

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer)

**Beeinflussung der Expression und Lokalisation von
Glukosetransportern durch Dioxin in einer Leber- und
Muskelzelllinie**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Friederike Neukirchner
geboren am 20.06.1983 in Hildesheim

Gutachter:

Prof. Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Prof. Dr. med. Mehdi Shakibaei, Ludwig-Maximilians-Universität München

Prof. Dr. rer. nat. Bruno Christ, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Eröffnung des Promotionsverfahrens am 05.08.2010

Öffentliche Verteidigung am 27.01.2011

Referat

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) gehört zur Familie der lipophilen halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffe. Es ist eines der schädlichsten Umweltgifte. Eine bekannte Wirkung der TCDD-Intoxikation ist das *Wasting Syndrom*, ein Verlust von Körpermasse trotz ausreichender Kalorienzufuhr. Die Energiebilanz einer Zelle hängt wesentlich von dem Verhältnis der Nährstoffaufnahme, deren Metabolisierung und der Energie- bzw. Stoffabgabe ab. Glukose ist der bedeutendste Energieträger für den Stoffwechsel adulter und embryonaler Zellen. Die Aufnahme von Glukose erfolgt über Glukosetransporter (GLUT). Eine verminderte Glukoseaufnahme durch TCDD konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits an embryonalen Stammzellen gezeigt werden [1]. Dabei bewirkte TCDD eine Verringerung der Proteinmenge der diffusionsabhängigen Glukosetransporter 1 und 3 (GLUT1 und 3) und störte die subzelluläre Anordnung der GLUT.

Ziel dieser Arbeit ist es zu klären, ob diese TCDD-Wirkung auf embryonale Stammzellen und spezifische GLUT-Isoformen beschränkt ist, oder ob sie auch an differenzierten Zellen, insbesondere aus den wichtigen Organen für den Glukosestoffwechsel, wie Muskel und Leber, und deren GLUT-Isoformen zum Tragen kommt. Dazu wurden die Maus-Myoblasten C2C12 und die Ratten-Hepatomazellen MH1C1 mit 10 nM TCDD exponiert und die Expression und Lokalisation von GLUT1, 2 und 4 zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Western Blot, Immunhistochemie und subzellulärer Fraktionierung untersucht. Die Glukoseaufnahme wurde anhand der Aufnahme von 3-O-methyl-D [3H]-Glukose quantifiziert.

Die GLUT1-Expression wurde in beiden Zelllinien durch TCDD signifikant verringert. Eine deutlichere, früher eintretende und statistisch hochsignifikante Verringerung trat jedoch bei den zelltypspezifischen GLUT2 und GLUT4 nach TCDD-Inkubation auf. Die Lokalisation von GLUT1 und GLUT4 in den C2C12 veränderte sich, indem sich unter TCDD-Einfluss eine vermehrte intrazelluläre Lage zeigte. Die reduzierte GLUT-Expression korrelierte mit einer signifikanten Abnahme der Glukoseaufnahme in den MH1C1-Zellen, nicht in den C2C12-Muskelzellen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein wichtiger Mechanismus der TCDD-Toxizität die Reduzierung der Glukoseaufnahme ist. Dieser Effekt konnte sicher in verschiedenen Zellen gezeigt werden und wird durch die vorliegende Arbeit auf kultivierte Muskel- und Leberzellen erweitert. Die Hauptveränderung scheint dabei die Prozessierung der GLUT-Proteine zu sein, wobei vor allem die Expression der zelltypspezifischen GLUT-Isoformen durch TCDD unterdrückt wird.

Neukirchner, Friederike: Beeinflussung der Expression und Lokalisation von Glukosetransportern durch Dioxin in einer Leber- und Muskelzelllinie
Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 75 Seiten, 2010

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 TCDD	1
1.1.1 Struktur und Eigenschaften	1
1.1.2 Entstehung und Vorkommen in der Umwelt	1
1.1.3 Wirkung von TCDD auf den Organismus	2
1.1.4 Einfluss von TCDD auf den Metabolismus	3
1.2 Der Arylhydrocarbonrezeptor (AhR)	4
1.2.1 Definition, Vorkommen und Liganden	4
1.2.2 Funktion des AhR	5
1.2.3 AhR-Signalkaskade	5
1.2.4 Cytochrom-P450-Enzyme	5
1.2.5 Antagonisten des AhR	6
1.3 Glukosetransporter	6
1.3.1 Klassifikation	6
1.3.2 GLUT1	10
1.3.3 GLUT2	11
1.3.4 GLUT3	12
1.3.5 GLUT4	12
1.3.6 Klasse II der GLUT-Isoformen	14
1.3.7 Klasse III der GLUT-Isoformen	14
2 Zielstellung	15
3 Material und Methoden	16
3.1 Zellkultur	16
3.1.1 Kultur von C2C12-Zellen	16
3.1.2 Differenzierung der C2C12	16
3.1.3 Kultur von MH1C1-Zellen	17
3.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	17
3.1.5 Exposition der Zellen mit TCDD und DMSO	18

3.2	Genexpressionsanalyse durch Polymerase-Ketten- Reaktion (PCR)	19
3.2.1	RNA-Isolierung	19
3.2.2	RNA-Konzentrationsmessung am Spektrophotometer	20
3.2.3	DNase-Verdau	20
3.2.4	Reverse-Transkriptase (RT)-Reaktion	20
3.2.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	21
3.2.6	Real-time PCR (qPCR)	22
3.3	Proteinchemie	23
3.3.1	Proteinisolation und -quantifizierung	23
3.3.2	Western Blot	23
3.3.3	Stripping der Nylonmembran	25
3.4	Immunhistochemie und Immunfluoreszenz	25
3.5	Glukoseaufnahmemessung	28
3.6	Transfektion	28
3.7	Subzelluläre Fraktionierung	29
3.8	Statistik	31
3.9	Geräte- und Softwareverzeichnis	31
3.10	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	32
4	Ergebnisse	37
4.1	Charakterisierung der Zelllinien	37
4.1.1	GLUT-Isoformen	37
4.1.2	TCDD-Sensitivität	37
4.1.3	Expressionsanalyse von GLUT1, 4 und Aktin während der Differenzierung von C2C12	39
4.2	Proteinexpression von GLUT unter TCDD-Einfluss	39
4.2.1	GLUT1	39
4.2.2	GLUT2	40
4.2.3	GLUT4	40
4.3	GLUT-Lokalisation in TCDD-exponierten C2C12- und MH1C1-Zellen	44
4.3.1	Lokalisation von GLUT1	44

4.3.2	Lokalisation von GLUT4	44
4.3.3	Lokalisation von GLUT2	46
4.4	Glukoseaufnahme nach TCDD-Inkubation	46
5	Diskussion	51
5.1	Zellkultursysteme zur Untersuchung der TCDD-Effekte	51
5.2	Einfluss von TCDD auf die Glukoseaufnahme	52
5.3	Einfluss von TCDD auf die Proteinexpression und Lokalisation der GLUTs	53
5.3.1	GLUT1	54
5.3.2	GLUT2	54
5.3.3	GLUT4	55
5.4	Potentielle Mechanismen der TCDD-Effekte auf GLUT	56
6	Zusammenfassung	57
7	Thesen	75

Abkürzungsverzeichnis

3-OMG	3-ortho-methyl D-glukose
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
α -NF	alpha-Naphtoflavon
Abb.	Abbildung
AhR	Arylhydrocarbonrezeptor
AhRR	Arylhydrocarbonrezeptor-Repressor
ARNT	Arylhydrocarbonrezeptor <i>nuclear translocator</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
(c)DNA	Desoxyribonukleinsäure
ca.	circa
CT	<i>cycle threshold</i>
Cyp1A1	Cytochrom P450 1A1
d	Tag
DDT	Dithiothreitol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	<i>dots per minute</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCS	fötales bovines Serum (<i>fetal calf serum</i>)
GLUT	diffusionsabhängiger Glukosetransporter
h	Stunde
HMIT	H-myo-inositol-Cotransporter
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IHC	Immunhistochemie
K_m	Michaelis-Menten-Konstante

kDa	kilo-Dalton (Molekulargewicht)
KG	Körpergewicht
(m)RNA	(<i>messenger</i>)Ribonukleinsäure
min	Minute
OD	optische Dichte
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phospat buffered saline</i>)
PBST	phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
PCDD	polychlorierte Dibenzo-p-Dioxine
PCDF	polychlorierte Dibenzofurane
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Reverse Transkriptase Reaktion
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SGLT	Natrium-abhängiger Glukosetransporter (<i>sodium dependent glucose transporter</i>)
Tab.	Tabelle
TAE	Tetra-aminoethylen
TBS/TBST	<i>tris buffered saline/tris buffered saline with tween</i>
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TEF	Toxizitätsäquivalenzfaktor
TEMED	N,N,N,N-teramethylethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	über Nacht
WHO	<i>World Health Organization</i>
XRE	<i>xenobiotic response elements</i>

1 Einleitung

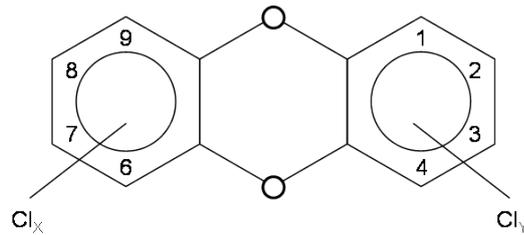
1.1 TCDD

1.1.1 Struktur und Eigenschaften

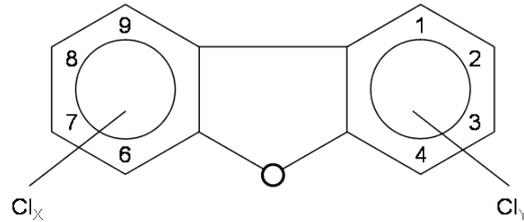
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) ist das bekannteste und toxischste Mitglied aus der Familie der Dioxine. Zu ihr gehören die polychlorierten Dibenzo-p-Dioxine (PCDD) mit 75 Kongenere und die polychlorierten Dibenzofurane (PCDF) mit 135 Kongenere. Dioxine bestehen aus zwei Gruppen zyklischer aromatischer Verbindungen (PCDDs/PCDFs), die ähnliche chemische und physikalische Eigenschaften besitzen. Die bestimmende Eigenschaft dieser Moleküle ist die Anzahl der Chloratome, die zwischen 1 und 8 variieren kann. Ihre Stellung zueinander wird durch eine systematische Bezifferung und Nummerierung wiedergegeben (s. Abb.1). Die 17 Kongenere mit Chloratomen an den Positionen 2, 3, 7 und 8 zeichnen sich durch die höchste Toxizität aus. PCDDs und PCDFs besitzen eine hohe Lipophilie und eine entsprechend geringe Wasserlöslichkeit. Ihre Löslichkeit in Wasser ist umso geringer, je höher der Chlorierungsgrad ist. Die Verbindungen sind chemisch reaktionsträge und thermostabil bis zu Temperaturen von etwa 700°C. Dioxine treten in der Umwelt stets als komplexe Gemische auf. Um das Risiko von PCDD/PCDF-Gemischen abschätzen zu können, werden Toxizitätsäquivalenzfaktoren (TEF) genutzt. TCDD als toxischster Vertreter der Dioxine besitzt einen TEF von 1. Andere Kongenere werden in Relation zur TCDD-Toxizität angegeben.

1.1.2 Entstehung und Vorkommen in der Umwelt

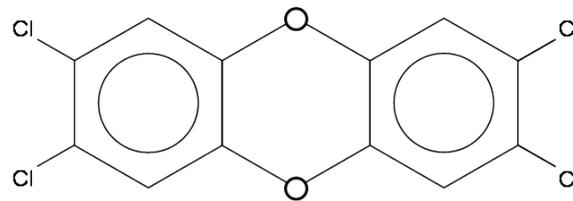
PCDDs und PCDFs entstehen als Nebenprodukte bei unvollständigen Verbrennungen in Anwesenheit von Chlorquellen. Diese Quellen können natürlichen Ursprungs sein, wie z.B. bei Vulkanausbrüchen oder Waldbränden. Der weitaus größere Anteil an Dioxinen entsteht jedoch durch industrielle Prozesse in der metallverarbeitenden Industrie, der chemischen Industrie und besonders in Müllverbrennungsanlagen. Durch Emmissionen verteilen sich die PCDD/PCDFs ubiquitär in der Umwelt. Die höchsten Konzentrationen liegen in der Erde und Sedimenten vor, da Dioxine sich intensiv an diese binden. Durch die Nahrungskette akkumulieren diese lipophilen Verbindungen im Fettgewebe von Tieren, so dass ebenfalls hohe Werte an Dioxinen in tierischen Lebensmitteln wie Fleisch, Milch oder Eier zu finden sind. Auch die menschliche Muttermilch ist mit Dioxinen belastet. Die Kontamination der Umwelt mit PCDD/PCDFs ist seit einigen Jahren aufgrund von strengen Regelungen und moderneren Verbrennungsanlagen rückläufig, was durch Untersuchungen an menschlicher Muttermilch bestätigt werden konnte [2, 3]. Geringe Konzentrationen wurden hingegen in



(a) PCDD



(b) PCDF



(c) TCDD

Abbildung 1: Strukturformeln der Dioxine PCDD, PCDF und TCDD. PCDD= Dibenzop-Dioxine, PCDF= Dibenzofurane, TCDD= 2,3,7,8- Tetrachlordibenzo-p-dioxin

Wasser und Luft gefunden [4].

1.1.3 Wirkung von TCDD auf den Organismus

Die Aufnahme von TCDD in den Körper erfolgt durch Inhalation von kontaminierter Luft, Absorption durch die Haut oder durch Nahrungsaufnahme. Dabei ist die Inkorporation von kontaminierten Lebensmitteln in den industriellen Ländern durch den Verzehr von tierischen Produkten der Hauptweg. Insbesondere Säuglinge nehmen durch die Muttermilch höhere Mengen an Dioxin (ca. 77 pg/kg KG) auf als Erwachsene (1-3 pg/kg KG) [5, 4]. Die Toleranzgrenze für die tägliche Aufnahme wurde 1998 von der WHO von 10 auf 1-4 pg/kg KG herabgesetzt, da neuere Studien an TCDD-exponierten Rhesusaffen gehäufte Endometriosen und Entwicklungsdefekte bei den Nachkommen zeigten [6]. Durch seinen lipophilen Charakter akkumuliert TCDD im Fettgewebe. Die Halbwertszeit wird beim erwachsenen Menschen mit 7-10 Jahren angegeben [7, 8].

In der Vergangenheit gab es mehrere Unfälle in Fabriken, die die umliegende Bevölkerung mit Dioxinen kontaminierten. Dabei konnten akute und chronische Effekte beobachtet werden. Sowohl die Kontamination von Reisöl mit Dioxinen 1968 in Japan (Yusho-Krankheit), als auch das Seveso-Unglück 1976, bei dem eine TCDD-Wolke durch eine

unkontrollierte exotherme Reaktion freigesetzt wurde, führten bei Teilen der Bevölkerung akut zu Chlorakne, Haut- und Augenläsionen [9, 10]. Das Seveso-Unglück ist unter wissenschaftlichen Gesichtspunkten geeignet, die Effekte von TCDD an Menschen zu untersuchen, da hier pures TCDD freigesetzt wurde und beide Geschlechter und alle Altersklassen gleichermaßen betroffen waren. In den folgenden Jahren wurden weitere Gesundheitseffekte an der Seveso-Bevölkerung durch Untersuchungen zu Spontanaborten [11], zytogenetische Abnormalitäten [12, 13], kongenitale Malformationen [14, 15], Veränderungen der Leberfunktionen und des Lipidmetabolismus [16, 17] und Einflüsse auf das Immun- und Nervensystem [18, 19, 20] beschrieben. Hierbei konnten signifikante zytogenetische Veränderungen im Abortmaterial, der Anstieg von Leberenzymen und vermehrte Nervenschäden in der Seveso-Population festgestellt werden.

Auch tierexperimentell wurden Einflüsse von TCDD auf die Reproduktion und die Entwicklung untersucht. Nager, die perinatal exponiert wurden, weisen ein vermindertes Reproduktionspotential, eine verminderte Spermienproduktion und Malformationen der Genitalien auf [21]. Bosveld und van den Berg zeigten, dass TCDD embryotoxisch bei verschiedenen Vogelarten wirkt [22]. Teratogene Effekte, die beobachtet worden sind, waren Thymusatrophie, subkutane Ödeme, Hydronephrosis, Kieferspalten, Wachstumsverzögerungen und Totgeburten. Diese Effekte sind speziesspezifisch [23, 24]. TCDD wirkt auf das Immun- und Nervensystem, indem es die humorale und zellvermittelte Immunantwort durch eine Regulierung von inflammatorischen Zytokine wie Interleukin 1 und Tumor Necrosis Factor alpha supprimiert [25]. Im Nervensystem verändert TCDD z.B. Neurotransmitterfunktionen und die Calciumhomöostase [26].

Ein weiterer Effekt von TCDD sowohl in Tierexperimenten [27, 28] als auch beim Menschen [29] ist dessen Kanzerogenität. Bei den Beteiligten des Seveso-Unfalls traten vermehrt Fälle von Rektum-, Leber- und Lungenkarzinomen, Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen und myeloischen Leukämien auf. Eine gesonderte Analyse zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen TCDD-Exposition und Brustkrebs [30]. Auch verschiedene andere Studien an Arbeitern, die TCDD exponiert waren, ließen das kanzerogene Potential dieser Verbindung erkennen [31, 32, 33, 34]. Basierend auf den verschiedenen epidemiologischen und tierexperimentellen Daten wurde TCDD 1997 von der *International Agency for Research on Cancer* (IARC) als humankanzerogen eingestuft.

1.1.4 Einfluss von TCDD auf den Metabolismus

Neben den oben genannten Folgen einer TCDD-Kontamination gab es auch Beobachtungen und Untersuchungen zu TCDD-bedingten Veränderungen im Metabolismus [35, 36, 37]. Ein

bekanntes Symptom einer TCDD-Vergiftung ist das sogenannte *Wasting Syndrom*. Dabei handelt es sich um den Verlust von Körpergewicht, der selbst durch gesicherte Nahrungszufuhr nicht gestoppt werden kann [38]. Insbesondere das Fettgewebe wird hierbei reduziert, wobei der genaue Mechanismus noch unverstanden ist. Jedoch weiß man um ein verändertes Serumlipidprofil, wie Hyperlipidämie und Hypertriglyceridämie [39, 40]. Das *Wasting Syndrom* konnte tierexperimentell bei Meerschweinchen, Mäusen, Kaninchen und Affen nachgewiesen werden [41, 42]. Beim Menschen sind Untersuchungen diesbezüglich unter anderem bei der Seveso-Bevölkerung und Soldaten der amerikanischen Air Force gemacht worden. Letztere kamen durch das Dioxin-kontaminierte Entlaubungsmittel ‘Agent Orange’ während des Vietnamkrieges mit TCDD in Kontakt. Bei den Vietnam-Veteranen, die stark dioxinbelastet waren, kam es zu einer signifikanten Zunahme von Hyperinsulinämie und Insulinresistenz und einem schnelleren Eintritt von Diabetes mellitus Typ 2 [43, 35].

Der Verlust von Körpergewicht beim *Wasting Syndrom* beruht nicht wie früher angenommen auf einer Malabsorption der Nahrungsstoffe oder einem höheren Energiebedarf [44, 45]. Verschiedene Studien belegen, dass TCDD sowohl auf der Ebene der Glukoseaufnahme in die Zelle als auch auf der Enzymebene den Metabolismus stört. Das Zusammenspiel von verminderter Glukoseaufnahme in die Zelle, verminderter Anzahl an GLUTs und verminderter Lipoproteinlipaseaktivität wird bisher als Hauptursache für das *Wasting Syndrom* angesehen [46, 47].

1.2 Der Arylhydrocarbonrezeptor (AhR)

1.2.1 Definition, Vorkommen und Liganden

Der molekulare Mechanismus der TCDD-Wirkung ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Ein möglicher Weg ist die Aktivierung des Arylhydrocarbonrezeptors (AhR) und damit die Veränderung des Expressionsprofils einzelner Zellen und Gewebe. Der AhR wurde erstmals 1976 von Poland und Mitarbeitern in Mäuselebern entdeckt [48]. Er ist ein Ligand-aktivierter Transkriptionsfaktor und gehört zur Familie der *basic-helix-loop-helix-Per-Arnt-Sim*-(bHLH-PAS-)Proteine. Der AhR kommt in allen Vertebraten vor und wird nahezu in jedem Gewebe exprimiert [49, 50]. Er wird nach Ligandbindung aktiviert. Zu seinen Zielgenen gehören die CYP1A1-Gene. Die Ligandbindungsstelle kann sowohl durch physiologische Moleküle wie Tryptamine, Bilirubin, Biliverdin, Lipoxin A4 und die Tryptophan-Derivate Indigo und Indirubin [51, 52, 53] als auch durch unphysiologische Stoffe, wie die Umweltstoffe Dibenzodioxine und -furane, polychlorierte und polybromierte Biphenyle, Benzopyren und 3-Methylcholanthren aktiviert werden. Die Verbindungen, die die höchste Affinität zum AhR besitzen, weisen auch die höchste Toxizität auf [54, 55]. Der stärkste

Ligand ist TCDD [56]. Die natürlichen Liganden haben im Vergleich zum TCDD eine geringere Affinität zum AhR. Ausgenommen davon sind die Tryptophan-Derivate Indigo und Indirubin, die eine höhere Affinität als TCDD zum AhR aufweisen [57].

1.2.2 Funktion des AhR

Neben den toxischen Effekten durch TCDD, die über den AhR vermittelt werden, spielt dieser Rezeptor auch bei physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Er ist eingebunden für zellregulatorische Signalwege wie Zellproliferation, Apoptosis und Differenzierung [58]. Anhand von Studien an AhR-*knock out* Mäusen konnte seine Wichtigkeit für die Regulation von Homöostase und körperliche Entwicklung gezeigt werden. So war die Wachstumsrate der AhR-*knock out* Mäuse signifikant vermindert. Weiter zeigten sie Defekte in der Leber- und Immunsystementwicklung sowie abnormale Strukturen der Leber- und Nierengefäße. Diese Mäuse zeigten eine geringere Fertilität und waren weniger lebensfähig [59, 60, 61, 62, 63]. Anhand der AhR-*knock out* Mäuse konnte auch gezeigt werden, dass die toxischen TCDD-Effekte über den AhR und die damit induzierten Gene vermittelt werden [63, 64, 65].

1.2.3 AhR-Signalkaskade

Ohne Ligand liegt der AhR im Zytosol in einem Komplex mit dem *Heat shock protein*90 (HSP90), einem Co-Chaperon P23 und dem *Immunophilin like Protein* XAP2 vor [66, 67]. Nach der Bindung eines Liganden an den AhR transloziert dieser in den Zellkern und bildet mit seinem Partnermolekül *Arylhydrocarbonreceptor nuclear translocator* (ARNT) ein Heterodimer [68]. AhR/ARNT binden an die *xenobiotic response elements* (XRE), die unter anderem die Induktion der Cytochrom P4501A1 (CYP1A1) Gene induzieren. Die Bindung des Heterodimers an die DNA ist phosphorylierungsabhängig [69]. Als Kompetitor wirkt der AhR-Repressor (AhRR), der immer im Zellkern liegt und auch mit ARNT dimerisiert [70]. AhRR/ARNT binden auch an die XRE-Elemente. Sie unterdrücken jedoch die Expression der Gene (s. Abb. 2).

1.2.4 Cytochrom-P450-Enzyme

Die Cytochrom-P450-Enzyme bilden eine Superfamilie von Hämproteinen. Ihren Namen haben sie von ihrem Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 450nm bekommen. Die P450-Hämproteine werden mit CYP abgekürzt, wie z.B. CYP1A1. Die erste Ziffer nennt die Genfamilie, der folgende Buchstabe die Unterfamilie und die zweite Ziffer das einzelne Enzym. Die Cytochrom-P450-Enzyme sind im endoplasmatischen Retikulum oder in den Mitochondrien lokalisiert. Sie sind an der Steroidhormon-Biosynthese, Oxidation

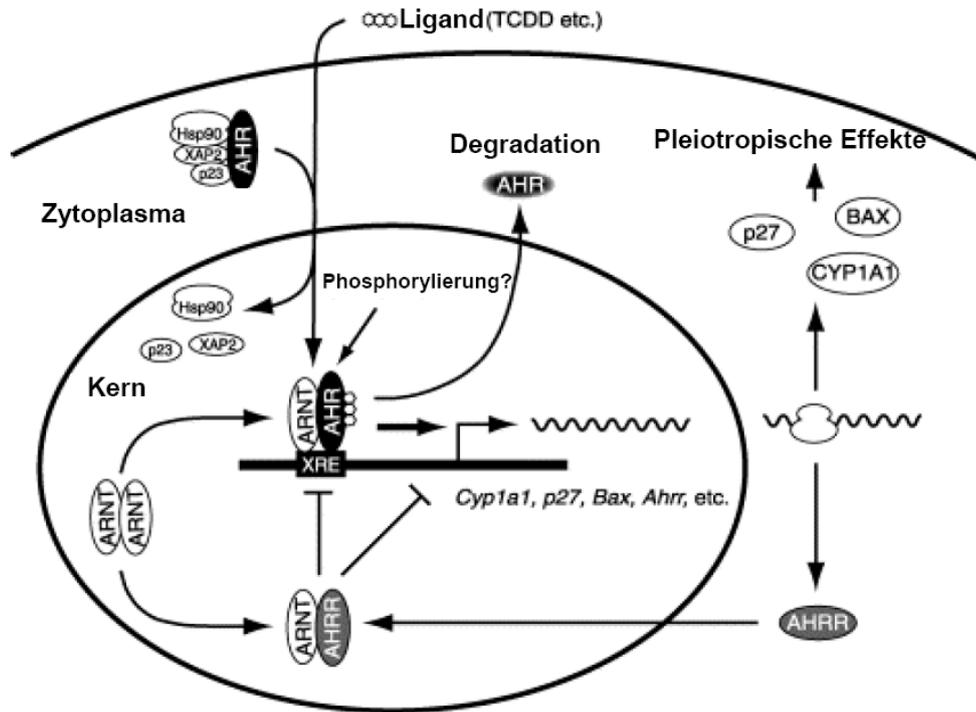


Abbildung 2: AhR-Signalkaskade und Blockierung des AhR durch AhRR (modifiziert nach [71])

ungesättigter Fettsäuren und am Stoffwechsel fettlöslicher Vitamine beteiligt. CYP1A1 wird am stärksten durch TCDD induziert und wird deshalb auch als Indikator genutzt, um eine Aktivierung der AhR-Signalkaskade durch TCDD zu verifizieren.

1.2.5 Antagonisten des AhR

Zu den Antagonisten des AhR zählen 7-Ketocholesterol, das die TCDD-Effekte *in vivo* antagonisiert [72] und einige Flavonoide [73, 74]. Zu den Flavonoiden zählt auch α -Naphthoflavon (α -NF), das in der vorliegenden Arbeit zur Klärung von TCDD-Effekten benutzt wurde. Der AhR verändert nach Bindung des α -NF seine Konformation, so dass die Erkennungssequenz des XRE und damit das Andocken an die DNA teilweise blockiert werden und damit die CYP1A1-Expression unterdrückt wird [75].

1.3 Glukosetransporter

1.3.1 Klassifikation

Glukose spielt eine zentrale Rolle im Organismus von Säugetieren. Sie steht im Mittelpunkt der Stoffwechselprozesse Glykolyse, Pentosephosphatweg, Glykogenese und Glukoneogenese. Durch sie wird Energie bereit gestellt, überschüssige Glukose gespeichert oder notwendige Glukose erzeugt, um den Blutglukosespiegel konstant zu halten, Ribosen für die Nukleotide produziert und der Elektronentransporter NADPH/H für die Biosynthese von

Fettsäuren, Cholesterin und Steroiden geliefert. Weiterhin ist Glukose ein Grundbaustein vieler Makromoleküle und Bestandteil von Proteinen (Glykoproteine) und Lipiden (Glykolipide). Die Glukoseaufnahme in die Zelle spielt dabei eine Schlüsselrolle in der Regulation und Kontrolle. Da die Plasmamembran der Zelle lipophil ist, fällt es dem Molekül Glukose schwer, diese Barriere ohne Transportmoleküle zu überwinden. Die Glukosetransporter werden in zwei strukturell und funktionell verschiedene Gruppen unterteilt: den aktiven Glukosetransporter *sodium dependent glucose transporter* (SGLT) und die diffusionsregulierten Glukoseransporter (GLUTs).

Der SGLT transportiert Glukose mit verschiedenen Affinitäten mit einem sekundär-aktiven Transportmechanismus. Die Glukose wird zusammen mit Natrium in die Zelle aufgenommen. Dies setzt eine Ausschleusung von Natrium aus der Zelle voraus, damit ein Gradient aufgebaut werden kann. Diese Ausschleusung geschieht durch die energieverbrauchende Na^+/K^+ -ATPase. Man unterscheidet 6 SGLTs. Der SGLT1 besitzt eine hohe Affinität zu Glukose und kommt in Enterozyten und dem proximalen Teil des geraden Tubulus in der Niere vor. Der SGLT2 zeigt eine geringe Affinität und wird vor allem im gebogenen Teil des proximalen Tubulus exprimiert. Eine Mutation im humanen SGLT1 führt zu einer Malabsorption von Glukose und Galaktose, die bei Säuglingen aufgrund der resultierenden Diarrhoe und Dehydratation tödlich enden kann [76].

Der Transport der Hexosen erfolgt bei den GLUTs durch erleichterte Diffusion und erfordert eine geringe Konzentration des Substrats in der Zelle, damit es dem Konzentrationsgefälle entsprechend nachfließen kann. Zu den diffusionsabhängigen Glukosetransportern werden inszwischen 13 Mitglieder gezählt, GLUT1-12 und der H^+ -myo-inositol-Cotransporter (HMIT) [77] (Tabelle 1). Bis zum Jahr 2000 waren nur die GLUTs 1-5 bekannt. Die restlichen GLUTs wurden durch Genomsequenzierung entdeckt. Da die neuen GLUTs von verschiedenen, voneinander unabhängigen Arbeitsgruppen beschrieben wurden, kam es zu einer konfusen Nomenklatur. Seit 2002 gibt es eine neue Nomenklatur, die die diffusionsabhängigen Glukosetransporter nach ihrer Sequenzhomologie in 3 Klassen einordnet. Dabei werden die Transporter 1-4 in die Klasse I, die GLUTs 5, 7, 9 und 11 zur Klasse II und GLUT6, 8, 10, 12 und der HMIT zur Klasse III gezählt [78](s. Abb. 3). Die gemeinsame Struktur der GLUTs beinhaltet 12 transmembrane Helices mit zytoplasmatischem C- und N-Terminus. Eine große intrazytoplasmatische Domäne liegt zwischen den Helices 6 und 7. Für die Substratbindung ist eine extrazytoplasmatische N-glykosolierte Domäne wichtig, die bei den GLUTs der Klassen I und II zwischen den Helices 1 und 2 und bei der Klasse III zwischen den Helices 9 und 10 liegt [79](s. Abb. 4). Die verschiedenen Iso-

formen zeigen eine unterschiedliche Substratspezifität und Transportgeschwindigkeit. Das Vorkommen der verschiedenen Isoformen ist zell- und gewebespezifisch [80]. Die Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der GLUT-Isoformen und ihr Vorkommen im Gewebe. Im Folgenden werden vor allem die Glukosetransporter der Klasse I genauer beschrieben, da sie in dieser Arbeit im Hinblick auf TCDD genauer untersucht wurden.

Tabelle 1: Übersicht über die GLUT-Isoformen in humanen Geweben [81, 77]

Trans- porter	Gewebs-Lokalisation	K_m -Werte	Biologische Funktion
GLUT1	Ubiquitär vorkommend	3 mM	Transport von Glukose über die Blut-Hirn-Schranke; genereller, basaler Glukosetransport
GLUT2	Hepatozyten, pankreatische β -Zellen, Dünndarm, Niere, V. porta, Hypothalamus	17 mM	Dünndarmabsorbtion, renale Absorbtion, pankreatische und hepatische Kontrolle des Glukosestoffwechsels, Glukosehomöostase
GLUT3	Neuronen	1.4 mM	Transport von Glukose in die Neuronen des Gehirns
GLUT4	Skelettmuskel, Herzmuskel, Fettgewebe	5 mM	Insulin-abhängiger Glukosetransport
GLUT5	Dünndarm, Niere, Skelettmuskel, Fettgewebe, Gehirn	6 mM	Transport von Fruktose
GLUT6	Gehirn, Milz, Leukozyten	5 mM	Früher auch als GLUT9 bezeichnet
GLUT7	Dünndarm, Dickdarm	Unbekannt	Wahrscheinlich ähnlich GLUT5, da im Homologie-Vergleich große Ähnlichkeit zu GLUT5
GLUT8	Testis; weniger im Skelettmuskel, Herz, Dünndarm, Gehirn, Nebenniere, Milz, Fettgewebe, Plazenta, Leber	2 mM	Hormonell regulierte Funktion im Testis (Unterdrückung durch Östrogenbehandlung)
GLUT9	Niere, Leber, Dünndarm, Plazenta, Lunge, Leukozyten	Unbekannt	Früher auch als GLUTX bezeichnet
GLUT10	Herz, Lunge, Gehirn, Leber, Skelettmuskel, Pankreas, Plazenta, Niere	0,3 mM	
GLUT11	Skelettmuskel, Herzmuskel, Gehirn, Dünndarm, Lunge, Leukozyten, Leber, Niere, Plazenta	Unbekannt	
GLUT12	Brustkrebszellen, Herz, Skelettmuskel, Fettgewebe, Prostata	Unbekannt	wahrscheinlich wichtige Funktion für die Versorgung von Krebszellen

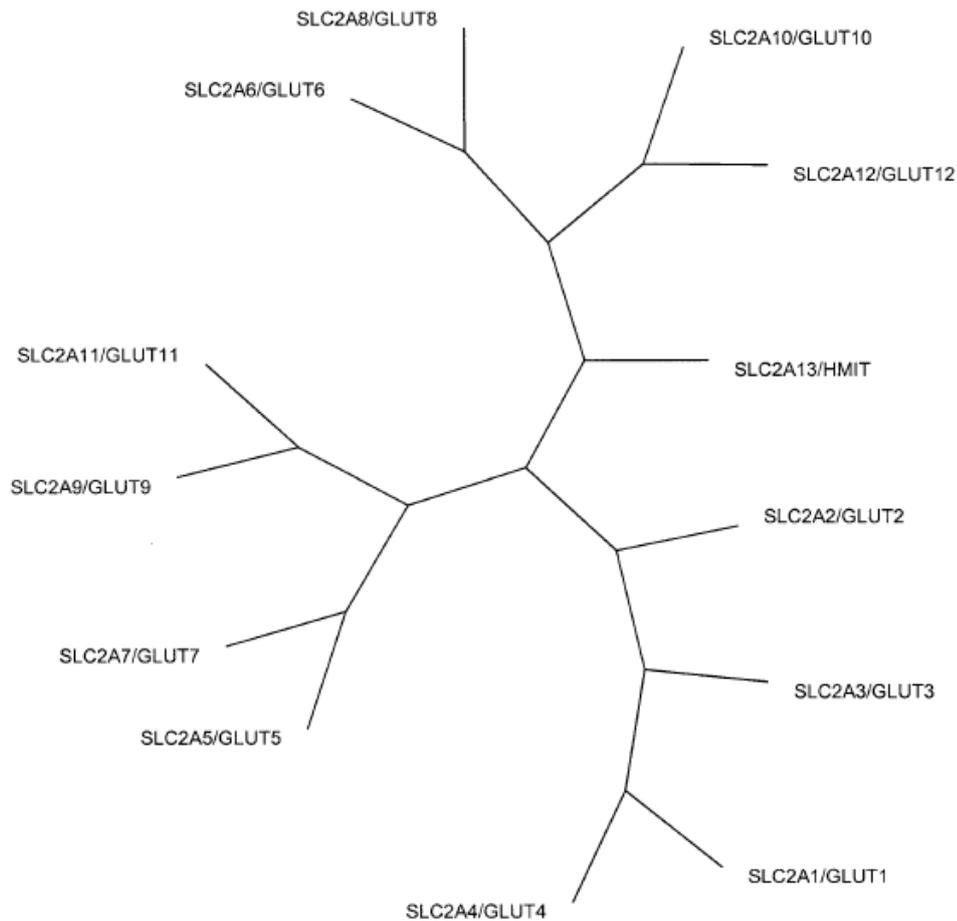


Abbildung 3: Sequenzhomologie aller GLUT-Isoformen, dargestellt als Baumdiagramm. Der Sequenzabgleich wurde mit dem Programm clustalW des EMBL European Bioinformatics Institute konstruiert. Die drei GLUT-Klassen sind gut zu erkennen: Klasse I: GLUT1-4, Klasse II: GLUT5, 7, 9 und 11 und Klasse III: GLUT6, 8, 10, 12 und H⁺-myoinositol-Cotransporter (HMIT) [77]

1.3.2 GLUT1

GLUT1 ist der erstbeschriebene diffusionsabhängige Glukosetransporter. Er wurde von Jung und Mitarbeitern 1971 in Erythrozyten entdeckt [82]. Er kommt in nahezu allen Gewebe- und Zellarten vor und stellt den basalen Glukosetransport bereit. Die Expression korreliert mit dem zellulärem Glukosemetabolismus [83] und ist in jedem Gewebe und jeder Zellart verschieden. Hypoglykämie und Ischämie steigern seine Expression [84, 85]. Er hat eine hohe Affinität zu Glukose (K_m 3 mM). Andere Substrate sind Galactose, Mannose und Glucosamine [86]. Besonders wichtig scheint der GLUT1 in der Blut-Hirn-Schranke zu sein, wo er hoch exprimiert wird (s. Abb. 5). Ein Mangel an GLUT1 geht mit einer verminderten Glukosekonzentration im Liquor einher. Klinische Symptome sind Krämpfe, verzögerte Entwicklung, Mikrocephalie und Hypotonie [87, 88].

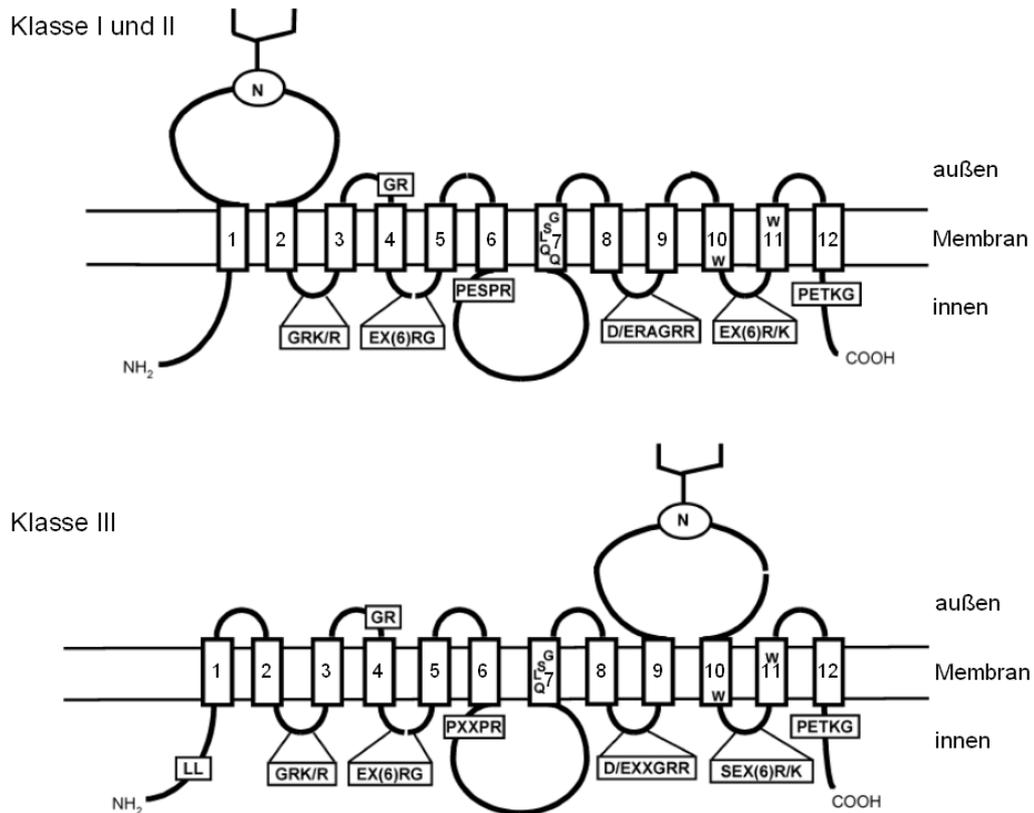


Abbildung 4: Sekundärstruktur der diffusionsabhängigen Glukosetransporter [77]

Für die Tertiärstruktur wurden 2 Modelle vorgeschlagen, die beide für die Helix 7 eine Schlüsselrolle in der Formation eines wassergefüllten Kanals vorsehen, der den Weg für die Glukose durch die Plasmamembran bildet [89, 90]. Weiterhin werden extra- und intrazelluläre Bindungsstellen für Glukose beschrieben, die bei Bindung von Glukose zu einer Konformationsänderung führen, so dass das Substrat durch die Plasmamembran gelangen kann. Auch Inhibitoren von GLUT1 benutzen diese Bindungsstellen. Cytochalasin B und Forskolin benutzen die intrazelluläre Bindungsstelle [91], HGCl, Phloretin und Phlorizin die extrazelluläre Seite [92, 93].

1.3.3 GLUT2

GLUT2 ist ein Transporter mit einer geringen Affinität für Glukose (K_m 17 mM), Galaktose (K_m 92 mM), Mannose (K_m 125 mM) und Fruktose (K_m 76 mM), aber mit einer hohen Affinität für Glucosamine (K_m 0,8 mM) [94, 86]. Aufgrund des hohen K_m -Wertes ist die Transportgeschwindigkeit der Glukose proportional zum Blutglukosewert. Er kommt in der basolateralen Membran der Enterozyten und in den Epithelien der Nieren vor, wo er zusammen mit SGLT1 und SGLT2 den transepithelialen Transport von Glukose gewährleistet [95, 96]. Weiterhin kommt er in den sinusoidalen Membranen von Hepatozyten vor, wo er in die Aufnahme und Abgabe von Glukose in/aus der Zelle beteiligt ist. In

der Betazelle des Pankreas ist er der Glukosesensor. Er reguliert den ersten Schritt in der glukosestimulierten Insulinsekretion, bei dem die eingeströmte Glukose in der Glykolyse zu Pyruvat umgewandelt wird und ATP entsteht [97, 98]. Der erhöhte ATP-Spiegel führt zu einer Abnahme der K^+ -Permeabilität eines ATP-sensitiven Kalium-Kanalproteins. Es kommt zu einer Senkung des Membranpotentials bis zur Depolarisation, die nun spannungsabhängige Calcium-Kanäle öffnet. Die Erhöhung des intrazellulären Calciums führt zu einer Exozytose von Insulingranula [99](s. Abb. 5). Die Expression von GLUT2 steigert sich bei Hyperglykämie und verringert sich bei Hyperinsulinämie [100]. Folgerichtig besitzt der GLUT2 eine wichtige Rolle in der Glukosehomöostase des Organismus. Sein Vorkommen ist in weiteren glukosesensitiven Organen wie dem Hypothalamus und dem Hirnstamm beschrieben, die in die Nahrungsaufnahme, die Aufnahme von Glukose in periphere Gewebe und in der Gegenregulierung involviert sind [101, 102]. Pathologische Veränderungen der GLUT2-Expression stehen im Zusammenhang mit der Stoffwechselerkrankung Diabetes mellitus. GLUT2 *-/- knock out* Mäuse entwickeln früh einen Diabetes, der durch die beeinträchtigte glukosestimulierte Insulinsekretion und einer abnormalen postnatalen Entwicklung der Inselzellen im Pankreas bedingt ist [103]. Beim Menschen ist der genetische Defekt des GLUT2 als Fanconi-Bickel-Syndrom bekannt. Diese seltene, autosomal-rezessive Erkrankung führt durch Glykogenakkumulation zu einer Vergrößerung von Leber und Niere, tubulärer Nephropathie, Glukose- und Galaktoseintoleranz und Nüchternhypoglykämie [104].

1.3.4 GLUT3

GLUT3 ist ein hochaffiner Glukosetransporter (K_m 1,4mM), der ebenfalls für die Substrate Galactose, Mannose, Maltose und Xylose eine hohe Affinität besitzt. Er kann durch Cytochalasin B, Phlorizin und Phloretin inhibiert werden [105]. Er konnte im Gehirn, Testis und langsamen Muskelfasern nachgewiesen werden [106, 107]. Bei Mäusen und Ratten wurde die mRNA nur im Gehirn nachgewiesen [108]. Der GLUT3 ist zusammen mit GLUT1 für den Transport von Glukose durch die Blut-Hirn-Schranke wichtig. Dabei wickelt GLUT1 den Transport von den Kapillaren und durch den Astrozyten ab, während die Aufnahme von Glukose in die Neuronen durch GLUT3 erfolgt (s. Abb. 5).

1.3.5 GLUT4

GLUT4 besitzt mit einer K_m von 5mM eine hohe Affinität zu Glukose. Auch er kann durch Cytochalasin B, Phloretin und Phlorizin inhibiert werden. Vor einigen Jahren wurde auch der Protease-Inhibitor Indinavir als nicht-kompetitiver Inhibitor erkannt. GLUT4 ist der Hauptglukosetransporter in braunem und weißem Fettgewebe, Skelett- und Herz-

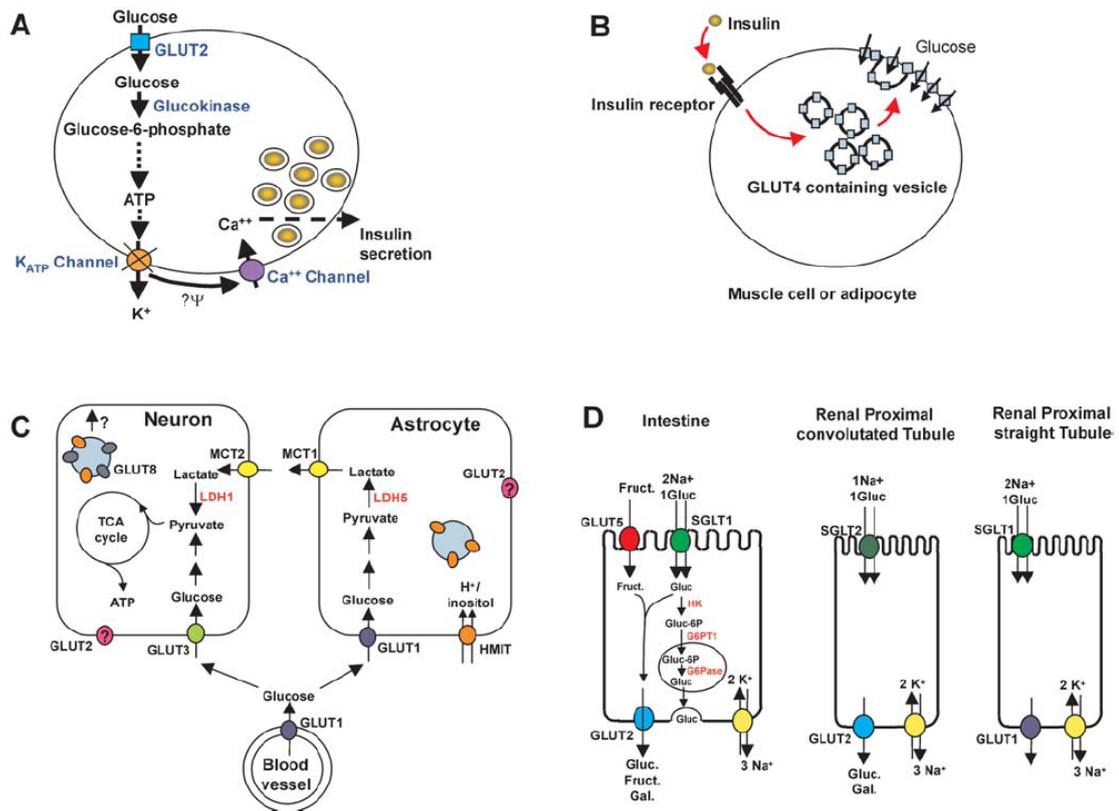


Abbildung 5: Signalwege der GLUTs [77]

muskulatur. Er ist insulin sensitiv. Bei niedrigem Plasmainsulinspiegel liegt der GLUT4 in intrazellulären Vesikeln vor, die in zwei verschiedene Kompartimente geteilt sind. Das eine Kompartiment recycelt die GLUTs aus der Plasmamembran, das andere reagiert auf Insulin [109]. Nach der Bindung von Insulin an die Plasmamembran translozieren die GLUTs aus diesem Kompartiment zur Zelloberfläche (s. Abb. 5). Dadurch steigt der Glukosetransport in die Zelle [110]. Andere Stimuli für eine Translokation sind körperliche Aktivität, Kontraktion und Hypoxie [111, 112, 113, 114]. Die genaue Signalkaskade, wie Insulin die Glukoseaufnahme stimuliert, ist noch nicht komplett verstanden, man weiß aber, dass eine Störung in dieser Kaskade ein Grund für eine Diabetes mellitus-Erkrankung sein kann. Untersuchungen mit +/- *knock out* Mäusen für GLUT4, die eine verringerte Expression des Transporters in Fett- und Muskelgewebe hatten, zeigten eine erhöhte Serumglukose, erhöhte Insulinwerte, reduzierte Glukoseaufnahme in die Muskeln, Hypertonie und Leber- und Herzveränderungen, die ähnlich waren wie bei menschlichen Diabetikern [115]. Die GLUT4 -/- *knock out* Mäuse waren kleiner, hatten erweiterte Herzen und eine kürzere Lebensspanne. Obwohl sie nach der Mahlzeit normoglykämisch waren, wiesen sie eine Hyperinsulinämie und eine beeinträchtigte Insulintoleranz auf [116]. Diese Ergebnisse zeigen, dass GLUT4 eine zentrale Stellung in der Glukosehomöostase einnimmt.

1.3.6 Klasse II der GLUT-Isoformen

GLUT5 ist ein Fruktosetransporter, der vor allem in der apikalen Membran der Enterozyten im Jejunum vorkommt. Dort ist er für den größten Anteil der Fruktoseabsorption verantwortlich [117]. Seine mRNA wurde außerdem in geringen Mengen in der humanen Niere, im Skelettmuskel, im Fettgewebe und im Gehirn in der Blut-Hirn-Schranke und Mikroglia gefunden [118]. Im Muskelgewebe wird über GLUT5 Fruktose für Glykolyse und Glukogenese unabhängig von GLUT1 und 4 benutzt [119].

GLUT7 wurde durch einen Homologie-Vergleich gefunden und besitzt die größte Ähnlichkeit mit GLUT5 [120]. Sein Protein wird in der apikalen Membran des Dün- und Dickdarms exprimiert und hat eine hohe Affinität für Glukose und Fruktose. GLUT7-mRNA wurde außerdem in Hoden und Prostata gefunden [121].

Die mRNA von GLUT9 wurde bislang in der Niere und der Leber und in geringen Mengen auch im Dünndarm, Plazenta, Lunge und Leukozyten gefunden [122]. Eine Mutation des GLUT9 soll eine renale Hypouricämie aufgrund verminderter Urat-Reabsorption bedingen [123].

GLUT11 kommt in drei Splice-Varianten vor, die sich durch die N-terminalen Aminosäuren unterscheiden (7,14 oder 10 AS)[124, 125, 126]. Je nach Splice-Form kommt die GLUT11-mRNA in Skellet- und Herzmuskel, Gehirn, Dünndarm, Lunge, Leukozyten, Leber, Niere und Plazenta vor.

1.3.7 Klasse III der GLUT-Isoformen

GLUT6, der frühere GLUT9, besitzt nur eine geringe Affinität für Glukose. Seine mRNA wurde bislang nur im Gehirn, der Milz und Leukozyten gefunden. Eine Proteinexpression konnte bislang nicht gezeigt werden [127].

GLUT8 mRNA ist weit verbreitet im Gehirn (Cerebellum, Hirnstamm, Hippocampus und Hypothalamus), Nebenniere, Milz, Fettgewebe, Plazenta, Leber und Skelett- und Herzmuskelgewebe. Am größten ist die Expression jedoch im Testis, wo seine Menge von zirkulierenden Gonadotropinen abhängt [128, 129, 130, 131]. GLUT8 kommt bei Mäusen und Menschen im Akrosom der Spermien vor [132]. Eine insulinstimulierte Translokation des GLUT8, wie bei Blastozysten postuliert [129] konnte in Adipozyten und insulinabhängigen Neuroblastzellen nicht bestätigt werden [129, 133]. In der Leber kommt der GLUT8 ähnlich wie GLUT1 vor allem in Hepatozyten vor, die in der Nähe einer Vene liegen und hat damit wahrscheinlich eine Funktion im Substrattransport der Glykolyse [134]. Weiterhin scheint der GLUT8 vor allem für den Glukosetransport zwischen den intrazellulären Membranen wichtig zu sein, da er sowohl in Endosomen, Lysosomen und als auch im endoplasmatischen

Retikulum vorkommt [133].

GLUT 10 besitzt eine hohe Affinität zu Glukose und die größte Ähnlichkeit zu GLUT8. Hohe mRNA-Werte gibt es in der Leber und im Pankreas. Geringere Mengen sind im Herz, Skelettmuskel, Plazenta, Niere, Lunge und Gehirn detektierbar. Der GLUT10 liegt in der Diabetes Typ 2-Region des humanen Chromosoms 20.q12-13.1 [135, 136].

Der Glukosetransporter 12 wurde zuerst in den Brustkrebszellen MCF-7 identifiziert [137]. Er wird außerdem in Herz, Skelettmuskel, Fettgewebe, Prostata und in der laktierenden Brustdrüse von Ratten exprimiert [138]. Rogers und Mitarbeiter zeigten, dass der GLUT12 hauptsächlich Glukose transportiert und in verschiedenen Tumoren stark exprimiert wird. Dies impliziert eine Funktion der Versorgung von Krebszellen mit einem erhöhten Glukosebedarf [139, 140].

Der HMIT ist ein Transporter, der spezifisch myo-Inositol zusammen mit H^+ transportiert. Mit abnehmenden extrazellulärem pH-Wert nimmt seine Aktivität zu. Er wird in hohen Mengen im Gehirn und in geringen Mengen im Fettgewebe, im Nebenhoden und in den Nieren exprimiert.

2 Zielstellung

TCDD ist das toxischste Mitglied aus der Familie der Dioxine. Es ist bekannt, dass dieses Dioxin schädliche Einflüsse auf den Glukosemetabolismus hat. Ein gut beschriebener Effekt des TCDD ist das *Wasting Syndrom*, bei dem es zu einer ungewollten Gewichtsabnahme insbesondere durch den Verlust von Fettgewebe kommt. Eine mögliche Ursache für dieses Phänomen ist die Störung der zellulären Glukoseaufnahme. In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe konnte in der embryonalen Karzinomzelllinie P-19 eine solche verringerte Glukoseaufnahme nach TCDD-Inkubation gezeigt werden. Dabei korrelierte die verminderte Glukoseaufnahme mit einer Abnahme des GLUT-Proteins besonders der Isoformen 1 und 3. Weiterhin konnte zum ersten Mal eine veränderte subzelluläre Lokalisation der GLUTs unter TCDD-Einfluss beobachtet werden. Diese TCDD-Effekte wurden über die AhR-Signalkaskade vermittelt.

Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob die oben beschriebenen Effekte auch an adulten Zellen und anderen GLUT-Isoformen zu erkennen sind und ob sie über den AhR vermittelt werden. Dazu wurden zwei Zelllinien ausgewählt, die aus zwei für den Glukosestoffwechsel wichtigen Organen stammen, die Myoblasten C2C12, die zu Myotuben differenzieren können, und die Hepatomazellen MH1C1. Sie wurden zwei Tage lang mit 10 nM TCDD behandelt. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit dem Lösungsmittel DMSO versetzt wurden. Nach 2, 5, 7 und 10 Kulturtagen wurden die Proben gewonnen. Die

Glukoseaufnahme in die Zellen wurde durch Inkorporation von 3-O-Methyl-D-[3H]Glukose analysiert. Durch Western Blot-Analysen wurde der Proteingehalt und mittels Immunhistochemie und -fluoreszenz die Lokalisation der GLUTs untersucht. Anhand der Transfektion von XRE-Elementen und der Messung der Luziferaseaktivität konnte die Ansprechbarkeit beider Zelllinien auf TCDD geprüft werden.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden Maus-Myoblasten der Zelllinie C2C12 [141] und Ratten-Hepatomazellen der Zelllinie MH1C1 [142] verwendet.

3.1.1 Kultur von C2C12-Zellen

Die Zellen der Linie C2C12 sind Myoblasten der Maus. C2C12-Zellen entstammen einer primären Zelllinie skelettaler Myoblasten und stellen Muskel-Vorläuferzellen dar. Sie wurden künstlich immortalisiert und damit zu einer stabilen Zelllinie umgewandelt. Um eine Differenzierung der Zellen zu induzieren, werden konfluente (dicht-gewachsene) Kulturen in ein so genanntes Hunger-Medium gebracht, welches anstelle von 20% fötalem Rinderserum (FCS) lediglich 10% Pferdeserum enthält. Diese Kulturbedingungen induzieren in den Zellen vielfältige strukturelle Veränderungen, welche schließlich zu einer Fusion der Myoblasten und zur Ausbildung von lang gestreckten Myotuben führen. Diese Myotuben sind vielkernig. Ein gewisser Anteil der Myotuben entwickelt die für Skelettmuskelzellen typische quergestreifte Anordnung der kontraktilen Elemente (Querstreifung) (s. Abb 6).

Die C2C12 in vitro Kultur erfolgte auf 90 mm Zellkulturschalen in *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM), zu dem 20% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin hinzugefügt wurde. Die Zellen wurden in Intervallen von 36h im Verhältnis 1:3 passagiert. Dafür wurden die Zellen mit 2-3 ml warmen PBS gewaschen und mit warmen 2 %igem Trypsin/0,02 %igem EDTA, welches 5 Minuten bei 37°C einwirkte, abgelöst. Der Ablösevorgang wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Anschließend wurden die Zellen aufgeteilt und in neue Kulturschalen mit insgesamt 7 ml frischem warmen Medium überführt. Das Wachstum der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 20% O₂, 5 % CO₂ und gesättigter Atmosphäre.

3.1.2 Differenzierung der C2C12

Bei den C2C12-Zellen handelt es sich um undifferenzierte Myoblasten. Dieser Zustand wird durch die hohe Prozentigkeit des FCS (20%) und das kontinuierliche Passagieren, welches eine Konfluenz der Zellen verhindert, erhalten. Um die Differenzierung der C2C12-

Myoblasten in Myotuben zu induzieren, wird ein Mangelmedium eingesetzt. Dazu wurde im Medium das FCS durch 10% Pferdeserum ersetzt. Für die 10tägige Differenzierung wurden die Zellen dünn ausgesät und nicht passagiert. Der Mediumwechsel erfolgte jeden 2. Tag (Differenzierung s. Abb. 6, B-D).

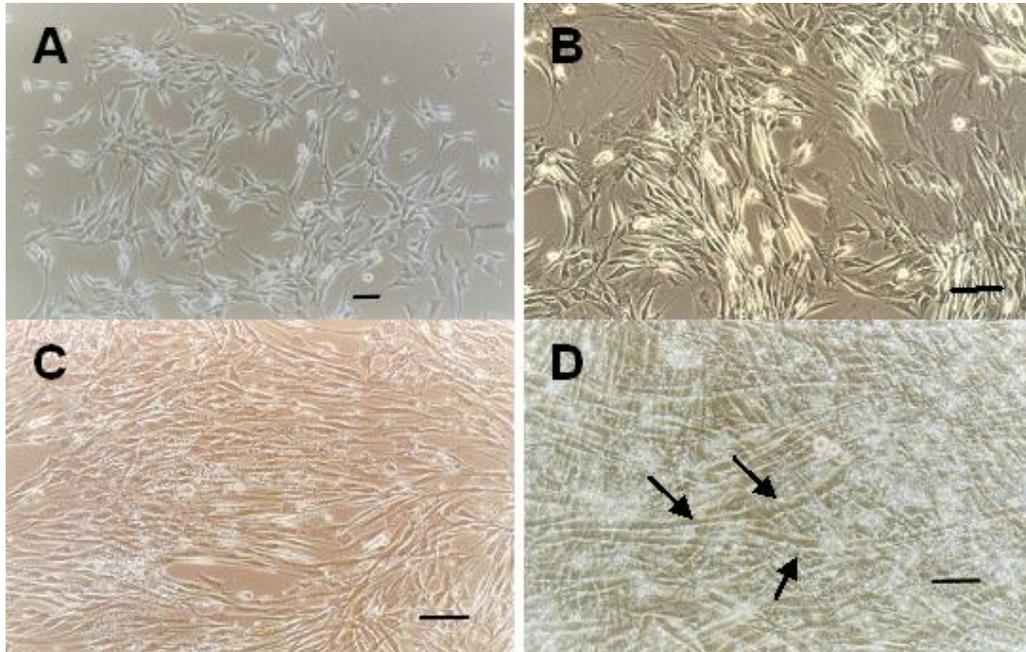


Abbildung 6: Phasenkontrastbilder von C2C12-Zellen in verschiedenen Stadien der Differenzierung . A) Myoblasten, undifferenzierte Zellen, 100fache Vergrößerung, Maßstab $\cong 20\mu\text{m}$. Differenzierte Zellen an B) Tag 5, C) Tag 7 und D) Tag 10. Die Pfeile (\rightarrow) in (D) markieren zwei Myotuben. Maßstab in B-D $\cong 20\mu\text{m}$, 200fache Vergrößerung

3.1.3 Kultur von MH1C1-Zellen

Die MH1C1 sind Hepatomazellen der Ratte. Sie wurden in 5 ml Zellkulturflaschen in *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) mit 10% FCS 2 mM L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 20% O₂, 5% CO₂ und gesättigter Atmosphäre im Brutschrank kultiviert. Die Zellen wurden zweimal pro Woche im Verhältnis 1:3 passagiert. Abgelöst wurden sie mit 2,5%igem Trypsin für 5 Minuten bei 37°C. Der Ablösevorgang wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Danach wurden die Zellen in neue Flaschen mit je 5 ml frischem warmen Medium überführt. Die MH1C1 zeigen mikroskopisch ein Wachstum in inselartigen Verbänden (s.Abb. 7).

3.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurde das Medium abpipettiert und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen wie oben beschrieben trypsiniert und in 5 ml Medium aufgenommen und bei 1000 rpm 5 Minuten abzentrifugiert. Danach wurde das Medium



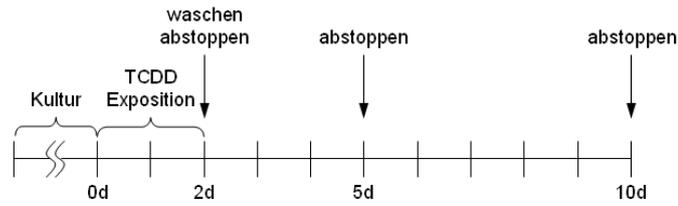
Abbildung 7: Phasenkontrastbild von Ratten-Hepatomazellen der Linie MH1C1. Die Zellen wachsen in inselartigen Verbänden zusammen. Maßstab $\cong 20\mu m$

vorsichtig abgesaugt und das entstandene Zellpellet in 1 ml Einfriermedium (Kulturmedium + 8% DMSO) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde nun in ein 2 ml Cryo-Röhrchen überführt und in einen Cryo-Container gestellt, wo sie bei $-80^{\circ}C$ über Nacht abkühlte. Die dauerhafte Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Wenn Zellen aufgetaut wurden, wurde das Cryo-Röhrchen für einige Minuten in ein $37^{\circ}C$ warmes Wasserbad gehalten. Die nun aufgetauten Zellen wurden mit 10 ml warmen Medium in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (1000 rpm, 5 min). Das Medium wurde abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium gelöst und auf die Zellkulturschale bzw. -flasche verteilt.

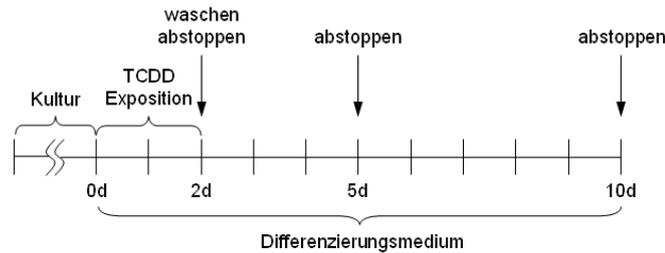
3.1.5 Exposition der Zellen mit TCDD und DMSO

Für die Versuche wurden MH1C1- und undifferenzierte C2C12-Zellen für 48 h mit 10 nM TCDD inkubiert. Das TCDD wurde wie folgt verdünnt und eingesetzt. Die Stammlösung von 1,55 mM TCDD, in DMSO (100%) gelöst, wurde in einem Verhältnis von 1:1000 mit dem verwendeten Medium vorverdünnt. Pro 1 ml Kulturmedium wurden dann 6,5 μl der 1:1000 TCDD-Verdünnung eingemischt und für die Zellkultur eingesetzt. Nach 48h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in frischem Medium aufgenommen. Die Proben wurden nach 2, 5, 7 und 10 Tagen abgestoppt. Diese Zeitpunkte wurden aufgrund von früheren Studien und der Vergleichbarkeit der experimentellen Ansätze ausgewählt [1, 143].

Da das TCDD in DMSO gelöst ist, wurden entsprechende Lösungsmittelkontrollen (Kontrollen) mitgeführt. Dafür wurden die Zellen mit der entsprechenden Menge DMSO versetzt und gleich den TCDD-exponierten Versuchsgruppen gehandhabt (s. Abb. 8).



(a) MH1C1 und C2C12 undifferenziert



(b) C2C12 differenziert

Abbildung 8: Kulturschemata für angegebene Zelllinien

3.2 Genexpressionsanalyse durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

3.2.1 RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend trypsinisiert (siehe 3.1.1 und 3.1.2). Anschließend wurde 1 ml PBS hinzugegeben und die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt, welches 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert wurde. Das entstandene Zellpellet wurde in 800 μ l Lysispuffer D aufgelöst und bei -80°C eingefroren. Die eingefrorenen Proben wurden auf Eis aufgetaut. Die Zellen wurden mit Einwegspritzen durch mehrmaliges Aufziehen homogenisiert. Anschließend wurden schrittweise 50 μ l 2 M Natriumacetat pH 4,0, 500 μ l Phenol und 100 μ l Chloroform hinzugegeben. Zwischen diesen Schritten wurden die Proben gut gemischt und schließlich 20 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Phasentrennung durch eine 15 minütige Zentrifugation in der Heraeus Biofuge 28RS bei 4°C bei 13000 rpm. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 500 μ l Isopropanol und Zentrifugation bei 4°C mit 13000 rpm für 30 min ausgefällt. Der Überstand wurde entfernt und die RNA zwei mal mit jeweils 1ml kalten 70%igen Ethanol gewaschen und bei 13000 rpm für 15 min zentrifugiert. Das nun vorliegende RNA-Pellet wurde luftgetrocknet und in 50 μ l DEPC Wasser resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C . Zur visuellen Kontrolle der RNA-Qualität wurden 1 μ g RNA auf ein 1,2 %iges Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in einer horizontalen Gelkammer mit 1 x TAE-Puffer.

Lysispuffer D	
Guanidiniumthiocyanat	4 M
Mercaptoethanol	100 mM
Natriumcitrat	25 mM
Natriumlaurosylsarcosinat	17 mM

3.2.2 RNA-Konzentrationsmessung am Spektrophotometer

Die RNA wurde 1:20 mit DEPC-Wasser verdünnt. Die Messung der optischen Dichte (OD) erfolgte bei 260 nm und 280 nm; 1 OD₂₆₀ entspricht der Konzentration 40 µg/ml RNA. Der Reinheitsfaktor $f = \text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ sollte zwischen 1,6 und 1,8 liegen.

3.2.3 DNase-Verdau

Folgender Ansatz wurde auf Eis pipettiert und anschließend für 1 min bei 13000 rpm bei 4°C abzentrifugiert:

3 M Natriumacetat pH 5,2	3,0 µl
0,1 M Magnesiumsulfat	4,5 µl
RNA (max. 50 µg)	x µl
DNase (1U pro µg RNA)	1,5 µl
RNase-Inhibitor	1,0 µl

Das Reaktionsgefäß wurde dann für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert, danach wurde die DNase für 10 min bei 75°C im Wasserbad hitzeinaktiviert. Die RNA-Qualität nach dem Verdau wurde überprüft, indem 1 µg RNA auf ein 1,2%iges Agarosegel aufgetragen wurde.

Agarosegel (1,2-1,8%ig)	
Agarose	1,2-1,8 g
TAE-Puffer (1x)	100 ml
Ethidiumbromid (10mg/ml)	1 µl

10x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA) (pH 8,0)	
Tris-Base	242 g
Eisessig	57,1 ml
EDTA (0,5M, pH 8,0)	100 ml
<i>Aqua dest.</i>	<i>ad 5 l</i>

3.2.4 Reverse-Transkriptase (RT)-Reaktion

Für die Reverse-Transkriptase-Reaktion wurden je 3 µg RNA eingesetzt. Zu der RNA wurden 1 µl Randomprimer hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde mit DEPC-Wasser auf 12 µl aufgefüllt, abzentrifugiert und für 10 min im Thermocycler bei 70°C inkubiert. Gleichzeitig wurde auf Eis der Reaktionsmix pipettiert:

5x Reaktionspuffer	4 μ l
0,1M DTT	2 μ l
10mM dNTP	1 μ l
Superscript II (200U/ μ l)	1 μ l

Zu jeder Probe wurden 8 μ l vom Mastermix hinzugegeben, gemischt und im Thermocycler bei folgendem Programm inkubiert: 10 min 22°C, 50 min 42°C, 15 min 70°C, 4°C Pause

3.2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für die PCR wurde der Ansatz auf Eis vorbereitet:

10 x PCR Puffer	5 μ l
50 mM Magnesiumchlorid	1,5 μ l
10 mM dNTP-Mix	1 μ l
25 μ M Primer-Mix	1 μ l
cDNA	x μ l
Taq DNA Polymerase	0,2 μ l
<i>Aqua dest.</i>	<i>ad</i> 50 μ l

Die Proben wurden abzentrifugiert, mit Mineralöl überschichtet und bei folgendem Programm in den Thermocycler gestellt:

3 min	94°C	DNA-Denaturierung
40 Zyklen	1 min 94°C	DNA-Denaturierung
	1 min 60°C	Primer-Anlagerung
	1 min 72°C	Elongation
10 min	72°C	Endelongation
Pause	4°C	Kühlung

Zur visuellen Kontrolle der PCR-Produkte wurden 20 μ l DNA-Probe mit 4 μ l Lade-puffer versetzt und auf ein 1,8 %iges Agarosegel aufgetragen. Für die Größenbestimmung wurde ein DNA-Marker eingesetzt. Nach der Auftrennung wurden die PCR-Produkte unter UV-Licht ausgewertet und mit der Bio 1d Software dokumentiert.

PCR Primer:

Tabelle 2: Sequenzen und Länge des amplifizierten PCR-Produktes der verwendeten Oligonucleotide

Name	Sequenz (5'— 3')	Produktlänge Bp
β-Aktin	F:CTACAATGAGCTGCGTGTGG R:TAGCTCTTCTCCAGGGAGGA	500
GLUT1	F:TGTGTACTGCGGCCTGACTACTG R:AACAGCTCCAAGATGGTGACCTTC	399
GLUT2	F:TTCGGCTATGACATCGGTGTG R:AGCTGAGGCCAGCAATCTGAC	555
GLUT3	F:GTCAACTTGCTGGCCATCATTG R:TGAGACAGCTGGAGGACAATGGp	551
GLUT4	F:GTGGGTTGTGGCAGTGAGTC R:AAGATGGCCACGGAGAGAG	416
GLUT8	F:GTCGGGTGTGATCATGGTGTTTC R:TCTGTCATCGTCCCTCGAAATG	464

3.2.6 Real-time PCR (qPCR)

Die Methode der Real-time PCR wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um die GLUT1-, GLUT4- und Aktin-Transkriptmengen während der Differenzierung der C2C12 zu quantifizieren. Es wurde ein 20 µl Ansatz des Sybr Green 2 x Mastermix (Applied Biosystems) für die Real-time PCR benutzt. Die Real-time PCR lief bei folgendem Programm:

2 min	50°C	Initialisierung
10 min	95°C	Initialisierung
40 Zyklen	15 sec 95°C	Denaturierung
	60 sec 60°C	Anlagerung/Elongation

Die Quantifizierung wurde nach der $\Delta\Delta CT$ (*cycle threshold*)-Methode berechnet. Der CT-Wert beschreibt die Zyklenzahl, bei der das Fluoreszenzsignal der PCR-Probe sich mit dem festgelegten Schwellwert (*threshold*) schneidet. Der Schwellwert wird in den Bereich der Fluoreszenzintensität gelegt, wo die PCR-Reaktion der einzelnen Proben exponentiell verläuft. Zur Normalisierung der cDNA-Mengen wurde 18S-RNA als Standard mitgeführt. Um zu gewährleisten, daß die PCR Reaktionen für Aktin, GLUT1, GLUT4 und 18S-RNA mit der gleichen Effizienz erfolgen, wurden Verdünnungen einer cDNA eingesetzt und Standardkurven für die einzelnen PCR-Primer erstellt. Der lineare Anstieg bei einer Auftragung des Logarithmus der cDNA-Menge gegen den CT-Wert lag bei allen PCR-Primern ähnlich, was einen Vergleich der PCR-Reaktionen mit der $\Delta\Delta CT$ -Methode ermöglichte.

Alle Real-time PCR-Produkte wurden mittels Analyse der Schmelzpunktkurve und auf einem Agarosegel überprüft. Die Identität der amplifizierten DNA-Produkte wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Tabelle 3: Sequenzen und Produktlänge der verwendeten qPCR-Primer

Name	Sequenz (5'— 3')	Produktlänge Bp
Real 18S	F:AGAAACGGCTACCACATCCAA R:CCTGTATTGTTATTTTCGTCACTACCT	91
Real GLUT4	F:TGACGCACTAGCTGAGCTGAA R:AGGAGCTGGAGCAAGGACATT	75
Real GLUT1	F:CCAGCTGGGAATCGTCGTT R:CAAGTCTGCATTGCCCATGAT	76
Real β-Aktin	F:TGTGATGGTGGGAATGGGTCAGAA R:TGTGGTGCCAGATCTTCTCCATGT	112

3.3 Proteinchemie

3.3.1 Proteinisolation und -quantifizierung

Für die Proteinisolation aus Zellen wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellspatel mechanisch abgelöst und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100 µl RIPA-Puffer aufgelöst. Ggf. wurden die Proben bis zum Proteinauflschluss bei -80°C gelagert. Für die Proteinisolation wurden die Proben auf Eis aufgetaut und mit einer Spritze (1 ml, Omnifix) homogenisiert. Dann wurde zu jeder Probe 2 µl Proteinkinase-Inhibitor- und 2 µl Phosphatase-Inhibitor-Cocktail hinzugegeben. Nach dem Mischen inkubierten die Proben 30 min auf Eis und wurden danach bei 4°C mit 13000 rpm für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Die Proteinmenge wurde mit dem Bradford-Reagenz in einer 3fach Bestimmung ermittelt. Dazu wurde 1 µl Proteinlösung in 799 µl *Aqua dest.* gelöst und anschließend 200 µl Bradford-Reagenz (Bio-rad) dazugegeben. Dieser Ansatz wurde gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um anschließend die Absorption bei 595 nm gegen einen Leerwert (800 µl Wasser+200 µl Bradford-Reagenz) zu messen. Die Proteinmenge wurde anhand einer Eichkurve berechnet.

RIPA-Puffer	
5x PBS	20 ml
Igepal Ca-630	1 ml
10x SDS	100 µl
Natrium-Deoxycholat	0,5 g

3.3.2 Western Blot

Bei der Western Blot-Methode werden Proteine gelelektrophoretisch separiert und auf einer Membran immobilisiert. Auf der Membran sind die Proteine durch spezifische Antikörper

detektierbar. Anhand mitgeführter Marker wird das Molekulargewicht und durch den Abgleich mit einem Standardprotein auch die relative Menge des Proteins ermittelt.

Für den Western Blot wurden 40 µg Protein pro Probe eingesetzt, die mit je 10 µl 4x Stopp-Puffer und 5 µl DTT versetzt und auf insgesamt 40 µl Volumen mit *Aqua dest.* aufgefüllt wurden. Die Proben wurden für 10 min bei 70°C im Wasserbad denaturiert. Danach erfolgte die Auftragung auf ein 12 %iges SDS-Gel. Die Separation erfolgte bei ca. 120 V im Sammelgel und bei 180 V im Trenngel für insgesamt 2 h in einer NOVEX-Gelkammer gepuffert mit 1 x Lämmli-Puffer. Die Proteingröße konnte anhand der Proteinleiter *Page Ruler Prest. Prot. Ladder* der Firma Fermentas bestimmt werden. Nach dem Lauf wurden die Proteine des Trenngels auf eine Nylonmembran übertragen. Dazu wurde die Biometra Blot-Apparatur bei 10°C für 2 h bei 150 mA benutzt. Der Aufbau der Blottinganlage ist in Abbildung 9 schematisch dargestellt.

12%iges SDS Gel		
	Trenngel	Sammelgel
Wasser	3,3 ml	2,7 ml
Acrylamid 30%	4,0 ml	0,67 ml
Tris/HCL 1,5M pH 8,8	2,5 ml	—
Tris/HCL 1M pH 6,8	—	0,5 ml
SDS 10%	0,1 ml	0,04 ml
Ammoniumpersulfat 10%	0,1 ml	0,04 ml
TEMED	0,010 ml	0,010 ml

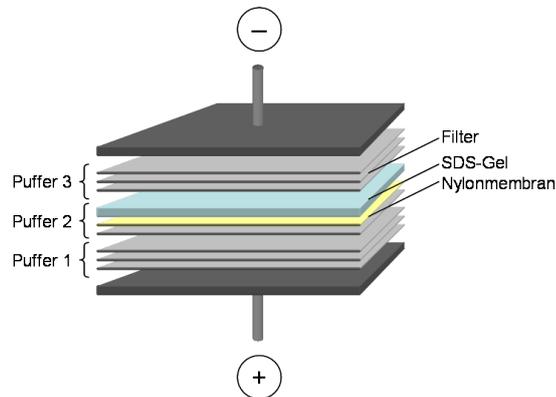


Abbildung 9: Aufbau des Western Blots

Tabelle 4: Puffer für Western Blot

	Puffer 1	Puffer 2	Puffer 3
Tris Base	36,3 g (0,3 M)	3 g (25mM)	3 g (25 mM)
Methanol (100%)	200 ml (20 %)	200 ml (20 %)	200 ml (20 %)
Amino Capronsäure	—	—	5,2 g (40 mM)
<i>Aqua dest.</i>	<i>ad 1 l</i>	<i>ad 1 l</i>	<i>ad 1 l</i>

Nach dem Blotten wurde die Effizienz des Transfers durch Färbung der Membran mit Ponceau-Rot kontrolliert. Anschließend wurde die Membran für 1 h in TBST mit 5 % Milch blockiert. Danach wurde der erste Antikörper (verwendete Antikörper, Konzentrationen und Inkubationszeiten siehe Tab. 5) hinzugegeben, der bei 4°C über Nacht inkubierte. Nach einstündigem Waschen mit TBST wurde der zweite Antikörper für 1 h und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der überschüssige Antikörper wurde durch Waschen für 1h mit TBST und 10 min mit TBS entfernt. Zur Detektion wurde das ECL-System (Fa. Amersham, Fa. Millipore) nach jeweiligem Herstellerprotokoll eingesetzt.

Das emittierte Fluoreszenzsignal der spezifischen Banden wurde mittels eines Chemilumineszenz Dokumentationssystems ChemiDoc (UVP, Cambridge, UK) quantifiziert und mit dem Programm LabWorks (UVP, Cambridge, UK) analysiert. Zur Bewertung der Proteinmengen wurden die ermittelten Werte der exponierten Zellproben auf die jeweilige DMSO-Kontrolle bezogen und als relative Veränderung gegenüber der Kontrolle dargestellt.

TBS/TBST-Puffer	
Tris/HCL pH 7,5	10 ml
NaCl	5,8 g
<i>Aqua dest.</i>	<i>ad 1 l</i>

Für die Herstellung von TBST wurden auf 1 l TBS 1 ml Tween hinzugegeben.

3.3.3 Stripping der Nylonmembran

Um die Western Blot-Membranen mehrfach für die Immundetektion einsetzen zu können, wurden nach der Chemilumineszenzdetektion der Antikörper von der Membran mit Stripping-Puffer für 30 min bei 70°C im Hybridisierungssofen entfernt.

Danach wurde die Membran wieder mit TBST gewaschen. Die Nylonmembran konnte nun wieder wie oben beschrieben geblockt und für eine erneute Western Blot-Detektion benutzt werden.

Stripping-Puffer	
SDS 10%	20 ml
Tris/HCL pH 6,8	12,5 ml
Mercaptoethanol	700 µl
<i>Aqua dest.</i>	66,8 ml

3.4 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Für die Immunhistochemie und -fluoreszenz wurden Proben von beiden Zelllinien verwendet. Die C2C12 wurden 25 h, 5 d, 7 d und 10 d mit TCDD oder DMSO inkubiert. Zusätzlich wurden die Myoblasten auch mit α -NF und α -NF/TCDD für 25 h und 5 d behandelt. Die

Hepatomazellen wurden für 25 h und 5 d mit TCDD bzw. DMSO versetzt.

Zur Vorbereitung wurden sterile Deckgläschen in 24er Wellplatten gelegt, mit 0,5 ml 0,1%iger Gelatine beschichtet und bei 4°C für 24 h gelagert. Die Gelatine wurde dann abgenommen und die Deckgläschen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde jedes Deckgläschen mit 0,5 ml Kulturmedium beschichtet, in welches dann die zuvor abgelösten Zellen hinzugegeben wurden. Nach der Inkubation wurde das Medium abgenommen und die Deckgläschen mit PBS gewaschen. Die auf den Deckgläschen anhaftenden Zellen wurden mit 4 %igem PFA 30 min fixiert. Nach 10 min Waschen mit PBS wurden die Zellen für 20 min in 10 % Ziegen Serum in PBS bei Raumtemperatur blockiert und dann der erste Antikörper in 1 % BSA/PBST (Verdünnung siehe Tabelle 5) bei 4°C über Nacht zugegeben. Der freie Antikörperüberstand wurde durch 3 x Waschen mit PBS entfernt. Die Inkubation der Sekundäntikörper Alexa 488 *goat-anti-rabbit* (1:600, Molecular Probes, Eugene, USA) und Cy3 *goat-anti-mouse* (1:200, Dianova, Hamburg, Deutschland), beide verdünnt in PBS erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Die Zellkerne wurden mit den Kernfarbstoffen Höchst (1:20 in PBS) oder 7-Aminoactinomycin D (7-AAD, 1:20 in PBS) angefärbt. Die Deckgläschen wurden 3 x 10 min mit PBS gewaschen, dann auf einen Objektträger gelegt und dort mit Moviol beschichtet. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte am Fluoreszenzmikroskop, der AxioCam Digitalkamera und mit dem Programm Axiovision.

PBS (phosphate buffered saline) pH 7,4	
Natriumchlorid	8,00 g
Kaliumchlorid	0,20 g
Di-Natriumhydrogenphosphat	1,44 g
Kalium-di-hydrogenphosphat	0,24 g
<i>Aqua dest.</i>	<i>ad 1 l</i>

Moviol	
Glycerol	6 g
Moviol	2,4 g
Tris/HCL 0,2 M pH 8,5	12 ml
<i>Aqua dest.</i>	6 ml

Tabelle 5: Verwendete Antikörper und Inkubationszeiten bei Western Blot und Immunhistochemie (IHC)

	1. Antikörper und Inkubationszeit		2. Antikörper und Inkubationszeit	Hersteller
	Western Blot	IHC	Western Blot	
GLUT1	<i>rabbit anti mouse</i> , 1:5000 in 5%Milch/TBST, ÜN	<i>rabbit anti mouse</i> , 1:1000 in 1%BSA/PBST, ÜN	<i>goat anti rabbit</i> , 1:12000 in 3 %BSA/TBST, 1 h 30 min	Abcam
GLUT2	<i>rabbit anti mouse</i> , 1:200 in 5%Milch/TBST, ÜN	<i>rabbit anti mouse</i> , 1:50 in 1%BSA/PBST, ÜN	<i>goat anti rabbit</i> , 1:20000 in 2 %BSA/TBST, 1 h 30 min	Prof. Joost (Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Potsdam)
GLUT4	<i>IRGT Monoclonal Antibody</i> , 1:2000 in 5%Milch/TBST, ÜN	<i>IRGT Monoclonal Antibody</i> , 1:2000 in 1%BSA/PBST, ÜN	<i>goat anti mouse</i> , 1:35000 in 1 %BSA/TBST, 1 h 30 min	Acris
ß-Aktin	1:40000 in 5%Milch/TBST, ÜN		<i>goat anti mouse</i> , 1:25000 in 1%BSA/TBST, 1 h 30 min	Sigma

3.5 Glukoseaufnahmemessung

Die Glukoseaufnahme der Zellen wurde anhand der Aufnahme von Tritium-markierter 3-O-Methyl-D-Glucose (OMG) im Szintillationsmessgerät (Beckmann Coulter) bestimmt. Die Zellen wurden dazu in 6-Well-Platten kultiviert und mit TCDD bzw. DMSO wie oben beschrieben inkubiert. 24 h vor Versuchsbeginn wurden die Zellen 3x mit serumfreiem Medium mit 0 mM Glukose gewaschen und anschließend in glukosefreiem Medium mit Zusätzen weiter kultiviert. Für den Versuch wurden die Zellen in 1ml DMEM ohne Glukose pro Well, dem 1 ml DMEM mit 10 mM OMG und 2 μ Ci 3H-OMG hinzugefügt wurde, bei 37°C für 20 min inkubiert. Dann wurden 200 μ l in die Scintillationsvials als Hot Probe abgenommen, um die verbliebene Radioaktivität im Medium zu bestimmen. Die Zellen wurden 3x mit eiskaltem DMEM gewaschen. Vom letzten Waschschrift wurden wiederum 200 μ l als Waschkontrolle abgenommen, um zu kontrollieren, dass die überschüssige Radioaktivität im Medium erfolgreich in den Waschschriften entfernt wurde. Schließlich wurden für die Zellyse 0,5 ml 50 mM NaOH pro Well pipettiert, die für 60 min bei 60°C im Hybridisierungsofen einwirkten. Danach wurden 200 μ l des Zellysates, welches die von den Zellen aufgenommene Radioaktivität enthält, in die Scintillationsvials überführt. Für den Messvorgang im Counter wurde je 10 ml Scintillationscocktail pro Vial hinzugegeben, gemischt und die Radioaktivität in dpm (dots per minute) gemessen. Zusätzlich wurden 3x20 μ l des Zellysats zum Vermessen von Protein nach Bradford abgenommen. Die Aufnahme der tritiumversetzten Glukose wurde in Bezug auf die Proteinmenge berechnet.

3.6 Transfektion

Mit der Methode „Transfektion“ wurden die Zelllinien auf ihre TCDD-Sensitivität geprüft, indem sie mit *xenobiotic response Elementen* (XRE) transfiziert wurden. Die XRE-Elemente werden durch den AhR/ARNT/TCDD-Komplex gebunden und induzieren die Transkription von Zielgenen wie z.B. CYP1A1. Der für diesen Versuch eingesetzte XRE-Vektor beinhaltet 3 Kopien des XRE-Elementes und wurde im Rahmen der Promotion von Dr. Sarah Tonack hergestellt [1]. Wenn der AhR/ARNT/TCDD-Komplex die XRE-Elemente des Vektors bindet, kommt es zur Transkription der Luziferase der Feuerfliege (*firefly luciferase*), die mittels eines Luziferase Assays (Promega) quantifiziert werden kann.

Für den Versuch wurden die Zellen in 6er Wellplatten in OptiMEM Medium kultiviert. In einer 96er Wellplatte wurde die Plasmidmischung vorbereitet: 1,5 μ g XRE und 0,037 μ g PRLSV 40 (Referenzplasmid, *renilla luciferase*) wurden in 50 μ l OptiMEM Medium verdünnt. 4,5 μ l des Transfektionsreagenz Metafectene (Fa Biontex) wurden mit Potimem auf 50 μ l verdünnt. Beide 50 μ l Stocks, die Plasmide und das Transfektionsreagenz wurden

nun gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Am Folgetag wurde für 24 h TCDD bzw. DMSO zugegeben. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 250 μ l 1x Lysis-Wasch-Puffer auf dem Rüttler 15 min gelöst. Anschließend konnte mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) die XRE-Aktivierung durch Ermittlung der *firefly*-Luziferaseaktivität bestimmt werden. Dazu wurden in 6 ml Propylenröhrchen 20 μ l des Zellysates mit 50 μ l Luciferase-Assay-Reagenz II versetzt. Dieses Gemisch wurde an dem Luminometer gemessen und zeigte die *firefly*-Luziferase-Aktivität an. Anschließend wurde in das gleiche Röhrchen 50 μ l Stop and Go Reagenz dazugegeben und die Aktivität der *renilla*-Luziferase gemessen, welche die erfolgreiche Transfektion anzeigt. Als Kontrolle, die als 100% angegeben wird, dienten unbehandelte transfektierte Zellen in Standardmedium.

3.7 Subzelluläre Fraktionierung

Durch Sedimentation im Dichtegradienten kann man Zellen subzellulär fraktionieren. Dabei werden die verschiedenen Zellkompartimente aufgetrennt. In dieser Arbeit wurde die Methode der Dichtezentrifugation eingesetzt, um eine Trennung von Kernfraktion, Plasmamembran, innere Zellmembranen und zytosolischer Fraktion vorzunehmen.

Für die subzelluläre Fraktionierung wurde eine hohe Ausgangsmaterialmenge benötigt. Je Probe wurden 8 große Kulturflaschen MH1C1 und 15 große Schalen C2C12 eingesetzt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, und dann mechanisch mit einem Zellspatel abgelöst. Anschließend wurden sie in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in Lösung II (250 mM Sucrose, 5 mM NaN_3 , 10 mM NaHCO_3 , pH 7,8) gelöst und bei -80°C eingefroren. Für den Versuch wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und je 100 μ l Phosphatase- und Protease-Inhibitor hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml Spritzen mit langen Nadeln homogenisiert. Der Aufschluss der Zellen wurde mittels Trypanblaufärbung unter dem Mikroskop kontrolliert. Die Proben wurden bei den Zentrifugationen mit Lösung II austariert. Alle Zentrifugationen wurden bei 4°C durchgeführt. Die subzelluläre Fraktionierung erfolgte nach Schema aus Abb. 10.

Ergänzung zur 5. Zentrifugation: Die externen Membranen wurden in einem Sucrosegradienten überführt, der eine 30%ige Schicht und eine 40%ige Schicht enthielt. Dabei wurden mit Hilfe einer 5 ml Pipette und langer Nadeln zuerst die Probe und dann die 30 % und 40 % Sucroselösung vorsichtig unterschichtet. Nach der 5. Zentrifugation wurde mit einer 5 ml Spritze und langer Nadel vorsichtig eine trübe Schicht über der 30 %igen Sucroselösung, die die externen Membranen enthält, abgenommen, bis ein Spiegel entstand. Bei der anschließenden 6. Zentrifugation wurden die Röhrchen mit Lösung III (10mM NaH-

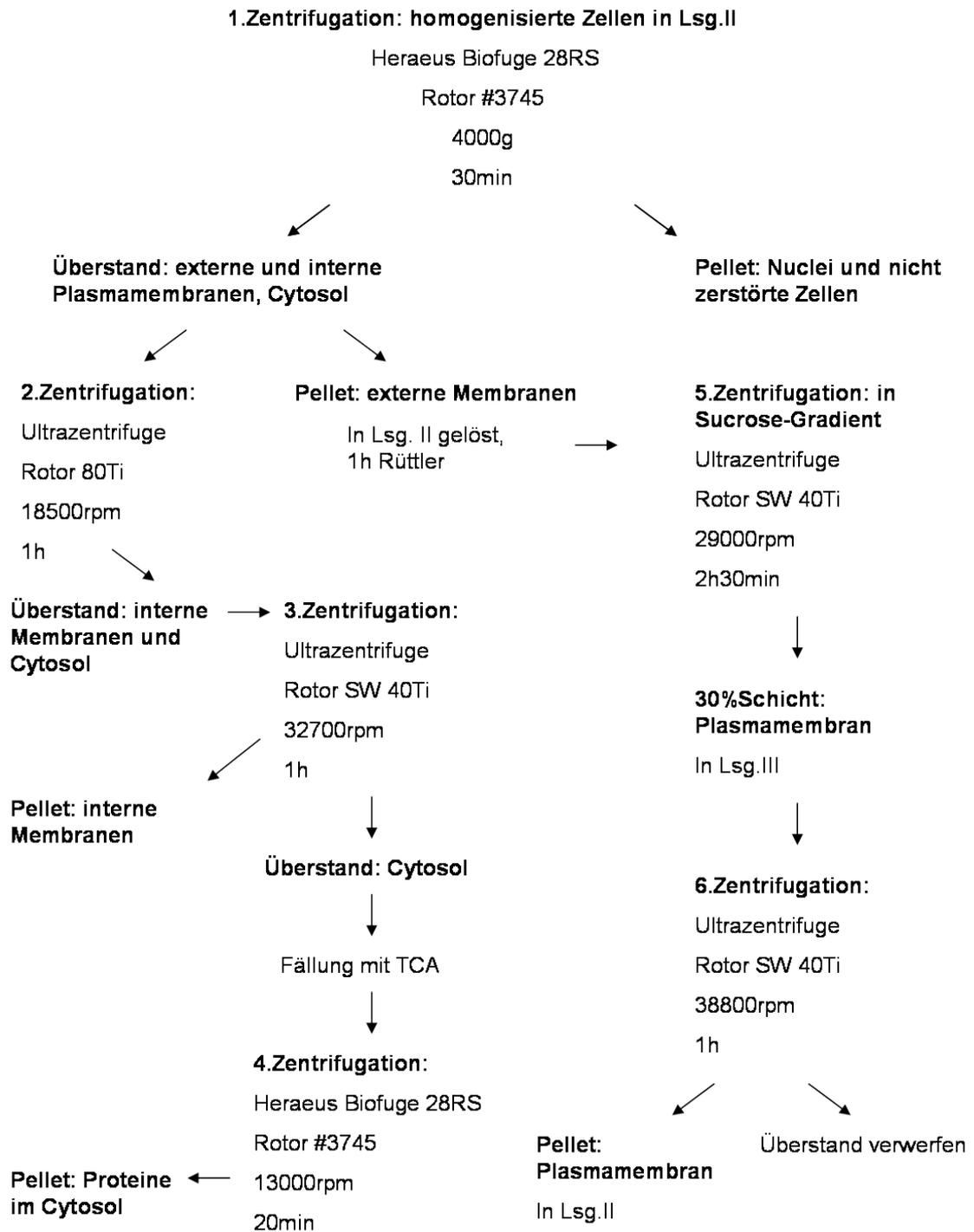


Abbildung 10: Protokoll der subzellulären Fraktionierung

CO₃), statt mit Lösung II austariert. Alle gewonnenen Pellets wurden in Lösung II gelöst und mit Phosphatase- und Protease-Inhibitor versetzt und dann bei -80°C eingefroren. Die so gewonnenen Proteinfractionen wurden dann mittels Western Blot analysiert. Dabei wurde das oben beschriebene Protokoll benutzt, mit der Ausnahme das nur 10-20 µg Protein eingesetzt werden konnte.

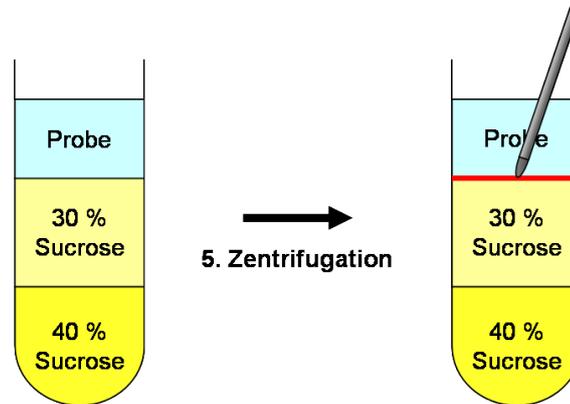


Abbildung 11: Entnahme der externen Membranen mit einer langen Nadel nach der 5. Zentrifugation

3.8 Statistik

Die Daten wurden mit den Programmen Microsoft Excel und Sigma Plot statistisch ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels t-test. Die verschiedenen Signifikanzniveaus wurden wie folgt angegeben: Irrtumswahrscheinlichkeit p kleiner als 5% als $p < 0,05$ und kleiner als 0,1% als $p < 0,001$. Die Zahl der Versuchsgruppen wurden mit n und die Zahl der unabhängigen Versuche mit N bezeichnet.

3.9 Geräte- und Softwareverzeichnis

Axiocam Digitalkamera	Zeiss, Jena, Deutschland
Bio1D Software	LTF, Wasserburg, Deutschland
Biometra Blot Apparatur	Biometra, Göttingen Deutschland
Chemilumineszenz Dokumentations- system ChemiDoc	UVP, Cambridge, UK
Excel XP	Microsoft, Redmond, USA
Fluoreszenzmikroskop Axioplan	Zeiss, Jena, Deutschland
Gelkammer	Biometra, Göttingen, Deutschland
Inkubatoren	Heraeus Holding, Deutschland
Kühlzentrifugen	Heraeus Holding, Deutschland

Lab Works	UVP, Cambridge, UK
Luminometer	Berthold Detection Systems, Pforzheim, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Novex Gelkammern	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Scintillationsmessgerät	Beckman Coulter GmbH Biomedical Research, Krefeld, Deutschland
Sigma Plot	SPSS Inc., USA
Software Axiovision 2.05	Zeiss, Jena, Deutschland
Spektrophotometer	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Thermocycler	TRIO-Thermoblock, Biometra, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge	Biofuge, Heraeus Holding, Deutschland
Zentrifuge für subzelluläre Fraktionierung	Biofuge 28S Heraeus, Berlin, Deutschland

3.10 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

α -Naphthoflavon	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
β -Mercaptoethanol	β -ME, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>	DMEM, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
3-O-Methyl-D-Glukose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
3-O-Methyl-D-[1- ³ H]Glukose	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
7-Amino-Actinomycin-D (7-AAD)	Molecular Probes, Eugene, USA
Acrylamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin	Serva GmbH Heidelberg, Deutschland

Bradford-Reagenz	Biorad, München, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Deckgläschen	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DEPC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
DNase I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
dNTP (100 mM)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
DTT	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dual Luciferase Assay System	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
e-Amino-n-Caprinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
ECL-System	Amerham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland, Millipore, Schwalbach, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Einwegspritze	Omnifix, B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Eisessig	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
fötales Kälberserum	FCS, ausgewählte Charge Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Gelatine	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Gene Pulser Küvetten	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Glycerol	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Guanidiniumthiocyanat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Igepal Ca-630	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Isopropanol	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kalium-di-hydrogenphosphat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Magnesiumsulfat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Metafectene	Biontex, München, Deutschland
Methanol (100%)	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mineralöl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Moviol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Natrium-Deoxycholat	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Natriumacetat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Natriumhydrogencarbonat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumlaurosyllarcosinat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Nylon-Membran	Amerham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Opti-MEM Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PBS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Pferdeserum	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Phenolgemisch (Phenol/ Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1. pH 8.0)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Ponceau-Rot	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
PP-Röhrchen steril 2 ml Cryo, 15 ml, 20 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Primer	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PRL-SV40 Vector	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Proteinkinase-/Phosphatase- inhibitor	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Proteinleiter	Page Ruler Prest. Prot. Ladder, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Restriktionsenzyme	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
RNase-Inhibitor	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Scintillationscocktail	Beckman Coulter GmbH Biomedical Research, Krefeld, Deutschland
Scintillationsvials	Beckman Coulter GmbH Biomedical Research, Krefeld, Deutschland

Sodium-dodecyl-sulfat	SDS, Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Streptomycin/Ampicillin	Strep/Amp, 5000 units/ml Amp, 5000 <i>microg</i> /ml Strep, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Sucrose	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
SYBR green Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TEMED (tetra-ethyl-methyl- ethylen-diamin)	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)	Amchro, Bad Soden, Deutschland
Tris Base	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tris HCL	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Trypanblau	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutsch- land
Trypsin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tween	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutsch- land
Zellkulturmultiplatten 24er	TPPS, Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Zellkulturmultiplatten 6er	TPPS, Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Zellkulturschalen 90 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutsch- land
Zellspatel	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutsch- land

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Zelllinien

4.1.1 GLUT-Isoformen

Um das Expressionsprofil der verschiedenen Glukosetransporter in den Zelllinien C2C12 und MH1C1 zu bestimmen, wurden die Transkripte der GLUT-Isoformen 1, 2, 3, 4 und 8 durch RT-PCR detektiert.

C2C12: Die Myoblasten exprimierten die GLUT-Isoformen 1, 4 und 8. GLUT2 wurde von ihnen nicht exprimiert (Abb. 12). Die GLUT4-Transkriptmenge nahm während der Differenzierung zu Myotuben zu.

MH1C1: Bei den Hepatomazellen konnten ebenfalls die Isoformen 1 und 8, zusätzlich die Isoform 2 nachgewiesen werden. GLUT3 und 4 waren nicht nachweisbar (Abb. 12).

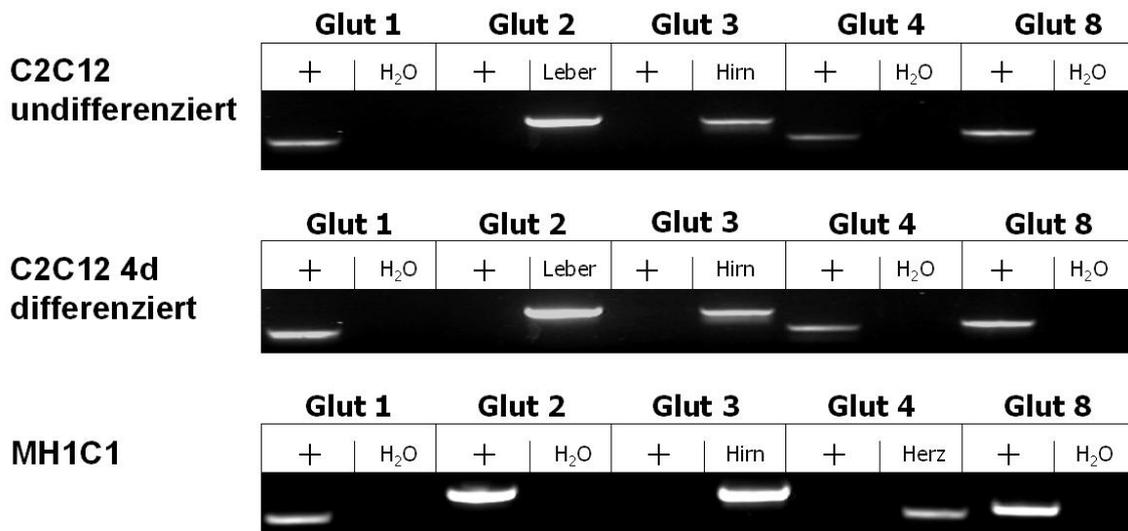


Abbildung 12: Nachweis der Expression von GLUT1-4, 8 mittels RT-PCR in C2C12- und MH1C1-Zellen. Abgebildet ist die Auftrennung der PCR-Produkte der zwei Zelllinien im 1,8%igen Agarosegel. (+ = cDNA-Probe der jeweiligen Zelllinie, H₂O- Kontrollreaktion ohne cDNA)

4.1.2 TCDD-Sensitivität

Da diese Arbeit sich mit dem Einfluss von TCDD auf Glukosetransporter beschäftigt, war es am Anfang der Arbeit von Interesse zu überprüfen, ob TCDD als Ligand auf die AhR-Signalkaskade in diesen Zellen wirkt und welche Sensitivität die verwendeten Zelllinien gegenüber diesem Dioxin aufweisen. Die Aktivierung des AhR-Transkriptionsfaktorkomplexes wurde mittels eines XRE-Reporterplasmides überprüft.

MH1C1: Bei den Hepatomazellen konnte eine signifikante Zunahme der Luziferaseaktivität nach TCDD-Zugabe um das 6fache im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet

werden. Die Luziferaseaktivität in der DMSO-Gruppe war bei den MH1C1 um ca. 20% zur Kontrolle verringert (Abb. 13).

C2C12: Eine noch deutlichere Zunahme der Luziferaseaktivität war bei den Myoblasten zu erkennen. Sie war unter TCDD-Zugabe signifikant um das 110fache zur Kontrolle und ca. 10fache zu DMSO-behandelten Zellen erhöht. Durch DMSO kam es zu einer Erhöhung der Aktivität bei dieser Zelllinie um das 9,6fache (Abb. 13).

Die Luziferaseaktivität ist ein Nachweis für eine XRE-Bindung durch den AhR-Transkriptionsfaktorkomplex. Durch die Zugabe von TCDD ist in beiden Zelllinien ein deutlicher Anstieg der Luziferaseaktivität gemessen worden. Dadurch wurde bewiesen, dass beide Zelllinien TCDD aufnehmen und dadurch die AhR-Signalkaskade aktiviert wird.

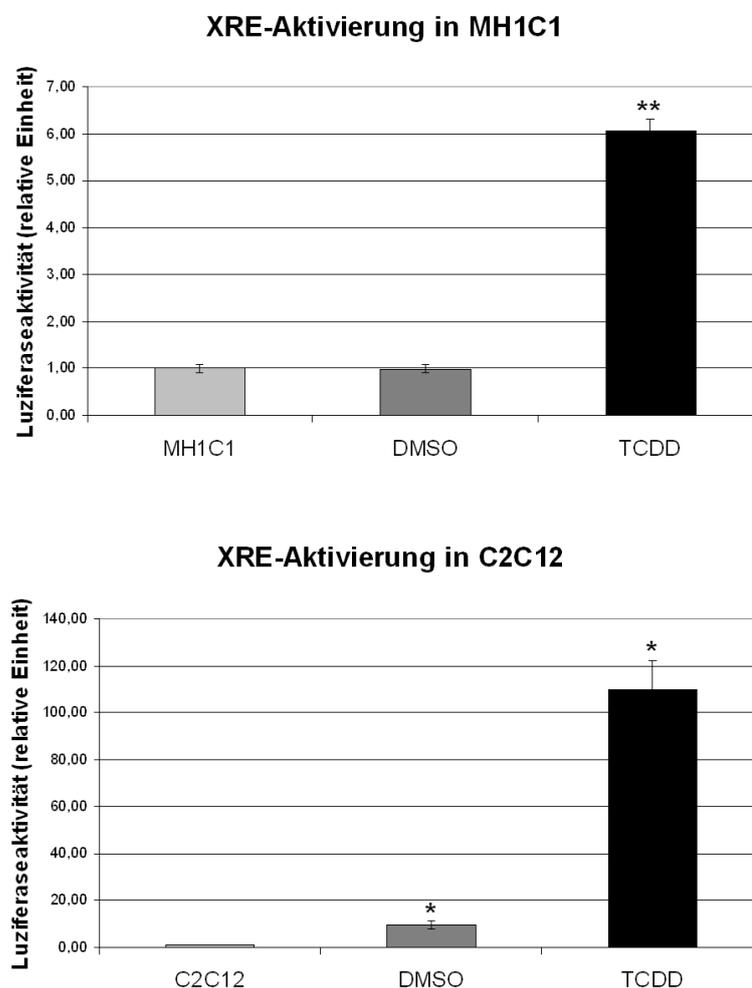


Abbildung 13: Relative Luziferaseaktivität in TCDD-stimulierten MH1C1- und C2C12-Zellen. In der Grafik ist die relative Luziferaseaktivität von unbehandelten MH1C1 bzw. C2C12 von TCDD-stimulierten (TCDD, 10nM) und DMSO-Kontrollen (DMSO) gezeigt. Die relative Luziferaseaktivität pro Probe wurde als Quotient des Wertes der *firefly luciferase* Aktivität und der *renilla luciferase* Aktivität der jeweiligen Probe ermittelt. Die relative Luciferaseaktivität in den behandelten Zellen wurde =1 gesetzt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, $N = 1$, $n = 3$

4.1.3 Expressionsanalyse von GLUT1, 4 und Aktin während der Differenzierung von C2C12

Bei der Zelllinie C2C12 handelt es sich um ein dynamisches Zellmodell, welches während der Differenzierung strukturellen Veränderungen unterliegt. Dies kann man sowohl an der Expression der GLUT als auch durch Expressionsänderungen bei Markergenen erkennen. Um Expressionsänderungen der Zielgene bewerten zu können, wurden die Expressionsprofile für GLUT1, GLUT4 und β -Aktin während der Differenzierung ermittelt (s. Abb. 14).

Die GLUT1-mRNA-Menge nimmt während der ersten sieben Differenzierungstage im Vergleich zum undifferenzierten Zustand der Zellen ab. Am 10. Differenzierungstag zeigten die Zellen jedoch eine fast verdoppelte mRNA-Menge gegenüber den undifferenzierten Zellen.

Die mRNA-Menge von GLUT4 zeigte während der Differenzierung einen deutlichen, kontinuierlichen Anstieg, der am 10. Differenzierungstag etwa das 80fache vom Wert der undifferenzierten C2C12 betrug.

Die β -Aktin-mRNA, welches als Kontrolle für ein homogenes Laden der Proteingele im Western Blot mitgeführt wurde, nahm während der Differenzierung der C2C12 kontinuierlich ab (s. Abb. 14). Deshalb konnte diese Kontrolle nicht genutzt werden.

Um das homogene Laden der Proteingele zu gewährleisten, wurden die Western Blot Membranen mit differenzierenden C2C12 mit Ponceau gefärbt (s. 3.3.2).

4.2 Proteinexpression von GLUT unter TCDD-Einfluss

Die Proteinexpression der Glukosetransporter der Zelllinien wurden sowohl in undifferenzierten Zellen (C2C12, MH1C1) als auch während der Differenzierung (C2C12) untersucht. Die Exposition der Zellen mit TCDD erfolgte für 48 Stunden (vgl. Abb. 8). Die Probenahme erfolgte am 2., 5., 7. und 10. Tag sowohl bei undifferenziert kultivierten Zellen, als auch bei differenzierten Zellen.

4.2.1 GLUT1

Das GLUT1-Protein war über den gesamten Zeitraum der Kultur bei beiden Zelllinien nachweisbar (s. Abb. 15).

C2C12: Die Western Blot-Analyse zeigte bei den undifferenzierten C2C12 eine signifikante Abnahme der Proteinmenge am 7. Kultivierungstag nach 48 stündiger Exposition mit TCDD (s. Abb. 16a). Dies konnte an den Myotuben nicht gezeigt werden (s. Abb. 16b).

MH1C1: Bei den MH1C1 zeigte sich eine Abnahme der Proteinexpression des GLUT1 am 7. und nachhaltig am 10. Kultivierungstag (s. Abb. 16c).

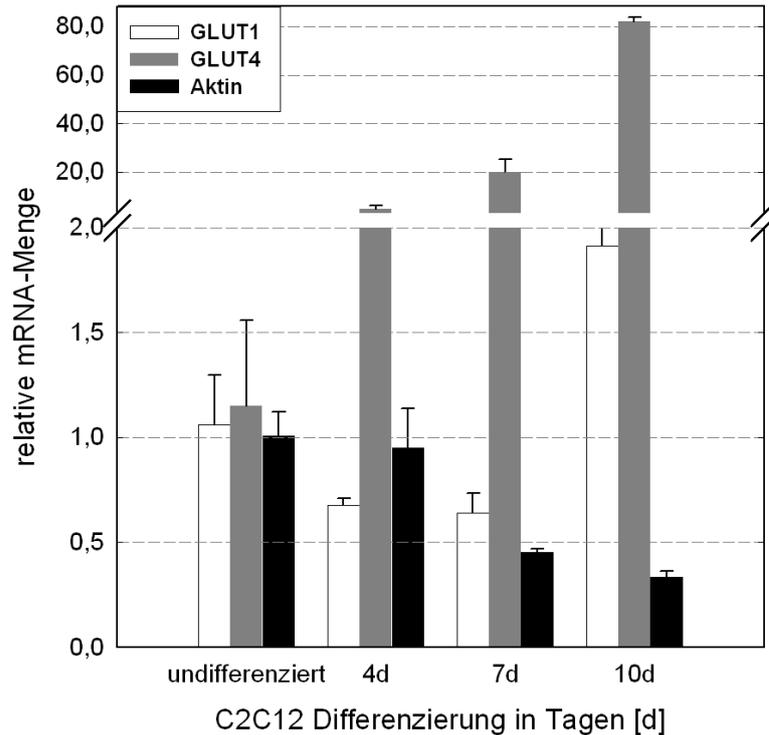


Abbildung 14: Relative mRNA-Mengen von GLUT 1, 4 und β -Aktin wahrend der Differenzierung der C2C12 zu Myotuben

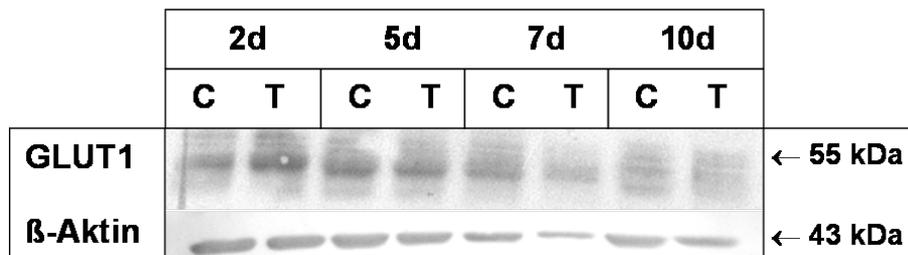
4.2.2 GLUT2

In den Leberzellen MH1C1 ist GLUT2 nachweisbar (s. Abb. 17).

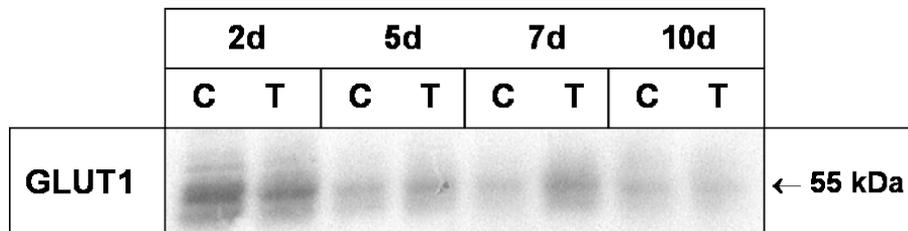
Die Expression des GLUT2 wurde nach 2, 5, 7 und 10 Tagen Kultur untersucht. Bereits ab dem 2. Tag zeigte sich eine signifikante Abnahme der GLUT2- Proteinmenge durch Exposition mit TCDD (Abb. 18). Die Verringerung war nachhaltig. Die deutlichste Abnahme der Proteinmenge konnte an Tag 5 und Tag 7 gemessen werden ($p < 0,001$).

4.2.3 GLUT4

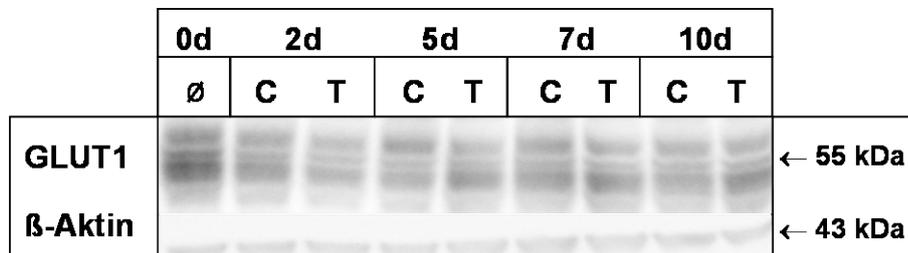
Die Expression des Insulin-sensitiven GLUT4, der typisch fur Skelett-, Herzmuskel- und Fettzellen ist, wurde in undifferenziert kultivierten und differenzierenden C2C12-Zellen untersucht. Im Unterschied zur gemessenen Reduktion der GLUT4-Proteinmenge in nicht-differenzierenden Zellen ab dem 5. Tag (Abb. 20), blieb das Expressionsniveau des GLUT4 in differenzierenden Myozyten durch TCDD unbeeinflusst (Abb. 20b). In Myotuben zeigte sich durch TCDD keine verminderte Proteinexpression. Blieb diese Zelllinie jedoch im undifferenzierten Stadium, so zeigte sich ab dem 5. Kultivierungstag eine kontinuierliche Abnahme der GLUT4-Proteinmenge unter TCDD-Einfluss (Abb. 20a).



(a) C2C12 undifferenziert



(b) C2C12 differenziert



(c) MH1C1

Abbildung 15: Expression von GLUT1-Protein in C2C12 und MH1C1. C=DMSO-Kontrolle, T=TCDD-Probe a) Repräsentativer Western Blot für GLUT1 (55 kDa). Auf dem selben Blot wurde β-Aktin detektiert und als Bezugsgröße und Ladekontrolle in die quantitative Auswertung eingerechnet. b) Densitometrische Auswertung des Western Blot von differenzierten C2C12 auf GLUT1. c) Densitometrische Auswertung des Western Blot von MH1C1 auf GLUT1. Hier ist β-Aktin als Bezugsgröße und Ladekontrolle miteingerechnet.

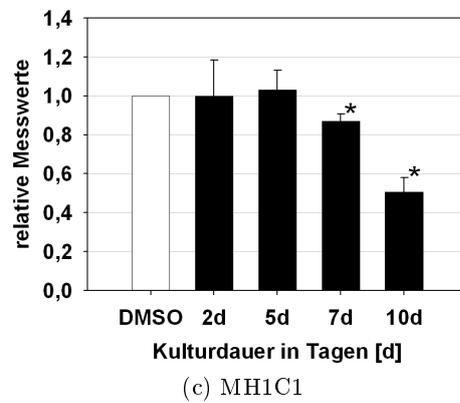
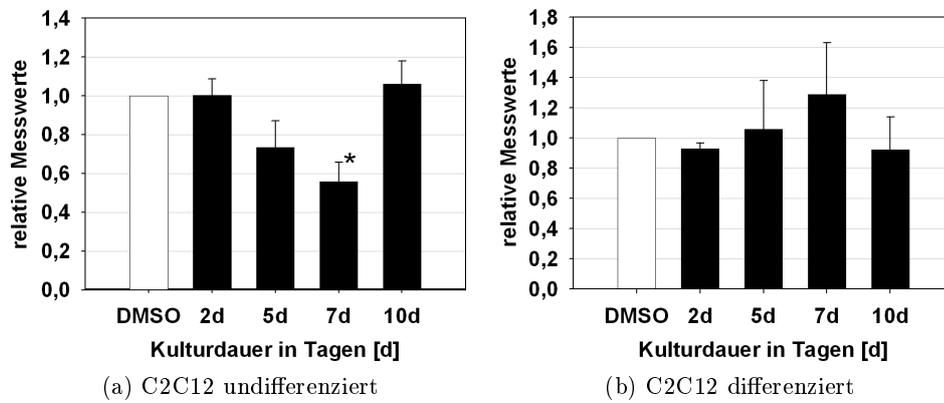


Abbildung 16: Densitometrische Auswertung der Western Blots zum GLUT1-Proteingehalt von TCDD-behandelten und Kontrollzellen (DMSO, 1) N=2, n=3, * $\hat{=}$ p<0,05

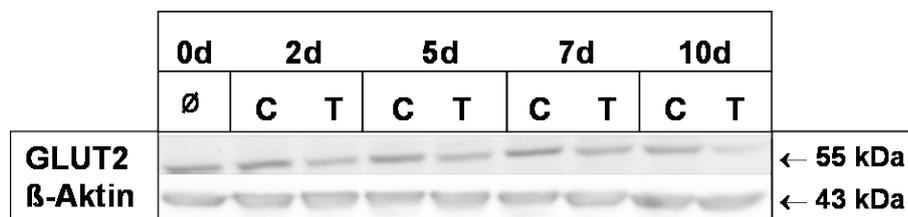


Abbildung 17: Expression von GLUT2-Protein in MH1C1. C=DMSO-Kontrolle, T=TCDD-Probe

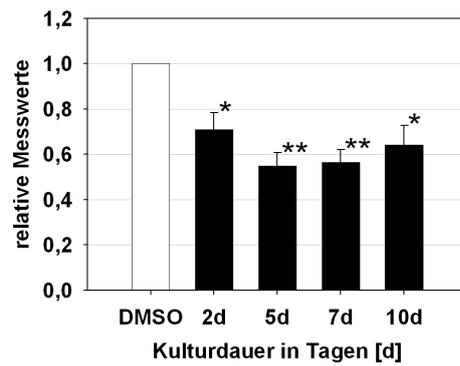
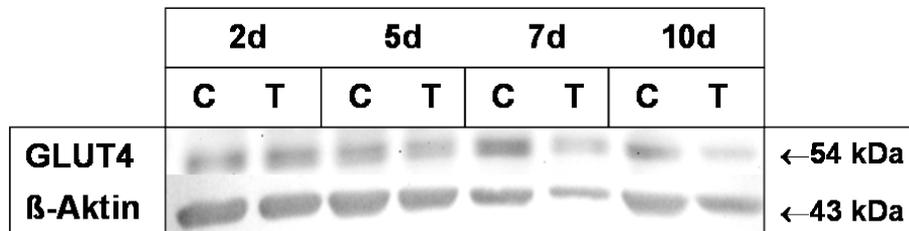
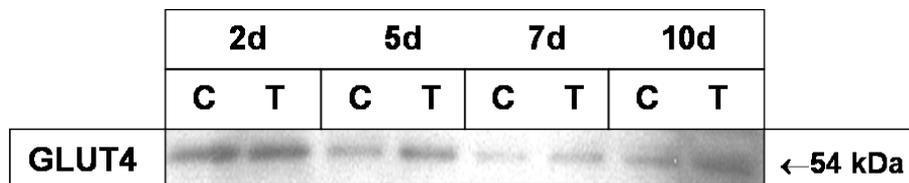


Abbildung 18: Densitometrische Auswertung der Western Blots zum GLUT2-Proteingehalt von TCDD-behandelten und Kontrollzellen (DMSO, 1) N=2, n=3, * $\hat{=}$ $p < 0,05$, ** $\hat{=}$ $p < 0,001$

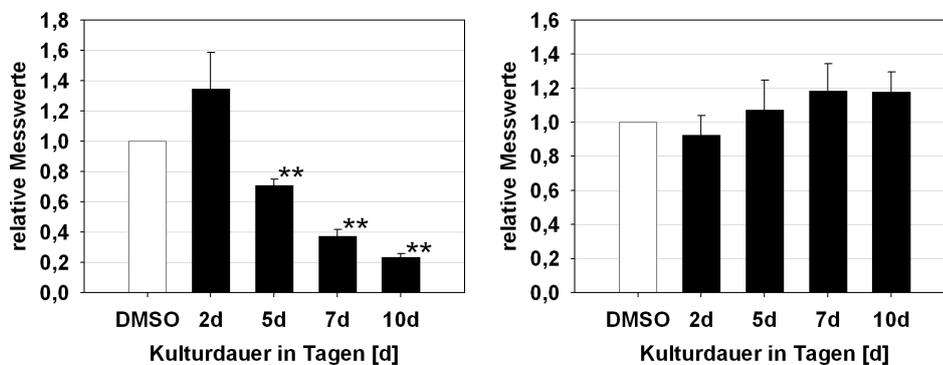


(a) C2C12 undifferenziert



(b) C2C12 differenziert

Abbildung 19: Expression von GLUT4-Protein in den angegebenen Zelllinien. C=DMSO-Kontrolle, T=TCDD-Probe



(a) C2C12 undifferenziert

(b) C2C12 differenziert

Abbildung 20: Densitometrische Auswertung der Western Blots zum GLUT4-Proteingehalt von TCDD-behandelten und Kontrollzellen (DMSO=1) N=2, n=3, ** $\hat{=}$ $p < 0,001$

4.3 GLUT-Lokalisation in TCDD-exponierten C2C12- und MH1C1-Zellen

Die Lokalisation von GLUT 1, 2 und 4 wurde mittels Immunocytochemie unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Zellen wurden für 48h mit 10 nM TCDD exponiert und nach 25h, 5d, 7d und 10d analysiert. Als Kontrolle wurden die Zellen nur mit DMSO kultiviert.

4.3.1 Lokalisation von GLUT1

C2C12:

In C2C12-Zellen ist GLUT1 sowohl in der Plasmamembran als auch zytosolisch lokalisiert (Abb. 21). Unter TCDD-Einfluss verändert sich diese Lokalisation. Nach 25h war GLUT1 verstärkt um den Zellkern herum detektierbar. Diese Lokalisationsveränderung war am 5. Tag am stärksten ausgeprägt. Die TCDD-Proben des 7. und 10. Tages zeigten hingegen keinen Unterschied zur DMSO-Kontrolle mehr.

Um diesen Effekt in der subzellulären Anordnung von GLUT1 dem AhR-Signalweg zuordnen zu können, wurde der AhR-Inhibitor α -Naphthoflavon benutzt. Dabei wurde α -Naphthoflavon zusammen mit TCDD für 5d zugegeben. Dieser Versuch konnte nicht beendet werden, da die Zellen nach ca. 2d keine Zellteilung mehr zeigten und nekrotisch wurden. Aus diesem Grund war es nicht möglich, eine Langzeitinkubation mit α -Naphthoflavon durchzuführen.

MH1C1:

Bei den Hepatomazellen MH1C1 war GLUT1 in der Plasmamembran und im Zytosol lokalisiert. Es zeigte sich an keinem Kultivierungstag eine Lokalisationsveränderung unter TCDD-Einfluss im Vergleich zur DMSO-Kontrolle.

4.3.2 Lokalisation von GLUT4

In C2C12 ist GLUT4 bei der Kontrolle sowohl im Zytoplasma als auch in der Plasmamembran lokalisiert. Nach 25stündiger Inkubation mit TCDD war das GLUT4-Protein nur um den Zellkern herum angeordnet (Abb. 23). Diese Anordnung war an den folgenden Kulturtagen nicht mehr zu erkennen. Die Inkubation des AhR durch α -Naphthoflavon hob den TCDD-Effekt auf, so dass die veränderte Anordnung (zellkernnah) nicht mehr zu beobachten war (s. Abb. 23).

Die Zellkompartimente wurden mittels subzellulärer Fraktionierung aufgetrennt und in den Fraktionen wurde die Menge von GLUT4-Protein bestimmt (s. Abb. 22). Der Vergleich der zytosolischen Fraktion TCDD-behandelter und Kontrollzellen ergab ein vermehrtes

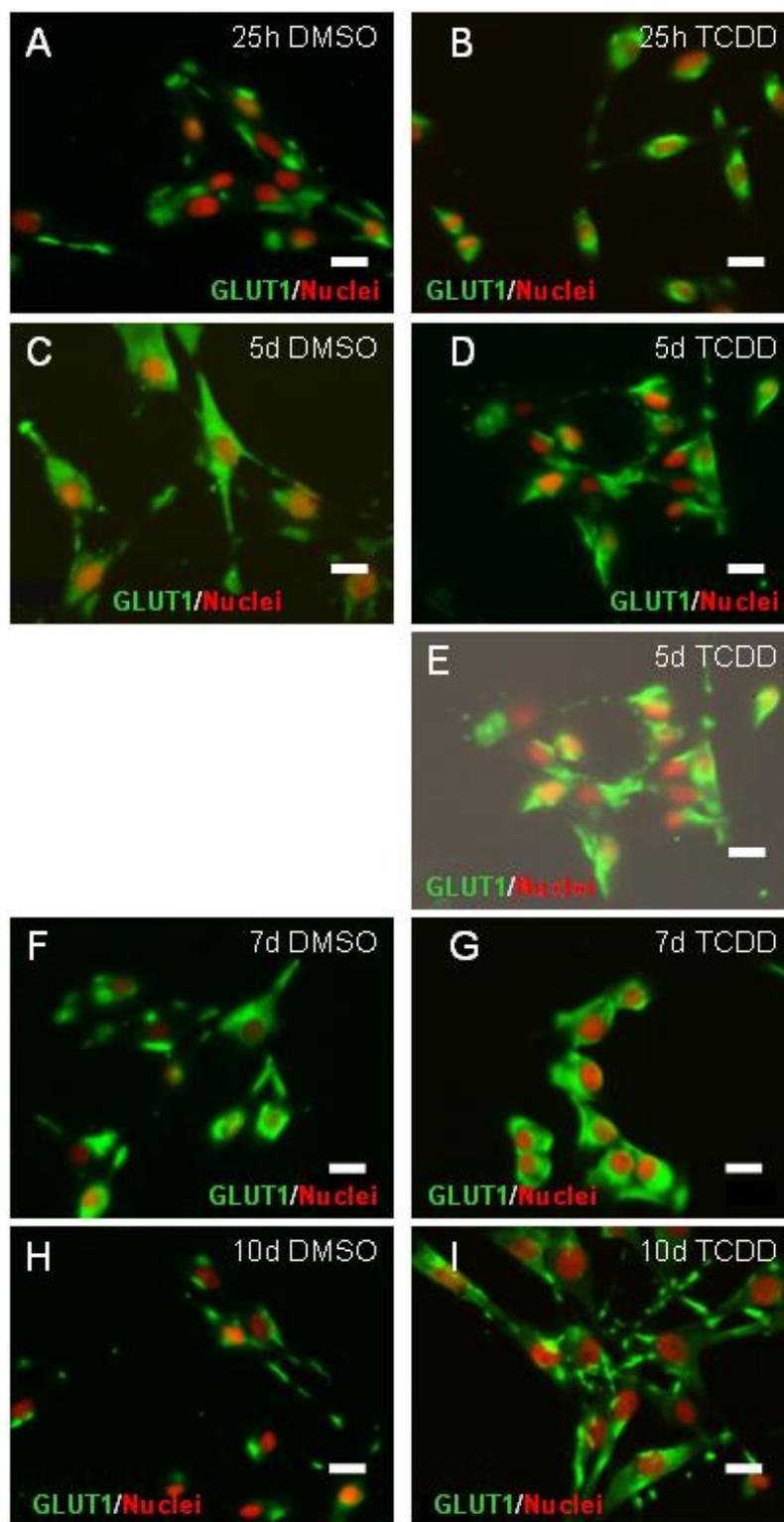


Abbildung 21: GLUT1-IHC bei C2C12-Zellen nach 25h bis 10d TCDD-Inkubation. Die linke Spalte zeigt die DMSO-Kontrollen, die rechte die TCDD-Proben. Die Nuclei sind rot gefärbt, der GLUT1 grün. An Tag 5 ist eine Verlagerung des GLUT1 um den Zellkern herum zu sehen (Bild D). Bild E zeigt durch Hinzunahme des Neutralkanal am Fluoreszenzmikroskop die Zellgrenzen. Maßstab $\cong 20\mu\text{m}$

Vorkommen von GLUT4-Protein im Zytosol nach TCDD-Exposition. Dies bestätigte das Ergebnis der Immunfluoreszenzanalyse und die Lokalisationsveränderung des GLUT4 von der Zellmembran in die zytoplasmatische Membranfraktion.

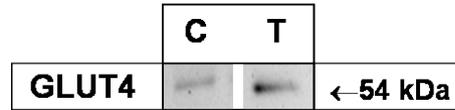


Abbildung 22: GLUT4 im Cytosol nach der subzellulären Fraktionierung der C2C12. C= DMSO-Kontrolle, T= TCDD-Probe

4.3.3 Lokalisation von GLUT2

Eine Veränderung der Lokalisation des GLUT2 nach TCDD-Zugabe bei den MH1C1 konnte zu keinem untersuchten Zeitpunkt beobachtet werden. Er lag sowohl bei der DMSO-Kontrolle als auch bei der TCDD-Probe hauptsächlich in der Plasmamembran und zu einem geringen Anteil im Zytoplasma vor (Abb. 24).

4.4 Glukoseaufnahme nach TCDD-Inkubation

Anhand der Messung der Glukoseinkorporation sollte untersucht werden, ob TCDD einen Einfluss auf die Glukoseaufnahme bei den beiden untersuchten Zelllinien hat. Ausgangspunkt war zunächst die Bestimmung der normalen Glukoseaufnahme in Abhängigkeit von der Kulturzeit. Ermittelt wurden die Zeitintervalle für beide Zelllinien, in denen die Glukoseaufnahme linear erfolgte und ab wann eine Sättigung der Reaktion eintrat. Bei den Zelllinien wurde die Glukoseaufnahme zu folgenden Zeitpunkten bestimmt: für MH1C1 nach 5, 10, 15, 20, 30 und 40 min; für C2C12 nach 10, 20, 30, 40 und 60 min (Abb.25). Für C2C12 war nach 40 und 60 Minuten die Sättigung der Reaktion erreicht. Aus diesem Grund wurde für die Versuche eine 20minütige Inkubation mit 3H-OMG gewählt. In der Literatur wurde gezeigt, dass die Glukoseaufnahme in Adipozytenkulturen nach 3h am Stärksten verringert war [144]. Daher wurde zusätzlich zu den TCDD-Inkubationen ein 3h Wert für die Bestimmung der Glukoseaufnahme gewählt. Die übrigen Zeitpunkte orientierten sich an den bei der Proteinexpression und Immunhistochemie gewählten.

C2C12: Die Myoblasten wurden für 3h, 25h, 48h und 5d mit TCDD bzw. DMSO inkubiert. Unbehandelte C2C12 dienten als weitere Kontrolle. Die durchschnittliche Glukoseaufnahme lag bei 2,12 pmol/mg Protein. Zu allen untersuchten Zeitpunkten ergab sich keine Veränderung der Glukose-Aufnahme durch TCDD-Exposition, weder im Vergleich zu behandelten noch im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrollen, DMSO-Kontrollen) (Abb. 26).

MH1C1: Die Hepatomazellen wurden für 3h, 25h und 5d mit TCDD bzw. DMSO in-

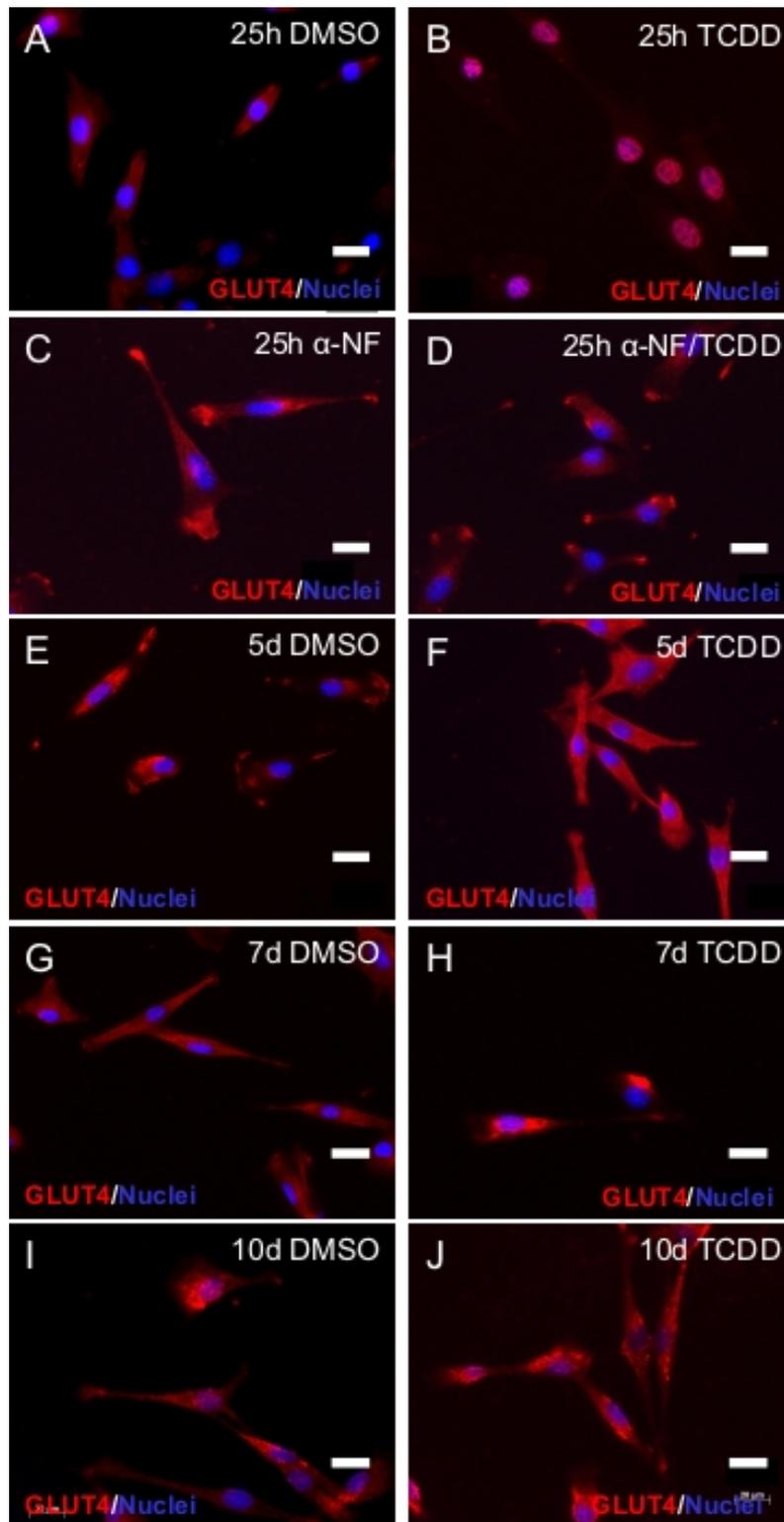


Abbildung 23: GLUT4-IHC in C2C12-Zellen. Der GLUT4 ist rot gefärbt, die Nuclei blau. A) DMSO-Kontrolle B) 10nM TCDD nach 25h. In (B) ist eine deutliche Anordnung des GLUT4 um den Zellkern herum zu erkennen. C,D) Die Zugabe von α -Naphtolavon blockiert die TCDD-induzierte Lageveränderung von GLUT4. E, F 10nM TCDD nach 5d, G, H, 10nM TCDD nach 7d, I, J 10nM TCDD nach 10d. Maßstab $\cong 20 \mu\text{m}$

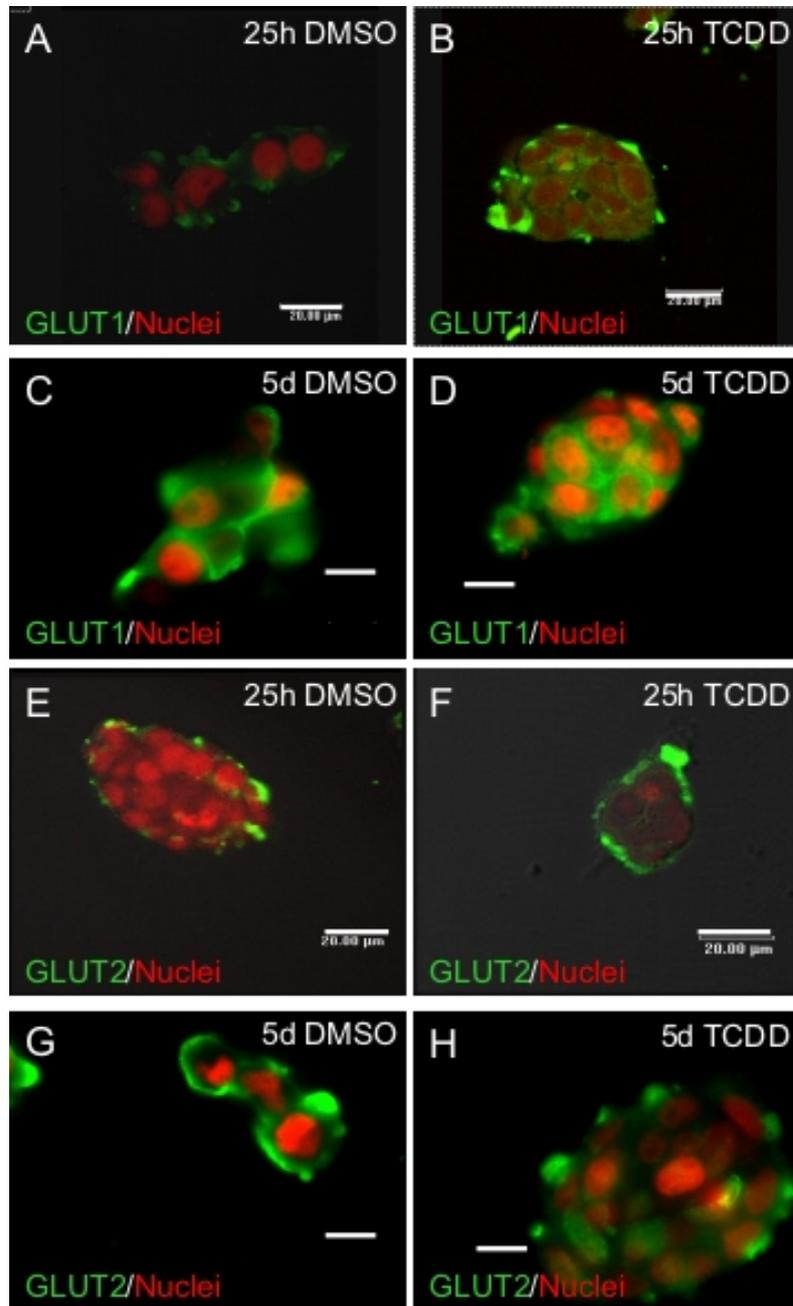


Abbildung 24: IHC der MH1C1-Zellen auf GLUT1 und GLUT2 nach 25h und 5d TCDD-Inkubation. Die GLUTs sind jeweils grün gefärbt, die Nuclei rot. Die Zellen bildeten beim Wachstum auf dem Deckgläschen kugelige Gebilde. Es war kein Unterschied in der GLUT-Lokalisation zwischen DMSO-Kontrolle und TCDD-exponierten Zellen zu erkennen. Maßstab $\cong 20 \mu\text{m}$

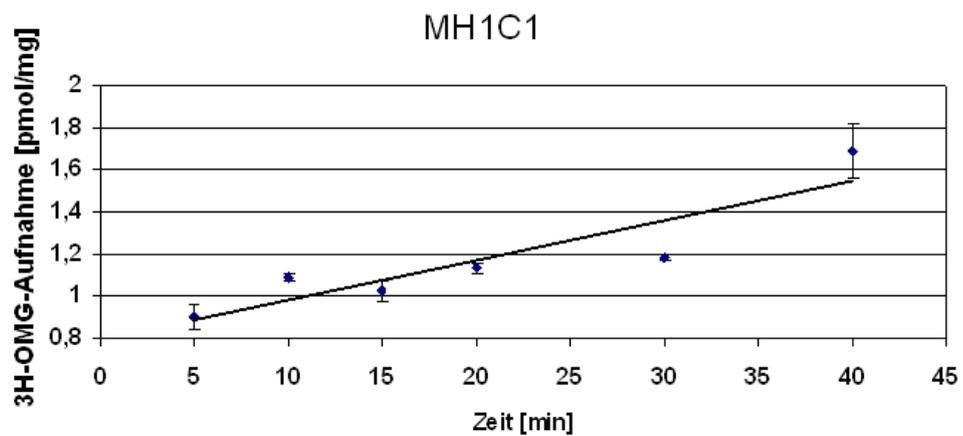
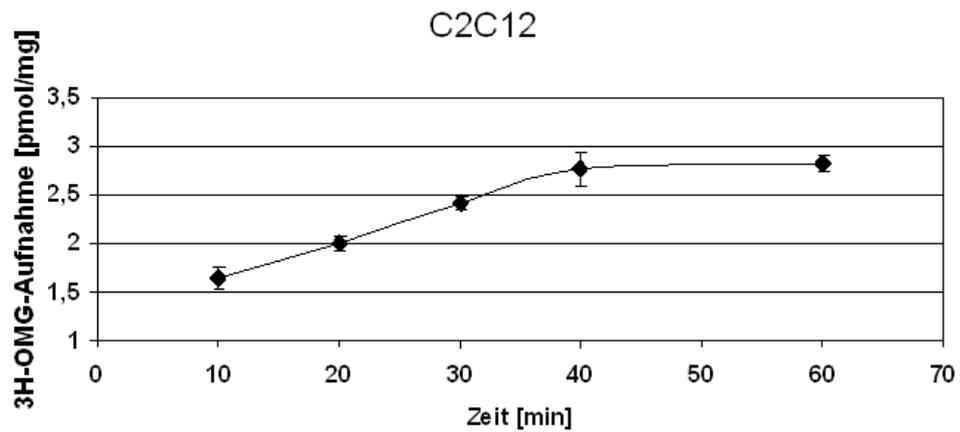


Abbildung 25: Zeitreihen zur Bestimmung der Glukoseaufnahmesättigung für beide Zelllinien. Der Zeitpunkt zur Bestimmung des TCDD-Effektes auf die Glukoseaufnahme wurde außerhalb des Sättigungsbereiches der Kurve bei 20min festgelegt.

kubiert. Auch hier dienten unbehandelte Zellen als zusätzliche Kontrolle, um den DMSO-Effekt erfassen zu können. Die durchschnittliche Glukoseaufnahme betrug 1,37 pmol/mg. Bei dieser Zelllinie zeigte sich eine signifikante Abnahme der Glukoseinkorporation bei TCDD-exponierten Zellen nach 3h. Hier wurde eine durchschnittliche Aufnahme der Glukose von 1,05 pmol/mg Protein gemessen, wohingegen die DMSO-Gruppe bei 1,53 pmol/mg und die Kontroll-Gruppe bei 1,48 pmol/mg und somit um ca. 50% höher lag (Abb. 26). Nach 25h oder 5 Tagen war die Verringerung der Glukoseaufnahmekapazität durch TCDD nicht mehr nachweisbar.

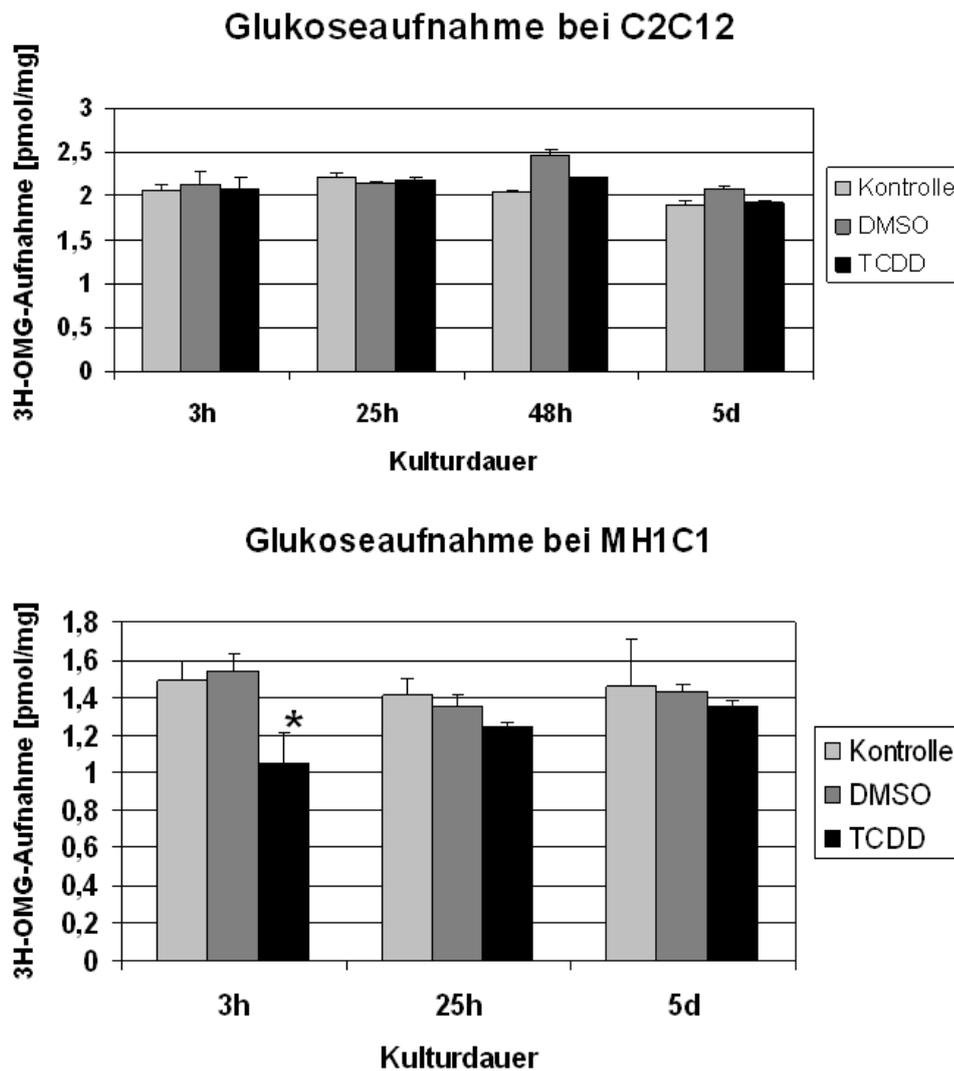


Abbildung 26: Bestimmung der Glukoseaufnahme von C2C12- und MH1C1-Zellen nach Exposition mit 10nM TCDD für 3 Stunden (3h), 25 Stunden (25h) oder 5 Tagen (5d). Bei den MH1C1 konnte nach 3stündiger Inkubation mit TCDD eine signifikante Verminderung der Glukoseaufnahme gezeigt werden. * $p < 0,05$, $N = 4$, $n = 3$, Kontrolle= unbehandelte Zellen, DMSO= Lösungsmittelkontrolle

5 Diskussion

TCDD beeinflusst den zellulären Glukosemetabolismus. Diese Effekte wurden sowohl in tiereperimentellen als auch in Zellkulturansätzen beobachtet. Bisher konnte unsere Arbeitsgruppe an embryonalen Stammzellen die veränderte Glukoseaufnahme dahingehend weiter beschreiben, dass sie mit einer Verringerung des GLUT-Proteins und einer veränderten Lokalisation von GLUT1 und 3 einhergeht. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob diese Effekte auch an adulten und weiter ausdifferenzierten Zellen und bei anderen GLUT-Isoformen auftreten.

5.1 Zellkultursysteme zur Untersuchung der TCDD-Effekte

Verschiedene Studien mit TCDD zeigten bestimmte Effekte auf den Organismus wie Tumorwachstum [27, 28], vermindertes Reproduktionspotential [21], Embryotoxizität [22], Teratogenität [23, 24] und Veränderungen des Glukosestoffwechsels [35, 36, 37]. Letzteres wurde in dieser Arbeit genauer untersucht. Dazu wurden zwei Zelllinien ausgesucht, die aus wichtigen glukoseverstoffwechselnden Organen stammen, dem Muskel und der Leber, und sensitiv auf TCDD reagieren. Durch diese beiden Eigenschaften sind die verwendeten Zelllinien geeignete Modelle, um die Wirkungen von TCDD auf den Glukosemetabolismus zu untersuchen.

Die toxischen Effekte von TCDD werden über den AhR und seine Signalkaskade vermittelt. Er kommt in allen Vertebraten und Geweben vor [49, 50]. Je höher die Affinität eines Liganden zum AhR ist, desto höher ist auch die Toxizität dieser Substanz [54, 55]. Bei den nichtnatürlichen Liganden besitzt TCDD die höchste Affinität zum AhR [56]. Nach Bindung eines Liganden wandert der AhR in den Zellkern und bildet mit ARNT ein Heterodimer [68]. Die Komplexbindung an die XRE-Elemente ist ein Indikator für die Aktivierung des AhR. Die Induktion der XRE-Bindung in C2C12- und MH1C1-Zellen durch TCDD beweist die Aktivierbarkeit des AhR-Komplexes und ermöglicht eine Einschätzung der Sensitivität der Zellen gegenüber TCDD. Beide Zelllinien zeigten eine signifikante Erhöhung der XRE-Luziferase-Aktivität, jedoch in unterschiedlichen Ausmaßen. Bei den Hepatomazellen MH1C1 konnte eine 6fache Induktion und bei den Myoblasten C2C12 eine 110fache Induktion gemessen werden. Im Vergleich dazu sind P19-Zellen (embryonale Karzinomazellen), die nur eine 2,2 fache Steigerung nach Transfektion mit dem gleichen XRE-Konstrukt zeigen [1], relativ unempfindlicher. Bemerkenswert ist, dass bei C2C12 auch die DMSO-Gruppe eine Veränderung in der Luziferase-Aktivität im Vergleich zu unbehandelten Zellen zeigte. Auch in P19-Zellen wird ein DMSO-Effekt auf XRE-Elemente verzeichnet. Dies gilt nicht für MH1C1. Der Mechanismus des DMSO-Effektes wurde in der vorliegenden Arbeit

nicht geklärt, ist aber auch aus anderen Zellmodellen gut bekannt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass beide Zelllinien auf TCDD mit der Aktivierung des AhR reagieren und dass die AhR-Signalkaskade unterschiedlich stark induziert wird.

5.2 Einfluss von TCDD auf die Glukoseaufnahme

Ein wichtiger Schritt im Glukosemetabolismus ist die Aufnahme von Glukose in die Zelle über die Glukosetransporter. Es ist bekannt, dass TCDD einen schädlichen Einfluss auf den Glukosemetabolismus hat, so dass unter anderem das *Wasting Syndrom* ausgelöst wird. Die Aufnahme von Glukose in die Zelle kann durch TCDD beeinflusst werden. So zeigten Enan und Matsumura, dass TCDD die Glukoseaufnahme in verschiedenen Geweben von Meerschweinchen, Mäusen und Ratten über die AhR-Kaskade inhibiert [145]. In den Zelllinien C2C12 und MH1C1 wurde die Glukoseaufnahmekapazität nach Inkubation mit 10 nM TCDD untersucht. Dabei war nur bei den Hepatomazellen eine verringerte Glukoseaufnahme messbar. Die Myoblasten wiesen an keinem der untersuchten Zeitpunkte eine signifikante Veränderung in der Glukoseaufnahme auf, obwohl bei den ihnen sowohl eine Abnahme in der Proteinmenge von GLUT1 und GLUT4 als auch eine Lokalisationsstörung beider Isoformen durch TCDD nachweisbar war. Bei den Hepatomazellen verringerte sich die GLUT-Proteinmenge, wobei jedoch bei beiden untersuchten Isoformen (GLUT1 und 2) keine Lokalisationsstörung auftrat. Beide Veränderungen könnten zu einer verminderten Glukoseaufnahme führen.

Untersuchungen an Adipozyten, die die gleichen Isoformen von GLUTs exprimieren wie Muskelzellen, zeigten nach 3h TCDD-Inkubation eine reduzierte Glukoseaufnahme auf 10% der Kontrollwerte [144]. Auch im Fettgewebe von TCDD-behandelten Meerschweinchen und Mäusen wurden verringerte Glukoseaufnahmen festgestellt [46, 143]. Die Abnahme begann innerhalb von 6h (Meerschweinchen) bzw. 24h (Mäuse) und hielt bei beiden über einen Zeitraum von 28-30d an. Die Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen stehen also im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen. Die untersuchten Zeitpunkte in dieser Arbeit wurden nach den Literaturwerten und den Ergebnissen der Proteinexpression und Immunfluoreszenz ausgewählt. Es könnte sein, dass bei den C2C12 in den Zeitfenstern von 3h und 25h der TCDD-Effekt nicht zum Tragen kommt. Eine weitere Ursache könnte in einer Kompensation der Funktionsausfälle durch GLUT1 liegen, da C2C12 noch relativ viel GLUT1 exprimieren. Das GLUT1-Protein wurde durch TCDD nicht so stark herunterreguliert wie das GLUT4-Protein, so dass der GLUT1 möglicherweise den Ausfall der GLUT4 kompensiert hat.

Auch im Pankreasgewebe der TCDD-behandelten Meerschweinchen (0,03-1 µg/kg/KG) konnte eine Reduzierung der Glukoseaufnahme gezeigt werden. Untersuchtes Lebergewebe, das die gleichen GLUT-Transporter wie das Pankreasgewebe besitzt, zeigte jedoch in der gleichen Studie eine Zunahme der Glukoseaufnahme nach TCDD-Behandlung. Ebenfalls eine Reduktion der Glukoseaufnahme im Pankreasgewebe von TCDD-behandelten Ratten (1 µg/kg/KG) zeigten Novelli und Mitarbeiter [146]. Sie untersuchten auch die GLUT2-Proteinmenge der Pankreaszellen, konnten aber keine signifikante Reduktion erkennen. In den hier untersuchten MH1C1 wurde jedoch sowohl eine Abnahme der Glukoseinkorporation als auch eine Abnahme der GLUT-Proteinmenge, insbesondere des zelltypspezifischen GLUT2, festgestellt. Diese uneinheitlichen Ergebnisse könnten durch die verschiedenen verwendeten TCDD-Konzentrationen oder unterschiedliche Kulturbedingungen (*in vivo* vs. *in vitro*) bedingt sein oder auf einen zelltypspezifischen (Pankreas vs. Leber) TCDD-Effekt schließen lassen.

5.3 Einfluss von TCDD auf die Proteinexpression und Lokalisation der GLUTs

Der erste Schritt im Glukosemetabolismus ist die Aufnahme von Glukose in die Zelle. Dies geschieht, wie in 1.3.1 näher erläutert, durch zwei Arten von Transportern, den aktiven Transporter SGLT und die passiven Glukosetransporter (GLUT). Bei Ratten, Meerschweinchen und Mäusen ist die Glukoseaufnahme im Fettgewebe und Pankreas durch TCDD reduziert [46, 145]. Die Analyse der GLUT-Expression zeigt, dass bei GLUT4 die mRNA-Menge und beim GLUT1 die Proteinmenge (um 40%) nach TCDD-Exposition abnehmen [143]. Die Lipoproteinlipase-Aktivität wird durch die verringerte, TCDD-vermittelte Glukoseaufnahme herunterreguliert [47]. Die Lipoproteinlipase ist wichtig für die Speicherung von Triglyceriden im Fettgewebe. Bei männlichen Ratten der Linie Sprague-Dawley, die für 2 oder 8 Tage mit 5-125mg/kg TCDD behandelt wurden, ist die Aktivität von Schlüsselenzymen der Glukoneogenese verändert. Dabei ist die Aktivität der Glukose-6-Phosphatase variabel und nicht dosisabhängig. Die Phosphoenol-Pyruvat-Carboxykinase dagegen wies bereits nach 2 Tagen eine Aktivitätsminderung auf. Die maximale Aktivitätsminderung bei der höchsten TCDD-Dosierung betrug 56% zur Kontrolle. Die Pyruvat-Carboxylase zeigte eine maximale Reduktion am achten Tag um 49% zur Kontrolle und nur eine leichte Verringerung nach 2 Tagen [147]. Zusätzlich dazu weisen TCDD exponierte pluripotente embryonale Karzinomazellen P19 eine Veränderung der subzellulären Lage der GLUT auf [1]. Diese Ergebnisse implizieren, dass TCDD nicht nur die Expression der GLUT beeinflusst, sondern auch die Prozessierung und den intrazellulären Transport dieser Proteine stört.

5.3.1 GLUT1

GLUT1 kommt im Organismus ubiquitär vor und stellt den basalen Glukosetransport für die Zellen bereit. In dieser Arbeit war von Interesse, ob der GLUT auf TCDD reagiert und wenn ja, in welcher Weise. In den Zelllinien MH1C1 und C2C12 konnte die Expression des GLUT1 nachgewiesen werden. GLUT1 ist während der Differenzierung der Muskelzelllinie C2C12 konstitutiv exprimiert. Die Proteinmenge von GLUT1 ist während der C2C12-Differenzierung konstant. Durch TCDD verringerte sich die GLUT1-Proteinmenge bei den undifferenzierten Myoblasten und den Hepatomazellen MH1C1 um ca. 40%. Auch Liu und Matsumura (1994) beschrieben für GLUT1 eine Verringerung der Proteinmenge in Hirngewebe von TCDD-exponierten Mäusen. Nach einer 40stündigen Expositionsdauer der Mäuse mit 116mg/kg TCDD wurde eine 35%ige Verminderung von GLUT1-Protein festgestellt [143]. In pluripotenten P19-Zellen kommt es ebenfalls zu einer Abnahme des GLUT1-Proteins durch TCDD [1]. Im Gegensatz zu Liu und Matsumura (1994) wurde bei P19-Zellen auch eine Abnahme der mRNA um 30-60% gemessen [1]. Bei den differenzierten C2C12 konnte in dieser Arbeit jedoch kein Effekt von TCDD auf die GLUT-Expression erkannt werden. Dieser Befund überrascht, eine Erklärung dafür konnte jedoch mit den bisher durchgeführten Experimenten nicht gefunden werden.

Neben der Menge des Glukosetransporterproteins ist seine Positionierung in der Zellmembran entscheidend für die Glukoseaufnahme. Deshalb wurde auch die Lokalisation von GLUT und eine mögliche Lageveränderung nach TCDD-Exposition mituntersucht. Bei den Myoblasten konnte nach 25h eine beginnende und nach 5d eine deutliche Veränderung der GLUT1-Lage gezeigt werden. Im Gegensatz zur normalen Anordnung, wo GLUT1 sich hauptsächlich in der Plasmamembran befindet, ist GLUT1 nach TCDD vermehrt zytoplasmatisch lokalisiert. GLUT1 ist in TCDD-exponierten Myoblasten stark reduziert nachweisbar. Dieses Ergebnis entspricht den Beobachtungen in P19-Zellen, wo eine Lokalisationsstörung des GLUT1 als Folge von TCDD auftrat. Auch hier zeigten behandelte Zellen ein verstärktes zytoplasmatisches Signal und ein verringertes Signal in der Plasmamembran [1].

Dass dieser Effekt nicht generell auftritt, sondern zelltypspezifisch ist, beweisen MH1C1-Zellen. In diesen Zellen verblieb GLUT1 und GLUT2 in der Plasmamembran unabhängig von einer TCDD-Exposition.

5.3.2 GLUT2

Obwohl der GLUT2 auf Proteinebene stark durch TCDD beeinflusst wird, konnte durch Immunfluoreszenz keine Lokalisationsveränderung in den Hepatomazellen bei diesem GLUT

festgestellt werden. Sowohl in den Kontrollen als auch in den behandelten Zellen lag der GLUT2 hauptsächlich in der Plasmamembran und zu geringeren Teilen im Zytoplasma vor. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen des GLUT1 und 4 bei den C2C12-Zellen. Vergleichende Arbeiten zur Lokalisation von GLUT2 unter TCDD-Einfluss wurden in der Literatur nicht gefunden. Es scheint demnach, dass TCDD bei den posttranslationalen Prozessen einen zelltyp- oder GLUT-spezifischen Effekt hat.

GLUT2 ist ein wichtiger Glukosetransporter für die Glukosehomöostase. Im Hinblick auf die gesamtregulatorische Funktion kommt der Betrachtung des GLUT2 eine besondere Bedeutung bei. Die GLUT2-Proteinmenge ist bei den Hepatomazellen durch TCDD signifikant vermindert. Der Effekt ist nachhaltig und hält über zehn Kulturtag bzw. mehrere Zellpassagen an. Besonders ausgeprägt war diese Verringerung am 5. und 7. Kulturtag. Im Intestinum und im Pankreas von *in vivo* exponierten Ratten und Mäusen konnte keine Reduktion des GLUT2-Proteins nachgewiesen werden [148, 146]. Diese abweichenden Ergebnisse könnten ihre Ursache in unterschiedlichen Expositionszeiten oder in gewebespezifischen Effekten haben. Weiterhin handelt es sich im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit um *in vivo*-Studien, bei der die lokale TCDD-Konzentration auf die Organe sehr verschieden ausfallen kann. In MH1C1 wurde der zelltypspezifische Transporter stärker durch das Dioxin beeinflusst als der ubiquitär vorkommende GLUT1. Eine Herunterregulierung des GLUT2 scheint daher ein wichtiger Punkt in der TCDD-bedingten Störung des Glukosemetabolismus zu sein.

5.3.3 GLUT4

Der GLUT4 ist der zelltypspezifische Glukosetransporter im Fett- und Muskelgewebe. Er reagiert sensibel auf Insulin. Bei niedrigen Plasmainsulinspiegeln liegt der GLUT4 hauptsächlich im Zytosol in Vesikeln vor. Nach einem Insulinreiz translozieren diese intrazellulären GLUTs zur Plasmamembran und erlauben einen gesteigerten Glukosetransport in die Zelle [110]. Störungen in der Expression von GLUT4 stehen ähnlich wie bei GLUT2 im Zusammenhang mit einer Diabetes mellitus-Erkrankung. C2C12-Myoblasten weisen, charakteristisch für Muskelzellen, sowohl im undifferenzierten als auch im differenzierten Stadium eine GLUT4-Expression auf. Die Expression nimmt mit der Differenzierung der Zellen zu Myotuben zu. Nach einer TCDD-Exposition verringerte sich die Proteinmenge ab dem 5. Kulturtag kontinuierlich und hochsignifikant. In den differenzierten Zellen zeigte TCDD diesen Effekt nicht. Warum dieser Effekt im differenzierten Zustand nicht auftritt, kann bislang nur vermutet werden. Am wahrscheinlichsten ist ein Zusammenhang mit Differenzierungsprozessen. Für eine Aussage dazu, müssten jedoch weitere Zeitpunk-

te untersucht werden. Die GLUT4-Verringerung in C2C12 durch TCDD entspricht der Abnahme der GLUT4-Proteinmenge bei P19-Zellen (um 20%) [149]. Die Reduktion fällt aber im Vergleich zu GLUT1 und 3 eher gering aus. Untersuchungen an Mäusen, die eine einzelne Dosis von 116 µg/kg TCDD bekommen haben, zeigten nach 40h eine Abnahme des GLUT4-Proteins im Fettgewebe um 40%. Hier wurde der GLUT4 stärker als der GLUT1 von TCDD beeinflusst[143]. Dies entspricht auch den Ergebnissen dieser Arbeit. Der GLUT4 wird in den C2C12 stärker durch TCDD reguliert als der GLUT1.

Nach diesem Befund und dem Wissen um eine Lageveränderung von GLUT1 durch TCDD wurde auch der GLUT4 bezüglich seiner Lokalisation untersucht. Er konnte in den Kontrollen mittels Immunfluoreszenz sowohl in der Plasmamembran als auch im Zytoplasma detektiert werden. Wie oben beschrieben führt ein Insulinreiz zu einer Translokation dieser Isoform von zytoplasmatischen Kompartimenten zur Plasmamembran. Untersuchungen mit Insulin konnten an dieser Zelllinie leider nicht durchgeführt werden, da die Zelllinie C2C12 insulinresistent ist [150, 151]. Bei den TCDD-behandelten Zellen konnte nach 25h eine Lokalisationsstörung des GLUT4 nachgewiesen werden. Das Immunfluoreszenz-Signal war nun nicht mehr in der Plasmamembran, sondern nur noch zellkernnah zu sehen. Die Ergebnisse der subzellulären Fraktionierung bekräftigen diese Aussage, weil der GLUT4 bei TCDD-behandelten C2C12 stärker in der Zytoplasma- als in der Plasmamembranfraktion vorhanden war. Dieser Effekt konnte durch Vorbehandlung der Zellen mit α -Naphthoflavon, welches TCDD-Effekte über eine AhR-Blockade antagonisiert, inhibiert werden. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Lokalisationsveränderung des GLUT4 über den AhR vermittelt wird. Auch in den pluripotenten P19-Zellen konnte unter TCDD-Einfluss eine veränderte Lage des GLUT4 festgestellt werden. Der GLUT4 kam bei ihnen nach TCDD-Einwirkung im Zellkern und punktförmig im Zytoplasma vor.

5.4 Potentielle Mechanismen der TCDD-Effekte auf GLUT

Die Ursachen für eine veränderte Lage der GLUT-Isoformen 1 und 4 könnte durch einen TCDD-Einfluss auf die Prozessierung dieser Proteine bedingt sein. Die Prozessierung der Proteine geschieht im endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Golgi-Apparat der Zelle. Im ER wird das GLUT-Protein so gefaltet, dass es schließlich mit 12 Helices die Plasmamembran durchspannen kann. Auch die Glykosylierung mit einem Oligosaccharid am Asparagin geschieht hier. An dieser Stelle könnte der nukleäre Faktor kappa B (NF-kappaB) eine Rolle spielen. Es handelt sich hierbei um einen Transkriptionsfaktor, der in allen Zelltypen und Geweben vorkommt und ein weites Spektrum an Genen inklusive Cytochrome P450 beeinflusst [152]. Er spielt eine zentrale Rolle bei zellulärem Stress, der z. B. durch

UV-Strahlung, freie Radikale, bakterielle und virale Antigene, aber auch durch Schadstoffe wie TCDD ausgelöst werden kann. Ein möglicher Mechanismus dabei ist die indirekte Regulierung über nukleäre Rezeptoren wie AhR [152]. Im Zusammenhang mit der Signalkaskade des NF-kappaB wurden ungefaltete und missgefaltete Proteine beschrieben, die dann zur einer inflammatorischen Antwort in der Zelle führen [153]. Dieser Mechanismus könnte auch zu einer fehlerhaften Lokalisierung der GLUT-Proteine führen.

Vom ER wird das Protein in Vesikeln zur cis-Seite des Golgi-Apparates transportiert, wo Modifikationen des Zuckerrestes vorgenommen werden. Danach schnüren sich Vesikel von der trans-Seite des Golgi-Netzes ab und transportieren die Proteine zur Membran. Für diesen Vesikeltransport sind sogenannte SNARE-Proteine wichtig. Sie könnten eine wichtige Zielgruppe für TCDD-induzierte Veränderungen sein, wenn auch bislang noch keine direkte Wirkung auf die SNARE-Proteine durch TCDD nachgewiesen werden konnte.

Weiterhin ist bekannt, dass der GLUT-Transport, insbesondere der insulinabhängige GLUT4-Transport zur Plasmamembran, von einem funktionsfähigem Aktin- und Mikrotubuli-Netzwerk abhängig ist. So zeigte eine Unterbrechung im Aktinzytoskelett in L6 Myotuben, 3T3-L1 Adipozyten und Adipozyten der Ratte eine Inhibierung der insulinvermittelten GLUT4-Translokation [154, 155, 156]. Auch eine Depolimerization der Mikrotubuli führte zu einer Umverteilung der zytoplasmatischen GLUT4-Speicher und einer Störung des Vesikeltransportes in Adipozyten [157, 158, 159]. Auch das Zytoskelett kommt als TCDD-Ziel daher mit hoher Wahrscheinlichkeit in Frage. Kurachi und Mitarbeiter führten eine generelle Analyse von Veränderungen in der Genexpression an Leberzellen der Maus durch TCDD durch. Die Genexpression in den Hepatozyten wurde 7 Tage nach der Behandlung mit einer oralen Einzeldosis von 20 µg/kg/KG TCDD untersucht. Von insgesamt 113067 untersuchten Genen wurden 346 Transkripte durch TCDD verändert. Wie erwartet waren darunter Gene, die Enzyme für Schadstoff-metabolisierende Enzyme und Enzyme der zellulären Stressantwort kodieren. Aber es waren auch Gene für Zytoskelett-verwandte Proteine, Signaltransduktionsproteine und Plasmaproteine in ihrer Genexpression verändert [160].

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss des Dioxins TCDD auf Glukoseaufnahme und -transport in Myoblasten (Zelllinie C2C12) und in Hepatomazellen (MH1C1) weiter aufzuklären. Hintergrund für diese Untersuchungen war, dass eine TCDD-Vergiftung zu einem pathologischen Gewichtsverlust beim Menschen führt (sog. *Wasting Syndrom*). Als potentielle Mechanismen wurden Expression, Lokalisation und Prozessierung von Glu-

kosetransportern (GLUT) und ihre Störung durch TCDD untersucht. Frühere Versuche aus unserer Arbeitsgruppe hatten nämlich gezeigt, dass TCDD die Glukoseaufnahme in embryonalen Karzinomazellen signifikant verringerte [1] und zu einer Abnahme der GLUT-Proteinmenge und zu einer veränderten GLUT-Lokalisation geführt hätten.

Beide Zelltypen verfügen über ein spezifisches, für den Zelltyp charakteristisches Expressionsprofil der Glukosetransporter. Sowohl in C2C12 als auch in MH1C1 findet sich GLUT1. Die C2C12 exprimieren außerdem den für Muskel- und Fettgewebe typischen GLUT4. Während der Differenzierung zu Myotuben nimmt die GLUT4-Expression zu (mRNA, Protein). Die MH1C1 exprimieren neben GLUT1 noch den zelltypspezifischen GLUT2.

Beide Zelllinien reagieren auf TCDD mit der Aktivierung der AhR-Signalkaskade. Der AhR ist ein ligand-aktivierter Transkriptionsfaktor und verantwortlich für die toxischen Wirkungen des TCDD. Der Nachweis der TCDD-Sensitivität wurde durch die Transfektion der Zellen mit Reportergenkonstrukten (XRE-Luziferase) nach Bindung des AhR/ARNT/TCDD-Komplexes geführt. Die Zelltypen zeigten unterschiedlich hohe Luziferaseaktivitäten, die C2C12 eine 110fache Induktion, die MH1C1 eine 6fache Induktion. Verglichen mit embryonalen Stammzellen (Anstieg auf das 2,2fache) reagieren demnach C2C12 und MH1C1 mit einer starken Genexpressionssteigerung auf TCDD.

Eine TCDD-Exposition führte in beiden Zelltypen zur Verringerung der GLUT-Isoformen. Die Proteinmengen der GLUT-Isoformen wurden mittels Western Blot und anschließender densitometrischer Auswertung bestimmt. In beiden Zelllinien sind die jeweiligen zelltypspezifischen GLUT stärker durch TCDD reguliert als der GLUT1. In C2C12 zeigte der GLUT4 eine hochsignifikante kontinuierliche Abnahme ab dem 5.Kulturtag, der GLUT2 war sogar über die gesamte Kulturzeit signifikant verringert. Die Proteinmengen in den differenzierten C2C12 blieb von TCDD unbeeinflusst. In MH1C1 nahm der GLUT2 stadienspezifisch ab.

Neben der verringerten Proteinmenge konnte auch eine Störung der subzellulären Anordnung der GLUTs als Folge einer TCDD-Exposition detektiert werden. In TCDD-behandelten C2C12-Zellen war der GLUT1 nicht in der Zellmembran sondern nur zytoplasmatisch lokalisiert. Das Signal in der Plasmamembran war reduziert bis aufgehoben. Diese Beobachtung konnte auch am GLUT4 gemacht werden. Hier zeigte sich die vermehrte zytosolische Lage bereits deutlich nach 25h. Die Lokalisationsstörung konnte durch α -Naphthoflavon inhibiert werden, was einen AhR-vermittelten TCDD-Effekt belegt. Auch in den von Tonack untersuchten P19-Zellen zeigte sich nach TCDD-Behandlung eine verän-

derte subzelluläre Lage von GLUT1 und 4 [149]. Sie beschrieb diesen Effekt als Erste an embryonalen Stammzellen. In der vorliegenden Arbeit konnte nun nachgewiesen werden, dass diese Lokalisationsveränderung auch bei adulten Zellen vorkommt. Die TCDD-Wirkung ist zelltypspezifisch, da solch eine Lageveränderung in den MH1C1 am GLUT2 trotz deutlicher TCDD-induzierter Expressionsminderung an keinem der untersuchten Zeitpunkte festgestellt werden konnte.

Die verringerte GLUT-Expression führt in MH1C1-Zellen zu einer reduzierten Glukoseaufnahmekapazität. Eine verminderte Anzahl an GLUTs und eine veränderte Lokalisation sind die wahrscheinlichen Ursachen dafür. Es war jedoch überraschend, dass in den Myoblasten C2C12, die sowohl eine GLUT-Proteinabnahme als auch eine veränderte GLUT-Lokalisation zeigten, keine verringerte Glukoseaufnahme gezeigt werden konnte. In den MH1C1 wurde jedoch nach 3h TCDD-Inkubation eine signifikante Reduzierung der Glukoseaufnahme festgestellt.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass TCDD in den behandelten Zelllinien zu Veränderungen führt, die eine Störung der Glukoseaufnahme und -verwertung bedingen können. Dabei greift TCDD in die Regulation der GLUT-Proteinsynthese ein und führt zur einer geringeren Menge an Glukosetransportern. Dies limitiert die Aufnahme von Glukose in die Zelle, obwohl Glukose als Substrat ausreichend vorliegt. Wichtig ist dabei, dass die TCDD-Wirkung zelltypabhängig ist, also sich zwischen Glukose-verwertenden Zellen deutlich unterscheidet, wie der Vergleich zwischen Muskel- und Leberzellen in der vorliegenden Arbeit belegt.

Literatur

- [1] Tonack S, Kind K, Thompson JG, Wobus AM, Fischer B, Santos AN (2007) Dioxin affects glucose transport via the arylhydrocarbon receptor signal cascade in pluripotent embryonic carcinoma cells. *Endocrinology* 148(12):5902–5912.
- [2] Becher G, Skaare JU, Polder A, Sletten B, Rossland OJ, Hansen HK, Ptashekas J (1995) PCDDs, PCDFs, and PCBs in human milk from different parts of Norway and Lithuania. *J Toxicol Environ Health* 46(2):133–148.
- [3] Brouwer A, Ahlborg UG, van Leeuwen FX, Feeley MM (1998) Report of the WHO working group on the assessment of health risks for human infants from exposure to PCDDs, PCDFs and PCBs. *Chemosphere* 37(9-12):1627–1643.
- [4] WHO Media Centre (1999). Dioxins and their effects on human health. Internet, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs225/en/>.

- [5] Abraham K, Knoll A, Ende M, Pöpke O, Helge H (1996) Intake, fecal excretion, and body burden of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in breast-fed and formula-fed infants. *Pediatr Res* 40(5):671–679.
- [6] van Leeuwen FX, Feeley M, Schrenk D, Larsen JC, Farland W, Younes M (2000) Dioxins: WHO's tolerable daily intake (TDI) revisited. *Chemosphere* 40(9-11):1095–1101.
- [7] Vito MD, Birnbaum L, Farland W, Gasiewicz T (1995) Comparisons of estimated human body burdens of dioxin-like chemicals and TCD body burdens in experimentally exposed animals. *Environ Health Perspect* 103:820–831.
- [8] Olson J (1994) Pharmacokinetics of dioxins and related chemicals. *Dioxins and Health*, Plenum Press :163–197.
- [9] Caramaschi F, del Corno G, Favaretti C, Giambelluca SE, Montesarchio E, Fara GM (1981) Chloracne following environmental contamination by TCDD in Seveso, Italy. *Int J Epidemiol* 10(2):135–143.
- [10] Aoki Y (2001) Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disruptors—what we have learned from Yusho disease. *Environ Res* 86(1):2–11.
- [11] Bisanti L, Bonetti F, Caramaschi F, Corno GD, Favaretti C, Giambelluca SE, Marni E, Montesarchio E, Puccinelli V, Remotti G, Volpato C, Zambrelli E, Fara GM (1980) Experiences from the accident of Seveso. *Acta Morphol Acad Sci Hung* 28(1-2):139–157.
- [12] Carli LD, Mottura A, Nuzzo F (1982) Cytogenetic investigation of the Seveso population exposed to TCDD. *National Academy Press* :292–317.
- [13] Tenchini ML, Crimando C, Pacchetti G, Mottura A, Agosti S, Carli LD (1983) A comparative cytogenetic study on cases of induced abortions in TCDD-exposed and nonexposed women. *Environ Mutagen* 5(1):73–85.
- [14] Rehder H, Sanchioni L, Cefis F, Gropp A (1978) [Pathological and embryological studies on abortion cases related to the Seveso accident]. *Schweiz Med Wochenschr* 108(42):1617–1625.

- [15] Mastroiacovo P, Spagnolo A, Marni E, Meazza L, Bertollini R, Segni G, Borgna-Pignatti C (1988) Birth defects in the Seveso area after TCDD contamination. *JAMA* 259(11):1668–1672.
- [16] Idéo G, Bellati G, Bellobuono A, Bissanti L (1985) Urinary D-glucaric acid excretion in the Seveso area, polluted by tetrachloro-dibenzo-p-dioxin (TCDD): five years of experience. *Environ Health Perspect* 60:151–157.
- [17] P Mocarelli PB A Marocci (1986) Clinical laboratory manifestations of exposure to dioxin in children. A six year study of the effects of an environmental disaster near Seveso, Italy. *JAMA* 256:2687–95.
- [18] Sirchia G (1982) Exposure to TCDD: immunologic effects. *National Acedemy Press* :234–66.
- [19] Filippini G, Bordo B, Crenna P, Massetto N, Musicco M, Boeri R (1981) Relationship between clinical and electrophysiological findings and indicators of heavy exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-dioxin. *Scand J Work Environ Health* 7(4):257–262.
- [20] Barbieri S, Pirovano C, Scarlato G, Tarchini P, Zappa A, Maranzana M (1988) Long-term effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the peripheral nervous system. Clinical and neurophysiological controlled study on subjects with chloracne from the Seveso area. *Neuroepidemiology* 7(1):29–37.
- [21] Gray LE, Kelce WR (1996) Latent effects of pesticides and toxic substances on sexual differentiation of rodents. *Toxicol Ind Health* 12(3-4):515–531.
- [22] Bosveld ATC, van den Berg M (2002) Reproductive failure and endocrine disruption by organohalogens in fish-eating birds. *Toxicology* 181-182:155–159.
- [23] Couture LA, Harris MW, Birnbaum LS (1990) Characterization of the peak period of sensitivity for the induction of hydronephrosis in C57BL/6N mice following exposure to 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Fundam Appl Toxicol* 15(1):142–150.
- [24] Couture-Haws L, Harris MW, McDonald MM, Lockhart AC, Birnbaum LS (1991) Hydronephrosis in mice exposed to TCDD-contaminated breast milk: identification of the peak period of sensitivity and assessment of potential recovery. *Toxicol Appl Pharmacol* 107(3):413–428.
- [25] Kerkvliet NI (1995) Immunological effects of chlorinated dibenzo-p-dioxins. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 9:47–53.

- [26] Mariussen E, Fonnum F (2006) Neurochemical targets and behavioral effects of organohalogen compounds: an update. *Crit Rev Toxicol* 36(3):253–289.
- [27] Vito MD, Birnbaum L (1994) Toxicology of dioxins and related chemicals. Plenum Press :139–62.
- [28] Huff J, Salmon A, Hooper N (1990) Long term carcinogenesis studies on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxins. *Cell Biol Toxicol* 7:67–94.
- [29] Johnsen E (1993) Important aspects of the evidence for TCDD carcinogenicity in man. *Environ Health Perspect* 99:383–90.
- [30] Warner M, Eskenazi B, Mocarelli P, Gerthoux PM, Samuels S, Needham L, Patterson D, Brambilla P (2002) Serum dioxin concentrations and breast cancer risk in the Seveso Women’s Health Study. *Environ Health Perspect* 110(7):625–628.
- [31] Ott MG, Zober A (1996) Cause specific mortality and cancer incidence among employees exposed to 2,3,7,8-TCDD after a 1953 reactor accident. *Occup Environ Med* 53(9):606–612.
- [32] Becher H, Flesch-Janys D, Kauppinen T, Kogevinas M, Steindorf K, Manz A, Wahrendorf J (1996) Cancer mortality in German male workers exposed to phenoxy herbicides and dioxins. *Cancer Causes Control* 7(3):312–321.
- [33] Fingerhut MA, Halperin WE, Marlow DA, Piacitelli LA, Honchar PA, Sweeney MH, Greife AL, Dill PA, Steenland K, Suruda AJ (1991) Cancer mortality in workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *N Engl J Med* 324(4):212–218.
- [34] Kogevinas M, Becher H, Benn T, Bertazzi PA, Boffetta P, de Mesquita HBB, Coggon D, Colin D, Flesch-Janys D, Fingerhut M, Green L, Kauppinen T, Littorin M, Lynge E, Mathews JD, Neuberger M, Pearce N, Saracci R (1997) Cancer mortality in workers exposed to phenoxy herbicides, chlorophenols, and dioxins. An expanded and updated international cohort study. *Am J Epidemiol* 145(12):1061–1075.
- [35] Henriksen GL, Ketchum NS, Michalek JE, Swaby JA (1997) Serum dioxin and diabetes mellitus in veterans of Operation Ranch Hand. *Epidemiology* 8(3):252–258.
- [36] Pazderova-Vejlupková J, Lukás E, Němcova M, Pícková J, Jirásek L (1981) The development and prognosis of chronic intoxication by tetrachlorodibenzo-p-dioxin in men. *Arch Environ Health* 36(1):5–11.

- [37] Sweeney M, Hornung R, Wall D, Fingerhut M, Halperin W (1992) Prevalence of diabetes and increased fasting serum glucose in workers with long-term exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Organohal Comp* 10:225–226.
- [38] Seefeld MD, Corbett SW, Keesey RE, Peterson RE (1984) Characterization of the wasting syndrome in rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol* 73(2):311–322.
- [39] Gasiewicz TA, Neal RA (1979) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin tissue distribution, excretion, and effects on clinical chemical parameters in guinea pigs. *Toxicol Appl Pharmacol* 51(2):329–339.
- [40] Brewster DW, Matsumura F (1984) TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) reduces lipoprotein lipase activity in the adipose tissue of the guinea pig. *Biochem Biophys Res Commun* 122(2):810–817.
- [41] Gupta BN, Vos JG, Moore JA, Zinkl JG, Bullock BC (1973) Pathologic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in laboratory animals. *Environ Health Perspect* 5:125–140.
- [42] McConnell EE, Moore JA, Haseman JK, Harris MW (1978) The comparative toxicity of chlorinated dibenzo-p-dioxins in mice and guinea pigs. *Toxicol Appl Pharmacol* 44(2):335–356.
- [43] Cranmer M, Louie S, Kennedy RH, Kern PA, Fonseca VA (2000) Exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) is associated with hyperinsulinemia and insulin resistance. *Toxicol Sci* 56(2):431–436.
- [44] Peterson R, Seefeld M, Christian B, Potter C, Kelling C, Keesey R (1984) The wasting syndrome in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity: basic features and their interpretation. *Banbury report (USA)* 18:291–308.
- [45] Neal RA, Beatty PW, Gasiewicz TA (1979) Studies of the mechanisms of toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Ann N Y Acad Sci* 320:204–213.
- [46] Enan E, Liu PC, Matsumura F (1992) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes reduction of glucose transporting activities in the plasma membranes of adipose tissue and pancreas from the guinea pig. *J Biol Chem* 267(28):19785–19791.

- [47] Olsen H, Enan E, Matsumura F (1998) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin mechanism of action to reduce lipoprotein lipase activity in the 3T3-L1 preadipocyte cell line. *J Biochem Mol Toxicol* 12(1):29–39.
- [48] Poland A, Glover E, Kende AS (1976) Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J Biol Chem* 251(16):4936–4946.
- [49] Hahn ME (2002) Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact* 141(1-2):131–160.
- [50] Okey AB, Riddick DS, Harper PA (1994) The Ah receptor: mediator of the toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds. *Toxicol Lett* 70(1):1–22.
- [51] Heath-Pagliuro S, Rogers W, Tullis K, Seidl S, Cenijm P, Brouwer A, Denison M (1998) Activation of Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites. *Biochemistry* 37:11508–11515.
- [52] Phelan D, Winter GM, Rogers WJ, Lam JC, Denison MS (1998) Activation of the Ah receptor signal transduction pathway by bilirubin and biliverdin. *Arch Biochem Biophys* 357(1):155–163.
- [53] Schaldach CM, Riby J, Bjeldanes LF (1999) Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor. *Biochemistry* 38(23):7594–7600.
- [54] Poland A, Knutson JC (1982) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 22:517–554.
- [55] Safe S (1990) Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs) and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Crit Rev Toxicol* 21:51–88.
- [56] Safe S (1984) Polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated biphenyls (PBBs): biochemistry, toxicology and mechanism of action. *Crit Rev Toxicol* 13:319–95.

- [57] Adachi J, Mori Y, Matsui S, Takigami H, Fujino J, Kitagawa H, Miller CA, Kato T, Saeki K, Matsuda T (2001) Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *J Biol Chem* 276(34):31475–31478.
- [58] Gasiewicz TA, Henry EC, Collins LL (2008) Expression and activity of aryl hydrocarbon receptors in development and cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 18(4):279–321.
- [59] Fernandez-Salguero P, Pineau T, Hilbert DM, McPhail T, Lee SS, Kimura S, Nebert DW, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ (1995) Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 268(5211):722–726.
- [60] Schmidt JV, Su GH, Reddy JK, Simon MC, Bradfield CA (1996) Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(13):6731–6736.
- [61] Abbott BD, Schmid JE, Pitt JA, Buckalew AR, Wood CR, Held GA, Diliberto JJ (1999) Adverse reproductive outcomes in the transgenic Ah receptor-deficient mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* 155(1):62–70.
- [62] Lahvis GP, Lindell SL, Thomas RS, McCuskey RS, Murphy C, Glover E, Bentz M, Southard J, Bradfield CA (2000) Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(19):10442–10447.
- [63] Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, Takahashi Y, Kume H, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y, Ishikawa T (2000) Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(2):779–782.
- [64] Peters JM, Narotsky MG, Elizondo G, Fernandez-Salguero PM, Gonzalez FJ, Abbott BD (1999) Amelioration of TCDD-induced teratogenesis in aryl hydrocarbon receptor (AhR)-null mice. *Toxicol Sci* 47(1):86–92.
- [65] Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nakao K, Ema M, Sogawa K, Yasuda M, Katsuki M, Fujii-Kuriyama Y (1997) Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells* 2(10):645–654.

- [66] Perdew GH (1988) Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein. *J Biol Chem* 263(27):13802–13805.
- [67] Petrusis JR, Hord NG, Perdew GH (2000) Subcellular localization of the aryl hydrocarbon receptor is modulated by the immunophilin homolog hepatitis B virus X-associated protein 2. *J Biol Chem* 275(48):37448–37453.
- [68] Hankinson O (1994) The role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein in aryl hydrocarbon receptor action. *Trends Endocrinol Metab* 5(6):240–244.
- [69] Park S, Henry EC, Gasiewicz TA (2000) Regulation of DNA binding activity of the ligand-activated aryl hydrocarbon receptor by tyrosine phosphorylation. *Arch Biochem Biophys* 381(2):302–312.
- [70] Mimura J, Ema M, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y (1999) Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev* 13(1):20–25.
- [71] Mimura J, Fujii-Kuriyama Y (2003) Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochimica et Biophysica Acta* 1619:263–268.
- [72] Savouret JF, Antenos M, Quesne M, Xu J, Milgrom E, Casper RF (2001) 7-ketocholesterol is an endogenous modulator for the arylhydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 276(5):3054–3059.
- [73] Reiners JJ, Clift R, Mathieu P (1999) Suppression of cell cycle progression by flavonoids: dependence on the aryl hydrocarbon receptor. *Carcinogenesis* 20(8):1561–1566.
- [74] Ashida H, Fukuda I, Yamashita T, Kanazawa K (2000) Flavones and flavonols at dietary levels inhibit a transformation of aryl hydrocarbon receptor induced by dioxin. *FEBS Lett* 476(3):213–217.
- [75] Gasiewicz TA, Kende AS, Rucci G, Whitney B, Willey JJ (1996) Analysis of structural requirements for Ah receptor antagonist activity: ellipticines, flavones, and related compounds. *Biochem Pharmacol* 52(11):1787–1803.
- [76] Turk E, Zabel B, Mundlos S, Dyer J, Wright EM (1991) Glucose/galactose malabsorption caused by a defect in the Na⁺/glucose cotransporter. *Nature* 350(6316):354–356.
- [77] Uldry M, Thorens B (2004) The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch* 447(5):480–489.

- [78] Joost HG, Bell GI, Best JD, Birnbaum MJ, Charron MJ, Chen YT, Doege H, James DE, Lodish HF, Moley KH, Moley JF, Mueckler M, Rogers S, Schürmann A, Seino S, Thorens B (2002) Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282(4):E974–E976.
- [79] Asano T, Takata K, Katagiri H, Ishihara H, Inukai K, Anai M, Hirano H, Yazaki Y, Oka Y (1993) The role of N-glycosylation in the targeting and stability of GLUT1 glucose transporter. *FEBS Lett* 324(3):258–261.
- [80] Mueckler M (1994) Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* 219(3):713–725.
- [81] Brown GK (2000) Glucose transporters: structure, function and consequences of deficiency. *J Inherit Metab Dis* 23(3):237–246.
- [82] Jung CY, Carlson LM, Whaley DA (1971) Glucose transport carrier activities in extensively washed human red cell ghosts. *Biochim Biophys Acta* 241(2):613–627.
- [83] Maher F, Vannucci SJ, Simpson IA (1994) Glucose transporter proteins in brain. *FASEB J* 8(13):1003–1011.
- [84] Simpson IA, Appel NM, Hokari M, Oki J, Holman GD, Maher F, Koehler-Stec EM, Vannucci SJ, Smith QR (1999) Blood-brain barrier glucose transporter: effects of hypo- and hyperglycemia revisited. *J Neurochem* 72(1):238–247.
- [85] Vannucci SJ, Reinhart R, Maher F, Bondy CA, Lee WH, Vannucci RC, Simpson IA (1998) Alterations in GLUT1 and GLUT3 glucose transporter gene expression following unilateral hypoxia-ischemia in the immature rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 107(2):255–264.
- [86] Uldry M, Ibberson M, Hosokawa M, Thorens B (2002) GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Lett* 524(1-3):199–203.
- [87] Klepper J, Voit T (2002) Facilitated glucose transporter protein type 1 (GLUT1) deficiency syndrome: impaired glucose transport into brain— a review. *Eur J Pediatr* 161(6):295–304.
- [88] Seidner G, Alvarez MG, Yeh JI, O’Driscoll KR, Klepper J, Stump TS, Wang D, Spinner NB, Birnbaum MJ, Vivo DCD (1998) GLUT-1 deficiency syndrome caused by haploinsufficiency of the blood-brain barrier hexose carrier. *Nat Genet* 18(2):188–191.

- [89] Mueckler M, Makepeace C (2002) Analysis of transmembrane segment 10 of the Glut1 glucose transporter by cysteine-scanning mutagenesis and substituted cysteine accessibility. *J Biol Chem* 277(5):3498–3503.
- [90] Zuniga FA, Shi G, Haller JF, Rubashkin A, Flynn DR, Iserovich P, Fischbarg J (2001) A three-dimensional model of the human facilitative glucose transporter Glut1. *J Biol Chem* 276(48):44970–44975.
- [91] Baldwin SA, Lienhard GE (1989) Purification and reconstitution of glucose transporter from human erythrocytes. *Methods Enzymol* 174:39–50.
- [92] Kasahara T, Kasahara M (1996) Expression of the rat GLUT1 glucose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 315 (Pt 1):177–182.
- [93] Mueckler M, Weng W, Kruse M (1994) Glutamine 161 of Glut1 glucose transporter is critical for transport activity and exofacial ligand binding. *J Biol Chem* 269(32):20533–20538.
- [94] Johnson JH, Newgard CB, Milburn JL, Lodish HF, Thorens B (1990) The high Km glucose transporter of islets of Langerhans is functionally similar to the low affinity transporter of liver and has an identical primary sequence. *J Biol Chem* 265(12):6548–6551.
- [95] Thorens B, Cheng ZQ, Brown D, Lodish HF (1990) Liver glucose transporter: a basolateral protein in hepatocytes and intestine and kidney cells. *Am J Physiol* 259(6 Pt 1):C279–C285.
- [96] Wright EM, Turk E (2004) The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch* 447(5):510–518.
- [97] Guillam MT, Dupraz P, Thorens B (2000) Glucose uptake, utilization, and signaling in GLUT2-null islets. *Diabetes* 49(9):1485–1491.
- [98] Matschinsky F (1996) A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 45:223–241.
- [99] Maechler P, Carobbio S, Rubi B (2006) In beta-cells, mitochondria integrate and generate metabolic signals controlling insulin secretion. *Int J Biochem Cell Biol* 38(5-6):696–709.

- [100] Postic C, Burcelin R, Rencurel F, Pegorier JP, Loizeau M, Girard J, Leturque A (1993) Evidence for a transient inhibitory effect of insulin on GLUT2 expression in the liver: studies in vivo and in vitro. *Biochem J* 293 (Pt 1):119–124.
- [101] Burcelin R, Thorens B (2001) Evidence that extrapancreatic GLUT2-dependent glucose sensors control glucagon secretion. *Diabetes* 50(6):1282–1289.
- [102] Burcelin R, Dolci W, Thorens B (2000) Glucose sensing by the hepatoportal sensor is GLUT2-dependent: in vivo analysis in GLUT2-null mice. *Diabetes* 49(10):1643–1648.
- [103] Guillam MT, Hümmler E, Schaerer E, Yeh JI, Birnbaum MJ, Beermann F, Schmidt A, Dériaz N, Thorens B, Wu JY (1997) Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islet development in mice lacking Glut-2. *Nat Genet* 17(3):327–330.
- [104] Santer R, Groth S, Kinner M, Dombrowski A, Berry GT, Brodehl J, Leonard JV, Moses S, Norgren S, Skovby F, Schneppenheim R, Steinmann B, Schaub J (2002) The mutation spectrum of the facilitative glucose transporter gene SLC2A2 (GLUT2) in patients with Fanconi-Bickel syndrome. *Hum Genet* 110(1):21–29.
- [105] Nelson JA, Falk RE (1993) Phloridzin and phloretin inhibition of 2-deoxy-D-glucose uptake by tumor cells in vitro and in vivo. *Anticancer Res* 13(6A):2293–2299.
- [106] Haber RS, Weinstein SP, O’Boyle E, Morgello S (1993) Tissue distribution of the human GLUT3 glucose transporter. *Endocrinology* 132(6):2538–2543.
- [107] Stuart CA, Wen G, Jiang J (1999) GLUT3 protein and mRNA in autopsy muscle specimens. *Metabolism* 48(7):876–880.
- [108] Kayano T, Fukumoto H, Eddy RL, Fan YS, Byers MG, Shows TB, Bell GI (1988) Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. Sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues. *J Biol Chem* 263(30):15245–15248.
- [109] Kupriyanova TA, Kandror V, Kandror KV (2002) Isolation and characterization of the two major intracellular Glut4 storage compartments. *J Biol Chem* 277(11):9133–9138.
- [110] Yang J, Clark AE, Harrison R, Kozka IJ, Holman GD (1992) Trafficking of glucose transporters in 3T3-L1 cells. Inhibition of trafficking by phenylarsine oxide implicates a slow dissociation of transporters from trafficking proteins. *Biochem J* 281 (Pt 3):809–817.

- [111] Gumà A, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H, Klip A (1995) Insulin induces translocation of GLUT-4 glucose transporters in human skeletal muscle. *Am J Physiol* 268(4 Pt 1):E613–E622.
- [112] Zorzano A, Muñoz P, Camps M, Mora C, Testar X, Palacín M (1996) Insulin-induced redistribution of GLUT4 glucose carriers in the muscle fiber. In search of GLUT4 trafficking pathways. *Diabetes* 45 Suppl 1:S70–S81.
- [113] Goodyear LJ, Hirshman MF, Napoli R, Calles J, Markuns JF, Ljungqvist O, Horton ES (1996) Glucose ingestion causes GLUT4 translocation in human skeletal muscle. *Diabetes* 45(8):1051–1056.
- [114] Slot JW, Geuze HJ, Gigengack S, James DE, Lienhard GE (1991) Translocation of the glucose transporter GLUT4 in cardiac myocytes of the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(17):7815–7819.
- [115] Stenbit AE, Tsao TS, Li J, Burcelin R, Geenen DL, Factor SM, Houseknecht K, Katz EB, Charron MJ (1997) GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. *Nat Med* 3(10):1096–1101.
- [116] Katz EB, Stenbit AE, Hatton K, DePinho R, Charron MJ (1995) Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4. *Nature* 377(6545):151–155.
- [117] Barone S, Fussell SL, Singh AK, Lucas F, Xu J, Kim C, Wu X, Yu Y, Amlal H, Seidler U, Zuo J, Soleimani M (2009) Slc2a5 (Glut5) Is Essential for the Absorption of Fructose in the Intestine and Generation of Fructose-induced Hypertension. *J Biol Chem* 284(8):5056–5066.
- [118] Mantych GJ, James DE, Devaskar SU (1993) Jejunal/kidney glucose transporter isoform (Glut-5) is expressed in the human blood-brain barrier. *Endocrinology* 132(1):35–40.
- [119] Zierath JR, Nolte LA, Wahlström E, Galuska D, Shepherd PR, Kahn BB, Wallberg-Henriksson H (1995) Carrier-mediated fructose uptake significantly contributes to carbohydrate metabolism in human skeletal muscle. *Biochem J* 311 (Pt 2):517–521.
- [120] Joost HG, Thorens B (2001) The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol* 18(4):247–256.

- [121] Cheeseman C (2008) GLUT7: a new intestinal facilitated hexose transporter. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295(2):E238–E241.
- [122] Phay JE, Hussain HB, Moley JF (2000) Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family, SLC2A9 (GLUT9). *Genomics* 66(2):217–220.
- [123] Matsuo H, Chiba T, Nagamori S, Nakayama A, Domoto H, Phetdee K, Wiriyasermkul P, Kikuchi Y, Oda T, Nishiyama J, Nakamura T, Morimoto Y, Kamakura K, Sakurai Y, Nonoyama S, Kanai Y, Shinomiya N (2008) Mutations in glucose transporter 9 gene SLC2A9 cause renal hypouricemia. *Am J Hum Genet* 83(6):744–751.
- [124] Doege H, Bocianski A, Scheepers A, Axer H, Eckel J, Joost HG, Schürmann A (2001) Characterization of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle. *Biochem J* 359(Pt 2):443–449.
- [125] Sasaki T, Minoshima S, Shiohama A, Shintani A, Shimizu A, Asakawa S, Kawasaki K, Shimizu N (2001) Molecular cloning of a member of the facilitative glucose transporter gene family GLUT11 (SLC2A11) and identification of transcription variants. *Biochem Biophys Res Commun* 289(5):1218–1224.
- [126] Wu X, LI W, Sharma V, Godzik A, Freeze H (2002) Cloning and characterization of glucose transporter 11, a novel sugar transporter that is alternatively spliced in various tissues. *Mol Genet Metabolism* 76:37–45.
- [127] Doege H, Bocianski A, Joost HG, Schürmann A (2000) Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes. *Biochem J* 350 Pt 3:771–776.
- [128] Ibberson M, Uldry M, Thorens B (2000) GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *J Biol Chem* 275(7):4607–4612.
- [129] Carayannopoulos MO, Chi MM, Cui Y, Pingsterhaus JM, McKnight RA, Mueckler M, Devaskar SU, Moley KH (2000) GLUT8 is a glucose transporter responsible for insulin-stimulated glucose uptake in the blastocyst. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(13):7313–7318.

- [130] Doege H, Schürmann A, Bahrenberg G, Brauers A, Joost HG (2000) GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *J Biol Chem* 275(21):16275–16280.
- [131] Reagan LP, Rosell DR, Alves SE, Hoskin EK, McCall AL, Charron MJ, McEwen BS (2002) GLUT8 glucose transporter is localized to excitatory and inhibitory neurons in the rat hippocampus. *Brain Res* 932(1-2):129–134.
- [132] Schürmann A, Axer H, Scheepers A, Doege H, Joost HG (2002) The glucose transport facilitator GLUT8 is predominantly associated with the acrosomal region of mature spermatozoa. *Cell Tissue Res* 307(2):237–242.
- [133] Schmidt S, Joost HG, Schürmann A (2009) GLUT8, the enigmatic intracellular hexose transporter. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E614–E618.
- [134] Gorovits N, Cui L, Busik JV, Ranalletta M, de Mouzon SH, Charron MJ (2003) Regulation of hepatic GLUT8 expression in normal and diabetic models. *Endocrinology* 144(5):1703–1711.
- [135] Dawson PA, Mychaleckyj JC, Fossey SC, Mihic SJ, Craddock AL, Bowden DW (2001) Sequence and functional analysis of GLUT10: a glucose transporter in the Type 2 diabetes-linked region of chromosome 20q12-13.1. *Mol Genet Metab* 74(1-2):186–199.
- [136] McVie-Wylie AJ, Lamson DR, Chen YT (2001) Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters, SLC2a10 (GLUT10), localized on chromosome 20q13.1: a candidate gene for NIDDM susceptibility. *Genomics* 72(1):113–117.
- [137] Rogers S, Macheda ML, Docherty SE, Carty MD, Henderson MA, Soeller WC, Gibbs EM, James DE, Best JD (2002) Identification of a novel glucose transporter-like protein-GLUT-12. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282(3):E733–E738.
- [138] Macheda ML, Williams ED, Best JD, Wlodek ME, Rogers S (2003) Expression and localisation of GLUT1 and GLUT12 glucose transporters in the pregnant and lactating rat mammary gland. *Cell Tissue Res* 311(1):91–97.
- [139] Rogers S, Chandler JD, Clarke AL, Petrou S, Best JD (2003) Glucose transporter GLUT12-functional characterization in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 308(3):422–426.

- [140] Rogers S, Docherty SE, Slavin JL, Henderson MA, Best JD (2003) Differential expression of GLUT12 in breast cancer and normal breast tissue. *Cancer Lett* 193(2):225–233.
- [141] Yaffe D, Saxel O (1977) Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 270(5639):725–727.
- [142] Richardson UI, Tashjian AH, Levine L (1969) Establishment of a clonal strain of hepatoma cells which secrete albumin. *J Cell Biol* 40(1):236–247.
- [143] Liu PC, Matsumura F (1994) Differential effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the "adipose-type" and "brain-type" glucose transporters in mice. *Mol Pharmacol* 47(1):65–73.
- [144] Olsen H, Enan E, Matsumura F (1994) Regulation of glucose transport in the NIH 3T3 L1 preadipocyte cell line by TCDD. *Environ Health Perspect* 102(5):454–458.
- [145] Enan E, Matsumura F (1994) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced changes in glucose transporting activity in guinea pigs, mice, and rats in vivo and in vitro. *J Biochem Toxicol* 9(2):97–106.
- [146] Novelli M, Piaggi S, Tata VD (2005) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced impairment of glucose-stimulated insulin secretion in isolated rat pancreatic islets. *Toxicol Lett* 156(2):307–314.
- [147] Weber LW, Lebofsky M, Greim H, Rozman K (1991) Key enzymes of gluconeogenesis are dose-dependently reduced in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-treated rats. *Arch Toxicol* 65(2):119–123.
- [148] Ishida T, Kan-o S, Mutoh J, Takeda S, Ishii Y, Hashiguchi I, Akamine A, Yamada H (2005) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced change in intestinal function and pathology: evidence for the involvement of arylhydrocarbon receptor-mediated alteration of glucose transportation. *Toxicol Appl Pharmacol* 205(1):89–97.
- [149] Tonack S (2005) Untersuchungen zum Glukosemetabolismus und der Toxizität von TCDD während der Differenzierung von embryonalen Stamm- und Karzinomzellen der Maus. Ph.D. thesis, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- [150] Tortorella LL, Pilch PF (2002) C2C12 myocytes lack an insulin-responsive vesicular compartment despite dexamethasone-induced GLUT4 expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283(3):E514–E524.

- [151] Kotliar N, Pilch PF (1992) Expression of the glucose transporter isoform GLUT 4 is insufficient to confer insulin-regulatable hexose uptake to cultured muscle cells. *Mol Endocrinol* 6(3):337–345.
- [152] Zordoky BNM, El-Kadi AOS (2009) Role of NF-kappaB in the regulation of cytochrome P450 enzymes. *Curr Drug Metab* 10(2):164–178.
- [153] Zhang K, Kaufman RJ (2008) From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 454(7203):455–462.
- [154] Tsakiridis T, Vranic M, Klip A (1994) Disassembly of the actin network inhibits insulin-dependent stimulation of glucose transport and prevents recruitment of glucose transporters to the plasma membrane. *J Biol Chem* 269(47):29934–29942.
- [155] Wang Q, Bilan PJ, Tsakiridis T, Hinek A, Klip A (1998) Actin filaments participate in the relocalization of phosphatidylinositol3-kinase to glucose transporter-containing compartments and in the stimulation of glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J* 331 (Pt 3):917–928.
- [156] Omata W, Shibata H, Li L, Takata K, Kojima I (2000) Actin filaments play a critical role in insulin-induced exocytotic recruitment but not in endocytosis of GLUT4 in isolated rat adipocytes. *Biochem J* 346 Pt 2:321–328.
- [157] Molero JC, Whitehead JP, Meerloo T, James DE (2001) Nocodazole inhibits insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes via a microtubule-independent mechanism. *J Biol Chem* 276(47):43829–43835.
- [158] Guilherme A, Emoto M, Buxton JM, Bose S, Sabini R, Theurkauf WE, Leszyk J, Czech MP (2000) Perinuclear localization and insulin responsiveness of GLUT4 requires cytoskeletal integrity in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 275(49):38151–38159.
- [159] Semiz S, Park JG, Nicoloso SMC, Furciniti P, Zhang C, Chawla A, Leszyk J, Czech MP (2003) Conventional kinesin KIF5B mediates insulin-stimulated GLUT4 movements on microtubules. *EMBO J* 22(10):2387–2399.
- [160] Kurachi M, Ichi Hashimoto S, Obata A, Nagai S, Nagahata T, Inadera H, Sone H, Tohyama C, Kaneko S, Ichi Kobayashi K, Matsushima K (2002) Identification of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-responsive genes in mouse liver by serial analysis of gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 292(2):368–377.

7 Thesen

1. Eine Ursache des nach Dioxin-Exposition beobachteten *Wasting Syndroms* ist die Störung der Glukoseaufnahme in die Zelle. Ziel der Arbeit war es, mögliche Ursachen in einem In-vitro-Model aufzuklären. Dazu wurden Zelllinien aus zwei für den Glukosestoffwechsel besonders wichtigen Organen, aus Leber (MH1C1) und Muskel (C2C12), ausgesucht und auf ihre GLUT-Expressionsmuster und Reaktion auf 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) untersucht.
2. Bei Leberzellen der Zelllinie MH1C1 führt TCDD zu einer Verringerung der Glukoseaufnahme. Ursächlich verantwortlich dafür ist die Abnahme von GLUT1 und GLUT2 unter TCDD-Behandlung.
3. Die Proteinmenge des zelltypenspezifischen GLUT1 ist durch TCDD in C2C12- und MH1C1-Zellen am 7. Kulturtag verringert. Auch in diesem Fall liegt die wahrscheinlichste Ursache für die verminderte Glukoseaufnahme in der verminderten GLUT-Expression. Die zelltypspezifischen Glukosetransporter GLUT2 und GLUT4 werden durch TCDD zu früheren Zeitpunkten und stärker als der ubiquitär-vorkommende GLUT1 beeinflusst.
4. Als weitere Ursache für die verminderte Glukoseaufnahme erwies sich die Störung der subzellulären Organisation und des Transportes der GLUTs in die Plasmamembran. In den C2C12-Zellen werden sowohl GLUT1 als auch GLUT4 in ihrer Lokalisation durch TCDD verändert. Nach TCDD-Exposition kommen sie vermehrt im Zytoplasma und vermindert in der Plasmamembran vor.
5. Der Mechanismus der TCDD-induzierten Lokalisationsstörungen der GLUTs ist AhR-abhängig. Die Inhibierung des AhR durch α -Naphthoflavon führt zur Aufhebung der TCDD-Wirkung und zu der in C2C12 normalen Lokalisation des GLUT4 in der Plasmamembran. Dies zeigt, dass der AhR direkt oder indirekt die Prozessierung und den Transport der GLUTs beeinflusst.

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- und Nachname	Friederike Neukirchner
Geburtsdatum	20.06.1983
Geburtsort	Hildesheim
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Berufliche Tätigkeit

Seit April 2009	Assistenzärztin in der Frauenklinik des Städtischen Klinikums Braunschweig
-----------------	----------------------------------------------------------------------------

Praktisches Jahr

März - Juli 2008	Gynäkologie/Geburtshilfe, Krankenhaus St. Elisabeth u. St. Barbara in Halle (Saale)
Dezember 2007 - März 2008	Innere Medizin, Spital Zimmerberg in Horgen, Schweiz
August - Dezember 2007	Chirurgie, Krankenhaus St. Elisabeth u. St. Barbara in Halle (Saale)

Famulaturen

Februar - März 2007	Pädiatrie, Praxis in Hildesheim
August - September 2006	Anästhesie/Intensivmedizin, Universitätsklinikum Halle (Saale)
Juli - August 2006	Nephrologie, Städtisches Klinikum Braunschweig
August 2005	Gynäkologie/Geburtshilfe, Vogtlandklinikum Plauen
Februar - März 2005	Allgemeinmedizin, Praxis in Diekholzen

Studium

Dezember 2008	Bestehen des zweiten Staatsexamens
September 2004	Erwerb des Physikums (Ärztliche Vorprüfung)
Oktober 2002	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Schulbildung

1993 - 2002	Gymnasium Marienschule in Hildesheim
1989 - 1993	Grundschule Diekholzen

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt, sowie aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen also solche kenntlich gemacht habe.

Friederike Neukirchner

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass es keine früheren Promotionsversuche gegeben hat und die vorliegende Arbeit somit den ersten von mir unternommenen Promotionsversuch darstellt.

Friederike Neukirchner

Veröffentlichungen

- Meinhard F, Fischer B, Navarrete Santos A, Tonack S (2007) Dioxin interferes specifically with glucose transport in myoblast and hepatoma cells. 102nd International Meeting of the Anatomische Gesellschaft AnatGes2007, abstract
- Posterpräsentation auf dem 102nd International Meeting of the Anatomische Gesellschaft AnatGes2007, Gießen 2007

Danksagung

Nach Abschluss der vorliegenden Arbeit bedanke ich mich herzlich bei Allen, die mich bei der Planung und Durchführung meiner Dissertation unterstützt haben:

Prof. Dr.med., Dr.agr. Bernd Fischer danke ich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in seinem Institut, für die Diskussionen und das stete Interesse an meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Anne Navarrete Santos für die vielen wissenschaftlichen Anregungen und Diskussionen, die gute Zusammenarbeit und die herzliche Unterstützung im Verlauf dieser Arbeit.

Ein ganz großes Dankeschön geht an Dr. Sarah Tonack, die mich in jeder Phase dieser Arbeit in vielen Bereichen unterstützt hat. Sie war bei der Einführung in die Methodik geduldig, zeigte stets Interesse an dieser Arbeit, gab mir viele Anregungen, half bei technischen Problemen und hatte immer ein offenes Ohr für mich. Danke für diese sehr gute Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Heidi Foth aus dem Institut für Umwelttoxikologie für die Benutzung der Zentrifugen für die Methode der subzellulären Fraktionierung bedanken.

Für die hilfreiche Unterstützung bei den Laborarbeiten möchte ich mich bei den MTAs Michaela Kirstein, Elisabeth Schlüter und Christine Fröhlich bedanken.

Letztendlich möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, insbesondere bei meinem Ehemann Moritz Neukirchner. Er hat mir durch sein Verständnis, seine Geduld und Motivation den benötigten Rückhalt gegeben, diese Dissertation fertigzustellen.