

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

**Expression von Natrium/Glukose-
Cotransportern im menschlichen Gehirn bei
Todesfällen durch Schädel-Hirn-Trauma und
Todesfällen durch Ersticken**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorgelegt von

Sabrina Oerter

aus Kitzingen

2017

Eingereicht am: 28.09.2017

Mitglieder der Promotionskommission:

Referent: Prof. Dr. med. Michael Bohnert

Korreferent: Prof. Dr. Georg Krohne

Dekan der Biologischen Fakultät: Prof. Dr. Thomas Rudel

Tag der Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Glukosetransporter.....	1
1.1.1.	Glukosetransporter (SLC2).....	1
1.1.2.	Natrium-abhängige Glukosetransporter (SLC5).....	4
1.2.	Blut-Hirn-Schranke (BHS)	8
1.3.	Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT)	10
1.3.1.	Pathomechanismen des SHT	10
1.4.	Ödem	13
1.4.1.	Vasogenes Hirnödem	14
1.4.2.	Zytotoxisches Hirnödem	14
1.4.3.	Weitere Formen des Hirnödems	14
1.5.	Funktion der Glukosetransporter bei SHT und Ischämie.....	15
1.5.1.	Wassertransport mittels Glukosetransporter.....	17
1.6.	Problematik der rechtsmedizinischen Untersuchung.....	18
1.7.	Ziel der Arbeit.....	20
2.	Material	21
2.1.	Zellkultur.....	21
2.1.1.	Zelllinie	21
2.1.2.	Medien und Medienzusätze zur Zell-Kultivierung	21
2.1.3.	Reagenzien für Transfektionsversuche	21
2.1.4.	siRNA	22
2.2.	Verwendete Chemikalien	22
2.3.	Verwendete Kits	25
2.4.	Verwendete Puffer.....	25
2.5.	Verwendete Antikörper.....	28
2.6.	Sonden und Primer für die Real-Time PCR	29

3. Methoden.....	30
3.1. Bioinformatik.....	30
3.2. Zellkultur.....	30
3.2.1. Kultivierung der HK-2 Zelllinie.....	30
3.2.2. Kultivierung der CaCo-2 Zelllinie	31
3.2.3. Kultivierung der HEK293 Zelllinie	31
3.2.4. Transfektion	32
3.3. Gewinnung humaner Gehirnregionen	32
3.4. Isolierung humaner Hirnkapillaren.....	33
3.5. Proteinarbeiten	34
3.5.1. Proteinisolation aus humanen Zellen.....	34
3.5.2. Proteinisolation aus humanen Gewebe	34
3.5.3. Konzentrationsbestimmung der Proteinlysate	34
3.5.4. SDS-PAGE	35
3.5.5. Western blotting.....	35
3.6. Strippen der Western Blot Membranen	36
3.7. Datenauswertung	37
3.7.1. Analyse der Rohdaten	37
3.8. RNA-Arbeiten	39
3.8.1. RNA-Isolation.....	39
3.8.2. Konzentrationsmessung mittels NanoDrop™	40
3.8.3. Reverse Transkription.....	40
3.8.4. Prä-Amplifikation.....	41
3.8.5. Primer Design	42
3.8.6. Real-Time Polymerase-Kettenreaktion	43
3.9. Immunhistologie	45
3.9.1. Anfertigung von Gefrierschnitten	45
3.9.2. Immunfluoreszenzfärbung	45

3.10. Blocken der Antikörper mit immunisiertem Peptid	46
4. Ergebnisse	47
4.1. Phylogenese von SGLT Proteinen	47
4.1.1. Entwicklung von Glukosetransportern der SCL2- und SLC5-Genfamilie	47
4.1.2. Phylogenie von SGLT1 und SGLT2.....	49
4.2. Analyse der Spezifität der verwendeten Antikörper.....	52
4.3. Immunhistologischer Nachweis von Glukosetransportern im menschlichen Gehirn.....	55
4.3.1. Gefrierschnitte des Gesamthirngewebe.....	55
4.3.2. Isolierte Kapillaren des menschlichen Gehirns	60
4.3.2.1. Lokalisation von Verunreinigungen durch Gliazell-Endfüßen	62
4.3.2.2. Lokalisation von SGLT1 und SGLT2 in unterschiedlichen Hirnregionen	63
4.4. mRNA-Expression von Glukosetransportern im menschlichen Gehirn	66
4.4.1. Expression nach globalem Sauerstoffmangel.....	66
4.4.2. mRNA-Expression in unterschiedlichen Hirnregionen	68
4.5. Proteinexpression von Glukosetransportern im menschlichen Gehirn	73
4.5.1. Expression nach globalem Sauerstoffmangel.....	73
4.5.2. Expression nach lokalem Sauerstoffmangel.....	77
4.6. Statistische Bewertung der Expression nach lokaler Schädigung	80
4.6.1. Datenanalyse der GLUT1-Daten	80
4.6.2. Datenanalyse der SGLT1-Daten.....	81
4.6.3. Datenanalyse der SGLT2-Daten.....	82
4.7. Expressionsverlauf von Glukosetransportern im menschlichen Gehirn nach lokaler Schädigung.....	83
4.8. Lokalisation von SGLT1 und SGLT2 in unterschiedlichen Hirnregionen	85
4.8.1. Lokalisation im menschlichen Gesamthirn.....	85
4.8.2. Lokalisation in menschlichen Hirnkapillaren	87
5. Diskussion	88

5.1.	Hirnevolution und Phylogenese der Natrium-abhängigen Glukosetransporter	88
5.2.	Spezifität der verwendeten Antikörper und Primer	90
5.3.	Problematik der rechtsmedizinischen Untersuchung.....	92
5.4.	Expression von Glukosetransportern im menschlichen Gehirn	93
5.4.1.	Lokalisation der Natrium-abhängigen Glukosetransporter SGLT1 und SGLT2 im menschlichen Gehirn.....	95
5.4.2.	Expressionsverlauf der Glukosetransporter	98
5.5.	Bedeutung der Ergebnisse für die medizinische Forschung	100
6.	Zusammenfassung	102
7.	Summary	104
	Abbildungsverzeichnis.....	106
	Tabellenverzeichnis.....	109
	Abkürzungen	110
	Anhang.....	112
	Literaturverzeichnis	117
	Danksagung	130

1. Einleitung

1.1. Glukosetransporter

Das gesunde Gehirngewebe benötigt täglich ca. 113 g Glukose, dies beträgt 20% des Gesamtglukoseumsatzes des menschlichen Körpers (Erbsloh et al. 1958, 1958). Da neuroaktive Komponenten, wie z. B. Glutamat und Glycin nicht durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) transportiert werden können, ist das Gehirn auf eine Synthetisierung dieser Moleküle aus Glukose innerhalb der Gehirnzellen angewiesen. Ergänzend wird in den Mitochondrien der Zellen die Glukose mittels Sauerstoff durch oxidative Phosphorylierung zu energiereichem Adenosintriphosphat (ATP) synthetisiert, welches die Zellintegrität und den Zellstoffwechsel wahrt. Das Gehirn besitzt jedoch keine nennenswerten Glukose- und Glykogenreserven, aus diesem Grund ist es auf eine ständige Zuckerzufuhr aus dem Blut angewiesen. Kann die Glukoseversorgung nicht aufrechterhalten werden, geht dies mit einer Funktionseinschränkung, sowie mit erhöhtem neuronalen Zellverlust einher. Eine schnelle Wiederherstellung der optimalen Versorgung ist somit von entscheidender Bedeutung für das Überleben des geschädigten Hirngewebes und für die Begrenzung des sogenannten Sekundärschadenwachstums.

Für die Resorption von Glukose in Körperzellen gibt es zwei Transportmechanismen, zum einen die Glukosetransporter (GLUT, SLC2 Genfamilie) und zum anderen die Natrium-abhängigen Glukosetransporter (SGLT, SLC5-Genfamilie) (Scheepers et al. 2004).

1.1.1. Glukosetransporter (SLC2)

Glukosetransporter der Genfamilie SLC2 sind in Säugetieren die wichtigsten Transporter für Glukose und finden sich in fast allen Zellen des menschlichen Körpers (siehe Tabelle 1; Mueckler und Thorens 2013). Es handelt sich hierbei um Uniporter, die Glukose durch erleichterte Diffusion, d. h. über einen Konzentrationsgradienten von Glukose und somit ohne Energieverbrauch, in die Zellen befördern. Es sind bis zum jetzigen Zeitpunkt 14 Mitglieder der SLC2-Familie bekannt, GLUT1 bis GLUT12, GLUT14 und HMIT (Mueckler und Thorens 2013).

Einleitung

Tabelle 1: Die SLC2-Genfamilie (nach Uldry und Thorens 2004)

Genname	Genlocus	Proteinname	Substrat	Gewebe	Splice Varianten
SLC2A1	1p35-31.3	GLUT1	Glukose, Galaktose, Mannose, Glukosamine	Erythrozyten, Gehirn	-
SLC2A2	3q26.1-q26.2	GLUT2	Glukose, Galaktose, Fruktose, Mannose, Glukosamine	Leber, Langerhans-Inseln, Darm, Niere, Gehirn	-
SLC2A3	12p13.3	GLUT3	Glukose, Galaktose, Mannose, Xylose	Gehirn (Neuronen), Hoden	-
SLC2A3P1	5q35.1	GLUT3 Pseudogen			-
SLC2A3P2	1p31.3	GLUT3 Pseudogen			-
SLC2A3P4	8q21.3	GLUT3 Pseudogen			-
SLC2A4	17p13	GLUT4	Glukose, Glukosamine	Fettgewebe, Skelettmuskulatur, Herzmuskulatur	-
SLC2A5	1p36.2	GLUT5	Fruktose	Dünndarm, Niere	√
SLC2A6	9q34	GLUT6	Glukose	Gehirn, Milz, Leukozyten	√
SLC2A7	1p36.2	GLUT7	Glukose, Fruktose	Dünndarm, Magen, Hoden, Prostata	-
SLC2A8	9q33.3	GLUT8	Glukose, Galaktose, Fruktose	Hoden, Gehirn, Nebenniere, Leber, Milz, plurivakuoläres Fettgewebe, Lunge	-
SLC2A9	4p16-15.3	GLUT9	Ureate (Glukose, Fruktose)	Niere, Leber, Dünndarm, Plazenta, Lunge, Leukozyten	√
SLC2A10	20q13.1	GLUT10	Glukose, Galaktose	Herz, Lunge, Gehirn, Leber, Skelettmuskulatur, Pankreas, Plazenta, Niere	-
SLC2A11	22q11.2	GLUT11	Glukose, Fruktose	Herz, Muskulatur	√
SLC2A12	6q23.2	GLUT12	Glucose	Herz, Prostata, Skelettmuskulatur, Plazenta	
SLC2A13	12q12	GLUT13	Myo-Inositol	Gehirn, Fettgewebe	-
SLC2A14	12p13.31	GLUT14		Hoden	-
SLC2AXP1	2q11.2	Pseudogen			-

Alle GLUT-Transporter teilen die Sekundärstruktur von 12 Transmembranproteinen, wobei das N- und C-terminale Ende auf der zytosolischen Seite gelegen ist, sowie einer N-Glykosylierungsstelle (Mueckler und Thorens 2013). Diese Transporter werden aufgrund ihrer Sequenz in 3 Klassen eingeteilt (Abbildung 1), der größte Unterschied hierbei ist die Position einer Schleife mit der N-Glykosylierungsstelle. Die Klassen 1 und 2 besitzen die Schleife am N-terminalen Ende, während sich diese bei der Klasse 3 am C-terminalen Ende befindet (Uldry und Thorens 2004).

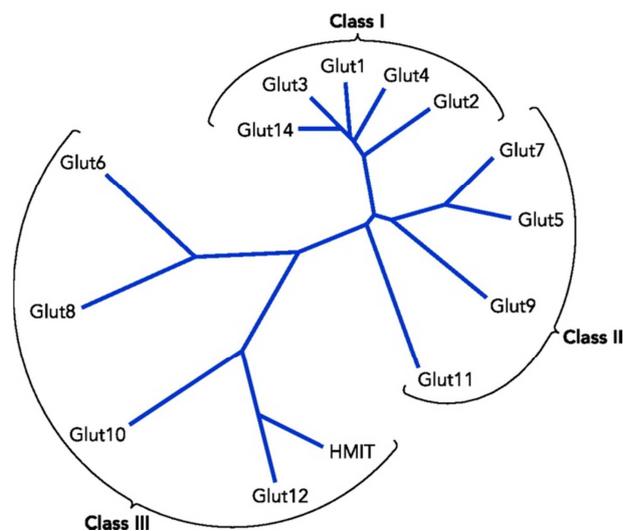


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der SLC2 Genfamilie. Die Transporter werden aufgrund ihrer Strukturunterschiede in drei Klassen eingeteilt (Manolescu et al. 2007).

Der häufigste Glukosetransporter ist die Isoform GLUT1. Er wird in fast allen Zellen des menschlichen Körpers exprimiert und wurde als erster Glukosetransporter in Hepatomzellen nachgewiesen (Mueckler et al. 1985; Fukumoto et al. 1988).

Die stärkste Expression von GLUT1 findet in humanen Erythrozyten statt und ist somit wesentlich für den Glukosetransport über das Blut verantwortlich (Mueckler und Thorens 2013; Kasahara und Hinkle 1977). Weiterhin kann GLUT1 in Endothelzellen verschiedener Mikrogefäße nachgewiesen werden (Mann et al. 2003). Verstärkt findet er sich in der abluminalen Membran von Endothelzellen des Gehirns, sowie den Astrozyten und dient der Energieversorgung entlang der Blut-Hirn-Schranke (BHS) und den Neuronen (Pardridge et al. 1990; Farrell und Pardridge 1991; Vannucci et al. 1998). Hierbei liegt das GLUT1-Protein aufgrund unterschiedlicher Glykosylierungsmuster in zwei Varianten vor. Entlang den Endothelzellen der BHS liegt GLUT1 als 55 kDa Protein vor, in Astrozyten und Gliazellen besitzt GLUT1 ein Molekulargewicht von 45 kDa (Kumagai et al. 1994;

Maher et al. 1994). Neben GLUT1 sorgt GLUT3 ebenfalls für die Energieversorgung des Gehirns, welcher direkt in Neuronen exprimiert wird (Maher et al. 1993; Shepherd et al. 1992; Vannucci et al. 1998).

Eine Versorgung des Gehirngewebes ist von enormer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Organfunktion. Eine Mutation des GLUT1 Transporters führt bereits im frühen Kindesalter zu einer schweren Gehirnpathologie mit Anfallsleiden und ausgeprägter geistiger Retardierung (Brown 2000). Weiterhin konnte bei Patienten mit schwerwiegenden Erkrankungen wie Alzheimer und Diabetes Mellitus eine verminderte GLUT1 und GLUT3 Expression im Gehirn aufgezeigt werden (Shah et al. 2012; Liu et al. 2008). *In vivo* Versuche, bei denen die Glut 3 Expression in Mäusen vermindert wurde, führte zu autistischem Verhalten (Zhao et al. 2010). Diese Erkenntnisse demonstrieren und bestätigen die frühere Annahme, dass eine verminderte Glukoseaufnahme im Gehirn zu gravierenden Folgen für den gesamten Organismus führt.

1.1.2. Natrium-abhängige Glukosetransporter (SLC5)

Natrium-abhängige Glukosetransporter (Sodium-dependent glucose transporter, SGLT) werden durch Gene der SLC5-Familie codiert (siehe Tabelle 2).

Die SGLTs verbrauchen, wie die Glukosetransporter der SLC2/GLUT-Genfamilie, keine Energie und sind somit passive Transporter. Im Gegensatz zu GLUT ist SGLT jedoch unabhängig von der Glukosekonzentration. Der Transport der Glukosemoleküle erfolgt durch Kopplung an ein Natriumion, somit wird die potentielle Energie des Natrium-Konzentrationsgradienten genutzt.

Dieses Konzentrationsgefälle wird durch eine zusätzliche Ionenpumpe, die Na^+/K^+ -ATPase, kontinuierlich hergestellt. Diese Ionenpumpe verbraucht Energie in Form von ATP, wodurch je 3 Moleküle Natrium und Kalium in den Extrazellulärraum transportiert werden. Da die SGLTs abhängig von derartigen Ionenpumpen sind, werden sie als sekundär aktiv bezeichnet.

Einleitung

Tabelle 2: Die SLC5-Genfamilie (nach Turk und Wright 2004)

Genname	Genlocus	Proteinname	Substrat	Gewebe	Splice Varianten
SLC5A1	22q13.1	SGLT1	Glukose, Galactose	Dünndarm, Trachea, Niere, Herz, Plasmamembran	-
SLC5A2	16p12-p11	SGLT2	Glukose	Niere	-
SLC5A3	12q22.12	SMIT	Myo-Inositol, Glukose	Gehirn, Herz, Niere, Lunge, Plasmamembran	√
SLC5A4	22q12.2-q12.3	SGLT3	Na ⁺	Dünndarm, Skelettmuskulatur, Niere, Uterus, Hoden, Plasmamembran	-
SLC5A5	19p13.2-p12	NIS	I ⁻ , ClO ₄ ⁻ , SCN ⁻ , NO ₃ ⁻ , Br ⁻	Thyroid, Brust, Magen, Eierstock, Plasmamembran	-
SLC5A6	2p23	SMVT	Biotin, Lipoate, Pantothenate	Gehirn, Herz, Niere, Lunge, Plazenta, Plasmamembran	-
SLC5A7	2q12	CHT	Choline	Rückenmark, Medulla	-
SLC5A8	1p32	SGLT4		Dünndarm, Niere, Leber, Lunge, Gehirn	√
SLC5A9	17p11.2	SGLT5		Niere	√

Die bisher am häufigsten beschriebenen Natrium-abhängigen Glukosetransporter sind SGLT1 und SGLT2. Das Gen für SGLT1 ist im Menschen auf dem Chromosom 22 lokalisiert und kodiert ein 75 kDa großes Membranprotein. SGLT2 findet sich dagegen auf dem Chromosom 16 und ist 72 kDa groß.

SGLT1 wurde erstmals 1987 aus dem Dünndarm eines Kaninchens kloniert (Hediger et al. 1987), 1989 folgte SGLT2 aus der Niere (Hediger et al. 1989). Das Modell des Natrium-abhängigen Glukosetransportes beschrieb Robert K. Crane jedoch schon im Jahr 1960 (Crane et al. 1961, Abbildung 2).

Einleitung

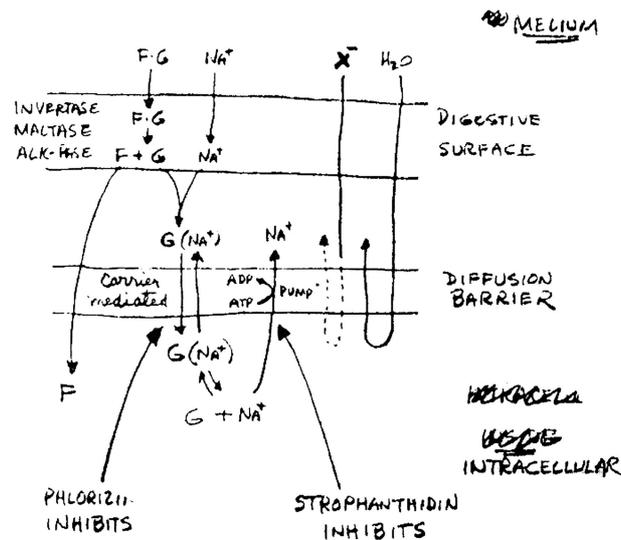


Abbildung 2: Erste Beschreibung des Natrium-gekoppelten Glukosetransport (Crane et al. 1961)

Fast 10 Jahre nach seiner Entdeckung konnte die vollständige Proteinstruktur von SGLT1 erstmalig definiert werden (Turk et al. 1996, Abbildung 3). Hierbei wurde gezeigt, dass es sich um ein Transmembranprotein mit 14 Helices handelt. Wie schon bei GLUT beschrieben (Scheepers et al. 2004, Mueckler und Thorens 2013), sind auch die verschiedenen SGLTs in ihrer Struktur homolog (Turk und Wright 2004).

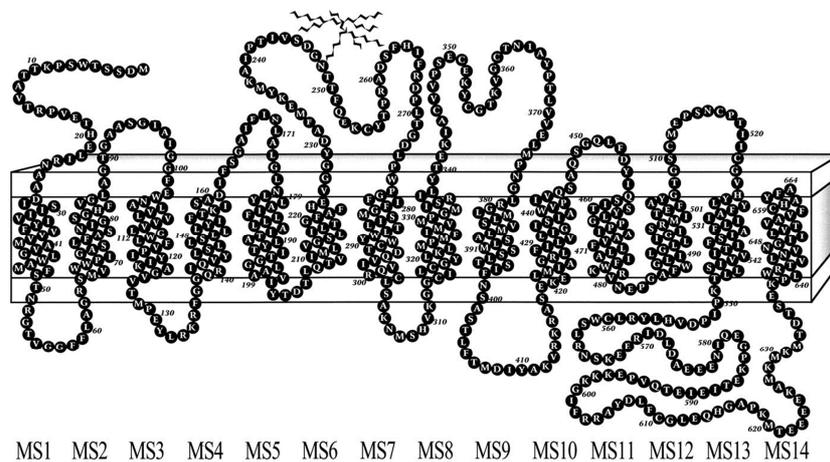


Abbildung 3: Aufbau von SGLT1 (Turk et al. 1996)

Jedoch unterscheiden sich die SLC5-Transporter in der Anzahl der transportierten Moleküle. SGLT1 benötigt für ein Molekül Glukose zwei Natriumionen (1:2), dahingegen beträgt das Verhältnis bei SGLT2 1:1 (Hummel et al. 2011). Somit ist SGLT1 in der Lage Glukose gegen einen höheren Konzentrationsgradienten zu transportieren, da die potentielle Energie von zwei Natriumionen genutzt werden kann.

Der am besten untersuchte SGLT Transporter ist SGLT1. Dieser ist im Menschen hauptsächlich für den Transport von Glukose an der luminalen Membran des Darmepithels zuständig. Jedoch wurde seine Expression ebenfalls in verschiedenen Organen, wie dem Herz, der Leber und der Skelettmuskulatur nachgewiesen (Chen et al. 2010). Über den Transporter SGLT2 ist dahingegen noch wenig bekannt, seine Untersuchung wurde erst in den letzten Jahren Gegenstand der Forschung. Bisher wird angenommen, dass SGLT2 hauptsächlich in der Niere lokalisiert ist und somit für den renalen Rücktransport der Glukose zuständig ist. Forschungsarbeiten in denen SGLT2-Inhibitoren, wie Beispielsweise Phlorizin, zur Behandlung von Diabetes Mellitus eingesetzt werden bestätigen diese Hypothese (Poudel 2013; Chao und Henry 2010). Hierdurch wird die Reabsorption von Glukose in der Niere gehemmt und eine Hyperglykämie vorgebeugt (Vallon und Thomson 2017).

Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist über die Expression oder Aktivität von SGLTs entlang der menschlichen BHS nur sehr wenig bekannt. Eine genaue Erkenntnis über deren Expression im Gehirn und dem zentralen Nervensystem erlangt durch die neue Diabetes-Medikation jedoch immer mehr an Bedeutung, da eine Hemmung von SGLT im Gehirn negative Folgen haben kann wie z. B. eine Beeinflussung der Energiebilanz in negativer Richtung oder eine Hemmung der neuronalen Aktivität.

Bisherige Untersuchungsergebnisse basieren auf der Analyse der mRNA-Expression in Gehirngewebe oder isolierten Zellen von Tieren. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass SGLT1 und SGLT2 mRNA in Hirngewebe von Ratten, Kaninchen und Schweinen exprimiert wird. Hierbei sind diese Transporter hauptsächlich in den Neuronen lokalisiert (Poppe et al. 1997; Balen et al. 2008; Yu et al. 2010; Yu et al. 2013). *In vitro* wurde eine SGLT-Expression ebenfalls in arteriellen Hirnzellen von Rindern nachgewiesen (Nishizaki und Matsuoka 1998). Trotz dessen konnte in Tierversuchen keine Lokalisation von SGLTs in Kapillaren der BHS gezeigt werden (Poppe et al. 1997; Balen et al. 2008; Yu et al. 2010; Yu et al. 2013).

Die meisten Studien bestätigen, dass entlang der menschlichen BHS ebenfalls kein Transport von Glukose mittels SGLTs stattfindet. Weder SGLT1, noch SGLT2 werden im Menschen in den Kapillaren exprimiert (Poppe et al. 1997; Nishimura und Naito 2005; Chen et al. 2010; Vrhovac et al. 2015). Jedoch wurde eine verstärkte Expression der SGLTs nach traumatisch bedingten Hirnveränderungen, wie Ischämie oder Schlaganfall, aufgezeigt (Vemula et al. 2009; Harada et al. 2013; Sajja et al. 2014).

Dies führt zu der Annahme, dass Natrium-abhängige Glukosetransporter eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Energieversorgung nach Glukosemangel besitzen. Ferner zeigte Matsuoka et al. im Jahr 1998 einen durch Phlorizin hemmbaren Glukosetransport entlang der BHS des Rindes. Dennoch sind die Expression und die Bedeutung von SGLT1 und SGLT2 im menschlichen Gehirn noch unzureichend untersucht. Seit SGLT2-Inhibitoren für die Behandlung von Diabetes Mellitus Patienten eingesetzt werden, ist es wichtig die Funktion dieser Transporter in extrarenalem Gewebe vollständig zu verstehen.

1.2. **Blut-Hirn-Schranke (BHS)**

Eine fehlerfreie Funktionalität des Gehirns und somit des zentralen Nervensystems (ZNS) ist für die Aufrechterhaltung des Organismus von größter Bedeutung. Aus diesem Grund ist der Schutz vor toxischen Substanzen, sowie die konstante Nährstoffversorgung durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) gesichert. Diese erfüllt die Funktion einer Barriere zwischen den Hirnzellen und dem Blutstrom und ist somit für die Homöostase und die Funktionen des ZNS zuständig (Serlin et al. 2015).

Die BHS findet sich in allen Organismen mit ausgebildetem ZNS, ihre Barrierefunktion wurde erstmals im späten 19. Jahrhundert von Paul Ehrlich dargestellt (Abbott 2005; Ehrlich 1885). Sie besteht aus den Endothelzellen der Kapillare, den Perizyten, der Basallamina, sowie den Astrozyten-Endfüßen (Abbildung 4, Sajja et al. 2016). Die Barrierefunktion wird hierbei hauptsächlich von Zell-Zell-Kontakten, den sog. *Tight Junctions*, aufrechterhalten. Diese bilden schmale zellumgebende Bänder und verknüpfen die Endothelzellen der Kapillare, so dass der Stoffaustausch selektiv reguliert werden kann (Dejana 2004). Dabei können lipophile Substanzen, wie Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid, die BHS per passiven Transport entlang ihres Konzentrationsgradienten passieren (Grieb et al. 1985).

Es konnte aufgezeigt werden, dass ca. 98% aller niedermolekularen Substanzen die BHS nicht ungehindert passieren können (Pardridge 2005). Vor allem polare Substanzen und Ionen benötigen ein spezifisches Transportsystem. Der Transport kann durch einen parazellulären Transport, Transportproteine (ABC-Transporter, Transporter der SLC-Genfamilie), sowie rezeptorvermittelte und adsorptive Endozytose erfolgen (Serlin et al. 2015).

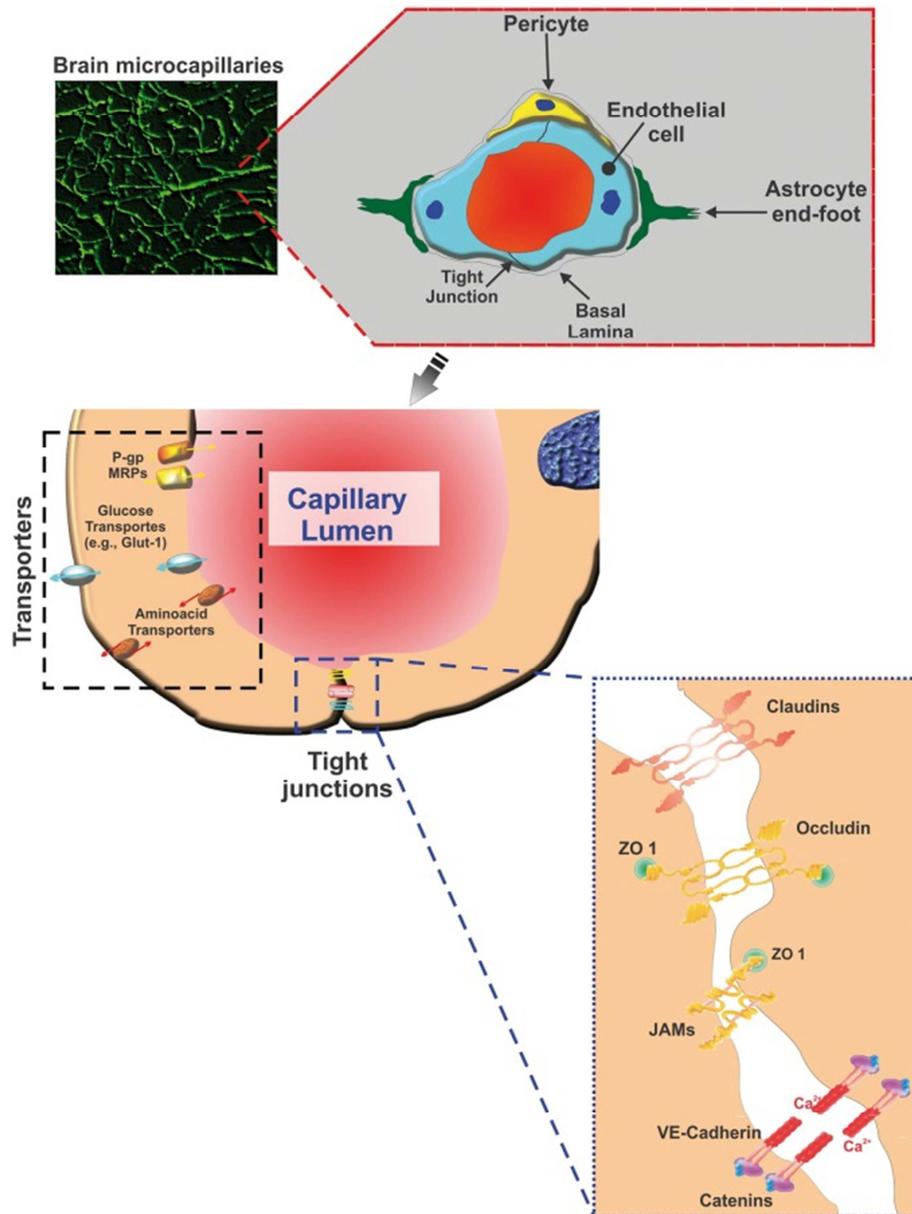


Abbildung 4: Aufbau der BHS (Sajja et al. 2016)

Die Blut-Hirn Schranke bildet zusammen mit den Neuronen, den Astrozyten und der Mikroglia die sog. neurovaskuläre Einheit. Dies ist ein dynamisches System, welches auf Umgebungseinflüsse und Änderung der Zellbedürfnisse eingehen kann. Für eine uneingeschränkte Versorgung des Gehirns mit Nährstoffen und Energie sind vor allem SLC-Transportproteine unerlässlich. Ist deren Funktion beeinträchtigt, folgt eine Dysfunktion der physiologischen Beschaffenheit der BHS. Dies führt zu einer Vielzahl an Erkrankungen. Darunter zählen unter anderem Multiple Sklerose (Correale und Villa 2007), Parkinson und Alzheimer (Zlokovic 2008), Hypoxie und Ischämie (Kaur und Ling 2008), sowie Epilepsie (Remy und Beck 2006).

Die Erforschung der Energieversorgung des Gehirns ist hierbei ein wichtiger Aspekt, da ein intakter Glukosetransport für die Aufrechterhaltung der physiologischen Hirnfunktion von großer Bedeutung ist.

1.3. Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT)

Als Schädel-Hirn-Trauma (SHT) bezeichnet man durch äußere Gewalteinwirkung entstandene strukturelle Verletzungen des Schädels mit Schädigung des Gehirns. Man unterscheidet hierbei die mechanische und die klinische Klassifikation. Die mechanische Klassifikation beschreibt das äußere Verletzungsmuster des SHT, das geschlossene und das penetrierende bzw. offene SHT. Die klinische Klassifikation beschreibt den physiologischen Grad der Verletzung.

Im Laufe der Zeit wurden unterschiedliche Bewertungskriterien veröffentlicht, unter anderem die Klassifizierung nach Tönnis und Loew (1953), welche den Verletzungsgrad anhand der Rückbildungszeit der Hirnfunktionsstörung beschreibt. Standard ist in heutiger Zeit jedoch die Klassifizierung anhand des „Glasgow Coma Score“, welche im Jahr 1974 definiert wurde und den Schweregrad des SHT anhand der Bewertung des Bewusstseinszustands beschreibt (Augenöffnung, verbale Kommunikation und motorische Reaktion) (Teasdale und Jennett 1974).

Trotz schwerwiegendem SHT steigt die Überlebenszeit der Patienten durch eine schnelle ärztliche Versorgung. Laut Deutscher Gesellschaft für Neurochirurgie geht man jedes Jahr von 400 SHT-Fällen pro 100.000 Einwohner aus, wobei 180 dieser Patienten eine dauerhafte Schädigung aufweisen. Die Daten des Statistischen Bundesamtes belegen dies, allein im Jahr 2014 sind in Deutschland 7.573 Todesfälle durch Verletzungen des Kopfes (aktueller Stand, 09.2016) aufgezeichnet worden. Dies liegt vor allem an der wachsenden klinischen Forschung der Pathomechanismen während und nach einer traumatisch bedingten Hirnverletzung, wodurch Sekundärschäden verringert werden können.

1.3.1. Pathomechanismen des SHT

Verletzungen des Schädels und des Gehirns können durch verschiedene Krafteinwirkungen auf den Kopf erzeugt werden, wie z. B. direkte Krafteinwirkung auf den Schädel oder Beschleunigungs-/Verzögerungs- und Rotationskräfte. Diese Kräfte erzeugen eine Reihe von Verletzungsmustern, die sog. Primärschäden.

Hierzu zählen Hämatome, Subarachnoidalblutung, diffuse Axonschäden und Rindenprellungsherde. Diese können sowohl am Ort der Gewalteinwirkung oder als *contre-coup* Verletzung, d. h. auf der Gegenseite, vorliegen (Schewe und Adebahr 1970).

Unmittelbar nach Gewalteinwirkung startet eine Vielzahl von miteinander interagierenden Pathomechanismen, welche an der Entstehung von Sekundärschäden und somit irreversiblen Hirnschäden, bis hin zu einer Nekrose bzw. Apoptose der Hirnzellen, beteiligt sind (siehe Abbildung 5; Giza und Hovda 2001, Werner und Engelhard 2007, Giza und Hovda 2014). Die Sekundärschäden sind Hypoxieschäden infolge einer lokalen Störung der Blutzirkulation oder Stauungsblutungen, auch Ischämie genannt. Die Zirkulationsstörung beruht auf einer Kompression der intakt gebliebenen Venen und Arterien durch Hirndruck, begünstigt durch den allg. Blutdruckabfall. Morphologisch finden sich Blutungen und anämische Nekrosen perifokal oder herdforn. Sekundärschäden bevorzugen demgegenüber das für Kreislaufstörungen bei Hirndruck anfälligere Windungstal (Schewe und Adebahr 1970).

Der initiale Pathomechanismus ist die neuronale Depolarisation. Unverzüglich nach einer biomechanischen Verletzung können exzitatorische Neurotransmitter, wie Glutamat und Aspartat, in hohem Maß freigesetzt werden und hierdurch neurotoxisch wirken. Ferner binden diese Transmitter an den N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA)-Rezeptor und führen so zum Ausstrom von Kaliumionen und Einstrom von Kalziumionen (Giza und Hovda 2014; Chodobski et al. 2011). Dies führt zu einer Störung der transmembranen Ionentransporter, vor allem der Adenosintriphosphat (ATP)-abhängigen Na^+/K^+ -Pumpe. Dies führt zu einem unkontrollierten Ein- und Ausstrom von Natrium- und Kaliumionen, was eine Depolarisation der Zellmembranen zur Folge hat. Weiterhin schwellen durch die Akkumulation von Natriumionen und den Konzentrationsanstieg der extrazellulären, exzitatorischen Neurotransmitter Dendriten und Zellkörper an.

Durch einen Anstieg der Kalziumkonzentration im Zytosol werden die ATP-Speicher der Mitochondrien geleert und somit die anaerobe Glykolyse gefördert, wodurch Laktat gebildet wird. Die nachfolgende Akkumulation von Laktat führt zur intrazellulären Azidose und somit zu azidose-induzierten Schwellung von Glia- und Nervenzellen (Staub et al. 1994).

Eine verminderte zerebrale Glukosekonzentration kann erstmals 2 Tage nach Hirnschädigung festgestellt werden und dauert bis zu 28 Tage an (Bergsneider et al. 2000). Diese verringerte Glukoseversorgung ist unabhängig vom jeweiligen *Glasgow Coma Score*. Sowohl Patienten mit einem vorhandenen Bewusstseinszustand, als auch komatöse Patienten verfügen über eine verringerte Glukoseversorgung. In Studien konnte aufgezeigt werden, dass die ischämisch induzierte Hypoglykämie die frühzeitige Ausbildung von neuronalen Schäden auslöst (Harada et al. 2012). Eine Aufrechterhaltung der physiologischen zerebralen Glukosekonzentration ist somit von großer Bedeutung für einen positiven Heilungsverlauf nach SHT.

1.4. Ödem

Als Ödem bezeichnet man eine Schwellung des Gewebes aufgrund einer Einlagerung von Flüssigkeit aus dem Gefäßsystem. Dies kann jegliche Körperregion betreffen, in der vorliegenden Arbeit wird der Fokus auf das Gehirnödem gelegt und dieses weiter erläutert.

Ein Hirnödem ist nicht nur bei klinischen Sterbefällen mit oftmals bekannter Hirndrucksteigerung, sondern auch in vielen Todesfällen ohne ärztliche Maßnahmen anzutreffen (Hausmann et al. 2006). Hierzu zählen beispielsweise Todesfälle durch Intoxikationen, Schädel-Hirn-Trauma, Verbrennungen oder Erstickten. Das Hirnödem wird nach Klatzo in zwei Kategorien unterteilt, das vasogene und das zytotoxische Ödem (Klatzo 1967). Ergänzend differenzierte Long im Jahr 1982 die Klassifizierung der Flüssigkeitszunahme der Hirnzellen anhand von humanen Hirnschnitten. Dabei unterschied er in die intrazelluläre Wasserzunahme, der Schwellung, bei der die Hirnschnitte trocken sind und die extrazelluläre Akkumulation von Wasser, das Ödem, bei der die Hirnschnitte feucht sind.

1.4.1. Vasogenes Hirnödem

Bei einem vasogenen Hirnödem führt die Verletzung der Blutgefäßwand zum Ausfluss von Wasser und Plasmabestandteilen in das umliegende Gehirngewebe. Im physiologischen Zustand kann Wasser nur über einen hydrostatischen Gradienten bzw. in Verbindung mit dem Transport von Ionen und Plasmaproteinen über die BHS transportiert werden. Durch den Zusammenbruch der BHS ist der Zusammenhalt der *Tight Junctions* geschwächt, somit gelangt Blut und Plasma, inklusive Plasmaproteinen, in das Gewebe. Das erste messbare Anzeichen für ein vasogenes Ödem ist der schnelle Anstieg des intrakraniellen Drucks durch die Flüssigkeitszunahme. In Folge dessen schwellen die Zellen der grauen und weißen Substanz an. Dies betrifft vor allem die Astrozyten, jedoch auch die Myelinlamellen und Dendriten (Kimmelberg 1995).

1.4.2. Zytotoxisches Hirnödem

Bei einem zytotoxischen Hirnödem bleibt die vaskuläre Permeabilität relativ ungestört. Es handelt sich um eine intrazelluläre Schwellung ohne Zusammenbruch der BHS, da schädliche Faktoren einen direkten Einfluss auf das Hirngewebe ausüben. Zellen innerhalb der grauen und weißen Materie sind betroffen, in erster Linie bedeutet das eine Schwellung der Astrozyten und des Myelins (Bakay 1965; Hackett et al. 1998). Aus diesem Grund wird es oftmals auch zelluläres Ödem genannt. In Patienten mit SHT konnte eine Schwellung der Astrozyten im Zeitrahmen von drei Stunden bis drei Tagen nach Traumatisierung festgestellt werden (Bullock et al. 1991). Allgemein ist zu sagen, dass das zytotoxische Ödem zeitnah nach Zelltraumatisierung auftritt und zuerst Neuronen und Zellen entlang der BHS, sowie Astrozyten betrifft (Jenkins et al. 1979; Kimmelberg und Ransom B. R. 1986).

1.4.3. Weitere Formen des Hirnödems

Im Jahr 1994 beschrieben Young und Constantini eine dritte Form des Ödems, das ionische Ödem. Bei dieser Form ist, wie bei einem vasogenen Ödem, eine Flüssigkeitszunahme anzutreffen. Dies wird jedoch durch eine gesteigerte Aktivierung der Ionenporter ausgelöst und nicht durch einen Zusammenbruch der BHS. Transporter entlang der BHS, wie die Na^+/K^+ -ATPase, Kationenkanäle oder Natrium-gekoppelte Cotransporter, transportieren zusätzlich zu den jeweiligen Ionen ebenfalls Wassermoleküle und führen so zu einer Schwellung der Zellen.

Es wurde beschrieben, dass das zytotoxische und das ionische Hirnödem zusammenhängen (Simard et al. 2007). Die Bildung eines zytotoxischen Ödems und die somit einhergehende Zellschwellung verringern den intrazellulären Raum für Natrium- und Kalziumionen, sowie Wasser. Hierdurch entsteht ein erhöhter Konzentrationsgradient, was zu einer gesteigerten Aktivität der Ionentransporter und somit zum vermehrten Wassertransport in den Intrazellulärraum führt. Das zytotoxische Ödem bildet somit die treibende Kraft für ein ionisches Ödem (Simard et al. 2007).

1.5. Funktion der Glukosetransporter bei SHT und Ischämie

Verletzungen des Gehirns führen zu einer Störung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) und daraufhin zu einer verminderten Versorgung des Hirngewebes mit Nährstoffen, vor allem der Glukose-Aufnahme und Sauerstoff. Für das Überleben des geschädigten Hirngewebes ist eine schnelle Wiederherstellung der Versorgung in den geschädigten Gehirnregionen wichtig, damit das sogenannte Sekundärschadenwachstum begrenzt wird.

Die hauptsächlich aktiven Glukose-Transportproteine im menschlichen Gehirn sind die Glukosetransporter der SLC2-Genfamilie. Es ist bekannt, dass der Transporter GLUT1 (SLC2A1) an der BHS und der Transporter GLUT3 (SLC2A3) in den Neuronen für die Glukoseversorgung zuständig ist (Maher et al. 1994; Qutub und Hunt 2005). Während physiologische Blutzuckerkonzentrationen vorliegen ist GLUT1 gesättigt (Uldry und Thorens 2004). Ändern sich jedoch die physiologischen Bedingungen des Gehirns in Richtung der Hypoglykämie, so wird der Transporter GLUT1 verstärkt exprimiert um die Glukoseversorgung der Zellen aus dem Blut aufrecht zu erhalten (Vemula et al. 2009).

Ferner wurde in *in vivo* und *in vitro* Tiermodellen gezeigt, dass die Expression des Natrium-gekoppelten Glukosetransportes SGLT1 ebenfalls maßgeblich an der erhöhten Glukoseaufnahme im Gehirn nach traumatisch bedingter Veränderung beteiligt ist. In einer Arbeit von Robert Poppes konnte eine gesteigerte SGLT1-spezifische Substrataufnahme nach künstlich induziertem Krampfanfall gezeigt werden. Hierzu wurde mittels Autoradiographie die Aufnahme eines radioaktiv markierten Glukoseanalogon - 2-Deoxy-d-(14C)-Glukose für GLUT1 und (14C)methyl-a-D-Glukopyranosid für SGLT1 - in gesundem Hirngewebe und

Hirngewebe nach Schlaganfall detektiert (Poppe et al. 1997). Während sich die Aufnahme des GLUT-Substrats nicht signifikant änderte, steigerte sich die Aufnahme bei dem für SGLT1 spezifischen Substrat in der geschädigten Hirnregion beträchtlich. Weiterhin konnte erwiesen werden, dass SGLT1 nach Ischämie/Reperfusion ebenfalls verstärkt in Hirnzellen exprimiert wird (Elfeber et al. 2004; Wais 2012; Neuhaus et al. 2012; Thal et al. 2013).

In einem experimentellen SHT-Maus-Modell (CCI - controlled cortical impact) und in einem *in vitro* Trauma-Modell (murine Hirndothelzelllinie cEND) konnte nachgewiesen werden, dass der Glukosetransport entlang der BHS ebenfalls durch einen Transporter der Genfamilie SLC5 stattfindet. Ein Expressionsverlauf der Glukosetransporter GLUT1, SGLT1 und SGLT2 konnte in diesen Modellen ebenfalls aufgezeigt werden (siehe Abbildung 6).

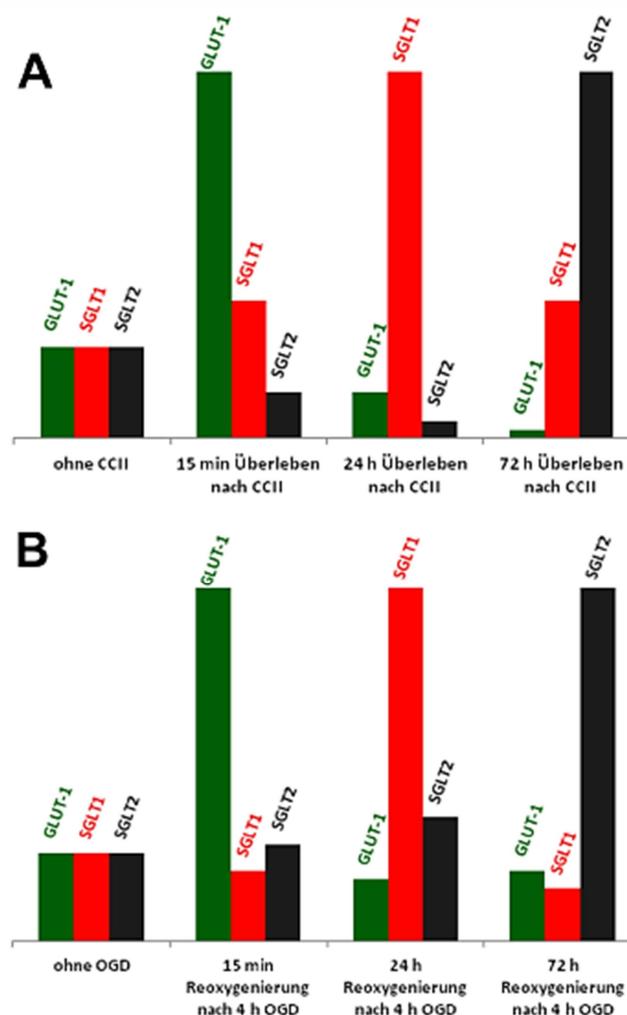


Abbildung 6: Zeitverlauf der Expression von SGLT1, SGLT2 und GLUT1 nach SHT
 A: SHT-Maus-Modell, B: *in vitro* Trauma Modell (OGD – oxygen glucose deprivation) (Wais 2012)

Der physiologische Nutzen der erhöhten Expression der Glukosetransporter liegt in der Erhöhung der Glukoseaufnahme während des Nährstoff- und Sauerstoffmangels im Gewebe. Jedoch führt dieser Mechanismus zu einer erhöhten Ödembildung nach SHT und Ischämie. Da SGLTs sekundär aktiv sind benötigen sie für den Transport einen elektrochemischen Gradienten. Der somit bedingte Transport von Natriumionen erhöht den osmotischen Druck im Interzellularraum, dem wird durch Transport von Wassermolekülen entgegen gewirkt. Der Transport von Glukose und Natrium mittels SGLT transportiert folglich ebenfalls Wassermoleküle in einem festen Kopplungskoeffizienten von ca. 260 Molekülen Wasser pro Glukosemolekül (Loo et al. 1996).

1.5.1. Wassertransport mittels Glukosetransporter

Der Wassertransport über Epithelzellen ist ein grundlegender physiologischer Prozess. Bis vor über 100 Jahren glaubte man, dass Wasser nur durch osmotische und hydrostatische Druckunterschiede transportiert werden kann. Dies konnte Edward W. Reid erstmalig 1892 widerlegen. Wiederum 100 Jahre später entdeckte Peter Agre den ersten speziellen Wassertransporter, das Aquaporin (Preston et al. 1992).

Ein Transport von Wasser durch Glukosetransporter in Anwesenheit eines osmotischen Gradienten konnte erstmals 1990 festgestellt werden (Fischbarg et al. 1990). Der Mechanismus des Transportes blieb allerdings noch ungeklärt und wurde mit der Durchlässigkeit der Glukosetransporter für Wassermoleküle dargestellt. Drei Jahre später konnte die selbe Forschungsgruppe auch den Transport in Abwesenheit eines osmotischen Gradienten nachweisen (Loike et al. 1993). Wassermoleküle gelangen somit in Abwesenheit eines Gradienten in die Zellen.

Es konnte aufgezeigt werden, dass Glukosetransporter nicht nur als Wasserkanäle, sondern ferner als molekulare Wasserpumpen fungieren. Hierbei weist der Glukosetransporter GLUT1 ein Verhältnis von 40 Molekülen Wasser pro transportiertem Glukosemolekül auf (MacAulay und Zeuthen 2010). Weiterhin wurde durch Loike et al. (1993) dargelegt, dass ein Wassertransport ebenfalls mittels Natrium-abhängiger Glukosetransporter stattfindet. Im selben Jahr hat Loo et al. dies bestätigt und konnte experimentell feststellen, dass SGLT1 ca. 260 Wassermoleküle pro Glukose transportieren kann.

Dieses Ergebnis wurde in den darauffolgenden Jahren von weiteren Forschungsgruppen bestätigt, wobei die Angabe der transportierten Wassermoleküle zwischen 210 und 265 schwankt (Charron F. M. et al. 2006, Loo et al. 2002, Naftalin 2008, Sasseville L. J. et al. 2011, Zeuthen et al. 2006, Zeuthen et al. 2001).

Diese Erkenntnisse macht sich heutzutage die medizinische Therapie zur Behandlung von Durchfallerkrankungen zu nutze. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schreibt für eine orale Rehydrierung vor, zu jedem Liter Wasser Salz (Natriumchlorid) und Zucker (Glukose) zu geben (Stuart et al. 2009). Durch die Zugabe von Glukose und Natriumionen wird die Aufnahme von Wasser über die Dünndarmmukosa erhöht, da hier SGLT1 in hoher Konzentration lokalisiert ist.

Jedoch führt dieser gekoppelte Wassertransport ebenfalls zu schwerwiegenden Problemen. Wie unter Punkt 1.5 (Seite 15) aufgezeigt wurde, erhöht sich die Expression der Glukosetransporter und Natrium-abhängigen Glukosetransporter im tierischen Gehirn nach einer Schädigung. Dies führt neben der Energieversorgung der Zellen mit Glukose ebenso zu einem vermehrten Wassertransport in die Zellen. Hierdurch wird die Bildung eines ionischen Hirnödems unterstützt. Aus diesem Grund ist der Nachweis der Glukosetransporter GLUT1, SGLT1 und SGLT2 im menschlichen Gehirn entlang der BHS Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Eine Bestätigung der Lokalisation dieser Transporter in den Kapillaren des menschlichen Gehirns könnte als Ansatz zur Behandlung von Sekundärschäden nach SHT und zur Reduzierung des Ödemvolumens dienen.

1.6. Problematik der rechtsmedizinischen Untersuchung

Die Bestimmung des Zeitpunkts der Entstehung eines Traumas ist in vielen forensischen Fällen von genauso großer Wichtigkeit wie die Feststellung ob ein Trauma vorliegt. Bisher lag das Hauptaugenmerk auf dem Nachweis von Reparationsvorgängen im geschädigten Gewebe, vor allem die Haut betreffend, durch biochemische, histochemische und immunhistologische Verfahren (Cecchi 2010). Untersuchungen des zeitlichen Verlaufs der zellulären inflammatorischen Antwort im geschädigten Gehirn wurden bisher seltener untersucht. Hierbei zeigte sich jedoch, dass für den Nachweis der meisten Parameter eine längere Überlebenszeit von bis zu mehreren Wochen notwendig ist (Hausmann et al. 1999; Hausmann und Betz 2000).

Auch ein Versuch der zeitlichen Eingrenzung durch Nachweis einer mRNA-Expression im geschädigten Gewebe hat nicht zum gewünschten Erfolg geführt (Huth et al. 2013). Somit ist die Anwendung solcher Verfahren in der rechtsmedizinischen Praxis eingeschränkt, da die Überlebenszeit nach einem Trauma meist nur sehr kurz ist.

Ein weiteres Problem in der rechtsmedizinischen Praxis ist die Autolyse und Fäulnis. Hierbei kommt es nach Eintritt des Todes zur Zersetzung des Gewebes und der Zellen durch körpereigene Enzyme. Bei heutigen Obduktionen werden die Körper in einer gekühlten Leichenhalle aufbewahrt, diese Kühlung sollte möglichst schnell nach Eintritt des Todes stattfinden. Jedoch kann diese Zeit von wenigen Stunden bis zu mehreren Tagen und Wochen variieren. Auch die Zeit der Lagerung an sich kann im Normalfall bis zu mehrere Tage andauern. Somit können Untersuchungsverfahren, welche in experimentellen *in vivo* und *in vitro* Versuchen etabliert sind, nur selten an Gewebe von Verstorbenen angewendet werden. Eine Adaption der Verfahren ist notwendig (Heinrich et al. 2007).

Trotz großer Varianz der Postmortalzeit (*Post mortem* interval, PMI) mit unterschiedlichen Leichenlagerungsbedingungen ist die Problematik der Autolyse und Fäulnis jedoch von geringfügiger Bedeutung. Studien konnten zeigen, dass bis zu 72 Stunden *post mortem* biologisch intakte Nukleinsäuren und Proteine nachgewiesen werden können (Perrett et al. 1988; Barton et al. 1993; Davidsson et al. 2001; Paepe et al. 2002). Die Degradation ist immer abhängig vom jeweiligen Target, da die Halbwertszeit mancher mRNAs von wenigen Minuten bis zu mehreren Tagen *post mortem* andauern kann (Krowczynska et al. 1985). Auch Proteine sind, in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts, über einen längeren Zeitraum stabil und können in Versuchen bis zu 50 Stunden *post mortem* detektiert werden (Blair et al. 2016).

Den größten Einfluss auf die Integrität der RNA und Proteine besitzen dahingehend Umgebungsbedingungen, die Patientenvorgeschichte und die Probenhandhabung. Hierzu zählen die vorhergehende Medikation, das Alter des Verstorbenen, die klinische Diagnose, die Dauer des Todeskampfes, sowie die Lagerbedingungen des Leichnams. Diese Einflüsse können jedoch durch Einschränkungen der Probenauswahl und Einbeziehung der Todesbedingungen als Faktor in die Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Die Aufbewahrung der Proben bei -80°C stellt für die mRNA- und Protein-Analyse kein Problem dar.

Es konnte gezeigt werden, dass auch in gefrorenem Gewebe nach über 5 Jahren eine funktionierende Analyse möglich ist (Leonard et al. 1993). Die Probenhandhabung wird für jede Probe gleich und nach einem standardisierten Protokoll durchgeführt und besitzt somit ebenfalls keinen Einfluss für die Ergebnisse.

1.7. Ziel der Arbeit

Diese Arbeit wurde im Rahmen einer Kooperation zwischen dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Würzburg (AG Prof. Dr. Bohnert) und der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie (AG Prof. Dr. Förster) des Universitätsklinikums Würzburg durchgeführt. Vorversuche in der Forschungsgruppe um Frau Prof. Förster konnten eine schadensabhängige Expression der Natrium-abhängigen (SGLT1, SGLT2) und Natrium-unabhängigen Glukosetransporter (GLUT1) in Mäusen aufzeigen (Wais 2012).

Ziel meiner Arbeit ist die Übertragung und Überprüfung der Ergebnisse der Tierversuche auf das menschliche Gehirn von Todesfällen nach Traumatisierung.

Es soll untersucht werden, ob der Nachweis der Natrium-abhängigen Glukosetransporter SGLT1 und SGLT2 sowie des Glukosetransporters GLUT1 im menschlichen Hirngewebe von Verstorbenen, welche wegen SHT oder Ersticken zur gerichtlichen Obduktion gelangen, möglich ist. Weiterhin ergibt sich die Frage, in welchen zeitlichem Verlauf nach der Traumatisierung die verschiedenen Formen der Glukosetransporter exprimiert werden und ob der Umfang und die Verteilung von SGLT1, SGLT2 und GLUT1 sowie das Verhältnis zueinander Auskünfte über eine vitale bzw. postmortale Entstehung eines Traumas bzw. dessen Überlebenszeit zulässt.

Abhängig von Todeszeitpunkt und Todesursache soll ein Expressionsschema der verschiedenen Glukosetransporter erstellt werden. Hierdurch soll zukünftig eine Methode an postmortalem Gehirngewebe etabliert werden, um Rückschlüsse auf den Zeitpunkt der Traumaentstehung in Relation zu der Expressionsstärke der SGLTs ziehen zu können.

2. Material

2.1. Zellkultur

2.1.1. Zelllinie

Medium	Bezugsquelle
CaCo-2	ATCC® HTB-37
HK-2	ATCC® CRL-2190
HEK293	ATCC® CRL-1573

2.1.2. Medien und Medienzusätze zur Zell-Kultivierung

Medium	Hersteller
EBM-2	Lonza
EGM-2 BulletKit	Lonza
DMEM w/o Glukose	Sigma Aldrich
DMEM + 4,5g/l Glukose	Thermo Fisher Scientific
EMEM	ATCC / Lonza
DMEM F12	Thermo Fisher Scientific
ssFCS	Gibco
Penicillin/ Streptomycin	Merck

2.1.3. Reagenzien für Transfektionsversuche

Medium	Hersteller
Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent	ThermoFisher Scientific
Opti-MEM®	ThermoFisher Scientific

2.1.4. siRNA

Medium	Hersteller	Artikelnr.
hDSG2	Santa Cruz	Sc-35226
hSGLT1	Santa Cruz	sc-61538
hSGLT2	Santa Cruz	sc-106547

2.2. Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aceton	Sigma Aldrich
Agarose	Sigma Aldrich
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
Bromphenolblau	Sigma Aldrich
Complete Protease Inhibitor	Roche
Destilliertes Wasser	Braun
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich
Eisessig	Merck
Ethanol 70%	Otto-Fischer GmbH
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	SERVA Electrophoresis
Gel-Ladepuffer	Ambion
Gelatine	Serva
Glycerol	SERVA Electrophoresis
Glycine	AppliChem
Hepes	AppliChem

Material

Chemikalie	Hersteller
Inhibitor Cocktail Tablets	Roche
Isopropanol	Sigma Aldrich
Kaliumchlorid	Merck
Kalziumchlorid	Merck
Luminol 97%	Sigma Aldrich
Magnesiumchlorid	Merck
Methanol	Sigma Aldrich
Natriumazid	Sigma Aldrich
Natriumdodecylsulfat	Sigma Aldrich
Natriumdesoxycholat	Sigma Aldrich
Natriumchlorid	Sigma Aldrich
Natriumhydroxid	Merck
Milchpulver	AppliChem
p-coumaric Essigsäure	Sigma Aldrich
peqGOLD 50 bp DNA-Ladder	VWR Peqlab
Phosphatgepufferte Salzlösung / PBS	Sigma Aldrich
RNase Away	Sigma Aldrich
RNase-freies Wasser	Ambion
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich
SYBR®Safe DNA gel stain	Thermo Fisher Scientific
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura
Tris	Roth
Triton X-100	Sigma Aldrich

Material

Chemikalie	Hersteller
TriZol®	Ambion
Trypsin-EDTA	Merck
Tween 20	Sigma Aldrich
VECTASHIELD Antifade Mounting Medium	Vector Labs
Wasserstoffperoxid	Sigma Aldrich
Ziegenserum	Vector Labs

2.3. Verwendete Kits

Kit	Hersteller
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits	Thermo Fisher Scientific™
ABsolute QPCR Mix, ROX	Thermo Fisher Scientific
PowerUp® Sybr Green™ Master Mix	Thermo Fisher Scientific
TaqMan® PreAmp Master Mix	Thermo Fisher Scientific
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega

2.4. Verwendete Puffer

- RIPA-Puffer
 - 150 mM NaCl
 - 50 mM Tris
 - 1 mM EDTA
 - 0,1 % SDS
 - 1 % Triton X-100
 - 1 % Sodium-Deoxycholate

- 4x Laemli-Probenpuffer
 - 8 % SDS
 - 40 % Glycerol
 - 0,250 mM Tris
 - 0,4 % Bromphenolblau
 - pH 6.8
 - Frisch zugeben
 - 6 % β-Mercaptoethanol

- Elektrophorese-Puffer
 - 250 mM Glycine
 - 25 mM Tris
 - 0,1 % SDS

- 10x Towbin-Puffer
 - 0,25 mM Tris
 - 1,92 M Glycine
 - 75 ml SDS (Stock 10%)
 - a. d. 1l ddH₂O
 - ➔ Frisch zugeben
 - 400 ml Methanol pro 1l 1x Puffer

- Blocking Puffer
 - 5 % Non-Fat dried Milk
 - a. d. in PBS

- Antikörper-Verdünnungspuffer I
 - 0,5 % BSA
 - a. d. in PBS

- Antikörper-Verdünnungspuffer II
 - 1 % BSA
 - in PBS

- WB-Waschpuffer
 - 0,1 % Tween-20
 - in PBS

- IF-Waschpuffer
 - 1 % BSA
 - in PBS

- ECL-Lösung

1) 250 mM Luminol in DMSO
90 mM p-coumaric Essigsäure in DMSO
10 % Tris
pH 8.8

2) 10 % Tris
6,4 ‰ Wasserstoffperoxid
pH 8.8

→ Gebrauchsfertige Lösung kurz vor Verwendung ansetzen, hierzu Lösung 1 und Lösung 2 im Verhältnis 1:1 mischen und dunkel lagern

- Stripping Puffer I

0,5 mM NaOH

- Stripping Puffer II

62 mM Tris
2 % SDS
pH 6.8

→ Frisch zugeben

10 mM β -Mercaptoethanol

- Puffer A

153 mM NaCl
5,6 mM KCl
2,3 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
15 mM Hepes
1% BSA

2.5. Verwendete Antikörper

Tabelle 3: Primärantikörper für den Western Blot

Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Artikelnr.
Rabbit polyclonal anti-human SGLT1	Abcam	1:200	ab14686
Rabbit polyclonal anti-human SGLT2	Abcam	1:200	ab137207
Rabbit polyclonal anti-human GLUT1	Merck-Millipore	1:500	07-1401
Monoclonal Anti-β-Actin–Peroxidase	Sigma Aldrich	1:20.000	A3854
Mouse polyclonal anti-human DSG2	Thermo Fisher Scientific	1:500	32-6100

Tabelle 4: Sekundärantikörper für den Western Blot

Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Artikelnr.
ECL™Anti-rabbit linked to HRP	GE-Healthcare	1:5000	NA934V
ECL™Anti-mouse linked to HRP	GE-Healthcare	1:5000	NA931

Tabelle 5: Primärantikörper für die Immunhistologie

Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Artikelnr.
goat polyclonal anti-human vWF	Santa Cruz	1:200	sc-8068
rabbit polyclonal anti-human vWF	Dako	1:200	A0082
Rabbit polyclonal anti-human GLUT1	Merck-Millipore	1:500	07-1401
goat polyclonal anti-human SGLT1	Everest Biotech	1:100	EB09310
Rabbit polyclonal anti-human SGLT2	Abcam	1:200	ab137207
Immunizing Peptide SGLT2	Abcam		ab101414
Immunizing Peptide SGLT1	Everest Biotech		EBPO9310

Material

Tabelle 6: Sekundärantikörper für die Immunhistologie

Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Artikelnr.
Donkey Anti-goat IgG Alexa 594	Thermo Fisher Scientific	1:200	A-11058
Donkey Anti-goat IgG Alexa 488	Thermo Fisher Scientific	1:200	A-11055
Donkey Anti-rabbit IgG Alexa 594	Thermo Fisher Scientific	1:200	A-21207
Donkey Anti-rabbit IgG Alexa 488	Thermo Fisher Scientific	1:200	A-21206

2.6. Sonden und Primer für die Real-Time PCR

Tabelle 7: Sonden für qPCR

TaqMan-Sonde	Assay-ID	Gen
SGLT1	Hs01573790_m1	SLC2A1
SGLT2	Hs00894642_m1	SLC5A2
GLUT1	Hs00359840_m1	SLC2A1
GLUT3	Hs00892681_m1	SLC2A3
β-Aktin	Hs00357333_g1	ACTB

Tabelle 8: Primer für qPCR

Primer	Sequenz 5' – 3'	TM [°C]	GC-Gehalt [%]	Produktlänge [bp]
SGLT1_Forward	ATTCGCAGGACAGCTCTTAC	57,7	50	739
SGLT1_Reverse	CCGAGAAGATGTCTGCCGAG	60,3	60	
SGLT2_Forward	TGCTCCAACATCGCCTACC	59,8	58	965
SGLT2_Reverse	GCTTATGGTGTCCAACGCA	58,5	53	
β-Aktin_Forward	CCTCGCCTTTGCCGATCC	60,5	67	626
β-Aktin_Reverse	GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC	60,6	48	

* (Raff et al. 1997)

3. Methoden

3.1. Bioinformatik

Bioinformatische Analysen zur Bestimmung der Phylogenese der SLC2 und SLC5 Transporter erfolgten anhand der jeweiligen speziesspezifischen Proteinsequenz.

Diese sind in der Datenbank UniProt des European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), in Kooperation mit dem Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) und dem Protein Information Resource (PIR), gespeichert.

Alignements der Sequenzen zur Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums, sowie ein *Molecular Clock Alignment* wurden mit Hilfe des Programms „Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0“ (MEGA 6, Tamura et al. 2013) und des Online-Programms „Basic Local Alignment Search Tool“ des National Center for Biotechnology Information (NCBI) durchgeführt.

3.2. Zellkultur

Die Arbeiten mit Zellkulturen werden unter einer Sterilwerkbank der Klasse II (Laminar-Airflow) durchgeführt. Die Arbeitsfläche sowie die verwendeten Medienflaschen wurden vor Gebrauch mit 70%-igem Ethanol desinfiziert. Benötigte Reagenzien und Kulturmedien sowie Pipetten werden steril vom Hersteller bezogen bzw. autoklaviert.

Die Kultivierung der Zellen erfolgt in einem Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ Anteil in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre.

3.2.1. Kultivierung der HK-2 Zelllinie

Bei den Nierenepithelzellen (HK-2-Zellen) handelt es sich um eine mit Papillomaviren immortalisierte Zelllinie. Diese stammt aus humanem Nierengewebe und wurde 1994 am Fred Hutchinson Cancer Research Center, Universität Washington, von Richard A. Zager entwickelt.

Benötigte Zellkulturflaschen wurden vorab mit 0,5 % Gelatine-Lösung beschichtet, überstehende Flüssigkeit wird abgesaugt. Die Zellen werden in einem Stickstofftank gelagert. Zur Kultivierung wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit 20 ml DMEM + Zusätzen (10 % FCS und Penicillin / Streptomycin) in einem 50-ml-Röhrchen vermischt und auf einer 25 cm² großen Zellkulturflasche (T-25-Zellkulturflasche, Greiner Bio-One GmbH) ausgesät.

Nach der Aussaat wurden die Zellen in einem Brutschrank bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit (RH) und 5% CO₂ kultiviert. Währenddessen erfolgte alle 2 – 3 Tage ein Mediumwechsel mit DMEM + Zusätzen. Einmal pro Woche wurden die Zellen im Verhältnis 1:4 gesplittet. Abfälle dieser Zelllinie werden dem infektiösen Müll zugeführt, da HK-2 Zellen mit einem Papillomavirus immortalisiert sind.

3.2.2. Kultivierung der CaCo-2 Zelllinie

Bei den epithelialen, kolorektalen Adenokarzinomzellen (CaCo-2-Zellen) handelt es sich um eine immortalisierte Zelllinie, welche aus einem humanen Dickdarmkarzinom stammt und 1975 am Sloan-Kettering Institute for Cancer Research, New York, von Dr. Jorgen Fogh entdeckt wurde.

Benötigte Zellkulturflaschen wurden vorab mit 0,5 % Gelatine-Lösung beschichtet, überstehende Flüssigkeit wird abgesaugt. Die Zellen werden in einem Stickstofftank gelagert. Zur Kultivierung wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit 20 ml EMEM + Zusätzen (10 % FCS und Penicillin / Streptomycin) in einem 50-ml-Röhrchen vermischt und auf einer 25 cm² großen Zellkulturflasche (T-25-Zellkulturflasche, Greiner Bio-One GmbH) ausgesät. Nach der Aussaat wurden die Zellen in einem Brutschrank bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit (RH) und 5% CO₂ kultiviert. Währenddessen erfolgte alle 2 – 3 Tage ein Mediumwechsel mit EMEM + Zusätzen. Einmal pro Woche wurden die Zellen im Verhältnis 1:20 gesplittet.

3.2.3. Kultivierung der HEK293 Zelllinie

Bei den embryonalen Nierenzellen (HEK293-Zellen) handelt es sich um eine durch Adenoviren immortalisierte Zelllinie, welche aus Nierenzellgewebe humaner Feten und Säuglinge stammt und 1973 an der Universität Leiden, Holland, im Labor von Alex van der Eb ausgearbeitet wurde.

Die Zellen werden in einem Stickstofftank gelagert. Zur Kultivierung wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit 20 ml EMEM + Zusätzen (10 % FCS und Penicillin / Streptomycin) in einem 50-ml-Röhrchen vermischt und auf einer 25 cm² großen Zellkulturflasche (T-25-Zellkulturflasche, Greiner Bio-One GmbH) ausgesät. Nach der Aussaat wurden die Zellen in einem Brutschrank bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit (RH) und 5% CO₂ kultiviert. Währenddessen erfolgte alle 2 – 3 Tage ein Mediumwechsel mit EMEM + Zusätzen. Einmal pro Woche wurden die Zellen im Verhältnis 1:20 gesplittet.

3.2.4. Transfektion

Zum Nachweis der Detektionsspezifität von SGLT1 und SGLT2 werden humane Zellen mit SGLT-spezifischer siRNA transfiziert (siehe Abschnitt 2.1.4). Die Transfektion erfolgte in den unter Punkt 2.1.1, S. 21, aufgeführten Zelllinien. Als Kontrolle der Transfektion dient eine Desmoglein-2 (DSG2) siRNA. Desmoglein-2 ist ein transmembranes Glykoprotein in Desmosomen und zuständig für den Zell-Zell-Kontakt.

Hierfür wurden die Zellen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 60 % kultiviert (Tag 0). Das Transfektionsreagenz wird vorbereitet, indem 15 µl des Lipofectamine®RNAiMAX Reagenz mit 5 µl siRNA und 500 µl Opti-MEM vermischt wird. An Tag 1 wurden 250 µl des Transfektionsreagenz in 2 ml DMEM-Medium ohne Zusätze zu der Zellkultur gegeben und einen Tag im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h (Tag 2) wurde das Medium von den Zellen abgenommen und diese mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgt die Isolation von RNA oder Proteinen.

3.3. Gewinnung humaner Gehirnregionen

Die Untersuchung erfolgt an Gewebeproben, die in normalem Umfang im Rahmen von gerichtlichen Obduktionen entnommen werden. Die Asservierung solcher Proben und deren Untersuchung ist durch die §§ 87 ff der Strafprozessordnung StPO gedeckt. Die vorliegende Studienarbeit und die damit verbundene Untersuchung der menschlichen Gewebeproben ist von der Ethik-Kommission der Julius-Maximilians-Universität Würzburg genehmigt.

Die Probennahme erfolgt bei Verstorbenen beiderlei Geschlechts, die im Institut für Rechtsmedizin der Universität Würzburg zur gerichtlichen Obduktion gelangen. Einschlusskriterien sind das Vorliegen eines Schädel-Hirn-Traumas oder eines Erstickungsvorgangs. Als solche sind zu nennen: Aspiration, Thoraxkompression, Kompression der Halsweichteile (Strangulation), Verlegung der Atemwege, Intoxikationen mit Dämpfung des Atemzentrums (z. B. Morphin/Heroin). Bei den Schädel-Hirn-Traumata werden zudem 2 Untergruppen gebildet, eine für Todesfälle in unmittelbarem zeitlichem Zusammenhang mit dem Trauma und eine für zunächst überlebt habende Fälle.

Bei jeder Testperson werden jeweils 4 Proben des Gehirns entnommen, wobei die Entnahmestellen die graue und weiße Substanz des Großhirns, das Kleinhirn und Pons abdecken.

Bei umschriebenen, herdförmigen Prozessen wie etwa Kontusionen oder Blutungen werden Proben aus deren Randbereichen und aus den unverletzten kontralateralen Bezirken entnommen. Von allen Fällen werden zudem folgende Daten erfasst: Alter, Geschlecht, Überlebenszeit, Reanimationsmaßnahmen, Postmortalzeitraum, Todesursache. Als Kontrollgruppe dienen Todesfälle durch primäres Herz-Kreislaufversagen. Die Kontrollfälle werden in Bezug auf Alter, Geschlecht und Postmortalzeit mit den Fällen der Untersuchungsgruppen gematcht. Ausschlusskriterien sind das Vorliegen von Fäulnis, unbekannter Sterbezeitpunkt oder unbekannte Lagerungsbedingungen des Leichnams. Die Proben werden in Asservaten-Röhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

3.4. Isolierung humaner Hirnkapillaren

Zur Isolierung von Kapillaren aus humanem Gehirngewebe wurden ca. 100 mg des Gewebes entnommen und in 200 µl Puffer A mittels Mikropistill homogenisiert. Das Homogenat wird in 10 ml eines 25 %-igen BSA-Puffer überführt und gut vermennt. Anschließend wurde die Probe 10 min bei 1.000 xg, 4°C, zentrifugiert. Hierdurch werden Verunreinigungen entfernt und die Kapillaren pelletiert. Das Pellet wurde entnommen, mit 5 ml Puffer A resuspendiert und über eine mit Glass Beads (acid-washed, 425-600 µm, Sigma Aldrich) gefüllte Filtereinheit (Pierce Tissue Strainers, 250 µm, Thermo Fisher Scientific) gegeben. Die Kapillaren bleiben dabei an der aufgerauten Oberfläche der Glass Beads haften. Verunreinigungen können anschließend durch dreimaliges Spülen der Glass Beads mit Puffer A entfernt werden. Die Beads wurden nun in eine sterile Gewebekulturschale überführt und es erfolgte das Lösen der Kapillaren durch Spülen der Beads mit ca. 3 ml Puffer A. Der Überstand wurde entnommen, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 4.000 xg, 4°C, zentrifugiert. Das Pellet enthält nun alle Kapillare und kann für eine weitere Versuchsdurchführung (Immunfluoreszenzfärbung, Protein- und RNA-Isolation) genutzt werden.

3.5. Proteinarbeiten

3.5.1. Proteinisolation aus humanen Zellen

Die Proteinisolation aus humanen Zellen erfolgt mittels RIPA Puffer, dem 1x Proteinase Inhibitor (Roche) zugesetzt wurde.

Zellen wurden vor der Proteinisolation auf Eis gelagert und mit eisgekühltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 50 µl gebrauchsfertiger RIPA-Puffer überschichtet und anschließend mittels Zellschaber abgeschabt. Die gewonnenen Proben wurden durch einen Ultraschall-Homogenisator (20 W) für zehnmal 0,5 Sekunden und 35 sek. Pause homogenisiert. Anschließend wird die Probe für 10 min mit 10.000 xg zentrifugiert um Zelltrümmer zu beseitigen.

3.5.2. Proteinisolation aus humanen Gewebe

Die Proteinisolation aus humanem Gewebe erfolgt ebenfalls mittels RIPA Puffer, dem 1x Proteinase Inhibitor (Roche) zugesetzt wurde.

Ungefähr 100 mg humanes Gewebe wird mittels TissueLyser (Quiagen) für 2 min bei 30 Hz zerkleinert. Um Zelltrümmer zu entfernen wurden die Proben anschließend für 10 min bei 11.000 xg zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben.

3.5.3. Konzentrationsbestimmung der Proteinlysate

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt mittels Pierce® BCA Protein Assay Kit. Dieses Kit funktioniert nach der Bicinchoninsäure - (BCA) – Methode (Smith et al. 1985). Da die BCA-Methode eine geringe Störanfälligkeit, sowie eine hohe Empfindlichkeit besitzt konnte die eingesetzte Probenmenge auf 3 µl reduziert werden. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgt durch photometrische Detektion bei 562 nm des violetten Reaktionsproduktes des BCA mit einem einwertigen Kupferion, welches quantitativ durch die enthaltenen Proteine reduziert wurde. Mit Hilfe einer vorgegebenen Standardreihe kann die Proteinkonzentration der Probe mathematisch ermittelt werden.

3.5.4. SDS-PAGE

Die Proben werden auf Eis aufgetaut und mit 4x Laemmli-Probenpuffer vermengt. Die Denaturierung erfolgte für 15 min bei 65°C.

Die Proteine wurden anschließend mittels 10%-igem SDS-Gel (siehe Tabelle 9 und Tabelle 10) in einer vertikalen Gelelektrophorese-Kammer (Bio-Rad) aufgetrennt. Hierbei wird eine Spannung von 60 V für 20 min und anschließend 100V für 90 min angelegt.

Tabelle 9: Zusammensetzung eines 10 % SDS-Trenngels

H₂O	4 ml
Bis-Acrylamid	3,4 ml
3 M Tris, pH 8,8	2,5 ml
10 % SDS	100 µl
APES	100 µl
TEMED	6 µl

Tabelle 10: Zusammensetzung eines Sammelgels

H₂O	3,48 ml
Bis-Acrylamid	850 µl
1 M Tris, pH 6,8	625 µl
10 % SDS	50 µl
APES	50 µl
TEMED	5 µl

3.5.5. Western blotting

Die aufgetrennten Proteine im SDS-Gel wurden mittels Mini Trans-Blot Elektrophoresekammer (Bio-Rad) auf eine Nitrozellulosemembran (Protran, GE Amersham) geblottet (Aufbau siehe Abbildung 7). Dies erfolgte mit 40 mA und 30 V pro Gel über Nacht bei 4°C.

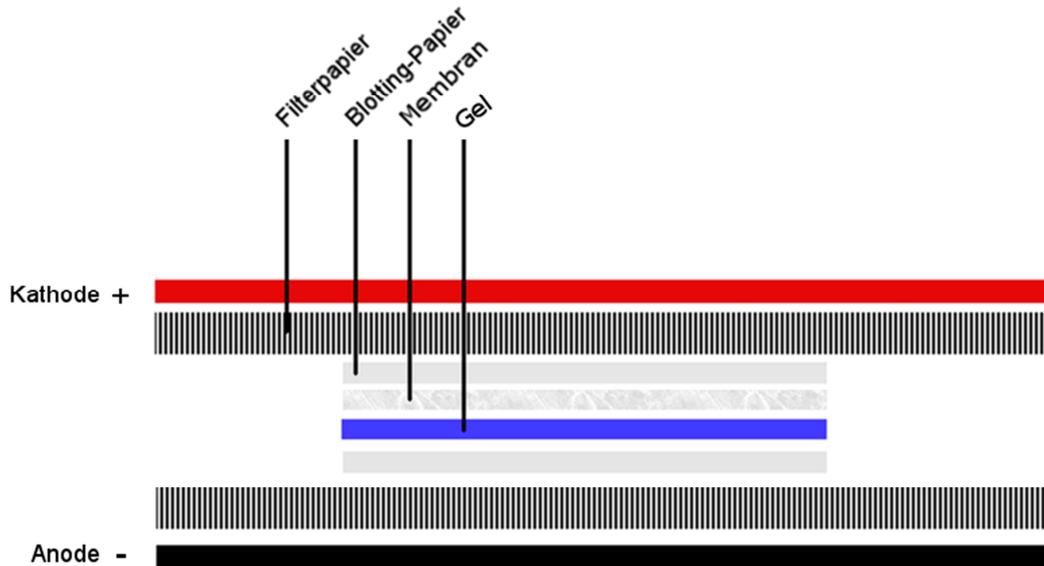


Abbildung 7: Aufbau des Western Blot

Nach dem Transfer wurde die Membran dreimal für 5 min in WB-Waschpuffer gewaschen und für 2 h bei RT in Blocking Puffer geblockt. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper in Antikörper-Verdünnungspuffer I inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein erneuter Wasch- und Blockierungsschritt der Membran und eine anschließende Inkubation für 2h bei RT mit dem Sekundärantikörper in Antikörper-Verdünnungspuffer II.

Für die Detektion wurde die Membran dreimal für 5 min in WB-Waschpuffer gewaschen und für 4 min in ECL-Lösung inkubiert. Hierbei ist darauf zu achten, dass dieser Schritt im Dunkeln erfolgt. Anschließend erfolgte die Detektion mit dem Imaging System FluorChem FC2 (Alpha Innotech).

3.6. Strippen der Western Blot Membranen

Zur Detektion mehrerer Targets auf einer Western Blot Membran muss das erhaltene Signal des ersten Targets zuerst entfernt werden. Hierzu kann ein leichter und ein starker Strip durchgeführt werden.

Zum Entfernen schwacher Signale bzw. Signale im Molekularbereich, die das Signal des zweiten Targets nicht beeinflussen, kann ein leichter Strip durchgeführt werden. Hierzu wurde die detektierte Membran mit vollentsalztem Wasser für 5 min. gewaschen. Danach erfolgte der eigentliche Strip durch Inkubation in Stripping Puffer I auf einem Laborschüttler.

Nach einem weiteren Waschschrift mit vollentsalztem Wasser kann die Membran wie ein neuer Blot behandelt werden und mit einem neuen Primärantikörper detektiert werden.

Zum Entfernen starker Signale bzw. Signale im Molekularbereich, die das Signal des zweiten Targets beeinflussen, muss ein starker Strip durchgeführt werden. Hierzu wurde die detektierte Membran mit WB-Waschpuffer für 5 min. gewaschen. Danach erfolgte der eigentliche Strip durch Inkubation mit Stripping Puffer II schüttelnd im Wasserbad bei 56°C. Die Membran wird anschließend dreimal für 5 min in WB-Waschpuffer gewaschen und kann erneut zur weiteren Targetdetektion mit einem neuen Primärantikörper verwendet werden.

3.7. Datenauswertung

Zur statistischen Auswertung der erhaltenen Ergebnisse der Western Blot Versuche wurden zunächst die erhaltenen Banden mittels AlphaView Software (AlphaInnotech) densitometrisch analysiert (IDV-Werte). Zur Normalisierung der Daten wurde die Stärke der Targetbanden (SGLT1, SGLT2, GLUT1) nach folgender Formel auf die Ladekontrolle β -Aktin bezogen:

$$\text{Expression Target} = \frac{\text{IDV Target}}{\text{IDV } \beta - \text{Aktin}}$$

Alle Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Anschließend wurde die statistische Bewertung der signifikanten Unterschiede aller Proben mit dem Statistikprogramm „IBM SPSS Statistics 23“ durchgeführt. Ein P-Wert kleiner als 0.05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

3.7.1. Analyse der Rohdaten

Bevor eine statistische Analyse der Expressionswerte für GLUT1, SGLT1 und SGLT2 erfolgen kann, müssen deren Rohdaten analysiert werden. Damit die erhobenen Daten statistisch analysiert werden können, müssen diese Skalenqualität besitzen. Diese Voraussetzung kann jedoch nicht geprüft werden, sondern beinhaltet qualitative Attribute wie Beispielsweise gleich unterteilte Einheiten entlang der Skala, mit oder ohne einen vordefinierten Nullpunkt.

Bei den zu analysierenden Rohdaten handelt es sich um Daten einer Intervallskala, da kein exakt zu definierender Nullpunkt vorhanden ist.

Der Vergleich der Proben mit Traumatisierung zu der Myokardinfarkt-Kontrolle zeigt allenfalls eine Relation der Expressionsstärken, da der Nullpunkt (Kontrollprobe) willkürlich gewählt wurde. Entsprechend bedeutet eine Expression von null nicht exakt eine nicht vorhandene Expression der Glukosetransporter im Gehirn.

Die Daten können nun durch eine parametrische oder nicht-parametrische Methode analysiert werden. Um eine parametrische Analyse durchführen zu können müssen die Daten jedoch zwei Voraussetzungen erfüllen:

1. Grundgesamtheit der Gruppen ist Normalverteilt (Kolmogorov-Smirnoff-Test)
2. Homogenität der Varianzen (Levene-Test)

Je nach Probenvoraussetzung können diese anschließend mittels parametrischen oder nicht-parametrischen Methoden analysiert werden. Hier werden mehr als zwei Gruppen auf deren Lageunterschiede getestet. Wenn ein signifikanter p-Wert ($p \leq 0,05$) angezeigt wird, bedeutet dies jedoch nur, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen vorliegt. Aus diesem Grund muss ein Paarvergleichstest, ein sog. Post-Hoc-Test, angeschlossen werden.

3.8. RNA-Arbeiten

3.8.1. RNA-Isolation

Die Isolation von RNA erfolgt mittels TriZol® (Thermo Fisher Scientific). Hierbei wurden die Zellen bzw. ca. 100 mg des humanen Gewebes in 1 ml TriZol® Reagenz aufgenommen. Die Zellen wurden durch einen Ultraschall-Homogenisator (20 W) für zehnmal 0,5 sek. und 35 sek. Pause homogenisiert. Bei dem Gewebe geschieht dies mittels Tissue Lyser (2 Minuten, Frequenz 30).

Nach der Homogenisierung erfolgte durch Zugabe von 200 µl Chloroform eine Auftrennung der DNA von den Proteinen (Phenol-Chloroform-Trennung). Durch Vortexen der Proben und anschließender Zentrifugation bei 16.200 xg für 10 min werden die Phasen aufgetrennt. Dabei findet sich die RNA in der oberen wässrigen Phase, Proteine sind in der unteren organischen Phase (siehe Abbildung 8). Die wässrige Phase wurde abgenommen, in einem neuen Reagenzgefäß mit 500 µl Isopropanol vermischt und über Nacht bei -20°C gefällt. Durch diese Isopropanol-Präzipitation wird die RNA unter einer weniger polaren Umgebung aufgrund der Verringerung ihrer Löslichkeit ausgefällt.

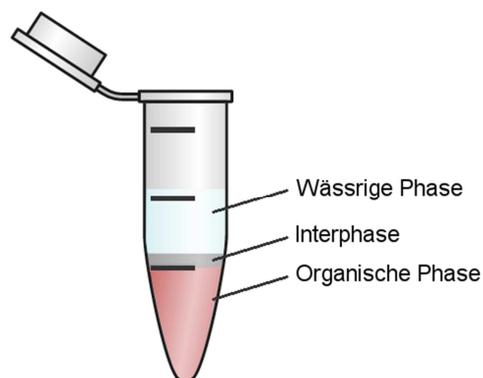


Abbildung 8: Phasentrennung mittels TriZol®; Die RNA befindet sich in der klaren, wässrigen Phase.

Am nächsten Tag kann die gefällte RNA mittels 10-minütiger Zentrifugation bei 13.800 xg pelletiert werden. Der Überstand wird verworfen und das Pellet zweimal mit 100%-igem, eiskaltem Ethanol gewaschen (Zugabe von 1 ml Ethanol, Zentrifugation 5 min bei 5.600 xg). Anschließend wurde das Pellet getrocknet und mit 50 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

3.8.2. Konzentrationsmessung mittels NanoDrop™

Von der isolierten RNA wurde 1 µl entnommen und die Konzentration photometrisch mittels NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Als Blank / Referenz dient dabei RNase-freies Wasser. Die Konzentration der Probe wird hierbei automatisch bestimmt und in ng/ml ausgegeben. Die Reinheit der Proben kann anhand des Verhältnisses der Absorptionswerte A260/A230 und A260/A280 bestimmen.

Jede Aminosäure hat eine bestimmte Absorptionswellenlänge, je nach Zusammensetzung der Target-RNA ändert sich so die Gesamtaborption bei 260 nm. Als Regel gilt jedoch, dass das Verhältnis A260/A280 bei 1,8 – 2,0 liegen muss. Liegt das Verhältnis unter dem angegebenen Wert, so ist die Probe mit organischen Substanzen wie Phenol oder Proteinen verunreinigt. Liegt das Verhältnis A260/A230 bei 2,0 – 2,2, so ist die Probe mit Substanzen wie EDTA oder Guanidinisothiocyanat verunreinigt, welche im TriZol Reagenz vorhanden sind.

Ist eine Probe verunreinigt, so kann diese nicht für die reverse Transkription eingesetzt werden. Zur Verbesserung wurde der Probe erneut 500 µl Isopropanol zugegeben, diese über Nacht gefällt und anschließend wie in Abschnitt 3.8.1 beschrieben weiterbehandelt.

3.8.3. Reverse Transkription

Um die erhaltene mRNA in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umzuschreiben erfolgt eine quantitative Umschreibung mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). Bei dem im Kit enthaltenen Random Primers handelt es sich um eine Mischung aus einzelsträngigen Nukleotidsequenzen mit zufällig zusammengesetzten Basenpaaren. Diese lagern sich komplementär an den RNA-Strang und bilden somit den Startpunkt für die reverse Transkriptase.

In die Reaktion wurde 1 µg der isolierten RNA in die Reaktion eingesetzt (siehe Tabelle 11) und die reverse Transkription in einem Thermocycler gestartet (siehe Tabelle 12).

Tabelle 11: MasterMix Ansatz für die reverse Transkription

Lösung	Volumen [μ l]
10x RT Buffer	2,5
10x Random Primers	2,5
dNTP Mix (100mm)	1
Reverse Transkriptase	1,25
RNase Inhibitor	1,25
RNA	1 μ g
ddH ₂ O	a. d. 25

Tabelle 12: PCR-Programm der reversen Transkription

Zeit [min]	Temperatur [$^{\circ}$ C]
10	25
120	37
5	85
~	4

Nach erfolgter reversen Transkription können die cDNA Proben entweder für eine Prä-Amplifikation genutzt oder direkt in die Real-Time PCR eingesetzt werden.

3.8.4. Prä-Amplifikation

Die Prä-Amplifikation erfolgt mit dem TaqMan PreAmp Master Mix (Thermo Fisher Scientific) vor der eigentlichen Real-Time PCR. Durch diesen Zwischenschritt wird die Konzentration jeglicher cDNA der transkribierten Probe erhöht. Hierfür wird 1 μ g der cDNA, entspricht je 1 μ l cDNA, in die Reaktion eingesetzt und mittels mitgelieferter, unspezifischer Sonden im Thermocycler vervielfältigt (siehe Tabelle 13 und Tabelle 14).

Tabelle 13: Master Mix Ansatz für die Prä-Amplifikation

Lösung	Volumen [μ l]
TaqMan PreAmp Master Mix (2x)	12,5
Pooled assay Mix (0,2x)	6,25
cDNA	1 μ l
ddH₂O	a. d. 25

Tabelle 14: PCR-Programm der Prä-Amplifikation

Zeit [min]	Temperatur [°C]	Zyklus
10	95	1
0,25	95	14
4	60	

Nach erfolgter Prä-Amplifikation wurden die Proben in die Real-Time PCR eingesetzt.

3.8.5. Primer Design

Um optimale PCR-Ergebnisse zu erzielen, sollen neben kommerziellen Sonden ebenfalls synthetisch hergestellte Primer getestet werden.

Diese Primer sollten folgende Eigenschaften erzielen:

- 18 – 25 Basenpaar Nukleotidlänge
- GC-Gehalt von 40-60 %
- Schmelztemperatur zwischen 57 °C und 60 °C
- Produktlänge von 500 – 1.000 bp

Hierbei wird pro Target ein sog. Forward- und ein Reverse-Primer designet.

Der Forward-Primer ist komplementär zum Anfangsstück der Zielsequenz im „sense“-Strang, der Reverse-Primer hingegen ist komplementär dem Ende der Zielsequenz im „anti-sense“-Strang gelegen. Die Sequenz der jeweiligen Primer wird üblicherweise immer von 5'- zu 3'-Ende angegeben.

Im Falle der endogene Kontrolle β -Aktin wurde der Primer aus bereits publizierten arbeiten übernommen (Raff et al. 1997). Primer für die spezifischen Targets SGLT1 und SGLT2 wurden manuell entworfen und mit Hilfe des Programms Primer-BLAST (National Center for Biotechnology Information, NCBI) gegeneinander getestet. Die mRNA-Sequenz der Targets wurde aus der Online-Datenbank des National Center for Biotechnology Information entnommen.

Bei Erstellung der Primer wurde darauf geachtet, dass diese Intron-überspannend liegen. Da die dazwischenliegenden Introns beim Spleißen der RNA zu mRNA entfernt werden, kann eine Kontamination der cDNA mit genomischer DNA erkannt werden. Im Falle einer Kontamination ist das resultierende PCR-Produkt länger als das gewünschte Amplifikat, da die Intronsequenz mit enthalten ist. Alle verwendeten Primer mit ihren spezifischen Eigenschaften können der Tabelle 8 auf Seite 29 entnommen werden.

3.8.6. Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

Bei der quantitativen Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (Real-Time PCR, qPCR) wird die gewünschte DNA-Sequenz mit einer hohen Spezifität und Sensitivität vermehrt. Hierzu werden spezifische Sonden bzw. Primer und hitzespezifische DNA-Polymerasen (Taq-Polymerase) eingesetzt. Ein Vorteil gegenüber der herkömmlichen PCR ist die quantitative Aussage über die amplifizierte DNA nach jedem Zyklus. Durch Beta-Aktin als endogene Kontrolle kann jede Genexpression auf die Expression der Kontrolle normalisiert werden.

Für den Reaktionsansatz wird jede cDNA zuvor 1:10 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Pro Probe wird ein Master Mix Ansatz mit Primern bzw. Sonden der spezifischen Targets (SGLT1, SGLT2, GLUT1) und der endogenen Kontrolle (β -Aktin) hergestellt und gesondert untersucht (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Master Mix Ansatz für die Real-Time PCR mit dem PowerUp™ SYBR® Green Master Mix

Lösung	Volumen [µl]
2x Master Mix Puffer	10
Forward Primer (3 µM)	1,75
Reverse Primer (3 µM)	1,75
ddH₂O	8,5
cDNA (0,1 µg/µl)	5 µl

Die Proben wurden anschließend in 40 Zyklen vervielfältigt und quantitativ beurteilt (siehe Tabelle 16). Anhand einer an den qPCR-Durchlauf angefügten Analyse der Schmelzkurven kann beurteilt werden, ob die erhaltenen Produkte verunreinigt sind (siehe Tabelle 17). Zeigt die Schmelzkurve einen Peak, so beinhaltet die Probe nur ein vervielfältigtes Produkt. Bei Vorkommen mehrerer Peaks beinhaltet die Probe unterschiedlich große Amplifikationsprodukte, die Sonden bzw. Primer sind somit nicht spezifisch für das ausgewählte Target.

Tabelle 16: PCR-Programm der Real-Time-PCR

Zeit [min]	Temperatur [°C]	Zyklus
2	50	1
2	95	1
0,25	95	40
1	60	

Tabelle 17: PCR-Programm der Real-Time PCR zur Darstellung der Schmelzkurve

Zeit [min]	Temperatur [°C]	Temperaturrampe
0,25	95 °C	1,6 °C / sec
1	60	1,6 °C / sec
0,25	95	0,15 °C / sec

3.9. Immunhistologie

3.9.1. Anfertigung von Gefrierschnitten

Die entnommenen humanen Gehirnregionen wurden im Ganzen bei -80°C gelagert. Nach 15-minütigem antauen auf Eis konnte von den Hirnproben ein Probenareal (Querschnitt durch die Hirnregion) mittels Skalpell abgetrennt werden. Die Proben, sowie Rückstellproben der Gehirnregionen wurden anschließend sofort wieder tiefgefroren bzw. auf Trockeneis bis zur weiteren Verarbeitung zwischengelagert.

Die entnommenen Proben wurden zum Schutz der Proteine und für eine bessere Verarbeitung in Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound eingebettet. Anschließend erfolgt die Anfertigung von 10 µm dicken Gefrierschnitten am Kryotom Leica CM3050S. Es wurden jeweils zwei Gefrierschnitte der gleichen Probe auf SuperFrost Plus Objektträger (Menzel) aufgezogen und in Objektträgermappen bei -80°C gelagert.

3.9.2. Immunfluoreszenzfärbung

Die benötigten Gefrierschnitte wurden aus dem -80°C Ultratiefkühlschrank entnommen und liegend für 15 Minuten auf den Lüftungsschlitzen des Laminar-Airflow getrocknet. Die Schnitte wurden mittels *ImmEdge Hydrophobic Barrier PAP Pen* (Vector Labs) umkreist und anschließend für 5 min in einem Färbetrog mit eiskaltem Aceton fixiert. Die Objektträger werden anschließend aus dem Färbetrog entnommen und für 15 min luftgetrocknet. Um restliches Aceton zu entfernen wurden die Objektträger in einem zweiten Färbetrog für 5 min in IF-Waschpuffer gewaschen. Vor dem Färben müssen Hintergrundproteine, welche mit den verwendeten Antikörpern unspezifisch reagieren können, geblockt werden. Dies erfolgt in einer mit Wasser gefüllten Färbekammer durch 5% Ziegenserum (Normal Goat Serum) in PBS. Nach 20 min wurde die Blockierlösung abgenommen, die Primärantikörperlösung auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Diese Lösung besteht aus den jeweiligen Primärantikörpern (Targetantikörper und Kontrollantikörper, z. B. Rabbit anti-human SGLT1 und goat anti-human vWF) in Antikörper-Verdünnungslösung II (Verdünnungen und Antikörper siehe Tabelle 5). Am nächsten Tag wurden die Objektträger dreimal für 5 min in IF-Waschpuffer gewaschen und wieder in die Färbekammer gelegt. Es erfolgte die Zugabe der Sekundärantikörperlösung auf die Schnitte.

Diese Lösung besteht aus den Sekundärantikörpern gegen den jeweiligen Primärantikörper (z. B. Donkey anti rabbit IgG und Donkey anti goat IgG) in Antikörper-Verdünnungslösung II (Verdünnungen und Antikörper siehe Tabelle 6). Alle nachfolgenden Arbeitsschritte müssen im abgedunkelten Raum durchgeführt werden, um die Fluoreszenzmarkierung der Sekundärantikörper nicht zu schwächen. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Objektträger dreimal für 5 min in IF-Waschpuffer gewaschen. Das Eindeckeln der Schnitte erfolgte mittels VECTASHIELD Antifade Mounting Medium.

3.10. Blocken der Antikörper mit immunisiertem Peptid

Das Blocken der Antikörper wurde jeweils mit dem firmeneigenen Protokoll durchgeführt (Abcam, Everest Biotech).

Hierbei wurden die Antikörper mit dem immunisierten Peptid in der dafür vorgesehenen Konzentration vermennt und über Nacht bei 4°C auf einem Laborschüttler inkubiert. Am darauffolgenden Tag kann das Experiment mit dem geblockten Antikörper, sowie einer ungeblockten Antikörperlösung als Kontrolle, durchgeführt werden. Hierzu siehe Abschnitt 3.5.5 Western blotting, S. 35, und Abschnitt 3.9.2 Immunfluoreszenzfärbung, S. 45.

4. Ergebnisse

4.1. Phylogenie von SGLT Proteinen

4.1.1. Entwicklung von Glukosetransportern der SCL2- und SLC5-Genfamilie

Zu Beginn soll der Frage nachgegangen werden, ob die Phylogenie der Natrium-abhängigen Glukosetransporter von Kleinstorganismen bis hin zum Menschen darzulegen ist. Hierfür wurde zunächst untersucht, ob sich die Glukosetransporter der Familie SLC2 und die Natrium-abhängigen Glukosetransporter der Familie SLC5 in Abhängigkeit voneinander oder getrennt entwickelt haben. Die Proteinsequenzen aller derzeit bekannten Transporter (SLC2 und SLC5, Stand 2017) wurden mittels Sequenzalignment gegeneinander analysiert, um einen Stammbaum darzustellen (Abbildung 9).

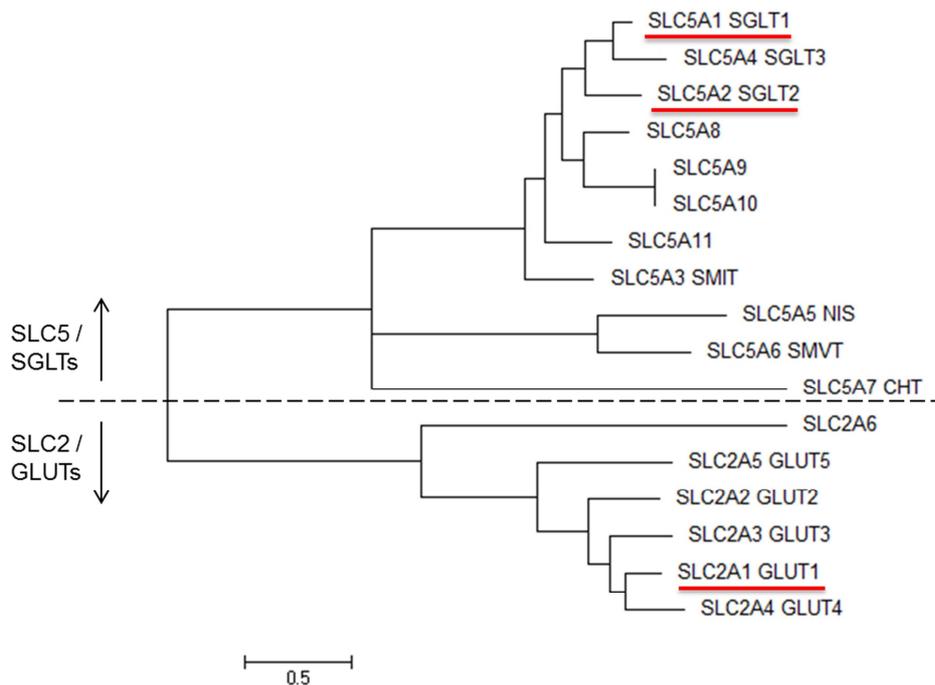


Abbildung 9: Stammbaum der Genfamilie SLC2 und SLC5 anhand deren Proteinsequenzen. Distance between branches and length of the lines indicates the degree of evolutionary divergence.

Im Stammbaum ist zu erkennen, dass sich die Glukosetransporter der Familie SLC2 und SLC5 getrennt zueinander und somit parallel entwickelt haben. Ein gemeinsamer Vorfahre bzw. Ursprung dieser Genfamilien lässt sich anhand dieses Verfahrens jedoch nicht bestimmen.

4.1.2. Phylogenie von SGLT1 und SGLT2

Eine Spezies-abhängige Entwicklung lässt sich durch Alignment der SGLT1 und SGLT2 Proteinsequenzen unterschiedlicher Spezies darstellen.

Hierzu wurden nachfolgende Spezies herbeigezogen, da diese zum gegenwärtigen Zeitpunkt vollständig sequenziert und in der Datenbank UniProt gespeichert sind (Abbildung 11):



8

Abbildung 11: Spezies zur Bestimmung der SGLT1 und SGLT2 Phylogenie

Für das Alignment der SGLT-Proteinsequenzen kann das Alpha-Proteobacterium Q1 als Ursprung angenommen werden. Hieraus entwickelten sich die zwei phylogenetischen Stammbäume von SGLT1 und SGLT2. Die Transporter des Menschen entwickelten sich hierbei als letztes, zusammen mit den SGLTs der Schimpansen (Abbildung 12).

Ergebnisse

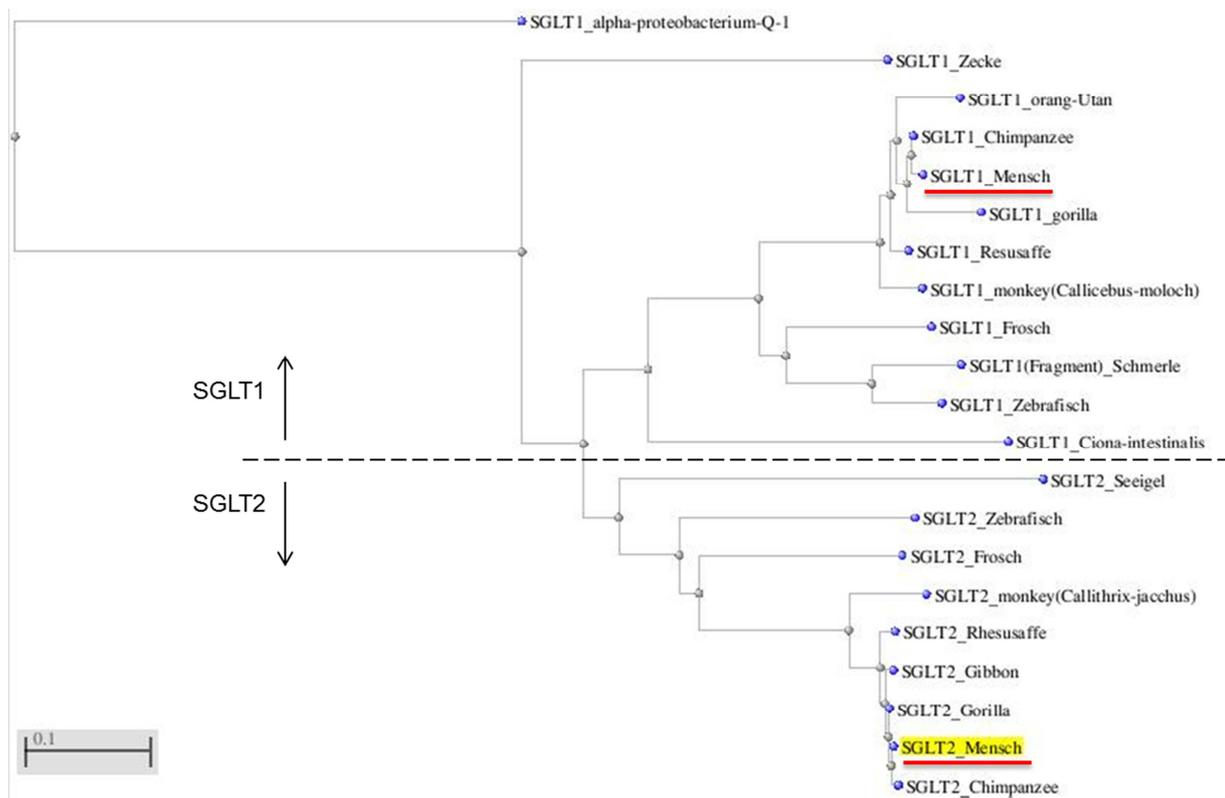


Abbildung 12: Phylogenese von SGLT1 und SGLT2;
Die Sequenz des Alpha-Proteobakterium kann als Ursprung gesehen werden. Hieraus entwickeln sich die zwei phylogenetischen Bäume von SGLT1 und SGLT2. Die Transporter des Menschen entwickeln sich hier als letztes, zusammen mit den SGLTs im Schimpansen.

Durch Auflistung der ersten evolutionären Entstehung aller getesteten Spezies, in denen SGLTs nachgewiesen werden können, kann eine evolutionäre Zeitachse abgebildet werden (Tabelle 18). Diese beginnt vor 500 Mio. Jahren und endet beim modernen Menschen.

Ergebnisse

Tabelle 18: Evolutionäre Zeitachse von SGLT1 und SGLT2

Evolution Zeitachse	SGLT1	SGLT2
	Proteobakterium	
ca. 500 Mio. Jahre	Schlauchaschidie	
ca. 300 Mio. Jahre	Hirschzecke	
ca. 65 Mio. Jahre		Seeigel
	Krallenfrosch	
	Neuweltaffe	
	Rhesusaffe	
ca. 15 Mio. Jahre	Orang Utan	
	Gorilla	
	Schimpanse	
ca. 0,5 Mio. Jahre		Mensch

4.2. Analyse der Spezifität der verwendeten Antikörper

Um die Spezifität der verwendeten Antikörper nachzuweisen, wurden unterschiedliche Protokolle für eine Transfektion humaner Zelllinien verwendet.

Als Zelllinien wurden anfänglich die humane Darmendothelzelllinie CaCo-2, sowie die humanen Nierenendothelzelllinie HK-2 und HEK293 getestet.

Die Zelllinien CaCo-2 und HK-2 konnten im ersten Versuchsdurchlauf nicht transfiziert werden, die Zelllinie HEK293 brachte dahingegen ein positives Resultat. Alle darauffolgenden Versuche wurden deshalb mit der Zelllinie HEK293 durchgeführt. Als Kontrolle dient das integrale Membranprotein Desmoglein-2, welches für die intrazelluläre Zellverbindung nötig ist. Somit wird für die Überprüfung der erfolgreichen Transfektion eine DSG2 siRNA genutzt.

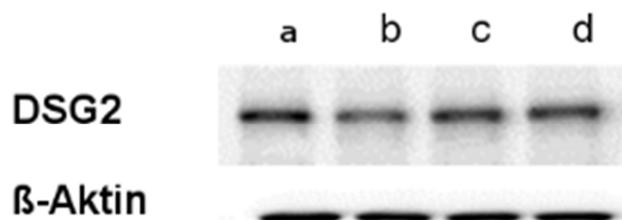


Abbildung 13: Western Blot der transfizierten HEK293-Zellen. DSG2 Antikörper von Thermo Fisher Scientific (jeweils bei ca. 130 kDa), β-Aktin dient als Ladekontrolle (42 kDa)
a) HEK293 untransfiziert; b) DSG2 siRNA; c) SGLT1 siRNA; d) SGLT2 siRNA

In Abbildung 13 ist zu erkennen, dass die Transfektion der HEK293-Zellen erfolgreich verlief. Der Test der Kontroll-siRNA DSG2 zeigt, dass diese Zellprobe (Linie b) eine erniedrigte DSG2-Expression aufweist im Vergleich zu der untransfizierten Zellkultur (Linie a).

Diese Transfektionsproben wurden anschließend mit einem anti-human SGLT1 und anti-human SGLT2 Antikörper der Firma Abcam überprüft. Hierbei müsste sich in den spezifisch transfizierten Zellproben eine ebenfalls verringerte Bandenintensität zeigen. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt. Für SGLT1 zeigt sich hier ebenfalls eine erniedrigte Expression für Zellproben mit SGLT1 siRNA (Linie c). Für SGLT2 dahingegen zeigt sich nur eine Veränderung der Expression zwischen transfizierten (Linie b-d) und der untransfizierten Zellprobe (Linie a). Eine Abschwächung der spezifischen SGLT2 siRNA Probe (Linie c) lässt sich nicht erkennen.

Ergebnisse

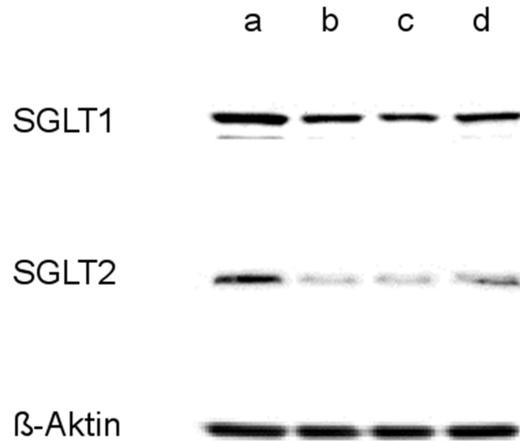


Abbildung 14: Western Blot der transfizierten HEK293-Zellen (20 μ g Gesamtprotein) hSGLT1 und hSGLT2 Antikörper von Abcam (jeweils bei ca. 75 kDa), β -Aktin dient als Ladekontrolle (42 kDa)
A) HEK293 untransfiziert; B) DSG2 siRNA; C) SGLT1 siRNA; D) SGLT2 siRNA

Diese Transfektionsversuche wurden mit insgesamt 5 Zellkulturproben wiederholt. Die Mittelwerte aus den Expressionsdaten (Bandenintensität / IDV mit Normalisierung durch β -Aktin) wurden statistisch ausgewertet und auf ihre Signifikanz untersucht. Zur Veranschaulichung wurde diese densitometrische Auswertung in einem Balkendiagramm dargestellt (Abbildung 16). Als Referenzkontrolle dient eine untransfizierte HEK293-Zellprobe (NT).

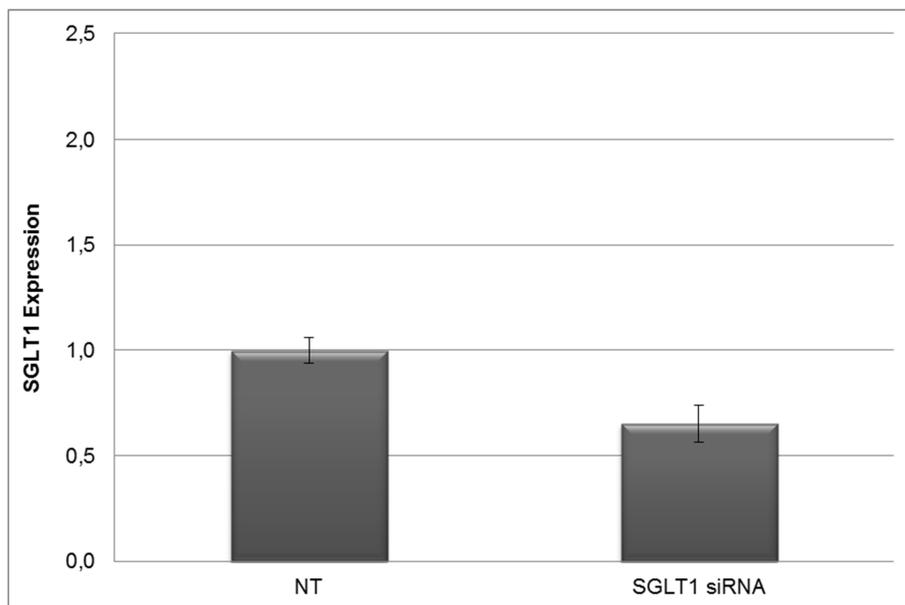


Abbildung 15: Densitometrische Auswertung der SGLT1 Western Blot Ergebnisse der transfizierten HEK293 Zellen; Expressionsanalyse von SGLT1 mittels anti-human SGLT1 Antikörper (Abcam). Die Verringerung der SGLT1 Expression in transfizierten HEK293-Zellen ist Signifikant gegenüber der nicht transfizierten (NT) Probe;

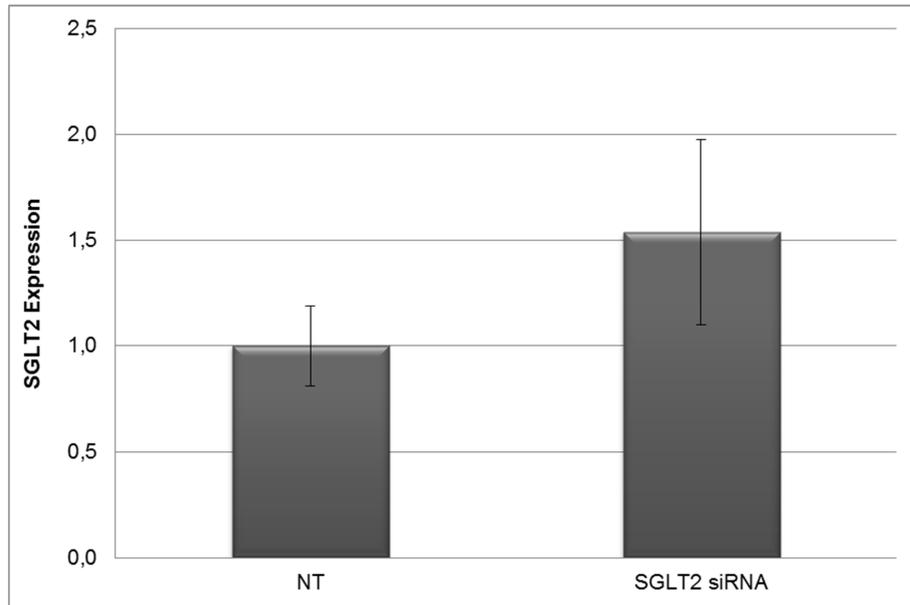


Abbildung 16: Densitometrische Auswertung der SGLT2 Western Blot Ergebnisse der transfizierten HEK293 Zellen; Expressionsanalyse von SGLT2 mittels anti-human SGLT2 Antikörper (Abcam). Es lässt sich keine Signifikante Expressionsänderung feststellen.

Da sich die Transfektionsversuche allgemein als schwierig darstellten, wurden für die Antikörper ebenfalls eine Signalblockierung mittels immunisiertem Peptid durchgeführt (siehe Abschnitt 4.3.1, S. 55).

4.3. Immunhistologischer Nachweis von Glukosetransportern im menschlichen Gehirn

4.3.1. Gefrierschnitte des Gesamthirngewebe

Aus heutiger Sicht wird der Glukosetransport im menschlichen Gehirn hauptsächlich von den Transportern der SLC2-/GLUT-Familie reguliert. Transporter der SLC5-/SGLT-Familie spielen dahingehend keine Rolle. Zur Untersuchung der physiologischen Expression der Natrium-abhängigen Glukosetransporter im menschlichen Gehirn wurden immunhistologische Präparate angefertigt.

In Abbildung 17 erfolgte der Nachweis von GLUT1 im menschlichen Gehirn. Durch eine Doppelfärbung mit einem Von-Willebrand-Faktor (vWF)-Antikörper konnten die Endothelstrukturen aufgezeigt werden. Die Überlagerung der GLUT1 und der vWF-gefärbten Gefrierschnitte zeigt eine exakte Lokalisation, welche durch eine orangene Färbung (Pfeile) markiert ist.

Da eine Expression der Natrium-abhängigen Glukosetransporter im menschlichen Gehirn noch nicht tiefergehend erforscht wurde, erfolgte der Nachweis von SGLT1 und SGLT2 mit überprüften, kommerziellen Antikörpern. Die Spezifität des anti-human SGLT1-Antikörpers der Firma Abcam konnte mittels Transfektionsversuchen nachgewiesen werden (Abschnitt 4.2, S. 52). Da dies für den anti-human SGLT2-Antikörper der Firma Abcam nicht gezeigt werden konnte, wurde ein Spezifitätstest der immunfluoreszenz-gefärbten Gefrierschnitte durchgeführt.

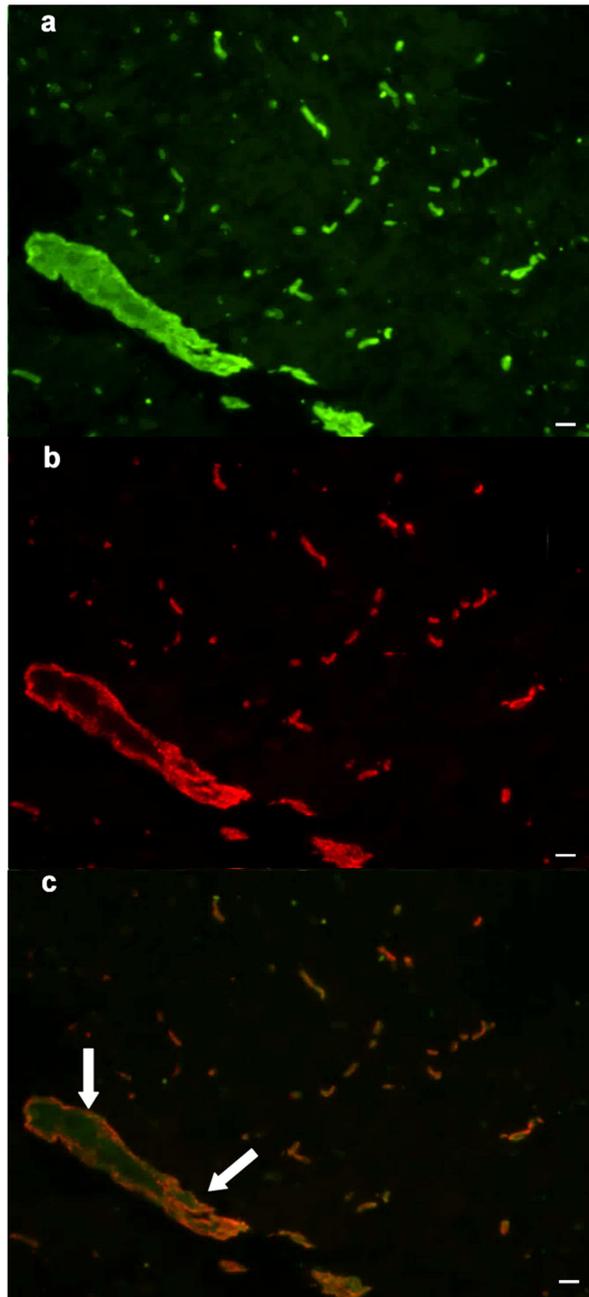


Abbildung 17: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von humanen Gehirn-Gefrierschnitten. GLUT1 (grün) und vWF (rot). Überlagerung der gefärbten Strukturen können als orangene Färbung lokalisiert werden (c, Pfeile). Markierung = 20 μm

Um erneut das Signal für SGLT1 in Gefrierschnitten zu testen, sollte dieser Versuch ebenfalls für ein SGLT1 Antikörper durchgeführt werden.

Da zum Zeitpunkt der Versuchsreihe kein SGLT1-spezifisches Peptid der Firma Abcam erworben werden konnte, wurde der Anbieter des Antikörpers gewechselt. Folglich wurden für alle Immunfluoreszenzfärbungen ein anti-human SGLT1 Antikörper der Firma Everest Biotech mit dazugehörigem Peptid verwendet.

Der Nachweis der spezifischen Färbung von SGLT1 und SGLT2 wurde somit durch Präinkubation der Antikörper mit einem Peptid durchgeführt. Hierbei wurden die Bindungsstellen der jeweiligen Antikörper durch das Peptid abgesättigt, wodurch spezifische Bindungen und somit die Detektion der SGLT-Proteine in den Gefrierschnitten blockiert wurde.

In Abbildung 18 und Abbildung 19 ist die Färbung der Natriumabhängigen Glukosetransporter, sowie die Blockierung der Immundetektion durch ein immunisiertes Peptid dargestellt.

Es ist zu erkennen, dass SGLT1 und SGLT2 im Endothel der Blutgefäße exprimiert werden (Abbildung a). Eine Kolo-kalisation mit dem vWF-Protein (Abbildung b) zeigt sich in den Abbildungen c als orangefarbene Struktur, zur besseren Erkennbarkeit sind diese mit Pfeilen markiert. Weiterhin kann demonstriert werden, dass das spezifische Signal sowohl für SGLT1, als auch für SGLT2 geblockt werden kann. Hierbei zeigt sich keine Färbung der Transporter (Abbildung d) und somit auch keine Überlagerung des vWF im Endothel (Abbildung f, Pfeile)

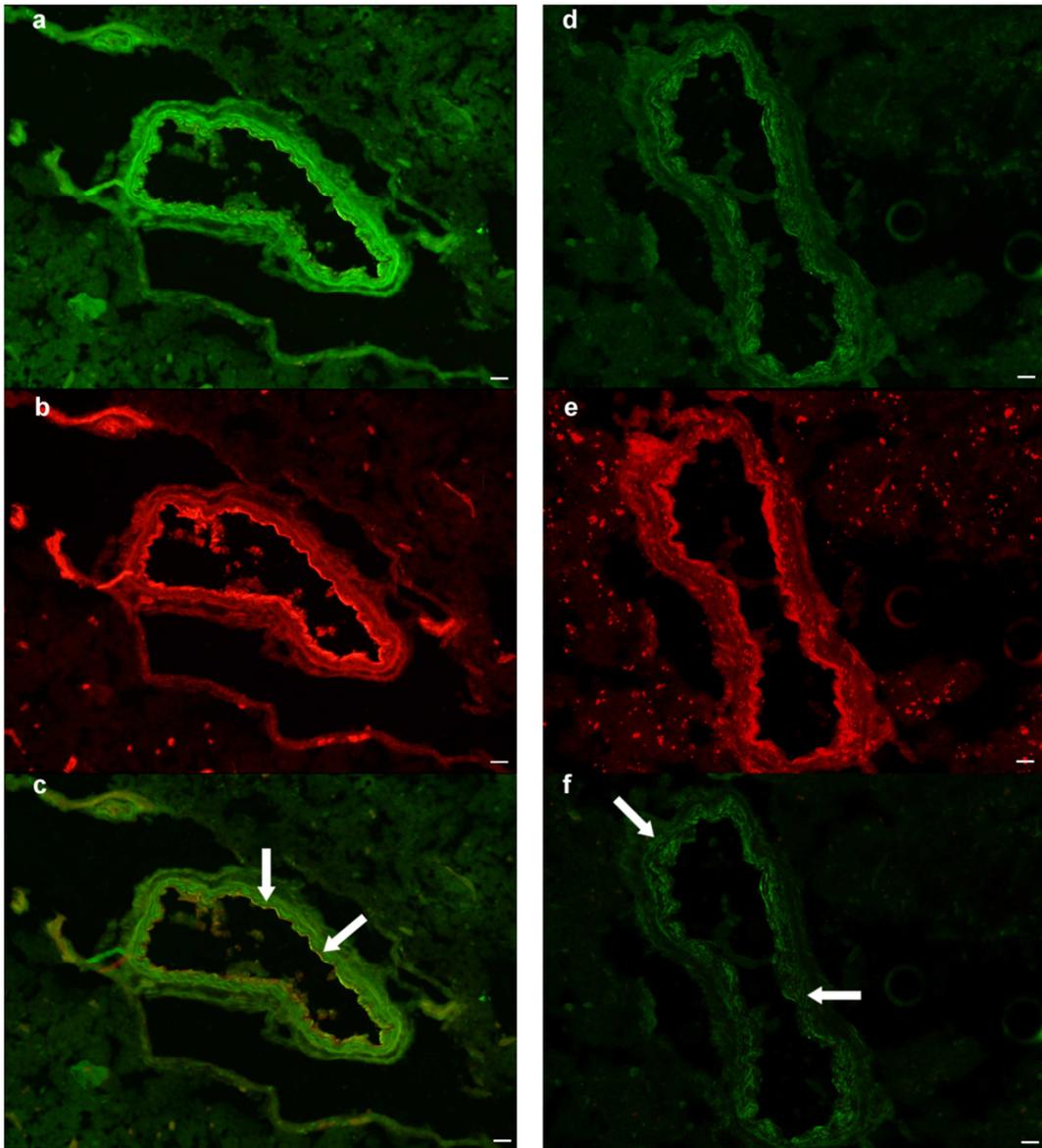


Abbildung 18: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von humanen Gehirn-Gefrierschnitten.
a-c) Doppelfärbung von SGLT1 (grün) und vWF (rot). Überlagerung der gefärbten Strukturen können als orangene Färbung lokalisiert werden (c, Pfeile).
d-e) Doppelfärbung von prä-inkubierten SGLT1-Antikörper mit spezifischem Peptid (grün) und vWF (rot). Es lassen sich keine überlagerten Strukturen erkennen (f, Pfeile). Markierung = 20 μ m

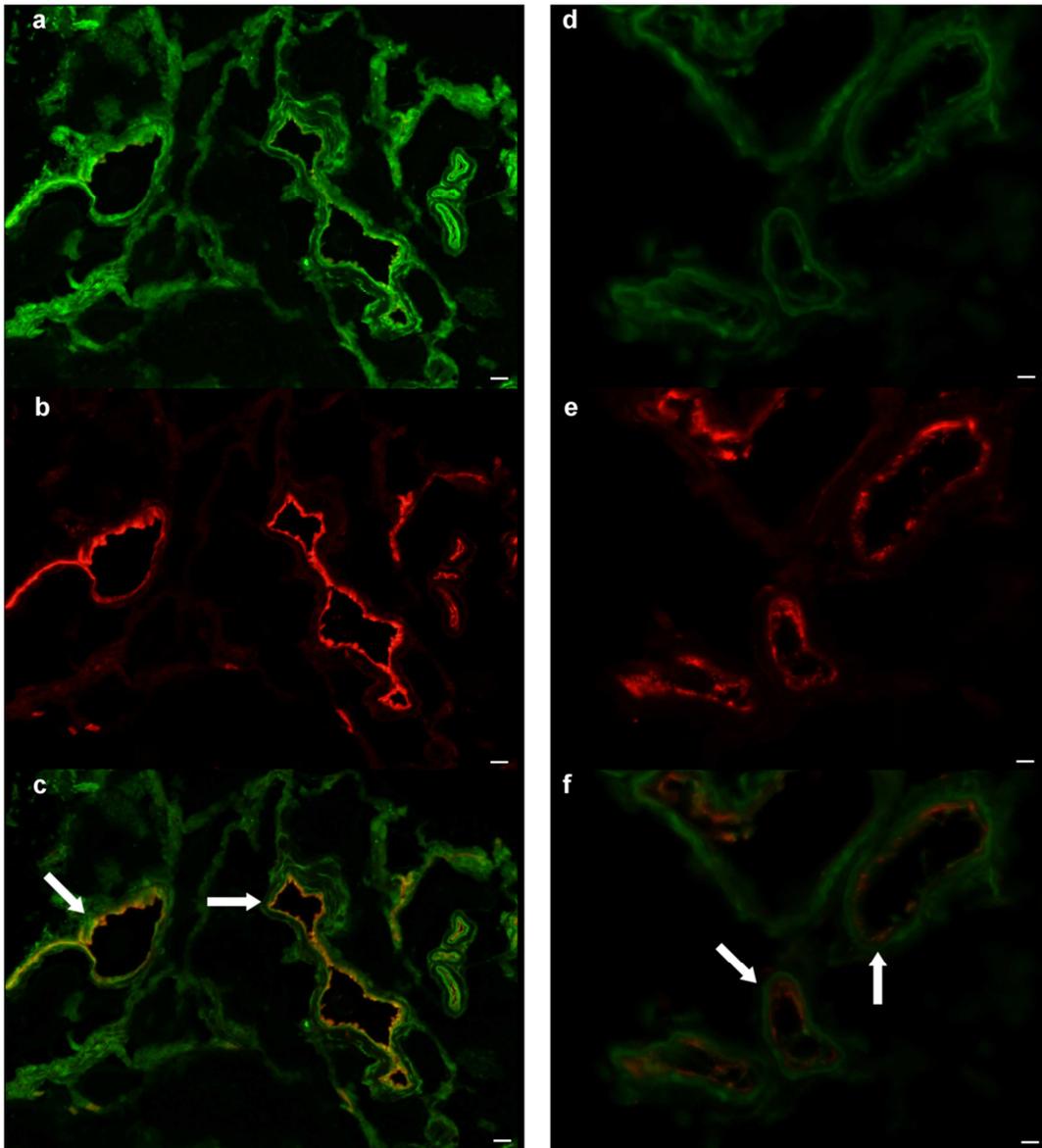


Abbildung 19: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von humanen Gehirn-Gefrierschnitten.
a-c) Doppelfärbung von SGLT2 (grün) und vWF (rot). Überlagerung der gefärbten Strukturen können als orangene Färbung lokalisiert werden (c, Pfeile).
d-e) Doppelfärbung von prä-inkubierten SGLT2-Antikörper mit spezifischem Peptid (grün) und vWF (rot). Es lassen sich keine überlagerten Strukturen erkennen (f, Pfeile). Markierung = 20 μ m

Ein großes Problem der Färbung von Gefrierschnitten ist jedoch eine hohe Hintergrundfluoreszenz des Hirngewebes, wodurch die spezifischen Signale nur begrenzt herausgefiltert werden konnten.

4.3.2. Isolierte Kapillaren des menschlichen Gehirns

Zur Reduzierung des Hintergrundsignals wurde die entscheidende Region der BHS isoliert, d. h. die KapillargefäÙe des Gehirns von anderen Zellstrukturen separiert und erneut immunhistologisch untersucht. Zur Verifizierung der erfolgreichen Isolation wurde eine Doppelfärbung mit einem vWF-Antikörper durchgeführt. Dieser bindet spezifisch an das BlutgefäÙendothel.

Es konnte gezeigt werden, dass Verunreinigung mit Strukturen wie Neuronen und Gliazellen minimiert wird und die spezifische Endothelstruktur der Kapillaren detailliert untersucht werden kann.

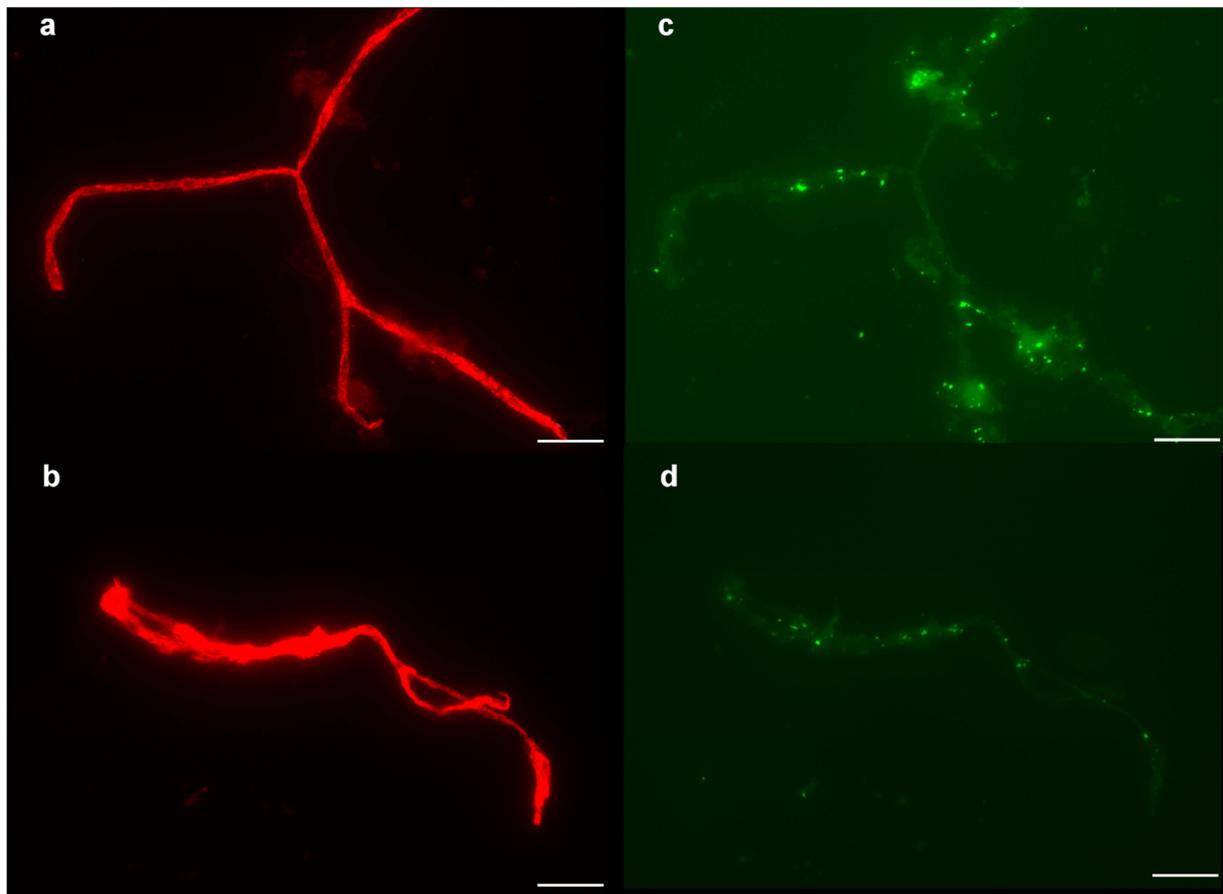


Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbung der isolierten Hirnkapillaren.
a, b) Färbung der Endothelstruktur mit einem von-Willebrand-Faktor (vWF) Antikörper. c, d) Detektion von unspezifischer Hintergrundfluoreszenz im grünen Filter. Markierung = 40 μm

Zu allererst wurden die isolierten Kapillaren mit dem vWF-Antikörper gefärbt um die erfolgreiche Isolation nachzuweisen (Abbildung 20). Da die Sekundärantikörper der Targets in allen Versuchen mit einem Alexa 488-Farbstoff gefärbt wurden, wurde dahingehend die Hintergrundfluoreszenz überprüft.

Es konnte nachgewiesen werden, dass das Endothel der Kapillare eine vernachlässigbare Eigenfluoreszenz aufweist.

Sowohl für GLUT1, als auch von SGLT1 und SGLT2 zeigt sich eine spezifische Färbung entlang dem Endothel der Kapillaren (Abbildung 21). Ergänzend wurden verschiedene Regionen des menschlichen Gehirns auf die Expression von SGLT1 und SGLT2 untersucht. Dies kann unter Abschnitt 4.3.2.2, S. 63, nachgelesen werden.

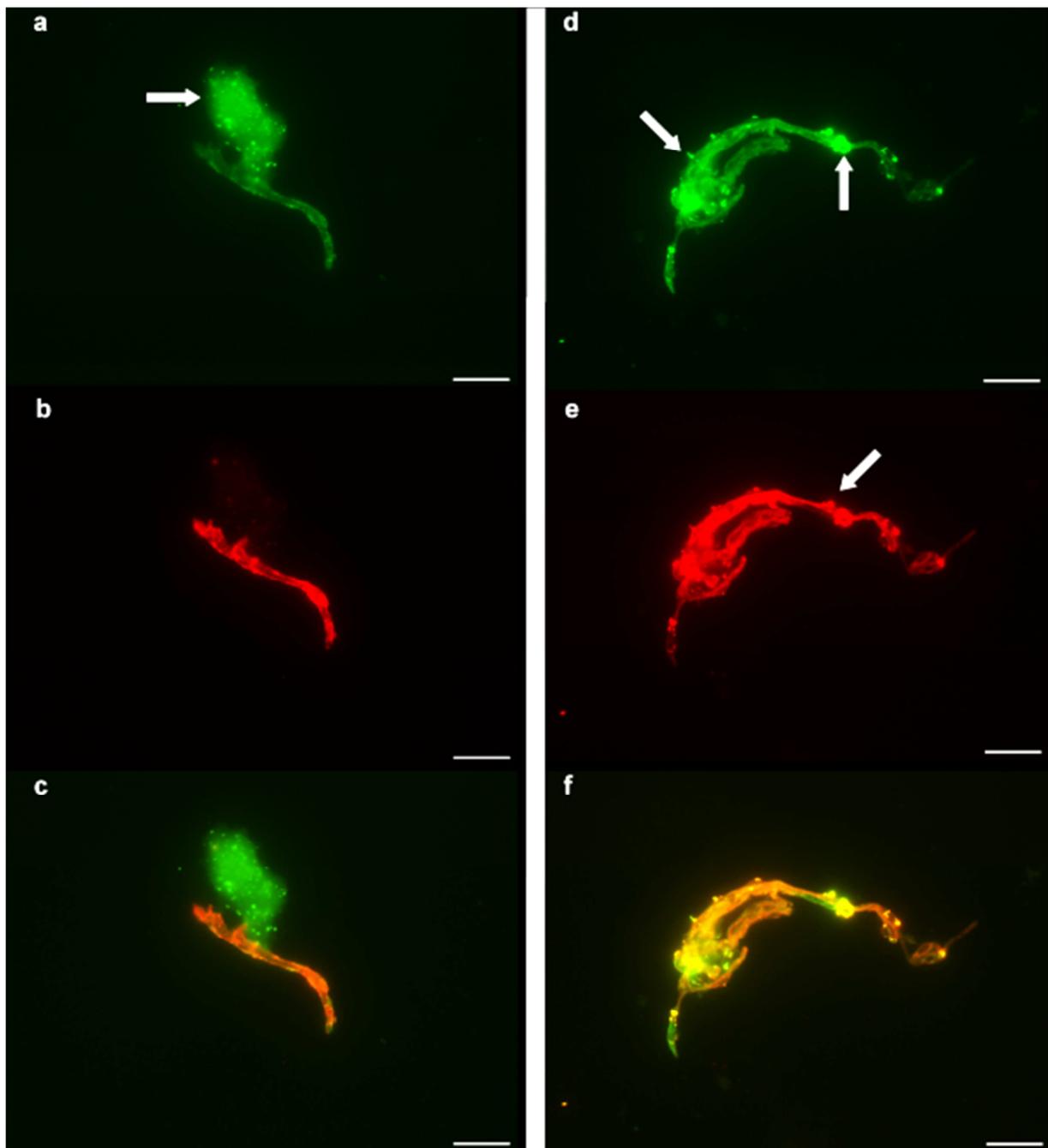


Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbung von GLUT1 (b, e) und SGLT1 (a) bzw. SGLT2 (d). Es zeigt sich eine großflächige Überlagerung von GLUT1 und SGLT1 (c) bzw. SGLT2 (f). Endothel-unspezifische Färbung ist mit Pfeilen markiert. Markierung =40µm

4.3.2.1. Lokalisation von Verunreinigungen durch Gliazell-Endfüßen

In Abbildung 21 kann man weiterhin erkennen, dass sowohl für GLUT1, als auch für SGLT1 und SGLT2 endothel-unspezifische Strukturen detektiert wurden (Pfeile). Diese erinnern an Reste unseparierter Astroglia, genauer gesagt den Endfüßen dieser Zellen. Die Endfüße sind um das Endothel der Hirnkapillare befestigt und somit nur schwer davon zu trennen.

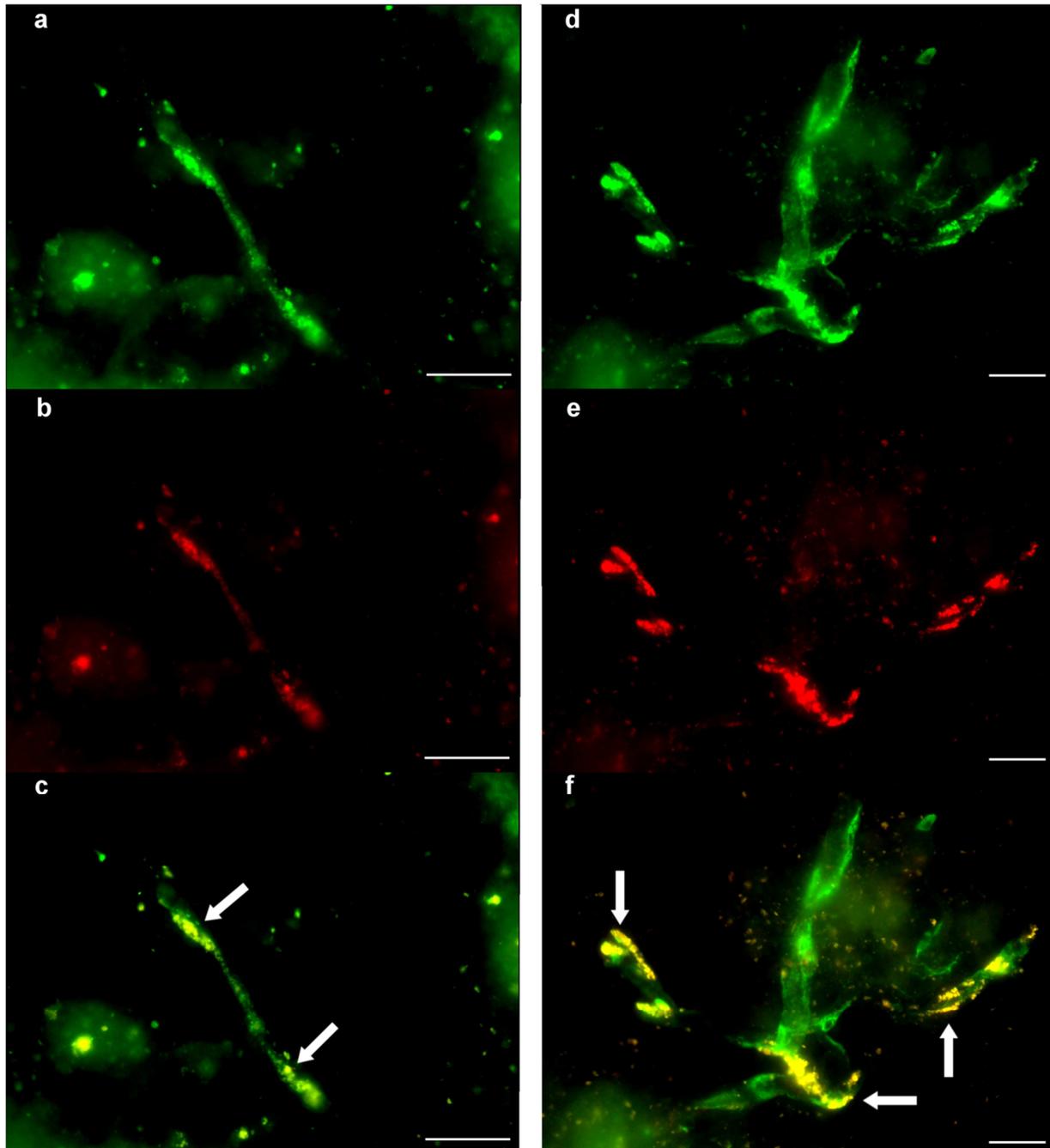


Abbildung 22: Kolokalisation von SGLT1 / SGLT2 und GFAP (Gliazellmarker).
 a) Färbung von SGLT1, d) Färbung von SGLT2; b / e) Färbung mit GFAP; c / f) Überlagerung von SGLT1 bzw. SGLT2 und GFAP. Kolokalisation ist gelb dargestellt und mit Pfeilen markiert. Markierung =40µm

Der verwendete Antikörper zur Detektion der Gliazell-Endfüße ist gegen das saure Gliafaserprotein (GFAP) gerichtet und bindet somit spezifisch an das Intermediärfilament der Gliazellen. Es ist in Abbildung 22 ist zu erkennen, dass den Kapillaren weiterhin Reste der Gliazell-Endfüße anhaften. Punktuelle Färbungen entlang des Kapillarendothels sind somit nicht spezifisch für den Natrium-abhängigen Glukosetransport an der BHS, sondern dienen der Versorgung der Astroglia.

4.3.2.2. Lokalisation von SGLT1 und SGLT2 in unterschiedlichen Hirnregionen

Da die Lokalisation von SGLT1 und SGLT2 an der BHS bisher nicht genauer definiert wurde, sollen unterschiedliche Hirnregionen deren Expressionsverteilung zeigen. Aus diesem Grund wurden vier Regionen ausgewählt, aus denen Kapillaren isoliert und mittels anti-human SGLT1 bzw. SGLT2 Antikörpern angefärbt wurden. Als Regionen wurden die graue und weiße Substanz des Großhirns, sowie das Kleinhirn und der Pons einer Kontrollprobe (Person nach plötzlichem Herztod) ausgewählt.

Abbildung 23 zeigt die Expression von SGLT1. Hierbei ist zu erkennen, dass in den Regionen des Großhirns (I, II) eine Lokalisation von SGLT1 erfolgen kann. Dahingehend ist dessen Expression im Kleinhirn (III) und im Pons (IV) nicht bzw. nur schwach nachweisbar.

Bei der Detektion von SGLT2 zeigt sich ein anders Expressionsmuster (Abbildung 24). Hier kann eine Lokalisation ebenfalls in der weißen Substanz (I) dargestellt werden, sowie eine schwache Expression im Pons (IV). Andererseits fehlt SGLT2 in der grauen Substanz (II). Im Kleinhirn (III) zeigt sich für SGLT2, wie in der weißen Substanz, die stärkste Expression.

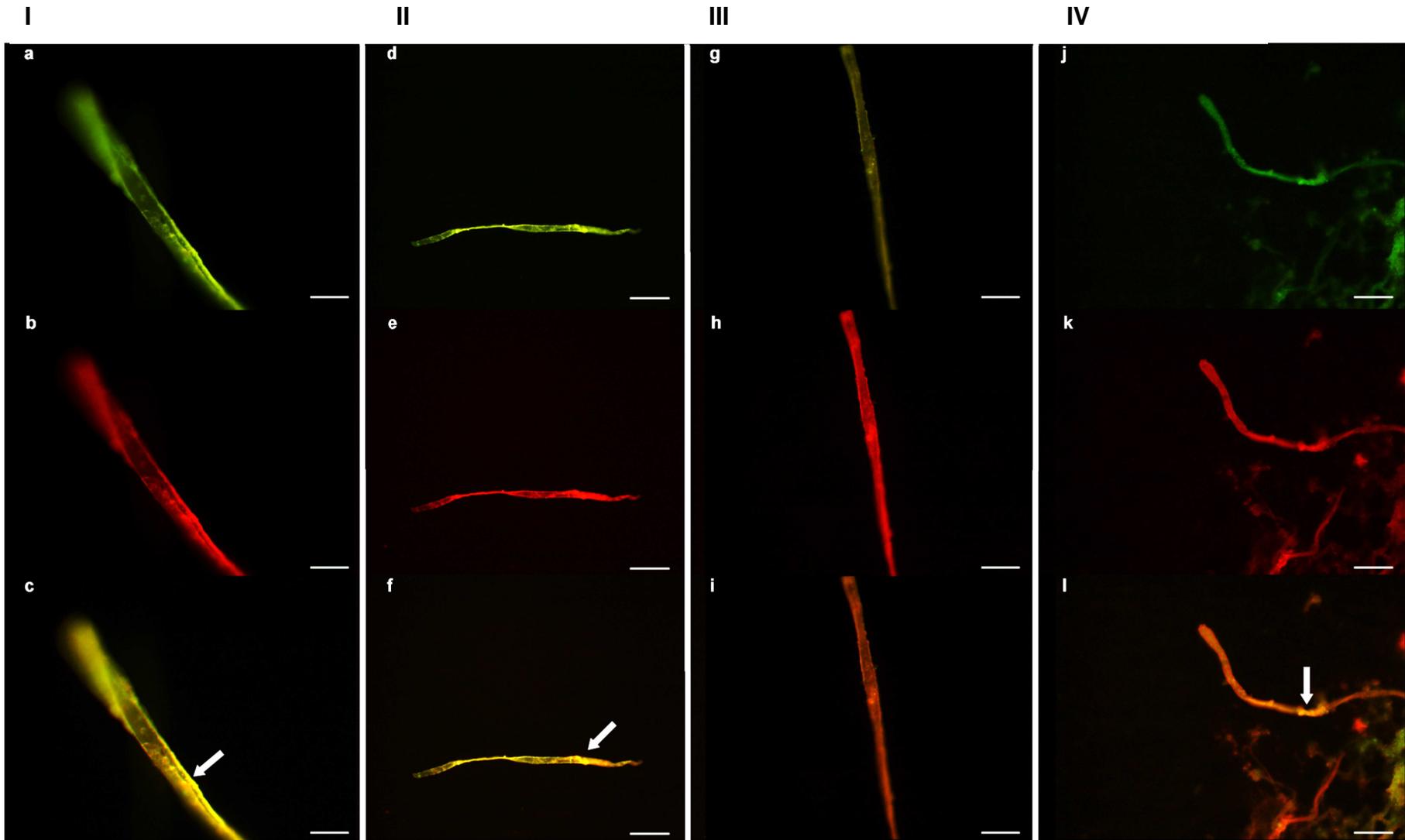


Abbildung 23: Lokalisation von SGLT1 in unterschiedlichen Bereichen des menschlichen Gehirns.
 I) Weiße Substanz, II) Graue Substanz, III) Kleinhirn, IV) Pons. Grüne Fluoreszenz zeigt SGLT1, rote Fluoreszenz zeigt vWF. Überlagerungen (c, f, i, l) zeigt die Kolo-kalisation von SGLT1 und vWF (Pfeile). Probe G1_15, Markierung = 40 μ m

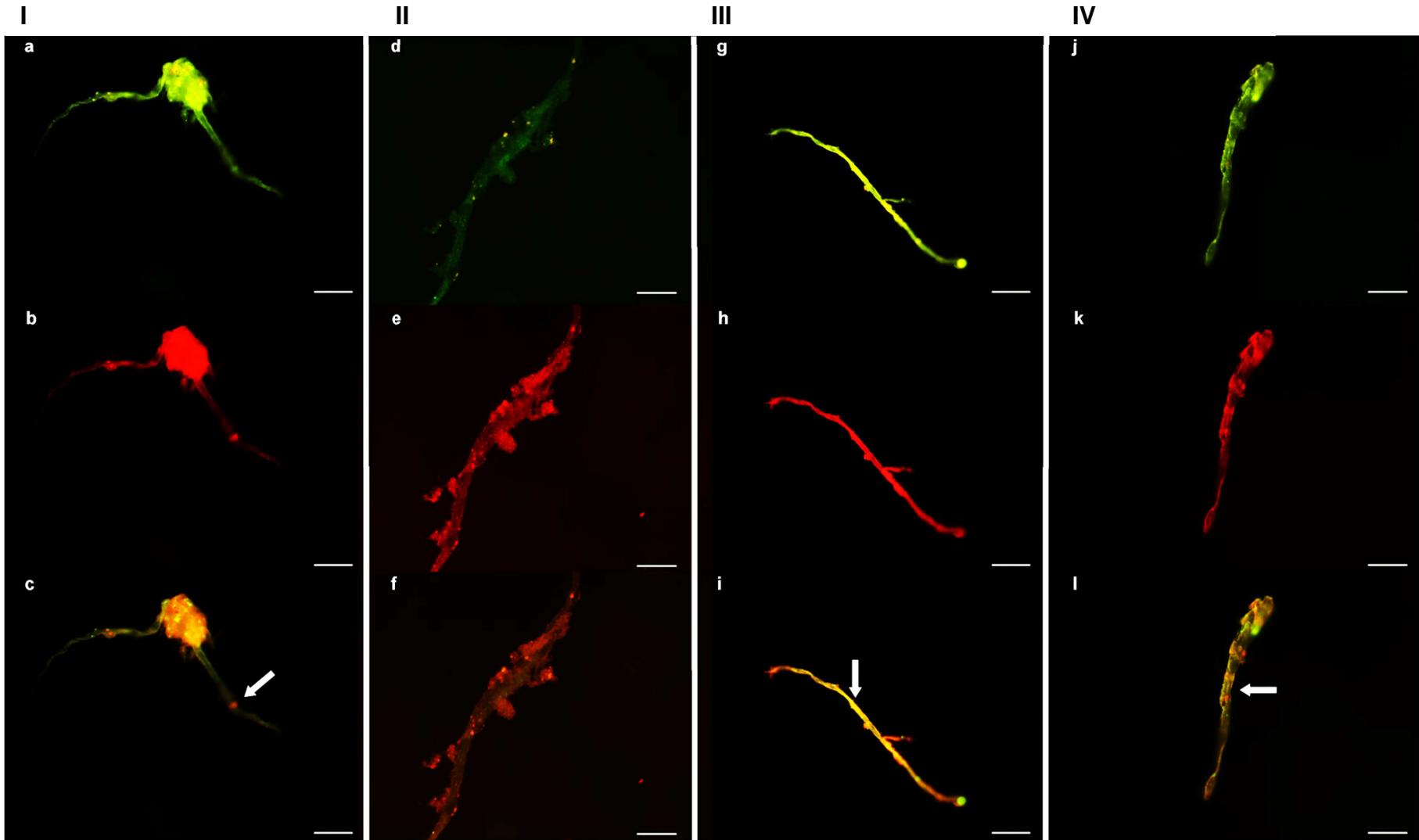


Abbildung 24: Lokalisation von SGLT2 in unterschiedlichen Bereichen des menschlichen Gehirns.

I) Weiße Substanz, II) Graue Substanz, III) Kleinhirn, IV) Pons. Grüne Fluoreszenz zeigt SGLT2, rote Fluoreszenz zeigt vWF. Überlagerungen (c, f, i, l) zeigt die Kolokalisation von SGLT2 und vWF (Pfeile). Probe T6_15 Markierung = 40 μ m

4.4. mRNA-Expression von Glukosetransportern im menschlichen Gehirn

4.4.1. Expression nach globalem Sauerstoffmangel

Die mRNA-Expression im menschlichen Gehirn nach einem globalen Sauerstoffmangel wurde mit Hilfe spezifischer Sonden (siehe Tabelle 7) und dem qPCR Kit „Absolute QPCR ROX Mix“ (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Dabei fungiert die Niere als Kontrollgewebe, alle weiteren Proben wurden anhand dieser kalibriert.

Neben Proben mit globaler Hirnschädigung (Strangulation) wurden ebenfalls Proben von Verstorbenen nach einer Intoxikation und Erfrieren (Hypothermie) verwendet, da diese eine ähnliche Wirkung auf die Versorgung des Gehirns ausüben (Atemlähmung, Blockierung der Zellatmung, Abnahme der Blutversorgung durch Schwächung des Herz-Kreislaufsystems).

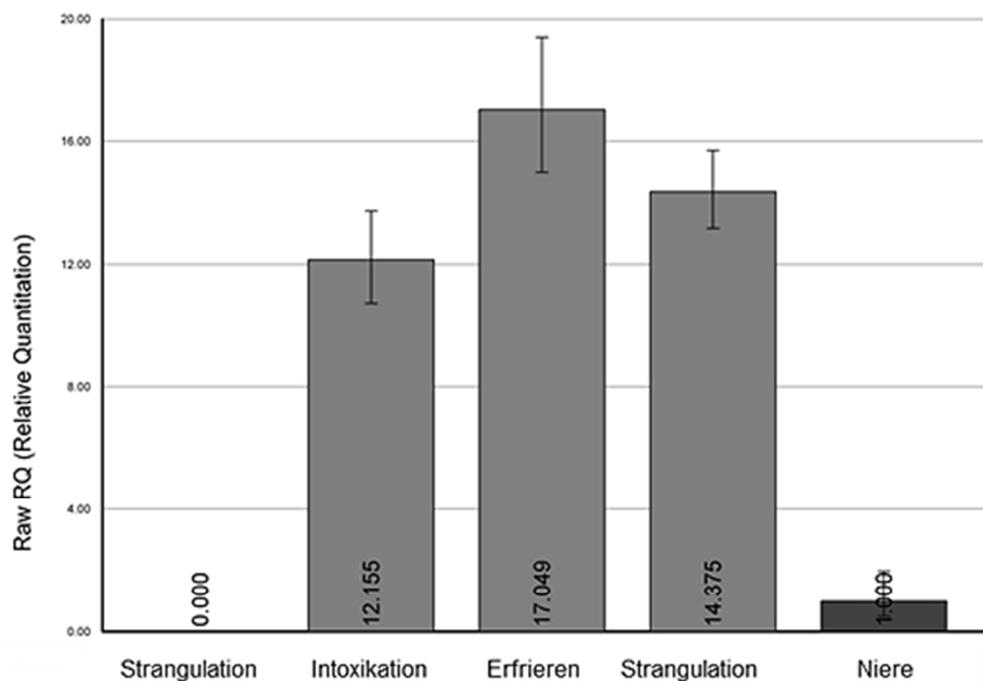


Abbildung 25: qPCR von GLUT1 spezifischen Sonden im menschlichen Gehirn nach globalem Sauerstoffmangel. β -Aktin dient als endogene Kontrolle. Alle Proben wurden auf die Expression in der Niere normalisiert.

Die qPCR mit einer spezifischen GLUT1 Sonde erbrachte gute Resultate. Hier erkennt man in allen Hirngeweben eine starke Expression (Abbildung 25). Einzig in einer Strangulations-Probe kann kein GLUT1 nachgewiesen werden. Die stärkste Expression lässt sich in Hirngewebe nach einer Hypothermie darstellen.

Die Ergebnisse für den Natrium-abhängigen Glukosetransporter SGLT1 zeigen dahingegen eine geringe Expression in Hirngewebe (Abbildung 26). Es kann hier ebenfalls kein identisches Expressionsmuster für Verstorbene nach Strangulation aufgezeigt werden.

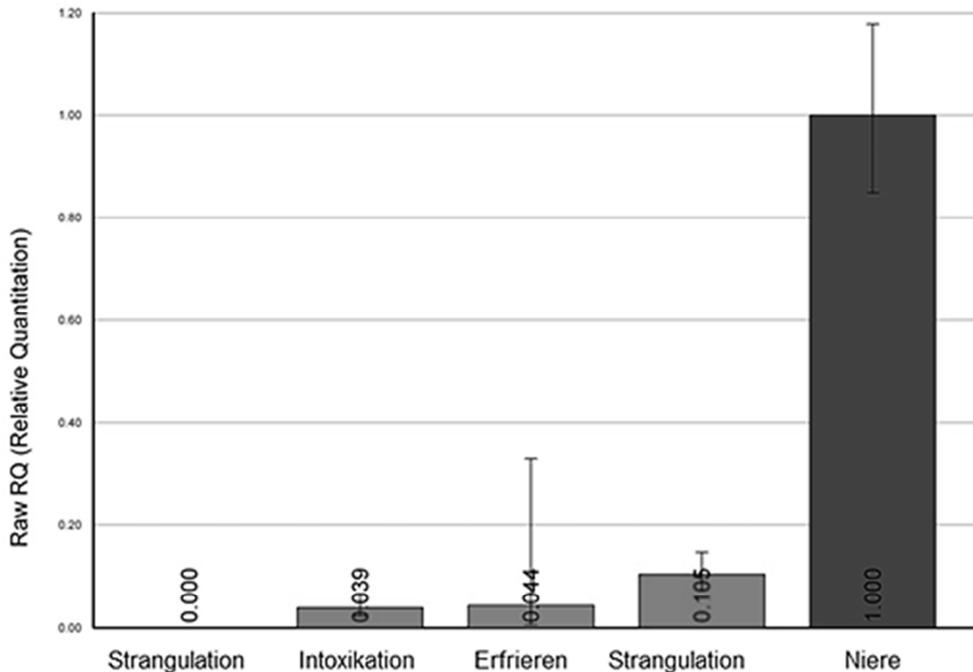


Abbildung 26: qPCR von SGLT1 spezifischen Sonden im menschlichen Gehirn nach globalem Sauerstoffmangel. β -Aktin dient als endogene Kontrolle. Alle Proben wurden auf die Expression in der Niere normalisiert.

Ein Trend für die mRNA-Expression von GLUT1 und SGLT1 in Hirngewebe nach unterschiedlichen Todesarten mit globaler Hirnschädigung lässt sich somit nicht feststellen.

Eine Analyse der SGLT2 mRNA zeigt keine auswertbaren Ergebnisse für humane Gehirnproben. Hier lässt sich einzig in der Nierenprobe SGLT2 gut nachweisen (Abbildung 27). Die Detektion in Hirngewebeproben zeigt Signale im Bereich der Nachweisgrenze, welche ebenfalls erst bei einer Zykluszahl von > 35 Zyklen in der qPCR signifikant vervielfältigt werden.

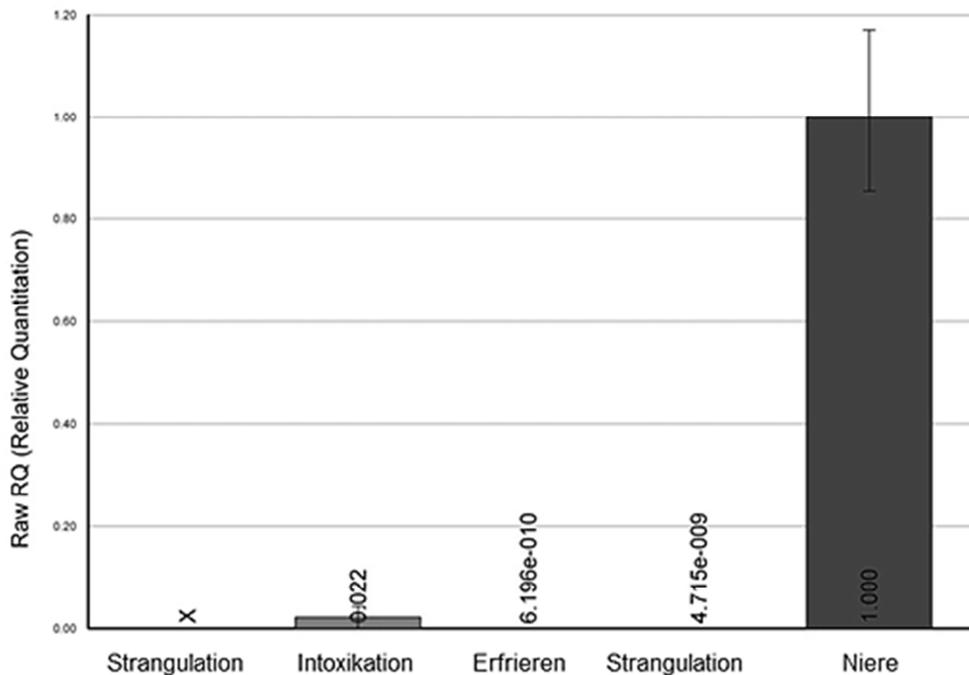


Abbildung 27: qPCR von SGLT2 spezifischen Sonden im menschlichen Gehirn nach globalem Sauerstoffmangel. β -Aktin dient als endogene Kontrolle. Alle Proben wurden auf die Expression in der Niere normalisiert.

Aufgrund der unzureichenden Ergebnisse für SGLT1 und SGLT2 wurde auf weitere Experimente mit kommerziellen Sonden verzichtet. Die Expression von GLUT1 ist längst bekannt, aus diesem Grund wurde sich für qPCR Versuche mit Primern auf die Natrium-abhängigen Glukosetransporter und deren Lokalisierung im menschlichen Gehirn fokussiert.

4.4.2. mRNA-Expression in unterschiedlichen Hirnregionen

Die im vorhergehenden Abschnitt 4.4.1 gezeigten Signale wurden mittels spezifischen Sonden (siehe Tabelle 7) und dem qPCR Kit „Absolute QPCR ROX Mix“ (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Diese Methode ergab, im Gegensatz zu der Analyse des Glukosetransporters GLUT1, keine auswertbaren Ergebnisse für die Natrium-abhängigen Glukosetransporter SGLT1 und SGLT2. Auch eine vorhergehende Prä-Amplifikation der cDNA mit Hilfe des TaqMan PreAmp MasterMix erzielte keine besseren Erfolge.

Aus diesem Grund wurde für diese zwei Transporter die Methode verändert und die qPCR mit selbst designten Primern (siehe Tabelle 8) und dem qPCR Kit „PowerUp Sybr Green Master Mix“ (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt.

Ergebnisse

Der Ansatz für den Master Mix und das qPCR-Programm sind der Tabelle 15 und Tabelle 16 zu entnehmen.

Zur Kontrolle der Amplifikate wurde eine Schmelzkurve an die qPCR angeschlossen (siehe Tabelle 17). Diese zeigt eine einheitliche Kurve, sodass von einem einzigen PCR-Produkt auszugehen ist (Abbildung 28).

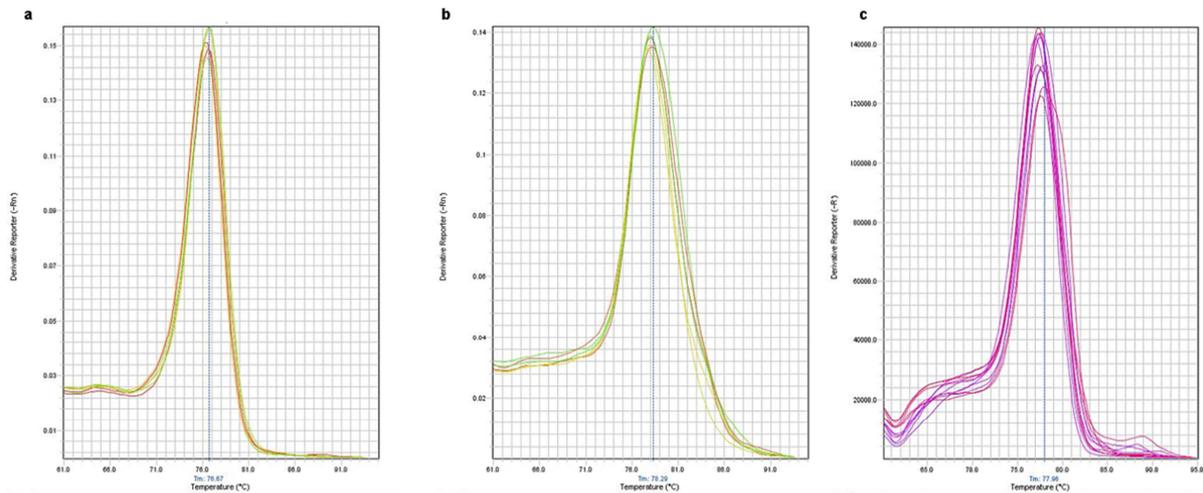


Abbildung 28: qPCR Schmelzkurve der verwendeten Primerpaare.
a) SGLT1 Primerpaar; b) SGLT2 Primerpaar; c) β -Aktin Primerpaar

Als endogene Kontrolle dient das Haushaltsgen β -Aktin. Die Primer wurden hierfür aus der Literatur entnommen, um deren Spezifität sicherzustellen. Ein Test der β -Aktin-Amplifikate zeigte ebenfalls eine reine Schmelzkurve (Abbildung 28, c).

Es wurden mRNA-Proben von unterschiedlichen Regionen des menschlichen Gesamthirns nach globalem und lokalem Trauma, sowie isolierten Hirnkapillaren eines Verstorbenen mit traumatisiertem Hirngewebe auf die Expression von SGLT1 und SGLT2 mRNA untersucht.

In Abbildung 29 und Abbildung 30 ist die Expression von SGLT1 und SGLT2 in menschlichem Hirngewebe nach globaler Schädigung aufgezeigt.

Ergebnisse

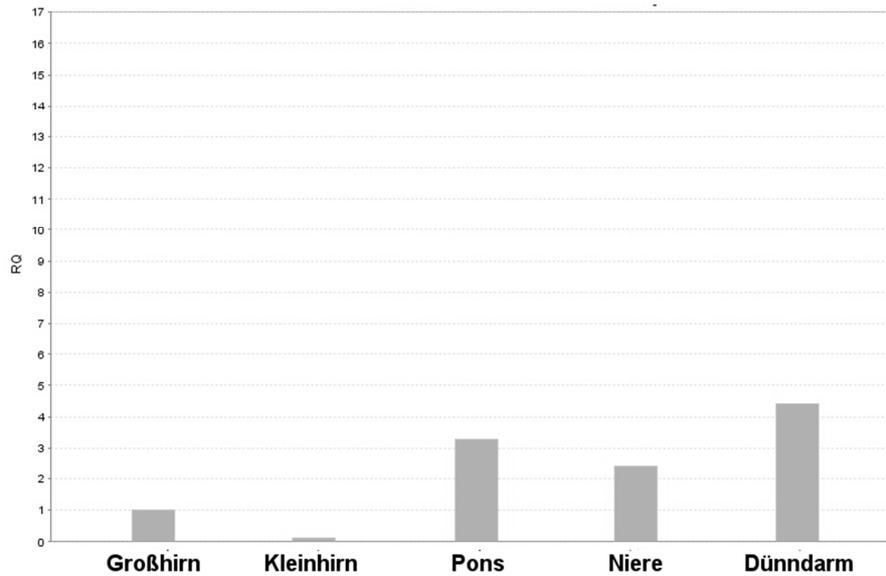


Abbildung 29: SGLT1 mRNA-Expression in humanem Gehirngewebe nach globalem Trauma. qPCR mit SGLT1 spezifischen Primern, β -Aktin dient als endogene Kontrolle. Alle Proben wurden auf die Expression im Gesamthirn normalisiert.

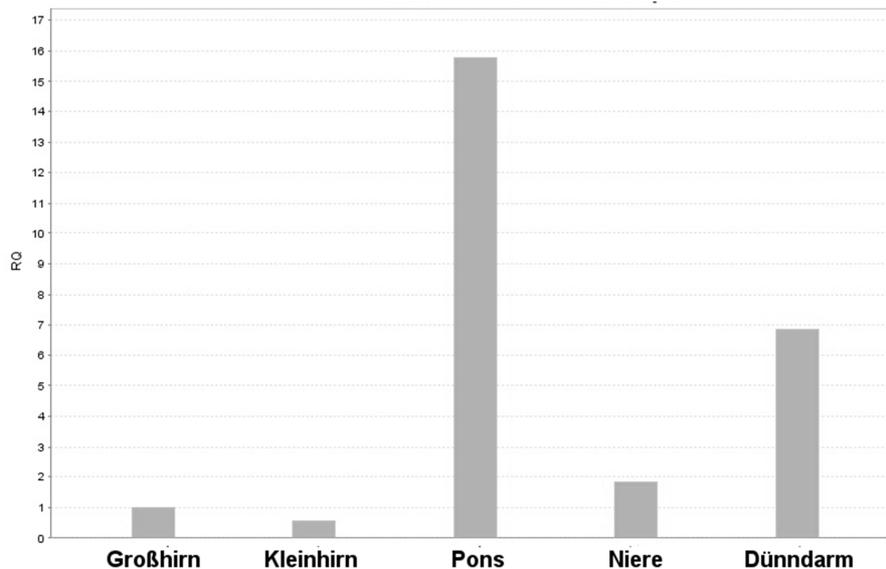


Abbildung 30: SGLT2 mRNA-Expression in humanem Gehirngewebe nach globalem Trauma. qPCR mit SGLT2 spezifischen Primern, β -Aktin dient als endogene Kontrolle. Alle Proben wurden auf die Expression im Gesamthirn normalisiert.

Anhand der Wiederholung der qPCR mit spezifischen Primern kann die Detektion der SGLT1 und SGLT2 mRNA-Expression verbessert werden. Man kann für beide Transporter die stärkste Expression in der Region des Pons erkennen. SGLT1 lässt sich ebenfalls stark im Großhirn und im Kleinhirn lokalisieren, während SGLT2 nur schwach in diesen beiden Regionen vorkommt. In den Kontrollen der Niere und des Dünndarms können wiederum beide Transporter detektiert werden, wobei die Niere für beide schwächer dargestellt ist.

Ergebnisse

Die Verbesserung der Detektion sollte im Folgenden ebenfalls für Hirngewebe nach lokaler Schädigung demonstriert werden. Weiterhin soll der Expressionsunterschied im Gesamthirngewebe und an der Hauptkomponente der Blut-Hirn-Schranke, den isolierten Kapillaren, dargestellt werden.

In Abbildung 31 lässt sich erkennen, dass die SGLT1 mRNA-Konzentration in Kapillaren durchschnittlich höher ist als in Gesamthirnproben ist. Dabei zeigt das Kleinhirn für beide Probenvarianten die höchste mRNA-Konzentration. Das Traumagewebe (Contusional, cs) zeigt eine stark erniedrigte Expression gegenüber dem gesunden Großhirngewebe (Contralateral, cl) in den Kapillaren. Im Gesamthirn ist dieses Ergebnis umgekehrt.

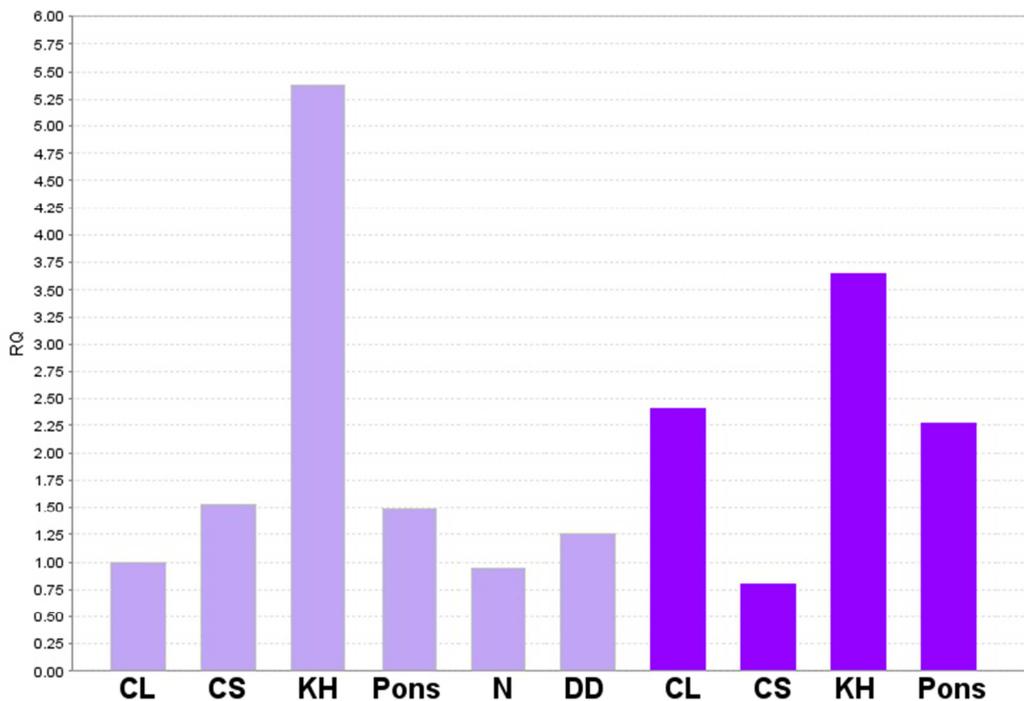


Abbildung 31: SGLT1 mRNA-Expression in humanem Gehirngewebe nach lokalem Trauma. (Helllila - Gesamthirn, Dunkellila - Kapillare); qPCR mit SGLT1 spezifischen Primern, β -Aktin dient als endogene Kontrolle
cl – Contralateral, cs – Contusional. KH – Kleinhirn, N – Niere, DD – Dünndarm
Alle Proben wurden auf die Expression im Gesamthirn cl normalisiert.

In Abbildung 32 ist die SGLT2 mRNA-Expression abgebildet. Die Proben wurden hierbei ebenfalls auf die Expression des Gesamthirns normalisiert. Es zeigt sich, dass die Kapillaren durchschnittlich eine niedrigere mRNA-Expression aufweisen. Übereinstimmend mit SGLT1 ist die stärkste Expression im Kleinhirn vorhanden, wobei auch der Pons eine hohe Expressionsstärke im Gesamthirnlysate und den Kapillaren aufweist. Auch im gesunden Großhirngewebe (cl) wird SGLT2 deutlich exprimiert. Die Traumaregion (cs) unterscheidet sich wiederum zwischen Gesamthirn und Kapillare, jedoch ist in beiden Fällen eine erniedrigte Expression im Vergleich zum gesunden Bereich detektierbar.

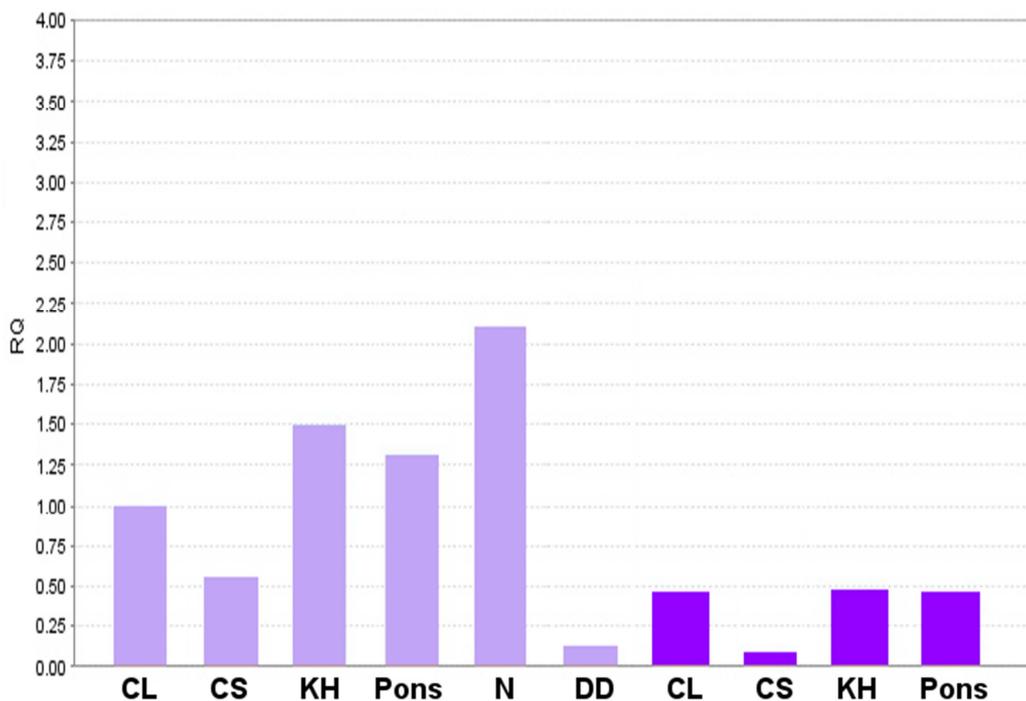


Abbildung 32: SGLT2 mRNA-Expression in humanem Gehirngewebe nach lokalem Trauma. (Helllila - Gesamthirn, Dunkellila - Kapillare); qPCR mit SGLT1 spezifischen Primern, β -Aktin dient als endogene Kontrolle. cl – Contralateral, cs – Contusional. KH – Kleinhirn, N – Niere, DD – Dünndarm
Alle Proben wurden auf die Expression im Gesamthirn cl normalisiert.

Allgemein lässt sich feststellen, dass SGLT2 eine schwächere mRNA-Expression als SGLT1 im Gehirn von Verstorbenen nach lokaler Hirnschädigung aufweist. Auch bei Verstorbenen nach globaler Hirnschädigung ist dieses Phänomen zu erkennen. Jedoch unterscheidet sich hier die Expression im Pons von SGLT2 gravierend gegenüber der SGLT1 mRNA-Expression.

4.5. Proteinexpression von Glukosetransportern im menschlichen Gehirn

4.5.1. Expression nach globalem Sauerstoffmangel

Todesursachen wie Ersticken, Strangulation und Ertrinken haben durch den entstehenden Sauerstoffmangel primär Hypoxieschäden des Gehirns zur Folge. Die Überlebenszeit beträgt hierbei meist nur wenige Minuten, das Hirngewebe hat somit nur eine kurze Zeitspanne zu reagieren. Diese Todesursachen sind ein interessanter Anhaltspunkt zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Sekundärmechanismen im Gehirn im Minutenbereich. Der Sauerstoffmangel betrifft hierbei das ganze Gehirn (global) und ist nicht auf einzelne Regionen beschränkt (lokal), eine Kontrollregion ist somit für einzelne Proben nicht vorhanden. Aus diesem Grund dient als Kontrollgruppe eine Hirnprobe von relativ unbeeinflussten Patienten, mit Todesursachen wie z. B. Myokardinfarkt.

Für die Untersuchung der Expression von SGLT1, SGLT2 und GLUT1 nach einem globalen Sauerstoffmangel wurden Hirnproben von fünf Verstorbenen nach Strangulation (PMI 1 – 3 d) und drei Verstorbenen nach Ersticken (PMI 4d) untersucht in den Western Blot eingesetzt. Als Kontrolle diente das Gehirn- und Nierengewebe von Verstorbenen nach plötzlichem Herztod. Hierbei wurde die Expression anhand des physiologischen Hirngewebes normalisiert, diese beträgt somit für alle getesteten Targets den Wert von 1.

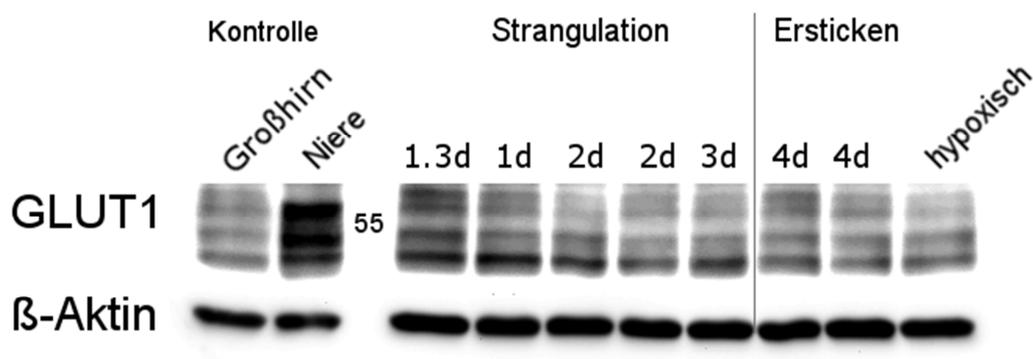


Abbildung 33: Western Blot zur Detektion von GLUT1 in humanem Gehirngewebe nach globalem Sauerstoffmangel. Physiologisches Hirn- und Nierengewebe dient als Kontrolle, als Ladekontrolle dient das Haushaltsgen β-Aktin. Die PMI ist bei gleichen Todesursachen zusätzlich in Tagen angegeben, Marker wird in kDa angegeben

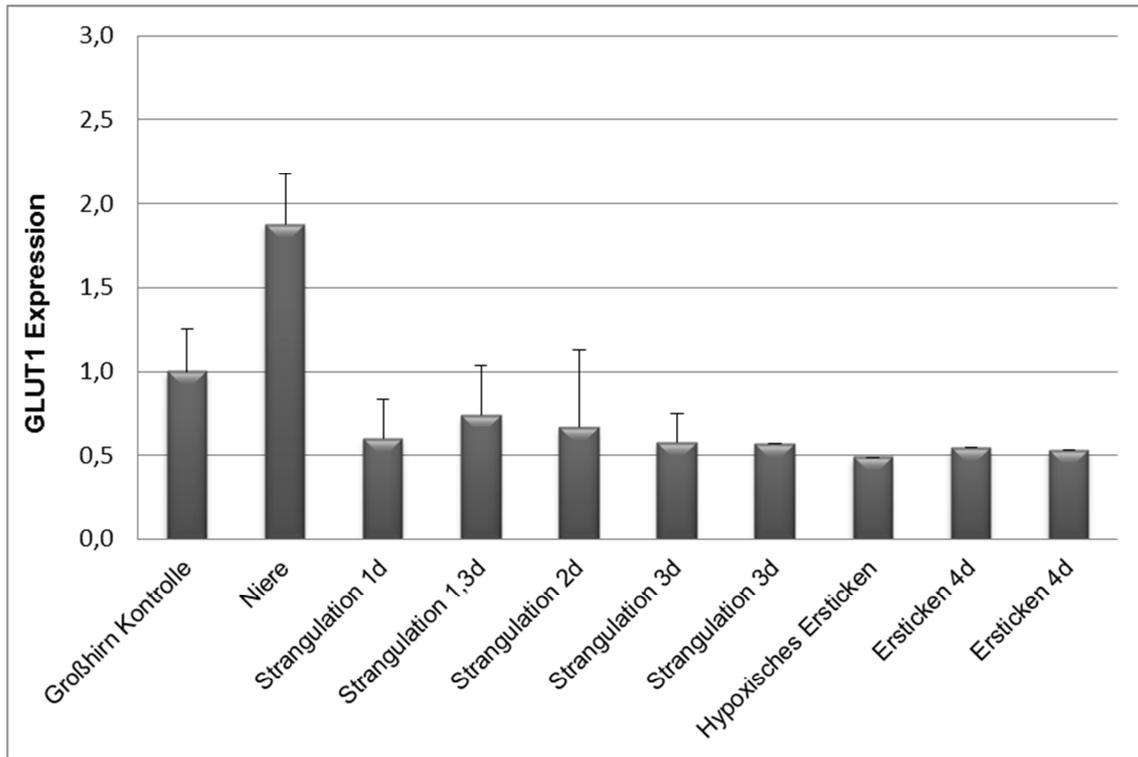


Abbildung 34: GLUT1 Proteinexpression im menschlichen Gehirn nach Sauerstoffmangel. Die PMI ist bei gleichen Todesursachen zusätzlich in Tagen angegeben. Großhirn- und Nierenproben von Myokardinfarkt-Fällen dienen als physiologische Kontrolle. Die Proteinexpression ergibt sich aus der Division der erhaltenen IDV-Werte von GLUT1 und dem Haushaltsgen β -Aktin.

In Abbildung 34 lässt sich erkennen, dass GLUT1 im Kontrollgewebe der Niere wie erwartet am stärksten exprimiert wird. Die Detektion von GLUT1 im Western Blot (Abbildung 33) gestaltet sich allgemein als schwierig, es lässt sich jedoch für alle Proben eine eindeutige Bande bei ca. 45 kDa erkennen.

Weiterhin ist zu erkennen, dass GLUT1 die stärkste Expression in dem physiologischen Gewebe aufweist. Es lagen fünf Proben von Strangulationsopfern vor, welche eine PMI von 1 d bis 3 d vorwiesen. Hierbei lässt sich erkennen, dass die Expression von GLUT1 in Abhängigkeit von der PMI leicht absinkt. Einzig bei einer PMI von 1 d ist die Probe leicht erniedrigt. Ein merklicher Unterschied zwischen den Erstickungsproben (PMI 4d) und Strangulationsproben ab einer PMI von 3d kann nicht erkannt werden.

Ergebnisse

Bei der Expressionsanalyse von SGLT1 (Abbildung 35, Abbildung 36) und SLT2 (Abbildung 37, Abbildung 38) lässt sich dagegen die stärkste Expression nicht in dem Kontrollgewebe darstellen. Es lässt sich hier kein Trend erkennen, jedoch nimmt die Expressionsstärke für beide Transporter mit fortschreitender PMI (≥ 2 d) im Durchschnitt leicht ab.

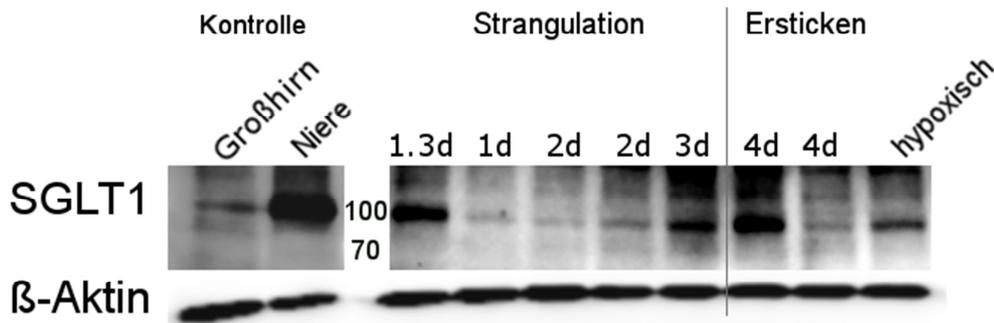


Abbildung 35: Western Blot zur Detektion von SGLT1 in humanem Gehirngewebe nach globalem Sauerstoffmangel. Physiologisches Hirn- und Nierengewebe dient als Kontrolle, als Ladekontrolle dient das Haushaltsgen β -Aktin. Die PMI ist bei gleichen Todesursachen zusätzlich in Tagen angegeben, Marker wird in kDa angegeben

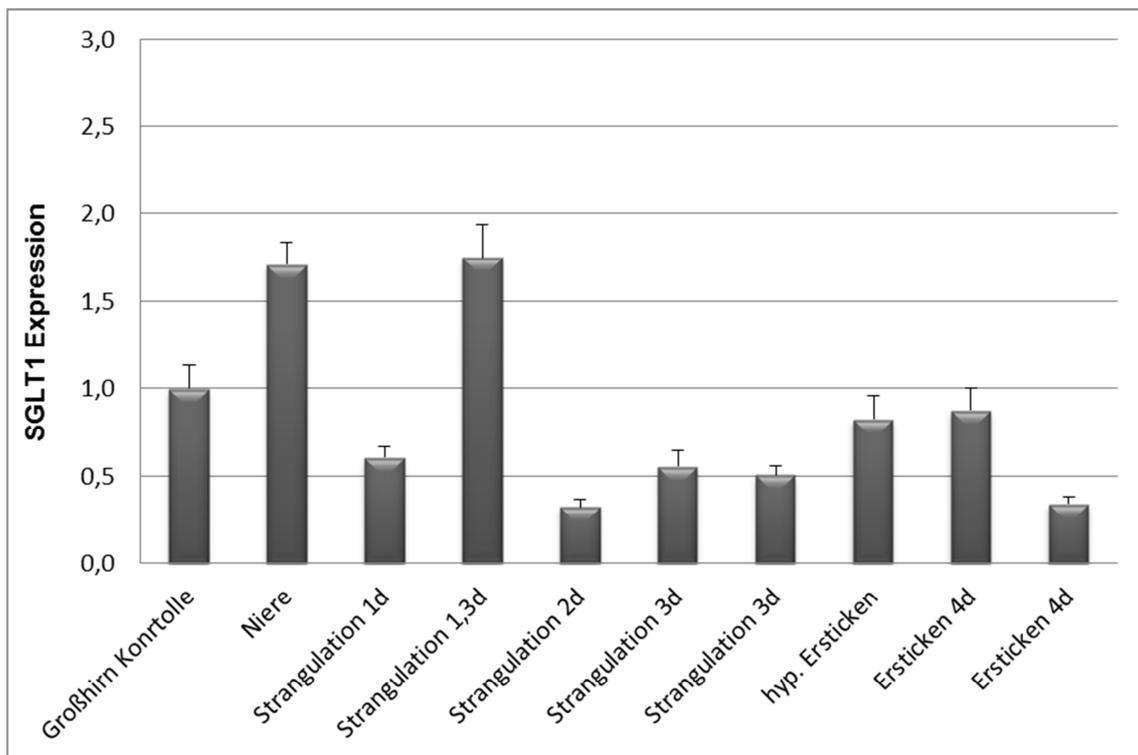


Abbildung 36: SGLT1 Proteinexpression im menschlichen Gehirn nach Sauerstoffmangel. Die PMI ist bei gleichen Todesursachen zusätzlich in Tagen angegeben. Großhirn- und Nierenproben von Myokardinfarkt-Fällen dienen als physiologische Kontrolle. Die Proteinexpression ergibt sich aus der Division der erhaltenen IDV-Werte von SGLT1 und dem Haushaltsgen β -Aktin.

Ergebnisse

Ein Unterschied zwischen SGLT1 und SGLT2 liegt in dem Molekulargewicht der detektierten Proteine. Während SGLT1 bei 100 kDa nachgewiesen werden kann, liegt der Transporter SGLT2 bei ca. 70 kDa. Für die Niere ergibt sich bei beiden Transmembranproteinen ein Molekulargewicht von 100 kDa.

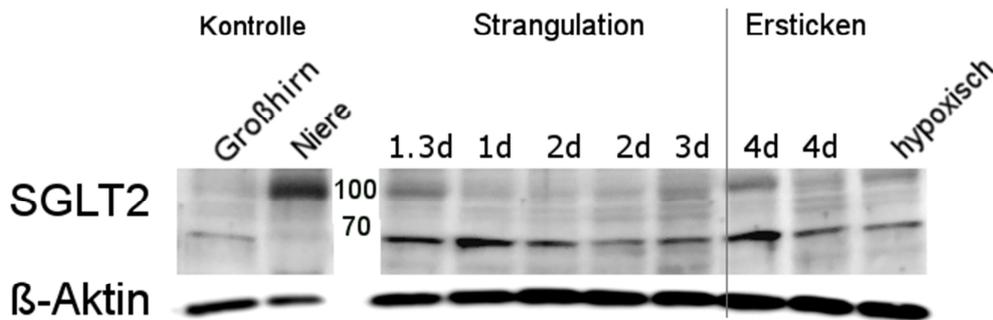


Abbildung 37: Western Blot zur Detektion von SGLT2 in humanem Gehirngewebe nach globalem Sauerstoffmangel. Physiologisches Hirn- und Nierengewebe dient als Kontrolle, als Ladekontrolle dient das Haushaltsgen β -Aktin. Die PMI ist bei gleichen Todesursachen zusätzlich in Tagen angegeben, Marker wird in kDa angegeben

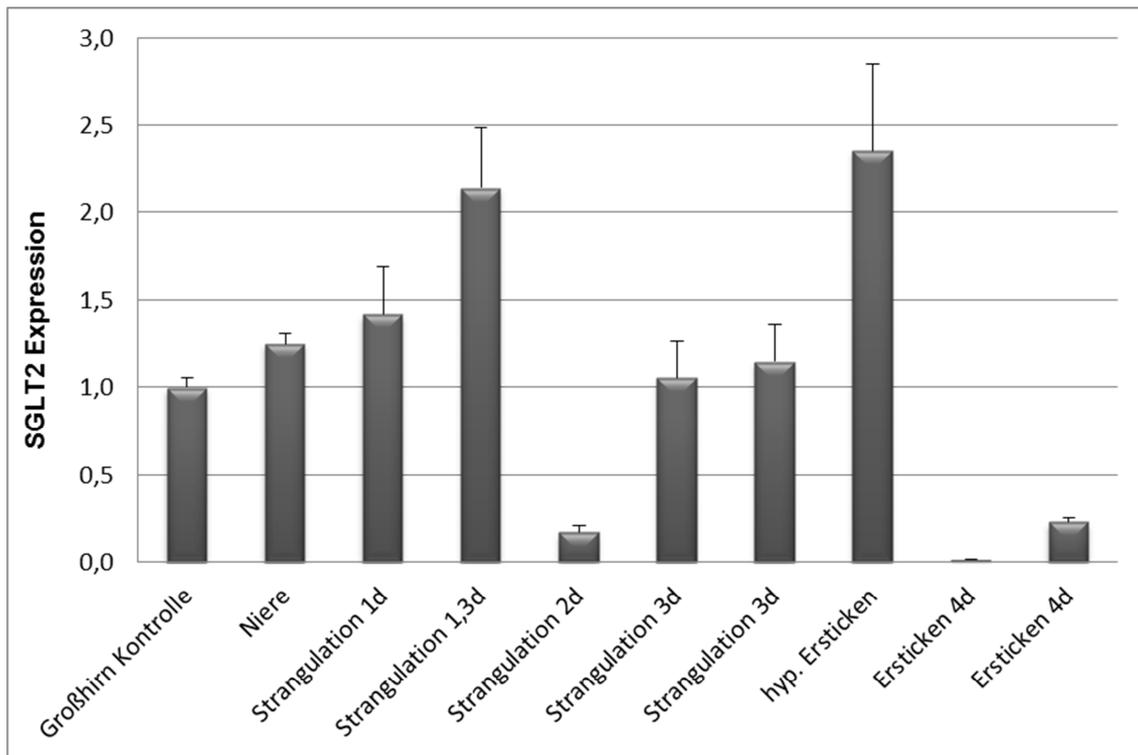


Abbildung 38: SGLT2 Proteinexpression im menschlichen Gehirn nach Sauerstoffmangel. Die PMI ist bei gleichen Todesursachen zusätzlich in Tagen angegeben. Großhirn- und Nierenproben von Myokardinfarkt-Fällen dienen als physiologische Kontrolle. Die Proteinexpression ergibt sich aus der Division der erhaltenen IDV-Werte von SGLT2 und dem Haushaltsgen β -Aktin.

4.5.2. Expression nach lokalem Sauerstoffmangel

Anders als bei einem globalen Sauerstoffmangel kann die Überlebenszeit bei lokalen Schädigungen von wenigen Minuten bis hin zu mehreren Wochen betragen. Das Hirngewebe hat somit einige Zeit um Sekundärschäden entgegenzuwirken.

Um physiologische Reaktionen im Gehirn nach einer Traumatisierung zu untersuchen sind diese Todesursachen ein interessanter Anhaltspunkt. Der Sauerstoffmangel betrifft hierbei nur eine kleine Region des Gehirns (lokal, contusionales/cs Gewebe). Eine Kontrollregion ist somit für einzelne Proben im gegenüberliegenden Hirnbereich (contralaterals/cl Gewebe) vorhanden.

In Anhang Nr. I, Abschnitt II-IV, sind die zu untersuchenden Proben aufgelistet. Es konnte hierbei eine Überlebenszeitspanne von 0h (sofortiger Tod nach Traumatisierung) bis hin zu 72h und sogar 121d (Verstarb nach frustraner Rehabilitation eines SHT) untersucht werden.

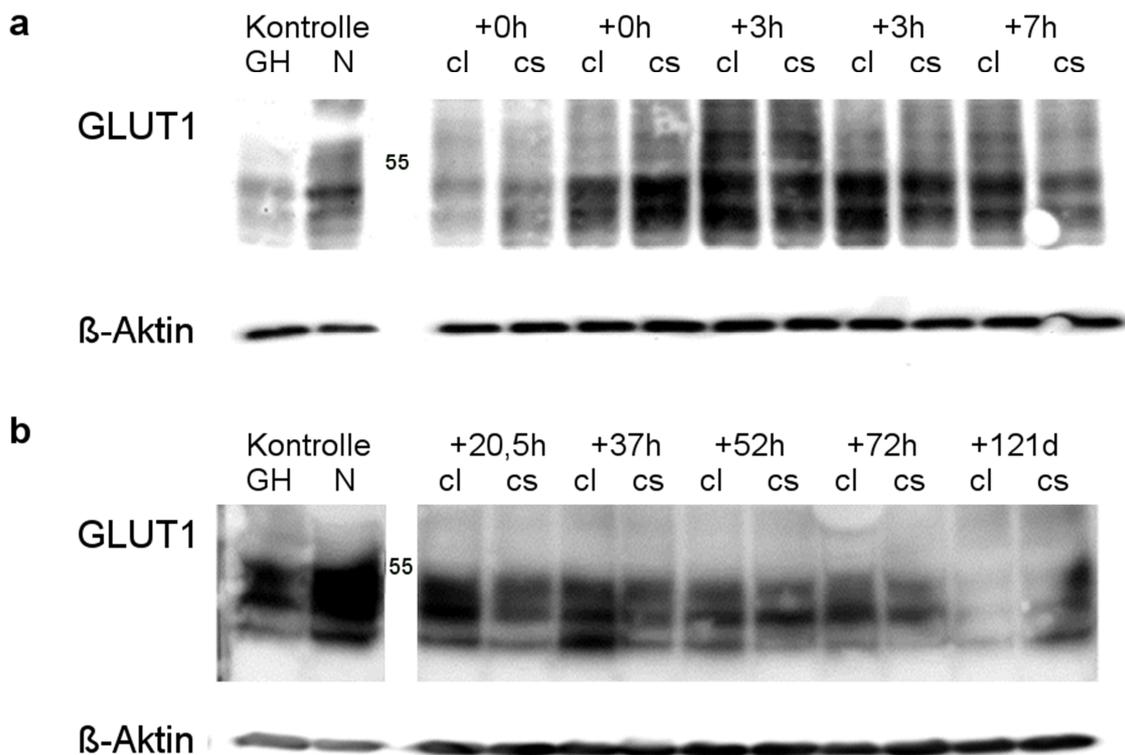


Abbildung 39: Western Blot zur Detektion von GLUT1 in humanem Gehirngewebe nach lokalem Sauerstoffmangel.
 + xh – SHT mit x h Überlebenszeit nach Trauma; cl – contralaterale Hirnregion, cs – contusionale Hirnregion
 Als physiologische Kontrolle dient Gewebe von Verstorbenen nach plötzlichem Herztod, Großhirn (GH) und Niere(N)
 β -Aktin dient als Ladekontrolle, Marker wird in kDa angegeben

Ergebnisse

Die Expressionsänderung von GLUT1 nach einer traumatisch bedingten Hirnverletzung zeigt keine signifikanten Änderungen. Die Expressionsstärke schwankt in Abhängigkeit der jeweiligen Probe und lässt keine genaue Folgerung auf die Überlebenszeit und somit auch auf die Traumazeitpunktentstehung schließen (Abbildung 39).

Dagegen sieht man für die SGLT1-Expression eine deutliche Schwankung in Abhängigkeit der Überlebenszeit (Abbildung 40). Während in der Kontrollregion kaum SGLT1 nachgewiesen werden kann, steigt deren Expression ab 20,5 h Überlebenszeit an und zeigt dessen Höhepunkt bei 72 h Überlebenszeit. Vor allem im contusionalen Gewebe zeigt sich eine verstärkte Expression im Gegensatz zu der dazugehörigen contralateralen Hirnseite.

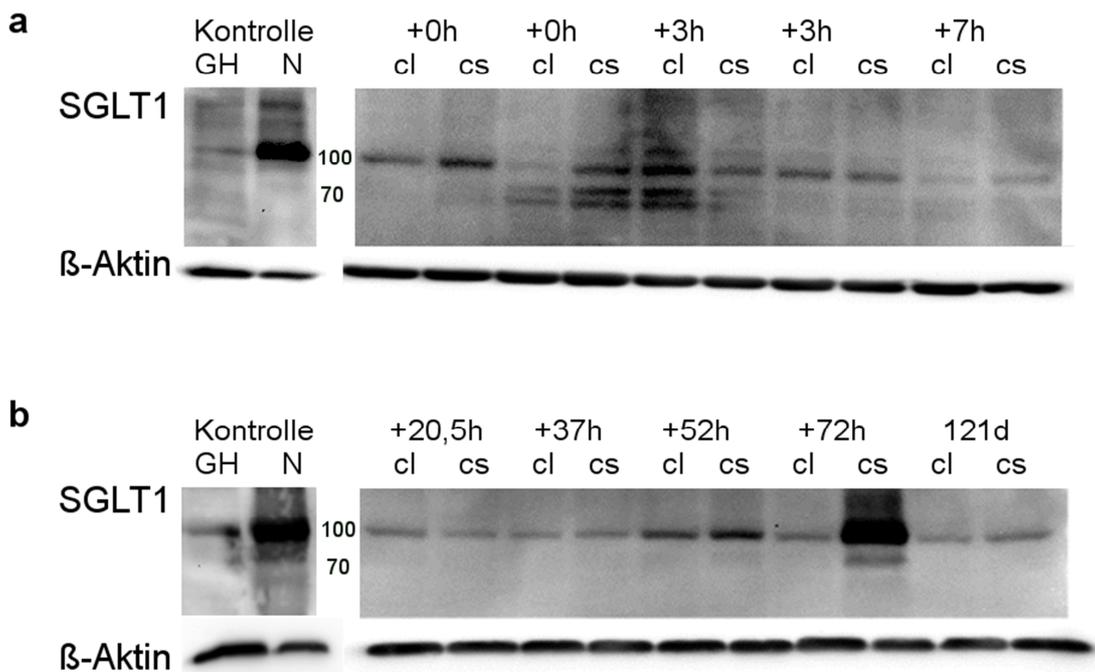


Abbildung 40: Western Blot zur Detektion von SGLT1 in humanem Gehirngewebe nach lokalem Sauerstoffmangel.
+ xh – SHT mit x h Überlebenszeit nach Trauma; cl – contralaterale Hirnregion, cs – contusionale Hirnregion
Als physiologische Kontrolle dient Gewebe von Verstorbenen nach plötzlichem Herztod, Niere(N)
β-Aktin dient als Ladekontrolle, Marker wird in kDa angegeben

Ergebnisse

Für SGLT2 konnte ein ähnlicher Expressionsverlauf nachgewiesen werden (Abbildung 41). In der Kontrolle, sowie in den traumatisierten Proben bis 3 h Überlebenszeit zeigt sich nur eine schwache SGLT2-Expression. Ab 7 h Überlebenszeit steigt die Konzentration des 75 kDa SGLT2 Isomeres. Ein Anstieg beider Formen (100 kDa und 75 kDa) ist ab 20,5 h Überlebenszeit zu verzeichnen. Die stärkste Expression für SGLT2 zeigt sich wiederum nach 72 h Überlebenszeit im contusionalen Gewebe als 100 kDa Isoform.

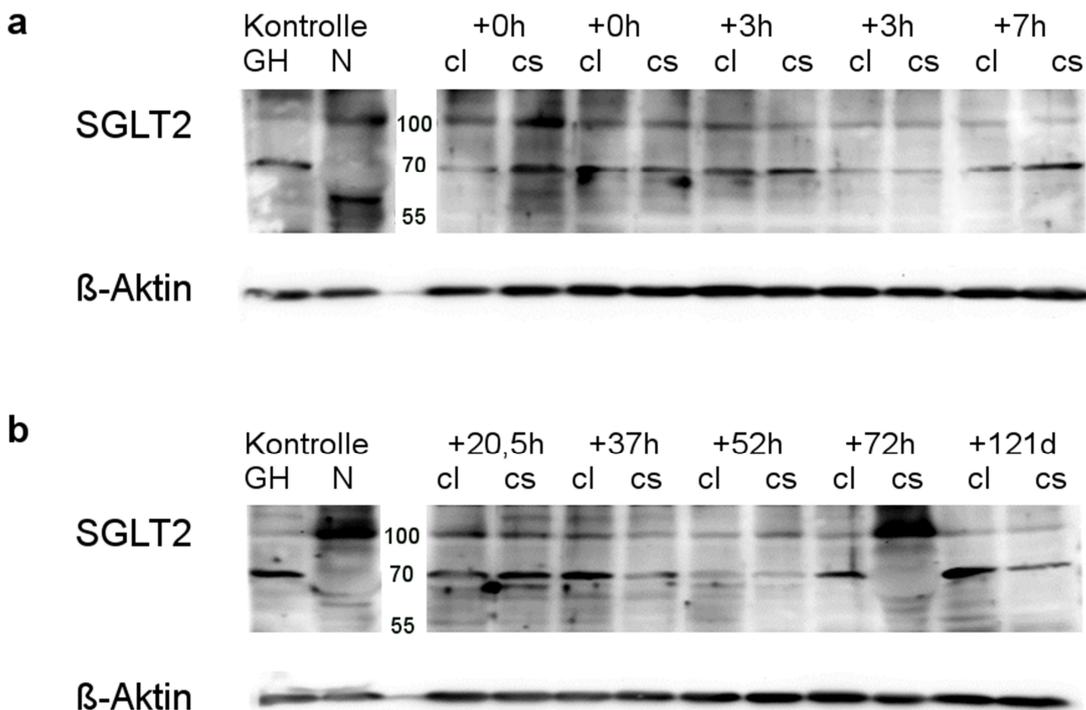


Abbildung 41: Western Blot zur Detektion von SGLT2 in humanem Gehirngewebe nach lokalem Sauerstoffmangel.
+ xh – SHT mit x h Überlebenszeit nach Trauma; cl – contralaterale Hirnregion, cs – contusionale Hirnregion
Als physiologische Kontrolle dient Gewebe von Verstorbenen nach plötzlichem Herztod, Großhirn (GH) und Niere(N)
β-Aktin dient als Ladekontrolle, Marker wird in kDa angegeben

Es ist zu erkennen, dass sich die dargestellten Isoformen von SGLT1 und SGLT2 voneinander unterscheiden. Während SGLT1 durchgehend bei einem Molekulargewicht von 100 kDa nachgewiesen werden kann, liegt SGLT2 bei 100 kDa und ca. 75 kDa vor. In dem Kontrollgewebe der Niere zeigt sich dagegen einzig eine 100 kDa Isoform für SGLT1 und SGLT2.

4.6. Statistische Bewertung der Expression nach lokaler Schädigung

Die statistische Bewertung der Expression der Glukosetransporter im menschlichen Gehirn erfolgt mit dem Statistikprogramm ‚IBM SPSS Statistica 23‘. Für SGLT1 und SGLT2 konnten im Western Blot jedoch unterschiedliche Isoformen nachgewiesen werden konnte, welche sich in der Expressionsstärke in den einzelnen Proben unterschieden. Für die Berechnung der Expressionswerte wurden die IDV-Werte beider Isoformen zusammengerechnet und auf einen Wert anhand der Ladekontrolle β -Aktin normalisiert.

In der Abbildung 42, Abbildung 43 und Abbildung 44 sind die normalisierten Werte aller ausgewerteten Proben für GLUT1, SGLT1 und SGLT2 als Mittelwerte \pm SEM in dargestellt. Signifikante Unterschiede der Proben zu dem Kontrollgewebe ist mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

4.6.1. Datenanalyse der GLUT1-Daten

Die Anzahl der zu testenden Stichproben beinhaltet 8 Zeitpunkte, sowie eine Kontrolle (Mittelwert der Stichprobengröße = 13,5). Dabei sind die enthaltenen IDV-Werte pro Gruppe gemäß dem Kolmogorov-Smirnov-Test normalverteilt ($p > 0.05$). Weiterhin schließt der Test nach Levene eine Varianzhomogenität aus ($p < 0.05$). Die Analyse folgt somit mit einem nicht-parametrischen Test (Welch-Anpassung des ANOVA). Dieser zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

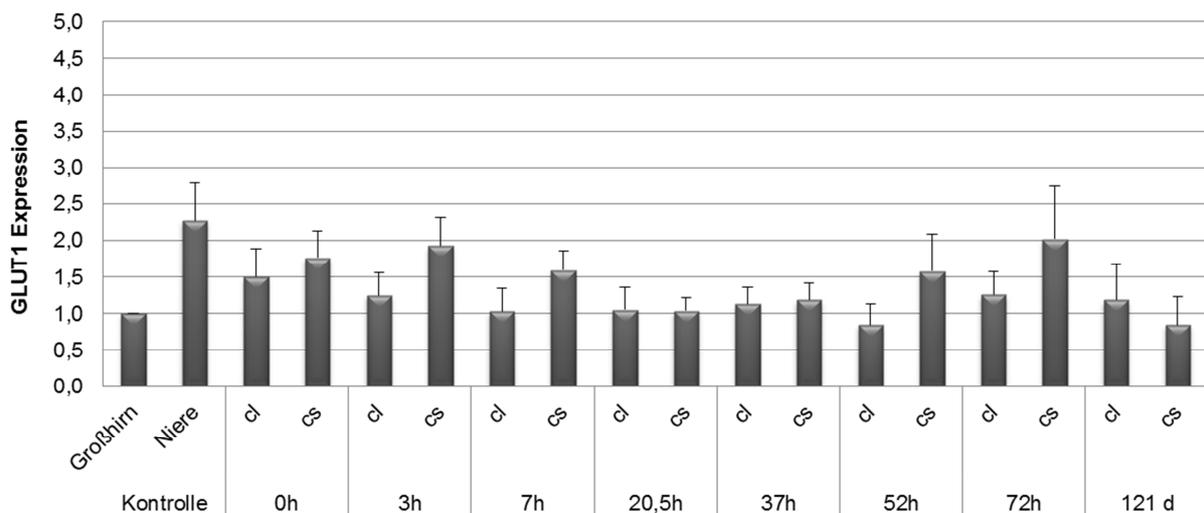


Abbildung 42: GLUT1 Proteinexpression im menschlichen Gehirn nach lokaler Schädigung (SHT).
 xh – SHT mit x h Überlebenszeit nach Trauma; cl – contralaterale Hirnregion, cs – contusionale Hirnregion
 Großhirn- und Nierenproben von Myokardinfarkt-Fällen dienen als physiologische Kontrolle. Die Proteinexpression ergibt sich aus der Division der erhaltenen IDV-Werte von GLUT1 und dem Haushaltsgen β -Aktin.

Für die Expression von GLUT1 in Proben mit traumatisierter Hirnschädigung ergeben sich somit keine signifikanten Unterschiede zu dem Kontrollgewebe (Gehirngewebe, Myokardinfarkt).

4.6.2. Datenanalyse der SGLT1-Daten

Die Anzahl der zu testenden Stichproben beinhaltet 8 Zeitpunkte, sowie eine Kontrolle (Mittelwert der Stichprobengröße = 16,1). Dabei sind die enthaltenen IDV-Werte pro Gruppe gemäß dem Kolmogorov-Smirnov-Test normalverteilt ($p > 0.05$). Weiterhin schließt der Test nach Levene eine Varianzhomogenität aus ($p < 0.05$). Die Analyse folgt somit mit einem nicht-parametrischen Test (Welch-Anpassung des ANOVA). Dieser zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p < 0.05$). Aus diesem Grund wird ein tieferer Einblick in die Unterschiede der traumatisierten Proben (Contusional) und der Kontrolle (Großhirn) mittels t-test durchgeführt. Hierbei lässt sich nachweisen, dass die traumatisierte Hirnprobe nach 0, 7, 20.5 und 52 Stunden Überlebenszeit einen signifikanten Unterschied zu der Kontrollprobe aufweist ($p[0h] = 0,042$, $p[7h] = 0,024$, $p[20.5h] = 0,025$, $p[52h] = 0,023$). Die traumatisierte Probe nach 72 Stunden Überlebenszeit besitzt überdies einen höchst signifikanten Unterschied zu der Kontrolle ($p[72h] = 0,001$).

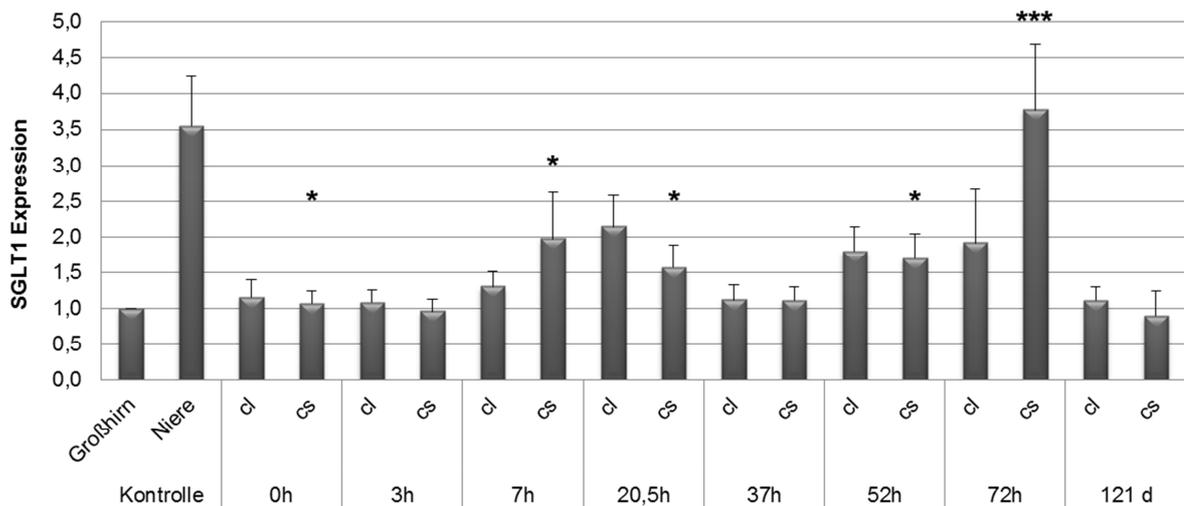


Abbildung 43: SGLT1 Proteinexpression im menschlichen Gehirn nach lokaler Schädigung (SHT).
 xh – SHT mit x h Überlebenszeit nach Trauma; cl – contralaterale Hirnregion, cs – contusionale Hirnregion
 Großhirn- und Nierenproben von Myokardinfarkt-Fällen dienen als physiologische Kontrolle. Die Proteinexpression ergibt sich aus der Division der erhaltenen IDV-Werte von SGLT1 und dem Haushaltsgen β -Aktin.
 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Für die Expression von SGLT1 in allen weiteren Proben mit traumatisierter Hirnschädigung ergibt sich kein signifikanter Unterschied zu dem Kontrollgewebe (Gehirngewebe, Myokardinfarkt).

4.6.3. Datenanalyse der SGLT2-Daten

Die Anzahl der zu testenden Stichproben beinhaltet 8 Zeitpunkte, sowie eine Kontrolle (Mittelwert der Stichprobengröße = 47,5). Dabei sind die enthaltenen IDV-Werte pro Gruppe gemäß dem Kolmogorov-Smirnov-Test normalverteilt ($p > 0.05$). Weiterhin schließt der Test nach Levene eine Varianzhomogenität aus ($p < 0.05$). Die Analyse folgt somit mit einem nicht-parametrischen Test (Welch-Anpassung des ANOVA). Dieser zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p < 0.05$). Aus diesem Grund wird ein tieferer Einblick in die Unterschiede den traumatisierten Proben (Contusional) und der Kontrolle (Großhirn) mittels t-test durchgeführt. Hierbei lässt sich nachweisen, dass die traumatisierte Hirnprobe nach 7, 52 und 72 Stunden Überlebenszeit einen hoch signifikanten Unterschied zu der Kontrollprobe aufweist ($p[7h] = 0,009$, $p[52h] = 0,007$, $p[72h] = 0,004$).

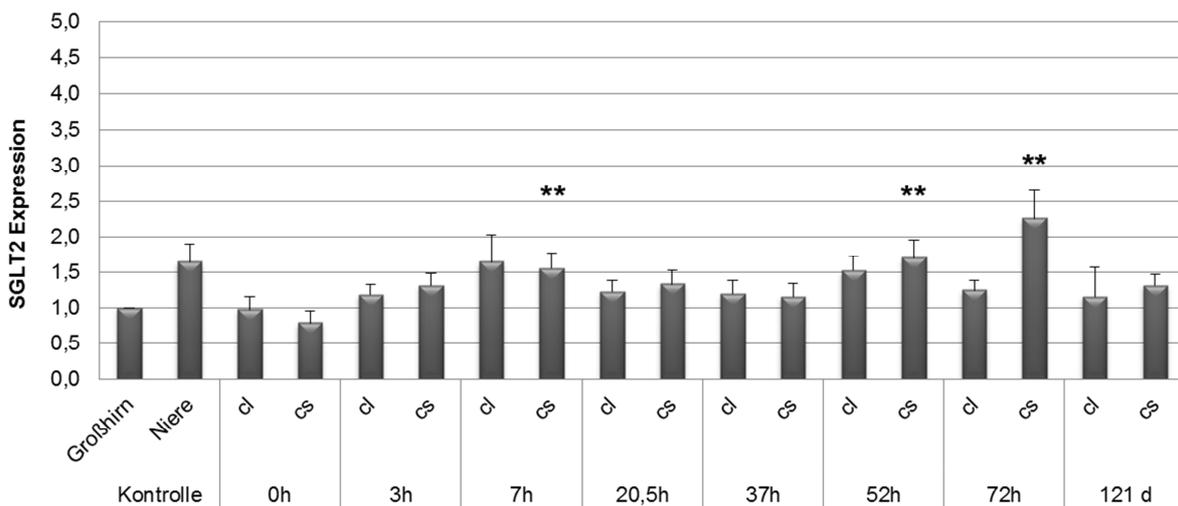


Abbildung 44: SGLT2 Proteinexpression im menschlichen Gehirn nach lokaler Schädigung (SHT).
 xh – SHT mit x h Überlebenszeit nach Trauma; cl – contralaterale Hirnregion, cs – contusionale Hirnregion
 Großhirn- und Nierenproben von Myokardinfarkt-Fällen dienen als physiologische Kontrolle. Die Proteinexpression ergibt sich aus der Division der erhaltenen IDV-Werte von SGLT2 und dem Haushaltsgen β -Aktin.
 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Für die Expression von SGLT2 in allen weiteren Proben mit traumatisierter Hirnschädigung ergibt sich kein signifikanter Unterschied zu dem Kontrollgewebe (Gehirngewebe, Myokardinfarkt).

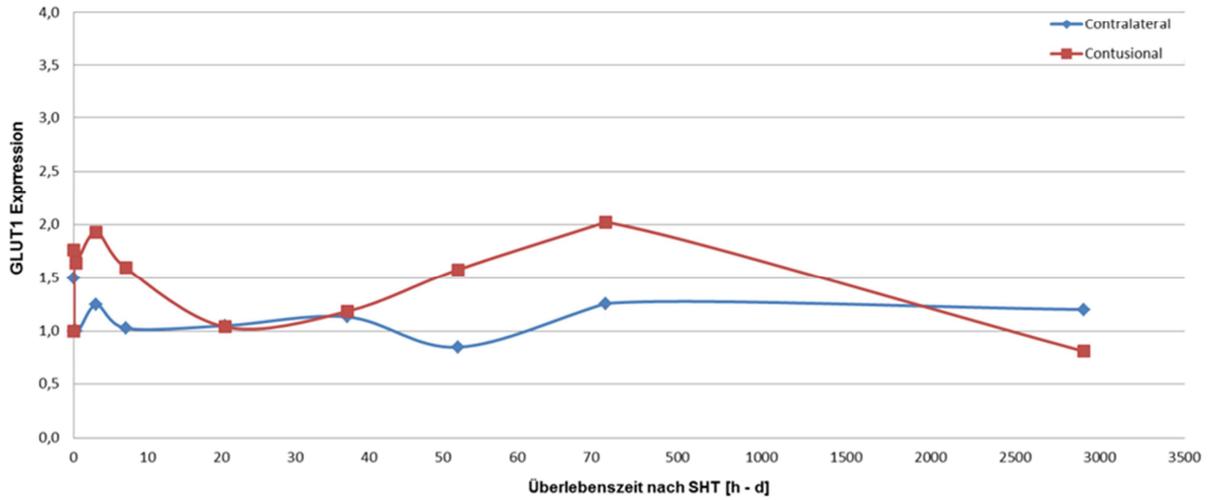
4.7. Expressionsverlauf von Glukosetransportern im menschlichen Gehirn nach lokaler Schädigung

Aus den berechneten Mittelwerten der Expression von GLUT1, SGLT1 und SGLT2 in traumatisierten Gewebeproben lässt sich ein Expressionsverlauf in Abhängigkeit der Überlebenszeit darstellen (Abbildung 45). Zur besseren Darstellung der Expressionsunterschiede zwischen traumatisierten (Contusional, rot) und nicht-geschädigtem (Contralateral, blau) Gewebe wurde für beide Regionen ein Liniendiagramm der Datenpunkte erstellt.

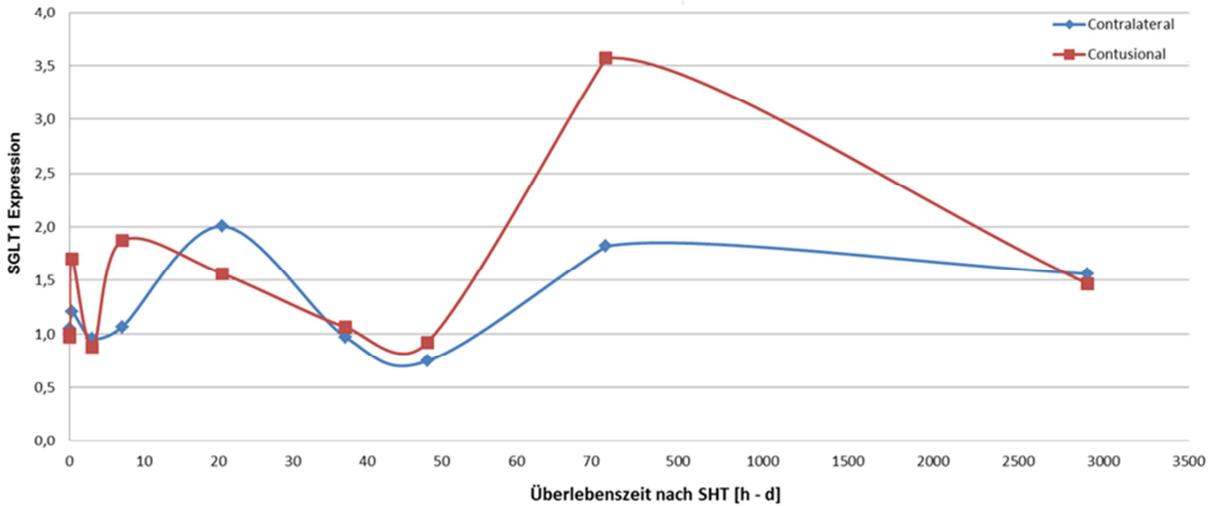
Es zeigt sich ein Expressionstrend wie unter Absatz 4.5.2 beschrieben. In den abgebildeten Diagrammen ist nun verdeutlicht, dass GLUT1 nach einer Traumatisierung nahezu unbedeutend ansteigt. Dahingehend sieht man für SGLT1 einen deutlichen Anstieg der Proteinkonzentration in dem contusionalen Gewebe nach 72 Stunden Überlebenszeit, bevor dies wieder auf deren physiologischen Wert sinkt. Dieser Konzentrationsanstieg fällt für SGLT2 deutlich geringer aus. Jedoch ist auch hier eine erhöhte Konzentration bei einer Überlebenszeit von 72 Stunden im contusionalen Gewebe erkennbar.

Ergebnisse

Expressionsverlauf von GLUT1 nach SHT



Expressionsverlauf von SGLT1 nach SHT



Expressionsverlauf von SGLT2 nach SHT

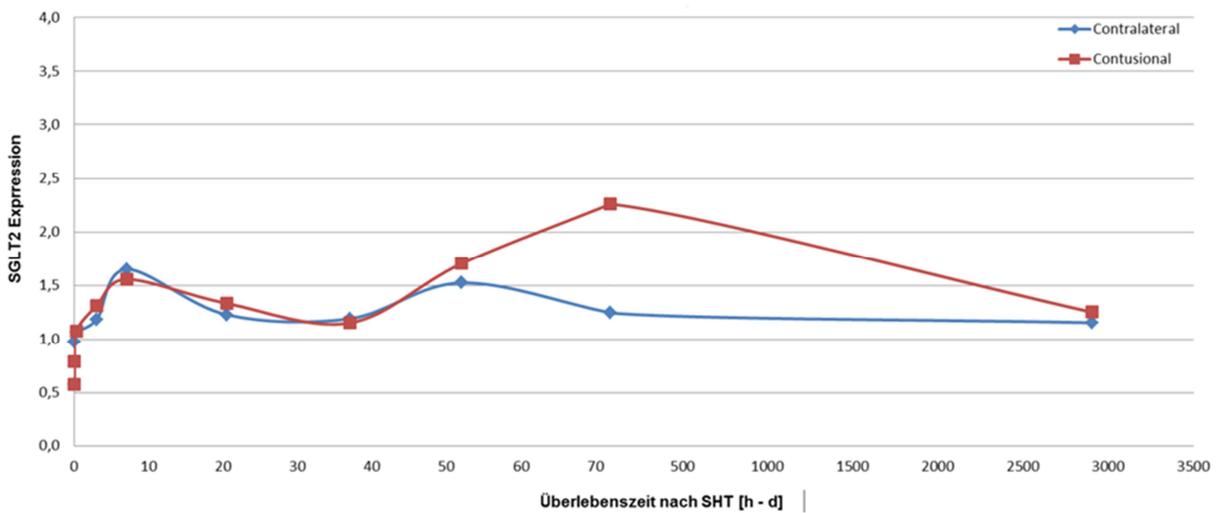


Abbildung 45: Expressionsverlauf der Glukosetransporter in Hirngewebe
Darstellung der ausgewerteten Proteinexpression in Abhängigkeit der Überlebenszeit nach einer Traumatisierung im Liniendiagramm zur Veranschaulichung der Expressionsänderung (contralateralen-blau, contusionalen-rot)

4.8. Lokalisation von SGLT1 und SGLT2 in unterschiedlichen Hirnregionen

4.8.1. Lokalisation im menschlichen Gesamthirn

Die Lokalisation von SGLT1 und SGLT2 soll nun neben der immunhistologischen Analyse (siehe Abschnitt 4.3.2.2, S. 63) ebenfalls im Western Blot untersucht werden.

Es wurden erneut vier Regionen des Gesamthirns ausgewählt, aus denen Proteinisolate angefertigt wurden. Diese wurden anschließend mittels anti-human SGLT1 bzw. SGLT2 Antikörpern angefärbt. Als Regionen wurde die graue und weiße Substanz des Großhirns (GS, WS), sowie das Kleinhirn (KH) und der Pons (Po) einer Kontrollprobe (Person nach plötzlichem Herztod), sowie einer traumatisierten Probe (Kopfschuss) ausgewählt. Als Kontrolle diente hierbei ebenfalls eine Nierengewebsprobe.

Es lässt sich sowohl für SGLT1, als auch für SGLT2 erkennen, dass in der Kontrollprobe nur wenig SGLT-Protein exprimiert wird (Abbildung 46 und Abbildung 47, a). Die stärkste Detektion lässt sich für beide im Bereich des Pons bei einem Molekulargewicht von 55 kDa feststellen. Das Nierengewebe zeigt ebenfalls in beiden Proben eine starke Expression bei 100 kDa.

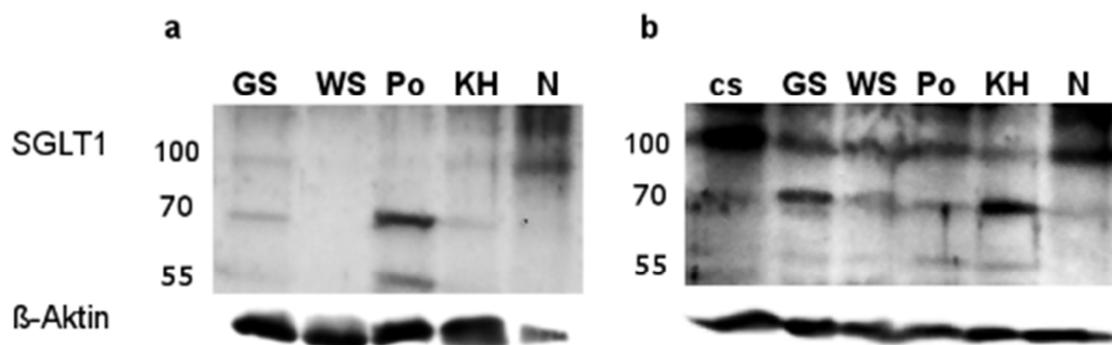


Abbildung 46: Western Blot zur Detektion von SGLT1 in unterschiedlichen Hirnregionen. Analyse von Proteinisolaten aus unterschiedlichen Regionen des Gesamthirns. a) Kontrollprobe (Myokardinfarkt); b) Traumatisierte Hirnprobe (Kopfschuss); cs – Contusional / traumatisiertes Gewebe GS – graue Substanz, WS – weiße Substanz, Po – Pons, KH – Kleinhirn, N – Niere
β-Aktin dient als Ladekontrolle, Marker wird in kDa angegeben

Ergebnisse

Die Lokalisation von SGLT1 in einer Probe mit traumatisch bedingter Hirnveränderung zeigt sich im contusionalen Gewebe als stärkste Expression (Abbildung 46, b). In unbeschädigten Geweberegionen (Contralateral; GS, WS, KH und Po) nimmt die Expression deutlich ab. In allen Regionen ist die Expression von SGLT1 bei einem Molekulargewicht von 100 kDa zu erkennen, jedoch kommt das Protein in unbeschädigtem Gewebe ebenfalls in einer Größe von ca. 75 kDa vor.

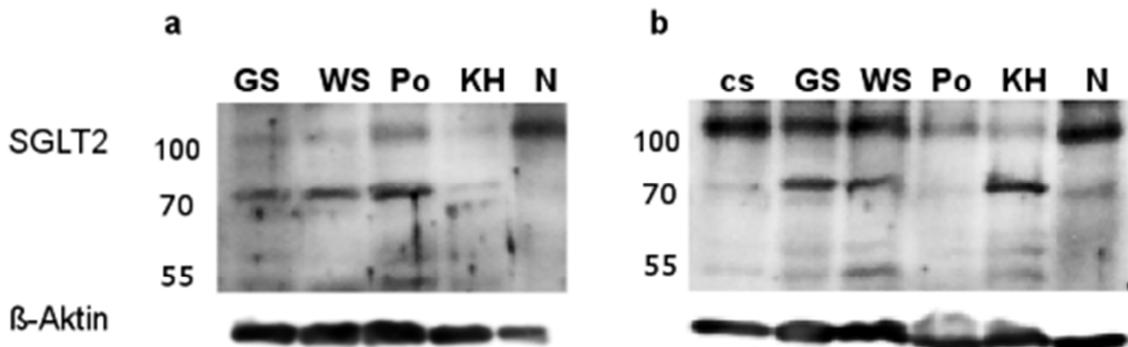


Abbildung 47: Western Blot zur Detektion von SGLT2 in unterschiedlichen Hirnregionen. Analyse von Proteinisolaten aus unterschiedlichen Regionen des Gesamthirns. a) Kontrollprobe (Myokardinfarkt); b) Traumatisierte Hirnprobe (Kopfschuss); cs – Contusional / traumatisiertes Gewebe GS – graue Substanz, WS – weiße Substanz, Po – Pons, KH – Kleinhirn, N – Niere
β-Aktin dient als Ladekontrolle, Marker wird in kDa angegeben

Die Lokalisation von SGLT2 zeigt ähnliche Expressionsmuster (Abbildung 47, b). In der traumatisierten Region ist eine Expression ebenfalls bei 100 kDa anzutreffen, während sich diese in den unbeschädigten Geweberegionen bei 100 kDa und 75 kDa zeigt. Die schwächste Expression ist dabei in Regionen des Kleinhirns und des Pons zu erkennen.

4.8.2. Lokalisation in menschlichen Hirnkapillaren

Die Analyse der SGLT-Lokalisation erfolgt anschließend ebenfalls für isolierte Hirnkapillaren. Da in Proteinlysaten des Gesamthirns die stärkste Expression für SGLT1 und SGLT2 in Bereichen des geschädigten Gewebes, sowie der grauen und weißen Substanz zu erkennen ist, wurden diese für eine weitere Analyse genutzt.

In Abbildung 48 zeigt sich die Lokalisation von SGLT1 (a) und SGLT2 (b) in Proteinlysaten isolierter Hirnkapillaren.

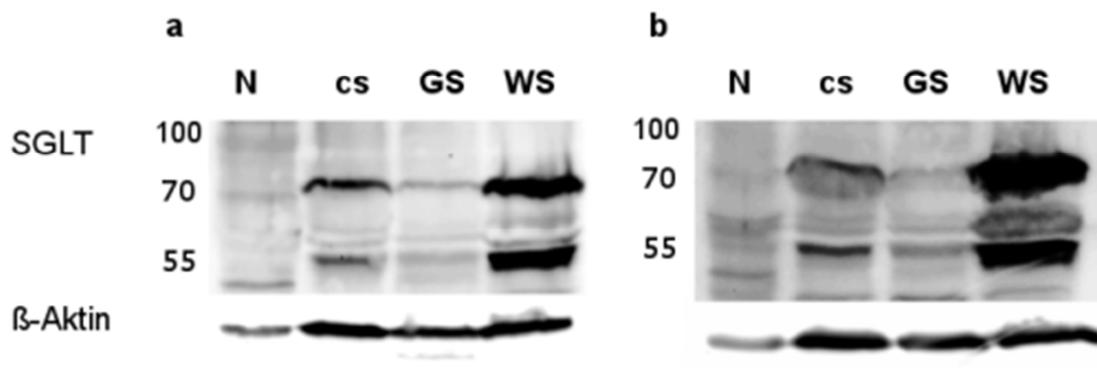


Abbildung 48: Western Blot zur Detektion von SGLT in Kapillaren unterschiedlicher Hirnregionen. Analyse von Proteinisolaten aus unterschiedlichen Regionen isolierter Kapillare. a) Detektion von SGLT1; b) Detektion von SGLT2; cs – Contusional / traumatisiertes Gewebe GS – graue Substanz, WS – weiße Substanz, N – Niere β -Aktin dient als Ladekontrolle, Marker wird in kDa angegeben

Hierbei kann man feststellen, dass sich das Molekulargewicht in Kapillaren deutlich von der Größe im Gesamthirn unterscheidet. Hier zeigt sich das Protein als 75 kDa und 55 kDa große Isoform.

In der grauen Substanz lässt sich nur eine geringe Expression darstellen. Die stärkste Lokalisation beider Isoformen findet sich sowohl für SGLT1, als auch SGLT2 in der weißen Substanz. Diese Ergebnisse unterscheiden sich deutlich von der Expression im Gesamthirngewebe. Jedoch können diese Resultate in der immunhistologischen Lokalisation in Hirnkapillaren (siehe Abschnitt 4.3.2.2, S. 63) dupliziert werden. Hier ist eine Expression von SGLT2 ebenfalls kaum in der grauen Substanz zu finden (Abbildung 24), die schwache SGLT1-Expression in dieser Region kann immunhistologisch jedoch deutlicher dargestellt werden (Abbildung 23).

5. Diskussion

5.1. Hirnevolution und Phylognese der Natrium-abhängigen Glukosetransporter

Die Evolutionstheorie des Gehirn „Triune Brain Theory“ nach Dr. Paul D. MacLean aus dem Jahr 1973 besagt, dass das Primatengehirn in drei Evolutionsstufen entstanden ist (MacLean und Kral 1973, siehe Abbildung 49).

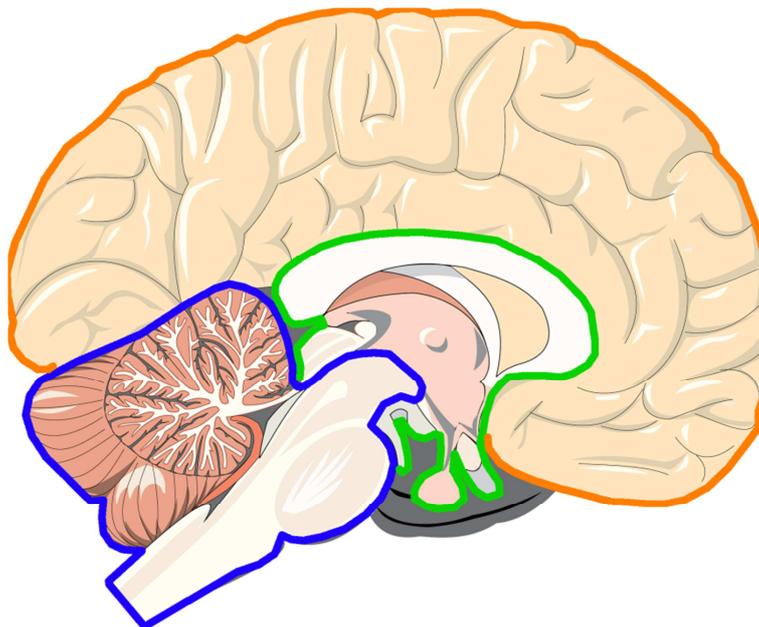


Abbildung 49: Die Entwicklungsstadien des Gehirns nach Dr. P. MacLean

Die erste Stufe begann vor ca. 500 Millionen Jahren, hier entwickelte sich in Amphibien das primitive Gehirn, auch Reptiliengehirn genannt (blaue Region). Anschließend begann die Entwicklung des Paleomammalisches Gehirns (Limbische System, grüne Region) in kleinen Säugern vor ca. 150 Millionen Jahren. Die Ausbildung des Neomammalisches Gehirns (Neocortex, orangener Bereich) in Primaten bildet die letzte Entwicklungsstufe. Diese erfolgte vor rund 2 – 3 Millionen Jahren. Die Lokalisation der Natrium-abhängigen Glukosetransporter zeigen, dass SGLT1 und SGLT2 in Regionen des Pons sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene exprimiert werden (Abschnitte 4.3.2.2, 4.4.2 und 4.8). Diese Hirnregion entstand in der ersten Entwicklungsstufe, dem sog. Primitiven Gehirn. Hierdurch stellt sich die Frage, ob diese Natrium-abhängigen Glukosetransporter ebenfalls vor ca. 500 Millionen Jahren vorhanden waren und ob die Phylogenie von Kleinstorganismen bis hin zum Menschen darzulegen ist.

Durch bioinformatische Untersuchung der Proteinsequenzen bekannter Glukosetransporter und Natrium-abhängiger Glukosetransporter können Rückschlüsse auf die Phylogense der SGLTs geschlossen werden.

Der erzeugte Stammbaum der Proteinsequenzen aller Glukosetransporter der SLC2- und SLC5-Genfamilie lässt darauf schließen, dass die Transporter der SLC5-Familie in dem frühen Stadium der Hirnentwicklung, dem primitiven Gehirn, entstanden sind (Abbildung 9, Abbildung 10). Die Phylogenie der SLC5 Transporter (SGLTs) ist demnach rund 500 Millionen Jahre alt. Demnach besitzen SGLT1 und SGLT2 schon in frühen Organismen eine Funktion für den Transport von Glukose. Die Evolution kann von dem einzelligen Bakterium Alpha-Proteobakterium Q1 bis zu höher entwickelten Spezies wie den Großaffen und dem Menschen nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Natrium-abhängigen Glukosetransporter nicht aus den Glukosetransportern der SLC2-Familie entwickelt haben. Die Proteine der Transporter SGLT1 findet sich schon in frühen Organismen wie dem Alpha-Proteobakterium Q1, sowie den höher entwickelten Spezies *Ciona intestinalis* (Schlauchascidie, Evolution vor ca. 500 Millionen Jahren, Huxley-Jones et al. 2007) und der Hirschzecke (Evolution vor ca. 300 Millionen Jahre; Cornman et al. 2010). SGLT2 wurde in *Strongylocentrotus purpuratus* (Seeigel, Evolution vor ca. 65 Millionen Jahren, Maxson et al. 1987) beschrieben. Ob SGLT2 ebenfalls in früheren Organismen vorhanden war lässt sich nur anhand des Stammbaumes darlegen. Da die Untersuchung dieses Transporters erst in der letzten Zeit zunahm, liegen hierzu weniger Ergebnisse und Veröffentlichungen vor, wie zu dem Transporter SGLT1. Erst Veröffentlichungen zu unterschiedlichen Affenspezies können eine gemeinsame, parallele Evolution anhand der Proteinsequenz darlegen (Tabelle 18).

5.2. Spezifität der verwendeten Antikörper und Primer

In der vorliegenden Arbeit wurden kommerziell erwerbliche Antikörper verwendet. Es ist bekannt, dass der Transporter GLUT1 im menschlichen Gehirn lokalisiert ist (Pardridge et al. 1990; Farrell und Pardridge 1991; Vannucci et al. 1998), weiterhin ist der anti-human GLUT1 Antikörper seit vielen Jahren auf dem Markt und von diversen Arbeitsgruppen erforscht. In dieser Arbeit wird die Lokalisation von GLUT1 reproduziert, eine neue Darstellung des Expressionsmusters erfolgt nicht. Somit kann auf einen erneuten Spezifitätstest dieses Antikörpers verzichtet werden. Da sich die Detektion von SGLT1 und SGLT2 als schwerfällig gestaltet und trotz selbst-designten Antikörpern zu falsch-positiven Ergebnisse geführt hat (Sabolić I. et al. 2006; Balen et al. 2008), erfolgt ein Spezifitätstest für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten anti-human SGLT1 und SGLT2 Antikörper.

Zuerst sollte dies mittels Transfektion einer humanen Zelllinie mit SGLT1 und SGLT2 siRNA stattfinden. Hierbei ergab sich das Problem einer ungenügenden Transfektion der humanen Zelllinien CaCo-2 und HK-2. Aus diesem Grund wurde auf die leicht zu transfizierende Zelllinie HEK293 zurückgegriffen. Da deren Ursprung das embryonale Nierenendothel ist, ist davon auszugehen, dass sowohl SGLT1 als auch SGLT2 im physiologischen Zustand exprimiert werden. Die erfolgreiche Transfektion wurde mit Hilfe des Kontrollproteins DSG2 bestätigt. Versuche mit einem SGLT1 Antikörper der Firma Abcam zeigen, dass die Expression mittels SGLT1 siRNA signifikant verringert werden konnten. Für SGLT2 zeigte sich dahingegen keine signifikante Expressionsänderung. Da bei der Detektion alle transfizierten Proben eine deutliche Verringerung der SGLT2 Expressionsstärke aufweisen ist davon auszugehen, dass die Transfektion an sich einen starken Einfluss auf die physiologische SGLT2 Expression besitzt. Dieser Test ist somit nicht zum Nachweis der Spezifität eines anti-human SGLT2 Antikörpers geeignet. Weitere Experimente mit Transfektionsreagenzien und SGLT2 siRNA anderer Hersteller sind nötig um zu prüfen, ob die verwendeten Reagenzien toxisch bzw. hemmend auf die Stoffwechselwege und somit der SGLT2-Expression der Zellen wirken.

Um die Ergebnisse der Transfektionsversuche zu bestätigen bzw. zu verbessern wurden die verwendeten Antikörper in den immunhistologischen Färbungen mit einem immunisierten Peptid geblockt. Hierbei ergab sich erneut das Problem der Novität der verwendeten Antikörper.

Es zeigte sich, dass ein kommerziell erwerbliches anti-human SGLT2 Peptid der Firma Abcam vertrieben wird, jedoch nicht gegen den anti-human SGLT1 Antikörper derselben Firma. Auch wenn die Spezifität des Abcam SGLT1 Antikörpers nachgewiesen werden konnte, so sollte eine Blockierung der detektierten Lokalisation in der Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurde auf einen weiteren anti-human SGLT1 Antikörper inklusive spezifischem Peptid der Firma Everest Biotech zurückgegriffen. Dieser Antikörper wurden ebenfalls in einer Arbeit von Ivana Vrhovac getestet, zeigte jedoch keine Lokalisation in unterschiedlichen Gehirnregionen (Vrhovac et al. 2015). In diesem Versuch konnten neben dem SGLT1 Antikörper nun ebenfalls die Spezifität des SGLT2 Antikörpers dargestellt werden. Man erkennt in den gefärbten Gefrierschnitten, dass die detektierten Strukturen nach einem Peptidblock vollständig verschwinden. Einzig der starke Hintergrund der Gefrierschnitte bleibt bestehen.

Die Experimente mit transfizierten Zellen und die erfolgreiche Blockierung des Signals mittels immunisierten Peptids bezeugen die Tatsache, dass die verwendeten SGLT1 und SGLT2 Antikörper eine hohe Spezifität aufweisen. Somit können diese für weitere Versuche eingesetzt werden.

5.3. Problematik der rechtsmedizinischen Untersuchung

Ein großes Problem dieser Arbeit ist die Probenqualität. Im Gegensatz zu *in vitro* oder *in vivo* Versuchen ist es bei humanen Proben nicht möglich frisches Gewebe zu entnehmen. Aus diesem Grund muss auf *post mortales* Hirngewebe von Verstorbenen bei der gerichtlichen Obduktion zurückgegriffen werden. Hierbei kann jedoch auf Faktoren wie die Liegezeit und Umgebungseinflüsse nur bedingt eingegangen werden. Da die Autolyse und Zersetzung von Proteinen und mRNA kurze Zeit nach dem Einsetzen des Todes startet, hilft auch eine sofortige Kühlung des Leichnams nur eingeschränkt für den Erhalt der physiologischen Zellumgebung. Weiterhin können bei rechtsmedizinischen Untersuchungen nur ungefähre Daten zu dem Todeszeitpunkt und Umgebungseinflüssen angegeben werden. Aus diesem Grund ist keine Angabe der PMI im Minutenbereich möglich, alle Werte sind von ermittlungstechnischer Seite als grobe Schätzung übermittelt. Eine Schwankung der Daten kann somit nicht verhindert werden.

Der Nachweis der Protein- und mRNA-Stabilität in *post mortalem* Gewebe ist, aufgrund der geringen Möglichkeit an frische humane Proben aus z. B. einer Biopsie oder Operation zu gelangen, ein wichtiger Aspekt der Forschung. Da bekannt ist, dass die Zellyse und fäulnisbedingter Abbau rasch nach dem Tod einsetzt, konzentrieren sich bisherige Publikationen auf kurze PMI. Die Stabilität bei einem PMI von über 3 Tagen ist kaum erforscht. Die Proben dieser Arbeit besitzen ein PMI von 5 h bis max. 8 d. Es kann gezeigt werden, dass Proteine bis mind. 8 d *post mortem* stabil vorliegen (Probe GT1_15; Immunhistologischer Nachweis).

Dies unterstützt die Ergebnisse von Blair et al., welche ebenfalls Proteine mittels Antikörperdetektion in *post mortalem* Gewebe nachgewiesen hat (Blair et al. 2016). Er konnte zeigen, dass diese mit einem PMI von über 50 h stabil nachgewiesen werden können. Mit einem maximalen PMI von 8 d bzw. 192 h übersteigen die vorliegenden Ergebnisse die publizierte Zeit. Neben den erwähnten Mangel an Proben mit einem hohen PMI kann dies ebenfalls an den vorliegenden Targetproteinen (GLUT1, SGLT1, SGLT2) liegen, die durch ihr transmembranes Vorliegen eventuell geschützter vor zellulären Abbaumechanismen und Fäulnisprozessen sind.

Auch die These von Christopher Perrett, welcher eine stabile mRNA bis über 84 h *post mortem* beschrieb, kann bestätigt werden (Perrett et al. 1988). Mittels spezifischen Primern wurden die Proben LT1_16 und GT1_16 (4d und 6d PMI, siehe Abschnitt 4.4.2, S. 68) auf deren mRNA-Expression mittels qPCR untersucht. Hierbei konnte ein starkes Signal erhalten werden.

Vor allem das Haushaltsgen β -Aktin erweist sich als unbeeinflusst durch das PMI und weitere äußere Einflüsse des Leichnams (z. B. Todesursache, Liegebedingungen). Aber auch die Natrium-abhängigen Glukosetransporter SGLT1 und SGLT2 können unabhängig der PMI detektiert werden. Einzig der Glukosetransporter GLUT1 ist im Western Blot schwer nachzuweisen. Hier erkennt man häufig eine kräftige, jedoch diffuse Bande. Versuche mit frischen humanen Proben (LT3_13. 1 d PMI) zeigen, dass dies jedoch nicht an dem PMI liegt. Es hat sich herausgestellt, dass GLUT1 in hoher Konzentration im menschlichen Gewebe vorkommt. Eine Erhöhung der Antikörper-Verdünnung, sowie Verkürzung dessen Inkubationszeit zeigte eine deutliche Verbesserung der Proteindetektion.

Auf die Expression und Lokalisation der untersuchten Transporter soll nun im Folgenden näher eingegangen werden.

5.4. Expression von Glukosetransportern im menschlichen Gehirn

Die Expression der Glukosetransporter wurde anhand Immunfluoreszenz, Western Blot und qPCR durchgeführt. Bisherige Forschungsergebnisse beschreiben, dass hauptsächlich Glukosetransporter der SLC2-Genfamilie für die Energieversorgung des Gehirns zuständig sind.

Kalaria et al. beschreiben eine exklusive Expression von GLUT1 an der BHS. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten ebenfalls eine starke Expression und Lokalisation von GLUT1 entlang der Endothelstruktur von Hirnkapillaren und im menschlichen Gehirn nach globalem und lokalem Trauma. Die Aufgabe der SLC5-Transporter ist dahingegen im Menschen nicht genau definiert. Auch in *in vivo* und *in vitro* Versuchen wird der Nachweis von SGLT1 und SGLT2 kritisch begutachtet. Da die Glukoseversorgung durch Transporter der SLC2-Genfamilie klar geregelt scheint, wird den Natrium-abhängigen Glukosetransportern nur wenig Beachtung geschenkt. Vor allem falsch-positive Resultate, welche durch unspezifische Antikörperreaktion hervorgerufen werden, führen zu einer notwendigen Skepsis.

Toshiyuki Matsuoka beschrieb die erste Annahme, wonach die Expression von SGLT Transportern in einer Hirndothelzelllinie von Rindern durch einen Glukosemangel induziert wird (Matsuoka et al. 1998). Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass SGLTs während einem Versorgungsmangel des Gehirns, z. B. während einer Ischämie oder einer traumatisch bedingten Hirnveränderung, eine wichtige Rolle spielen. Weitere Versuche *in vivo* und *in vitro* folgten, jedoch ist bisher eine Untersuchung in menschlichem Gewebe kaum Gegenstand der Forschung.

In Zusammenarbeit mit Frau Professor Dr. Carola Förster (Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Würzburg) wurden *post mortale* Hirngewebeproben auf die Expression der SGLT Transporter untersucht. In Hirngewebe von Kontrollpatienten, sowie nach einem globalen Hirntrauma ist die mRNA- und Proteinexpression von SGLT1 und SGLT2 nur schwach detektierbar. Nur in vereinzelt Proben lassen sich starke Banden im Western Blot nachweisen. Ein gegenteiliges Ergebnis zeigt sich, sobald eine traumatisch bedingte Hirnveränderung vorhanden ist. Hier verändert sich die Proteinexpression in Abhängigkeit der Lokalisation (Contusional, Contralateral) und der Überlebenszeit nach dem Trauma. Auf diesen Expressionsverlauf wird unter Abschnitt 5.4.2, S. 98, näher eingegangen.

Auffallend ist jedoch, dass unterschiedliche Proteingrößen von SGLT1 und SGLT2 nachgewiesen werden. Das Vorliegen unterschiedlicher Glykosylierungsformen wurde von Arno Kumagai für den Transporter GLUT1 beschrieben (Kumagai et al. 1994). Hier ist bereits bekannt, dass verschiedene Isoformen in Abhängigkeit der Geweberegion im menschlichen Gehirn exprimiert werden. Des Weiteren wurden drei Glykosylierungsstellen in der Schleife des SGLT2 Proteins nachgewiesen (Feric et al. 2011). Bisherige Forschungsarbeiten der Glukoseversorgung im ZNS, besser gesagt den Neuronen, zeigte einzig die 75 kDa große glykosylierte Form von SGLT1 (Pope et al. 1997). Strukturanalysen der SLC5-Transporter konnte jedoch aufzeigen, dass SGLTs verschiedene Isoformen annehmen. Den ca. 100-120 kDa großen Dimeren, dem 75 kDa großen glykosylierten, sowie dem 55 kDa großen Kernglykosyliertem Protein (Panayotova-Heiermann et al. 1997; Tyagi et al. 2005; Sasseville et al. 2016). In dieser Studie können diese Isoformen der Natrium-abhängigen Glukosetransporter gezeigt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass in der menschlichen Niere sowohl SGLT1, als auch SGLT2 als Dimer nachgewiesen werden kann.

Weiterhin weist SGLT1 auch im menschlichen Gehirngewebe eine Expression als 100 kDa großes Dimer auf. SGLT2 liegt in zwei verschiedene Isoformen vor, dem glykosylierten Protein und ebenfalls als Dimer. Im Gegensatz dazu, zeigt sich in isolierten Kapillaren nur die Kernglykosylierte sowie die glykosylierte Isoform von SGLT1 und SGLT2. Dies führt zu der Annahme, dass SGLTs in unterschiedlichen Geweben durch ihre funktionelle Expression andere Aufgabenbereiche besitzen. Nachdem die Lokalisation von SGLT1 und SGLT2 im menschlichen Gehirn *post mortem* nachgewiesen werden kann, muss eine exakte Untersuchung der Proteinstrukturen, sowie den damit verbundenen funktionellen Änderungen erfolgen.

5.4.1. Lokalisation der Natrium-abhängigen Glukosetransporter SGLT1 und SGLT2 im menschlichen Gehirn

Die Lokalisation von Natrium-abhängigen Glukosetransportern im menschlichen Gehirn ist zum derzeitigen Stand nur vereinzelt Fokus von Forschungsgruppen. Ein von Jian Chen groß angelegtes Screening der SLC5-Transporter im menschlichen Organismus zeigte, dass SGLT1 und SGLT2 nicht an der BHS gefunden werden kann (Chen et al. 2010). Auch eine ausführliche Untersuchung von Poppe et al. ergab, dass einzig SGLT1 in Neuronen exprimiert wird. Für die Glukoseversorgung spielen diese Transporter somit keine Rolle. Im Jahr 2009 konnten Vemula et al. nachweisen, dass SGLT in Gehirndothelzellen mit traumatisch bedingter Veränderung exprimiert werden. *In vivo* Versuche der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Förster der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Würzburg konnten dies in einem Mausmodell bestätigen (Wais 2012). Aus diesem Grund kam die Fragestellung der vorliegenden Arbeit auf und es sollte die Lokalisation und die Funktion der SGLTs ebenfalls im menschlichen Gehirn erforscht werden.

Der Nachweis gestaltet sich generell als problematisch. Vor allem Analysen mit menschlichem Hirngewebe sind selten für die Grundlagenforschung verfügbar. Auch in dieser Arbeit wurde für die Untersuchung auf *post mortales* Gewebe zurückgegriffen, hier besteht jedoch immer das Problem der Probenbedingungen. Weiterhin hat sich die Sensitivität der angewandten Methoden als kritisch erwiesen.

Durch den Sensitivitätstest der verwendeten Antikörper kann dessen ungeachtet ein falsch-negatives Resultat durch unspezifische Reaktionen ausgeschlossen werden. Der Lokalisationsnachweis der Glukosetransporter erfolgte zunächst immunhistologisch an Gefrierschnitten des menschlichen Gehirns *post mortem*. Hierbei wurde die starke Eigenfluoreszenz des Gewebes und das damit verbundene hohe Hintergrundsignal zu einem Problem, wodurch spezifische Signale nur erschwert detektiert werden können. Die Lokalisation im Gesamthirn ist folglich nur bedingt möglich. Nach kontinuierlicher Verbesserung der Versuchsbedingungen konnte ein Signal im Bereich des luminalen Endothels der Blutgefäße gefärbt werden, welches durch ein spezifisches immunisiertes Peptid geblockt werden kann (siehe Abschnitt 14.3.1, S. 55). Dies konnte sowohl für SGLT1 als auch für SGLT2 gezeigt werden und spricht für eine Lokalisation im Blutgefäßendothel und somit der BHS. Aufgrund der anfänglichen Schwierigkeiten der Detektion sollte ein tiefergehender Einblick in den Aufbau der BHS, im Speziellen den Kapillaren, erfolgen. Aus diesem Grund wurde eine Methode zur Isolation von Kapillaren aus dem menschlichen Gehirn *post mortem* etabliert (siehe Methodik 3.4, S. 33). Durch diesen Versuchsaufbau konnte der Hintergrund auf ein Minimum reduziert werden. Jedoch bleiben Gliazell-Endfüße weiterhin an den Kapillaren haften, da diese mit dem Endothel stark verbunden sind und nicht ohne weitere Zerstörung der Kapillarstruktur entfernt werden können. Da diese Verunreinigung nur sehr gering ist, kann die Expression der Glukosetransporter GLUT1, SGLT1 und SGLT2 trotz dessen direkt an der Hauptkomponente der BHS detektiert werden (siehe 4.3.2.2, S. 63). Die Isolation von Kapillaren aus unterschiedlichen Hirnregionen ergab, dass SGLT1 im Großhirn (graue und weiße Substanz) und dem Pons lokalisiert ist. Gleichermäßen findet man SGLT2 in der weißen Substanz und dem Pons, jedoch ebenfalls im Kleinhirn und nicht im Cortex (graue Substanz).

Der Lokalisationsnachweis der SGLT Proteinexpression wurde ferner per Western Blot sowohl im Gesamthirnllysate als auch im Lysat aus isolierten Kapillaren wiederholt (siehe Abschnitt 4.8, S. 85). Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Expression nach einer Traumatisierung in allen Regionen des Gehirns ansteigt. Während in der Kontrollprobe (Myokardinfarkt) SGLT1 und SGLT2 hauptsächlich im Pons und nur im sehr geringen Anteil in der grauen Substanz und im Kleinhirn vorkommt, ist das Protein nach einer lokalen Schädigung in allen Bereichen stark nachweisbar. Das Ergebnis der Western Blot Analyse von Kapillar-Proteinlysaten unterstützt die These der Lokalisation aus der Immunfluoreszenzfärbung.

Während SGLT1 in allen Bereichen in unterschiedlicher Expressionsstärke lokalisiert ist, kann SGLT2 in der grauen Substanz in kaum vorhandenem Anteil nachgewiesen werden.

Frühere Untersuchungen der Natrium-abhängigen Glukosetransporter erfolgten mittels Uptake-Assay oder Analyse der mRNA-Expression (Yu et al. 2010). Die Proteinanalyse erfolgte erst im späteren Zeitraum. Aus diesem Grund soll der Lokalisationsnachweis von SGLT1 und SGLT2 durch eine quantitative mRNA-Analyse vervollständigt werden. Da hierfür inzwischen kommerzielle Sonden erhältlich sind, wurden diese für eine Untersuchung ausgewählt. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass durch Experimente mit kommerziellen Sonden keine mRNA-Expression für SGLT2, bzw. eine sehr erniedrigte Expression für SGLT1 dargestellt werden kann. Versuche mit dem Glukosetransporter GLUT1 und auch die Kontrolle des Haushaltsgen β -Aktin verliefen dagegen stark positiv. Da der Nachweis der Proteine erfolgte, musste der Frage nachgegangen werden, ob die SGLT mRNA durch eventuelle Lyse im *post mortalen* Gewebe zersetzt wurde, oder ob die Methode schlichtweg fehlerhaft verlief. Zur Überprüfung dieser Thesen erfolgte ein veränderter Versuchsaufbau der qPCR. Es wurden spezifische Sonden für SGLT1 und SGLT2 manuell designt und die Experimente mit isolierter mRNA aus Gesamthirngewebe und Kapillaren wiederholt (Abschnitt 4.4.2, S. 68). Hierbei konnte aufgezeigt werden, dass vorhergehende Versuche mit Sonden fehlerhaft verliefen. Die Expression von SGLT mRNA konnte anhand designter Primer nachgewiesen werden. Woran dies liegt kann nicht aufgezeigt werden, da vom Hersteller keine weiteren Informationen, wie z. B. die Sequenz der Sonde bzw. Lokalisation der Target-mRNA-Sequenz, veröffentlicht werden. Zwei Faktoren können jedoch eine Rolle spielen.

Einerseits kann die kommerzielle Sonde eine geringe Spezifität und Sensitivität zur Detektion von humanem SGLT aus Gewebe aufweisen. Andererseits kann die Target-mRNA-Lokalisation in einem Bereich der SGLT-Sequenz liegen, welche in *post mortalem* Gewebe anfällig für eine frühzeitige Degeneration ist. Somit ist keine Detektion möglich. Die Lokalisation der mRNA kann nun mit der Lokalisation der SGLT-Proteine verglichen werden. Hierbei fällt auf, dass die SGLT1 in Kapillaren des Kleinhirns in hoher Konzentration vorliegt, während das Protein in der Immunfluoreszenz nicht nachgewiesen werden konnte. Ein analoges Ergebnis lässt sich für die weiße Substanz in Proben mit einer globalen Hirnschädigung darstellen. Hier kann ebenfalls mRNA nachgewiesen werden, während kein Signal für das Protein im Western Blot detektierbar ist. Auch für SGLT2 gibt es einen gravierenden Unterschied in Kapillaren der grauen Substanz. Hier liegt die mRNA mit hoher Expressionsstärke vor, während in der Immunfluoreszenz und im Western Blot kein Signal vorhanden ist. Diese Ergebnisse verwundern jedoch nicht, da ein zeitlicher Shift zwischen mRNA- und Proteinexpression allgemein bekannt ist. Hierbei reagiert die Änderung des mRNA-Levels schneller und sensitiver als die des Proteinlevels (Cheng et al. 2016).

5.4.2. Expressionsverlauf der Glukosetransporter

Die Fragestellung nach der zeitlichen Entstehung eines SHT ist in forensischen Untersuchungen von Todesfällen ein wichtiger Aspekt. Vor allem für ungeklärte Todesursachen, sowie gerichtlich angeordnete Ermittlungen ist die Eingrenzung der Zeitspanne zwischen Traumaentstehung und dem Versterben von großer Bedeutung.

Die These, dass Natrium-abhängige Glukosetransporter eine Aussage über die Überlebenszeit nach einer traumatisch bedingten Hirnveränderung besitzen wird durch die Erstellung eines zeitlichen Expressionsverlaufs dargestellt (siehe Abschnitt 4.7, S. 83). Im Gegensatz zu den *in vivo* Ergebnissen von Sebastian Wais kann im menschlichen Gehirn *post mortem* keine signifikante Änderung der GLUT1-Expression nachgewiesen werden. Der Transporter SGLT1 zeigt dagegen eine signifikante Expressionsänderung im contusionalen Gewebe nach 0, 7, 20.5 und 52 Stunden Überlebenszeit. Weiterhin ist die Erhöhung der SGLT1 Expression im traumatisierten Gewebe nach 72 Stunden Überlebenszeit höchst signifikant. Die statistische Bewertung der SGLT2 Expression stellt ein analoges Ergebnis dar.

Hier kann eine hohe signifikante Änderung der contusionalen Proben mit 7, 52 und 72 Stunden Überlebenszeit nachgewiesen werden. Die Erhöhte SGLT2 Signifikanz der Proben mit kurzen Überlebenszeiten im Gegensatz zu dem Transporter SGLT1 (MW[Probenanzahl] = 16,1) kann an der Stichprobengröße liegen. Da der Probenumfang für SGLT2 (MW[Probenanzahl] = 47,5) ein ca. 3-fach erhöhtes Datenmenge aufweist, kann die statistische Signifikanz exakter berechnet werden. Die Natrium-abhängigen Glukosetransporter könnte somit für die forensische Fragestellung der zeitlichen Entstehung eines SHT herangezogen werden.

Die erhaltenen Daten geben jedoch nur einen ersten Anhaltspunkt für die Korrelation der Expression mit dem zeitlichen Entstehen einer traumatisch bedingten Hirnveränderung. Weitere Überlebenszeitpunkte und vor allem eine höhere Anzahl an Verstorbenen mit gleichen Überlebenszeiten sind für die Darstellung eines exakten zeitlichen Verlaufs und somit für den Einsatz in der Routineanalyse unerlässlich. Ergänzend sollte eine tiefergehende Analyse der Glukosetransporter GLUT1 nicht außer Acht gelassen werden, da eine endgültige statistische Aussage erst bei einer großen Probenanzahl angegeben werden kann.

Im weiteren Verlauf dieses Forschungsthemas sollten Störgrößen wie vorhergehende Erkrankungen der Verstorbenen (z. B. Diabetes Mellitus und eventuelle Behandlung mittels SGLT-Inhibitoren) oder weitere Faktoren die zu einer Veränderung der Glukoseversorgung und somit der Expression der SLC-Transporter führen, mit in die Analyse einbezogen werden. Leider werden diese Faktoren und Vorerkrankungen nicht immer für eine gerichtlich angeordnete Obduktion angegeben, so dass sich diese Analyse als problematisch darstellt.

5.5. Bedeutung der Ergebnisse für die medizinische Forschung

Diese Arbeit weist die Expression der Natrium-abhängigen Glukosetransporter SGLT1 und SGLT2 an der luminalen Seite von Hirnkapillaren und somit der BHS nach. Diese Erkenntnis ist nicht nur für forensische Fragestellungen von großer Bedeutung. Eine erhöhte Expression dieser Transporter im menschlichen Gehirn nach einem Trauma kann zu schwerwiegenden Sekundärmechanismen und somit zur zusätzlichen Schädigung des Gewebes führen.

Es ist bekannt, dass der sekundär-aktive Transport von Glukose durch SGLTs zu einem Co-Transport von Wassermolekülen führt (Loo et al. 1996). Vemula et al. untersuchten die Korrelation der SGLT1-Expression und Ödembildung bei Mäusen mittels permanentem zerebralem Arterienverschluss (MCAO) (Vemula et al. 2009). Er beschreibt eine verminderte Ödembildung bei MCAO-Mäusen durch Behandlung mit Phlorizin, einem spezifischen SGLT-Inhibitor. Da eine erhöhte zerebrale SGLT1-Aktivierung nach ischämischer Hyperglykämie bei Tiermodellen berichtet wurde, kann die Hemmung durch Phlorizin zu einer verminderten ischämischen Schädigung des ZNS, sowie einer verringerten Ödembildung führen.

Diese Korrelation der SGLT-Expression und einer Zellschwellung kann durch die Analyse der gesammelten Gehirnproben nur unzureichend bestätigt werden. Die untersuchten Gehirne weisen ein leicht erhöhtes mittleres Gewicht von 1383 g, sowie oftmals sichtbare Wassereinlagerungen (siehe Anhang II-IV). Es erfolgte jedoch keine akkurate Analyse des Grad der Hirnschwellung. Diese Daten müssen jedoch noch weiter untersucht werden, um auch diese These effektiv zu bestätigen. Aufgrund der möglichen Bedeutung von Natrium-abhängigen Glukosetransportern bei der Verbesserung der Genesung nach einer traumatisch bedingten Hirnveränderung ist die in dieser Arbeit gezeigte direkte Lokalisierung von SGLT1 und SGLT2 an der BHS für eine verbesserte Präventions- und Behandlungsstrategie von größter Bedeutung. Diese Transporter können als Ansatzpunkt genutzt werden, um die Sekundärmechanismen nach einem SHT zumindest zu minimieren.

Auf der anderen Seite sei noch erwähnt, dass die Expression von SGLTs an der BHS eine wichtige Erkenntnis für weitere Entwicklung von Medikamenten für die Behandlung von Diabetes mellitus ist. Da SGLT Inhibitoren einen pharmakologischen Behandlungsansatz für Patienten mit Diabetes mellitus darstellen, ist es wichtig die Funktion der SGLTs für die Energieversorgung im Gehirn zu verstehen (Chao und Henry 2010). Die medizinische Verwendung von SGLT-Inhibitoren wie Phlorizin soll für eine reduzierte Glukoseaufnahme durch SGLT2 im Nierengewebe von Diabetespatienten sorgen. Allerdings können diese Inhibitoren auch an SGLT1 binden und ihre Fähigkeit des Glukosetransports senken. Es konnte überdies nachgewiesen werden, dass die Interaktion von Phlorizin mit SGLT1 stärker ist, als die Hemmung von SGLT2 (Raja und Kinne 2015). Derzeit gibt es keine Daten über die Auswirkungen von SGLT-Inhibitoren im Gehirn und im zentralen Nervensystem. Eine unbeabsichtigte SGLT-Hemmung kann allerdings zu einer signifikanten Störung der neuronalen Hirnfunktion führen, da hierdurch ein Glukosemangel des ZNS auftreten kann. Vor allem unter dem Aspekt, dass Patienten mit schwerer Diabetes Mellitus Erkrankung oder einer akuten Hyperglykämie zu einem erhöhten Risiko einer ischämisch bedingten Hirnschädigung mit geringen Überlebenschancen neigen (Luitse et al. 2012). Aus diesen Gründen ist eine eingehendere Kenntnis der SGLT-Aktivität und deren Mechanismen im menschlichen Gehirn an der BHS von großer Bedeutung.

6. Zusammenfassung

Glukosetransporter spielen eine wichtige Rolle in der Versorgung des Gehirns mit Nährstoffen und somit für den Erhalt der physiologischen Zellintegrität. Glukose wird über die Blut-Hirn-Schranke (BHS) mittels spezifischen transmembranen Transportproteinen der SLC-Genfamilie (GLUT, SGLT) befördert. Dabei scheint während physiologischen Bedingungen hauptsächlich der Glukosetransporter GLUT1 (SLC2A1) für die Energieversorgung des Gehirns zuständig zu sein.

Die Erforschung der SGLT-Expression ist in den letzten Jahren ein wichtiger Ansatzpunkt für neue Behandlungsstrategien vieler Erkrankungen, wie Diabetes Mellitus, maligne Neoplasien oder eines Herzinfarkts, geworden. Jedoch ist über deren Expression und Funktion im menschlichen Gehirn nur wenig bekannt. Besonders die Lokalisation entlang der BHS bleibt fraglich. Ein Großteil bisheriger Forschungsarbeiten beschäftigt sich hauptsächlich mit der Expressionsanalyse des Transporters SGLT1 im tierischen Gehirn *in vivo* (Pope et al. 1997; Balen et al. 2008; Yu et al. 2013). Es konnte aufgezeigt werden, dass SGLT1 mRNA exklusiv in Neuronen und nicht an der BHS exprimiert wird. Dies wird durch *in vitro* Analysen einer humanen Hirnendothelzelllinie bestätigt. Demnach kann kein SGLT1 unter physiologischen Bedingungen nachgewiesen werden (Sajja et al. 2014). Im menschlichen Hirngewebe besitzen SGLTs somit keine zentrale Funktion für den Glukosetransport an der BHS. Im Gegensatz dazu konnte eine Expression von SGLT sowohl *in vivo* als auch *in vitro* während hypoglykämischen Bedingungen belegt werden (Vemula et al. 2009; Sajja et al. 2014). Die Expression der SGLT-Transporter während einer ischämischen Hypoglykämie führt zu der Annahme, dass diese Transporter für die Aufrechterhaltung der Energieversorgung des geschädigten Hirngewebes notwendig sind. Um die physiologischen Mechanismen nach einem Glukosemangel zu untersuchen, wurden SHT-Modelle etabliert (Salvador et al. 2013). In einem experimentellen Modell des Schädel-Hirn-Traumas im Rahmen eines DFG-gefördertes Projekts ist ein Expressionsverlauf von Glukosetransportern im Maushirn und in Hirnendothelzellen erarbeitet worden (Wais 2012; Salvador et al. 2015). Somit könnten SGLTs als Ansatzpunkt für den Nachweis der Überlebenszeit nach einem SHT fungieren.

Die vorliegende Arbeit fokussiert sich auf die Expression der Natrium-abhängigen Glukosetransporter SGLT1 und SGLT2 im menschlichen Gehirn. Hierbei liegt das Hauptaugenmerk auf der Lokalisation dieser Transporter an der menschlichen BHS von *post mortalem* Hirngewebe. Weiterhin wird untersucht ob die Expressionsstärke von SGLT1 und SGLT2 eine Aussage über die Überlebenszeit von Verstorbenen nach einer traumatisch bedingten Hirnveränderung zulässt.

Die Lokalisation von SGLT1 und SGLT2 an der menschlichen BHS konnte durch die Etablierung eines Protokolls zur Isolation von Hirnkapillaren erfolgen. Vorab wurden alle verwendeten Antikörper auf ihre Spezifität mittels siRNA Transfektion und Blockierung der Immunfluoreszenzsignale mittels immunisierten Peptids getestet. Somit ist die Spezifität der detektierten SGLT1- und SGLT2-Expression in menschlichen Hirnkapillaren gewährleistet. Anschließend wird untersucht, in welchem zeitlichem Verlauf nach einer traumatisch bedingten Hirnveränderung die verschiedenen Formen der Glukosetransporter exprimiert werden und ob ggf. der Umfang und die Verteilung von SGLT1, SGLT2 und GLUT1 sowie das Verhältnis zueinander Auskünfte über eine vitale bzw. postmortale Entstehung eines Traumas bzw. dessen Überlebenszeit zulässt. Hierfür wird ein Expressionsschema der Glukosetransporter generiert, abhängig von Todeszeitpunkt und Todesursache. Es konnte festgestellt werden, dass GLUT1 nicht als Target für die Ermittlung der Überlebenszeit nach einem Trauma geeignet ist. Dahingegen zeigen SGLT1 und SGLT2 eine signifikante Änderung der Expressionsstärke im contusionalen Gewebe in Abhängigkeit von der Überlebenszeit. Obwohl diese vorläufigen Daten einen neuen Ansatzpunkt für die forensische Fragestellung aufzeigen, müssen weitere Experimente mit einem erhöhten Umfang der Probenanzahl und kürzere Zeitspannen der Überlebenszeiträume durchgeführt werden.

7. Summary

The transport of glucose across the endothelial cells of the human blood-brain barrier (hBBB) plays a major role for energy supply of the brain and therefore for neuronal integrity. Glucose enters the brain cells through specific transmembrane transporter proteins of the SLC-gene family (GLUT, SGLT). Under physiological conditions glucose uptake across the BBB seems to be mediated primarily by facilitated diffusion through glucose transporter 1 (GLUT1).

Although SGLTs are a known drug target for diabetes and furthermore play a role in other disease like cancer and cardiac ischemia, active glucose transport by SGLTs is hardly observed and very little is known about their expression or activity in human brain. Especially the function along the BBB remains uncertain. Up to now, expression analysis focused on SGLT1 and has been confirmed *in vivo* by analyzing brain tissue of animals (Poppe et al. 1997; Balen et al. 2008; Yu et al. 2013). Here detection mainly occurs in neurons, no SGLT1 mRNA in capillaries of the BBB could be found. Similarly *in vitro* experiments with a human brain microvascular endothelial cell line reveals no expression of SGLT1 under physiological conditions (Sajja et al. 2014). In human brain, SGLT1 is hardly expressed and so far could not be found along the BBB. In contrast to these findings, expression of SGLT1 could be detected *in vivo* as well as *in vitro* under hypoglycemic conditions (Vemula et al. 2009; Sajja et al. 2014). The occurrence of these transporters during ischemic hypoglycemia could lead to the conclusion that the secondary active glucose transport by SGLTs is necessary for additional glucose supply in injured brain. To investigate if SGLTs are required for the reconstruction of energy supply after glucose deficiency, traumatic brain injury (TBI) models were established to study secondary physiological mechanisms along the BBB established (Salvador et al. 2013). In an experimental CCI (controlled cortical impact) mouse model within a DFG-funded project, an expression pattern of glucose transporters in the mouse brain and in brain endothelial cells has been developed (Wais 2012; Salvador et al. 2015). Thus it could lead as a Target for evidence of the time of survival after TBI.

This study focuses on the sodium-dependent glucose transporters SGLT1 and SGLT2 expression in human brain. The main topic is to localize the sodium-dependent glucose transporters along the human BBB of *post mortem* brain tissue

and to examine whether SGLT expression allow a conclusion to be drawn about the survival time of a patient after TBI.

First of all the localization of SGLT1 and SGLT2 at the human BBB could be shown by establishment a capillary isolation protocol of human *post mortem* brain tissue. Therefore the antibody specificity was tested by a siRNA transfection protocol and blocking the immunofluorescence signal with an immunized peptide. Thus, specific SGLT1 and SGLT2 expression at the endothelial lining of the capillary lumen could be demonstrated. After attaching the value of SGLTs at the human BBB, the relationship of the glucose transporter expression in TBI tissue according to the survival time of the patient is presented. Hereby it should be clarified whether the expression and distribution of the transporters GLUT1, SGLT1 and SGLT2 as well as the relation to each other provide information on a vital or *post mortal* development of a trauma or its survival time. It could determine that GLUT1 is not suitable as a target for the representation of survival time after TBI. However, SGLT1 and SGLT2 show a significant change in the expression profile of traumatic brain regions. Here an increase according to the survival time after trauma can be shown. Although these preliminary data suggest a novel target for forensic questions, more experiments with an increased scope of survival time frames should be carried out.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der SLC2 Genfamilie. Die Transporter werden aufgrund ihrer Strukturunterschiede in drei Klassen eingeteilt (Manolescu et al. 2007).....	3
Abbildung 2: Erste Beschreibung des Natrium-gekoppelten Glukosetransport (Crane et al. 1961).....	6
Abbildung 3: Aufbau von SGLT1 (Turk et al. 1996).....	6
Abbildung 4: Aufbau der BHS (Sajja et al. 2016).....	9
Abbildung 5: Metabolische Kaskaden während einer Ischämie (Giza und Hovda 2001)	12
Abbildung 6: Zeitverlauf der Expression von SGLT1, SGLT2 und GLUT1 nach SHT16	
Abbildung 7: Aufbau des Western Blot	36
Abbildung 8: Phasentrennung mittels TriZol®; Die RNA befindet sich in der klaren, wässrigen Phase.	39
Abbildung 9: Stammbaum der Genfamilie SLC2 und SLC5 anhand deren Proteinsequenzen. Distance between branches and length of the lines indicates the degree of evolutionary divergence.....	47
Abbildung 10: <i>Molecular Clock Alignment</i> von Glukosetransportern der Familie SLC2 und SLC4;.....	48
Abbildung 11: Spezies zur Bestimmung der SGLT1 und SGLT2 Phylogenie.....	49
Abbildung 12: Phylogenese von SGLT1 und SGLT2;.....	50
Abbildung 13: Western Blot der transfizierten HEK293-Zellen.	52
Abbildung 14: Western Blot der transfizierten HEK293-Zellen (20 µg Gesamtprotein)	53
Abbildung 15: Densitometrische Auswertung der SGLT1 Western Blot Ergebnisse der transfizierten HEK293 Zellen;.....	53
Abbildung 16: Densitometrische Auswertung der SGLT2 Western Blot Ergebnisse der transfizierten HEK293 Zellen;.....	54
Abbildung 17: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von humanen Gehirn-Gefrierschnitten. GLUT1 (grün) und vWF (rot).	56
Abbildung 18: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von humanen Gehirn-Gefrierschnitten.	58
Abbildung 19: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von humanen Gehirn-Gefrierschnitten.	59

Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbung der isolierten Hirnkapillaren.	60
Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbung von GLUT1 (b, e) und SGLT1 (a) bzw. SGLT2 (d).....	61
Abbildung 22: Kolokalisation von SGLT1 / SGLT2 und GFAP (Gliazellmarker).	62
Abbildung 23: Lokalisation von SGLT1 in unterschiedlichen Bereichen des menschlichen Gehirns.	64
Abbildung 24: Lokalisation von SGLT2 in unterschiedlichen Bereichen des menschlichen Gehirns.	65
Abbildung 25: qPCR von GLUT1 spezifischen Sonden im menschlichen Gehirn nach globalem Sauerstoffmangel.	66
Abbildung 26: qPCR von SGLT1 spezifischen Sonden im menschlichen Gehirn nach globalem Sauerstoffmangel.	67
Abbildung 27: qPCR von SGLT2 spezifischen Sonden im menschlichen Gehirn nach globalem Sauerstoffmangel.	68
Abbildung 28: qPCR Schmelzkurve der verwendeten Primerpaare.	69
Abbildung 29: SGLT1 mRNA-Expression in humanem Gehirngewebe nach globalem Trauma.	70
Abbildung 30: SGLT2 mRNA-Expression in humanem Gehirngewebe nach globalem Trauma.	70
Abbildung 31: SGLT1 mRNA-Expression in humanem Gehirngewebe nach lokalem Trauma.	71
Abbildung 32: SGLT2 mRNA-Expression in humanem Gehirngewebe nach lokalem Trauma.	72
Abbildung 33: Western Blot zur Detektion von GLUT1 in humanem Gehirngewebe nach globalem Sauerstoffmangel.	73
Abbildung 34: GLUT1 Proteinexpression im menschlichen Gehirn nach Sauerstoffmangel.	74
Abbildung 35: Western Blot zur Detektion von SGLT1 in humanem Gehirngewebe nach globalem Sauerstoffmangel.	75
Abbildung 36: SGLT1 Proteinexpression im menschlichen Gehirn nach Sauerstoffmangel.	75
Abbildung 37: Western Blot zur Detektion von SGLT2 in humanem Gehirngewebe nach globalem Sauerstoffmangel.	76

Abbildung 38: SGLT2 Proteinexpression im menschlichen Gehirn nach Sauerstoffmangel.	76
Abbildung 39: Western Blot zur Detektion von GLUT1 in humanem Gehirngewebe nach lokalem Sauerstoffmangel.	77
Abbildung 40: Western Blot zur Detektion von SGLT1 in humanem Gehirngewebe nach lokalem Sauerstoffmangel.	78
Abbildung 41: Western Blot zur Detektion von SGLT2 in humanem Gehirngewebe nach lokalem Sauerstoffmangel.	79
Abbildung 42: GLUT1 Proteinexpression im menschlichen Gehirn nach lokaler Schädigung (SHT).	80
Abbildung 43: SGLT1 Proteinexpression im menschlichen Gehirn nach lokaler Schädigung (SHT).	81
Abbildung 44: SGLT2 Proteinexpression im menschlichen Gehirn nach lokaler Schädigung (SHT).	82
Abbildung 45: Expressionsverlauf der Glukosetransporter in Hirngewebeproben	84
Abbildung 46: Western Blot zur Detektion von SGLT1 in unterschiedlichen Hirnregionen.	85
Abbildung 47: Western Blot zur Detektion von SGLT2 in unterschiedlichen Hirnregionen.	86
Abbildung 48: Western Blot zur Detektion von SGLT in Kapillaren unterschiedlicher Hirnregionen.	87
Abbildung 49: Die Entwicklungsstadien des Gehirns nach Dr. P. MacLean	88

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die SLC2-Genfamilie (nach Uldry und Thorens 2004).....	2
Tabelle 2: Die SLC5-Genfamilie (nach Turk und Wright 2004).....	5
Tabelle 3: Primärantikörper für den Western Blot.....	28
Tabelle 4: Sekundärantikörper für den Western Blot.....	28
Tabelle 5: Primärantikörper für die Immunhistologie	28
Tabelle 6: Sekundärantikörper für die Immunhistologie.....	29
Tabelle 7: Sonden für qPCR.....	29
Tabelle 8: Primer für qPCR.....	29
Tabelle 9: Zusammensetzung eines 10 % SDS-Trenngels	35
Tabelle 10: Zusammensetzung eines Sammelgels	35
Tabelle 11: MasterMix Ansatz für die reverse Transkription.....	41
Tabelle 12: PCR-Programm der reversen Transkription.....	41
Tabelle 13: Master Mix Ansatz für die Prä-Amplifikation	42
Tabelle 14: PCR-Programm der Prä-Amplifikation	42
Tabelle 15: Master Mix Ansatz für die Real-Time PCR mit dem PowerUp™ SYBR® Green Master Mix	44
Tabelle 16: PCR-Programm der Real-Time-PCR	44
Tabelle 17: PCR-Programm der Real-Time PCR zur Darstellung der Schmelzkurve	44
Tabelle 18: Evolutionäre Zeitachse von SGLT1 und SGLT2	51
Tabelle 19: Protein- und mRNA-Lokalisationsnachweis von SGLT1	112
Tabelle 20: Protein- und mRNA-Lokalisationsnachweis von SGLT1	113

Abkürzungen

a. d.	auffüllen
ATP	Adenosintriphosphat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bp	Basenpaar
ca.	circa
CBF	zerebraler Blutfluss
CCI	controlled cortical impact
cDNA	komplementäre
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GFAP	Saures Gliafaserprotein
GLUT	Sodium-unabhängige Glukosetransporter / Natrium-unabhängige Glukosetransporter
IDV	„Integrated densitometry value“ / Integrierter Densitometriewert
kDA	Kilodalton
max.	maximal
min.	Minuten
Mio.	Millionen
MODS	Multiorganversagen
Nr.	Nummer
OGD	oxygen glucose deprivation
PMI	<i>Post mortem interval</i> / Postmortalzeit
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure

Abkürzungen

RT	Raumtemperatur
sek.	Sekunden
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SGLT	Sodium-abhängige Glukosetransporter / Natrium-abhängige Glukosetransporter
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
sog.	sogenannt
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrale Nervensystem

Anhang

I. Übersicht der Expressionsverhältnisse von SGLT1 und SGLT2 zur r Lokalisation in unterschiedlichen Gehirnregionen des Menschen.

Tabelle 19: Protein- und mRNA-Lokalisationsnachweis von SGLT1
 GS – Graue Substanz, WS – Weiße Substanz (bei der mRNA-Analyse zusammengefasst als Großhirnpräparat); CS – Contusional/traumatisiertes Gewebe, KH – Kleinhirn
 ++ starke Expression, + schwache Expression, - keine Expression, n. U. nicht untersucht

	Protein			mRNA	
	Immunfluoreszenz	Western Blot		qPCR	
	Global	Global	Lokal	Global	Lokale
Gesamthirn - GS	n. U.	+	++		
Gesamthirn - WS	n. U.	-	+	++	+
Gesamthirn – CS	n. U.	n. U.	++	++	++
Gesamthirn - KH	n. U.	+	++	+	++
Gesamthirn - Pons	n. U.	++	+	++	++
Kapillare – GS	++	n. U.	+		
Kapillare – WS	++	n. U.	++	++	++
Kapillare – CS	n. U.	n. U.	++	n. U.	+
Kapillare - KH	-	n. U.	n. U.	++	++
Kapillare - Pons	++	n. U.	n. U.	++	++

Literaturverzeichnis

Tabelle 20: Protein- und mRNA-Lokalisationsnachweis von SGLT1
 GS – Graue Substanz, WS – Weiße Substanz (bei der mRNA-Analyse zusammengefasst als Großhirnpräparat); CS –
 Contusional/traumatisiertes Gewebe, KH – Kleinhirn
 ++ starke Expression, + schwache Expression, - keine Expression, n. U. nicht untersucht

	Protein			mRNA	
	Immunfluoreszenz	Western Blot		qPCR	
	Global	Global	Lokal	Global	Lokal
Gesamthirn - GS	n. U.	++	++		
Gesamthirn - WS	n. U.	++	++	++	++
Gesamthirn – CS	n. U.	n. U.	++	+	+
Gesamthirn - KH	n. U.	+	+	+	++
Gesamthirn - Pons	n. U.	++	+	++	++
Kapillare – GS	-	n. U.	-	++	++
Kapillare – WS	++	n. U.	++		
Kapillare – CS	n. U.	n. U.	++	+	+
Kapillare - KH	++	n. U.	n. U.	++	++
Kapillare - Pons	+	n. U.	n. U.	++	++

II. Humane Proben nach lokalem Sauerstoffmangel (traumatisch bedingter Hirnveränderung)

Proben-nummer	Geschlecht	Alter [Jahre]	PMI	Überlebenszeit	Gehirngewicht [g]	Todesursache
LT1_13	M	85	7 d	0 h	1.120	Kopfschuss
LT2_13	m	77	5 d	7 h	1.430	Unfall mit SHT
LT3_13	w	63	1 d	37 h	1.490	Unfall mit SHT
LT4_13	w	15	2 d	3 h	1.390	Polytrauma mit SHT
LT5_13	w	94	3 d	3 h	1.119	Unfall mit SHT
LT6_13	w	89	4 d	72 h	1.180	Unfall mit SHT
LT7_13	w	78	3 d	20,5 h	1.200	Unfall mit SHT
LT8_13	w	92	5 d	52 h	1.160	Unfall mit SHT
LT1_14	m	51	2 d	0 h	1.120	Unfall mit SHT
LT2_14	m	48	2 d	121 d	1.420	MODS mit SHT
LT3_14	m	60	3 d	48 h	1.430	Unfall mit SHT
LT4_14	m	63	4 d	120 h	1.470	Unfall mit SHT
LT5_14	m	95	3 d	0 h	1.030	Kopfschuss
LT1_15	m	79	2 d	96 h	1.470	Unfall mit SHT
LT1_16	w	93	4 d	0 h	1.050	Unfall mit SHT

III. Humane Proben nach globalem Sauerstoffmangel (Strangulation, Erstickten)

Probennummer	Geschlecht	Alter [Jahre]	PMI	Gehirn- gewicht [g]	Todesursache
GT1_12	m	42	3 d	1.650	Strangulation
GT1_13	m	25	4 d	1.510	Intoxikation
GT2_13	m	25	5 h	1.300	Hypothermie
GT3_13	w	43	32 h	1.300	Drosselung
GT4_13	m	30	1d	1.510	Strangulation
GT5_13	m	22	2 d	1.470	Ertrinken
GT6_13	w	34	4 d	1.170	hyperkapnisches Erstickten
GT7_13	w	43	3 d	1.320	Strangulation
GT8_13	m	43	4 d	1.720	hypoxisches Erstickten
GT1_14	m	39	4 d	1.320	hyperkapnisches Erstickten
GT1_15	m	29	8 d	1.360	Polytrauma
GT1_16	m	41	6 d	1.660	Ertrinken

IV. Humane Kontrollproben

Probennummer	Geschlecht	Alter [Jahre]	PMI	Gehirn- gewicht [g]	Todesursache
K1_13	m	79	3 d	1.500	Myokardinfarkt
K2_13	m	72	2 d	1.480	Myokardinfarkt
K3_13	m	63	2 d	1.480	Myokardinfarkt
K1_14	m	82	5 d	1.350	Myokardinfarkt

V. Lizenzrechte der verwendeten Abbildungen

Folgende Abbildungen sind aus Publikationen entnommen und dürfen ohne gesonderte Genehmigung in einer wissenschaftlichen Promotionsarbeit verwendet werden:

- Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der SLC2 Genfamilie. Die Transporter werden aufgrund ihrer Strukturunterschiede in drei Klassen eingeteilt
Journal: *Physiology*
Copyright: APS - Rightslink® by Copyright Clearance Center
- Abbildung 2: Erste Beschreibung des Natrium-gekoppelten Glukosetransport (Crane et al. 1961)
Journal: *Physiol. Rev.*
Copyright: APS - Rightslink® by Copyright Clearance Center
- Abbildung 3: Aufbau von SGLT1 (Turk et al. 1996)
Journal: *J. Biol. Chem.*
Copyright: ASBMB – Copyright Permission Policy
- Abbildung 4: Aufbau der BHS
Journal: *J. Cereb. Blood Flow Metab.*
Copyright: SAGE-Publishing - Rightslink® by Copyright Clearance Center
- Abbildung 5: Metabolische Kaskaden während einer Ischämie (Giza und Hovda 2001)
Journal: *J. Athl. Train.*
Copyright: NATA - Permissions
- Abbildung 49: Die Entwicklungsstadien des Gehirns nach Dr. P. MacLean
Copyright: www.pixabay.com, alle Bilder dieser Seite sind ‚unter Creative Commons CC0‘ als Public Domain bzw. als gemeinfrei veröffentlicht.

Alle weiteren Abbildungen wurden eigens für die vorliegende Promotionsarbeit angefertigt oder zeigen Resultate der durchgeführten Experimente.

Literaturverzeichnis

Abbott, N. J. (2005): Dynamics of CNS Barriers. Evolution, Differentiation, and Modulation. In: *Cell Mol Neurobiol* 25 (1), S. 5–23. DOI: 10.1007/s10571-004-1374-y.

Bakay, L. (1965): Morphological and chemical studies in cerebral edema. Triethyl tin-induced edema. In: *Journal of the neurological sciences* 2 (1), S. 52–67. DOI: 10.1016/0022-510X(65)90062-6.

Balen, D.; Ljubojevic, M.; Breljak, D.; Brzica, H.; Zlender, V.; Koepsell, H.; Sabolic, I. (2008): Revised immunolocalization of the Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT1 in rat organs with an improved antibody. In: *AJP: Cell Physiology* 295 (2), C475-C489. DOI: 10.1152/ajpcell.00180.2008.

Barton, A. J. L.; Pearson, R. C. A.; Najlerahim, A.; Harrison, P. J. (1993): Pre-and Postmortem Influences on Brain RNA. In: *J. Neurochem.* 61 (1), S. 1–11. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1993.tb03532.x.

Bergsneider, M.; Hovda, D. A.; Lee, S. M.; Kelly, D. F.; McArthur, D. L.; Vespa, P. M. et al. (2000): Dissociation of cerebral glucose metabolism and level of consciousness during the period of metabolic depression following human traumatic brain injury. In: *J. Neurotrauma* 17 (5), S. 389–401. DOI: 10.1089/neu.2000.17.389.

Blair, J. A.; Wang, C.; Hernandez, D.; Siedlak, S. L.; Rodgers, M. S.; Achar, R. K. et al. (2016): Individual Case Analysis of Postmortem Interval Time on Brain Tissue Preservation. In: *PloS one* 11 (3), e0151615. DOI: 10.1371/journal.pone.0151615.

Brown, G. K. (2000): Glucose transporters: structure, function and consequences of deficiency. In: *Journal of inherited metabolic disease* 23 (3), S. 237–246. DOI: 10.1023/A:1005632012591.

Bullock, R.; Maxwell, W. L.; Graham, D. I.; Teasdale, G. M.; Adams, J. H. (1991): Glial swelling following human cerebral contusion. An ultrastructural study. In: *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 54 (5), S. 427–434. DOI: 10.1136/jnnp.54.5.427.

Cecchi, R. (2010): Estimating wound age: looking into the future. In: *Int. J. Legal Med.* 124 (6), S. 523–536. DOI: 10.1007/s00414-010-0505-x.

- Chao, E. C.; Henry, R. R. (2010): SGLT2 inhibition-a novel strategy for diabetes treatment. In: *Nature reviews. Drug discovery* 9 (7), S. 551–559. DOI: 10.1038/nrd3180.
- Charron F. M.; Blanchard M. G.; Lapointe JY. (2006): Intracellular hypertonicity is responsible for water flux associated with Na⁺/glucose cotransport. In: *Biophys. J.* 90 (10), S. 3546–3554. DOI: 10.1529/biophysj.105.076745.
- Chen, J.; Williams, S.; Ho, S.; Loraine H.; Hagan D.; Whaley, J. M.; Feder, J. N. (2010): Quantitative PCR tissue expression profiling of the human SGLT2 gene and related family members. In: *Diabetes therapy : research, treatment and education of diabetes and related disorders* 1 (2), S. 57–92. DOI: 10.1007/s13300-010-0006-4.
- Cheng, Z.; Teo, G.; Krueger, S.; Rock, T. M.; Koh, H. W. L.; Choi, H.; Vogel, C. (2016): Differential dynamics of the mammalian mRNA and protein expression response to misfolding stress. In: *Molecular systems biology* 12 (1), S. 855. DOI: 10.15252/msb.20156423.
- Chodobski, A.; Zink, B. J.; Szmydynger-Chodobska, J. (2011): Blood-brain barrier pathophysiology in traumatic brain injury. In: *Translational stroke research* 2 (4), S. 492–516. DOI: 10.1007/s12975-011-0125-x.
- Cornman, Scott R.; Schatz, Michael C.; Johnston, Spencer J.; Chen, Yan-Ping; Pettis, Jeff; Hunt, Greg et al. (2010): Genomic survey of the ectoparasitic mite *Varroa destructor*, a major pest of the honey bee *Apis mellifera*. In: *BMC genomics* 11, S. 602. DOI: 10.1186/1471-2164-11-602.
- Correale, J.; Villa, A. (2007): The blood-brain-barrier in multiple sclerosis: functional roles and therapeutic targeting. In: *Autoimmunity* 40 (2), S. 148–160. DOI: 10.1080/08916930601183522.
- Crane, R. K.; Robert K.; Miller, D.; Bihler, I. (1961): The restrictions on possible mechanisms of intestinal transport of sugars. In: *Membrane Transport and Metabolism. Proceedings of a Symposium held in Prague 1960*, 439–449.
- Davidsson, Pia; Paulson, Linda; Hesse, Camilla; Blennow, Kaj; Nilsson, Carol L. (2001): Proteome studies of human cerebrospinal fluid and brain tissue using a preparative two-dimensional electrophoresis approach prior to mass spectrometry. In: *Proteomics* 1 (3), S. 444–452. DOI: 10.1002/1615-9861(200103)1:3<444::AID-PROT444>3.0.CO;2-Q.

Dejana, E. (2004): Endothelial cell-cell junctions: happy together. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 5 (4), S. 261–270. DOI: 10.1038/nrm1357.

Ehrlich, P. (1885): Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus: Eine Farbanalytische Studie. Berlin: Hirschwald.

Elfeber, K.; Kohler, A.; Lutzenburg, M.; Osswald, C.; Galla, HJ.; Witte, O. W.; Koepsell, H. (2004): Localization of the Na⁺/D-glucose cotransporter SGLT1 in the blood-brain barrier. In: *Histochem. Cell Biol.* 121 (3), S. 201–207. DOI: 10.1007/s00418-004-0633-9.

Erslooh, F.; Bernsmeier, R. A.; Hillesheim, H. (1958): Der Glucoseverbrauch des Gehirns und seine Abhängigkeit von der Leber. In: *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten, vereinigt mit Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* 196 (6), S. 611–626.

Farrell, C. L.; Pardridge, W. M. (1991): Blood-brain barrier glucose transporter is asymmetrically distributed on brain capillary endothelial luminal and abluminal membranes: an electron microscopic immunogold study. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (13), S. 5779–5783.

Feric, M.; Zhao, B.; Hoffert, J. D.; Pisitkun, T.; Knepper, M. A. (2011): Large-scale phosphoproteomic analysis of membrane proteins in renal proximal and distal tubule. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 300 (4), C755-70. DOI: 10.1152/ajpcell.00360.2010.

Fischbarg, J.; Kuang, K. Y.; Vera, J. C.; Arant, S.; Silverstein, S. C.; Loike, J.; Rosen, O. M. (1990): Glucose transporters serve as water channels. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 (8), S. 3244–3247.

Fukumoto, H.; Seino, S.; Imura, H.; Seino, Y.; Bell, G. I. (1988): Characterization and expression of human HepG2/erythrocyte glucose-transporter gene. In: *Diabetes* 37 (5), S. 657–661. DOI: 10.2337/diab.37.5.657.

Giza, C. C.; Hovda, D. A. (2001): The Neurometabolic Cascade of Concussion. In: *J Athl Train.* 36 (3), S. 228–235.

Giza, C. C.; Hovda, D. A. (2014): The new neurometabolic cascade of concussion. In: *Neurosurgery* 75 Suppl 4, S24-33. DOI: 10.1227/NEU.0000000000000505.

- Grieb, P.; Forster, R. E.; Strome, D.; Goodwin, C. W.; Pape, P. C. (1985): O₂ exchange between blood and brain tissues studied with ¹⁸O₂ indicator-dilution technique. In: *J. Appl. Physiol.* 58 (6), S. 1929–1941.
- Hackett, P. H.; Yarnell, P. R.; Hill, R.; Reynard, K.; Heit, J.; McCormick, J. (1998): High-altitude cerebral edema evaluated with magnetic resonance imaging. Clinical correlation and pathophysiology. In: *JAMA* 280 (22), S. 1920–1925. DOI: 10.1001/jama.280.22.1920.
- Harada, S.; Fujita-Hamabe, W.; Tokuyama, S. (2012): Ischemic stroke and glucose intolerance. A review of the evidence and exploration of novel therapeutic targets. In: *Journal of pharmacological sciences* 118 (1), S. 1–13. DOI: 10.1254/jphs.11R04CR.
- Harada, S.; Yamazaki, Y.; Nishioka, H.; Tokuyama, S. (2013): Neuroprotective effect through the cerebral sodium-glucose transporter on the development of ischemic damage in global ischemia. In: *Brain Research* 1541, S. 61–68. DOI: 10.1016/j.brainres.2013.09.041.
- Hausmann, R.; Betz, P. (2000): The time course of the vascular response to human brain injury--an immunohistochemical study. In: *International journal of legal medicine* 113 (5), S. 288–292. DOI: 10.1007/s004149900126.
- Hausmann, R.; Kaiser, A.; Lang, C.; Bohnert, M.; Betz, P. (1999): A quantitative immunohistochemical study on the time-dependent course of acute inflammatory cellular response to human brain injury. In: *Int. J. Legal Med.* 112 (4), S. 227–232. DOI: 10.1007/s004140050241.
- Hausmann, R.; Vogel, C.; Seidl, S.; Betz, P. (2006): Value of morphological parameters for grading of brain swelling. In: *Int. J. Legal Med.* 120 (4), S. 219–225. DOI: 10.1007/s00414-005-0021-6.
- Hediger, M. A.; Coady, M. J.; Ikeda, T. S.; Wright, E. M. (1987): Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter. In: *Nature* 330 (6146), S. 379–381. DOI: 10.1038/330379a0.
- Hediger, M. A.; Turk, E.; Pajor, A. M.; Wright, E. M. (1989): Molecular genetics of the human Na⁺/glucose cotransporter. In: *Klin. Wochenschr.* 67 (17), S. 843–846. DOI: 10.1007/BF01717337.

- Heinrich, M.; Matt, K.; Lutz-Bonengel, S.; Schmidt, U. (2007): Successful RNA extraction from various human postmortem tissues. In: *Int. J. Legal Med.* 121 (2), S. 136–142. DOI: 10.1007/s00414-006-0131-9.
- Hummel, C. S.; Lu, C.; Loo, D. D. F.; Hirayama, B. A.; Voss, A. A.; Wright, E. M. (2011): Glucose transport by human renal Na⁺/D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2. In: *AJP: Cell Physiology* 300 (1), C14-21. DOI: 10.1152/ajpcell.00388.2010.
- Huth, A.; Vennemann, B.; Fracasso, T.; Lutz-Bonengel, S.; Vennemann, M. (2013): Apparent versus true gene expression changes of three hypoxia-related genes in autopsy derived tissue and the importance of normalisation. In: *Int. J. Legal Med.* 127 (2), S. 335–344. DOI: 10.1007/s00414-012-0787-2.
- Huxley-Jones, Julie; Clarke, Toni-Kim; Beck, Christine; Toubaris, George; Robertson, David L.; Boot-Handford, Raymond P. (2007): The evolution of the vertebrate metzincins; insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio*. In: *BMC evolutionary biology* 7, S. 63. DOI: 10.1186/1471-2148-7-63.
- Jenkins, L. W.; Povlishock, J. T.; Becker, D. P.; Miller, J. D.; Sullivan, H. G. (1979): Complete cerebral ischemia. An ultrastructural study. In: *Acta neuropathologica* 48 (2), S. 113–125. DOI: 10.1007/BF00691152.
- Kalaria, R. N.; Gravina, S. A.; Schmidley, J. W.; Perry, G.; Harik, S. I. (1988): The glucose transporter of the human brain and blood-brain barrier. In: *Ann. Neurol.* 24 (6), S. 757–764. DOI: 10.1002/ana.410240610.
- Kasahara, M.; Hinkle, P. C. (1977): Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes. In: *J. Biol. Chem.* 252 (20), S. 7384–7390.
- Kaur, C.; Ling, E. (2008): Blood Brain Barrier in Hypoxic-Ischemic Conditions. In: *CNR* 5 (1), S. 71–81. DOI: 10.2174/156720208783565645.
- Kimelberg, H. K. (1995): Current concepts of brain edema. Review of laboratory investigations. In: *J. Neurosurg.* 83 (6), S. 1051–1059. DOI: 10.3171/jns.1995.83.6.1051.
- Kimelberg, H. K.; Ransom B. R. (1986): Physiological and pathological aspects of astrocyte swelling. In: Fedoroff S. und Vernadakis E. (Hg.): *Astrocytes. Cell Biology and Pathology of Astrocytes*. Orlando, Florida: Academic Press. Inc. (Astrocytes, Vol 3), S. 129–166.

- Klatzo, I. (1967): Neuropathological aspects of brain edema. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 26 (1), S. 1–14. DOI: 10.1097/00005072-196701000-00001.
- Krowczynska, A.; Yenofsky, R.; Brawerman, G. (1985): Regulation of messenger RNA stability in mouse erythroleukemia cells. In: *Journal of Molecular Biology* 181 (2), S. 231–239. DOI: 10.1016/0022-2836(85)90087-7.
- Kumagai, A. K.; Dwyer, K. J.; Pardridge, W. M. (1994): Differential glycosylation of the GLUT1 glucose transporter in brain capillaries and choroid plexus. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1193 (1), S. 24–30. DOI: 10.1016/0005-2736(94)90328-X.
- Leonard, S.; Logel, J.; Luthman, D.; Casanova, M.; Kirch, D.; Freedman, R. (1993): Biological stability of mRNA isolated from human postmortem brain collections. In: *Biological Psychiatry* 33 (6), S. 456–466. DOI: 10.1016/0006-3223(93)90174-C.
- Liu, Y.; Liu, F.; Iqbal, K.; Grundke-Iqbal, I.; Gong, CX. (2008): Decreased glucose transporters correlate to abnormal hyperphosphorylation of tau in Alzheimer disease. In: *FEBS letters* 582 (2), S. 359–364. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.12.035.
- Loike, J. D.; Cao, L.; Kuang, K.; Vera, J. C.; Silverstein, S. C.; Fischbarg, J. (1993): Role of facilitative glucose transporters in diffusional water permeability through J774 cells. In: *J. Gen. Physiol.* 102 (5), S. 897–906. DOI: 10.1085/jgp.102.5.897.
- Long, D. M. (1982): Traumatic brain edema. In: *Clinical neurosurgery* 29, S. 174–202.
- Loo, D. D.; Zeuthen, T.; Chandy, G.; Wright, E. M. (1996): Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (23), S. 13367–13370.
- Loo, D. D. F.; Wright, E. M.; Zeuthen, T. (2002): Water pumps. In: *J. Physiol. (Lond.)* 542 (Pt 1 // 1), S. 53–60. DOI: 10.1113/jphysiol.2002.018713.
- Luitse, M. JA.; Biessels, G. J.; Rutten, G. E.; Kappelle, L. J. (2012): Diabetes, hyperglycaemia, and acute ischaemic stroke. In: *The Lancet Neurology* 11 (3), S. 261–271. DOI: 10.1016/S1474-4422(12)70005-4.
- MacAulay, N.; Zeuthen, T. (2010): Water transport between CNS compartments: contributions of aquaporins and cotransporters. In: *Neuroscience* 168 (4), S. 941–956. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2009.09.016.

- MacLean, Paul D.; Kral, V. A. (1973): A triune concept of the brain and behaviour. Toronto, Buffalo: Published for the Ontario Mental Health Foundation by University of Toronto Press (The Clarence M. Hincks memorial lectures, 1969).
- Maher, F.; Vannucci, S. J.; Simpson, I. A. (1993): Glucose transporter isoforms in brain: absence of GLUT3 from the blood-brain barrier. In: *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 13 (2), S. 342–345. DOI: 10.1038/jcbfm.1993.43.
- Maher, F.; Vannucci, S. J.; Simpson, I. A. (1994): Glucose transporter proteins in brain. In: *FASEB J.* 8 (13), S. 1003–1011.
- Mann, Giovanni E.; Yudilevich, David L.; Sobrevia, Luis (2003): Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. In: *Physiological Reviews* 83 (1), S. 183–252. DOI: 10.1152/physrev.00022.2002.
- Manolescu, A. R.; Witkowska, K.; Kinnaird, A.; Cessford, T.; Cheeseman, C. (2007): Facilitated hexose transporters: new perspectives on form and function. In: *Physiology (Bethesda, Md.)* 22, S. 234–240. DOI: 10.1152/physiol.00011.2007.
- Matsuoka, T.; Nishizaki, T.; Kisby, G. E. (1998): Na⁺-dependent and phlorizin-inhibitable transport of glucose and cycasin in brain endothelial cells. In: *J. Neurochem.* 70 (2), S. 772–777. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1998.70020772.x.
- Maxson, R.; Mohun, T.; Gormezano, G.; Kedes, L. (1987): Evolution of late H2A, H2B, and H4 histone genes of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. In: *Nucleic acids research* 15 (24), S. 10569–10582. DOI: 10.1093/nar/15.24.10569.
- Mueckler, M.; Caruso, C.; Baldwin, S.; Panico, M.; Blench, I.; Morris, H. et al. (1985): Sequence and structure of a human glucose transporter. In: *Science* 229 (4717), S. 941–945. DOI: 10.1126/science.3839598.
- Mueckler, M.; Thorens, B. (2013): The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. In: *Mol. Aspects Med.* 34 (2-3), S. 121–138. DOI: 10.1016/j.mam.2012.07.001.
- Naftalin, R. J. (2008): Osmotic Water Transport with Glucose in GLUT2 and SGLT // Osmotic water transport with glucose in GLUT2 and SGLT. In: *Biophysical Journal* 94 (10), S. 3912–3923. DOI: 10.1529/biophysj.107.122531.
- Neuhaus, Winfried; Burek, Malgorzata; Djuzenova, Cholpon S.; Thal, Serge C.; Koepsell, Hermann; Roewer, Norbert; Forster, Carola Y. (2012): Addition of NMDA-

receptor antagonist MK801 during oxygen/glucose deprivation moderately attenuates the upregulation of glucose uptake after subsequent reoxygenation in brain endothelial cells. In: *Neuroscience letters* 506 (1), S. 44–49. DOI: 10.1016/j.neulet.2011.10.045.

Nishimura, M.; Naito, S. (2005): Tissue-specific mRNA Expression Profiles of Human ATP-binding Cassette and Solute Carrier Transporter Superfamilies. In: *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 20 (6), S. 452–477. DOI: 10.2133/dmpk.20.452.

Nishizaki, T.; Matsuoka, T. (1998): Low glucose enhances Na⁺/glucose transport in bovine brain artery endothelial cells. In: *Stroke* 29 (4), S. 844–849.

Paepe, M. E. de; Mao, Q.; Huang, C.; Zhu, D.; Jackson, C. L.; Hansen, K. (2002): Postmortem Rna and Protein Stability in Perinatal Human Lungs. In: *Diagnostic Molecular Pathology* 11 (3), S. 170–176.

Panayotova-Heiermann, Mariana; Eskandari, Sepehr; Turk, Eric; Zampighi, Guido A.; Wright, Ernest M. (1997): Five Transmembrane Helices Form the Sugar Pathway through the Na⁺ /Glucose Cotransporter. In: *J. Biol. Chem.* 272 (33), S. 20324–20327. DOI: 10.1074/jbc.272.33.20324.

Pardridge, W. M. (2005): The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. In: *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2 (1), S. 3–14. DOI: 10.1602/neurorx.2.1.3.

Pardridge, W. M.; Boado, R. J.; Farrell, C. R. (1990): Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier. Studies with quantitative western blotting and in situ hybridization. In: *J. Biol. Chem.* 265 (29), S. 18035–18040.

Perrett, C. W.; Marchbanks, R. M.; Whatley, S. A. (1988): Characterisation of messenger RNA extracted post-mortem from the brains of schizophrenic, depressed and control subjects. In: *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 51 (3), S. 325–331. DOI: 10.1136/jnnp.51.3.325.

Poppe, R.; Karbach, U.; Gambaryan, S.; Wiesinger, H.; Lutzenburg, M.; Kraemer, M. et al. (1997): Expression of the Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT1 in neurons. In: *J. Neurochem.* 69 (1), S. 84–94. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1997.69010084.x.

- Poudel, R. R. (2013): Renal glucose handling in diabetes and sodium glucose cotransporter 2 inhibition. In: *Indian journal of endocrinology and metabolism* 17 (4), S. 588–593. DOI: 10.4103/2230-8210.113725.
- Preston, G. M.; Carroll, T. P.; Guggino, W. B.; Agre, P. (1992): Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. In: *Science* 256 (5055), S. 385–387. DOI: 10.1126/science.256.5055.385.
- Qutub, A. A.; Hunt, C. A. (2005): Glucose transport to the brain. A systems model. In: *Brain research. Brain research reviews* 49 (3), S. 595–617. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2005.03.002.
- Raff, T.; van der Giet, M.; Endemann, D.; Wiederholt, T.; Paul, M. (1997): Design and testing of beta-actin primers for RT-PCR that do not co-amplify processed pseudogenes. In: *BioTechniques* 23 (3), S. 456–460.
- Raja, M.; Kinne, R. K. H. (2015): Identification of phlorizin binding domains in sodium-glucose cotransporter family: SGLT1 as a unique model system. In: *Biochimie* 115, S. 187–193. DOI: 10.1016/j.biochi.2015.06.003.
- Reid, E. W. (1892): Preliminary Report on Experiments upon Intestinal Absorption without Osmosis. In: *Br Med J* 1 (1639), S. 1133–1134.
- Remy, S.; Beck, H. (2006): Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. In: *Brain : a journal of neurology* 129 (Pt 1), S. 18–35. DOI: 10.1093/brain/awh682.
- Sabolić I.; Skarica M.; Gorboulev V.; Ljubojević M.; Balen, D.; Herak-Kramberger C. M.; Koepsell, H. (2006): Rat renal glucose transporter SGLT1 exhibits zonal distribution and androgen-dependent gender differences. In: *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 290 (4), F913-26. DOI: 10.1152/ajprenal.00270.2005.
- Sajja, R. K.; Prasad, S.; Cucullo, L. (2014): Impact of altered glycaemia on blood-brain barrier endothelium: an in vitro study using the hCMEC/D3 cell line. In: *Fluids and barriers of the CNS* 11 (1), S. 8. DOI: 10.1186/2045-8118-11-8.
- Sajja, R.K.; Rahman, S.; Cucullo, L. (2016): Drugs of abuse and blood-brain barrier endothelial dysfunction: A focus on the role of oxidative stress. In: *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 36 (3), S. 539–554. DOI: 10.1177/0271678X15616978.

Salvador, Ellaine; Burek, Malgorzata; Förster, Carola Y. (2015): Stretch and/or oxygen glucose deprivation (OGD) in an in vitro traumatic brain injury (TBI) model induces calcium alteration and inflammatory cascade. In: *Frontiers in cellular neuroscience* 9, S. 323. DOI: 10.3389/fncel.2015.00323.

Salvador, Ellaine; Neuhaus, Winfried; Foerster, Carola (2013): Stretch in brain microvascular endothelial cells (cEND) as an in vitro traumatic brain injury model of the blood brain barrier. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (80), e50928. DOI: 10.3791/50928.

Sasseville, Louis J.; Morin, Michael; Coady, Michael J.; Blunck, Rikard; Lapointe, Jean-Yves (2016): The Human Sodium-Glucose Cotransporter (hSGLT1) Is a Disulfide-Bridged Homodimer with a Re-Entrant C-Terminal Loop. In: *PloS one* 11 (5), e0154589. DOI: 10.1371/journal.pone.0154589.

Sasseville L. J.; Cuervo J. E.; Lapointe JY.; Noskov, Sergei Y. (2011): The structural pathway for water permeation through sodium-glucose cotransporters. In: *Biophys. J.* 101 (8), S. 1887–1895. DOI: 10.1016/j.bpj.2011.09.019.

Scheepers, A.; Joost, H. G.; Schürmann, A.; Scheepers, Andrea; Joost, Hans-Georg; Schurmann, Annette (2004): The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function // The glucose transporter families SGLT and GLUT. Molecular basis of normal and aberrant function. In: *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 28 (5), S. 364–371. DOI: 10.1177/0148607104028005364.

Schewe, G.; Adebahr, G. (1970): Sekundärschäden am Gehirn bei Schädeltrauma. In: *G. Z. Rechtsmed (Zeitschrift für Rechtsmedizin)* 67 (3), S. 129–146. DOI: 10.1007/BF00200353.

Serlin, Y.; Shelef, I.; Knyazer, B.; Friedman, A. (2015): Anatomy and physiology of the blood-brain barrier. In: *Seminars in cell & developmental biology* 38, S. 2–6. DOI: 10.1016/j.semcd.2015.01.002.

Shah, K.; Desilva, S.; Abbruscato, T. J. (2012): The role of glucose transporters in brain disease. Diabetes and Alzheimer's Disease. In: *IJMS* 13 (10), S. 12629–12655. DOI: 10.3390/ijms131012629.

Shepherd, P. R.; Gould, G. W.; Colville, C. A.; McCoid, S. C.; Gibbs, E. M.; Kahn, B. B. (1992): Distribution of GLUT3 glucose transporter protein in human tissues. In:

Biochemical and Biophysical Research Communications 188 (1), S. 149–154. DOI: 10.1016/0006-291X(92)92362-2.

Simard, J. M.; Kent, T. A.; Chen, M.; Tarasov, K. V.; Gerzanich, V. (2007): Brain oedema in focal ischaemia. Molecular pathophysiology and theoretical implications. In: *The Lancet Neurology* 6 (3), S. 258–268. DOI: 10.1016/S1474-4422(07)70055-8.

Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D. et al. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. In: *Analytical Biochemistry* 150 (1), S. 76–85. DOI: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.

Staub, F.; Mackert, B.; Kempfski, O.; Haberstock, J.; Peters, J.; Baethmann, A. (1994): Schwellung und Schädigung von Nerven- und Gliazellen durch Azidose. In: *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie : AINS* 29 (4), S. 203–209. DOI: 10.1055/s-2007-996719.

Stuart, Mark C.; Kouimtzi, Maria; Hill, Suzanne (2009): WHO model formulary 2008. Geneva: World Health Organization.

Tamura, Koichiro; Stecher, Glen; Peterson, Daniel; Filipowski, Alan; Kumar, Sudhir (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. In: *Molecular biology and evolution* 30 (12), S. 2725–2729. DOI: 10.1093/molbev/mst197.

Teasdale, G.; Jennett, B. (1974): Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. In: *Lancet (London, England)* 2 // 304 (7872), S. 81–84. DOI: 10.1016/S0140-6736(74)91639-0.

Thal, Serge C.; Schaible, Eva-Verena; Neuhaus, Winfried; Scheffer, David; Brandstetter, Moritz; Engelhard, Kristin et al. (2013): Inhibition of proteasomal glucocorticoid receptor degradation restores dexamethasone-mediated stabilization of the blood-brain barrier after traumatic brain injury. In: *Critical care medicine* 41 (5), S. 1305–1315. DOI: 10.1097/CCM.0b013e31827ca494.

Tönnis, W.; Loew, F. (1953): Einteilung der gedeckten Hirnschädigungen. In: *Ärztliche Praxis* 5 (36), S. 13–14.

Turk, E.; Kerner, C. J.; Lostao, M. P.; Wright, E. M. (1996): Membrane topology of the human Na⁺/glucose cotransporter SGLT1. In: *J. Biol. Chem.* 271 (4), S. 1925–1934. DOI: 10.1074/jbc.271.4.1925.

- Turk, E.; Wright, E. M. (2004): The sodium/glucose cotransport family SLC5. In: *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 447 (5), S. 510–518. DOI: 10.1007/s00424-003-1063-6.
- Tyagi, Navneet K.; Goyal, Pankaj; Kumar, Azad; Pandey, Dharmendra; Siess, Wolfgang; Kinne, Rolf K. H. (2005): High-yield functional expression of human sodium/d-glucose cotransporter1 in *Pichia pastoris* and characterization of ligand-induced conformational changes as studied by tryptophan fluorescence. In: *Biochemistry* 44 (47), S. 15514–15524. DOI: 10.1021/bi051377q.
- Uldry, M.; Thorens, B. (2004): The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 447 (5), S. 480–489. DOI: 10.1007/s00424-003-1085-0.
- Vallon, V.; Thomson, S. C. (2017): Targeting renal glucose reabsorption to treat hyperglycaemia: the pleiotropic effects of SGLT2 inhibition. In: *Diabetologia* 60 (2), S. 215–225. DOI: 10.1007/s00125-016-4157-3.
- Vannucci, S. J.; Clark, R. R.; Koehler-Stec, E.; Li, K.; Smith, C. B.; Davies, P. et al. (1998): Glucose transporter expression in brain: relationship to cerebral glucose utilization. In: *Dev. Neurosci.* 20 (4-5), S. 369–379.
- Vemula, S.; Roder, K. E.; Yang, T.; Bhat, G. J.; Thekkumkara, T. J.; Abbruscato, T. J. (2009): A functional role for sodium-dependent glucose transport across the blood-brain barrier during oxygen glucose deprivation. In: *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 328 (2), S. 487–495. DOI: 10.1124/jpet.108.146589.
- Vrhovac, I.; Balen, E. D.; Klessen, D.; Burger, C.; Breljak, D.; Kraus, O. et al. (2015): Localizations of Na(+)-D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2 in human kidney and of SGLT1 in human small intestine, liver, lung, and heart. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2014 // 467 (9), S. 1881–1898. DOI: 10.1007/s00424-014-1619-7.
- Wais, S. (2012): Die Rolle der Glukosetransporter an der Blut-Hirn-Schranke nach einem Schädel-Hirn-Trauma und deren eventueller Einfluss auf die Entwicklung eines sekundären Hirnödems. Unveröffentlichte Dissertation. Unter Mitarbeit von C. Forster. Universität Würzburg.
- Werner, C.; Engelhard, K. (2007): Pathophysiology of traumatic brain injury. In: *British journal of anaesthesia* 99 (1), S. 4–9. DOI: 10.1093/bja/aem131.

Young, W.; Constantini, S. (1994): Ionic and water shifts in injured central nervous tissues. In: Salzman S.K. und Faden A.I. (Hg.): *The Neurobiology of Central Nervous System Trauma*. New York: Oxford University Press, S. 123–130.

Yu, A. S.; Hirayama, B. A.; Timbol, G.; Liu, J.; Basarah, E.; Kepe, V. et al. (2010): Functional expression of SGLTs in rat brain. In: *AJP: Cell Physiology* 299 (6), C1277–C1284. DOI: 10.1152/ajpcell.00296.2010.

Yu, A. S.; Hirayama, B. A.; Timbol, G.; Liu, J.; Diez-Sampedro, A.; Kepe, V. et al. (2013): Regional distribution of SGLT activity in rat brain in vivo. In: *AJP: Cell Physiology* 304 (3), C240–C247. DOI: 10.1152/ajpcell.00317.2012.

Zeuthen, T.; Belhage B.; Zeuthen E. (2006): Water transport by Na⁺-coupled cotransporters of glucose (SGLT1) and of iodide (NIS). The dependence of substrate size studied at high resolution. In: *J. Physiol. (Lond.)* 570 (Pt 3), S. 485–499. DOI: 10.1113/jphysiol.2005.100933.

Zeuthen, T.; Meinild, A.-K.; Loo, D. D. F.; Wright, E. M.; Klaerke, D. A. (2001): Isotonic transport by the Na⁺ + -glucose cotransporter SGLT1 from humans and rabbit. In: *J. Physiol. (Lond.)* 531 (3), S. 631–644. DOI: 10.1111/j.1469-7793.2001.0631h.x.

Zhao, Y.; Fung, C.; Shin, D.; Shin, B-C; Thamocharan, S.; Sankar, R. et al. (2010): Neuronal glucose transporter isoform 3 deficient mice demonstrate features of autism spectrum disorders. In: *Molecular psychiatry* 15 (3), S. 286–299. DOI: 10.1038/mp.2009.51.

Zlokovic, B. V. (2008): The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. In: *Neuron* 57 (2), S. 178–201. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.01.003.

Erklärungen nach §4 Abs. 3 Satz 3, 5, 8 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „**Expression von Natrium/Glukose-Cotransportern im menschlichen Gehirn bei Todesfällen durch Schädel-Hirn-Trauma und Todesfällen durch Ersticken**“, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled: „ Expression von Natrium/Glukose-Cotransportern im menschlichen Gehirn bei Todesfällen durch Schädel-Hirn-Trauma und Todesfällen durch Ersticken“ is the result of my own work.

I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Gerbrunn, den 28.09.2017

Unterschrift

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Michael Bohnert, der mir die Möglichkeit gegeben hat meine Arbeit im Institut für Rechtsmedizin der Universität Würzburg durchzuführen.

Ebenso danke ich Frau Professor Dr. Carola Förster für die Kooperation mit Ihrer Forschungsgruppe in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Würzburg, der Bereitstellung des Themas und für das Vertrauen in mich, auch eigenständig an diesem Thema arbeiten zu dürfen.

Bei Herrn Professor Dr. Georg Krohne möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferates als Vertreter der Fakultät der Biologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg bedanken.

Herr Professor Dr. Hermann Koepsell danke ich für die hilfreichen Kritiken und zahlreichen Diskussionsrunden.

Des Weiteren gilt mein Dank den Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Würzburg für die kompetente Hilfe bei immer neuen Fragestellungen, insbesondere der Abteilung Sektion für die Möglichkeit der Probenbesorgung.

Einen großen Dank verdienen auch alle Mitarbeiter der Forschungsgruppen in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, welche mir immer zur Seite standen und für viele schöne Stunden auch in problematischen Zeiten gesorgt haben. Frau Elisabeth Wilken, Frau Sabine Adam und Frau Susanne Breunig danke ich für Ihre Unterstützung bei jeglichen Problemen und Fragestellungen. Insbesondere gilt mein Dank jedoch Frau PD Dr. Malgorzata Burek, Frau Anja Neuhoff und Frau Katherina Steinisch für die stete Hilfe bei der praktischen Durchführung, sowie Diskussionsrunden, Kritik und Anregungen. Zum anderen sind sie mir in dieser Zeit zu guten Freundinnen geworden.

Ein abschließendes, großes Dankeschön gilt Matthias Endriss, sowie meiner Familie, die mich über all die Jahre meiner Promotion immer unterstützt haben und mir bei Problemen stets mit Ruhe und Kraft hilfreich zur Seite standen.