

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

**Direktor: Professor Dr. med. J. Deckert**

**Die *SLC2A3*-Genduplikation als Kandidatengenvariante der  
Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung –  
molekularbiologische und neurale Korrelate**

**Inaugural – Dissertation**

zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Georg Christoph Ziegler  
aus Würzburg

Würzburg, März 2017

Referent: Prof. Dr. med. K.-P. Lesch  
Korreferent: Prof. Dr. med. M. Romanos  
Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2017

Der Promovend ist Arzt

*Meinen Eltern*

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in folgende Publikation eingegangen:

Merker, S\*., Reif, A.\*, Ziegler, G. C.\*, Weber, H., Mayer, U., Ehrlis, A. C., Conzelmann, A., Johansson, S., Müller-Reible, C., Nanda, I., Haaf, T., Ullmann, R., Romanos, M., Fallgatter, A. J., Pauli, P., Strekalova, T., Jansch, C., Vasquez, A. A., Haavik, J., Ribases, M., Ramos-Quiroga, J. A., Buitelaar, J. K., Franke, B., Lesch, K. P. (2017). *SLC2A3* single-nucleotide polymorphism and duplication influence cognitive processing and population-specific risk for attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Child Psychol Psychiatry*.

\*die Autoren trugen gleichermaßen bei.

Die in Kapitel 3.1.2 präsentierten und in den Kapiteln 4.1.2 und 4.1.3 dieser Arbeit diskutierten Ergebnisse zur basalen *SLC2A3*-Expression wurden bereits in der Dissertation von Sören Merker (Fakultät für Biologie, Würzburg): “Genome-wide screenings in attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): investigation of novel candidate genes *SLC2A3* and *LPHN3*“ (2014) beschrieben, werden im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der unmittelbaren Ableitung der nachfolgenden Untersuchungen zur Expression in dynamischen Systemen dennoch erneut dargestellt und unter neuen Aspekten diskutiert.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	ADHS	1
1.1.1	Diagnose	2
1.1.2	Komorbidität	4
1.1.3	Epidemiologie	4
1.1.4	Ätiologische Faktoren	5
1.1.4.1	Umweltfaktoren	6
1.1.4.2	Genetische Risikofaktoren und Kandidatengene	7
1.1.5	Neurobiologie der ADHS	9
1.1.5.1	Neurochemie der ADHS	10
1.1.5.2	Bildmorphologische Korrelate der ADHS	11
1.2	Glukosetransport und Glukosemetabolismus	12
1.2.1	Assoziation einer <i>SLC2A3</i> -Genduplikation mit ADHS	12
1.2.2	Die <i>SLC2A</i> -Familie der Glukosetransporter (GLUTs)	13
1.2.3	Der Glukosetransporter GLUT3	13
1.2.3.1	Bedarfsabhängige GLUT3-Expression	13
1.2.3.2	<i>SLC2A3</i> -Varianten und -Expression im klinischen Kontext	16
1.2.4	Zentraler Glukosemetabolismus	17
1.2.4.1	Glukosestoffwechsel und Neurotransmission	18
1.2.4.2	Glukosemetabolismus während der ZNS-Entwicklung	19
1.2.4.3	Synaptogenese	20
1.2.4.4	Strukturell-morphologische Gehirnentwicklung	22
1.2.5	Die Bedeutung von Glukosetransportern für die Hungerregulation	22
1.2.6	Der Einfluss von Glukose auf die Emotionsverarbeitung	23
1.3	Fragestellung und Arbeitshypothesen	24
<b>2</b>	<b>Probanden, Material und Methoden</b>	<b>26</b>
2.1	Molekularbiologische Untersuchungen	26
2.1.1	Probanden	26
2.1.2	Genotypisierung mittels TaqMan CNV-Assay	26
2.1.3	Zellkulturarbeiten	27
2.1.3.1	PBMC-Isolation	27
2.1.3.2	Herstellung, Kultivierung und Lagerung von EBV-LCLs	28
2.1.3.3	Aussaat zur Messung der basalen <i>SLC2A3</i> -Expression	29
2.1.3.4	Stimulationsversuche	29
2.1.4	Methoden zur Quantifizierung der Genexpression	30
2.1.4.1	RNA-Extraktion	30
2.1.4.2	Bestimmung von RNA-Konzentration- und Reinheit	31
2.1.4.3	RNA-Qualitätskontrollen	32
2.1.4.4	cDNA-Synthese	34

2.1.4.5	Quantitative reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR).....	35
2.1.5	Methoden zur Quantifizierung der Proteinexpression.....	38
2.1.5.1	Herstellung von Proteinlysaten .....	38
2.1.5.2	Quantifizierung des Proteingehalts mit Bicinchoninsäure (BCA) ....	39
2.1.5.3	Probenvorbereitung und SDS-PAGE .....	39
2.1.5.4	Elektroblot und Ponceau-S-Färbung .....	40
2.1.5.5	Immunologische Detektion mit Antikörpern .....	40
2.1.5.6	Quantitative Auswertung von Western-Blot-Banden .....	41
2.1.6	Kolorimetrische Bestimmung von Glukosekonzentrationen.....	42
2.1.7	Statistische Auswertung .....	42
2.2	fMRT-Untersuchung.....	44
2.2.1	Probanden .....	44
2.2.2	Psychometrische Untersuchungen.....	45
2.2.3	Versuchsbedingungen.....	45
2.2.4	Magnetresonanz-Bildgebung.....	46
2.2.5	Vorverarbeitung der fMRT-Daten und Datenanalyse .....	47
2.2.6	Univariate Gesamthirn-Analyse .....	47
2.2.7	Multivariate Analyse .....	48
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>51</b>
3.1	Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen .....	51
3.1.1	Western-Blot-Detektion von GLUT3 .....	51
3.1.2	Basale <i>SLC2A3</i> -Expression .....	52
3.1.2.1	mRNA-Expression .....	52
3.1.2.2	Protein-Expression .....	53
3.1.3	<i>SLC2A3</i> -Expression im dynamischen Modell.....	54
3.1.3.1	<i>SLC2A3</i> -mRNA-Expression im Aushungerungsversuch.....	54
3.1.3.2	<i>SLC2A3</i> -Protein-Expression im Aushungerungsversuch.....	56
3.1.3.3	Glukose-Stimulationsversuch.....	56
3.2	Ergebnisse der fMRT-Untersuchung .....	58
3.2.1	Ergebnisse der psychometrischen Untersuchungen .....	58
3.2.2	Keine Gruppenunterschiede bei der univariaten Gesamthirn-Analyse ....	60
3.2.3	Gruppenunterschiede bei der multivariaten Analyse.....	60
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>62</b>
4.1	Diskussion der molekularbiologischen Ergebnisse .....	62
4.1.1	Western-Blot Detektion von GLUT3 .....	62
4.1.2	Starker Gendosiseffekt der <i>SLC2A3</i> -Duplikation auf mRNA-Ebene.....	63
4.1.3	Fehlender Gendosiseffekt der <i>SLC2A3</i> -Duplikation auf Proteinebene ....	64
4.1.4	Effekt der <i>SLC2A3</i> -Duplikation in dynamischen Systemen.....	65
4.2	Diskussion der fMRT-Daten.....	68
4.2.1	Unterschätzung der Kalorienzahl durch <i>SLC2A3</i> -Duplikationsträger.....	68

4.2.2	Kein Unterschied bei der univariaten Gesamthirn-Analyse .....	69
4.2.3	Gruppenunterschiede bei der multivariaten Analyse.....	70
<b>5</b>	<b>Ausblick und Zusammenfassung .....</b>	<b>73</b>
5.1	Ausblick .....	73
5.2	Zusammenfassung .....	75
5.3	Summary .....	76
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>77</b>
	<b>Danksagung</b>	
	<b>Lebenslauf</b>	

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Integratives Modell zur ADHS-Ätiologie .....	6
Abb. 2: Synaptogenese, strukturelle Entwicklung und Glukoseutilisation .....	21
Abb. 3: Invertiertes Bild von rRNA-Banden im 1 % Agarosegel.....	33
Abb. 4: RNA Qualitätsbestimmung mit der Experion-Software .....	34
Abb. 5: Beispielhafte qRT-PCR Amplifikationskurven .....	36
Abb. 6: GLUT3-Banden in verschiedenen Lysaten humanen Ursprungs.....	51
Abb. 7: <i>SLC2A3</i> mRNA-Expression in EBV-LCLs und PBMCs.....	52
Abb. 8: Untersuchung der basalen GLUT3-Expression in EBV-LCLs und PBMCs .....	53
Abb. 9: <i>SLC2A3</i> mRNA-Expression im Aushungerungsversuch .....	55
Abb. 10: Negative Korrelation zwischen Glukose-Konzentration und <i>SLC2A3</i> -Expression ..	56
Abb. 11: <i>SLC2A3</i> mRNA-Expression unter verschiedenen glykämischen Bedingungen .....	57
Abb. 12: Einfluss des <i>SLC2A3</i> Genotyps auf die Einschätzung der Kalorienzahl .....	59

## **Tabellenverzeichnis**

Tab. 1: Faktoren, die die <i>SLC2A3</i> -Expression beeinflussen .....	15
Tab. 2: Reaktionsansatz für den TaqMan-Genotypisierungs Assay .....	27
Tab. 3: Reaktionsansatz für die SYBR-Green Real-Time PCR.....	38
Tab. 4: Probenzusammensetzung für die SDS-PAGE .....	40
Tab. 5: Verwendete Antikörper.....	41
Tab. 6: ROIs und deren hypothetische Funktion.....	50
Tab. 7: Deskriptive Daten .....	58
Tab. 8: Ergebnisse der multivariaten Gesamthirn-Datenanalyse .....	61

## Abkürzungsverzeichnis

### a

Abb.	Abbildung
AC-PC-Linie	virtuelle Gerade zwischen vorderer und hinterer Kommissur
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung
aMCC	anteriorer mittlerer cingulärer Kortex
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat

### b

bp	Basenpaar
----	-----------

### c

<i>CDH13</i>	Cadherin-13-Gen
Chr.	Chromosom
<i>CHRNA4</i>	neuronales Acetylcholinrezeptor-Untereinheit alpha 4-Gen
<i>CHRNA7</i>	neuronales Acetylcholinrezeptor-Untereinheit alpha 7-Gen
CNV	Kopienzahl-Variation (engl.: <i>copy number variation</i> ), Änderung der Kopienzahl eines DNA-Abschnittes
CN	<i>copy number</i> , hier Kopienzahl eines Gens
<i>COMT</i>	Kathechol-ortho-Methyltransferase-Gen

### d

ddH <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser
DLPFC	dorsolateraler präfrontaler Kortex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	desoxy-Nukleosidtriphosphate
<i>DRD4</i>	Dopaminrezeptor-D4-Gen
<i>DRD5</i>	Dopaminrezeptor-D5-Gen
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSM-IV	4. Auflage des Diagnostischen und Statistischen Manuals Psychischer Störungen

### e

EBV	Eppstein-Barr-Virus
EBV-LCLs	Eppstein-Barr-Virus-transformierte lymphoblastoide Zelllinien
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

### f

FBS	Fetales bovines Serum
FOV	<i>field of view</i> , Untersuchungsfeld
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer

**g**

GLUT3	Glukosetransporter-3, auf das Protein bezogen
<i>GRM</i>	metabotrope Glutamat-Rezeptor-Gene
G x U	Gen-Umwelt-Interaktion

**h**

<i>HTR1B</i>	Serotonin-Rezeptor-1B-Gen
--------------	---------------------------

**i**

ICD-10	10. Version der <i>International Classification of Diseases</i> der WHO
i. v.	intravenös
IAPS	<i>International Affective Picture System</i>

**k**

Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen

**m**

mA	Milliampere
MAF	mittlere Allelfrequenz
METH	Methamphetamin
MMLV	Moloney murines Leukämie Virus
MRT	Magnetresonanztomografie
MWU-Test	Man-Whitney-U-Test

**n**

nM	nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NTC	no template control; Negativkontrolle, bei der Anstelle der Matrize Wasser eingesetzt wurde

**P**

<i>PARK2</i>	Parkinson-Protein-2-Gen
PBMCs	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCBs	polychlorierte Biphenyle
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomografie

**q**

qRT-PCR	quantitative reverse Transkriptase-PCR
---------	--

**r**

rCMRGlc	regional cerebral metabolic rate for glucose
RFU	relative Fluoreszenzeinheiten

RIPA	Radio-Immuno-Präzipitationsassay
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RQI	RNA quality index
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion
-RTC	Negativkontrolle, bei der in die cDNA-Reaktion keine RNA eingesetzt wird

**s**

SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyakrylamid Gel-Elektrophorese
SLC	Solute Carrier-Transporterfamilie
<i>SLC2A3</i>	Glukosetransporter-3-Gen
<i>SLC6A2</i>	Noradrenalintransporter-Gen
<i>SLC6A3</i>	Dopamintransporter-Gen
<i>SLC6A4</i>	Serotonintransporter-Gen
<i>SNAP25</i>	25 kDa-synaptosomal-assoziiertes Protein-Gen
SNP	Single-Nukleotid-Polymorphismus
SSRI	Selektive Serotonin Wiederaufnahmehemmer
Stimul.	Stimulanz

**t**

Tab.	Tabelle
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween <sup>®</sup> -20
TCA	Trizyklische Antidepressiva
TE	Tris-EDTA
TR	<i>Repetition Time</i> , Zeit, die bei der MRT zwischen zwei Anregungspulsen vergeht

**v**

V	Volt
VLPFC	ventrolateraler präfrontaler Kortex

**w**

WCX-Test	Wilcoxon-Rangsummentest
----------	-------------------------

<i>5HTT</i>	Serotonintransporter-Gen
-------------	--------------------------

# 1 Einleitung

Im Bereich neuropsychiatrischer Erkrankungen hat sich die erste Begeisterung über die Möglichkeiten der genetischen Forschung mittlerweile etwas gelegt, da zwar eine Vielzahl neuer Kandidatengene identifiziert wurde, einzelne Gene jedoch oft nur einen kleinen Anteil der phänotypischen Varianz erklären können (siehe Kap. 1.1.4.2) und die genetische Forschung bisher kaum psychopharmakotherapeutische Innovationen hervorbrachte. Mittlerweile ist es möglich, aus einer Vielzahl an Kandidatengenomen gemeinsame neuronale Netzwerke zu identifizieren, um diese auf krankheitsassoziierte Endophänotypen zu untersuchen. Man geht davon aus, dass die klinischen Symptome einer Krankheit als äußerlich erkennbarer Phänotyp nur die Spitze des Eisbergs bilden, darunter aber messbare intermediäre Phänotypen liegen, die durch die Kombination unterschiedlicher Alterationen auf molekularer Ebene und modulierenderer Umwelteinflüsse bedingt sein können (siehe Kap. 1.1.4). Nach dem Endophänotypen-Ansatz ist es möglich, einen Phänotyp in intrinsische Unterkategorien einzuteilen, die möglicherweise wegweisend für neue therapeutische Ansätze sind, um so vielleicht doch noch den Weg zu einer personalisierten Medizin auch im Feld der neuropsychiatrischen Erkrankungen zu bahnen.

Die Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS) kann als Beispiel eines polygenetischen Syndroms dienen, für das Hinweise auf krankheitsrelevante Endophänotypen mit genetischem Hintergrund vorliegen (Kebir und Joobar 2011). In dieser Arbeit soll eine mit ADHS assoziierte genomische Duplikation des *SLC2A3*-Gens sowohl auf molekularer als auch auf neuraler Ebene untersucht werden, um mögliche funktionelle Konsequenzen dieser Genvariante zu diskutieren. Da *SLC2A3* den wichtigsten neuronalen Glukosetransporter kodiert, bietet die Erforschung der *SLC2A3*-Duplikation potentiell die Chance, einen Einblick in die Rolle metabolischer Dysfunktionen für die Pathogenese der ADHS zu gewinnen.

## 1.1 ADHS

Die ADHS ist eine im klinischen Erscheinungsbild heterogene Beeinträchtigung der Gehirnentwicklung, die zu verminderter Aufmerksamkeit, Hyperaktivität, gesteigerter Impulsivität und emotionaler Dysregulation führt. Als häufigste Verhaltensstörung im Kindes- und Jugendalter zeichnet sie sich durch einen frühen Beginn aus und zeigt eine hohe Persistenz ins Erwachsenenalter (Lesch 2009). Die gut erkennbaren Symptome der motorischen Unruhe, Zappeligkeit und Impulsivität bilden sich im Verlauf stärker zurück als das nach außen hin

weniger auffällige Aufmerksamkeitsdefizit (Hart et al. 1995), was erklären mag, warum der adulten ADHS lange Zeit nur wenig Beachtung geschenkt wurde. 1976 wurde die damals noch als „minimaler Hirnschaden“ diskutierte Störung erstmals in einer Erwachsenen-Stichprobe beschrieben (Wood et al. 1976). Dennoch herrschte danach weiterhin die Auffassung vor, dass sich die ADHS-Symptomatik in der Mehrzahl der Fälle mit zunehmendem Alter zurückbilde (Mannuzza et al. 1993). Die meisten Patienten leiden aber auch noch im Erwachsenenalter unter den ADHS-assoziierten Beeinträchtigungen, selbst wenn durch eine syndromale Remission die Diagnosekriterien nicht mehr komplett erfüllt werden (Biederman et al. 2000). In einer Metaanalyse kamen Faraone et al. (2006) zu dem Ergebnis, dass in etwa zwei Drittel aller Fälle ADHS-spezifische Symptome bis ins Erwachsenenalter fortbestehen.

Eine Vielzahl von auftretenden Komorbiditäten (siehe Kap. 1.1.2) und die heterogene klinische Präsentation der ADHS erschweren in der psychiatrisch-klinischen Praxis häufig die Diagnosestellung (siehe Kap. 1.1.1) und die Einleitung einer adäquaten Therapie. Neben gemeinsamen klinischen Merkmalen finden sich eine hohe Erbllichkeit (siehe Kap. 1.1.4.2) sowie zahlreiche Krankheits-assoziierte neuropsychologische, elektrophysiologische und mit modernen Bildgebungsverfahren detektierbare anatomische sowie funktionell hirmorphologische Korrelate (siehe Kap. 1.1.5.2). Die Aufgabe zukünftiger Forschungsbemühungen wird darin liegen, erhobene Einzelbefunde stärker zu integrieren, um mit einem multimethodischen Ansatz ein schärferes Bild der weitestgehend noch im Dunklen liegenden individuellen ätiopathogenetischen Mechanismen zu zeichnen. Unter Berücksichtigung phänotypischer Unterschiede sollten dabei möglichst mehrere Ebenen der vielschichtigen ätiologischen Mechanismen (siehe Abb. 1) untersucht werden. Dafür stehen neben neuropsychologischen Testverfahren, elektrophysiologischen und bildgebenden Studien am Menschen auch Tier- und Zellkulturmodelle zur Verfügung.

### **1.1.1 Diagnose**

Nach der vierten Auflage des Diagnostischen und Statistischen Manuals Psychischer Störungen (DSM-IV) ist ADHS zu diagnostizieren, wenn nicht mit dem Entwicklungsstand zu vereinbarende Symptome der Unaufmerksamkeit und/oder Hyperaktivität-Impulsivität über einen Zeitraum von mindestens einem halben Jahr auftreten. Mindestens ein Symptom muss vor Erreichen des siebten Lebensjahres in Erscheinung treten. Zudem wird eine klinisch bedeutsame Einschränkung in mindestens zwei Lebensbereichen gefordert und es soll ausgeschlossen werden, dass die Symptome in ursächlichem Zusammenhang mit einer anderen

psychischen Erkrankung stehen. Je nach Symptomausprägung werden nach DSM-IV drei Subtypen unterschieden: ADHS-Mischtypus mit kombinierter Aufmerksamkeitsdefizit- und Hyperaktivitätsstörung (F90.0 nach ICD-10) sowie vorwiegend unaufmerksamer Typus (F98.8 nach ICD-10) und vorwiegend hyperaktiv-impulsiver Typus (F90.1 nach ICD-10).

Im DSM-IV wird das Symptom der Unaufmerksamkeit als Unfähigkeit sich längere Zeit auf gestellte Aufgaben zu konzentrieren verbunden mit leichter Ablenkbarkeit durch äußere Reize beschrieben. Zudem leiden Patienten oft unter Vergesslichkeit und desorganisiertem Verhalten. Die Hyperaktivität zeigt sich durch starke äußere oder innere Unruhe. Betroffene zappeln häufig herum, können nur schwer stillsitzen, sind ständig „auf Achse“ und fühlen sich „wie getrieben“. Durch die erhöhte Impulsivität und Ungeduld haben ADHS-Patienten Probleme, Gesprächspartner ausreden zu lassen und platzen mit Antworten heraus, ehe sie an der Reihe sind. All diese Schwierigkeiten müssen in einem für den jeweiligen Entwicklungszustand inadäquaten Ausmaß auftreten.

Für eine Diagnosestellung im Erwachsenenalter wird das Vorliegen der Störung bereits im Kindesalter gefordert. Daher wird bei der Befunderhebung auf standardisierte Fragebögen, wie z.B. die Wender Utah Rating Scale (Ward et al. 1993) zurückgegriffen werden, die eine *ex post* Diagnose ermöglichen sollen. Weitere Instrumente der retrospektiven Symptomerhebung sind Schulzeugnisse und Elterninterviews. Zur Erhebung von ADHS-Symptomen im Erwachsenenalter hat sich die Conners Adult ADHD Rating Scale (CAARS) etabliert, für die auch eine deutschsprachige Fassung zur Verfügung steht (Christiansen et al. 2011, Christiansen et al. 2012a, Christiansen et al. 2012b). Die ADHS-Diagnostik nach DSM-IV basiert auf kategorialen Kriterien. Dennoch weisen genetische Studien darauf hin, dass die ADHS eine Extremvariante ohne definierbaren Schwellenwert am Ende des normalen Verhaltensspektrums darstellt (Levy et al. 1997, Hudziak et al. 2005), was auf eine dimensionale Ausprägung der Störung deutet. Bis zu 60 % der Allgemeinbevölkerung zeigen Symptome der Unaufmerksamkeit oder Hyperaktivität (Arcos-Burgos und Acosta 2007). Daher sollte die Störung von der normalen Bandbreite an Wesensmerkmalen durch den quantitativen Grad der Symptom-Ausprägung und durch das Vorliegen einer zeitlich kontinuierlichen Symptomausprägung abgegrenzt werden. Die Grenze zwischen Pathologie und Normvariante ist dort zu ziehen, wo für Betroffene durch das Syndrom zahlreiche alltagsrelevante Probleme bedingt sind (Kooij et al. 2010).

### **1.1.2 Komorbidität**

Sowohl im Kindes- als auch im Erwachsenenalter geht die Diagnose ADHS häufig mit Begleiterkrankungen einher. So leiden je nach Stichprobe 60-100 % der ADHS-Patienten an mindestens einer weiteren psychischen Störung (Gillberg et al. 2004). Wie sich ADHS und komorbide Erkrankungen wechselseitig bedingen und welche Rolle Genvarianten als pleiotrope Vulnerabilitätsprädiktoren spielen, ist ebenso unklar wie die Frage, ob Begleiterkrankungen bei ADHS als separate Entitäten oder als Ausdruck der phänotypischen Varianz derselben Grunderkrankung betrachtet werden sollten (Marks et al. 2001).

Die kindliche ADHS zeigt eine hohe Komorbidität mit Verhaltensstörungen, oppositionellem Trotzverhalten, affektiven Störungen, Angststörungen (Biederman et al. 1991) und Dyslexie (Willcutt et al. 2007, Yoshimasu et al. 2010). Auch eine Verbindung zur Rechenschwäche wird diskutiert, wobei die Ergebnisse einer familiären Risikoanalyse, durchgeführt von Monuteaux et al. (2005), gegen einen gemeinsamen genetischen Hintergrund von ADHS und Dyskalkulie sprechen. Tic-Störungen sind ebenfalls häufig mit ADHS assoziiert. So leiden zwischen 35 % und 90 % der Kinder mit Tourette-Syndrom zusätzlich an ADHS (Erenberg 2005). Affektive Störungen, Angststörungen, Persönlichkeitsstörungen und Substanzmissbrauch gehören zu den häufigsten komorbiden Störungen der adulten ADHS (Sobanski 2006). Ein Zusammenhang mit Schlafstörungen (Voinescu et al. 2012) und Essstörungen (Ptacek et al. 2010) wird ebenfalls diskutiert.

In einer Metaanalyse aus 43 verschiedenen Studien, die den Zusammenhang zwischen ADHS und Übergewicht untersuchten (69669 ADHS-Patienten und 621295 Kontrollen), zeigte sich ein um 22 % erhöhtes Risiko für Übergewicht bei den ADHS-Patienten und ein um 30 % erhöhtes Risiko, wenn nur die unmedizierten Patienten betrachtet werden. Der Zusammenhang zwischen ADHS und Übergewicht war bei Erwachsenen deutlicher als bei Kindern (Nigg et al. 2016).

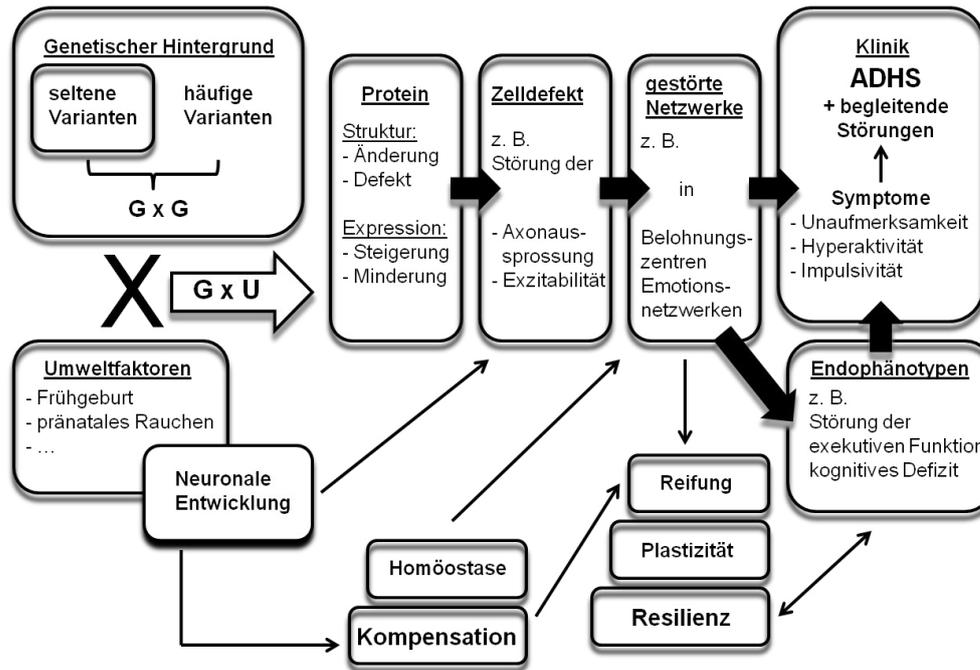
### **1.1.3 Epidemiologie**

Laut einer Metaregressions-Analyse, die Studien von 1978 bis 2005 berücksichtigte (n = 171756), liegt die weltweite Prävalenz kindlicher ADHS bei 5,3 % (Polanczyk et al. 2007). In Erwachsenenstichproben erfüllen 2-4 % der Teilnehmer die Diagnosekriterien (Fayyad et al. 2007, Simon et al. 2009). Das Geschlechterverhältnis von Jungen zu Mädchen reicht von 3:1 bis 9:1, je nachdem, ob populationsbasierte oder klinische Stichproben betrachtet werden (Gaub

und Carlson 1997). Bei Erwachsenen zeigt sich eine Odds-Ratio (Männer: Frauen) von etwa 1,6 (Kessler et al. 2006).

#### **1.1.4 Ätiologische Faktoren**

Die Ätiopathogenese der ADHS lässt sich am besten durch ein multimodales Entstehungskonzept erklären, an dem genetische-, Umweltfaktoren sowie individuelle Mechanismen der Kompensation durch Resilienz derartig interagieren, dass weit verbreitete Wesenszüge die Schwelle zur beeinträchtigenden Störung überschreiten (Geissler und Lesch 2011). Da wichtige Bindeglieder zwischen Erbinformation, Umweltfaktoren, molekularen Mechanismen der Signalübertragung, kognitiven Prozessen und Verhalten unbekannt sind, bedient man sich in der neurogenetischen Forschung des sogenannten Endophänotypen-Modells, das durch Castellanos und Tannock (2002) in die Diskussion über die Ätiologie der ADHS eingeführt wurde: Endophänotypen beschreiben quantifizierbare vererbare Risikofaktoren, die näher an den ursächlichen Kräften liegen als diagnostische Subgruppen und nehmen eine Mittelstellung zwischen Ätiologie und Klinik ein. Als biologische Marker können sie neurophysiologischer, biochemischer, endokrinologischer, neuroanatomischer, kognitiver oder neuropsychologischer Natur sein (Gottesman und Gould 2003). Die Erforschung sogenannter Gen-Umwelt-Interaktionen (G x U) bei neuropsychiatrischen Erkrankungen liefert einen Ansatz zur Entwirrung unklarer Zusammenhänge zwischen Erbinformation und Lebensbedingungen und deren individuellen Auswirkungen in einem sozialen Kontext. G x U beschreiben, wie einerseits Genvarianten die Empfindlichkeit eines Individuums auf Umweltfaktoren konditionieren und andererseits bestimmte Genvarianten mitunter erst unter widrigen Umweltbedingungen einen schädlichen Einfluss nehmen. G x U können potentiell als Erklärung für das bunte klinische Erscheinungsbild der ADHS dienen, da eine Vielzahl von genetischen Risikofaktoren in Verbindung mit individuellen Umwelteinflüssen einen multiplikativen Effekt auf die phänotypische Varianz ausüben kann (Banerjee et al. 2007) (siehe Abb. 1).



**Abb. 1: Integratives Modell zur ADHS-Ätiologie**

Das Zusammenspiel verschiedener Genvarianten ( $G \times G$ ), sowie Gen-Umweltinteraktionen ( $G \times U$ ) führen zu konsekutiven Veränderungen auf Proteinebene, Zellebene und schließlich in neuronalen Netzwerken, die bereits in frühen neuronalen Entwicklungsstadien zum Tragen kommen. Die Auswirkung dieser Veränderungen auf die Expression spezifischer Endophänotypen und Phänotypen wird modifiziert durch kompensatorische Mechanismen der Homöostase, die Reifungsvorgänge in Form von neuronaler Plastizität beeinflussen können und so die individuelle Resilienz beeinflussen. Endophänotypen beschreiben messbare intermediäre Phänotypen und nehmen eine Mittelstellung zwischen Symptomebene und zugrundeliegenden  $G \times U$  ein [adaptiert und modifiziert aus Geissler und Lesch (2011)].

#### 1.1.4.1 Umweltfaktoren

An der ADHS-Ätiologie beteiligte Umweltfaktoren können prä-, peri- oder postnatal auftreten. Als toxische Risikofaktoren werden unter anderem mütterliches Rauchen (Milberger et al. 1998) und Alkoholkonsum während der Schwangerschaft (Knopik et al. 2005), sowie Exposition gegenüber Blei und PCBs (Eubig et al. 2010) diskutiert. Gestationsdiabetes in Verbindung mit einem niedrigen sozioökonomischen Status (Nomura et al. 2012, Schmitt und Romanos 2012) sowie Frühgeburtlichkeit und niedriges Geburtsgewicht (Shum et al. 2008) gelten als mögliche perinatale Risikofaktoren. Zwischen dem Ausmaß des Fernsehkonsums in frühen Lebensjahren und der Entwicklung von ADHS-Symptomen wurde in mehreren longitudinalen Studien kein signifikanter Zusammenhang gefunden (Christakis et al. 2004, Obel et al. 2004, Stevens und Mulsow 2006). Wohl aber scheint eine Assoziation mit traumatischen Erfahrungen, wie früher Heimunterbringung (McLaughlin et al. 2010, Merz und McCall 2010) und Kindesmissbrauch zu bestehen (Briggs-Gowan et al. 2010).

Anekdotische Berichte über Zuckerintoleranz oder übermäßigen Zuckerkonsum bei Kindern mit ADHS warfen in der Vergangenheit die Frage auf, ob Zuckerkonsum ein maßgeblicher Risikofaktor für die Entstehung von ADHS oder die Verschlimmerung von ADHS-Symptomen in der Kindheit ist (Kinsbourne 1994). Eine Reihe von Studien führte zu negativen oder indifferenten Ergebnissen (Milich und Pelham 1986, Wender und Solanto 1991, Hoover und Milich 1994, Wolraich et al. 1994) bis eine Meta-Analyse nahelegte, dass tatsächlich kein evidenter Zusammenhang zwischen Zuckerkonsum und ADHS-Symptomen besteht (Wolraich et al. 1995). Johnson et al. (2011) warfen die Frage nach der Rolle von Zuckerkonsum bei ADHS allerdings erneut auf, indem sie Limitationen der oben genannten Studien aufzeigten und eine mögliche Rolle von chronischem Zuckerkonsum für ADHS diskutierten: Chronischer Zuckerkonsum soll demnach zu adaptiven Veränderungen im mesolimbischen Dopaminsystem und präfrontalen Kortex führen, die potentiell an der Entstehung von ADHS-Symptomen und Binge-Eating beteiligt sind.

#### 1.1.4.2 Genetische Risikofaktoren und Kandidatengene

Eine Metaanalyse 20 verschiedener Zwillingsstudien zeigte eine durchschnittliche Heritabilität der ADHS von 76 % (Faraone et al. 2005). Genetische Effekte scheinen auch für die intraindividuelle Beständigkeit von ADHS-Symptomen verantwortlich zu sein (Larsson et al. 2004, Kuntsi et al. 2005). Es handelt sich um eine Störung mit polygenetischem Hintergrund, wobei einzelne Kandidatengene nur einen kleinen bis moderaten Effekt haben (Comings et al. 2005). Viele der bisher identifizierten Kandidatengene sind in gemeinsame neuronale Netzwerke integriert. Darunter fällt die Steuerung der Axonaussprossung (Poelmans et al. 2011), sowie die Regulation der Neurotransmitterfreisetzung und neuronalen Exzitabilität (Arcos-Burgos et al. 2012).

Bisherige Kandidatengenuntersuchungen konzentrierten sich vor allem auf Polymorphismen dopaminerger und serotonerger Gene (Franke et al. 2011). Zu den am häufigsten untersuchten Genen gehören der Dopamintransporter *SLC6A3*, sowie das Dopaminrezeptorgen *DRD4*, die beide in einer Metaanalyse eine signifikante Assoziation mit kindlicher ADHS zeigten. Des Weiteren wurden Varianten in den Genen *DRD5*, *5HTT*, *HTR1B*, *CHRNA4* und *SNAP25* mit kindlicher ADHS in Verbindung gebracht (Gizer et al. 2009). Zhou et al. (2008) fanden in einer Metaanalyse 7 unabhängiger genomweiter Kopplungsanalysen 10 verschiedene Loci, die zumindest nominale Signifikanz erreichten. Darunter befand sich eine Region auf dem langen Arm von Chromosom 16, die eine genomweit

signifikante Kopplung zeigte. Die bisher durchgeführten genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) konnten keine Variante mit genomweiter Signifikanz identifizieren. Allerdings wurde eine Vielzahl neuer Kandidatengene entdeckt. Die stärkste Evidenz liegt für das *CDH13*-Gen vor, das innerhalb des erwähnten Chromosom 16q-Locus mit genomweit signifikanter Kopplung liegt. In diesem Zelladhäsions-Gen wurden in mehreren Studien mit ADHS assoziierte Polymorphismen beschrieben (Lasky-Su et al. 2008, Lesch et al. 2008, Neale et al. 2010).

Neben SNPs wurden in den vergangenen Jahren zunehmend auch strukturelle Veränderungen erforscht. Unter *Copy number variants* (CNVs) versteht man strukturelle genomische Veränderungen, die in einer Abweichung der Kopienzahl eines bestimmten DNA-Abschnittes resultieren und eine DNA-Sequenz  $> 1$  kb umfassen. Kleinere strukturelle Veränderungen werden als Indels (Insertions-Deletions-Polymorphismen) bezeichnet. CNVs, die in mehr als 1,0 % der Bevölkerung auftreten, nennt man Kopienzahl-Polymorphismen (CNPs) (Feuk et al. 2006). Durch die Entwicklung Chip-basierter Verfahren wie der *Array-comparative genomic hybridization* (aCGH) ist es möglich, submikroskopische strukturelle Veränderungen nachzuweisen (Pinkel et al. 1998). CNVs werden mehrheitlich vererbt, können jedoch auch *de novo* auftreten (McCarroll et al. 2008). Nicht-allelische homologe Rekombination, die bevorzugt in Bereichen segmentaler Duplikationen auftritt, scheint der häufigste Entstehungsmechanismus von CNVs zu sein (Kidd et al. 2008). Daneben gibt es nicht-rekurrente CNVs, die durch nicht-homologe Rekombination gebildet werden. Die Lokus-spezifische Mutationsrate für CNVs ist dabei 2-4 mal höher als für Punktmutationen (Hastings et al. 2009). Zunächst vor allem in maligne transformierten Zellen beobachtet (Merlino et al. 1985, Tapper et al. 1997), zeigten zwei wegweisende Studien schließlich, dass CNVs regelhaft im Genom gesunder Menschen nachweisbar sind und erheblich zur interindividuellen genetischen Diversität beitragen (Iafrate et al. 2004, Sebat et al. 2004). Strukturelle Veränderungen umfassen insgesamt sogar mehr Basenpaare als SNPs (Redon et al. 2006). CNVs können komplette Gensequenzen umfassen und durch einen Gen-Dosis-Effekt mRNA- (Yoshikawa et al. 1994, Hollox et al. 2003, McCarroll et al. 2006) und Proteinexpression (Miller et al. 2004, Gonzalez et al. 2005) beeinflussen. In mehreren genomweiten Analysen wurde eine signifikante Häufung seltener oftmals *de novo* aufgetretener CNVs in Zusammenhang mit neuropsychiatrischen Erkrankungen gefunden. Darunter befanden sich neben ADHS (Williams et al. 2010) auch Erkrankungen des autistischen- (Kusenda und Sebat 2008) und schizophrenen Formenkreises sowie die bipolare Störung (Malhotra et al. 2011). Insbesondere große ( $> 500$  kb), seltene (MAF  $< 1,0$  %) CNVs scheinen bei ADHS gehäuft

aufzutreten (Williams et al. 2010, Williams et al. 2012). Elia et al. (2010) untersuchten in einer genomweiten Studie seltene vererbte CNVs, die nur bei ADHS-Patienten, nicht aber in einem Kontrollkollektiv auftraten, und entdeckten, dass diese CNVs bevorzugt Gene umfassten, die zuvor bereits mit der Entwicklung des Nervensystems, sowie mit Autismus und Schizophrenie in Zusammenhang gebracht wurden. Williams et al. (2010) identifizierten eine Duplikation am 16p13.11-Locus, die eine signifikante Assoziation mit ADHS zeigte. Weitere genomweite Studien erbrachten Signifikanz für eine Duplikation des *CHRNA7*-Gens (Stergiakouli et al. 2012, Williams et al. 2012), CNVs in verschiedenen metabotropen Glutamatrezeptoren der *GRM*-Familie (Elia et al. 2012) sowie Duplikationen und Deletionen im *PARK2*-Gen (Jarick et al. 2012). CNVs besitzen keine diagnostische Spezifität für neuropsychiatrische Erkrankungen, da sie mit verschiedenen Phänotypen vergesellschaftet sein können und auch im Gesunden auftreten (Grayton et al. 2012). Das Auftreten von großen, seltenen CNVs bei ADHS ist nicht mit der Symptomschwere, bestimmten klinischen Subtypen oder Komorbiditäten assoziiert (Langley et al. 2011).

### **1.1.5 Neurobiologie der ADHS**

Einen Überblick über die wichtigsten pathophysiologischen Hintergründe bietet Cortese (2012). Ob neurobiologische Veränderungen lediglich als Epiphänomene zu betrachten sind oder kausal an der Symptomentwicklung der ADHS mitwirken, ist ungeklärt (Liston et al. 2011). Es besteht jedoch eine Korrelation zwischen Veränderungen in spezifischen neuronalen Netzwerken und funktionellen Beeinträchtigungen, die als Endophänotypen diskutiert werden. So finden sich bei der ADHS regelmäßig Störungen des frontostriatalen Systems und funktionell messbare Alterationen der Antwortinhibition als Korrelat beeinträchtigter exekutiver Funktionen (Casey et al. 1997, Rubia et al. 1999). Eine Beteiligung des präfrontalen Kortex einschließlich frontostriataler sowie frontozerebellärer Netzwerke und daraus folgende Defizite der exekutiven Funktionen können zu Beeinträchtigungen der kognitiven Kontrolle, der zeitlichen Planung und der Aufmerksamkeitssteuerung führen (Durstun et al. 2011).

Neben Störungen der exekutiven Funktionen scheinen emotional-motivationale Defizite bedeutsam für die Entwicklung ADHS-typischer Symptome zu sein (Conzelmann et al. 2011). Dementsprechend finden sich Abweichungen im mesolimbischen Dopamin-System, das als Belohnungszentrum der Taktgeber der Motivation ist und ausgehend von dopaminergen Neuronen der Area tegmentalis ventralis Strukturen des limbischen Systems wie Amygdala und Nucleus accumbens innerviert, die an der Emotionsregulation beteiligt sind (Alcaro et al. 2007).

Bei ADHS-Probanden wurden bezüglich des Mandelkerns verminderte Volumina der gesamten (Frodl et al. 2010) oder basolateralen Amygdala (Plessen et al. 2006) sowie eine erniedrigte Dopaminfreisetzung (Volkow et al. 2007) und eine gestörte Verschaltung amygdalokortikaler Bahnen (Cocchi et al. 2012) gefunden. Ein veränderter Dopaminstoffwechsel im Nucleus accumbens wurde sowohl in einem Tiermodell für ADHS (Kujirai et al. 1990, Vaughan et al. 1999, Russell 2000) als auch durch Positronenemissionstomografie (PET)-Studie am Menschen (Forsberg et al. 2006) festgestellt.

#### 1.1.5.1 Neurochemie der ADHS

Alle zur Behandlung der ADHS zugelassenen Medikamente wirken auf das monoaminerge, insbesondere das katecholaminerge System. Sowohl Methylphenidat als auch Amphetamine erhöhen als Wiederaufnahmehemmer die Verfügbarkeit von Dopamin und Noradrenalin im synaptischen Spalt. Amphetamine steigern zusätzlich die Freisetzung von Dopamin und Noradrenalin aus dem präsynaptischen Neuron. Das Zweitlinienpräparat Atomoxetin erhöht die extrazelluläre Verfügbarkeit von Noradrenalin (Antshel et al. 2011). Als einer der ersten Autoren vermutete Wender (1973), dass eine Unterfunktion des monoaminergen Systems zur Pathogenese der „minimalen Hirndysfunktion“ beiträgt. Insbesondere ein möglicher Zusammenhang mit Störungen im dopaminergen System wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht: Neben Kandidatengenstudien, die Assoziationen mit verschiedenen Dopamintransporter- und Rezeptorgenen nahelegen (siehe Kap. 1.1.4.2) (Gizer et al. 2009), bekräftigen PET-Studien und Tiermodelle eine Dysfunktion des dopaminergen Systems bei ADHS. In PET-Studien wurden kongruent zu den genetischen Befunden Alterationen in Vermittlern der dopaminergen Signalübertragung, dem Dopamintransporter (Jucaite et al. 2005) und Dopaminrezeptoren (Volkow et al. 2007) gefunden. Sowohl DAT-KO-Mäuse als auch 6-Hydroxy-Dopamin-geschädigte Mäuse legen eine motorische Hyperaktivität an den Tag, die durch die Gabe von Stimulanzien gemildert wird und haben eine hohe Validität als Modell für ADHS (van der Kooij und Glennon 2007). Neben dem dopaminergen und noradrenergen System scheinen auch serotonerge und cholinerge Botenstoffgefüge am komplizierten Zusammenspiel von ADHS-relevanten Netzwerken beteiligt zu sein (Prince 2008). Diskutiert wird zudem eine Rolle von glutamatergen Signalübertragungswegen, die in frontostriatalen Schaltkreisen eng mit dem dopaminergen System verknüpft sind (Lesch et al. 2012).

### 1.1.5.2 Bildmorphologische Korrelate der ADHS

Mit Hilfe der Magnetresonanztomografie (MRT) lassen sich sowohl strukturelle, als auch funktionelle Alterationen bei ADHS-Probanden feststellen. In zwei kleinen Studien wurden Volumenreduktionen in präfrontalen und frontalen Regionen von Interesse (*regions of interest*, ROIs) sowie frontaler weißer Substanz gefunden (Kates et al. 2002, Mostofsky et al. 2002). In einem dynamischen Ansatz, in dem die Dicke der Hirnrinde im longitudinalen Verlauf wiederholt gemessen wurde, zeigte sich bei ADHS-Kindern eine kortikale Reifungsverzögerung, die in präfrontalen Arealen am ausgeprägtesten war (Shaw et al. 2007). Eine von Valera et al. (2007) durchgeführte Metaanalyse zeigte ein signifikant reduziertes globales Hirnvolumen bei ADHS-Kindern. ROIs, die in derselben Analyse die größten Unterschiede zu Kontrollprobanden aufwiesen, beinhalten den hinteren unteren Kleinhirnwurm, das Splenium corporis callosi, den rechten Nucleus caudatus, sowie die gesamte rechte Hemisphäre. In allen genannten Regionen zeigte sich bei den ADHS-Probanden ein vermindertes Volumen. Im Gegensatz zur ROI-Methode, bei der einzelne Gehirnregionen a priori manuell definiert werden müssen, ermöglichen auf Voxel-basierter Morphometrie (VBM) beruhende Methoden eine hypothesenfreie automatische Auswertung verschiedener Volumina, die quantitative Unterschiede zwischen zwei Gruppen aufweisen (Davatzikos et al. 2001). In einer Metaanalyse VBM-basierter MRT-Studien zeigte sich ein vermindertes Volumen im rechten Putamen von ADHS-Patienten (Ellison-Wright et al. 2008).

Neben diesen strukturellen Abweichungen wurden mit Hilfe der funktionellen Magnetresonanztomografie (fMRT) funktionelle Alterationen aufgedeckt. Die fMRT-Messung findet meist zunächst im Ruhezustand (*resting state*) mit geschlossenen Augen und anschließend unter Stimulation mit visuellen Reizen oder kognitiven Aufgaben statt. Bei fehlenden äußeren Reizen wird das sogenannte Ruhezustandsnetzwerk (*default-mode network*) aktiviert, das sich aus verschiedenen miteinander verschalteten Gehirnregionen rekrutiert (Otti et al. 2012). Eine Hypothese zur gestörten Aufmerksamkeitskontrolle entstand aus der Beobachtung, dass bei ADHS-Probanden dieses Ruhezustandsnetzwerk auch unter externer Stimulation regelmäßig eine abnormal hohe Aktivität zeigt. Dieses Phänomen wird als „*default-mode interference*“ bezeichnet (Sonuga-Barke und Castellanos 2007). Zudem wurde in einer Metaanalyse 16 verschiedener fMRT- und PET-Studien unter Stimulation eine signifikante Hypofrontalität bei ADHS-Probanden gefunden: Der anteriore cinguläre Kortex, der dorsolaterale und inferiore präfrontale Kortex sowie die Basalganglien, der Thalamus und

Anteile des parietalen Kortex zeigten eine geringere Aktivierung als bei Kontrollprobanden (Dickstein et al. 2006).

## **1.2 Glukosetransport und Glukosemetabolismus**

Da Glukose-Moleküle aufgrund ihrer Größe und Hydrophilie Zellmembranen nicht durch einfache Diffusion überwinden können, bedarf es spezifischer Mechanismen, die den transmembranären Glukosetransport ermöglichen. Es gibt zwei Proteinklassen, die als Glukosetransportermoleküle fungieren können. Einerseits die Klasse der Natrium-Glukose-Symporter (SGLTs). Zum anderen die Klasse der sogenannten Glukosetransporter (GLUTs). Der Mechanismus des transmembranären Glukosetransports über GLUTs entspricht einer erleichterten Diffusion entlang des elektrochemischen Gradienten des Substrates und ist im Gegensatz zum sekundär aktiven Glukosetransport über SGLTs nicht an eine energieverbrauchende Katalyse der Natrium-Kalium-ATPase gekoppelt. Die Zell- und Gewebe-abhängige Expression und Kinetik der verschiedenen GLUTs und SGLTs dient der Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase des Organismus und ist an der Kontrolle des Glukoseverbrauchs, der Glukosespeicherung sowie der hormonellen Regulation des Glukosemetabolismus beteiligt (Scheepers et al. 2004).

### **1.2.1 Assoziation einer *SLC2A3*-Genduplikation mit ADHS**

Im Rahmen einer hypothesenfrei angelegten familienbasierenden CNV-Analyse wurden durch Lesch et al. (2011) einige mögliche ADHS-Kandidatengene umfassende Mikrodeletionen und -duplikationen identifiziert. Darunter befand sich eine etwa 130 kb umfassende Duplikation auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 (max. Ausdehnung Chr. 12: 7993703-8125719, min. Ausdehnung Chr. 12: 7996763-8124244), welche neben drei 5'-terminalen Exons des im Hoden exprimierten *SLC2A14* (Wu und Freeze 2002) das komplette *SLC2A3*-Gen umfasst, das für den neuronalen Glukosetransporter GLUT3 kodiert. Eine anschließende Fall-Kontroll-Studie zeigte in einer deutschen ADHS-Kohorte ein signifikant häufigeres Auftreten der *SLC2A3*-Duplikation als in der Kontrollstichprobe (Merker et al. 2017).

### 1.2.2 Die *SLC2A*-Familie der Glukosetransporter (GLUTs)

Die *SLC2A*-Familie der Zucker- und Polyoltransporter umfasst 14 Mitglieder und besteht aus den Genen *SLC2A1-SLC2A12*, dem Myoinositoltransporter *HMIT* sowie dem evolutionsbiologisch jüngsten Mitglied *SLC2A14*. Jedes der 14 Transportproteine verfügt über 12 Transmembrandomänen, die derart orientiert sind, dass sowohl der C-terminale als auch der N-terminale Anteil intrazellulär liegen. Alle GLUTs sind stark glykosilierte Membranproteine. Aufgrund von Sequenzhomologie sowie Lokalisation der Substratbindungs- und Glykosilierungsstellen werden die 14 Transporter in drei Klassen eingeteilt. Während Klasse I und Klasse II –Transporter eine N-Glykosylierung an der ersten extrazellulären Schleife tragen, findet sich bei Klasse III -Transportern ein Zuckerrest an der fünften extrazellulären Schleife. Die einzelnen Mitglieder unterscheiden sich durch ihre Substratspezifität, Kinetik und Expressionsmuster (Augustin 2010).

### 1.2.3 Der Glukosetransporter GLUT3

Das GLUT3-Transportprotein wird durch das *SLC2A3*-Gen codiert, welches auf Chromosom 12p13.3 liegt und eine Gesamtlänge von etwa 17 kb hat. Die erstmalige Klonierung von *SLC2A3* durch Kayano et al. (1988) gelang aus einer cDNA-Bibliothek für fetalen Skelettmuskel. Das 496 Aminosäuren umfassende Transmembranprotein hat ein Molekulargewicht von 54 kDa. Neben Glukose kann GLUT3 *in vitro* Galactose, Mannose und Ascorbinsäure transportieren (Gould et al. 1991, Rumsey et al. 1997). Mit einer  $K_m$  von 1,4 hat GLUT3 eine hohe Affinität zu D-Glukose (Colville et al. 1993).

#### 1.2.3.1 Bedarfsabhängige GLUT3-Expression

*SLC2A3*-mRNA wird in einer Vielzahl humaner Gewebearten exprimiert, am stärksten im Gehirn (Kayano et al. 1988). Auch die Proteinexpression ist im Gehirn am höchsten, weshalb GLUT3 als neuronaler Glukosetransporter bezeichnet wird. Daneben wird das Protein beim Menschen in geringerer Konzentration in einer Vielzahl weiterer Organe und Gewebe wie Hoden, Spermatozoen, Plazenta, Leber, Niere, Herzmuskelgewebe und Leukozyten exprimiert (Shepherd et al. 1992, Haber et al. 1993, Kipmen-Korgun et al. 2009). Beim Menschen wurde GLUT3-Protein vor allem in axonalen Fortsätzen des Neuropils im reifen Neokortex sowie in zellulären Fortsätzen tieferer kortikaler Regionen gefunden, was eine Rolle von GLUT3 bei der

Energiebereitstellung für Mechanismen des axonalen Transportes und der Neurotransmission (siehe auch Kap. 1.2.4.1) nahelegt (Mantych et al. 1992).

Bei Maus und Ratte wird GLUT3 nur in Neuronen exprimiert (Yano et al. 1991, Gould et al. 1992). Im Mausgehirn findet sich die höchste Expression im Hippocampus, den Purkinje-Zellen des Kleinhirns sowie im piriformen Kortex (Nagamatsu et al. 1992). In den meisten Hirnregionen ist die GLUT3-Expression dabei auf neuronale Fortsätze beschränkt (Fields et al. 1999). Im Gehirn der Ratte zeigen sich ähnliche Verteilungsmuster wie bei der Maus mit hoher Expression in *Hippocampus*, Kleinhirn, Neokortex, olfaktorischem System und Kerngebieten des Hirnstamms (Bondy et al. 1992). Ähnlich wie bei Mensch und Maus ist die zelluläre Verteilung von GLUT3 bei der Ratte auf das Neuropil, insbesondere auf Moosfasern des Hippocampus konzentriert, während *Perikarya* immunhistochemisch kaum angefärbt werden (McCall et al. 1994, Fattoretti et al. 2001, Reagan et al. 2002). In einer ultrastrukturellen Studie konnten diese Ergebnisse bestätigt werden: Die GLUT3-Expression zeigte sich am höchsten in prä- und postsynaptischen neuronalen Endigungen sowie in kleinen neuronalen Fortsätzen (Leino et al. 1997).

Die *SLC2A3*-Expression divergiert zwischen verschiedenen Gewebearten, kann aber auch innerhalb eines Gewebeverbandes durch metabolische, hormonelle oder toxisch-medikamentöse Faktoren zeitlichen Schwankungen unterworfen sein. Insbesondere Hypoglykämie, Hyperglykämie und Hypoxie scheinen die *SLC2A3*-Expression zu beeinflussen (siehe Tab. 1). Obgleich die Brutto-Expression von GLUT3 bis auf wenige Ausnahmen (Taha et al. 1995, Thomas et al. 1996) Insulin-unabhängig zu sein scheint, gibt es Hinweise darauf, dass Insulin zu einer Translokation von GLUT3 aus einem intrazellulären Pool an die Plasmamembran und somit zu einer Steigerung der zellulären Glukoseaufnahme führen kann (Dimitriadis et al. 2005, Uemura und Greenlee 2006, Piatkiewicz et al. 2010). Die Speicherung von GLUT3 in intrazellulären Vesikeln konnte durch mehrere Studien bestätigt werden. In neuronalen Zellen und PC12-Zellen wurde GLUT3 in Vesikeln gefunden, die synaptischen Vesikeln ähnelten (Thoidis et al. 1999). Leino et al. (1997) haben GLUT3 neben der hauptsächlichen Lokalisation in der Plasmamembran ebenfalls in Vesikeln, aber auch in mitochondrialen Membranen beschrieben. In Thrombozyten wird GLUT3 in sekretorischen  $\alpha$ -Granula angereichert. Nach Stimulation mit Thrombin wird das Protein mit diesen Granula an die Plasmamembran transloziert, was zu einer Steigerung der Glukoseaufnahme führt (Heijnen et al. 1997). Sowohl die Expression als auch die intrazelluläre Verteilung von GLUT3 ist demnach abhängig von funktioneller zellulärer Aktivität.

Substanz / Kondition	GLUT3-Expression		Modell	Studie	
	mRNA	Protein			
Hypoglykämie	↑	k. E.	Gehirn (mo)	Nagamatsu et al. (1994) *	
	n. a.	↑	Gehirn (rat)	Uehara et al. (1997)	
	n. a.	↑	Gehirn (rat)	Duelli et al. (1999)	
	↑	↑	Gehirn (rat)	Lee et al. (2000)	
	n. a.	k. E.	Plazenta (sh)	Das et al. (2000)	
Hyperglykämie	n. a.	↑	Leukozyten (hu)	Korgun et al. (2002)	
	↑	↑	Plazenta (rat)	Boileau et al. (1995)	
	↓	↑	Chorion-Ca (hu)	Hahn et al. (1998) *	
	↑	↑	Hippoc. (rat)	Reagan et al. (1999)	
	n. a.	↓	Plazenta (sh)	Das et al. (2000)	
	↑	↑	Linse (rat)	Merriman-Smith et al. (2003)	
	↓	↓	Gehirn (rat)	Hou et al. (2007)	
Hypoxie/Ischämie	↓	↓	Embryo (mo)	Shen et al. (2009)	
	n. a.	↑	Gehirn (rat)	Vannucci et al. (1996)	
	↑	n. a.	Trophoblast (hu)	Esterman et al. (1997)	
	↑	n. a.	Gehirn (rat Embryo)	Royer et al. (2000)	
	↑	n. a.	Adipozyten (hu)	Wood et al. (2007)	
Schlafentzug	↑	↑	Chondrozyten (mo)	Ren et al. (2008)	
	↑	n. a.	Kortex (mo)	Hinard et al. (2012)	
	↓	n. a.	Hippocampus (rat)	Porter et al. (2012)	
Insulin	↑	n. a.	Leukozyten (hu)	Möller-Levet et al. (2013)	
	↑	↑	L6-Muskelzellen (rat)	Taha et al. (1995)	
Östrogene	↑	↑	Osteosarkomzellen (rat)	Thomas et al. (1996)	
	↑	↑	Kortex (mac)	Cheng et al. (2001)	
Progesteron	k. E.	n. a.	Endometrium (hu)	von Wolff et al. (2003)	
	↑	↑	ZR-75-1 Zellen (hu)	Medina et al. (2003)	
BDNF	↑	↑	Neuronale Zellkultur (mo)	Burkhalter et al. (2003)	
Stimulanzien	Nikotin	k. E.	n. a.	Gehirn (rat)	Monteggia et al. (1994)
		n. a.	↑	Gehirn (rat)	Duelli et al. (1998)
	Modafinil	↑	n. a.	Kortex (mo)	Petit et al. (2010)
	METH	n. a.	↓	Kort. Neuronen (hu)	Abdul Muneer et al. (2011a)
Anti-depressiva	TCA	↓	n. a.	HepG2-Zellen (hu)	Sawada et al. (2005)
		↓	n. a.	HepG2-Zellen (hu)	Atienzar et al. (2007)
		↓	n. a.	HepG2-Zellen (hu)	Nioi et al. (2007)
	SSRI	↓	n. a.	HepG2-Zellen (hu)	Sawada et al. (2005)
		↓	n. a.	HepG2-Zellen (hu)	Atienzar et al. (2007)
		↓	n. a.	HepG2-Zellen (hu)	Nioi et al. (2007)
Antipsychotika	n. a.	↑	PC12-Zellen (rat)	Dwyer et al. (1999)	
Ethanol	n. a.	↓	Gehirn (rat)	Handa et al. (2000)	
	n. a.	↓	Gehirn (rat)	Fattoretti et al. (2003)	
	n. a.	↑	Neuron. Zellkultur (rat)	Braza-Boils et al. (2006)	
	n. a.	↓	Neuron. Zellkultur (hu)	Abdul Muneer et al. (2011b)	

**Tab. 1: Faktoren, die die SLC2A3-Expression beeinflussen**

Metabolische (blau) und hormonelle (rosa) Faktoren sowie psychoaktive Substanzen (grün) beeinflussen die SLC2A3-Expression im Sinne einer Expressionssteigerung (Pfeil nach oben) bzw. Expressionsminderung (Pfeil nach unten). Es fällt auf, dass mRNA- und Proteinexpression nicht immer in dieselbe Richtung verändert sind, und, dass eine Änderung auf mRNA-Ebene nicht in allen Fällen auch auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte (\*) (n. a. = nicht angegeben, wurde im Fachartikel nicht erwähnt/nicht getestet; k. E. = kein signifikanter Effekt nachweisbar; hu = human, rat = Ratte, mo = Maus, sh = Schaaf, mac = Rhesus-Makake).

### 1.2.3.2 *SLC2A3*-Varianten und -Expression im klinischen Kontext

Es liegen Hinweise für eine Beteiligung von *SLC2A3*-Genvarianten bzw. von geänderter *SLC2A3*-Expression für Krankheiten aus dem neuropsychiatrischen, neurodegenerativen und immunologischen Bereich vor.

Bemerkenswerterweise zeigten *SLC2A3*-KO-Mäuse trotz signifikant verminderter GLUT3-Protein-Expression keine verminderte zelluläre Glukoseaufnahme (Schmidt et al. 2008, Zhao et al. 2010, Stuart et al. 2011). Während der homozygote Knock-Out in einem frühen Embryonalstadium letal endet, sind heterozygote *SLC2A3*-KO-Mäuse lebensfähig (Stuart et al. 2007, Schmidt et al. 2009). Die heterozygoten KO-Tiere unterscheiden sich von ihren Wildtyp-Artgenossen nicht in Nahrungsaufnahme, Körpergewicht, sowie Blut-Glukose- und Insulinspiegeln. Auch bezüglich Koordination, Motorik, Reflexen, Ängstlichkeit, Lernen und Gedächtnis zeigen sich keine Auffälligkeiten. Allerdings ist bei den heterozygoten *SLC2A3*-KO-Mäusen die im EEG gemessene elektrische Aktivität leicht erhöht und sie zeigen sich empfindlicher gegenüber einem akustischen Startle-Stimulus (Schmidt et al. 2008). Die Arbeitsgruppe um Zhao et al. (2010) fand, dass heterozygote *SLC2A3*-KO Mäuse eine reduzierte Vokalisation, vermehrt stereotype Bewegungen sowie eine verstärkte Neigung zu epileptischen Anfällen zeigten und interpretierten diese Befunde als möglichen Hinweis auf ein Autismus-ähnliches Syndrom. Zudem fanden sie im Gegensatz zu Schmidt et al. (2008) ein gestörtes räumliches Lernen sowie ein beeinträchtigtes Arbeitsgedächtnis bei den KO-Tieren.

Ogleich am Menschen bislang keine Assoziationsstudie durchgeführt wurde, die einen Zusammenhang zwischen heterozygoter *SLC2A3*-Deletion und dem Vorliegen von Autismus-Spektrum Erkrankungen untersucht, wird eine derartige Deletion zumindest in einer Autismus-Studie erwähnt (O'Roak et al. 2012). Merker et al. (2017) beschreiben einen Einfluss der in dieser Arbeit behandelten *SLC2A3*-Duplikation auf EEG-Messwerte während eines Arbeitsgedächtnistests sowie eines Tests zur Antwortinhibition, was auf einen möglichen Zusammenhang dieses Genotyps mit ADHS-spezifischen Endophänotypen gestörter Gedächtnisprozessierung sowie alterierter präfrontaler Konnektivität hindeutet. Die Duplikation des *SLC2A3*-Gens wurde zudem im Zusammenhang mit affektiven Störungen beschrieben (Yang et al. 2009a). Auf eine mögliche Assoziation zwischen Dyslexie und *SLC2A3* weist eine Studie von Roeske et al. (2011) hin: Zwei SNPs auf Chromosom 4, die mit einem Dyslexie-Endophänotypen assoziiert sind, zeigten womöglich über einen transregulatorischen Effekt eine signifikante Assoziation mit der Höhe der *SLC2A3*-Expression. Nachdem bereits längere Zeit über einen möglichen Zusammenhang zwischen

Glukosemetabolismus und Schizophrenie spekuliert wurde (Holden und Mooney 1994, McDermott und de Silva 2005), fanden Kuzman et al. (2009) schließlich eine durchschnittlich 2-fach erhöhte *SLC2A3*-mRNA Expression im peripheren Blut unbehandelter Patienten während einer erstmals aufgetretenen psychotischen Episode. Da einige Antipsychotika neben D2-Rezeptoren auch GLUT3 blockieren (Dwyer et al. 1999), erscheint dieses Ergebnis besonders interessant. Ein Zusammenhang zwischen GLUT3-Expression und der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen wird ebenfalls diskutiert. GLUT3-Protein war im zerebralen Kortex von Alzheimer-Patienten signifikant reduziert (Simpson et al. 1994). Eine Studie von Liu et al. (2008) ergab, dass diese verminderte GLUT3-Expression bei Alzheimer gut mit der Tau-Hyperphosphorylierung und der Akkumulierung von neurofibrillären Bündeln korreliert. Bei Chorea Huntington Patienten wiederum zeigte sich eine Korrelation zwischen *SLC2A3*-Kopienzahl und Alter bei Krankheitsausbruch im Sinne eines protektiven Effektes einer höheren Kopienzahl (Vittori et al. 2014). Für das Risiko, an rheumatoider Arthritis zu erkranken, scheint wiederum eine heterozygote Deletion des *SLC2A3*-Gens von Vorteil zu sein (Veal et al. 2014).

#### **1.2.4 Zentraler Glukosemetabolismus**

Glukose ist das wichtigste Substrat für die Energieversorgung des Gehirns durch den universellen Energieträger ATP. Die Glukoseutilisation in verschiedenen Regionen des ZNS lässt sich *post mortem* durch Autoradiografie oder *in vivo* durch PET messen. Sie wird durch die regionale zerebrale metabolische Rate für Glukose (rCMRGlc) beschrieben. Während GLUT1 den Transport von Glukose über die Blut-Hirnschranke erleichtert und in Astrozyten exprimiert wird, ist GLUT3 der überwiegend neuronale Glukosetransporter (Maher et al. 1994). Es besteht ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen Plasma-Glukose-Spiegel und rCMRGlc (Blomqvist et al. 1991). Zudem wurde eine positive Korrelation zwischen rCMRGlc und GLUT3- bzw. GLUT1-Expression nachgewiesen (Duelli et al. 1998, Duelli et al. 1999, Khan et al. 1999). Die Aufrechterhaltung des neuronalen Ruhemembranpotentials und die Neurotransmission tragen den größten Anteil an der zerebralen Glukoseutilisation, da durch den ständigen Zusammenbruch des Membranpotentials beim Feuern von Neuronen große Mengen an ATP für die Wiederherstellung des elektrochemischen Gradienten benötigt werden (Harris et al. 2012). Das Gehirn verfügt daher über Mechanismen, die eine aktivitätsabhängige Anpassung der Glukoseversorgung erlauben (Gobel et al. 2013).

#### 1.2.4.1 Glukosestoffwechsel und Neurotransmission

Sowohl dem glutamatergen als auch dem dopaminergen System wird eine Rolle für die Pathophysiologie der ADHS zugeschrieben (siehe Kap. 1.1.5.1). In beiden Systemen bestehen enge Wechselwirkungen mit der regionalen Glukoseutilisation und der Expression von Glukosetransportern. In glutamatergen Neuronen ist eine ausreichende Glukoseversorgung notwendig für die Aufrechterhaltung des Botenstoffgleichgewichts während synaptischer Aktivität (Bak et al. 2006). Ferreira et al. (2011) konnten die GLUT3-Oberflächenexpression und Glukoseaufnahme synaptischer Endigungen von kortikalen und hippocampalen Neuronen durch elektrische Stimulation erhöhen. Sie erhielten Hinweise darauf, dass diesem Mechanismus auf molekularer Ebene die glutamaterge Bindung an NMDA-Rezeptoren mit konsekutiver Phosphorylierung und Aktivierung der neuronalen NO-Synthase *NOS1* über Kalziumeinstrom oder Aktivierung der Proteinkinase *Akt* und eine cGMP-vermittelte Translokation von GLUT3 an die Zelloberfläche zugrunde liegt. Demnach erhöht neuronale Aktivität in glutamatergen Neuronen die Glukoseaufnahme, wodurch wiederum Energie für die weitere Bereitstellung und Freisetzung von Botenstoffen zur Verfügung gestellt wird. Interessanterweise wird *NOS1* als ADHS-Kandidatengens diskutiert (Lasky-Su et al. 2008, Reif et al. 2009). *Akt* wiederum ist ein Interaktionspartner des vielversprechenden Kandidatengens *CDH13*. Im Zusammenspiel scheinen die beiden Gene eine wichtige Rolle für neuronales Zellüberleben, Axonaussprossung und Synaptogenese zu spielen (Rivero et al. 2013). Auf einem Poster von Li et al. (2011) wird auf einen Fall eines Patienten mit Zwangsstörung und Deletion des *SLC2A3*-Gens hingewiesen. Bei diesem Patienten wurden mit Magnetresonanztomographie in allen untersuchten Hirnregionen sehr niedrige Glukosekonzentrationen gemessen. Es ist daher denkbar, dass Alterationen in den wechselseitigen Beziehungen zwischen Glukosemetabolismus und glutamaterger Neurotransmission krankheitsrelevante Endophänotypen bedingen.

Bezüglich des dopaminergen Systems wurde eine signifikant positive Korrelation des Blutglukosespiegels mit Metaboliten von Dopamin und Noradrenalin im Liquor nachgewiesen (Umhau et al. 2003). Experimentell induzierte Läsionen in dopaminergen Kerngebieten führen zu Alterationen der Glukoseaufnahme in nachgeschalteten Zentren (Schwartz et al. 1976, Wooten und Collins 1981) und genetische Varianten in dopaminergen Genen können einen veränderten Glukosemetabolismus nach sich ziehen. So zeigen Träger eines bestimmten mit Alkohol- und Drogenmissbrauch assoziierten Polymorphismus im D2-Dopaminrezeptorgen eine verminderte Glukoseaufnahme in verschiedenen Hirnregionen (Noble et al. 1997). An

Ratten, die über mehrere Wochen an die regelmäßige orale Aufnahme von Glukose gewöhnt wurden, wurden veränderte Bindungseigenschaften von Dopaminrezeptoren (Colantuoni et al. 2001) sowie eine mit der Zuckeraufnahme verbundene verstärkte Dopaminfreisetzung im *Nucleus accumbens* (Rada et al. 2005) gefunden. Antipsychotika, die primär für ihre Bindung an D2-Dopaminrezeptoren bekannt sind, zeigen wiederum erhebliche Wechselwirkungen mit dem Glukosemetabolismus. So blockieren Fluphenazin, Chlorpromazin, Haloperidol und Clozapin in PC12-Zellen den Glukosetransport und erhöhen die GLUT3-Expression (Dwyer et al. 1999). Zudem ist das Risiko für krankenhauspflichtige Episoden von Hyperglykämien bei älteren Nicht-Diabetikern unter Antipsychotika-Einnahme höher (Lipscombe et al. 2011). Dass Psychostimulanzien, die die intersynaptische Verfügbarkeit von Dopamin erhöhen, zu Veränderungen des regionalen Glukosetransports und Glukosemetabolismus führen, konnte sowohl für Methylphenidat (Bell et al. 1983, Volkow et al. 1997) als auch für Methamphetamin (Huang et al. 1999, Muneer et al. 2011) und Kokain (London et al. 1990, Thanos et al. 2008) gezeigt werden.

#### 1.2.4.2 Glukosemetabolismus während der ZNS-Entwicklung

Beim Menschen unterliegt der zentrale Glukosemetabolismus bis zum frühen Erwachsenenalter quantitativen Schwankungen, die gut mit neurophysiologischen und anatomisch-funktionellen Änderungen korrelieren, durch die die kindliche ZNS-Entwicklung begleitet wird. Beim Neugeborenen findet sich die höchste rCMRGlc in phylogenetisch älteren Strukturen wie dem primär somatosensorischen Kortex, Thalamus, Hirnstamm und Kleinhirnwurm, während sie in kortikalen Arealen verhältnismäßig gering ist. Im Alter von 2 Jahren erreicht die initial relativ geringe Glukoseutilisation in kortikalen Arealen das Niveau von Erwachsenen, um danach auf das Doppelte anzusteigen und im zweiten Lebensjahrzehnt langsam wieder auf Erwachsenenwerte abzufallen (siehe Abb. 2c). Auch in allen anderen Hirnregionen ist der Glukoseverbrauch zwischen dem dritten und achten Lebensjahr höher als im Erwachsenenalter (Chugani et al. 1987). Die GLUT3-Expression im Kortex Erwachsener ist etwa 2-3 mal höher als bei Neugeborenen (Mantych et al. 1992).

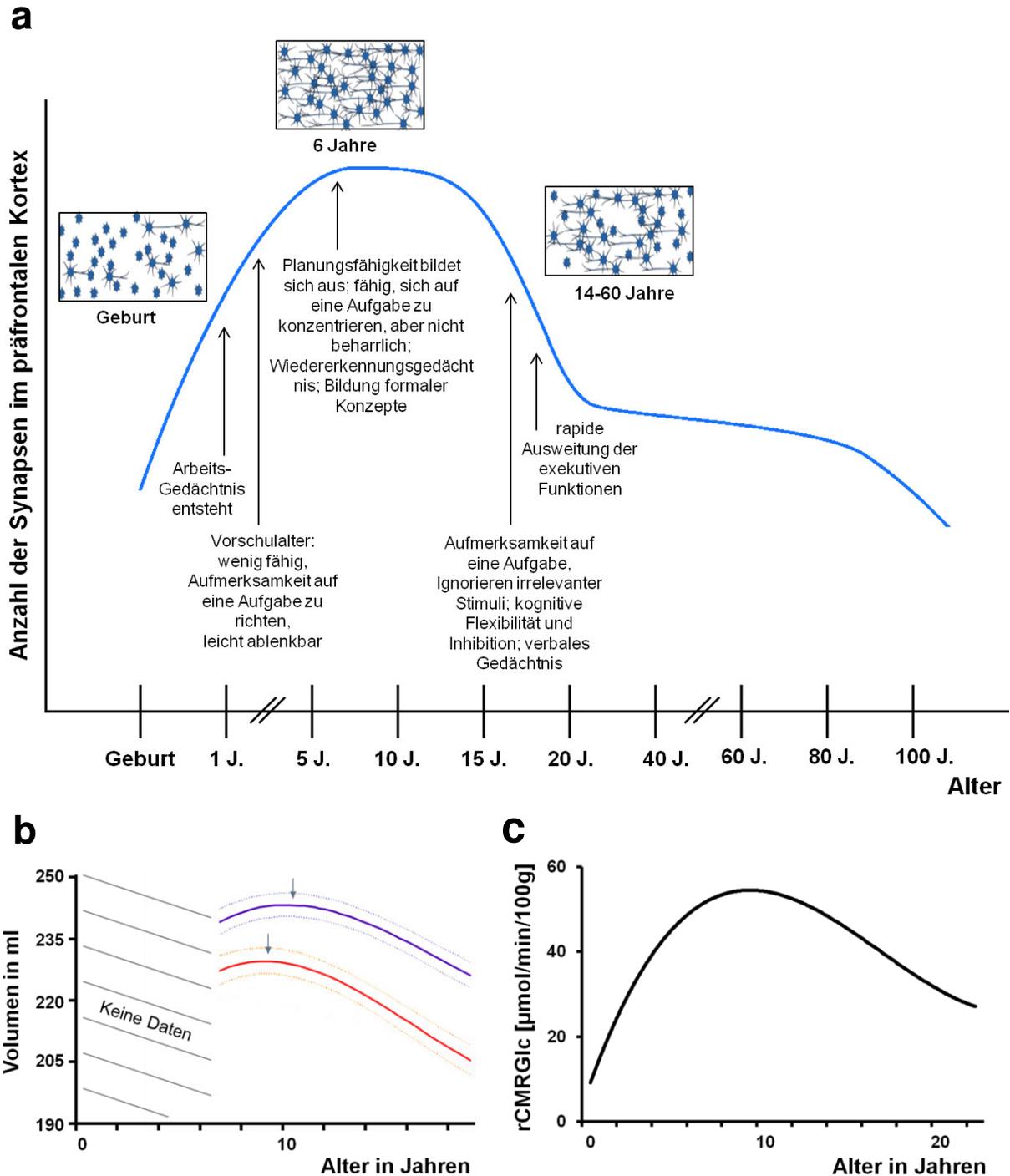
Auch bei der Ratte zeigen sich während der ZNS-Entwicklung dynamische Veränderungen der zerebralen Glukoseutilisation. Diese Veränderungen werden von Anpassungen der *SLC2A3*-mRNA- und Proteinexpression begleitet. Ein starker Anstieg der GLUT3-Proteinexpression wurde zwischen dem 14. und 21. Lebenstag beobachtet, einem Zeitraum, der mit Vorgängen der Synaptogenese (siehe Kap. 1.2.4.3) und neuronalen Reifung

zusammenfällt (Vannucci et al. 1998). Nicht nur die zeitliche Entwicklung, sondern auch die strukturelle Verteilung der *SLC2A3*-Expression folgt dabei regionalen Mustern der Glukoseutilisation (Bondy et al. 1992).

#### 1.2.4.3 Synaptogenese

GLUT3-Expressionsmuster während der ZNS-Entwicklung decken sich gut mit der Expression von Synaptophysin, einem Markerprotein für synaptische Übertragung (Thamotharan et al. 2013), was eine Bedeutung des neuronalen Glukosetransporters für die Synaptogenese nahelegt. Während der Entwicklung des Nervensystems kommt es zunächst zu einem exzessiven Aussprossen an Axonen, der sogenannten Arborisation, sowie einer Überproduktion an dendritischen Fortsätzen und Synapsen, die später zugunsten einer gezielteren Innervation wieder abgebaut werden. Damit die Synaptogenese geregelt verläuft, wird eine Vielzahl verschiedener Signalmoleküle benötigt, für deren Koordination wiederum aufwendige, energieabhängige Signalkaskaden zuständig sind. Anregende, adhäsive, induktive und destabilisierende Faktoren müssen derartig interagieren, dass Axone ihre Zieldendriten finden und die gebildeten Synapsen bei Bedarf auch wieder degradiert werden können. Obgleich ein Aussprossen von Axonen und der Aufbau neuer interneuronaler Schnittstellen theoretisch lebenslang möglich ist und beim Erwachsenen zu Lern- und Gedächtnisprozessen beitragen kann, finden diese Prozesse überwiegend in der embryonalen und frühen postnatalen Reifung statt (Waites et al. 2005).

Bemerkenswerterweise repräsentiert der Mechanismus der Axonaussprossung eine mögliche Endstrecke für ein ADHS-Kandidatengennetzwerk (Poelmans et al. 2011). Eine dysfunktionelle Synaptogenese kann daher möglicherweise zu veränderten Verbindungen im präfrontalen Kortex und frontostriatalen System und gestörten exekutiven Funktionen und damit zur Manifestation der ADHS führen. Parallel zu Synaptogenese und kortikaler Reifung entwickeln sich die exekutiven Funktionen. Nach dem 1. Lebensjahr bildet sich das Arbeitsgedächtnis allmählich aus, wohingegen die Anzahl der Neurone und synaptischen Verbindungen im präfrontalen Kortex rapide ansteigt. Während Kinder im Vorschulalter ihre Aufmerksamkeit nur schwer auf eine spezifische Aufgabe richten können, haben Grundschul Kinder die Fähigkeit, sich besser zu konzentrieren, und beginnen zu planen. Etwa ab dem 6. Lebensjahr werden überflüssige Synapsen konsekutiv wieder abgebaut. Fehler in diesem Prozess können die weitere Entwicklung exekutiver Funktionen behindern und so zur Ätiologie der ADHS beitragen (siehe Abb. 2a) (Stahl 2013).



**Abb. 2: Synaptogenese, strukturelle Entwicklung und Glukoseutilisation**

Diagramm a) veranschaulicht den Prozess der Synaptogenese im präfrontalen Kortex. Dargestellt sind neben der Entwicklung der Synapsenzahl wichtige Entwicklungsschritte der exekutiven Funktionen [adaptiert und modifiziert aus Stahl (2013)]. Diagramm b) zeigt die Volumenentwicklung frontaler grauer Substanz im Alter zwischen 7 und 19 Jahren bei Mädchen (rot) und Jungen (violett) [adaptiert und modifiziert aus (Rapoport und Gogtay 2008)]. Diagramm c) zeigt den Verlauf der Glukoseutilisation (rCMRGlc in  $\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{g}$ ) in frontaler grauer Substanz zwischen dem 1. und 22. Lebensjahr [Der Graph entspricht einer polynomischen Trendlinie 3. Ordnung der Daten von Chugani et al. (1987)]. Es fällt auf, dass sowohl Synaptogenese, als auch Volumenentwicklung und Glukosemetabolismus des frontalen Kortex einen umgekehrt u-förmigen Verlauf zeigen und dass das Maximum aller 3 Parameter zwischen dem 6. und 12. Lebensjahr liegt. Die Synaptogenese scheint daher mit Anpassungen im regionalen Glukosemetabolismus und strukturell morphologischen Veränderungen einherzugehen und repräsentiert zudem ein ADHS-Kandidatengennetzwerk.

#### 1.2.4.4 Strukturell-morphologische Gehirnentwicklung

Die postnatale strukturell-morphologische Reifung kortikaler Areale ist zunächst mit einer Zunahme und darauffolgend einer Wiederabnahme der Hirnrindendicke verbunden und zeigt damit einen ähnlichen Verlauf wie die Vorgänge der Synaptogenese und synaptischen Degeneration, als deren makroskopisches Korrelat sie von manchen Autoren interpretiert wird (Jiang et al. 2009, Tau und Peterson 2010). Sie vollzieht sich zunächst in entwicklungsgeschichtlich älteren Strukturen primär sensorischer Areale und später in Arealen des Assoziationskortex, die höhere integrative Funktionen innehaben (Giedd 2004, Gogtay et al. 2004, Rapoport und Gogtay 2008). Die Ergebnisse von Chugani et al. (1987) (siehe oben), die für die rCMRGlc während der kindlichen Entwicklung ebenfalls einen umgekehrt U-förmigen Verlauf sowie eine Entwicklung der rCMRGlc in einer phylogenetischen Reihenfolge nahelegen, weisen darauf hin, dass die dynamischen Prozesse der kortikalen Reifung durch eine Anpassung der regionalen Glukoseutilisation begleitet werden (siehe Abb. 2c). Da die kortikale Reifung bei Kindern mit ADHS insbesondere in präfrontalen Arealen verzögert zu sein scheint (siehe Kap. 1.1.5.2), ist die regionale Glukoseversorgung des Gehirns möglicherweise ein kritischer Faktor für die ADHS-Entstehung. Zametkin et al. (1990) stellten in einer PET-Studie eine global verminderte rCMRGlc mit Betonung des präfrontalen und prämotorischen Kortex bei Erwachsenen mit ADHS fest. Dieses Ergebnis konnte von der gleichen Arbeitsgruppe in einer Studie mit niedrigerer Teststärke bei Jugendlichen mit ADHS teilweise repliziert werden (Zametkin et al. 1993).

#### 1.2.5 Die Bedeutung von Glukosetransportern für die Hungerregulation

Am Beispiel des *SLC2A2*-Gens konnte gezeigt werden, dass genetische Varianten in Glukosetransporter-Genen einen Einfluss auf die Höhe des Kohlenhydrat-Konsums haben können (Eny et al. 2008), was nahelegt, dass Glukosetransporter eine wichtige Rolle für die zentrale Steuerung der Nahrungsaufnahme spielen. Bereits vor über 60 Jahren postulierte Mayer (1953) die Existenz von „hypothalamischen Glukorezeptoren“, deren elektrische Aktivität von Schwankungen der Glukosekonzentration abhängig sei und kam damit der Entdeckung Glukose-detektierender Zellen im Hypothalamus durch Anand et al. (1964) und Oomura et al. (1964) 11 Jahre zuvor. Tatsächlich sind an der zentralen Glukosehomöostase und Hungerregulation glukosesensitive Neuronen verschiedener hypothalamischer Kerngebiete beteiligt, deren elektrische Aktivität von der Glukosekonzentration abhängt. Dementsprechend fungieren diese Neuronen als Glukosesensoren, können ihre Aktivität aber auch an andere

metabolische und hormonelle Faktoren anpassen. Als Beispiele für glukosesensitive Neuronen, die gleichzeitig auf weitere Eingangssignale reagieren, können die anabolen NPY-Neurone und die katabolen POMC-Neurone des Nucleus arcuatus dienen (Levin et al. 2004). In einem vereinfachten dualen Modell der Hungerregulation wird das Kerngebiet des ventromedialen Hypothalamus als Sättigungszentrum und der laterale Hypothalamus als Hungerzentrum angesehen (Elmquist et al. 1999). GLUT3 ist der vorwiegend exprimierte Glukosetransporter sowohl im ventromedialen als auch im lateralen Hypothalamus (Yu et al. 1995, Kang et al. 2004) und ist daher wahrscheinlich maßgeblich an den molekularen Mechanismen beteiligt, die dem neuronalen Glukosesensing und der Hungerregulation zugrundeliegen (Levin et al. 2004). Daher ist es denkbar, dass Varianten des *SLC2A3*-Gens ähnlich wie es bereits für eine Variante des *NPY*-Gens beschrieben wurde (Lesch et al. 2011), eine Bedeutung für den Zusammenhang zwischen ADHS und Übergewicht zukommt.

Neben homöostatischen Faktoren spielen bei der Nahrungsaufnahme emotionale Aspekte eine große Rolle. Essen wird, insbesondere wenn es im Überfluss vorhanden ist, nicht alleine zur notwendigen Auffüllung metabolischer Ressourcen eingesetzt, sondern kann auch als Belohnungsstimulus der Emotionsregulation dienen. Bei der Steuerung der Nahrungsaufnahme über das dopaminerge Belohnungssystem spielt der zentrale Glukosemetabolismus wahrscheinlich eine bedeutende Rolle. Dabei spielt hirnpfysiologisch das mesolimbische Dopaminsystem eine große Rolle, das wiederum mit dem hypothalamischen Hungerzentrum verschaltet ist. Daher ist eine klare Unterscheidung der beiden Mechanismen nicht möglich (Berthoud 2011). Im nüchternen Zustand zeigt sowohl das ventrale Tegmentum als Taktgeber des mesolimbischen Dopaminsystems als auch der Hypothalamus bei visueller Präsentation hochkalorischer Stimuli eine niedrigere Aktivierung als bei niedrigkalorischen Stimuli, was sich nach intravenöser Infusion einer Glukoselösung umkehrt (Ulrich et al. 2016).

### **1.2.6 Der Einfluss von Glukose auf die Emotionsverarbeitung**

Es liegen bisher keine Studien vor, in denen ein Zusammenhang zwischen Varianten des *SLC2A3*-Gens und der Fähigkeit zur Emotionswahrnehmung und Emotionsregulation bzw. der Reaktion auf emotionale Reize untersucht wurde. Es wurde aber ein neurales Korrelat zum Einfluss des Blutzuckerspiegels auf die Emotionsverarbeitung gefunden: In einer fMRT-Studie konnte gezeigt werden, dass der Hypothalamus unter hyperglykämischen Bedingungen seine Reaktivität auf emotionale Stimuli verliert (Schöpf et al. 2013), was darauf hindeuten könnte,

dass hypothalamische Neuronen mit Glukosesensitivität nicht nur für die Glukosehomöostase und Hungerregulation sondern auch für die Emotionsverarbeitung bedeutsam sind.

### 1.3 Fragestellung und Arbeitshypothesen

ADHS ist eine stark erblich bedingte Störung, deren Ursache in einer abnormalen Entwicklung des ZNS liegt. Vor dem Hintergrund der ausgeprägten klinischen und ätiologischen Heterogenität mit komplexer Genetik erscheint es sinnvoll, sich auf die Exploration verschiedener ADHS-assoziiierter Endophänotypen zu konzentrieren, die reduktionistische Korrelate der Störung repräsentieren. Ein solcher Endophänotyp mag aus Genvarianten entspringen, die einen Einfluss auf die neuronale Energieversorgung haben, da der Glukosemetabolismus insbesondere während der Entwicklung des ZNS ein kritischer Parameter für synaptische Plastizität und Synaptogenese (siehe Kap. 1.2.4.3) zu sein scheint und mit dem monoaminergen und glutamatergen System interagiert (siehe Kap. 1.2.4.1). Für einige ADHS-Kandidatengene ist zudem eine Wechselwirkung mit dem Glukosestoffwechsel anzunehmen. Darunter *SNAP25* und *CDH13*, die eine wichtige Rolle bei der Insulinsekretion spielen (Sadoul et al. 1995, Zhuang et al. 2009, Tyrberg et al. 2011), *PARK2*, dessen Expression Einfluss auf Glykolyse und mitochondriale Atmungskette nimmt (Zhang et al. 2011) und *NOS1*, das im glutamatergen System mit *SLC2A3* interagiert (Ferreira et al. 2011). Die Duplikation des neuronalen Glukosetransporters-Gens *SLC2A3* zeigte eine Assoziation mit ADHS (Merker et al. 2017). Da *SLC2A3* eine wichtige Rolle für die zerebrale Energieversorgung sowie insbesondere für axonalen Transport und neuronale Signalübertragung (siehe Kap. 1.2.3.1) zu spielen scheint, beides mögliche Endpunkte von ADHS-Kandidatengennetzwerken, soll die funktionelle Untersuchung der *SLC2A3*-Genduplikation einen Beitrag zur Frage leisten, wie neurometabolische Faktoren die Pathogenese der ADHS beeinflussen können.

Es soll untersucht werden, ob und wie die Duplikation des *SLC2A3*-Gens die Expression des neuronalen Glukosetransporters GLUT3 beeinflusst. Die molekularbiologischen Analysen sollen an zwei Zellmodellen durchgeführt werden, die eine stabile *SLC2A3*-Expression zeigen und einfach zu gewinnen sind. Dazu werden Eppstein-Barr-Virus (EBV) transformierte lymphoblastoide Zelllinien (EBV-LCLs) sowie native, nicht mit EBV behandelte mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) verwendet.

Mittels funktioneller Bildgebung (fMRT) sollen zudem Aktivierungsmuster in ADHS-relevanten Netzwerken zwischen den Probandengruppen verglichen werden.

Es werden folgende Arbeitshypothesen aufgestellt:

- 1) Die Duplikation des *SLC2A3*-Gens führt auf mRNA- und Proteinebene zu einer Gen-Dosis-abhängigen Expressionssteigerung, sowohl bezüglich basaler als auch stimulierter *SLC2A3*-Genexpression.
  
- 2) *SLC2A3*-Duplikationsträger können von Kontrollprobanden durch funktionelle Bildgebung unterschieden werden. In spezifischen Gehirnarealen zeigt sich dabei ein messbar veränderter BOLD-Effekt als Antwort auf verschiedene visuelle Reize.
  - a) Im Vergleich zu ADHS-Patienten und gesunden Kontrollprobanden ohne *SLC2A3*-Duplikation zeigt sich bei ADHS-Patienten mit *SLC2A3*-Duplikation eine alterierte neurale Aktivität als Antwort auf emotionale Stimuli in Hirnarealen, die an Prozessen der Emotionsverarbeitung beteiligt sind.
  
  - b) Die Präsentation von visuellen Belohnungsreizen in Form von Essensbildern führt bei *SLC2A3*-Duplikationsträgern im Vergleich zu Kontrollprobanden zu signifikanten Unterschieden im BOLD-Kontrast in Belohnungsarealen des mesolimbischen Dopaminsystems und/oder Arealen, die wichtig für die zentrale Hungerregulation sind.

## 2 Probanden, Material und Methoden

### 2.1 Molekularbiologische Untersuchungen

#### 2.1.1 Probanden

EBV-transformierte lymphoblastoide Zelllinien (EBV-LCLs), gewonnen aus einem randomisierten Probandenkollektiv ohne bekannte psychiatrische Vorerkrankungen, wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Clemens Müller-Reible (Institut für Humangenetik, Würzburg) bereitgestellt. Darunter waren 15 *SLC2A3*-Kontroll- und 6 *SLC2A3*-Duplikationskulturen. Weitere EBV-LCLs mit *SLC2A3*-Duplikation wurden von Patienten der Psychiatrischen Klinik, Würzburg gewonnen (darunter 8 Patienten mit ADHS und 2 mit bipolar affektiver Störung). Die entsprechenden Daten wurden zusammengefasst, da der diagnostische Status der Probanden keinen Einfluss auf die Ergebnisse der *SLC2A3*-Expressionsuntersuchungen hatte.

Daneben wurden native mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) von *SLC2A3*-Duplikationsträgern sowie Kontrollprobanden mit 2 *SLC2A3*-Genkopien gewonnen. Die Duplikationsträger wurden aus ADHS-Patienten der klinischen Forschergruppe KFO125 rekrutiert, während die Kontrollgruppe aus 10 gesunden Probanden und 4 ADHS-Patienten bestand. Auch hier wurden die Daten der Kontrollgruppe gepoolt, da der diagnostische Status keinen Einfluss auf die *SLC2A3*-Expression hatte. Alle Probanden gaben nach schriftlicher und mündlicher Aufklärung ihr Einverständnis in die Untersuchung.

#### 2.1.2 Genotypisierung mittels TaqMan CNV-Assay

Zur Genotypisierung bezüglich der *SLC2A3*-Kopienzahl wurden jeweils zwei 9 ml EDTA-Röhrchen venöses Blut entnommen und daraus DNA mit der Methode nach Miller et al. (1988) isoliert. Jeweils 10 ng DNA dienten als Matrize in einer TaqMan Real-Time-PCR-Reaktion. Der Assay ist als Duplex-PCR konzipiert, bei der zwei Produkte gleichzeitig amplifiziert werden. Der Primer des von der Firma Applied Biosystems entwickelten Copy-Number-Assays (Hs0440005\_cn) bindet im Bereich des sechsten Introns von humanem *SLC2A3* und führt zur Amplifikation eines 98 bp langen Amplikons. Neben dem für das *SLC2A3*-Gen spezifischen Primer enthält der Ansatz einen zweiten Primer zur Amplifikation des Referenzgenes *RNAse P*, das beim Menschen stets in 2 Kopien vorliegt. Bei der TaqMan-PCR handelt es sich um eine Anwendung der Echtzeit-PCR, die eine hohe Spezifität für das zu amplifizierende Zielgen

besitzt. Wie alle Real-Time-PCR-Verfahren beruht die TaqMan-PCR auf der Möglichkeit der Template-Quantifizierung durch Messung eines Fluoreszenzsignals während der exponentiellen Amplifikationsphase. Neben spezifischen Vorwärts- und Rückwärtsprimern sind im Reaktionsansatz spezifische Sonden enthalten, die während der Annealing-Phase mit einem Abschnitt der zu amplifizierenden Matrize hybridisieren. Während an das 5'-Ende der Sonden ein Reporter-Fluorophor kovalent gebunden ist, trägt das 3'-Ende einen sogenannten Quencher, durch welchen bei intakter Sonde die Fluoreszenz des Reporters durch FRET unterdrückt wird. Durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase wird während der Elongationsphase das 5'-Ende der Sonde abgebaut, so dass es zu einem messbaren Anstieg von Fluoreszenz kommt, da durch die räumliche Distanz die Fluoreszenz des Reporters nun nicht mehr durch den Quencher unterdrückt werden kann. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden „FAM“ (für die *SLC2A3*-Sonde) und „VIC“ (für die *RNase P*-Sonde) verwendet.

Der Reaktionsansatz wurde gemäß Tab. 2 pipettiert. Die Messung erfolgte mit einem CFX384-Real-Time-Gerät (Biorad). Auf einen initialen 10-minütigen Schritt zur Aktivierung der AmpliTaqGold-Polymerase bei 95°C folgten 40 Zyklen bestehend aus jeweils 15 Sekunden Denaturierung bei 95°C und 60 Sekunden Annealing und Elongation bei 60°C. Jede Messung wurde in Triplikaten ausgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der CopyCaller®-Software (Version 1.0, Applied-Biosystems). Ergebnisse, die eine *SLC2A3*-Kopienzahl ungleich 2 anzeigten, wurden repliziert.

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen</b>
2 X TaqMan Genotyping Master Mix	5 µl
TaqMan Copy number" assay ( <i>SLC2A3</i> )	3 µl
"TaqMan Copy number" Referenz ( <i>RNase P</i> )	0,5 µl
Nuklease-freies Wasser	0,5 µl
gDNA (10 ng/µl)	1 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>10 µl</b>

**Tab. 2: Reaktionsansatz für den TaqMan-Genotypisierungs Assay**

### 2.1.3 Zellkulturarbeiten

#### 2.1.3.1 PBMC-Isolation

Probanden wurden jeweils sechs 9 ml EDTA-Monovetten peripher venösen Blutes durch Punktion einer Kubitalvene abgenommen. Die Weiterverarbeitung des Blutes erfolgte unmittelbar nach Entnahme in einem S2-Zellkulturlabor unter der Sicherheitswerkbank. Zur Isolierung von PBMCs wurde eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (Noble und Cutts

1967) durchgeführt. In 15 ml Ficoll-Trennscheiben-Tubes (Greiner Bio One) wurden 3 ml Ficoll-Paque (GE-Healthcare) vorgelegt. Das Blut wurde 1:2 mit PBS (Gibco) vermischt und 8 ml des Blut-PBS-Gemisches vorsichtig auf die Trennscheibe geschichtet. Zur Trennung der PBMCs von Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten und Blutplasma folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 165 g ohne Bremse. Der PBMC-Ring wurde anschließend abpipettiert und in 20 ml PBS resuspendiert. Es folgten 3 Waschschrte des Pellets in 20 ml PBS (jeweils 10 Minuten, 165 g), um mögliche Kontaminationen durch Ficoll-Reste, Plasmabestandteile und Thrombozyten zu entfernen. Nach dem letzten Waschschrte wurde das Zellpellet in 6 ml PBS resuspendiert. 10 µl der Suspension wurden mit 90 µl 0,2 % Trypanblau gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer oder mit Hilfe des automatisierten Cellometer™ Auto T4 Cell Counters (Nexcelom Bioscience) gezählt. Für die weitere Verarbeitung wurden durch erneute Zentrifugation eines Zellsuspension-Volumens definierter Zellkonzentration (5 Minuten, 165 g) Pellets mit gewünschter Zellzahl gewonnen.

#### 2.1.3.2 Herstellung, Kultivierung und Lagerung von EBV-LCLs

EBV führt zur Transformation von B-Lymphozyten durch Induktion eines Zellzyklusverlustes. Die mittels EBV immortalisierten Lymphoblasten zeichnen sich durch eine theoretisch unbegrenzte Proliferation und leichte Kultivierbarkeit aus. Zur Transformation der Lymphozyten wurde der steril-filtrierte EBV-reiche Mediumsüberstand einer lymphoblastoiden Krallenaffenzelllinie (B95-8) verwendet (Caputo 1991). Im Anschluss an die PBMC-Isolation wurden pro Individuum jeweils 2 Pellets à  $5 \times 10^6$  Zellen in 1 ml Kulturmedium bestehend aus RPMI-1640 (Invitrogen), 15 % FBS (Invitrogen), 1 % L-Glutamin (Invitrogen), sowie 0,1 % Gentamicin resuspendiert, 0,5 ml EBV-haltigen Affenepithelzellüberstandes hinzugegeben und der Ansatz anschließend in einem 15 ml Falcon-Röhrchen im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Nach 24 Stunden wurde der virushaltige Überstand komplett abpipettiert und durch reines Kulturmedium ersetzt.

Alle drei Tage wurde ein Teil des alten Mediums gegen frisches Medium ausgetauscht. Die erste Passage der Zellen in eine 25 ml Zellkulturflasche für Suspensionszellen (Sarstedt) erfolgte, sobald klare Zeichen der Proliferation sichtbar wurden. Dazu gehören ein wachsendes Pellet, sowie der immer schneller auftretende Farbumschlag des im Kulturmedium enthaltenen pH-Indikators Phenolrot von rot nach gelb. Sobald sich in der 25 ml Zellkulturflasche ein stabiles Wachstum zeigte, wurden die Zellen in eine größere 75 ml Kulturflasche (Sarstedt) überführt und anschließend bis zum Erreichen der nötigen Endkonzentration kultiviert und

passagiert. Der Mediumsüberstand der kultivierten EBV-LCLs wurde routinemäßig nach jeder zehnten Passage per PCR auf Kontaminationen durch Mykoplasmen-Spezies untersucht. Zur Lagerung von EBV-LCLs und nativen PBMCs wurden von jeder Zelllinie jeweils drei Kryostocks angelegt. Hierzu wurden die Zellen pelletiert und mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in Einfriermedium (RPMI-1640-Medium versetzt mit 10 % FBS, sowie 10 % DMSO, das Einfriermedium für native PBMCs aus FBS und 10 % DMSO) resuspendiert, in ein 1 ml Kryoröhrchen (Sarstedt) überführt und in einem Stickstofftank gelagert. Zur Rekultivierung von EBV-LCLs wurden die Zellen bei 37 °C im Brutschrank aufgetaut, in PBS durch Zentrifugation (5 Minuten, 165 g) pelletiert und schließlich in Kulturmedium resuspendiert.

#### 2.1.3.3 Aussaat zur Messung der basalen *SLC2A3*-Expression

Zur Messung der basalen *SLC2A3-Expression* wurden EBV-LCLs in 75 ml Zellkulturflaschen solange kultiviert bis eine Konzentration von 0,5 - 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml erreicht war. Zur Gewinnung von RNA und Proteinlysaten wurden die Zellen 48 Stunden nach der vorausgegangenen Fütterung geerntet.

#### 2.1.3.4 Stimulationsversuche

Für alle Stimulationsversuche wurden EBV-LCLs in Gewebekulturplatten mit 24 Nöpfchen (Sarstedt) ausgesät. Die verschiedenen Zelllinien wurden in gleicher Konzentration über den gleichen Zeitraum kultiviert. Bei der Zellernte wurden Zellen mit RNAprotect<sup>®</sup> Cell Reagent (Qiagen) bei -20°C für die spätere RNA-Extraktion eingefroren und Proteinlysate frisch hergestellt. Glukose-Lösung (45 %) wurde von Sigma-Aldrich erworben.

Um die *SLC2A3*-Expression im zeitlichen Verlauf der Kultivierung von EBV-LCLs und einen möglichen Effekt metabolischer Ressourcenknappheit auf die *SLC2A3*-Expression zu beurteilen, wurden je vier Duplikations- und Kontrollkulturen mit einer Dichte von 2,5 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml in Quadruplikaten ausgesät und sechs Tage lang kultiviert. Alle 24 Stunden wurden Zellen für RNA-Extraktion und Herstellung von Proteinlysaten geerntet. Jeweils zum Zeitpunkt der Zellernte erfolgte eine Zellzählung und Bestimmung der Viabilität mit Hilfe des Cellometer<sup>™</sup> Auto T4 Cell Counters. Um die Zellen auszuhungern, erfolgten nach der Aussaat während des sechstägigen Versuches keine Fütterungen. Mediumsüberstände wurden bei -20°C zur späteren Analyse der Glukosekonzentration eingefroren.

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Glukosekonzentrationen auf die *SLC2A3*-Expression in EBV-LCLs wurden von vier Kontroll- und Duplikationskulturen jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen in 2 ml Medium in Quadruplikaten ausgesät. Als Medien wurden ein normoglykämisches- (RPMI, 15 % FBS, 110 mg/dl = 6,1 mM Glukose), ein Glukose-armes- (RPMI, 15 % FBS, 27,5 mg/dl = 1,5 mM Glukose), sowie ein hyperglykämisches Medium (RPMI, 15 % FBS, 220 mg/dl = 12,2 mM Glukose) verwendet. 48 Stunden nach Beginn der Inkubation (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) erfolgte die Ernte der EBV-LCLs.

## 2.1.4 Methoden zur Quantifizierung der Genexpression

### 2.1.4.1 RNA-Extraktion

EBV-LCLs bzw. PBMCs wurden pelletiert (10 Minuten, 165 g), das Zellpellet in 6 ml PBS gewaschen und die absolute Zellzahl durch Zählung im Cellometer™ Auto T4 Cell Counter bestimmt. Nach erneuter Zentrifugation (10 Minuten, 165 g) wurden die gewonnenen Zellpellets in 500 µl des TTAOx-haltigen RNAProtect® Cell Reagent (Qiagen) resuspendiert und bis zur RNA-Extraktion bei -20 °C eingefroren. Durch Experimente mit Konzentrationsreihen konnte für EBV-LCLs und PBMCs je eine Zellzahl festgelegt werden, die stets einen Ertrag zwischen 100 und 500 ng/µl RNA erbrachte. Von EBV-LCLs wurden jeweils  $1-1,5 \times 10^6$ , von PBMCs jeweils  $3,5-4 \times 10^6$  Zellen für die RNA-Extraktion verwendet.

Zur Gewinnung von RNA wurde das RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen) und das vom Hersteller empfohlene Protokoll unter leichter Modifikation verwendet. Es handelt es sich um ein säulenbasiertes Aufreinigungsverfahren. Isolieren lassen sich damit alle RNA-Moleküle, die eine Größe von 200 bp überschreiten, wodurch kleinere RNA-Moleküle, wie z.B. 5S-, 5.8S-rRNA oder tRNA ausgeschlossen werden. Zunächst werden die Zellen zur Inhibition von RNasen in einem das chaotrope Salz Guanidinthiocyanat- sowie β-Mercaptoethanol enthaltenden Puffer homogenisiert und das gewonnene Lysat zur Elimination genomischer DNA durch eine spezielle Spinsäule zentrifugiert. Zur Erhöhung der RNA-Bindekapazität wird das Lysat mit 70-prozentigem Ethanol verdünnt und die enthaltene RNA an die Silikagelmembran einer RNeasy® Spinsäule gebunden. Nach mehreren Waschschrinen wird die immobilisierte RNA in RNase-freiem Wasser eluiert.

Die mit RNAProtect® Cell Reagent eingefrorenen Zellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, pelletiert (5 Minuten, 5000 g) und der Überstand verworfen. Zur Lyse der Proben, sowie zur Inaktivierung zellulärer RNasen wurden 350 µl des Guanidinthiocyanat- haltigen und

mit 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzten RLT-Plus-Puffers addiert. Das Hinzufügen einer sterilen Metallkugel und anschließendes Schütteln der Proben (30 Sekunden, 20 Hz) in einem TissueLyser (Qiagen) führte zur kompletten Homogenisierung der Lysate. Das gewonnene Homogenat wurde zur Entfernung genomischer DNA anschließend durch eine gDNA-Eliminations-Spinsäule zentrifugiert (30 Sekunden, 8000 g) und der Durchfluss 1:2 mit 70-prozentigem Ethanol (Sigma-Aldrich) verdünnt, um eine optimale Bindekapazität der RNA zu schaffen. Das verdünnte Homogenat wurde durch die Silikagelmembran der RNeasy® Spinsäule zentrifugiert (15 Sekunden, 8000 g) und der in einem 2 ml Sammel-Tube gesammelte Durchfluss verworfen. Es folgten mehrere Waschstschritte, einmal mit 700  $\mu$ l RW1-Puffer (15 Sekunden, 8000 g) sowie zweimal mit je 500  $\mu$ l RPE-Puffer (zunächst 15 Sekunden, dann 2 Minuten bei 8000 g). Beim RW1-Puffer handelt es sich um einen Waschpuffer zur Entfernung von Kohlenhydraten, Proteinen und Fettsäuren. Durch den RPE-Puffer werden Salze eliminiert. Im Anschluss wurde das 2 ml Sammel-Tube gewechselt und die Spinsäule zur Trocknung der Membran und vollständigen Entfernung von möglicherweise vorhandenen Ethanolrückständen 2 Minuten bei 14000 g zentrifugiert. Die Elution (1 Minute, 8000 g) der RNA erfolgte durch Zugabe von 50  $\mu$ l RNase-freien Wassers direkt auf die Silikagelmembran. Das Eluat wurde in einem frischen 1,5 ml Sammel-Tube (Eppendorf) aufgefangen und sofort auf Eis gelagert. Anschließend wurden die RNA-Proben mittels Agarosegelelektrophorese beurteilt und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 2.1.4.2 Bestimmung von RNA-Konzentration- und Reinheit

Konzentration und Reinheit der RNA-Proben wurden mit einem NanoDrop 1000 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Das Nanodrop-System besteht aus zwei fiberoptischen Kabeln, die als Sender- bzw. Empfängerkabel fungieren. Auf das Endstück des Empfängerkabels pipettiert man 1  $\mu$ l RNA-Probe und schließt den Kontakt, indem man den Pol des Senderkabels ebenfalls mit der Probe in Kontakt bringt. Als Lichtquelle fungiert ein UV-Licht erzeugender pulsierender Xenon-Blitz, dessen Intensität sich Wellenlängen-abhängig durch die zu analysierende Probe abschwächt. Ein CCD-Sensor misst die Intensität des transmittierten UV-Lichtes. Vor Analyse der RNA-Proben muss eine Nullmessung unter Verwendung von RNase-freiem Wasser durchgeführt werden. Die Absorption der Probe errechnet sich aus dem dekadischen Logarithmus des Quotienten aus Wellenlängen-abhängiger Intensität von einstrahlendem und durch die Probe transmittiertem Licht, wobei die bei der Nullmessung auftretende Absorption von der Absorption der RNA-Probe subtrahiert wird.

$$A_\lambda = \log(I_0/I_1)$$

$A_\lambda$ : Wellenlängen-abhängige Absorption  
 $I_0$ : Intensität des einstrahlenden Lichtes  
 $I_1$ : Intensität des transmittierten Lichtes

Da das Absorptionsmaximum von RNA bei 260 nm liegt, ist die zu bestimmende RNA-Konzentration direkt proportional zur Absorptionsstärke der Probe bei 260 nm und errechnet sich aus dem Quotienten der Absorptionsstärke bei 260 nm und dem Produkt aus RNA-spezifischem Extinktionskoeffizienten und optischer Weglänge:

$$c = A_{260}/(\epsilon \cdot l)$$

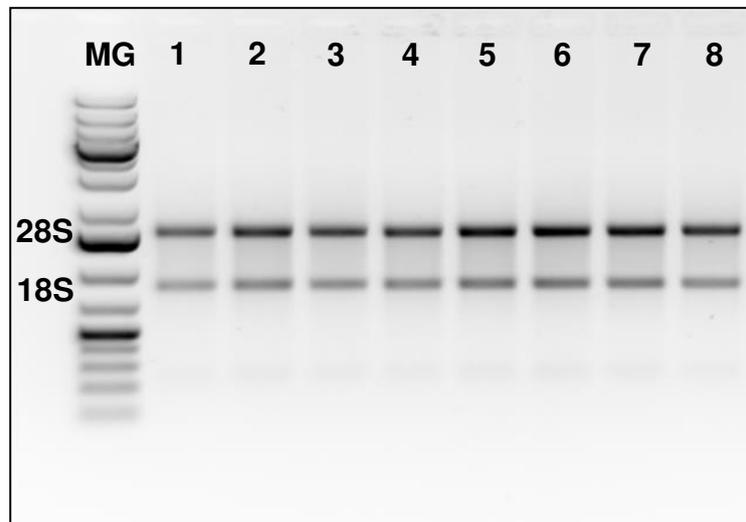
$c$ : RNA-Konzentration [ng/μl]  
 $A_{260}$ : Absorption bei 260 nm [au]  
 $\epsilon$ : Wellenlängen-abhängiger Extinktionskoeffizient  
 für RNA:  $40 \text{ (ng/}\mu\text{l)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$   
 $l$ : optische Weglänge [cm]: Abstand zwischen Sender- und Empfängerkebel: 0,1 cm

Für die Bestimmung der Reinheit von RNA-Proben wird die Absorptionsstärke bei 260 nm in Relation gesetzt zur Absorption bei 280 bzw. 230 nm. Reine RNA weist  $A_{260/280}$ -Quotienten von 2,0 auf. Kleinere Werte zeigen eine Kontamination mit Proteinen an, für deren Absorptionsmaximum bei 280 nm vor allem die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin verantwortlich sind. Der  $A_{260/230}$ -Werte sollte zwischen 1,8 und 2,2 liegen. Abweichende Werte können auf eine Verunreinigung mit Lösungsmitteln hinweisen, die bei der RNA-Extraktion zum Einsatz kamen.

#### 2.1.4.3 RNA-Qualitätskontrollen

Zur Bewertung der RNA-Integrität und zum Ausschluss von Kontaminationen mit genomischer DNA wurden alle RNA-Proben auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch separiert. Da mRNA nur einen Anteil von 1-3 % der Gesamt-RNA ausmacht, ist eine unmittelbare visuelle Beurteilung der mRNA nicht ohne weiteres möglich. Stattdessen erfolgt die qualitative Bewertung anhand der rRNA. Intakte RNA-Proben zeigen eine deutliche 28S- und 18S-Bande, die die beiden größten ribosomalen Untereinheiten repräsentieren. Man geht davon aus, dass Proben, deren 28S- und 18S-Banden keine Degradationszeichen aufweisen, eine intakte mRNA haben. Das Intensitätsverhältnis zwischen 28S und 18S-Bande (28S/18S) beträgt bei eukaryoter RNA 2:1. Wesentlich kleinere Werte sowie ein deutlicher „Schmier“ zwischen 28S- und 18S-Bande können eine Degradation anzeigen, Kontaminationen durch gDNA zeigen sich durch ein hochmolekulares Signal oberhalb der 28S-Bande. Proben, zusammengesetzt aus je 2 μl RNA,

2,5 µl 6X DNA-Ladepuffer (Fermentas) und 10,5 µl RNase-freiem Wasser sowie ein 1 kb Molekulargewichtsmarker (Fermentas) wurden auf ein 1 % Agarosegel (100 ml TAE-Puffer; 1,0 g Biozym LE Agarose, 3 µl Ethidiumbromid) aufgetragen und über eine Stunde bei 105 V aufgetrennt (siehe Abb. 3).



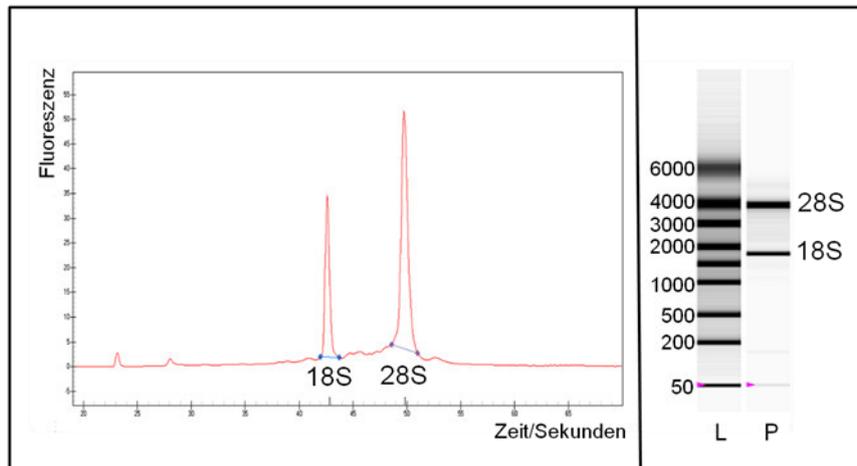
**Abb. 3: Invertiertes Bild von rRNA-Banden im 1 % Agarosegel**

Dargestellt sind ein Molekulargewichtsmarker und 8 verschiedene RNA-Proben gewonnen aus EBV-LCLs (1-8). In sauberen RNA-Proben ist eine deutliche 28S- und 18S-Bande zu erkennen. Die Intensität der 28S-Bande sollte in intakten, nicht-degradierten Proben aus eukaryoten Spezies doppelt so groß sein wie die der 18S-Bande (28S/18S-Quotient = 2).

Für eine objektivere qualitative Beurteilung der RNA-Proben wurde zusätzlich eine automatisierte Kapillargelelektrophorese mit dem Experion™-System (Bio-Rad) durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein Mikrochip-Verfahren, das, sensitiver als die herkömmliche Agarosegelelektrophorese, eine automatisierte Auswertung erlaubt. Neben genau berechneten Werten für das 28S/18S-Verhältnis erhält man einen RNA-Qualitätsindex, den sogenannten RQI, der Aufschluss über die Intaktheit bzw. Degradationsgrad der RNA gibt. Ein RQI-Wert von 10,0 entspricht dabei vollständig intakter RNA, während ein RQI-Wert von 1,0 eine komplett degradierte RNA repräsentiert. Für cDNA-Synthese und anschließende qRT-PCR-Experimente wurden ausschließlich RNA-Proben mit einem RQI > 7,0 verwendet.

Vor Analyse wurden die RNA-Proben sowie eine RNA-Leiter für 2 Minuten bei 70°C denaturiert, um Sekundärstrukturen aufzubrechen. Auf jedem Mikrochip befinden sich 12 Nöpfchen, in die jeweils 1 µl der zu analysierenden RNA-Probe sowie 5 µl Ladepuffer pipettiert werden. Dabei wird die RNA durch eine Fluoreszenzsonde markiert. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wandert die RNA anodenwärts und die Intensität des Fluoreszenzsignals

wird am Ende der durchlaufenen Mikrokapillare durch eine Photodiode gemessen. Kleinere Moleküle wandern schneller und passieren die Photodiode dementsprechend früher. Die Experion™-Software zeichnet für jede Probe die Fluoreszenzintensität gegen die Zeit auf. Aus den Daten des Elektropherogramms wird durch die Software schließlich ein virtuelles Gelbild kreiert (siehe Abb. 4).



**Abb. 4: RNA Qualitätsbestimmung mit der Experion-Software**

Abgebildet ist ein typisches Elektropherogramm (A), und ein daraus rekonstruiertes virtuelles Gelbild (B) mit Leiter (L) und analysierter Probe (P) für eine RNA-Probe mit einem RQI-Wert von 9,9 und einem 28S/18S-Verhältnis von 1,92. Das 28S/18S-Verhältnis errechnet sich aus dem Quotienten der Basislängen des 28S- und 18S-Peaks. Die etwa 4000 Basen lange 28S-rRNA durchläuft die Mikrokapillare des Elektrophoresechips langsamer als die etwa 1900 Basen lange 18S-rRNA. Dadurch erscheint der 28S-Peak im Elektropherogramm zeitlich später als der 18S-Peak.

#### 2.1.4.4 cDNA-Synthese

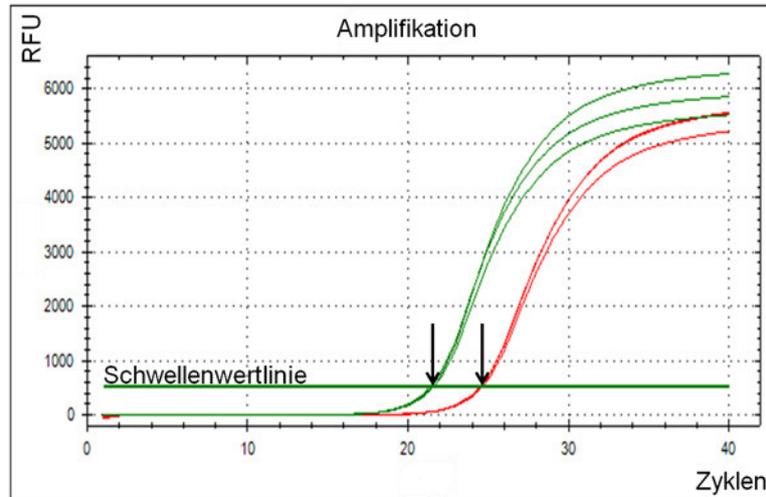
Da einzelsträngige RNA als Template für PCR-Reaktionen ungeeignet ist und die mRNA nur einen Bruchteil der Gesamt-RNA ausmacht, muss die extrahierte RNA zunächst durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase in einzelsträngige, zur mRNA komplementären, cDNA umgeschrieben werden. Diese mit Hilfe der reversen Transkriptase synthetisierte cDNA kann dann für spezifische quantitative Analysen verschiedener mRNA-Produkte als Matrize in eine PCR-Reaktion eingesetzt werden, die sogenannte reverse Transkriptase PCR (RT-PCR). Für die cDNA-Synthese wurde das iScript™cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) verwendet. Das Kit beinhaltet eine modifizierte aus dem Moloney Murinen Leukämie Virus (MMLV) stammende reverse Transkriptase. Diese benötigt als Startpunkt einen kurzen doppelsträngigen Abschnitt, der durch die Anlagerung von Oligo d(T) Primern an den 3` Poly-A-Schwanz der mRNA geschaffen wird. Ist der komplementäre DNA-Strang synthetisiert, wird der angelagerte

mRNA-Strang durch die RNase H-Aktivität der reversen Transkriptase abgebaut. Ein zweiter, zum ersten cDNA-Strang komplementärer Strang, wird anschließend durch die Anlagerung von Random-Hexamer-Oligonukleotiden und die Aktivität der reversen Transkriptase als DNA-abhängige DNA-Polymerase synthetisiert. Das Verfahren, lange DNA-Abschnitte durch die Anlagerung zufällig zusammengestellter Oligonukleotide (Random-Hexamere) zu amplifizieren, wurde durch Feinberg und Vogelstein (1983) entwickelt.

Die cDNA-Synthese erfolgte gemäß Herstellerprotokoll. RNA-Konzentrationen wurden mit dem NanoDrop Spektrophotometer bestimmt, von jeder RNA-Probe ein Volumen entsprechend 500 ng RNA eingesetzt und der Ansatz mit Nuklease-freiem Wasser auf 15 µl aufgefüllt. Als Negativkontrollen wurden ein Reaktionsansatz ohne RNA-Matrize (NTC) und mehrere Reaktionsansätze ohne reverse Transkriptase (-RTC) angesetzt. Dazu wurde ein Master-Mix bestehend aus jeweils 4 µl Reaction-Mix (dNTPs, Random-Hexamere, Oligo d(T)s) und 1 µl reverser Transkriptase pipettiert und folgende Reaktion in einem Thermocycler (Biometra) gestartet: 5 Minuten bei 25 °C, 30 Minuten bei 42 °C, 5 Minuten bei 85 °C. Anschließend wurde jede cDNA-Probe 1:5 mit TE-Puffer verdünnt und kurzfristig bei 4 °C oder längerfristig bei 20 °C gelagert.

#### 2.1.4.5 Quantitative reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR entspricht einer modifizierten PCR, mit Hilfe derer Aussagen über die relative Höhe der Expression einzelner Gene auf mRNA-Ebene getroffen werden können. Im Gegensatz zu einer herkömmlichen PCR wird dem Reaktionsansatz zusätzlich zu Matrize, hitzestabiler DNA-Polymerase, Primern, dNTPs, Mg<sup>2+</sup> und geeigneten Puffersubstanzen ein Fluoreszenz-Farbstoff zugefügt, mit dessen Hilfe eine relative Quantifizierung der gebildeten dsDNA ermöglicht wird. Als Fluorophor kam der Cyanin-Farbstoff SYBR-Green I (iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup>-Green Supermix, Bio-Rad) zum Einsatz, der nach Bindung an dsDNA grünes Licht mit einem Maximum bei einer Wellenlänge von 521 nm emittiert. Die Intensität des Fluoreszenzsignals wird am Ende eines jeden PCR-Zyklus mit Hilfe einer CCD-Kamera gemessen und beschreibt eine sigmoide Kurve. Nur in der exponentiellen Phase der PCR ist die Fluoreszenzintensität proportional zur Menge der gebildeten dsDNA, da zuvor das Signal-Rausch-Verhältnis zu klein ist und danach ein Sättigungseffekt auftritt, der durch Inhibitionseffekte zunehmend kumulierender dsDNA auf die DNA-Polymerase bedingt ist (siehe Abb. 5).



**Abb. 5: Beispielhafte qRT-PCR Amplifikationskurven**

Gezeigt sind Amplifikationskurven zweier in Triplikaten durchgeführter Expressionsmessungen für *SLC2A3*. Zu Beginn der PCR-Reaktion ist das Fluoreszenz-Signal [RFU] zu schwach, um vom Hintergrund-Signal distinguiert zu werden, bis der Amplifikationsvorgang eine exponentielle Phase erreicht, in die Mitte derer der Fluoreszenzschwellenwert gelegt wird. Je früher eine Amplifikationskurve den Fluoreszenz-Schwellenwert überschreitet (Pfeile), beschrieben durch den sogenannten Schwellenwert-Zyklus CT, desto höher ist die Menge des Amplikons in der zu analysierenden Probe. In diesem Beispiel wird *SLC2A3* in der grün dargestellten Probe stärker exprimiert (gleiche cDNA-Mengen vorausgesetzt) als in der rot Dargestellten. Auf die exponentielle Phase folgt schließlich eine Plateauphase, die für die quantitative Auswertung unerheblich ist.

Die qRT-PCR Messungen wurden in einem C1000<sup>TM</sup> Thermal Cycler mit CFX384<sup>TM</sup> Real-Time System (Bio-Rad) durchgeführt. Folgendes Protokoll wurde verwendet: Initialer Denaturierungsschritt für 300 Sekunden bei 95°C gefolgt von 40 PCR-Zyklen bestehend aus jeweils 10-sekündiger Denaturierung bei 95°C und anschließender Primerhybridisierung und Elongation bei 60°C für jeweils 30 Sekunden.

Nach Ende des 40. PCR-Zyklus wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität der Reaktion bezüglich des Amplikons zu evaluieren. Dabei wird die Temperatur ausgehend von 65°C in 5-sekündigen Intervallen um jeweils 0,5°C bis zu einer Temperatur von 95°C erhöht und nach jedem Temperaturanstieg das Fluoreszenzsignal gemessen. Dabei schmilzt der DNA-Doppelstrang bei einer für das jeweilige Amplikon spezifischen Temperatur in zwei Einzelstränge auf, was sich durch eine rapide Abnahme des Fluoreszenzsignals bemerkbar macht. Die Schmelztemperatur lässt sich an der Spitze der Schmelzkurve ablesen. Unspezifische Nebenprodukte, wie z.B. Primerdimere lassen sich durch ihre niedrigere Schmelztemperatur vom spezifischen Amplikon unterscheiden. Zusätzlich zur Schmelzkurvenanalyse wurde das PCR-Produkt zur Größenbestimmung im Agarosegel (3 % Agarosegel, 3 µl Ethidiumbromid) aufgetrennt.

qRT-PCR-Experimente wurden für jede Probe in Triplikaten durchgeführt. In die Kavitäten einer Mikrotiterplatte mit 384 Nöpfchen (Bio-Rad) wurden mit Hilfe einer elektronischen Multipipette 9 µl eines Mastermixes bestehend aus iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix, Nuclease-freiem Wasser und spezifischem Primer vorgelegt (Pipettierschema siehe Tab. 3). Anschließend wurde mit einer 8-Kanal-Pipette in jedes Nöpfchen 1 µl cDNA gegeben. Als Negativkontrollen dienten NTC, -RTC sowie Wasserkontrollen (siehe Kap. 2.1.4.4). Vor dem Start des PCR-Laufes wurde die Mikrotiterplatte zum Schutz vor Verdunstung mit einer durchsichtigen Folie (Bio-Rad) beklebt und 30 Sekunden bei 2200 g zentrifugiert. Die Real-Time-Daten wurden durch die CFX-Manager Software (Version 1.5, Bio-Rad) aufgezeichnet und die durch die Software berechneten CT-Werte zur statistischen Auswertung übernommen.

Um eine gute Reproduzierbarkeit von qRT-PCR-Ergebnissen zu erreichen, ist es wichtig, die PCR-Effizienz zu berücksichtigen, die sich zwischen einzelnen Proben aber auch Amplikon-abhängig voneinander unterscheidet. Durch die Amplikon-abhängige symmetrische Verteilung individueller PCR-Effizienzwerte kann die Nutzung der Durchschnittseffizienz pro Amplikon anstelle einer auf Einzeleffizienzen basierten Auswertung gerechtfertigt werden (Ruijter et al. 2009). Pro Amplikon gemittelte PCR-Effizienzen wurden durch die von Ruijter et al. (2009) designte LinRegPCR Software ermittelt. Im optimalen Fall wird die zu amplifizierende cDNA in jedem PCR-Zyklus verdoppelt, was einer PCR-Effizienz von 2,0 entspricht, während ein Effizienzwert von 1,0 bedeuten würde, dass kein Produkt amplifiziert wurde. In qRT-PCR-Experimenten sollten Effizienzwerte von 1,8 erreicht werden, was einer 90 % Effizienz entspricht. Die relative Expressionshöhe wurde mit folgender Formel ermittelt:

$$Q = E_{\text{mean}}^{(CT_{\text{min}} - CT)}$$

Q: relative Expressionsstärke  
 $E_{\text{mean}}$ : durchschnittliche PCR-Effizienz  
 $CT_{\text{min}}$ : kleinster CT-Wert für das jeweilige Amplikon  
 CT: durchschnittlicher CT-Wert des Triplikats

Um mögliche Unterschiede in der Menge des Ausgangsmaterials zu glätten, wurden neben den Genen von Interesse bei jedem Versuch mehrere sogenannte Referenz-Gene quantifiziert. Zur Identifizierung der zwei am stabilsten exprimierten Referenz-Gene wurde die von Vandesompele et al. (2002) entwickelte GeNorm-Software herangezogen. Normalisierte Expressionswerte  $Q_{\text{norm}}$  der Gene von Interesse ergaben sich durch Division des jeweiligen Q-Wertes durch einen von GeNorm ermittelten Normalisationsfaktor.

Bei der Auswahl der qRT-PCR Primer wurde darauf geachtet, dass intronale Sequenzen mit einer Länge von mehreren hundert bp umfasst werden, so dass eine mögliche Amplifikation

genomischer DNA ausgeschlossen wird. Der verwendete *SLC2A3*-Primer wurde selbst designet und dabei berücksichtigt, dass das stark homologe *SLC2A14* und andere Paraloga nicht koamplifiziert werden (3 Mismatches im Reverse-Primer gegenüber *SLC2A14*, unter anderem ein A/G-Mismatch am 3'-Ende). Vom Vorwärts-Primer 5'-GGGTATGATCGGCTCCTTTT-3', und Rückwärts-Primer 5':GCATTTCAACCGACTTAGCTACT:3' wird ein Amplikon von 140 bp Länge vermehrt. Daneben wurden Primer zur Quantifizierung von *SLC2A1* (GLUT1), *SLC2A4* (GLUT4), *SLC2A14* (GLUT14) *SLC6A2* (NET), *SLC6A3* (DAT), *SLC6A4* (SERT) von Qiagen erworben. Ebenfalls von Qiagen stammten die Primer für die Referenzgene *ALAS1*, *B2M*, *GAPDH* und *PGK1*.

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen</b>
4 X SYBR-Green Super Mix	5 µl
Nuclease-freies Wasser	3 µl
Primer	1 µl
cDNA-Matrize	1 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>10 µl</b>

**Tab. 3: Reaktionsansatz für die SYBR-Green Real-Time PCR**

## 2.1.5 Methoden zur Quantifizierung der Proteinexpression

### 2.1.5.1 Herstellung von Proteinlysaten

Zunächst wurden Gesamtzell-Proteinlysate hergestellt. Zur Disruption der Zellmembran sowie zellulärer Kompartimente wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS in eiskaltem RIPA-Puffer (Sigma-Aldrich) resuspendiert, dem eine Proteaseinhibitor-Cocktail-Tablette (Roche) zur Unterdrückung möglicher intrinsischer wie auch extrinsischer proteolytischer Aktivität kurz vor Verwendung zugesetzt wurde. Der verwendete RIPA-Puffer enthält mit 0,1 % SDS und 1 % IGEPAL CA-630 zwei verschiedene Detergenzien, die hydrophobe Membranproteine effektiv in Lösung bringen können. Für EBV-LCLs wurde eine Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/100 µl, für native PBMCs eine Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/100 µl RIPA-Puffer verwendet. Nach halbstündiger Inkubation der Zellysate auf Eis wurden unlöslicher Zellebris sowie Zellkerne abzentrifugiert (10.000 g, 10 Minuten, 4 °C) und der Überstand als Proteinlysat bei -70 °C gelagert.

### 2.1.5.2 Quantifizierung des Proteingehalts mit Bicinchoninsäure (BCA)

Die Proteinkonzentrationen der Lysate wurden mittels BCA-Test (Pierce® BCA-Assay-Kit, Thermo Scientific) gemäß Gebrauchsanweisung bestimmt. Der BCA-Test beruht auf der sogenannten Biuret-Reaktion: Die Peptidbindungen in Proteinen führen zu einer Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$ . Je zwei Moleküle BCA bilden mit einem einwertigen Kupferion einen purpurfarbenen Komplex, dessen Absorptionsmaximum bei 562 nm liegt. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist die Extinktion elektromagnetischer Strahlung mit definierter Wellenlänge direkt proportional zur Konzentration der absorbierenden Substanz. Daher können mittels einer Kalibrationsreihe aus BSA-Lösungen definierter Konzentrationen (0-2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) die Proteinkonzentrationen der zu bestimmenden Proben berechnet werden.

Auf einer transparenten 96-Näpchen-Mikrotiterplatte (Sarstedt) wurden zu je 25  $\mu\text{l}$  1:5 vorverdünnter Probe bzw. BSA-Standard 200  $\mu\text{l}$  BCA-Reagenz gegeben, die Platte für 30 Sekunden bei 500 rpm geschüttelt und 20 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 562 nm mit einem ELISA-Reader (Multiskan Spectrum Microplate Spectrophotometer, Thermo Labsystems) gemessen. Als Lösungsmittel für die BSA-Standards sowie für eine Negativkontrolle wurde RIPA-Puffer verwendet. Die Bestimmung erfolgte für jede Probe in Triplikaten. Die Proteinkonzentrationen von Proben für einen quantitativen Western-Blot, wurden unmittelbar vor der SDS-Gelelektrophorese bestimmt.

### 2.1.5.3 Probenvorbereitung und SDS-PAGE

Jeweils 10  $\mu\text{g}$  Protein wurden auf ein SDS-Gradientengel (NuPAGE® Novex 4-12 % Bis Tris Gel, Life-Technologies) aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgte unter reduzierenden, denaturierenden Bedingungen. Dazu wurde den Proben das DTT-haltige NuPAGE® Sample Reducing Agent (2x) (Life-Technologies) beigefügt und die Proben vor der Elektrophorese 10 Minuten auf 70°C erhitzt. Durch diese Maßnahmen wird die räumliche Struktur der Proteine aufgebrochen, so dass sie in einer linearisierten Konformation im SDS-Gel migrieren können. Das im Probenpuffer (NuPAGE® LDS Sample buffer (4x), Life-Technologies) enthaltene LDS maskiert die Eigenladung der Proteine, so dass eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht unabhängig von der Eigenladung erfolgt (Pipettierschema siehe Tab. 4). Zusätzlich zu den Proben wurde auf jedes Gel 12  $\mu\text{l}$  eines Molekulargewichtsmarkers aufgetragen (Novex Sharp Prestained Protein Standard, Life-

Technologies). Der äußere Kammerpuffer setzte sich aus 95 % ddH<sub>2</sub>O sowie 5 % NuPAGE<sup>®</sup> MOPS SDS-Running buffer (Life-Technologies) zusammen, der innere Kammerpuffer bestand aus äußerem Kammerpuffer unter Zusatz von 0,1 % NuPAGE<sup>®</sup> Antioxidant (Life-Technologies). Die SDS-PAGE erfolgte in einer Elektrophoresekammer (XCell SureLock<sup>™</sup> Novex<sup>®</sup> Mini-Cell) für 1 Stunde bei 200 V, 400 mA und RT.

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen</b>
NuPAGE <sup>®</sup> LDS Sample buffer (4x)	5 µl
NuPAGE <sup>®</sup> Sample Reducing agent (10x)	2 µl
Proteinlysate (10 µg)	x µl
Aqua dest.	13-x µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>

**Tab. 4: Probenzusammensetzung für die SDS-PAGE**

#### 2.1.5.4 Elektroblot und Ponceau-S-Färbung

Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung der Proteinproben im SDS-Gel wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer entnommen und mit Transferpuffer, zusammengesetzt aus 10 % (v/v) Methanol, 5 % (v/v) NuPAGE<sup>®</sup> Transferpuffer und 0,1 % (v/v) NuPAGE<sup>®</sup> Antioxidant, feucht gehalten. Die Übertragung der Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte nach dem Verfahren des nassen Transfers (Towbin et al. 1979) für 1 Stunde bei 30 V, 400 mA in einem XCell<sup>™</sup> II Blot Modul (Invitrogen). Um den Erfolg des Proteintransfers zu verifizieren, wurde die Nitrozellulosemembran im Anschluss an den Elektroblot mit ddH<sub>2</sub>O abgespült, zwei Minuten in Ponceau-S-Lösung (AppliChem) inkubiert und dreimal in ddH<sub>2</sub>O geschüttelt um die Proteinbanden sichtbar zu machen.

#### 2.1.5.5 Immunologische Detektion mit Antikörpern

Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrozellulosemembran für eine Stunde bei RT mit 5 % Milchpulver in TBS-T schüttelnd inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation mit einem Antikörper gegen humanes GLUT3 (1/400, Abcam, ab15311, anti-GLUT3 made in rabbit) in 5 % Milchpulver in TBS-T auf dem Schüttler bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Membran bei RT dreimal für je fünf Minuten mit TBS-T gewaschen, um ungebundenen Primär-Antikörper zu entfernen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper (1/7500, Santa-Cruz, SC-2054, goat anti-rabbit IgG) für 1 Stunde bei RT. Eine Übersicht der verwendeten Antikörper zeigt Tab. 5. Für rein

qualitative Western-Blots wurde der Primär-Antikörper bis zu zweimal wiederverwendet (Lagerung bei 4°C unter Zusatz von 0,1 % Natriumazid), für quantitative Versuche wurde die Antikörper-Lösung frisch angesetzt. Vor der Detektion wurde die Membran dreimal für zehn Minuten in TBS-T gewaschen.

Die verwendeten Sekundär-Antikörper sind an Meerrettichperoxidase gekoppelt, welche die Oxidation des im Detektionsreagenz (SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Scientific) enthaltenen Luminols unter einer Chemolumineszenzreaktion katalysiert. Zur Visualisierung der Western-Blot Banden wurde das bei 425 nm emittierte Licht mit Hilfe einer CCD-Kamera (ChemiDoc™, Biorad) detektiert. Dazu wurde die mit Detektionsreagenz benetzte Nitrocellulosemembran in eine Klarsichtfolie eingeschlagen. Die Aufnahmen der Membran wurden als 16-Bit tiff.-Datei gespeichert. Auf die GLUT3-Detektion folgend wurde ein Stripping-Protokoll ausgeführt, um die Antikörper der ersten Immundetektion von der Membran abzulösen: Zweimalige 10 minütige Inkubation mit mildem Stripping-Puffer (ddH<sub>2</sub>O, 3 mM SDS, 200 mM Glycin, 1 % Tween-20) gefolgt von mehreren Waschsritten (2 x 10 Minuten in PBS, 2 x 5 Minuten in TBS-T). Danach erfolgte ein erneutes Blocken der Membran mit 5 % BSA in TBS-T und Inkubation mit einem Antikörper gegen humanes  $\beta$ -Actin (1/10000 in 5 % BSA-TBS-T), das als Referenzprotein diente.

Wirtsspezies	Zielprotein	Hersteller	Epitop
Kaninchen	GLUT3 (Mensch)	Abcam (ab15311)	AS 485-496
Kaninchen	GLUT3 (Mensch)	Abcam (ab53059)	AS 216-265
Kaninchen	GLUT3 (Maus/Mensch)	Abcam (ab41525)	AS 485-496
Maus	$\beta$ -Actin (Mensch)	Abcam, HRP-konjugiert	unbekannt
Ziege	Kaninchen-IgG	Santa-Cruz, HRP-konjugiert	unbekannt

**Tab. 5: Verwendete Antikörper**

#### 2.1.5.6 Quantitative Auswertung von Western-Blot-Banden

Western-Blot-Banden wurden mit Hilfe der Software AIDA (Version 2.0, Raytest Isotopenmessgeräte GmbH) densitometrisch ausgewertet. Dazu wurde um jede Bande eine Fläche gezogen, deren Begrenzung dem Umriss der auszuwertenden Bande anlag. Die Software misst durch eine densitovolumetrische Methode das absolute Signal jeder Bande, so dass sowohl die Abstufung von Grauwerten als auch die Bandenfläche berücksichtigt wird. Ab einer Stichprobengröße von 10 mussten die zu analysierenden Proben auf mehrere SDS-Gele verteilt

werden. Um dennoch eine quantitative Auswertung zu ermöglichen, wurde auf jedes Gel dieselbe Menge einer identischen Probe als interne Kontrolle jeweils in die gleiche Wellposition pipettiert. Die Intensitätswerte der einzelnen Banden wurden dann durch die Intensität der internen Kontrolle dividiert. Um Pipettierungenauigkeiten auszugleichen erfolgte eine Normalisierung mit Hilfe des ubiquitär exprimierten Proteins  $\beta$ -Actin. Die relativen Expressionswerte repräsentieren den Quotienten aus Intensität der GLUT3-Banden und Intensität der  $\beta$ -Actin-Bande.

### **2.1.6 Kolorimetrische Bestimmung von Glukosekonzentrationen**

Glukosekonzentrationen in Mediumsüberständen wurden mit Hilfe des QuantiChrom™ Glucose Assay Kits (BioAssay Systems) bestimmt. Dabei handelt es sich um ein kolorimetrisches Verfahren, bei dem Glukose unter einer Farbreaktion enzymatisch umgesetzt wird. Die Absorption bei 630 nm ist direkt proportional zur Glukose-Konzentration der analysierten Probe.

Mediumsüberstände wurden bis zur Analyse bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Analyse erfolgte nach folgendem Herstellerprotokoll: Der gelieferte 300 mg/dl Glukose-Standard wurde in ddH<sub>2</sub>O zu verschiedenen Konzentrationen der Standardreihe ausverdünnt (300 mg/dl, 200 mg/dl, 100 mg/dl, 50 mg/dl, 0 mg/dl). In 1,5 ml Eppendorf-Tubes wurden jeweils 500  $\mu\text{l}$  der Arbeitslösung vorgelegt und 5  $\mu\text{l}$  Standard oder 5  $\mu\text{l}$  der zu analysierenden Probe hinzugegeben. Die Reaktion lief anschließend 8 Minuten lang in einem kochenden Wasserbad ab. Danach wurden jeweils 200  $\mu\text{l}$  in Duplikaten in eine transparente Mikrotiterplatte mit 96 Nöpfchen (Sarstedt) pipettiert und die Absorption photometrisch bei 630 nm gemessen (Spectrum Microplate Spectrophotometer, Thermo Labsystems). Aus den beiden Absorptionswerten jeden Duplikates wurde der Mittelwert gebildet und davon der Absorptionswert der Wasserkontrolle subtrahiert. Die Glukosekonzentration (mg/dl) errechnet sich aus dem Quotienten des normalisierten Absorptionswertes der Probe ( $A_{\text{Probe}} - A_{\text{Wasserkontrolle}}$ ) und der Steigung der Standardgeraden S.

### **2.1.7 Statistische Auswertung**

Daten sind als arithmetische Mittel der Gruppeneinzelwerte dargestellt. Als Fehler wird der Standardfehler angezeigt. Signifikanz wurde bei allen Daten, die Kontroll- und Duplikationsgruppe bei gegebener Normalverteilung vergleichend darstellen, mit Hilfe eines

Zweistichproben-T-Tests ermittelt. Bei fehlender Normalverteilung wurde die Signifikanz mit Hilfe non-parametrischer Tests, dem Mann-Whitney-Test bei ungepaarten Stichproben und dem Wilcoxon-Test bei gepaarten Stichproben bestimmt. Zum Vergleich von mindestens 3 gepaarten Stichproben wurde der Friedman-Test verwendet. Die Statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft-Excel 2007 und SPSS.

## 2.2 fMRT-Untersuchung

Die funktionelle MRT erlaubt es, mittels BOLD (*blood-oxygen-level-dependent*)-Kontrast Rückschlüsse auf die neuronale Aktivität einzelner Hirnregionen zu ziehen. Der BOLD-Kontrast basiert darauf, dass Hämoglobin durch die Bindung von Sauerstoff seine magnetische Eigenschaft von einem paramagnetischen in einen diamagnetischen Zustand ändert (Pauling und Coryell 1936) und beschreibt die Abhängigkeit der Signalintensität im T2-gewichteten Bild vom Oxygenierungsgrad des Hämoglobins (Thulborn et al. 1982, Ogawa et al. 1990). Die Vermutung, dass die regionale Durchblutung von Hirnarealen abhängig von der neuronalen Aktivität reguliert werde, wurde bereits von Roy und Sherrington (1890) geäußert: „[...] *the brain possesses an intrinsic mechanism by which its vascular supply can be varied locally in correspondence with local variations of functional activity*“. Dieser Zusammenhang gilt heute als gesichert und ist unter dem Begriff der neurovaskulären Kopplung bekannt (Nair 2005). Die Korrelation zwischen neuronaler Aktivität und BOLD-Kontrast wurde von Logothetis et al. (2001) erstmals beschrieben: Es ist zu berücksichtigen, dass der BOLD-Kontrast wahrscheinlich weniger das Abfeuern von Aktionspotentialen abbildet, als vielmehr eingehende elektrische Signale und deren intrakortikale Verarbeitung.

### 2.2.1 Probanden

14 ADHS-Patienten mit *SLC2A3*-Duplikation, 14 gematchte ADHS-Patienten und 14 gesunde Kontrollprobanden jeweils ohne Risikogenotyp wurden untersucht. Das Geschlechterverhältnis innerhalb der Gruppen war ausgeglichen (7 Frauen und 7 Männer). Alle ADHS-Patienten waren ambulante Patienten der Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapie Würzburg. Die 14 Kontrollprobanden wurden über Anzeigen rekrutiert. Für die Patienten wurden folgende Einschlusskriterien festgelegt: ADHS in Kindheit und Erwachsenenalter gemäß DSM-IV-Kriterien mit Krankheitsbeginn vor Vollendung des 7. Lebensjahres. Die Diagnosen wurden von einem erfahrenen Psychiater gestellt und von einem 2. Psychiater bestätigt. Zum Zeitpunkt der Teilnahme mussten mindestens 5 Kriterien der Unaufmerksamkeit, sowie 5 Kriterien der Hyperaktivität/Impulsivität vorliegen. Ausschlusskriterien waren: Alter unter 18 oder über 60 Jahre, IQ unter 80 (MWT-B), schwere körperliche Behinderung, Hörminderung sowie Alkohol- oder Drogenkonsum vor der Untersuchung. Patienten wurden zudem von der Studie ausgeschlossen, wenn die Symptome besser durch eine andere psychiatrische Störung erklärt wurden oder gleichzeitig eine Bipolar-I-Erkrankung vorlag (ausgeschlossen aufgrund

ungelöster differentialdiagnostischer Schwierigkeiten). Kontrollprobanden wurden zudem ausgeschlossen, wenn sie eine SCID-I oder SCID II-Diagnose hatten oder wenn sie mehr als 2 Symptome der Unaufmerksamkeit oder Hyperaktivität/Impulsivität nach DSM-IV erfüllten. Psychostimulanzien mussten mindestens 4 Tage vor dem Experiment abgesetzt werden, andere Psychopharmaka durften seit mindestens 4 Halbwertszeiten nicht mehr eingenommen worden sein. Zwei Stunden vor dem Experiment mussten die Probanden nüchtern bleiben.

### **2.2.2 Psychometrische Untersuchungen**

Der BMI wurde erhoben und die Probanden gaben ihre Präferenzen bezüglich verschiedener Nahrungsmittel auf einer Ordinalskala an. Zudem wurde nach Präsentation von Bildern hoch- und niederkalorischer Nahrung die Einschätzung der Kalorienzahl der auf den Bildern präsentierten Nahrungsmittel und deren subjektiven Schmackhaftigkeit abgefragt.

### **2.2.3 Versuchsbedingungen**

Die Probanden bekamen Essensbilder sowie emotionale Stimuli präsentiert. Die Kategorie der Essensbilder setzte sich zusammen aus hoch- und niederkalorischen Stimuli. Die hochkalorischen Stimuli bestanden aus 20 Bildern, darunter 10, die süßes Essen (z. B. Kuchen, Bonbons, Gummibären) sowie 10, die fettig-salziges Essen (z. B. Kartoffelchips, Mahlzeiten mit viel Fleisch oder Käse) darstellten. Die 20 niederkalorischen Stimuli zeigten Obst oder Gemüse. Die Essensbilder wurden aus der IAPS-Bilderdatenbank sowie einer eigenen Datenbank gewonnen. Außerdem wurden im Rahmen eines Paradigmas zur Emotionsregulation 20 neutrale IAPS-Bilder, die Haushaltsobjekte oder Pflanzen ohne Menschen zeigten, 20 neutrale Bilder mit Menschen (z. B. neutrale Gesichter), 20 angenehme (z. B. erotisch, abenteuerlich) und 20 unangenehme IAPS-Bilder (z. B. Bilder von Verstümmelungen, Unfällen) gezeigt. Die Präsentation eines weißen Fixationskreuzes wurde für die Nullmessung verwendet. Alle Bilder hatten eine vergleichbare Helligkeit. Sie wurden zudem so aufeinander abgestimmt (9-Punkte Skala; 1 = maximal unangenehm, minimal erregend, 9 = maximal angenehm, maximal erregend), dass angenehme und unangenehme emotionale Stimuli eine ähnlich hohe Erregung auslösten: die durchschnittliche Valenz/Erregung betrug bei angenehmen Bildern: 7,2/5,7 und bei unangenehmen Stimuli 2,5/6,1. Die Essensbilder waren untereinander ebenfalls vergleichbar bezüglich ihres Valenz- und Erregungslevels (Valenz/Erregung: hochkalorisch fettig-salzig: 5,1/3,7; hochkalorisch süß:

5,3/3,8; niedrig-kalorisch: 5,1/3,6). Sie ähnelten bezüglich ihres Valenz- und Erregungslevels dabei den neutralen Stimuli (Valenz/Erregung: neutral mit Menschen: 5,1/3,6; neutral ohne Menschen: 5,0/3,1).

Zunächst erfolgte eine Einführungsrunde, in welcher die Probanden nacheinander je ein angenehmes Bild, ein neutrales Bild, ein unangenehmes Bild, ein Essensbild sowie das weiße Fadenkreuz präsentiert bekamen. Die Bilder wurden auf einem grauen Hintergrund über eine MRT-kompatible Brille (VisuaStim; Magnetic Resonance Technologies, Northridge, Kalifornien, USA) und die „Presentation“ Software (Version 9.13, Neurobehavioral Systems, Albany, Kalifornien, USA) gezeigt. Im Anschluss an diese Testphase begann der experimentelle Teil, in dem die Stimuli blockweise präsentiert wurden. Jeder Block setzte sich aus 10 Bildern derselben Unterkategorie zusammen, so dass jede Unterkategorie (bestehend aus 20 Bildern) demnach in 2 Blöcken präsentiert wurde. Innerhalb jedes Blocks wurden die Bilder in einer zufälligen Reihenfolge für eine Zeitdauer von jeweils 3 Sekunden ohne Interstimulus-Intervall gezeigt. Das weiße Fadenkreuz wurde zweimal für jeweils 30 Sekunden gezeigt. Die einzelnen Blöcke wurden durch Pausen von jeweils 12 Sekunden voneinander abgegrenzt. Es wurde darauf geachtet, dass niemals 2 Blöcke derselben Kategorie unmittelbar aufeinander folgten.

#### **2.2.4 Magnetresonanz-Bildgebung**

Zur Gewinnung von Schnittbildern des Gehirns wurde ein 1,5 Tesla Ganzkörper-Tomograph (SIEMENS Avanto mit Quantum-Gradientensystem) mit Standard-Kopfspule und einer voreingebauten Kopfstütze zur Reduktion von Bewegungsartefakten verwendet. Die strukturellen Bilder bestanden aus 160 T1-gewichteten sagittalen Gradienten-Echo (MP-RAGE) 3-D MRT-Sequenzen (1 mm Schichtdicke, TR: 2250 ms, Echo-Zeit: 3,93 ms, Flipwinkel 8°, FOV: 250 mm, Matrix: 256 x 256, Voxel-Fläche: 1 x 1 x 1 mm). Für die Aufnahme funktioneller Bilder wurden über das gesamte Gehirn 395 Volumina mit Hilfe einer T2\*-gewichteten planaren Gradienten-Echo Bildsequenz mit 25 axialen Schichten aufgenommen (Schichtdicke 5 mm, 1 mm Lücke, versetzte absteigende Reihenfolge, 100 ms TA, 40 ms Echozeit, TR: 2500 ms, Flipwinkel 90°, FOV 240 x 240 mm, Matrix 64 x 64, Voxel-Fläche 3,1 x 3,1 x 3,1 mm). Die Orientierung der axialen Schnitte wurde parallel zur AC-PC-Linie gewählt.

### 2.2.5 Vorverarbeitung der fMRT-Daten und Datenanalyse

Die gewonnenen Daten wurden mittels statistischem parametrischem Mapping (SPM5, Wellcome Department of Cognitive Neurology, London, 2005) mit der MatLab 7.0 Software (Mathworks Inc., Sherborn MA, USA) verarbeitet. Bewegungsartefakte wurden wie durch Ashburner und Friston (2005) beschrieben korrigiert. Die funktionellen Bilder wurden anschließend mit den T1-gewichteten strukturellen Aufnahmen in Deckung gebracht, um eine räumliche Zuordnung der Signale zu ermöglichen. Die anatomischen T1-Aufnahmen wurden dann in Felder aufgeteilt und im nächsten Schritt die EPI-Sequenzen (*echo planar imaging*) durch räumliche Normalisierung in den MNI Standardraum (das Montreal Neurological Institute = MNI entwickelte ein 3-dimensionales Standard Koordinatensystem für das Gehirn) gebracht, so dass ein voxelweiser Vergleich zwischen den Probanden möglich ist. Die Daten wurden dann mit einem 8 mm FWHM (*full-width-half-maximum*) Gauß Filter geglättet, um Hintergrundrauschen zu reduzieren.

Alle sechs Konditionen (hochkalorisch, niederkalorisch, angenehm, unangenehm, neutral, Fixationskreuz) wurden als jeweils unabhängige Variablen in einem allgemein linearen Modell betrachtet (*general linear model*). Dazu wurden die Versuchsbedingungen in SPM jeweils mit einem Boxcar Referenzvektor modelliert und mit der kanonischen hämodynamischen Antwortfunktion konvolviert. Die voxel-basierten Zeitserien wurden zusätzlich mit einem Hochpassfilter (128 s) bearbeitet, um Störeffekte zu reduzieren. In der *first level* Analyse wurden die t-Kontraste (angenehm vs. neutral, unangenehm vs. neutral, hochkalorisch vs. Fixationsblock, niederkalorisch vs. Fixationsblock) der Beta-Gewichte für jede Versuchsperson berechnet. Um Gruppenunterschiede zu untersuchen, wurden die in der *first level* Analyse gewonnenen Kontraste der Beta-Gewichte gruppenweise miteinander verglichen.

### 2.2.6 Univariate Gesamthirn-Analyse

Es wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) zum Vergleich der 3 Gruppen (ADHS mit Risikogenotyp, ADHS ohne Risikogenotyp, Kontrollprobanden ohne Risikogenotyp) durchgeführt. Die Gruppenzugehörigkeit ist demnach der unabhängige Faktor (mit 3 Faktorstufen), dessen Einfluss auf die abhängige Variable, die Aktivierung jedes einzelnen Voxels in einer Zeitserie, untersucht wird. Dieser Ansatz, bei dem die voxelweise Aktivierung aller Voxel im gesamten Gehirn zwischen den Gruppen miteinander verglichen wird, wurde ausgewählt da die *SLC2A3*-Expression im Gehirn ubiquitär ist und bisher keine Studien zum

Einfluss der *SLC2A3*-Kopienzahl auf regionale Aktivierungsmuster vorliegen. Das Signifikanzniveau wurde auf einen korrigierten p-Wert  $< 0,05$  festgelegt. Da bei dem beschriebenen Vorgehen eine große Anzahl an Tests durchgeführt wird, ist eine statistische Korrektur für multiples Testen notwendig. Diese wurde mit der Methode der *false discovery rate* (FDR) durchgeführt (Benjamini und Hochberg 1995).

### 2.2.7 Multivariate Analyse

Im Gegensatz zur univariaten Analyse wird bei der multivariaten Analyse nicht die Aktivität einzelner Voxel gruppenweise verglichen, sondern es wird nach Aktivierungsmustern gesucht, an denen (über das ganze Gehirn verteilt) viele Voxel in unterschiedlicher Art und Weise (starke vs. schwache Aktivierung) beteiligt sein können. So ist es möglich, Gruppenunterschiede darzustellen, die bei der univariaten Analyse ggf. nicht sichtbar sind bzw. beim Vergleich einzelner Voxel miteinander verloren gehen. Die multivariate Analyse ist daher das sensitivere Verfahren mit besserer räumlicher Auflösung und damit gut geeignet durch maschinelles Lernen Gruppenunterschiede vorherzusagen, erlaubt jedoch keine befriedigende Aussage über den Beitrag einzelner Voxel bzw. Hirnregionen am Gruppenunterschied. Dadurch ist die multivariate Analyse beispielsweise gut geeignet, Biomarker zu finden, jedoch weniger gut geeignet, um hypothesenbildende Aussagen zu funktionellen Netzwerken zu formulieren. Mit Hilfe der multivariaten Analyse soll untersucht werden, ob die drei Probandengruppen anhand neuraler Antwortmuster auf die sechs verschiedenen Versuchsbedingungen im Gesamthirn und innerhalb verschiedener *regions of interest* (ROIs) unterschieden werden können. Für die ROI-Analyse wurden verschiedene Hirnregionen eingeschlossen, die Bestandteil des dopaminergen Belohnungssystems sind und/oder wichtig für die zentrale Hungerregulation sein sollen (siehe Tab. 6).

Es wurden drei binäre Zuordnungen durchgeführt, anhand derer die drei untersuchten Gruppen (ADHS-Patienten mit *SLC2A3*-Duplikation vs. ADHS-Patienten ohne Risikogenotyp vs. gesunde Kontrollen ohne Risikogenotyp) mit Hilfe von Aktivierungsmaps der 6 untersuchten Konditionen (hoch- vs. niederkalorische Essensstimuli, positiv und negativ emotionale Stimuli, neutrale Reize und der Fixationsblock) unterschieden werden sollen. Für jede Zuordnung wurde eine Entscheidungsbaum-Klassifikation mit mindestens 5 Blättern bei einer Lernrate von 0,1 durchgeführt und dabei 1000 Entscheidungsbäume gebildet. Hierzu wurde der *Random Under Sampling Boost* Algorithmus (Seiffert et al. 2010) in Matlab verwendet. Dieser Ansatz wurde angewandt, um das Problem zu verringern, dass bei einer

feststehenden Anzahl von Trainingsproben die Genauigkeit der Zuordnung mit steigender Dimensionalität abnimmt (Hughes Effekt). Zudem muss berücksichtigt werden, dass viele Dimensionen hauptsächlich ein „Rauschen“ erzeugen, wenn man in einem hochdimensionalen Raum versucht Gesamthirn-Klassifikatoren zu schaffen. Ein Lösungsansatz für beide Probleme besteht darin, nur die Voxel zu berücksichtigen, die die Genauigkeit des Modells verbessern. Dieser so genannte *Boosting*-Prozess verringert die Dimensionalität und den Zeitaufwand der Analyse, da für das Modell irrelevante Voxel nicht berechnet werden. Dadurch werden die Beta-Gewichte (Regressionskoeffizienten) etwas stabiler (Freund und Schapire 1997).

Um die generelle Aussagekraft des Klassifikators sicherzustellen, wurde zur Vorhersage der Gruppenzugehörigkeit eine sogenannte *leave-one-out cross-validation* (LOO-CV) durchgeführt. In jedem Durchlauf werden dazu die Daten von allen außer einem Probanden ( $n-1$  bei  $n$  Probanden) verwendet, um den Klassifikator zu trainieren. Daraufhin wird die Gruppenzugehörigkeit des Probanden berechnet, der bis dahin vom Algorithmus noch nicht „gesehen“ wurde. Dieses Vorgehen wird  $n$ -mal wiederholt, wobei in jedem Durchgang die Daten eines anderen Probanden weggelassen werden. Die Trefferquote (Wahrscheinlichkeit der Zuordnung zur richtigen Gruppe) wird berechnet, indem die Anzahl der korrekten Zuordnungen durch die Anzahl der Probanden geteilt wird. Um die statistische Signifikanz der Trefferquote zu berechnen, können für jeden Klassifikator 1000 erneute Durchgänge mit zufälliger Verteilung der Gruppenzugehörigkeit durchgeführt werden. Dabei wird die Anzahl der Durchgänge gezählt, in denen eine bessere Trefferquote als mit den richtigen Gruppenzugehörigkeiten erreicht wird. Diese Anzahl geteilt durch 1000 repräsentiert den  $p$ -Wert. Aufgrund des enormen zeitlichen Rechenaufwands wurde in dieser Arbeit auf die Berechnung der exakten  $p$ -Werte verzichtet.

ROI	Hypothetische Funktion
Hypothalamus	Hungerregulation, Homöostase (siehe Kap. 1.2.5)
Insula	Geschmacksverarbeitung (1)
Präzentrale Regionen	Appetit (2)
Cingulum	Appetit (2)
Precuneus	Appetit (2)
Kleinhirn	Appetitkontrolle (2)
ACC	Appetit, Emotionsverarbeitung, Impulskontrolle, (2, 3)
Basalganglien	Hunger (3)
Dorsolateraler präfrontaler Kortex	Kognitive Kontrolle, Impulskontrolle, Satttheit (3, 5)
Linke parahippocampale Regionen	Hunger (4)
Amygdala	Emotionsregulation, Appetit (4)
Orbitofrontaler Kortex	Emotionskontrolle, Impulskontrolle, Appetit (5)
Ventromedialer präfrontaler Kortex	Emotionskontrolle, Furchtextinktion, Appetit (5)
Ventrolateraler präfrontaler Kortex	Emotionskontrolle, motorische Kontrolle (5)
Hippocampus	Gedächtnis, eng geknüpft an emotionale Prozesse (6)
Nucleus accumbens	Belohnungssystem, Appetit (siehe Kap. 1.2.5)
Left superior frontal regions	Arbeitsgedächtnis (7)
Rechter superiorer temporaler Gyrus	Visuelle räumliche Wahrnehmung (8)
Lingualer Gyrus	Verarbeitung von Seheindrücken (9)
Nucleus geniculatus lateralis	Visuelle Wahrnehmung (9)
Sulcus calcarinus	Verarbeitung von Seheindrücken, Teil der primären Sehrinde (9)
Primäre visuelle Regionen	Verarbeitung von Seheindrücken (9)
Thalamus	Informationsleitung sensorischer Afferenzen an den Neokortex

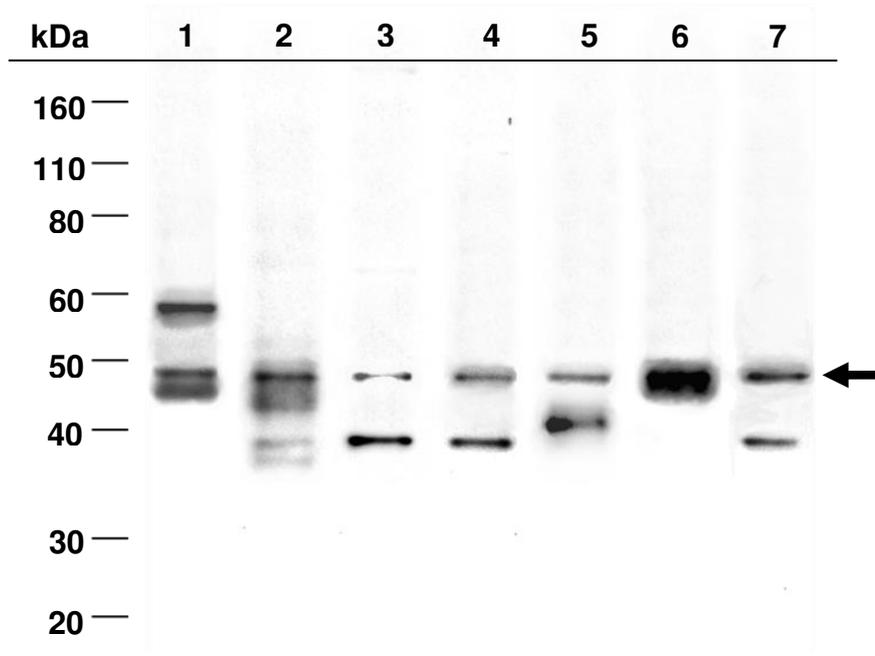
**Tab. 6: ROIs und deren hypothetische Funktion**

Die hypothetischen Funktionen, die zur Auswahl der ROIs geführt haben, sind folgenden Quellen entnommen: (1) Rolls (2016), (2) Tuulari et al. (2015), (3) Tataranni et al. (1999), (4) Anderberg et al. (2014), (5) Miller und Cohen (2001), (6) Richter-Levin (2004), (7) du Boisgueheneuc et al. (2006), (8) Gharabaghi et al. (2006), (9) Tong (2003).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen

##### 3.1.1 Western-Blot-Detektion von GLUT3



**Abb. 6: GLUT3-Banden in verschiedenen Lysaten humanen Ursprungs**

Nicht quantitativer Western-Blot zur Darstellung der erfolgreichen Identifizierung von GLUT3-Protein. Der Pfeil zeigt auf eine 48 kDa-Bande, die als Einzige in allen untersuchten Zelllinien und Gewebearten erschien und auf die sich die quantitative Auswertung bezüglich GLUT3-Protein in PBMCs und EBV-LCLs bezieht. In PBMCs (6) ist eine deutliche breite Bande bei 48 kDa zu sehen. In EBV-LCLs (7), sowie in weiteren Lysaten aus immortalen bzw. kultivierten Zelllinien (2, 3, 4) erscheint zusätzlich eine unspezifische Bande bei ca. 38 kDa, in Spermatozoenlysaten (5) eine zusätzliche Bande bei ca. 41 kDa, in Hirnlysat eine Bande zwischen 55 und 60 kDa.

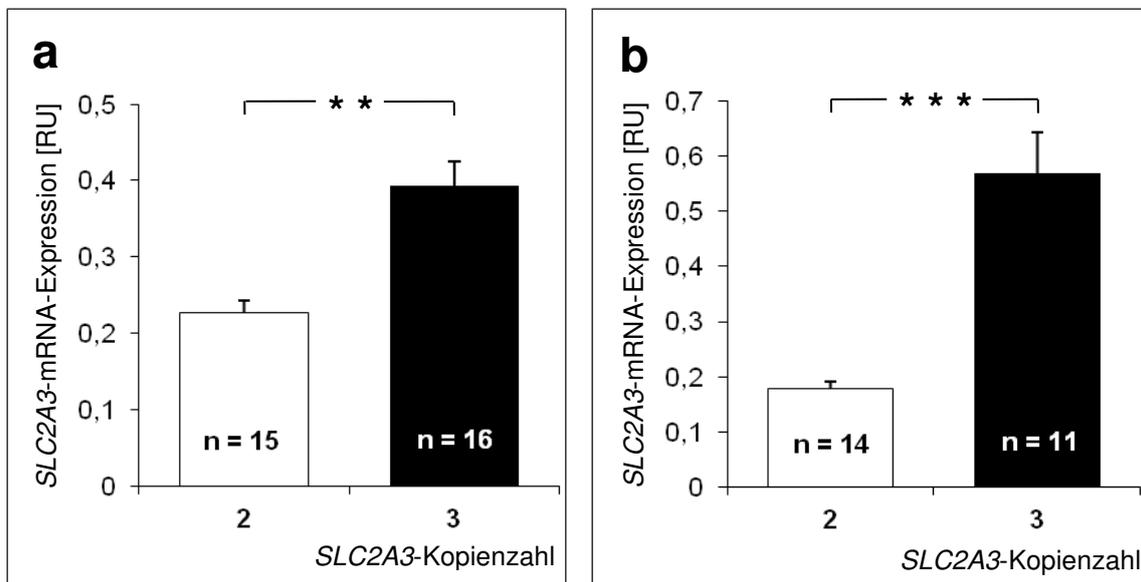
- 1) Humanes Hirnlysate
- 2) U87-MG Glioblastomzelllinie (Santa Cruz Biotechnologies)
- 3) SH-SY5Y Neuroblastomzelllinie
- 4) Fibroblastoide Zelllinie
- 5) Spermatozoen
- 6) PBMCs
- 7) EBV-LCLs

Der verwendete GLUT3-Antikörper (ab15311, Abcam) ist gegen die C-terminal intrazytosolisch liegenden 12 Aminosäuren SIEPAKETTNTNV von humanem GLUT3-Protein gerichtet. Da für diesen Antikörper kein spezifisches Blockpeptid verfügbar war, wurde die Spezifität durch verschiedene Positivkontrollen getestet (siehe Abb. 6). Es konnte in allen untersuchten Proben humanen Ursprungs eine deutliche Bande bei ca. 48 kDa detektiert werden. In humanen Hirnlysaten wurde eine zusätzliche Bande zwischen 55 und 60 kDa

gefunden, in Spermatozoen eine zusätzliche Bande bei etwa 41 kDa. In allen untersuchten Zelllinien, die längere Zeit kultiviert worden waren, nicht aber in frisch gewonnenen PBMCs, Spermatozoen und humanen Hirnproben erschien eine zusätzliche Bande bei ca. 38 kDa. Während sich die relative Intensität der 48 kDa-Bande in 3 aufeinanderfolgenden Versuchen mit 16 Samples aus Lymphoblasten gut reproduzieren ließ (Retest-Reliabilität 0,83 – 0,90), war dies für die 38-kDa-Bande nicht der Fall (Retest-Reliabilität 0,29 – 0,69). Zudem erschien die 38 kDa Bande im Gegensatz zur 48 kDa-Bande nicht bei Verwendung eines anderen GLUT3-Antikörpers (ab53059) mit einem größeren intrazytosolischen Epitop (AS 216-265). Bei Verwendung von ab53059 wurde ebenfalls in allen getesteten humanen Lysaten (Lymphoblasten, PBMCs, Hirnlysat, U87-MG) eine deutliche Bande bei ca. 48 kDa detektiert. Die 48 kDa-Bande erschien bei PBMCs stets breiter als in EBV-LCL-Proben. Kontrollen mit Inkubation der geblotteten Nitrozellulosemembran alleine mit dem Sekundärantikörper ergaben eine unspezifische Bande bei ca. 42 kDa. Das rechnerische Molekulargewicht der großen GLUT3-Splice-Variante beträgt ca. 54 kDa.

### 3.1.2 Basale *SLC2A3*-Expression

#### 3.1.2.1 mRNA-Expression

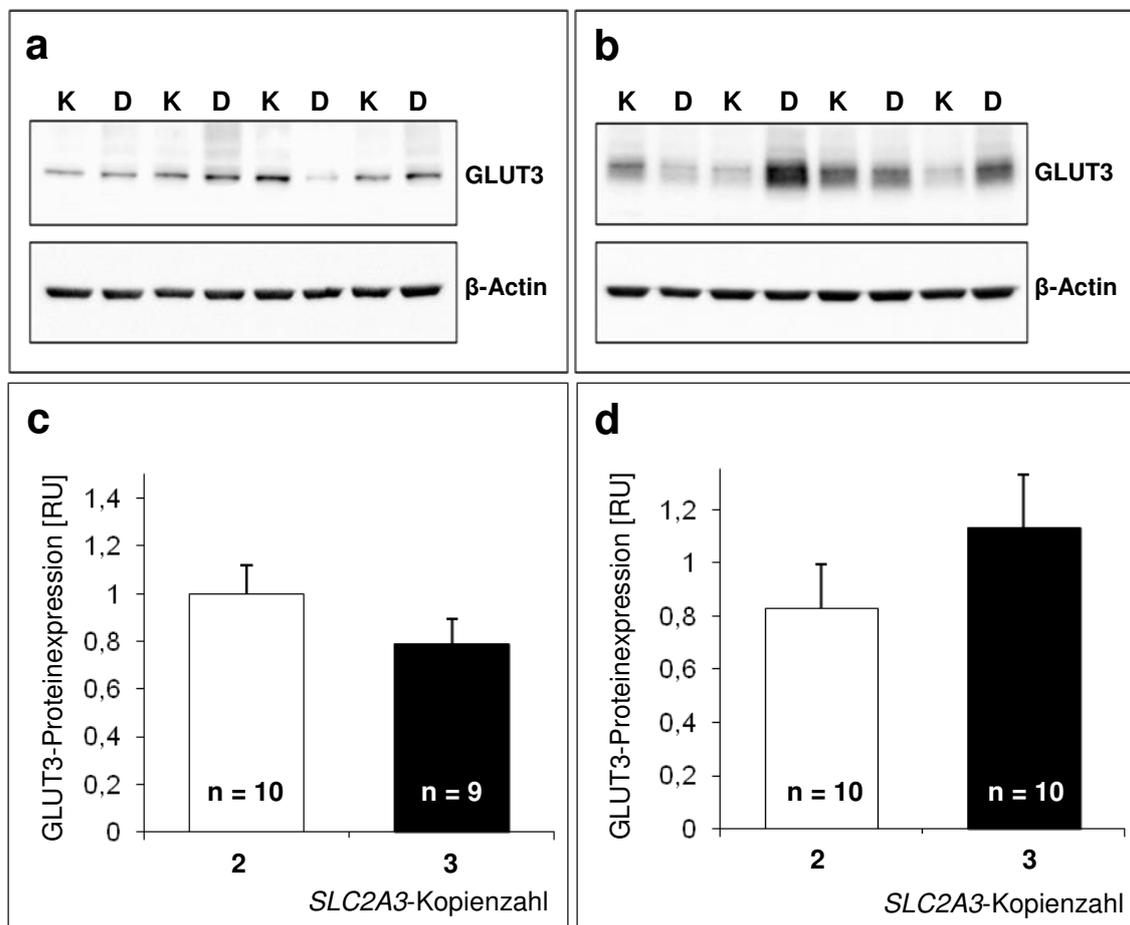


**Abb. 7:** *SLC2A3* mRNA-Expression in EBV-LCLs und PBMCs

Mittlere basale *SLC2A3*-mRNA-Expression und Standardfehler in EBV-LCLs (a), sowie PBMCs (b) in relativen Einheiten [RU]. *SLC2A3*-Kontrollzelllinien (Kopienzahl = 2, weiße Balken)- und Duplikationszelllinien (Kopienzahl = 3, schwarze Balken) im Vergleich. Der Versuch wurde in Triplikaten für jedes Sample durchgeführt und die Ergebnisse repliziert. MWU-Test: \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$ ; n: Stichprobengröße.

Die relative Höhe der basalen *SLC2A3*-mRNA-Expression wurde sowohl in PBMCs als auch in EBV-LCLs durch qRT-PCR bestimmt und die Mittelwerte der normalisierten Expressionswerte von Duplikations- und Kontrollgruppe miteinander verglichen. Wie Abb. 7 zu entnehmen ist, wurde in PBMCs ein höchst signifikanter, in EBV-LCLs ein hoch signifikanter Effekt der *SLC2A3*-Duplikation auf die Höhe der basalen *SLC2A3*-mRNA-Expression gefunden, der sich in PBMCs in einer Expressionserhöhung von über 200 % (MWU-Test:  $p < 0,001$ ), in EBV-LCLs über 70 % (MWU-Test:  $p < 0,01$ ) manifestierte. Siehe hierzu auch Merker (2014).

### 3.1.2.2 Protein-Expression



**Abb. 8: Untersuchung der basalen GLUT3-Expression in EBV-LCLs und PBMCs**

Repräsentative Western-Blot Banden für GLUT3 und das Referenzprotein  $\beta$ -Actin in EBV-LCLs (a) und PBMCs (b) von *SLC2A3*-Kontrollprobanden (K) mit 2 Genkopien und *SLC2A3*-Duplikationsträgern (D). Weder in EBV-LCLs (c), noch in PBMCs (d) konnte ein signifikanter Unterschied in der basalen GLUT3-Proteinexpression zwischen Zellen von *SLC2A3*-Duplikationsträgern (schwarze Balken) und Kontrollen mit 2 *SLC2A3*-Genkopien (weiße Balken) gefunden werden. Expressionsangabe in relativen Einheiten [RU], Fehlerindikatoren repräsentieren den Standardfehler, n: Stichprobengröße.

Für die relative Quantifizierung der GLUT3-Protein-Level in PBMCs und EBV-LCLs wurde eine denaturierende SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot durchgeführt. Ebenso wie bei der Analyse der mRNA-Expressionsstärke wurden *SLC2A3*-Duplikations- und Kontrollzelllinien bezüglich der relativen Höhe der GLUT3-Proteinexpression verglichen. Wie bereits in der Arbeit von Merker (2014) beschrieben fand sich weder in PBMCs (t-Test:  $p = 0,265$ ), noch in EBV-LCLs (t-Test:  $p = 0,219$ ) zwischen den beiden Gruppen ein signifikanter Unterschied in der Höhe der GLUT3-Proteinexpression (siehe Abb. 8).

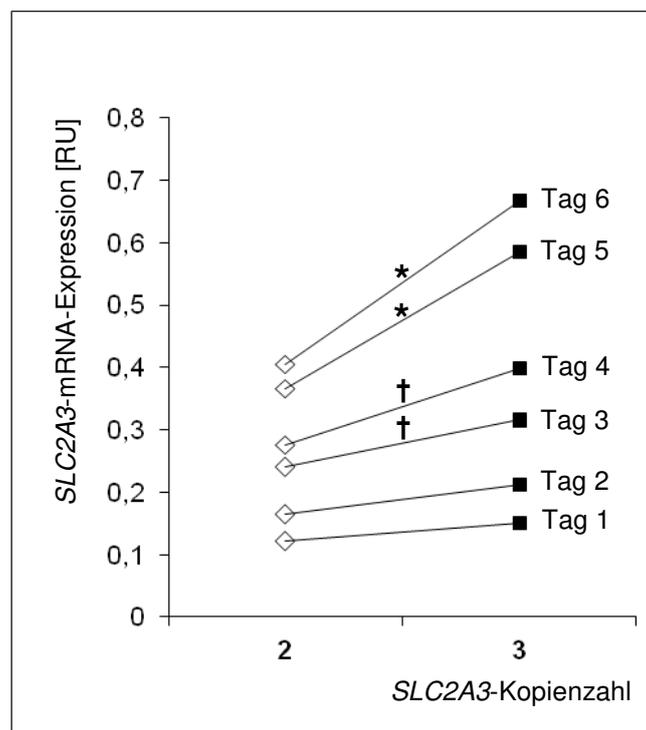
### 3.1.3 *SLC2A3*-Expression im dynamischen Modell

#### 3.1.3.1 *SLC2A3*-mRNA-Expression im Aushungerungsversuch

Mit Hilfe eines Aushungerungsversuches wurde getestet, ob die *SLC2A3*-Expression unter metabolischem Stress in EBV-LCLs abhängig von der *SLC2A3*-Kopienzahl reguliert wird. EBV-LCLs mit zwei ( $n=4$ ) und drei ( $n=4$ ) Kopien des *SLC2A3*-Gens wurden gleichzeitig unter standardisierten Bedingungen ausgesät und sechs Tage lang kein frisches Kulturmedium zugeführt, was zu einem deutlich sichtbaren Farbumschlag des Phenolrot-Indikators führte.

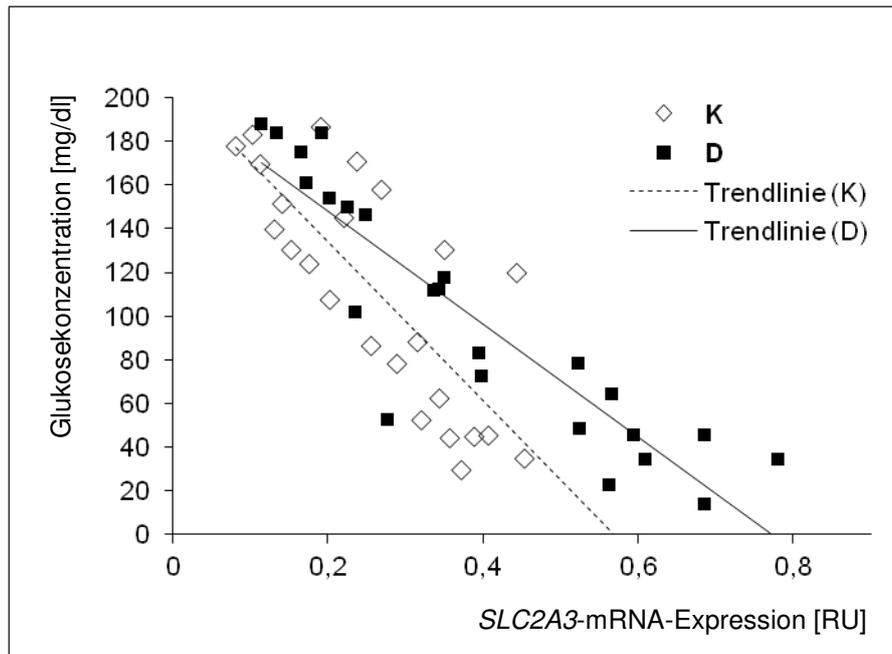
Sowohl in Duplikations- als auch Kontrollkulturen steigerte sich die *SLC2A3*-mRNA-Expression täglich. In Duplikationskulturen betrug die durchschnittliche tägliche Expressionssteigerung 35 %, in Kontrollkulturen 28 %, so dass der nominale Unterschied zwischen Duplikations- und Kontrollkulturen von Tag zu Tag größer wurde (24 % an Tag 1, 64 % an Tag 6). Verglichen mit den Expressionswerten von Versuchstag 1 zeigte sich die *SLC2A3*-mRNA-Expression an Versuchstag 6 in den Kontrollkulturen 3,3-fach, in den Duplikationskulturen 4,4-fach gesteigert, ohne dass ein Plateau erreicht wurde. Die *SLC2A3*-mRNA-Expressionssteigerung zwischen Tag 1 und Tag 6 war in Duplikationskulturen signifikant höher als in Kontrollkulturen (MWU-Test:  $p = 0,021$ ). Am dritten (MWU-Test:  $p = 0,081$ ) sowie am vierten Tag (MWU-Test:  $p = 0,083$ ) nach der Aussaat zeigte sich ein statistischer Trend, am fünften und sechsten Tag nach der Aussaat wurde der Unterschied in der quantitativen *SLC2A3*-Expression zwischen Duplikations- und Kontrollkulturen signifikant (MWU-Test:  $p$ -Wert jeweils 0,021), (siehe Abb. 9). Zur Identifikation möglicher kompensatorischer Veränderungen in anderen Glukosetransporter-Genen wurde zudem die *SLC2A1*-Expression gemessen. Weder der Faktor Zeit, noch die *SLC2A3*-Kopienzahl hatten hierbei einen signifikanten Effekt auf die *SLC2A1*-Expression.

Am vierten Tag nach der Aussaat war in allen beteiligten Zelllinien ein Wachstumsplateau erreicht. Mit einer Konzentration von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät wurde an Tag 5 die höchste Durchschnittsdichte von  $7,4 \times 10^5$  Zellen/ml gemessen. Die in den Mediumsüberständen gemessenen Glukosekonzentrationen fielen von Tag zu Tag ab, so dass sich sowohl in Duplikations- (Pearson-Korrelationskoeffizient =  $-0,90$ ; t-Test:  $p = 1,69 \times 10^{-9}$ ), als auch in Kontrollkulturen (Pearson-Korrelationskoeffizient =  $-0,78$ ; t-Test:  $p = 6,69 \times 10^{-6}$ ) eine höchst signifikant negative Korrelation zwischen der Höhe der *SLC2A3*-mRNA-Expression und Mediums-Glukosekonzentration ergab (siehe Abb. 10).



**Abb. 9: *SLC2A3* mRNA-Expression im Aushungerungsversuch**

Sowohl in EBV-LCLs mit 2 (leere Rauten, Mittelwerte aus  $n = 4$ ) als auch mit 3 *SLC2A3*-Genkopien (schwarze Quadrate, Mittelwerte aus  $n = 4$ ) steigerte sich die relative *SLC2A3*-mRNA-Expression (y-Achse [RU]), gemessen mit qRT-PCR, im Rahmen eines 6-tägigen Aushungerungsversuches (Tag 1 bis Tag 6) täglich. Die *SLC2A3*-Expressionssteigerung war in *SLC2A3*-Duplikationskulturen signifikant höher als in Kontrollkulturen (MWU-Test:  $p = 0,021$ ). Ab dem 3. Versuchstag zeigte sich ein statistischer Trend († MWU-Test:  $p$ , Tag 3 =  $0,081$ ;  $p$ , Tag 4 =  $0,083$ ), am 5. Und 6. Versuchstag war die *SLC2A3*-mRNA-Expression in Duplikationskulturen signifikant höher als in den Kontrollkulturen (\* MWU-Test:  $p = 0,021$ ).



**Abb. 10: Negative Korrelation zwischen Glukose-Konzentration und *SLC2A3*-Expression**

Im Aushungerungsversuch zeigte sich in EBV-LCLs eine höchst signifikant negative Korrelation zwischen Medium-Glukosekonzentrationen (y-Achse) und der relativen *SLC2A3*-mRNA-Expression (x-Achse) sowohl in Duplikationen (D) - (schwarze Quadrate,  $R = -0,90$ ,  $R^2 = 0,81$ ; t-Test:  $p = 1,69 \times 10^{-9}$ ) als auch in Kontrollkulturen (K) (leere Rauten,  $R = -0,78$ ,  $R^2 = 0,61$ ; t-Test:  $p = 6,69 \times 10^{-6}$ ).

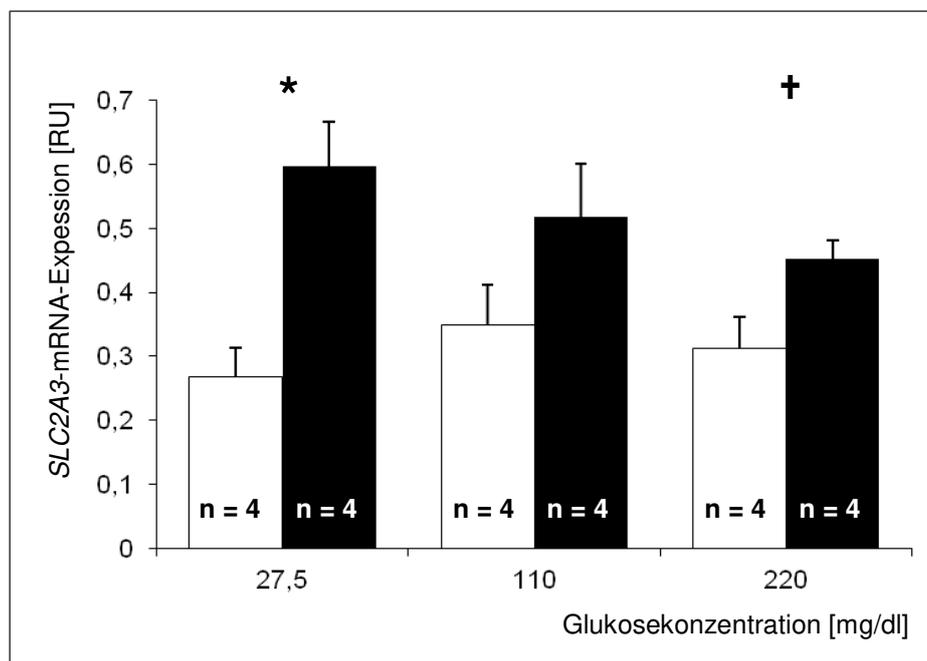
### 3.1.3.2 *SLC2A3*-Protein-Expression im Aushungerungsversuch

Verglichen wurde die GLUT3-Proteinexpression von Duplikations- und Kontrollkulturen in den Proteinlysaten der Versuchstage 1 und 6 des Aushungerungsversuches. Weder an Tag 1 (MWU-Test,  $p=0,248$ ) noch an Tag 6 (MWU-Test,  $p=0,564$ ) fand sich dabei ein signifikanter Unterschied zwischen Duplikations- und Kontrollkulturen. Die Betrachtung des longitudinalen Verlaufs der GLUT3-Expression (Tag 1 verglichen mit Tag 6) ergab für Kontrollkulturen keine signifikante Veränderung (WCX-Test,  $p = 0,144$ ) wohl aber einen statistischen Trend für eine gesteigerte GLUT3-Expression in Duplikationskulturen in ausgehungertem Zustand (WCX-Test,  $p = 0,068$ ).

### 3.1.3.3 Glukose-Stimulationsversuch

Um herauszufinden, ob die Glukosekonzentration im Zellkulturmedium einen Einfluss auf die *SLC2A3*-mRNA-Expression in EBV-LCLs hat, wurden dieselben Zellkulturpopulationen wie im Aushungerungsversuch für 48 Stunden in Kulturmedien mit drei verschiedenen Glukosekonzentrationen (220 mg/dl, 110 mg/dl, 27,5 mg/dl) kultiviert. Die

Glukosekonzentrationen wurden so ausgewählt, dass sie im oberen, mittleren und unteren Bereich der beim Aushungerungsversuch gemessenen Mediums-Glukosekonzentrationen lagen (siehe Abb. 10). Unter allen drei Bedingungen war die *SLC2A3*-mRNA-Expression in den Duplikationskulturen nominal höher als in den Kontrollkulturen (siehe Abb. 11), wobei der größte Unterschied bei der niedrigsten Glukosekonzentration gefunden wurde (prozentualer Unterschied bei 27,5 mg/dl Glukose: 122 %, bei 110 mg/dl: 48 %, bei 220 mg/dl: 45 %). Bei der niedrigsten Glukosekonzentration war dieser Unterschied signifikant (MWU-Test:  $p = 0,029$ ), bei 220 mg/dl Glukose zeigte sich ein statistischer Trend (MWU-Test:  $p = 0,057$ ).



**Abb. 11: *SLC2A3* mRNA-Expression unter verschiedenen glykämischen Bedingungen**

Relative *SLC2A3*-mRNA-Expression in EBV-LCLs unter Kultivierung mit verschiedenen Glukosekonzentrationen (y-Achse: 27,5 mg/dl, 110 mg/dl, 220 mg/dl). Bei der niedrigsten Glukosekonzentration zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied (\* MWU-Test:  $p = 0,029$ ) zwischen *SLC2A3*-Duplikations- (schwarze Balken) und Kontrollkulturen (weiße Balken), bei 220 mg/dl zeigte sich ein statistischer Trend († MWU-Test:  $p = 0,057$ ). Der nominale Unterschied zwischen *SLC2A3*-Duplikations- und Kontrollkulturen ist bei der niedrigsten Glukosekonzentration am höchsten. Fehlerindikatoren repräsentieren den Standardfehler, n: Stichprobengröße.

## 3.2 Ergebnisse der fMRT-Untersuchung

### 3.2.1 Ergebnisse der psychometrischen Untersuchungen

Die drei untersuchten Probandengruppen unterschieden sich nicht in Alter und BMI, zeigten keine Unterschiede bei der Präferenz verschiedener Nahrungsmittel und waren gruppenunabhängig nach dem Versuch hochsignifikant hungriger als vor dem Versuch (siehe Tab. 7).

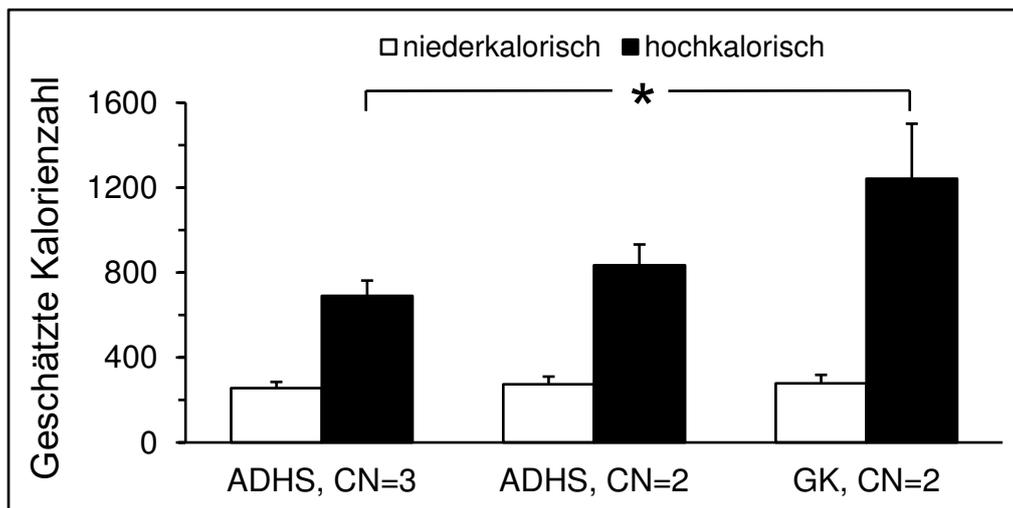
	<b>Kontrollen</b> <i>SLC2A3</i> CN=2	<b>ADHS</b> <i>SLC2A3</i> CN=3	<b>ADHS</b> <i>SLC2A3</i> CN=2	<b>Statistik</b>	
	<i>M</i> ( <i>SD</i> )	<i>M</i> ( <i>SD</i> )	<i>M</i> ( <i>SD</i> )	<i>F</i> (2, 39)	<i>p</i>
Alter	44.9 (11.0)	42.1 (12.8)	40.7 (9.7)	0.5	.602
BMI	26.2 (4.6)	26.8 (5.8)	24.9 (5.3)	0.5	.626
<sup>a</sup> Präferenz Süßes	6.4 (2.8)	7.5 (1.6)	6.3 (2.1)	1.2	.322
<sup>a</sup> Präferenz Fettiges	3.6 (1.9)	4.9 (2.2)	4.7 (2.6)	1.3	.288
<sup>a</sup> Präferenz Fleisch	6.6 (1.6)	6.0 (2.3)	5.8 (3.0)	0.4	.689
<sup>a</sup> Präferenz Fisch	6.4 (2.4)	5.4 (2.4)	6.2 (2.8)	0.6	.573
<sup>a</sup> Präferenz Gemüse	6.9 (1.5)	7.1 (1.8)	7.1 (1.5)	0.04	.962
<sup>a</sup> Präferenz Obst	7.3 (1.5)	6.4 (2.3)	6.9 (2.0)	0.7	.513
<sup>a</sup> Präferenz Salat	7.5 (1.5)	6.4 (2.4)	6.5 (2.2)	1.0	.366
<sup>a</sup> Präferenz Getreide	6.3 (1.9)	7.0 (1.4)	6.6 (1.8)	0.5	.601
<sup>a</sup> Präferenz Milch	6.9 (2.1)	6.9 (1.6)	6.6 (2.0)	0.1	.913
<sup>a</sup> Präferenz Eier	5.8 (1.9)	6.2 (2.0)	4.6 (1.8)	2.5	.092
Hunger vor Versuch	3.2 (2.4)	2.6 (1.5)	3.2 (2.0)	$F_{\text{Zeit}}=56.0$	$p<.001$
Hunger nach Versuch	5.5 (2.2)	5.6 (2.8)	5.5 (2.2)		

<sup>a</sup>Skala von 1 (überhaupt nicht mögen) bis 9 (sehr mögen).

#### Tab. 7: Deskriptive Daten

Deskriptive Daten für gesunde Kontrollen mit 2 *SLC2A3*-Genkopien (CN =2), ADHS Patienten mit *SLC2A3*-Duplikation (CN = 3) und ADHS-Patienten mit 2 *SLC2A3*-Genkopien. Gezeigt sind die Mittelwerte (*M*) mit Standardabweichung (*SD*) sowie die statistische Auswertung. Es zeigten sich keine Gruppenunterschiede bezüglich Alter, BMI und Präferenz der abgefragten Nahrungsmittel. Nach dem Versuch waren die Probanden gruppenunabhängig ( $F_{\text{Gruppe} \times \text{Zeit}} = 1.7, p = 0.202$ ) hungriger ( $p < 0.001$ ) als vor dem Versuch.

Die ADHS-Patienten mit *SLC2A3*-Duplikation schätzten den Kaloriengehalt hochkalorischer Nahrungsmittel signifikant niedriger ein als gesunde Kontrollprobanden mit 2 *SLC2A3* Kopien ( $p=0,050$ ). Zudem schätzten alle drei untersuchten Probandengruppen die Kalorienzahl niedrigkalorischer Nahrung hochsignifikant niedriger ( $p<0,001$ ) ein als die Kalorienzahl hochkalorischer Nahrung (siehe Abb. 12).



**Abb. 12: Einfluss des *SLC2A3* Genotyps auf die Einschätzung der Kalorienzahl**

ADHS-Patienten mit *SLC2A3*-Duplikation ( $n=14$ ; ADHS, CN=3), ohne *SLC2A3*-Duplikation ( $n=14$ ; ADHS, CN=2) und gesunde Kontrollen ohne *SLC2A3*-Duplikation ( $n=14$ ; GK, CN=2) schätzten die Kalorienzahl von hoch- und niedrigkalorischen Lebensmitteln. Varianzanalyse mittels ANOVA bei wiederholten Messungen mit der Gruppenzugehörigkeit als Inter-Subjekt-Faktor und Essensstimulus (hoch-, niedrigkalorisch) als Intra-Subjekt-Faktor: Grenzwertiger Effekt der Gruppenzugehörigkeit ( $F_{2,39}=2,6$ ;  $p=0,088$ ), hochsignifikanter Effekt des Essensstimulus ( $F_{1,39}=60,0$ ;  $p<0,001$ ), Interaktion Gruppenzugehörigkeit x Essensstimulus ( $F_{3,39}=3,4$ ;  $p=0,044$ ), wobei ADHS-Patienten mit Duplikation die Kalorien des hochkalorischen Essens signifikant niedriger einschätzten als die gesunden Kontrollen ( $p=0,050$ ).

Bei der subjektiven Bewertung der Schmackhaftigkeit hoch- und niedrigkalorischer Nahrungsmittel zeigte sich kein Unterschied zwischen den drei Probandengruppen ( $F(2, 39) = 0,1$ ;  $p = 0,93$ ). Die niedrigkalorischen Nahrungsmittel wurden ohne Unterschied zwischen den drei Probandengruppen durchschnittlich als schmackhafter beurteilt als die hochkalorischen Nahrungsmittel ( $F(2, 39)$ ;  $p = 0,009$ ).

### 3.2.2 Keine Gruppenunterschiede bei der univariaten Gesamthirn-Analyse

Bei der univariaten Gesamthirn-Analyse konnten bei der voxelweisen Analyse keine signifikanten Unterschiede (korrigiertes Signifikanzniveau  $p < 0,05$ , FDR) zwischen den untersuchten Probandengruppen festgestellt werden.

### 3.2.3 Gruppenunterschiede bei der multivariaten Analyse

Bei der multivariaten Datenanalyse der ereigniskorrelierten Bildgebung auf Gesamthirn-Ebene waren nach maschinellem Lernen alle drei Gruppen durch binäre Klassifikatoren voneinander unterscheidbar (siehe Tab. 8). Bei den Essensstimuli fand sich eine signifikant ( $p < 0,05$ ) überzufällig gute Trefferquote der Gruppenzuordnung beim Vergleich der Risikoträger (ADHS) mit den gesunden Kontrollen beim Betrachten hochkalorischer Stimuli. Dies war mit 0,86 die beste gemessene Trefferquote in diesem Versuch (mit 86-prozentiger Wahrscheinlichkeit richtige Gruppenzuordnung durch den Klassifikator). In der Gruppe der ADHS-Probanden war dieser Genotyp-Effekt jedoch nicht zu beobachten.

Beim Betrachten niederkalorischer Stimuli zeigte sich kein Genotyp-Effekt, beide ADHS-Gruppen waren jedoch mit überzufällig guter Trefferquote von den gesunden Kontrollen unterscheidbar. Beim Betrachten neutraler und negativ emotionaler Bilder konnten ADHS-Probanden ohne die Risikogenvariante von gesunden Kontrollen durch den Algorithmus nach maschinellem Lernen ebenfalls mit signifikanter Trefferquote unterschieden werden, es zeigte sich hier aber kein Genotyp-Effekt (Probanden mit 2 *SLC2A3* Genkopien unabhängig von Diagnose nicht von *SLC2A3*-Duplikationsträgern unterscheidbar). Ein Genotyp-Effekt zeigte sich bei den positiv emotionalen Stimuli: hier konnten durch den Algorithmus die ADHS-Probanden mit *SLC2A3*-Duplikation mit signifikanter Trefferquote sowohl von ADHS-Probanden als auch von gesunden Kontrollen jeweils ohne die Risikogenvariante unterschieden werden. Überraschenderweise konnten die beiden ADHS-Probandengruppen (2 vs. 3 *SLC2A3* Genkopien) auch beim Betrachten des Fixationsblockes voneinander unterschieden werden (Trefferquote 64 %), nicht aber die ADHS-Patienten von den gesunden Kontrollprobanden.

Bei der multivariaten Analyse innerhalb verschiedener ROIs (siehe Tab. 6) wurde durch keines der ROI-basierten Modelle ein klassifikatorischer Unterschied zwischen den drei Probandengruppen festgestellt.

Vergleichsgruppen	niederkal.	hochkal.	positiv	negativ	neutral	Fix. block
ADHS, CN=3 vs. ADHS, CN=2	ns	ns	0.64	ns	ns	0.64
ADHS, CN=3 vs. GK, CN=2	0.71	0.86	0.61	ns	ns	ns
ADHS, CN=2 vs. GK, CN=2	0.79	ns	ns	0.61	0.79	ns

**Tab. 8: Ergebnisse der multivariaten Gesamthirn-Datenanalyse**

Aufgeführt sind die signifikanten (alle  $p < 0,05$ ; ns = nicht signifikant) Trefferquoten (korrekte Zuordnung in die jeweilige Diagnose/Genotyp-Gruppe), die durch maschinelles Lernen mit einem Klassifikator für die jeweiligen Konditionen (hoch- vs. niederkalorische Essensstimuli, positiv und negativ emotionale Stimuli, sowie neutrale Reize und der Fixationsblock) erreicht werden konnten. Die zuverlässigste Unterscheidbarkeit (richtige Zuordnung in 86 % der Fälle) besteht zwischen ADHS-Probanden mit *SLC2A3*-Duplikation (ADHS, CN=3) und gesunden Kontrollen ohne *SLC2A3*-Duplikation (GK, CN=2) beim Betrachten von hochkalorischen Essensstimuli.

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der molekularbiologischen Ergebnisse

#### 4.1.1 Western-Blot Detektion von GLUT3

GLUT3 wurde im Western-Blot als Bande von ca. 48 kDa gefunden. Diese Bande war die einzige, die in humanen Proteinlysaten verschiedenen Ursprungs mit mehreren Antikörpern (ab15311, ab41525, ab53059) zuverlässig reproduziert werden konnte (siehe Kap. 3.1.1). Das rechnerische Molekulargewicht von GLUT3 beträgt allerdings 54 kDa. Dieser Widerspruch trat in der Vergangenheit bereits in einer Vielzahl von Studien auf. GLUT3-Protein migriert im SDS-Gel weiter als erwartet zwischen 45 und 50 kDa, was sowohl bei menschlichen Lysaten (Shepherd et al. 1992, Haber et al. 1993, Grover-McKay et al. 1999, Hahn et al. 2001, Belkacemi et al. 2005) als auch bei Proben von Nagern (Gould et al. 1992, Maher et al. 1994, Fattoretti et al. 2001, Rajakumar et al. 2004) berichtet wurde. Ein möglicher Erklärungsversuch für ein zu klein bestimmtes Molekulargewicht ist die Proteolyse. Da den Zelllysaten ein Proteaseinhibitor zugesetzt wurde (siehe Kap. 2.1.5.1), ist Proteolyse allerdings ein wenig plausibler Erklärungsansatz. Eine mögliche Begründung wird durch Miyake et al. (1978), sowie Rath et al. (2009) geliefert: Durch eine im Vergleich zu löslichen Proteinen höhere Bindungskapazität für das Detergenz SDS wandern Membranproteine im SDS-Gel häufig weiter als erwartet. Verwendet man dann, wie üblich, einen löslichen Proteinmarker zur Größenbestimmung, so wird das Molekulargewicht unterschätzt. Dieses Phänomen wurde unter anderem für ein GLUT3-Fusionsprotein (Yang et al. 2009b) und für den humanen Adenosin-Rezeptor (Weiss und Grisshammer 2002) beschrieben. In humanem Hirnlysate, U87-MG-Zellen, sowie PBMCs zeigte sich die GLUT3-Bande unscharf bis zu etwa 45 kDa verbreitert, was für das Vorliegen mehrerer verschiedener Isoformen spricht, die sich in ihrem Molekulargewicht geringfügig voneinander unterscheiden. Im Falle von GLUT3 ist dies am ehesten durch differentielle Glykosylierungsmuster zu erklären, da alle Mitglieder der GLUT-Familie stark glykosyliert sind (Augustin 2010). Bemerkenswerterweise zeigte sich im Gegensatz zu den PBMCs in den daraus gewonnenen EBV-LCLs eine schmalere GLUT3-Bande, was für einen teilweisen Verlust der N-Glykosylierung unter Zellkulturbedingungen spricht. Der Verlust von Zuckerketten könnte dem viralen Transformationsprozess oder dem Mangel wichtiger Glykosylierungsbausteine, wie z. B. Mannose, im Zellkulturmedium geschuldet sein.

Eine zusätzliche Bande bei etwa 38 kDa zeigte sich nur in kultivierten Zelllinien, darunter auch in einem käuflich erworbenen Proteinlysate aus U87-MG-Zellen und nur unter Verwendung des Antikörpers ab15311. Da sich die relative Intensität dieser Bande in aufeinanderfolgenden Versuchen mit denselben Proben nicht reproduzieren ließ (siehe Kap. 3.1.1), ist davon auszugehen, dass sie durch unspezifische Bindung des Primärantikörpers entsteht. Im Hirnlysate zeigte sich eine zweite Bande bei ca. 58 kDa (siehe Abb. 6). Die 58 kDa-Bande könnte durch eine phosphorylierte Isoform des Proteins erklärt werden, da Glukosetransporter eine Konsensussequenz für Phosphorylierung tragen (Dwyer 2001). Ein vergleichbares doppeltes Bandenmuster wurde für GLUT3 der Schafsplazenta (Das et al. 2000) sowie Spermatozoen Iberischer Schweine gefunden (Sancho et al. 2007). Da die Inkubation der geblotteten Nitrozellulosemembran mit dem Sekundärantikörper alleine nur eine unspezifische Bande bei ca. 42 kDa ergab, die bei Einsatz des Primärantikörpers nicht mehr sichtbar war, sind alle in Abb. 6 gezeigten Banden auf Bindung des Primärantikörpers (ab15311) zurückzuführen.

#### **4.1.2 Starker Gendosiseffekt der *SLC2A3*-Duplikation auf mRNA-Ebene**

In beiden verwendeten Zellmodellen, PBMCs und EBV-LCLs, wurde ein signifikanter Einfluss der *SLC2A3*-Duplikation auf die basale *SLC2A3* mRNA-Expression gefunden, siehe hierzu auch Merker (2014). Mit 220 % in PBMCs und 73 % in EBV-LCLs war der Unterschied zwischen Kontroll- und Duplikationskulturen größer als der rechnerisch erwartete Unterschied von 50 %, wenn man zugrunde legt, dass der Transkriptionsprozess einem annähernd linearen Modell folgt. Die Expressionserhöhung von 73 % in EBV-LCLs ist gut zu vereinbaren mit den Ergebnissen von Yang et al. (2009a), die bei der Untersuchung der gleichen Variante in humanen Fibroblasten auf mRNA-Ebene zwischen Kontroll- und *SLC2A3*-Duplikationskulturen einen mittleren Unterschied von etwa 75 % fanden. Es fällt auf, dass der Unterschied in PBMCs deutlich höher ausfällt als in EBV-LCLs. Dies mag der Abhängigkeit der *SLC2A3*-Expression von hormonellen oder metabolischen Einflüssen geschuldet sein (siehe Tab. 1). Solche Variablen sind unter Kulturbedingungen besser zu kontrollieren. Es ist außerdem zu berücksichtigen, dass PBMCs eine Mischung aus Lymphozyten und Monozyten sind und dadurch interindividuelle Schwankungen der Zellzusammensetzung bestehen, die durchaus zu einer schlechteren Vergleichbarkeit der Samples führen könnten als bei der homogeneren EBV-LCL Stichprobe. Die *SLC2A3*-Expression in Monozyten ist nämlich 8fach höher als in Lymphozyten (Fu et al. 2004). Insgesamt liegt eine starke Evidenz vor, dass die *SLC2A3*-Duplikation im Sinne eines Gen-Dosis-Effekts zu einer erhöhten *SLC2A3*-mRNA-

Expression führt. Dass dieser Gen-Dosis-Effekt auch umgekehrt wirksam ist, konnte Schmidt et al. (2008) an der heterozygoten *SLC2A3*-Knock-Out-Maus zeigen. Die Knock-Out-Maus zeigt sowohl zentral (Gehirn) als auch peripher (Hodengewebe) eine um ca. 50 % verminderte *SLC2A3* mRNA-Expression.

#### 4.1.3 Fehlender Gendosisseffekt der *SLC2A3*-Duplikation auf Proteinebene

Trotz erhöhter *SLC2A3* mRNA-Expression wurde auf Proteinebene weder in PBMCs noch in EBV-LCLs ein signifikanter Unterschied bezüglich relativer GLUT3-Expression im Vergleich zwischen *SLC2A3*-Duplikations- und Kontrollproben gefunden. Während in PBMCs die GLUT3-Expression in Duplikationskulturen nominal um 37 % erhöht war, fand sich in EBV-LCLs umgekehrt eine um 21 % erhöhte Expression in den Kontrollkulturen (siehe Abb. 8). Dies wurde bereits durch Merker (2014) beschrieben und diskutiert.

Unsere Ergebnisse stehen in Konkurrenz zu den Daten von Vittori et al. (2014), die in EBV-LCLs mit der gleichen Methode und dem gleichen Antikörper eine signifikant höhere GLUT3-Expression in Duplikationskulturen fanden. Die Autoren räumen eine erhebliche Varianz sowohl auf biologischer Ebene als auch bedingt durch technische Einschränkungen der semiquantitativen Methode ein. Zudem ist die beschriebene Stichprobe von 5 je Gruppe sehr klein. Daher kann diese Studie kaum als Beweis für einen Dosis-Effekt der *SLC2A3*-Kopienzahl auf Proteinebene gelten. Eine sehr hohe biologische Varianz sowohl in der Kontroll- als auch der Duplikationsgruppe trat auch in unseren Versuchen auf (siehe Abb. 8), so dass möglicherweise die Frage nicht lauten sollte, ob die GLUT3-Proteinexpression generell einem Gen-Dosis-Effekt unterliegt, sondern unter welchen Bedingungen in welchen Gewebearten ein derartiger Effekt auftreten kann. Interessanterweise fanden Vittori et al. (2014) keine erniedrigte GLUT3-Expression in EBV-LCLs von heterozygoten *SLC2A3*-Deletionsträgern, obwohl bei der heterozygoten *SLC2A3*-KO-Maus eine signifikant verminderte GLUT3-Expression in Gehirn- und Hodengewebe festgestellt wurde (Schmidt et al. 2008, Zhao et al. 2010, Stuart et al. 2011).

Die Diskrepanz zwischen starkem Gen-Dosis-Effekt auf mRNA-Ebene einerseits und fehlendem Effekt auf Proteinebene andererseits verwundert auf den ersten Blick, da man intuitiv eine hohe positive Korrelation zwischen mRNA- und Proteinexpression annimmt. Einige Studien konnten allerdings zeigen, dass das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) für die Korrelation zwischen der Höhe der mRNA- und Proteinexpression durchschnittlich kleiner als 0,4 ist, d. h., dass nur etwa maximal 40 % der Varianz der Proteinexpression durch die Höhe der mRNA-

Expression erklärt werden können (Tian et al. 2004, Lundberg et al. 2010, Vogel et al. 2010, Schwanhauser et al. 2011). Die übrigen 60 % lassen sich durch posttranskriptionale und translationale Regulationsprozesse sowie durch Steuerung auf Ebene der Proteindegradation erklären (Vogel und Marcotte 2012).

Ogleich in einer Vielzahl von Veröffentlichungen eine positive Korrelation zwischen *SLC2A3* mRNA- und Proteinexpression gezeigt werden konnte (siehe Tab. 1), machten mehrere Autoren kontraintuitive Beobachtungen für die *SLC2A3*-Expression. Nagamatsu et al. (1994) fanden unter hypoglykämischen Bedingungen eine erhöhte mRNA-Expression bei unveränderter Proteinexpression von *SLC2A3*. Eine andere Gruppe fand bei erhöhten Glukosespiegeln entgegengesetzt veränderte *SLC2A3*-mRNA- und Proteinlevel (Hahn et al. 1998). Unterschiede zwischen mRNA- und Proteinlevel in dynamischen Modellen wurden auch für *SLC2A4* gezeigt (Sivitz et al. 1992).

Eine geringe Korrelation zwischen mRNA- und Proteinexpression bei Glukosetransportern ist möglicherweise für die Aufrechterhaltung der zellulären Glukosehomöostase notwendig. Da GLUT3 eine entscheidende Rolle für die neuronale Energieversorgung spielt, ist es wichtig, dass die Proteinexpression unmittelbar an den zellulären Energiebedarf angepasst werden kann. Eine Steuerung der GLUT3-Expression alleine durch die *SLC2A3* mRNA-Expression wäre demzufolge zu unflexibel, um eine bedarfsgerechte Glukoseaufnahme zu gewährleisten. Bei GLUT3 bekannte Mechanismen der posttranskriptionalen Regulation sind der Insulin-abhängige Einbau des Transporters in die Plasmamembran (siehe Kap. 1.2.3.1) sowie die Steuerung der Expressionshöhe über eine Veränderung der Halbwertszeit, wie es von Khayat et al. (1998) beobachtet wurde.

#### **4.1.4 Effekt der *SLC2A3*-Duplikation in dynamischen Systemen**

In einem zeitabhängigen Modell konnten dynamische Veränderungen der *SLC2A3* mRNA-Expression in EBV-LCLs nachgewiesen werden. Diese dynamischen Veränderungen zeigten sich abhängig von der *SLC2A3*-Kopienzahl. Mit steigender Zelldichte und sinkendem pH-Wert stieg die *SLC2A3* mRNA-Expression im Aushungerungsversuch sowohl in Duplikations- als auch in Kontrollkulturen von Tag zu Tag an. Die Expressionssteigerung fiel in Duplikationskulturen dabei signifikant höher aus als in Kontrollkulturen. Wie schon bei der basalen *SLC2A3*-Expression spiegelten sich die Veränderungen auf mRNA-Ebene nicht eindeutig in den Ergebnissen der durchgeführten Western-Blots. Lediglich in den

Duplikationskulturen zeigte sich hierbei ein statistischer Trend für eine erhöhte GLUT3-Proteinexpression im ausgehungerten Zustand.

Es fällt auf, dass der mittlere Unterschied zwischen Duplikations- und Kontrollkulturen bei diesem Aushungerungsversuch durchweg geringer ist als bei der Bestimmung der basalen *SLC2A3* mRNA-Expression. Dies mag einerseits der kleineren Stichprobe beim Aushungerungsversuch, andererseits der Tatsache geschuldet sein, dass die EBV-LCLs beim Aushungerungsversuch in einer relativ niedrigen Konzentration von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät wurden. Die durchschnittliche Zelldichte lag erst am letzten Versuchstag mit  $7,3 \times 10^5$  Zellen/ml im Bereich der für die Bestimmung der basalen *SLC2A3* mRNA-Expression vorhandenen Zelldichte (siehe Kap. 2.1.3.3) – hier lag der Unterschied zwischen Duplikations- und Kontrollkulturen mit 64 % wieder nahe an dem gemessenen basalen Expressionsunterschied von 73 %.

Der Anstieg der *SLC2A3*-Expression im Aushungerungsversuch weist darauf hin, dass die Höhe der *SLC2A3*-Expression in EBV-LCLs unter metabolischem Stress um einen Faktor von mindestens 4 schwanken kann. Dies liegt im Bereich der *SLC2A3*-Expressionsveränderung, die Nagamatsu et al. (1994) unter hypoglykämischen Bedingungen bei einer neuronalen Zellkultur von Ratten maßen. Unter Hypoxie wurden in menschlichen Zellen sogar bis zu 10-fache Erhöhungen der *SLC2A3*-Expression gemessen (Esterman et al. 1997, Wood et al. 2007).

Sowohl in den Kontroll- als auch in den Duplikationskulturen fand sich eine höchst signifikante negative Korrelation zwischen der Höhe der *SLC2A3*-mRNA-Expression und den im Zellkulturmedium gemessenen Glukosespiegeln (siehe Abb. 10). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Ergebnissen von Nagamatsu et al. (1994), sowie Lee et al. (2000), die unter hypoglykämischen Bedingungen eine erhöhte *SLC2A3*-Expression in Nagergehirnen fanden. Auch auf Proteinebene scheint Hypoglykämie zu einer erhöhten Expression von GLUT3 zu führen (Uehara et al. 1997, Duelli et al. 1999, Lee et al. 2000, Korgun et al. 2002). Bezüglich Hyperglykämie wurden uneinheitliche Ergebnisse, teils eine *SLC2A3*-Expressionssteigerung, teils eine Expressionsminderung gefunden (Boileau et al. 1995, Reagan et al. 1999, Merriman-Smith et al. 2003, Hou et al. 2007, Shen et al. 2009) (siehe Tab. 1). Es scheint demnach unstrittig, dass die *SLC2A3*-Expression in Abhängigkeit von der umgebenden Glukosekonzentration reguliert werden kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Hypothese einer solchen bedarfsabhängigen Regulation von *SLC2A3*. Dennoch lässt die negative Korrelation zwischen Glukosespiegel und *SLC2A3*-Expression, die im hier durchgeführten Aushungerungsversuch gefunden wurde, keinen Kausalschluss auf die Ursache der

Expressionssteigerung zu, da die Glukosekonzentration ebenso wie die *SLC2A3*-Expression eine abhängige Variable ist und für die beobachtete Expressionssteigerung neben sinkenden Glukosekonzentrationen auch andere Faktoren, wie die sich steigernde Zellzahl verbunden mit einer gesteigerten Anzahl von Zell-Zell-Kontakten, der abfallende pH-Wert und der Anfall von Stoffwechselendprodukten, wie zum Beispiel Laktat oder Ammoniak verantwortlich sein können.

Um zu überprüfen, ob die im Aushungerungsversuch gefundenen Ergebnisse auf Änderungen in der Glukosekonzentration im Zellkulturmedium zurückzuführen sind, wurden die gleichen EBV-LCLs wie beim Aushungerungsversuch über 48 Stunden in verschiedenen Glukosekonzentrationen inkubiert. Ebenso wie beim Aushungerungsversuch zeigte sich der größte nominale Unterschied zwischen *SLC2A3*-Duplikations- und Kontrollkulturen bei der niedrigsten Glukosekonzentration. Auch wurde der Expressionsunterschied zwischen Kontroll- und Duplikationskulturen nur bei der niedrigsten Glukosekonzentration signifikant (siehe Abb. 11). Die Ergebnisse der dynamischen Expressionsversuche weisen darauf hin, dass es unter Hypoglykämie zu einem Anstieg der *SLC2A3* mRNA-Expression kommt, der in *SLC2A3*-Duplikationskulturen proportional höher ausfällt als in Kontrollkulturen. Der beobachtete Gen-Dosis-Effekt der *SLC2A3*-Duplikation scheint demnach unter metabolischem Stress höher auszufallen als unter Ruhebedingungen, so dass der ohnehin schon vorhandene quantitative Unterschied in der Genexpression noch verstärkt wird, was in Duplikationszelllinien zu einer Überkompensation mit unklaren Folgen für nachgeschaltete Stoffwechselwege führen könnte. Die Ergebnisse der Untersuchungen zur *SLC2A3*-Expression in dynamischen Modellen verdeutlichen eindrucksvoll die bedarfsabhängige Expression des neuronalen Glukosetransporters, der bei metabolischer Ressourcenknappheit hochreguliert wird und deuten auf einen verstärkten Gen-Dosis-Effekt der *SLC2A3*-Duplikation unter zellulärem Stress hin.

## 4.2 Diskussion der fMRT-Daten

### 4.2.1 Unterschätzung der Kalorienzahl durch *SLC2A3*-Duplikationsträger

ADHS-Patienten mit *SLC2A3*-Duplikation schätzten die Kalorienzahl hochkalorischer Nahrung signifikant niedriger ein als ADHS-Probanden und gesunde Kontrollen mit 2 *SLC2A3* Genkopien. ADHS-Patienten ohne die Risikogenvariante schätzten die Kalorienzahl hochkalorischer Nahrungsmittel nur nominell niedriger ein als die gesunde Kontrollgruppe. Dies deutet darauf hin, dass die Unterschätzung der Kalorienzahl hochkalorischer Nahrung aus einer Phänotyp-Genotyp-Interaktion entsteht. Leider konnte aufgrund der Seltenheit der *SLC2A3*-Duplikation (ca. 1 % in der Allgemeinbevölkerung) keine ausreichende Anzahl gesunder Kontrollprobanden mit *SLC2A3*-Duplikation in die Studie eingeschlossen werden, so dass keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob die Variante auch bei gesunden Kontrollprobanden zu einer niedrigeren Einschätzung der Kalorienzahl hochkalorischer Nahrungsmittel führt. Bezüglich der entsprechenden Einschätzung niedrigkalorischer Nahrungsmittel ergaben sich keine Gruppenunterschiede. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die *SLC2A3*-Duplikation die Reaktivität gegenüber Essensstimuli beeinflusst, was möglicherweise zu einer Fehlbewertung des energetischen Gehaltes der Nahrung führt. Dieser unterschiedlichen Einschätzung der Kalorienzahl hochkalorischer Nahrungsmittel könnten Unterschiede in der Bevorzugung bestimmter Nahrungsmittel oder Unterschiede in der subjektiven Bewertung der Schmackhaftigkeit zugrunde liegen. Gruppenunterschiede in der Nahrungsmittelpräferenz und der Bewertung der Schmackhaftigkeit hoch- und niederkalorischer Nahrungsmittel zeigten sich in den untersuchten Probandengruppen jedoch nicht (siehe Kap. 3.2.1), so dass dies weitestgehend ausgeschlossen zu sein scheint. Es ist zu vermuten, dass eine vergleichsweise „Unterschätzung“ der Kalorienzahl hochkalorischer Nahrungsmittel aufgrund einer kognitiven Fehlbewertung zu einer vermehrten Nahrungsaufnahme bzw. hochkalorischen Ernährung führen kann. Da zwischen den drei untersuchten Probandengruppen kein Unterschied in der Höhe des BMI besteht, ergibt sich hierfür aber zunächst kein objektiver Hinweis. Auch die Theorie, dass eine erhöhte Präferenz hochkalorischer Nahrungsmittel zu einer Unterbewertung der Kalorienzahl führt, kann durch die vorliegende deskriptive Statistik nicht untermauert werden. Sowohl die primäre Unterschätzung der Kalorienzahl hochkalorischer Nahrung als auch eine „bagatellisierende“ Unterbewertung aufgrund erhöhter Präferenz zur Vermeidung kognitiver Dissonanz könnten aber theoretisch zu einer erhöhten Kalorienzufuhr führen und damit das Risiko für eine Gewichtszunahme erhöhen.

#### 4.2.2 Kein Unterschied bei der univariaten Gesamthirn-Analyse

Weder bei der Präsentation von Essensstimuli noch beim Betrachten emotionaler Stimuli zeigten sich bei der univariaten Gesamthirn-Standardanalyse Unterschiede der voxelweisen Aktivierung zwischen den 3 untersuchten Probandengruppen, was darauf hindeutet, dass die *SLC2A3*-Duplikation bei den gewählten Paradigmen keinen signifikanten Einfluss (korrigiertes Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ) auf die neurale Aktivität in umschriebenen Hirnregionen hat. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass die GLUT3-Expression im menschlichen Gehirn ubiquitär und nicht auf einzelne Regionen begrenzt ist, da GLUT3 der wichtigste Glukosetransporter für die Energieversorgung des gesamten Gehirns ist. Es ist daher wahrscheinlich, dass die untersuchte Genvariante entweder zu komplexen Änderungen der Aktivierung verschiedener Hirnregionen und deren Interaktion untereinander führt, was durch das einfache lineare Modell der univariaten voxelweisen Datenanalyse nicht abzubilden ist. Andererseits ist es denkbar, dass die *SLC2A3*-Duplikation nur zu sehr subtilen Änderungen neuraler Aktivität führt, die nach der Korrektur für multiples Testen ebenfalls nicht nachweisbar sind. In nachfolgenden Analysen könnte die Problematik des multiplen Testens durch ROI-Analysen abgeschwächt werden. Hierbei wird entweder der Mittelwert der Aktivierung in verschiedenen Hirnregionen gruppenweise miteinander verglichen oder ein voxelweiser Vergleich zwischen den Gruppen innerhalb verschiedener ROIs durchgeführt. Dieses Vorgehen ist insbesondere dann sinnvoll, wenn gut etablierte Versuchsbedingungen gewählt werden, durch die einzelne Hirnregionen spezifisch angesprochen werden, z.B. das ventrale Striatum durch Aufgaben zur Belohnungserwartung (Hahn et al. 2009). Nachdem die Untersuchungen im dynamischen Zellmodell eine starke bedarfsabhängige *SLC2A3*-Expression nahelegen und darauf hinweisen, dass die *SLC2A3*-Expression unter metabolischem Stress möglicherweise zu einer Überkompensation der Glukoseaufnahme führt, wäre es andererseits interessant zu beobachten, ob eine Beeinflussung des Glukosestoffwechsels, beispielsweise durch eine längere Nüchternperiode (im hier durchgeführten Experiment nur 2 Stunden) oder durch die intravenöse Verabreichung einer Glukoselösung vor Durchführung der bildgebenden Untersuchungen zu einem messbaren Effekt auf die Ruhezustands- oder ereigniskorrelierte neurale Aktivität führt.

### 4.2.3 Gruppenunterschiede bei der multivariaten Analyse

Da in der univariaten Datenanalyse der ereigniskorrelierten fMRT keine Gruppenunterschiede auftraten, wurde zusätzlich eine multivariate Analyse durchgeführt, die Gruppenunterschiede mit höherer Sensitivität erkennen kann als eine univariate Analyse, da hierbei kein voxelweiser Vergleich vorgenommen wird, sondern über das ganze Gehirn verteilte komplizierte Aktivierungsmuster analysiert und auch nichtlineare Zusammenhänge erkannt werden können.

Beim Betrachten hochkalorischer Stimuli konnten ADHS-Probanden mit *SLC2A3*-Duplikation mit einer signifikanten Trefferquote von 86 % von gesunden Kontrollen mit 2 *SLC2A3* Genkopien unterschieden werden. Beim Vergleich gesunde Kontrollen vs. ADHS-Patienten mit 2 *SLC2A3*-Genkopien ergab sich bei diesem Paradigma jedoch kein Unterschied, was darauf hinweist, dass die *SLC2A3*-Duplikation hier mit einem echten hirnpfysiologischen Unterschied assoziiert ist, der die ADHS-Patienten mit *SLC2A3*-Duplikation von gesunden Kontrollen mit hoher Sensitivität unterscheidet. Dieser hirnpfysiologische Unterschied, der aufgrund der multivariaten Natur der Analyse nicht näher spezifizierbar ist, tritt demnach in einer Genotyp-Phänotyp-Kombination auf und es ist davon auszugehen, dass eine Interaktion mit anderen ADHS-spezifischen pathophysiologischen Faktoren besteht. Erstaunlicherweise zeigte sich bei der Einschätzung der Kalorienzahl hochkalorischer Stimuli ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen *SLC2A3*-Duplikationsträgern und gesunden Kontrollprobanden (siehe Abb. 12). Daher kann man davon ausgehen, dass die *SLC2A3*-Duplikation einen Einfluss auf die Reaktivität gegenüber hochkalorischen Essensstimuli hat, wofür sowohl die psychometrischen Daten als auch das Ergebnis der multivariaten Analyse der ereigniskorrelierten fMRT-Daten spricht. Eine veränderte Wahrnehmung, gestörte Verarbeitung oder verzerrte kognitive Bewertung der hochkalorischen Stimuli mögen zu einem Fehlurteil in der Einschätzung des Kaloriengehaltes führen. Dass der Unterschied nur in der multivariaten Auswertung, nicht aber in der univariaten Analyse sichtbar wurde, weist darauf hin, dass die veränderte Reaktivität der *SLC2A3*-Duplikationsträger gegenüber hochkalorischen Essensstimuli mit einem komplexen Muster veränderter Hirnaktivierung assoziiert ist, das mit einem einfachen linearen Modell (univariate Analyse) nicht zu erklären ist. Da beim Betrachten zwischen denselben Probandengruppen sowohl ein Unterschied hinsichtlich der kognitiven Bewertung als auch ein hirnpfysiologisches Korrelat vorzuliegen scheint, liegt der veränderten Reaktivität gegenüber hochkalorischen Stimuli möglicherweise ein spezifischer Endophänotyp zugrunde.

Ein von der Diagnose unabhängiger Genotyp-Effekt für die *SLC2A3*-Kopienzahl zeigte sich beim Betrachten positiv emotionaler Stimuli. Hier unterschieden sich die ADHS-Patienten mit *SLC2A3*-Duplikation sowohl von den gesunden Kontrollen als auch von den ADHS-Patienten ohne die Risikovariante. Mit signifikanten Trefferquoten von 61 % bzw. 64 % (siehe Tab. 8) ist der Effekt allerdings nicht so groß wie beim Betrachten hochkalorischer Stimuli, was darauf hindeutet, dass die Emotionswahrnehmung eher unspezifisch verändert ist und ebenfalls nicht auf die Dysregulation einer einzelnen oder weniger miteinander interagierender Hirnregionen, sondern vielmehr auf ein komplex verändertes neurales Aktivierungsmuster zurückzuführen ist. Selbst beim Betrachten des Fixationskreuzes konnte der Algorithmus die beiden ADHS-Gruppen (*SLC2A3*-Kopienzahl 2 vs. 3) signifikant überzufällig gut voneinander unterscheiden, was darauf hindeutet, dass die multivariate Analyse durch ihre hohe Sensitivität auch eher unspezifische Effekte aufdecken kann, eventuell liegt diesem Effekt aber auch eine unterschiedlich genaue Befolgung der Instruktion, das Fadenkreuz mit den Augen zu fixieren, zugrunde, was zu einer mehr oder weniger gerichteten Aufmerksamkeit führt. Auch eine veränderte Ruhezustandsaktivität ist zu diskutieren. Dies sollte in dieser Arbeit nachfolgenden Analysen funktioneller Konnektivitäten überprüft werden.

Interessanterweise gelang eine signifikante Unterscheidung der drei Versuchsgruppen nur durch die multivariate Analyse auf Gesamthirn-Ebene, jedoch nicht durch multivariate Analysen innerhalb verschiedener Hirnvolumina (siehe Tab. 6), die hypothetisch durch die Versuchsbedingungen aktiviert werden. Dies deutet darauf hin, dass die *SLC2A3*-Duplikation zu einem hirnphysiologischen Unterschied auf einem hohen Organisationsniveau mit Interaktion verschiedener Hirnregionen führt.

Da die Hirnmaps multivariater Muster nur schwer zu interpretieren sind, wurde in dieser Arbeit darauf verzichtet, aus den signifikanten Ergebnissen der multivariaten Analyse Schlüsse auf möglicherweise involvierte Hirnregionen zu ziehen. Zwar gibt es Versuche, den Beitrag einzelner Voxel zur Gesamtklassifikation zu quantifizieren, da die Hirnmaps aber ein nicht lineares multivariates Muster beschreiben, ist ein solches Vorgehen oft Ursache für Miss- und Überinterpretation von multivariaten Ergebnissen und bleibt spekulativ. Es ist nicht möglich, die korrekte Gruppenzuordnung durch den Klassifikator auf den Beitrag einzelner Hirnregionen zurückzuführen, wenn ein multivariates Muster analysiert wird, da die Aktivierung eines Voxels im Gegensatz zur univariaten Datenanalyse nichts darüber aussagt, ob er viel oder wenig zur korrekten Klassifikation beiträgt (Nichols et al. 2016). Würden einzelne Hirnregionen *per se* einen maßgeblichen Beitrag zur Unterscheidung der Gruppen leisten, wäre dies (bei

gleichgerichteter Aktivierung benachbarter Voxel) ggf. bereits bei der univariaten Gesamthirnanalyse sichtbar geworden.

## 5 Ausblick und Zusammenfassung

### 5.1 Ausblick

Bei dieser Arbeit nachfolgenden Experimenten wurde kein Effekt der *SLC2A3*-Duplikation auf die zelluläre Glukoseaufnahme gefunden (Merker et al. 2017), so dass die Frage nach den funktionellen Auswirkungen der *SLC2A3*-Duplikation auf molekularer Ebene zunächst unbeantwortet bleiben muss. Da die *SLC2A3*-Expression gewebeabhängig ist und zudem durch eine Vielzahl an metabolischen, hormonellen und chemischen Faktoren beeinflusst wird (siehe Tab. 1), ist es denkbar, dass auf der *SLC2A3*-Duplikation beruhende molekulare Veränderungen jenseits der mRNA-Ebene in peripheren Zellmodellen nicht detektierbar sind oder erst durch geeignete „zelluläre Stressoren“ provoziert werden müssen.

Unter Berücksichtigung der gewonnenen Erkenntnisse sollten zukünftige Forschungsprojekte, die sich mit den molekularen Auswirkungen der *SLC2A3*-Duplikation beschäftigen, sowohl dem Aspekt der gewebeabhängigen als auch der bedarfsabhängigen *SLC2A3*-Expression Rechnung tragen. Da fraglich ist, inwiefern die an peripheren Zellmodellen gewonnenen Ergebnisse auf neuronale Zellen übertragen werden können, ist es sinnvoll, ein neuronales Zellmodell zu etablieren. In einem solchen Modell könnten beispielsweise Interaktionen des Glukosetransports mit Neurotransmittersystemen und den zugehörigen Transporter- und Rezeptorproteinen oder die Bedeutung von GLUT3 für das Aussprossen von Axonen näher erforscht werden. Geeignete Zellmodelle sind induzierte pluripotente Stammzellen oder das Arbeiten mit einem Überexpressionsvektor in neuronaler Zellkultur. Die bedarfsabhängige *SLC2A3*-Expression birgt die Chance, zeitabhängige Systemveränderungen in dynamischen Modellen zu studieren. Versuche mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen, Hypoxie oder Stimulation mit Psychopharmaka unter Berücksichtigung weiterer ADHS-Kandidatengene, die ebenso wie *SLC2A3* an der Ausbildung von Synapsen und der Neurotransmission beteiligt sind, könnten tiefere Einblicke in glukoseabhängige neuronale Differenzierungsprozesse liefern. Möglicherweise kann ein aberranter Glukosemetabolismus im Zusammenspiel mit prädisponierenden Umweltfaktoren zur Ausbildung ADHS-typischer Endophänotypen führen. Als vulnerables Zeitfenster kommt hierfür insbesondere die Phase der frühen Hirnentwicklung bis etwa zum 10. Lebensjahr in Betracht, da in diesem Zeitraum energieaufwendige Prozesse der Synaptogenese mit einem starken Anstieg der zerebralen Glukoseutilisation unter anderem im frontalen Kortex einhergehen und die bei ADHS beeinträchtigten exekutiven Funktionen ausgebildet werden

(siehe Abb. 2). Als möglicher interagierender Umweltfaktor sollte insbesondere der anekdotisch immer wieder mit der Entstehung von ADHS-Symptomen in Zusammenhang gebrachte Zuckerkonsum speziell bei Probanden mit *SLC2A3*-Duplikation im longitudinalen Verlauf ab dem Kleinkindalter reevaluiert werden. Eine *SLC2A3*-Überexpressionsmaus wäre ein weiteres hilfreiches Modell zur Klärung der Funktionalität der *SLC2A3*-Duplikation. Ein solches Tiermodell könnte potentiell einen Einblick sowohl in verhaltensspezifische als auch zelluläre Korrelate der *SLC2A3*-Duplikation liefern und einen direkten Vergleich mit Forschungsergebnissen an der heterozygoten *SLC2A3*-KO-Maus erlauben.

Weitere bildgebende Untersuchungen könnten sich darauf konzentrieren, noch gezielter ADHS-relevante Netzwerke mit gut etablierten Paradigmen zur Aufmerksamkeitssteuerung oder zum Belohnungslernen zu aktivieren. Solche Aufgaben könnten mit Eingriffen in das metabolische System verbunden werden, z.B. Messung der Aufmerksamkeitsleistung nach intravenöser Infusion einer Glukoselösung bei gleichzeitiger Messung des BOLD-Signals. Neben weiteren fMRT-Untersuchungen ist die Durchführung einer Glukose-PET Untersuchung mit Probanden, die sich in der *SLC2A3*-Kopienzahl unterscheiden, zu erwägen, um eine mögliche Glukoseminderutilisation bzw. erhöhten Glukosemetabolismus feststellen zu können. Eine erhöhte neuronale Glukoseaufnahme bei *SLC2A3*-Duplikationsträgern erscheint aber aufgrund der bedarfsabhängigen Regulierung der GLUT3-Expression eher unwahrscheinlich. In Mangelsituationen, z.B. bei Ischämie oder neurodegenerativer Erkrankung könnte die *SLC2A3*-Duplikation möglicherweise aber sogar zu einer besseren Energieversorgung führen. Neben der PET kommt auch die Anwendung der Magnetresonanztomographie in Frage, mit Hilfe derer sich verschiedene Metabolite im Gehirn nachweisen lassen. Gelungen ist dies bereits Li et al. (2011), die bei einem Patienten mit Zwangsstörung und Deletion des *SLC2A3*-Gens erniedrigte Glutamatkonzentrationen maßen. Die untersuchte Stichprobe von 14 Probanden je Gruppe bei der fMRT-Untersuchung ist recht klein. Daher wäre es sinnvoll, die gewonnenen Ergebnisse hinsichtlich der relativen Unterschätzung der Kalorienzahl hochkalorischer Nahrung durch *SLC2A3*-Duplikationsträger im Vergleich zu gesunden Kontrollen und die gute Unterscheidbarkeit dieser Gruppen in der multivariaten fMRT-Analyse in einer größeren unabhängigen Stichprobe zu replizieren. So könnte möglicherweise geklärt werden, ob der veränderten Reaktivität gegenüber hochkalorischen Essensstimuli tatsächlich ein abgrenzbarer Endophänotyp zugrunde liegt. Hypothesenkonforme univariate ROI-Analysen, *Resting-State* Analysen und volumetrische Untersuchungen des erhobenen Datensatzes sollten sich anschließen.

## 5.2 Zusammenfassung

Diese Arbeit widmet sich der Untersuchung einer Kopienzahlvariante (CNV) im Erbgut, die zu einer genomischen Duplikation des *SLC2A3*-Gens führt. Die Auswirkungen der *SLC2A3*-Duplikation wurden im Zellkulturmodell und durch bildgebende Verfahren untersucht. Für die *SLC2A3*-Duplikation konnte eine populationsspezifische Assoziation mit ADHS gezeigt werden (Merker et al. 2017). *SLC2A3* kodiert für den neuronalen Glukosetransporter GLUT3, der u.a. Prozesse der Neurotransmitterfreisetzung und Synaptogenese vermittelt und daher wichtig für die Hirnreifung ist. Mögliche Endpunkte für Endophänotypen, die auf einem alterierten Glukosemetabolismus basieren, sind dysfunktionale Hungerregulationsmechanismen ebenso wie eine veränderte neurale Reaktivität gegenüber emotionalen Stimuli und Belohnungsreizen.

In zwei peripheren Zellmodellen konnte gezeigt werden, dass die *SLC2A3*-Duplikation Gen-Dosis-abhängig zu einer Steigerung der basalen *SLC2A3*-mRNA Expression führt. Ein Expressionsunterschied auf Proteinebene konnte jedoch nicht gefunden werden. Metabolischer Zellstress durch Aushungern der Zellkulturen und eine niedrige Glukosekonzentration im Zellkulturmedium führten zu einer signifikanten Erhöhung des schon unter basalen Bedingungen vorhandenen *SLC2A3*-Expressionsunterschiedes zwischen Duplikations- und Kontrollzelllinien. Dies deutet darauf hin, dass die *SLC2A3*-Duplikation bei verminderter zellulärer Energiezufuhr zu einer Überkompensation der Glukoseaufnahme führt.

In einer fMRT-Untersuchung wurden erwachsene ADHS-Patienten mit *SLC2A3*-Duplikation mit ADHS-Patienten und gesunden Kontrollen mit jeweils 2 Genkopien hinsichtlich ereigniskorrelierter neuraler Aktivität als Antwort auf emotionale Stimuli und Essensreize verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die *SLC2A3*-Duplikation zu einer veränderten Reaktivität gegenüber hochkalorischen Essensreizen führt, was sich in einem durch maschinelles Lernen identifizierten multivariaten neuronalen Antwortmuster und einer relativen Unterschätzung des Kaloriengehaltes hochkalorischer Nahrung zeigt. Bei der univariaten Gesamthirn-Analyse der Bilddaten wurden keine signifikanten Gruppenunterschiede gefunden, was darauf hinweist, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen keine fokal umschriebenen Gruppenunterschiede der Hirnaktivierung bestehen.

Diese Arbeit zeigt, dass die *SLC2A3*-Duplikation zu einer Erhöhung der *SLC2A3*-Genexpression mit bisher unbekanntem Auswirkungen auf nachgeschaltete Stoffwechselwege und zu einem komplex veränderten neuronalen Antwortmuster führt, das durch einen linearen Zusammenhang nicht zu beschreiben ist. Weitere Untersuchungen auf Zellebene und eine

Erweiterung der bildgebenden Verfahren könnten zu einer besseren Einordnung der *SLC2A3*-Duplikation bezüglich ihres Anteils an der endophänotypischen Varianz der ADHS führen.

### 5.3 Summary

This thesis is dedicated to the investigation of a genomic copy number variant (CNV) which leads to a duplication of the *SLC2A3* gene. The effects of the *SLC2A3* duplication were examined in cell culture models and by imaging genetics. The *SLC2A3* duplication is associated with ADHD on a population level (Merker et al. 2017). *SLC2A3* encodes the neuronal glucose transporter GLUT3 which mediates processes of neurotransmitter release and synaptogenesis and therefore is crucial for brain development. Dysfunctional mechanisms of hunger regulation and an altered neural reactivity towards emotional and reward associated stimuli are possible endophenotypic end points based on an altered glucose metabolism.

In two peripheral cell models the *SLC2A3* duplication could be shown to lead to a significant increase in basal *SLC2A3* mRNA expression levels. On protein level, however, the expression did not differ. Metabolic cell stress induced by cell starving and low glucose concentrations in cell culture media led to a significant increase of *SLC2A3* expression differences between duplication and control cell lines. It was concluded that in states of decreased cellular energy supply the *SLC2A3* duplication triggers an overcompensation of glucose uptake.

Adult ADHD patients with *SLC2A3* duplication were compared to ADHD patients and healthy controls each with 2 gene copies of *SLC2A3* by means of fMRI regarding event related neural activity towards emotional stimuli and food cues. It could be shown, that the *SLC2A3* duplication leads to an altered reactivity towards high caloric food cues which was indicated by a multivariate neural response pattern and relative underestimation of calories of high caloric food. The whole brain univariate standard analysis showed no significant group differences. Therefore, it was concluded that under the experimental conditions the *SLC2A3* duplication does not induce alterations in focal brain activity.

This work shows that the *SLC2A3* duplication is associated with an increase in *SLC2A3* gene expression with so far unknown consequences on downstream metabolic pathways. Furthermore the *SLC2A3* duplication leads to a complex change in neural response that can not be described by a linear association. Further investigation on cellular level and extension of the imaging studies might elucidate the contribution of the *SLC2A3* duplication to the endophenotypic variance in ADHD.

## Literaturverzeichnis

- Abdul Muneer, P. M., Alikunju, S., Szlachetka, A. M. und Haorah, J. (2011a). Methamphetamine inhibits the glucose uptake by human neurons and astrocytes: stabilization by acetyl-L-carnitine. *PLoS One* 6(4): e19258.
- Abdul Muneer, P. M., Alikunju, S., Szlachetka, A. M., Mercer, A. J. und Haorah, J. (2011b). Ethanol impairs glucose uptake by human astrocytes and neurons: protective effects of acetyl-L-carnitine. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 3(1): 48-56.
- Alcaro, A., Huber, R. und Panksepp, J. (2007). Behavioral functions of the mesolimbic dopaminergic system: an affective neuroethological perspective. *Brain Res Rev* 56(2): 283-321.
- Anand, B. K., Chhina, G. S., Sharma, K. N., Dua, S. und Singh, B. (1964). Activity of Single Neurons in the Hypothalamic Feeding Centers: Effect of Glucose. *Am J Physiol* 207: 1146-1154.
- Anderberg, R. H., Anefors, C., Bergquist, F., Nissbrandt, H. und Skibicka, K. P. (2014). Dopamine signaling in the amygdala, increased by food ingestion and GLP-1, regulates feeding behavior. *Physiol Behav* 136: 135-144.
- Antshel, K. M., Hargrave, T. M., Simonescu, M., Kaul, P., Hendricks, K. und Faraone, S. V. (2011). Advances in understanding and treating ADHD. *BMC Med* 9: 72.
- Arcos-Burgos, M. und Acosta, M. T. (2007). Tuning major gene variants conditioning human behavior: the anachronism of ADHD. *Curr Opin Genet Dev* 17(3): 234-238.
- Arcos-Burgos, M., Velez, J. I., Solomon, B. D. und Muenke, M. (2012). A common genetic network underlies substance use disorders and disruptive or externalizing disorders. *Hum Genet* 131(6): 917-929.
- Ashburner, J. und Friston, K. J. (2005). Unified segmentation. *Neuroimage* 26(3): 839-851.
- Atienzar, F., Gerets, H., Dufrane, S., Tilmant, K., Cornet, M., Dhalluin, S., Ruty, B., Rose, G. und Canning, M. (2007). Determination of phospholipidosis potential based on gene expression analysis in HepG2 cells. *Toxicol Sci* 96(1): 101-114.
- Augustin, R. (2010). The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB Life* 62(5): 315-333.
- Bak, L. K., Schousboe, A., Sonnewald, U. und Waagepetersen, H. S. (2006). Glucose is necessary to maintain neurotransmitter homeostasis during synaptic activity in cultured glutamatergic neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 26(10): 1285-1297.
- Banerjee, T. D., Middleton, F. und Faraone, S. V. (2007). Environmental risk factors for attention-deficit hyperactivity disorder. *Acta Paediatr* 96(9): 1269-1274.

- Belkacemi, L., Lash, G. E., Macdonald-Goodfellow, S. K., Caldwell, J. D. und Graham, C. H. (2005). Inhibition of human trophoblast invasiveness by high glucose concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 90(8): 4846-4851.
- Bell, R. D., Alexander, G. M. und Schwartzman, R. J. (1983). Methylphenidate Decreases Local Glucose-Metabolism in the Motor Cortex. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 18(1): 1-5.
- Benjamini, Y. und Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 57(1): 289-300.
- Berthoud, H. R. (2011). Metabolic and hedonic drives in the neural control of appetite: who is the boss? *Curr Opin Neurobiol* 21(6): 888-896.
- Biederman, J., Mick, E. und Faraone, S. V. (2000). Age-dependent decline of symptoms of attention deficit hyperactivity disorder: impact of remission definition and symptom type. *Am J Psychiatry* 157(5): 816-818.
- Biederman, J., Newcorn, J. und Sprich, S. (1991). Comorbidity of attention deficit hyperactivity disorder with conduct, depressive, anxiety, and other disorders. *Am J Psychiatry* 148(5): 564-577.
- Blomqvist, G., Gjedde, A., Gutniak, M., Grill, V., Widen, L., Stone-Elander, S. und Hellstrand, E. (1991). Facilitated transport of glucose from blood to brain in man and the effect of moderate hypoglycaemia on cerebral glucose utilization. *Eur J Nucl Med* 18(10): 834-837.
- Boileau, P., Mrejen, C., Girard, J. und Hauguel-de Mouzon, S. (1995). Overexpression of GLUT3 placental glucose transporter in diabetic rats. *J Clin Invest* 96(1): 309-317.
- Bondy, C. A., Lee, W. H. und Zhou, J. (1992). Ontogeny and cellular distribution of brain glucose transporter gene expression. *Mol Cell Neurosci* 3(4): 305-314.
- Braza-Boils, A., Tomas, M., Marin, M. P., Megias, L., Sancho-Tello, M., Fornas, E. und Renau-Piqueras, J. (2006). Glycosylation is altered by ethanol in rat hippocampal cultured neurons. *Alcohol and Alcoholism* 41(5): 494-504.
- Briggs-Gowan, M. J., Carter, A. S., Clark, R., Augustyn, M., McCarthy, K. J. und Ford, J. D. (2010). Exposure to potentially traumatic events in early childhood: differential links to emergent psychopathology. *J Child Psychol Psychiatry* 51(10): 1132-1140.
- Burkhalter, J., Fiumelli, H., Allaman, I., Chatton, J. Y. und Martin, J. L. (2003). Brain-derived neurotrophic factor stimulates energy metabolism in developing cortical neurons. *Journal of Neuroscience* 23(23): 8212-8220.
- Caputo, J. L., Thompson, A., McClintock P., Reid, Y. A., Hay, R. J. (1991). An effective method for establishing human b lymphoblastic cell lines using epstein-barr virus. *Tiss. Cult. Meth.* 13: 39-44.

- Casey, B. J., Castellanos, F. X., Giedd, J. N., Marsh, W. L., Hamburger, S. D., Schubert, A. B., Vauss, Y. C., Vaituzis, A. C., Dickstein, D. P., Sarfatti, S. E. et al. (1997). Implication of right frontostriatal circuitry in response inhibition and attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 36(3): 374-383.
- Castellanos, F. X. und Tannock, R. (2002). Neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorder: the search for endophenotypes. *Nat Rev Neurosci* 3(8): 617-628.
- Cheng, C. M., Cohen, M., Wang, J. und Bondy, C. A. (2001). Estrogen augments glucose transporter and IGF1 expression in primate cerebral cortex. *FASEB J* 15(6): 907-915.
- Christakis, D. A., Zimmerman, F. J., DiGiuseppe, D. L. und McCarty, C. A. (2004). Early television exposure and subsequent attentional problems in children. *Pediatrics* 113(4): 708-713.
- Christiansen, H., Hirsch, O., Philipsen, A., Oades, R. D., Matthies, S., Hebebrand, J., Uekermann, J., Abdel-Hamid, M., Kraemer, M., Wiltfang, J. et al. (2012a). German Validation of the Conners Adult ADHD Rating Scale-Self-Report: Confirmation of Factor Structure in a Large Sample of Participants With ADHD. *J Atten Disord*.
- Christiansen, H., Kis, B., Hirsch, O., Matthies, S., Hebebrand, J., Uekermann, J., Abdel-Hamid, M., Kraemer, M., Wiltfang, J., Graf, E. et al. (2012b). German validation of the Conners Adult ADHD Rating Scales (CAARS) II: Reliability, validity, diagnostic sensitivity and specificity. *European Psychiatry* 27(5): 321-328.
- Christiansen, H., Kis, B., Hirsch, O., Philipsen, A., Henneck, M., Panczuk, A., Pietrowsky, R., Hebebrand, J. und Schimmelmann, B. G. (2011). German validation of the Conners Adult ADHD Rating Scales-self-report (CAARS-S) I: Factor structure and normative data. *European Psychiatry* 26(2): 100-107.
- Chugani, H. T., Phelps, M. E. und Mazziotta, J. C. (1987). Positron emission tomography study of human brain functional development. *Ann Neurol* 22(4): 487-497.
- Cocchi, L., Bramati, I. E., Zalesky, A., Furukawa, E., Fontenelle, L. F., Moll, J., Tripp, G. und Mattos, P. (2012). Altered functional brain connectivity in a non-clinical sample of young adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Neurosci* 32(49): 17753-17761.
- Colantuoni, C., Schwenker, J., McCarthy, J., Rada, P., Ladenheim, B., Cadet, J. L., Schwartz, G. J., Moran, T. H. und Hoebel, B. G. (2001). Excessive sugar intake alters binding to dopamine and mu-opioid receptors in the brain. *Neuroreport* 12(16): 3549-3552.
- Colville, C. A., Seatter, M. J., Jess, T. J., Gould, G. W. und Thomas, H. M. (1993). 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* 290 ( Pt 3): 701-706.
- Comings, D. E., Chen, T. J., Blum, K., Mengucci, J. F., Blum, S. H. und Meshkin, B. (2005). Neurogenetic interactions and aberrant behavioral co-morbidity of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): dispelling myths. *Theor Biol Med Model* 2: 50.

- Conzelmann, A., Woidich, E., Mucha, R. F., Weyers, P., Jacob, C. P., Lesch, K. P. und Pauli, P. (2011). Methylphenidate normalizes emotional processing in adult patients with attention-deficit/hyperactivity disorder: preliminary findings. *Brain Res* 1381: 159-166.
- Cortese, S. (2012). The neurobiology and genetics of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD): what every clinician should know. *Eur J Paediatr Neurol* 16(5): 422-433.
- Das, U. G., He, J., Ehrhardt, R. A., Hay, W. W., Jr. und Devaskar, S. U. (2000). Time-dependent physiological regulation of ovine placental GLUT-3 glucose transporter protein. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279(6): R2252-2261.
- Davatzikos, C., Genc, A., Xu, D. und Resnick, S. M. (2001). Voxel-based morphometry using the RAVENS maps: methods and validation using simulated longitudinal atrophy. *Neuroimage* 14(6): 1361-1369.
- Dickstein, S. G., Bannon, K., Castellanos, F. X. und Milham, M. P. (2006). The neural correlates of attention deficit hyperactivity disorder: an ALE meta-analysis. *J Child Psychol Psychiatry* 47(10): 1051-1062.
- Dimitriadis, G., Maratou, E., Boutati, E., Psarra, K., Papasteriades, C. und Raptis, S. A. (2005). Evaluation of glucose transport and its regulation by insulin in human monocytes using flow cytometry. *Cytometry A* 64(1): 27-33.
- du Boisgueheneuc, F., Levy, R., Volle, E., Seassau, M., Duffau, H., Kinkingnehun, S., Samson, Y., Zhang, S. und Dubois, B. (2006). Functions of the left superior frontal gyrus in humans: a lesion study. *Brain* 129(Pt 12): 3315-3328.
- Duelli, R., Staudt, R., Duembgen, L. und Kuschinsky, W. (1999). Increase in glucose transporter densities of Glut3 and decrease of glucose utilization in rat brain after one week of hypoglycemia. *Brain Res* 831(1-2): 254-262.
- Duelli, R., Staudt, R., Grunwald, F. und Kuschinsky, W. (1998). Increase of glucose transporter densities (Glut1 and Glut3) during chronic administration of nicotine in rat brain. *Brain Res* 782(1-2): 36-42.
- Durston, S., van Belle, J. und de Zeeuw, P. (2011). Differentiating frontostriatal and frontocerebellar circuits in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 69(12): 1178-1184.
- Dwyer, D. S. (2001). Model of the 3-D structure of the GLUT3 glucose transporter and molecular dynamics simulation of glucose transport. *Proteins* 42(4): 531-541.
- Dwyer, D. S., Pinkofsky, H. B., Liu, Y. und Bradley, R. J. (1999). Antipsychotic drugs affect glucose uptake and the expression of glucose transporters in PC12 cells. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 23(1): 69-80.
- Elia, J., Gai, X., Xie, H. M., Perin, J. C., Geiger, E., Glessner, J. T., D'Arcy, M., deBerardinis, R., Frackelton, E., Kim, C. et al. (2010). Rare structural variants found in attention-

- deficit hyperactivity disorder are preferentially associated with neurodevelopmental genes. *Mol Psychiatry* 15(6): 637-646.
- Elia, J., Glessner, J. T., Wang, K., Takahashi, N., Shtir, C. J., Hadley, D., Sleiman, P. M., Zhang, H., Kim, C. E., Robison, R. et al. (2012). Genome-wide copy number variation study associates metabotropic glutamate receptor gene networks with attention deficit hyperactivity disorder. *Nat Genet* 44(1): 78-84.
- Ellison-Wright, I., Ellison-Wright, Z. und Bullmore, E. (2008). Structural brain change in Attention Deficit Hyperactivity Disorder identified by meta-analysis. *BMC Psychiatry* 8: 51.
- Elmquist, J. K., Elias, C. F. und Saper, C. B. (1999). From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22(2): 221-232.
- Eny, K. M., Wolever, T. M., Fontaine-Bisson, B. und El-Soheby, A. (2008). Genetic variant in the glucose transporter type 2 is associated with higher intakes of sugars in two distinct populations. *Physiol Genomics* 33(3): 355-360.
- Erenberg, G. (2005). The relationship between tourette syndrome, attention deficit hyperactivity disorder, and stimulant medication: a critical review. *Semin Pediatr Neurol* 12(4): 217-221.
- Esterman, A., Greco, M. A., Mitani, Y., Finlay, T. H., Ismail-Beigi, F. und Dancis, J. (1997). The effect of hypoxia on human trophoblast in culture: morphology, glucose transport and metabolism. *Placenta* 18(2-3): 129-136.
- Eubig, P. A., Aguiar, A. und Schantz, S. L. (2010). Lead and PCBs as Risk Factors for Attention Deficit/Hyperactivity Disorder. *Environmental Health Perspectives* 118(12): 1654-1667.
- Faraone, S. V., Biederman, J. und Mick, E. (2006). The age-dependent decline of attention deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis of follow-up studies. *Psychol Med* 36(2): 159-165.
- Faraone, S. V., Perlis, R. H., Doyle, A. E., Smoller, J. W., Goralnick, J. J., Holmgren, M. A. und Sklar, P. (2005). Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57(11): 1313-1323.
- Fattoretti, P., Bertoni-Freddari, C., Casoli, T., Di Stefano, G., Giorgetti, G. und Solazzi, M. (2003). Ethanol-induced decrease of the expression of glucose transport protein (Glut3) in the central nervous system as a predisposing condition to apoptosis: the effect of age. *Ann N Y Acad Sci* 1010: 500-503.
- Fattoretti, P., Bertoni-Freddari, C., Di Stefano, G., Casoli, T., Gracciotti, N., Solazzi, M. und Pompei, P. (2001). Quantitative immunohistochemistry of glucose transport protein (Glut3) expression in the rat hippocampus during aging. *J Histochem Cytochem* 49(5): 671-672.
- Fayyad, J., De Graaf, R., Kessler, R., Alonso, J., Angermeyer, M., Demyttenaere, K., De Girolamo, G., Haro, J. M., Karam, E. G., Lara, C. et al. (2007). Cross-national

- prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder. *Br J Psychiatry* 190: 402-409.
- Feinberg, A. P. und Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132(1): 6-13.
- Ferreira, J. M., Burnett, A. L. und Rameau, G. A. (2011). Activity-dependent regulation of surface glucose transporter-3. *J Neurosci* 31(6): 1991-1999.
- Feuk, L., Carson, A. R. und Scherer, S. W. (2006). Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 7(2): 85-97.
- Fields, H. M., Rinaman, L. und Devaskar, S. U. (1999). Distribution of glucose transporter isoform-3 and hexokinase I in the postnatal murine brain. *Brain Res* 846(2): 260-264.
- Forsberg, H., Fernell, E., Waters, S., Waters, N. und Tedroff, J. (2006). Altered pattern of brain dopamine synthesis in male adolescents with attention deficit hyperactivity disorder. *Behav Brain Funct* 2: 40.
- Franke, B., Faraone, S. V., Asherson, P., Buitelaar, J., Bau, C. H., Ramos-Quiroga, J. A., Mick, E., Grevet, E. H., Johansson, S., Haavik, J. et al. (2011). The genetics of attention deficit/hyperactivity disorder in adults, a review. *Mol Psychiatry*.
- Freund, Y. und Schapire, R. E. (1997). A Decision-Theoretic Generalization of On-Line Learning and an Application to Boosting. *Journal of Computer and System Sciences* 55: 119-139.
- Frodl, T., Stauber, J., Schaaff, N., Koutsouleris, N., Scheuerecker, J., Ewers, M., Omerovic, M., Opgen-Rhein, M., Hampel, H., Reiser, M. et al. (2010). Amygdala reduction in patients with ADHD compared with major depression and healthy volunteers. *Acta Psychiatr Scand* 121(2): 111-118.
- Fu, Y., Maianu, L., Melbert, B. R. und Garvey, W. T. (2004). 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* 32(1): 182-190.
- Gaub, M. und Carlson, C. L. (1997). Gender differences in ADHD: a meta-analysis and critical review. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 36(8): 1036-1045.
- Geissler, J. und Lesch, K. P. (2011). A lifetime of attention-deficit/hyperactivity disorder: diagnostic challenges, treatment and neurobiological mechanisms. *Expert Rev Neurother* 11(10): 1467-1484.
- Gharabaghi, A., Fruhmann Berger, M., Tatagiba, M. und Karnath, H. O. (2006). The role of the right superior temporal gyrus in visual search-insights from intraoperative electrical stimulation. *Neuropsychologia* 44(12): 2578-2581.
- Giedd, J. N. (2004). Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain. *Ann N Y Acad Sci* 1021: 77-85.

- Gillberg, C., Gillberg, I. C., Rasmussen, P., Kadesjo, B., Soderstrom, H., Rastam, M., Johnson, M., Rothenberger, A. und Niklasson, L. (2004). Co-existing disorders in ADHD -- implications for diagnosis and intervention. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 13 Suppl 1: 180-92.
- Gizer, I. R., Ficks, C. und Waldman, I. D. (2009). Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet* 126(1): 51-90.
- Gobel, B., Oltmanns, K. M. und Chung, M. (2013). Linking neuronal brain activity to the glucose metabolism. *Theor Biol Med Model* 10: 50.
- Gogtay, N., Giedd, J. N., Lusk, L., Hayashi, K. M., Greenstein, D., Vaituzis, A. C., Nugent, T. F., 3rd, Herman, D. H., Clasen, L. S., Toga, A. W. et al. (2004). Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(21): 8174-8179.
- Gonzalez, E., Kulkarni, H., Bolivar, H., Mangano, A., Sanchez, R., Catano, G., Nibbs, R. J., Freedman, B. I., Quinones, M. P., Bamshad, M. J. et al. (2005). The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science* 307(5714): 1434-1440.
- Gottesman, II und Gould, T. D. (2003). The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *Am J Psychiatry* 160(4): 636-645.
- Gould, G. W., Brant, A. M., Kahn, B. B., Shepherd, P. R., McCoid, S. C. und Gibbs, E. M. (1992). Expression of the brain-type glucose transporter is restricted to brain and neuronal cells in mice. *Diabetologia* 35(4): 304-309.
- Gould, G. W., Thomas, H. M., Jess, T. J. und Bell, G. I. (1991). Expression of human glucose transporters in *Xenopus* oocytes: kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocyte, liver, and brain isoforms. *Biochemistry* 30(21): 5139-5145.
- Grayton, H. M., Fernandes, C., Rujescu, D. und Collier, D. A. (2012). Copy number variations in neurodevelopmental disorders. *Prog Neurobiol* 99(1): 81-91.
- Grover-McKay, M., Walsh, S. A. und Thompson, S. A. (1999). Glucose transporter 3 (GLUT3) protein is present in human myocardium. *Biochim Biophys Acta* 1416(1-2): 145-154.
- Haber, R. S., Weinstein, S. P., O'Boyle, E. und Morgello, S. (1993). Tissue distribution of the human GLUT3 glucose transporter. *Endocrinology* 132(6): 2538-2543.
- Hahn, D., Blaschitz, A., Korgun, E. T., Lang, I., Desoye, G., Skofitsch, G. und Dohr, G. (2001). From maternal glucose to fetal glycogen: expression of key regulators in the human placenta. *Mol Hum Reprod* 7(12): 1173-1178.
- Hahn, T., Barth, S., Hofmann, W., Reich, O., Lang, I. und Desoye, G. (1998). Hyperglycemia regulates the glucose-transport system of clonal choriocarcinoma cells in vitro. A potential molecular mechanism contributing to the adjunct effect of glucose in tumor therapy. *Int J Cancer* 78(3): 353-360.

- Hahn, T., Dresler, T., Ehlis, A. C., Plichta, M. M., Heinzl, S., Polak, T., Lesch, K. P., Breuer, F., Jakob, P. M. und Fallgatter, A. J. (2009). Neural response to reward anticipation is modulated by Gray's impulsivity. *Neuroimage* 46(4): 1148-1153.
- Handa, R. K., DeJoseph, M. R., Singh, L. D., Hawkins, R. A. und Singh, S. P. (2000). Glucose transporters and glucose utilization in rat brain after acute ethanol administration. *Metab Brain Dis* 15(3): 211-222.
- Harris, J. J., Jolivet, R. und Attwell, D. (2012). Synaptic energy use and supply. *Neuron* 75(5): 762-777.
- Hart, E. L., Lahey, B. B., Loeber, R., Applegate, B. und Frick, P. J. (1995). Developmental change in attention-deficit hyperactivity disorder in boys: a four-year longitudinal study. *J Abnorm Child Psychol* 23(6): 729-749.
- Hastings, P. J., Lupski, J. R., Rosenberg, S. M. und Ira, G. (2009). Mechanisms of change in gene copy number. *Nat Rev Genet* 10(8): 551-564.
- Heijnen, H. F., Oorschot, V., Sixma, J. J., Slot, J. W. und James, D. E. (1997). 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* 138(2): 323-330.
- Hinard, V., Mikhail, C., Pradervand, S., Curie, T., Houtkooper, R. H., Auwerx, J., Franken, P. und Tafti, M. (2012). Key electrophysiological, molecular, and metabolic signatures of sleep and wakefulness revealed in primary cortical cultures. *J Neurosci* 32(36): 12506-12517.
- Holden, R. J. und Mooney, P. A. (1994). Schizophrenia is a diabetic brain state: an elucidation of impaired neurometabolism. *Med Hypotheses* 43(6): 420-435.
- Hollox, E. J., Armour, J. A. und Barber, J. C. (2003). Extensive normal copy number variation of a beta-defensin antimicrobial-gene cluster. *Am J Hum Genet* 73(3): 591-600.
- Hoover, D. W. und Milich, R. (1994). Effects of sugar ingestion expectancies on mother-child interactions. *J Abnorm Child Psychol* 22(4): 501-515.
- Hou, W. K., Xian, Y. X., Zhang, L., Lai, H., Hou, X. G., Xu, Y. X., Yu, T., Xu, F. Y., Song, J., Fu, C. L. et al. (2007). Influence of blood glucose on the expression of glucose transporter proteins 1 and 3 in the brain of diabetic rats. *Chin Med J (Engl)* 120(19): 1704-1709.
- Huang, Y. H., Tsai, S. J., Su, T. W. und Sim, C. B. (1999). Effects of repeated high-dose methamphetamine on local cerebral glucose utilization in rats. *Neuropsychopharmacology* 21(3): 427-434.
- Hudziak, J. J., Derks, E. M., Althoff, R. R., Rettew, D. C. und Boomsma, D. I. (2005). The genetic and environmental contributions to attention deficit hyperactivity disorder as measured by the Conners' Rating Scales--Revised. *Am J Psychiatry* 162(9): 1614-1620.

- Iafrate, A. J., Feuk, L., Rivera, M. N., Listewnik, M. L., Donahoe, P. K., Qi, Y., Scherer, S. W. und Lee, C. (2004). Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 36(9): 949-951.
- Jarick, I., Volckmar, A. L., Putter, C., Pechlivanis, S., Nguyen, T. T., Dauvermann, M. R., Beck, S., Albayrak, O., Scherag, S., Gilsbach, S. et al. (2012). Genome-wide analysis of rare copy number variations reveals PARK2 as a candidate gene for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*.
- Jiang, J., Zhu, W., Shi, F., Liu, Y., Li, J., Qin, W., Li, K., Yu, C. und Jiang, T. (2009). Thick visual cortex in the early blind. *J Neurosci* 29(7): 2205-2211.
- Johnson, R. J., Gold, M. S., Johnson, D. R., Ishimoto, T., Lanaspá, M. A., Zahniser, N. R. und Avena, N. M. (2011). Attention-deficit/hyperactivity disorder: is it time to reappraise the role of sugar consumption? *Postgrad Med* 123(5): 39-49.
- Jucaite, A., Fernell, E., Halldin, C., Forssberg, H. und Farde, L. (2005). Reduced midbrain dopamine transporter binding in male adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder: association between striatal dopamine markers and motor hyperactivity. *Biol Psychiatry* 57(3): 229-238.
- Kang, L., Routh, V. H., Kuzhikandathil, E. V., Gaspers, L. D. und Levin, B. E. (2004). Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons. *Diabetes* 53(3): 549-559.
- Kates, W. R., Frederikse, M., Mostofsky, S. H., Folley, B. S., Cooper, K., Mazur-Hopkins, P., Kofman, O., Singer, H. S., Denckla, M. B., Pearlson, G. D. et al. (2002). MRI parcellation of the frontal lobe in boys with attention deficit hyperactivity disorder or Tourette syndrome. *Psychiatry Res* 116(1-2): 63-81.
- Kayano, T., Fukumoto, H., Eddy, R. L., Fan, Y. S., Byers, M. G., Shows, T. B. und Bell, G. I. (1988). 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* 263(30): 15245-15248.
- Kebir, O. und Joobar, R. (2011). Neuropsychological endophenotypes in attention-deficit/hyperactivity disorder: a review of genetic association studies. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 261(8): 583-594.
- Kessler, R. C., Adler, L., Barkley, R., Biederman, J., Conners, C. K., Demler, O., Faraone, S. V., Greenhill, L. L., Howes, M. J., Secnik, K. et al. (2006). The prevalence and correlates of adult ADHD in the United States: results from the National Comorbidity Survey Replication. *Am J Psychiatry* 163(4): 716-723.
- Khan, J. Y., Rajakumar, R. A., McKnight, R. A., Devaskar, U. P. und Devaskar, S. U. (1999). Developmental regulation of genes mediating murine brain glucose uptake. *Am J Physiol* 276(3 Pt 2): R892-900.

- Khayat, Z. A., McCall, A. L. und Klip, A. (1998). Unique mechanism of GLUT3 glucose transporter regulation by prolonged energy demand: increased protein half-life. *Biochem J* 333 ( Pt 3): 713-718.
- Kidd, J. M., Cooper, G. M., Donahue, W. F., Hayden, H. S., Sampas, N., Graves, T., Hansen, N., Teague, B., Alkan, C., Antonacci, F. et al. (2008). Mapping and sequencing of structural variation from eight human genomes. *Nature* 453(7191): 56-64.
- Kinsbourne, M. (1994). Sugar and the hyperactive child. *N Engl J Med* 330(5): 355-356.
- Kipmen-Korgun, D., Bilmen-Sarikcioglu, S., Altunbas, H., Demir, R. und Korgun, E. T. (2009). Type-2 diabetes down-regulates glucose transporter proteins and genes of the human blood leukocytes. *Scand J Clin Lab Invest* 69(3): 350-358.
- Knopik, V. S., Sparrow, E. P., Madden, P. A., Bucholz, K. K., Hudziak, J. J., Reich, W., Slutske, W. S., Grant, J. D., McLaughlin, T. L., Todorov, A. et al. (2005). Contributions of parental alcoholism, prenatal substance exposure, and genetic transmission to child ADHD risk: a female twin study. *Psychol Med* 35(5): 625-635.
- Kooij, S. J., Bejerot, S., Blackwell, A., Caci, H., Casas-Brugue, M., Carpentier, P. J., Edvinsson, D., Fayyad, J., Foeken, K., Fitzgerald, M. et al. (2010). European consensus statement on diagnosis and treatment of adult ADHD: The European Network Adult ADHD. *BMC Psychiatry* 10: 67.
- Korgun, E. T., Demir, R., Sedlmayr, P., Desoye, G., Arikan, G. M., Puerstner, P., Haeusler, M., Dohr, G., Skofitsch, G. und Hahn, T. (2002). Sustained hypoglycemia affects glucose transporter expression of human blood leukocytes. *Blood Cells Mol Dis* 28(2): 152-159.
- Kujirai, K., Przedborski, S., Kostic, V., Jackson-Lewis, V., Fahn, S. und Cadet, J. L. (1990). Autoradiography of dopamine receptors and dopamine uptake sites in the spontaneously hypertensive rat. *Brain Res Bull* 25(5): 703-709.
- Kuntsi, J., Rijdsdijk, F., Ronald, A., Asherson, P. und Plomin, R. (2005). Genetic influences on the stability of attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms from early to middle childhood. *Biol Psychiatry* 57(6): 647-654.
- Kusenda, M. und Sebat, J. (2008). The role of rare structural variants in the genetics of autism spectrum disorders. *Cytogenet Genome Res* 123(1-4): 36-43.
- Kuzman, M. R., Medved, V., Terzic, J. und Krainc, D. (2009). Genome-wide expression analysis of peripheral blood identifies candidate biomarkers for schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research* 43(13): 1073-1077.
- Langley, K., Martin, J., Agha, S. S., Davies, C., Stergiakouli, E., Holmans, P., Williams, N., Owen, M., O'Donovan, M. und Thapar, A. (2011). Clinical and cognitive characteristics of children with attention-deficit hyperactivity disorder, with and without copy number variants. *Br J Psychiatry* 199(5): 398-403.
- Larsson, J. O., Larsson, H. und Lichtenstein, P. (2004). Genetic and environmental contributions to stability and change of ADHD symptoms between 8 and 13 years of

- age: a longitudinal twin study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 43(10): 1267-1275.
- Lasky-Su, J., Neale, B. M., Franke, B., Anney, R. J., Zhou, K., Maller, J. B., Vasquez, A. A., Chen, W., Asherson, P., Buitelaar, J. et al. (2008). Genome-wide association scan of quantitative traits for attention deficit hyperactivity disorder identifies novel associations and confirms candidate gene associations. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B(8): 1345-1354.
- Lee, D. H., Chung, M. Y., Lee, J. U., Kang, D. G. und Paek, Y. W. (2000). Changes of glucose transporters in the cerebral adaptation to hypoglycemia. *Diabetes Res Clin Pract* 47(1): 15-23.
- Leino, R. L., Gerhart, D. Z., van Bueren, A. M., McCall, A. L. und Drewes, L. R. (1997). Ultrastructural localization of GLUT 1 and GLUT 3 glucose transporters in rat brain. *J Neurosci Res* 49(5): 617-626.
- Lesch, K. P. (2009). Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Encyclopedia of Molecular Mechanisms of Disease*
- Lesch, K. P., Merker, S., Reif, A. und Novak, M. (2012). Dances with black widow spiders: Dysregulation of glutamate signalling enters centre stage in ADHD. *Eur Neuropsychopharmacol*.
- Lesch, K. P., Selch, S., Renner, T. J., Jacob, C., Nguyen, T. T., Hahn, T., Romanos, M., Walitza, S., Shoichet, S., Dempfle, A. et al. (2011). Genome-wide copy number variation analysis in attention-deficit/hyperactivity disorder: association with neuropeptide Y gene dosage in an extended pedigree. *Mol Psychiatry* 16(5): 491-503.
- Lesch, K. P., Timmesfeld, N., Renner, T. J., Halperin, R., Roser, C., Nguyen, T. T., Craig, D. W., Romanos, J., Heine, M., Meyer, J. et al. (2008). Molecular genetics of adult ADHD: converging evidence from genome-wide association and extended pedigree linkage studies. *J Neural Transm* 115(11): 1573-1585.
- Levin, B. E., Routh, V. H., Kang, L., Sanders, N. M. und Dunn-Meynell, A. A. (2004). Neuronal glucosensing: what do we know after 50 years? *Diabetes* 53(10): 2521-2528.
- Levy, F., Hay, D. A., McStephen, M., Wood, C. und Waldman, I. (1997). Attention-deficit hyperactivity disorder: a category or a continuum? Genetic analysis of a large-scale twin study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 36(6): 737-744.
- Li, B., Marshall, M., Lionel, A., Shaheen, S.-M., Scherer, S. W., Hanna, G. L., Kennedy, J. L., Rosenberg, D. R. und Arnold, P. D. (2011). A preliminary study of genotype-phenotype correlations for rare copy number variants in children with Obsessive-Compulsive Disorder. *The 12th International Congress of Human Genetics and the American Society of Human Genetics 61st Annual Meeting*, October 11-15, 2011. Montreal, Canada.
- Lipscombe, L. L., Levesque, L. E., Gruneir, A., Fischer, H. D., Juurlink, D. N., Gill, S. S., Herrmann, N., Hux, J. E., Anderson, G. M. und Rochon, P. A. (2011). Antipsychotic

- Drugs and the Risk of Hyperglycemia in Older Adults Without Diabetes: A Population-Based Observational Study. *American Journal of Geriatric Psychiatry* 19(12): 1026-1033.
- Liston, C., Malter Cohen, M., Teslovich, T., Levenson, D. und Casey, B. J. (2011). Atypical prefrontal connectivity in attention-deficit/hyperactivity disorder: pathway to disease or pathological end point? *Biol Psychiatry* 69(12): 1168-1177.
- Liu, Y., Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I. und Gong, C. X. (2008). Decreased glucose transporters correlate to abnormal hyperphosphorylation of tau in Alzheimer disease. *FEBS Lett* 582(2): 359-364.
- Logothetis, N. K., Pauls, J., Augath, M., Trinath, T. und Oeltermann, A. (2001). Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal. *Nature* 412(6843): 150-157.
- London, E. D., Cascella, N. G., Wong, D. F., Phillips, R. L., Dannals, R. F., Links, J. M., Herning, R., Grayson, R., Jaffe, J. H. und Wagner, H. N., Jr. (1990). Cocaine-induced reduction of glucose utilization in human brain. A study using positron emission tomography and [fluorine 18]-fluorodeoxyglucose. *Arch Gen Psychiatry* 47(6): 567-574.
- Lundberg, E., Fagerberg, L., Klevebring, D., Matic, I., Geiger, T., Cox, J., Algenas, C., Lundeberg, J., Mann, M. und Uhlen, M. (2010). Defining the transcriptome and proteome in three functionally different human cell lines. *Mol Syst Biol* 6: 450.
- Maher, F., Vannucci, S. J. und Simpson, I. A. (1994). Glucose transporter proteins in brain. *FASEB J* 8(13): 1003-1011.
- Malhotra, D., McCarthy, S., Michaelson, J. J., Vacic, V., Burdick, K. E., Yoon, S., Cichon, S., Corvin, A., Gary, S., Gershon, E. S. et al. (2011). High frequencies of de novo CNVs in bipolar disorder and schizophrenia. *Neuron* 72(6): 951-963.
- Mannuzza, S., Klein, R. G., Bessler, A., Malloy, P. und LaPadula, M. (1993). Adult outcome of hyperactive boys. Educational achievement, occupational rank, and psychiatric status. *Arch Gen Psychiatry* 50(7): 565-576.
- Mantych, G. J., James, D. E., Chung, H. D. und Devaskar, S. U. (1992). Cellular localization and characterization of Glut 3 glucose transporter isoform in human brain. *Endocrinology* 131(3): 1270-1278.
- Marks, D. J., Newcorn, J. H. und Halperin, J. M. (2001). Comorbidity in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Ann N Y Acad Sci* 931: 216-238.
- Mayer, J. (1953). Glucostatic mechanism of regulation of food intake. *N Engl J Med* 249(1): 13-16.
- McCall, A. L., Van Bueren, A. M., Moholt-Siebert, M., Cherry, N. J. und Woodward, W. R. (1994). Immunohistochemical localization of the neuron-specific glucose transporter (GLUT3) to neuropil in adult rat brain. *Brain Res* 659(1-2): 292-297.

- McCarroll, S. A., Hadnott, T. N., Perry, G. H., Sabeti, P. C., Zody, M. C., Barrett, J. C., Dallaire, S., Gabriel, S. B., Lee, C., Daly, M. J. et al. (2006). Common deletion polymorphisms in the human genome. *Nat Genet* 38(1): 86-92.
- McCarroll, S. A., Kuruvilla, F. G., Korn, J. M., Cawley, S., Nemesh, J., Wysoker, A., Shapero, M. H., de Bakker, P. I., Maller, J. B., Kirby, A. et al. (2008). Integrated detection and population-genetic analysis of SNPs and copy number variation. *Nat Genet* 40(10): 1166-1174.
- McDermott, E. und de Silva, P. (2005). Impaired neuronal glucose uptake in pathogenesis of schizophrenia - can GLUT 1 and GLUT 3 deficits explain imaging, post-mortem and pharmacological findings? *Med Hypotheses* 65(6): 1076-1081.
- McLaughlin, K. A., Fox, N. A., Zeanah, C. H., Sheridan, M. A., Marshall, P. und Nelson, C. A. (2010). Delayed maturation in brain electrical activity partially explains the association between early environmental deprivation and symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 68(4): 329-336.
- Medina, R. A., Meneses, A. M., Vera, J. C., Guzman, C., Nualart, F., Astuya, A., Garcia, M. A., Kato, S., Carvajal, A., Pinto, M. et al. (2003). Estrogen and progesterone up-regulate glucose transporter expression in ZR-75-1 human breast cancer cells. *Endocrinology* 144(10): 4527-4535.
- Merker, S. (2014). Genome-wide screenings in attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): investigation of novel candidate genes SLC2A3 and LPHN3, Würzburg.
- Merker, S., Reif, A., Ziegler, G. C., Weber, H., Mayer, U., Ehli, A. C., Conzelmann, A., Johansson, S., Müller-Reible, C., Nanda, I. et al. (2017). SLC2A3 single-nucleotide polymorphism and duplication influence cognitive processing and population-specific risk for attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Child Psychol Psychiatry*.
- Merlino, G. T., Xu, Y. H., Richert, N., Clark, A. J., Ishii, S., Banks-Schlegel, S. und Pastan, I. (1985). Elevated epidermal growth factor receptor gene copy number and expression in a squamous carcinoma cell line. *J Clin Invest* 75(3): 1077-1079.
- Merriman-Smith, B. R., Krushinsky, A., Kistler, J. und Donaldson, P. J. (2003). Expression patterns for glucose transporters GLUT1 and GLUT3 in the normal rat lens and in models of diabetic cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(8): 3458-3466.
- Merz, E. C. und McCall, R. B. (2010). Behavior problems in children adopted from psychosocially depriving institutions. *J Abnorm Child Psychol* 38(4): 459-470.
- Milberger, S., Biederman, J., Faraone, S. V. und Jones, J. (1998). Further evidence of an association between maternal smoking during pregnancy and attention deficit hyperactivity disorder: findings from a high-risk sample of siblings. *J Clin Child Psychol* 27(3): 352-358.
- Milich, R. und Pelham, W. E. (1986). Effects of sugar ingestion on the classroom and playground behavior of attention deficit disordered boys. *J Consult Clin Psychol* 54(5): 714-718.

- Miller, D. W., Hague, S. M., Clarimon, J., Baptista, M., Gwinn-Hardy, K., Cookson, M. R. und Singleton, A. B. (2004). Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication. *Neurology* 62(10): 1835-1838.
- Miller, E. K. und Cohen, J. D. (2001). An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu Rev Neurosci* 24: 167-202.
- Miller, S. A., Dykes, D. D. und Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16(3): 1215.
- Miyake, J., Ochiai-Yanagi, S., Kasumi, T. und Takagi, T. (1978). Isolation of a membrane protein from R rubrum chromatophores and its abnormal behavior in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis due to a high binding capacity for SDS. *J Biochem* 83(6): 1679-1686.
- Möller-Levet, C. S., Archer, S. N., Bucca, G., Laing, E. E., Slak, A., Kabiljo, R., Lo, J. C., Santhi, N., von Schantz, M., Smith, C. P. et al. (2013). Effects of insufficient sleep on circadian rhythmicity and expression amplitude of the human blood transcriptome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(12): E1132-1141.
- Monteggia, L. M., Arneric, S. P. und Giordano, T. (1994). Nicotine effects on the regulation of amyloid precursor protein splicing, neurotrophin and glucose transporter RNA levels in aged rats. *Int J Dev Neurosci* 12(2): 133-141.
- Monuteaux, M. C., Faraone, S. V., Herzig, K., Navsaria, N. und Biederman, J. (2005). ADHD and dyscalculia: Evidence for independent familial transmission. *J Learn Disabil* 38(1): 86-93.
- Mostofsky, S. H., Cooper, K. L., Kates, W. R., Denckla, M. B. und Kaufmann, W. E. (2002). Smaller prefrontal and premotor volumes in boys with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 52(8): 785-794.
- Muneer, P. M. A., Alikunju, S., Szlachetka, A. M. und Haorah, J. (2011). Methamphetamine Inhibits the Glucose Uptake by Human Neurons and Astrocytes: Stabilization by Acetyl-L-Carnitine. *PLoS One* 6(4).
- Nagamatsu, S., Kornhauser, J. M., Burant, C. F., Seino, S., Mayo, K. E. und Bell, G. I. (1992). Glucose Transporter Expression in Brain - Cdna Sequence of Mouse Glut3, the Brain Facilitative Glucose Transporter Isoform, and Identification of Sites of Expression by Insitu Hybridization. *Journal of Biological Chemistry* 267(1): 467-472.
- Nagamatsu, S., Sawa, H., Inoue, N., Nakamichi, Y., Takeshima, H. und Hoshino, T. (1994). Gene expression of GLUT3 glucose transporter regulated by glucose in vivo in mouse brain and in vitro in neuronal cell cultures from rat embryos. *Biochem J* 300 ( Pt 1): 125-131.
- Nair, D. G. (2005). About being BOLD. *Brain Res Brain Res Rev* 50(2): 229-243.
- Neale, B. M., Medland, S., Ripke, S., Anney, R. J., Asherson, P., Buitelaar, J., Franke, B., Gill, M., Kent, L., Holmans, P. et al. (2010). Case-control genome-wide association

- study of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 49(9): 906-920.
- Nichols, T. E., Das, S., Eickhoff, S. B., Evans, A. C., Glatard, T., Hanke, M., Kriegeskorte, N., Milham, M. P., Poldrack, R. A., Poline, J.-B. et al. (2016). Best Practices in Data Analysis and Sharing in Neuroimaging using MRI. *OHBM COBIDAS Report v1.0*, 2016/5/19: 1-71.
- Nigg, J. T., Johnstone, J. M., Musser, E. D., Long, H. G., Willoughby, M. T. und Shannon, J. (2016). Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and being overweight/obesity: New data and meta-analysis. *Clin Psychol Rev* 43: 67-79.
- Nioi, P., Perry, B. K., Wang, E. J., Gu, Y. Z. und Snyder, R. D. (2007). In vitro detection of drug-induced phospholipidosis using gene expression and fluorescent phospholipid based methodologies. *Toxicol Sci* 99(1): 162-173.
- Noble, E. P., Gottschalk, L. A., Fallon, J. H., Ritchie, T. L. und Wu, J. C. (1997). D2 dopamine receptor polymorphism and brain regional glucose metabolism. *Am J Med Genet* 74(2): 162-166.
- Noble, P. B. und Cutts, J. H. (1967). Separation of blood leukocytes by Ficoll gradient. *Can Vet J* 8(5): 110-111.
- Nomura, Y., Marks, D. J., Grossman, B., Yoon, M., Loudon, H., Stone, J. und Halperin, J. M. (2012). Exposure to gestational diabetes mellitus and low socioeconomic status: effects on neurocognitive development and risk of attention-deficit/hyperactivity disorder in offspring. *Arch Pediatr Adolesc Med* 166(4): 337-343.
- O'Roak, B. J., Vives, L., Girirajan, S., Karakoc, E., Krumm, N., Coe, B. P., Levy, R., Ko, A., Lee, C., Smith, J. D. et al. (2012). Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature* 485(7397): 246-250.
- Obel, C., Henriksen, T. B., Dalsgaard, S., Linnet, K. M., Skajaa, E., Thomsen, P. H. und Olsen, J. (2004). Does children's watching of television cause attention problems? Retesting the hypothesis in a Danish cohort. *Pediatrics* 114(5): 1372-1373; author reply 1373-1374.
- Ogawa, S., Lee, T. M., Kay, A. R. und Tank, D. W. (1990). Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(24): 9868-9872.
- Oomura, Y., Kimura, K., Ooyama, H., Maeno, T., Iki, M. und Kuniyoshi, M. (1964). Reciprocal Activities of the Ventromedial and Lateral Hypothalamic Areas of Cats. *Science* 143(3605): 484-485.
- Otti, A., Gundel, H., Wohlschlagel, A., Zimmer, C., Sorg, C. und Noll-Hussong, M. (2012). [Default mode network of the brain. Neurobiology and clinical significance]. *Nervenarzt* 83(1): 16, 18-24.

- Pauling, L. und Coryell, C. D. (1936). The Magnetic Properties and Structure of Hemoglobin, Oxyhemoglobin and Carbonmonoxyhemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 22(4): 210-216.
- Petit, J. M., Tobler, I., Kopp, C., Morgenthaler, F., Borbely, A. A. und Magistretti, P. J. (2010). Metabolic response of the cerebral cortex following gentle sleep deprivation and modafinil administration. *Sleep* 33(7): 901-908.
- Piatkiewicz, P., Czech, A., Taton, J. und Gorski, A. (2010). Investigations of cellular glucose transport and its regulation under the influence of insulin in human peripheral blood lymphocytes. *Endokrynol Pol* 61(2): 182-187.
- Pinkel, D., Se Graves, R., Sudar, D., Clark, S., Poole, I., Kowbel, D., Collins, C., Kuo, W. L., Chen, C., Zhai, Y. et al. (1998). High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20(2): 207-211.
- Plessen, K. J., Bansal, R., Zhu, H., Whiteman, R., Amat, J., Quackenbush, G. A., Martin, L., Durkin, K., Blair, C., Royal, J. et al. (2006). Hippocampus and amygdala morphology in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry* 63(7): 795-807.
- Poelmans, G., Pauls, D. L., Buitelaar, J. K. und Franke, B. (2011). Integrated genome-wide association study findings: identification of a neurodevelopmental network for attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* 168(4): 365-377.
- Polanczyk, G., de Lima, M. S., Horta, B. L., Biederman, J. und Rohde, L. A. (2007). The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry* 164(6): 942-948.
- Porter, N. M., Bohannon, J. H., Curran-Rauhut, M., Buechel, H. M., Dowling, A. L., Brewer, L. D., Popovic, J., Thibault, V., Kraner, S. D., Chen, K. C. et al. (2012). Hippocampal CA1 transcriptional profile of sleep deprivation: relation to aging and stress. *PLoS One* 7(7): e40128.
- Prince, J. (2008). Catecholamine dysfunction in attention-deficit/hyperactivity disorder: an update. *J Clin Psychopharmacol* 28(3 Suppl 2): S39-45.
- Ptacek, R., Kuzelova, H., Papezova, H. und Stepankova, T. (2010). Attention deficit hyperactivity disorder and eating disorders. *Prague Med Rep* 111(3): 175-181.
- Rada, P., Avena, N. M. und Hoebel, B. G. (2005). Daily bingeing on sugar repeatedly releases dopamine in the accumbens shell. *Neuroscience* 134(3): 737-744.
- Rajakumar, A., Thamocharan, S., Raychaudhuri, N., Menon, R. K. und Devaskar, S. U. (2004). Trans-activators regulating neuronal glucose transporter isoform-3 gene expression in mammalian neurons. *J Biol Chem* 279(25): 26768-26779.
- Rapoport, J. L. und Gogtay, N. (2008). Brain neuroplasticity in healthy, hyperactive and psychotic children: insights from neuroimaging. *Neuropsychopharmacology* 33(1): 181-197.

- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G. und Deber, C. M. (2009). Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(6): 1760-1765.
- Reagan, L. P., Magarinos, A. M., Lucas, L. R., van Bueren, A., McCall, A. L. und McEwen, B. S. (1999). Regulation of GLUT-3 glucose transporter in the hippocampus of diabetic rats subjected to stress. *Am J Physiol* 276(5 Pt 1): E879-886.
- Reagan, L. P., Rosell, D. R., Alves, S. E., Hoskin, E. K., McCall, A. L., Charron, M. J. und McEwen, B. S. (2002). GLUT8 glucose transporter is localized to excitatory and inhibitory neurons in the rat hippocampus. *Brain Res* 932(1-2): 129-134.
- Redon, R., Ishikawa, S., Fitch, K. R., Feuk, L., Perry, G. H., Andrews, T. D., Fiegler, H., Shapero, M. H., Carson, A. R., Chen, W. et al. (2006). Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444(7118): 444-454.
- Reif, A., Jacob, C. P., Rujescu, D., Herterich, S., Lang, S., Gutknecht, L., Baehne, C. G., Strobel, A., Freitag, C. M., Giegling, I. et al. (2009). Influence of functional variant of neuronal nitric oxide synthase on impulsive behaviors in humans. *Arch Gen Psychiatry* 66(1): 41-50.
- Ren, B. F., Deng, L. F., Wang, J., Zhu, Y. P., Wei, L. und Zhou, Q. (2008). Hypoxia regulation of facilitated glucose transporter-1 and glucose transporter-3 in mouse chondrocytes mediated by HIF-1 alpha. *Joint Bone Spine* 75(2): 176-181.
- Richter-Levin, G. (2004). The amygdala, the hippocampus, and emotional modulation of memory. *Neuroscientist* 10(1): 31-39.
- Rivero, O., Sich, S., Popp, S., Schmitt, A., Franke, B. und Lesch, K. P. (2013). Impact of the ADHD-susceptibility gene CDH13 on development and function of brain networks. *Eur Neuropsychopharmacol* 23(6): 492-507.
- Roeske, D., Ludwig, K. U., Neuhoff, N., Becker, J., Bartling, J., Bruder, J., Brockschmidt, F. F., Warnke, A., Remschmidt, H., Hoffmann, P. et al. (2011). First genome-wide association scan on neurophysiological endophenotypes points to trans-regulation effects on SLC2A3 in dyslexic children. *Mol Psychiatry* 16(1): 97-107.
- Rolls, E. T. (2016). Functions of the anterior insula in taste, autonomic, and related functions. *Brain Cogn* 110: 4-19.
- Roy, C. S. und Sherrington, C. S. (1890). On the Regulation of the Blood-supply of the Brain. *J Physiol* 11(1-2): 85-158 117.
- Royer, C., Lachuer, J., Crouzoulon, G., Roux, J., Peyronnet, J., Mamet, J., Pequignot, J. und Dalmaz, Y. (2000). Effects of gestational hypoxia on mRNA levels of Glut3 and Glut4 transporters, hypoxia inducible factor-1 and thyroid hormone receptors in developing rat brain. *Brain Res* 856(1-2): 119-128.
- Rubia, K., Overmeyer, S., Taylor, E., Brammer, M., Williams, S. C., Simmons, A. und Bullmore, E. T. (1999). Hypofrontality in attention deficit hyperactivity disorder

- during higher-order motor control: a study with functional MRI. *Am J Psychiatry* 156(6): 891-896.
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J. und Moorman, A. F. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 37(6): e45.
- Rumsey, S. C., Kwon, O., Xu, G. W., Burant, C. F., Simpson, I. und Levine, M. (1997). Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid. *J Biol Chem* 272(30): 18982-18989.
- Russell, V. A. (2000). The nucleus accumbens motor-limbic interface of the spontaneously hypertensive rat as studied in vitro by the superfusion slice technique. *Neurosci Biobehav Rev* 24(1): 133-136.
- Sadoul, K., Lang, J., Montecucco, C., Weller, U., Regazzi, R., Catsicas, S., Wollheim, C. B. und Halban, P. A. (1995). SNAP-25 is expressed in islets of Langerhans and is involved in insulin release. *J Cell Biol* 128(6): 1019-1028.
- Sancho, S., Casas, I., Ekwall, H., Saravia, F., Rodriguez-Martinez, H., Rodriguez-Gil, J. E., Flores, E., Pinart, E., Briz, M., Garcia-Gil, N. et al. (2007). Effects of cryopreservation on semen quality and the expression of sperm membrane hexose transporters in the spermatozoa of Iberian pigs. *Reproduction* 134(1): 111-121.
- Sawada, H., Takami, K. und Asahi, S. (2005). A toxicogenomic approach to drug-induced phospholipidosis: analysis of its induction mechanism and establishment of a novel in vitro screening system. *Toxicol Sci* 83(2): 282-292.
- Scheepers, A., Joost, H. G. und Schurmann, A. (2004). The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 28(5): 364-371.
- Schmidt, S., Hommel, A., Gawlik, V., Augustin, R., Junicke, N., Florian, S., Richter, M., Walther, D. J., Montag, D., Joost, H. G. et al. (2009). Essential role of glucose transporter GLUT3 for post-implantation embryonic development. *J Endocrinol* 200(1): 23-33.
- Schmidt, S., Richter, M., Montag, D., Sartorius, T., Gawlik, V., Hennige, A. M., Scherneck, S., Himmelbauer, H., Lutz, S. Z., Augustin, R. et al. (2008). Neuronal functions, feeding behavior, and energy balance in Slc2a3<sup>+/-</sup> mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295(5): E1084-1094.
- Schmitt, J. und Romanos, M. (2012). Prenatal and perinatal risk factors for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Pediatr Adolesc Med* 166(11): 1074-1075.
- Schöpf, V., Fischmeister, F. P., Windischberger, C., Gerstl, F., Wolzt, M., Karlsson, K. A. E. und Moser, E. (2013). Effects of individual glucose levels on the neuronal correlates of emotions. *Front Hum Neurosci* 7: 212.

- Schwanhausser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W. und Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473(7347): 337-342.
- Schwartz, W. J., Sharp, F. R., Gunn, R. H. und Evarts, E. V. (1976). Lesions of ascending dopaminergic pathways decrease forebrain glucose uptake. *Nature* 261(5556): 155-157.
- Sebat, J., Lakshmi, B., Troge, J., Alexander, J., Young, J., Lundin, P., Maner, S., Massa, H., Walker, M., Chi, M. et al. (2004). Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 305(5683): 525-528.
- Seiffert, C., Khoshgoftaar, T. M., Van Hulse, J. und Napolitano, A. (2010). RUSBoost: A Hybrid Approach to Alleviating Class Imbalance *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics—Part A: Systems and Humans* 40(1).
- Shaw, P., Eckstrand, K., Sharp, W., Blumenthal, J., Lerch, J. P., Greenstein, D., Clasen, L., Evans, A., Giedd, J. und Rapoport, J. L. (2007). Attention-deficit/hyperactivity disorder is characterized by a delay in cortical maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(49): 19649-19654.
- Shen, X. H., Han, Y. J., Yang, B. C., Cui, X. S. und Kim, N. H. (2009). Hyperglycemia reduces mitochondrial content and glucose transporter expression in mouse embryos developing in vitro. *J Reprod Dev* 55(5): 534-541.
- Shepherd, P. R., Gould, G. W., Colville, C. A., McCoid, S. C., Gibbs, E. M. und Kahn, B. B. (1992). Distribution of GLUT3 glucose transporter protein in human tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 188(1): 149-154.
- Shum, D., Neulinger, K., O'Callaghan, M. und Mohay, H. (2008). Attentional problems in children born very preterm or with extremely low birth weight at 7-9 years. *Arch Clin Neuropsychol* 23(1): 103-112.
- Simon, V., Czobor, P., Balint, S., Meszaros, A. und Bitter, I. (2009). Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis. *Br J Psychiatry* 194(3): 204-211.
- Simpson, I. A., Chundu, K. R., Davies-Hill, T., Honer, W. G. und Davies, P. (1994). Decreased concentrations of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 35(5): 546-551.
- Sivitz, W. I., DeSautel, S. L., Lee, E. C. und Pessin, J. E. (1992). Time-dependent regulation of rat adipose tissue glucose transporter (GLUT4) mRNA and protein by insulin in streptozocin-diabetic and normal rats. *Metabolism* 41(11): 1267-1272.
- Sobanski, E. (2006). Psychiatric comorbidity in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 256 Suppl 1: i26-31.
- Sonuga-Barke, E. J. und Castellanos, F. X. (2007). Spontaneous attentional fluctuations in impaired states and pathological conditions: a neurobiological hypothesis. *Neurosci Biobehav Rev* 31(7): 977-986.

- Stahl, S. (2013). *Stahl's Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications*, Cambridge University Press.
- Stergiakouli, E., Hamshere, M., Holmans, P., Langley, K., Zaharieva, I., Hawi, Z., Kent, L., Gill, M., Williams, N., Owen, M. J. et al. (2012). Investigating the contribution of common genetic variants to the risk and pathogenesis of ADHD. *Am J Psychiatry* 169(2): 186-194.
- Stevens, T. und Mulsow, M. (2006). There is no meaningful relationship between television exposure and symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pediatrics* 117(3): 665-672.
- Stuart, C. A., Howell, M. E., Yin, D., Copland, J. A., Wood, T. G. und Ceci, J. D. (2007). The brain glucose transporter (Glut3) null genotype is associated with post-implantation failure of embryo formation. *Diabetes* 56: A329-A329.
- Stuart, C. A., Ross, I. R., Howell, M. E., McCurry, M. P., Wood, T. G., Ceci, J. D., Kennel, S. J. und Wall, J. (2011). Brain glucose transporter (Glut3) haploinsufficiency does not impair mouse brain glucose uptake. *Brain Res* 1384: 15-22.
- Taha, C., Mitsumoto, Y., Liu, Z., Skolnik, E. Y. und Klip, A. (1995). The insulin-dependent biosynthesis of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in L6 muscle cells is mediated by distinct pathways. Roles of p21ras and pp70 S6 kinase. *J Biol Chem* 270(42): 24678-24681.
- Tapper, J., Butzow, R., Wahlstrom, T., Seppala, M. und Knuutila, S. (1997). Evidence for divergence of DNA copy number changes in serous, mucinous and endometrioid ovarian carcinomas. *Br J Cancer* 75(12): 1782-1787.
- Tataranni, P. A., Gautier, J. F., Chen, K., Uecker, A., Bandy, D., Salbe, A. D., Pratley, R. E., Lawson, M., Reiman, E. M. und Ravussin, E. (1999). Neuroanatomical correlates of hunger and satiation in humans using positron emission tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(8): 4569-4574.
- Tau, G. Z. und Peterson, B. S. (2010). Normal development of brain circuits. *Neuropsychopharmacology* 35(1): 147-168.
- Thamotharan, S., Raychaudhuri, N., Tomi, M., Shin, B. C. und Devaskar, S. U. (2013). Hypoxic adaptation engages the CBP/CREST-induced coactivator complex of Creb-HIF-1alpha in transactivating murine neuroblastic glucose transporter. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 304(6): E583-598.
- Thanos, P. K., Michaelides, M., Benveniste, H., Wang, G. J. und Volkow, N. D. (2008). The effects of cocaine on regional brain glucose metabolism is attenuated in dopamine transporter knockout mice. *Synapse* 62(5): 319-324.
- Thoidis, G., Kupriyanova, T., Cunningham, J. M., Chen, P., Cadel, S., Foulon, T., Cohen, P., Fine, R. E. und Kandror, K. V. (1999). Glucose transporter Glut3 is targeted to secretory vesicles in neurons and PC12 cells. *J Biol Chem* 274(20): 14062-14066.

- Thomas, D. M., Maher, F., Rogers, S. D. und Best, J. D. (1996). Expression and regulation by insulin of GLUT 3 in UMR 106-01, a clonal rat osteosarcoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 218(3): 789-793.
- Thulborn, K. R., Waterton, J. C., Matthews, P. M. und Radda, G. K. (1982). Oxygenation dependence of the transverse relaxation time of water protons in whole blood at high field. *Biochim Biophys Acta* 714(2): 265-270.
- Tian, Q., Stepaniants, S. B., Mao, M., Weng, L., Feetham, M. C., Doyle, M. J., Yi, E. C., Dai, H., Thorsson, V., Eng, J. et al. (2004). Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in Mammalian cells. *Mol Cell Proteomics* 3(10): 960-969.
- Tong, F. (2003). Primary visual cortex and visual awareness. *Nat Rev Neurosci* 4(3): 219-229.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4354.
- Tuulari, J. J., Karlsson, H. K., Hirvonen, J., Salminen, P., Nuutila, P. und Nummenmaa, L. (2015). Neural circuits for cognitive appetite control in healthy and obese individuals: an fMRI study. *PLoS One* 10(2): e0116640.
- Tyrberg, B., Miles, P., Azizian, K. T., Denzel, M. S., Nieves, M. L., Monosov, E. Z., Levine, F. und Ranscht, B. (2011). T-cadherin (Cdh13) in association with pancreatic beta-cell granules contributes to second phase insulin secretion. *Islets* 3(6): 327-337.
- Uehara, Y., Nipper, V. und McCall, A. L. (1997). Chronic insulin hypoglycemia induces GLUT-3 protein in rat brain neurons. *Am J Physiol* 272(4 Pt 1): E716-719.
- Uemura, E. und Greenlee, H. W. (2006). Insulin regulates neuronal glucose uptake by promoting translocation of glucose transporter GLUT3. *Exp Neurol* 198(1): 48-53.
- Ulrich, M., Endres, F., Kollé, M., Adolph, O., Widenhorn-Müller, K. und Gron, G. (2016). Glucose modulates food-related salience coding of midbrain neurons in humans. *Hum Brain Mapp* 37(12): 4376-4384.
- Umhau, J. C., Petruilis, S. G., Diaz, R., Rawlings, R. und George, D. T. (2003). Blood glucose is correlated with cerebrospinal fluid neurotransmitter metabolites. *Neuroendocrinology* 78(6): 339-343.
- Valera, E. M., Faraone, S. V., Murray, K. E. und Seidman, L. J. (2007). Meta-analysis of structural imaging findings in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 61(12): 1361-1369.
- van der Kooij, M. A. und Glennon, J. C. (2007). Animal models concerning the role of dopamine in attention-deficit hyperactivity disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 31(4): 597-618.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. und Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data

- by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3(7): RESEARCH0034.
- Vannucci, S. J., Clark, R. R., Koehler-Stec, E., Li, K., Smith, C. B., Davies, P., Maher, F. und Simpson, I. A. (1998). Glucose transporter expression in brain: relationship to cerebral glucose utilization. *Dev Neurosci* 20(4-5): 369-379.
- Vannucci, S. J., Seaman, L. B. und Vannucci, R. C. (1996). Effects of hypoxia-ischemia on GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in immature rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 16(1): 77-81.
- Vaughan, C. E., van den Buuse, M. und Roland, B. L. (1999). Brain dopamine D2 receptor mRNA levels are elevated in young spontaneously hypertensive rats. *Neurosci Res* 34(4): 199-205.
- Veal, C. D., Reekie, K. E., Lorentzen, J. C., Gregersen, P. K., Padyukov, L. und Brookes, A. J. (2014). A 129-kb Deletion on Chromosome 12 Confers Substantial Protection Against Rheumatoid Arthritis, Implicating the Gene SLC2A3. *Hum Mutat* 35(2): 248-256.
- Vittori, A., Breda, C., Repici, M., Orth, M., Roos, R. A., Outeiro, T. F., Giorgini, F., Hollox, E. J. und the, R. i. o. t. E. H. s. D. N. (2014). Copy-number variation of the neuronal glucose transporter gene SLC2A3 and age of onset in Huntington's disease. *Hum Mol Genet*.
- Vogel, C., Abreu Rde, S., Ko, D., Le, S. Y., Shapiro, B. A., Burns, S. C., Sandhu, D., Boutz, D. R., Marcotte, E. M. und Penalva, L. O. (2010). Sequence signatures and mRNA concentration can explain two-thirds of protein abundance variation in a human cell line. *Mol Syst Biol* 6: 400.
- Vogel, C. und Marcotte, E. M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet* 13(4): 227-232.
- Voinescu, B. I., Szentagotai, A. und David, D. (2012). Sleep disturbance, circadian preference and symptoms of adult attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *J Neural Transm*.
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Fowler, J. S., Logan, J., Angrist, B., Hitzemann, R., Lieberman, J. und Pappas, N. (1997). Effects of methylphenidate on regional brain glucose metabolism in humans: relationship to dopamine D2 receptors. *Am J Psychiatry* 154(1): 50-55.
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Newcorn, J., Telang, F., Solanto, M. V., Fowler, J. S., Logan, J., Ma, Y., Schulz, K., Pradhan, K. et al. (2007). Depressed dopamine activity in caudate and preliminary evidence of limbic involvement in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry* 64(8): 932-940.
- von Wolff, M., Ursel, S., Hahn, U., Steldinger, R. und Strowitzki, T. (2003). Glucose transporter proteins (GLUT) in human endometrium: expression, regulation, and function throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 88(8): 3885-3892.

- Waites, C. L., Craig, A. M. und Garner, C. C. (2005). Mechanisms of vertebrate synaptogenesis. *Annu Rev Neurosci* 28: 251-274.
- Ward, M. F., Wender, P. H. und Reimherr, F. W. (1993). The Wender Utah Rating Scale: an aid in the retrospective diagnosis of childhood attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* 150(6): 885-890.
- Weiss, H. M. und Grisshammer, R. (2002). Purification and characterization of the human adenosine A(2a) receptor functionally expressed in Escherichia coli. *Eur J Biochem* 269(1): 82-92.
- Wender, E. H. und Solanto, M. V. (1991). Effects of sugar on aggressive and inattentive behavior in children with attention deficit disorder with hyperactivity and normal children. *Pediatrics* 88(5): 960-966.
- Wender, P. H. (1973). Some speculations concerning a possible biochemical basis of minimal brain dysfunction. *Ann N Y Acad Sci* 205: 18-28.
- Willcutt, E. G., Pennington, B. F., Olson, R. K. und DeFries, J. C. (2007). Understanding comorbidity: a twin study of reading disability and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B(6): 709-714.
- Williams, N. M., Franke, B., Mick, E., Anney, R. J., Freitag, C. M., Gill, M., Thapar, A., O'Donovan, M. C., Owen, M. J., Holmans, P. et al. (2012). Genome-wide analysis of copy number variants in attention deficit hyperactivity disorder: the role of rare variants and duplications at 15q13.3. *Am J Psychiatry* 169(2): 195-204.
- Williams, N. M., Zaharieva, I., Martin, A., Langley, K., Mantripragada, K., Fossdal, R., Stefansson, H., Stefansson, K., Magnusson, P., Gudmundsson, O. O. et al. (2010). Rare chromosomal deletions and duplications in attention-deficit hyperactivity disorder: a genome-wide analysis. *Lancet* 376(9750): 1401-1408.
- Wolraich, M. L., Lindgren, S. D., Stumbo, P. J., Stegink, L. D., Appelbaum, M. I. und Kiritsy, M. C. (1994). Effects of diets high in sucrose or aspartame on the behavior and cognitive performance of children. *N Engl J Med* 330(5): 301-307.
- Wolraich, M. L., Wilson, D. B. und White, J. W. (1995). The effect of sugar on behavior or cognition in children. A meta-analysis. *JAMA* 274(20): 1617-1621.
- Wood, D. R., Reimherr, F. W., Wender, P. H. und Johnson, G. E. (1976). Diagnosis and treatment of minimal brain dysfunction in adults: a preliminary report. *Arch Gen Psychiatry* 33(12): 1453-1460.
- Wood, I. S., Wang, B., Lorente-Cebrian, S. und Trayhurn, P. (2007). Hypoxia increases expression of selective facilitative glucose transporters (GLUT) and 2-deoxy-D-glucose uptake in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 361(2): 468-473.
- Wooten, G. F. und Collins, R. C. (1981). Metabolic effects of unilateral lesion of the substantia nigra. *J Neurosci* 1(3): 285-291.

- Wu, X. und Freeze, H. H. (2002). GLUT14, a duplicon of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms. *Genomics* 80(6): 553-557.
- Yang, S., Wang, K., Gregory, B., Berrettini, W., Wang, L. S., Hakonarson, H. und Bucan, M. (2009a). Genomic landscape of a three-generation pedigree segregating affective disorder. *PLoS One* 4(2): e4474.
- Yang, Y., Hu, Z., Liu, Z., Wang, Y., Chen, X. und Chen, G. (2009b). High human GLUT1, GLUT2, and GLUT3 expression in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemistry (Mosc)* 74(1): 75-80.
- Yano, H., Seino, Y., Inagaki, N., Hinokio, Y., Yamamoto, T., Yasuda, K., Masuda, K., Someya, Y. und Imura, H. (1991). Tissue distribution and species difference of the brain type glucose transporter (GLUT3). *Biochem Biophys Res Commun* 174(2): 470-477.
- Yoshikawa, H., Nishimura, T., Nakatsuji, Y., Fujimura, H., Himoro, M., Hayasaka, K., Sakoda, S. und Yanagihara, T. (1994). Elevated expression of messenger RNA for peripheral myelin protein 22 in biopsied peripheral nerves of patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Ann Neurol* 35(4): 445-450.
- Yoshimasu, K., Barbaresi, W. J., Colligan, R. C., Killian, J. M., Voigt, R. G., Weaver, A. L. und Katusic, S. K. (2010). Gender, attention-deficit/hyperactivity disorder, and reading disability in a population-based birth cohort. *Pediatrics* 126(4): e788-795.
- Yu, S., Tooyama, I., Ding, W. G., Kitasato, H. und Kimura, H. (1995). Immunohistochemical localization of glucose transporters (GLUT1 and GLUT3) in the rat hypothalamus. *Obes Res* 3 Suppl 5: 753S-776S.
- Zametkin, A. J., Liebenauer, L. L., Fitzgerald, G. A., King, A. C., Minkunas, D. V., Herscovitch, P., Yamada, E. M. und Cohen, R. M. (1993). Brain metabolism in teenagers with attention-deficit hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry* 50(5): 333-340.
- Zametkin, A. J., Nordahl, T. E., Gross, M., King, A. C., Semple, W. E., Rumsey, J., Hamburger, S. und Cohen, R. M. (1990). Cerebral glucose metabolism in adults with hyperactivity of childhood onset. *N Engl J Med* 323(20): 1361-1366.
- Zhang, C., Lin, M., Wu, R., Wang, X., Yang, B., Levine, A. J., Hu, W. und Feng, Z. (2011). Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(39): 16259-16264.
- Zhao, Y., Fung, C., Shin, D., Shin, B. C., Thamocharan, S., Sankar, R., Ehninger, D., Silva, A. und Devaskar, S. U. (2010). Neuronal glucose transporter isoform 3 deficient mice demonstrate features of autism spectrum disorders. *Mol Psychiatry* 15(3): 286-299.
- Zhou, K., Dempfle, A., Arcos-Burgos, M., Bakker, S. C., Banaschewski, T., Biederman, J., Buitelaar, J., Castellanos, F. X., Doyle, A., Ebstein, R. P. et al. (2008). Meta-analysis of genome-wide linkage scans of attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B(8): 1392-1398.

Zhuang, G. Q., Wu, W., Liu, F., Ma, J. L., Luo, Y. X., Xiao, Z. X., Liu, Y., Wang, W. und He, Y. (2009). SNAP-25(1-180) enhances insulin secretion by blocking Kv2.1 channels in rat pancreatic islet beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 379(4): 812-816.

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Professor Lesch einerseits für die freundliche Überlassung des Themas danken, das mich im Laufe der Arbeit mehr und mehr zu fesseln vermochte, andererseits für sein offenes Ohr, das er mir bei aufkommenden Problemen geliehen hat und nicht zuletzt für die mir zugestandene kreative Freiheit, die mir bei der Planung, sowie Durchführung der Experimente stets als Motivation zur Fortführung meiner Arbeit diente.

Großer Dank gilt zudem Sören Merker, der diese Arbeit in Detailfragen betreut hat und der mich in die Welt des wissenschaftlich experimentellen Arbeitens eingeführt und mir wertvolle Hilfe beim Korrekturlesen geleistet hat.

Für eine sehr belebende Zusammenarbeit und die freundliche Überlassung der fMRT-Daten möchte ich Annette Conzelmann und allen beteiligten Mitarbeitern (allen voran Ramona Baur, Martina Berger und Philipp Reicherts) des Instituts für Psychologie, Würzburg, herzlich Danke sagen. Ebenso sei in diesem Zusammenhang Tim Hahn gedankt, der die aufwendige statistische Auswertung der fMRT-Daten übernahm.

Allen Labormitarbeitern sei gedankt für die Schaffung einer sehr angenehmen, kollegialen Arbeitsatmosphäre. Hervorheben möchte ich insbesondere Ute Mayer, die den Western-Blot trotz vieler Widrigkeiten unermüdlich vorangetrieben hat und so die methodischen Voraussetzungen für die Durchführung meiner eigenen Western-Blot-Experimente schuf, Olga Rivero und Lena Weißflog, die oft hilfreiche Tipps auf dem Gebiet der Proteinbiochemie gaben und Proteinlysate zur Verfügung stellten, Joyce Auer, die mich in die Methodik des TaqMan-Genotypisierungs-Assays eingeführt hat und den Großteil der Genotypisierungen selbst durchgeführt hat, Heike Weber, die die Statistik bezüglich der CNV-Assays erstellt hat, Terri Töpner, die bei Fragen bezüglich der Kultivierung von Zelllinien stets eine kompetente Ansprechpartnerin war, Max Hilscher, der mir fibroblastoide Zellkulturen zur Verfügung stellte, Ricarda Schwarz, die mich über ihre eigenen Forschungsergebnisse bezüglich *SLC2A3* auf dem Laufenden hielt, Gabi Ortega, die immer kompetent und helfend zur Seite stand, wenn Fragen aufkamen und allen anderen DNA-HIWI, ohne die das DNA-Labor nicht funktionieren würde.

## Danksagung

---

Silke Groß-Lesch, Susanne Reichert und Julia Heupel haben mir bei der Patientenrekrutierung unschätzbare Hilfe geleistet. Dafür herzlichen Dank!

Ohne die wertvolle Mithilfe und bereichernde Neugier der Probanden wären meine Studien nicht möglich gewesen. Vielen Dank allen Probanden!

Zu guter Letzt gilt mein größter Dank meiner Familie. Meinen Geschwistern Clemens, Anita und Marina für die stetige Unterstützung. Meinen lieben Eltern, Rita und Winfried, dafür, dass sie mir großes Vertrauen in meine Fähigkeiten mit auf den Weg gegeben haben.