

**Funktionelle Charakterisierung einer Tripletdeletion in
SLC5A4 (SGLT3) als Kandidatengen für das
Aufmerksamkeitsdefizit-/ Hyperaktivitätssyndrom (ADHS)**

**Functional characterization of a triplet deletion in the
attention-deficit/hyperactivity (ADHD) candidate gene
SLC5A4 (SGLT3)**



Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde der
Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Maximilian Uwe Friedrich

aus Helmbrechts

Würzburg, 2018

Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender:	Prof. Dr. Philip Tovote
1. Betreuer	Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch
2. Betreuer:	Priv.-Doz. Dr. Frank Döring
3. Betreuer:	Prof. Dr. Erhard Wischmeyer

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Der Promovend ist Arzt

*Meiner Familie
in Dankbarkeit*

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	III
Summary	IV
1 Einleitung.....	6
1.1 Das Aufmerksamkeitsdefizit-/ Hyperaktivitätssyndrom	6
1.1.1 Klinik und Therapie	6
1.1.2 Pathophysiologie des ADHS	7
1.1.3 Bildgebende Korrelate	8
1.1.4 Molekulargenetische Korrelate	9
1.2 SLC5A4 (SGLT3) als ADHS Kandidatengen.....	10
1.3 Humane Glukosetransporter.....	10
1.3.1 Taxonomie.....	10
1.3.2 Struktur und Funktion der Transporter der SLC5A Familie.....	11
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	16
2 Material.....	18
2.1 Biologisches Material.....	18
2.2 Molekularbiologisches Material.....	18
2.3 Geräte	24
3 Methoden.....	27
3.1 Identifikation des ADHS Kandidatengens SLC5A4/ SGLT3	27
3.2 Erstellung des Expressionsprofils von SLC5A4/ SGLT3	28
3.3 Herstellung des SGLT3-pSGEM Konstrukts	32
3.4 Herstellung der SGLT3 Mutanten	36
3.5 In-Vitro Transkription der Konstrukte	37
3.6 Elektrophysiologie.....	37
3.7 In-Silico Effektvorhersage	39
3.8 Lasermikroskopischer Expressionsnachweis.....	39
4 Ergebnisse.....	41
4.1 Expressionsprofil von SGLT3.....	41
4.1.1 RT-PCR Kortex.....	41
4.1.2 RT-PCR subkortikaler Areale.....	41
4.1.3 Real-time PCR kortikaler und subkortikaler Areale	42
4.2 Elektrophysiologische Charakterisierungen	44
4.2.1 Charakterisierung von wildtypischem SGLT3.....	44
4.2.2 Charakterisierung von Δ M500-SGLT3 und Δ I501-SGLT3.....	510

Inhaltsverzeichnis

4.3	In-Silico Effektvorhersage der Mutationen auf die Funktion von SGLT3.....	55
4.4	Nachweis der Transporter in der Oozytenmembran.....	56
5	Diskussion	59
5.1	Das SGLT3 Expressionsprofil im Kontext bildgebender und neuroanatomischer Befunde bei ADHS	59
5.1.1	SGLTs im Säugerhirn	59
5.1.2	Striatum	60
5.1.3	Hypothalamus.....	61
5.1.4	Hippocampus, Hirnstamm und Kleinhirn	61
5.1.5	Zusammenfassung	63
5.2	Vergleichende elektrophysiologische Charakterisierung	64
5.2.1	Zentralnervöser Glukosestoffwechsel im Kontext neuropsychiatrischer Erkrankungen	64
5.2.2	Weitere Substrate für SGLT3 im ZNS.....	67
5.2.3	pH-Abhängigkeit von SGLT3 im Kontext zerebraler metabolischer Aktivität	67
5.2.4	Struktur-Funktions-Beziehung von Δ M500-SGLT3 bzw. Δ I501-SGLT3 im Kontext bekannter pathogener SGLT Mutationen	68
5.2.5	Zusammenfassung	72
5.3	In-Silico Vorhersage der funktionellen Konsequenzen der Mutationen.....	73
5.4	Effekte der Mutationen auf das SGLT3-Membrantargeting	74
6	Anhang	76
6.1	Literaturverzeichnis.....	76
6.2	Abbildungsverzeichnis	88
6.3	Tabellenverzeichnis	88
6.4	Abkürzungsverzeichnis	89
6.5	Aminosäuresequenzen im FASTA-Format.....	90
6.6	Curriculum Vitae des Autors	91
6.7	Publikationen des Autors	93
6.8	Danksagung	94
6.9	Eidesstattliche Erklärung	95

Zusammenfassung

Natrium-Glukose Transporter (SGLT) gehören zur „solute carrier 5“ (SLC5) Familie, die sich durch einen sekundär aktiven, natriumabhängigen Transport von Zuckern und anderen Molekülen nach intrazellulär auszeichnen. Die durch das Gen SLC5A4 kodierte Isoform SGLT3 transportiert dagegen keinen Zucker, sondern verhält sich als Glukose-sensor, der nach Bindung seiner Liganden eine Membrandepolarisation induziert. In genomweiten Exomsequenzierungsstudien (whole exome sequencing, WES) mehrerer erweiterter Stammbäume mit hoher Prävalenz des Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndroms (ADHS) wurde im Vorfeld eine ATG-Tripletdeletion in SLC5A4 identifiziert, die zum Verlust einer Aminosäure (Δ M500) in SGLT3 führt und zumindest partiell mit dem klinischen Phänotyp kosegregiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die zentralnervöse Expression von SGLT3 auf RNA-Ebene mittels Reverse-Transkriptase PCR sowie real-time PCR aus humanen Gesamt-RNAs nachgewiesen. Dabei konnte eine ubiquitäre Expression im Gehirn mit relativ erhöhter Expression unter anderem in Striatum und Hypothalamus, deren Dysfunktion in der Pathogenese des ADHS impliziert wurde, gezeigt werden. Da Mutationen in homologen Domänen der eng strukturverwandten Isoformen SGLT1 und SGLT2 sowohl intestinale als auch renale Funktionen schwer beeinträchtigen, wurden in dieser Arbeit funktionelle Charakteristika sowohl des wildtypischen als auch der Δ M500 und der benachbarten Δ I501 Deletionsvariante von SGLT3 mittels Zwei-Elektroden Spannungs- und Stromklemme in entsprechend cRNA-injizierten *Xenopus laevis* Oozyten untersucht. Der hochpotente SGLT3-spezifische Iminozuckeragonist 1-Desoxynojirimycin (DNJ) induzierte an SGLT3-exprimierenden Oozyten in sauren Bedingungen etwa dreifach größere Kationeneinströme als D-Glukose, was sowohl im Spannungsklemmen-, und anhand einer entsprechenden Membrandepolarisation im Stromklemmenmodus gezeigt wurde. Die mit der Δ M500 bzw. Δ I501 Variante injizierten Oozyten dagegen zeigten in den maximalen Aktivierungsbedingungen um 92% bzw. 96% ($p < 0,01$) reduzierte Kationeneinströme, sodass diese als hochgradig schädliche „Loss of Function“ Mutationen in SGLT3 charakterisiert wurden. Dieser Befund wurde mittels bioinformatischer in-silico Effektvorhersage validiert.

Um Konsequenzen der Sequenzalteration auf den Membraneinbau der Transporter zu untersuchen, wurden die mit einem gelb fluoreszierenden Farbstoff (YFP) markierten Transporter in Oozytenmembranen mittels Laser-Scanning Mikroskop nachgewiesen

Summary

und die jeweiligen Mengen der Konstrukte anhand der Fluoreszenzintensitäten quantifiziert. Dabei zeigte sich eine um 53% bzw. 42% ($p < 0,01$) reduzierte Menge der mutierten Konstrukte $\Delta M500$ bzw. $\Delta I501$ in der Membran, was zusätzliche schädliche Effekte der Mutationen auf das sogenannte Membrantargeting der Transporter belegt.

Zusammenfassend demonstrieren die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die $\Delta M500$ Variante von SGLT3, welcher in ADHS-relevanten Hirnarealen exprimiert wird, dessen substratinduzierte Natriumleitfähigkeit aufhebt und den Membraneinbau beeinträchtigen könnte, was in Wechselwirkung mit anderen genetischen ADHS Risikovarianten das Risiko für ADHS in Mutationsträgern beeinflussen kann.

Summary

Sodium-glucose transporters (SGLT) belong to the solute carrier 5 family, which is characterized by secondary active sodium dependent transport of sugars and other solutes. In contrast, SGLT3, encoded by the SLC5A4 gene, does not transport sugar but acts as a glucose sensor, inducing membrane depolarization upon ligand binding. In whole exome sequencing studies of several extended pedigrees with high density of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD), an ATG triplet deletion of SLC5A4, leading to a single amino acid loss ($\Delta M500$) in SGLT3, was found to cosegregate, although imperfectly, with the clinical phenotype.

In this work, expression of SGLT3 on RNA level was proven ubiquitously in the human brain with relatively increased expression levels in striatum and hypothalamus, which had repeatedly been implicated in ADHD pathophysiology. Since mutations in homologous domains of the structurally closely related isoforms SGLT1 and SGLT2 can significantly impair intestinal and renal function, functional properties of wildtype, $\Delta M500$ and neighboring $\Delta I501$ deletion variants of SGLT3 were investigated by voltage clamp and current clamp recordings in cRNA-injected *Xenopus laevis* oocytes. The SGLT3-specific iminosugar agonist 1-Desoxynojirimycin (DNJ) induced a threefold increase of cation influx compared to the classic SGLT substrate D-glucose alone as revealed by robust inward currents in voltage clamp and cell depolarization in current clamp modes. $\Delta M500$ -SGLT3 and $\Delta I501$ -SGLT3 injected oocytes showed cationic inward currents significantly reduced by 92% and 96% ($p < 0,01$) respectively. In-silico modelling predicted deleterious functional effects of both mutations, thus validating these results.

To investigate possible effects of these sequence alterations on membrane targeting of the transporters, fusion constructs with YFP were generated and intensity of membrane

Summary

fluorescence was quantified by confocal laser scanning microscopy. In comparison to wildtype SGLT3, fluorescence signals of $\Delta M500$ and $\Delta I501$ injected oocytes were decreased by 53% and 42% ($p < 0,01$) respectively.

Taken together, the results of this work suggest that the $\Delta M500$ mutant of SGLT3, which is expressed in ADHD-implicated brain tissues completely abolishes its ligand dependent sodium conductance and may impair its membrane targeting, which, in interaction with other genetic ADHD risk variants, may confer a risk for ADHD in deletion carriers.

1 Einleitung

1.1 Das Aufmerksamkeitsdefizit-/ Hyperaktivitätssyndrom

1.1.1 Klinik und Therapie

Das Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom (ADHS) (nach DSM-5, korrespondierend die sog. „hyperkinetische Störung“ nach ICD-10) ist eine klinisch heterogene, wahrscheinlich entwicklungsneurologische Erkrankung (Klein et al., 2017) die durch die Kernsymptomtrias Unaufmerksamkeit, gesteigerte Impulsivität und/oder motorische Unruhe gekennzeichnet ist (American Psychiatric Association, 2013).

Mit einer weltweiten Prävalenz von etwa fünf Prozent ist ADHS in Deutschland eine der häufigsten Diagnosen im Kindes- und Jugendalter (Robert-Koch-Institut, 2014). Eine weltweite Prävalenz des adulten ADHS von 2,5% illustriert, dass ein substanzieller Anteil der jugendlichen Betroffenen eine zumindest partielle Symptompersistenz bis ins Erwachsenenalter aufweist (Chang et al., 2013), was teilweise zu beträchtlichen Einschränkungen der Funktionsfähigkeit im Alltag und daraus resultierenden negativen gesundheitlichen, psychosozialen und ökonomischen Konsequenzen führt, die mit einer geringer wahrgenommenen Lebensqualität, einem niedrigeren sozioökonomischen Status sowie einem erhöhtem Delinquenzrisiko der Betroffenen einhergehen (Banaschewski et al., 2017). Die Evolution der Symptomatik hin zu einer im Erwachsenenalter weniger offensichtlichen und klinisch führenden Desorganisiertheit mit emotionalen Dysregulation und Irritabilität trägt zu einer häufigen Verkennung der Diagnose bei (ADHS Deutschland e.V., 2013). 75% der erwachsenen Betroffenen weist mindestens eine, 60% mehrere komorbide psychiatrische Störungen auf (Banaschewski et al., 2017), darunter Depression und Substanzabusus (Renner et al., 2008). Das Lebenszeitrisiko für einen Suizid korreliert, auch unabhängig von den psychiatrischen Komorbiditäten, mit dem Schweregrad der ADHS-Symptomatik (Stickley et al., 2016), was die Notwendigkeit gezielter Diagnostik und frühzeitiger Therapie unterstreicht.

Obwohl eine entwicklungsparallele Trajektorie der Erkrankung durchaus möglich ist, deuten aktuelle Erkenntnisse auf einen nontrivialen Zusammenhang mit nur teilweise geteiltem Phäno- sowie Genotyp des kindlichen und adulten ADHS hin (Chang et al., 2013), was die Generalisierbarkeit von Studienergebnisse auf Basis der Daten aus juvenilen Patientenpopulationen einschränkt und die Komplexität der Erkrankung weiter unterstreicht.

Die momentan zugelassenen medikamentösen Therapien greifen im Allgemeinen als Psychostimulanzien in den monoaminergen Stoffwechsel ein, indem sie wahrscheinlich die Verfügbarkeit von Katecholaminen wie Dopamin und Noradrenalin im synaptischen Spalt in striatalen und präfrontalen Projektionsneuronen erhöhen. Der Amphetaminabkömmling Methylphenidat fungiert als effektives und effizientes Erstlinientherapeutikum (Effektstärke 0,8-1,0 auf die Kernsymptomatik; NNT=2,5), während der selektive Noradrenalinwiederaufnahmehemmer Atomoxetin sowie der zentrale α 2-Agonist Guanfacin als gut wirksame Alternativpräparate zur Verfügung stehen (Banaschewski et al., 2017). Neben der symptomatischen Wirksamkeit sind mit der Einnahme von Stimulanzien jedoch weitreichende günstige Effekte auf die Lebensqualität (unter anderem gemessen an schulischen und beruflichen Leistungen, sozialer Funktion, subjektiven Maßen wie Selbstwertgefühl) (Shaw et al., 2012) sowie in longitudinalen, bildgebenden Studien auf die Größenentwicklung kortikaler Hirnregionen assoziiert (Shaw et al., 2009). Studien auf Basis großer skandinavischer Register bestätigen die protektive Wirkung einer Stimulanzientherapie auf die Entwicklung eines oft komorbiden Substanzmissbrauchs (Chang et al., 2014).

1.1.2 Pathophysiologie des ADHS

Trotz intensiver Forschungsbemühungen der letzten Jahre ist es bisher noch nicht gelungen, ein präzises pathophysiologisches Modell der ADHS-Entstehung zu generieren. Der momentane wissenschaftliche Konsens berücksichtigt sowohl genetische als auch umweltbezogene Einflüsse und insbesondere deren Interaktionen auf verschiedenen Ebenen biologischer Komplexität bei der Pathophysiologie des ADHS (Banaschewski et al., 2017).

Einer genetischen Komponente kommt bei der Ursachensuche eine besonders gewichtige Rolle zu: sie erklärt in Zwillingsstudien im Mittel 76% der phänotypischen Varianz hinsichtlich ADHS-relevanter Züge (Faraone et al., 2005). Darüber hinaus haben erst- oder zweitgradige Verwandte von ADHS-Indexpatienten ein fünf- bis zehnfach erhöhtes Erkrankungsrisiko (Banaschewski et al., 2017). Hinsichtlich schädlicher Umwelteinflüsse wurden in epidemiologischen Studien prä- sowie perinatale Risikofaktoren (maternaler Nikotin- oder Alkoholkonsum während der Schwangerschaft, niedriges Geburtsgewicht bzw. Frühgeburtlichkeit), Umwelttoxine und psychosoziale Stressoren in der Mutter-Kind-Beziehung postuliert (Thapar & Cooper, 2016); deren kausale Relevanz ist zwar uneindeutig (Banaschewski et al., 2017), jedoch scheint ein beträchtliches Interaktionspotenzial mit genetischen Faktoren zu bestehen (Kahn et al., 2003).

Übereinstimmend finden sich bei Patienten auffällige neuropsychologische (z. B. in Tests der Reaktionszeitvariabilität, Belohnungs- und Verhaltensinhibitionsparadigmen), assoziierte neurophysiologische, z. B. mittels alterierter ERPs, und bildgebende Befunde (Cortese, 2012; Banaschewski et al., 2017; Klein et al., 2017). Diese konsistent in Patientenpopulationen nachweisbaren, umschriebenen Auffälligkeiten werden in jüngster Zeit als sogenannte Endophänotypen, also potenziell transdiagnostische und besser operationalisierbare Befunde auf einer intermediären Komplexitätsebene zwischen Genetik und klinischem Phänotyp, bezeichnet (Del Campo et al., 2012).

In diesem Kontext haben besonders Befunde aus Molekulargenetik, Neurophysiologie und multimodaler Bildgebung im letzten Jahrzehnt massiv zum Verständnis der Pathophysiologie des ADHS beigetragen (Klein et al., 2017) und werden daher im Folgenden kurz beschrieben.

1.1.3 Bildgebende Korrelate

Ein bedeutender Zweig der neurowissenschaftlichen und im Speziellen der ADHS Forschung sind multimodale bildgebende Studien, die bereits einige für ADHS spezifische Befunde nachweisen konnten.

Allen Modalitäten voran steht hier die Magnetresonanztomografie, mittels derer sowohl strukturelle, funktionelle, als auch konnektivitätsbezogene Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollgruppen gezeigt werden konnten. Dazu gehört unter anderem eine kortikal betonte, generelle Hirnvolumenminderung um etwa 3% von ADHS-Patienten gegenüber ihren unbetreffenen Geschwistern, die insbesondere auch subkortikale Kerngebiete wie die Basalganglien einbezieht (Greven, 2015). Aufgabenspezifische funktionelle Alterationen projizieren sich besonders auf fronto-subkortiko-zerebelläre Netzwerke, welche in Belohnungslernen, Salienzdetektion, präfrontal-inhibitorischen und diversen motorischen Funktionen impliziert sind (Cortese, 2012) während sich die funktionelle Konnektivität exekutiver und möglicherweise auch zerebellärer Netzwerke bei Patienten in Ruhebedingungen von der der Kontrollpersonen unterscheidet (Mostert et al., 2016).

Neben weiteren bildgebenden Verfahren wie SPECT und fNIRS konnten mittels PET Studien signifikante Unterschiede im prä- bzw. postsynaptischen Katecholamintransmitterstoffwechsel bei Individuen mit ADHS gegenüber Kontrollen gezeigt werden, die offenbar abhängig von einer vorhergehenden Stimulanzientherapie sind (Fusar-Poli et al., 2012).

Zusammenfassend deuten diese Erkenntnisse also auf strukturelle zerebrale Alterationen sowie funktionelle Veränderungen in kortikalen, subkortikalen und zerebellären Funktionssystemen (Bush, 2010) bei ADHS hin. Ein substanzieller Anteil der Varianz einiger bildgebender Befunde ist wiederum durch genetische Varianten erklärbar (Klein et al., 2017), was deren kausale Relevanz für die erhobenen Datensätze und die Notwendigkeit der Verbindung von Erkenntnissen verschiedener Ebenen biologischer Komplexität zum tieferen Verständnis der Pathophysiologie des ADHS unterstreicht (Dresler et al., 2014).

1.1.4 Molekulargenetische Korrelate

Für ADHS-typische Verhaltensmerkmale besteht eine substanzielle familiäre Häufung. Obwohl diese Evidenz für eine starke Vererbbarkeit der Erkrankung spricht, konnten mittels groß angelegter sog. genomweiter Assoziationsstudien (GWAS), bei denen die relative Häufigkeit genetischer Alterationen, sogenannter „small nucleotide polymorphisms“ (SNPs) oder größerer „copy number variations“ (CNVs) in chromosomalen Abschnitten in großen klinischen und neurotypischen Vergleichskollektiven verglichen wird, bislang noch keine genomweit signifikante Variante mit dem Phänotyp ADHS assoziiert werden (Vgl. Neale et al., 2010 und Middeldorp et al., 2016). Aus einer aktuellen Meta-Analyse mehrerer GWAS-Studien, die sich momentan im „peer-review“ Prozess befindet, geht jedoch hervor, dass offenbar erstmals zwölf genomweit signifikante, genetische Risikoloci für ADHS identifiziert werden konnten. Diese zeichnen sich durch hohe evolutionäre Konservierung in Säugetieren bei geringer Toleranz gegenüber funktionsschädigenden Polymorphismen aus (Demontis et al., 2017).

Obgleich die Datenlänge hinsichtlich assoziierter genetischer Varianten in der Pathogenese des ADHS noch uneindeutig ist, konnten durch die a priori hypothesenfreien GWAS Ansätze neue Hypothesen über Risikovarianten bestimmter Gene oder ferner chromosomaler Loci formuliert werden. Dabei zeigt sich, dass sowohl gewöhnliche Varianten mit geringen Effektstärken (sog. „common variants“, vorhanden in >5% der untersuchten Population), als auch seltene Varianten mit größeren Effektstärken in einem kleinen Kollektiv (sog. „rare variants“, vorhanden in <5% der untersuchten Population), eventuell in komplexer biologischer Interaktion (Banaschewski et al., 2017), in einem polygenetischen Risikoscore einfließen, der als ein Suszeptibilitätsmaß für ADHS angesehen werden kann (Martin et al., 2015).

Demgegenüber konnten in Meta-Analysen von per se statistisch schwachen, hypothesengetriebenen Kandidatengenstudien eine Vielzahl von gewöhnlichen Varianten in Genen, die eine Rolle in monoaminergem, nikotinerger und glutamaterger Neurotransmission spielen oder generell in Prozessen synaptischer Plastizität und dem Neuritenwachstum involviert sind (Banaschewski et al., 2010, 2017) mit dem ADHS-Phänotyp assoziiert werden (Klein et al., 2017). Daneben konnte mittels genomweiter Studien auch eine Anreicherung von seltenen Varianten, insbesondere zweier CNVs in der Gensequenz einer Untereinheit des nikotinergeren Acetylcholinrezeptors (Williams et al., 2012) und des Neurotransmitters Neuropeptid Y (Lesch et al., 2011) in der ADHS Population nachgewiesen werden. In jüngster Zeit konnten sowohl häufige als auch seltene Varianten eines Kandidatengens in unabhängigen ADHS-Studienpopulationen impliziert werden; so zum Beispiel SLC2A3, welches für den ubiquitär exprimierte Glucosetransporter Typ 3 (GLUT3) kodiert (Merker et al., 2017).

Mittels bioinformatischer Analysen lassen sich die bisher identifizierten Kandidatengene demnach funktionellen Clustern zuordnen, zu denen vornehmlich die Entwicklung des Nervensystems, zentralnervöse Zell-Zell-Interaktionen, neuronale Projektionen sowie eventuell auch der zentralnervöse Energiestoffwechsel (NPY, GLUT3) gehören (Lesch et al., 2011, Klein et al., 2017, Merker et al., 2017).

1.2 SLC5A4 (SGLT3) als ADHS Kandidatengen

Zur Identifikation mit dem Phänotyp assoziierter, seltener und schädlicher genetischer Varianten war im Vorfeld eine Exomsequenzierung bei mehreren Familien deutscher Abstammung mit hoher Prävalenz eines adulten ADHS durchgeführt worden. Die klinische Diagnose der Familienmitglieder wurde entsprechend DSM-IV Kriterien gestellt (siehe hierzu (Romanos et al., 2008)). Im Rahmen dieses Sequenzierungsexperiments wurde eine partiell mit dem Phänotyp kosegregierende ATG-Deletion in SLC5A4 (c.1502-4delATG) im Gen SLC5A4, kodierend für den humanen Natrium-Glukose Transporter Typ 3 (SGLT3), identifiziert (Einzelheiten siehe Kapitel 3.1.). Dieses Gen wurde damit erstmals für ADHS impliziert und wird im Folgenden näher beschrieben.

1.3 Humane Glucosetransporter

1.3.1 Taxonomie

Das Monosaccharid Glukose ist einer der wichtigsten Energieträger für eine Vielzahl von Organismen. Die zelluläre Aufnahme von Glukose ist ein integraler Schritt des anabolen

sowie katabolen Metabolismus und damit essenziell für die Aufrechterhaltung der Homöostase. Als polares Molekül kann Glukose die Zellmembran nicht spontan passieren und benötigt daher zwingend Transportmechanismen, welche von membranständigen Transportproteinen vermittelt werden. Diese werden in drei Genfamilien eingeteilt.

Eine davon wird von den faszilitativen Glukosetransportern (GLUTs) gebildet, die zur SLC2A Gruppe gehören und deren Vertreter ubiquitär im Organismus die zelluläre Glukoseaufnahme sicherstellen. Zwei Isoformen der GLUTs, GLUT1 und GLUT3, sind zentralnervös exprimiert. Während sich GLUT1 als niedrig affiner Transporter vorwiegend in Kapillaren der Bluthirnschranke befindet, wird GLUT3 als hochaffiner Transporter besonders an Dendriten und axonalen Endigungen exprimiert und ist essenziell für den neuronalen Energiemetabolismus (Mantych et al., 1992, Benarroch, 2015).

Neben den rezent entdeckten SWEETs (SLC50 Gruppe) (Feng & Frommer, 2015) existieren noch die sekundär-aktiven Natrium-Glukose Transporter (SGLT), die der SLC5A Gruppe zugeordnet werden und im Folgenden näher erläutert werden.

1.3.2 Struktur und Funktion der Transporter der SLC5A Familie

1.3.2.1 SGLT1 und SGLT2 und deren Pathophysiologie

Die bekanntesten Vertreter der SLC5A Familie, der „Natrium-Glukose-Transporter Type 1“, SGLT1 (*SLC5A1*) und Type 2, SGLT2 (*SLC5A2*) sind extensiv charakterisierte sekundär aktive Membrantransporter, die den transzellulären Kationengradienten um Glukose durch die Membran zu transportieren. Deren herausragende physiologische Rolle liegt demnach in der Glukose- und Galaktoseresorption (letztere vornehmlich durch SGLT1) aus dem intestinalen Lumen bzw. dem Tubulussystem der Niere; dabei zeigt SGLT1 eine deutlich höhere Substrataffinität zu D-Glukose als SGLT2 ($K_{mSGLT1} = 0,5mM$, $K_{mSGLT2} = 6mM$) (Voss et al., 2007).

In Abwesenheit von Natrium zeigt sich eine hohe Affinität von SGLT1 zu H^+ -Protonen, die in diesen Bedingungen als treibende Kraft für den Kotransport fungieren (Hirayama et al., 1994). Mit jedem Transportzyklus werden zusätzlich etwa 260 Wassermoleküle in die Zelle transportiert (Wright et al., 2004). Das Pflanzenglykosid Phlorizin ist ein SGLT-spezifischer Inhibitor mit nano- bzw. niedrig mikromolaren Inhibitionskonstanten für SGLT1 bzw. SGLT2 (Wright et al., 2011).

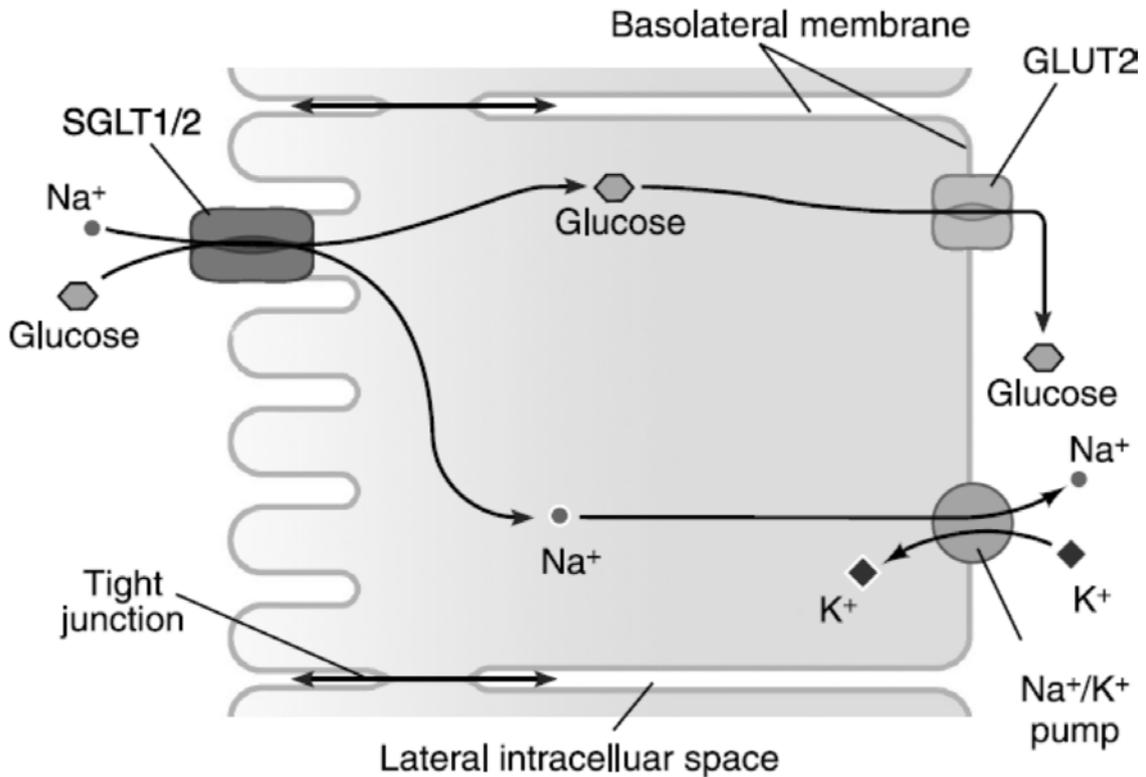


Abbildung 1 - SGLTs vermitteln die zelluläre Glukoseaufnahme. Die im beispielhaft dargestellten Enterozyten apikal sitzenden SGLTs nutzen den durch die basolaterale Na⁺-K⁺-ATPase aufrecht erhaltenen, transzellulären Kationengradienten (hier Na⁺), um Glukose nach intrazellulär zu transportieren (nach Wright et al., 2011).

Beide Transporter sind in einer Vielzahl weiterer Gewebe exprimiert (siehe Reviews von (Wright et al., 2011 und Sotak et al., 2017), darunter auch im Gehirn verschiedener Säugerspezies (Poppe et al., 1997). Eine wichtige Rolle scheinen SGL-Transporter in glucosesensitiven, hypothalamischen Neuronen der Ratte zu spielen (O'Malley et al., 2006), während ihre funktionellen Beiträge in den übrigen Abschnitten des ZNS noch weitgehend ungeklärt sind.

Die exakte Proteinstruktur der SGL-Transporter ist unbekannt, jedoch lassen in-silico Vorhersagen und Analysen der aufgelösten Kristallstruktur des aus *Vibrio parahaemolyticus* stammenden vSGLT (Faham et al., 2008) vermuten, dass es sich um Proteine mit 14 Transmembranhelices handelt. Innerhalb der Kernstruktur, die die Transmembrandomänen TM1-10, welche am C-, und N-terminalen Ende von drei bzw. einer weiteren Domäne flankiert werden (TM11-13 und -TM1), befinden sich für die Substrat- und Natriumbindung relevante Aminosäuren (Abramson & Wright, 2009). Ein etabliertes kinetisches Modell postuliert ein Durchlaufen von sechs Konformationen bei Bindung und Entlassen des Substrats sowie des Kations auf dem Weg von extra- nach intrazellulär (Wright et al., 2011), während ein rezenteres Modell mit sieben Konformationen einen

Einleitung

Großteil vorhandener elektrophysiologischer Daten zum Transportverhalten von SGLT1 besser zu erklären vermag (Longpré et al., 2012). Die Funktion der flankierenden Domänen –TM1 und TM11-13 ist noch weitgehend unverstanden.

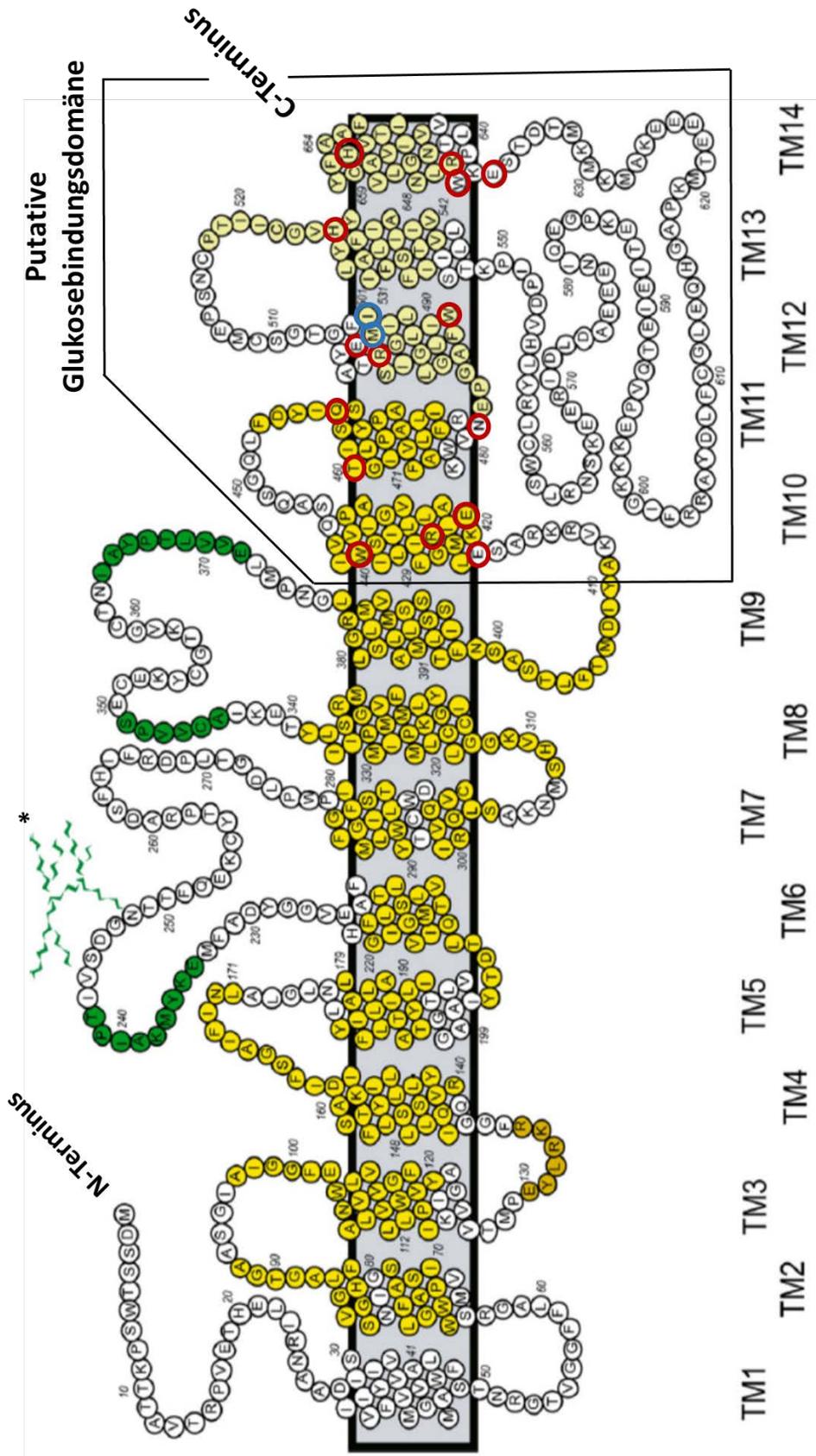


Abbildung 2 - Homologieplot der Aminosäuresequenz von SGLT1 auf die Sekundärstruktur von vSGLT. Die bekannte SGLT1-Aminosäuresequenz wurde auf ein 14-Transmembranhelixmodell von vSGLT geplotet. N-Terminus links, C-Terminus rechts, Extrazellulärraum oben, Zytoplasma unten im Bild. Gelb und grün markiert sind die helikalen Domänen von vSGLT. Die Glukosebindungsdomäne befindet sich zwischen TM10 und TM14, rot markiert sind vermutete Bindungsstellen extra- bzw. intrazellulärer Glukose. Blau markiert sind die in dieser Arbeit untersuchten Aminosäuren. Mit * markiert ist ein Zuckerrest, der an der Glykosylierungsdomäne an Stelle 248 illustriert ist (modifiziert nach Wright et al., 2004, 2011).

Schädliche Mutationen dieser Transporter führen zu monogenetischen Erkrankungen, im Falle von SGLT1 der „Glukose-Galaktose Malabsorption“ bzw. für SGLT2 der „familiären renalen Glukosurie“ (Wright et al., 2004).

Daneben sind Natrium-Glukose Transporter auch als pharmakologische Zielstrukturen interessant. Aufgrund des relevanten Kotransportes von Wasser ist SGLT1 besonders bei krisenhaften Diarrhoen als Ziel der oralen Rehydratationstherapie etabliert. Durch die „Gliflozine“, strukturelle Abkömmlinge des Phlorizin, wurde auch SGLT2 in jüngster Zeit erfolgreich als pharmakologische Zielstruktur in der Therapie des Diabetes mellitus etabliert (Andrianesis et al., 2016). Darüber hinaus wird SGLT2 als Zielstruktur einer antiödematösen Therapie in der Neurotraumatologie geprüft (Wais, 2013). Neuere Arbeiten deuten weiterhin auf potenzielle therapeutische Relevanz der SGLT Modulation in der Onkologie sowie der Schwangerschaft hin (Wright et al., 2017).

1.3.2.2 SGLT3

Der weniger gut charakterisierte Vertreter SGLT3, ehemals als SAAT1 bekannt, teilt eine Sequenzidentität von etwa 70% mit SGLT1 sowie etwa 55-60% mit SGLT2 (Wright et al., 2011) und wurde erstmals von Diez-Sampedro und Kollegen im Jahr 2003 kloniert und charakterisiert.

In deutlichem Gegensatz zu den übrigen Vertretern wurde SGLT3 als niedrigaffiner, glukoseabhängiger ($K_m=20\text{mM}$) Natriumkanal ohne intrinsische Transportfähigkeit und daher als „Glukosesensor“ charakterisiert. Im Gegensatz zu SGLT1 induziert Galaktose überdies keine Ströme an SGLT3 (Diez-Sampedro et al., 2003). Demgegenüber zeigte sich jedoch eine um den Faktor 40,000 höhere Affinität von SGLT3 zu dem Iminozucker Desoxyojirimycin (DNJ) und seinen strukturellen Abkömmlingen (Voss et al., 2007), während die Inhibitionskonstante für Phlorizin etwa um den Faktor 100 höher liegt als für SGLT1 (Raja & Kinne, 2015). Durch den Austausch einzelner Aminosäuren wird die Substrataffinität der Natrium-Glukose Transporter teils drastisch verändert (Wright et al., 2011).

Im Unterschied zu SGLT1 und SGLT2 sind die substratinduzierten Kationenströme durch SGLT3 deutlich pH-abhängig zugunsten saurer Bedingung (Diez-Sampedro et al., 2003, Voss et al., 2007). Die murinen sowie Rattenhomologe SGLT3a und SGLT3b rekapitulieren in ihrer Funktion sowohl Eigenschaften von humanem SGLT3 als auch SGLT1; dabei ähnelt mSGLT3a als pH-sensitiver, glukoseabhängiger Kationenkanal ohne Transportfähigkeit funktionell am ehesten dem humanen Vertreter SGLT3a (Barcelona et al., 2012).

SGLT3 mRNA findet sich in verschiedenen humanen Geweben, darunter dem Gastrointestinaltrakt, der muskulären Endplatte und Testes bzw. Ovarien (Sotak et al., 2017). Auf zellulärer Ebene konnte eine Expression von SGLT3 in peripheren und zentralnervösen cholinergen Neuronen gezeigt werden (Diez-Sampedro et al., 2003, Yamazaki et al., 2014).

Auf Proteinebene konnte SGLT3 mit einer Betonung des Kapillarendothels in einer Vielzahl von Geweben im menschlichen Körper nachgewiesen werden (Oerter et al., 2016). Überdies findet sich eine relevante Expression von SGLT3 in verschiedenen Karzinomarten (Veyhl et al., 1998).

Anders als seine Homologen wurde SGLT3 bisher nicht kausal in einem mono- oder polygenetischen Krankheitsprozess impliziert.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Aufmerksamkeitsdefizit/ Hyperaktivitätssyndrom stellt angesichts einer hohen Prävalenz über die Lebensspanne einerseits und einer beträchtlichen Symptomschwere andererseits mit teils verheerenden sozialen Konsequenzen für die Betroffenen eine große medizinische, psychologische und nicht zuletzt volkswirtschaftliche Herausforderung dar. Obgleich stetig steigende Ressourcen in die Erforschung des Krankheitsbildes investiert werden, entzog es sich bislang einer schlüssigen mechanistischen Erklärung auf verschiedenen Ebenen biologischer Komplexität. Die wissenschaftlichen Bemühungen der letzten Jahrzehnte haben die herausragende Rolle genetischer Varianten und ihrer funktionell-neurophysiologischen Konsequenzen in den Fokus der Aufmerksamkeit gerückt und in translationalen Ansätzen überprüft.

Grundlage der vorliegenden Arbeit ist eine familienbasierte, exomweite Sequenzierungsstudie („Whole Exome Sequencing“, *WES*), in der eine partielle Kosegregation eines genetischen Polymorphismus im Sinne einer Aminosäuredeletion an Stelle 500 in TM11 des durch *SLC5A4* kodierten Sodium-Glucose-Transporter Type 3 ($\Delta M500$ -SGLT3) mit dem ADHS Phänotyp nachweisbar war.

Bis dato ist unbekannt, ob und in welchem Umfang das Kandidatengen SGLT3 auf RNA-Ebene im zentralen Nervensystem des Menschen exprimiert wird. In dieser Arbeit soll daher ein qualitatives und quantitatives Expressionsprofil von SGLT3 mittels Reverse-Transkriptase PCR und quantitativer real-time PCR auf Basis menschlicher Gesamt-RNAs aus verschiedenen Geweben erstellt werden.

Einleitung

Da Mutationen in verwandten Isoformen von SGLT3 bekanntermaßen zu schweren Funktionsausfällen der betroffenen Transporter und damit monogenetischen Erkrankungen führen können, sollen überdies die Effekte des in der WES detektierten Δ M500 Polymorphismus von SGLT3 auf dessen elektrophysiologische Eigenschaften überprüft werden. Hierzu soll zunächst mittels gezielter Mutagenese eine Δ M500-SGLT3 cRNA hergestellt und neben wildtypischer cRNA in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert werden. Mittels Spannungs- und Stromklemmenexperimenten sollen daraufhin vergleichend Ströme bzw. Spannungsänderungen abgeleitet werden.

Im Lichte bestehender Hinweise auf den kritischen Einfluss benachbarter Aminosäuren auf die Funktion der SGL-Transporter (Martín & Wright, 1996) und um zu untersuchen ob etwaige Effekte der Mutation auf eine strukturelle Alteration der betreffenden Domäne oder durch die fehlende Funktion der Aminosäure selbst zurückzuführen ist, soll parallel eine Deletion der direkt flankierende Aminosäure, Δ I501-SGLT3, in gleichen Bedingungen untersucht werden. Die jeweiligen funktionellen Ergebnisse sollen daraufhin anhand einer in-silico Vorhersage auf Basis großer bioinformatischer Datensätze validiert werden.

Um zu überprüfen, ob die untersuchte Δ M500 Mutation auch das „targeting“ des Transporters an die Zellmembran beeinträchtigt, sollen Fusionskonstrukte der verschiedenen SGLT3 Varianten mit einem biologischen Fluoreszenzfarbstoff (YFP, yellow fluorescent protein) in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert werden und die membranständige Fluoreszenzintensitäten unter dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop verglichen werden.

Obgleich die genetische Architektur des ADHS nicht trivial ist, konnten familienbasierte Kandidatengenstudien wiederholt zum Verständnis beteiligter Strukturen und Netzwerke beitragen (Renner et al., 2008). Die erwarteten Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit sollen als Grundlage zur weiteren Aufklärung der Rolle von SLC5A4 und ferner des zentralnervösen Energiestoffwechsels in der Pathophysiologie des ADHS beitragen.

2 Material

2.1 Biologisches Material

Versuchstiere und Oozyten

Die *Xenopus laevis* Frösche wurden gemäß Tierschutzgesetz in der Tierversuchsanlage im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg gehalten. Die operative Entnahme von *Xenopus laevis* Oozyten wurde den Vorgaben des Tierschutzgesetzes entsprechend in halbjährlichem Abstand unter Aufsicht von bevollmächtigtem Personal im Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universität Würzburg durchgeführt.

Gewebe

Verwendet wurden käuflich erworbene Gesamt-RNAs folgender Hirnareale: Kleinhirn, Pons, Nucleus caudatus, Hippocampus, Medulla oblongata, Cortex, Putamen, Hypothalamus (in fünf nicht näher bezeichneten Subgruppen). Diese Gesamt-RNAs stammen aus der gewebeextrahierten RNA von 10 bis 35 kaukasischen Frauen und Männern im Alter von 16 bis 70 Jahren nach plötzlichem Tod (BD Biosciences, Erembodegem, Belgien). Weitere Gesamt-RNA aus makrodissezierten Kortices und Hypothalami von jeweils vier bzw. fünf suizidalen und nicht-suizidalen Spendern kaukasischer Herkunft wurde von der „Human Brain Tissue Bank“ des anatomischen Instituts der Semmelweis Universität (Budapest, Ungarn) bezogen. Die Gesamt-RNAs von Colon und Jejunum waren mittels Standardprotokoll von der AG Translational Neuroscience am Zentrum für Seelische Gesundheit, Würzburg aus chirurgischen Präparaten mittels Phenol/Chloroform Präzipitation nach Standardprotokoll extrahiert worden.

2.2 Molekularbiologisches Material

Nukleinsäuren und Plasmidvektoren

Der Ausgangsklon hSGLT3 (*h=human*) im *Xenopus*vektor „pRSSP“ wurde freundlicherweise von Prof. H. Koepsell (Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften, Würzburg) zur Verfügung gestellt. In der AG Molekulare Elektrophysiologie, Universität Würzburg wurde das hSGLT3 in den dort vorhandenen Oozytenvektor „pSGEM“ umklont. Letzterer besitzt am 3'- und 5'- untranslatiertem Ende die Sequenz des *Xenopus* β -Globin Gens, welches die Expression in Oozyten verstärkt. Weiterhin enthält der Vektor zwei RNA-Polymerase Promotorregionen (SP6 sowie T7) und eine Sequenz für eine Ampicillinresistenz, die sich zur Selektion eignet. Zwischen den Promotorregionen finden sich zur Vektorlinearisierung Restriktionsschnittstellen für zahlreiche Restriktionsenzyme (Kollert, 2015).

Material

Für die lasermikroskopischen und elektrophysiologischen Untersuchungen wurde der Vektor „pNBI22“ von der AG Geiger (Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften, Würzburg) verwendet. Dieser besitzt neben einem ähnlichen Aufbau wie pSGEM die Sequenz eines Yellow Fluorescent Protein (YFP) am C-terminalen Ende, hinter einer sogenannten „USER Kasette“, die für die gleichnamige Klonierungsmethode von der AG Geiger verwendet wurde (Nour-Eldin et al., 2010).

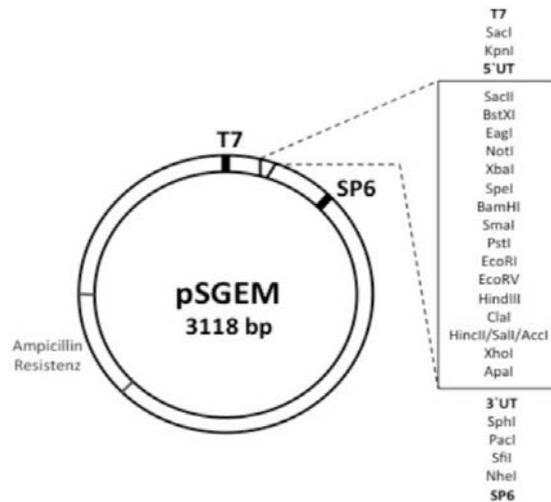


Abbildung 3 - pSGEM Vektor. Angabe aller Restriktionsenzymstimmstellen, den RNA-Polymerase Promotorregionen SP6 und T7 sowie der Ampicillinresistenzregion (nach Kollert, 2015).

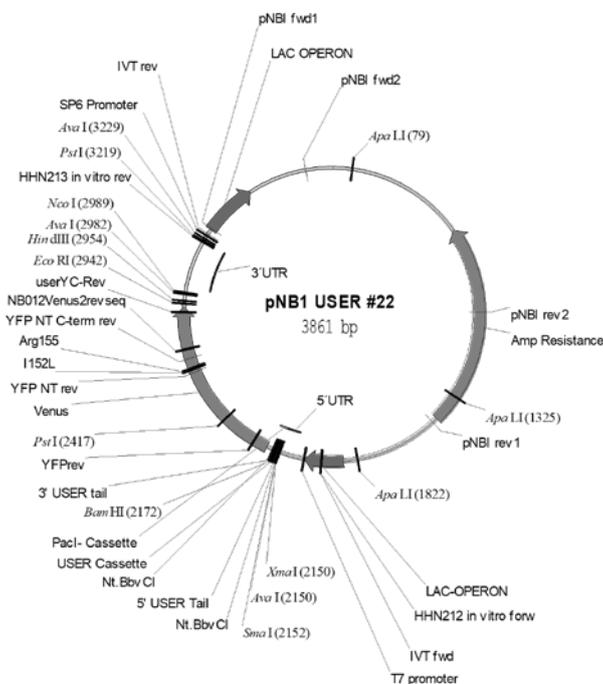


Abbildung 4 - pNBI22 Vektor. Angabe unter anderem aller Restriktionsschnittstellen, den RNA-Polymerase Promotorregionen SP6 und T7, der Ampicillinresistenzregion, sowie den YFP Sequenzen und der USER Kasette (AG Geiger, Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften)

Material

Oligonukleotide

Die konventionelle Leserichtung der hier angegebenen Oligonukleotidsequenzen ist 5' - 3'.

Reverse Transkriptase-PCR Primer

Angegeben sind die Sequenzen der Primer die für das Expressionsprofil von wildtypischem SGLT3 aus den Gesamt-RNAs benutzt wurden.

Primer	Sequenz	Länge [bp]
HSA 38/39	Forward: GGGACAACCTTGACAATCAGTGCC Reverse: GCCAACATCAACGCCACAGTG	344
HSA 42/37	Forward: GTCAGGAAGAAACAGATGATGGTG Reverse: TAGAGTTCAGGCATAGTAGCCG	251

Tabelle 1 - Primersequenzen für RT-PCR Expressionsprofil von SGLT3.

Sequenzierungsprimer

Primer	Sequenz
pSGEM rev.	ATTCGGGTGTTCTTGAGGCTGG
T7 Promotor	TGTAATACGACTCACTATAGGGCGA

Tabelle 2 - Sequenzierungsprimer pSGEM

cRNA-Synthese

Angegeben sind die Sequenzen der Primer die für die Herstellung von capped-RNA von wildtypischem SGLT3 sowie den durch gezielte Mutagenese hergestellten Deletionsmutanten Δ I501-SGLT3 bzw. Δ M500-SGLT3 benutzt wurden.

Primer	Sequenz	Länge [bp]
hSGLT3	Fwd:CGCGGATCGCCACCATGGCCAGTACGGt-TAGCCCCAGC Rev: CCGGAATTCTCAGGCATAGTAGCCGTGAAT	2029
ΔI501-SGLT3	Fwd: GGCCTCATTCGTATGACAGAGTTTGCTTATG Rev: CATAAGCAAACCTCTGTCATACGAATGAGGCC	2028
ΔM500-SGLT3	Fwd: ATTCGTAUAACAGAGTTTGCTTATGGAAC Rev: ATACGAAUGAGGCCCATGCA	2028

Tabelle 3 - Primersequenzen für in-vitro Transkription von SGLT3 und der Mutanten. Fwd: Forward, Rev: Reverse.

Material

Real-Time PCR Primer

Angegeben sind die Sequenzen der Primer die für die quantitative real-time PCR benutzt wurden.

Primer (Hersteller)	Zielgen	Genbank Nr.	Primersequenz bzw. Referenznummer	Länge [bp]
hSGLT3	Sodium-Glucose-Transporter 3	NM_014227	Fwd: GATGCTGTGACTGGGGACAT Rev: AGCGCTGCACAATGACCT	100
hGAPDH (Metabion)	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase	NM_002046	Fwd: CTCATGACCACAGTCCAT-GCC Rev: GCCATCCACATCTTCTGGGT	119
huUBC (Qiagen)	Ubiquitin C	NM_021009	QT00234430	75
huACTB (Qiagen)	Beta-Aktin	NM_001101	QT00095431	104
huHPRT1 (Metabion)	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase	NM_000194	Fwd: CTTGGTCAGGCATTAATCCAA Rev: CTTTATCCAACATTCGTGGGG	100
huRS27A (Metabion)	Ribosomales Protein 27A	NP_001021	Fwd: GGTTAGCTGGCTGTCCTGAA Rev: AGAAGGGCACTCTCGACGAA	84

Tabelle 4 - Primer für die quantitative real-time PCR. SGLT3 sowie verschiedene sog. "house keeping genes". Fwd: Forward, Rev: Reverse

Material

Enzyme

Art des Enzyms	Hersteller
Restriktionsenzyme	
BamHI (20U/μl)	NEB
DpnI (20U/μl)	
EcoRI (20U/μl)	
XhoI (20U/μl)	
Polymerasen	
PFU Polymerase (2,5U/μl)	Agilent
SYBR Green Mastermix	Thermo Fisher Scientific
T7 RNA Polymerase (10U/μl)	
Taq PCR Mastermix	Qiagen
Weitere Enzyme	
Antarctic Phosphatase (5U/μl)	New England Biolabs
Overnight Ligase (1U/μl)	
Quick Ligase T4 (1U/μl)	

Tabelle 5- Enzyme

Reaktionskits

Zweck	Titel	Hersteller
cDNA Synthese/ Reverse Transkriptase	iScript cDNA Synthesis	Biorad
DNA Präparation	Nucleospin	Macherey-Nagel
	NucleoBond x-tra MidiPrep	
DNA-Mutagenese	Quickchange site directed Mutagenesis Kit	Agilent
Gelextraktion	Quiaex	Qiagen
In-vitro Transkription	mMessage mMachine T7	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 6- Reaktionskits

Material

Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Calciumchloriddihydrate	Sigma
Cholinchlorid	
Deoxynojirimycin-hydrochlorid	
D-Galaktose	
D-Glukose	
HEPES	
Kaliumchlorid	
Lysogeny broth LB-Agar	
LB-Medium (Lennox)	Roth
LE-Agarose	Biozyme
Magnesiumchlorid	Sigma
MES	
Natriumchlorid	
Phlorizin-dihydrat	
D-Sorbitol	
TRIS Base	

Tabelle 7- Chemikalien

Medien und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	Bezeichnung	Zusammensetzung
Agarplatten	LE-Agar 35g/L Ampicillin 50µg/mL H ₂ O, autoklaviert	TRIS-Acetat-EDTA TAE Puffer 50x	Tris 121g, Eisessig 28,55mL, EDTA 50mL, 0,5 M H ₂ O auf 500mL, pH 8,0
LB-Medium	LB Lennox Medium 25g/L pH 7,1, autoklaviert	TRIS-EDTA Puffer	Tris 10mM EDTA 1mM pH 8,0

Tabelle 8- Medien und Puffer

Material

Messlösungen

Die neutrale Ausgangslösung wurde für Experimente bei pH7 mit 20mM HEPES, bei pH5 mit 20mM HEPES/MES gepuffert. Der Ausgleich der Osmolarität in glucosefreien Bedingungen erfolgte mit 75mM D-Sorbitol.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Bezeichnung	Zusammensetzung
Ausgangslösung pH7 bzw. pH5	NaCl 100mM KCl 2mM MgCl ₂ 2mM CaCl ₂ 2mM HEPES 20mM für pH7 bzw. HEPES/MES 20mM für pH5 D-Sorbitol 75mM	Aktivierungslösung DNJ pH7 bzw. pH5	NaCl 100mM KCl 2mM MgCl ₂ 2mM CaCl ₂ 2mM HEPES 20mM für pH7 bzw. HEPES/MES 20mM für pH5 D-Sorbitol 75mM DNJ 10µM
Aktivierungslösung Glukose pH7 bzw. pH5	NaCl 100mM KCl 2mM MgCl ₂ 2mM CaCl ₂ 2mM HEPES 20mM für pH7 bzw. HEPES/MES 20mM für pH5 D-Glukose 75mM	Inhibitorlösung pH5 bzw. pH7	NaCl 100mM KCl 2mM MgCl ₂ 2mM CaCl ₂ 2mM HEPES 20mM für pH7 bzw. HEPES/MES 20mM für pH5 D-Sorbitol 75mM DNJ 10µM Phlorizin 240µM

Tabelle 9- Messlösungen

2.3 Geräte

Bezeichnung	Fabrikat	Hersteller
16bit AD/DA Wandler	ITC16 ST	Instrutech Corporation
37°C Brutschrank	Lukra	Hartenstein
Autoklav	V150	Systemec
Binokular	Stemi SV11	Zeiss
Binokular	204946	Wild Heerbrugg

Material

Feinwaage	Shinko Denshi	PF
Gefrierschrank -20°C		Liebherr
Gefrierschrank -80°C		Thermo Electron Corp.
Gelkammern	verschiedene	Peqlab
Kapillarziehgerät		Scientific Instrument Lab
Konfokales Laser Scanning Mikroskop	DM6000 CS	Leica Microsystems CMS GmbH
Kühlschrank		Siemens
Messrechner 1	iMac auf Mac OS Basis	Apple
Messrechner 2	Intel auf Windows XP Basis	IBM, Maxdata
Messverstärker	Turbo Tec- 10C	NPI Electronic
Messverstärker	Turbo TEC 01C	NPI Electronic
Mikroinjektionspumpe	Nanoject II Auto Nanoliter Injectors	Drummond
Mikropipetten Puller	P-97	Flaming& Brown
Nanoinjektor	Nanoliter 2010	WPI
Oozyten-Brutschrank	IPP 30	Memmet
pH-Meter	HI991001	Hanna
Photometer		GeneQuant pro
Pumpe	12031041	ALA Scientific Instruments
Real-time PCR-Gerät	CFX 384	Biorad
Schüttelbrutschrank	TH 15	Edmund Bühler
Schüttler	Rotamax 120	Heidolph
Thermoblock	5436	Eppendorf
Thermocycler	Professional Trio	Biometra
Tischzentrifuge	Sprout	Biozym
UV Spektrometer	NanoDrop	PeqLab Biotechnologies
UV-Detektion Gelelektrophorese		Alpha Innotech Corporation
Vortexer	VortexGenie2	Scientific Instruments
Wasserbad		Memmert
Zentrifuge	Biofuge Pico	Kendro
Zentrifuge Zellkultur	4K10	Sigam Zentrifugen

Tabelle 10- Geräte

Material

Software & Tools

Bezeichnung	Hersteller
qbase+	Biogazelle, USA
SWISS-Model Server	Biozentrum Universität Basel, Schweiz
Pulse & Pulse fit	HEKA Elektronik, Deutschland
Fitmaster	
Patchmaster	
Excel	Microsoft, USA
Word	
IGOR Pro	WaveMetrics, USA
MutationTaster	www.mutationtaster.org
PROVEAN	www.provean.jcvi.org

Tabelle 11- Software

3 Methoden

3.1 Identifikation des ADHS Kandidatengens SLC5A4/ SGLT3

Die Identifikation des Kandidatengens war im Vorfeld durch eine Exomsequenzierung bei mehreren Familien deutscher Abstammung mit hoher Prävalenz eines adulten ADHS erfolgt. Obwohl der Autor der vorliegenden Arbeit selbst nicht an dieser Studie beteiligt war, werden hier aus Gründen der Vollständigkeit einige Details dargestellt.

Die klinische Diagnose der Familienmitglieder wurde entsprechend DSM-IV Kriterien gestellt (siehe hierzu (Romanos et al., 2008)). Mindestens zwei klinisch betroffene Familienmitglieder wurden jeweils für die WES ausgewählt, als Kriterien wurden die meiotische Distanz und/oder die Verwandtschaftsverhältnisse im Stammbaum herangezogen. Durch die Kollegen Dres. M. Klein und B. Franke, Abteilung Humangenetik der Radboud Universität Nijmegen, Niederlande erfolgte die Selektion des Exoms, die Sequenzierung und Abbildung auf ein Referenzgenom sowie die Identifikation der Einzelnukleotidvarianten mit Hilfe eines Bayes-Algorithmus und deren Annotation.

Um das Vorhandensein der ausgewählten, seltenen Varianten bei den Probanden der WES zu überprüfen und eine Segregationsanalyse zu erstellen, wurden alle Personen des Stammbaums P14 für die ATG-Deletion in SLC5A4 (c.1502-4delATG) mittels PCR-basierter DNA-Sequenzierung genotypisiert (siehe Abbildung 1). Der genetische Ziellokus wurde mittels PCR amplifiziert. Danach wurde die Kosegregation des für $\Delta M500$ -SGLT3 kodierende Genotyps mit der klinischen ADHS Diagnose bestimmt. Hierbei zeigte sich eine zumindest partielle Kosegregation, was nicht untypisch für entwicklungsneurologische Krankheitsbilder wie ADHS ist (weitere Einzelheiten siehe Schäfer et al., 2018).

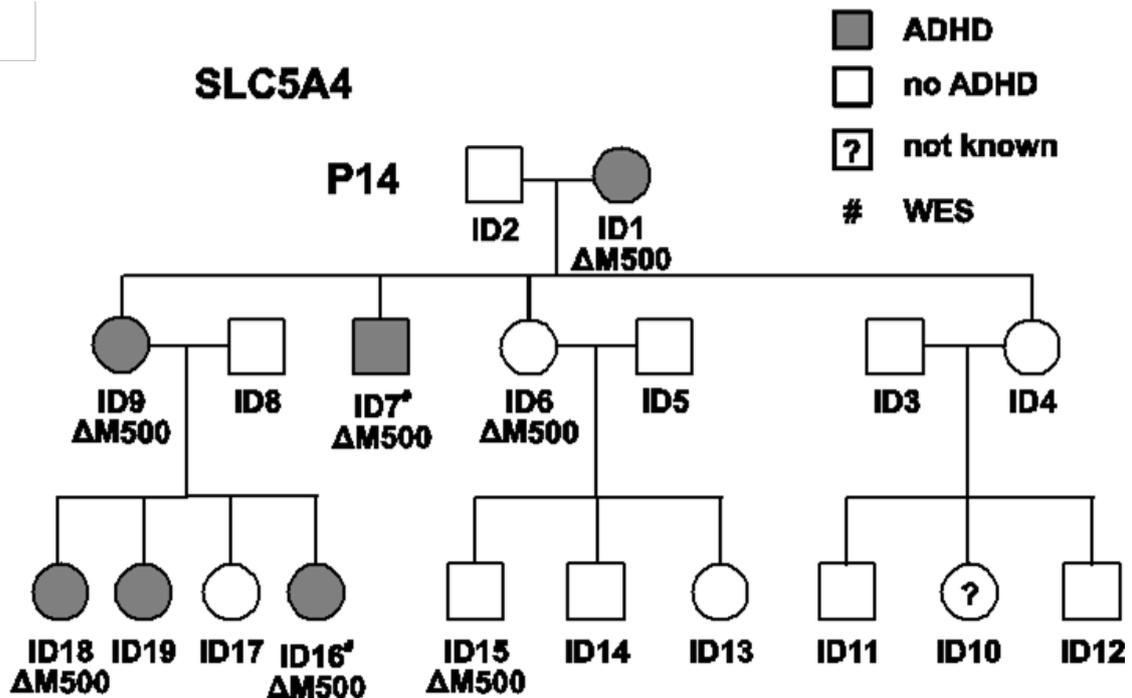


Abbildung 5 - Stammbaumanalyse der Indexfamilie. Dunkelgrau markiert sind bestätigte ADHS Fälle. $\Delta M500$ -SGLT3 Mutationsträger sind entsprechend gekennzeichnet (nach Schäfer et al. 2018).

3.2 Erstellung des Expressionsprofils von SLC5A4/ SGLT3

RNA Pools und reverse Transkription

Um zu klären, in welchen Geweben bzw. Hirnarealen SLC5A4 exprimiert wird, sind die unter Material beschriebenen RNA-Proben aus verschiedenen Geweben herangezogen worden. Zum Erstellen eines PCR- und damit DNA-basierten Expressionsprofils von SLC5A4 wurden jeweils 1000ng RNA der Gesamt-RNAs (500ng/ μ l) sowie der kortikalen RNA Proben suizidaler/ nicht-suizidaler Spender (individuelle Konzentrationen) sowie von Colon (760ng/ μ l) und Jejunum (1179ng/ μ l) mit nukleasefreiem H₂O auf 15 μ l eingestellt und gemäß Anleitung des „iScript cDNA synthesis kit“ in einem 20 μ l Gesamtansatz mit 1 μ l des enthaltenen Reverse-Transkriptase Enzyms sowie 4 μ l des Reaktionsmix zu cDNA umgeschrieben. Zusätzlich wurde ein Pool aus jeweils 2 μ l jedes entstandenen RT-PCR Ansatzes aus den kortikalen Proben als Positivkontrolle angelegt.

Qualitative RT-PCR

Zum Nachweis der hSGLT3 Sequenz in den entstandenen cDNA Ansätzen der Gesamt-RNAs wurde eine Polymerasekettenreaktion mit je 0,7µl der SLC5A4- spezifischen, int-ronspannenden Primer HSA37/38 und HSA39/42 (jeweils 100pmol/µl, 1:10, *siehe Mate-rial*) durchgeführt. Dabei wurde 1µl der vorangegangenen Reversen Transkriptase Reak-tion als DNA-Template mit 2,5µl Magnesiumchloridpuffer (15mM), 1µl Nukleotiden (2,5mM each) sowie 0,2µl der House Taq-Polymerase der AG Translationale Neurowis-senschaft auf 25µl Volumen mit nukleasefreiem Wasser angesetzt. Nach Optimierung wurden 2µl der Proben von Kortex, Jejunum und Colon (je 500ng/µl) mit je 1µl der SLC5A4-spezifischen Primer und 12,5µl des Hot Star Taq Mastermix mit 8,5µl nuklea-sefreiem Wasser auf 25µl Reaktionsvolumen aufgefüllt. Im Folgenden dargestellt sind die Reaktionsbedingungen der PCR.

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholung
Denaturierung	95°C	3 Minuten	1
Denaturierung	95°C	45 Sekunden	35
Annealing, Amplifika-tion	60,5°C 72°C	45 Sekunden 45 Sekunden	
Elongation	72°C	3 Minuten	1
Abkühlen	10°C	-	-

Tabelle 12 - PCR Protokoll RT-PCR Expressionsprofil von SGLT3.

Gelelektrophorese

Der Nachweis der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte durch Gelelektrophorese. Nach dem Auftragen der mit Blaupuffer versetzten PCR Ansätze auf ein ethidiumbro-midhaltiges, zweiprozentiges Agarosegel in einer wassergefüllten Kammer wird diese unter Spannung gesetzt, worauf die DNA als Polyanion in Richtung der Anode wandert. Nach einiger Zeit haben sich alle aufgetragenen Moleküle gemäß ihrer elektrochemi-schen Eigenschaften im Gel verteilt. Deren Größe kann mittels eines mitlaufenden 1kb-DNA Größenmarkers bestimmt werden. Die SLC5A4 Sequenz findet sich bei etwa 2000bp. Das Ergebnis wurde auf einem UV-Tisch kontrolliert und fotografisch dokumen-tiert.

Quantitative real-time PCR

Um neben der qualitativen Expression von hSGLT3 in verschiedenen Geweben auch eine quantitative Analyse der Expression anfertigen zu können, wurde eine real-time PCR (qPCR bzw. rt-PCR) durchgeführt.

Mit dieser Methode ist es möglich, den Grad der Expression eines Zielgens relativ zu sogenannten „housekeeping“ Genen zu bestimmen. Diese Gene kodieren für basale Zellstrukturen (z.B. Zytoskelett, Ribosomen) und sind daher im Zielgewebe weitgehend frei von äußeren Einflüssen konstitutionell exprimiert. Der Expressionsgrad des Zielgens wird in Bezug zu dem der „housekeeping“ Gene gesetzt und damit „normalisiert“. Hierdurch kann für Störeinflüsse (variable Extraktionseffizienz, Gewebeeffekte usw.), die ja alle amplifizierten Sequenzen betreffen, kontrolliert werden (Pfaffl, 2004). Zur Detektion der amplifizierten Sequenzen wurde der fluoreszierende Farbstoff „SYBR Green“ verwendet, der zwar mit verschiedenen Nukleinsäuren interkaliert, jedoch nur bei Bindung an Doppelstrang DNA sein Fluoreszenzmaximum erreicht. Die Veränderung des Fluoreszenzsignals pro Zyklus verhält sich damit proportional zu der Menge der amplifizierten Sequenzen. Derjenige PCR Zyklus, in dem das Fluoreszenzsignal einer amplifizierten Sequenz einen definierten Wert erreicht, wird Schwellenzyklus oder „Thresholdcycle“ (C_t) genannt. Diese Größe gibt Aufschluss über die Ausgangsmenge und damit den Grad der Expression der gesuchten Sequenz.

Die Spezifität des Signals wird mit einer sich anschließenden Schmelzkurvenanalyse geprüft. Potenzielle Störeinflüsse wie eine Primerdimerisierung oder „hairpin“- DNA Strukturen schlagen sich in einer Veränderung der Schmelzkurve (z.B. im Sinne einer zweigipfligen Verteilung) nieder.

Die Ansätze für die quantitative real-time PCR enthielten die aus den Gesamt-RNA Proben mittels Reverse Transkriptase hergestellten cDNAs (1µl, 1:5 verdünnt), 5µl des SYBR Green Master Mix, je 5µM der beiden SGLT3-Primer (*siehe Material*) und der Primer für verschiedene humane Referenzgene und wurden mit 3µl nukleasefreiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10µl aufgefüllt. Die Fluoreszenzmessung erfolgte mittels CFX384 real-time PCR Analyse (Biorad). Im Folgenden dargestellt sind die Reaktionsbedingungen der PCR.

Methoden

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholung
Denaturierung	95°C	2 Min.	1
Denaturierung	95°C	5 Sek.	45
Annealing, Amplifikation und Fluoreszenzmessung	60°C	30 Sek.	
Denaturierung	95°C	10 Sek.	1
Schmelzkurve	65°C- 95°C	5 Sek. pro 0,5°C Schritt	1
Abkühlen	15°C	-	-

Tabelle 13 – PCR Protokoll des real-time PCR Expressionsprofils von SGLT3.

Analytische Methoden

Nach Kalkulation der Stabilität der Referenzgenexpression (M) unter der Annahme einer optimalen Effizienz ($E=2$) und einer erlaubten Triplikatabweichung ($C_t < 0,7$) wurden mit dem „GeNorm“ Algorithmus in qbase die stabilsten Referenzgene identifiziert (Vandesompele et al., 2002). Generell liegt für Werte $M_{\text{Referenzgen}} < 1$ eine geringe C_t - Varianz eines Referenzgens über allen zur Berechnung verwendeten Proben vor. Ideale Referenzgene weisen einen $M_{\text{Referenzgen}} < 0,5$ auf, durchschnittliche Referenzgene zeigen M -Werte zwischen 0,5 und 1.

Unter Einschluss sowohl der gastrointestinalen als auch der zentralnervösen GesamtrNAs ergaben sich die robustesten Normalisierungsergebnisse mit drei Referenzgenen: UBC ($M_{\text{UBC}} = 0,59$), GAPDH ($M_{\text{GAPDH}} = 0,63$) sowie RS27A ($M_{\text{RS27A}} = 0,67$). Insgesamt fand sich hier eine mittelmäßige Referenzgenstabilität.

Für die Analyse der zentralnervösen Expressionsstärken unter Ausschluss der gastrointestinalen Proben ergaben sich optimale Normalisierungsergebnisse mit zwei Referenzgenen: RS27A ($M_{\text{RS27A}} = 0,37$) und GAPDH ($M_{\text{GAPDH}} = 0,39$). Insgesamt fand sich hierbei eine höhere Referenzgenstabilität ($M_{\text{UBC}} = 0,42$, $M_{\text{HPRT1}} = 0,51$, $M_{\text{ACTB}} = 0,51$), was typisch für homogene Proben ist.

Um den normalisierten Expressionsgrad des Zielgens SLC5A4 zu berechnen, wurden mittels des Programms qbase die entsprechenden C_t Werte in jeder Probe durch den

Normalisierungsfaktor dividiert und als dimensionslose, relative Zahlen sowohl auf logarithmischer als auch linearer Skala geblotted (Hellemans et al., 2007).

3.3 Herstellung des SGLT3-pSGEM Konstrukts

PCR Amplifikation von SGLT3

Zunächst wurden 3,3µl des vorhandene SGLT3-pRSSP Konstrukts (1073ng/µl) mit 3µl des Restriktionsenzym XhoI und 5µl NEB4 Puffer auf ein Volumen von 50µl mit nukleasefreiem Wasser angesetzt und gemäß Herstellerangabe für 2 Stunden bei 37°C inkubiert, um ein Nukleinsäure mit überstehenden, sogenannten „sticky ends“ zu erzeugen. Nach Kontrolle des korrekten Schnitts mittels Größenmessung der Banden in einer Gelelektrophorese wurde mit 2,2µl des Restriktionsverdau, entsprechend 100ng DNA eine PCR- basierte Amplifikation der Zielsequenz durchgeführt. Hierfür wurden entsprechende forward und reverse SGLT3 Primer (je 10pmol/µl), 1µl Nukleotide (2,5mM each) sowie 1µl der Pfu-Polymerase und 5µl des Pfu-Puffers (Agilent) zugesetzt und mit nukleasefreiem Wasser auf 50µl Reaktionsvolumen eingestellt. Im Folgenden sind die Einstellungen für die PCR Zyklen dargestellt.

Methoden

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholung
Denaturierung	95°C	2 Minuten	1
Denaturierung	95°C	45 Sekunden	30
Annealing & Amplifikation	58°C-65°C 72°C	45 Sekunden 2 Minuten 15 Sekunden	
Elongation	72°C	4 Minuten	1
Abkühlen	10°C	-	-

Tabelle 14 – PCR Protokoll SGLT3 Amplifikation aus SGLT3-pRSSP

Restriktionsverdau und Vektordephosphorylierung

Um die SGLT3 Sequenz aus dem pRSSP-Vektor herauszulösen und eine passende Insertionsstelle für SGLT3 im pSGEM Vektor (Konzentration 1050ng/μl) zu schaffen, wurden beide Produkte mit je 2μl der Restriktionsenzymen BamHI und EcoRI und entsprechendem Puffer nach Herstellervorgaben über zwei Stunden inkubiert und das Restriktionsergebnis gelelektrophoretisch kontrolliert. Im Anschluss wurde der Restriktionsverdau von pSGEM in einem weiteren enzymatischen Schritt an der 5'-Stelle dephosphoryliert, um eine eventuelle Autoligation der beiden freien Enden zu verhindern. Dies erfolgte gemäß Protokoll der Antarctic Phosphatase bei 37°C für 15 Minuten, sowie bei 60°C für weitere zehn Minuten.

Gelextraktion

Die bei der Restriktion entstandenen Fragmente, einerseits SGLT3 und andererseits der passend geschnittene pSGEM-Vektor, müssen zur späteren Ligation isoliert werden. Hierfür wurden die Ansätze des Verdau auf ein einprozentiges, ethidiumbromidhaltiges Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und die entsprechenden Fragmentbanden anhand einer Größenreferenz (linearisierter pSGEM-Vektor bei 3000bp, SGLT3 bei 2100bp) mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden gemäß Anleitung des „Quiaex“ Kits behandelt und die auf den Säulen gebundenen DNAs mit jeweils 25μl nukleasefreiem H₂O eluiert.

Ligation

Vor der eigentlichen Ligation ist es notwendig, ein günstiges Verhältnis von 4:1 zwischen Insert und Vektor herzustellen. Hierzu wurden die geextrahierten Ansätze von Insert und

Vektor abermals auf ein Gel aufgetragen und anhand der Strahlungsintensität der Banden das Verhältnis in den Proben abgeleitet. Folgende Formel wurden zur Berechnung der Insertmenge bei bekannter Vektormenge sowie Größe von Insert bzw. Vektor benutzt:

$$\frac{\text{Vektormenge in } \mu\text{l}}{\text{Verhältnis } 1/4} \times \frac{3(\text{Insertgröße in bp})}{2(\text{Vektorgröße in bp})} = \text{Insertmenge in } \mu\text{l}$$

Formel 1 - Berechnung der Insertmenge für Ligation

Um die Probenreste effizient zu verwerten, wurde die Ligation mit dem „T4 Quick-Ligation“ Kit zusätzlich im Insert:Vektor-Verhältnis von 2:1, also 4µl Insert zu 2µl Vektor, durchgeführt. Eine weitere Ligation ohne SGLT3-Insert (Selbstligation) wurde als Kontrolle für die korrekte Dephosphorylierung des Vektors durchgeführt. Alle Ansätze wurden gemäß Protokoll der T4 Ligase mit entsprechendem Puffer und H₂O bei Raumtemperatur für fünf Minuten inkubiert und dann bis zur Weiterbearbeitung auf Eis gelegt.

Transformation

Die Transformation erfolgte mit kompetenten E. Coli Bakterienstämmen, die gemäß Standardprotokoll zunächst langsam aufgetaut wurden bevor das komplette Ligationsprodukt hinzugegeben wurde. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis und 45-sekündigem Hitzeschock bei 42°C im Thermoblock wurden die Zellen erneut auf Eis gestellt und mit 400µl LB-Medium versetzt. Im Schüttelbrutschrank wurden die Zellen bei etwa 37°C und 200rpm inkubiert. Die resultierenden Suspensionen der beiden Ligationen wurden zu 100µl bzw. 400µl auf insgesamt vier Ampicillin-haltige Agarnährböden aufgetragen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die am besten sichtbaren Kolonien von den beimpften Agarplatten mit einem Holzzahnstocher aufgeladen und in 4ml LB-Medium mit 20µl Ampicillin zur Selektion der korrekt transformierten Bakterien in Flüssigkultur überführt. Die Ansätze wurden danach bei 37°C im Schüttelinkubator über Nacht inkubiert.

Plasmidpräparation Mini

Die Isolation und Aufreinigung der Plasmid-DNA aus den 4ml Flüssigkulturen erfolgte mit dem „Nucleospin Plasmid (NoLid)“ Kit gemäß Herstellerprotokoll. Dabei werden nach Lyse der Bakterien Verunreinigungen (Makromoleküle, chromosomale DNA) entfernt und die Plasmid-DNA in entsalzten Bedingungen mit 50µl eines leicht alkalischen Puffers (Tris/HCl, pH 8,5) eluiert. Die Konzentration der erhaltenen DNA wurde photometrisch bestimmt. Anschließend wurde zur Kontrolle des korrekt präparierten SGLT3-pSGEM Konstrukts ein Restriktionsschritt gemäß oben beschriebenen Protokolls mit den bereits

Methoden

verwendeten Enzymen BamHI und EcoRI durchgeführt. Der Verdau wurde gelektrophoretisch auf das Vorhandensein der erwarteten Banden bei etwa 2000bp (SGLT3) bzw. 3100bp (pSGEM) geprüft. Jeweils 1000ng der insgesamt vier erhaltenen Plasmidpräparationen wurden anschließend mit den Primern T7 und pSGEM rev. (siehe Material) bei einem externen Dienstleister (Eurofins Genomics) nach Anleitung sequenziert und die korrekte Präparation zur weiteren Verarbeitung ausgewählt.

Plasmidpräparation Midi

Nach erfolgreicher Präparation eines korrekten Fusionsprodukts galt es höherkonzentrierte Plasmid-DNA des Konstruktes herzustellen, wofür das „NucleoBond X-tra Midi Kit“ benutzt wurde. Nach der erneuten Animpfung einer 4ml Vorkultur mit einer der korrekten Kolonien aus der Minipräparation erfolgte die Inkubation bei 37°C unter Schütteln (200rpm) für etwa acht Stunden. Anschließend wurde 400µl der Vorkultur in 40ml LB-Medium mit 40µl Ampicillin überführt und erneut bei 37°C und ausreichender Sauerstoffzufuhr im Schüttelbrutschrank inkubiert. Das Prinzip der Midipräparation entspricht dem der Minipräparation, wohingegen die verwendete anionenaffine, poröse Silicamembran für größere Probenmengen und bessere DNA-Ausbeute optimiert ist. Schlussendlich erfolgte ein weiterer, analoger Restriktionsschritt um die erfolgreiche Präparation des korrekten Konstruktes zu bestätigen.

3.4 Herstellung der SGLT3 Mutanten

Nach der erfolgreichen Herstellung eines SGLT3-pSGEM Konstruktes wurde eine SGLT3 Mutante mit Nukleotiddeletion an Stelle 501, $\Delta I501$ -SGLT3 erzeugt. Im Folgenden ist die Herstellung dieser Mutante beschrieben. Die in der WES identifizierte Mutante ($\Delta M500$ -SGLT3) wurde von der AG Geiger (Julius-von-Sachs Institut für Biowissenschaften, Universität Würzburg) hergestellt.

Gezielte Mutagenese

Die gezielte, ortsspezifische Mutagenese („site directed mutagenesis“) via PCR erfolgte nach Protokoll des „QuikChange site-directed mutagenesis“ Kit mit kommerziellen Primern, die die Sequenz für die gewünschte Mutation, nämlich die Deletion eines Isoleucin an Stelle 501 von SGLT3, bereits enthalten. Essenziell für dieses Verfahren ist, dass die verwendete „pfu“-Polymerase eine Korrekturlesefunktion besitzt, mittels der nach Einbringen der Deletion möglichst exakte Kopien der mutierten Ziel-DNA amplifiziert werden. Neben 1 μ l des pSGEM-SGLT3 Konstrukts (Konzentration 20ng/ μ l) wurden 1 μ l der Pfu-Polymerase und 5 μ l des 10x Pfu-Puffers, sowie 1 μ l Nukleotide (2,5mM each) und je 1,4 μ l der mutationstragenden $\Delta I501$ -SGLT3 sense und antisense Primer (93pmol/ μ l und 107pmol/ μ l, siehe Material) auf ein Reaktionsvolumen von 51 μ l mit nukleasefreiem Wasser angesetzt. Im Folgenden sind die Reaktionsschritte der PCR dargestellt.

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholung
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	1
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	45
Annealing, Amplifikation	55°C	1 Minute	
Denaturierung	68°C	5:30 Minuten	1
Abkühlen	10°C	-	--

Tabelle 15 - PCR Protokoll Mutagenese $\Delta I501$ -hSGLT3

Im Anschluss wurde den jeweiligen Ansätzen 1µl des Restriktionsenzymes Dpn-I hinzugefügt um selektiv die Reste der methylierten, sogenannten parentalen Ausgangs-DNA zu verdauen.

Transformation und Präparation

Die Transformation der mutierten Konstrukte erfolgte analog der des Wildtyps mit 2µl bzw. 5µl der jeweiligen DNA und 100µl bzw. 400µl Ausstrichvolumen auf den Agarplatten. Der Testschnitt erfolgte mit BamHI und EcoRI. Alle weiteren Schritte der Plasmidpräparation erfolgten analog derer des Wildtyps.

3.5 In-Vitro Transkription der Konstrukte

Um aus der vorhandenen DNA die für die Oozyteninjektion benötigte, direkt translatierbare „capped RNA“ herzustellen, wurde das „mMessage mMachine Kit“ verwendet. Hiermit wird zunächst das zirkuläre Vektor-Insert Konstrukt enzymatisch linearisiert (Verdau mit NHEI nach Herstellervorgaben), der Schnitt per Gelelektrophorese kontrolliert und die DNA per Standard Phenol-Chloroform Extraktion und Isopropanol Präzipitation aufgereinigt. Nach dieser Vorbereitung wird die Ausgangs-DNA in einem Ansatz unter anderem mit der RNA-Polymerase, die am T7-Promotor des pSGEM Vektors ansetzt, freien Nukleotiden sowie der für die Stabilität der translatierbaren RNA im Oozyten notwendigen 7-Methylguanoscaps über eine Stunde inkubiert. Nach einem weiteren Aufreinigungsschritt konnte die cRNA Konzentration photometrisch mit 445,9ng/µl für den Wildtyp und 842,9ng/µl für ΔI501-SGLT3 bestimmt werden. Für die Standardisierung der Injektion wurden Aliquots mit einer Konzentration von jeweils 500ng/µl hergestellt.

3.6 Elektrophysiologie

Spannungsklemme an *Xenopus laevis* Oozyten

Für die elektrophysiologische Charakterisierung der Transporter mittels Spannungsklemme wurden Oozyten von *Xenopus laevis* Fröschen verwendet. Dabei misst eine in die Oozyte gestochene Elektrode die Spannung zwischen dem Zytoplasma und der extrazellulären Lösung, eine weitere injiziert Ströme ins Zellinnere bis sich die gewünschte Klemmspannung einstellt. Die Menge injizierter Ladungen bei einer induzierten Potenzialänderung über der Zellmembran entspricht dabei dem Betrag der gewanderten Ladungen.

Injektion und Inkubation

Für die elektrophysiologischen Experimente wurden jeweils 50,6nl der auf 500ng/µl eingestellten cRNA des wildtypischen und (zur Korrektur des reduzierten Membraneinbaus)

100nl der ebenfalls auf 500ng/µl eingestellten cRNA der mutierten Transporter sowohl im pSGEM als auch im pNBI22 Vektor (durch die AG Geiger, Julius-von-Sachs Institut für Biowissenschaften, Universität Würzburg) unter stereomikroskopischer Sicht mit einer ölbefüllten Glaskapillare durch eine Mikroinjektionspumpe in die Oozyten der Reifestadien IV-VI injiziert. Die Inkubation erfolgte in spezialisierten Kühlschränken über zwei bis vier Tage bei 19°C.

Messstand

Der standardmäßige Aufbau des Messstandes beinhaltete im Wesentlichen ein Binokular zur Einstellung der Oozyten, zwei Mikromanipulatoren, mit denen die beiden Elektroden in die Zellen eingestochen wurden, einen Verstärker und AD-Wandler, einen Puls-generator sowie einen Messcomputer mit Messsoftware, um die gemessenen, analogen Rohdaten digitalisiert aufzuzeichnen und auszuwerten. Der Messstand war mittels Faraday-Käfig elektrisch abgeschirmt.

Die Oozyte wurde in einer Kunststoffkammer abgelegt und ununterbrochen von den angewandten Messlösungen umspült; diese wurden aus herkömmlichen, in gleicher Höhe angebrachten 50ml Spritzen durch ein „Luerlock“- Schlauchsystem mit Mehrwegeperfusionssystem eingespült. Die verwendete Glaskapillaren enthielten 3mM KCl und wiesen Widerstandswerte um 1 MΩ auf. Vor jeder neuen Oozyte wurde ein Nullabgleich beider Elektroden durchgeführt. Die Messdaten wurden mit den Programmen Patchmaster (HEKA Electronics) aufgezeichnet und mit IGOR Pro (Wavemetrics) weiter analysiert und visualisiert.

Messprotokoll

Die verwendeten Messprotokolle umfassten im Wesentlichen das Anlegen einer konstanten Klemmspannung von -60mV unter sequenzieller Perfusion der im Kapitel Material spezifizierten Messlösungen und Registrierung der Ladungsbewegungen. Daneben wurde auch ein Stromklemmenprotokoll verwendet, bei dem statt der induzierten Ströme die entsprechenden Spannungsveränderungen über der Oozytenmembran mittels der Spannungselektrode registriert und als Spur aufgenommen wurde.

Statistische Methoden

Für die Berechnung der substratinduzierten Effekte wurde jeweils der Wert der stabilen Baseline nach (bzw. vor) Zugabe des Substrats von der stabilen Baseline vor (bzw. nach) Zugabe des Substrats subtrahiert und der arithmetische Mittelwert der Differenzen

gebildet. Die Ergebnisse werden in der Form „Mittelwert± Standardabweichung“ angegeben. Die Zahl der untersuchten Oozyten wird mit „n“ angegeben. Die Überprüfung auf Normalverteilung erfolgte mit dem Shapiro-Wilk Test. Die Bestimmung der statistischen Signifikanz der mutationsassoziierten Effekte erfolgte mittels eines zweiseitigen T-Tests (gepaart bei identischem Oozytensatz sowie unter Annahme unterschiedlicher Varianzen bei Vergleich verschiedener Oozytensätze) beziehungsweise einer entsprechenden einfachen oder mehrfaktoriellen Varianzanalyse mittels ANOVA-Test unter Angabe des F-Wertes. Im Falle einer möglichen Abweichung der Daten von der Normalverteilung wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U Test durchgeführt. Für jedes Experiment wurden mindestens zwei unabhängige Oozytensätze verwendet, andernfalls ist eine entsprechende Erläuterung ergänzt. Signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) werden mit *, hochsignifikante Ergebnisse ($p < 0,01$) mit ** gekennzeichnet.

3.7 In-Silico Effektvorhersage

Ergänzend wurden die funktionellen Konsequenzen beider Aminosäuresequenzvarianten auf SGLT3 mittels einer in-silico Modellierung und Effektvorhersage untersucht (Protein Variation Effect Analyzer, „PROVEAN“, (Choi et al., 2012, www.provean.jcvi.org).

Dem resultierenden PROVEAN-Score liegt ein Vergleich der betreffenden Sequenz mit einer Vielzahl funktioneller homologer Proteinsequenzen zu Grunde. Dabei wird der Grad der Ähnlichkeit der Sequenzen vor und nach Einführen einer Mutation in der Zielsequenz als Maß für die resultierende Funktionalität herangezogen. Je weniger ähnlich die resultierenden Sequenzen hinsichtlich ihrer wahrscheinlichen dreidimensionalen Struktur also sind, desto wahrscheinlicher ist ein Funktionsverlust durch Einführen der Mutation. Die Schwelle, unterhalb derer PROVEAN eine Sequenzalteration als wahrscheinlich schädlich klassifiziert, basiert auf einem mittels Maschinelernen abgeleiteten Algorithmus der von biologischen Datensätzen informiert ist. Die für die Vorhersage verwendeten Aminosäuresequenzen von SGLT3 und den beiden Aminosäuredeletionsvarianten $\Delta M500$ -SGLT3 und $\Delta I501$ -SGLT3 im „FASTA“-Format finden sich im Anhang.

3.8 Lasermikroskopischer Expressionsnachweis

Zum visuellen Nachweis der korrekten Membrantranslokation der injizierten Konstrukte wurden die Transporter in den pNBI22 Vektor kloniert und dadurch wie oben beschrieben mit ein „*Yellow Fluorescent Protein*“ (YFP) am C-terminalen Ende des entstehenden Proteins fusioniert. Die Oozyten wurden nach erfolgter elektrophysiologischer Messung

unter einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM) in äquatorialer Ebene dargestellt.

Zur Dokumentation der Expression werden einige der Oozyten auf einen Objektträger aufgebracht, in ihrer Äquatorialebene eingestellt und das Fluorophor YFP mit einem Argon-Laser der Wellenlänge 514nm angeregt, wodurch eine Lichtemission im Wellenlängenbereich 528-580nm erzeugt wird, die unter dem Leica HCX IRAPO L25x/0.95W Objektiv detektiert werden kann. Die aufgenommenen Pixel werden mit der Software LAS AF zu einem Bild mit Darstellung des YFPs in gelber Farbe rekonstruiert und die relative Intensität der Fluoreszenz bezogen auf den Wildtyp mittels eines programminternen Algorithmus gemessen. Zur statistischen Analyse wurden die Mittelwerte \pm SD der membranständigen Fluoreszenzintensitäten von jeweils 5 Oozyten bestimmt und mittels T-Tests auf Unterschiedlichkeit geprüft. Der Mittelwert der membranständigen Fluoreszenzintensität der wt-SGLT3 injizierten Oozyten wurde für das Balkendiagramm als Referenzwert benutzt und die darauf bezogenen relativen Leuchtintensitäten der übrigen Oozyten in arbiträren Einheiten dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Expressionsprofil von SGLT3

Um zu bestimmen, ob SLC5A4 im Zentralnervensystem exprimiert wird, wurde ein PCR-basiertes Expressionsprofil anhand Gesamt-RNAs verschiedener Gewebe angefertigt.

4.1.1 RT-PCR Kortex

Zuerst wurde eine Expression von SLC5A4 im zerebralen Kortex überprüft, der höhere kognitiven Funktionen vermittelt und daher neben ADHS in einer Vielzahl von neuropsychiatrischen Erkrankungen impliziert wurde (Banaschewski et al., 2010).

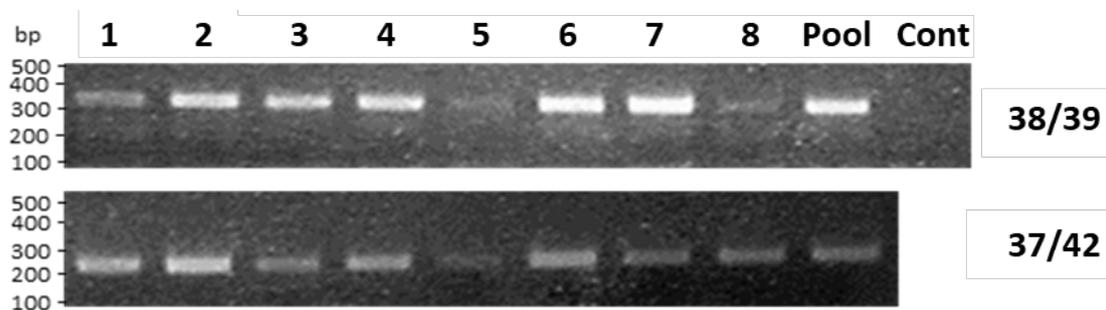


Abbildung 6 - RT-PCR Expressionsprofil von SLC5A4 in humanen kortikalen Gesamt-RNAs. Nachweis der für SGLT3 kodierenden Gensequenz (SLC5A4) mit zwei spezifischen intronspannenden Primerpaaren (38/39, erwartete Fragmentgröße 343bp bzw. 37/42, 250bp) in allen 8 Gesamt-RNAs. Markierungen 1 mit 8 entsprechen Proben je eines Spenders. „Pool“ bestehend aus je 2µg RNA aller Samples (1-8) als Positivkontrolle, hier deutlich positiv. „Cont“ mit H₂O statt cRNA als Negativkontrolle ohne Amplifikation. bp= Basenpaare.

In allen acht Kortexproben ließen sich mittels RT-PCR zwei spezifische Sequenzen von SLC5A4 mit den zu erwartenden Fragmentgrößen (343bp für HSA38/39 bzw. 250bp für HSA37/42) amplifizieren, womit zunächst das Vorhandensein von SLC5A4 auf RNA-Ebene im Großhirn bestätigt wurde. Der Kontrollansatz mit H₂O statt RNA zeigte erwartungsgemäß keine Amplifikation was für die Freiheit von kontaminierendem genomischen Material in den Ansätzen spricht.

4.1.2 RT-PCR subkortikaler Areale

Neben dem Kortex sind jedoch auch subkortikale und limbische Regionen wie die Basalganglien, Hypothalamus und Hippocampus bei neuropsychiatrischen Krankheitsbildern wie ADHS impliziert (Renner et al., 2008, Cortese, 2012, Banaschewski et al., 2017). Aus diesem Grund galt es in einem nächsten Schritt eine eventuelle Expression

Ergebnisse

von SLC5A4 in ADHS-relevanten subkortikalen Arealen zu überprüfen. Proben aus Colon und Jejunum wurden bei vorbekannter hoher SLC5A4-Expression als Positivkontrollen eingesetzt (Diez-Sampedro et al., 2003).

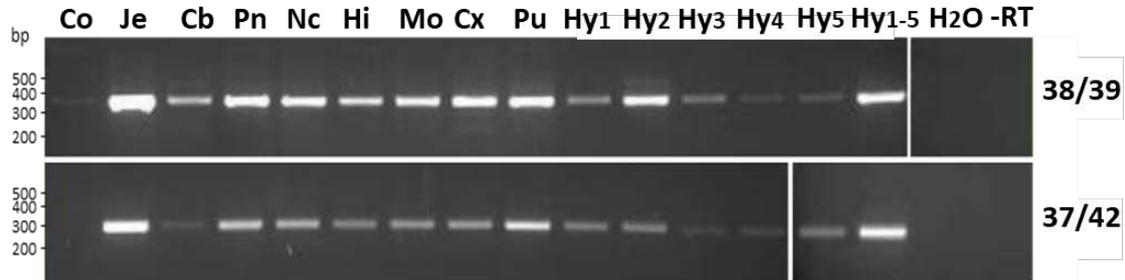


Abbildung 7 - RT-PCR Expressionsprofil von SLC5A4 in ADHS-relevanten Hirnarealen. Nachweis der SLC5A4-Sequenz in humanen gewebe- bzw. hirnearealspezifischen Gesamt-RNAs mit zwei spezifischen intronspannenden Primerpaaren (38/39, erwartete Fragmentgröße 343bp bzw. 37/42, 250bp). Colon (Co) und Jejunum (Je) als Positivkontrollen, Co schwach, Je deutlich positiv. Proben ohne Reverse Transkriptase (-RT) sowie mit H₂O statt cDNA als Negativkontrolle. Cb= Cerebellum, Pn= Pons, Nc= Nucleus caudatus, Hi= Hippocampus, Mo= Medulla oblongata, Cx= Cortex, Pu= Putamen, Hy₁ mit Hy₅= Hypothalami verschiedener Spender, Hy₁₋₅= gepoolte Hypothalamusproben. bp= Basenpaare.

Mit beiden Primerpaaren konnten die zu erwartenden Amplicons (343bp für HSA38/39 bzw. 250bp für HSA37/42) in allen verwendeten subkortikalen Regionen nachgewiesen werden.

Zusammenfassend beweisen beide qualitative PCRs ein Vorhandensein von SLC5A4 auf RNA Ebene sowohl in kortikalen als auch subkortikalen Hirnarealen.

4.1.3 Real-time PCR kortikaler und subkortikaler Areale

Da die qualitativen PCRs keine Aussage über die differenzielle Expressionsstärke von SLC5A4 in verschiedenen Hirnarealen bzw. Geweben erlaubt, wurde eine quantitative real-time PCR auf Basis der bereits verwendeten Gesamt-RNAs ergänzt, um eine Aussage über die relative Stärke der Expression von SLC5A4 in verschiedenen Geweben treffen zu können.

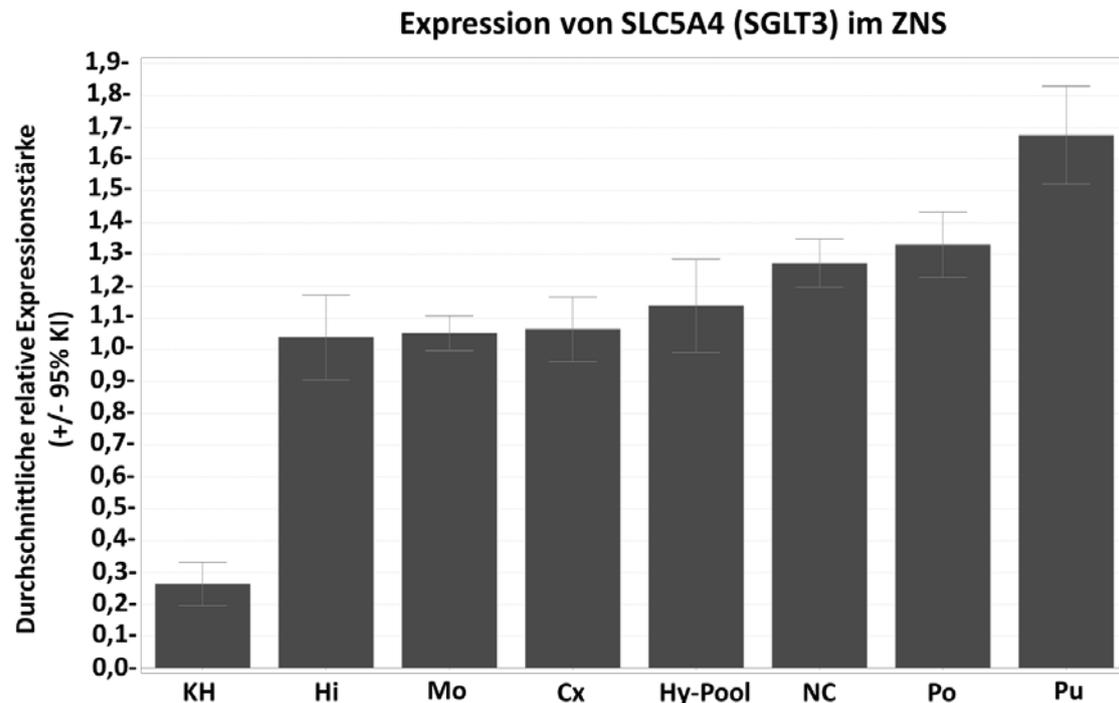


Abbildung 8 - Real-time PCR Expressionsprofil von SLC5A4 in verschiedenen Hirnarealen. Auf der Y-Achse dargestellt ist die durchschnittliche relative Expressionsstärke von SLC5A4 bezogen auf zwei mittels geNorm Algorithmus bestimmte Referenzgene (RS27A und GAPDH). KH= Kleinhirn, Hi= Hippocampus, Mo= Medulla oblongata, Cx= Cortex, Hy-Pool= gepoolte Hypothalamusproben, NC= Nucleus caudatus, Po= Pons, Pu= Putamen.

Wie bereits in der qualitativen PCR gezeigt war die SLC5A4 Sequenz in allen Proben nachweisbar. Eine über die Norm relativ erhöhte Expression von SLC5A4 konnte im Putamen (etwa 68%), Pons (etwa 33%) und Nucleus caudatus (etwa 28%) nachgewiesen werden. Im Hypothalamus fand sich eine moderate Erhöhung der Expression von SLC5A4. In Cortex, Medulla oblongata und Hippocampus waren die Expressionsniveaus von SGLT3 gegenüber der Referenz geringfügig erhöht. Eine jedoch deutlich verringerte Expression von SGLT3 konnte dagegen im Kleinhirn (etwa 77% unter Referenz) nachgewiesen werden. In der Jejunumprobe zeigte sich erwartungsgemäß eine um den Faktor 100 erhöhte Expression (Daten nicht gezeigt).

4.2 Elektrophysiologische Charakterisierungen

Um die Funktion membranständiger Transporter zu beurteilen, können sowohl durch sie fließende Ströme nach Ligandenbindung als auch resultierende Spannungsänderungen zwischen Zytoplasma und umgebendem Medium gemessen werden. Hierfür wurden Oozyten nach Injektion der entsprechenden Konstrukte und Inkubation per Spannungs- und Stromklemme untersucht.

4.2.1 Charakterisierung von wildtypischem SGLT3

SGLT3 besitzt eine niedrige Affinität zum klassischen Substrat der SGL-Transporter, der D-Glukose. Die dadurch induzierbaren Ströme liegen lediglich im Bereich von einigen Nanoampere und damit mehr als eine Zehnerpotenz geringer im Vergleich zu SGLT1 (Wright et al., 2011). Daher war es zunächst von Interesse, möglichst optimale Messbedingungen im Sinne einer Maximierung der messbaren Ströme zu definieren. Diese Optimierung wurde durch Einsatz unterschiedlicher pH-Werte in den Messlösungen sowie Testung weiterer potenter Liganden durchgeführt.

Im Folgenden exemplarisch dargestellt sind Ableitungen einzelner Oozyten in Spannungs- und Stromklemme und – sofern durchgeführt – ergänzend in Stromklemmentchnik. Die jeweils eingewaschenen Messlösungen sowie der herrschende pH-Wert werden über den Messspuren illustriert.

4.2.1.1 pH-Abhängigkeit

Angesichts bestehender Hinweise auf eine pH-abhängige Aktivität von SGLT3 (Diez-Sampedro et al., 2003) wurden zunächst durch D-Glukose induzierte Ströme in verschiedenen pH-Werten bei einer Klemmspannung von -60mV, also in der Größenordnung des physiologischen Ruhepotenzials, abgeleitet.

Ergebnisse

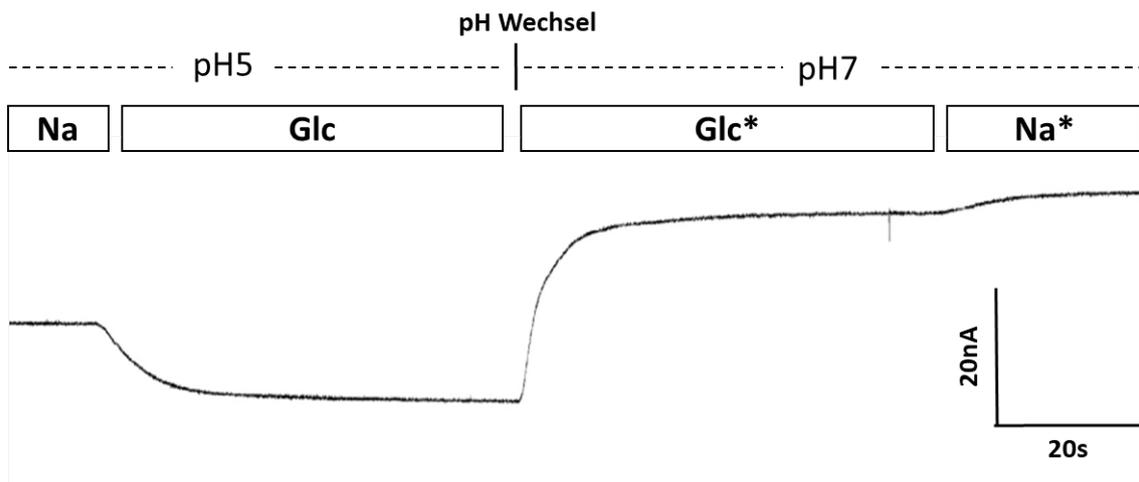


Abbildung 9 - Aktivierung von SGLT3 durch D-Glucose bei verschiedenen pH Werten. Klemmpotential -60mV. Beginn mit Ausgangslösung pH5 (Na). 75mM D-Glucose (Aktivierungslösung Glucose pH5, Glc) induziert einen depolarisierenden Kationeneinstrom. Nach Wechsel auf neutralen pH-Wert (Aktivierungslösung Glucose pH7, Glc*) zeigt sich eine deutlich geringere Stromdifferenz zur substratfreien Baseline unter Ausgangslösung pH7 (Na*).

In Anwesenheit von 75mM D-Glukose zeigte sich in der Tat eine pH-Abhängigkeit der gemessenen Differenzströme zu der jeweiligen substratfreien Baseline. Es zeigte sich hierbei eine signifikante Vergrößerung der Kationenströme in sauren gegenüber neutralen pH-Bedingungen ($-6,18 \pm 3,40 \text{ nA}$ vs. $-31,35 \pm 9,4 \text{ nA}$; $F= 19,2$, $p=0,046$, $n=3$ bzw. $n=5$).

Aufgrund dessen wurden die weiteren Aktivierungsexperimente daher vornehmlich unter pH5 durchgeführt. Da die so erzeugten Ströme jedoch noch relativ gering und damit anfällig für eventuelle Messfehler waren, wurde daraufhin untersucht, ob potentere Agonisten zur Maximierung der messbaren Ströme beitragen können.

4.2.1.2 Aktivierung durch D-Glukose und 1-Deoxynojirimicin

Neben den klassischen Monosacchariden existieren potente, hochspezifische SGLT3-Agonisten wie der Iminozucker 1-Deoxynojirimicin (DNJ) und seine zahlreichen Abkömmlinge. In der Literatur wird für DNJ eine um den Faktor 40.000 höhere Affinität zu SGLT3 als D-Glukose ($K_{m_{DNJ}}=0,5 \mu\text{M}$ vs. $K_{m_{D-Glc}}=20 \text{ mM}$) angegeben (Voss et al., 2007). In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob der Einsatz von DNJ zu einer weiteren Vergrößerung der messbaren Kationenströme in SGLT3-exprimierenden Oozyten führt.

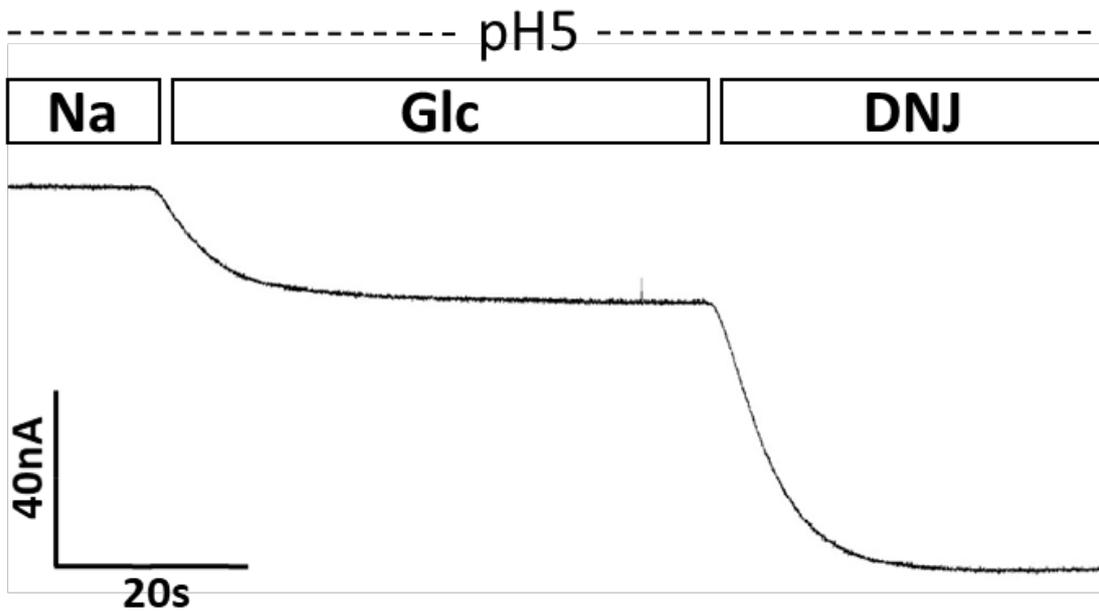


Abbildung 8 - Aktivierung von SGLT3 durch Glucose und DNJ bei pH5. Klemmpotenzial -60mV. Beginn mit Ausgangslösung pH5 (Na). Einwaschen von 75mM D-Glucose (Aktivierungslösung Glucose pH5, Glc) führt zu einem depolarisierenden Strom. Nach Abwarten des „steady-states“ induziert Einwaschen von 10 μ M DNJ (Aktivierungslösung DNJ pH5, DNJ) einen zusätzlichen, kräftigen Kationeneinstrom.

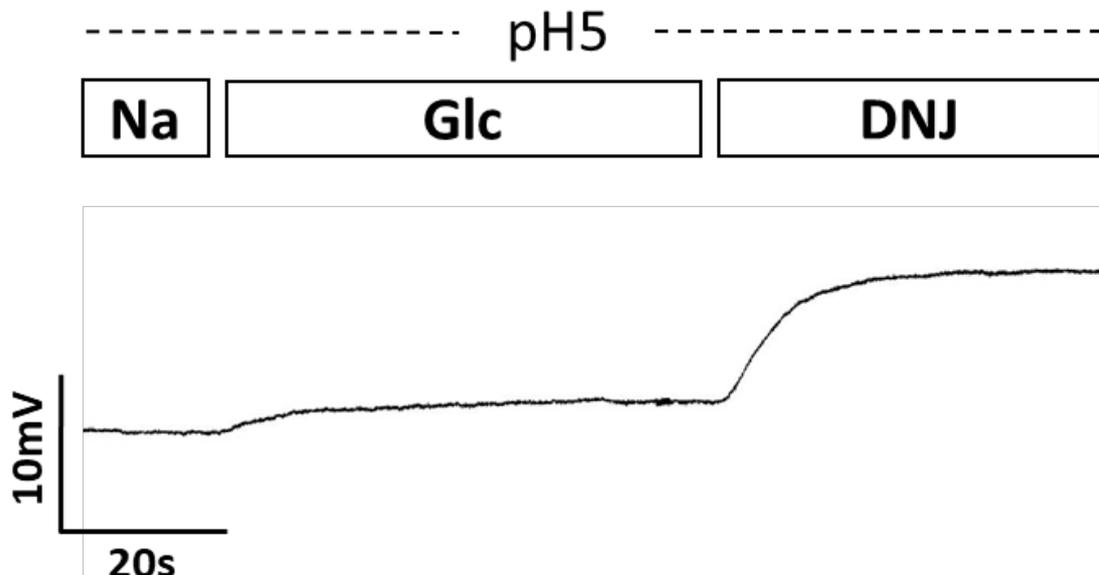


Abbildung 9 - Aktivierung von SGLT3 durch Glucose und DNJ im Stromklemmenmodus. Selbe Oozyte und Einwaschschritte wie in Abb. 8. Einwaschen von 75mM D-Glucose bzw. 10 μ M DNJ führt zu sukzessiver Depolarisationen der Oozytenmembran.

Ergebnisse

In den gezeigten Spannungs- bzw. Stromklemmenexperimenten konnte demonstriert werden, dass die Zugabe von 10 μ M DNJ gegenüber substratfreier Baseline hochsignifikante (-61 \pm 35nA vs. -144 \pm 39nA, p=0,01, n=5) und etwa dreifach stärkere Kationeneinströme an SGLT3-exprimierenden Oozyten induziert als 75mM D-Glukose alleine (-81,36 \pm 17,39nA vs. -31,35 \pm 9,4nA, U-Wert=0, p<0,01, n=5). An H₂O-injizierten Kontrollloozyten waren weder in der Glukose- noch in der DNJ-Bedingung signifikante Ströme gegenüber der Baseline abzuleiten (-25,9 \pm 8,3nA vs. -23,6 \pm 7,2 bzw. -24,2 \pm 7,5nA, U-Wert=14,5, p=0,6, n=3, zwei Batches).

Dies bestätigte die Evidenz einer hohen agonistischen Potenz des Iminozuckers DNJ an SGLT3 und dadurch die Spezifität der gemessenen Ladungsbewegungen für SGLT3.

4.2.1.3 Substratinduzierte Ströme und pH

Zusammenfassend werden die essenziellen Eigenschaften der Aktivierung von SGLT3 herausgestellt.

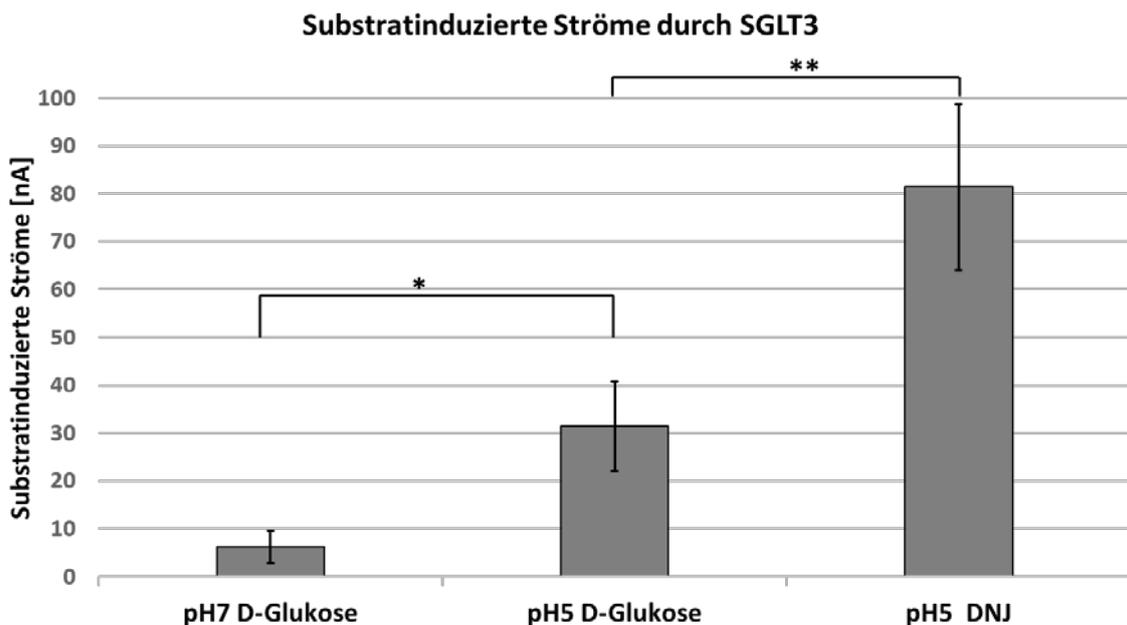


Abbildung 10 –Substratinduzierte Ströme von wildtypischem SGLT3. Auf der Y-Achse substratinduzierte Ströme in nA. Alle Bedingungen mit 75mM D-Glukose. Glukoseinduzierte Ströme in pH5 sind um den Faktor fünf größer als in neutralen pH-Bedingungen (p=0,046). Bei pH5 erzeugt der Zusatz von 10 μ M DNJ um 250% stärkere Ströme als D-Glukose alleine (p<0,01).

Sowohl der Einsatz von D-Glukose als auch DNJ führte in den gemessenen Oozyten zu Kationeneinströmen. Diese Ströme waren in hohem Maße pH-abhängig wie der Unterschied zwischen den substratinduzierten Strömen in der neutralen gegenüber der sauren Bedingung illustriert (-6,18 \pm 3,40nA vs. -31,35 \pm 9,4nA, p=0,046, n=3 bzw. n=5). DNJ

Ergebnisse

induzierte bei pH5 deutlich stärkere Ströme als D-Glukose alleine ($-31,35 \pm 9,4 \text{ nA}$ vs. $-81,36 \pm 17,39 \text{ nA}$, U-Wert=0, $p < 0,01$, $n=5$).

Zusammenfassend konnte in diesen Experimenten demonstriert werden, dass sowohl D-Glukose als auch 1-Desoxynojirimycin depolarisierende Ströme in SGLT3-injizierten Oozyten induzieren. Diese waren am größten in sauren Bedingungen. Daher wurde für die weiteren Experimente die Kombination aus 75mM D-Glukose und 10 μ M DNJ bei pH5 als maximale Aktivierungsbedingung definiert.

4.2.1.4 Inhibition durch Phlorizin

Neben agonistisch wirkenden Substanzen sind bei einer elektrophysiologischen Charakterisierung auch spezifische Inhibitoren von Interesse, da sie weitere Aufschlüsse über die Spezifität der beobachteten Ströme und die Modulierbarkeit der Leitfähigkeit eines Transporters bzw. Ionenkanals erlauben. Um die Spezifität der demonstrierten Ströme für SGLT3 weiter zu untermauern wurde das Pflanzenglykosid Phlorizin, ein gut bekannter kompetitiver Inhibitor mit hohen Affinitäten für die SGL-Transporter verwendet ($K_i=120 \mu\text{M}$ für SGLT3, $K_i=1 \mu\text{M}$ für SGLT1 nach Raja & Kinne, 2015).

Im Folgenden sollte überprüft werden, in wie weit Phlorizin die durch D-Glukose alleine sowie in Kombination mit 1-Desoxynojirimycin induzierten, depolarisierenden Ströme in verschiedenen pH-Bedingungen inhibiert und damit die Spezifität der gezeigten Ladungsbewegungen für SGLT3 untermauert.

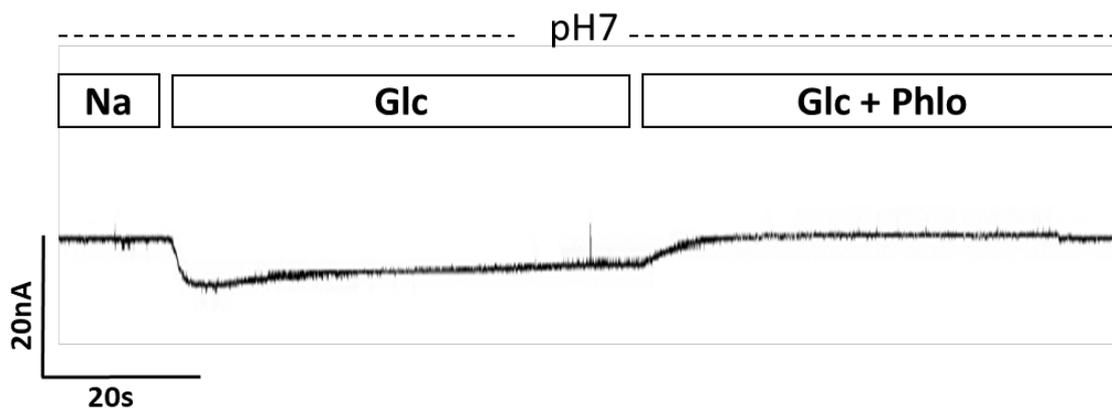


Abbildung 11 - Inhibition von SGLT3 durch Phlorizin bei pH7. Klemmspannung -60mV. Beginn mit substratfreier Ausgangslösung pH7 (Na). Einwaschen von 75mM D-Glucose (Aktivierungslösung Glucose pH7, Glc) führt zu einem depolarisierenden Strom. Phlorizin (Inhibitorlösung pH7, Glc+ Phlo) inhibiert die depolarisierenden Ströme weitestgehend.

Ergebnisse

Bei pH-neutralen Bedingungen inhibierte Phlorizin die durch D-Glukose induzierten depolarisierenden Ströme nicht signifikant ($-6,18 \pm 3,40 \text{ nA}$ vs. $-4,30 \pm 0,89 \text{ nA}$, U-Wert=10, $p=0,23$; $n=3$, gleicher Batch). Analog zu den Aktivierungsexperimenten wurde daraufhin untersucht, inwieweit die in Maximalbedingung induzierten Ströme durch die gleiche Menge Phlorizin inhibiert werden.

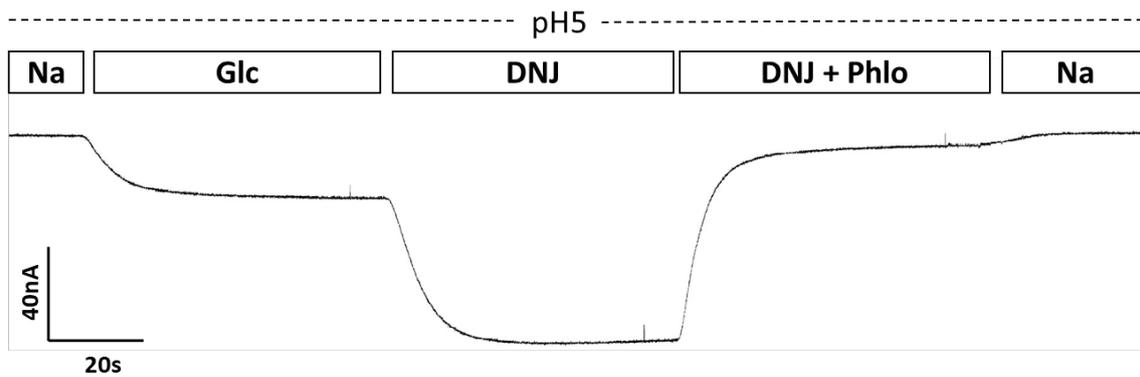


Abbildung 12 - Inhibition von SGLT3 durch Phlorizin bei pH5. Klemmspannung -60mV. Sequenzielles Einwaschen von D-Glukose und DNJ (exakte Schritte siehe Abb. 8). 0,24mM Phlorizin (Inhibitorlösung pH5, *Glc+DNJ+Phlo*) inhibiert die induzierten Ströme nahezu vollständig. Auswaschen aller Substrate führt zur Wiedereinstellung der Baseline (Ausgangslösung pH5, *Na*)

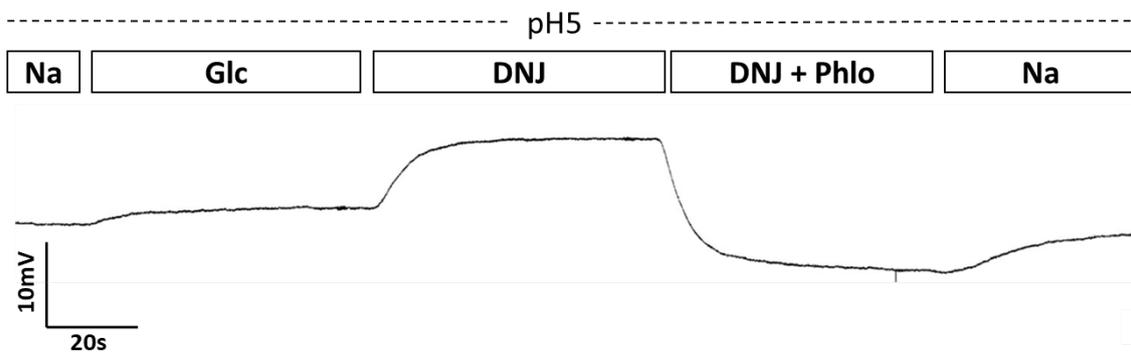


Abbildung 13 - Inhibition von SGLT3 durch Phlorizin bei pH5 im Stromklemmenmodus. Selbe Oozyte und Einwaschschritte wie Abb. 12. Sequenzielles Einwaschen von Glucose und DNJ induzierte Depolarisationen der Membran. Einwaschen von 0,24mM Phlorizin führte zu einer deutlichen Hyperpolarisation der Zellmembran. Auswaschen der Substrate stellte die Baseline weitgehend wieder her.

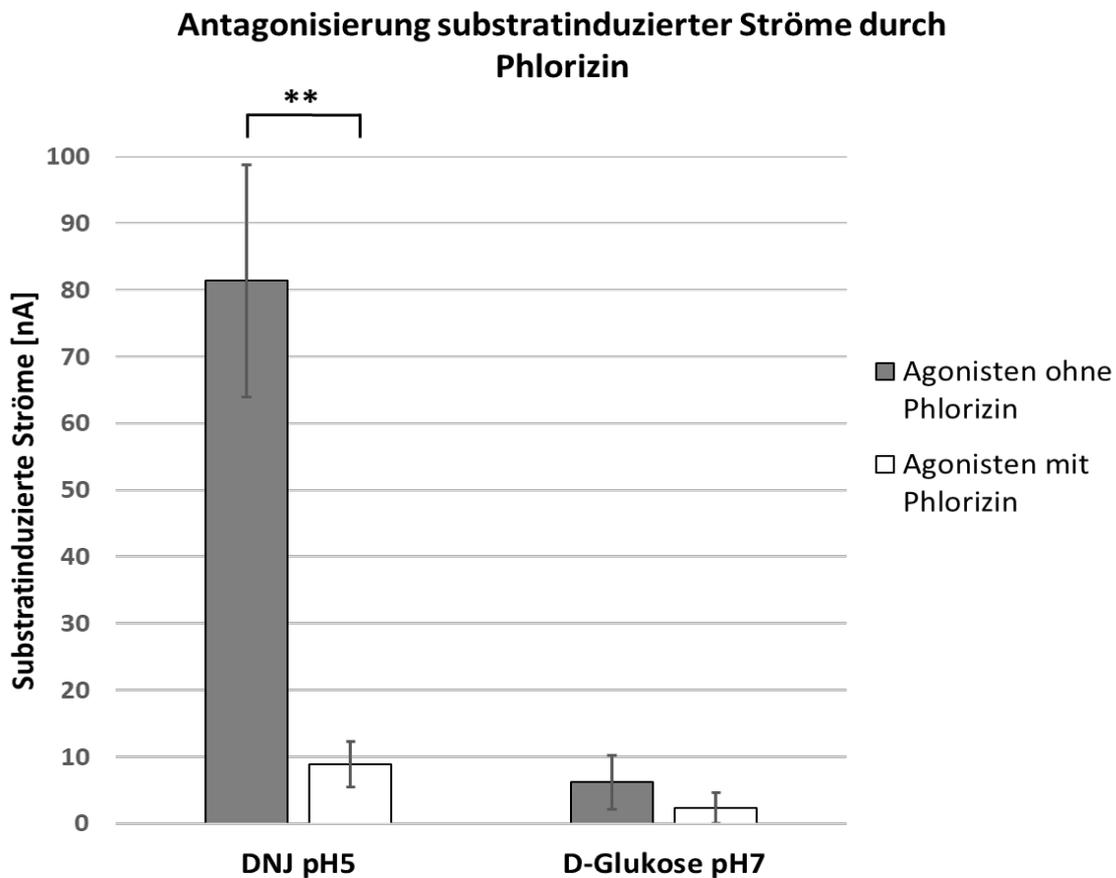


Abbildung 14 – Zusammenfassung der Inhibition von SGLT3 durch Phlorizin. Auf der Y-Achse substratinduzierte Ströme in nA. Vergleich der substratinduzierten Ströme mit und ohne Zusatz des Inhibitors Phlorizin. Phlorizin inhibierte die durch 75mM D-Glucose und 10 μ M DNJ induzierten Ströme bei pH5 um 89% ($p < 0,01$).

Phlorizin inhibierte sowohl die von D-Glucose als auch die durch DNJ induzierten, depolarisierenden Ströme durch wildtypischen SGLT3. In Maximalbedingungen führte der Zusatz von Phlorizin zu einer Antagonisierung von 89% der substratinduzierten Ströme (-81,36 \pm 17,39nA vs. -8,85 \pm 4,03nA, $F=81,1$, $p < 0,01$, $n=5$). In neutralen Ausgangsbedingungen zeigte sich allenfalls ein Trend zur Reduktion der substratinduzierten Ströme um 29% (-6,18 \pm 3,40nA vs. -4,30 \pm 0,89nA, $p=0,2$, $n=3$, gleicher Batch).

Zusammenfassend konnte in diesen Versuchsreihen gezeigt werden, dass die beobachteten glukose- bzw. DNJ-induzierten Ströme sowohl pH-abhängig als auch phlorizinsensitiv sind – und damit von wildtypischem SGLT3 vermittelt werden (Diez-Sampedro et al., 2003; Voss et al., 2007; Bianchi & Díez-Sampedro, 2010).

4.2.2 Charakterisierung von $\Delta M500$ -SGLT3 und $\Delta I501$ -SGLT3

Um zu überprüfen, ob die in der WES detektierte Deletion eines Methionin an Stelle 500 der Aminosäurekette von SGLT3 Konsequenzen auf dessen Funktion hat, wurde $\Delta M500$ -SGLT3 in Oozyten exprimiert und unter den gleichen Bedingungen wie das wild-typische Protein elektrophysiologisch untersucht. Eine analoge Aminosäuredeletionsvariante an der benachbarten Stelle, $\Delta I501$ -SGLT3, wurde ebenfalls hergestellt und in Oozyten exprimiert, um überdies zu untersuchen, ob eventuelle Effekte durch eine strukturelle Alteration der betreffenden Transmembrandomäne oder durch die fehlende Funktion des betreffenden Methionin selbst vermittelt werden (Vgl. hierzu Panayotova-Heiermann et al., 1996 und Martín & Wright, 1996).

4.2.2.1 Aktivierung von $\Delta M500$ -SGLT3 und $\Delta I501$ -SGLT3

Basierend auf den experimentell ermittelten maximalen Aktivierungsbedingungen erfolgten die Messungen beider Mutanten sowie der Kontrolloozyten bei -60mV Klemmspannung in sauren Bedingungen mit der sequenziellen Kombination aus 75mM D-Glucose und 10 μ M DNJ als Agonisten.

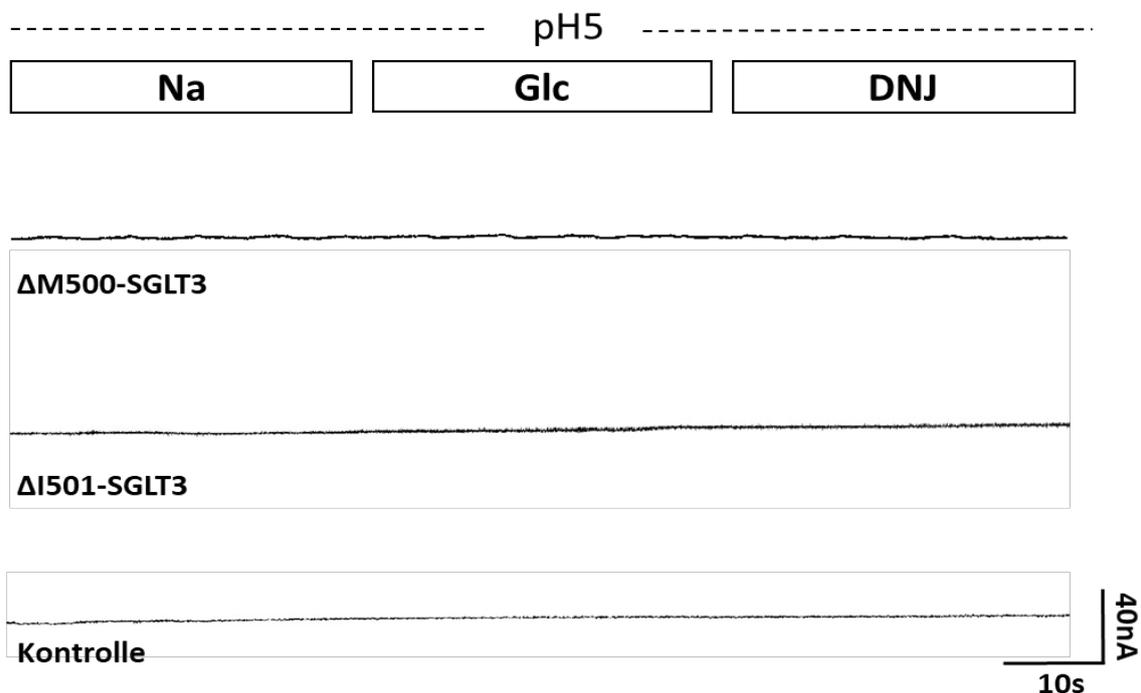


Abbildung 15 - Aktivierungsexperiment von $\Delta M500$ -SGLT3 (oben) bzw. $\Delta I501$ -SGLT3 (mittig) und Kontrollen (unten) bei pH5. Klemmspannung jeweils -60mV. Beginn mit Ausgangslösung pH5

Ergebnisse

(Na). 75mM D-Glukose (Aktivierungslösung Glukose pH5, *Glc*) und 10 μ M DNJ (Aktivierungslösung DNJ pH5, *DNJ*) induzieren keine signifikanten Ströme in Δ M500 bzw. Δ I501-SGLT3-exprimierenden sowie H₂O injizierten Kontrolloozyten.

Wie aus Abb. 15 hervorgeht, war es bei maximalen Aktivierungsbedingungen nicht möglich, dem wildtypischen Transporter vergleichbare Ströme in den Δ M500-SGLT3 bzw. Δ I501-SGLT3 exprimierenden Oozyten zu induzieren. Durch diese Versuchsreihe konnte schlüssig demonstriert werden, dass beide Mutationen zu einer hochgradigen Funktionseinschränkung des Transporters führen, die dessen ligandenabhängige Aktivierung bei pH5 betrifft.

Die folgende Abbildung soll repräsentativ die Ergebnisse der Aktivierungsexperimente mindestens dreier unabhängiger Oozytensätze hinsichtlich der pH-Abhängigkeit sowie der substratinduzierten Ströme von wildtypischem SGLT3 im Vergleich zu den beiden Mutanten zusammenfassen. Zusätzlich dargestellt sind Messdaten von Kontrolloozyten (injiziert mit gleichem Volumen H₂O statt cRNA).

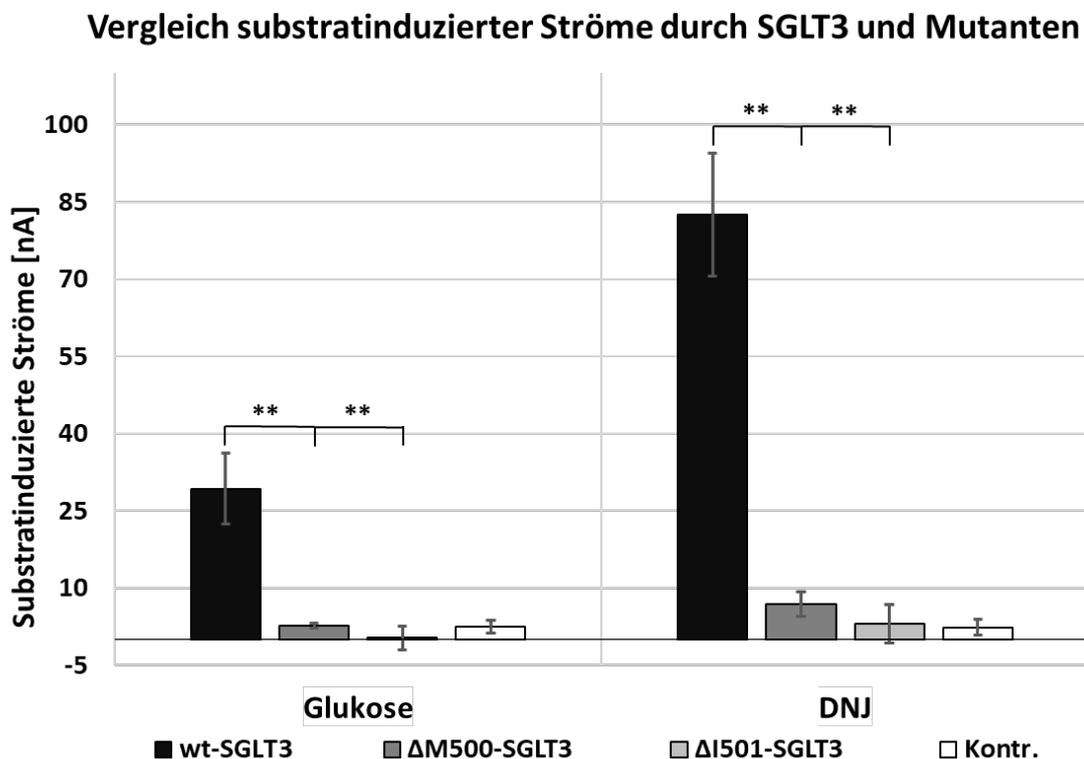


Abbildung 16 - Vergleich der substratinduzierten Ströme an wildtypischem SGLT3, Δ M500-SGLT3, Δ I501-SGLT3 sowie Kontrollen bei pH5, nach Agonisten geordnet. Auf der Y-Achse sub-

Ergebnisse

stratinduzierte Ströme in nA. 10 μ M DNJ induziert an SGLT3 etwa dreifach stärkere depolarisierende Ströme als 75mM D-Glukose alleine (-29,3 \pm 6,9nA vs. 82,5 \pm 12nA, n=10). Beide Mutanten zeigen sowohl in der Glukose- als auch der Maximalaktivierungsbedingung mit DNJ hochgradig reduzierte Kationenströme (Daten erhoben in Zusammenarbeit mit Dr. N. Schäfer, AG Geiger, Julius-von-Sachs Institut f. Biowissenschaften, siehe auch Schäfer et al., 2018).

Die untersuchten Mutationen Δ M500-SGLT3 und Δ I501-SGLT3 erzeugen einen annähernd vollständigen Funktionsverlust der Transporter. In Maximalbedingungen waren die Ströme an Δ M500-SGLT3 gegenüber Wildtyp um rund 92% reduziert (-82,5 \pm 12nA vs. -6,9 \pm 2,4nA, n=10 bzw. n=5), an Δ I501-SGLT3 um 96% (-82,5 \pm 12nA vs. -3,2 \pm 3,7nA, n=10; F=100,1, p<0,01). Analog zeigten sich in der Glukosebedingung die substratinduzierten Ströme an Δ M500-SGLT3 gegenüber Wildtyp um rund 91% (-29,3 \pm 6,9nA vs. -2,7 \pm 0,5nA, n=10 bzw. n=5), an Δ I501-SGLT3 um 98% reduziert (-29,3 \pm 6,9nA vs. -0,4 \pm 2,3nA, n=10; F=54,0, p<0,01).

4.2.2.2 Weiterführende Charakterisierung von Δ I501-SGLT3

Zur Prüfung, ob die gezeigten Effekte der Mutationen auch in neutralem pH nachweisbar sind, wurden Aktivierungs- sowie Inhibitionsexperimente für Δ I501-SGLT3 bei pH7 ergänzt.

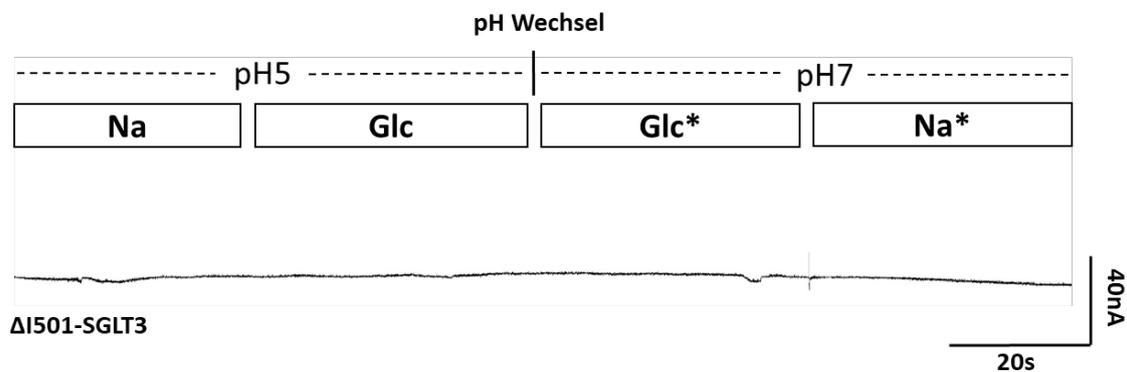


Abbildung 17 - Aktivierung von Δ I501-SGLT3 in verschiedenen pH Bedingungen. Klemmspannung -60mV. Beginn mit Ausgangslösung pH5 (Na). Präsenz von 75mM D-Glukose (Aktivierungslösung Glucose pH5, Glc) induziert weder in pH5 noch bei Wechsel zu pH7 (Aktivierungslösung Glucose pH7, Glc*) depolarisierende Ströme. Auswaschen der Substrate zur Ausgangslösung bei pH7 (Na*) hat keinen Einfluss auf die Baseline.

Wie Abb. 16 illustriert konnten erwartungsgemäß auch in neutralen pH-Bedingungen keine glukoseinduzierten Ströme in Δ I501-SGLT3 exprimierenden Oozyten aufgezeichnet werden (-0,9 \pm 0,7nA vs. -0,8 \pm 0,7nA, U-Wert=29,5, p=0,8, n=4). Folglich konnte durch

Ergebnisse

diese Versuche gezeigt werden, dass es durch beide Mutationen zu einem Funktionsverlust des Transporters in sauren und zumindest für $\Delta I501$ -SGLT3 auch in neutralen Bedingungen kommt.

Bekanntermaßen löst Phlorizin am eng verwandten SGL-Transporter Typ 1 auch unabhängig von einer eigentlichen Depolarisierung eine geringfügige Hyperpolarisation aus. Hierbei handelt es sich wohl um die Inhibition eines Natriumleckstroms durch SGLT1, der einen kleinen Teil der gesamten Natriumströme durch den Transporter ausmacht (Parent et al., 1992). Daneben existieren Hinweise für einen pH-abhängigen und substratunabhängigen Protoneneinstrom durch SGLT3, der phlorizinsensitiv ist (Bianchi & Díez-Sampedro, 2010). Es war daher von Interesse, ob die Mutationen jede durch Phlorizin induzierbare Hyperpolarisation an $\Delta I501$ -SGLT3-injizierten Oozyten unterbinden. Wie Abbildung 17 illustriert, induzierte die Zugabe von Phlorizin weder in sauren ($-0,6 \pm 1,8 \text{ nA}$ vs. $0,9 \pm 1,1 \text{ nA}$, $F=1,8$, $p=0,2$, $n=5$) noch in neutralen ($-0,8 \pm 0,7 \text{ nA}$ vs. $0,7 \pm 0,7 \text{ nA}$, $U\text{-Wert}=29,5$, $p=0,8$, $n=4$) Bedingungen eine signifikante Hyperpolarisation an $\Delta I501$ -SGLT3 exprimierenden Oozyten.

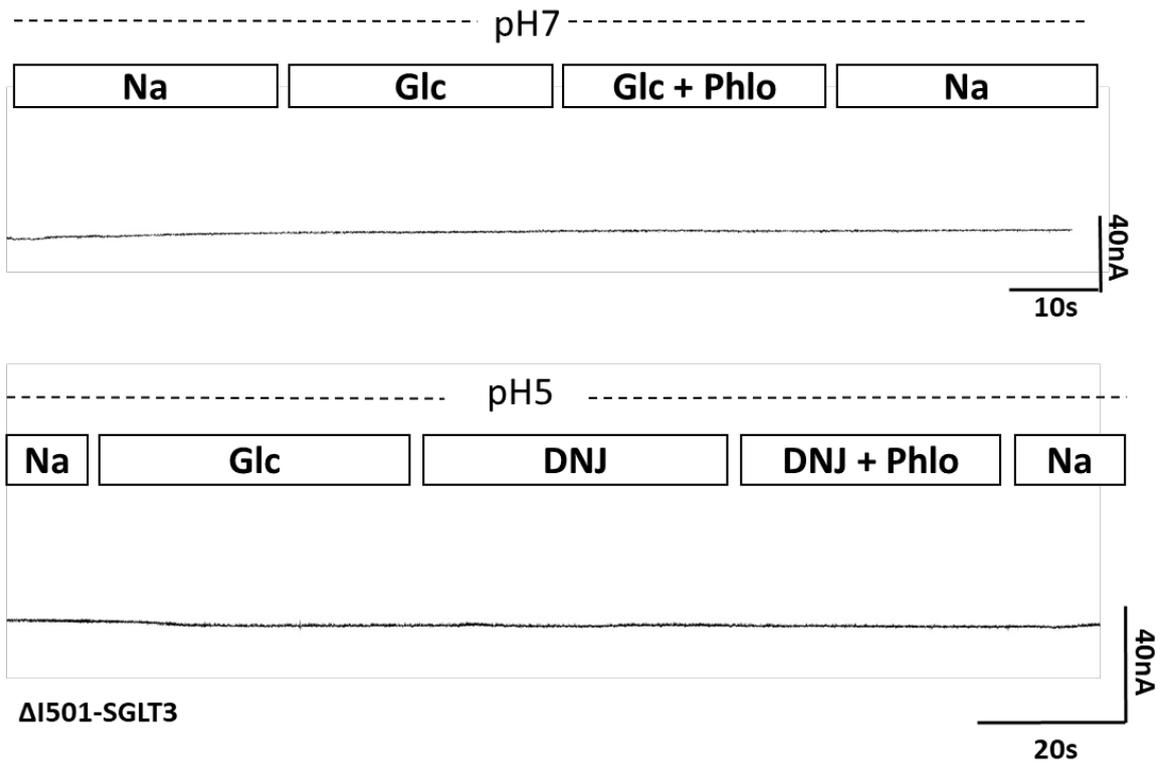


Abbildung 18 - Hyperpolarisationsexperimente an $\Delta I501$ -SGLT3. Klemmspannung -60mV. Oben: Beginn mit Ausgangslösung pH7. Einwaschen von 0,24mM Phlorizin induziert keinerlei Ladungsbewegungen. Unten: Einwaschschritte Vgl. Abb. 12. 0,24mM Phlorizin hat keinen hyperpolarisierenden Effekt.

Durch die vorliegenden Ergebnisse wird unterstrichen, dass der durch $\Delta I501$ -SGLT3 verursachte Funktionsdefekt auch die Inhibition durch den spezifischen Antagonisten Phlorizin betrifft.

4.3 In-Silico Effektvorhersage der Mutationen auf die Funktion von SGLT3

Ergänzend wurden die funktionellen Konsequenzen beider Aminosäuresequenzvarianten auf SGLT3 mittels einer in-silico Modellierung und Effektvorhersage untersucht (Protein Variation Effect Analyzer, „PROVEAN“, Choi et al., 2012).

Diese Analyse bestätigte sowohl $\Delta M500$ -SGLT3 als auch $\Delta I501$ -SGLT3-SGLT3 mit hoher Wahrscheinlichkeit als „krankheitserzeugende“ Sequenzvarianten (PROVEAN Scores -13,81 für $\Delta M500$ -SGLT3 bzw. -12,71 für $\Delta I501$ -SGLT3, Schwellenwert -2,5).

4.4 Nachweis der Transporter in der Oozytenmembran

Bekanntermaßen können Mutationen von membranständigen Proteinen neben Funktionsveränderungen auch Unterschiede in der posttranslationalen Prozessierung und dem Membraneinbau („membrane targeting“) hervorrufen (Howell & Holloway, 2016). Besonders bei den strukturell eng verwandten anderen Vertretern der SGLT-Familie sind verschiedene Mutationen beschrieben, die auch zu einem Defekt im Membraneinbau führen (Wright EM, 2011; Martín & Wright, 1996).

Um einerseits zu klären, ob die untersuchten Mutationen einen Einfluss auf Membraneinbau haben und andererseits sicherzustellen, dass die in dieser Arbeit beschriebenen profunden Effekte der Mutationen auf die Elektrophysiologie von SGLT3 nicht alleine durch mangelnden Membraneinbau bedingt waren, wurden fluoreszenzbasierte Nachweise von SGLT3 in den Oozytenmembranen durchgeführt.

Hierzu wurden die Oozyten, die die verschiedenen SGLT-YFP Konstrukten exprimierten, nach elektrophysiologischen Messungen mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop untersucht (*siehe Methoden*).

Ergebnisse

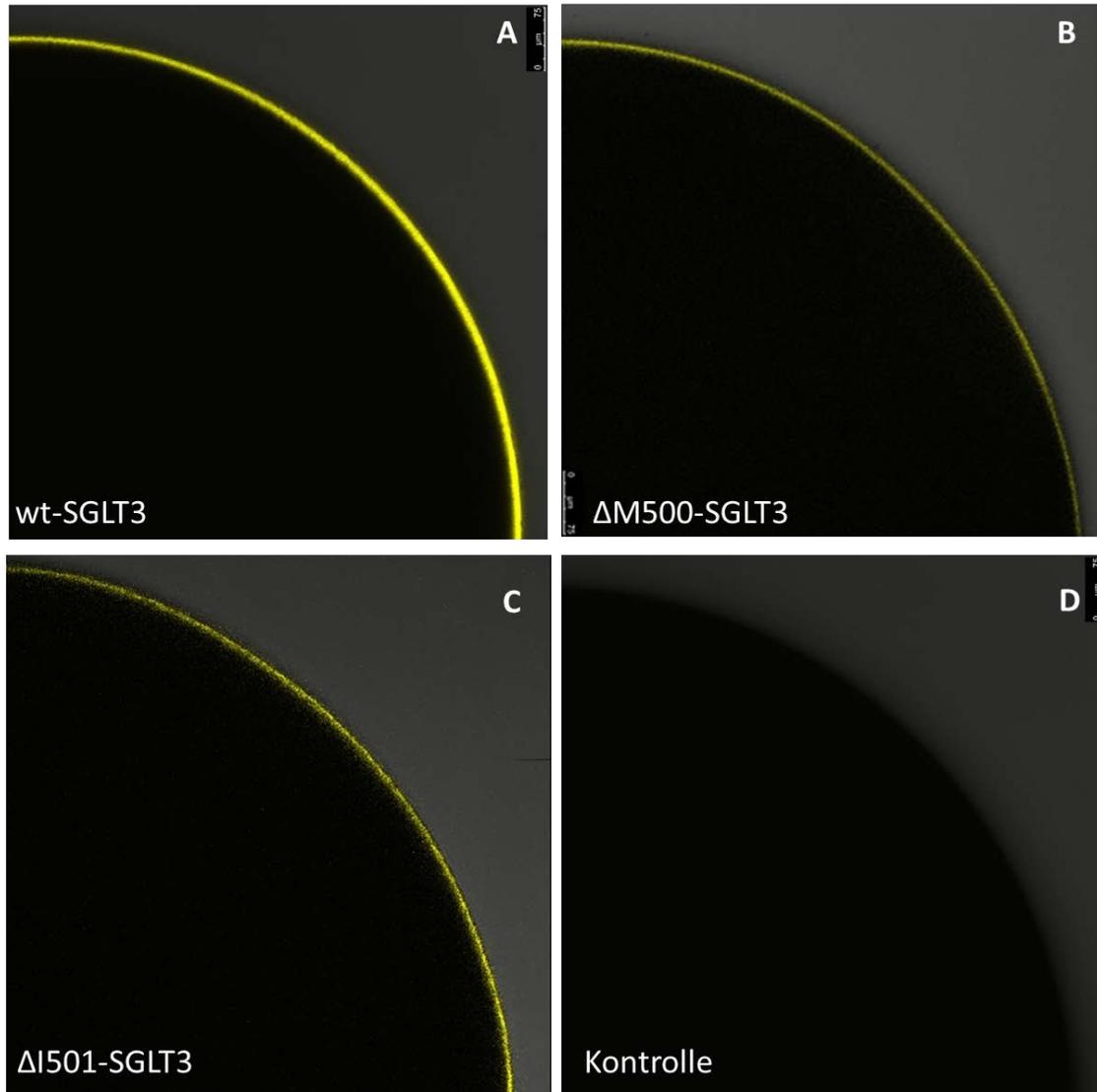


Abbildung 19 – LSM Aufnahmen von SGLT3-YFP exprimierenden Oozyten. Injiziert wurden je 25ng der jeweiligen cRNA, entsprechend 50,6nL der auf 500ng/μl eingestellten Aliquots. wt-SGLT3-YFP (A) zeigt eine intensive Fluoreszenz in der Zellmembran, wohingegen Δ M500-SGLT3-YFP (B) bzw. Δ I501-SGLT3-YFP (C) eine geringere Fluoreszenz und damit wahrscheinlich eine geringere Menge der Konstrukte in die Membran aufweisen. Nicht injizierte Kontrollloozyten (D) zeigen keinerlei Fluoreszenz. Die Bilder sind repräsentativ für mindestens 3 unterschiedliche Oozytenbatches und wurden unter identischen Anzeigebedingungen aufgenommen.

Abbildung 20 zeigt eine deutliche, membranständige Fluoreszenz für den wildtypischen Transporter, der folglich effizient in die Oozytenmembran transloziert wurde. Die Mutanten zeigten eine schwächere, die Kontrollloozyten keine relevante Fluoreszenz.

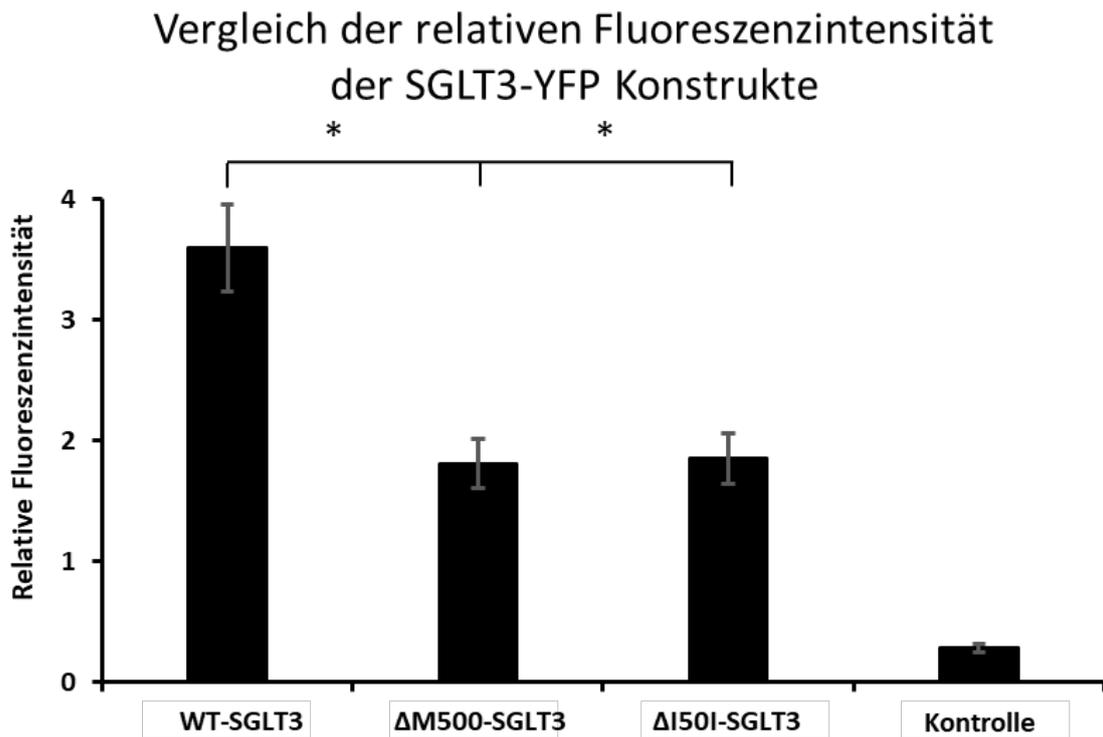


Abbildung 20 - Vergleich der relativen Fluoreszenzintensitäten verschiedener SGLT3-YFP Konstrukte und Kontrollen. Auf der Y-Achse relative Fluoreszenzintensität bezogen auf wildtypischen SGLT3 als dimensionslose Zahl. $\Delta M500$ -SGLT3 bzw. $\Delta I501$ -SGLT3 zeigen gemessen an den Werten des wildtypischen Transporters eine um 53% bzw. 42% reduzierte Fluoreszenzintensität. Kontrolloozyten zeigen keine relevante Fluoreszenz ($p < 0,01$) (in Zusammenarbeit mit N. Schäfer, AG Geiger, Julius-von-Sachs Institut f. Biowissenschaften).

Das obige Diagramm vergleicht die Fluoreszenzintensität der YFP-fusionierten SGLT3 Konstrukte in den Oozytenmembranen. Diese war für wildtypisches SGLT3 am stärksten, was für einen effizienten Einbau des Konstrukts in die Zellmembran spricht. In Relation dazu zeigten $\Delta M500$ -SGLT3-YFP sowie $\Delta I501$ -SGLT3-YFP eine um 53% ($n=6$; $p < 0,01$) bzw. 42% ($n=6$; $p < 0,01$) reduzierte Fluoreszenzintensität in der Zellmembran, was einen partiellen Defekt in den zellulären Prozessen zwischen Translation und Membrantranslokation durch diese Mutationen nahelegt.

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung eines Kandidatengens, das in einer familienbasierten Sequenzierungsstudie partiell mit einem ADHS-Phänotyp koregulierte und somit potenziell zum sogenannten polygenetischen Risikoscore von ADHS beiträgt (Martin et al., 2015). Dies beinhaltete die Erstellung eines differenzierten Expressionsprofils, die vergleichende elektrophysiologische Untersuchung des wildtypischen Proteins, der mittels Exomsequenzierung identifizierten $\Delta M500$ -, sowie einer benachbarten analogen Deletionsvariante $\Delta I501$ -SGLT3 in *Xenopus laevis* Oozyten, der in-silico Modellierung zur Effektvorhersage und die Überprüfung der Konsequenzen dieser Mutationen auf den Membraneinbau des Transporters.

5.1 Das SGLT3 Expressionsprofil im Kontext bildgebender und neuroanatomischer Befunde bei ADHS

5.1.1 SGLTs im Säugerhirn

Ergänzend zu bestehenden Expressionsnachweisen im enterischen Nervensystem bzw. dem Gastrointestinaltrakt (Wright et al., 2011), in Skelettmuskel und Testes (Diez-Sampedro et al., 2003) sowie in der Niere (Kothintia et al., 2012) des Menschen wurde in dieser Arbeit erstmals sowohl ein qualitativer als auch quantitativer differenzieller Expressionsnachweis von SLC5A4 in verschiedenen ADHS-relevanten Arealen des menschlichen Gehirns auf RNA-Ebene erbracht.

Dabei brachten die mit dem Primerpaar HSA38/39 amplifizierte Fragmente im Durchschnitt ein stärkeres Signal hervor. Dies ist wahrscheinlich dem höheren GC Gehalt (52,2% für HSA38/39 vs. 49,6% für HSA37/42) geschuldet, der zu einer stabileren Bindung der Primer an die zu amplifizierenden Fragmente führt und damit eine höhere Ausbeute in der Polymerasekettenreaktion ermöglicht. Die in der Reversen Transkriptase PCR ausbleibende Amplifikation von SLC5A4 in der Colonprobe trotz mehrfach reproduzierter positiver Befunde in der Literatur (Diez-Sampedro et al., 2003; Sotak et al., 2017) sowie positiver Befunde mit der gleichen Probe in der quantitativen PCR ist am ehesten im Kontext hoher gewebspezifischer Nukleaseaktivität und methodischer Unterschiede (Erhitzungszyklen, Nukleaseinhibitoren) zu interpretieren. Für das Jejunum als zweiter Positivkontrolle zeigte sich hingegen erwartungsgemäß eine deutliche Amplifikation, was die Validität des Ansatzes bestätigt (Sotak et al., 2017).

In der quantitativen PCR waren besonders das Striatum, Pons und Hypothalamus, in geringerem Maße auch Hippocampus, Kortex und Medulla Oblongata Strukturen mit relativ erhöhter SLC5A4 Expression. Diese Befunde decken sich mit immunhistochemischen Nachweisen von SGLT3 in verschiedenen Geweben menschlicher Leichen, darunter auch in Kortex, Hypothalamus und Kleinhirn (Oerter et al., 2016).

Die differenzielle Expression im Zentralnervensystem mit Betonung striataler Areale, Kortex und Hypothalamus deckt sich wiederum mit immunhistochemischen Nachweisen des entsprechenden SGLT3 Homologs im Rattenhirn (Yamazaki et al., 2014). In PET-basierten ex-vivo Nachweisen von SGLTs im Rattenhirn wurde dieses Muster ebenfalls reproduziert. Dass die in dieser Arbeit gezeigte Anreicherung eines SGLT-spezifischen, jedoch nicht subtypselektiven PET-Tracers nicht vollständig deckungsgleich mit dem immunhistochemischen Nachweis von SGLT1 war, legt den Einfluss anderer, funktionell im ZNS exprimierter SGLT Isoformen wie zum Beispiel SGLT3 nahe (Yu et al., 2010, 2013).

Einige dieser genannten Areale gelten wiederum als Schlüsselstellen von Schaltkreisen („*circuits*“) die in systemneurophysiologischen Paradigmen in der Pathogenese des ADHS impliziert wurden (Vgl. Cortese, 2012 und Klein et al., 2017). Die in dieser Arbeit identifizierten Areale mit der relativ höchsten Expression von SGLT3, nämlich Striatum, Hirnstamm, Hypothalamus und ferner auch Hippocampus und Kortex stellen weiterhin essenzielle Schaltstellen zentraler cholinergischer Transmission dar. Auf einer intermediären Komplexitätsebene soll daher ebenfalls das zentrale cholinerge System hervorgehoben werden. Gene cholinergischer Signalwege wurden wiederholt bei ADHS impliziert (Klein et al., 2017). In der Tat existieren auch Hinweise darauf, dass Nikotin, namensgebender Agonist des nikotinischen Acetylcholinrezeptors, einige neuropsychologische Kernbefunde des ADHS zu verringern vermag, was eine kausale oder kompensatorische Rolle der zentralen cholinergen Transmission bei ADHS nahelegen könnte (Potter et al., 2014).

Im Folgenden werden die Ergebnisse des Expressionsprofils in den Kontext neurobiologischer Befunde bei ADHS gesetzt um eine mögliche Beteiligung von SLC5A4 zu diskutieren.

5.1.2 Striatum

Das Striatum ist eingebettet in das (prä-)frontostriatalen Netzwerk, welches konsistent in der Pathogenese des ADHS impliziert wurde (Dickstein et al., 2006; Renner et al., 2008;

Banaschewski et al., 2010; Cortese, 2012). Das Volumen striataler Areale wie dem Ncl. caudatus korreliert dabei mit der Symptomschwere des ADHS (Castellanos et al., 2002). Gleichzeitig ist das Striatum das prominenteste Ziel der Pharmakotherapie des ADHS (Czerniak et al., 2013). Eine Hypoaktivität der frontostriatalen Schleife in fMRT Experimenten ist einer der am robustesten reproduzierten Befunde bei Individuen mit ADHS (siehe Übersichtsarbeit von Banaschewski et al., 2017).

Übereinstimmend mit den hier gezeigten Nachweisen von SGLT3 im menschlichen Striatum konnten Yamazaki und Kollegen (2014) SGLT3 immunhistochemisch in cholinergen Neuronen des Striatums der Maus nachweisen. Mittels ex-vivo Radiographie konnte SGLT3 durch Yu und Kollegen (2013) auch im Striatum der Ratte nachgewiesen werden. Einerseits befinden sich cholinerge Interneurone in großer Zahl im Striatum, andererseits beeinflussen cholinerge Kerngruppen des Hirnstamms indirekt striatale Mikroschaltkreise und stehen damit in einem noch weitgehend unverstandenen, komplexen Wechselspiel mit dopaminergen, noradrenergen und anderen in der Pathophysiologie des ADHS implizierten monoaminergen Signalwegen (Lim et al., 2014).

5.1.3 Hypothalamus

Die nachgewiesene Expression von SGLT3 im humanen Hypothalamus ist vereinbar mit der von O' Malley und Kollegen (2006) sowie Yu und Kollegen (2010, 2013) gezeigten funktionellen Expression von SGLTs im Hypothalamus der Ratte. Der Hypothalamus ist Teil der „Hypophysen-Hypothalamus-Nebennierenachse“, deren Dysregulation bei ADHS impliziert wurde (Baird et al., 2012; Ma et al., 2011). Der dort residierende Ncl. arcuatus beherbergt unter anderem Neurone, die den Cotransmitter Neuropeptid Y freisetzen, dessen Gen von Lesch und Kollegen (2011) als Kandidatengen für ADHS impliziert wurde. NPY-freisetzende Neurone im Hypothalamus spielen unter anderem eine Rolle im Energiestoffwechsel, sind im Säuger durch eine Vielzahl cholinergischer Projektionen innerviert (Huang et al., 2011) und tragen dementsprechend nikotinische Acetylcholinrezeptoren, vorwiegend des $\alpha 7$ -Typs. Dieser wiederum wird durch das ADHS Kandidatengen *CHRNA7* kodiert (Williams et al., 2012). Interessanterweise befinden sich NPY-exprimierende Interneurone ebenfalls in den SGLT3-exprimierenden Regionen Striatum, Hirnstamm und Hippocampus (Reichmann & Holzer, 2016), was eine Interaktion im Sinne eines gemeinsamen Signalwegs denkbar macht.

5.1.4 Hippocampus, Hirnstamm und Kleinhirn

Im Hippocampus war eine geringfügig erhöhte SGLT3 Expression nachweisbar. Dieser und das limbische System im weiteren Sinne wurden wiederholt für affektiven Symptome

im Rahmen des ADHS impliziert; die Evidenz hierfür ist jedoch uneindeutig (Vgl. Perlov et al., 2008 und Cortese, 2012). Dazu passend konnten Russell und Kollegen (2014) im Hippocampus der „spontan hypertensiven Ratte“, einem gut etablierten Tiermodell des ADHS, eine reduzierte acetylcholininduzierte Freisetzung von Noradrenalin nachweisen, was erneut die Interaktion cholinergischer und anderer monoaminergischer Schaltkreise in der Pathophysiologie des ADHS unterstreicht.

Daneben wurde in dieser Arbeit eine verstärkte Expression von SLC5A4 auch im Pons und der Medulla Oblongata nachgewiesen. Dieser Befund wird auf Proteinebene im Rattenmodell nicht vollständig bestätigt (Yu et al., 2010, 2013). Das im Hirnstamm lokalisierte aufsteigende retikuläre Aktivierungssystem vermittelt unter anderem basale Aufmerksamkeitsleistungen, sodass eine Beteiligung an komplexen Aufmerksamkeitsstörungen wie ADHS zwar denkbar wäre, jedoch noch nicht systematisch analysiert wurde (Bush, 2010). Im Hirnstamm residieren eine Vielzahl monoaminergischer Zellgruppen, deren Projektionen in nahezu alle kortikalen und subkortikalen Areale ausstrahlen. Die unter anderem in den pedunculo-pontinen und laterodorsalen tegmentalern Kernen des Hirnstamms befindlichen cholinergen Neuronen projizieren auf dopaminerge Kerngebiete, die wie bereits ausgeführt immer wieder in der Pathophysiologie und letztlich auch medikamentösen Therapie des ADHS impliziert wurden (Potter et al., 2014).

Die relative Expressionsstärke im Kleinhirn war in der vorliegenden Untersuchung deutlich verringert, was eher gegen eine konstitutionelle, funktionelle Rolle von SGLT3 in diesem Areal spricht. Jedoch zeigen strukturelle MR-Studien eine konsistente zerebelläre Volumenabnahme bei Individuen mit ADHS (Renner, et al., 2008; Cortese, 2012); übereinstimmend implizieren funktionelle Studien zerebelläre Netzwerke in der Pathophysiologie des ADHS (Banaschewski et al., 2017). Yu et al. (2013) zeigten zumindest für SGLT1 immunhistochemisch und mittels PET eine hohe Expression in zerebellären Purkinje-Zellen. Da SGL-Transporter durch eine Vielzahl peritranslationaler und epigenetischer Mechanismen in pathologischen ZNS Prozessen reguliert werden, (Pope et al., 1997; Wright, et al., 1997; Wright & Turk, 2004, Lee et al., 2012, Yamazaki et al., 2014) ist nicht auszuschließen, dass eine posttranslationale Regulation von SGLTs im Kleinhirn im pathophysiologischen Kontext von ADHS Effekte auf zerebelläre Funktionen haben können.

5.1.5 Zusammenfassung

Insgesamt besteht also eine Kongruenz zwischen SGLT3-exprimierenden und ADHS-implizierten neuroanatomischen Strukturen und deren Schaltkreisen. Ein mutationsbedingter Funktionsverlust von SGLT3 könnte demnach zu einer veränderten Erregbarkeit SGLT3-exprimierender Zellen und folglich zur Störung des Signalverhaltens in den genannten Arealen und deren Netzwerken führen. Einschränkend muss beachtet werden, dass die Expression eines Gens nicht zwangsläufig eine relevante Rolle für dessen Produkt in der Krankheitsentstehung des ADHS bedeutet. Zwar legen mehrere Befunde aus Tierversuchen eine neuronale Expression von SGLT3 nahe, jedoch existieren bisher kaum zelluläre Nachweise im menschlichen Gehirn auf Proteinebene. Außerdem muss angeführt werden, dass in der vorliegenden Arbeit keine tiefergehende Differenzierung verschiedener kortikaler Areale (z.B. präfrontaler, parietaler und zingulärer Kortex) und weiterer, potenziell für ADHS relevanter subkortikaler Areale (Amygdala, Thalamus) vorgenommen wurde. Ein differenzierter immunhistochemischer Nachweis an menschlichem Hirngewebe, gegebenenfalls mit Kolo-kalisation cholinergischer Neuronenmarker könnte weitere Aufschlüsse über die potenzielle Rolle von SGLT3 in Neuronen und anderen Zellen des zentralen Nervensystems geben.

5.2 Vergleichende elektrophysiologische Charakterisierung

Zunächst konnten in dieser Arbeit die bisher bekannten funktionellen Eigenschaften von SGLT3 wie pH-Abhängigkeit und Phlorizinsensitivität, sowie die bisher noch nicht reproduzierte agonistische Potenz von Iminozuckern in *Xenopus* Oozyten demonstriert werden. Seine Funktion als pH-sensitiver, glucoseabhängiger Kationenkanal konnte damit bestätigt werden (Vgl. Diez-Sampedro et al., 2003; Voss et al., 2007; Wright et al., 2011)).

Vor dem Hintergrund einer potenziellen Beteiligung von SGLT3 an pathophysiologischen Vorgängen im ZNS gilt es, die in dieser Arbeit demonstrierten funktionellen Charakteristika in Beziehung zu neurophysiologischen Befunden des ADHS zu setzen.

5.2.1 Zentralnervöser Glukosestoffwechsel im Kontext neuropsychiatrischer Erkrankungen

Ogleich das Gehirn nur etwa 2% der menschlichen Körpermasse ausmacht, konsumiert es etwa 25% der zirkulierenden Energieträger in Form von Glukose (Killeen et al., 2013). Die Sicherstellung eines ausreichend hohen zentralnervösen Glucoseangebots in Bedarfszuständen (z. B. Stress, fortgesetzte Konzentration) ist ein essenzielles Prinzip des zentralnervösen Glukosestoffwechsels (Peters et al., 2011). Pathologische Abweichungen können daher eine Vielzahl akuter und chronischer neuropsychiatrischer Störungen bedingen (Mergenthaler et al., 2013). In PET-Studien zeigten sich Veränderungen des Glucosemetabolismus bei einer Vielzahl neuropsychiatrischer Erkrankungen, darunter der bipolaren Störung (Hosokawa et al., 2009), der Autismus-Spektrumerkrankungen (Mitelman et al., 2017) und des ADHS (Zametkin et al., 1990; Bush, Valera, & Seidman, 2005).

Auf molekularer Ebene ist der zentralnervöse Energiemetabolismus mit immanenten Glukosetransportprozessen essenziell für energiekonsumierende Vorgänge. Dazu zählt die Aufrechterhaltung synaptischer Aktivität und damit neuronaler Informationsverarbeitung (Benarroch, 2015). Diese Prozesse werden wahrscheinlich in enger Kopplung von astrozytärem und neuronalem Metabolismus realisiert (Pellerin & Magistretti, 2012). Darauf aufbauend postulierten Russell und Kollegen (2006) das Modell des „neuroenergetischen Defizits“ in der Pathogenese des ADHS. Damit entstand ein konzeptueller Rahmen hinsichtlich einer Dysregulation des Energiestoffwechsels als Substrat für ADHS-typische neurokognitive Auffälligkeiten.

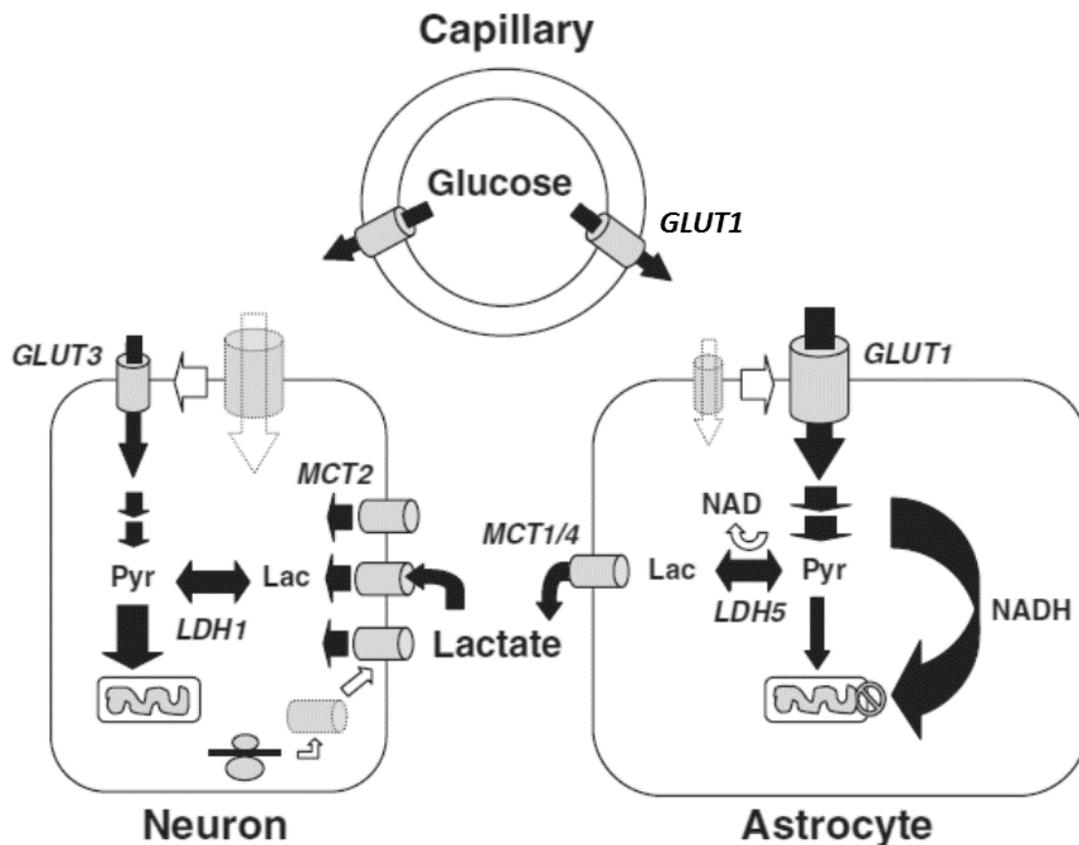


Abbildung 21 - Neurogliale Kopplung bzw. Astrozyten-Neuronen-Laktat-Shuttle. Glukose überwindet durch den gefäßendothelständigen, fasilitativen GLUT1 die Blut-Hirn-Schranke und wird über GLUT1 und GLUT3 in Astrozyten bzw. Neuronen aufgenommen. Astrozyten produzieren Laktat, welches über Monocarboxylattransporter (MCT) in Neuronen aufgenommen wird, wo es zu Pyruvat umgewandelt wird und direkt in den oxidativen Stoffwechsel eingespeist werden kann. Durch diese Kopplung versorgen Astrozyten schnellfeuernde Neuronen mit hohem Energiebedarf (modifiziert nach Pellerin & Magistretti, 2012).

Als glukoseabhängiger Kationenkanal kann SGLT3 in Anwesenheit seiner Substrate die Erregbarkeit von Zellen beeinflussen, in deren Membran er sich befindet. Diez-Sampedro und Kollegen (2003) schlugen auch aufgrund der fehlenden Transportaktivität eine Glukosesensorfunktion von SGLT3 vor. Die Datenlage zur physiologischen Funktion von SGLTs im Säugetiergehirn ist bis dato jedoch spärlich. O' Malley und Kollegen (2006) zeigten eine phlorizinsensitive Veränderung der Aktionspotenzialfrequenz kultivierter glukosesensitiver, exzitatorischer Neurone des Rattenhypothalamus in Abhängigkeit der Leitfähigkeit von SGLT3, was die Rolle des Transporters in der Modulation der zellulären Erregbarkeit unterstützt. Diese sogenannten glukosesensitiven Neurone scheinen im menschlichen Belohnungssystem, einem Netzwerk zu dem unter anderem der Nucleus accumbens, ein Teil des Striatums sowie der Hippocampus und das Frontalhirn gehören,

eine relevante Rolle zu spielen (Koekkoek & Mul, 2017). Diese Areale wiederum überschneiden sich in weiten Teilen mit den für ADHS implizierten neuronalen Strukturen, sodass eine funktionelle Veränderung des Glukosesensors SGLT3 in diesem Kontext verhaltensrelevant werden kann. Mikroschaltkreise des ventromedialen Hypothalamus modulieren daneben auch das Aggressionsverhalten der Ratte (Falkner & Lin, 2014). Dieses ist in der spontan hypertensiven Ratte, einem etablierten Tiermodell für ADHS, neben anderen behavioralen Auffälligkeiten besonders ausgeprägt (Potegal & Myers, 1989). Eine Leitfähigkeitsänderung SGLT3-exprimierender hypothalamischer Zellen könnte daher einen Einfluss auf ein impulsiv gefärbtes behaviorales Spektrum haben. Ferner besitzt der Hypothalamus eine zentrale Rolle in der Kontrolle von Appetit und Nahrungsaufnahme von Säugetieren und ist befindet sich in Interaktion mit einer Vielzahl anderer glukoseabhängiger Signalwege (Ahima & Antwi, 2008). Einige Befunde deuten auf eine potenzielle Rolle der Homologen SGLT1 und SGLT2 in der Regulation des Glukosetransports an der Blut-Hirn-Schranke des Menschen hin (Elfeber et al., 2004; Wais, 2013).

Neben SGLT3 ist auch der neuronal exprimierte, fazilitative Glukosetransporter GLUT3 (SLC2A3) bei ADHS impliziert (Lesch et al., 2011). Merker und Kollegen (2017) konnte die Assoziation neurokognitiver Auffälligkeiten im Sinne veränderter ereigniskorrelierter EEG-Potenziale (ERPs) von Trägern verschiedener SLC2A3 Sequenzvarianten mit ADHS beweisen. Bei Kindern mit Lese-Rechtschreibschwäche, die Sequenzvarianten trugen, die die Transkription von SLC2A3 beeinflussen, zeigten sich typische, umschriebene neurophysiologische Auffälligkeiten. Der neuronal exprimierte GLUT3 ist daneben bei einer Vielzahl anderer neuropsychiatrischer Krankheitsbilder impliziert, darunter der affektiven Störung (Yang et al., 2009) und der Demenz vom Alzheimerertyp (Benarroch, 2015; Shah, DeSilva, & Abbruscato, 2012). Darüber hinaus führt ein Funktionsverlust des homologen GLUT1 zu einer Reihe schwerer kognitiver, motorischer und assoziierter neurophysiologischer Störungsbilder (Graham, 2012; Benarroch, 2015). Das von Lesch und Kollegen (2011) für ADHS implizierte NPY-Gen ist ebenso am zentralnervösen Glukosemetabolismus beteiligt (Marston et al., 2011) und ist wahrscheinlich ursächlich für umschriebene Signalalterationen in einem fMRT Experiment auf Basis eines Belohnungsparadigmas (Lesch et al., 2011).

Ein Funktionsverlust von neuronalem SGLT3 und damit eine Einschränkung dessen Glukosensensorfunktion könnte daher auf verschiedenen Ebenen des zentralnervösen Glu-

kocestoffwechsels relevant werden und zu analogen neurophysiologischen und neurokognitiven Auffälligkeiten führen. Um diese Hypothese zu überprüfen, müssten jedoch entsprechende neurophysiologische und behaviorale Daten von Trägern der untersuchten $\Delta M500$ Sequenzvariante erhoben werden.

5.2.2 Weitere Substrate für SGLT3 im ZNS

Der in dieser Arbeit ebenfalls verwendete potente SGLT3-Agonist DNJ kommt natürlicherweise nicht im Säugetierstoffwechsel vor. Der in der weißen Maulbeere enthaltene Iminozucker wird in der Traditionellen Chinesischen Medizin als Antidiabetikum, das eng strukturverwandte N-Butyl-1-Desoxynojirimycin (NB-DNJ, Miglustat, Handelsname Zavesca®) als α -Glucosidasehemmstoff in der Therapie hereditärer, lysosomaler Speicherkrankheiten wie M. Gaucher oder der neuroviszeralen Verlaufsform des M. Niemann-Pick eingesetzt (Voss et al., 2007).

Neuere Reviews zeigen, dass NB-DNJ geringfügig liquorgängig ist (Ficicioglu, 2008). Da dieses Iminozuckerderivat mit hoher Affinität an SGLT3 bindet (Voss et al., 2007) ist es nicht auszuschließen, dass die ADHS-ähnlichen zentralnervösen Therapienebenwirkungen wie Nervosität und Konzentrationsstörungen auch durch Effekte dieser Substanz an SGLT3 vermittelt werden, was indirekt Aufschluss über die funktionelle Rolle des Transporters im ZNS geben könnte.

Um die funktionellen Beiträge von SGLT3 im ZNS aufzuklären sind weitere pharmakologische Untersuchungen notwendig. Da die Affinität zu Glucose sehr gering ist und Iminozucker physiologisch nicht relevant zu sein scheinen, müssten potenzielle Interaktionen anderer typischerweise im ZNS vorkommender Substrate (allen voran Neurotransmitter wie Glutamat, monoaminerge Transmitter sowie Stoffwechselprodukte wie z. B. das saure Laktat) mit SGLT3 ebenfalls analysiert werden.

5.2.3 pH-Abhängigkeit von SGLT3 im Kontext zerebraler metabolischer Aktivität

Einerseits sind SGLT3 (und SGLT1) neben Natrium auch für H^+ -Protonen durchlässig (Hirayama et al., 1994; Bianchi & Díez-Sampedro, 2010; Longpré et al., 2010), andererseits beeinflusst der pH-Wert selbst die Substrataffinität (Wright et al., 2011). Zusammengefasst erklärt dies wahrscheinlich die in dieser Arbeit gezeigte stärkere Aktivierung in sauren Bedingungen. Damit keine endogenen, osmotisch aktivierten Ströme (Weber, 1999) das Messergebnis verfälschen wurde zu der formal hypoosmolaren Aktivierungslösung mit DNJ D-Sorbitol in gleicher Konzentration wie D-Glukose beigemischt.

Im ZNS existieren neben SGLT3 eine Vielzahl anderer pH-abhängiger Transporter bzw. Kanäle, darunter die synapsennah lokalisierten NMDA-Rezeptoren sowie Glutamat- und GABA-Transporter (Sinning & Hübner, 2013). In limbischen Neuronen existieren überdies spezialisierte Säuresensoren, denen u.a. bei Epilepsie pathophysiologische Relevanz zukommt (Gründer & Xuanmao Chen, 2010). Zwar wird der physiologische pH-Wert des Menschen strengstens zwischen 7,35-7,45 reguliert, jedoch konnte sowohl mittels Zellkulturexperimenten in Neuronen und Glia (Chesler, 2003) als auch mittels kranialen MRT Untersuchungen am Menschen in-vivo gezeigt werden, dass pH-Werte in Abhängigkeit zellulärer Aktivierung regional deutlich schwanken können (Magnotta et al., 2012). Phasen hoher Aufmerksamkeit und Konzentration gehen mit einer hochfrequenten γ -Aktivität im EEG einher, die wiederum mit einem hohen Maß an synaptischer Aktivität korreliert (Buzsáki et al., 2012). Im Inneren synaptischer Vesikel herrscht ein saurer pH-Wert (Moriyama et al., 1992), sodass es bei aktivitätsbedingter Neurotransmitterfreisetzung zu einer relevanten pH-Senkung im synaptischen Spalt kommt, und zwar proportional zum Grad der Aktivität (Sinning & Hübner, 2013). Innerhalb des konzeptuellen Rahmens des ANLS (Pellerin & Magistretti, 2012) könnte auf molekularer Ebene eine vermehrte Bereitstellung von Laktat aus Astrozyten in Phasen hoher synaptischer Aktivität eine weitere Azidifizierung der Mikroumgebung vermitteln (Killeen et al., 2013).

In der Tat konnte bereits gezeigt werden, dass eine ischämische Azidifizierung im Rattehirn weitreichende Effekte auf die Erregbarkeit SGLT3-exprimierender, cholinergischer Neurone hat und die posttranslationale Regulation des Transporters unter anderem in Striatum, Kortex und Hippocampus dadurch beeinflusst wird (Yamazaki et al., 2014). Analog dazu wird auch die Expression von SGLT1 und SGLT2 an der Bluthirnschranke in Abhängigkeit azidifizierender Pathologien reguliert (Wais, 2013). Mit einer zellulären Azidifizierung assoziierter oxidativer Stress beeinflusst im Kontext von anderen neuropsychiatrischen Erkrankungen ebenso die Expression des neuronalen Glukosetransporters GLUT3 (Simpson et al., 2008). In diesem Zusammenhang könnte SGLT3 in Phasen hoher synaptischer Aktivität oder anderweitiger extrazellulärer Azidifizierung eine zunehmende funktionelle Relevanz bekommen.

5.2.4 Struktur-Funktions-Beziehung von Δ M500-SGLT3 bzw. Δ I501-SGLT3 im Kontext bekannter pathogener SGLT Mutationen

Nach der Charakterisierung der wildtypischen Variante wurde die in der Exomsequenzierung identifizierte Δ M500 Variante von SGLT3 als auch eine direkt benachbarte De-

letionsvariante, $\Delta I501$ -SGLT3, charakterisiert. Beide Mutanten befinden sich extrazellulär und membrannah in der C-terminal flankierenden Transmembranhelix 11 von SGLT3, also außerhalb der eigentlichen Kernstruktur des Transporters und gegenüber der bisher bekannten Natrium- respektive Zuckerbindungsstellen in TM10 und TM12 (s. Abb. 23). Beide Mutanten waren auch nach Sicherstellung vergleichbarer Mengen membranständiger Transporter in den elektrophysiologischen Untersuchungen annähernd funktionslos hinsichtlich pharmakologischer Aktivierung und Inhibierung, sodass beide Mutationen am ehesten als subtotale „Loss-of-Function“ Mutationen von SGLT3 aufgefasst werden können. Interessanterweise führt ein Einbringen der analogen $\Delta M500$ und $\Delta I501$ Mutationen in SGLT1 gleichermaßen zu einem fast vollständigen Funktionsverlust des Glukosetransporters (Schäfer et al., 2018). Wahrscheinlich werden daher die gezeigten schädlichen Effekte nicht alleine durch das fehlende Methionin an Stelle 500 vermittelt, sondern rühren von einer globaleren strukturellen Alteration der betreffenden Transmembrandomäne her. Zur Visualisierung der dreidimensionalen strukturellen Verhältnisse in SGLT3 wurde im Kontext der vorliegenden Untersuchung ein dreidimensionales Homologiemodell von SGLT3, basierend auf der bekannten vSGLT Kristallstruktur (vgl. hierzu Kapitel 1.3.2.), die eine Sequenzidentität von 23% aufweist, angefertigt.

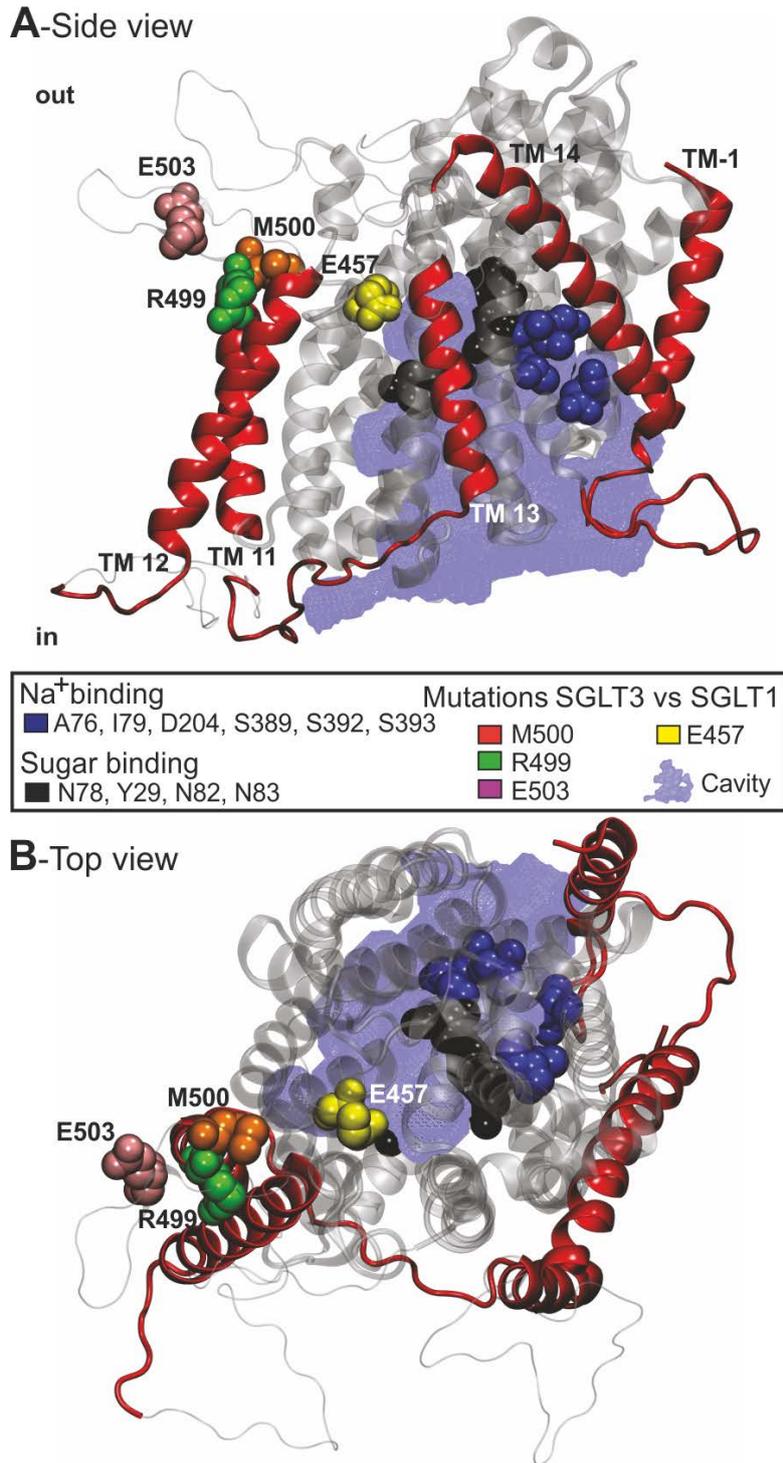


Abbildung 22 - Dreidimensionales Homologiemodell mit Fokus auf diskutierte SGLT Mutanten (nach Schäfer et al., 2018). A, Seitansicht, B, Ansicht von oben. Im dreidimensionalen Homologiemodell von SGLT3 werden die Positionen der in dieser Arbeit untersuchten Aminosäuredeletion an Position 500 (M500, orange), sowie die diskutierte Mutanten E457 (gelb), 499 (rot) und 503 (rosa) farbig illustriert. Daneben in blau die bekannten Natrium- respektive in schwarz die Zuckerbindungsstellen. Das SGLT-Kernmotiv der TM1-TM10 wird in Silber dargestellt. Die umgebenden helikalen Domänen sind in rot, Schleifenregionen als silberne Fadenstruktur dargestellt (nicht durch die Modellvorlage erklärt). Die durch das Modell vorhergesagte Kavität für das Substrat („cavity“) ist als blaue Netzstruktur illustriert.

Insgesamt fügen sich diese Ergebnisse damit in bestehende Evidenz für eine Reihe von bekannten Mutationen der Vertreter der SLC5-Genfamilie ein, die zu Funktionsverlusten oder -veränderungen der Genprodukte führen und teilweise monogenetisch vererbbar sind. Hierzu gehört die familiäre renale Glukosurie, bei der eine Reihe bekannter (Punkt-)mutationen zu einem Funktionsverlust von SGLT2 führen, wodurch die Resorption von Glucose in der Niere gestört ist und es konsekutiv zu Hypoglykämien kommt. Eine der nachgewiesenen „Loss-of-Function“ Mutationen ist eine Punktmutation des für die Aminosäure an Stelle 500 von SGLT2 kodierenden Basentriplets, die zu einer Trunkierung des Proteins führt. Dabei betroffen ist die für die Substratbindung wahrscheinlich relevante Transmembranhelix 12 des SGL-Transporters (Calado et al., 2006). Auch die erbliche „Glukose-Galaktose-Malabsorption“ gehört zu diesen monogenetischen Krankheitsbildern. Dabei führen eine Reihe unterschiedlicher Mutationen zu einem Funktionsverlust von SGLT1, wodurch die Resorption beider Monosaccharide im Gastrointestinaltrakt gestört ist, was konsekutiv zu Durchfällen und Hypoglykämien führt (Wright, 1998). Unter den in Familienstudien nachgewiesenen „Loss-of-Function“ Mutationen findet sich eine Aminosäureaustauschvariante an Stelle 499 von SGLT1 (R499H), die sich direkt neben den hier identifizierten Deletionsvarianten befindet. R499H-SGLT1 weist sowohl eine von 0,3mM auf 2,4mM reduzierte Substrataffinität als auch eine Störung des Membrantargetings im *Xenopus* Expressionssystem auf (Martín & Wright, 1996). Interessanterweise führt die Mutation zu C499-SGLT1 zu einer deutlichen Zunahme der Affinität zu 6-Desoxy-D-Glucopyranose sowie einer Reduktion der Transportaktivität um über 80% (Schäfer et al., 2018). Übereinstimmend sind Mutationen an Stelle 499 von SGLT2 auch in Patienten mit familiärer renaler Glukosurie sequenziert worden (Santer et al., 2003). Eine Mutation des sich im dreidimensionalen Homologiemodell zwischen TM11 und TM12 und damit ebenfalls in struktureller Nähe befindlichen Glutamat an Position 503 zu einem Cystein in SGLT1 (SGLT1-E503 bzw. SGLT1-C503) dagegen hat zwar keinen Effekt auf die Substratspezifität oder den Transportmechanismus, führt jedoch zu einer signifikanten Reduktion der SGLT1-typischen Glukoseaufnahme nach intrazellulär (Vgl. Schäfer et al., 2018). Die hier untersuchten Mutanten führen noch drastischer zu einem annähernd vollständigen Funktionsverlust der Transporter. H⁺-Protonen erzeugen selbst einen substratunabhängigen, phlorizinsensitiven Kationeneinstrom an SGLT3 (Bianchi & Díez-Sampedro, 2010). Dieser war ebenfalls in beiden Mutanten von SGLT3 nicht mehr messbar. Insgesamt unterstreichen diese Ergebnisse die funktionelle Relevanz der Transmembrandomäne 11 für die Funktion der SGL-Transporter.

Ein weiteres eindrückliches Beispiel für die funktionellen Effekte einer Aminosäuremutation im C-terminalen Anteil der SGL-Transporter wurde von Bianchi & Díez-Sampedro (2010) geliefert. Ein in der TM10 befindlicher Aminosäureaustausch an Stelle 457 in SGLT1 (Q457E-SGLT1) führt nicht nur zu einem Verlust der Transportfähigkeit, sondern auch zu einer Abnahme der Affinität zu Glucose- beides typische Charakteristika von SGLT3. Der analoge Aminosäureaustausch an Stelle 457 von SGLT3 (E457Q-SGLT3) stellte vice versa dessen Transportfähigkeit wieder her und steigerte die Affinität zu Glucose auf das Niveau von SGLT1. Dies illustriert, dass einzelne Aminosäuremutationen weitreichende funktionelle Effekte auf SGL-Transporter haben können.

Vor dem Hintergrund einer bis zu 84-prozentigen Sequenzähnlichkeit der SGL-Transporter Typen 1 bis 6 (Wright et al., 2011) und der putativen Lage der Substratbindungsstelle in der C-terminalen Hälfte der Transporter (Panayotova-Heiermann et al., 1996; Wimmer et al., 2009), ist davon auszugehen, dass sich die in dieser Arbeit untersuchten Mutationen in der flankierenden TM11 von SGLT3 negativ auf die Substratbindung oder Kationenpermeabilität (Bianchi & Díez-Sampedro, 2010), die wahrscheinlich von den gegenüberliegenden TM10 bzw. TM12 vermittelt werden, auswirken. Die Art und Weise dieser funktionellen Interaktion dieser Domänen bleibt bis dato jedoch unverstanden.

Um letztlich sicher dissoziieren zu können, ob die gezeigten Effekte der Mutationen auf eine strukturelle Veränderung der Transmembranhelix oder andere Ursachen zurückzuführen sind, müssten analoge Aminosäureaustauschmutanten, die möglichst wenig Einfluss auf die sterischen Eigenschaften der gesamten Domäne ausüben, hergestellt und vergleichend charakterisiert werden.

5.2.5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden sowohl bekannte als auch bisher nicht reproduzierte Befunde des wildtypischen SGLT3 bestätigt und mit $\Delta M500$ - bzw. $\Delta I501$ -SGLT3 zwei Mutanten identifiziert die zu einem Funktionsverlust des Transporters führen, der wiederum zu einer veränderten Erregbarkeit von SGLT3-exprimierenden Zellen im ZNS, und damit zu Störungen verschiedener ADHS-relevanter Netzwerke und Schaltkreise führen kann. Selbstverständlich müssen die gezeigten Ergebnisse im Lichte der Limitationen des heterologen Expressionssystems mit Vorsicht interpretiert werden. Einerseits können posttranslationale Modifikationen in der Oozyte die Funktion der entstandenen Transporter verändern, andererseits variiert die Qualität der Oozyten mit der Jahreszeit, was die Messungen verfälschen kann (Accardi et al., 2016). Demgegenüber existieren jedoch analog aufgebaute ADHS Kandidatengenstudien, beispielsweise zum sogenannten

GIRK-Kanal, die eine erfolgreiche klinische Translation der elektrophysiologischen Ergebnisse aus dem Xenopus Expressionssystem ermöglichten (Kobayashi et al., 2010; Mooney et al., 2016).

5.3 In-Silico Vorhersage der funktionellen Konsequenzen der Mutationen

Diese Analyse identifizierte mit hoher Sicherheit sowohl Δ M500- als auch Δ I501-SGLT3 als „krankheitserzeugende“ Sequenzvarianten.

Zur Validierung wurde die bereits als „Loss-of-Function“ bekannte R499H Sequenzvariante sowohl in der SGLT1 als auch in der SGLT3-Proteinsequenz mittels PROVEAN analysiert. Dies ergab jeweils einen PROVEAN Score von -4,74 (Schwellenwert -2,5) was mit mittlerer Wahrscheinlichkeit für schädliche funktionelle Konsequenzen spricht. Dieser Befund deckt sich mit einem elektrophysiologisch bestätigten, partiellen Funktionsverlust dieser Variante. Für die ebenfalls diskutierte und hochgradig schädliche C503-SGLT1 Variante ergab sich korrekterweise ein Score von -8,2 (Schwellenwert -2,5).

Im Gegensatz dazu wurde die von Bianchi et al. (2010) charakterisierte Q457E-SGLT1 beziehungsweise die korrespondierende Variante E457Q-SGLT3 mit einem PROVEAN Score von -1,88 (Schwellenwert -2,5) korrekterweise als neutral klassifiziert, was die Validität des Scores untermauert.

Zusammenfassend konnten mit den elektrophysiologischen Messungen und der in-silico Analyse ein Abschnitt der Aminosäuresequenz von SGLT3 identifiziert werden, der offenbar von essenzieller Wichtigkeit für die Funktion des Proteins ist. Ein Funktionsverlust durch Einbringen der Mutationen konnte mit konvergierender Evidenz in dieser Arbeit schlüssig belegt werden.

5.4 Effekte der Mutationen auf das SGLT3-Membrantargeting

Aminosäuresequenzalterationen können neben direkten Funktionsveränderungen auch schädliche Konsequenzen auf posttranslationale Prozesse wie dem gezielten Transport eines Membranproteins vom Zytoplasma an seinen Bestimmungsort, der Zellmembran, haben (Howell & Holloway, 2016). Da das Ausbleiben von Strömen auch auf einen fehlerhaften Membraneinbau zurückzuführen sein kann, wurden mit YFP markierte SGLT3 Konstrukte per LSM in den Oozytenmembranen nachgewiesen. Alle Konstrukte waren dabei in die Membran eingebaut, wobei Oozyten mit $\Delta M500$ -SGLT3 eine um 53%, mit $\Delta I501$ -SGLT3 um 42% signifikant gegenüber wildtypinjizierten Oozyten reduzierte Fluoreszenzintensität aufwiesen. Folglich wurde nur ein reduzierter Teil der mutierten Transporter korrekt in die Membran eingebaut. Interessanterweise führen die analogen Mutationen in SGLT1 zu einer noch deutlicheren Einschränkung des Membrantargetings, nämlich um 68% und 91% (Schäfer et al., 2018). Aus Gründen der Auflösung kann eine unmittelbar submembranöse Ansammlung der YFP-fusionierten Konstrukte am LSM jedoch nicht sicher von einem korrekten Membraneinbau unterschieden werden. Dazu erfolgten durch die Kollegen der AG Geiger freundlicherweise repräsentative Färbungen einiger injizierter Oozyten (Wildtyp und Mutanten) mit dem membranselektiven Farbstoff FM4-64, wodurch der korrekte Membraneinbau der YFP-fusionierten Konstrukte anhand überlappender Fluoreszenz mit FM4-64 nachgewiesen werden konnte (*Daten nicht gezeigt*). Einschränkung muss jedoch angeführt werden, dass aufgrund der Auflösung des LSM nicht mit letzlicher Sicherheit auf eine intramembranöse Lokalisation der Konstrukte geschlossen werden kann. Zumindest per Western Blot konnten jedoch annähernd identische Mengen des wildtypischen und beider mutierter SGL-Transporter in Membranfraktionen von entsprechenden cRNA-injizierten Oozyten nachgewiesen werden konnten, sodass zumindest von einer korrekten Translation aller Konstrukte auszugehen ist (Schäfer et al., 2018).

Auch für andere Vertreter der SGLT-Familie wurden verschiedene Mutationen charakterisiert, die ebenso Defekte im Membraneinbau hervorrufen (Wright et al., 2011). Dazu gehört unter anderem die bereits diskutierte R499H Variante von SGLT1, die neben einem Funktionsverlust auch zu einem (mittels Ladungsbewegungen kalkulierten) deutlich eingeschränkten Membraneinbau in *Xenopus* Oozyten führt (Martín & Wright, 1996). Dass die dargestellten Defekte auf den Membraneinbau in Oozyten auch direkt auf den Menschen übertragbar sein können demonstrieren immunhistochemische Untersuchungen an Dünndarmbiopsien von Patienten die an Glukose-Galaktose-Malabsorption erkrankt sind. Übereinstimmend mit den Befunden in *Xenopus* Oozyten

Diskussion

wurde mittels Immunhistochemie an menschlichen Duodenalzotten eine Sequestrierung von SGLT1 zwischen Zytoplasma und Membran nachgewiesen, während sich in Kontrollbiopsien von Trägern der wildtypischen SGLT1 Variante eindeutig die Membranständigkeit des Proteins nachweisen ließ (Wright, 1998; Wright et al., 2011). Eine Reihe weiterer Glukose-Galaktose-Malabsorption bzw. familiärer Glukosurie-assoziiierter Mutationen in SGLT1 bzw. SGLT2 (darunter R135W, R300S, A304V) führen ebenso zu nachweisbaren Defekten im Membraneinbau (Wright et al., 2011). Um letztlich zu evaluieren, ob die hier untersuchten Mutationen tatsächlich in menschlichen Gewebe zu Alterationen des Membraneinbaus führen, müssen immunhistochemische Färbungen an entsprechenden Geweben ergänzt werden.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

- Abramson, J., & Wright, E. (August 2009). Structure and function of Na(+)-symporters with inverted repeats. *Curr Opin Struct Biol.* 19(4), S. 425-432.
- Accardi, M., Pugsley, M., Forster, R., Troncy, E., Huang, H., & Authier, S. (September-Oktober 2016). The emerging role of in vitro electrophysiological methods in CNS safety pharmacology. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 81, S. 47-59.
- ADHS Deutschland e.V. (November 2013). *ADHS im Erwachsenenalter - ein Positionspapier*. Von http://www.adhs-deutschland.de/PortalData/1/Resources/pdf/4_8_4_politik/ADHS_im_Erwachsenalter_-_ein_Positionspapier.pdf abgerufen
- Ahima, R. S., & Antwi, D. A. (Dezember 2008). Brain regulation of appetite and satiety. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 37(4), S. 811–823. .
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.)*. Arlington, VA: American Psychiatric Publishing.
- An, Y., Varma, V., Varma, S., Casanova, R., Dammer, E., Pletnikova, O., . . . Thambisetty, M. (19. Oktober 2017). Evidence for brain glucose dysregulation in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.*
- Andrianesis, V., Glykofridi, S., & Doupis, J. (Dezember 2016). The renal effects of SGLT2 inhibitors and a mini-review of the literature. *Ther Adv Endocrinol Metab;* 7(5-6), S. 212–228.
- Baird, A., Coogan, A., Siddiqui, A., Donev, R., & Thome, J. (2012). Adult attention-deficit hyperactivity disorder is associated with alterations in circadian rhythms at the behavioural, endocrine and molecular levels. *Molecular Psychiatry* (17), S. 988–995.
- Banaschewski, T., Becker, K., Döpfner, M., Holtmann, M., Rösler, M., & Romanos, M. (2017). Attention-deficit/hyperactivity disorder—a current overview. *Dtsch Arztebl Int* 114, S. 149–59.
- Banaschewski, T., Becker, K., Scherag, S., Franke, B., & Coghill, D. (2010). Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: an overview. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 19, S. 237–257.
- Barcelona, S., Menegaz, D., & Díez-Sampedro, A. (15. April 2012). Mouse SGLT3a generates proton-activated currents but does not transport sugar. *Am J Physiol Cell Physiol.* 302(8), S. C1073-82.
- Benarroch, E. E. (April 2015). Brain glucose transporters. *Neurology* 82,(15), S. 1374-1379.
- Bianchi, L., & Díez-Sampedro, A. (April 2010). A single amino acid change converts the sugar sensor SGLT3 into a sugar transporter. *PLoS One.* 20;5(4), S. e10241.

- Burdakov D, L. S. (2005). Glucose-sensing neurons of the hypothalamus. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360, S. 2227–2235.
- Bush, G. (2010). Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Attention Networks. *Neuropsychopharmacology Reviews* 35, S. 278-300.
- Bush, G., Valera, E. M., & Seidman, L. (1. Juni 2005). Functional Neuroimaging of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Review and Suggested Future Directions. *Biol Psychiatry*. 57(11), S. 1273-1284.
- Bush, W., & Moore, J. (2012). Chapter 11: Genome-Wide Association Studies. *PLoS Comput Biol* 8(12): e1002822. doi:10.1371/journal.pcbi.1002822.
- Buzsáki, G., Anastassiou, C., & Koch, C. (Juni 2012). The origin of extracellular fields and currents — EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nat Rev Neurosci.*; 13(6), S. 407-420.
- Calado, J., Loeffler, J., Sakallioğlu, O., Gok, F., Lhotta, K., Barata, J., & Rueff, J. (März 2006). Familial renal glucosuria: SLC5A2 mutation analysis and evidence of salt-wasting. *Kidney Int*. 69(5), S. 852-855.
- Castellanos, F., Lee, P., Sharp, W., Jeffries, N., Greenstein, D., Clasen, L., . . . Rapoport, J. (9. Oktober 2002). Developmental trajectories of brain volume abnormalities in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *JAMA*. 2002 288(14), S. 1740-1748.
- Chang, Z., Lichtenstein, P., Asherson, P., & Larsson, H. (2013). Developmental twin study of attention problems: high heritabilities throughout development. *JAMA Psychiatry* 70, S. 311–318.
- Chang, Z., Lichtenstein, P., Halldner, L., D'Onofrio, B., Serlachius, E., Fazel, S., . . . Larsson, H. (August 2014). Stimulant ADHD medication and risk for substance abuse. *J Child Psychol Psychiatry*. 55(8), S. 878-885.
- Chen, J., Williams, S., Ho, S., Loraine, H., Hagan, D., Whaley, J., & JN, F. (Dec 2010). Quantitative PCR tissue expression profiling of the human SGLT2 gene and related family members. *Diabetes Ther*. 2010 1(2), S. 57-92.
- Chesler, M. (Oktober 2003). Regulation and modulation of pH in the brain. *Physiol Rev*. 2003; 83(4), S. 1183-1221.
- Choi, Y., Sims, G., Murphy, S., Miller, J., & Chan, A. (2012). Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *PLoS One*. 7(10), S. e46688.
- Chuhma, N., Mingote, S., Moore, H., & Rayport, S. (Februar 2014). Dopamine neurons control striatal cholinergic neurons via regionally heterogeneous dopamine and glutamate signaling. *Neuron*. 81(4), S. 901–912.
- Corominas, J., Klein, M., Zayats, T., Rivero, O., Ziegler, G., Pauper, M., & al., e. (2018). Identification of ADHD risk genes in extended pedigrees by combining linkage analysis and whole-exome sequencing (revision under review). *Mol Psychiatry*.

- Cortese, S. (2012). The neurobiology and genetics of Attention-Deficit/Hyperactivity Syndrome (ADHD): what every clinician should know. *European Journal of Paediatric Neurology* 16, S. 422-433.
- Czerniak, S., Sikoglu, E., King, J., Kennedy, D., Mick, E., Frazier, J., & Moore, C. (May-June 2013). Areas of the brain modulated by single-dose methylphenidate treatment in youth with ADHD during task-based fMRI: a systematic review. *Harv Rev Psychiatry*. 21(3), S. 151-162.
- De Ligt, J., Willemsen, M., van Bon, B., Kleefstra, T., Yntema, H., Kroes, T., & al., e. (2012). Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. . *N Engl J Med*. 367, S. 1921-1929.
- Dean, B., Thomas, N., Scarr, E., & Udawela, M. (November 2016). Evidence for impaired glucose metabolism in the striatum, obtained postmortem, from some subjects with schizophrenia. *Transl Psychiatry*. 6(11), S. e949.
- Del Campo, N., Müller, U., & Sahakian, B. (April 2012). Neural and behavioral endophenotypes in ADHD. *Curr Top Behav Neurosci*. 11, S. 65-91.
- Demontis, D., Walters, R. K., Martin, J., Mattheisen, M., Als, T. D., Agerbo, E., . . . Neale, B. M. (Juni 2017). Discovery Of The First Genome-Wide Significant Risk Loci For ADHD. *bioRxiv preprint 2017*; doi.: <https://doi.org/10.1101/145581>.
- Dickstein, S., Bannon, K., Castellanos, F., & Milham, M. (Oktober 2006). The neural correlates of attention deficit hyperactivity disorder: an ALE meta-analysis. *J Child Psychol Psychiatry*. 47(10), S. 1051-1062.
- Dienel, G., & Cruz, N. (Juli 2016). Aerobic glycolysis during brain activation: adrenergic regulation and influence of norepinephrine on astrocytic metabolism. *J Neurochem*. 138(1), S. 14-52.
- Diez-Sampedro, A., & Koepsell, H. (30. September 2003). A glucose sensor hiding in a family of transporters. *Proceedings of the National Academy of Science vol. 100 no. 20*, S. 11753–11758.
- Diez-Sampedro, A., Hirayama, B., Osswald, C., Gorboulev, V., Baumgarten, K., Volk, C., . . . Koepsell, H. (2003). A Glucose sensor hiding in a family of transporters. *Proceedings of the National Academy of Science*, S. 1722-1822.
- Dimatelis, J., Hsieh, J., Sterley, T., Marais, L., Womersley, J., Vlok, M., & Russell, V. (Juli 2015). Impaired Energy Metabolism and Disturbed Dopamine and Glutamate Signalling in the Striatum and Prefrontal Cortex of the Spontaneously Hypertensive Rat Model of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. *J Mol Neurosci*. 56(3), S. 696-707.
- Dresler, T., Barth, B., Ethofer, T., Lesch, K.-P., Ehlis, A.-C., & Fallgatter, A. J. (12. May 2014). Imaging genetics in adult attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): a way towards pathophysiological understanding? *Borderline Personal Disord Emot Dysregul*. 1: 6.
- Dresler, T., Ehlis, A.-C., Heinzl, S., Renner, T. J., Reif, A., Baehne, C. G., . . . Fallgatter, A. J. (Oktober 2010). Dopamine Transporter (SLC6A3) Genotype Impacts Neurophysiological Correlates of Cognitive Response Control in an

- Adult Sample of Patients with ADHD. *Neuropsychopharmacology*. 35(11), S. 2193–2202.
- Elfeber, K., Köhler, A., Lutzenburg, M., Osswald, C., Galla, H., Witte, . . . H. (März 2004). Localization of the Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT1 in the blood-brain barrier. *Histochem Cell Biol*. 121(3), S. 201-207.
- Faham, S., Watanabe, A., Besserer, G., Cascio, D., Specht, A., Hirayama, B., . . . Abramson, J. (8. August 2008). The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na⁺/sugar symport. *Science*. 321(5890), S. 810-814.
- Falkner, A. L., & Lin, D. (September 2014). Recent advances in understanding the role of the hypothalamic circuit during aggression. *Front. Syst. Neurosci*.
- Faraone, S. V., Perlis, R. H., Doyle, A. E., Smoller, J. W., Goralnick, J. J., Holmgren, M. A., & Sklar, P. (2005). Molecular Genetics of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Biol Psychiatry* 57, S. 1313–1323.
- Feng, L., & Frommer, W. (August 2015). Structure and function of SemiSWEET and SWEET sugar transporters. *Trends in Biochemical Sciences*, 40; 8, S. 480-486.
- Ficiocioglu, C. (April 2008). Review of miglustat for clinical management in Gaucher disease type 1. *Ther Clin Risk Manag.* ; 4(2), S. 425–431.
- Friedrich, M., Schaefer, N., Wischmeyer, E., Geiger, D., Groß-Lesch, S., Kollert, S., . . . Döring, F. (2015). Loss of function mutation in the glucose sensor SGLT3: possible association with ADHD (Poster). *GK Emotions Spring School*. Rothenburg o.d.T.
- Fusar-Poli, P., Rubia, K., Rossi, G., Sartori, G., & Balottin, U. (März 2012). Striatal dopamine transporter alterations in ADHD: pathophysiology or adaptation to psychostimulants? A meta-analysis. *Am J Psychiatry*. 169(3), S. 264-272.
- Graham, J. J. (Mai 2012). GLUT1 deficiency syndrome as a cause of encephalopathy that includes cognitive disability, treatment-resistant infantile epilepsy and a complex movement disorder. *Eur J Med Genet*; 55(5), S. 332-332.
- Greven, C. B.-V. (2015). Developmentally stable whole-brain volume reductions and developmentally sensitive caudate and putamen volume alterations in those with attention-deficit/hyperactivity disorder and their unaffected siblings. *JAMA Psychiatry* 72, S. 90–499.
- Gründer, S., & Xuanmao Chen, X. (2010). Structure, function, and pharmacology of acid-sensing ion channels (ASICs): focus on ASIC1a. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.*; 2(2), S. 73-94.
- Harrell, L., & Davis, J. (June 1985). Cholinergic influences on hippocampal glucose metabolism. *Neuroscience*. 15(2), S. 359-369.
- Hellemans et al. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology* 8:R19.

- Hermey, G., Mahlke, C., Schwake, M., & Sommer, T. (2010). *Der Experimentator: Neurowissenschaften*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Hirayama, B., Loo, D., & Wright, E. (26. August 1994). Protons drive sugar transport through the Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1). *J Biol Chem.* 269(34), S. 21407-21410.
- Hosokawa, T., Momose, T., & Kasai, K. (17. März 2009). Brain glucose metabolism difference between bipolar and unipolar mood disorders in depressed and euthymic states. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 33(2), S. 243-250.
- Howell, G., & Holloway, Z. (2016). Cell Biology of Membrane Trafficking in Human Disease. *International Review of Cytology, Vol. 252*, S. 0074-7696/06.
- Huang, H., Xu, Y., & van den Pol, A. (September 2011). Nicotine excites hypothalamic arcuate anorexigenic proopiomelanocortin neurons and orexigenic neuropeptide Y neurons: similarities and differences. *J Neurophysiol.* 106(3), S. 1191-1202.
- Huss, M., Chen, W., & Ludolph, A. G. (2016). Guanfacine Extended Release: A New Pharmacological Treatment Option in Europe. *Clin Drug Investig.* 36, S. 1–25.
- Jeong, D., Oh, J., Lee, J., Lee, J., Cho, Z., Chang, J., & Chang, W. (January 2016). Basal Forebrain Cholinergic Deficits Reduce Glucose Metabolism and Function of Cholinergic and GABAergic Systems in the Cingulate Cortex. *Yonsei Med J.* ;57(1), S. 165-172.
- Jones, V., Atkinson-Dell, R., Verkhratsky, A., & Mohamet, L. (23. März 2017). Aberrant iPSC-derived human astrocytes in Alzheimer's disease. *Cell Death Dis.* 8(3), S. e2696.
- Juopperi, T. A., Song, H., & Ming, G.-I. (Mai 2011). Modeling neurological diseases using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Future Neurol.* 6(3), S. 363–373. .
- Kahn, R., Houry, J., Nichols, W., & Lanphear, B. (July 2003). Role of dopamine transporter genotype and maternal prenatal smoking in childhood hyperactive-impulsive, inattentive, and oppositional behaviors. *J Pediatr.* 143(1), S. 104-110.
- Kern, S., Oakes, T. R., Stone, C. K., McAuliff, E. M., Kirschbaum, C., & Davidson, R. J. (Mai 2008). Glucose metabolic changes in the prefrontal cortex are associated with HPA axis response to a psychosocial stressor. *Psychoneuroendocrinology.* 33(4), S. 517–529.
- Killeen, P., Russell, V., & Sergeant, J. (Mai 2013). A behavioral neuroenergetics theory of ADHD. *Neurosci Biobehav Rev.* 37(4), S. 625-657.
- Klein, M., Onnink, M., van Donkelaar, M., Wolfers, T., Harich, B., Shi, Y., . . . Franke, B. (2017). Brain imaging genetics in ADHD and beyond – Mapping pathways from gene to disorder at different levels of complexity. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 75, S. 115-155.

- Kobayashi, T., Washiyama, K., & Ikeda, K. (Juni 2010). Inhibition of G-Protein-Activated Inwardly Rectifying K⁺ Channels by the Selective Norepinephrine Reuptake Inhibitors Atomoxetine and Reboxetine. *Neuropsychopharmacology*. 35(7), S. 1560–1569. .
- Koekkoek, L., & Mul, J. L. (19. Dezember 2017). Glucose-Sensing in the Reward System. *Front. Neurosci.* 11, S. 716.
- Kollert, S. (2015). Kaliumkanäle der K2P-Familie kontrollieren die Aktivität neuronaler Zellen - TRESK als Regulator inflammatorischer Hyperalgesie. *Dissertation*. Julius-Maximilians Universität Würzburg.
- Kothintia, R. K., Blodgetta, A. B., North, P. E., Roman, R. J., & Tabatabai, a. N. (5. September 2012). A novel SGLT is expressed in the human kidney. *Eur J Pharmacol.* (690(1-3)), S. 77–83.
- Lee, Y., Kim, M., Ryu, J., & Han, H. (April 2012). Regulation of SGLT expression and localization through Epac/PKA-dependent caveolin-1 and F-actin activation in renal proximal tubule cells. *Biochim Biophys Acta.* 1823(4), S. 971-982.
- Leo, D., & Gainetdinov, R. (2013). Transgenic mouse models for ADHD. *Cell Tissue Res.*; 354(1), S. 259–271. .
- Lesch, K., Selch, S., Renner, T., Jacob, C., Nguyen, T., Hahn, T., . . . Ullmann, R. (May 2011). Genome-wide copy number variation analysis in attention-deficit/hyperactivity disorder: association with neuropeptide Y gene dosage in an extended pedigree. *Molecular Psychiatry* 16(5), S. 491-503.
- Levin, E., Conners, C., Sparrow, E., Hinton, S., Erhardt, D., Meck, W., . . . March, J. (Januar 1996). Nicotine effects on adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychopharmacology (Berl)*.;123(1), S. 55-634.
- Lim, S. A., Kang, U. J., & McGehee, D. S. (Oktober 2014). Striatal cholinergic interneuron regulation and circuit effects. *Front. Synaptic Neurosci.*
- Longpré, J., Gagnon, D., Coady, M., & Lapointe, J. (Januar 2010). The Actual Ionic Nature of the Leak Current through the Na⁺/Glucose Cotransporter SGLT1. *Biophys J.* 98(2), S. 231–239.
- Longpré, J.-P., Sasseville, L. J., & Lapointe, J.-Y. (Oktober 2012). Simulated annealing reveals the kinetic activity of SGLT1, a member of the LeuT structural family. *J Gen Physiol.* 2012 Oct;140(4):361-74.
- Loo, S. K., Hale, T. S., Hanada, G., Macion, J., Shrestha, A., McGough, J. J., . . . Smalley, S. L. (April 2010). Familial clustering and DRD4 effects on EEG Measures in multiplex families with Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 49(4), S. 368–377.
- Ma, L., Chen, Y., Chen, H., Liu, Y., & Wang, Y. (Januar 2011). The function of hypothalamus-pituitary-adrenal axis in children with ADHD. *Brain Res.* 12; 1368, S. 159-162.
- Magistretti, P. J., & Allaman, I. (20. May 2015). A Cellular Perspective on Brain Energy Metabolism and Functional Imaging. *Volume 86, Issue 4*, S. 883-901.

- Magnotta, V., Heo, H., Dlouhy, B., Dahdaleh, N., Follmer, R., Thedens, D., . . . Wemmie, J. (Mai 2012). Detecting activity-evoked pH changes in human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109(21), S. 8270-8273.
- Mantych, G., James, D., Chung, H., & Devaskar, S. (September 1992). Cellular localization and characterization of Glut 3 glucose transporter isoform in human brain. *Endocrinology*. 131(3), S. 1270-1278.
- Marston, O., Hurst, P., Evans, M., Burdakov, D., & Heisler, L. (November 2011). Neuropeptide Y cells represent a distinct glucose-sensing population in the lateral hypothalamus. *Endocrinology*. 152(11), S. 4046-52.
- Martin, J., O'Donovan, M., Thapar, A., Langley, K., & Williams, N. (2015). The relative contribution of common and rare genetic variants to ADHD. *Transl Psychiatry* 5, e506.
- Martín, M., & Wright, E. (Februar 1996). Defects in Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) trafficking and function cause glucose-galactose malabsorption. *Nature Genetics*. 1996 12(2), S. 216-220.
- McClernon, F., & Kollins, S. (Oktober 2008). ADHD and Smoking. *Ann N Y Acad Sci.*; 1141, S. 131–147.
- Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G., & Meisel, A. (October 2013). Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci*. 36(10), S. 587–597.
- Merker, S., Reif, A., Ziegler, G., Weber, H., Mayer, U., Ehli, A., . . . Lesch, K. (July 2017). SLC2A3 single-nucleotide polymorphism and duplication influence cognitive processing and population-specific risk for attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Child Psychol Psychiatry*. 58(7), S. 798-809.
- Middeldorp et al., C. (Oktober 2016). A Genome-Wide Association Meta-Analysis of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Symptoms in Population-Based Pediatric Cohorts. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 55(10), S. 896–905.
- Mitelman, S., Bralet, M., Mehmet, H. M., Hollander, E., Shihabuddin, L., Hazlett, E., & Buchsbaum, M. (19. April 2017). Positron emission tomography assessment of cerebral glucose metabolic rates in autism spectrum disorder and schizophrenia. *Brain Imaging Behav*.
- Mooney, M. A., McWeeney, S. K., Faraone, S. V., Hinney, A., Hebebrand, J., Consortium, I., . . . Wilmot, B. (September 2016). Pathway Analysis in Attention Deficit Hyperactivity Disorder: An Ensemble Approach. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 171(6), S. 815–826. .
- Moriyama, Y., Maeda, M., & Futai, M. (November 1992). The role of V-ATPase in neuronal and endocrine systems. *J Exp Biol.*;172, S. 171-178.
- Mostert JC, S. E. (Juni 2016). Characterising resting-state functional connectivity in a large sample of adults with ADHD. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 3;67, S. 82-91.

- Neale et al., B. M. (September 2010). Meta-Analysis of Genome-Wide Association Studies of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 49(9), S. 884-897.
- Nour-Eldin, H., Geu-Flores, F., & Halkier, B. (2010). USER cloning and USER fusion: the ideal cloning techniques for small and big laboratories. *Methods Mol. Biol.* 643, S. 185-200.
- Oerter, S., Morschek, L., Monoranu, C., Förster, C., & Bohnert, M. (2016). Nachweis des Glukosesensors SGLT3 im postmortalen menschlichen Gewebe. 95. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM), August 30 – September 3, 2016*. Heidelberg.
- O'Malley, D., Reimann, F., Simpson, A., & Gribble, F. (Dec 2006). Sodium coupled glucose co-transporters contribute to hypothalamic glucose sensing. *Diabetes* 55(12), S. 3381–3386.
- Ott, J., Kamatani, Y., & Lathrop, M. (Juli 2011). Family-based designs for genome-wide association studies. *Nature Reviews: Genetics*, Vol 12.
- Panayotova-Heiermann, M., Loo, D., Kong, C., Lever, J., & Wright, E. (April 1996). Sugar Binding to Na⁺/Glucose Cotransporters Is Determined by the Carboxyl-terminal Half of the Protein. *J Biol Chem*. 26;271(17), S. 10029-10034.
- Parent, L., Supplisson, S., Loo, D., & Wright, E. (Januar 1992). Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter: I. Voltage-clamp studies. *J Membr Biol*. 1992 125(1), S. 49-62.
- Pellerin, L., & Magistretti, P. (Juli 2012). Sweet sixteen for ANLS. *J Cereb Blood Flow Metab*. 32(7), S. 1152-1166.
- Perlov, E., Philipsen, A., Matthies, S., Drieling, T., Maier, S., Bubl, E., . . . Tebartz Van Elst, L. (2009). Spectroscopic findings in attention-deficit/hyperactivity disorder: review and meta-analysis. *World J Biol Psychiatry*. 10(4 Pt 2), S. 355-365.
- Perlov, E., Philipsen, A., Tebartz van Elst, L., Ebert, D., Henning, J., Maier, S., . . . Hesslinger, B. (November 2008). Hippocampus and amygdala morphology in adults with attention-deficit hyperactivity disorder. *J Psychiatry Neurosci*. 33(6), S. 509–515.
- Peters, A., Kubera, B., Hubold, C., & Langemann, D. (2011). The Selfish Brain: Stress and Eating Behavior. *Front Neurosci*. 5: 74.
- Peters, A., Schweiger, U., Pellerin, L., Hubold, C., Oltmanns, K., Conrad, M., . . . Fehm, H. (April 2004). The selfish brain: competition for energy resources. *Neurosci Biobehav Rev*. 28(2), S. 143-180.
- Pfaffl, M. (Jan 2004). Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifikation. *Biospektrum*, 10. Jahrgang, S. 92-95.
- Poppe, R., Karbach, U., Gambaryan, S., Wiesinger, H., Lutzenburg, M., Kraemer, M., . . . H, K. (July 1997). Expression of the Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT1 in neurons. *J Neurochem*. 69(1), S. 84-94.

- Potegal, M., & Myers, M. (März 1989). Spontaneously hypertensive Wistar-derived male rats are more aggressive than those of their normotensive progenitor strain. *Behav Neural Biol.* 51(2), S. 247-61.
- Potter, A. S., Newhouse, P. A., & Bucci, D. J. (2006). Central nicotinic cholinergic systems: A role in the cognitive dysfunction in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder? *Behavioural Brain Research* 175, S. 201–211.
- Potter, A., Schaubhut, G., & Shipman, M. (Dezember 2014). Targeting the Nicotinic Cholinergic System to Treat Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: Rationale and Progress to Date. *CNS Drugs.*; 28(12), S. 1103-1113.
- Quick, M., Loo, D., & Wright, E. (Januar 2001). Neutralization of a conserved amino acid residue in the human Na⁺/glucose transporter (hSGLT1) generates a glucose-gated H⁺ channel. *J Biol Chem.* 2001;276(3), S. 1728-1734.
- Raja, M., & Kinne, R. (2015). Identification of phlorizin binding domains in sodium-glucose cotransporter family: SGLT1 as a unique model system. *Biochimie.* 115, S. 187-193.
- Raja, M., & Kinne, R. (2015). Identification of phlorizin binding domains in sodium-glucose cotransporter family: SGLT1 as a unique model system. *Biochimie* 115, S. 187-193.
- Reichmann, F., & Holzer, P. (Februar 2016). Neuropeptide Y: A stressful review. *Neuropeptides.* 55, S. 99–109. .
- Renner, T., Gerlach, M., Romanos, M., Herrmann, M., Reif, A., Fallgatter, A., & Lesch, K. (2008). Neurobiologie des Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndroms. *Nervenarzt* , S. 1-8.
- Rivera, H., Christiansen, K., & Sullivan, E. (2015). The role of maternal obesity in the risk of neuropsychiatric disorders. *Front.Neurosci.* 9: 194.
- Robert-Koch-Institut. (2014). *KiGGS Studie*. Von <https://www.kiggs-studie.de> abgerufen
- Roeske, D., Ludwig, K., Neuhoff, N., Becker, J., Bartling, J., Bruder, J., . . . Schulte-Körne, G. (Januar 2011). First genome-wide association scan on neurophysiological endophenotypes points to trans-regulation effects on SLC2A3 in dyslexic children. *Mol Psychiatry.* 16(1), S. 97-107.
- Romanos, M., Freitag, C., Jacob, C., Craig, D., Dempfle, A., Nguyen, T., & al., e. (2008). Genome-wide linkage analysis of ADHD using high-density SNP arrays: novel loci at 5q13.1 and 14q12. *Mol Psychiatry* 13, S. 522-530.
- Russell, V., Oades, R., Tannock, R., Killeen, P., Auerbach, J., Johansen, E., & Sagvolden, T. (August 2006). Response variability in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: a neuronal and glial energetics hypothesis. *Behav Brain Funct.* 23;2:30.
- Sala-Rabanal, M., Hirayama, B., Ghezzi, C., Liu, J., S, H., Kepe, V., . . . Barrio, J. (2016). Revisiting the physiological roles of SGLTs and GLUTs using positron emission tomography in mice. *J Physiol* 594.15 , S. 4425–4438.

- Santer, R., Kinner, M., Lassen, C. L., Schneppenheim, R., Eggert, P., Bald, M., . . . G.F, P. (November 2003). Molecular Analysis of the SGLT2 Gene in Patients with Renal Glucosuria . *J Am Soc Nephrol.* 14(11), S. 2873-2882.
- Schäfer, N. F., Jørgensen, M., Kollert, S., Koepsell, H., Klein, M., Franke, B., . . . Döring, F. (Oktober 2018). Functional analysis of a mutation in the glucose sensor SGLT3 identified as a genetic risk factor for ADHD. *PLOS ONE* 13(10): e0205109.
- Schwarz, R., Reif, A., Scholz, C., Weissflog, L., Schmidt, B., Lesch, K., . . . Kittel-Schneider, S. (April 2015). A preliminary study on methylphenidate-regulated gene expression in lymphoblastoid cells of ADHD patients. *World J Biol Psychiatry.* 16(3), S. 180-189.
- Shah, K., DeSilva, S., & Abbruscato, T. (2012). The Role of Glucose Transporters in Brain Disease: Diabetes and Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 13(10), S. 12629–12655.
- Shaw, M., Hodgkins, P., Caci, H., Young, S., Kahle, J., Woods, A. G., & Arnold., L. E. (4. September 2012). A systematic review and analysis of long-term outcomes in attention deficit hyperactivity disorder: effects of treatment and non-treatment. *BMC Med.* 10: 99.
- Shaw, P., De Rossi, P., Watson, B., Wharton, A., Greenstein, D., Raznahan, A., . . . Chakravarty, M. (Juli 2014). Mapping the Development of the Basal Ganglia in Children With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 53(7), S. 780-789.
- Shaw, P., Sharp, W., Morrison, M., Eckstrand, K., Greenstein, D., Clasen, L., . . . Rapoport, J. (Januar 2009). Psychostimulant treatment and the developing cortex in attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry.* 166(1), S. 58-63.
- Sigma Aldrich.* (Januar 2017). Von Datenblatt Miglitol:
www.sigmaaldrich.com/catalog/product/SIGMA/M1574 abgerufen
- Sigma-Aldrich.* (2017). *Phlorizin dihydrate.* Von Datenblatt:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/SIGMA/P3449> abgerufen
- Simpson, I. A., Dwyer, D., Malide, D., Moley, K. H., Travis, A., & Vannucci, S. J. (August 2008). The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 295(2), S. E242–E253.
- Sinning, A., & Hübner, C. (Juni 2013). Minireview: pH and synaptic transmission. *FEBS Lett.*;587(13), S. 1923-1928.
- Sotak, M., Marks, J., & Unwin, R. (2017). Putative tissue location and function of the SLC5 family member SGLT3. *Experimental Physiology* 102.1, S. 5-13.
- Sterley, T.-L., Howells, F., & Russell, V. (Juli 2014). Nicotine-stimulated release of [3H]norepinephrine is reduced in the hippocampus of an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder, the spontaneously hypertensive rat. *Brain Research Volume* 1572, S. 1-10.

- Stickley, A., Koyanagi, A., Ruchkin, V., & Kamio, Y. (Januar 2016). Attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms and suicide ideation and attempts: Findings from the Adult Psychiatric Morbidity Survey 2007. *J Affect Disord.* 189, S. 321-328.
- Thapar, A., & Cooper, M. (19. March 2016). Attention deficit hyperactivity disorder. *Lancet.* 2016; 387(10024), S. 1240-1250.
- Todd, R., & Botteron, K. (2001). Is Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder an Energy Deficiency Syndrome? *Biol Psychiatry* 50, S. 151-158.
- van Ewijk, H., Heslenfeld, D., Zwiers, M., Buitelaar, J., & Oosterlaan, J. (April 2012). Diffusion tensor imaging in attention deficit/hyperactivity disorder: a systematic review and meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev.* 36(4), S. 1093-1106.
- Vandesompele et al. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3(7): research, S. 0034.1–0034.11.
- Veyhl, M., Wagner, K., Volk, C., Gorboulev, V., Baumgarten, K., Weber, W., . . . Koepsell, H. (17. März 1998). Transport of the new chemotherapeutic agent beta-D-glucosylisophosphoramid mustard (D-19575) into tumor cells is mediated by the Na⁺-D-glucose cotransporter SAAT1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(6), S. 2914-2919.
- Videbech, P. (Januar 2000). PET measurements of brain glucose metabolism and blood flow in major depressive disorder: a critical review. *Acta Psychiatr Scand.* 101(1), S. 11-20.
- Vollenweider, F., Maguire, R., Leenders, K., Mathys, K., & Angst, J. (1998). Effects of high amphetamine dose on mood and cerebral glucose metabolism in normal volunteers using positron emission tomography (PET). *Psychiatry Research: Neuroimaging Section* 83, S. 149-162.
- Voss, A., Diez-Sampedro, A., Hirayama, B., Loo, D., & Wright, E. (2007). Imino Sugars Are Potent Agonists of the Human Glucose Sensor SGLT3. *Mol Pharmacol* 71, S. 628–634.
- Wais, S. (Juli 2013). Die Rolle der Glukosetransporter an der Blut-Hirn-Schranke nach einem Schädel-Hirn-Trauma und deren eventueller Einfluss auf die Entwicklung eines sekundären Hirnödems. Julius-Maximilians Universität Würzburg.
- Wang, X., Du, X., Tian, Q., & Wang, J. (Mai 2008). Correlation between choline signal intensity and acetylcholine level in different brain regions of rat. *Neurochem Res.* ;33(5), S. 814-819.
- Weber, W. (15. Oktober 1999). Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochim Biophys Acta.* 1421(2), S. 213-233.
- Williams, N., Franke, B., Mick, E., Holmans, P., Kent, L., Middleton, F., . . . Faraone, S. (2012). Genome-wide analysis of copy number variants in attention deficit hyperactivity disorder: the role of rare variants and duplications at 15q13.3. *Am. J. Psychiatry* 169, S. 195–204.

- Wimmer, B., Raja, M., Hinterdorfer, P., Gruber, H., & Kinne, R. (Januar 2009). C-terminal loop 13 of Na⁺/glucose cotransporter 1 contains both stereospecific and non-stereospecific sugar interaction sites. *J Biol Chem.* 2009; 284(2), S. 983-991.
- Wright, E. (November 1998). I. Glucose galactose malabsorption. *Am J Physiol.* 275(5 Pt 1), S. G879-882.
- Wright, E., & Turk, E. (Februar 2004). The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch.* 447(5), S. 510-518.
- Wright, E., Ghezzi, C., & Loo, D. (November 2017). Novel and Unexpected Functions of SGLTs. *Physiology (Bethesda).* 32(6), S. 435-443.
- Wright, E., Hirsch, J., Loo, D., & Zampighi, G. (January 1997). Regulation of Na⁺/glucose cotransporters. *J Exp Biol.* 200(Pt 2), S. 287-293.
- Wright, E., Loo, D., & Hirayama, B. (2011). Biology of Human Sodium Glucose Transporters. *Physiol Rev* 91, S. 733–794.
- Wright, E., Loo, D., Hirayama, B., & Turk, E. (Dezember 2004). Surprising versatility of Na⁺-glucose cotransporters: SLC5. *Physiology (Bethesda)*;19, S. 370-376.
- Yamazaki, Y., Harada, S., & Tokuyama, S. (Juni 2014). Sodium-glucose transporter type 3-mediated neuroprotective effect of acetylcholine suppresses the development of cerebral ischemic neuronal damage. *Neuroscience* 6;269, S. 134-142.
- Yang, S., Wang, K., Gregory, B., Berrettini, W., Wang, L.-S., Hakonarson, H., & Bucan, M. (2009). Genomic Landscape of a Three-Generation Pedigree Segregating Affective Disorder. *PLoS ONE.* 4(2), S. 4474.
- Yu, A., Hirayama, B., Timbol, G., Liu, J., Basarah, E., Kepe, V., . . . Barrio, J. (Dezember 2010). Functional expression of SGLTs in rat brain. *Am J Physiol Cell Physiol.* 299(6), S. C1277–C1284.
- Yu, A., Hirayama, B., Timbol, G., Liu, J., Diez-Sampedro, A., Kepe, V., . . . Barrio, J. (2013). Regional distribution of SGLT activity in rat brain in vivo. *Am J Physiol Cell Physiol* 304, S. 240-247.
- Zametkin, A., Nordahl, T., Gross, M., King, A., Semple, W., Rumsey, J., . . . Cohen, R. (15. November 1990). Cerebral Glucose Metabolism in Adults with Hyperactivity of Childhood Onset. *N Engl J Med.* 323(20), S. 1361-6.

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - SGLTs vermitteln die zelluläre Glukoseaufnahme.....	12
Abbildung 2 - Homologieplot der Aminosäuresequenz von SGLT1 auf die Sekundärstruktur von vSGLT.....	14
Abbildung 3 - pSGEM Vektor.....	19
Abbildung 4 - pNBI22 Vektor.....	19
Abbildung 5 - Stammbaumanalyse der Indexfamilie.....	28
Abbildung 6 - RT-PCR Expressionsprofil von SLC5A4 in humanen kortikalen Gesamt- RNAs.....	41
Abbildung 7 - RT-PCR Expressionsprofil von SLC5A4 in ADHS-relevanten Hirnarealen.	42
Abbildung 8 - Real-time PCR Expressionsprofil von SLC5A4 in verschiedenen Hirnarealen.....	43
Abbildung 9 - Aktivierung von SGLT3 durch D-Glukose bei verschiedenen pH Werten.	45
Abbildung 10 –Substratinduzierte Ströme von wildtypischem SGLT3.....	47
Abbildung 11 - Inhibition von SGLT3 durch Phlorizin bei pH7.....	48
Abbildung 12 Inhibition von SGLT3 durch Phlorizin bei pH5.....	49
Abbildung 13 - Inhibition von SGLT3 durch Phlorizin bei pH5 im Stromklemmenmodus.	49
Abbildung 14 – Zusammenfassung der Inhibition von SGLT3 durch Phlorizin.....	50
Abbildung 15 - Aktivierungsexperiment von Δ M500-SGLT3, Δ I501-SGLT3 und Kontrollen bei pH5.....	51
Abbildung 16 - Vergleich der substratinduzierten Ströme an wildtypischem SGLT3, Δ M500-SGLT3, Δ I501-SGLT3 sowie Kontrollen bei pH5.....	52
Abbildung 17 - Aktivierung von Δ I501-SGLT3 in verschiedenen pH Bedingungen.....	53
Abbildung 18 - Hyperpolarisationsexperimente an Δ I501-SGLT3.....	55
Abbildung 20 – LSM Aufnahmen von SGLT3-YFP exprimierenden Oozyten.....	57
Abbildung 21 - Vergleich der relativen Fluoreszenzintensitäten verschiedener SGLT3- YFP Konstrukte und Kontrollen.....	58
Abbildung 22 - Neurogliale Kopplung bzw. Astrozyten-Neuronen-Laktat-Shuttle.....	65
Abbildung 23 - Dreidimensionales Homologiemodell mit Fokus auf diskutierte SGLT Mutanten (nach Schäfer et al., 2018).....	70

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Primersequenzen für RT-PCR Expressionsprofil von SGLT3.....	20
Tabelle 2 - Sequenzierungsprimer pSGEM.....	20
Tabelle 3 - Primersequenzen für in-vitro Transkription von SGLT3 und der Mutanten.....	20
Tabelle 4 - Primer für die quantitative real-time PCR.....	21
Tabelle 5- Enzyme.....	22
Tabelle 6- Reaktionskits.....	22
Tabelle 7- Chemikalien.....	23
Tabelle 8- Medien und Puffer.....	23
Tabelle 9- Messlösungen.....	24
Tabelle 10- Geräte.....	25
Tabelle 11- Software.....	26

Tabelle 12 - PCR Protokoll RT-PCR Expressionsprofil von SGLT3.....	29
Tabelle 13 – PCR Protokoll des real-time PCR Expressionsprofils von SGLT3.....	31
Tabelle 14 – PCR Protokoll SGLT3 Amplifikation aus SGLT3-pRSSP	33
Tabelle 15 - PCR Protokoll Mutagenese Δ I501-hSGLT3.....	36

6.4 Abkürzungsverzeichnis

ADHS.....	<i>Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom</i>
ANLS	<i>Astrozyten-Neuronen Laktatshuttle</i>
bp	<i>Basenpaare</i>
CLSM.....	<i>Konfokales Laserscanning-Mikroskop</i>
CNV	<i>Copy number variant</i>
cRNA	<i>Capped RNA</i>
DNJ.....	<i>1- Desoxynojirimycin</i>
DSM.....	<i>Diagnostic and Statistical Manual</i>
ERP	<i>Event-related potentials</i>
fNIRS	<i>Functional near infrared spectroscopy</i>
GAPDH	<i>Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase</i>
GLUT	<i>Familie der faszilitativen Glukosetransporter</i>
GLUT3.....	<i>Neuronaler Glukosetransporter Typ 3</i>
GWAS.....	<i>Genomweite Assoziationsstudie</i>
ICD-10	<i>International Classification of Disease</i>
MCT	<i>Monocarboxylattransporter</i>
MRT	<i>Magnetresonanztomografie</i>
mSGLT	<i>Muriner SGLT</i>
NNT	<i>Number needed to treat</i>
NPY	<i>Neuropeptid Y</i>
PCR	<i>Polymerasekettenreaktion</i>
PET	<i>Positronenemissionstomografie</i>
pNBI22.....	<i>Xenopusvektor mit YFP</i>
PROVEAN.....	<i>Protein Variation Effect Analyzer</i>
pRSSP	<i>Xenopusvektor</i>
pSGEM	<i>Xenopusvektor</i>
qPCR	<i>Quantitative real-time PCR</i>
RNA	<i>dt. Ribonukleinsäure</i>
RS27A	<i>Ribosomales Protein 27A</i>
SAAT	<i>Natrium-Aminosäuren-Transporter, jetzt: SGLT3</i>
SLC.....	<i>Solute-Carrier Genfamilie</i>
SNPs	<i>Small nucleotide polymorphism</i>
SPECT.....	<i>Single photon emission computed tomography</i>
SWEET	<i>Zuckertransporterfamilie</i>
WES	<i>Whole Exome Sequencing, dt. Exomweite Sequenzierungsstudie</i>
Wt.....	<i>Wildtyp</i>
YFP.....	<i>Yellow fluorescent protein</i>

6.5 Aminosäuresequenzen im FASTA-Format

In-silico Translation erfolgte mittels Emboss Transeq (www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq).

SGLT3

MASTVSPSTI AETPEPPPLS DHIRNAADIS VIVIYFLVVM AVGLWAMLKT NRGTTGGFFL AGRD-
MAWWPM GASLFASNIG SNHYVGLAGT GAASGVATVT FEWTSSVMLL ILGWIFVPIY IKS-
GVMTMPE YLKKRFGGER LQVYLSILSL FICVLLISA DIFAGAIFIK LALGLDLYLA IFILLAMTAV YTT-
TGGLASV IYDRTLQTII MLIGSFILMG FAFNEVGGYE SFTEKYVNAT PSVVEGDNL ISASCYTPRA
DSFHIFRDAV TGDIPWPGII FGMPITALWY WCTNQVIVQR CLCGKDMSHV KAACIMCAYL KLLPM-
FLMVM PGMISRILYT DMVACVVPSE CVKHCGVDVG CTNYAYPTMV LELMPQGLRG LMLSVMLASL
MSSLTSIFNS ASTLFTIDLY TKMRKQASEK ELLIAGRIFV LLLTVVSIVW VPLVQVSQNG QLIHYTE-
SIS SYLGPPIAAV FVLAIFCKRV NEQGAFWGLM VGLAMGLIRM ITEFAYGTGS CLAPSNCPKI
ICGVHYLYFS IVLFFGSMLV TLGISLLTKP IPDVHLYRLC WVLNRNTEER IDIDAEKESQ EETDDG-
VEED YPEK RGCLK KAYDLFCGLQ KGPCLTKEEE EALSKKLTDT SERPSWRTIV NINAILLAV
VFIHGYYA

ΔM500-SGLT3

MASTVSPSTI AETPEPPPLS DHIRNAADIS VIVIYFLVVM AVGLWAMLKT NRGTTGGFFL AGRD-
MAWWPM GASLFASNIG SNHYVGLAGT GAASGVATVT FEWTSSVMLL ILGWIFVPIY IKSGVMTMPE
YLKKRFGGER LQVYLSILSL FICVLLISA DIFAGAIFIK LALGLDLYLA IFILLAMTAV YTTTGGLASV
IYDRTLQTII MLIGSFILMG FAFNEVGGYE SFTEKYVNAT PSVVEGDNL ISASCYTPRA DSF-
HIFRDAV TGDIPWPGII FGMPITALWY WCTNQVIVQR CLCGKDMSHV KAACIMCAYL KLLPM-
FLMVM PGMISRILYT DMVACVVPSE CVKHCGVDVG CTNYAYPTMV LELMPQGLRG LMLSVMLASL
MSSLTSIFNS ASTLFTIDLY TKMRKQASEK ELLIAGRIFV LLLTVVSIVW VPLVQVSQNG QLIHYTE-
SIS SYLGPPIAAV FVLAIFCKRV NEQGAFWGLM VGLAMGLIRI TEFAYGTGSC LAPSNCPKII
CGVHYLYFSI VLFFGSMLVT LGISLLTKPI PDVHLYRLCW VLRNTEERI DIDAEKESQ EETDDGVE-
EDY PEK RGCLKK AYDLFCGLQK GPKLTKEEEE ALSKKLTDTS ERPSWRTIVN INAILLAVV
VFIHGYYA

ΔI501-SGLT3

MASTVSPSTI AETPEPPPLS DHIRNAADIS VIVIYFLVVM AVGLWAMLKT NRGTTGGFFL AGRD-
MAWWPM GASLFASNIG SNHYVGLAGT GAASGVATVT FEWTSSVMLL ILGWIFVPIYIKSGVMTMPE
YLKKRFGGER LQVYLSILSL FICVLLISA DIFAGAIFIK LALGLDLYLA IFILLAMTAV YTTTGGLASV
IYDRTLQTII MLIGSFILMG FAFNEVGGYE SFTEKYVNAT PSVVEGDNL TISASCYTPR ADSF-
HIFRDAV TGDIPWPGII FGMPITALWY WCTNQVIVQR CLCGKDMSHV KAACIMCAYL KLLPM-
FLMVM PGMISRILYT DMVACVVPSE CVKHCGVDVG CTNYAYPTMV LELMPQGLRG LMLSVMLASL
MSSLTSIFNS ASTLFTIDLY TKMRKQASEK ELLIAGRIFV LLLTVVSIVW VPLVQVSQNG QLIHYTESIS
SYLGPPIAAV FVLAIFCKRV NEQGAFWGLM VGLAMGLIRM ITEFAYGTGS CLAPSNCPKI
ICGVHYLYFS IVLFFGSMLV TLGISLLTKP IPDVHLYRLC WVLNRNTEER IDIDAEKESQ EETDDG-
VEED YPEKSRGCLK KAYDLFCGLQ KGPCLTKEEE EALSKKLTDT SERPSWRTIV NINAILLAV
VFIHGYYA* TLSEPLE**I ILKKKX

SGLT1

MDSSTWSPKT TAVTRPVETH ELIRNAADIS IIVIYFVVM AVGLWAMFST NRGTVGGFFL AGRS-
MWWPI GASLFASNIG SGHFVGLAGT GAASGIAIG FEWNALVLV VLGWLVFVPIY IKAGVVTMPE
YLRKRFGGQR IQVYLSLLSL LLYIFTKISA DIFSGAIFIN LALGLNLILA IFLLLAITAL YTTTGGLAAV
IYDRTLQTVI MLVGSILITG FAFHEVGGYD AFMEKYMKAI PTIVSDGNNT FQEKCYTPRA DSF-
HIFRDPL TGDLPWPGFI FGMSILTLWY WCTDQVIVQR CLSAKNMSHV KGGCILCGYL KLMPM-
FIMVM PGMISRILYT EKIACVVPSEC EKYCGTKVGC TNIAAYPTLVV ELMPNGLRGL MLSVMLASLM
SSLTSIFNSA STLFTMDIYA KVRKRASEKE LMIAGRLFIL VLGISIAWV PIVQSAQSGQ LFDYIQSITS
YLGPPIAAVF LLAIFWKRNV EPGAFWGLILG LIGISRMITE FAYGTGSCME PSNCPHICGV
HYLYFAILLFA ISFITIVVI SLLTKPIPDV HLYRLCWSLRN SKEERIDLDA EENIQEGPK ETIEIETQVPE
KKKGIFRRAY DLFCGLEQHG APKMTEEEEEK AMKMKMTDTSE KPLWRTVLN VNGIILVTAV
FCHAYFA

6.6 Curriculum Vitae des Autors

Maximilian Uwe Friedrich

Eduard-Buchner Str. 18

97080 Würzburg

Mobil: +491702422338

Email: maximilianuwefriedrich@gmail.com

Geboren am 8. Juli 1988 in Kulmbach/ Oberfranken

Studium

Julius-Maximilians Universität Würzburg **Germanistik, Latein und Philosophie**
10/2009- 02/2010 Lehramt für Gymnasien

Julius-Maximilians Universität Würzburg **Humanmedizin**
04/2010- 05/2017

Klinik

Praxis Dr. Kropp, Würzburg
09/2014-10/2015,
05/2017- 08/2017

Neurologie & Psychiatrie
Betreuung ambulanter neurologischer und psychiatrischer Patienten unter ärztl. Supervision

**Juliusspital Würzburg;
Royal Victoria Infirmary, Newcastle, UK;
Universitätsklinikum Würzburg**
05/2016-04/2017

**Neurologie;
Neurochirurgie;
Innere Medizin**
Praktisches Jahr

**Universitätsklinikum Würzburg,
Neurologische Klinik**
(Prof. Dr. J. Volkmann)
seit 08/2017

**Weiterbildung zum Facharzt für Neurologie;
Betreuung der Epilepsieambulanz**
(seit 09/18)

Forschung

**Zentrum für Psychische Gesundheit,
Würzburg**
(Prof. Dr. K.-P. Lesch)
2013-2018

Laboratory of Translational Neuroscience
Experimentelle Doktorarbeit in einem strukturierten Promotionsprogramm (GSLs); Thema: „Funktionelle Charakterisierung einer Triplet-deletion in SLC5A4 (SGLT3) als Kandidatengen für das Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom (ADHS)“

The Rockefeller University, New York, USA

(Prof. Dr. W. Freiwald)
11/2015- 05/2016

Laboratory of Neural Systems

Kognitive Neurogenetik der kongenitalen und erworbenen Prosopagnosie; Interpretation und Modellierung hochdimensionaler elektrophysiologischer Daten von Primaten

Institute of Neuroscience, Newcastle, UK

(Prof. Dr. M. Cunningham)
09/2016- 12/2016

Laboratory of Neuronal Dynamics

Elektrophysiologische Untersuchung und pharmakologische Modulation der Iktogenität in humanen, periläsionellen Hirnschnitten

Universitätsklinikum Würzburg, Neurologische Klinik

(Priv.-Doz. Dr. CW Ip)
09/2018-

Neuronal Circuits in Movement Disorders

Behaviorale, elektrophysiologische sowie optogenetische Charakterisierung und Modulation motorischer neuronaler Netzwerke und Schaltkreise

Auszeichnungen und Mitgliedschaften

2013- 2017	Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes
Seit 2013	Promotionsstipendiat der Würzburg Graduate School of Life Sciences
2015	Vollstipendiat der Studienstiftung und der Rockefeller University, New York, USA für einen Forschungsaufenthalt ebenda
2016	Stipendiat des DAAD für einen klinischen Aufenthalt an der Newcastle University, UK
2016	Mentorenprogramm der Jungen Neurologen; Mentor Prof. Dr. H. Lerche
2018	Mitglied der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, der American Academy of Neurology, der European Society of Cardiology sowie ehrenamtliches Mitglied der Auswahlkommission der Studienstiftung des deutschen Volkes

Lehrtätigkeit

**Klinisches Praktikum
Neurologie und Untersuchungskurs Neurologie**

Universitätsklinikum Würzburg (seit 2017)

Sprachen

Deutsch Muttersprache

Englisch Verhandlungssicher

Italienisch Grundkenntnisse

Französisch Grundkenntnisse

6.7 Publikationen und Posterbeiträge des Autors

Friedrich, M; Schaefer, N; Wischmeyer E; Geiger, D; Groß-Lesch, S; Kollert, S; Koepsell, H; Klein, M; Franke, B; Lesch, KP; Döring, F. “**A deletion in the glucose sensor SGLT3: possible association with ADHD**”, Poster präsentiert am World Congress of Psychiatric Genetics, Copenhagen, 2014.

Aas M, Blokland G, Chawner S, Choi S, Estrada J, Forsingdal A, **Friedrich M**, Ganesham S, Hall L, Haslinger D, Huckins L, Loken E, Malan-Muller S, Martin J, Misiewicz Z, Pagliaroli L, Pardinias AF, Pisanu C, Quadri G, Santoro ML, Shaw A, Ranlund S, Song J, Tesli MS, Tropeano M, van der Voet M, Wolfe K, Cormack FK, DeLisi L. “**Summaries of Plenary, Symposia, and Oral Sessions at the XXII World Congress of Psychiatric Genetics, Copenhagen, Denmark, October 12 –16, 2014**”. Psychiatric Genetics, 2015.

Friedrich, M; Schaefer, N; Wischmeyer E; Geiger, D; Groß-Lesch, S; Kollert, S; Koepsell, H; Klein, M; Franke, B; Lesch, KP; Döring, F. “**A deletion in the glucose sensor SGLT3: possible association with ADHD (updated version)**”, Poster präsentiert am GK Emotions Retreat Rothenburg o.d.T., 2015.

Giannakaki, V*, **Friedrich, M***, Hussain, A; Mitchell, P. “**Effect of cranioplasties on the cerebral ventricular system**“, Poster präsentiert am Congress of Neurological Surgeons, Oxford, 2016.

Pressl, C; Jiang, C; **Friedrich, M**; Correa da Rosa, J; Freiwald, W; Tobin, J. “**Utilization of an ICD-coded electronic health records database to characterize the epidemiology of Prosopagnosia**”, präsentiert am Annual Meeting of the Association for Clinical Translational Science, Washington, D.C., April 19th-21st, 2017.

Augustin, K; Williams, S; Devlin, A; **Friedrich, M**; Jayasekera, A; Hussain, M; Holliman, D; Mitchell, P; Jenkins, A; Chen, P; Walker, M; Williams, R; Cunningham M. “**Decanoic acid and Perampanel show synergistic action against seizures**”. Epilepsia. 2018; 00:1–7.

Schäfer N*, **Friedrich M***, Jørgensen ME, Kollert S, Koepsell H, et al. (2018) “**Functional analysis of a triplet deletion in the gene encoding the sodium glucose transporter 3, a potential risk factor for ADHD**”. PLOS ONE 2018; 13(10): e0205109, 2018.

*equally contributing authors

6.8 Danksagung

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. K.-P. Lesch für die Überlassung dieses interessanten Themas danken, welches in mir eine tiefe Faszination für Neurophysiologie weckte und damit einen Grundstein für meinen weiteren Werdegang in diesem Feld gelegt hat. Seine Unterstützung in allen Phasen des Entstehungsprozesses dieser Arbeit werde ich mit großer Dankbarkeit in Erinnerung behalten.

Herrn PD Dr. F. Döring danke ich für die zuverlässige und geduldige Betreuung meiner Arbeit sowie besonders für seine stets hilfreichen Anmerkungen und Vorschläge, die meine Fähigkeit zu kritischem wissenschaftlichen Denken und Arbeiten wesentlich geformt haben. Nicht weniger möchte ich Herrn Prof. Dr. E. Wischmeyer, Herrn Prof. D. Geiger und Frau Dr. N. Schäfer für ihre unverzichtbaren und immens geschätzten intellektuellen und technischen Beiträge in elektrophysiologischen Belangen danken. Frau Dr. S. Kollert, sowie den MTAs Frau K. Gerber und Frau G. Ortega danke ich für ihre herzliche und inhaltlich exzellente Einarbeitung im Labor für Molekulare Elektrophysiologie respektive dem Labor für Translationale Neurowissenschaft.

Nicht unerwähnt bleiben sollen Herr Prof. Dr. W. Freiwald und Frau Dr. C. Pressl, Rockefeller University, New York sowie Herr Prof. Dr. M. Cunningham, Trinity College, Dublin, die mich und diese Arbeit im Rahmen ihrer Betreuung und daraus erwachsender inspirierender Diskussionen systemneurophysiologischer Themen nachhaltig geprägt haben.

Von unschätzbarem Wert war und ist die unaufhörliche, liebevolle und motivierende Unterstützung meiner Familie. Mein tiefer Dank und aufrichtigste Wertschätzung gilt allen voran Helen, Elke und Uwe, Elisabeth, Annerose und Inge.

6.9 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „*Funktionelle Charakterisierung einer Triplet-deletion in SLC5A4 (SGLT3) als Kandidatengen für das Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom (ADHS)*“ 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.

Würzburg, 08.10.2018

Ort, Datum

Unterschrift

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “*Functional characterization of a triplet deletion in the attention-deficit/hyperactivity (ADHD) candidate gene SLC5A4 (SGLT3)*“ 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 confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, Oct 8th, 2018

Place, Date

Signature