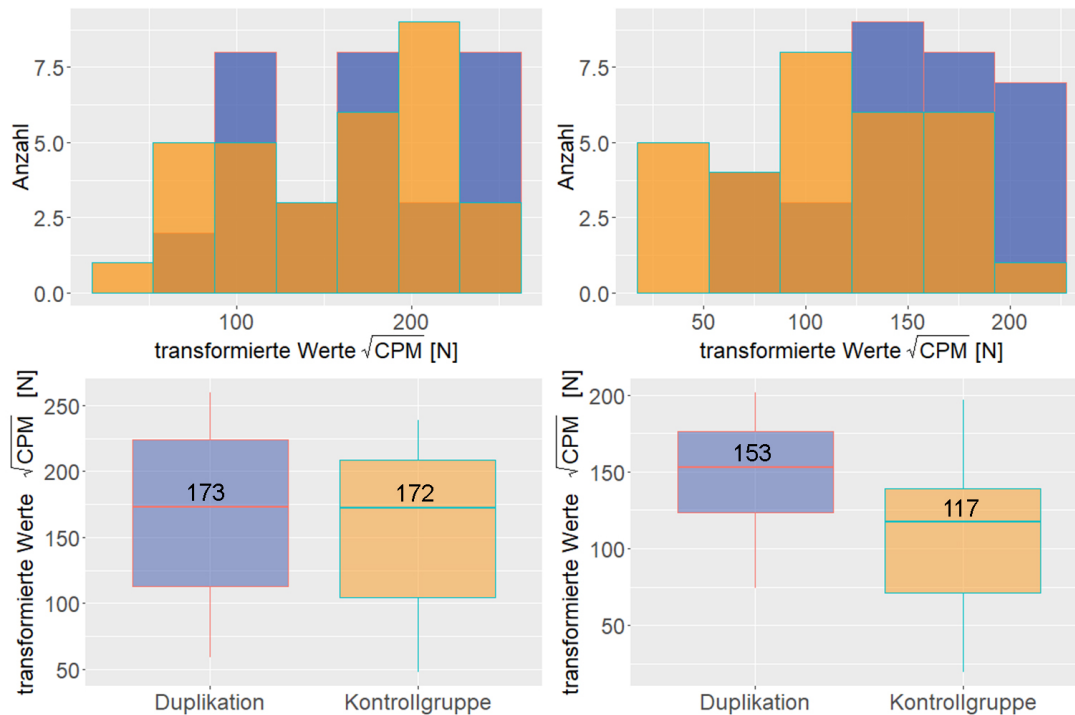


Abbildung 14: transformierte Daten von Duplikation- (blau) und Kontrollgruppe (gelb), t_1 (links) und t_2 (rechts); oben Histogramme, unten Boxplots

Median zu t_1 für die Duplikations- (173 $\sqrt{\text{CPM}}$) und Kontrollgruppe (172 $\sqrt{\text{CPM}}$)

Median zu t_2 für die Duplikations- (153 $\sqrt{\text{CPM}}$) und Kontrollgruppe (117 $\sqrt{\text{CPM}}$)

Tabelle 8: gerundete Mittelwerte (beide Gruppen) der transformierten Daten [$\sqrt{\text{CPM}}$] zu beiden Zeitpunkten

transformierte Daten	t_1	t_2
Duplikationsgruppe	169	150
Kontrollgruppe	155	112

Um den beschriebenen optischen Eindruck auch mathematisch auf signifikante Unterschiede zu testen, wird ein allgemeines Statistik-Modell verwendet, da es sich formal um wiederholte Messungen der gleichen Beobachtungsobjekte handelt: ein Lineares Gemischtes Modell mit festen und zufälligen Effekten. Dieses ist einer ANOVA mit wiederholten Messungen, welche zu exakt gleichen Ergebnissen führt, sehr ähnlich. Dies kann durch die folgende Gleichung beschrieben werden; als Referenzgruppe wird die Duplikationsgruppe gewählt, Zeitpunkt war t_1 (vergleiche die Gleichung mit Tabelle 9):

$$\sqrt{y_{i,t,j}} = \alpha_0 + \beta * Gruppe_i + \delta * Zeitpunkt_t + \theta * Gruppe_i * Zeitpunkt_t + \eta_j + \varepsilon_{i,t,j}$$

Tabelle 9: Legende – Interpretation der Koeffizienten (feste Effekte)

<u>Koeffizient</u>	<u>Interpretation</u>
α_0	\sqrt{CPM} -Mittelwert für Duplikationsgruppe zu t_1 (Referenzgruppe)
β	Zusatzeffekt der Kontrollgruppe zu t_1 (Within-Subject-Factor)
δ	Zusatzeffekt, der sich bei beiden Gruppen (i) zu t_2 zeigt (Between-Subject-Factor)
θ	Zusatzeffekt, der sich zu t_2 zusätzlich auf die Kontrollgruppe ergibt

3 Ergebnisse

Bestimmtheitsmaß

Das marginale Bestimmtheitsmaß R_m^2 des Modells, welches nur auf die festen Effekte zurückzuführen ist, beträgt 10,65%, während das konditionale Bestimmtheitsmaß R_c^2 , welches auch den großen Erklärungsanteil der zufälligen kulturindividuellen Effekte berücksichtigt, einen Wert von 80,02% annimmt. Dies weist auf einen hohen Erklärwert des Modells hin.⁵⁸

Tabelle 10: Schätzergebnisse der festen Effekte;
erstellt mittels Restricted-Maximum-Likelihood-Methode (Methode der maximalen
Mutmaßlichkeit)

<u>Koeffizient</u>	<u>Schätzwert</u>	<u>Standardfehler</u>	<u>p-Wert</u>	<u>Effektstärke</u>
α_0	162,44	16,96	< 0,001	-
β	-10,39	23,00	0,670	-0,21
δ	-13,15	6,90	0,059	-0,37
θ	-27,40	9,73	0,006	-0,55

Signifikanzniveau

Die Ergebnisse zeigen zu t_1 noch keine signifikante Verschiebung des Niveaus zwischen den beiden Gruppen (β), hingegen kann zwischen den Zeitpunkten ein deutlicher Unterschied festgestellt werden (δ) und sehr signifikant zeigt sich der Unterschied (Lageverschiebung) zwischen den beiden Gruppen zu t_2 (θ). [203]

⁵⁸ Darüber hinaus ist der Erklärwert des Modells mit individuellen Residuen im Anhang zu finden (siehe Tabelle 13).

Effektstärke

Cohen's d misst, als Effektstärke, den Abstand der Gruppenmittelwerte und gibt diesen in Standardabweichungen⁵⁹ an. Für den Zeiteffekt (dynamische Aushungerung von t_1 auf t_2) ergibt sich eine mittlere Effektstärke (δ : 0,37), eine hohe Effektstärke (θ : 0,55) zeigt sich zwischen den Gruppen zu t_2 . [204]

3.1 Erster Messzeitpunkt (t_1)

Vergleicht man bereits nach etwa 48 Stunden (t_1) Inkubationszeit die im Szintillationsdetektor gemessenen absoluten CPM-Werte der Gruppenmittel nach der 20-minütigen [³H]-2-Desoxyglukoseaufnahme, so zeigt der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test (Teststatistik-Wert = 440; p -Wert = 0,34) keine signifikante Lage-Verschiebung zwischen den beiden unabhängigen Gruppen (originäre und transformierte Daten).⁶⁰

3.2 Zweiter Messzeitpunkt (t_2)

Das Lineare Gemischte Modell belegt, dass es zu t_2 einen sehr signifikanten Unterschied zwischen Duplikations- und Kontrollgruppe gibt ($p=0,006$ mit einer hohen Effektstärke von 0,55) – der im Boxplot graphisch veranschaulichte Unterschied im Median (siehe Abbildung 14 unten rechts: 153 $\sqrt{\text{CPM}}$ Duplikationsgruppe und 117 $\sqrt{\text{CPM}}$ Kontrollgruppe).

⁵⁹ Cohens d (Effektstärke) > 0,5: kann als hoch bezeichnet werden
0,2 – 0,5: kann als mittel bezeichnet werden
0,0 – 0,2: kann als gering bezeichnet werden

⁶⁰ Ein Zweistichproben-t-Test (originäre Messwerte: Teststatistik-Wert = -0,92; $p = 0,36$; keine Signifikanz – transformierte Messwerte: Teststatistik-Wert = -0,89; $p = 0,38$; keine Signifikanz) bestätigt den U-Test (Abbildung 12).

4 Diskussion

Die funktionelle Untersuchung zur Duplikation des *SLC2A3*-Gens ist darin begründet, dass diese Kopienanzahlvariante mit ADHS assoziiert ist (siehe Kapitel 1.1.2 und 4.1). Die Charakterisierung dieser strukturellen Variante auf zellulärer Ebene soll zu einem besseren Verständnis genetisch bedingter und mutmaßlich über fehlgeleitete Stoffwechselprozesse vermittelte psychische Entwicklungsstörungen führen (siehe Kapitel 4.3). Die Hypothese, dass der Transport von Glukose durch funktionell wirksame genetische Varianten im *SLC2A3*-Gen Gendosis-abhängig alteriert ist, wurde aus der Erkenntnis abgeleitet, dass die Duplikation zu einer Erhöhung der mRNA-Synthese führt (siehe Kapitel 1.3.5).

Viele Kofaktoren beeinflussen die Expression und Umsatzrate des GLUT3. In dieser Arbeit zeigt eine einschleichende Hypoglykämie: die Messungen nach zwei Tagen (t_1) weisen keine statistische Signifikanz im Gruppenunterschied auf (siehe Kapitel 3.1). Die Messungen der transformierten CPM-Werte zeigen hingegen nach dem vierten Karenz-Tag (t_2) einen hoch signifikanten Unterschied mit einer geringen Effektstärke in den Gruppen auf (siehe Kapitel 3.2). H_0 kann folglich teils abgelehnt werden und die Hypothese bedingt auf den chronologischen Verlauf angenommen werden.

Die Qualität der Untersuchungsmethode wurde durch Verbesserung der Prozessschritte angehoben, wobei der mittlere Variationskoeffizient der Replikate innerhalb einer Kultur um knapp 80% gesenkt werden konnte (siehe Kapitel 2.2.4 und 4.2). Diese Standardisierung kann dazu genutzt werden, um in der Zukunft unterschiedliche Messmethoden zu vergleichen, zu verbessern und die Qualität zu sichern.

4.1 SLC2A3-Duplikation und der GLUT3

Die Nullhypothese⁶¹ kann in dieser Arbeit bedingt hoch signifikant (***) widerlegt werden (>99%). Die statistische Auswertung lässt nun die Schlussfolgerung zu, dass EBV-LCLs, welche in ihrem Genom die Duplikation des *SLC2A3*-Gens aufweisen, resilienter auf eine dynamische Aushungerung reagieren als die Kontrollgruppe und nach spätestens vier Tagen einen signifikanten Glukoseaufnahmevorteil gegenüber der Kontrollgruppe besitzen. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass jene Zellen mit einem größeren Reservoir an *SLC2A3*-mRNA, zumindest in einer einschleichenden Karenzsituation, einen hoch signifikanten [205] metabolischen Vorteil im Sinne einer höheren Kapazität oder einer gesteigerten Grundversorgung für die Glukoseaufnahme besitzen.

4.1.1 Gain-of-Function-Mutation durch Kofaktoren

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass die *SLC2A3*-Duplikation neben transkriptionellen Veränderungen auch funktionelle Konsequenzen nach sich zieht: Eine veränderte energetische Versorgung oder gar „Überversorgung“ durch eine *Gain-of-Function-Mutation* könnte die Genese bestimmter Zellen insofern beeinflussen, dass bestimmte Zellen/Zellgruppen und/oder Hirnareale/Schaltkreise möglicherweise unter speziellen Umweltbedingungen und in „vulnerablen Phasen“ länger und/oder früher mit etwas mehr Glukose versorgt werden können. So könnte die Homöostase zwischen Astrozyten/Gliazellen und Neuronen konsekutiv betroffen sein (siehe Kapitel 1.2.2), was schlussendlich psychische Pathologien/Veränderungen begünstigen kann (siehe Kapitel 1.3.3 und 4.3) [206] [93] [99] [207]. GLUT3 scheint vor allem während des ersten und zweiten Trimester in Trophoblasten / der Plazenta stark exprimiert zu sein. Die Ergebnisse sind allerdings widersprüchlich, wie von *Brown et al.* (2011) diskutiert [208] [135] (siehe fortführend Kapitel 4.3.4 und vergleiche unter anderem mit Kapitel 4.4.2 – Frühgeburten).

Bezüglich einer möglichen pathophysiologischen Bedeutung der *SLC2A3*-Duplikation sprechen diese Daten gegen eine kurzweilige, spontane Varianz der Glukosekonzentration im erwachsenen Gehirn. Mutmaßlich deutet dieser Fund auf eine

⁶¹ Die zwei Gruppen (Duplikationsgruppe mit 3 Kopien und die Kontrollgruppe mit 2 Kopien) der EBV-LCLs weichen nicht signifikant in ihrer Glukoseaufnahme voneinander ab, weder zu t_1 , noch zu t_2 .

noch zu untersuchende Gewichtung von bisher ungeklärten Kofaktoren hin [116] (siehe Kapitel 1.2.4), welche in vulnerablen oder kritischen Phasen, wie etwa der Genese (unter anderem Embryogenese, Neurogenese, Immunsystementwicklung; siehe hierzu fortführend Kapitel 4.3.2), ihren Einfluss auf die Duplikation entfalten können [206]. Dies deckt sich insofern mit der etablierten Meinung, dass für die genetische ADHS-Ätiologie ein polygenetischer Effekt als Kofaktoren zugrunde liegt, welcher für einzelne Gene nur eine geringe Effektstärke annimmt [29].

4.1.2 RNA und Translation

RNA besitzt selbst nicht nur kodierende, sondern auch weitreichende modifizierende Eigenschaften [209] [210]. Die mRNA⁶² dient unter anderem in Axonen und Dendriten zum Polarisieren der Zelle, sodass Proteine ortsabhängig kontrolliert exprimiert und in ihrer Aktivität beeinflusst werden können [211]. Dies wird unter anderem für die Zellmigration von Mikroglia und anderen Nervenzellen für die synaptische Plastizität benötigt sowie für die Embryogenese [212]. Gegebenenfalls unterliegen durch den hier gezeigten Gendosisseffekt auf der mRNA-Ebene daher der Abbau, Aufbau und/oder das Recycling der *SLC2A3*-mRNA, des Proteins⁶³ oder der GLUT3-tragenden Vesikel [123] besonderen metabolischen Voraussetzungen [144] [123] [213] [170].

Hypothesen zur Diskrepanz zwischen mRNA- und Proteinexpression

Gould et al. (1993) erwähnten unter anderem die Möglichkeit einer „negativen posttranskriptionellen Regulation“ und stellten die Hypothese auf, GLUT3 könnte in Geweben wie Leber und Niere zu „speziellen Subpopulationszellen“ gehören (vergleiche mit Kapitel 1.3.2) [143] [214]. *Khayat et al.* (1998) mutmaßten, dass GLUT3 zumindest im fötalen Muskelgenese und -Aufbau von Bedeutung sein mag [170]. Gegebenenfalls wird die Expression und Translation danach heruntergefahren, was die Diskrepanz zwischen mRNA- und Protein-Expression in manchen Geweben erklären mag (vergleiche mit Abbildung 16 im Anhang). Bereits *Maher et al.* (1994) zogen die Option in Betracht, dass diese Diskrepanz an zu ungenauen Methoden liegen könne [142], die Schwierigkeit *in situ*-Ergebnisse auf *in vitro*-Geschehen zu übertragen.

⁶² Über 2.500 unterschiedliche mRNAs wurden bereits im Hippocampus-Neuropil in Axonen/Dendriten gefunden.

⁶³ *Khayat et al.* (1998) errechneten eine Halbwertszeit des GLUT3-Proteins in immortalisierten Ratten-Myoblasten von 15h (GLUT1 von 6h) *in vitro*.

Vesikel und Hypoglykämie

Ob der Einbau von GLUT3 in intrazelluläre Vesikel auch im Gehirn relevant ist, bleibt noch unklar, da der Nachweis für intrazelluläre Vesikel mit GLUT3-Proteinen bisher nur in Thrombozyten erbracht wurde [160], wie bereits kritisch durch *Merker et al.* (2017) erwähnt [56].

Unter Insulin-getriggerten hypoklygämischen Bedingungen wurde eine gesteigerte GLUT3-Protein-Expression [215] [216] und mRNA-Expression in Rattengehirnen beobachtet [217]. Auch andere humane Leukozyten zeigen unter hypoglykämischen Bedingungen eine gesteigerte GLUT3-mRNA-Transkription [218]. *Maher et al.* (1991) erwähnten bereits in ihrer Veröffentlichung, „dass ein vollständiger Glukose-Entzug für [lediglich] 60 min die 2-Desoxyglukose-Aufnahme [von GLUT1 und GLUT3 noch] nicht ändert“ [144].⁶⁴ Effekte zeigen sich gegebenenfalls erst nach einigen Stunden [170].

Kofaktoren und zu Beleuchtendes

Es ist angemessen anzunehmen, dass auch andere expressionssteigernde Faktoren bei der *SLC2A3*-Duplikation zu einem hypermorphen Effekt führen (siehe Kapitel 4.3). „Effiziente neuronale Funktion ist übermmittelt durch die Ansammlung und Integration von Signalen, erhalten durch Dendriten, Verarbeitung und der ‚Entscheidungsfindung‘ im Soma und der Informationstransmission zum Axon“ [219]. Sollte dieser Entscheidungsfindungs-Prozess durch fehlgeleitete mRNA-Funktion beeinträchtigt sein, könnte sich dieser intrazelluläre Effekt eben möglicherweise phänotypisch, pathologisch äußern. Mehrere tausend Synapsen können mit einem Neuron verbunden sein, dabei reicht theoretisch ein einziges konstantes Signal aus, um eine Veränderung des verarbeiteten Musters herbeizuführen. Dies ist auch abhängig von der Lokalisation der Synapse / des Dendrites [220] (lese fortführend Kapitel 4.3.1).

Das Feld der transkriptionellen/translationalen GLUT-Regulation und des Membraneinbaus insulinunabhängiger GLUTs benötigt noch weitere Beleuchtung, da die aufgezählten Mechanismen genabhängig unterschiedlichen zellulären Prozessen unterworfen sind [221] [222] [223], welche Auswirkungen auf Signalwege [124] oder Proteininteraktionen zeigen können, die wiederum Expressionsmuster beeinflussen

⁶⁴ Ohne jedoch die Daten zu präsentieren.

[224] [225]. *Ancey et al.* (2018) beschreiben in ihrem Review einige Faktoren der GLUT3-Regulation (vergleiche mit den möglichen Kofaktoren Kapitel 4.4) und eine alterierte Expression anderer Gene als Antwort auf eine erhöhte GLUT3-Expression bei Tumoren. Dabei wird ebenfalls die Möglichkeit hervorgehoben, dass Glukosetransporter von anderen membranständigen Proteinen mit Signalrezeptorfunktion beeinflusst werden können [58].

Vielversprechend erscheint auch die Perspektive posttranskriptioneller Modifikationen, deren intensivere Untersuchung vielfach gefordert wird [139] [226] [227] [228] [229] [230]. Eine longitudinale Beobachtung ribosomaler Prozesse über definierte Intervalle wäre für die *SLC2A3*-Duplikation in lebenden Zellen sicher von hohem Aufschluss, vor allem da „eine erstaunliche Heterogenität in der Translation individueller mRNAs in derselben Zelle“ besteht [231].

4.2 Methodische Diskussion

Es ist zu bedenken, dass in der untersuchten *SLC2A3*-Duplikationsgruppe eine größere Anzahl von Zelllinien von ADHS-Patienten gewonnen wurde, während die Zellen der Kontrollgruppe von nicht auf psychische Erkrankungen untersuchten Blutspendern stammen. Es konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen Diagnosestatus und *SLC2A3*-Expression gefunden werden [56] (Merker et al. 2017), sodass diese Imbalance keinen Confounder darstellt. Anzumerken ist hingegen, dass MPH in EBV-LCLs zu einer gesteigerten *SLC2A3*-Expression führt, was in einer kleinen Stichprobe gezeigt werden konnte [232].

4.2.1 Messung der Proteinexpression mit der Western blot-Methode

Dass ein Einfluss der *SLC2A3*-Duplikation auf die Höhe der Proteinexpression auf LCLs bisher nicht eindeutig gezeigt werden konnte [56], mag daran liegen, dass die Western blot-Methode nicht sensitiv genug zur Detektierung feinerer Expressionsunterschiede ist [233]. Dagegen ist die quantitative Echtzeit-PCR, mit der die erhöhte *SLC2A3*-mRNA-Expression in Duplikationsträgern in derselben Publikation von *Merker et al.* (2017) nachgewiesen wurde, sehr viel sensitiver [234].

Ziegler beschreibt in seiner vorangegangenen Dissertation, in der er auf die *SCL2A3*-Proteinexpression der LCLs eingeht, zwar keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, jedoch einen Trend zur gesteigerten Proteinexpression in der

Duplikationsgruppe im dynamischen Aushungerungsversuch. Allerdings wurde dies bloß durch einen Western Blot und mit lediglich vier Zellkulturen (N=4) pro Gruppe (Duplikation gegen Kontrollgruppe) getestet [235]. So könnte sich nach methodischen Modifizierungen womöglich auch hier ein signifikanter Unterschied auf Protein-Ebene zeigen [236]. Aus der Veröffentlichung von *Vittori et al.* (2014), in welcher ein gesteigerter Gendosisseffekt auch auf Protein-Ebene für die Duplikation nachgewiesen wurde, sind folgende Unterschiede zu *Zieglers* Methode zu finden: Die LCLs von Patienten, welche unter Chorea Huntington litten, wurde von der Firma „BioRep“ (aus Milan, Italien) gewonnen. Außerdem besaß das verwendete Zellkulturmedium eine leicht abweichende Antibiotika-Zusammensetzung. Zusätzlich wurden die Zellen wohl nicht 48h nach der letzten Fütterung geerntet. Verwendet wurde die Bradford-Methode, anstatt dem Pierce® BCA-Assay-Kit, nur ein Zehntel des gleichen anti-Glut3-Antikörpers und die „ImageJ software“ anstatt der „AIDA“-Software zur Auswertung [186].

4.2.2 Modifizierung des Protokolls zur [³H]-2-Desoxyglukoseaufnahme

Durchführungsdauer, FBS und Cytochalasin B

Wie in der Methodenarbeit von *Yamamoto et al.* (2011) beschrieben [194], könnten die Zellen vor den Tests für einige Stunden in einem Medium ohne FBS inkubiert werden, um den Einfluss der beinhalteten Hormone auf die Glukoseaufnahme zu minimieren, was die Durchführung allerdings verkompliziert [237] [238]. Eine Reduktion der gemessenen Zellkulturen pro Versuchsdurchführung kann Verfälschungen der Messwerte aufgrund des Zeitverzugs vermeiden, zur Erhöhung der Messgenauigkeit führen und gibt zusätzlich Aufschluss über die Intra-Assay-Variabilität. Eine zügigere Versuchsdurchführung konnte in dieser Arbeit bereits durch das Exkludieren der Cytochalasin B-Gegenproben erreicht werden, da die unspezifische Glukoseaufnahme in diesem Modell mit einer Aufnahmezeit (Uptake-Zeit) von 20 min im Wasserbad zu vernachlässigen ist.

Phenolrot

Der Farbumschlag des Mediums (durch Phenolrot) schien durch subjektive Beobachtung mit den gemessenen CPM-Werten in Verbindung zu stehen. Um die Genauigkeit der Methode fortführend zu verbessern und weiter zu standardisieren, sollte in Zukunft auch der Farbumschlag, zum Beispiel durch die Photospektrometriemethode

oder durch eine digitale Spektralanalyse von Fotomaterial, miterfasst und berücksichtigt werden [239]. Anekdotisch soll noch erwähnt werden, dass EBV-LCLs mit der Duplikation im Genom subjektiv den Eindruck erweckten, generell besser und schneller im Brutschrank zu florieren, als angelegte EBV-LCLs mit lediglich zwei *SLC2A3*-Kopien im Genom.

4.2.3 Zellintrinsische Eigenschaften der EBV-LCLs und deren Einflüsse auf Messergebnisse

Gen-Bursts und Zellzyklus-Deregulation

Die Vermutung liegt nahe, dass die Zufallseffekte der Fehlerterme (siehe Kapitel 2.3.3) unter anderem aus Gen-„Bursts“, einem transkriptionellen „Pulsieren“ von Genen, und dem darin begründeten gesteigerten Energiebedarf resultieren. Dies könnte zu einer unterschiedlich starken Aufnahme der markierten Glukose bei den einzelnen Messungen führen [240], dies ist für homogene Zellkulturen allerdings normal [241].

Durch die EBV-Immortalisierung wird der Zellzyklus dereguliert. Ob sich diese vermeintlich stochastische Deregulation nun positiv auf die statistische Auswertung auswirkt, weil alle Zellen zufällig betroffen sind oder negativ, da unter anderem Transkriptionsfaktoren – potentielle Kofaktoren – unverhältnismäßig stark differieren können und insgesamt nur etwa 10% der B-Lymphozyten durch diese Methode immortalisiert werden können, bleibt spekulativ [242]. Eine Schwachstelle der vorliegenden Thesis ist die kleine Stichprobe von neun unterschiedlichen Zelllinien (Zellkulturen) pro Gruppe (n=2; N=9), was aber ein allgemeiner Schwachpunkt von arbeitsintensiven und zeitaufwendigen Zellkulturarbeiten ist, die Hochdurchsatzverfahren daher kaum ermöglichen.

Zwei Glukosetransporter mit Warburg-Effekt

Die Lymphoblasten unterliegen durch die Immortalisierung mit EBV kanzerogenen Alterierungen, was mit einem veränderten Stoffwechsel und einem veränderten Transkriptionsmuster einhergeht [243] [244]. Dabei wird die Translation sowie die Expression von Glukosetransportern stimuliert (Warburg-Effekt)⁶⁵ [58] [245] [246].

⁶⁵ Bei vielen Krebszellen beobachtete Veränderung des Glukose-Stoffwechsels, durch welchen die Zellen ihre Energie hauptsächlich durch Glykolyse mit anschließender Ausscheidung von Laktat gewinnen, statt das Endprodukt der Glykolyse dem Citratzyklus in den Mitochondrien zuzuführen.

Onkogen-induzierter Replikationsstress könnte auch in den hier verwendeten Zelllinien zu sekundären Veränderungen geführt haben, während die Zellkulturen alterten [247]. Alle Tests wurden jedoch deutlich unter sieben Monaten nach dem Auftauen durchgeführt.

Zu berücksichtigen ist, dass die untersuchten Lymphoblasten-Kulturen auch GLUT1 exprimieren [195]. GLUT1 besitzt für D-Glukose eine K_m von etwa 1,4-1,6 [mmol/l], GLUT3 hingegen eine K_m von etwa 3,44 [mmol/l] (siehe Abbildung 4 und [145] [130]). Die [³H]-Glukosekonzentration des in dieser Arbeit verwendeten Uptake-Mediums beträgt 0,68 mM. Unter der wahrscheinlichen Bedingung, dass eine geringere enzymatische Konzentration an Transportern in der Probe herrscht als an Glukosemolekülen ($[Enzyme] < [^3H\text{-Glukose}]$) kann idealisiert davon ausgegangen werden, dass GLUT3 für etwa die doppelte Menge der absorbierten Glukose verantwortlich ist als GLUT1 [248]. Jener methodische Nachteil würde sich weiter schmälern, ließe sich auch für B-Lymphoblasten eindeutig eine gesteigerte GLUT3- und eine gesenkte GLUT1-Proteinexpression beobachten, wie bereits in anderen PBMCs gezeigt [218]. Bei einem möglichen konträren Fund hierzu ergibt sich sonst der Umkehrschluss eines untermauernden starken Effektes des GLUT3 auf die Glukoseaufnahme. Trotzdem kann in zukünftigen Untersuchungen zusätzlich der neu-identifizierte, hoch-spezifische GLUT1-Inhibitor BAY-876 eingesetzt werden, welcher das Problem der Koexistenz der zwei GLUTs noch weiter reduziert [249]. Für zukünftige Investigationen soll angemerkt sein, dass in einer Untersuchung an humanen, retinalen Endothelzellen, nach Kultivierung in einem sehr hyperglykämischen Milieu (15 mM; ähnlich des hier verwendeten Mediums mit 11,11 mM – siehe Tabelle 2), die mRNA-Synthese für beide GLUTs anscheinend maximal war [250].

In vitro versus in vivo

Ein Nachteil des hier verwendeten Methodendesigns ist, dass homogene lymphoblastoide Zelllinien in Zellkulturen untersucht wurden, mit dem Versuch, die Ergebnisse auf das heterogene, reich verknüpfte Nervengewebe zu übertragen, welches ein anderes Genexpressionsmuster aufweist und einem anderen Milieu ausgesetzt ist [251] [61]. *In vitro* können kultivierte Zellen ihre gewebespezifische Glukosetransporter-Isoform-Ausprägung ändern [155], was in dieser Dissertation vorteilhaft in der Auswahl der Nähr-Glukosekonzentration genutzt wird. Dieser Kompromiss wurde aus praktischen Gründen eingegangen, was jedoch eine gängige Praxis in Wissenschaft und Forschung

darstellt [252] [253]. Anzumerken ist, dass die spezielle Lipidzusammensetzung der Biomembran die GLUT-Umsatzrate ebenfalls beeinflusst [254]. *In vitro* wurde dieser mögliche Effekt durch ein standardisiertes Medium (siehe Tabelle 2) gleichgeschaltet und wird hier lediglich als mögliche Differenz zu *in vivo* angeführt. Auch der zerebrale Kofaktor des Glykogen-Stoffwechsels wurde *in vivo* bisher von der Forschung weniger stark untersucht [255] [90].

4.3 Nervengewebe und ADHS

Die ADHS-Hypothese, die Pathologie sei auf eine verzögerte Reifung zurückzuführen [30], kann durch die *Gain-of-Function-Mutation* nur unter besonderen Konditionen in Betracht gezogen werden. Hierfür müssten weitere Kofaktoren gefunden werden, welche einen chronischen Effekt auf die neuronale Reifung verschiedener Gehirnareale mit sich führen. Die Vermutung liegt nahe, dass weitere Effekte/Faktoren, die zu einer gesteigerten GLUT3-(mRNA-)Expression führen, durch eine zusätzliche Gen-Kopie im Genom ebenfalls verstärkt werden (vergleiche unter anderem mit Kapitel 4.4.2 – Hypoxie).

4.3.1 Histologie

Eine aktuelle Übersichtsarbeit zu Metaanalysen über die Neurobiologie der ADHS von *Pievsky et al.* (2018) schlussfolgert, dass die ADHS und ihre pathologischen Folgen vor allem aus der Schwierigkeit des Gehirns resultieren, vom Ruhemodus in einen aktiven Modus umzuschalten [14]. Die genauere Verteilung von GLUT3 im humanen Gehirn sollte untersucht werden, mit einem speziellen Augenmerk auf die neuroanatomische Konnektivität des Default Mode Network (DMN)⁶⁶ und die beeinflussenden Strukturen [256] [257] [258]. Das DMN wurde zudem in Verbindung mit weiteren neuronalen Pathologien wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Epilepsie und Affektstörungen gebracht [259]. Möglicherweise führen *Gain-of-Function-Mutationen* von *SLC2A3* in sensiblen Perioden der Neurogenese zu einer alterierten neuronalen Konnektivität, sodass eintreffende synaptische Signale zu einer veränderten neuronalen Informationsverarbeitung führen.

⁶⁶ Mit zwei „Hauptknotenpunkten“ im posterioren cingulären Kortex und dem anterioren medialen präfrontalen Cortex, sowie zwei Subsystemen.

4.3.2 Neuroplastizität durch Neuroinflammation

Zhou et al. (2017) diskutieren den Zusammenhang von Entzündungen, dem Immunsystem und ADHS [260]. Dies ist in Verbindung mit der erhöhten GLUT3-Expression in entzündetem Gewebe interessant und sollte weiter verfolgt werden [137]. Es wird vermutet, dass ein Großteil des erhöhten Glukosebedarfs inflammatorischen Gewebes von aktivierten Makrophagen⁶⁷ ausgeht [261]. Dies ist besonders interessant, da die *SLC2A3*-Duplikation einen stärkeren Effekt auf die mRNA-Expression in Makrophagen hat als in den hier untersuchten B-Lymphoblasten; ebenso exprimieren Duplikations-PBMCs das GLUT3-Protein relativ stärker als LCLs [56].

Potentiell lässt sich auch eine verbindende Brücke zu Pharmaka wie Methylphenidat (MPH) und inflammatorischen Prozessen schlagen (siehe fortführend Kapitel 4.4.1). MPH zeigte neuroplastische Veränderungen in der Ratte [262]. Auch das Alter von Probanden ist für die neuronale Plastizität und Entzündungsprozesse von besonderer Bedeutung, das Augenmerk wird in der Forschung allerdings häufig auf die Adoleszenz gelegt [14].

4.3.3 Zuckerkonsum

Genetische Varianten von Glukosetransportern können zudem mit dem Zuckerkonsum in Verbindung stehen [263]. So konnte gezeigt werden, dass *SLC2A3*-Duplikationsträger hochkalorische Nahrung als weniger energiereich einschätzten als Kontrollprobanden mit nur zwei *SLC2A3*-Kopien. Auch für ein SGLT-Gen wird bereits eine Korrelation zu ADHS diskutiert [264]. So sollten in Zukunft auch weiterhin die Beziehungen zwischen Ernährungsgewohnheiten und anderen Lebensstilfaktoren untersucht werden [265]. Ferner liegen Befunde zu gesteigertem Zuckerkonsum bei Entzündungen, Veränderungen des mesolimbischen Dopaminsystems und des präfrontalen Kortex im Zusammenhang mit ADHS vor [266] [260] [267] [268] [269]. Für die intrazelluläre Verwertung energiereicher Substrate sind Veränderungen der Hexokinasen⁶⁸ und des PPAR- γ im Auge zu behalten [270] [271] [157]. Da zurzeit die Beziehung des Mikrobioms mit der Darm-Hirn-Achse intensiv investigiert wird, könnte in diesem Kontext auch eine

⁶⁷ Etwa drei Stunden post Endotoxin-Administration in der Peripherie zu beobachten.

⁶⁸ Sie sind wichtige Enzyme aus dem Kohlenhydratstoffwechsel, sie phosphorylieren Hexosen.

Brücke zu Zuckerkonsum, GLUT-Expression und ADHS geschlagen werden [272] [70] [131] (siehe Kapitel 1.1.2). In diesem Zusammenhang scheint vor allem die mikrogliale Reifung bedeutsam für die Entwicklung neuropsychiatrischer Erkrankungen zu sein [273].

4.3.4 Epigenetik von ADHS

Epigenetische Veränderungen der DNS durch Stress wurden bereits in verschiedenen Maus-Modellen beobachtet. Die veränderten Methylierungsmuster zeigten sich vor allem an Genen, welche schon mit psychischen Erkrankungen assoziiert wurden [274]. Auch die Untersuchung der generationenübergreifenden epigenetischen Vererbung ist für ein besseres ätiopathogenetisches Verständnis der ADHS spannend zu verfolgen [275] [276] [277]. So könnte dieser Forschungszweig das Erkrankungsbild der ADHS vor dem Hintergrund von Umwelteinflüssen schärfen [278]. Die jüngere Wissenschaft der Epigenetik könnte Methylierungsmuster⁶⁹ des *SLC2A3*-Gens hinsichtlich der Auswirkungen auf die Neuroplastizität bei ADHS untersuchen [279] [280]. Eine aktuelle systematische Übersichtsarbeit zu ADHS und Epigenetik von *Dall'Aglio et al.* (2018) warnt zwar vor voreiligen Schlüssen in diesem jungen Feld, erwähnt allerdings das mit der Nahrungsaufnahme in Verbindung stehende *VIPR2*-Gen⁷⁰ mit der höchsten Korrelation zur ADHS [281] [282].

Auch ein möglicher transregulatorischer Effekt auf das *SLC2A3*-Gen in Kindern mit Dyslexie wurde in signifikanter Korrelation für zwei Einzelnukleotid-Polymorphismen auf dem Chromosom 4 beobachtet [283].

⁶⁹ Es sei hier angemerkt, dass sowohl für GLUT3, als auch für GLUT10 regulatorische Methylierungen in der Plazenta gefunden wurden. Jedoch noch nicht für GLUT1.

⁷⁰ Gen zu einem Rezeptor für das vasoaktive intestinale Peptid.

4.4 Ausblick

Gegebenenfalls kann die untersuchte GLUT3-Mutation als „Neben-Gen“ für einige assoziierte Pathologien angesehen werden [284]. Sehr interessant für die intrazellulären Auswirkungen der *SLC2A3*-Duplikation sind auch hier mögliche Kofaktoren – wie die folglich erwähnten.

4.4.1 Variation der Untersuchung:

Mögliche Kofaktoren auf die *SLC2A3*-Duplikation

Die Einflussnahme möglicher Kofaktoren auf das *SLC2A3*-Gen und die CNVs sollte hinsichtlich Energieverwertung, Enzym-Expression, Signaltransduktion und Expressionsveränderungen unbedingt untersucht werden: Zum Beispiel von Pharmaka wie Metformin [285] [286] oder MPH, welches die Glukoseaufnahme im Gehirn von Ratten erhöht [287] und sogar die benötigte Basisversorgung herabsetzen kann [288]. Dies ist vor allem im Zusammenhang mit der paradoxen Wirkung von MPH auf ADHS-Patienten interessant [289] [290] [291] [292].

Weiterführend zu untersuchen sind Sympathomimetika wie Noradrenalin [293] oder Cortisol [172], Hormone wie Insulin [195], Androgene [294] [230] sowie diverse Wachstumsfaktoren [295] [237] wie Interleukin-3 [296], Neurotransmitter/Gliotransmitter [297] wie dem exzitatorischen, mit ADHS assoziierten Glutamat [298] [299], welches bei einem Überangebot auch neurotoxisch wirken kann [102], Gasotransmitter wie Stickstoffmonoxid [300] oder Drogen wie Nikotin [301] [302].

Interessant zu beforschen wären auch andere Zuckerformen wie zum Beispiel Galaktose, für welche der GLUT3 eine höhere K_m als zu Glukose aufweist [125]. Auch Laktat oder Ascorbinsäure beeinflussen den GLUT3 in Neuronen [303].

So könnten in vertiefenden Untersuchungen zum Beispiel durch FDG-PET-Scans Einflüsse *in vivo* auf verschiedene Gewebe gezeigt werden [304] [305] [139]. Während in einer „Megaanalyse“ bildgebender Verfahren signifikante Abweichungen von partiellen Gehirnregionen im Volumen für Patienten mit ADHS im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden wurden, wäre eine solch riesig angelegte Untersuchung an Trägern der *SLC2A3*-Duplikation von immensem Aufschluss [306]. Auch die *in vivo* Glukose-Aufnahme durch die Magnetresonanztomographie könnte im direkten Vergleich zwischen der Duplikations- und der Kontrollgruppe weitere Erkenntnis über

das physiologische Wirken der hypermorphen Duplikation aufzeigen [94]. Insbesondere könnten spezielle Hirnregionen/-strukturen, auf ihre Aktivität und Expression untersucht werden [307].

4.4.2 Anmerkungen zu fortführenden Untersuchungen

Eine Herausforderung weiterer Untersuchungen wird die Vereinbarkeit einiger Forderungen sein: Zum einen der Wunsch nach Untersuchung von Neuronen (für Gliazellen siehe Kapitel 4.3.2), zum anderen die exklusive Untersuchung des GLUT3 und seiner CNVs. Hierzu existieren für weitere Studien mittlerweile auch pluripotente Stammzellen mit der *SLC2A3*-Duplikation [308], die sich in neuronale Zellen verschiedener Funktionssysteme, wie dem dopaminergen, serotonergen oder glutamatergen System differenzieren lassen und damit ein geeignetes Instrument zur Erforschung des Einflusses von Neurotransmittern in Zellen von Patienten darstellen. Alternativ könnte ein genetisch alterierter Hefepilz, zum Beispiel nach der Methode von *Tripp et al.* (2017), verwendet werden, um speziell die *SLC2A3*-CNVs isoliert zu untersuchen [309].

Da das hier verwendete Protokoll 20 Minuten für die Inkubation mit [³H]-Desoxyglukose vorgibt, wäre es auch interessant, die Glukoseaufnahme nach nur wenigen Minuten/Sekunden Inkubation zu untersuchen. Hierfür könnte dann wieder Cytochalasin B für die Feinmessung herangezogen werden [194] [237] [145]. Eine Erhöhung der Inkubationszeit über 20 Minuten scheint nicht sinnvoll zu sein, da die [³H]-Desoxyglukose intrazellulär nicht weiter metabolisiert wird [196]. Eine Verlängerung der Glukosekarenz oder Variationen der Glukosekonzentration im Zellkulturmedium sind weitere Anpassungen, durch die das Protokoll verbessert werden könnte.

Mit weiterführenden NMR-Untersuchungen könnten spezifischere Protein-Bewegungen beobachtet werden, welche Investigationen zum Abbau der *SLC2A3*-mRNA sowie zum Transport von GLUT3 zwischen verschiedenen zellulären Kompartimenten ermöglichen [310], um so mehr Aufschluss über die Signalwege des *SLC2A3*-Gens zu generieren. Wenn die Verfahren zur Entschlüsselung der Proteinstrukturen, der Protein-Ligand-Interaktionen und der Protein-Protein-Interaktionen in Zukunft weiter voranschreiten, könnten unter Umständen auch weitere Differenzen zwischen der Duplikation und der einfachen GLUT3-Variante gezeigt werden [128] [111].

Hypoxie, Rauchen und Frühgeburten

Hypoxie führt bei der Ratte zu einer gesteigerten GLUT3-Expression im Gehirn [311].⁷¹ Hypoxie ist eine häufige Komplikation bei Frühgeburten, welche die Nervenreifung beeinflusst [312]. Gegebenenfalls ließe sich auch hier eine differenzierte Verbindung / ein genaueres Verständnis schaffen, wenn jene speziell betroffene Gruppe auf eine GLUT3-Mutation untersucht wird, da die Frühgeburtlichkeit einen Risikofaktor für ADHS-Symptome darstellt [313]. *Janzen et al.* (2013) untersuchten den humanen plazentalen Glukosetransport intrauteriner Wachstumsrestriktionen. Dabei fanden sie eine gesteigerte GLUT3-Proteinexpression⁷², vermutlich durch eine Perfusionsstörung, gegebenenfalls bedingt durch ein plazentrales Trauma. Weiter mutmaßten sie, dass in solch einer pathologischen Situation eine erhöhte GLUT3-Protein-Expression, fehlgeleitet in den Langhans-Zellen⁷³ fehlgeleitet, eine fötale Hypoglykämie verstärken könne [314]. Auch konnte gezeigt werden, dass Tabak-Missbrauch in der Schwangerschaft die *SLC2A3*-mRNA-Expression in der Plazenta steigert [302].

4.4.3 Genetik und Therapie

Wir benötigen ein klareres Verständnis für die Interaktion unserer Gene und wie diese auf ein verändertes Milieu reagieren. Weitere Grundlagenforschung kann dazu führen, dass wir in der Lage sind, das Gehirn, den Menschen und die Nosologie bestimmter Krankheitsbilder angemessener zu verstehen. Ebenso mag dies in Zukunft zu einem besseren Verständnis der Prozesse in den unterschiedlichen Geschlechtern führen. All dies stellt einen weiteren Schritt zur personalisierten Medizin dar, sobald unter anderem auch die non-coding-RNA-Abschnitte (~98% der genomischen Ausgabe) genauer untersucht sind, wie bereits von *Mustafin et al.* (2018) gefordert [315] [316]. Bluttests sind bereits in der Erprobung [317]. So könnte es eines Tages Medikamente speziell für die Biomembran geben, welche eine Pathologie möglicherweise bereits in ihrer Genese unterdrücken [318] (siehe auch Kapitel 1.2.3) oder mit Genen interagieren [319].

⁷¹ für die anaerobe Glykolyse

⁷² via HIF-1 α (Hypoxie-induzierter Faktor 1 α -Untereinheit)

⁷³ Langhans-Zellen – unreife Stammzellen – bilden den Zytotrophoblasten, sind Teil der Plazentaschranke und fetaler Teil der Zottenwand.

4.4.4 Geschichtlicher Kontext

Während sich die Wissenschaft, Medizin und Diagnostik im letzten Jahrtausend mit dem Zeitgeist und der Weltanschauung wandelten und unter anderem auf Moral, Ethik oder Tugenden begründet waren [25] [320], verändert sich auch aktuell das diagnostische Bild der ADHS. Erst kürzlich wurden die überlappenden Spektren des Autismus und der ADHS genauer differenziell dargestellt und in Richtlinien umgesetzt, welche die Diagnostik für das Individuum sensitiver⁷⁴ machen. Der Trend steuert gegenwärtig von einer Klassifikation als Verhaltensstörung zu einer Charakterisierung als neurologische Entwicklungsstörung, von Alterationen in einzelnen Hirnregionen zu komplexen neuronalen Netzwerkstörungen und weg von monokausalen zu multifaktoriellen Erklärungsmodellen. Die Subtypen-Klassifikation wandelte sich vom DSM-IV zu DSM-V zu einer Ausprägungs-Klassifikation [321] [17] [174]. Parallel dazu entwickeln das amerikanische National Institute of Health (NIH) das Projekt „Research Domain Criteria“ (RDoC), eine neue systematische Datenbank für die psychiatrische Forschung. Sie ist im Gegensatz zur DSM- oder ICD-Klassifikation weniger auf Symptome und Einschränkungsggrad basierend und versucht stärker auf den ätiologischen Kontext einer Ausprägung einzugehen (emotionale Wertigkeit sowie kognitive, soziale und anregende/regulierende Systeme). Das Projekt soll unter anderem die Entwicklung von individualisierten Therapiestrategien fördern, indem es „molekulare, genetische, zelluläre, neuronale Schaltkreise [und unter anderem] das Verhalten“ analysiert [322] [323]. Auch in der Genetik werden neue Begriffe, wie die „Omnigenetik“⁷⁵, etabliert, welche benötigt werden, da klassische Modelle nicht alle Beobachtungen einbeziehen können. Das omnigenetische Modell versucht die Ergebnisse von GWAS und SNPs⁷⁶ zusammenzuführen und schlägt die Möglichkeit von „Haupt- und Nebengenen“ in bestimmten Zellpopulationen vor, welche zu einer bestimmten Pathologie/Ausprägung führen oder deren Ausprägung unterstützen [284] [6].⁷⁷

⁷⁴ bezogen auf die Richtig-positiv-Rate (Statistik); siehe Kapitel 1.1.1

⁷⁵ Die Omnigenetik befasst sich mit phenotypischen Ausprägungen einer Pathologie, welche sich nicht eindeutig durch ein Gen oder eine bestimmte, zusammengehörige Gengruppe erklären lässt.

⁷⁶ Sie vermitteln in ihrer Kontribution zu bestimmten Pathologien nur eine sehr geringe Signifikanz.

⁷⁷ Auch in der Evolutionsbiologie zeigen neue Erkenntnisse, dass neuronale Prozesse wohl transgeneralen Einfluss auf die Keimbahn haben via RNA.

Auch die Forschung zur Glukose- / Energie-Homöostase hat im letzten Jahrhundert einen Wandel vom ZNS in die Peripherie und wieder zurück erfahren. Dabei verspricht die Beobachtung der weiteren Entwicklung sehr spannend zu bleiben [76].

Die vorliegende Forschungsarbeit „Funktionelle Untersuchung zur Duplikation des SLC2A3-Gens in Patienten mit Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung“ versucht einen weiteren kleinen Baustein für die Zukunft mitzugeben und hoch aktuelle Verbindungen zu knüpfen, helfen Diagnostik zu verfeinern, Leidenden über Umwege zu helfen, gegebenenfalls Erklärungsstützen für Modelle zu liefern und ihren winzigen Teil zum riesigen Gesamtbild der Pathologie und zum Nervengewebe beizutragen.

5 Zusammenfassung

5.1 Fragestellung und zentrale Untersuchung

Unter der Hypothese, dass die Transportrate des Glukosetransporters Typ 3 (GLUT3) abhängig von der Kopienanzahl (CNV) des für ihn kodierenden Gens *SLC2A3* ist, wurden Zelllinien mit drei Kopien (Duplikation) mit Kontroll-Zelllinien mit nur zwei Kopien bezüglich ihrer Glukoseaufnahme miteinander verglichen ($n=2$; $N=9$). Hierzu wurde die zelluläre Glukoseaufnahme mittels radioaktiv markierter 2-Desoxyglukose in via Epstein-Barr-Virus immortalisierten lymphoblastoiden Zelllinien (EBV-LCLs) gemessen. In den initialen Untersuchungen zeigt sich, dass das Protokoll an manchen Stellen zu viel Spielraum lässt. Die Methode wird daraufhin standardisiert und bezüglich einiger Parameter angepasst: g-Zentrifugeneinstellung, Mischen/Aliquotieren, Zellanzahl, Replikatanzahl, Inkubationszeit/-intervalle und Durchführungsdauer.

5.2 Wichtigste Ergebnisse

Die funktionelle Untersuchung zur Duplikation des *SLC2A3*-Gens in Patienten mit Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS) zeigt schließlich im dynamischen Aushungerungsversuch der EBV-LCLs über vier Tage (Vergleich t_2 zu t_1) statistisch für die Gruppen eine deutliche Differenz mit mittlerer Effektstärke (Lineares Gemischtes Modell; $p = 0,06$; Cohens $d = 0,37$).

Zum zweiten Messzeitpunkt (t_2) zeigt sich statistisch zwischen den Gruppen eine sehr signifikante Differenz mit hoher Effektstärke (Lineares Gemischtes Modell; $p < 0,006$; Cohens $d = 0,55$).

Damit konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass die *SLC2A3*-Duplikation neben dem Gendosiseffekt auf mRNA-Ebene auch hypermorph funktionelle Veränderungen auf zellulärer Ebene nach sich zieht. Nachfolgende Untersuchungen sollten vor diesem Hintergrund mögliche Kofaktoren investigieren und auf Alterationen in nachgeschalteten Signalwegen abzielen.

1. Polanczyk, G.V., et al., *Annual research review: A meta-analysis of the worldwide prevalence of mental disorders in children and adolescents*. J Child Psychol Psychiatry, 2015. **56**(3): p. 345-65.
2. Mokdad, A.H., et al., *Global burden of diseases, injuries, and risk factors for young people's health during 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013*. Lancet, 2016. **387**(10036): p. 2383-401.
3. Brook, J.S., et al., *ADHD, Conduct Disorder, Substance Use Disorder, and Nonprescription Stimulant Use*. J Atten Disord, 2017. **21**(9): p. 776-782.
4. Tang-Schomer, M.D., et al., *Bioengineered functional brain-like cortical tissue*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(38): p. 13811-6.
5. Wermter, A.K., et al., *From nature versus nurture, via nature and nurture, to gene x environment interaction in mental disorders*. Eur Child Adolesc Psychiatry, 2010. **19**(3): p. 199-210.
6. Posner, R., et al., *Neuronal Small RNAs Control Behavior Transgenerationally*. Cell, 2019. **177**(7): p. 1814-1826 e15.
7. Willcutt, E.G., *The prevalence of DSM-IV attention-deficit/hyperactivity disorder: a meta-analytic review*. Neurotherapeutics, 2012. **9**(3): p. 490-9.
8. Schlack, R., et al., *[The prevalence of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) among children and adolescents in Germany. Initial results from the German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents (KiGGS)]*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2007. **50**(5-6): p. 827-35.
9. Rucklidge, J.J., *Gender differences in attention-deficit/hyperactivity disorder*. Psychiatr Clin North Am, 2010. **33**(2): p. 357-73.
10. Wender, P.H., L.E. Wolf, and J. Wasserstein, *Adults with ADHD. An overview*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **931**: p. 1-16.
11. Faraone, S.V., J. Biederman, and E. Mick, *The age-dependent decline of attention deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis of follow-up studies*. Psychol Med, 2006. **36**(2): p. 159-65.
12. Fayyad, J., et al., *Cross-national prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder*. Br J Psychiatry, 2007. **190**: p. 402-9.
13. Dilling, H., Mombour, W., Schmidt, M. H., Schulte-Markwort, E., & Remschmidt, H., *ICD-10-GM (Version 2019) - Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme*. Herausgegeben vom Deutschen Institut für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI) im Auftrag des Bundesministeriums für Gesundheit (BMG) unter Beteiligung der Arbeitsgruppe ICD des Kuratoriums für Fragen der Klassifikation im Gesundheitswesen (KKG) / Kohlhammer (Stuttgart), 2019. **10. Revision**(German Modification).
14. Pievsky, M.A. and R.E. McGrath, *The Neurocognitive Profile of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Review of Meta-Analyses*. Arch Clin Neuropsychol, 2018. **33**(2): p. 143-157.
15. Singh, A., et al., *Overview of Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Young Children*. Health Psychol Res, 2015. **3**(2): p. 2115.

16. American Psychiatric, A., *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* 2013. **5**(5): p. 947.
17. Cortese, S. and D. Coghill, *Twenty years of research on attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): looking back, looking forward*. *Evid Based Ment Health*, 2018. **21**(4): p. 173-176.
18. Association, A.P., *Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen DSM-5®*. 2015. **5**: p. 467.
19. Brassett-Harknett, A. and N. Butler, *Attention-deficit/hyperactivity disorder: an overview of the etiology and a review of the literature relating to the correlates and lifecourse outcomes for men and women*. *Clin Psychol Rev*, 2007. **27**(2): p. 188-210.
20. Kadesjo, B. and C. Gillberg, *The comorbidity of ADHD in the general population of Swedish school-age children*. *J Child Psychol Psychiatry*, 2001. **42**(4): p. 487-92.
21. Gillberg, C., et al., *Co-existing disorders in ADHD -- implications for diagnosis and intervention*. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 2004. **13 Suppl 1**: p. 180-92.
22. Biederman, J., *Attention-deficit/hyperactivity disorder: a selective overview*. *Biol Psychiatry*, 2005. **57**(11): p. 1215-20.
23. Rommelse, N., et al., *An evidenced-based perspective on the validity of attention-deficit/hyperactivity disorder in the context of high intelligence*. *Neurosci Biobehav Rev*, 2016. **71**: p. 21-47.
24. Dalsgaard, S., et al., *Mortality in children, adolescents, and adults with attention deficit hyperactivity disorder: a nationwide cohort study*. *Lancet*, 2015. **385**(9983): p. 2190-6.
25. Barkley, R.A. and H. Peters, *The earliest reference to ADHD in the medical literature? Melchior Adam Weikard's description in 1775 of "attention deficit" (Mangel der Aufmerksamkeit, Attentio Volubilis)*. *J Atten Disord*, 2012. **16**(8): p. 623-30.
26. Thapar, A., et al., *What have we learnt about the causes of ADHD?* *J Child Psychol Psychiatry*, 2013. **54**(1): p. 3-16.
27. Banerjee, T.D., F. Middleton, and S.V. Faraone, *Environmental risk factors for attention-deficit hyperactivity disorder*. *Acta Paediatr*, 2007. **96**(9): p. 1269-74.
28. Nikolas, M.A. and S.A. Burt, *Genetic and environmental influences on ADHD symptom dimensions of inattention and hyperactivity: a meta-analysis*. *J Abnorm Psychol*, 2010. **119**(1): p. 1-17.
29. Faraone, S.V. and H. Larsson, *Genetics of attention deficit hyperactivity disorder*. *Mol Psychiatry*, 2019. **24**(4): p. 562-575.
30. Gallo, E.F. and J. Posner, *Moving towards causality in attention-deficit hyperactivity disorder: overview of neural and genetic mechanisms*. *Lancet Psychiatry*, 2016. **3**(6): p. 555-67.
31. Schachar, R., *Genetics of Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD): Recent Updates and Future Prospects*. *Current Developmental Disorders Reports*, 2014. **1**(1): p. 41-49.
32. Thagaard, M.S., et al., *Empirical tests of natural selection-based evolutionary accounts of ADHD: a systematic review*. *Acta Neuropsychiatr*, 2016. **28**(5): p. 249-56.

33. Froehlich, T.E., et al., *Update on environmental risk factors for attention-deficit/hyperactivity disorder*. *Curr Psychiatry Rep*, 2011. **13**(5): p. 333-44.
34. Sciberras, E., et al., *Prenatal Risk Factors and the Etiology of ADHD-Review of Existing Evidence*. *Curr Psychiatry Rep*, 2017. **19**(1): p. 1.
35. Wolraich, M.L., D.B. Wilson, and J.W. White, *The effect of sugar on behavior or cognition in children. A meta-analysis*. *JAMA*, 1995. **274**(20): p. 1617-21.
36. Abbasi, K., et al., *Dietary Patterns and Attention Deficit Hyperactivity Disorder Among Iranian Children: A Case-Control Study*. *J Am Coll Nutr*, 2019. **38**(1): p. 76-83.
37. Azadbakht, L. and A. Esmailzadeh, *Dietary patterns and attention deficit hyperactivity disorder among Iranian children*. *Nutrition*, 2012. **28**(3): p. 242-9.
38. Lien, L., et al., *Consumption of soft drinks and hyperactivity, mental distress, and conduct problems among adolescents in Oslo, Norway*. *Am J Public Health*, 2006. **96**(10): p. 1815-20.
39. Park, S., et al., *Association between dietary behaviors and attention-deficit/hyperactivity disorder and learning disabilities in school-aged children*. *Psychiatry Res*, 2012. **198**(3): p. 468-76.
40. Kim, Y. and H. Chang, *Correlation between attention deficit hyperactivity disorder and sugar consumption, quality of diet, and dietary behavior in school children*. *Nutr Res Pract*, 2011. **5**(3): p. 236-45.
41. Del-Ponte, B., et al., *Sugar consumption and attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): A birth cohort study*. *J Affect Disord*, 2019. **243**: p. 290-296.
42. Cortese, S., et al., *Association Between ADHD and Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *Am J Psychiatry*, 2016. **173**(1): p. 34-43.
43. Pelsser, L.M., et al., *Diet and ADHD, Reviewing the Evidence: A Systematic Review of Meta-Analyses of Double-Blind Placebo-Controlled Trials Evaluating the Efficacy of Diet Interventions on the Behavior of Children with ADHD*. *PLoS One*, 2017. **12**(1): p. e0169277.
44. Ptacek, R., et al., *Attention deficit hyperactivity disorder and disordered eating behaviors: links, risks, and challenges faced*. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2016. **12**: p. 571-9.
45. Nigg, J.T., et al., *Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and being overweight/obesity: New data and meta-analysis*. *Clin Psychol Rev*, 2016. **43**: p. 67-79.
46. Faraone, S.V., et al., *Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder*. *Biol Psychiatry*, 2005. **57**(11): p. 1313-23.
47. Demontis, D., et al., *Discovery of the first genome-wide significant risk loci for attention deficit/hyperactivity disorder*. *Nat Genet*, 2019. **51**(1): p. 63-75.
48. Neale, B.M., et al., *Meta-analysis of genome-wide association studies of attention-deficit/hyperactivity disorder*. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 2010. **49**(9): p. 884-97.
49. Lesch, K.P., et al., *Molecular genetics of adult ADHD: converging evidence from genome-wide association and extended pedigree linkage studies*. *J Neural Transm (Vienna)*, 2008. **115**(11): p. 1573-85.
50. Voss, P., et al., *Dynamic Brains and the Changing Rules of Neuroplasticity: Implications for Learning and Recovery*. *Front Psychol*, 2017. **8**: p. 1657.

51. Franke, B., B.M. Neale, and S.V. Faraone, *Genome-wide association studies in ADHD*. Hum Genet, 2009. **126**(1): p. 13-50.
52. Banaschewski, T., et al., *Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: an overview*. Eur Child Adolesc Psychiatry, 2010. **19**(3): p. 237-57.
53. Arcos-Burgos, M., et al., *A common variant of the latrophilin 3 gene, LPHN3, confers susceptibility to ADHD and predicts effectiveness of stimulant medication*. Mol Psychiatry, 2010. **15**(11): p. 1053-66.
54. Poelmans, G., et al., *Integrated genome-wide association study findings: identification of a neurodevelopmental network for attention deficit hyperactivity disorder*. Am J Psychiatry, 2011. **168**(4): p. 365-77.
55. Lesch, K.P., et al., *Genome-wide copy number variation analysis in attention-deficit/hyperactivity disorder: association with neuropeptide Y gene dosage in an extended pedigree*. Mol Psychiatry, 2011. **16**(5): p. 491-503.
56. Merker, S., et al., *SLC2A3 single-nucleotide polymorphism and duplication influence cognitive processing and population-specific risk for attention-deficit/hyperactivity disorder*. J Child Psychol Psychiatry, 2017. **58**(7): p. 798-809.
57. Thapar, A., et al., *Psychiatric gene discoveries shape evidence on ADHD's biology*. Mol Psychiatry, 2016. **21**(9): p. 1202-7.
58. Ancey, P.B., C. Contat, and E. Meylan, *Glucose transporters in cancer - from tumor cells to the tumor microenvironment*. FEBS J, 2018. **285**(16): p. 2926-2943.
59. Database, P.C., *D-Glucose*. National Center for Biotechnology Information., 2019: p. CID=5793.
60. Thorens, B. and M. Mueckler, *Glucose transporters in the 21st Century*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **298**(2): p. E141-5.
61. Mulukutla, B.C., et al., *Regulation of Glucose Metabolism - A Perspective From Cell Bioprocessing*. Trends Biotechnol, 2016. **34**(8): p. 638-651.
62. Lienhard, G.E., et al., *How cells absorb glucose*. Sci Am, 1992. **266**(1): p. 86-91.
63. Scheepers, A., H.G. Joost, and A. Schurmann, *The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2004. **28**(5): p. 364-71.
64. Pao, S.S., I.T. Paulsen, and M.H. Saier, Jr., *Major facilitator superfamily*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(1): p. 1-34.
65. Jia, B., et al., *New insight into the classification and evolution of glucose transporters in the Metazoa*. FASEB J, 2019. **33**(6): p. 7519-7528.
66. Perland, E. and R. Fredriksson, *Classification Systems of Secondary Active Transporters*. Trends Pharmacol Sci, 2017. **38**(3): p. 305-315.
67. Hediger, M.A., et al., *The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins* Introduction. Pflugers Arch, 2004. **447**(5): p. 465-8.
68. Saier, M.H., Jr., C.V. Tran, and R.D. Barabote, *TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Database issue): p. D181-6.
69. Hediger, M.A., et al., *The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(2-3): p. 95-107.

70. Uluseker, C., et al., *A closed-loop multi-level model of glucose homeostasis*. PLoS One, 2018. **13**(2): p. e0190627.
71. Bell, G.I., et al., *Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters*. J Biol Chem, 1993. **268**(26): p. 19161-4.
72. Kellett, G.L., et al., *Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2*. Annu Rev Nutr, 2008. **28**: p. 35-54.
73. Ait-Omar, A., et al., *GLUT2 accumulation in enterocyte apical and intracellular membranes: a study in morbidly obese human subjects and ob/ob and high fat-fed mice*. Diabetes, 2011. **60**(10): p. 2598-607.
74. Concha, II, et al., *Human erythrocytes express GLUT5 and transport fructose*. Blood, 1997. **89**(11): p. 4190-5.
75. Bombardieri, G. and L.R. Conti, *Pathophysiology of liver circulation with an overview of medical and invasive treatments*. Rays, 1997. **22**(2): p. 196-210.
76. Grayson, B.E., R.J. Seeley, and D.A. Sandoval, *Wired on sugar: the role of the CNS in the regulation of glucose homeostasis*. Nat Rev Neurosci, 2013. **14**(1): p. 24-37.
77. Han, H.S., et al., *Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective*. Exp Mol Med, 2016. **48**: p. e218.
78. Kurata, M. and K. Nakamoto, [*the Central Blood Sugar Regulation, with Special Reference to the Nervous Pathway for Blood Sugar Regulation*]. Nihon Naika Gakkai Zasshi, 1964. **53**: p. 408-12.
79. Jouvét, N. and J.L. Estall, *The pancreas: Bandmaster of glucose homeostasis*. Exp Cell Res, 2017. **360**(1): p. 19-23.
80. Kayano, T., et al., *Human facilitative glucose transporters. Isolation, functional characterization, and gene localization 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, 1990. **265**(22): p. 13276-82.
81. Bryant, N.J., R. Govers, and D.E. James, *Regulated transport of the glucose transporter GLUT4*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(4): p. 267-77.
82. Devarakonda, K. and C.V. Mobbs, *Mechanisms and significance of brain glucose signaling in energy balance, glucose homeostasis, and food-induced reward*. Mol Cell Endocrinol, 2016. **438**: p. 61-69.
83. Levin, B.E., A.A. Dunn-Meynell, and V.H. Routh, *Brain glucosensing and the K(ATP) channel*. Nat Neurosci, 2001. **4**(5): p. 459-60.
84. Levin, B.E., *Nutrient Sensing: Carbohydrates*. 2009: p. 1295-1302.
85. Szabo, I., et al., [*Glucose-monitoring neurons of the medial ventrolateral prefrontal (orbitofrontal) cortex are involved in the maintenance of homeostasis*]. Orv Hetil, 2017. **158**(18): p. 692-700.
86. Attwell, D., et al., *Glial and neuronal control of brain blood flow*. Nature, 2010. **468**(7321): p. 232-43.
87. Daneman, R. and A. Prat, *The blood-brain barrier*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(1): p. a020412.
88. Nijland, P.G., et al., *Cellular distribution of glucose and monocarboxylate transporters in human brain white matter and multiple sclerosis lesions*. Glia, 2014. **62**(7): p. 1125-41.
89. Simpson, I.A., et al., *The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **295**(2): p. E242-53.

90. Shestov, A.A., et al., *Simultaneous measurement of glucose transport and utilization in the human brain*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011. **301**(5): p. E1040-9.
91. Dienel, G.A., *Fueling and imaging brain activation*. ASN Neuro, 2012. **4**(5).
92. Saudubray, J.M. and A. Garcia-Cazorla, *An overview of inborn errors of metabolism affecting the brain: from neurodevelopment to neurodegenerative disorders*. Dialogues Clin Neurosci, 2018. **20**(4): p. 301-325.
93. Mergenthaler, P., et al., *Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function*. Trends Neurosci, 2013. **36**(10): p. 587-97.
94. Oz, G., et al., *Revisiting Glycogen Content in the Human Brain*. Neurochem Res, 2015. **40**(12): p. 2473-81.
95. Saez, I., et al., *Neurons have an active glycogen metabolism that contributes to tolerance to hypoxia*. J Cereb Blood Flow Metab, 2014. **34**(6): p. 945-55.
96. Dinuzzo, M., et al., *The role of astrocytic glycogen in supporting the energetics of neuronal activity*. Neurochem Res, 2012. **37**(11): p. 2432-8.
97. Lutas, A. and G. Yellen, *The ketogenic diet: metabolic influences on brain excitability and epilepsy*. Trends Neurosci, 2013. **36**(1): p. 32-40.
98. Erbsloh, F., A. Bernsmeier, and H. Hillesheim, *[The glucose consumption of the brain & its dependence on the liver]*. Arch Psychiatr Nervenkr Z Gesamte Neurol Psychiatr, 1958. **196**(6): p. 611-26.
99. Attwell, D. and S.B. Laughlin, *An energy budget for signaling in the grey matter of the brain*. J Cereb Blood Flow Metab, 2001. **21**(10): p. 1133-45.
100. Segarra-Mondejar, M., et al., *Synaptic activity-induced glycolysis facilitates membrane lipid provision and neurite outgrowth*. EMBO J, 2018. **37**(9).
101. Kimelberg, H.K. and M.D. Norenberg, *Astrocytes*. Sci Am, 1989. **260**(4): p. 66-72, 74, 76.
102. Kettenmann, H. and A. Verkhratsky, *[Neuroglia--living nerve glue]*. Fortschr Neurol Psychiatr, 2011. **79**(10): p. 588-97.
103. Chen, R., A. Canales, and P. Anikeeva, *Neural Recording and Modulation Technologies*. Nat Rev Mater, 2017. **2**(2).
104. Simpson, I.A., A. Carruthers, and S.J. Vannucci, *Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters*. J Cereb Blood Flow Metab, 2007. **27**(11): p. 1766-91.
105. Mason, S., *Lactate Shuttles in Neuroenergetics-Homeostasis, Allostasis and Beyond*. Front Neurosci, 2017. **11**: p. 43.
106. Jueptner, M. and C. Weiller, *Review: does measurement of regional cerebral blood flow reflect synaptic activity? Implications for PET and fMRI*. Neuroimage, 1995. **2**(2): p. 148-56.
107. Barros, L.F., et al., *A quantitative overview of glucose dynamics in the gliovascular unit*. Glia, 2007. **55**(12): p. 1222-37.
108. Wallin, E. and G. von Heijne, *Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms*. Protein Sci, 1998. **7**(4): p. 1029-38.
109. Tsirigos, K.D., et al., *The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(W1): p. W401-7.

110. Randles, M.J., M.J. Humphries, and R. Lennon, *Proteomic definitions of basement membrane composition in health and disease*. *Matrix Biol*, 2017. **57-58**: p. 12-28.
111. Yan, N., *A Glimpse of Membrane Transport through Structures-Advances in the Structural Biology of the GLUT Glucose Transporters*. *J Mol Biol*, 2017. **429**(17): p. 2710-2725.
112. Hediger, M.A., et al., *Mammalian ion-coupled solute transporters*. *J Physiol*, 1995. **482**: p. 7S-17S.
113. Olson, A.L. and J.E. Pessin, *Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family*. *Annu Rev Nutr*, 1996. **16**: p. 235-56.
114. Asano, T., et al., *The role of N-glycosylation of GLUT1 for glucose transport activity*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(36): p. 24632-6.
115. Mueckler, M. and B. Thorens, *The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters*. *Mol Aspects Med*, 2013. **34**(2-3): p. 121-38.
116. Gutierrez Aguilar, G.F., et al., *Glial Excitatory Amino Acid Transporters and Glucose Incorporation*. *Adv Neurobiol*, 2017. **16**: p. 269-282.
117. Harris, J.J., R. Jolivet, and D. Attwell, *Synaptic energy use and supply*. *Neuron*, 2012. **75**(5): p. 762-77.
118. Szablewski, L., *Glucose Transporters in Brain: In Health and in Alzheimer's Disease*. *J Alzheimers Dis*, 2017. **55**(4): p. 1307-1320.
119. Wu, X. and H.H. Freeze, *GLUT14, a duplicon of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms*. *Genomics*, 2002. **80**(6): p. 553-7.
120. Zhao, F.Q. and A.F. Keating, *Functional properties and genomics of glucose transporters*. *Curr Genomics*, 2007. **8**(2): p. 113-28.
121. Kayano, T., et al., *Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. Sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(30): p. 15245-8.
122. Nagamatsu, S., et al., *Glucose transporter expression in brain. cDNA sequence of mouse GLUT3, the brain facilitative glucose transporter isoform, and identification of sites of expression by in situ hybridization*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(1): p. 467-72.
123. Thoidis, G., et al., *Glucose transporter Glut3 is targeted to secretory vesicles in neurons and PC12 cells*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(20): p. 14062-6.
124. Dasgupta, S. and R.C. Rai, *PPAR-gamma and Akt regulate GLUT1 and GLUT3 surface localization during Mycobacterium tuberculosis infection*. *Mol Cell Biochem*, 2018. **440**(1-2): p. 127-138.
125. Colville, C.A., et al., *Kinetic analysis of the liver-type (GLUT2) and brain-type (GLUT3) glucose transporters in Xenopus oocytes: substrate specificities and effects of transport inhibitors*. *Biochem J*, 1993. **290** (Pt 3): p. 701-6.
126. Rumsey, S.C., et al., *Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(30): p. 18982-9.
127. Seatter, M.J., et al., *QLS motif in transmembrane helix VII of the glucose transporter family interacts with the C-1 position of D-glucose and is involved in substrate selection at the exofacial binding site*. *Biochemistry*, 1998. **37**(5): p. 1322-6.
128. Deng, D., et al., *Molecular basis of ligand recognition and transport by glucose transporters*. *Nature*, 2015. **526**(7573): p. 391-6.

129. Gould, G.W., et al., *Expression of human glucose transporters in Xenopus oocytes: kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocyte, liver, and brain isoforms*. *Biochemistry*, 1991. **30**(21): p. 5139-45.
130. Liang, H., et al., *Gibbs Free-Energy Gradient along the Path of Glucose Transport through Human Glucose Transporter 3*. *ACS Chem Neurosci*, 2018. **9**(11): p. 2815-2823.
131. Ghosh, S., et al., *Bioenergetic regulation of microglia*. *Glia*, 2018. **66**(6): p. 1200-1212.
132. Hermo, L., et al., *Dark side of the epididymis: tails of sperm maturation*. *Andrology*, 2019. **7**(5): p. 566-580.
133. Schmidt, S., et al., *Essential role of glucose transporter GLUT3 for post-implantation embryonic development*. *J Endocrinol*, 2009. **200**(1): p. 23-33.
134. Shepherd, P.R., et al., *Distribution of GLUT3 glucose transporter protein in human tissues*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. **188**(1): p. 149-54.
135. Brown, K., et al., *Glucose transporter 3 (GLUT3) protein expression in human placenta across gestation*. *Placenta*, 2011. **32**(12): p. 1041-9.
136. Craik, J.D., M. Stewart, and C.I. Cheeseman, *GLUT-3 (brain-type) glucose transporter polypeptides in human blood platelets*. *Thromb Res*, 1995. **79**(5-6): p. 461-9.
137. Jurcovicova, J., *Glucose transport in brain - effect of inflammation*. *Endocr Regul*, 2014. **48**(1): p. 35-48.
138. Ferreira, J.M., A.L. Burnett, and G.A. Rameau, *Activity-dependent regulation of surface glucose transporter-3*. *J Neurosci*, 2011. **31**(6): p. 1991-9.
139. Vannucci, S.J., et al., *Glucose transporter expression in brain: relationship to cerebral glucose utilization*. *Dev Neurosci*, 1998. **20**(4-5): p. 369-79.
140. Duelli, R. and W. Kuschinsky, *Brain glucose transporters: relationship to local energy demand*. *News Physiol Sci*, 2001. **16**: p. 71-6.
141. Carayannopoulos, M.O., et al., *GLUT3 gene expression is critical for embryonic growth, brain development and survival*. *Mol Genet Metab*, 2014. **111**(4): p. 477-83.
142. Maher, F., S.J. Vannucci, and I.A. Simpson, *Glucose transporter proteins in brain*. *FASEB J*, 1994. **8**(13): p. 1003-11.
143. Gould, G.W. and G.D. Holman, *The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression*. *Biochem J*, 1993. **295 (Pt 2)**(2): p. 329-41.
144. Maher, F., et al., *Expression of two glucose transporters, GLUT1 and GLUT3, in cultured cerebellar neurons: Evidence for neuron-specific expression of GLUT3*. *Mol Cell Neurosci*, 1991. **2**(4): p. 351-60.
145. Deng, D. and N. Yan, *Crystallization and Structural Determination of the Human Glucose Transporters GLUT1 and GLUT3*. *Methods Mol Biol*, 2018. **1713**: p. 15-29.
146. Nagamatsu, S., et al., *Neuron-specific glucose transporter (NSGT): CNS distribution of GLUT3 rat glucose transporter (RGT3) in rat central neurons*. *FEBS Lett*, 1993. **334**(3): p. 289-95.
147. Weisova, P., et al., *Regulation of glucose transporter 3 surface expression by the AMP-activated protein kinase mediates tolerance to glutamate excitation in neurons*. *J Neurosci*, 2009. **29**(9): p. 2997-3008.

148. Fidler, T.P., et al., *Deletion of GLUT1 and GLUT3 Reveals Multiple Roles for Glucose Metabolism in Platelet and Megakaryocyte Function*. Cell Rep, 2017. **20**(4): p. 881-894.
149. Maurer, M.H., et al., *Adult neural stem cells express glucose transporters GLUT1 and GLUT3 and regulate GLUT3 expression*. FEBS Lett, 2006. **580**(18): p. 4430-4.
150. McCall, A.L., et al., *Immunohistochemical localization of the neuron-specific glucose transporter (GLUT3) to neuropil in adult rat brain*. Brain Res, 1994. **659**(1-2): p. 292-7.
151. Sadiq, F., et al., *The ontogeny of the rabbit brain glucose transporter*. Endocrinology, 1990. **126**(5): p. 2417-24.
152. Zhao, Y., et al., *Neuronal glucose transporter isoform 3 deficient mice demonstrate features of autism spectrum disorders*. Mol Psychiatry, 2010. **15**(3): p. 286-99.
153. TL, G., *The Allen Brain Atlas as a Resource for Teaching Undergraduate Neuroscience*. J Undergrad Neurosci Educ., 2018. **16**(3): p. A261-A267.
154. Van Bueren, A.M., et al., *An immunization method for generation of high affinity antisera against glucose transporters useful in immunohistochemistry*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **197**(3): p. 1492-8.
155. Maher, F. and I.A. Simpson, *The GLUT3 glucose transporter is the predominant isoform in primary cultured neurons: assessment by biosynthetic and photoaffinity labelling*. Biochem J, 1994. **301** (Pt 2): p. 379-84.
156. Haber, R.S., et al., *Tissue distribution of the human GLUT3 glucose transporter*. Endocrinology, 1993. **132**(6): p. 2538-43.
157. Kleinridders, A., et al., *Regional differences in brain glucose metabolism determined by imaging mass spectrometry*. Mol Metab, 2018. **12**: p. 113-121.
158. Estrada, D.E., et al., *Regulation of glucose transport and expression of GLUT3 transporters in human circulating mononuclear cells: studies in cells from insulin-dependent diabetic and nondiabetic individuals*. Metabolism, 1994. **43**(5): p. 591-8.
159. Fu, Y., et al., *Facilitative glucose transporter gene expression in human lymphocytes, monocytes, and macrophages: a role for GLUT isoforms 1, 3, and 5 in the immune response and foam cell formation*. Blood Cells Mol Dis, 2004. **32**(1): p. 182-90.
160. Heijnen, H.F., et al., *Thrombin stimulates glucose transport in human platelets via the translocation of the glucose transporter GLUT-3 from alpha-granules to the cell surface*. J Cell Biol, 1997. **138**(2): p. 323-30.
161. Risau, W., B. Engelhardt, and H. Wekerle, *Immune function of the blood-brain barrier: incomplete presentation of protein (auto-)antigens by rat brain microvascular endothelium in vitro*. J Cell Biol, 1990. **110**(5): p. 1757-66.
162. Knott, R.M., M. Robertson, and J.V. Forrester, *Regulation of glucose transporter (GLUT 3) and aldose reductase mRNA in bovine retinal endothelial cells and retinal pericytes in high glucose and high galactose culture*. Diabetologia, 1993. **36**(9): p. 808-12.
163. Gerhart, D.Z., et al., *Neurons and microvessels express the brain glucose transporter protein GLUT3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(2): p. 733-7.
164. Wolf, S.A., H.W. Boddeke, and H. Kettenmann, *Microglia in Physiology and Disease*. Annu Rev Physiol, 2017. **79**: p. 619-643.

165. Lenz, K.M. and M.M. McCarthy, *A starring role for microglia in brain sex differences*. *Neuroscientist*, 2015. **21**(3): p. 306-21.
166. Osborne, B.F., et al., *Sex- and region-specific differences in microglia phenotype and characterization of the peripheral immune response following early-life infection in neonatal male and female rats*. *Neurosci Lett*, 2019. **692**: p. 1-9.
167. Dai, Y., et al., *Sex-Specific Life Course Changes in the Neuro-Metabolic Phenotype of Glut3 Null Heterozygous Mice: Ketogenic Diet Ameliorates Electroencephalographic Seizures and Improves Sociability*. *Endocrinology*, 2017. **158**(4): p. 936-949.
168. O'Connor, T.G., J.A. Moynihan, and M.T. Caserta, *Annual research review: The neuroinflammation hypothesis for stress and psychopathology in children--developmental psychoneuroimmunology*. *J Child Psychol Psychiatry*, 2014. **55**(6): p. 615-31.
169. Kelly, S.D., C.S. Harrell, and G.N. Neigh, *Chronic stress modulates regional cerebral glucose transporter expression in an age-specific and sexually-dimorphic manner*. *Physiol Behav*, 2014. **126**: p. 39-49.
170. Khayat, Z.A., A.L. McCall, and A. Klip, *Unique mechanism of GLUT3 glucose transporter regulation by prolonged energy demand: increased protein half-life*. *Biochem J*, 1998. **333 (Pt 3)**: p. 713-8.
171. Ystrom, E., et al., *Prenatal Exposure to Acetaminophen and Risk of ADHD*. *Pediatrics*, 2017. **140**(5).
172. Pinto, R., et al., *The aetiological association between the dynamics of cortisol productivity and ADHD*. *J Neural Transm (Vienna)*, 2016. **123**(8): p. 991-1000.
173. Chen, M.H., et al., *Asthma and attention-deficit/hyperactivity disorder: a nationwide population-based prospective cohort study*. *J Child Psychol Psychiatry*, 2013. **54**(11): p. 1208-14.
174. Leahy, L.G., *Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Historical Review (1775 to Present)*. *J Psychosoc Nurs Ment Health Serv*, 2017. **55**(9): p. 10-16.
175. Borschuk, A.P., C. Rodweller, and C.F. Salorio, *The influence of comorbid asthma on the severity of symptoms in children with attention-deficit hyperactivity disorder*. *J Asthma*, 2018. **55**(1): p. 66-72.
176. Verlaet, A.A., et al., *Nutrition, immunological mechanisms and dietary immunomodulation in ADHD*. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 2014. **23**(7): p. 519-29.
177. King, A. and E. Gottlieb, *Glucose metabolism and programmed cell death: an evolutionary and mechanistic perspective*. *Curr Opin Cell Biol*, 2009. **21**(6): p. 885-93.
178. Cherbuin, N. and E.I. Walsh, *Sugar in mind: Untangling a sweet and sour relationship beyond type 2 diabetes*. *Front Neuroendocrinol*, 2019. **54**: p. 100769.
179. Leffa, D.T., I.L.S. Torres, and L.A. Rohde, *A Review on the Role of Inflammation in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder*. *Neuroimmunomodulation*, 2018. **25**(5-6): p. 328-333.
180. Dwyer, D.S., *Model of the 3-D structure of the GLUT3 glucose transporter and molecular dynamics simulation of glucose transport*. *Proteins*, 2001. **42**(4): p. 531-41.

181. Mayer, U., *Effects of SLC2A3 duplication - investigation of gene expression in human peripheral blood mononuclear cells and lymphoblastoid cell lines*. Diplomarbeit, 2011: p. 96.
182. Deng, D. and N. Yan, *GLUT, SGLT, and SWEET: Structural and mechanistic investigations of the glucose transporters*. *Protein Sci*, 2016. **25**(3): p. 546-58.
183. Shaikh, T.H., et al., *High-resolution mapping and analysis of copy number variations in the human genome: a data resource for clinical and research applications*. *Genome Res*, 2009. **19**(9): p. 1682-90.
184. Prakash, S.K., et al., *Autosomal and X chromosome structural variants are associated with congenital heart defects in Turner syndrome: The NHLBI GenTAC registry*. *Am J Med Genet A*, 2016. **170**(12): p. 3157-3164.
185. Mlynarski, E.E., et al., *Copy-Number Variation of the Glucose Transporter Gene SLC2A3 and Congenital Heart Defects in the 22q11.2 Deletion Syndrome*. *Am J Hum Genet*, 2015. **96**(5): p. 753-64.
186. Vittori, A., et al., *Copy-number variation of the neuronal glucose transporter gene SLC2A3 and age of onset in Huntington's disease*. *Hum Mol Genet*, 2014. **23**(12): p. 3129-37.
187. Yang, S., et al., *Genomic landscape of a three-generation pedigree segregating affective disorder*. *PLoS One*, 2009. **4**(2): p. e4474.
188. Veal, C.D., et al., *A 129-kb deletion on chromosome 12 confers substantial protection against rheumatoid arthritis, implicating the gene SLC2A3*. *Hum Mutat*, 2014. **35**(2): p. 248-56.
189. Simpfendorfer, K.R., et al., *Influence of genetic copy number variants of the human GLUT3 glucose transporter gene SLC2A3 on protein expression, glycolysis and rheumatoid arthritis risk: A genetic replication study*. *Mol Genet Metab Rep*, 2019. **19**: p. 100470.
190. Shin, B.C., et al., *Neural Deletion of Glucose Transporter Isoform 3 Creates Distinct Postnatal and Adult Neurobehavioral Phenotypes*. *J Neurosci*, 2018. **38**(44): p. 9579-9599.
191. Caputo, J.L., et al., *An effective method for establishing human B lymphoblastic cell lines using epstein-barr virus*. *Journal of Tissue Culture Methods*, 1991. **13**(1): p. 39-44.
192. Daneman, D., et al., *Insulin-stimulated glucose transport in circulating mononuclear cells from nondiabetic and IDDM subjects*. *Diabetes*, 1992. **41**(2): p. 227-34.
193. Kaliman P., V.F., Testar X., Palacin M. and Zorzano A., *Disruption of GLUT1 glucose carrier trafficking in L6E9 and Sol8 myoblasts by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin*. *Biochem. J*. 1995.
194. Yamamoto, N., et al., *Measurement of glucose uptake in cultured cells*. *Curr Protoc Pharmacol*, 2011. **Chapter 12**: p. Unit 12 14 1-22.
195. Paweł Piątkiewicz, A.C., Jan Tatoń, Andrzej Górski, *Investigations of cellular glucose transport and its regulation under the influence of insulin in human peripheral blood lymphocytes*. 2010.
196. Tanti, J.F., et al., *Assays of glucose entry, glucose transporter amount, and translocation*. *Methods Mol Biol*, 2001. **155**: p. 157-65.
197. Leo, W.R., *Techniques for Nuclear and Particle Physics Experiments*. Springer, 1994. **2nd ed**.

198. Rogers, A.W., *Scintillation autoradiography at the light microscopic level: a review*. Histochem J, 1981. **13**(2): p. 173-86.
199. Beckman Coulter, I., *Scintillation System LS 6500 - Operating Instruction*. Manual 247971, 1999 Sept: p. 235.
200. Eppendorf SOP - *Standardanweisung für Pipetten*. 2013.
201. AG, E., *Eppendorf Reference*® 2. Bedienungsanleitung, 2016: p. 34.
202. Strober, W., *Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability*. Curr Protoc Immunol, 2015. **111**: p. A3 B 1-A3 B 3.
203. Bortz, J. and N. Doering, *Forschungsmethoden und Evaluation für Human- und Sozialwissenschaftler*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006. **4**: p. XIX, 900.
204. Gignac, G.E. and E.T. Szodorai, *Effect size guidelines for individual differences researchers*. Personality and Individual Differences, 2016. **102**: p. 74-78.
205. Fisher, R.A., *Theory of Statistical Estimation*. Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society, 2008. **22**(5): p. 700-725.
206. Ismail, F.Y., A. Fatemi, and M.V. Johnston, *Cerebral plasticity: Windows of opportunity in the developing brain*. Eur J Paediatr Neurol, 2017. **21**(1): p. 23-48.
207. Fish, J.L. and C.A. Lockwood, *Dietary constraints on encephalization in primates*. Am J Phys Anthropol, 2003. **120**(2): p. 171-81.
208. Chu, A. and S.U. Devaskar, *Carbohydrate Metabolism During Pregnancy*. 2017: p. 404-405.
209. Jung, Y. and D. Goldman, *Role of RNA modifications in brain and behavior*. Genes Brain Behav, 2018. **17**(3): p. e12444.
210. Shabalina, S.A., N.A. Spiridonov, and A. Kashina, *Sounds of silence: synonymous nucleotides as a key to biological regulation and complexity*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(4): p. 2073-94.
211. Cajigas, I.J., et al., *The local transcriptome in the synaptic neuropil revealed by deep sequencing and high-resolution imaging*. Neuron, 2012. **74**(3): p. 453-66.
212. Liao, G., et al., *Control of cell migration through mRNA localization and local translation*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2015. **6**(1): p. 1-15.
213. Leino, R.L., et al., *Ultrastructural localization of GLUT 1 and GLUT 3 glucose transporters in rat brain*. J Neurosci Res, 1997. **49**(5): p. 617-26.
214. Jansson, T., M. Wennergren, and N.P. Illsley, *Glucose transporter protein expression in human placenta throughout gestation and in intrauterine growth retardation*. J Clin Endocrinol Metab, 1993. **77**(6): p. 1554-62.
215. Uehara, Y., V. Nipper, and A.L. McCall, *Chronic insulin hypoglycemia induces GLUT-3 protein in rat brain neurons*. Am J Physiol, 1997. **272**(4 Pt 1): p. E716-9.
216. Duelli, R., et al., *Increase in glucose transporter densities of Glut3 and decrease of glucose utilization in rat brain after one week of hypoglycemia*. Brain Res, 1999. **831**(1-2): p. 254-62.
217. Lee, D.H., et al., *Changes of glucose transporters in the cerebral adaptation to hypoglycemia*. Diabetes Res Clin Pract, 2000. **47**(1): p. 15-23.

218. Korgun, E.T., et al., *Sustained hypoglycemia affects glucose transporter expression of human blood leukocytes*. *Blood Cells Mol Dis*, 2002. **28**(2): p. 152-9.
219. Rangaraju, V., S. Tom Dieck, and E.M. Schuman, *Local translation in neuronal compartments: how local is local?* *EMBO Rep*, 2017. **18**(5): p. 693-711.
220. Hawkins, J. and S. Ahmad, *Why Neurons Have Thousands of Synapses, a Theory of Sequence Memory in Neocortex*. *Front Neural Circuits*, 2016. **10**: p. 23.
221. Dargemont, C. and A. Babour, *Novel functions for chromatin dynamics in mRNA biogenesis beyond transcription*. *Nucleus*, 2017. **8**(5): p. 482-488.
222. Stoecklin, G. and O. Muhlemann, *RNA decay mechanisms: specificity through diversity*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1829**(6-7): p. 487-90.
223. Schoenberg, D.R. and L.E. Maquat, *Regulation of cytoplasmic mRNA decay*. *Nat Rev Genet*, 2012. **13**(4): p. 246-59.
224. Mendes, A.I., et al., *Protein kinase WNK1 promotes cell surface expression of glucose transporter GLUT1 by regulating a Tre-2/USP6-BUB2-Cdc16 domain family member 4 (TBC1D4)-Rab8A complex*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(50): p. 39117-26.
225. Kioumourtzoglou, D., G.W. Gould, and N.J. Bryant, *Proximity Ligation Assay to Study the GLUT4 Membrane Trafficking Machinery*. *Methods Mol Biol*, 2018. **1713**: p. 217-227.
226. Choi, J., et al., *N(6)-methyladenosine in mRNA disrupts tRNA selection and translation-elongation dynamics*. *Nat Struct Mol Biol*, 2016. **23**(2): p. 110-5.
227. Tiedge, H., et al., *Transport of BC1 RNA in hypothalamo-neurohypophyseal axons*. *J Neurosci*, 1993. **13**(10): p. 4214-9.
228. Trembleau, A., M. Morales, and F.E. Bloom, *Differential compartmentalization of vasopressin messenger RNA and neuropeptide within the rat hypothalamo-neurohypophysial axonal tracts: Light and electron microscopic evidence*. *Neuroscience*, 1996. **70**(1): p. 113-125.
229. Mobasher, A., et al., *Facilitative glucose transporters in articular chondrocytes. Expression, distribution and functional regulation of GLUT isoforms by hypoxia, hypoxia mimetics, growth factors and pro-inflammatory cytokines*. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 2008. **200**: p. 1 p following vi, 1-84.
230. Nie, L., et al., *Progesterone-induced miR-152 interferes with embryonic implantation by downregulating GLUT3 in endometrial epithelium*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2019. **316**(4): p. E557-E567.
231. Yan, X., et al., *Dynamics of Translation of Single mRNA Molecules In Vivo*. *Cell*, 2016. **165**(4): p. 976-89.
232. Schwarz, R., et al., *A preliminary study on methylphenidate-regulated gene expression in lymphoblastoid cells of ADHD patients*. *World J Biol Psychiatry*, 2015. **16**(3): p. 180-9.
233. Hnasko, T.S. and R.M. Hnasko, *The Western Blot*. *Methods Mol Biol*, 2015. **1318**: p. 87-96.
234. Korbie, D.J. and J.S. Mattick, *Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification*. *Nat Protoc*, 2008. **3**(9): p. 1452-6.
235. Ziegler, G., *Die SLC2A3-Genduplikation als Kandidatengenvariante der Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung – molekularbiologische und*

neurale Korrelate, in *Kinder und Jugendpsychiatrie Würzburg*. 2017, Julius-Maximilian-Universität in Würzburg. p. 101.

236. Silva, J.M. and M. McMahon, *The fastest Western in town: a contemporary twist on the classic Western blot analysis*. *J Vis Exp*, 2014(84): p. e51149.

237. Fladeby, C., R. Skar, and G. Serck-Hanssen, *Distinct regulation of glucose transport and GLUT1/GLUT3 transporters by glucose deprivation and IGF-I in chromaffin cells*. *Biochim Biophys Acta*, 2003. **1593**(2-3): p. 201-8.

238. Basketter, D.A. and W.F. Widdas, *Asymmetry of the hexose transfer system in human erythrocytes. Comparison of the effects of cytochalasin B, phloretin and maltose as competitive inhibitors*. *J Physiol*, 1978. **278**(1): p. 389-401.

239. Kostelnik, A., A. Cegan, and M. Pohanka, *Color Change of Phenol Red by Integrated Smart Phone Camera as a Tool for the Determination of Neurotoxic Compounds*. *Sensors (Basel)*, 2016. **16**(9).

240. Suter, D.M., et al., *Mammalian genes are transcribed with widely different bursting kinetics*. *Science*, 2011. **332**(6028): p. 472-4.

241. Ezer, D., et al., *Determining Physical Mechanisms of Gene Expression Regulation from Single Cell Gene Expression Data*. *PLoS Comput Biol*, 2016. **12**(8): p. e1005072.

242. McFadden, K., et al., *Metabolic stress is a barrier to Epstein-Barr virus-mediated B-cell immortalization*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. **113**(6): p. E782-90.

243. Wang, C., et al., *Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen Leader Protein Coactivates EP300*. *J Virol*, 2018. **92**(9).

244. Lopes-Ramos, C.M., et al., *Regulatory network changes between cell lines and their tissues of origin*. *BMC Genomics*, 2017. **18**(1): p. 723.

245. Zhang, J., et al., *Epstein-Barr Virus-Encoded Latent Membrane Protein 1 Upregulates Glucose Transporter 1 Transcription via the mTORC1/NF-kappaB Signaling Pathways*. *J Virol*, 2017. **91**(6).

246. Lunt, S.Y. and M.G. Vander Heiden, *Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011. **27**: p. 441-64.

247. Tsao, W.C. and K.A. Eckert, *Detours to Replication: Functions of Specialized DNA Polymerases during Oncogene-induced Replication Stress*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(10).

248. Cornish-Bowden, A., *One hundred years of Michaelis–Menten kinetics*. *Perspectives in Science*, 2015. **4**: p. 3-9.

249. Siebeneicher, H., et al., *Identification and Optimization of the First Highly Selective GLUT1 Inhibitor BAY-876*. *ChemMedChem*, 2016. **11**(20): p. 2261-2271.

250. Knott, R.M., et al., *Regulation of glucose transporters (GLUT-1 and GLUT-3) in human retinal endothelial cells*. *Biochem J*, 1996. **318 (Pt 1)**(1): p. 313-7.

251. Hu, V.W., et al., *Gene expression profiling of lymphoblastoid cell lines from monozygotic twins discordant in severity of autism reveals differential regulation of neurologically relevant genes*. *BMC Genomics*, 2006. **7**: p. 118.

252. Viswanath, B., et al., *Cellular models to study bipolar disorder: A systematic review*. *J Affect Disord*, 2015. **184**: p. 36-50.

253. Hagan, J.J., *Molecular and Functional Models in Neuropsychiatry*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011, 2011. **7**: p. 74.
254. Hresko, R.C., et al., *Mammalian Glucose Transporter Activity Is Dependent upon Anionic and Conical Phospholipids*. J Biol Chem, 2016. **291**(33): p. 17271-82.
255. Prats, C., T.E. Graham, and J. Shearer, *The dynamic life of the glycogen granule*. J Biol Chem, 2018. **293**(19): p. 7089-7098.
256. Otti, A., et al., [*Default mode network of the brain. Neurobiology and clinical significance*]. Nervenarzt, 2012. **83**(1): p. 16, 18-24.
257. Raichle, M.E., *The brain's default mode network*. Annu Rev Neurosci, 2015. **38**: p. 433-47.
258. Schneider, F. and G.R. Fink, *Funktionelle MRT in Psychiatrie und Neurologie*. 2013. **2. Auflage**: p. 230-233.
259. Mohan, A., et al., *The Significance of the Default Mode Network (DMN) in Neurological and Neuropsychiatric Disorders: A Review*. Yale J Biol Med, 2016. **89**(1): p. 49-57.
260. Zhou, R.Y., et al., *Attention deficit hyperactivity disorder may be a highly inflammation and immune-associated disease (Review)*. Mol Med Rep, 2017. **16**(4): p. 5071-5077.
261. Meszaros, K., et al., *Contribution of different organs to increased glucose consumption after endotoxin administration*. J Biol Chem, 1987. **262**(23): p. 10965-70.
262. Quansah, E., et al., *Chronic methylphenidate regulates genes and proteins mediating neuroplasticity in the juvenile rat brain*. Neurosci Lett, 2017. **654**: p. 93-98.
263. Eny, K.M., et al., *Genetic variant in the glucose transporter type 2 is associated with higher intakes of sugars in two distinct populations*. Physiol Genomics, 2008. **33**(3): p. 355-60.
264. Schafer, N., et al., *Functional analysis of a triplet deletion in the gene encoding the sodium glucose transporter 3, a potential risk factor for ADHD*. PLoS One, 2018. **13**(10): p. e0205109.
265. Lange, K.W., *Dietary factors in the etiology and therapy of attention deficit/hyperactivity disorder*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2017. **20**(6): p. 464-469.
266. Johnson, R.J., et al., *Attention-deficit/hyperactivity disorder: is it time to reappraise the role of sugar consumption?* Postgrad Med, 2011. **123**(5): p. 39-49.
267. Anand, D., et al., *Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder And Inflammation: What Does Current Knowledge Tell Us? A Systematic Review*. Front Psychiatry, 2017. **8**: p. 228.
268. Rada, P., N.M. Avena, and B.G. Hoebel, *Daily bingeing on sugar repeatedly releases dopamine in the accumbens shell*. Neuroscience, 2005. **134**(3): p. 737-44.
269. Choi, C.S., et al., *High sucrose consumption during pregnancy induced ADHD-like behavioral phenotypes in mice offspring*. J Nutr Biochem, 2015. **26**(12): p. 1520-6.

270. Morita, H., et al., *Coexpression of glucose transporters and glucokinase in Xenopus oocytes indicates that both glucose transport and phosphorylation determine glucose utilization*. J Clin Invest, 1994. **94**(4): p. 1373-82.
271. Fan, W., et al., *PPARdelta Promotes Running Endurance by Preserving Glucose*. Cell Metab, 2017. **25**(5): p. 1186-1193 e4.
272. Cenit, M.C., et al., *Gut microbiota and attention deficit hyperactivity disorder: new perspectives for a challenging condition*. Eur Child Adolesc Psychiatry, 2017. **26**(9): p. 1081-1092.
273. Martin, C.R., et al., *The Brain-Gut-Microbiome Axis*. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2018. **6**(2): p. 133-148.
274. Yao, B., et al., *DNA N6-methyladenine is dynamically regulated in the mouse brain following environmental stress*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 1122.
275. Heard, E. and R.A. Martienssen, *Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms*. Cell, 2014. **157**(1): p. 95-109.
276. van Otterdijk, S.D. and K.B. Michels, *Transgenerational epigenetic inheritance in mammals: how good is the evidence?* FASEB J, 2016. **30**(7): p. 2457-65.
277. Daskalakis, N.P. and R. Yehuda, *Site-specific methylation changes in the glucocorticoid receptor exon 1F promoter in relation to life adversity: systematic review of contributing factors*. Front Neurosci, 2014. **8**: p. 369.
278. Babenko, O., I. Kovalchuk, and G.A. Metz, *Stress-induced perinatal and transgenerational epigenetic programming of brain development and mental health*. Neurosci Biobehav Rev, 2015. **48**: p. 70-91.
279. Walton, E., et al., *Epigenetic profiling of ADHD symptoms trajectories: a prospective, methylome-wide study*. Mol Psychiatry, 2017. **22**(2): p. 250-256.
280. Novakovic, B., et al., *Glucose as a fetal nutrient: dynamic regulation of several glucose transporter genes by DNA methylation in the human placenta across gestation*. J Nutr Biochem, 2013. **24**(1): p. 282-8.
281. Dall'Aglio, L., et al., *The role of epigenetic modifications in neurodevelopmental disorders: A systematic review*. Neurosci Biobehav Rev, 2018. **94**: p. 17-30.
282. Wilmot, B., et al., *Methylomic analysis of salivary DNA in childhood ADHD identifies altered DNA methylation in VIPR2*. J Child Psychol Psychiatry, 2016. **57**(2): p. 152-60.
283. Roeske, D., et al., *First genome-wide association scan on neurophysiological endophenotypes points to trans-regulation effects on SLC2A3 in dyslexic children*. Mol Psychiatry, 2011. **16**(1): p. 97-107.
284. Boyle, E.A., Y.I. Li, and J.K. Pritchard, *An Expanded View of Complex Traits: From Polygenic to Omnigenic*. Cell, 2017. **169**(7): p. 1177-1186.
285. Ravera, S., et al., *Concentration-dependent metabolic effects of metformin in healthy and Fanconi anemia lymphoblast cells*. J Cell Physiol, 2018. **233**(2): p. 1736-1751.
286. Samuel, S.M., et al., *Metformin represses glucose starvation induced autophagic response in microvascular endothelial cells and promotes cell death*. Biochem Pharmacol, 2017. **132**: p. 118-132.
287. Reus, G.Z., et al., *Methylphenidate increases glucose uptake in the brain of young and adult rats*. Pharmacol Rep, 2015. **67**(5): p. 1033-40.

288. Volkow, N.D., et al., *Methylphenidate decreased the amount of glucose needed by the brain to perform a cognitive task*. PLoS One, 2008. **3**(4): p. e2017.
289. Hinshaw, S.P., L.E. Arnold, and M.T.A.C. Group, *Attention-deficit hyperactivity disorder, multimodal treatment, and longitudinal outcome: evidence, paradox, and challenge*. Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci, 2015. **6**(1): p. 39-52.
290. J Millard, W.a.S., Leanna, *The paradoxical effect of central nervous system stimulants on hyperactivity: a paradox unexplained by the rate-dependent effect*. The Journal of nervous and mental disease, 1982. **170**(8): p. 499-501.
291. Drtilkova, I., J. Misurec, and K. Nahunek, *The paradox effect of psychostimulants in the treatment of the child hyperkinetic syndrome*. Act Nerv Super (Praha), 1990. **32**(4): p. 302-3.
292. Gainetdinov, R.R., et al., *Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity*. Science, 1999. **283**(5400): p. 397-401.
293. Somkuwar, S.S., K.M. Kantak, and L.P. Dwoskin, *Effect of methylphenidate treatment during adolescence on norepinephrine transporter function in orbitofrontal cortex in a rat model of attention deficit hyperactivity disorder*. J Neurosci Methods, 2015. **252**: p. 55-63.
294. Vaz, C.V., et al., *Androgens enhance the glycolytic metabolism and lactate export in prostate cancer cells by modulating the expression of GLUT1, GLUT3, PFK, LDH and MCT4 genes*. J Cancer Res Clin Oncol, 2016. **142**(1): p. 5-16.
295. Galvez-Contreras, A.Y., et al., *Alterations of Growth Factors in Autism and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder*. Front Psychiatry, 2017. **8**: p. 126.
296. McCoy, K.D., et al., *The hemopoietic growth factor, interleukin-3, promotes glucose transport by increasing the specific activity and maintaining the affinity for glucose of plasma membrane glucose transporters*. J Biol Chem, 1997. **272**(28): p. 17276-82.
297. Engin, A.B., et al., *N-Methyl-D aspartate receptor-mediated effect on glucose transporter-3 levels of high glucose exposed-SH-SY5Y dopaminergic neurons*. Food Chem Toxicol, 2017. **109**(Pt 1): p. 465-471.
298. Pajicka, K., et al., *Glucose replaces glutamate as energy substrate to fuel glutamate uptake in glutamate dehydrogenase-deficient astrocytes*. J Neurosci Res, 2015. **93**(7): p. 1093-100.
299. Lesch, K.P., et al., *Dances with black widow spiders: dysregulation of glutamate signalling enters centre stage in ADHD*. Eur Neuropsychopharmacol, 2013. **23**(6): p. 479-91.
300. Richa, R., A.K. Yadawa, and C.M. Chaturvedi, *Hyperglycemia and high nitric oxide level induced oxidative stress in the brain and molecular alteration in the neurons and glial cells of laboratory mouse, Mus musculus*. Neurochem Int, 2017. **104**: p. 64-79.
301. Duelli, R., et al., *Increase of glucose transporter densities (Glut1 and Glut3) during chronic administration of nicotine in rat brain*. Brain Res, 1998. **782**(1-2): p. 36-42.
302. Walker, N., et al., *Nutrient transporter expression in both the placenta and fetal liver are affected by maternal smoking*. Placenta, 2019. **78**: p. 10-17.
303. Solis-Maldonado, M., et al., *Altered lactate metabolism in Huntington's disease is dependent on GLUT3 expression*. CNS Neurosci Ther, 2018. **24**(4): p. 343-352.

304. Zimmer, L., *Positron emission tomography neuroimaging for a better understanding of the biology of ADHD*. *Neuropharmacology*, 2009. **57**(7-8): p. 601-7.
305. Ernst, M., et al., *Cerebral glucose metabolism in adolescent girls with attention-deficit/hyperactivity disorder*. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 1997. **36**(10): p. 1399-406.
306. Hoogman, M., et al., *Subcortical brain volume differences in participants with attention deficit hyperactivity disorder in children and adults: a cross-sectional mega-analysis*. *Lancet Psychiatry*, 2017. **4**(4): p. 310-319.
307. Veliev, F., et al., *Recording Spikes Activity in Cultured Hippocampal Neurons Using Flexible or Transparent Graphene Transistors*. *Front Neurosci*, 2017. **11**: p. 466.
308. Jansch, C., et al., *Generation of a human induced pluripotent stem cell (iPSC) line from a 51-year-old female with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) carrying a duplication of SLC2A3*. *Stem Cell Res*, 2018. **28**: p. 136-140.
309. Tripp, J., et al., *Establishing a yeast-based screening system for discovery of human GLUT5 inhibitors and activators*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 6197.
310. Sprangers, R., A. Velyvis, and L.E. Kay, *Solution NMR of supramolecular complexes: providing new insights into function*. *Nat Methods*, 2007. **4**(9): p. 697-703.
311. Vannucci, S.J., L.B. Seaman, and R.C. Vannucci, *Effects of hypoxia-ischemia on GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in immature rat brain*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1996. **16**(1): p. 77-81.
312. Bonkowsky, J.L. and J.H. Son, *Hypoxia and connectivity in the developing vertebrate nervous system*. *Dis Model Mech*, 2018. **11**(12).
313. James, S.N., et al., *Association of preterm birth with ADHD-like cognitive impairments and additional subtle impairments in attention and arousal malleability*. *Psychol Med*, 2018. **48**(9): p. 1484-1493.
314. Janzen, C., et al., *Placental glucose transporter 3 (GLUT3) is up-regulated in human pregnancies complicated by late-onset intrauterine growth restriction*. *Placenta*, 2013. **34**(11): p. 1072-8.
315. Mustafin, R.N., et al., *[Genetics and epigenetics of attention deficit hyperactivity disorder]*. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*, 2018. **118**(9): p. 106-110.
316. Mattick, J.S., *Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity*. *EMBO Rep*, 2001. **2**(11): p. 986-91.
317. Wang, L.J., et al., *Blood-Borne MicroRNA Biomarker Evaluation in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder of Han Chinese Individuals: An Exploratory Study*. *Front Psychiatry*, 2018. **9**: p. 227.
318. Nicolson, G.L., *The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1838**(6): p. 1451-66.
319. Bruxel, E.M., et al., *ADHD pharmacogenetics across the life cycle: New findings and perspectives*. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2014. **165B**(4): p. 263-82.
320. Casadevall, A. and F.C. Fang, *(A)Historical science*. *Infect Immun*, 2015. **83**(12): p. 4460-4.

321. Doernberg, E. and E. Hollander, *Neurodevelopmental Disorders (ASD and ADHD): DSM-5, ICD-10, and ICD-11*. CNS Spectr, 2016. **21**(4): p. 295-9.
322. Musser, E.D. and J.S. Raiker, Jr., *Attention-deficit/hyperactivity disorder: An integrated developmental psychopathology and Research Domain Criteria (RDoC) approach*. Compr Psychiatry, 2019. **90**: p. 65-72.
323. Sanislow, C.A., et al., *Developing constructs for psychopathology research: research domain criteria*. J Abnorm Psychol, 2010. **119**(4): p. 631-9.
324. Siegfried, T., *Odds Are, It's Wrong - The Misuse of Math in Science, Medicine and the Media*. Alfred and Julia Hill Lecture, 2009.
325. Joost, H.G., et al., *Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **282**(4): p. E974-6.
326. Fukumoto, H., et al., *Sequence, tissue distribution, and chromosomal localization of mRNA encoding a human glucose transporter-like protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(15): p. 5434-8.
327. Fukumoto, H., et al., *Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues*. J Biol Chem, 1989. **264**(14): p. 7776-9.
328. Mueckler, M., et al., *Sequence and structure of a human glucose transporter*. Science, 1985. **229**(4717): p. 941-5.
329. Arluison, M., et al., *Distribution and anatomical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain--an immunohistochemical study*. J Chem Neuroanat, 2004. **28**(3): p. 117-36.
330. Arluison, M., et al., *Immunocytochemical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain. II. Electron microscopic study*. J Chem Neuroanat, 2004. **28**(3): p. 137-46.
331. Thorens, B., et al., *Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells*. Cell, 1988. **55**(2): p. 281-90.
332. Simmons, R.A., *Cell Glucose Transport and Glucose Handling During Fetal and Neonatal Development*. 2017: p. 428-435.e3.
333. Buse, J.B., et al., *Human GLUT4/muscle-fat glucose-transporter gene. Characterization and genetic variation*. Diabetes, 1992. **41**(11): p. 1436-45.
334. Chiaramonte, R., et al., *Identification of the 5' end of the gene encoding a human insulin-responsive glucose transporter*. Gene, 1993. **130**(2): p. 307-8.
335. Choi, W.H., et al., *Molecular scanning of insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) gene in NIDDM subjects*. Diabetes, 1991. **40**(12): p. 1712-8.
336. Manolescu, A.R., et al., *Facilitated hexose transporters: new perspectives on form and function*. Physiology (Bethesda), 2007. **22**: p. 234-40.
337. Wood, I.S. and P. Trayhurn, *Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins*. Br J Nutr, 2003. **89**(1): p. 3-9.
338. Waddell, I.D., et al., *Cloning and expression of a hepatic microsomal glucose transport protein. Comparison with liver plasma-membrane glucose-transport protein GLUT 2*. Biochem J, 1992. **286** (Pt 1): p. 173-7.
339. Phay, J.E., H.B. Hussain, and J.F. Moley, *Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family, SLC2A9 (GLUT9)*. Genomics, 2000. **66**(2): p. 217-20.

340. Doege, H., et al., *Characterization of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle*. *Biochem J*, 2001. **359**(Pt 2): p. 443-9.
341. Doege, H., et al., *Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes*. *Biochem J*, 2000. **350 Pt 3**(3): p. 771-6.
342. Carayannopoulos, M.O., et al., *GLUT8 is a glucose transporter responsible for insulin-stimulated glucose uptake in the blastocyst*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(13): p. 7313-8.
343. Doege, H., et al., *GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(21): p. 16275-80.
344. Ibberson, M., M. Uldry, and B. Thorens, *GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(7): p. 4607-12.
345. McVie-Wylie, A.J., D.R. Lamson, and Y.T. Chen, *Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters, SLC2a10 (GLUT10), localized on chromosome 20q13.1: a candidate gene for NIDDM susceptibility*. *Genomics*, 2001. **72**(1): p. 113-7.
346. Rogers, S., et al., *Identification of a novel glucose transporter-like protein-GLUT-12*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002. **282**(3): p. E733-8.
347. Uldry, M., et al., *Identification of a mammalian H(+)-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain*. *EMBO J*, 2001. **20**(16): p. 4467-77.
348. Augustin, R., *The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all*. *IUBMB Life*, 2010. **62**(5): p. 315-33.
349. Uhlen, M., et al., *Proteomics. Tissue-based map of the human proteome*. *Science*, 2015. **347**(6220): p. 1260419.

7 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Glukosemetabolismus und -homöostase – Glukose ist die Haupt-Energiequelle des menschlichen Gehirns. Aufgenommen wird es vor allem über den Gastrointestinaltrakt (GI; A). Spezialisierte Zentren im Gehirn (B), unter anderem im **Hypothalamus (hellblau)**, nehmen zentrale und periphere Glukosespiegel wahr und regulieren dabei über die Mikrobiom-Darm-Hirn-Achse (C) (unter anderem durch den Nervus vagus und neuroendokrine Signale im Blutkreislauf) die Glukosehomöostase. Quelle: eigene Darstellung, Größenverhältnisse nicht realistisch dargestellt, einige Zellen zur besseren Darstellung nicht abgebildet 10
- Abbildung 2: Glukosezufuhr zum Zentralen Nervengewebe – Glukose gelangt über die Blut-Hirn-Schranke (BHS; D) ins Gehirn mit seinem reich verknüpften Nervengewebe. **Astrozyten (F)** sind dabei sehr eng mit der BHS verknüpft. Im Gehirn wird die Energie vor allem zur Signaltransduktion an **Neuronen (E)** und zur Zytogenese utlisiert. **Oligodendrozyten (G)** bilden die Myelinschicht der Neuronenfortsätze. **Mikrogliazellen (H)** sind Gewebsmakrophagen im Gehirn. Quelle: eigene Darstellung. Größenverhältnisse nicht unbedingt realistisch dargestellt; **Perizyten, Basalmembran** und **Endothelzellen** (je in D) zur Vollständigkeit ebenfalls dargestellt. 13
- Abbildung 3: schematische Darstellung der GLUT-Sekundärstruktur anhand GLUT1 und GLUT4 (wobei die roten Aminosäuren einzigartig für GLUT4 sind.) Quelle: in Anlehnung an [81] 16
- Abbildung 4: Glukoseaufnahme durch GLUT1 und GLUT3 in Abhängigkeit der Glukosekonzentration – in vitro (Assay auf Proteoliposom-Basis) Quelle: in Anlehnung an [145] 19
- Abbildung 5: Mäusegehirn, Koronalschnitt. Rechts zu sehen ist der dargestellte Nachweis der SLC2A3-RNA-Expression, links eine In-situ-Hybridisierung (ISH). Eine hohe Expression zeigt sich zum Beispiel im Iso-kortex (SG) und im Hippocampus (HPF), Hypothalamus (HTH), Artefakt im histologischen Präparat (A), schwächer exprimiert wird SLC2A3 in der weißen Substanz (SA). 20
- Abbildung 6: a) 3D-Modell der GLUT3-Struktur. Das Peptid- Rückgrat wird durch eine Schleifenstruktur dargestellt. Die Amino (N)- (**schwarz**) und Carboxyl (C)-Enden (weiß) wurden beschriftet, sowie die einzige extrazellulär glykolisierte Seite (CHO) b) Blick auf die Pore mit einem D-Glukosemolekül (**schwarz**) im Zentrum der Öffnung. Die 12 Transmembransegmente (TM) wurden nummeriert. Die intrazellulären Segmente wurden bei dieser Darstellung weggelassen Das Molekulargewicht des Proteins beträgt 53,9 kDa [181]. 24
- Abbildung 7: Transportmechanismus von Glukose (**rot-graue** Struktur, mittig) über die GLUTs; Die Öffnung des GLUT3 ist extrazellulär (links) und GLUT1 nach intrazellulär gerichtet (rechts); C = C-Domäne, N = N-Domäne Quelle: in Anlehnung an [182] 25
- Abbildung 8: SLC2A3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) des menschlichen Chromosoms 12. Zur Hybridisierung des Chromosoms 12 (p13.31) wurde das BAC RP11-277E18 benutzt. Es wird ein homologes Chromosomenpaar (**blau**) eines SLC2A3-Duplikationsträgers gezeigt. Das linke Homolog zeigt ein sichtbar größeres und helleres Signal (**grün**), was auf eine zusätzliche Kopie der BAC-Probe hinweist. Quelle: zur Verfügung gestellt von Dr. Indrajit Nanda, Institut für Humangenetik, Julius-Maximilians-Universität Würzburg 26
- Abbildung 9: Scan einer Chip-Kammer mit **Trypanblau** (links) und derselbe Scan gezählt (rechts; **grün: lebende Zellen**, **rot: Zellreste/tote Zellen**, **gelb: nicht zuordenbar**) Quelle: eigene Darstellung [Cellometer™ Auto T4 Cell Counters (Nexcelom Bioscience)] 35

- Abbildung 10: Variationskoeffizient der Replikate (Y-Achse), experimentelle Durchführung mit EBV-LCL-Kulturen (X-Achse), initiales Protokoll (**rot; gestrichelte horizontale Linie = Mittelwert; 84,4%**) und nach der Modifizierung (**grün; durchgehende horizontale Linie = Mittelwert; 10,2%**) 36
- Abbildung 11: Histogramm der Messwerte (alle Gruppen und Zeitpunkte) – links (originäre Messwerte), rechts (transformierte Messwerte) Quelle: eigene Darstellung 39
- Abbildung 12: Mittelwerte von **Duplikations- (blau)** und **Kontrollgruppe (gelb)** zu t_1 ; Deutlich zu erkennen ist die Varianzreduktion bei den transformierten Daten innerhalb der jeweiligen Gruppe, anhand kürzerer Fehlerbalken (rechts) im Vergleich mit den originären Messwerten (links). 40
- Abbildung 13: Mittelwerte der originären Werte von **Duplikations- (blau)** und **Kontrollgruppe (gelb)**, vergleiche t_1 (links) und t_2 (rechts); oben Histogramme, unten Boxplots (mit Median) 41
- Abbildung 14: transformierte Daten von **Duplikation- (blau)** und **Kontrollgruppe (gelb)**, t_1 (links) und t_2 (rechts); oben Histogramme, unten Boxplots Median zu t_1 für die **Duplikations- (173 $\sqrt{\text{CPM}}$)** und **Kontrollgruppe (172 $\sqrt{\text{CPM}}$)** Median zu t_2 für die **Duplikations- (153 $\sqrt{\text{CPM}}$)** und **Kontrollgruppe (117 $\sqrt{\text{CPM}}$)** 42
- Abbildung 15: Die GLUT-Mitglieder. Der wurzellose, polygenetische Baum zeigt die Verwandtschaft zwischen den 14 humanen GLUTs. Hergestellt mit CLUSTAL W Software. Die Abstände zwischen den abzweigenden Ästen und die Linienlänge weist auf den divergierenden Evolutionsgrad hin; 11-a und 9-1 als Isoform a und 1.
- Abbildung 16: RNA- und Proteinexpression des GLUT3 (SLC2A3) Quelle: [\[349\]](#)

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Materialien und Produktangabe.....	31
Tabelle 2: Mediumssuspensionen und Ingredienzen	32
Tabelle 3: Kontingenztafel hinsichtlich der Anzahl der Beobachtungen	37
Tabelle 4: Skalenniveau der Variablen.....	38
Tabelle 5: deskriptive Kennzahlen der endogenen Variable „CPM“	38
Tabelle 6: deskriptive Kennzahlen der transformierten Messwerte (CPM)	40
Tabelle 7: gerundete Mittelwerte (beide Gruppen) der originären Messwerte [CPM] zu beiden Zeitpunkten	41
Tabelle 8: gerundete Mittelwerte (beide Gruppen) der transformierten Daten [$\sqrt{\text{CPM}}$] zu beiden Zeitpunkten	42
Tabelle 9: Legende – Interpretation der Koeffizienten (feste Effekte)	43
Tabelle 10: Schätzergebnisse der festen Effekte; erstellt mittels Restricted-Maximum-Likelihood-Methode (Methode der maximalen Mutmaßlichkeit)	44
Tabelle 11: gewebespezifische Expression der GLUT-Familienmitglieder Quelle: in Anlehnung an Yamamoto et al. (2011) [194]	
Tabelle 12: aufbereiteter Input-Datensatz der Messungen; Gruppe (Kontrollgruppe und Duplikationsgruppe), Zeitpunkt 2 (nach 2 Tagen) und 4 (nach 4 Tagen), CPM (Counts per Minute), Kultur (18 verschiedene Kulturen).....	
Tabelle 13: erwartete Mittelwerte des Linearen Gemischten Modells mit festen Effekten (plus zusätzlich individuelle Effekte). Die Werte in Klammern entsprechen den Gruppenmittelwerten der wurzeltransformierten Daten aus der Stichprobe – diese entsprechen exakt den Schätzwerten des Modells unter Berücksichtigung der kulturindividuellen Zufallseffekte.	

9 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit eigenständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt wurde und übernommene Inhalte eindeutig angegeben sind; erstmalig zu diesem Studienggebiet eingereicht wird; unter Beachtung und Kenntnis der gültigen Studien- und Prüfungsordnung erstellt wurde; die gute wissenschaftliche Praxis der Universität Würzburg eingehalten hat; noch keiner anderen Fakultät vorgelegt wurde, auch nicht teilweise, insbesondere nicht mit dem Ziel einen akademischen Grad zu erwerben.

Des Weiteren erkläre ich an Eides statt, dass dem Bewerber bis dato auch noch kein akademischer Grad entzogen wurde, es wurde auch kein strafrechtliches Ermittlungsverfahren oder ein Disziplinarverfahren eingeleitet; die Gelegenheit zum Promotionsvorhaben wurde nicht kommerziell vermittelt, insbesondere wurde auch keine Person oder Organisation eingeschaltet, welche gegen Entgelt Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen suchte. Auch versuchte der Bewerber prior hierzu keinen akademischen Grad zu erwerben, der über ein Staatsexamen hinausging.

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorgenannten Angaben nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und dass die Angaben der Wahrheit entsprechen und ich nichts verschwiegen habe.

10 Abkürzungen

°	Grad (Geometrie)
°C	Grad Celsius
®	eingetragene Handelsmarke
¹³ C-Glukose	radioaktiv-markierte Glukose
3D	dreidimensional
³ H	Tritium
³ H-2-Desoxyglukose	³ H-Glukose
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	Varianzanalyse oder Streuungszerlegung; englisch: analysis of variance
APA	American Psychiatric Association
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat (ein Nukleotid)
BAC	Bacterial Artificial Chromosome [Vektor]
BAY-876	[N4-[1-(4-cyanobenzyl)-5-methyl-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-4-yl]-7-fluoroquinoline-2,4-dicarboxamide]
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CHO	extrazellulär glykolisierte Seite
Ci	Curie (1 Ci ~ 3,7 • 10 ¹⁰ Bq)
Ci/mmol	Curie / millimol
CNV	copy number variation; deutsch: Kopienanzahlvariation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COOH	Carboxylgruppe
CPM	Counts per minute; deutsch: Zählimpulse pro Minute
CREB	cAMP response element-binding protein
DMN	Default Mode Network; deutsch: Basis- oder Ruhemodusnetzwerk
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSM	diagnostic and statistical manual of mental disorders; deutsch: diagnostischer und statistischer Leitfaden psychischer Störungen
EBV	Epstein-Barr-Virus
EEG	Elektroenzephalografie
EtOH	Ethanol
FDG	Fluordesoxyglukose
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GBq	giga Becquerel
GI	Gastrointestinaltrakt
GLUT	Glukosetransporter
GLUT1	Glukosetransporter Typ 1
GLUT14	Glukosetransporter Typ 14
GLUT2	Glukosetransporter Typ 2
GLUT3	Glukosetransporter Typ 3; das Protein referierend
GLUT4	Glukosetransporter Typ 4
GLUT5	Glukosetransporter Typ 5
h	Stunde [Latein: horus], Hypothese, Stunde
H ₀	Nullhypothese

H ₂ O	Wasser
hg17	humanes Genom (Ensembl Version 17)
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor α -Untereinheit
HI-FBS	Fetal Bovine Serum; deutsch: fötales Kälberserum
ICD	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems; deutsch: Internationale statistische Klassifikation von Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme
in silico	Vorgänge, die im Computer ablaufen
in situ	in der natürlichen Lage im Körper
in vitro	im (Reagenz)Glas, außerhalb des Körpers
in vivo	am lebenden Objekt [beobachtet oder durchgeführt] (von wissenschaftlichen Versuchen)
IQ	Intelligenzquotient
IS	Immunsystem
j	Kultur (Statistik)
K ⁺	Kaliumion
keV	Kiloelektroenvolt [1keV = 1,6 x 10 ⁻¹⁶ Joule]
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
LCLs	lymphoblastoid cell lines; deutsch: Lymphoblastoide Zelllinien
LSC	Liquid Scintillation Counter
M	molar [mol * l ⁻¹]
ml	Milliliter
mM	Millimeter [10 ⁻³ m], Millimolar [mmol/l]
mmol/l	Millimol pro Liter
MPH	Methylphenidat
mRNA	messenger ribonucleic acid; deutsch: Boten-RNA
n	die Größe der Grundgesamtheit (Statistik; groß-N), Normalverteilung, die Anzahl der Merkmalsausprägungen (hier: Gruppenanzahl; Statistik; klein-n)
Na ⁺	Natriumion
Na-K-ATPase	Natrium-Kalium-ATPase (Transportenzym)
NANOGP1	Nanog Homeobox Pseudogene 1
NaOH	Natriumhydroxid
NH ₂	Aminogruppe
NIH	National Institute of Health; deutsch: Nationale Gesundheitsinstitute)
nm	Nanometer [10 ⁻⁹ m]
NMR	Nuclear Magnetic Resonance; deutsch: Kernspinresonanz
p	p-Wert (statistische Größe)
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell; deutsch: mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate-Buffered Saline; deutsch: Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	polymerase chain reaction; deutsch: Polymerase-Kettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
R 3.52	R-Statistikprogramm (Version 3.52)
R ²	Regressionskoeffizient (Bestimmtheitsgrad; Statistik)
RDoC	Research Domain Criteria
RNA	ribonucleic acid; deutsch: Ribonukleinsäure
RP11-277E18	Klonname des Vektors

RPMI.....	Roswell Park Memorial Institute
sec	Sekunde(n)
SGLT	Natrium-Glukose-Transporter
SGLTs.....	sodium-dependent glucose transporter; deutsch: Natrium/Glukose-Kotransporter
SLC.....	solute-carrier-transporter
SLC2A	Glukosetransporter-Gene
SLC2A14	GLUT14-Gen
SLC5A	SGLT-Gene
t ₁	Messzeitpunkt 1 (nach zwei Tagen)
t ₂	Messzeitpunkt 2 (nach vier Tagen)
TM.....	Transmembransegment
UpM	Umdrehungen pro Minute
U-Test.....	Mann-Whitney-U-Test
v. u. Z.....	vor unserer Zeitrechnung
van-der-Waals-Kräfte	nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen Teilchen
ZNS.....	Zentrales Nervensystem
α	alpha
β	beta
γ	Gamma
μ	Mittelwert (Statistik)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer [10 ⁻⁶ m]
μmol	Mikromol
σ ²	Varianz (Statistik)

13 Anhang

Tabelle 11: gewebespezifische Expression der GLUT-Familienmitglieder
 Quelle: in Anlehnung an Yamamoto et al. (2011) [194]

<u>Klasse</u>	<u>Isoform</u>	<u>alte Namen</u> [325]	<u>Genname</u>	<u>Expression</u>	<u>Funktion</u>	<u>Quelle</u>	<u>Zusatz</u>
Klasse I	GLUT1		SLC2A1	Alle Gewebe (auch in den β -Zellen des Pankreas, aber v.a. in ZNS, Erythrozyten, Fibroblasten und Endothelzellen)	Grundversorgung und Glukosesensor im menschlichen Pankreas	[326, 327, 328, 113]	Erster isolierter Zuckertransporter. [328] 492 AS; K_m -Wert: ~ 7 mmol * l-1. [71]
	GLUT2		SLC2A2	Leber, Niere proximal, Darmmukosa, Retina, Hypothalamus [329] [330] [72] (Pankreas- β -Zellen; nur bei Katzen, nicht beim Menschen) [331]	Glukosesensor und Haupt-Glukosetransporter in der Leber	[327, 326, 327]	452 AS; 55% mit GLUT-1 \ddot{u} bereinstimmend; K_m -Wert: 17-66 mmol * l-1; transportiert ebenfalls Galaktose und Fruktose [71]

GLUT3		SLC2A3	ZNS; Nervenzellen; Plazenta (gering) [135], Niere (gering); Leber (gering); Herz (gering)	unterstützt oft GLUT1 in Geweben mit hohem Energiebedarf; "neuronaler" Glucosetransporter [122] Grundversorger für Neurone und einige Blutzellen [89] Fötus ⁷⁹ [332], Spermatozoen	[121]	Der GLUT-3 besitzt eine geringere Glukose- K_m im Vergleich zu den anderen Transportern der Klasse I (3,44 mM), somit kann er auch bei niedrigerem BZ eine Versorgung der Zellen gewährleisten oder bei höherem Glukosebedarf. Dehydroascorbinsäure (1,7mM) [126] Fruktose ist kein Substrat. Galaktose- K_m (85mM) [125] Xylose [89]
GLUT4		SLC2A4	Muskel; Herz; Adipozyten Neuronensubpopulationen (Purkinje- und Granulazellen im Cerebellum), Zellen im Hippocampus, und einzelnen Zellen im Cortex und Hypothalamus [89]	Ganzkörperzuckerspiegel	[333]; [334]; [335]; [327]	509 AS; nimmt lediglich Glukose auf [336]; gleicht zu 65% GLUT1, zu 54% GLUT2, zu 58% GLUT3; Insulin-abhängig, vor Einbau liegt er in Vesikeln vor und erhöht nach Einbau die Transportrate um 10-20x [80] [81]

⁷⁹ „Keine Studie konnte bisher GLUT3 oder GLUT4 im humanen Fötusgehirn nachweisen. [Stand 2017]“

	GLUT14	GLUT3	SLC2A14	Testikel		[119]	entstand evolutionär aus dem Slicen von GLUT3 (Duplikation von diesem), bis zu 95% identisch (497-520 AS)
Klasse II „odd transporters“ [336]	GLUT5		SLC2A5	Dünndarm (apikale Membran), Testikel, Niere; ZNS; Muskel (low levels); Adipozyten (low levels) [337]	Fruktosetransporter	[74]; [80]	501 AS 40% Übereinstimmung mit Klasse I-Transportern [80] hohe Affinität zu Fruktose
	GLUT7		SLC2A7			[338]	Die anfänglich zugeschriebene Sequenz für GLUT-7 wurde wieder zurückgezogen, da es sich um ein Klon-Artefakt gehandelt hat. [325]
	GLUT9	GLUTX	SLC2A9	Leber; Niere		[339]	
	GLUT11	GLUT8	SLC2A11	Herz; Muskel		[340]	
Klasse III „even transporters“ [325]	GLUT6	GLUT9	SLC2A6	Milz; Leukozyten; ZNS		[341]	45% mit GLUT8 identisch
	GLUT8	GLUTX1	SLC2A8	Testikel; Blastocyste; ZNS		[342] [343] [344]	

	GLUT10		<i>SLC2A10</i>	Leber; Pankreas		[345]	
	GLUT12	GLUT8	<i>SLC2A12</i>	Herz; Prostata		[346]	
	HMIT	GLUT13	<i>SLC2A13</i>	ZNS	Protonen-Myo-Inositol-Symporter	[347]	

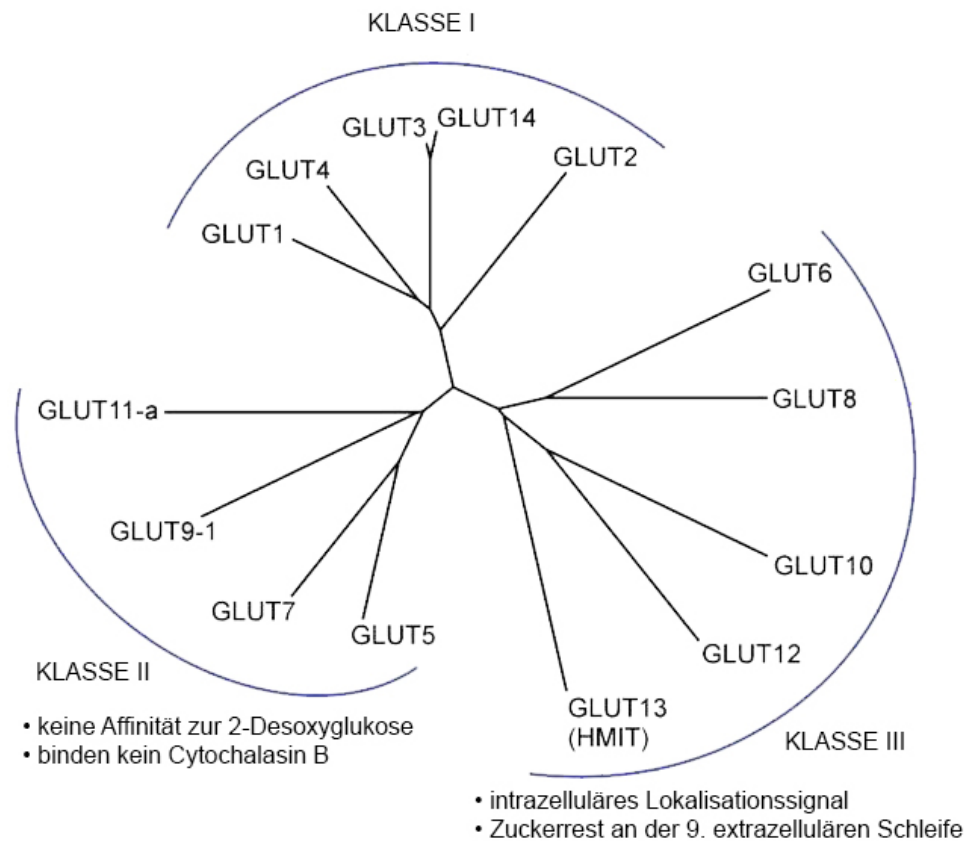


Abbildung 15: Die GLUT-Mitglieder. Der wurzellose, polygenetische Baum zeigt die Verwandtschaft zwischen den 14 humanen GLUTs. Hergestellt mit CLUSTAL W Software. Die Abstände zwischen den abzweigenden Ästen und die Linienlänge weist auf den divergierenden Evolutionsgrad hin; 11-a und 9-1 als Isoform a und 1.

Quelle: in Anlehnung an [348]

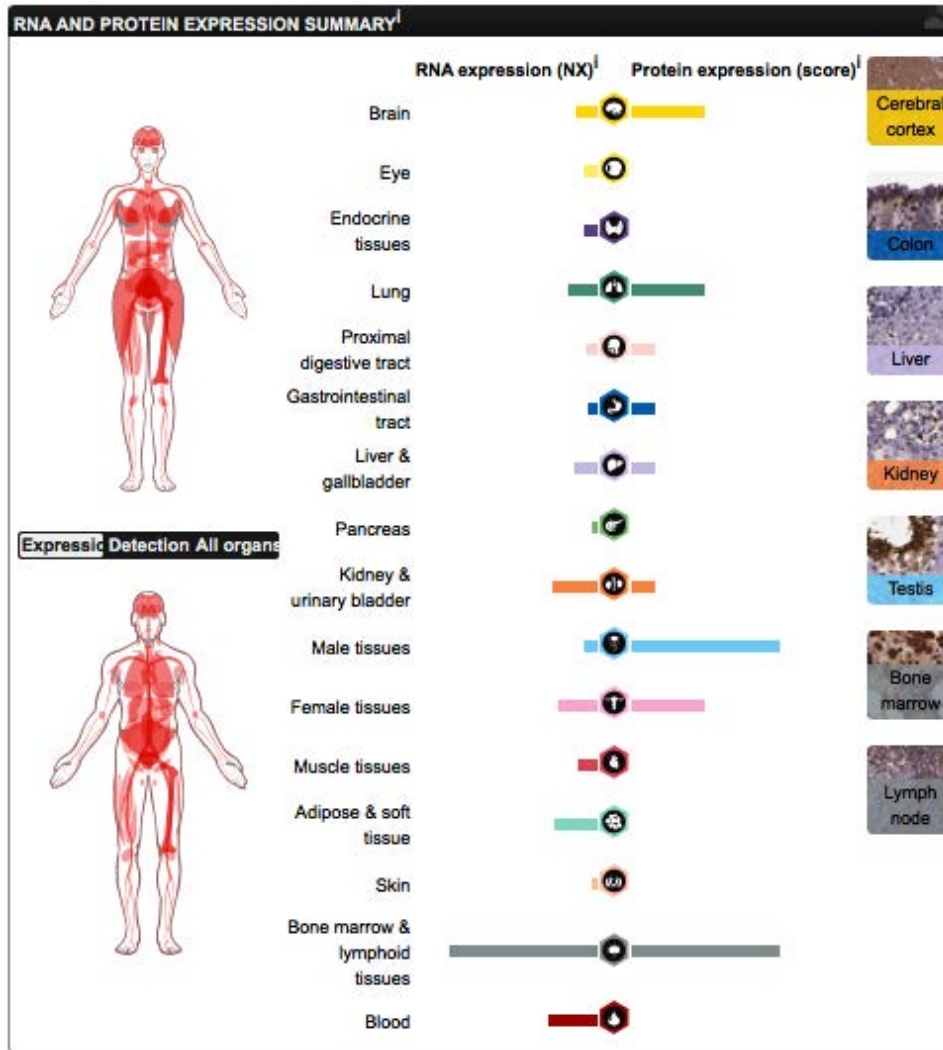


Abbildung 16: RNA- und Proteinexpression des GLUT3 (SLC2A3)
 Quelle: [349]

Tabelle 12: aufbereiteter Input-Datensatz der Messungen; Gruppe (Kontrollgruppe und Duplikationsgruppe), Zeitpunkt 2 (nach 2 Tagen) und 4 (nach 4 Tagen), CPM (Counts per Minute), Kultur (18 verschiedene Kulturen)

Gruppe	Zeitpunkt	CPM	Kultur
Kontrollgruppe	2	55442	1
Duplikation	2	63362	2
Kontrollgruppe	2	9326	3
Duplikation	2	15014	4
Kontrollgruppe	2	42502	5
Duplikation	2	67370	6
Kontrollgruppe	2	17930	7
Duplikation	2	28963	8
Kontrollgruppe	2	22045	9
Duplikation	2	3515	10
Kontrollgruppe	2	39660	11
Duplikation	2	9018	12
Kontrollgruppe	2	44530	13
Duplikation	2	18100	14
Kontrollgruppe	2	2282	15
Duplikation	2	46261	16
Kontrollgruppe	2	10638	17
Duplikation	2	32447	18
Kontrollgruppe	2	57038	1
Duplikation	2	58290	2
Kontrollgruppe	2	11162	3

Duplikation	2	9193	4
Kontrollgruppe	2	43481	5
Duplikation	2	61042	6
Kontrollgruppe	2	16931	7
Duplikation	2	31040	8
Kontrollgruppe	2	28472	9
Duplikation	2	4124	10
Kontrollgruppe	2	12381	11
Duplikation	2	14981	12
Kontrollgruppe	2	30464	13
Duplikation	2	12960	14
Kontrollgruppe	2	4003	15
Duplikation	2	49135	16
Kontrollgruppe	2	10980	17
Duplikation	2	35983	18
Kontrollgruppe	2	52197	1
Duplikation	2	60134	2
Kontrollgruppe	2	5795	3
Duplikation	2	0	4
Kontrollgruppe	2	48055	5
Duplikation	2	64578	6
Kontrollgruppe	2	0	7
Duplikation	2	27202	8
Kontrollgruppe	2	28982	9
Duplikation	2	0	10

Kontrollgruppe	2	44267	11
Duplikation	2	11368	12
Kontrollgruppe	2	36293	13
Duplikation	2	12108	14
Kontrollgruppe	2	3046	15
Duplikation	2	44719	16
Kontrollgruppe	2	7471	17
Duplikation	2	31677	18
Kontrollgruppe	2	51375	1
Duplikation	2	53073	2
Kontrollgruppe	2	0	3
Duplikation	2	0	4
Kontrollgruppe	2	37256	5
Duplikation	2	61036	6
Kontrollgruppe	2	0	7
Duplikation	2	23908	8
Kontrollgruppe	2	0	9
Duplikation	2	0	10
Kontrollgruppe	2	43778	11
Duplikation	2	10707	12
Kontrollgruppe	2	30826	13
Duplikation	2	10243	14
Kontrollgruppe	2	3461	15
Duplikation	2	30954	16
Kontrollgruppe	2	0	17

Duplikation	2	26442	18
Kontrollgruppe	2	0	1
Duplikation	2	0	2
Kontrollgruppe	2	0	3
Duplikation	2	0	4
Kontrollgruppe	2	0	5
Duplikation	2	0	6
Kontrollgruppe	2	0	7
Duplikation	2	0	8
Kontrollgruppe	2	0	9
Duplikation	2	0	10
Kontrollgruppe	2	34758	11
Duplikation	2	0	12
Kontrollgruppe	2	0	13
Duplikation	2	0	14
Kontrollgruppe	2	0	15
Duplikation	2	0	16
Kontrollgruppe	2	0	17
Duplikation	2	0	18
Kontrollgruppe	4	32986	1
Duplikation	4	37931	2
Kontrollgruppe	4	9725	3
Duplikation	4	21573	4
Kontrollgruppe	4	14147	5
Duplikation	4	40018	6

Kontrollgruppe	4	0	7
Duplikation	4	0	8
Kontrollgruppe	4	34725	9
Duplikation	4	6340	10
Kontrollgruppe	4	16796	11
Duplikation	4	25967	12
Kontrollgruppe	4	19335	13
Duplikation	4	15494	14
Kontrollgruppe	4	4660	15
Duplikation	4	32888	16
Kontrollgruppe	4	453	17
Duplikation	4	27094	18
Kontrollgruppe	4	29970	1
Duplikation	4	38789	2
Kontrollgruppe	4	13908	3
Duplikation	4	20283	4
Kontrollgruppe	4	13564	5
Duplikation	4	37585	6
Kontrollgruppe	4	0	7
Duplikation	4	0	8
Kontrollgruppe	4	35955	9
Duplikation	4	5493	10
Kontrollgruppe	4	11475	11
Duplikation	4	26288	12
Kontrollgruppe	4	16621	13

Duplikation	4	14235	14
Kontrollgruppe	4	3757	15
Duplikation	4	27867	16
Kontrollgruppe	4	421	17
Duplikation	4	22509	18
Kontrollgruppe	4	30441	1
Duplikation	4	38589	2
Kontrollgruppe	4	12310	3
Duplikation	4	15384	4
Kontrollgruppe	4	15913	5
Duplikation	4	38820	6
Kontrollgruppe	4	0	7
Duplikation	4	0	8
Kontrollgruppe	4	35279	9
Duplikation	4	7095	10
Kontrollgruppe	4	0	11
Duplikation	4	25711	12
Kontrollgruppe	4	19055	13
Duplikation	4	15137	14
Kontrollgruppe	4	2796	15
Duplikation	4	28489	16
Kontrollgruppe	4	660	17
Duplikation	4	22460	18
Kontrollgruppe	4	6522	1
Duplikation	4	40590	2

Kontrollgruppe	4	11457	3
Duplikation	4	14294	4
Kontrollgruppe	4	10485	5
Duplikation	4	22640	6
Kontrollgruppe	4	0	7
Duplikation	4	0	8
Kontrollgruppe	4	38701	9
Duplikation	4	5960	10
Kontrollgruppe	4	0	11
Duplikation	4	0	12
Kontrollgruppe	4	18563	13
Duplikation	4	10510	14
Kontrollgruppe	4	2592	15
Duplikation	4	29509	16
Kontrollgruppe	4	380	17
Duplikation	4	23438	18

Tabelle 13: erwartete Mittelwerte des Linearen Gemischten Modells mit festen Effekten (plus zusätzlich individuelle Effekte). Die Werte in Klammern entsprechen den Gruppenmittelwerten der wurzeltransformierten Daten aus der Stichprobe – diese entsprechen exakt den Schätzwerten des Modells unter Berücksichtigung der kulturindividuellen Zufallseffekte.

	t ₁	t ₂
Duplikation	162,44 (168,94)	149,29 (149,69)
Kontrollgruppe	152,04 (155,43)	121,89 (112,28)