

Die Rolle des Glucosetransporters 8 (Slc2a8) in der Regulation der Glucosehomöostase, der Spermienmotilität sowie des Verhaltens

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
"doctor rerum naturalium" (Dr. rer. nat.)

angefertigt am Deutschen Institut für Ernährungsforschung, Abteilung Pharmakologie
und eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Universität Potsdam

vorgelegt von Diplom-Biologin
Verena Behrens (geb. Gawlik)
aus Bremen

Potsdam-Rehbrücke, im April 2009

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:
Namensnennung - Keine kommerzielle Nutzung - Weitergabe unter gleichen
Bedingungen 3.0 Deutschland

Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Online veröffentlicht auf dem

Publikationsserver der Universität Potsdam:

URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2009/3630/>

URN urn:nbn:de:kobv:517-opus-36308

[<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-36308>]

Die vorliegende Dissertation wurde mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Potsdam in der Wissenschaftsdisziplin Molekulare Zellbiologie am Deutschen Institut für Ernährungsforschung unter Aufsicht von Herrn Prof. Dr. Dr. H.-G. Joost angefertigt.

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. Dr. H.-G. Joost
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. H. Koepsell
3. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. J. Eckel

Tag der mündlichen Prüfung: 26.08.2009

Ernst zu nehmende Forschung erkennt man daran,
daß plötzlich zwei Probleme existieren, wo es vorher nur eines gegeben hat.

Thorstein B. Veblen

Inhalt

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	GLUCOSE UND GLUCOSETRANSPORT.....	1
1.2	DIE SGLT-FAMILIE	1
1.3	DIE GLUT-FAMILIE	2
1.3.1	Der Klasse-III-Transporter GLUT8.....	3
1.3.2	GLUT8, ein intrazellulärer Glucosetransporter	3
1.4	AUFBAU DER HODEN.....	4
1.5	SPERMIENBILDUNG	5
1.5.1	Spermatogenese.....	5
1.5.2	Spermiogenese.....	7
1.6	SPERMIENAUFBAU.....	7
1.7	SPERMATOGENESEWELLE	8
1.8	SPERMIENREIFUNG	8
1.8.1	Nebenhodenreifung	9
1.8.2	Kapazitation	9
1.8.3	Akrosomreaktion	9
1.9	ROLLE VON GLUCOSE IN DER FORTPFLANZUNG.....	10
1.10	ERSTELLUNG EINER <i>SLC2A8-KNOCKOUT</i> -MAUS (<i>SLC2A8^{-/-}</i> -MAUS).....	11
1.11	PUBLIZIERTE MURINE DELETIONEN VON GLUCOSETRANSPORTERN DER GLUT-FAMILIE.....	13
1.11.1	Der embryonal letale Phänotyp der <i>Slc2a1^{-/-}</i> -Mäuse.....	13
1.11.2	Der diabetische Phänotyp der <i>Slc2a2^{-/-}</i> -Mäuse	13
1.11.3	Der embryonal letale Phänotyp der <i>Slc2a3^{-/-}</i> -Mäuse.....	14
1.11.4	Der diabetische Phänotyp der <i>Slc2a4^{-/-}</i> -Mäuse	14
1.12	ROLLE VON GLUT8 IN DER GLUCOSEHOMÖOSTASE DES KÖRPERS	15
1.12.1	Mögliche Funktion von GLUT8 in den Keimzellen.....	15
1.12.2	Mögliche Funktion von GLUT8 im Gehirn.....	16
1.12.3	Mögliche Funktion von GLUT8 in weiteren Geweben	17
1.13	ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	18
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	MATERIAL.....	19
2.1.1	Verwendete Antikörper	19
2.1.1.1	Primärantiseren.....	19
2.1.1.2	Sekundärantikörper.....	19
2.1.2	Synthetische Oligonukleotide (<i>primer</i>).....	19
2.1.2.1	<i>primer</i> für die Genotypisierung der <i>Slc2a8^{-/-}</i> -Mäuse.....	19
2.1.2.2	<i>primer</i> für die cDNA-Synthese	19
2.1.3	qRT-PCR-Sonden.....	19
2.1.4	Enzyme und Reaktionskits.....	20
2.1.5	Medien, Puffer und Lösungen.....	21

2.1.6	Mausdiäten.....	21
2.2	METHODEN.....	21
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	21
2.2.1.1	Isolierung von genomischer DNA aus Mausschwänzen	21
2.2.1.2	Isolierung von RNA aus Gewebe	22
2.2.1.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	22
2.2.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR)	22
2.2.1.5	Agarose-Gelelektrophorese	23
2.2.1.6	cDNA-Synthese aus RNA	23
2.2.1.7	Analyse der Genexpression mittels qRT-PCR	24
2.2.2	Zellbiologische Methoden	24
2.2.2.1	Spermienisolation	24
2.2.2.2	Bestimmung der zytoplasmatischen und mitochondrialen Kalziumkonzentration von Spermien.....	25
2.2.2.3	Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials der Spermien	25
2.2.2.4	Bestimmung des ATP-Gehalts der Spermien	26
2.2.2.5	Bestimmung der Anzahl der lebenden Spermien.....	26
2.2.2.6	Ermittlung der Glucoseaufnahme der Spermien	26
2.2.2.7	Bestimmung der Spermienzahl und -motilität.....	26
2.2.3	Biochemische Methoden.....	27
2.2.3.1	Membranfraktionierung	27
2.2.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	27
2.2.3.3	Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)	27
2.2.3.4	Westernblotting nach Towbin <i>et al.</i> (1979).....	29
2.2.3.5	Immunologischer Nachweis des Antigens auf dem Blot.....	30
2.2.3.6	Lektin-Blot	31
2.2.3.7	Glykogenbestimmung aus Gewebe	31
2.2.3.8	ATP-Bestimmung aus Gewebe.....	32
2.2.4	Histologie und indirekte Immunhistochemie	32
2.2.4.1	Fixierung und Einbettung von Gewebe sowie Herstellung von Paraffinschnitten.....	32
2.2.4.2	Perfusion der Maus zur vollständigen Fixierung des Gehirns	33
2.2.4.3	Entparaffinierung.....	33
2.2.4.4	Entwässerung	34
2.2.4.5	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung).....	34
2.2.4.6	<i>Periodic-acid-Schiff</i> -Färbung (PAS-Färbung).....	34
2.2.4.7	<i>Pisum-sativum</i> -Agglutinin-Färbung (PSA-Färbung)	35
2.2.4.8	Immunhistochemischer Nachweis von GLUT8	35
2.2.4.9	Elektronenmikroskopie.....	35
2.2.5	Phänotypische Charakterisierung der <i>Slc2a8</i> ^{-/-} -Mäuse	36
2.2.5.1	Versuchstierhaltung	36
2.2.5.2	Zeitplan der verschiedenen Messungen der Versuchstiere	36
2.2.5.3	Messung des Körpergewichts und der Körperzusammensetzung	37
2.2.5.4	Bestimmung der Blutglucosespiegel.....	37
2.2.5.5	Körpertemperaturmessung	37
2.2.5.6	Blutentnahme.....	37

2.2.5.7	Organentnahme	37
2.2.5.8	Bestimmung der metabolischen Parameter	38
2.2.5.9	Oraler Fettoleranztest	38
2.2.5.10	Bestimmung der körperlichen Aktivität	39
2.2.5.11	Bestimmung der Nahrungsaufnahme.....	39
2.2.5.12	Bestimmung des Energieumsatzes.....	39
2.2.5.13	Bestimmung der Lebensdauer	40
3	ERGEBNISSE.....	41
3.1	GENOTYPISIERUNG DER <i>SLC2A8</i> ^{-/-} -MÄUSE	41
3.2	CHARAKTERISIERUNG DER FERTILITÄT DER <i>SLC2A8</i> ^{-/-} -MÄUSE.....	43
3.2.1	Abweichende Verteilung der Genotypen von der Mendel'schen Regel	43
3.2.2	Beeinträchtigte Motilität der <i>Slc2a8</i> ^{-/-} -Spermien	45
3.2.3	Veränderte Morphologie der <i>Slc2a8</i> ^{-/-} -Spermien	46
3.2.4	Untersuchung der Spermienreifung in den Nebenhoden	48
3.2.5	Bestimmung der Glucoseaufnahme der <i>Slc2a8</i> ^{-/-} -Spermien	49
3.2.6	Reduziertes mitochondriales Membranpotential der <i>Slc2a8</i> ^{-/-} -Spermien	49
3.2.7	Bestimmung der zytoplasmatischen und der mitochondrialen Kalziumkonzentration der <i>Slc2a8</i> ^{-/-} -Spermien	51
3.3	VERTEILUNG DER GLUT8-EXPRESSION IM GEHIRN	53
3.3.1	Gesteigerte körperliche Aktivität der <i>Slc2a8</i> ^{-/-} -Mäuse.....	54
3.3.2	Bestimmung der Glykogenspiegel im postnatalen Gehirn von <i>Slc2a8</i> ^{-/-} -Mäusen	56
3.4	ANALYSE DER ENERGIE- UND GLUCOSEHOMÖOSTASE DER <i>SLC2A8</i> ^{-/-} -MÄUSE	58
3.4.1	Charakterisierung des Körpergewichts der <i>Slc2a8</i> ^{-/-} -Mäuse nach Gabe verschiedener Diäten.....	58
3.4.2	Untersuchung der Futteraufnahme der <i>Slc2a8</i> ^{-/-} -Mäuse	60
3.4.3	Bestimmung des Energieumsatzes der <i>Slc2a8</i> ^{-/-} -Mäuse.....	61
3.4.4	Analyse der Lebenserwartung der <i>Slc2a8</i> ^{-/-} -Mäuse.....	62
3.4.5	Bestimmung des Glucose- und Fettstoffwechsels der <i>Slc2a8</i> ^{-/-} -Mäuse	63
4	DISKUSSION	67
4.1	LEBENSFÄHIGKEIT DER <i>SLC2A8</i> ^{-/-} -MÄUSE.....	67
4.2	FUNKTION VON GLUT8 IN DER FORTPFLANZUNG.....	69
4.2.1	Einfluss von GLUT8 auf die Fertilität	69
4.2.2	Rolle von GLUT8 in der Spermienfunktion	70
4.2.2.1	Einfluss von GLUT8 auf den Spermienaufbau	70
4.2.2.2	Einfluss von GLUT8 auf die Glykosylierung von Lipiden und Proteinen in den Testes	71
4.2.2.3	Funktion von GLUT8 in der Glucoseaufnahme von Spermien.....	71
4.2.2.4	Rolle von GLUT8 in der Energieversorgung von Spermien	72
4.3	FUNKTION VON GLUT8 IM GEHIRN	75
4.3.1	Lokalisation von GLUT8 im Gehirn.....	75
4.3.2	Einfluss von GLUT8 auf die Hippocampusfunktion	75

4.4	FUNKTION VON GLUT8 IN DER REGULIERUNG DER ENERGIE- UND GLUCOSEHOMÖOSTASE DES KÖRPERS.....	77
4.4.1	Einfluss von GLUT8 auf die Körpergewichtsentwicklung	77
4.4.2	Rolle von GLUT8 in der Regulation der Nahrungsaufnahme	78
4.4.3	Funktion von GLUT8 in der Regulation des Blutglucosespiegels.....	80
4.4.4	Rolle von GLUT8 im Fettstoffwechsel des Körpers	80
4.4.5	Einfluss von GLUT8 auf die Lebensdauer	82
5	ZUSAMMENFASSUNG	84
6	SUMMARY	86
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	88
8	TABELLENVERZEICHNIS	90
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	91
10	LITERATURVERZEICHNIS.....	96
11	ANHANG.....	I

1 Einleitung

1.1 Glucose und Glucosetransport

Glucose ($C_6H_{12}O_6$) ist das in der Natur am häufigsten vorkommende Monosaccharid. Es ist für die Chemie des Lebens von zentraler Bedeutung, da seine Oxidation die Hauptquelle für die Gewinnung metabolischer Energie in Form von ATP (Adenosintriphosphat) und NADH (reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid) darstellt (Bell *et al.*, 1990; Campbell und Reese, 2003). Die Funktion der meisten Körperzellen in Säugetieren ist auf eine konstante Versorgung mit Glucose angewiesen, speziell das Nervensystem deckt seinen Energiebedarf fast ausschließlich über Glucose (Schmidt *et al.*, 2000; Scheepers *et al.*, 2004). Die Blutglucosekonzentration wird daher vom Körper konstant auf 5 mmol/l gehalten. In der Regulation der Homöostase spielen die Absorption der mit der Nahrung aufgenommenen Glucose aus dem Darm sowie der Glucoseverbrauch der verschiedenen Organe eine entscheidende Rolle. Weitere Möglichkeiten zur Regulation der Glucosehomöostase bieten zum einen die Speicherung von Glucose in Form von Glykogen in der Leber und dessen Abbau sowie zum anderen die Gluconeogenese in der Leber aus Lactat, Glycerin und Aminosäuren (Kahn, 1992; Scheepers *et al.*, 2004). Durch diese Mechanismen soll der Körper sowohl vor einer Glucoseunterversorgung (Hypoglykämie), die zu irreversiblen Zellschädigungen, Aggressivität, neurologischen Ausfällen, Krämpfen und Bewusstlosigkeit (Koma) führt, als auch vor exzessiv erhöhten Blutglucosespiegeln (Hyperglykämie), die Blindheit, Nierenversagen und Herz-Kreislaufkrankungen verursachen, geschützt werden (Kaiser *et al.*, 2003; Scheepers *et al.*, 2004).

Da Glucose in Säugetieren nicht frei durch die Lipid-Doppelschicht der Plasmamembran diffundieren kann, wird der Transport durch transmembranäre Transportproteine katalysiert. Aufgrund von Struktur und Funktion werden in der Klasse der Glucosetransporter zwei Proteinfamilien unterschieden, die aktiven Natrium-abhängigen Glucosetransporter (SGLT) und die passiven Glucosetransporter (GLUT) (Scheepers *et al.*, 2004, Wright *et al.*, 2007).

1.2 Die SGLT-Familie

Die Transporterfamilie der Natrium-abhängigen Glucosetransporter SGLT (*sodium dependent glucose cotransporters*, Gennamen *SLC5A*) umfasst im Menschen 12 integrale Membranproteine (*SLC5A1-12*) von denen allerdings nur vier Mitglieder (SGLT1, SGLT2, SGLT4 und SGLT6) tatsächlich Glucose transportieren. SGLT-Proteine sind aus 14 α -Helices aufgebaut und N- und C-Terminus sind extrazellulär lokalisiert (Srinivas *et al.*, 2005). Zur SGLT-Familie gehören die beiden Glucosekotransporter SGLT1 (*SLC5A1*) und SGLT2 (*SLC5A2*), die für die Glucoseaufnahme aus dem Darm (SGLT1) und aus der Niere (SGLT1 und SGLT2) verantwortlich sind (Wright *et al.*, 2007). Sie koppeln den Transport von Glucose

gegen seinen Konzentrationsgradienten an den energetisch günstigen Symport von Natrium. Natrium wird von einer Na^+/K^+ -ATPase unter Verbrauch von ATP wieder aus der Zelle transportiert, um den Konzentrationsgradienten aufrecht zu halten. Daher spricht man bei der SGLT-Familie auch von einer aktiven Transporterklasse (Wood und Trayhurn, 2003; Scheepers *et al.*, 2004). SGLT1 transportiert im Gegensatz zu SGLT2 neben Glucose auch Galactose. SGLT4 (Genname *SLC5A9*) und SGLT6 (Genname *SLC5A11*) besitzen nur eine geringe Affinität zu Glucose und transportieren außerdem Mannose (SGLT4) und Myoinositol (SGLT6) (Wright *et al.*, 2007). Die weiteren Mitglieder dieser Genfamilie transportieren Myoinositol (SMIT, Genname *SLC5A3*), Anionen (NIS, Genname *SLC5A5* und SMCT, Genname *SLC5A8*), Vitamine (SMVT, Genname *SLC5A6*) und Choline (CHT, Genname *SLC5A7*). Bei SGLT3 (*SLC5A4*) handelt es sich um einen Glucosesensor und auch SGLT5 (*SLC5A10*) scheint einen Sensor zu kodieren, dessen Substrat allerdings noch nicht entdeckt wurde. Die Funktion von *SLC5A12* ist bisher unbekannt (Srinivas *et al.*, 2005; Wright *et al.*, 2007).

1.3 Die GLUT-Familie

Die Familie der passiven Glucosetransporter (GLUT, Genname *SLC2A*) transportiert Glucose und andere Zucker ausschließlich entlang ihres Konzentrationsgradienten durch erleichterte Diffusion (Wood und Trayhurn, 2003). Die humane Transporterfamilie umfasst 14 Mitglieder, GLUT1 bis 12, GLUT14 und HMIT, denen allen gemeinsam ihre Sekundärstruktur mit 12 transmembranären Helices und einem intrazellulär lokalisierten N- und C-Terminus ist (Scheepers *et al.*, 2004). Bereits 1985 wurde von Mueckler *et al.* das Modell der Proteinstruktur von GLUT1 durch Sequenzvergleiche aufgestellt. Es wurden acht porenbildende α -Helices identifiziert, die von vier äußeren α -Helices stabilisiert werden (Mueckler und Makepeace, 2006). Ebenfalls durch Sequenzvergleiche wurden zahlreiche konservierte Aminosäurestrukturen gefunden, die für den Transportprozess notwendig sind. Man bezeichnet sie daher als *sugar transport signatures*. Zu ihnen gehören sieben Glycinreste in den transmembranären Helices 1, 2, 4, 5, 7, 8 und 10, die die Helixstruktur stabilisieren (Joost und Thorens, 2001), geladene Aminosäurereste auf der intrazellulären Proteinoberfläche, die eine wichtige Rolle in der Konformationsänderung des Transporters während des Substrattransports spielen (Schürmann *et al.*, 1997), die aber auch die Membrantopologie stabilisieren (Sato und Mueckler, 1999) sowie Tryptophan- (Helix 6 und 11) und Tyrosinreste (Helix 4 und 7), die für die Transportaktivität und die Ligandenbindung wichtig sind (Schürmann *et al.*, 1993; Wandel *et al.*, 1994).

Unterschiede zwischen den Mitgliedern der GLUT-Familie bestehen in ihrer Gewebsverteilung (Kahn, 1992; Gould und Holman, 1993), ihrer Substratspezifität und Transportkinetik sowie in ihrer Bindung der inhibitorischen Liganden Cytochalasin B und Forskolin

(Joost und Thorens, 2001). Aufgrund von Sequenzhomologien wird die Familie in drei Klassen unterteilt (I-III) (Joost und Thorens, 2001).

1.3.1 Der Klasse-III-Transporter GLUT8

Zur Klasse III der GLUT-Familie zählen die fünf Isotypen GLUT6, GLUT8, GLUT10, GLUT12 und der Myoinositoltransporter HMIT. Charakteristisch für diese Klasse ist ihre große extrazelluläre *loop 9*, die eine putative Glykosylierungsstelle aufweist (Joost und Thorens, 2001). Interessanterweise zeigen GLUT8 und sein nächster Verwandter GLUT6 eine hohe Sequenzhomologie mit dem Inositoltransporter der Hefe sowie den bakteriellen Xylose- und Arabinose-Protonensymportern. Aus diesem Grund wird vermutet, dass die Klasse III der Glucosetransporter die evolutionär älteste Klasse ist, aus der sich die anderen Transporter entwickelt haben (Joost und Thorens, 2001).

Das humane *SLC2A8*-Gen ist auf Chromosom 9q33.3 lokalisiert und weist eine Sequenzhomologie von 86,2% mit dem murinen *Slc2a8* auf, welches auf Chromosom 2qB lokalisiert ist (Doege *et al.*, 2000). Das murine Gen umfasst einen Bereich von 9 kb und besteht aus 10 Exonen. Entdeckt wurde GLUT8 durch *in-silico* Datenbankrecherchen nach einem GLUT4-Homologon, da die *Slc2a4*^{-/-}-Maus nicht den erwarteten diabetischen Phänotyp zeigte und daher die Existenz eines weiteren insulinstimulierbaren Glucosetransporters vermutet wurde (Katz *et al.*, 1995).

1.3.2 GLUT8, ein intrazellulärer Glucosetransporter

GLUT8 besitzt in seinem N-Terminus ein Dileucin-Motiv, welches in *Xenopus* Oozyten (Ibberson *et al.*, 2000), in HEK293T-Zellen (Ibberson *et al.*, 2000) und in COS-7-Zellen (Lisinski *et al.*, 2001) für die Sortierung des Transporters in ein intrazelluläres Kompartiment verantwortlich ist. Ersetzt man das LL-Motiv durch Alaninreste, wird GLUT8 in die Plasmamembran integriert. GLUT4, der ebenfalls in einem intrazellulären Kompartiment lokalisiert ist und über einen Insulinstimulus zur Plasmamembran transloziert wird, besitzt ein vergleichbares Dileucin-Motiv in seinem C-Terminus (Sandoval *et al.*, 2000), weshalb auch für GLUT8 ein Translokationsstimulus vermutet wurde. In Blastozysten zeigten Carayannopoulos *et al.* (2000) eine insulinstimulierte Translokation von GLUT8 an die Membran. Dieses Ergebnis konnte allerdings weder in transfizierten Fett- und COS-7-Zellen (Lisinski *et al.*, 2001) noch in N2A-Neuroblastomazellen (Shin *et al.*, 2004) reproduziert werden. Auch die Austestung anderer möglicher Stimuli wie Glucosemangel, osmotischer Schock, Membrandepolarisation oder verschiedene Wirkstoffe, die die Proteinkinase A oder C aktivieren, den Tyrosinkinase-Signalweg aktivieren oder hemmen, oder die AMP-aktivierte Proteinkinase stimulieren, zeigten keinen Einfluss auf die Lokalisation von GLUT8. Aufgrund

dieser Ergebnisse wird vermutet, dass GLUT8 in erster Linie eine intrazelluläre Aufgabe übernimmt (Widmer *et al.*, 2005).

Die subzelluläre Lokalisation von GLUT8 wurde mittels Immunzytochemie (Kokolisationsstudien) und Zellfraktionierung mit nachfolgender Westernblotanalyse untersucht. Die Arbeitsgruppe Widmer *et al.* (2005) fand eine teilweise Kokolisation von GLUT8 mit Calreticulin, einem Marker des endoplasmatischen Reticulums (ER) und TGN38, einem *trans*-Golgi-Marker, in mit GLUT8 transfizierten PC12-Zellen. Augustin *et al.* (2005) zeigten dagegen in speziesübergreifenden Sequenzvergleichen, dass das N-terminale Dileucin-Motiv von GLUT8 Teil des [DE]XXXL[LI] Motivs ist. Bei diesem Motiv handelt es sich um ein hoch konserviertes Sortierungssignal für späte Endosomen und Lysosomen. Die Arbeitsgruppe konnte ihre Hypothese durch Kokolisation von GLUT8 mit dem lysosomalen Marker LAMP1 und Syntaxin8, einem Marker für späte Endosomen und Lysosomen in CHO- und HEK293-Zellen stützen. Ebenfalls für eine Lokalisation von GLUT8 in späten Endosomen und Lysosomen spricht seine, mittels Hefe-*two-hybrid*-System und GST-*pull down assay* nachgewiesene, Interaktion mit den Adapterproteinen AP1 und AP2 (Schmidt *et al.*, 2006).

In der Aminosäuresequenz von GLUT8 wurden alle essentiellen *sugar transport signatures* nachgewiesen. Die Transportaktivität für Glucose ($K_m \sim 2 \text{ mM}$) wurde zum einen in *Xenopus* Oozyten nach *Slc2a8*-mRNA-Injektion (Ibberson *et al.*, 2000) und zum anderen in einem *in-vitro*-System rekonstituierter Lecithin-Vesikel, die rekombinanten, aus transfizierten COS-7-Zellen isolierten GLUT8 enthielten, gezeigt (Doege *et al.*, 2000). Da die Transportaktivität durch Fructose und Galactose gehemmt wurde, scheint GLUT8 mehr als nur ein Substrat transportieren zu können (Ibberson *et al.*, 2000).

Die Gewebsverteilung von GLUT8 wurde mittels RT-PCR untersucht. Die stärkste mRNA-Expression wurde im Hodengewebe beobachtet, gefolgt vom Gehirn. Geringere *Slc2a8*-mRNA-Spiegel wurden in den meisten anderen Geweben gefunden, wie Leber und Milz, aber auch in insulin sensitiven Geweben, wie Skelettmuskel, Herz und Fettgewebe (Doege *et al.*, 2000; Scheepers *et al.*, 2001).

1.4 Aufbau der Hoden

Die Hoden enthalten zahlreiche gewundene Hodenkanälchen/Samenkanäle (*tubuli seminiferi contorti*). Sie bestehen aus einer Bindegewebshülle, einer Basalmembran und dem Keimepithel (*epithelium spermatogenicum*). Das Keimepithel setzt sich wiederum aus den Sertoli-Zellen und den verschiedenen Stadien der sich teilenden und differenzierenden Keimzellen zusammen. Die Sertoli-Zellen erfüllen zum einen eine Stütz- und Ammenfunktion, indem sie die Keimzellen mit ihren zahlreichen Fortsätzen umgeben und ernähren sowie zum anderen für die passende hormonelle Umgebung sorgen. Ihre Fortsätze verbinden benachbarte Sertoli-Zellen über *tight junctions* miteinander und bilden so die Blut-

Hoden-Schranke, die die Spermien vor Mutagenen und der körpereigenen Abwehr schützt. Die ersten Spermien entstehen erst nach der Lymphozytenprägung, so dass das Immunsystem sie für körperfremde Zellen halten würde (Petersen und Söder, 2006; Yildiz *et al.*, 2006). Weitere Funktionen der Sertoli-Zellen sind der Transport der Keimzellen Richtung Lumen sowie die Phagozytose von degenerierten Keimzellen und Zellresten (in Form von Residualkörperchen), die bei der Spermatogenese entstehen. Zwischen den Hodenkanälchen befindet sich das Interstitium, das sich aus Bindegewebe, Nervenfasern, Blutgefäßen und den Leydig-Zellen zusammensetzt. Die Leydig-Zellen produzieren in Abhängigkeit von luteinisierendem Hormon (LH) Androgene wie das Testosteron, welches essentiell für die Reifung der Spermatozoen im Keimepithel ist (Campbell und Reese, 2003). Über *gap junctions* bilden sie ein funktionelles Synzytium und produzieren neben den männlichen Geschlechtshormonen zahlreiche weitere hormonell wirksame Peptide (Schmidt *et al.*, 2000; Petersen und Söder, 2006).

Bei den meisten Wirbeltieren gehen die gewundenen Hodenkanälchen an beiden Enden in einen kurzen, geraden Samenkanal über, den *tubulus seminiferus rectus*. Die geraden Kanäle münden wiederum in das Hodennetz (*rete testis*), wo eine Konzentrierung der Spermien stattfindet. Vom *rete testis* wandern die Spermien über mehrere *ductuli efferentes testis* in den Nebenhoden (*epididymis*), wo sie gesammelt werden (Toshimori, 2003).

1.5 Spermienbildung

Mit dem Eintritt in die Pubertät setzt in den Hoden die Spermienbildung ein, bei der die aufeinander folgenden Entwicklungsstadien der Keimzellen (Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatozoen) in Richtung Lumen transportiert werden (Abb. 1.1). Die Spermienbildung lässt sich in zwei Stufen unterteilen: einen Prozess der Meiose, der die Zellen von den Spermatogonien bis zu den sekundären Spermatozyten umfasst und als Spermatogenese bezeichnet wird sowie die Reifung der Spermatozoen zu Spermatozoen, was unter dem Begriff Spermiozytogenese zusammengefasst wird (Abb. 1.1). Die Spermienbildung dauert von der Spermatogonie bis zum Spermatozoon zwischen 35 (Maus) und 64 (Mensch) Tagen (Lalouette *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 2000; Campbell und Reese, 2003; Behr *et al.*, 2007).

1.5.1 Spermatogenese

An der Peripherie eines jeden Hodenkanälchens liegen die Spermatogonien in der basalen Zone des Epithels. Man unterscheidet zwischen Typ A-Spermatogonien und Typ B-Spermatogonien. Typ A-Spermatogonien teilen sich mitotisch und erhalten so die Stammzellpopulation. Typ B-Spermatogonien teilen sich ebenfalls mitotisch und bringen die primären Spermatozoen (I) hervor. Eingeleitet wird die Spermatogenese durch eine so genannte

1.5.2 Spermiogenese

Den zweiten Teil der Spermienbildung bildet die Spermiogenese, bei der die Spermatiden aus der Spermatogenese zu Spermatozoen differenzieren (Campbell und Reese, 2003). Die erste Struktur, die sich bildet, ist der Spermischwanz (Geißel). Die Entwicklung geht von den beiden Zentriolen aus, die in einer T-Stellung zueinander angeordnet werden. Aus dem distalen Zentriol wächst die axonemale Struktur heraus, die aus neun peripheren Doppel- und zwei zentralen Einzel-Tubuli besteht. Damit einher geht die spiralförmige Anordnung der Mitochondrien im Mittelteil des Spermiums. Mehr oder weniger gleichzeitig findet die Verdichtung des Chromatins (Kernkondensation) und die Bildung des Akrosoms statt (Toshimori, 2003). Letzteres stellt eine enzymhaltige Kappe über dem Zellkern dar, die für die Durchdringung der Glashaut (*zona pellucida*) der Eizelle notwendig ist. Sie bildet sich aus Vesikeln des Golgi-Apparats und entspricht funktionell einem Lysosom. Im letzten Schritt der Spermiogenese werden nicht mehr benötigte zytoplasmatische Zellbestandteile in Form von Residualkörperchen abgeschnürt (Zytoplasmareduktion). Diese beinhalten komprimierte RNA und Organellen wie den Golgi-Apparat, das endoplasmatische Reticulum (ER), Lysosomen und Peroxisomen. Durch den Verlust dieser Bestandteile sind Spermatozoen weder zu Proteinexpression noch zu Vesikeltransport in der Lage (Toshimori, 2003; Flesch und Gadella, 2000).

1.6 Spermienaufbau

Das reife Spermium besteht aus dem Kopf, dem Mittelstück und dem Flagellum (Abb. 1.2). Die gesamte Zelloberfläche wird von der Plasmamembran bedeckt, die die Zelle nicht nur begrenzt, sondern eine sehr dynamische Struktur darstellt und eine wichtige Rolle in der Befruchtung spielt (Flesch und Gadella, 2000). Der Spermienkopf besteht fast ausschließlich aus dem haploiden Zellkern. Außerdem befindet sich im anterioren Teil des Kopfes das Akrosom, das wie eine Kappe um 2/3 des Kerns liegt (Bedford, 2008). Das Flagellum wird in drei Segmente unterteilt, den Mittel-, den Haupt- und den Endteil. Auch das Halsstück wird als eigenständige Region aufgefasst, es bildet ein bewegliches Verbindungsstück zwischen dem Spermienkopf und dem Mittelteil des Flagellums. Aus dem distalen Zentriol formt sich im Mittelstück das zentrale Axonema, das eine für Geißeln typische radialsymmetrische Struktur aufweist. Diese besteht aus zwei zentral angeordneten Mikrotubuli umgeben von neun Doppelmikrotubuli (9 + 2 Struktur), denen neun dichte Außenfibrillen aufliegen. Es folgt eine spiralförmig angeordnete Mitochondrienschicht, die für die Energieversorgung der Spermien zuständig ist. Das Mittelstück wird vom Schlussring begrenzt, an den sich das Hauptstück anschließt. Das Hauptstück bildet den längsten Teil des Spermiums und enthält neben dem zentralen Axonema eine distal dünner werdende Schicht Außenfibrillen, die auf sieben reduziert ist und von der Ringfaserscheide, einer Schicht fibrillärer Proteine, umgeben

wird. Das Endstück besteht nur noch aus der 9 + 2 Struktur des Axonemas und die Mikrotubuli enden frei, nur von der Plasmamembran umgeben (Toshimori, 2003).

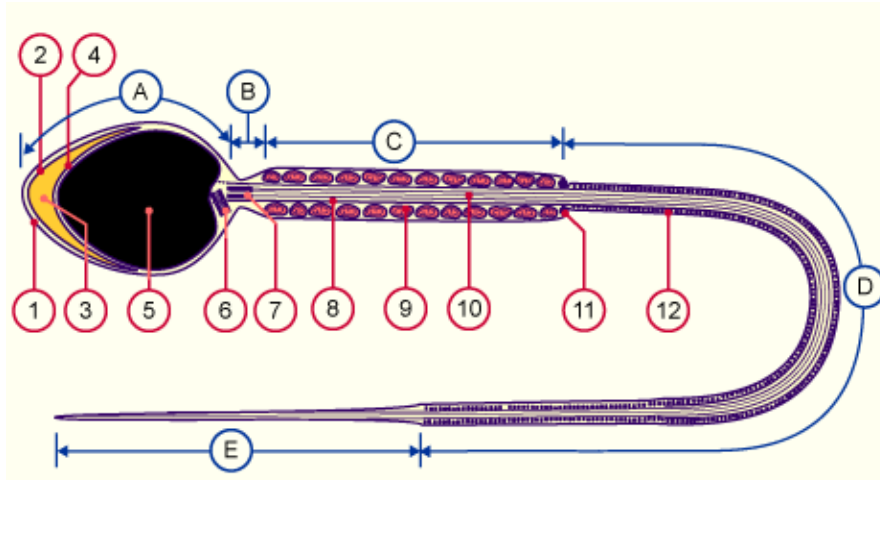


Abb. 1.2 Aufbau eines Spermatozoon.

1 Plasmamembran, 2 äußere akrosomale Membran, 3 Akrosom, 4 innere akrosomale Membran, 5 Nukleus, 6 proximales Zentriol, 7 distales Zentriol, 8 Außenfibrillen, 9 Mitochondrien, 10 Axonema, 11 Schlussring, 12 Ringfaserscheide; A Kopf, B Hals, C Mittelstück, D Hauptstück, E Endstück. Quelle: www.embryologie.ch

1.7 Spermatogenesewelle

Die bereits in Abschnitt 1.5.1 beschriebene Zytoplasmabrücke der Tochter spermatogonien wird bis ins Spermatidenstadium aufrechterhalten, so dass aus einer Spermatogonie ein ganzes Netz von Tochterzellen entsteht. Die Netzbildung gewährleistet den synchronen Ablauf der Vorgänge in den verschiedenen Entwicklungsstadien der Keimzellen. Die Spermatogonien entlang des Samenkanals beginnen nacheinander mit ihrer Entwicklung, so entsteht eine Welle von aufeinander folgenden Entwicklungsstadien. Bei Nagetieren überlappen sich die Spermatogenesewellen, so dass zwei Entwicklungsstadien von Spermatozyten und ein oder zwei Entwicklungsstadien der Spermiogenese im Samenepithel übereinander liegen. Beim Menschen ist in einem Samenkanal-Querschnitt die Ordnung im Sinne einer Spermatogenesewelle nicht zu erkennen, da die Wellen in überlappenden Spiralen angeordnet sind. Erst die Rekonstruktion aus Serienschnitten macht beim Menschen die Spermatogenesewellen sichtbar (Keck *et al.*, 2002; Drews, 2006).

1.8 Spermienreifung

Die reifen Spermien, die am Ende der Spermatogenese ins Lumen der Samenkanäle abgegeben werden, sind noch nicht bewegungs- und befruchtungsfähig. Sie müssen erst weitere zeitlich und räumlich getrennte Reifungsschritte durchlaufen, um letztendlich eine Eizelle befruchten zu können (Toshimori, 2003).

1.8.1 Nebenhodenreifung

Von den Testes wandern die Spermatozoen über die *ductuli efferentes testis* in die Nebenhoden (*epididymis*). Jeder Nebenhoden wird in drei Bereiche unterteilt, den Nebenhodenkopf (*caput epididymis*), den Nebenhodenkörper (*corpus epididymis*) und den Nebenhodenschwanz (*cauda epididymis*). Während ihrer Passage durch die unterschiedlichen Bereiche des Nebenhodengangs finden verschiedene morphologische und funktionelle Reifungsschritte statt. Die DNA im Kern wird stärker kondensiert und auch das Zytoplasma wird weiter reduziert. Ihre Bewegungsfähigkeit erlangen die Spermatozoen ebenfalls erst während der Nebenhodenreifung. Die Plasmamembran wird hier durch Abgabe, Modifikation und Absorption von Proteinen und Lipiden verändert, was einen Einfluss auf die Bewegungsfähigkeit, die Fähigkeit zur Kapazitation und die Fähigkeit zur Akrosomreaktion hat (Bedford, 2008; Flesch und Gadella, 2000; Visconti *et al.*, 1995). Im Nebenhodenschwanz werden die Spermien gesammelt und bis zur Ejakulation gelagert.

1.8.2 Kapazitation

Nach der Passage des Muttermundes finden im weiblichen Genitaltrakt weitere physiologische Veränderungen der Spermatozoen statt, die als Kapazitation bezeichnet werden. Diese physiologische Reifung wird durch Sekrete des weiblichen Trakts ausgelöst. Der Beginn der Kapazitation wird durch die Tyrosin-Phosphorylierung einer großen Zahl von Proteinen mit einer relativen molekularen Masse von 4.000-12.000 gekennzeichnet, welche hauptsächlich von Bicarbonat, aber auch von Albumin und Kalzium reguliert wird (Suarez *et al.*, 1993; Visconti *et al.*, 1995; Flesch und Gadella, 2000). Während der Kapazitation kommt es zu Veränderungen der Glykokalyx an der Membran des Spermienkopfes durch chemische Modifikationen und/oder Repositionierung der Glykolipide und Glykoproteine sowie zu einer Verringerung des Cholesterolgehalts, wodurch später die Akrosomreaktion ermöglicht wird (Cross, 1998; Schröter *et al.*, 1999). Die Membranveränderungen beeinflussen die motilen Eigenschaften der Spermien, die seitliche Pendelbewegung des Kopfes vergrößert sich und es kommt zu einer ausladenden Peitschenschlagbewegung des Schwanzes. Diese Art der Spermienbewegung wird als Hyperaktivität bezeichnet. Sie ist die Folge einer vollständigen Kapazitation (Visconti *et al.*, 1995; Flesch und Gadella, 2000; Yanagimachi, 2009).

1.8.3 Akrosomreaktion

Die Eizelle wird von der *zona pellucida* und von Kumuluszellen umgeben. Nur Spermien, die die Kapazitation erfolgreich durchlaufen haben, sind durch ihr verändertes Fortbewegungsmuster (Hyperaktivität) in der Lage, die Kumuluszellschicht zu durchdringen (Yanagimachi, 2009). Die Hyperaktivität allein reicht aber nicht aus, um bis zur Eizelle zu gelangen.

Zusätzlich ist die Akrosomreaktion notwendig, bei der Enzyme freigesetzt werden, wie Hyaluronidase, die die interzelluläre Matrix zwischen den Kumuluszellen auflöst, während andere Enzyme, wie Akrosin, die *zona pellucida* lysieren. Bei der Akrosomreaktion, die wie auch die Kapazitation vom extrazellulären Kalziumgehalt abhängig ist (Yanagimachi, 2009), verschmilzt die Zellmembran des Spermiums mit der äußeren Membran des Akrosoms. Dadurch entstehen Poren, durch die der Inhalt des Akrosoms nach außen freigesetzt wird. Nach vollständiger Akrosomreaktion liegt im vorderen Bereich des Spermiums die ehemals innere akrosomale Membran außen. Sie enthält Zuckermoleküle, die eine spezifische Bindung an die Eizellmembran ermöglichen. Nach der Bindung beginnt an der post-akrosomalen Membran des Spermiums die Membranverschmelzung mit der Eizelle (Bedford, 2008; Flesch und Gadella, 2000).

1.9 Rolle von Glucose in der Fortpflanzung

Für die Spermienfunktion gelten zwei Glucosstoffwechselwege als beherrschend, zum einen die Glykolyse, bei der ATP und Pyruvat gebildet werden und zum anderen der Pentosephosphatweg, bei dem NADPH und Ribose-5-Phosphat entstehen. Trotzdem wird die Notwendigkeit von Glucose für die Befruchtung kontrovers diskutiert, es scheinen starke Unterschiede zwischen den verschiedenen Spezies zu existieren. Für Rinderspermien wurde beispielsweise eine Hemmung der Spermienkapazitation durch Glucose beschrieben (Parrish *et al.*, 1989), wogegen in der Maus Glucose essentiell für die Kapazitation zu sein scheint (Hoppe, 1976; Fraser und Quinn, 1981). In der Maus wurde Glucose ebenfalls als essentiell für die Bindung und die Fusion des Spermatozoon mit der Oozyte beschrieben (Urner und Sakkas, 1999; Urner *et al.*, 2001), wogegen die ATP-abhängige Tyrosin-Phosphorylierung ausgewählter Spermienproteine, die die Kapazitation einleitet, auch ohne Glucose ablief. Redkar und Olds-Clarke (1999) zeigten, dass die Fusion von Spermium und Eizelle auch ohne Glucose stattfand, sie aber stark verlangsamt ablief. Neuere Arbeiten von Travis *et al.* (2004) zeigten ähnliche Daten für die Fusion von Spermatozoon und Eizelle, sie zeigten aber auch die Notwendigkeit von Glucose für die Kapazitation.

In den Hoden werden verschiedene Mitglieder der Glucosetransporterfamilie exprimiert. Neben dem Fructosetransporter GLUT5 wurden im Menschen und in der Maus auch GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT7, GLUT8 und GLUT9 gefunden (Burant und Davidson, 1994; Kokk *et al.*, 2004; Kim und Moley, 2007, Cheeseman, 2008), so dass genügend Glucose in die Spermien aufgenommen werden kann, um die Glykolyse und den Pentosephosphatweg mit Substrat zu versorgen.

1.10 Erstellung einer *Slc2a8*-knockout-Maus (*Slc2a8*^{-/-}-Maus)

Die Möglichkeit, Gene in der Maus spezifisch zu modifizieren, ist noch jung. Erst Anfang der 80er Jahre wurden die ersten Arbeiten zu lebenden transgenen Mäusen veröffentlicht, die aus DNA-Mikroinjektion in Oozyten hervorgingen (Gordon *et al.*, 1980). Mäuse, bei denen einzelne Gene spezifisch ausgeschaltet wurden (*knockout*-Mäuse) folgten 1987 (Doetschmann *et al.*, 1987; Kuehn *et al.*, 1987; Thomas und Capecchi, 1987).

Heutzutage sind das so genannte *gene-trapping* (Stanford *et al.*, 2001) und das Cre/LoxP-System zur Erstellung von *knockout*-Mäusen am weitesten verbreitet.

Für die Generierung der *Slc2a8*^{-/-}-Maus wurde das erst seit Beginn der 90er Jahre bekannte Cre/LoxP-System verwendet, da es gegenüber dem *gene-trapping* die Möglichkeit bietet, das Ausschalten des spezifischen Gens räumlich und/oder zeitlich zu regulieren (Lasko *et al.*, 1992; Orban *et al.*, 1992). *Knockout*-Mäuse, bei denen die Deletion zeitlich oder gewebespezifisch reguliert wird bezeichnet man daher auch als konditionalen *knockout*. Sie bieten den Vorteil, eine eventuelle embryonale Letalität der homozygoten Deletion zu umgehen, wie sie beispielsweise bereits für *Slc2a1* und *Slc2a3* beschrieben wurde (Ohtsuki *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Ganguly *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 2009a). Außerdem kann durch die homozygote Deletion ein sehr komplexer Phänotyp entstehen, wenn das spezifische Gen in verschiedenen Geweben exprimiert wird. Es könnte dann erschwert sein direkte Effekte des kodierenden Proteins von Sekundäreffekten zu unterscheiden. Auch das *Slc2a8*-Gen wird in vielen Geweben exprimiert (Doege *et al.*, 2000; Scheepers *et al.*, 2001), daher bietet ein konditionales Ausschalten eine sinnvolle Alternative.

Das Prinzip des Cre/LoxP-Rekombinationssystems beruht auf der Erkennung der Cre (*causes recombination*)-Rekombinase des Phagen P1 einer 34 bp langen so genannten loxP (*locus of crossing over of P1 recombinase*)-site, die sich zusammensetzt aus einer 8 bp langen asymmetrischen Kernsequenz, die von zwei 13 bp langen palindromischen Sequenzen umgeben wird. Die Cre-Rekombinase katalysiert, ohne dass Kofaktoren benötigt werden, die homologe Rekombination zwischen zwei gleichgerichteten loxP-sites, wobei die dazwischen liegende Region ausgeschnitten wird, was zu einem Funktionsverlust des Gens führt (Orban *et al.*, 1992).

Für die Inaktivierung von *Slc2a8* wurde von Andrea Scheepers im Rahmen ihrer Promotion (Scheepers, 2003; Gawlik *et al.*, 2008) ein DNA-*targeting*-Konstrukt erstellt, in dem die Exone 5-7 von loxP-sites flankiert wurden (Abb. 1.3). Die loxP-sites lagen in intronischen Sequenzen, um die Wildtyp-Aktivität des Gens zu erhalten. Das *targeting*-Konstrukt enthielt zur Selektion der ES-Zellen mit erfolgreich integriertem Konstrukt zusätzlich eine Neomycin- und eine *Herpes simplex*-Virus-Thymidinkinase (HSVtk)-Resistenz-Kassette. Da es Hinweise gibt, dass Resistenzkassetten im Intron die Genexpression beeinflussen können (Xu *et al.*,

2001), wurden sie ebenfalls mit *loxP-sites* flankiert, damit sie nach erfolgreicher Selektion wieder entfernt werden konnten.

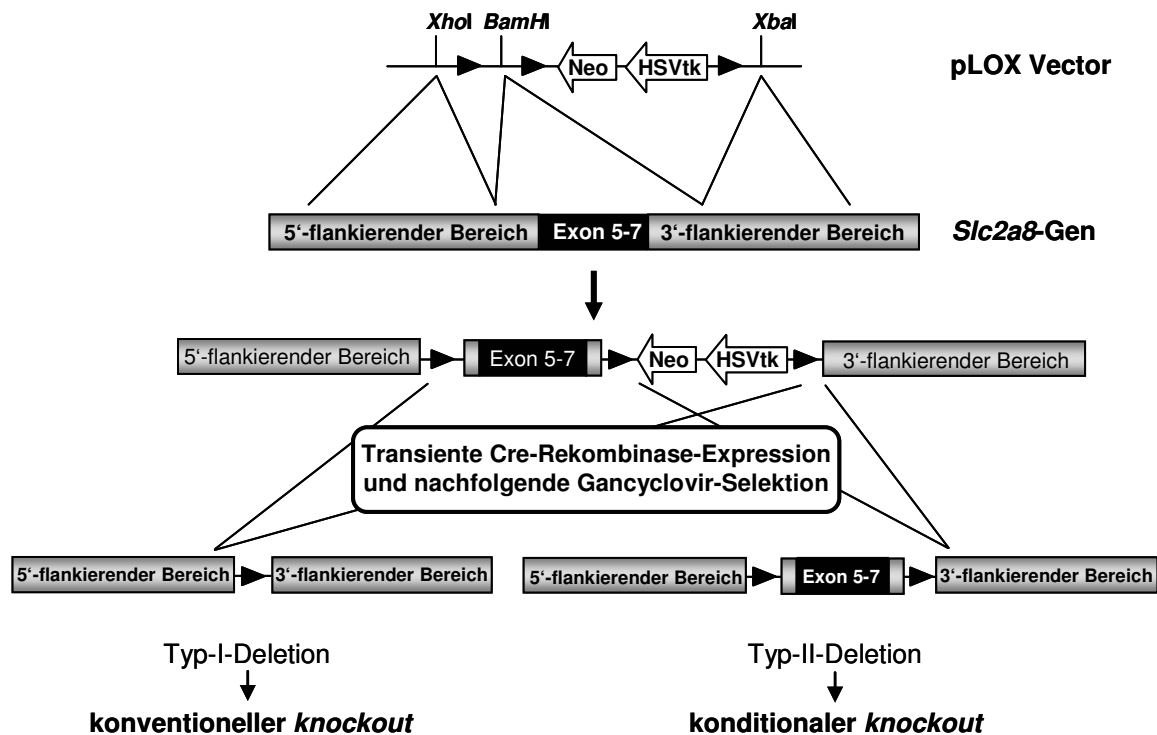


Abb. 1.3 Generierung des *knockout*-Konstrukts.

In das *Slc2a8*-Gen wurden mittels Transfektion eine *loxP-site* vor Exon 5 und zwei *loxP-sites*, zwischen denen sich zwei Selektionskassetten befanden, hinter Exon 7 integriert. Durch transiente Expression der Cre-Rekombinase entstanden so zwei verschiedene Deletionen: der konventionelle *knockout*, bei dem Exon 5-7 ausgeschnitten wurden sowie der konditionale *knockout*, bei dem Exon 5-7 durch *loxP-sites* flankiert vorlagen. Letzteres ermöglichte es GLUT8 gewebsspezifisch auszuschalten.

Durch die transiente Expression der Cre-Rekombinase entstanden zum einen Klone, in denen die mit *loxP-sites* flankierten Exone 5-7 vollständig ausgeschnitten wurden (Typ-I-Deletion). ES-Zellen mit dieser Deletion wurden für die Zucht konventioneller *ko*-Mäuse verwendet. Außerdem entstanden Klone, in denen die Exone 5-7 von *loxP-sites* umrahmt vorlagen (Typ-II-Deletion). ES-Zellen, die dieses gefloxt (= von *loxP-sites* flankiert) Allel trugen, waren für die Erzeugung konditioneller *ko*-Mäuse vorgesehen. Sie sollten mit Mäusen verpaart werden, die die Cre-Rekombinase unter einem gewebsspezifischen Promotor exprimierten. Die 129/Sv-ES-Zellen mit Typ-I-Deletion wurden mit CD-1-Morulae aggregiert und die daraus entstandenen chimären Mäuse mit C57BL/6J-Mäusen rückgekreuzt. Die 129/Sv-ES-Zellen mit Typ-II-Deletion wurden in C57BL/6J-Blastozysten injiziert und die Chimären wurden ebenfalls mit C57BL/6J-Mäusen rückgekreuzt.

1.11 Publizierte murine Deletionen von Glucosetransportern der GLUT-Familie

Bis heute wurde die Funktionsanalyse mittels muriner Deletion für vier Mitglieder der Glucosetransporterfamilie beschrieben: *Slc2a1* (GLUT1), *Slc2a2* (GLUT2), *Slc2a3* (GLUT3) und *Slc2a4* (GLUT4). Der Erkenntnisgewinn für die Funktion der einzelnen Transporter durch den murinen *knockout* soll im Folgenden näher erläutert werden.

1.11.1 Der embryonal letale Phänotyp der *Slc2a1*^{-/-}-Mäuse

Die Hauptaufgabe von GLUT1 besteht im Transport von Glucose durch die Blut-Hirnschranke in das Gehirn. Die homozygote Deletion von *Slc2a1* resultiert in embryonaler Letalität, die ab dem embryonalen Tag 13 in Form von zurückgebliebener Entwicklung und missgestalteten Embryonen sichtbar wird (Ohtsuki *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). Mäuse mit heterozygoter Deletion zeigen Defizite in ihren motorischen Fähigkeiten, wie Balance und Koordination sowie epileptiforme Anfälle, eine verringerte Glucoseaufnahme in das Gehirn und erniedrigte Glucosekonzentrationen in der Cerebrospinalflüssigkeit sowie eine Mikroenzephalie. Damit imitiert der Phänotyp der *Slc2a1*^{+/-}-Maus das Krankheitsbild des humanen Glut-1-DS (Glut1-Defizit-Syndrom) und bietet die Möglichkeit zur Entwicklung neuer Behandlungsformen der humanen Krankheit im Tiermodell (Wang *et al.*, 2006).

1.11.2 Der diabetische Phänotyp der *Slc2a2*^{-/-}-Mäuse

GLUT2 wird in Darm, Leber, Niere, Gehirn sowie in den β -Zellen des Pankreas exprimiert (Guillam *et al.*, 1997). Im Pankreas leitet GLUT2 die Glucose-stimulierte Insulinsekretion der β -Zellen ein. Die durch GLUT2 aufgenommene Glucose wird von der Glucokinase phosphoryliert und aktiviert eine Signalkaskade, an deren Ende die Exozytose der Insulinvesikel steht. Die murine Deletion des Transporters resultiert in einem *Diabetes mellitus*-ähnlichen Phänotyp, mit Hyperglykämie, Hypoinsulinämie, Hyperglukagonämie und Glucosurie. Die Tiere zeigen eine stark beeinträchtigte Glucosetoleranz und eine Umkehrung des α - zu β -Zellverhältnis in den Langerhans-Inseln des Pankreas. Sie versterben vor Erreichen der vierten Lebenswoche (Guillam *et al.*, 1997). Das Überleben der Mäuse kann durch die pankreasspezifische Reexpression von GLUT2 oder GLUT1 gerettet werden, was zeigt, dass die Funktion von GLUT2 in den anderen Geweben (Darm, Leber, Niere, Gehirn) nicht überlebenswichtig ist (Thorens *et al.*, 2000). Die murine Deletion von *Slc2a2* bietet demnach ein wichtiges Tiermodell zur Erforschung der Behandlungsmöglichkeiten des humanen *Diabetes mellitus*.

1.11.3 Der embryonal letale Phänotyp der *Slc2a3*^{-/-}-Mäuse

GLUT3 wird auch als neuronaler Glucosetransporter bezeichnet, da er hauptsächlich in den Axonen und Dendriten der Neurone des ZNS (zentrales Nervensystem) exprimiert wird (McCall *et al.*, 1994; Simpson *et al.*, 2008). Weiterhin konnte seine Expression in Spermien, weißen Blutkörperchen, Karzinomazellen sowie während der Embryonalentwicklung nachgewiesen werden (Simpson *et al.*, 2008). Die homozygote Deletion von *Slc2a3* in der Maus resultiert in embryonaler Letalität zu einem frühen Entwicklungszeitpunkt (Ganguly *et al.*, 2007, Schmidt *et al.*, 2009a). Unsere Arbeitsgruppe zeigte eine normale Entwicklung von Morulae und Blastozysten. Erste Apoptosesignale waren nach Implantation ab Tag 6,5 der Embryonalentwicklung im Ektoderm der *Slc2a3*^{-/-}-Embryonen zu beobachten (Schmidt *et al.*, 2009a). Der apikal lokalisierte trophektoderme Transporter scheint daher, zusammen mit dem basolateral vorliegenden GLUT1, essentiell für die Nährstoffversorgung des sich entwickelnden Embryos zu sein.

Slc2a3^{+/-}-Mäuse sind lebensfähig und entwickeln sich im Gegensatz zu *Slc2a1*^{+/-}-Mäusen normal. Sie zeigen lediglich eine leicht erhöhte zerebrokortikale Aktivität, aber keine Auffälligkeiten in motorischen Fähigkeiten, Lernfähigkeit, Angstverhalten oder Körpergewichtsentwicklung und Nahrungsaufnahme, so dass ein funktionierendes *Slc2a3*-Allel für die neuronale Energieversorgung auszureichen scheint (Schmidt *et al.*, 2008a).

1.11.4 Der diabetische Phänotyp der *Slc2a4*^{-/-}-Mäuse

Die Deletion des murinen *Slc2a4* resultiert in einer Wachstumsverzögerung und einer verkürzten Lebensspanne von maximal 5-7 Monaten. Außerdem wurde ein verringertes Körpergewicht aufgrund reduzierter Fettdepots beobachtet. Überraschenderweise zeigten nur die männlichen *Slc2a4*^{-/-}-Mäuse eine moderate Hypoglykämie, obwohl die Insulinsensitivität stark verringert war. Diese Beobachtung ließ einen kompensatorischen Effekt durch einen anderen Glucosetransporter vermuten (Katz *et al.*, 1995). Mäuse in denen der Transporter spezifisch in Adipozyten und Muskelfasern ausgeschaltet wurde, zeigten dagegen ein normales Wachstum und keine Änderungen in ihrer Körperzusammensetzung oder Lebenserwartung. Bereits mit zwei Monaten wurde sowohl Insulinresistenz als auch Glucoseintoleranz in den Tieren nachgewiesen. Die *knockout*-Mäuse gleichen das Fehlen von GLUT4 im Skelettmuskel und im Fettgewebe durch eine verstärkte Glucoseaufnahme und Lipidsynthese der Leber aus, indem der Skelettmuskel der Tiere vorwiegend Lipide verstoffwechselt (Kotani *et al.*, 2004). Interessanterweise ergab die Untersuchung der *Slc2a4*^{+/-}-Maus den für die *Slc2a4*^{-/-}-Maus erwarteten diabetischen Phänotyp mit erhöhten Blutzuckerspiegeln, Hypertonie und reduzierter Glucoseaufnahme in den Skelettmuskel (Stenbit *et al.*, 1997). Die muskelspezifische Deletion von *Slc2a4* führte zu einer reduzierten insulinstimulierten Glucoseaufnahme in den Skelettmuskel sowie zu Insulinresistenz in Leber

und Fettgewebe der Maus aufgrund von Glucosetoxizität (Kim *et al.*, 2001). Die fettspezifische Deletion von *Slc2a4* führte ebenfalls zu Glucoseintoleranz und Hyperinsulinämie in Adipozyten sowie zu einer untergeordneten Insulinresistenz in Leber und Muskel. Die Autoren vermuteten daher eine komplementäre Rolle von Fettgewebe und Skelettmuskel in der Glucoseverwertung *in vivo*. Die gewebsspezifischen *Slc2a4*^{-/-}-Mäuse bieten die Möglichkeit, die Abläufe und Ursachen des humanen *Diabetes mellitus* im Tiermodell zu untersuchen (Zisman *et al.*, 2000; Abel *et al.*, 2001).

1.12 Rolle von GLUT8 in der Glucosehomöostase des Körpers

1.12.1 Mögliche Funktion von GLUT8 in den Keimzellen

Die starke *Slc2a8*-mRNA-Expression in den Hoden wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen in Ratte, Maus und Mensch nachgewiesen (Doege *et al.*, 2000; Ibberson *et al.*, 2002; Schürmann *et al.*, 2002a; Kim und Moley, 2007). Da sowohl für die Ratte (Doege *et al.*, 2000) als auch für die Maus (Scheepers *et al.*, 2004; Gomez *et al.*, 2006) gezeigt wurde, dass die *Slc2a8*-Expression erst mit Beginn der Pubertät und damit auch erst mit Beginn der Spermatogenese eintritt, liegt die Vermutung nahe, dass GLUT8 eine Funktion in der Spermienreifung und/oder der Spermienfunktion übernimmt. Tatsächlich wurde GLUT8 in der Ratte mittels Immunzytochemie in primären Spermatozyten nachgewiesen (Ibberson *et al.*, 2002), wohingegen in der Maus und im Menschen eine Lokalisation in der akrosomalen Region des Spermienkopfes von reifen Spermatozoen postuliert wurde (Schürmann *et al.*, 2002a; Gomez *et al.*, 2006). Neuere Untersuchungen von Kim und Moley (2007) zeigten in der Maus neben der akrosomalen Lokalisation auch eine Expression im Mittelteil und im Hauptteil von späten Spermatiden und reifen Spermatozoen sowie in den Leydig-Zellen. Die Lokalisation im Mittelteil von reifen Spermatozoen wurde auch von Stefan Schmidt im Rahmen seiner Dissertation (2007) publiziert, allerdings wurde in dieser Arbeit die *Slc2a8*-Expression in sämtlichen Keimzellstadien nachgewiesen und nicht erst ab dem Spermatidenstadium (Gawlik *et al.*, 2008).

Das Akrosom zeigt mit seinem sauren pH-Wert und den dort exprimierten Hydrolasen funktionelle Ähnlichkeit mit Lysosomen (Ramalho-Santos *et al.*, 2001). Eine akrosomale Lokalisation von GLUT8 ist daher durchaus vorstellbar, da bereits in verschiedenen Zellsystemen eine lysosomale Lokalisation von GLUT8 gezeigt wurde (vergl. Kapitel 1.3.2). GLUT8 könnte aufgrund dieser Verteilung eine Rolle in der Regulation der Akrosomreaktion spielen oder aber nach abgeschlossener Akrosomreaktion den durch die hyperaktivierte Motilität erhöhten Energiebedarf decken, wenn er nach erfolgreicher Akrosomreaktion an die äußere Membran gelangt. Eine Lokalisation im Mittelteil der Spermien lässt wiederum vermuten, dass GLUT8 an der Bereitstellung von Hexosen für die mitochondriale Phosphorylierung beteiligt sein könnte. Da sich der Glucosetransport von GLUT8 durch Fructose

und Galactose hemmen lässt, scheint es sich um einen multifunktionalen Transporter zu handeln (Ibberson *et al.*, 2000), der sowohl Fructosederivate (männlicher Genitaltrakt) als auch Glucosederivate (weiblicher Genitaltrakt) intrazellulär transportieren könnte.

1.12.2 Mögliche Funktion von GLUT8 im Gehirn

Das Gehirn stellt das Gewebe mit der zweit höchsten *Slc2a8*-Expression dar, weshalb vermutet wird, dass der Transporter für die Gehirnfunktion von notwendiger Bedeutung ist. Neben GLUT8 werden im Gehirn auch die Glucosetransporter GLUT1, GLUT3, GLUT6 und GLUT10 sowie zu einem geringen Maße auch GLUT2, GLUT4 und GLUT5 exprimiert (McEwen und Reagan, 2004). Die verschiedenen Transporter zeigen sowohl Lokalisations- und Zelltypspezifität als auch Unterschiede in ihrer subzellulären Verteilung. Während GLUT1 und GLUT3 im Gehirn weit verbreitet vorliegen und für den Großteil der Glucoseaufnahme und -nutzung verantwortlich zu sein scheinen, werden GLUT2 (*nucleus arcuatus*, *nucleus paraventricularis*, *lateral* Hypothalamus) und GLUT4 (Cerebellum, Cortex, Hippocampus, Hypothalamus) nur in wenigen Arealen exprimiert, was eine hoch spezialisierte Funktion dieser Transporter vermuten lässt. Es wird daher angenommen, dass der Glucosetransport im Gehirn stark reguliert und kompartimentalisiert abläuft (McEwen und Reagan, 2004). Die Arbeitsgruppe um Reagan *et al.* (2001) beschrieb GLUT8 mittels *in-situ* Hybridisierung und Immunhistochemie als einen ubiquitär im Zellkörper neuronaler Zellen (Prinzipalneurone sowie Interneurone) verteilten Transporter. Besonders stark war die GLUT8-Expression in den Pyramidenzellen des Hippocampus und in den Körnerzellen des Gyrus dentatus. Außerdem konnte die Arbeitsgruppe schwächere Signale in der Großhirnrinde (cerebraler Cortex) und im Hypothalamus nachweisen. Die Mikroinjektion von Glucose in den Hippocampus erhöht die Acetylcholinausschüttung. Eine solche Ausschüttung wurde in Ratten auch während Lernprozessen beobachtet, was vermuten lässt, dass Glucose das cholinerge System regulieren kann (Ragozzino *et al.*, 1998). Die starke Expression im Hippocampus führt zu der Hypothese, dass GLUT8 an den glucoregulatorischen und kognitiven Funktionen des Hippocampus mitwirkt. Auch die Arbeitsgruppe um Ibberson *et al.* (2002) konnte die Expression von GLUT8 in den Körnerzellen des Gyrus dentatus nachweisen außerdem detektierten sie den Transporter im primären olfaktorischen Cortex, im dorsalen Hypothalamus und in der Amygdala. Mittels Immunogold-Elektronenmikroskopie fanden sie GLUT8 intrazellulär, in präsynaptischen Vesikeln der synaptischen Endigungen und sekretorischen Granula Vasopressin-positiver Neurone, lokalisiert. Da diese Vesikel zur Exozytose stimuliert werden können vermuten die Autoren, dass GLUT8 so eventuell an die Plasmamembran gelangt, um dort aktiv die Glucoseaufnahme der Zelle zu erhöhen. Allerdings konnten sie kein Signal für GLUT8 an der Plasmamembran in den von Ihnen untersuchten Gewebeschnitten beobachten.

Auch die Arbeitsgruppe um Piroli *et al.* (2002) konnte GLUT8 in Westernblotanalysen nicht in Plasmamembranfraktionen des Hippocampus nachweisen. Sie fanden den Transporter mittels Immunogold-Elektronenmikroskopie im Zytosol und im rauen endoplasmatischen Reticulum (rER) und beschrieben eine glucosestimulierte Translokation vom Zytosol zum rER. Die Autoren vermuten, dass GLUT8 dort Glucosemoleküle, die von Glykoproteinen abgetrennt wurden, aus dem rER ins Zytosol transportiert und so die neuronale Glucosehomöostase reguliert.

1.12.3 Mögliche Funktion von GLUT8 in weiteren Geweben

Auch im weißen Fettgewebe scheint GLUT8 eine wichtige Funktion zu übernehmen, da die *Slc2a8*-mRNA-Expression während der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen von Fibroblasten zu Adipozyten stark ansteigt (Scheepers *et al.*, 2001). Eine Hypoglykämie führt dagegen zu einer verringerten mRNA-Expression von *Slc2a8* in den 3T3-L1-Adipozyten, wogegen die Expression in den 3T3-L1-Fibroblasten sich nicht verändert. Da sich die Expression von *Slc2a8* in den 3T3-L1-Adipozyten auffällig von der *Slc2a1*-Expression (steigt bei Hypoglykämie an) und *Slc2a4*-Expression (unverändert bei Hypoglykämie, steigt durch Insulin) unterscheidet, scheint GLUT8 eine spezifische Funktion in der Regulation des Glucosemetabolismus der Fettzelle zu übernehmen (Scheepers *et al.*, 2001). Die reziproke Regulation von GLUT1 und GLUT8 ist möglicherweise Teil eines komplexen Adaptationsmechanismus der Zelle bei Nährstoffmangel, wobei bisher ungeklärt ist, wie der intrazellulär lokalisierte GLUT8 die Glucosehomöostase der Adipozyten beeinflussen kann.

Ein weiteres Gewebe, das eine relativ hohe *Slc2a8*-Expression zeigt, ist die Leber. Durch ihre Fähigkeit, Glucose in Form von Glykogen zu speichern, spielt sie eine essentielle Rolle in der Regulation der Glucosehomöostase des gesamten Organismus, da Glykogen in der Leber als Glucosespeicher fungiert, der bei niedrigen Blutglucosespiegeln mobilisiert werden kann. Bei hohen Blutglucosespiegeln nach der Nahrungsaufnahme wird die Glucose von GLUT2 in die Hepatozyten transportiert und von der Glucokinase direkt zu Glucose-6-Phosphat umgewandelt. Die Glucokinase ist erst bei Glucosekonzentrationen ab 5 mM aktiv und reguliert dadurch die Glykogensynthese und damit auch die Glykogenbildung. Sinkt der Blutglucosespiegel unter 5 mmol/l, wird die Glykogenphosphorylase aktiviert, die die Glykogenolyse katalysiert. Durch diese beiden Stoffwechselwege ist die Leber maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Blutglucosekonzentration des Körpers beteiligt (Brown, 2004). Es wäre möglich, dass GLUT8 als multifunktionaler Zuckertransporter intrazellulär an der Glykogenese und/oder der Glykogenolyse beteiligt ist.

Durch die geringe Expression von GLUT8 in Geweben, wie Skelettmuskel, Herz oder Milz, ist eine essentielle Funktion von GLUT8 hier eher nicht zu vermuten. Es ist anzunehmen,

dass andere Mitglieder der Glucosetransporterfamilie im Falle der Deletion von *Slc2a8* die Funktion des Transporters in diesen Geweben kompensieren können.

1.13 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung der physiologischen Funktion des ubiquitär exprimierten, multifunktionalen Glucosetransporters GLUT8 (*Slc2a8*) in der Glucosehomöostase des Organismus durch die phänotypische Charakterisierung der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse. Ein besonderes Interesse galt dabei den Geweben mit der stärksten *Slc2a8*-Expression, den Hoden im Hinblick auf Störungen in der Fortpflanzungsfähigkeit der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse und dem Gehirn in Bezug auf eine mögliche Rolle von GLUT8 in der Regulation des Verhaltens.

1. Analyse der Fertilität:

Der Einfluss von GLUT8 auf die Fertilität männlicher und weiblicher *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse sollte durch verschiedene Verpaarungsstrategien sowie durch Analyse der Spermienzahl und -motilität untersucht werden. Die Spermienfunktion sollte zudem durch mikroskopische Analyse des Reifungsstatus in den Hoden und Nebenhoden ermittelt werden. Der Energiestatus der Spermatozoen sollte mittels verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe im Durchflusszytometer sowie durch Bestimmung der Glucoseaufnahme untersucht werden.

2. Funktion von GLUT8 im Gehirn:

Um die Funktion von GLUT8 im Gehirn zu untersuchen, sollte seine Lokalisation durch Analyse der Expression in den verschiedenen Gehirnarealen bestimmt werden. Ein möglicher Einfluss von GLUT8 auf die Regulation der körperlichen Aktivität sollte im infraMot- und im *Running-Wheel*-System (TSE-Systems GmbH, Bad Homburg) gemessen werden.

3. Charakterisierung der Energie- und Glucosehomöostase:

Ziel war es, die Rolle von GLUT8 in der Regulation der Energiehomöostase des Körpers durch Analyse des Körpergewichts und der Körperzusammensetzung nach Verabreichung verschiedener Diäten zu analysieren. Des Weiteren sollten der Energieumsatz und der respiratorische Quotient der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse mittels indirekter Kalorimetrie sowie ihre Nahrungsaufnahme bestimmt werden, um eine mögliche Rolle von GLUT8 im neuronalen *Glucose-sensing* zu prüfen.

Zur Untersuchung des Einflusses von GLUT8 auf die Regulation der Glucosehomöostase war die Messung der Blutglucosespiegel im gefütterten als auch im gefasteten Zustand und die Analyse der Glycogenspeicherfähigkeit der Leber geplant. Eine mögliche Aufgabe von GLUT8 im Fettstoffwechsel sollte durch Bestimmung der Triglyceridkonzentration und der freien Fettsäuren im Plasma gefasteter sowie *ad libitum* gefütterter *Slc2a8*^{-/-}- und *Slc2a8*^{+/+}-Mäuse und mittels eines oralen Fettoleranztest untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Antikörper

2.1.1.1 Primäntiseren

anti-GLUT8-C-Antiserum: Ein Kaninchen wurde von Eurogentec (Seraing, Belgien) mit Peptiden, die aus den Aminosäuren WGSEEGWEEPPVGAEH des intrazellulären *Loops* 6 und KGRTLEQVTAHFEGR des C-Terminus bestanden immunisiert. Das Serum wurde gegen die C-terminale Sequenz aufgereinigt und in der Immunhistochemie eingesetzt.

anti-GLUT8-N-Antiserum: Eine Ratte wurde von Eurogentec mit einem Peptid aus den Aminosäuren MSPEDPQETQPLLRPC des N-Terminus immunisiert. Das aufgereinigte Serum wurde im Westernblot eingesetzt.

2.1.1.2 Sekundäntikörper

Biotin-konjugierter Sekundäntikörper: *Biotin-spacer-conjugated secondary antibody donkey anti rabbit* IgG, Dianova (Hamburg).

Meerrettichperoxidase-konjugierter Sekundäntikörper: *goat anti rat* IgG, Thermo Scientific Pierce (Rockford, IL, USA)

2.1.2 Synthetische Oligonukleotide (*primer*)

2.1.2.1 *primer* für die Genotypisierung der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse

Die für die Genotypisierung der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse verwendeten *primer* wurden von MWG Biotech (Ebersberg) bezogen.

G8_for: 5' ATCTTCTGTGCAGTCCATC 3'

G8_rev: 5' GGTACCAAAGGCACTCATACTG 3'

2.1.2.2 *primer* für die cDNA-Synthese

18S_for: 5' GCC ATG CAT GTC TAA GTA CGC 3'

18S_rev: 5' CTT CCT TGG ATG TGG TAG CC 3'

2.1.3 qRT-PCR-Sonden

Mit Ausnahme der β -Aktin-Sonde, wurden die Sonden für die quantitative *realtime*-PCR (qRT-PCR) von Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) bezogen.

GLUT8: Mm00444635_g1

GLUT1: Mm00441473_m1

GLUT3: Mm00441483_m1

GLUT5: Mm00600311_m1

GLUT6: Mm00554217_m1

GAPDH-S: Mm00484668_m1

Calmodulin: Mm00486655_m1

GGT: Mm00492322_m1

GSH-Peroxidase: Mm00656767_g1

β -Aktin: Die β -Aktin-Sonde wurde in der Arbeitsgruppe Schürmann designt. *Primer*:

act_b_design_for: 5' GCCAACCGTGAAAAGATGAC 3'

act_b_design_rev: 5' TACGACCAGAGGCATACAG 3'

Sondensequenz: 5' TTGAGACCTTCAACACCCCAGCCA 3', Modifikationen: 5' Fluorescein (FAM), 3' TAMRA

2.1.4 Enzyme und Reaktionskits

Verwendete Enzyme:

Die Amyloglucosidase aus *aspergillus niger* wurde von der Firma Fluka (Basel, Schweiz) bezogen.

Verwendete Reaktionskits:

ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II (Roche, Mannheim)

BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL, USA)

NEFA-C (Wako Chemicals GmbH, Neuss)

First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Free Glycerol Determination Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

GLUCOSE liquicolor (Human, Taunusstein)

Insulin Mouse Ultrasensitive ELISA EIA-3440 (DRG Instruments GmbH, Marburg)

Invisorb[®] Genomic DNA Kit II (Invitek, Berlin)

LIVE/DEAD[®] Sperm Viability Kit L-7011 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)

MitoProbe[™] JC-1 Assay Kit for Flow Cytometry M34152 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)

Phusion[™] High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland)

RNeasy[®] Mini Kit (Quiagen, Hilden)

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Reaktionskits nach Herstellerangaben verwendet.

2.1.5 Medien, Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders unter den einzelnen Methoden (2.2) angegeben, wurden die Standardpuffer, -medien und -lösungen nach Ausubel *et al.*, (1995) und Coligan *et al.*, (1995) angesetzt. Für die Ansätze wurde generell entionisiertes Wasser verwendet und der pH-Wert mit 1 M HCl bzw. 1 M NaOH eingestellt (pH211 Microprocessor pH-Meter, Hanna Instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein), falls nicht anders vermerkt.

2.1.6 Mausdiäten

Innerhalb der Mausezucht und der Versuche wurden verschiedene Diäten verwendet. Die Zusammensetzung der Diäten ist in Tabelle 2.1 dargestellt.

Diät	Kalorien- prozent aus Protein	Kalorien- prozent aus Kohlen- hydraten	Kalorien- prozent aus Fett	Energie- gehalt in kcal/g	Art.-Nr.	Hersteller
Haltung	23	69	8	3,06	V153 x R/M-H	ssniff Spezialdiäten GmbH (Soest)
SD-1	20	67	13	3,52	C1000	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG (Lage)
HFD-1	17	48	35	3,65	C1057	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG
SD-2	20	70	10	3,85	D12450B	Research Diets (New, Brunswick, NJ, USA)
HFD-2	20	20	60	5,24	D12492	Research Diets

Tab. 2.1 Verwendete Mausezucht.

Zusammensetzungen und Bezugsquellen der verschiedenen Mausezucht, die in der Zucht und in den Versuchen eingesetzt wurden.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus Mausschwänzen

Den Mäusen wurde im Alter von drei Wochen mit einem Skalpell ein ca. 3-4 mm großes Stück der Schwanzspitze abgetrennt. Die Isolierung der DNA erfolgte mit dem Invisorb® Genomic DNA Kit II (Invitex, Berlin) nach Angaben des Herstellers.

2.2.1.2 Isolierung von RNA aus Gewebe

Die Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben der Maus wurde mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits (Quiagen, Hilden) isoliert. Das eingewogene Gewebe (30-100 mg je nach Gewebeart) wurde zermörsert und mit 1 ml *quiazol reagenz* zur Lyse versetzt. Die Homogenisierung erfolgte im TissueLyser II (Quiagen, Hilden). Das Lysat wurde nach Zugabe von 200 µl Chloroform 15 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert (Biofuge® *fresco*, Heraeus®, Hanau) und der Überstand mit 600 µl Ethanol (75%) versetzt. Hintereinander wurden jeweils 600 µl des Gemisches auf die Säule gegeben und 15 sec bei 13.000 rpm (Biofuge® *pico*, Heraeus®) zentrifugiert. Es folgten hintereinander die Zugabe von 700 µl RW1-Puffer und 500 µl RPE-Puffer auf die Säule mit anschließendem Zentrifugationsschritt (1 min bei 13.000 rpm). Am Ende folgte eine 2-minütige Inkubation der Säule mit 100 µl DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat-Wasser) und eine finale Zentrifugation für 1min bei 13.000 rpm.

2.2.1.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Das Absorptionsmaximum von DNA und RNA liegt bei etwa 260 nm. Dabei entsprechen 50 g DNA/ml bzw. 40 g RNA/ml jeweils 1 OD. Proteine dagegen zeigen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Um störende Protein-Verunreinigungen ausschließen zu können, wurden Proben mit einem Quotienten $OD_{260}/OD_{280} < 1,6$ nicht verwendet. Die Konzentration der DNA-Arbeitslösungen wurde auf 10 µg/ml eingestellt.

2.2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*)

Unter Polymerase-Kettenreaktion (PCR) versteht man die spezifische *in vitro*-Amplifikation von DNA-Fragmenten (Saiki *et al.*, 1985). Mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotiden (*primern*), einer thermostabilen DNA-Polymerase und den vier dNTPs können individuelle DNA-Fragmente in kurzer Zeit und in großer Menge synthetisiert werden. Die Genotypisierungs-PCRs wurden im 20 µl Maßstab angesetzt:

<i>Template</i> -DNA	40 ng
5'- <i>primer</i>	0,5 µM
3'- <i>primer</i>	0,5 µM
dNTP-Mix (25 mM/dNTP)	250 µM
5 x <i>Taq</i> -DNA-Polymerase Puffer	4 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	0,02 U/µl
Destilliertes Wasser	<i>ad</i> 20 µl

Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgte im Mastercycler *gradient* (Eppendorf, Hamburg), nach dem in Tabelle 2.2 aufgeführten Protokoll. Das Protokoll ist in Dauer und Temperatur der *primer*-Anlagerung auf die unter Abschnitt 2.1.2.1 angegebenen *primer* zur

Slc2a8-Genotypisierung angepasst. Die Temperatur der Elongation ist auf die Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland) optimiert und die Dauer der Elongation auf die Größe des zu amplifizierenden *Slc2a8*-Fragments (1,8 kb).

Dauer	Temperatur	PCR-Schritt
30 sec	98 °C	initiale Denaturierung
10 sec	98 °C	Denaturierung
30 sec	56 °C	<i>primer</i> -Anlagerung
10 sec	72 °C	Elongation
Wiederholung von 30 Zyklen von Denaturierung bis Elongation		
7 min	72 °C	finale Elongation

Tab. 2.2 PCR-Protokoll.

Dauer und Temperatur der einzelnen Schritte der *Slc2a8*-Genotypisierungs-PCR.

2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde durchgeführt, um die in der PCR amplifizierten DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen. Dazu wurden 1,5%ige Gele verwendet. Die Agarose wurde in TAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlung auf ca. 60 °C mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in einen Schlitten gegossen. Um Probenaschen zu erhalten, wurde ein Kamm in die flüssige Gel-Lösung eingesetzt. Nach der Polymerisation des Gels wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit den aufzutrennenden Proben sowie einer DNA-Leiter (*generuler 1 kb DNA ladder*, Fermentas, St. Leon-Rot) beladen. Der Gellauf erfolgte in mit TAE-Puffer gefüllten Elektrophorese-Kammern bei 80-120 V.

TAE-Puffer

Tris-HCl	2 M
EDTA	50 mM
Eisessig	1 M

2.2.1.6 cDNA-Synthese aus RNA

Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nach Angaben des Herstellers. Zur Überprüfung der Reinheit der synthetisierten cDNA wurde eine PCR mit *primern* spezifisch für 18S durchgeführt.

2.2.1.7 Analyse der Genexpression mittels qRT-PCR

Die Quantifizierung der Genexpression verschiedener Gene wurde mittels quantitativer *real-time*-PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Diese Methode kombiniert die cDNA-Amplifikation mit der Detektion und der Quantifizierung der Produkte.

Die Analyse erfolgte im 7300 *Real-Time* PCR-System (Applied Biosystems, Darmstadt) mit Hilfe genspezifischer, exonübergreifender Sonden (TaqMan, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Die Sonden sind mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen markiert, wobei die Fluoreszenz des 5'-Reporterfarbstoffs (FAM) bei intakter Sonde durch die räumliche Nähe des 3'-Quencherfarbstoffs (TAMRA) unterdrückt wird. Während der PCR-Elongation spaltet die Taq-Polymerase mit ihrer 5'-nukleolytischen Aktivität die Sonde, wodurch die Fluoreszenz des Reporters nicht mehr unterdrückt werden kann. Die Intensität der Lichtemission ist direkt proportional zu der Menge des gebildeten PCR-Produkts.

Die Quantifizierung erfolgte über die Δ ct-Methode (Livak & Schmittgen, 2001) mit Aktin als Bezugsgen. Als ct-Wert (*threshold cycle*) wurde derjenige PCR-Zyklus bestimmt, bei dem das gemessene Fluoreszenzsignal in den exponentiellen Anstieg überging.

Die qRT-PCR wurde in einem Volumen von 20 μ l mit 4 ng cDNA sowie 1 μ l der entsprechenden Sonde (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) und 1 x TaqMan® Universal PCR Master-Mix, No AmpErase® UNG (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Der Master Mix enthielt 400 μ M dATP, dCTP, dGTP, 800 μ M dUTP, 0,2 U UNG (AmpErase Uracil N-glykosylase) und 1 U Amplitaq-Gold-DNA-Polymerase. Die PCR erfolgte in optisch durchlässigen 96-Well-Platten. Ein einleitender Dekontaminierungsschritt für 2 min bei 50°C sollte zum Abbau eventuell vorhandener Uracil-haltiger Amplikons führen. Es schloss sich eine initiale Denaturierung für 10 min an. Anschließend folgten 40 Zyklen mit je einer Denaturierung für 15 sec bei 95°C und einem kombinierten Anlagerungs- und Elongationsschritt für 1 min bei 60°C, entsprechend der Empfehlung von Applied Biosystems. Die Analyse eines cDNA-templates erfolgte in Triplikaten, um Pipettierungenauigkeiten zu minimieren.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Spermienisolation

Die 10-12 Wochen alten männlichen Mäuse wurden durch Genickbruch getötet. Hoden, Nebenhoden sowie Samenleiter wurden aus dem Tier heraus präpariert und kurz in 37°C warmem PBS gewaschen. Die Nebenhoden wurden mitsamt der Samenleiter in je 300 μ l 37°C warmes Medium199 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), versetzt mit 25 mmol/L NaHCO₃, 4 mg/ml BSA und 4mmol/L EGTA (um die Akrosomreaktion zu verhindern), überführt und mit einer 27 G-Insulinkanüle perforiert. Die Spermien konnten 10 min bei 37°C/5% CO₂ im Inkubator ausschwimmen (Butler *et al.*, 2002) und wurden danach mit

einem 70 µm Nylonfilter (BD Falcon™, Franklin Lakes, NJ, USA) von Gewebsresten getrennt. Im Anschluss wurde mittels Neugebauer-Zählkammer die Spermienanzahl bestimmt und die Spermien entsprechend den folgenden Färbungen verdünnt. Die Färbungen erfolgten im direkten Anschluss an die Isolation, wobei darauf geachtet wurde, dass die Spermien nicht auskühlten.

2.2.2.2 Bestimmung der zytoplasmatischen und mitochondrialen Kalziumkonzentration von Spermien

Die zytoplasmatische Kalziumkonzentration der Spermien ($10^6/\text{ml}$) wurde mittels Inkubation mit 1 mM des fluoreszierenden Kalziumindikators Fluo3/Acetoxymethyl (AM)-Ester (Gentaur, Brüssel, Belgien; Anregung: 506 nm, Emission: 525 nm mit einem FL-1, 530 ± 30 nm Bandpassfilter aufgenommen, FACSCalibur™, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) für 20 min bei 37°C/5% CO₂ bestimmt. Nach dem Transport in die Zellen erfolgt die AM-Hydrolyse, wodurch der Farbstoff in der Zelle gefangen ist. Auf die Bindung von Kalzium reagiert Fluo3 mit einem Anstieg der Fluoreszenzintensität (Perl *et al.*, 2006).

Die mitochondriale Kalziumkonzentration wurde mit Hilfe von 4 mM Rhod2/AM-Ester (Gentaur, Brüssel, Belgien) ermittelt. Rhod2 wird in der Zelle in den Mitochondrien kompartimentiert (Perl *et al.*, 2006). $10^6/\text{ml}$ Spermien wurden 20 min bei 37°C/5% CO₂ mit dem Farbstoff inkubiert und die Emission wurde mit einem FL-2 (585 ± 42 nm) Bandpassfilter aufgezeichnet.

2.2.2.3 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials der Spermien

Die Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials der Spermien erfolgte ebenfalls mittels Durchflusszytometrie. Die Spermien wurden auf $10^6/\text{ml}$ verdünnt und mit 2 µM 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethylbenzimidazolcarbocyanin-Iodid (JC-1) (MitoProbe™ JC-1 Assay Kit for Flow Cytometry, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) 20 min bei 37°C/5% CO₂ im Inkubator gefärbt. Als Positivkontrolle diente eine 5-minütige Inkubation mit 50 µM CCCP (Carbonyl-Cyanid-3-Chlorophenylhydrazon) vor der JC-1-Färbung. JC-1 ist ein, in Abhängigkeit des Membranpotentials, Iod-Aggregate bildendes, lipophiles Kation, welches in den Mitochondrien kompartimentiert und das Membranpotential durch eine Emissionsänderung von grün (527 nm) zu rot (590 nm, hohes Membranpotential) anzeigt.

Die Proben wurden 3 min bei 800 g zentrifugiert und in 500 µl PBS 37°C resuspendiert. Die Auswertung erfolgte am Durchflusszytometer (FACSCalibur™, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) bei einer Anregung von 488 nm. Die Emission der Monomere (527 nm, grün) wurde mit dem FL-1 Bandpassfilter (530 +/- 30 nm) und die Emission der Aggregate (590 nm, rot) mit dem FL-2 Bandpassfilter (585 +/- 42 nm) aufgezeichnet.

2.2.2.4 Bestimmung des ATP-Gehalts der Spermien

Die Bestimmung des ATP-Gehalts von Wildtyp- und *knockout*-Spermien erfolgte mittels des ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II von Roche (Mannheim). Dazu wurden 10^7 Spermien in 200 μ l *dilution buffer* aufgenommen und mit 200 μ l Lysispuffer 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine 1-minütige Zentrifugation bei 12.000 rpm gestoppt. 50 μ l Überstand wurden mit 50 μ l des Luciferasereagenz im Luminometer (FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH, Offenburg) 10 sec gemessen. Die ermittelten ATP-Werte wurden auf den Proteingehalt der Spermienproben bezogen.

2.2.2.5 Bestimmung der Anzahl der lebenden Spermien

Die Spermien wurden auf 10^6 /ml verdünnt und 10 min mit 50 nM SYBR14 (LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) im Inkubator bei 37°C/5% CO₂ inkubiert. Abgestoppt wurde die Färbung durch eine 3-minütige Zentrifugation bei 800 g. Die Spermien wurden in 400 μ l PBS 37°C resuspendiert und die Färbung im Durchflusszytometer (FACSCalibur, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) ausgewertet. Die Anregung erfolgte bei 488 nm und die Emission bei 520 nm.

2.2.2.6 Ermittlung der Glucoseaufnahme der Spermien

Die Ermittlung der Aufnahme von [¹⁴C]-2-Desoxyglucose durch Spermien von 12 Wochen alten *Slc2a8*^{-/-} und *Slc2a8*^{+/+}-Mäusen erfolgte nach McLean *et al.* (1997). Die isolierten Spermien wurden dazu auf $0,5 \times 10^6$ /ml mit 50 mM TES (pH 7,4)/130 mM NaCl verdünnt und bei 700 g zentrifugiert. Die gewaschenen Spermien wurden in dem oben genannten Puffer, versetzt mit 1 mM Desoxy-D-Glucose, 2 mM CaCl₂ und 1 mCi/ml [¹⁴C]-2-Desoxyglucose, wieder aufgenommen und für 15 min bei 37°C/5% CO₂ inkubiert. Die Glucoseaufnahme wurde durch die Zugabe von kalter 0,1 M Glucoselösung gestoppt. Die Proben wurden bei 12.000 g für 5 min zentrifugiert und die Radioaktivität des Pellets wurde in einem Beckman LS 6000LL (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) Szintillationszähler gemessen.

2.2.2.7 Bestimmung der Spermienzahl und -motilität

Die Gesamtanzahl und die Motilität der Spermien wurde mit Hilfe eines CASA (*computer assisted sperm analyzer*, MTG, medeaLAB, Altdorf) in Kooperation mit Prof. Dr. Wennemuth (Phillips-Universität Marburg) bestimmt. Die aus den Nebenhoden von 10-12 Wochen alten Mäusen isolierten Spermien wurden in eine 50 μ m tiefe *slide chamber* überführt, wobei insgesamt 20 Felder für jeweils 5 sec gemessen wurden. Pro Maus wurden mindestens 200 Spermien analysiert. Alle Spermien, die ein sich bewegendes Flagellum aufwiesen, wurden als motil klassifiziert und ihre Bewegungsfähigkeit aufgrund der Geschwindigkeit ihrer Fortbewegung näher analysiert. Als Kriterium für Vorwärtsbewegung galt eine zurückgelegte

Strecke von minimal 100 μm . Um Effekte durch Kapazitationsprozesse zu verhindern, wurden die Spermien direkt nach ihrer Isolation gemessen.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Membranfraktionierung

Die aus den Mäusen präparierten Hoden und Gehirne wurden jeweils in 2 ml Homogenisierungspuffer + Proteaseinhibitoren im 30 ml Potter-Elvehjem-Homogenisator (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA; Abstand zwischen Pistill und Gefäß 0,15 mm) auf Eis zerkleinert. Die Homogenate wurden 10 min bei 1.000 g und 4°C zentrifugiert (Biofuge® *fresco*, Heraeus®, Hanau), um Zellkerne und Zellbruchstücke zu entfernen. Die Überstände wurden danach eine Stunde bei 200.000 g und 4°C in einer Ultrazentrifuge (Optima™ Max, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) zentrifugiert, um die Membranen von der zytosolischen Fraktion zu trennen. Das Pellet, welches die Membranen enthielt, wurde in 200 μl Homogenisierungspuffer resuspendiert und die Proben bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

Homogenisierungspuffer pH 7,4

Tris-HCl	20 mM
EDTA	1 mM
Saccharose	250 mM

Proteininaseinhibitoren

cOmplete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers.

2.2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Um den Proteingehalt der verschiedenen Membranfraktionen zu ermitteln, wurde die BCA-Methode verwendet. Dabei wird Cu(II) zu Cu(I) reduziert, welches mit BCA einen spezifischen, violetten Komplex bildet. Es wurde das BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Auswertung erfolgte am Photometer (Spectra Max M2^e, Molecular Devices, Union City, CA, USA).

2.2.3.3 Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die Proteine aus den Membranfraktionen entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. SDS (*sodium dodecyl sulfate*) löst hydrophobe Moleküle und bringt dadurch Proteine in ihre Primärstruktur.

Zusätzlich bestückt es die Proteine mit einer negativen Ladung, so dass sie in einem elektrischen Feld zur Anode wandern. Aufgetrennt werden die Proteine in Polyacrylamidgelen mit bestimmter Porengröße, die eine Wanderung der Proteine entsprechend ihrer Größe und Ladung ermöglichen. Verwendet wurde die diskontinuierliche Gelelektrophorese, bei der zwei Acrylamidgele unterschiedlicher Konzentration und mit verschiedenem pH-Wert übereinander geschichtet wurden. Das obere großporige und saure Sammelgel konzentrierte die Proteine zu einer engen Bande. Das untere engmaschige und alkalische Trenngel trennte die Proteine entsprechend ihrer Größe auf. Anhand der relativen Wanderungsgeschwindigkeit und unter Verwendung von Markerproteinen mit bekanntem Molekulargewicht, ließ sich auf die Größe der Proteine schließen, da die Laufgeschwindigkeit der Polypeptidketten direkt proportional dem Logarithmus ihres Molekulargewichtes ist.

Das Gelsystem bestand aus zwei Glasplatten, wobei die Geldicke von spezifischen Abstandshaltern vorgegeben wurde. Nach dem Zusammenpipettieren wurde die Trenngellösung zwischen die Glasplatten gebracht und sofort mit 0,1% SDS überschichtet, um eine gerade Polymerisation der Gelkante zu gewährleisten. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel gegossen. Ein Kamm bildete die Taschen, in die später die Proben eingefüllt wurden. Nachdem auch das Sammelgel auspolymerisiert war, wurde das Gelsystem in die mit Laufpuffer gefüllte Gelkammer eingespannt.

Es wurden 20 µg Protein von jeder Probe aufgetragen. Die Fraktionen wurden mit Homogenisierungspuffer auf 15 µl aufgefüllt, um ein gleiches Volumen zu erhalten. Dieses Gemisch wurde mit 5 µl 2 x Laemmli-Puffer sowie 60 mg/ml DTT versehen und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, um eventuell vorhandene Disulfidbrücken zu zerstören. Die Proben und ein Marker-Mix wurden in die Geltaschen gefüllt und die Proteine anhand ihrer Größe, bei einer Spannung von 160 V, aufgetrennt.

unterer Gelpuffer pH 8,8

Tris-HCL	1,5 M
SDS	0,4%

oberer Gelpuffer pH 6,8

Tris-HCL	0,5 M
SDS	0,4%

12%iges Trenngel

unterer Gelpuffer	1,56 ml
Acrylamid/Bisacrylamid 40%, 19:1	2,44 ml
H ₂ O	2,00 ml
Ammoniumpersulfat	6 mg
TEMED	6 µl

Sammelgel

oberer Gelpuffer	520 µl
Acrylamid/Bisacrylamid 40%, 19:1	260 µl
H ₂ O	1220 µl
Ammoniumpersulfat	2 mg
TEMED	2 µl

2 x Laemmli-Puffer

Glycerin	20%
SDS	8%
EDTA	10 mM
Tris	250 mM
Bromphenolblau	1%

8 x Laufpuffer

Tris	25 mM
SDS	0,4%
Glycin	250 mM

2.2.3.4 Westernblotting nach Towbin *et al.* (1979)

Der Westernblot ermöglicht es spezifische Antigene mit Hilfe von Antikörpern in Proteingemischen nachzuweisen, nachdem diese gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran (Protran, Schleicher und Schuell, Dassel) transferiert wurden. Die mit SDS negativ geladenen Proteine wanderten im elektrischen Feld aus dem Gel in Richtung Nitrozellulosemembran, in der sie aufgrund der Bindekapazität der Nitrozellulose hängen blieben. Geblottet wurde für eine Stunde bei 200 mA.

Im Anschluss an das Blotten wurde die Nitrozellulose zur Überprüfung des erfolgreichen Proteintransfers mit Ponceau-Rot-Lösung gefärbt. Hierbei handelt es sich um eine reversible Proteinfärbung, deren Intensität von der Proteinkonzentration abhängt. Somit dient sie auch gleichzeitig als Überprüfung der Proteinbestimmung.

Vor der Immunreaktion erfolgte die vollständige Entfärbung des Blots mit TBS.

Transferpuffer

Tris	2,5 mM
Glycin	19,2 mM
MetOH	20%

Ponceau-Rot-Lösung

Ponceau S	0,2%
Essigsäure	3%

TBS (*tris buffered saline*) pH 8,0

Tris-HCl	10,0 mM
NaCl	0,15 mM

2.2.3.5 Immunologischer Nachweis des Antigens auf dem Blot

Die Proteine auf der Nitrozellulosemembran wurden durch spezifische Antiseren nachgewiesen. Das primäre Antiserum bindet spezifisch an sein Antigen und der sekundäre Antikörper bindet an das primäre Antiserum, an das wiederum HRP (Meerrettichperoxidase) gebunden ist. Mit Hilfe einer Reaktionslösung, welche Wasserstoffperoxid und Luminol enthält, katalysiert die HRP eine Reaktion, bei der Elektronen der Luminol-Moleküle auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Unter Freisetzung von Photonen, welche mit einem photosensitiven Film aufgefangen werden können, fallen diese Elektronen auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. Dieses Verfahren wird ECL = *enhanced chemiluminescence*-Westernblot genannt.

Nach dem Waschen des Blots in TBST wurden zuerst die unspezifischen Bindungsstellen durch Inkubation des Blots für 1 h bei 37°C in TBST + 5% Milchpulver blockiert. Anschließend wurde mit dem primären aufgereinigten anti-GLUT8-C-Antiserum in einer Konzentration von 10 µg/ml über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde nach dreimaligem Waschen in TBST für 1 h bei Raumtemperatur mit dem sekundären, HRP-markierten *goat anti rat* IgG (Thermo Scientific Pierce Rockford, IL, USA) in einer Verdünnung von 1:20.000 inkubiert. Vor der abschließenden ECL-Reaktion folgten drei weitere Waschgänge. Die beiden verschiedenen ECL-Lösungen (ECL Western-*blotting* Detection Kit, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wurden zu gleichen Teilen gemischt und gleichmäßig auf der Membran verteilt. Die Auswertung der ECL-Reaktion erfolgte mit einer Kamera (FUJIFILM LAS-1000, Düsseldorf) und der zugehörigen Software (Image Reader LAS-1000) bei einer Entwicklungszeit von 10 min.

TBST pH 8,0

Tris-HCl	10,0 mM
NaCl	0,15 mM
Tween 20	0,05%

2.2.3.6 Lektin-Blot

Lektine sind eine Klasse von sekundären Pflanzenstoffen, die spezifische Kohlenhydratstrukturen binden und zur Markierung glykosylierter Proteine eingesetzt werden. Je nachdem aus welcher Pflanze das Lektin stammt, bindet es verschiedene Kohlenhydratstrukturen. Durch die Fusion des Lektins mit HRP lassen sich die glykosylierten Proteine auf der Nitrozellulose sichtbar machen. Auch hier wurden Membranfraktionen aus Gehirn und Hoden in einem 10%-Gel bei 160 V gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose übertragen. Anschließend wurde für 2 min in 2% Tween20/PBS geblockt. Die Inkubation mit 2 µg/ml Lektin aus Concanavalin A (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) wurde über Nacht bei Raumtemperatur in PBS-Spezial durchgeführt. Da das Lektin mit HRP markiert war, folgte im Anschluss direkt die ECL-Reaktion mit Auswertung am Detektionssystem (FUJIFILM LAS-1000, Düsseldorf), bei einer Entwicklungszeit von 15 sec.

PBS-Spezial pH 7,4

NaCl	140 mM
KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Na ₂ HPO ₄	40,1 mM
Tween20	0,05%
CaCl ₂	1 mM
MgCl ₂	1 mM
MnCl ₂	1 mM

2.2.3.7 Glykogenbestimmung aus Gewebe

Das im Gewebe gespeicherte Glykogen wurde durch das Enzym Amyloglucosidase (Fluka, Basel, Schweiz) in Glucoseuntereinheiten gespalten, welche mittels des Glucose-Detektions-Kits (GLUCOSE liquicolor, Human, Taunusstein) enzymatisch bestimmt werden konnten.

Jeweils 50 mg gefrorenes und gemörsertes Gewebe wurde mit 100 µl 1 M KOH bei 70 °C lysiert. Zu jeder Probe wurden 17 µl konzentrierte Essigsäure und 250 µl assay-Puffer gegeben. Die katalytische Spaltung fand bei 37 °C über Nacht statt. Nach einem Zentrifugationsschritt für 10 min bei 2.000 g erfolgte die Glucosemessung mittels des Glucose-Detektions-Kits nach Herstellerangaben. Die Auswertung erfolgte am Plattenreader (Spectra Max M2[®], Molecular Devices, Union City, CA, USA).

assay-Puffer 30 ml:

Natriumacetat	293 mg
Amyloglucosidase	150 mg
konz. Essigsäure	144 µl

2.2.3.8 ATP-Bestimmung aus Gewebe

Jeweils 30 mg tiefgefrorenenes, pulverisiertes Gewebe wurde in 1,5 ml eisgekühlter PCA-Lösung homogenisiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 4°C und 16.000 g für 7 min wurde der Überstand vollständig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 3 M KOH/0,5 M KCl neutralisiert (pH 7,0-8,0). Während einer 10-minütigen Inkubation auf Eis fiel Natriumperchlorat als weißer Niederschlag aus. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4°C und 16.000 g für 7 min. Die ATP-Bestimmung aus dem Überstand erfolgte mit Hilfe des ATP Bioluminescence Assay Kits CLS II von Roche (Mannheim) nach Angaben des Herstellers. Die Auswertung erfolgte am Luminometer (FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH, Offenburg). Die ermittelte ATP-Menge wurde auf die Gewebeeinwaage bezogen.

PCA-Lösung

Perchlorsäure	0,6 M
EGTA	1 mM

2.2.4 Histologie und indirekte Immunhistochemie

2.2.4.1 Fixierung und Einbettung von Gewebe sowie Herstellung von Paraffinschnitten

Die zu untersuchenden Gewebestücke wurden für 24 h in 4% PFA/PBS fixiert und anschließend 48 h unter fließendem Leitungswasser gespült. Im Entwässerungsautomaten (Hypercenter® XP, Shandon, Frankfurt) wurde das Gewebe über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und im Vakuum über Toluol in Histoplast (Mikrom, Walldorf) eingebettet.

EtOH 40%	2 min	40°C
EtOH 50%	2 min	40°C
EtOH 70%	1,30 min	40°C
EtOH 96%	1,30 min	40°C
EtOH 99,9%	45 sec	40°C
EtOH 99,9%	1 min	40°C
EtOH 99,9%	1,30 min	40°C
Toluol	2 min	40°C
Toluol (Vakuum)	2 min	40°C
Histoplast (Vakuum)	1,45 min	60°C
Histoplast (Vakuum)	1,45 min	60°C

Von dem eingebetteten Gewebe wurden mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (HM 355 S, Microm, Walldorf) 2 µm dünne Schnitte angefertigt, die auf beschichtete Objektträger aufgezogen wurden.

2.2.4.2 Perfusion der Maus zur vollständigen Fixierung des Gehirns

Da es nicht möglich war, auf Gehirnschnitten, die wie unter Punkt 2.2.4.1 erstellt wurden, positive Signale mit dem *anti*-GLUT8-N-Antiserum nachzuweisen, wurde eine Perfusion durchgeführt. Dabei kommt es zu einer vollständigen Fixierung des Gewebes, außerdem werden störende Hintergrundsignale durch Erythrozyten in der Immunhistochemie minimiert. Die Maus wurde dazu mit einer Überdosis Narkotikum (120 mg/kg Körpergewicht Ketamin, 12 mg/kg Körpergewicht Xylazin) in eine tiefe, letale Narkose versetzt. Nachdem keine Tiefensensibilität mehr nachzuweisen war, wurde die Maus auf dem Rücken liegend fixiert und die Brusthöhle geöffnet. Der linke Herzventrikel wurde mit einer Knopfkanüle punktiert und das rechte Herzohr geöffnet. Über ein Schlauchsystem, welches mit der Knopfkanüle verbunden war, wurde zuerst mit 30 ml NaCl-Lösung gespült, um die Bildung von Blutkoagula zu vermeiden, bevor die Perfusion mit etwa 40 ml der 4%igen Paraformaldehydlösung erfolgte. Die entnommenen Gehirne wurden dann wie unter Punkt 2.2.4.1 weiter behandelt.

2.2.4.3 Entparaffinierung

Bevor die Gewebsschnitte auf den Objektträgern gefärbt oder immunhistochemisch untersucht werden konnten, musste das Gewebe zuerst nach folgendem Schema entparaffiniert werden:

Toluol	3 min
Toluol	5 min
EtOH 99,9%	3 min
EtOH 99,9%	5 min
EtOH 96%	2 min
EtOH 70%	2 min
EtOH 40%	2 min
<i>Aqua dest.</i>	

2.2.4.4 Entwässerung

Die Entwässerung der gefärbten Schnitte verlängert die Haltbarkeit der Färbungen. Sie verlief nach folgendem Schema:

EtOH 70%	30 sec
EtOH 96%	45 sec
EtOH 99,9%	3 min
EtOH 99,9%	4 min
Toluol	3 min
Toluol	4 min

2.2.4.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die HE-Färbung dient, durch den Einsatz der beiden Einzelfarbstoffe Hämatoxylin und Eosin, der Unterscheidung verschiedener Gewebestrukturen im mikroskopischen Bild. Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff, der aus dem Blauholzbaum gewonnen wird und basophile Strukturen in der Zelle blau färbt, insbesondere die DNA in den Zellkernen und das raue endoplasmatische Reticulum (rER). Eosin ist ein synthetischer Farbstoff, der eosinophile Strukturen, wie Zytoplasmaproteine rot färbt.

Die entparaffinierten Schnitte wurden 10 sec in Mayer's Hematoxylin (Bio-Optica, Mailand, Italien) inkubiert und im Anschluss 2 min unter fließendem Wasser gebläut. Nach einem kurzen Waschschrift in *Aqua dest.* folgten die Inkubation der Schnitte in 1% Eosinlösung für 50 sec, ein weiter Waschschrift in *Aqua dest.* sowie die abschließende Entwässerung und Eindeckelung in Histofluid (Krankenhaus- und Laborbedarf Fremdling, Geberskirchen).

2.2.4.6 Periodic-acid-Schiff-Färbung (PAS-Färbung)

Bei der PAS-Färbung kommt es durch die Periodsäure zur Oxidation von Glykolgruppen zu Aldehydgruppen. Das Schiff'sche Reagenz enthält fuchsinschwefelige Säure. Durch Bindung an die entstandenen Aldehydgruppen kommt es zu einem molekularen Umbau und eine chromogene Eigenschaft entsteht, deutlich erkennbar an einer magenta-roten Farbe.

Die entparaffinierten Schnitte wurden 5 min in 5% Periodsäure inkubiert und nach einem Waschschrift in *Aqua dest.* weitere 15 min in Schiff'schem Reagenz gehalten. Es folgte eine 5 minütige Inkubation in 1% Natriumdisulfid + 10% 1 N HCl. Danach wurden die Schnitte 5 min unter fließendem Wasser gespült.

Als kontrastreiche Färbung wurde im Anschluss an die PAS-Färbung noch eine HE-Färbung durchgeführt, bevor die Schnitte entwässert und eingedeckelt wurden.

2.2.4.7 *Pisum-sativum*-Agglutinin-Färbung (PSA-Färbung)

Bei *Pisum-sativum*-Agglutinin handelt es sich um ein Lektin, das aus der Gartenerbse gewonnen wird. PSA bindet spezifisch α -Methyl-Mannose-Reste, die bei Säugerspermien vor allem an Komponenten des akrosomalen Inhalts (Akrosin) vorkommen und eignet sich daher als akrosomaler Marker (Schürmann *et al.*, 2002a). Die Färbung wurde freundlicherweise von Stefan Schmidt durchgeführt. Die entparaffinierten Schnitte wurden für 30 min bei 37°C in 50 mg/ml FITC-markiertem PSA (Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO, USA) inkubiert. Zur besseren Übersicht wurden die Zellkerne parallel mit TOPRO-3 Iodid (Invitrogen, Karlsruhe) 1:100 gefärbt. Die in *Aqua dest.* gewaschenen Schnitte wurden nicht entwässert, sondern direkt in *Vectashield* (VectorLaboratories Inc, Burlingame, USA) eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte am Leica LCS (Solms)-Laserscanningmikroskop in vier sequentiellen Ebenen.

2.2.4.8 Immunhistochemischer Nachweis von GLUT8

Nach der Entparaffinierung der Schnitte erfolgte eine Mikrowellenbehandlung in Zitratpuffer (*Target-Retrieval-Solution*, ChemMate™, Dako, Hamburg), um die Antiserumbindungsstellen besser zugänglich zu machen. Die Objektträger wurden dazu 2,5 min bei 800 W in der Mikrowelle, in kochendem Zitratpuffer inkubiert. Nachdem die Objektträger abgekühlt waren, wurden sie 3 min in *Aqua dest.* gewaschen. Die Blockierung der endogenen Peroxidase fand für 10 min in 1% H₂O₂ statt, danach folgte ein Waschschrift in PBS. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Objektträger für 30 min in Antikörperverdünnungsmedium (*Antibody-Diluent with Background-Reducing-Components*, Dako, Hamburg) bei RT inkubiert und anschließend kurz in PBS gespült. Die Inkubation mit dem *anti*-GLUT8-N-Antiserum erfolgte in einer Konzentration von 1 μ g/ml in Antikörperverdünnungsmedium über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Nach einem Waschschrift in PBS wurde mit einem Biotin-konjugierten *donkey anti rabbit* IgG (Dianova, Hamburg) in einer Verdünnung von 1:800 für 30 min bei 37°C inkubiert. Es schloss sich eine 30-minütige Inkubation mit einem Streptavidin-Biotin-HRP-Komplex an. Die Visualisierung erfolgte durch Diaminobenzidin (DAB, Dako, Hamburg) nach Angaben des Herstellers. Die Schnitte wurden abschließend entwässert und in Histofluid eingedeckelt. Die Färbung wurde mikroskopisch am ECLIPSE E-100-Mikroskop (Nikon, Düsseldorf) ausgewertet und bildlich mit der Kamera CCD-1300CB (Vosskühler, Osnabrück) und dem Analyse-System LUCIA G (Nikon, Düsseldorf) festgehalten.

2.2.4.9 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopische Darstellung von Hodengewebe der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse und ihrer *Slc2a8*^{+/+}-Geschwister erfolgte in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Wennemuth (Phillips-Universität Marburg). Kleine Hodengewebsstücke wurden dazu über Nacht bei 4°C in 2,5%

Glutaraldehyd in 100 mM Cacodylat-Puffer (pH 7,4) fixiert. Nach einem Waschschrift in Na-Cacodylat-Puffer pH 7,4 wurde das Gewebe in 1% Osmiumtetroxid in Na-Cacodylat-Puffer pH 7,4 für 2 h bei 4°C behandelt. Nach einem weiteren Waschschrift wurde das Gewebe in Ethanol entwässert und in Epon 812 (Roth, Karlsruhe) eingebettet. Die Polymerisation des Einbettmediums erfolgte bei 60°C. Das geschnittene Gewebe wurde bei 80 kV am Elektronenmikroskop EM 906 (Zeiss, Oberkochen) analysiert.

2.2.5 Phänotypische Charakterisierung der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse

2.2.5.1 Versuchstierhaltung

Die Versuchstiere wurden in klimatisierten Räumen bei einer Temperatur von $20 \pm 2^\circ\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchte von 50-60% gehalten. Die Haltungsräume unterlagen einem Tag-/Nacht-Rhythmus von jeweils 12 h. Die Haltung der Tiere erfolgte in Übereinstimmung mit den NIH-Richtlinien zur Pflege und Nutzung von Versuchstieren und alle Versuche waren von der Tierversuchskommission des Landesamts für Verbraucherschutz, Landwirtschaft und Flurneuordnung des Bundeslands Brandenburg genehmigt (32-44457+36).

Um die in den Versuchen eingesetzten *Slc2a8*^{-/-}- und *Slc2a8*^{+/-}-Mäuse zu generieren, wurden ausschließlich *Slc2a8*^{+/-}-Mäuse miteinander verpaart, um unspezifische Effekte aufgrund eines unterschiedlichen genetischen Hintergrunds möglichst gering zu halten.

2.2.5.2 Zeitplan der verschiedenen Messungen der Versuchstiere

Die Jungtiere wurden im Alter von drei Wochen von den Muttertieren abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt. Die Geschwister wurden gleichmäßig auf die verschiedenen Diäten verteilt und eine Schwanzbiopsie zur Genotypisierung genommen. In Lebenswoche fünf begann die wöchentliche Messung des Körpergewichts sowie die Messung der Körperzusammensetzung und der Blutglucosespiegel. Im Laufe des Versuchs wurden verschiedene Parameter gemessen, wie die Körpertemperatur in Lebenswoche 10 oder verschiedene metabolische Parameter in Lebenswoche 12, 15 und 16. In Lebenswoche 16 fand die Tötung mit gleichzeitiger Organentnahme statt. Der Ablauf ist schematisch in Abb. 2.1 dargestellt.

Zeitplan:

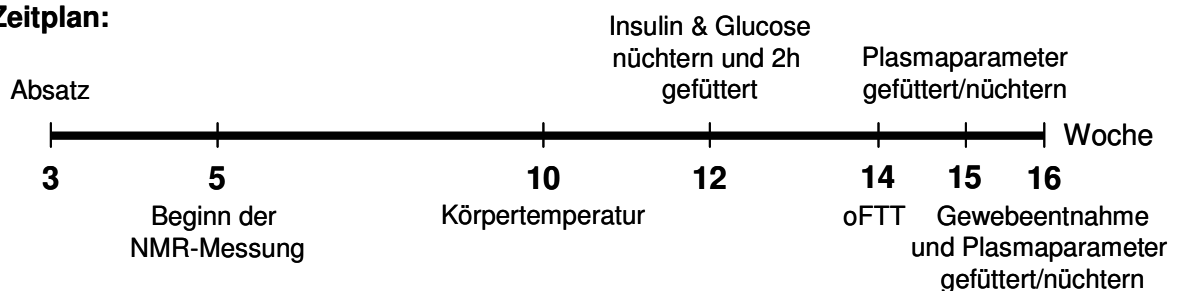


Abb. 2.1 Zeitplan der phänotypischen Charakterisierung der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse.

2.2.5.3 Messung des Körpergewichts und der Körperzusammensetzung

Das Körpergewicht der Mäuse wurde ab Lebenswoche fünf bis zur finalen Lebenswoche 16 wöchentlich mit einer Waage (Satorius, Göttingen) im Laufe des Vormittags ermittelt. Im Anschluss folgte die Messung der Körperzusammensetzung mit Hilfe der Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie; Bruker-Minispec-NMR-analyser mq 10, Bruker optics, Ettlingen). Das Spektrometer wurde vor jedem Einsatz mit Rapssamen, die einen definierten Eiweiß- und Fettgehalt besaßen, adjustiert.

2.2.5.4 Bestimmung der Blutglucosespiegel

Die Bestimmung der Blutglucosewerte erfolgte wöchentlich, regelmäßig um 8.30 Uhr. Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Messung in der Regel *ad libitum* gefüttert. Die Bestimmung der Zuckerspiegel bei 15 h gefasteten Mäusen erfolgte in den Lebenswochen 12, 15 oder 16. Der Blutzuckerspiegel wurde mit einem Glucose-Messgerät (Glucose Elite) der Firma Bayer (Leverkusen) ermittelt. Das Messprinzip beruht auf der Reaktion von Glucose mit dem Enzym Glucoseoxidase. Die durch diese Reaktion freigesetzten Elektronen produzieren einen elektrischen Strom, proportional zur Blutglucosekonzentration.

2.2.5.5 Körpertemperaturmessung

Die Messung der Körpertemperatur erfolgte rektal, mit einem elektronischen Thermometer (physitemp *model* BAT-12, Physitemp *instruments*, Clifton, NJ, USA), in Lebenswoche 10. Die Bestimmung erfolgte immer um 8.30 Uhr sowohl bei *ad libitum* gefütterten Tieren als auch bei 15 h gefasteten Tieren. Die Messungen wurden an zwei aufeinander folgenden Versuchstagen durchgeführt und ein Mittelwert aus beiden Untersuchungstagen gebildet.

2.2.5.6 Blutentnahme

Zur Bestimmung der metabolischen Plasmaparameter wurde den Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten Blut entnommen. Die Entnahme erfolgte in der Regel aus den Schwanzvenen, durch Kappen der Schwanzspitze. Lediglich bei ihrer Tötung in Lebenswoche 16, wurde das Blut, nach vorheriger Narkose mit Isofluran, durch Herzpunktion gewonnen. Das Blut wurde bis zur Zentrifugation in mit Lithium-Heparin oder EDTA beschichteten Gefäßen auf Eis gelagert und anschließend bis zur Analyse bei -80°C aufbewahrt. Die Blutabnahmen fanden immer zwischen 9 und 10 Uhr morgens statt, entweder im gefütterten Zustand oder nach einer 15-stündigen Fastenzeit über Nacht.

2.2.5.7 Organentnahme

Die Organentnahme fand in Lebenswoche 16 statt. Die Tötung der entweder *ad libitum* gefütterten oder 15h gefasteten Tiere erfolgte zwischen 9 und 10 Uhr. Nach der finalen Blutentnahme der narkotisierten Tiere wurde die Körperlänge der Mäuse gemessen, bevor die Tötung durch zervikale Dislokation stattfand. Präpariert wurden Leber, Pankreas, Hoden,

gonadale Fettdepots, subkutanes Fettgewebe, Herz, Quadrizeps, Gastrocnemius, braunes Fettgewebe und Gehirn. Die Gewichte der Organe wurden von Leber, Hoden, gonadalem Fettgewebe und Quadrizeps bestimmt. Die Organe wurden direkt nach Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und für weitere Untersuchungen bei -80°C aufbewahrt.

2.2.5.8 Bestimmung der metabolischen Parameter

Freie Fettsäuren (FA)

Die freien Fettsäuren im Plasma wurden mit dem NEFA-C-Kit der Firma Wako Chemicals GmbH (Neuss) bestimmt. Das Testprinzip basiert auf der ACS (Acyl-CoA-Synthetase)-ACOD (Acyl-CoA-Oxidase)-MEHA (3-Methyl-N-Ethyl-N-(β -Hydroxyethyl)-Anilin)-Methode. Dabei werden freie Fettsäuren durch ACS zu acyl-CoA umgesetzt. Im zweiten Schritt wird acyl-CoA durch ACOD oxidiert. Mit Hilfe des erzeugten Wasserstoffperoxids wird die oxidative Kondensation von MEHA ermöglicht, wobei ein roter Chinonimin-Farbstoff gebildet wird, welcher bei 550 nm photometrisch nachweisbar ist. Das Kit wurde nach Angaben des Herstellers verwendet.

Triglyceride (TG)

Die Plasma-Triglyceridkonzentration wurde mit dem Free Glycerol Determination Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) gemessen. Triglyceride wurden durch Lipasen zu freien Fettsäuren und Glycerol umgewandelt. Das Glycerol wurde zu Glycerol-1-Phosphat (G-1-P) phosphoryliert, welches wiederum unter anderem zu Wasserstoffperoxid oxidiert wurde. H_2O_2 katalysierte letztendlich die Bildung eines Quinonimin-Farbstoffes, der bei 540 nm photometrisch nachweisbar war. Das Kit wurde nach Angaben des Herstellers verwendet.

Insulin

Die Plasma-Insulinkonzentration wurde mit Hilfe des Insulin Mouse Ultrasensitive ELISA der Firma DRG Instruments GmbH (Marburg) bestimmt. Das Reaktionsprinzip beruht auf einer direkten Sandwich-Technik mit zwei monoklonalen Antikörpern, die an unterschiedliche Bereiche des Insulins binden. Während der eine Antikörper an eine 96-Well-Mikrotiterplatte gebunden ist, liegt der zweite Antikörper Peroxidase-konjugiert vor. Die Peroxidase wandelte das Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin zu einem Farbstoff um, welcher photometrisch nachgewiesen wurde. Die Plasma-Insulinkonzentration der Proben ließ sich durch eine mitgeführte Standardreihe errechnen. Der ELISA wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.5.9 Orale Fettoleranztest

Mit Hilfe des oralen Fettoleranztests (oFTT) lässt sich der postprandiale Fettstoffwechsel untersuchen. Dieser Versuch wurde in Lebenswoche 14 durchgeführt. Die Mäuse wurden dazu über Nacht 12 h nüchtern gesetzt. Es folgte die Gewichtsbestimmung der Tiere sowie

eine basale Blutentnahme zur Messung der Plasma-Triglyceride. Zum Zeitpunkt 0 bekamen die Tiere 10 μ l/g Körpergewicht Olivenöl gavagiert. Es folgten Blutentnahmen zu den Zeitpunkten 2, 3, 4, 6 und 12 Stunden nach Gavage. Mäusen, bei denen ein oFTT stattfand, wurde in Lebenswoche 15 kein Blut zur Bestimmung der Plasmaparameter entnommen.

2.2.5.10 Bestimmung der körperlichen Aktivität

Die Aktivität der Mäuse wurde im Alter von sechs bis acht Wochen gemessen. Es wurden gleichzeitig zwei unterschiedliche, computergestützte Systeme der Firma TSE-Systems GmbH (Bad Homburg) verwendet. Das infraMot-System zur Messung der körperlichen Aktivität und das *Running-Wheel*-System zur Messung der freiwilligen Aktivität.

Das infraMot-System basiert auf Infrarotsensoren, welche die Körperwärme der Tiere registrieren und Bewegungen in allen drei Dimensionen, die länger als 5 ms andauern, erfassen. In einem Abstand von 10 min wurde die Anzahl der Lageveränderungen der Tiere aufgezeichnet. Nach einer zweitägigen Adaptationsphase wurde die Anzahl der Bewegungsimpulse/h errechnet und für 24 Stunden, bzw. für die Licht- und die Dunkelphase gemittelt.

Das *Running-Wheel*-System erfasste jede viertel Umdrehung des Rads in beiden Orientierungen in einem definierten Beobachtungszeitraum von 10 min. Die Zahl der Umdrehungen pro Stunde wurde mit dem Umfang des Rads multipliziert, um die von jeder Maus zurückgelegte Strecke zu berechnen. Auch hier wurde nach einer zweitägigen Adaptationsperiode aus den stündlich zurückgelegten Strecken ein Mittelwert über 24 Stunden sowie für die Licht- und die Dunkelphase berechnet.

2.2.5.11 Bestimmung der Nahrungsaufnahme

Mit Hilfe des computergestützten Drinking & Feeding Monitor der Firma TSE-Systems GmbH wurde die Nahrungsaufnahme von sechs Wochen alten Mäusen bestimmt. Die Messung der Futter- und Wasseraufnahme erfolgte in frei hängenden Futterkörben und Wasserflaschen, die mit Gewichtssensoren verbunden waren. Das verbleibende Gewicht der Körbe und Flaschen wurde im Abstand von 10 min aufgezeichnet. Vor der Datenerhebung hatten die Tiere zwei Tage Zeit, um sich an das System zu adaptieren.

2.2.5.12 Bestimmung des Energieumsatzes

Der Energieumsatz von *Slc2a8*^{-/-}- und *Slc2a8*^{+/+}-Mäusen wurde mit Hilfe der indirekten Tierkalorimetrie im Oxymax Lab Animal Monitoring System (Columbus Instruments, Columbus, OH, USA) ermittelt.

Der respiratorische Quotient ($V\text{CO}_2/V\text{O}_2$) und der Energieumsatz (in kJ/Tag/kg) wurden nach Weir (1949) berechnet. Die Messdaten von zwei aufeinanderfolgenden Tagen wurden pro Stunde gemittelt und für jedes Tier ein Mittelwert jeweils über 24 Stunden, die Lichtphase und die Dunkelphase gebildet. Die Tiere hatten vor der Datenerhebung zwei Tage Zeit sich

an die neue Umgebung zu gewöhnen. Futter und Wasser standen während der Messung *ad libitum* zur Verfügung. Die Messung fand bei einer Umgebungstemperatur von 22°C statt.

2.2.5.13 Bestimmung der Lebensdauer

Um die Lebensdauer der Mäuse zu untersuchen, wurden *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Männchen und -Weibchen direkt nach dem Absetzen in Gruppen von vier bis fünf Tieren zusammengesetzt. Diese Mäuse wurden nicht zur Generierung weiterer Daten verwendet. Der Gesundheitszustand der Mäuse wurde zunächst wöchentlich, mit zunehmendem Alter der Tiere im Abstand von zwei Tagen überprüft.

3 Ergebnisse

3.1 Genotypisierung der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse

Mit Hilfe des Cre/loxP-Rekombinationssystems wurden im *Slc2a8*-Gen die Exone 5-7 ausgeschnitten. Dadurch entstand eine verkürzte mRNA, aus der kein funktionsfähiges Protein hervorgehen konnte. Mit Hilfe eines spezifischen *primer*-Paares, das vor Exon 5 und hinter Exon 7 bindet, wurde nach Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Gelelektrophorese für das Wildtyp-Allel eine Bande von 1,8 kb im Agarosegel nachgewiesen, wohingegen die Bande des *knockout*-Allels nur noch 0,5 kb betrug.

Entsprechend des Genotyps der Elterntiere konnten unter den Jungtieren drei verschiedene Genotypen vorkommen: Tiere, die homozygot das Wildtyp-Allel trugen (*Slc2a8*^{+/+}), Tiere, die homozygot das Allel mit Deletion trugen (*Slc2a8*^{-/-}) sowie Tiere, die heterozygot das Allel mit Deletion trugen (*Slc2a8*^{+/-}) (Abb. 3.1).

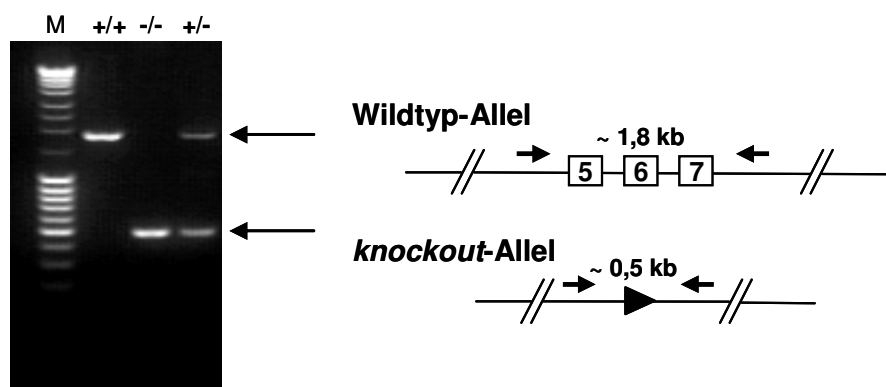


Abb. 3.1 Nachweis der drei Genotypen *Slc2a8*^{+/+}, *Slc2a8*^{+/-} und *Slc2a8*^{-/-} mittels PCR.

PCR-Ergebnis der drei möglichen Genotypen einer *Slc2a8*^{-/-}-Mauszucht nach Auftrennung im Agarosegel. Nachkommen einer Kreuzung heterozygoter Tiere konnten das Wildtyp-Allel (1,8 kb) homozygot tragen, homozygot das Allel mit Deletion von Exon 5-7 (0,5 kb) oder heterozygot das Allel mit Deletion tragen.

Sämtliche Ergebnisse dieser Arbeit wurden durch die Untersuchung von männlichen Tieren gewonnen, die homozygot die Deletion trugen (*Slc2a8*^{-/-}) und mit Wurfgeschwistern verglichen, die homozygot das Wildtyp-Allel trugen (*Slc2a8*^{+/+}).

Da unter den Nachkommen heterozygoter (*Slc2a8*^{+/-} x *Slc2a8*^{+/-}) Verpaarungen *Slc2a8*^{-/-}-Tiere nachgewiesen wurden, zeigte sich, dass Mäuse auch ohne GLUT8 lebensfähig sind. Mittels quantitativer-*realtime*-PCR (qRT-PCR) wurde keine *Slc2a8*-mRNA in den untersuchten Geweben von 16 Wochen alten *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen (F2N3) nachgewiesen (Abb. 3.2A), wohingegen ihre gleichaltrigen *Slc2a8*^{+/+}-Wurfgeschwister die höchste *Slc2a8*-mRNA Expression im Hodengewebe aufwiesen, gefolgt von Muskel, Gehirn, Leber und weißem Fettgewebe.

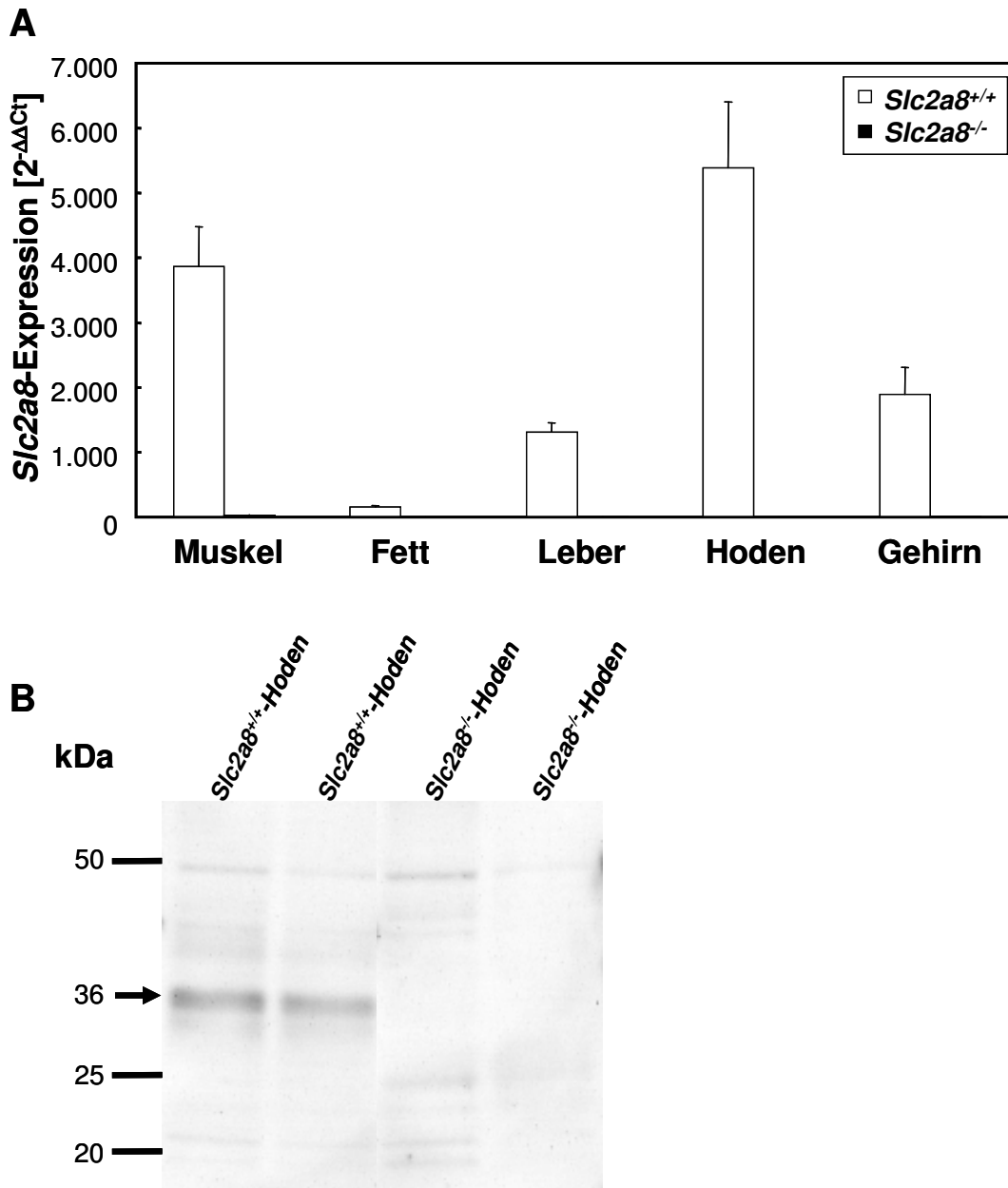


Abb. 3.2 Fehlende *Slc2a8*-mRNA- und GLUT8-Expression in Geweben von *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen.

(A) Die mRNA-Expression von *Slc2a8* wurde mittels qRT-PCR ermittelt. Die Balken zeigen die Mittelwerte der *Slc2a8*-Expression von sechs Tieren je Genotyp + SEM in den angegebenen Geweben von *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen (F2N3). Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Organentnahme 16 Wochen alt. (B) Homogenate aus Hodengewebe von 12 Wochen alten *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen (F2N3) wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit dem *anti*-GLUT8-N-Antiserum inkubiert.

Auch im Westernblot wurde mit einem gegen den N-Terminus von GLUT8 gerichteten Antiserum (*anti*-GLUT8-N-Antiserum) kein Signal im Homogenat der Hodengewebe 12 Wochen alter *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse (F3N3) nachgewiesen, wobei Lysate ihrer *Slc2a8*^{+/+}-Geschwister eine deutliche Bande bei 36 kD zeigten (Abb. 3.2B).

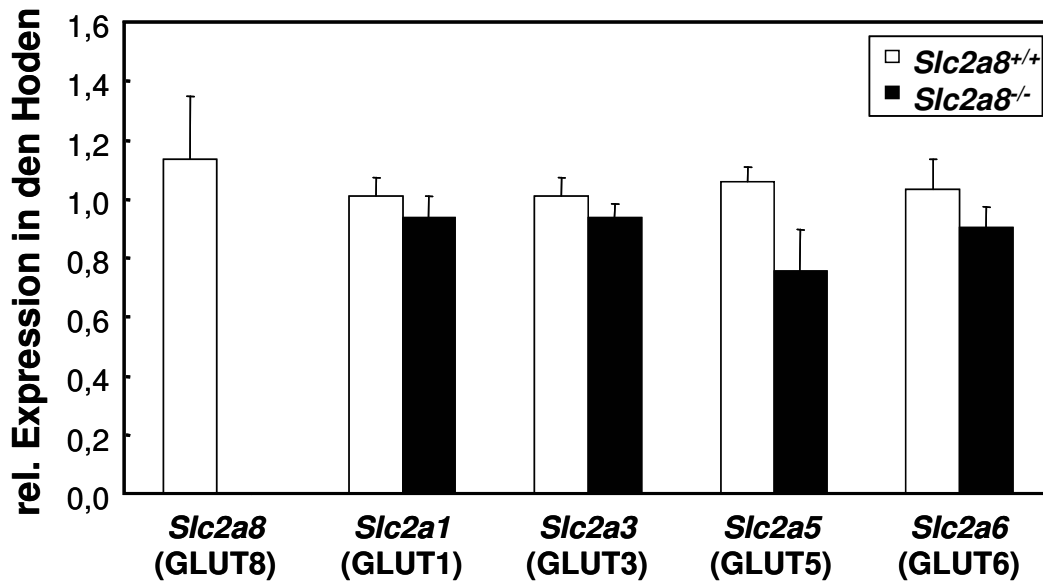


Abb. 3.3 mRNA-Gehalt verschiedener Glucosetransporter im Hodengewebe von *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen.

Die Balken zeigen die Mittelwerte der mRNA-Expression verschiedener Glucosetransporter von sechs Tieren je Genotyp + SEM in den Hoden von 16 Wochen alten *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen (F2N3).

Um zu untersuchen, ob ein anderer in den Hoden exprimierter Glucosetransporter zur Kompensation des fehlenden GLUT8 in den *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen stärker exprimiert wird, wurde mittels qRT-PCR der mRNA-Gehalt von *Slc2a1*, *Slc2a3* und *Slc2a5* in den Hoden von 16 Wochen alten *Slc2a8*^{-/-}-Tieren und ihren *Slc2a8*^{+/+}-Wurfgeschwistern (F2N3) untersucht (Abb. 3.3). Zudem wurde die Expression des nächsten Verwandten von *Slc2a8*, dem Klasse III-Transporter *Slc2a6* ermittelt. Wie in Abb. 3.3 dargestellt konnten keine signifikanten Expressionsänderungen der untersuchten Glucosetransporter im Hodengewebe der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse nachgewiesen werden.

3.2 Charakterisierung der Fertilität der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse

3.2.1 Abweichende Verteilung der Genotypen von der Mendel'schen Regel

Bei der Verpaarung von *Slc2a8*^{+/+}-Mäusen ließ sich in der F2N3-Generation eine Verschiebung der Mendel-Verteilung beobachten. Statt den erwarteten 25% *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}- sowie 50% *Slc2a8*^{+/-}-Nachkommen zeigten die insgesamt 714 genotypisierten Jungtiere eine Verteilung von 218 *Slc2a8*^{+/+}-, 158 *Slc2a8*^{-/-}- und 338 *Slc2a8*^{+/-}-Tieren. Daraus ergab sich eine signifikante ($p = 0,002$) Reduzierung der Anzahl an *Slc2a8*^{-/-}-Nachkommen von der erwarteten Mendel-Verteilung. Die Geschlechterverteilung innerhalb dieser 714 Jungtiere, wich dagegen nicht von der Erwartung ab (Tab. 3.1).

	beobachtet	erwartet	beobachtet
<i>Slc2a8</i> ^{+/+}	30,50%	25%	218 (113 Männchen)
<i>Slc2a8</i> ^{-/-}	22,10%	25%	158 (89 Männchen)
<i>Slc2a8</i> ^{+/-}	47,30%	50%	338 (186 Männchen)

Tab. 3.1 Verteilung der Genotypen (*Slc2a8*^{+/+}, *Slc2a8*^{-/-}, *Slc2a8*^{+/-}) von insgesamt 714 Nachkommen (F2N3) aus *Slc2a8*^{+/+} x *Slc2a8*^{+/-}-Verpaarungen .

Um zu überprüfen, ob diese geringere Anzahl an geborenen *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen auf eine verschlechterte Fertilität der *Slc2a8*^{-/-}-Tiere zurückzuführen ist, wurden über einen Zeitraum von sechs Monaten *Slc2a8*^{+/+}-Männchen mit *Slc2a8*^{+/+}-Weibchen (N = 7), *Slc2a8*^{-/-}-Männchen mit *Slc2a8*^{+/+}-Weibchen (N = 8) und *Slc2a8*^{-/-}-Männchen mit *Slc2a8*^{-/-}-Weibchen (N = 9) verpaart und der daraus hervorgegangene Nachwuchs hinsichtlich Anzahl der Würfe, durchschnittlicher Wurfgröße, Gesamtzahl geborener Jungtiere sowie Anzahl männlicher und weiblicher Nachkommen untersucht (Tab. 3.2). Die Elterntiere dieser Verpaarungen befanden sich alle in der Rückkreuzungsgeneration F2N3. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Verpaarungen beobachtet, woraus sich schließen lässt, dass weder *Slc2a8*^{-/-}-Männchen noch *Slc2a8*^{-/-}-Weibchen infertil sind.

<i>Slc2a8</i> -Genotyp		Wurfzahl	Wurfgröße	geborene Jungtiere pro Paar	% Männchen	% Weibchen
Männchen	Weibchen					
+/+	+/+	5,43 ± 0,43	5,79 ± 0,41	31,14 ± 3,11	55,33 ± 4,36	44,66 ± 4,36
-/-	+/+	4,33 ± 0,50	5,57 ± 0,54	24,78 ± 3,72	59,21 ± 1,91	40,79 ± 1,91
-/-	-/-	4,75 ± 0,53	6,23 ± 0,39	29,38 ± 3,44	60,05 ± 3,47	39,95 ± 3,47

Tab. 3.2 Bestimmung der Fertilität mittels Analyse der Nachkommen homozygoter Verpaarungen.

Slc2a8^{+/+}-Männchen und -Weibchen (N = 7), *Slc2a8*^{-/-}-Männchen und *Slc2a8*^{+/+}-Weibchen (N = 8) und *Slc2a8*^{-/-}-Männchen und -Weibchen (N = 9) (alle F2N3) wurden miteinander verpaart. Die Wurfgröße und die Anzahl der geborenen Jungtiere wurden über einen Zeitraum von sechs Monaten untersucht.

3.2.2 Beeinträchtigte Motilität der *Slc2a8*^{-/-}-Spermien

Eine reduzierte Spermienzahl sowie eine beeinträchtigte Beweglichkeit der Spermien könnte die Ursache für die verminderte Zahl von *Slc2a8*^{-/-}-Nachkommen heterozygoter Eltern sein. Mittels *computer assisted sperm analysis* (CASA) wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Wennemuth (Phillips-Universität Marburg) die Spermienanzahl und -motilität von 10-12 Wochen alten Mäusen (F2N3) untersucht.

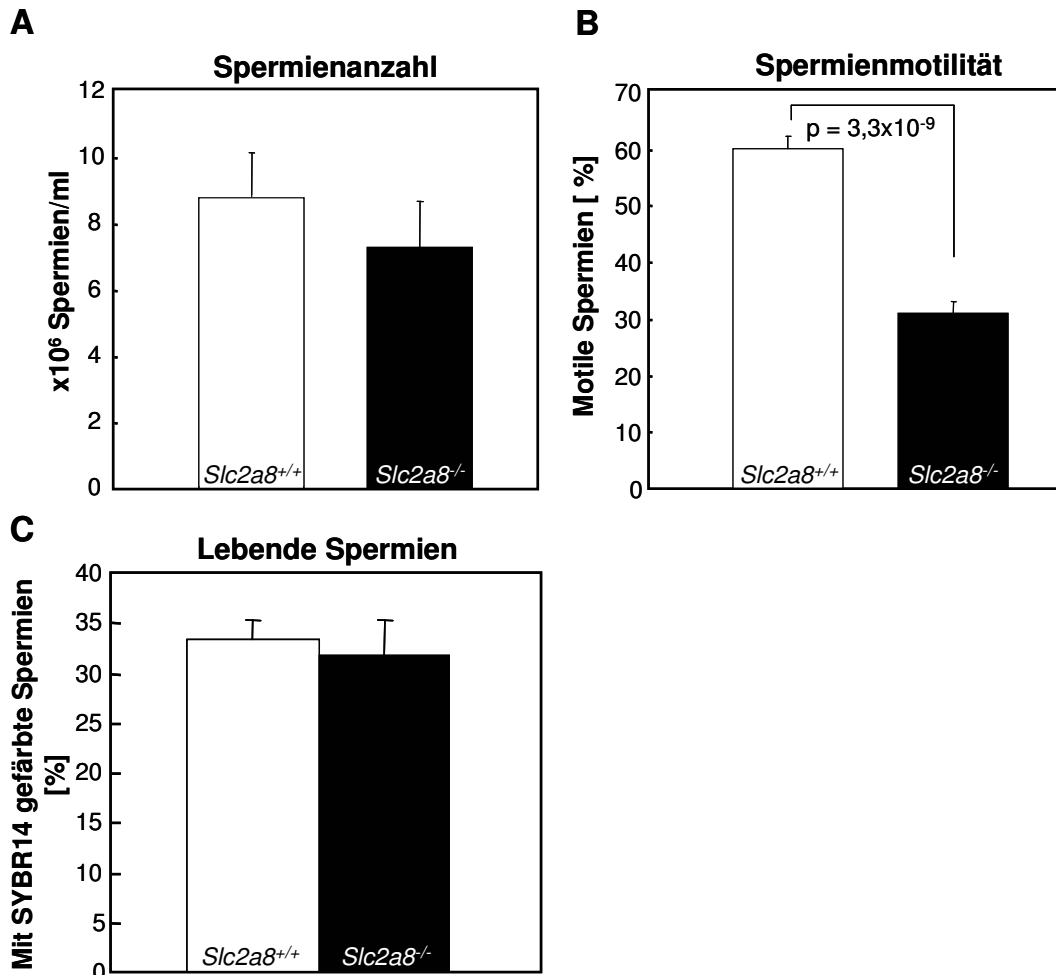


Abb. 3.4 Bestimmung der Spermienanzahl und -motilität.

Die Spermienanzahl (A) und die Spermienmotilität (B) wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Wennemuth (Phillips-Universität Marburg) mittels CASA bestimmt. Die Balken zeigen die Mittelwerte der Analysen von sechs Mäusen je Genotyp + SEM im Alter von 10-12 Wochen (F2N3). Die Anzahl der lebenden Spermien (C) wurde durch die Aufnahme des Kernfarbstoffs SYBR14 bestimmt. Die Auswertung der Färbung erfolgte am Durchflusszytometer. Die Balken zeigen die Mittelwerte der Prozentzahlen gefärbter Spermien von je acht *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Tieren (F2N3) im Alter von 10-12 Wochen + SEM.

Es wurden keine Unterschiede in der Gesamtzahl der Spermien zwischen *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Geschwistern beobachtet (Abb. 3.4A). Allerdings konnte eine signifikante ($p = 3,3 \times 10^{-9}$) Verringerung um fast 50% in der Anzahl bewegungsfähiger Spermien diagnostiziert werden. Von den aus den *Slc2a8*^{+/+}-Tieren isolierten Spermien waren etwa 60% motil, wogegen von den aus den *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen isolierten Spermien nur 31% Motilität zeigten (Abb. 3.4B). Betrachtete man jedoch nur die motilen Spermien, schienen die *Slc2a8*^{-/-}-

Spermien keine Nachteile in ihrer Fähigkeit zur Fortbewegung gegenüber den *Slc2a8*^{+/+}-Spermien zu haben. Es wurden keine Unterschiede in der schnellen ($\geq 25 \mu\text{m}/\text{sec}$; $56,75 \pm 1,6$ zu $56,83 \pm 2,1\%$), der langsamen ($< 25 \mu\text{m}/\text{sec}$; $32,75 \pm 1,1$ zu $33,17 \pm 1,6\%$) und der nicht progressiven lokalen Bewegung ($< 5 \mu\text{m}/\text{sec}$ und $> 1 \mu\text{m}/\text{sec}$; $10,5 \pm 1,3$ zu $10,0 \pm 2,3\%$) zwischen *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Spermien ausgemacht.

Ebenfalls kein Unterschied zwischen den Genotypen war bezüglich der Anzahl lebender Spermien (Abb. 3.4C) zu beobachten.

Die aus den Nebenhoden von 10-12 Wochen alten Mäusen (F2N3) präparierten Spermien wurden mit dem Kernfarbstoff SYBR14 inkubiert und die Färbung am Durchflusszytometer mit einem FL-1-Bandpassfilter ($530 \pm 30 \text{ nm}$) ausgewertet. Etwa 30% der *Slc2a8*^{+/+}- als auch der *Slc2a8*^{-/-}-Spermien wiesen eine Emission größer 10^1 auf und konnten daher als lebend klassifiziert werden. Das zeigt, dass die geringere Anzahl motiler *Slc2a8*^{-/-}-Spermien nicht auf eine reduzierte Zahl an lebenden Spermien zurückzuführen war.

3.2.3 Veränderte Morphologie der *Slc2a8*^{-/-}-Spermien

Die reduzierte Anzahl bewegungsfähiger *Slc2a8*^{-/-}-Spermien könnte der Grund für die geringere Anzahl geborener *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse aus *Slc2a8*^{+/+}- x *Slc2a8*^{+/+}-Verpaarungen sein. Zur näheren Analyse der Ursache der geringeren Motilität wurden verschiedene Parameter untersucht, die die Beweglichkeit von Spermien beeinflussen.

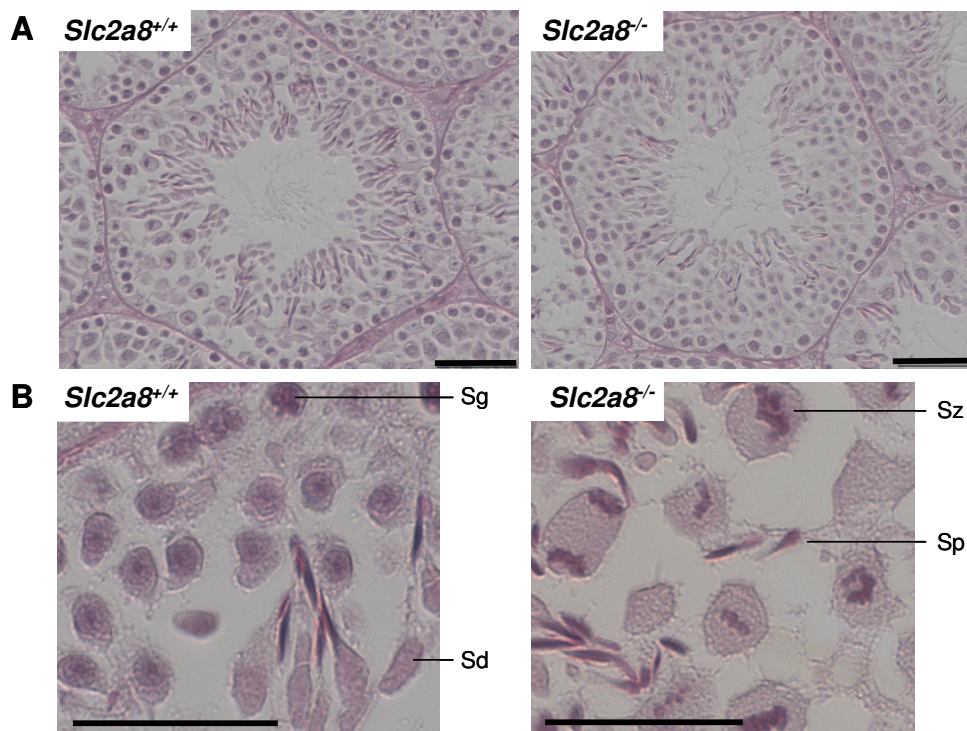


Abb. 3.5 Überprüfung der Morphologie der *Slc2a8*^{-/-}-Spermien.

Hodengewebe von 10-12 Wochen alten *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen (F2N3) wurde mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Gleichzeitig wurde das in den Zellen gespeicherte Glykogen im Hodengewebe durch eine PAS-Färbung (magenta-rot) sichtbar gemacht. (A) Balken $50 \mu\text{m}$, (B) Balken $24 \mu\text{m}$. Sg = Spermatogonie, Sz = Spermatozyte, Sd = Spermatide, Sp = Spermium.

Essentiell für die Bewegungsfähigkeit eines Spermiums ist die vollständige Spermienreifung und der richtige Aufbau des Spermiums. Defekte in der Spermienreifung können zu sehr unterschiedlichen Veränderungen in der Spermienstruktur führen (Escalier und David, 1984; Lalouette *et al.*, 1996; Butler *et al.*, 2002).

Um die Morphologie und die Reifung der *Slc2a8*^{-/-}-Spermien zu analysieren, wurden Hodenschnitte von *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen (F2N3) mit Hämatoxylin-Eosin (HE-Färbung) gefärbt. Es waren keine strukturellen Unterschiede innerhalb der Spermatogonien, der Spermatozyten, der Spermatiden sowie der Spermien zwischen den Genotypen erkennbar (Abb. 3.5). Gleichzeitig wurde eine *Periodic-acid-Schiff-Reaction* (PAS-Färbung) durchgeführt, um zu überprüfen, ob es durch Störungen im Glykogenstoffwechsel zu einer Unterversorgung der immotilen Spermien kommt. Aber auch in der Menge des im Gewebe gespeicherten Glykogens, erkennbar an der magenta-roten Färbung, war kein Unterschied zwischen den Genotypen auszumachen (Abb. 3.5).

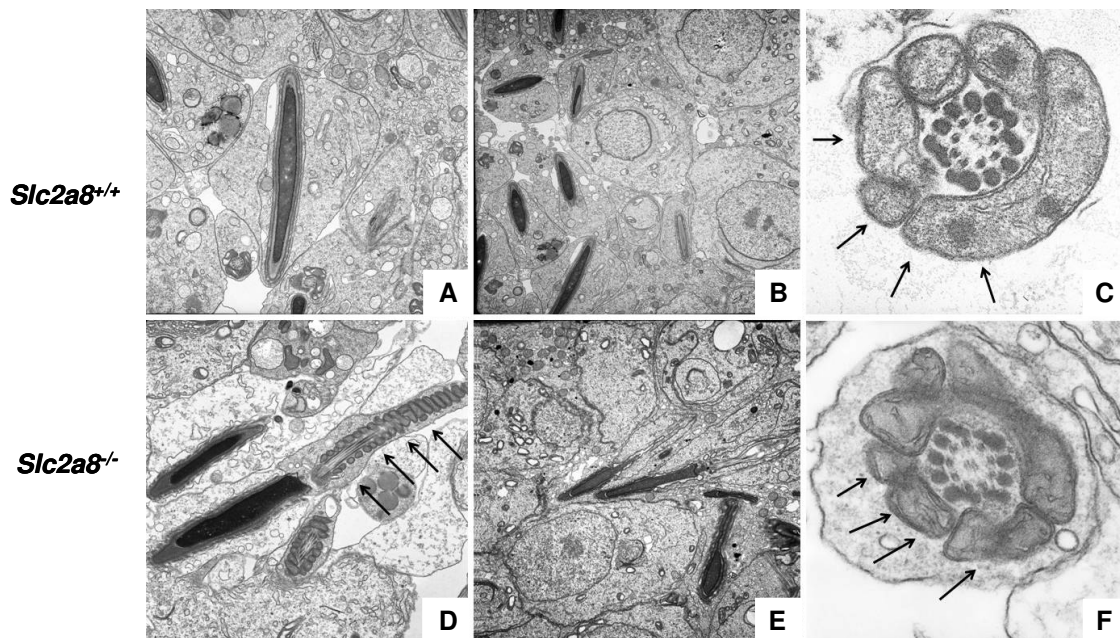


Abb. 3.6 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Hodenschnitten.

Die Elektronenmikroskopie des (A-C) *Slc2a8*^{+/+}- und des (D-F) *Slc2a8*^{-/-}-Hodengewebes (F2N3) erfolgte in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Wennemuth (Phillips-Universität Marburg). (A) Frühe Spermatiden, (B, D, E) späte Spermatiden, (C, F) Schnitt durch das Mittelstück der Spermien. Die Pfeile markieren die Mitochondrien. (Vergrößerung: A & D x 18.000, B & E x 12.000, C & F x 40.000)

Die Spermienstruktur wurde zusätzlich elektronenmikroskopisch in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Wennemuth (Phillips-Universität Marburg) untersucht (Abb. 3.6). Die späten *Slc2a8*^{-/-}-Spermatiden (F2N3) zeigten den klassischen Aufbau mit einer normal geformten Kopfregion, die neben dem Kern auch das Akrosom enthielt, einem verdickten Mittelteil, in dem die Mitochondrien um die Axonema angeordnet waren sowie einem geraden Spermischwanz, ohne Windungen oder Knicke (Abb. 3.6D). Auch in den verschiedenen Vorläuferzellen wurden keine Veränderungen in den *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen (Abb. 3.6E), im

Vergleich zu ihren *Slc2a8*^{+/+}-Geschwistern (Abb. 3.6A&B), beobachtet. Auffällig war allerdings, dass die Mitochondrien einiger *Slc2a8*^{-/-}-Spermatiden eine mangelhafte Kondensation aufwiesen (Abb. 3.6F), ein Befund, der in keiner *Slc2a8*^{+/+}-Spermatide auszumachen war (Abb. 3.6C).

3.2.4 Untersuchung der Spermienreifung in den Nebenhoden

Spermien, die die Hoden verlassen, sind noch immer unreif und infertil. Ihre weitere Reifung erfolgt in den Nebenhoden, hier entwickeln die Spermien Fähigkeiten wie die gerichtete Vorwärtsbewegung, die Befähigung zur Hyperaktivierung und die Akrosomreaktion (Toshimori, 2003; Aitken *et al.*, 2007).

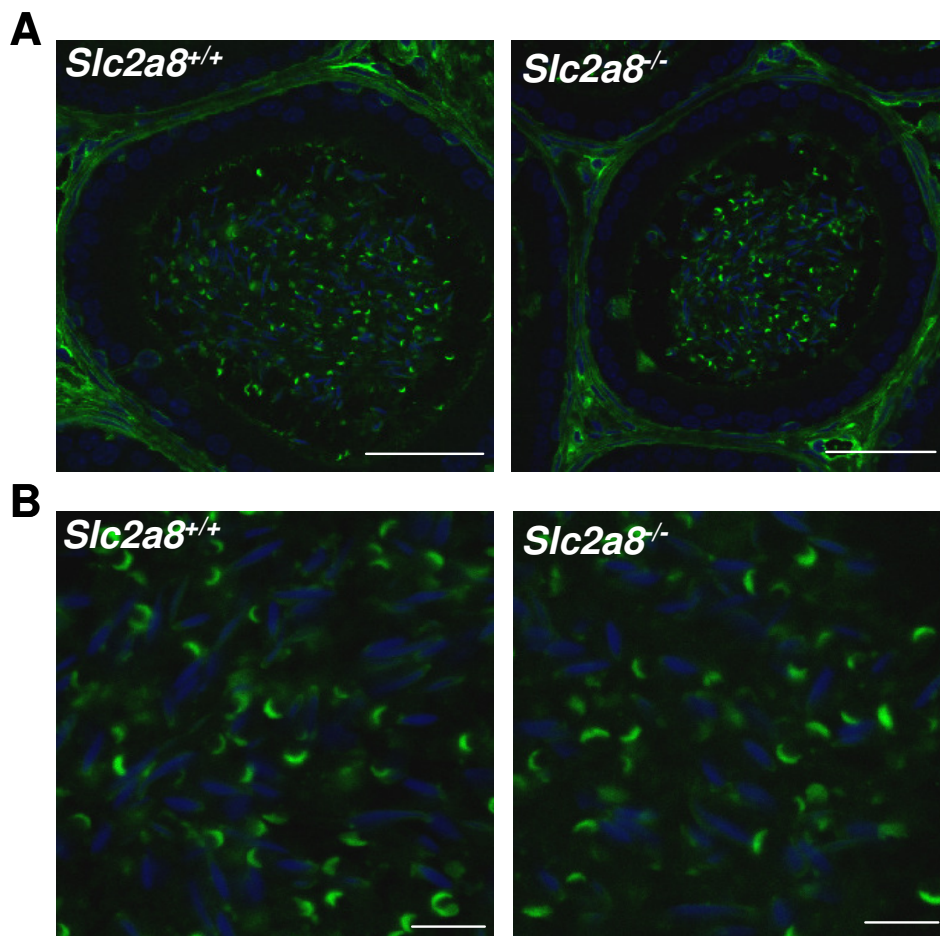


Abb. 3.7 Untersuchung der Spermienreifung durch die Färbung des Akrosoms mittels *Pisum-sativum*-Agglutinin.

Nebenhodenschnitte von 10-12 Wochen alten *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen (N2N7) wurden mit dem akrosomalen Marker *Pisum-sativum*-Agglutinin und DAPI als Kernmarker gefärbt. Die Färbung wurde von Stefan Schmidt durchgeführt. Die Auswertung der Färbung erfolgte am konfokalen Fluoreszenzmikroskop. (A) Balken 40 μ m, (B) Balken 8 μ m.

Die Spermienreifung in den Nebenhoden wurde mit Hilfe des akrosomalen Markers *Pisum-sativum*-Agglutinin (PSA) in 10-12 Wochen alten *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Tieren (F2N7) untersucht, wobei die Zellkerne gleichzeitig mit DAPI markiert wurden. Es waren keine

Unterschiede in der Färbung zwischen den Genotypen sichtbar (Abb. 3.7), was vermuten lässt, dass die Reifung der *Slc2a8*^{-/-}-Spermien in den Nebenhoden nicht beeinträchtigt war.

3.2.5 Bestimmung der Glucoseaufnahme der *Slc2a8*^{-/-}-Spermien

Obwohl es unwahrscheinlich erschien, dass durch Fehlen eines intrazellulär lokalisierten Glucosetransporters die Glucoseaufnahme beeinträchtigt ist, wurde die Aufnahme von 1 mCi/ml [¹⁴C]-2-Desoxyglucose in aus Nebenhoden isolierte Spermien untersucht, da auch eine verschlechterte Energieaufnahme für eine verminderte Motilität der Spermien verantwortlich sein könnte. Die Mäuse (F2N7) waren zum Zeitpunkt der Spermienisolation 12 Wochen alt. Die [¹⁴C]-2-Desoxyglucose-Aufnahme wurde nach 15 min durch die Zugabe kalter Glucoselösung gestoppt. Wie erwartet wurden keine signifikanten Unterschiede in der Aufnahmerate von *Slc2a8*^{+/+}-Spermien und *Slc2a8*^{-/-}-Spermien beobachtet (Abb. 3.8).

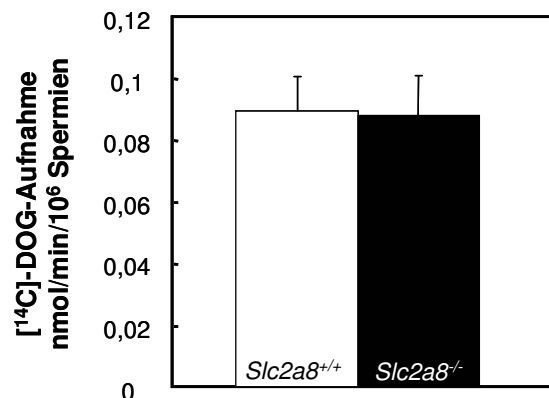


Abb. 3.8 Untersuchung der Glucoseaufnahme der *Slc2a8*^{-/-}-Spermien.

Die Aufnahme von 1 mCi/ml [¹⁴C]-2-Desoxyglucose (DOG) wurde in Spermien von 12 Wochen alten *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen (F2N7) ermittelt. Die Aufnahme wurde nach 15 min gestoppt. Die Balken zeigen die Mittelwerte der [¹⁴C]-2-Desoxyglucose-Aufnahme, berechnet auf nmol/min/10⁶ Spermien von je sechs *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen + SEM.

3.2.6 Reduziertes mitochondriales Membranpotential der *Slc2a8*^{-/-}-Spermien

Für die Energieversorgung der Spermien spielt, neben der Glykolyse entlang des Schwanzes, die mitochondriale Phosphorylierung eine wichtige Rolle (Perl *et al.*, 2006). Das mitochondriale Membranpotential 10-12 Wochen alter *Slc2a8*^{-/-}-Spermien (F2N3) war signifikant ($p = 0,009$) niedriger als das der gleichaltrigen *Slc2a8*^{+/+}-Geschwister (Abb. 3.9A&B). Nur etwa die Hälfte der *Slc2a8*^{-/-}-Spermien zeigte nach Färbung mit JC-1 im FL-2-Bandpassfilter (585 ± 42 nm) eine Emission größer 10^2 , wohingegen 74% der *Slc2a8*^{+/+}-Spermien diese Emission aufwiesen (Abb. 3.9A). Das entsprach einer Reduktion des Membranpotentials um 20%. Dieser Effekt war auch mikroskopisch mit geringerer Fluoreszenzintensität des Mittelteils der Spermien im roten Wellenbereich gut sichtbar. Abb. 3.9B zeigt exemplarisch die geringere JC-1-Färbung im roten Fluoreszenzbereich (590 nm), was einem reduzierten Membranpotential entspricht.

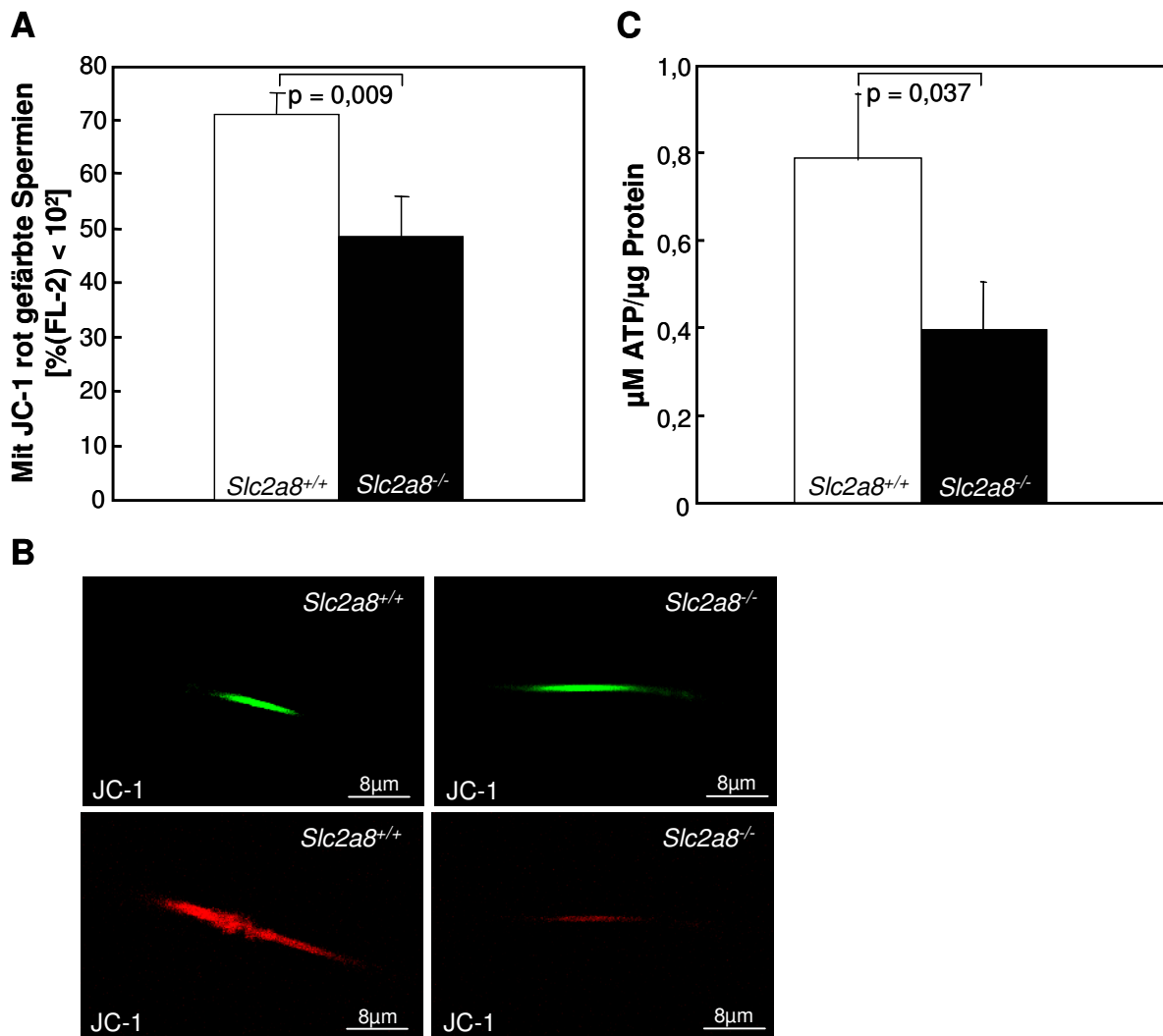


Abb. 3.9 Bestimmung des ATP-Gehalts und des mitochondrialen Membranpotentials von *Slc2a8^{+/+}*- und *Slc2a8^{-/-}*-Spermien.

Für die Analysen wurden Spermien von 10-12 Wochen alten Mäusen (F2N3) isoliert. (A & B) Das mitochondriale Membranpotential der Spermien wurde mittels JC-1-Färbung bestimmt. JC-1 ändert in Abhängigkeit des mitochondrialen Membranpotentials seine Farbe von grün nach rot. Die Auswertung der Färbung erfolgte am Durchflusszytometer (A) und am Mikroskop (B). Die Balken zeigen die Mittelwerte der Analysen von 10 *Slc2a8^{+/+}*- und 12 *Slc2a8^{-/-}*-Mäusen. (C) Der ATP-Gehalt der *Slc2a8^{+/+}*- und *Slc2a8^{-/-}*-Spermien wurde mittels Luciferase-Assay der Firma Roche bestimmt (siehe Methodenteil 2.2.3.8). Die Balken zeigen die Mittelwerte der Analysen von je acht *Slc2a8^{+/+}*- und *Slc2a8^{-/-}*-Mäusen + SEM.

Um zu untersuchen, welche Auswirkung das reduzierte Membranpotential der *Slc2a8^{-/-}*-Spermien auf die ATP-Produktion hat, wurde mittels eines Luciferase-assays der ATP-Gehalt in isolierten Spermien von 10-12 Wochen alten *Slc2a8^{+/+}*- und *Slc2a8^{-/-}*-Tieren (F2N3) bestimmt (Abb. 3.9C). In den Spermien der *Slc2a8^{-/-}*-Männchen wurde im Vergleich zu ihren *Slc2a8^{+/+}*-Geschwistern ein signifikant ($p = 0,0037$) verringerter ATP-Gehalt gemessen.

Ein weiteres Kriterium zur Analyse der Bewegungsfähigkeit von Spermien ist die Expression verschiedener Gene, deren Produkte Einfluss auf die Motilität der Spermien haben.

Aber für keinen der untersuchten Kandidaten (spermien-spezifische *Glyceraldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase* [GAPDH-S], *Calmodulin*, γ -*Glutamyltranspeptidase* [GGT] und

Glutathionperoxidase [*GSH-Peroxidase*] wurde mittels qRT-PCR ein Expressionsunterschied zwischen *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Hoden (F2N3) beobachtet (Abb. 3.10).

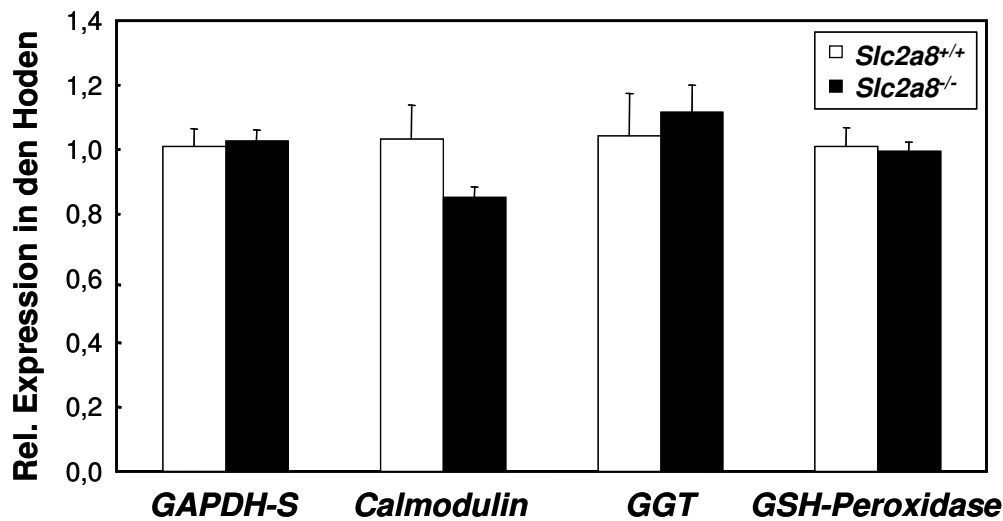


Abb. 3.10 m-RNA-Spiegel verschiedener, für die Spermienmotilität wichtiger Gene in Hoden von *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen.

Die quantitative Ermittlung der mRNA-Spiegel erfolgte mit Hilfe von *Taqman*-Sonden. Die Balken zeigen die Mittelwerte der Analysen aus Hodengewebe von je sechs *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen (F2N3) + SEM im Alter von 16 Wochen. (*Gapdh-S* = spermien-spezifische *Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase*, *GGT* = γ -*Glutamyltranspeptidase*, *GSH-Peroxidase* = *Glutathionperoxidase*)

3.2.7 Bestimmung der zytoplasmatischen und der mitochondrialen Kalziumkonzentration der *Slc2a8*^{-/-}-Spermien

Weitere Parameter, die mit der Bewegungsfähigkeit von Spermien assoziiert werden, sind Veränderungen in der intrazellulären (Perl *et al.*, 2006) oder der mitochondrialen (Okunade *et al.*, 2004) Kalziumkonzentration sowie die unvollständige Glykosylierung von Proteinen und Lipiden in den Hoden (Yildiz *et al.*, 2006).

Die zytoplasmatische und mitochondriale Kalziumkonzentration der Spermien (F2N3) wurde mittels spezifischer Kalziumindikatoren am Durchflusszytometer analysiert (Abb. 3.11). Die zytoplasmatische Kalziumkonzentration wurde durch Färbung von isolierten Spermien aus 10-12 Wochen alten Mäusen mit dem Kalziumindikator Fluo3/AM-Ester ermittelt (Abb. 3.11A). Die Abbildung zeigt den Mittelwert der Prozentzahl von *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Spermien, die mit dem FL-1-Bandpassfilter (530 ± 30 nm) eine Emission von 10¹-10² zeigten. Die mitochondriale Kalziumkonzentration wurde durch die Färbung der Spermien von 10-12 Wochen alten Tieren mit dem Indikator Rhod2/AM-Ester untersucht (Abb. 3.11B). Errechnet wurde der Mittelwert der Prozentzahl von *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Spermien mit einer Emission von 10¹-10², welche mit dem FL-2-Bandpassfilter (585 ± 42 nm) aufgenommen wurde. Es wurden jedoch weder in der zytoplasmatischen noch in der mitochondrialen Kalziumkonzentration Unterschiede zwischen den Genotypen beobachtet.

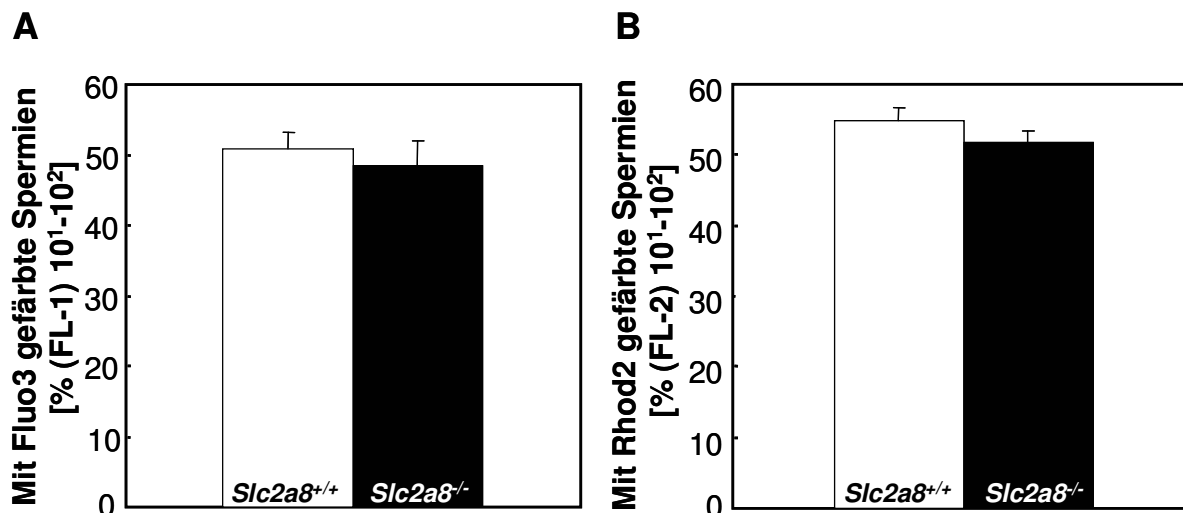


Abb. 3.11 Bestimmung der intrazellulären und der mitochondrialen Kalziumkonzentration von *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Spermien.

Die isolierten Spermien von 10-12 Wochen alten Mäusen (F2N3) wurden mit (A) Fluo3/AM-Ester bzw. (B) Rhod2/AM-Ester inkubiert. Die Auswertung der Färbung erfolgte am Durchflusszytometer. Die Balken zeigen die Mittelwerte der Prozentzahl Spermien mit einer Emission von 10¹-10² + SEM, die (A) mit dem FL-1-Bandpassfilter (530 ± 30 nm) bzw. (B) dem FL-2-Bandpassfilter (585 ± 42 nm) von sieben *Slc2a8*^{+/+}- und acht *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen je Genotyp aufgenommen wurde.

Die korrekte Proteinglykosylierung der Hodenproteine wurde über die Bindung eines Lektins überprüft. Lektine sind eine Klasse von sekundären Pflanzenstoffen, die spezifische Kohlenhydratstrukturen binden und zur Markierung glykosylierter Proteine eingesetzt werden. Hodenhomogenate von 12 Wochen alten *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen (F3N3) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose übertragen. Die Markierung der Zuckerreste erfolgte durch Meerrettichperoxidase-konjugiertes Concanavalin A aus *Canavalia ensiformis*. Mit diesem Lektin ergab sich kein unterschiedliches Bandenmuster der Proben von *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Tieren (Abb. 3.12B), so dass die Proteinglykosylierung in den *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen nicht beeinträchtigt zu sein scheint. Die Überprüfung des Proteingehalts der aufgetragenen Proben erfolgte mit Hilfe einer Ponceau-Rot-Färbung (Abb. 3.12A).

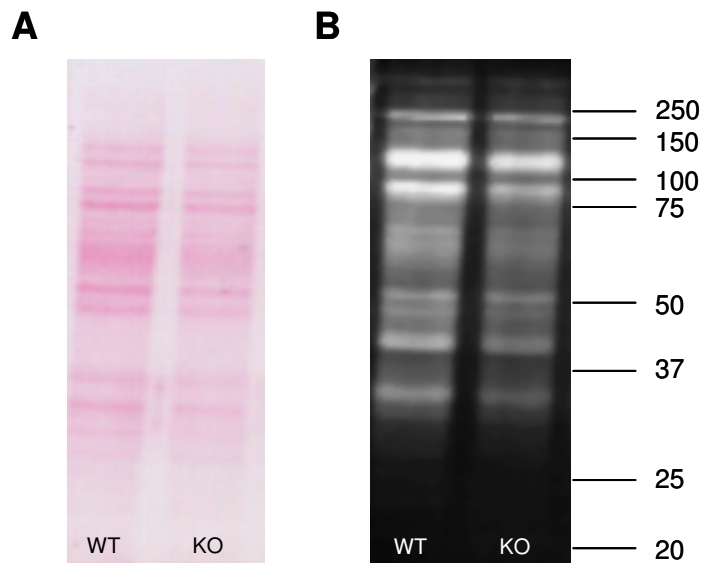


Abb. 3.12 Analyse des Glykosylierungsmusters von Hodenproteinen der *Slc2a8*^{-/-}-Maus.

Hodenhomogenate von 12 Wochen alten *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen (F3N3) wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrozellulose übertragen. Die Überprüfung der aufgetragenen Proteinmenge erfolgte mittels Ponceau-Rot-Färbung (A). Die glykosylierten Proteine wurden durch Inkubation mit dem Lektin Concanavalin A (*Canavalia ensiferum*) sichtbar (B).

3.3 Verteilung der GLUT8-Expression im Gehirn

Da *Slc2a8* in der qRT-PCR neben den Hoden die höchste Expression im Gehirn zeigte, wurde geprüft, in welchen Regionen des Gehirns GLUT8 vorlag. Die genaue Verteilung von GLUT8 sollte Hinweise darauf geben, welche Rolle der Transporter neben GLUT1 und GLUT3 in der Glucosehomöostase des Gehirns spielt. Mittels qRT-PCR wurde *Slc2a8*-mRNA im Hypothalamus, in der Amygdala und im Hippocampus von 12 Wochen alten *Slc2a8*^{+/+}-Mäusen (F3N7) nachgewiesen, wohingegen kein Signal in den Gehirnen ihrer *Slc2a8*^{-/-}-Geschwister detektierbar war (Abb. 3.13A).

Zur detaillierten Analyse der GLUT8-Expression im Gehirn wurde das *anti*-GLUT8-Antiserum, welches gegen eine C-terminale Sequenz des Proteins gerichtet ist (*anti*-GLUT8-C Antiserum), immunhistologisch eingesetzt und die Spezifität der Färbung durch parallele Behandlung von Schnitten der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse (F3N7) geprüft (Abb. 3.13Bf). Hierbei zeigten sich die stärksten spezifischen Signale im Hippocampus, gefolgt von Cortex und Thalamus (Abb. 3.13Ba-c). Schwache positive Signale waren im Hypothalamus und im Gyrus dentatus sichtbar (Abb. 3.13Bd&e).

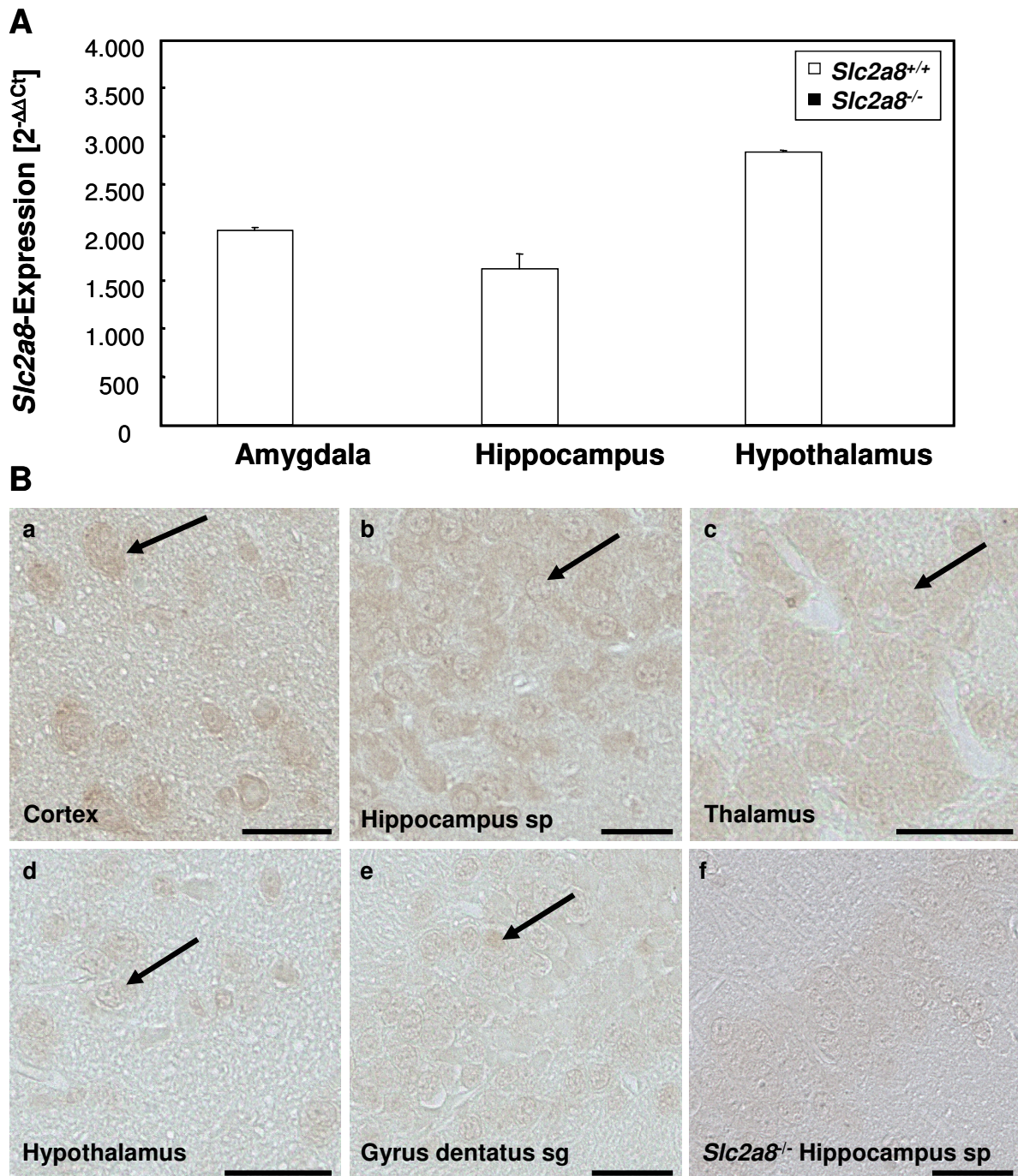


Abb. 3.13 Expression von GLUT8 im Gehirn.

(A) Die mRNA-Expression von GLUT8 in verschiedenen Gehirnregionen von 12 Wochen alten *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen (F3N7) wurde mittels qRT-PCR untersucht (A). Die Balken zeigen die Mittelwerte der mRNA-Expression von sechs Mäusen je Genotyp + SEM. (B) Immunhistologischer Nachweis von GLUT8 mit Hilfe des *anti*-GLUT8-C-Antiserums auf Gehirnschnitten von 12 Wochen alten (a-e) *Slc2a8*^{+/+}- und (f) *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen (F3N7). Die Pfeile markieren Beispiele positiv gefärbter Zellen. Die Balken entsprechen 30 μ m. sg = *stratum granulosum*, sp = *stratum pyramidale*.

3.3.1 Gesteigerte körperliche Aktivität der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse

Die Gehirnregionen, in denen GLUT8 exprimiert wird, spielen in Erinnerungs- und Lernprozessen (Bliss und Colingridge, 1993; Nakazawa *et al.*, 2002), Angst- und Stressverhalten (Bannerman *et al.*, 2003), Explorationsverhalten (Honey *et al.*, 2007) und Akti-

vitätsregulierung (Bannerman *et al.*, 2001) eine Rolle. Stefan Schmidt hatte im Rahmen seiner Doktorarbeit das Verhalten der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse im *modified hole board* (mHB)-Test, in Kooperation mit der Deutschen Mauslinik in München untersucht. Die acht Wochen alten *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse zeigten die Tendenz zu einem gesteigerten Angstverhalten und einer höheren Stressanfälligkeit. Außerdem konnte eine signifikant gesteigerte körperliche Aktivität der *Slc2a8*^{-/-}-Tiere im Vergleich zu ihren *Slc2a8*^{+/+}-Geschwistern beobachtet werden (Schmidt *et al.*, 2008b).

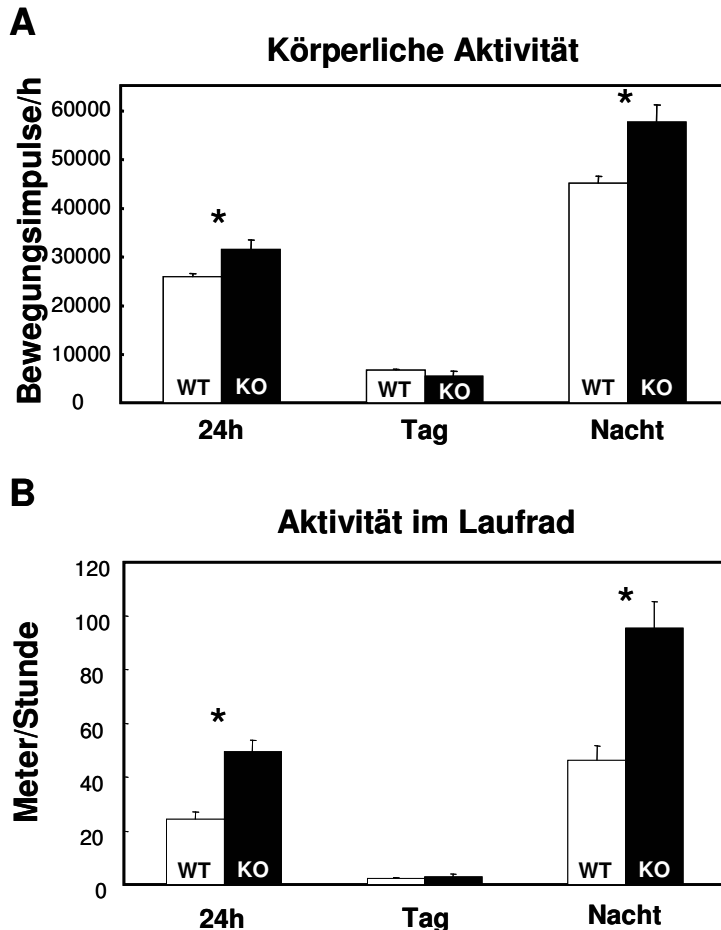


Abb. 3.14 Bestimmung der körperlichen Aktivität von *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen.

Die Aktivität von neun *Slc2a8*^{+/+}- und 12 *Slc2a8*^{-/-}-Tieren (F2N3) wurde mit einem Infrarot-Detektor (A) und der Bestimmung der freiwilligen Nutzung eines Laufrads (B) untersucht. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Messung sechs bis acht Wochen alt. Die Balken zeigen die Mittelwerte der (A) stündlichen Bewegungsimpulse ≥ 5 ms bzw. (B) der pro Stunde zurückgelegten Strecke in Metern der verschiedenen Genotypen + SEM. * $p < 0,001$.

Um die im mHB-Test gezeigte Hyperaktivität zu belegen, wurde die Aktivität von sechs bis acht Wochen alten *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen (F2N3) in zwei unterschiedlichen Versuchansätzen analysiert. Mit einem Infrarot-Sensor (TSE, Bad Homburg, Deutschland), der Bewegungen in allen drei Dimensionen, die länger als 5 ms andauerten, erfasste, wurde die körperliche Aktivität der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse ermittelt. Nach einer zweitägigen Adaptationsphase wurde stündlich die Anzahl der Bewegungsimpulse aufgezeichnet und dann für 24 Stunden bzw. für

die Licht- und die Dunkelphase gemittelt. Die 12 *Slc2a8*^{-/-}-Tiere zeigten während der aktiven Dunkelphase ($p = 0,006$) und im Mittelwert über 24 Stunden ($p = 0,008$) eine signifikant erhöhte körperliche Aktivität im Vergleich zu ihren neun *Slc2a8*^{+/+}-Geschwistern. In der inaktiven Lichtphase wiesen die *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse dagegen keine erhöhte Aktivität auf (Abb. 3.14A).

Die freiwillige Aktivität wurde mit Hilfe eines Laufrad-Systems (TSE) analysiert. Das System ermittelt jede viertel Umdrehung des Rads in beide Orientierungen. Die Umdrehungen wurden mit dem Umfang des Rads multipliziert, um die von jeder Maus zurückgelegte Strecke zu berechnen. Auch in dieser Auswertung wurde aus den stündlichen Daten ein Mittelwert über 24 Stunden sowie für die Licht- und die Dunkelphase berechnet. Die *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse zeigten eine signifikant höhere Benutzung des Laufrads (Abb. 3.14B) gegenüber ihren *Slc2a8*^{+/+}-Wurfgeschwistern während der aktiven Dunkelphase ($p = 0,0003$) sowie über 24 Stunden gemittelt ($p = 0,0002$). In der inaktiven Lichtphase benutzten beide Genotypen das Laufrad kaum.

3.3.2 Bestimmung der Glykogenspiegel im postnatalen Gehirn von *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen

Um zu untersuchen, ob die moderaten Verhaltensänderungen der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse auf Störungen in der Energieversorgung während der Gehirnentwicklung zurückzuführen sind, wurden die Glykogenspiegel von *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen (F3N10) und ihren *Slc2a8*^{+/+}-Geschwistern mittels PAS-Färbung und Amyloglucosidase-assay untersucht (Abb. 3.15). Die Analysen wurden maximal 48h nach der Geburt durchgeführt, bevor sich der Energiemetabolismus der Neugeborenen mit Beginn des Säugens umstellen konnte.

Die PAS-Färbung postnataler Gehirne zeigte Glykogensignale im äußersten Bereich des Cortex und in einer Zellschicht, die um den Hippocampus lokalisiert ist (Abb. 3.15A). Schwache Färbungen wurden auch in Zellen anderer Gehirnareale beobachtet, es konnten aber keine Unterschiede in der Verteilung oder der Intensität der Färbung zwischen *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Gehirnen gesehen werden. Quantitativ wurden die Glykogengehalte bestimmt, indem das im Gehirn gespeicherte Glykogen durch das Enzym Amyloglucosidase in Glucose umgewandelt wurde. Die Glucosekonzentration der Proben wurde dann über einen Oxidations-assay photometrisch gemessen (Abb. 3.15B). Auch mit dieser Methode waren keine Unterschiede im Glykogenspiegel des Gehirns von 1-2 Tage alten *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen zu sehen.

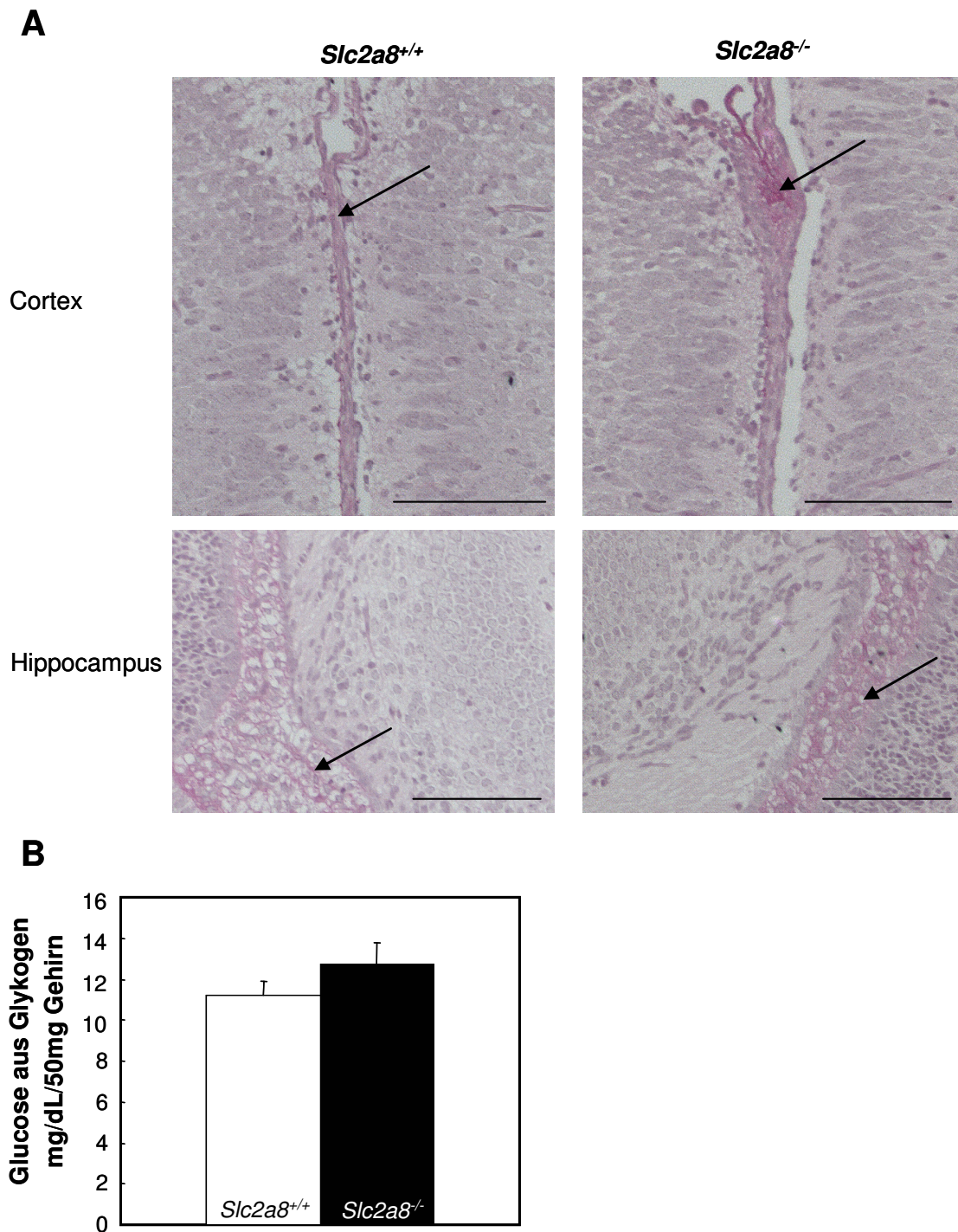


Abb. 3.15 Glykogenspiegel im Gehirn von 1-2 Tage alten *Slc2a8^{+/+}*- und *Slc2a8^{-/-}*-Mäusen.

Das im postnatalen Gehirn von *Slc2a8^{+/+}*- und *Slc2a8^{-/-}*-Mäusen (F3N10) gespeicherte Glykogen wurde mittels PAS-Färbung (A) und durch einen Amyloglucosidase-assay (B) untersucht. (A) PAS-Färbung im Cortex und Hippocampus von *Slc2a8^{+/+}*- und *Slc2a8^{-/-}*-Mäusen. Der Balken entspricht 100µm. (B) Glucosespiegel im Gehirn von *Slc2a8^{+/+}*- und *Slc2a8^{-/-}*-Mäusen nach Umwandlung von Glykogen mittels Amyloglucosidase. Die Balken zeigen die Mittelwerte der Analysen von 10 Mäusen je Genotyp + SEM.

3.4 Analyse der Energie- und Glucosehomöostase der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse

3.4.1 Charakterisierung des Körpergewichts der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse nach Gabe verschiedener Diäten

Um zu prüfen, ob GLUT8 eine Rolle in der Energie- und Glucosehomöostase des Körpers spielt, wurden *Slc2a8*^{+/-}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse, zum Teil jeweils mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund (F2N3 und F2N7), direkt nach dem Absetzen in ihrer dritten Lebenswoche auf verschiedene Diäten verteilt und ihr Körpergewicht, ihre Körperzusammensetzung sowie ihr Glucose- und Fettstoffwechsel untersucht.

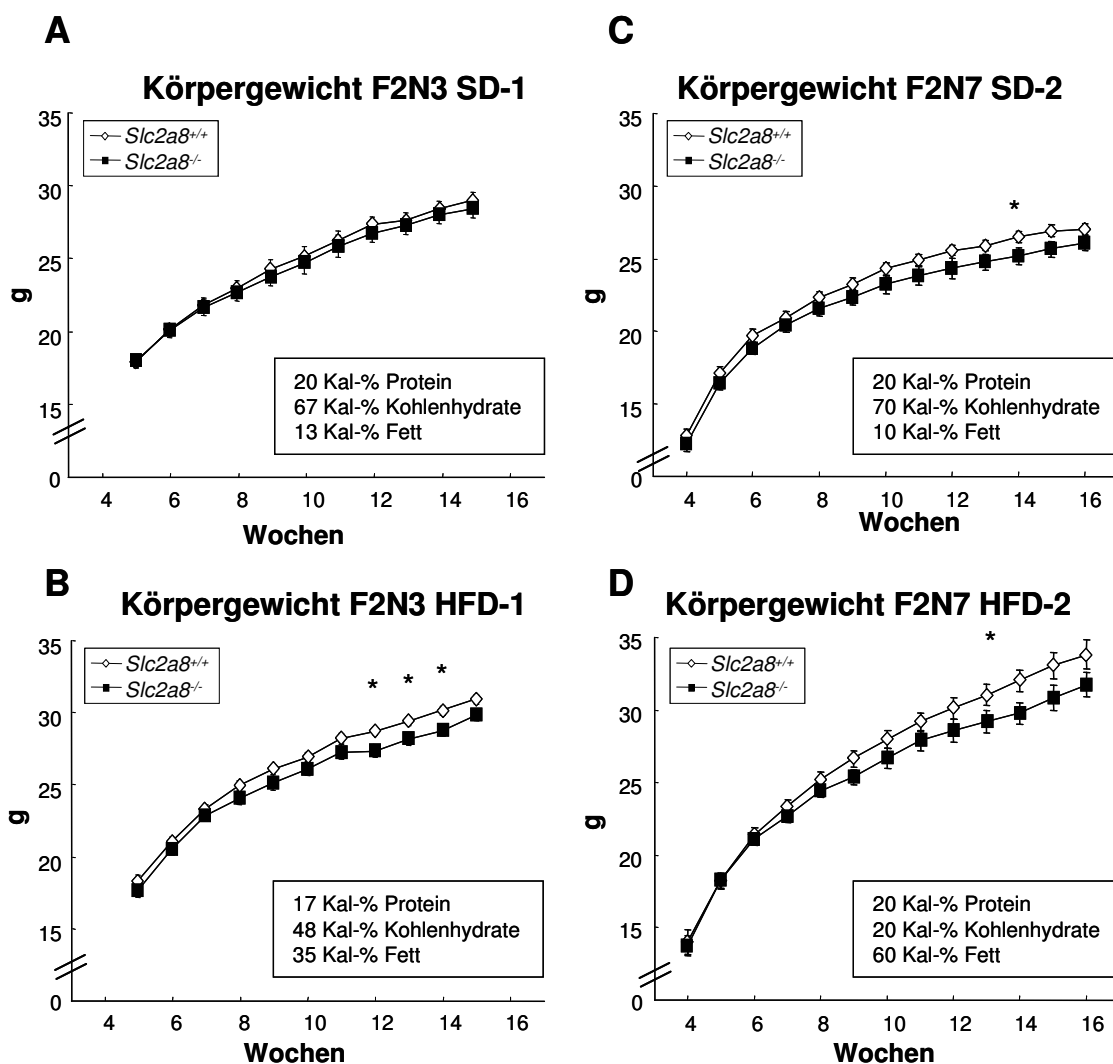


Abb. 3.16 Körpergewichtsentwicklung der *Slc2a8*^{+/-}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse unter verschiedenen Diäten.

Das Körpergewicht von männlichen *Slc2a8*^{-/-}- und *Slc2a8*^{+/-}-Geschwistern wurde über einen Zeitraum von 12-13 Wochen einmal wöchentlich bestimmt. Die Tiere wurden direkt nach dem Absetzen mit drei Wochen auf die verschiedenen Diäten verteilt: (A) SD-1, N = 22 bzw. 36 (ab LW12) *Slc2a8*^{+/-} & 18 bzw. 28 (ab LW12) *Slc2a8*^{-/-} (B) HFD-1, N = 30 bzw. 40 (ab LW12) *Slc2a8*^{+/-} & 19 bzw. 30 (ab LW12) *Slc2a8*^{-/-} (C) SD-2, N = 21 *Slc2a8*^{+/-} & 25 *Slc2a8*^{-/-} (D) HFD-2, N = 22 *Slc2a8*^{+/-} & 19 *Slc2a8*^{-/-}. Die Punkte zeigen die Mittelwerte der Körpergewichte der Genotypen ± SEM. *p < 0,05.

In beiden Rückkreuzungsgenerationen zeigten die *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern ein leicht reduziertes Körpergewicht, dass unter den beiden Hochfett-diäten besonders ausgeprägt war (Abb. 3.16). In der N3-Generation betrug die Differenz im Körpergewicht 1,2 g zwischen den Genotypen nach 12-wöchiger Fütterung der HFD-1-Diät (Altromin GmbH & Co. KG, Lage; 35 Kalorienprozent aus Fett, 48 Kalorienprozent aus Kohlenhydraten, 17 Kalorienprozent aus Protein) (Abb. 3.16B), wogegen die Differenz im Körpergewicht unter der entsprechenden SD-1-Diät (13 Kalorienprozent aus Fett, 67 Kalorienprozent aus Kohlenhydraten, 20 Kalorienprozent aus Protein) 0,6 g betrug (Abb. 3.16A).

Um zu untersuchen, ob der Fettgehalt der Diät für das geringere Körpergewicht der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse verantwortlich war, wurde in der F2N7-Generation die Körpergewichtsentwicklung unter einer Hochfett-diät untersucht, die einen höheren Fettanteil als die HFD-1-Diät aufwies. Die *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse zeigten unter dieser HFD-2-Diät (*Research Diets New Brunswick, NJ, USA*; 60 Kalorienprozent aus Fett, 20 Kalorienprozent aus Kohlenhydraten, 20 Kalorienprozent aus Protein) nach 12 Wochen eine Differenz von 2,3 g (Abb. 3.16D) im Körpergewicht. Unter der entsprechenden SD-2-Diät (10 Kalorienprozent aus Fett, 70 Kalorienprozent aus Kohlenhydraten, 20 Kalorienprozent aus Protein) betrug die Gewichts-differenz der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse 1,3 g (Abb. 3.14C).

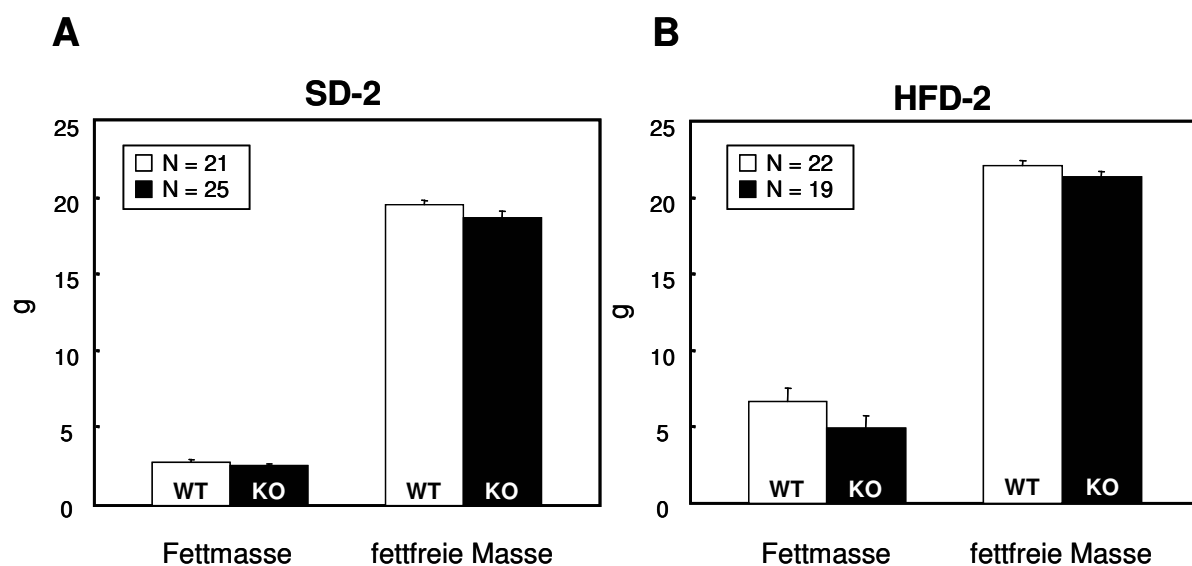


Abb. 3.17 Körperzusammensetzung der *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse im Alter von 14 Wochen.

Die Körperzusammensetzung von männlichen *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen (F2N7) wurde bis zum Alter von 15-16 Wochen einmal wöchentlich mittels NMR bestimmt. Die Tiere wurden direkt nach dem Absetzen mit den verschiedenen Diäten gefüttert: (A) SD-2 und (B) HFD-2. Die Balken zeigen die Mittelwerte der Analysen der verschiedenen Genotypen + SEM.

Die Bestimmung der Körperzusammensetzung der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse erfolgte durch NMR-Messung (*nuclear magnetic resonance*) und wurde ebenfalls wöchentlich durchgeführt. In Abbildung 3.17 ist exemplarisch die Körperzusammensetzung von 14 Wochen alten Tieren

der F2N7-Generation dargestellt, wobei die Werte den Verlauf über den gesamten Messzeitraum widerspiegeln. Die leichte Reduktion im Körpergewicht ließ sich unter der SD-2-Diät auf eine gering reduzierte fettfreie Masse im Vergleich zu ihren *Slc2a8^{+/+}*-Geschwistern zurückführen (Abb. 3.17A). Die Tiere zeigten unter dieser Diät keinen Unterschied in der Fettmasse. Unter der HFD-2-Diät wiesen die *Slc2a8^{-/-}*-Mäuse dagegen eine geringere Fettmasse auf, die wegen der großen Varianz zwischen den Tieren nicht signifikant war (Abb. 3.17B).

Um den Grund für das geringere Körpergewicht der *Slc2a8^{-/-}*-Mäuse näher zu bestimmen, wurde bei der Organentnahme in der 16. Lebenswoche der Tiere (F2N7) exemplarisch das Gewicht der Hoden, des Quadrizeps, der Leber und des gonadalen Fettes ermittelt. Zusätzlich wurde die Körperlänge der Tiere gemessen (Tab. 3.3). Eine signifikante ($p = 0,02$) Reduktion war nur im Hodengewicht der *Slc2a8^{-/-}*-Tiere unter der SD-2-Diät im Vergleich zu ihren *Slc2a8^{+/+}*-Geschwistern zu beobachten. Die 30%ige Reduktion im gonadalen Fettdepot der *Slc2a8^{-/-}*-Mäuse unter der HFD-2-Diät im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern war aufgrund des großen Standardfehlers nicht signifikant. Unter beiden Diäten aber war der Trend zu einem geringeren Gewicht aller untersuchten Organe als auch einer geringeren Körperlänge der *Slc2a8^{-/-}*-Mäuse sichtbar.

Diät	SD-2		HFD-2	
	<i>Slc2a8^{+/+}</i> (N = 21)	<i>Slc2a8^{-/-}</i> (N = 25)	<i>Slc2a8^{+/+}</i> (N = 22)	<i>Slc2a8^{-/-}</i> (N = 19)
Hoden	0,21 ± 0,004	0,19* ± 0,003	0,21 ± 0,003	0,20 ± 0,004
Quadrizeps	0,37 ± 0,01	0,35 ± 0,009	0,38 ± 0,01	0,39 ± 0,009
Leber	0,91 ± 0,04	0,88 ± 0,03	0,96 ± 0,03	0,92 ± 0,03
gonadales Fett	0,35 ± 0,04	0,33 ± 0,04	1,20 ± 0,17	0,84 ± 0,17
Körperlänge	9,92 ± 0,05	9,81 ± 0,05	10,13 ± 0,05	10,05 ± 0,05

Tab. 3.3 Messung der Organgewichte von *Slc2a8^{+/+}*- und *Slc2a8^{-/-}*-Mäusen.

Nachdem die männlichen *Slc2a8^{+/+}*- und *Slc2a8^{-/-}*-Mäuse (F2N7) 13 Wochen unter SD-2- und HFD-2-Diät gehalten wurden, erfolgte die Tötung der Tiere, bei der die Organgewichte mit einer Feinwaage sowie die Körperlänge der Tiere gemessen wurde. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte dieser Daten der entsprechenden Genotypen ± SEM. * $p < 0,05$.

3.4.2 Untersuchung der Futteraufnahme der *Slc2a8^{-/-}*-Mäuse

Ein reduziertes Körpergewicht kann verschiedene Ursachen haben. Möglich wären eine verminderte Nahrungsaufnahme, eine erhöhte Körpertemperatur, eine höhere körperliche Aktivität und/oder ein gesteigerter Energieumsatz. Dass die *Slc2a8^{-/-}*-Mäuse im Vergleich zu ihren *Slc2a8^{+/+}*-Geschwistern eine erhöhte körperliche Aktivität zeigten, wurde bereits unter Abschnitt 3.3.1 beschrieben. Dagegen wurden keine Unterschiede in der Körpertemperatur

der Mäuse (F2N3) in Woche 10 beobachtet. Auf der SD-2-Diät betrug die Temperatur der *Slc2a8^{+/+}*-Mäuse $37,13 \pm 0,2^\circ\text{C}$ und die der *Slc2a8^{-/-}*-Mäuse $37,14 \pm 0,2^\circ\text{C}$, auf der HFD-2-Diät wurden $37,78 \pm 0,2^\circ\text{C}$ (*Slc2a8^{+/+}*) und $37,84 \pm 0,2^\circ\text{C}$ (*Slc2a8^{-/-}*) gemessen.

Auch die Untersuchung der Nahrungsaufnahme erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen *Slc2a8^{-/-}*-Mäusen und ihren *Slc2a8^{+/+}*-Geschwistern (Abb. 3.18). Die zum Zeitpunkt der Untersuchung sechs Wochen alten *Slc2a8^{-/-}*-Mäuse (F2N3) zeigten weder in der Futteraufnahme (Abb.3.18A) noch in der Wasseraufnahme (Abb.3.18B) signifikante Differenzen zu ihren *Slc2a8^{+/+}*-Geschwistern, nachdem sie sich zwei Tage an das System adaptieren konnten.

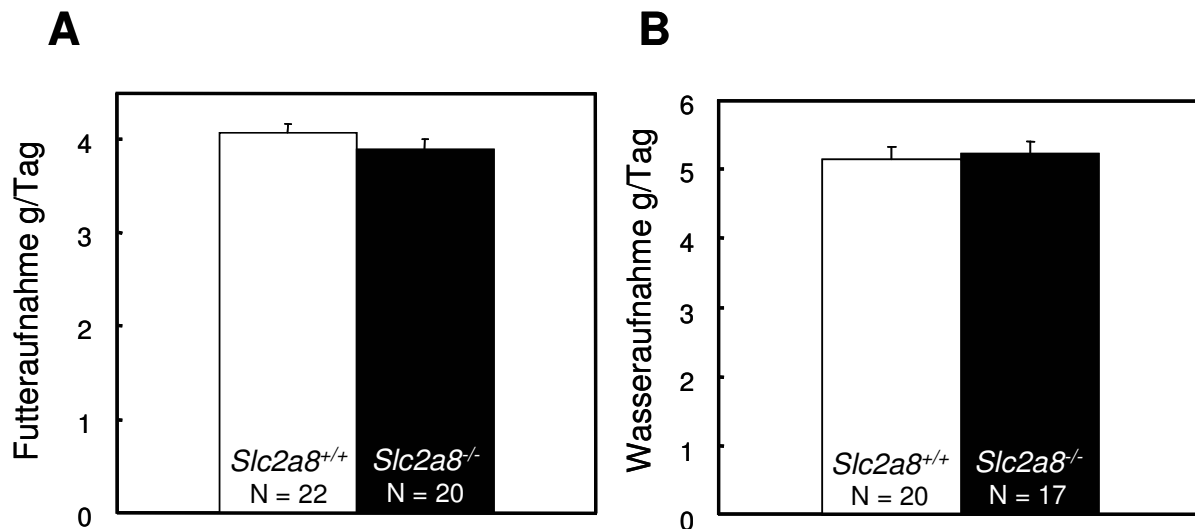


Abb. 3.18 Untersuchung der Futter- und Wasseraufnahme der *Slc2a8^{+/+}*- und *Slc2a8^{-/-}*-Mäuse.

Der Futter- und Wasserverbrauch von sechs Wochen alten männlichen *Slc2a8^{+/+}*- und *Slc2a8^{-/-}*-Mäusen (F2N3) wurde im Drinking & Feeding Monitor der Firma TSE bestimmt. Die Tiere hatten vor der Datenerhebung zwei Tage Zeit sich an das System zu adaptieren. Danach wurde über 24 Stunden der Futter- (A) und Wasserverbrauch (B) der Tiere protokolliert. Die Balken zeigen die Mittelwerte der Aufnahmen + SEM.

3.4.3 Bestimmung des Energieumsatzes der *Slc2a8^{-/-}*-Mäuse

Der Energieumsatz von 18 *Slc2a8^{-/-}*-Mäusen und 19 *Slc2a8^{+/+}*-Geschwistern wurde im Oxymax Lab Animal Monitoring System (Columbus Instruments, Columbus, OH, USA) mittels indirekter Kalorimetrie ermittelt. Die Analyse von sieben Wochen alten Tieren (F2N3) ergab weder Unterschiede im respiratorischen Quotienten (VCO_2/VO_2) (Abb. 3.19A) noch im Energieumsatz (in kJ/Tag/kg) (Abb. 3.19B) zwischen den Genotypen. Auch zwischen 18 Wochen alten *Slc2a8^{-/-}*- und *Slc2a8^{+/+}*-Tieren konnten keine Unterschiede im Energieumsatz unter der SD-1-Diät ($51,87 \pm 2,4$ kJ/Tag/kg bei *Slc2a8^{-/-}*-Mäusen zu $55,89 \pm 1,7$ kJ/Tag/kg bei *Slc2a8^{+/+}*-Mäusen) oder der HFD-1-Diät ($56,32 \pm 1,0$ kJ/Tag/kg bei *Slc2a8^{-/-}*-Mäusen zu $59,35 \pm 1,4$ kJ/Tag/kg bei *Slc2a8^{+/+}*-Mäusen) beobachtet werden. Die Tiere hatten vor der Messung 2 Tage Zeit sich an die neue Umgebung zu adaptieren.

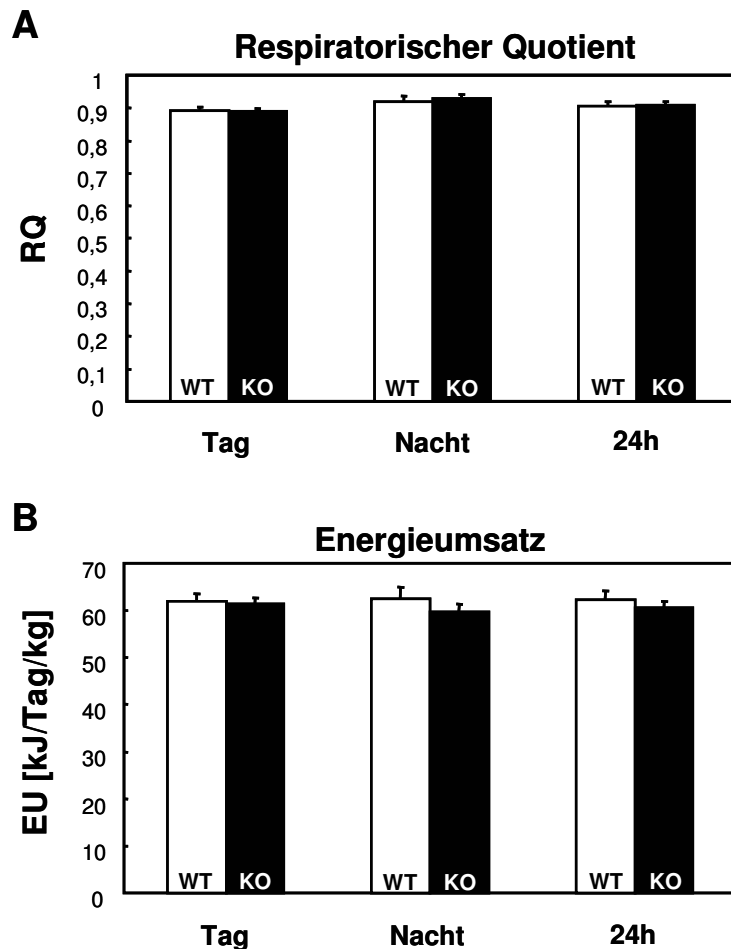


Abb. 3.19. Energieumsatz der *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse im Alter von sieben Wochen.

Der respiratorische Quotient (A) und der Energieumsatz (B) von sieben Wochen alten *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen (F2N3) wurde im Oxymax Lab Animal Monitoring System (Columbus Instruments, Columbus, OH, USA) ermittelt. Die Tiere hatten vor der Datenerhebung zwei Tage Zeit sich an das System zu adaptieren. Danach wurde über 24 Stunden VO₂ und VCO₂ gemessen und der respiratorische Quotient sowie der Energieumsatz errechnet. Die Balken zeigen die Mittelwerte der Aufnahmen von 19 *Slc2a8*^{+/+}- und 18 *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen + SEM.

3.4.4 Analyse der Lebenserwartung der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse

Die Untersuchung der Lebensdauer ergab einen Hinweis auf eine leicht erhöhte Lebenserwartung der *Slc2a8*^{-/-}-Tiere (F2N3). Die Lebensdauer der *Slc2a8*^{-/-}-Männchen (N = 4) betrug durchschnittlich 876,5 ± 48 Tage, wohingegen die Lebensspanne der *Slc2a8*^{+/+}-Männchen (N = 4) nur 832,5 ± 20 Tage betrug. Bei den weiblichen Tieren war die Tendenz noch deutlicher, während die *Slc2a8*^{+/+}-Weibchen (N = 5) nur eine Lebensdauer von 682,4 ± 18 Tage zeigten, überlebten die *Slc2a8*^{-/-}-Weibchen (N = 3) im Durchschnitt 830,3 ± 33 Tage. Aufgrund der geringen Tierzahl in diesem Versuch kann dieses Ergebnis nur als Anhaltspunkt gewertet werden und sollte mit einer größeren Tierzahl reproduziert werden.

3.4.5 Bestimmung des Glucose- und Fettstoffwechsels der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse

Die Analyse der Plasmaparameter ergab für *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse (F2N7), die unter der SD-2-Diät gehalten wurden, in ihrer 16. Lebenswoche eine signifikante Erniedrigung des Blutzuckerspiegels im nüchternen Zustand (Tab. 3.4). Tiere, die unter der HFD-2-Diät gehalten wurden, zeigten dieselbe Tendenz, jedoch war der Effekt nicht signifikant. *Slc2a8*^{-/-}-Tiere, die die HFD-2-Diät erhielten, zeigten signifikant niedrigere Plasma-Triglyceridwerte sowohl im gefütterten (Lebenswoche 15) als auch im nüchternen Zustand (Lebenswoche 16) (Tab. 3.4). In diesem Parameter verhielten sich die Werte der Mäuse unter der SD-2-Diät ebenso, jedoch erreichte die Differenz unter dieser Diät keine Signifikanz. Entgegen der Erwartung waren die Plasma-Triglyceridwerte *ad libitum* gefütterter Mäuse beider Genotypen unter SD-2- und HFD-2-Diät geringer als nach einer Fastenperiode von 15 h über Nacht.

Diät	SD-2		HFD-2	
	<i>Slc2a8</i> ^{+/+} (N = 21)	<i>Slc2a8</i> ^{-/-} (N = 25)	<i>Slc2a8</i> ^{+/+} (N = 22)	<i>Slc2a8</i> ^{-/-} (N = 19)
Glucose gefüttert Woche 15, mg/dl	131,62 ± 7,5	116,20 ± 7,6	154,86 ± 10,35	146,93 ± 6,04
Glucose 15h nüchtern Woche 16, mg/dl	67,86 ± 3,47	56,76* ± 3,06	69,01 ± 4,39	63,68 ± 2,46
TG gefüttert Woche 15, µg/ml	341,74 ± 50,81	306,69 ± 37,40	440,81 ± 65,60	282,33* ± 35,38
TG 15 h nüchtern Woche 16, µg/ml	507,32 ± 42,22	427,15 ± 58,91	591,93 ± 31,91	475,69* ± 40,00
FA gefüttert Woche 15, mmol/l	0,88 ± 0,05	0,94 ± 0,06	1,11 ± 0,07	1,26 ± 0,14
FA 15h nüchtern Woche 16, mmol/l	1,14 ± 0,05	1,07 ± 0,04	0,97 ± 0,05	0,94 ± 0,04
Insulin 2h nach Fasten Woche 12, µg/l	3,93 ± 0,32	3,49 ± 0,25	2,34 ± 0,18	2,00 ± 0,15
Insulin 15h nüchtern Woche 12, µg/l	0,37 ± 0,06	0,37 ± 0,06	0,34 ± 0,03	0,50* ± 0,06

Tab. 3.4 Metabolische Parameter der *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse.

Zur Bestimmung der metabolischen Parameter wurde den männlichen *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen (F2N7) in der Regel Blut aus der Schwanzvene entnommen. Lediglich bei Tötung in ihrer 16. Lebenswoche wurde das Blut durch Herzpunktion entnommen. Aus dem Blutplasma wurden die Triglyceride (TG), die freien Fettsäuren (FA) und der Insulingehalt bestimmt. Die Messung der Blutglucosespiegel erfolgte aus Vollblut. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte der Analysen der entsprechenden Genotypen ± SEM.

Auch die freien Fettsäuren sollten in den *ad libitum* gefütterten Tieren deutlich niedriger als in den nüchternen Mäusen sein. Zudem zeigten die *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse signifikant erhöhte Nüchtern-Insulinspiegel unter der HFD-2-Diät.

Der verminderte Nüchtern-Blutzucker der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse könnte auf Veränderungen des Glucosestoffwechsels der Leber zurückzuführen sein. So könnten die *Slc2a8*^{-/-}-Tiere weniger Glykogen in ihren Lebern speichern oder eine Störung in der Glykogenmobilisierung

aufweisen. Um den niedrigeren Nüchtern-Blutzucker näher zu untersuchen, wurden die Glykogengehalte der Lebern 16 Wochen alter *Slc2a8^{+/+}*- und *Slc2a8^{-/-}*-Mäuse (F3N7) unter SD-2- und HFD-2-Diät, durch die Amyloglucosidase katalysierte Umwandlung von Glykogen zu Glucose, ermittelt (Abb. 3.20). Im nüchternen Zustand zeigten die *Slc2a8^{-/-}*-Tiere unter SD-2-Diät Intervention leicht erhöhte Leber-Glykogenspiegel im Vergleich zu ihren *Slc2a8^{+/+}*-Geschwistern, wobei diese Differenz statistisch nicht signifikant war (Abb. 3.20A). Dieser Trend ließ sich weder im gefütterten Zustand unter der SD-2-Diät (Abb. 3.20B) noch unter der HFD-2-Diät im nüchternen (Abb. 3.20C) oder im gefütterten Zustand zu bestätigen (Abb. 3.20D).

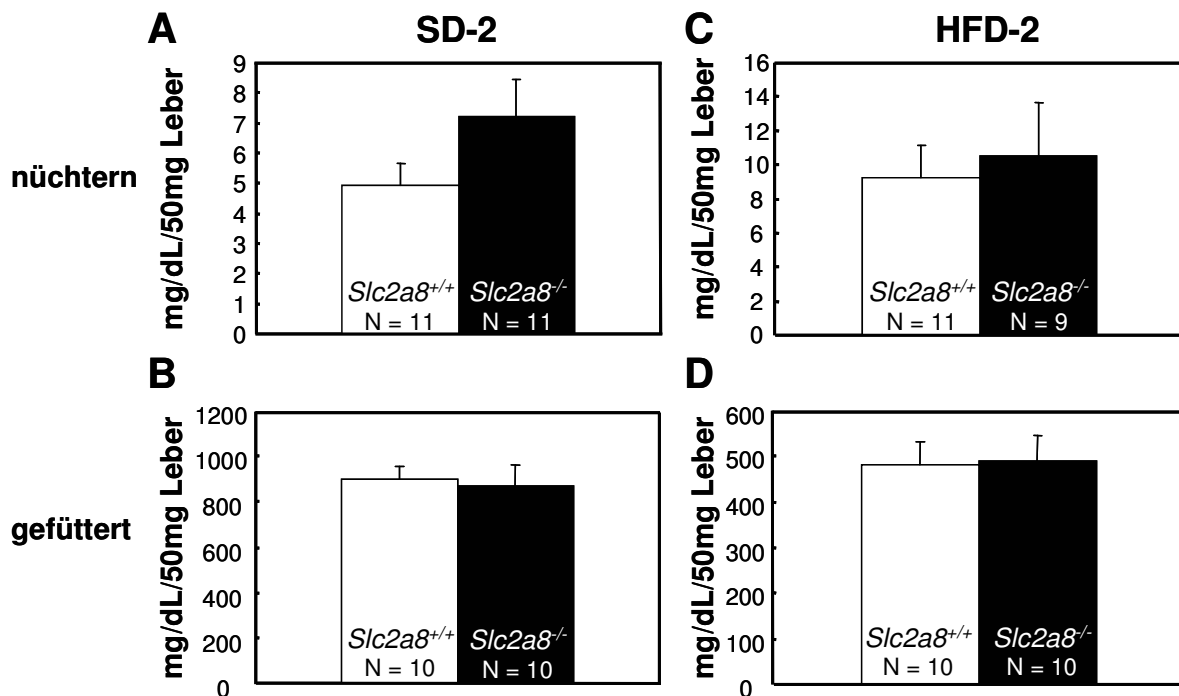


Abb. 3.20 Bestimmung der Glykogenspiegel in den Lebern von *Slc2a8^{+/+}*- und *Slc2a8^{-/-}*-Mäusen.

Das in der Leber gespeicherte Glykogen von 16 Wochen alten Mäusen (F3N7) wurde mit dem Enzym Amyloglucosidase in Glucose umgewandelt und über einen Oxidations-assay der Firma Human photometrisch ausgewertet. Die Balken zeigen die Mittelwerte der Analysen von Mäusen unter SD-2-Diät (A+B) und HFD-2-Diät (C+D) + SEM.

Aufgrund der leicht verringerten Triglyceridwerte der *Slc2a8^{-/-}*-Mäuse sowohl im gefütterten als auch im nüchternen Zustand (HFD-2-Diät), wurde der Fett-Metabolismus der *Slc2a8^{-/-}*-Mäuse mit Hilfe eines oralen Fettoleranztests (oFTT) in der 14. Lebenswoche der Tiere (F3N7) genauer untersucht. Doch weder Mäuse, die unter der SD-2-Diät gehalten wurden (Abb. 3.21A) noch Mäuse, die die HFD-2-Diät erhielten (Abb. 3.21B), zeigten Unterschiede im Verlauf der Plasma-Triglyceridkonzentration 12 Stunden nach oraler Gavage von Olivenöl im Vergleich zu ihren *Slc2a8^{+/+}*-Geschwistern.

Auch die reduzierten Triglyceridwerte der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse nach Fasten (vergl. Tab. 3.4) konnten in diesem Versuchsansatz nicht reproduziert werden. Der Grund dafür könnte die geringere Fastenzeit in diesem Versuch von nur 12 h, im Gegensatz zu den 15h in Tab. 3.4 sein.

Bei beiden Genotypen stiegen die Triglyceridwerte zwei Stunden nach oraler Ölgabe an und fielen dann in den folgenden zehn Stunden auf den jeweiligen Ausgangswert ab. Der Anstieg der Triglyceridkonzentration war dabei deutlich höher, wenn die Tiere mit der HFD-2-Diät gefüttert wurden.

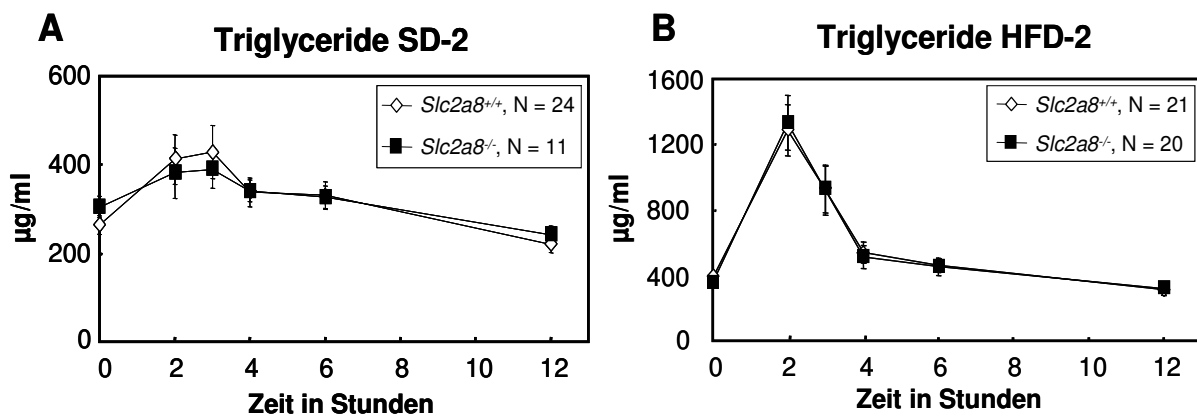


Abb. 3.21 Untersuchung der Plasma-Triglyceridkonzentration der *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse im oralen Fettoleranztest.

Der Verlauf der Plasma-Triglyceridkonzentration nach oraler Gavage von 10 µl/g Körpergewicht Olivenöl wurde in Tieren (F3N7) ermittelt, die unter SD-2-Diät (A) oder HFD-2-Diät (B) gehalten wurden. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Messung 14 Wochen alt. Die Punkte zeigen die Mittelwerte ± SEM.

Da die Spermien der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse einen verminderten ATP-Gehalt aufwiesen, wurde dieser ebenfalls in der Leber und im Quadrizeps von 16 Wochen alten *Slc2a8*^{-/-}-Tieren (F3N7) bestimmt (Abb. 3.22). Die mittels Luciferase-assay bestimmten Werte zeigten, dass die ATP-Produktion dieser Gewebe scheinbar nicht beeinträchtigt war. Es konnten in der Leber (Abb. 3.22A-D) unter beiden Diäten weder im nüchternen (Abb. 3.22A&C) noch im gefütterten (Abb. 3.22B&D) Zustand Unterschiede im ATP-Gehalt zwischen den Genotypen ermittelt werden. Auch im Quadrizeps (Abb. 3.22E-H) waren keine Unterschiede zwischen *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Geschwistern zu beobachten.

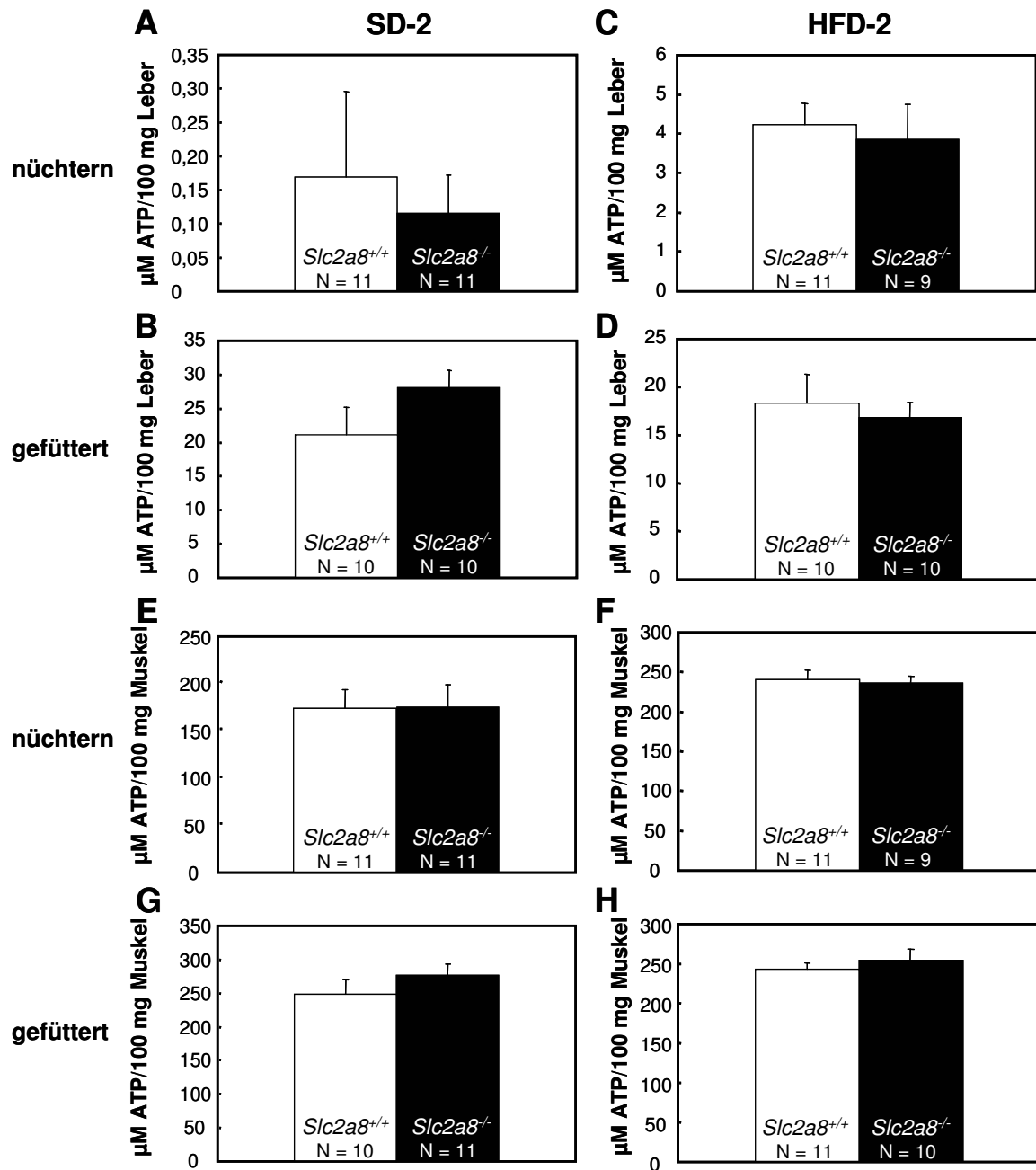


Abb. 3.22 Bestimmung des ATP-Gehalts in Lebern und Quadrizeps von *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen.

Der ATP-Gehalt von Lebern und Oberschenkelmuskeln 16 Wochen alter *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse (F3N7) wurde mittels Luciferase-assay der Firma Roche bestimmt. Die Balken zeigen die Mittelwerte der Analyse von nüchternen (A&E) und gefütterten (B&G) Mäusen unter SD-2- sowie nüchternen (C&F) und gefütterten Mäusen (D&H) unter HFD-2-Diät + SEM.

4 Diskussion

Die Charakterisierung der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse ergab, entgegen den Erwartungen, keinen stark ausgeprägten Phänotyp. Die auffälligsten Auswirkungen hatte die Deletion von *Slc2a8* auf die Gewebe mit der höchsten Expression des Transporters, die Testes und das Gehirn. GLUT8 ist in den Spermien für die Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials wichtig, von dem wiederum die ATP-Produktion abhängt, welche für die Geißelschlagbewegung des Spermiumschwanzes notwendig ist. Im Gehirn zeigte GLUT8 die stärkste Expression im Hippocampus und sein Ausschalten resultierte in einer Hyperaktivität der Mäuse. Dieser Befund lässt eine Störung des Glucosemetabolismus der Hippocampus-Neurone in Abwesenheit von GLUT8 vermuten.

4.1 Lebensfähigkeit der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse

Die Verpaarung von Mäusen, die heterozygot die Deletion von Exon 5-7 des *Slc2a8*-Gens trugen, erbrachte lebensfähige *Slc2a8*^{-/-}-Nachkommen beider Geschlechter, die sich nicht auffällig von ihren *Slc2a8*^{+/+}-Geschwistern unterschieden. Aufgrund von in der Literatur beschriebenen Befunden, war ein moderater Phänotyp der *Slc2a8*^{-/-}-Maus nicht zu erwarten. Zum einen führte die homozygote Deletion der Glucosetransporter *Slc2a1* und *Slc2a3* in der Maus zu einer embryonalen Letalität (Ohtsuki *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Ganguly *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 2009a) und zum anderen war auch für GLUT8 in der Maus wie für GLUT1 und GLUT3 eine besonders starke Expression im Blastozystenstadium beschrieben worden (Carayannopoulos *et al.*, 2000) und damit ein embryonal letaler Phänotyp denkbar gewesen. Im Blastozystenstadium wechselt die Energieversorgung des Embryos von der oxidativen Phosphorylierung mit Pyruvat und Lactat als Hauptenergielieferanten zur Glykolyse mit Glucose als Hauptsubstrat (Gardner und Leese, 1986; Leese und Barton, 1984). Daher reagiert die Blastozyste in diesem Stadium der Embryonalentwicklung besonders empfindlich auf eine Glucoseunterversorgung. Die Folge ist eine erhöhte Apoptoserate, die zu Missbildungen des Embryos und Aborten führt (Chi *et al.*, 2000). Carayannopoulos *et al.* (2000) zeigten, dass GLUT8 in der Blastozyste durch einen Insulinstimulus von seinem intrazellulären Kompartiment zur Membran transloziert wurde und dadurch zu einer erhöhten Glucoseaufnahme in die Blastozyste beitrug. Neben GLUT8 wurde die Expression verschiedener anderer Mitglieder der Familie der Glucosetransporter in den unterschiedlichen Stadien der Embryonalentwicklung nachgewiesen. Die GLUT1-Expression wurde vom Ein-Zell-Stadium durchgängig bis in die Blastozyste gezeigt (Hogan *et al.*, 1991; Aghayan *et al.*, 1992), wogegen die mRNA-Expression von *Slc2a2* im späten Acht-Zell-Stadium begann (Hogan *et al.*, 1991). Ebenfalls durchgängig vom Ein-Zell-Stadium des Embryos bis in die Blastozyste wurde GLUT9 detektiert (Carayannopoulos *et al.*, 2004).

Die Expression von GLUT3 konnte ab dem Vier-Zell-Stadium bis ins Blastozystenstadium beobachtet werden (Pantaleon *et al.*, 1997) und GLUT12 wurde vom Zwei-Zell-Stadium bis Tag 11 der Embryonalentwicklung nachgewiesen (Zhou *et al.*, 2004). Kontrovers diskutiert wird die Expression von GLUT4 während der Embryonalentwicklung; weder Hogan *et al.* (1991) noch Aghayan *et al.* (1992) konnten GLUT4 hier nachweisen, wogegen neuere Arbeiten von Tonack *et al.* (2004) die Expression von GLUT4 in der Blastozyste zeigten. Obwohl es wegen der großen Zahl an exprimierten Glucosetransportern während der Embryonalentwicklung möglich wäre, dass bei Fehlen eines Transporters ein anderes Mitglied der Familie seine Funktion übernehmen kann, ließen Versuche von Pinto *et al.* (2002) vermuten, dass die Embryonalentwicklung ohne GLUT8 massiv gestört ist. Sie zeigten *in vitro* eine erhöhte Apoptoserate in Mausembryonen, bei denen die GLUT8-Expression durch GLUT8-*antisense*-Oligonukleotide verringert wurde. Nach Transfer dieser Embryonen in scheinchwangere Mäuse kam es zu einer erhöhten Resorption und einer verringerten Trächtigkeitsrate im Vergleich zu Embryonen, die mit GLUT8-*sense*-Oligonukleotiden behandelt wurden.

Die vermutete essentielle Rolle von GLUT8 in der Embryonalentwicklung konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit widerlegt werden, da aus heterozygoten Verpaarungen *Slc2a8*^{-/-}-Jungtiere hervorgingen (vergl. Tab. 3.1), die eine normale Entwicklung zeigten.

Die Überprüfung des *knockouts* mittels quantitativer *realtime*-PCR (qRT-PCR) ergab keine detektierbare mRNA in Muskel, Fettgewebe, Leber, Testes und Gehirn der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse (vergl. Abb. 3.2A). Für die Überprüfung der Proteinexpression mit Hilfe eines Westernblots wurde Hodengewebe verwendet, da die *Slc2a8*^{+/+}-Mäuse die stärkste *Slc2a8*-mRNA-Expression in den Hoden zeigten. Auch im Westernblot wurde kein GLUT8-Signal in den Hoden der *Slc2a8*^{-/-}-Tiere nachgewiesen (vergl. Abb. 3.2B), was vermuten lässt, dass die Deletion des Gens im gesamten Organismus erfolgreich war. Die Überprüfung der Expression anderer in den Testes exprimierter Glucosetransporter inklusive GLUT6, dem nächsten Verwandten von GLUT8, zeigte, dass keiner der untersuchten Glucosetransporter in den Hoden eine gesteigerte Expression zeigte, um das Fehlen von GLUT8 zu kompensieren (vergl. Abb. 3.3).

Die Gewebsverteilung von GLUT8 ist in der Literatur für den Menschen (Doege *et al.*, 2000), die Ratte (Ibberson *et al.*, 2000) und die Maus (Scheepers *et al.*, 2001) dargestellt. In allen drei Spezies wurde GLUT8 mittels Northern Blot als ubiquitär verteilter Transporter beschrieben, der die höchste Expression in den Hoden und im Gehirn zeigte. Die publizierte Gewebsverteilung von GLUT8 konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden.

4.2 Funktion von GLUT8 in der Fortpflanzung

4.2.1 Einfluss von GLUT8 auf die Fertilität

Die Verpaarung heterozygoter *Slc2a8*-Mäuse brachte eine geringere Anzahl an *Slc2a8*^{-/-}-Nachkommen hervor, was zu einer signifikanten Abweichung von der erwarteten Mendel-Verteilung führte (vergl. Tab. 3.1). Diese reduzierte Anzahl an geborenen *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen wurde ebenfalls von der Arbeitsgruppe Membrez *et al.* (2006) in einer unabhängig generierten *Slc2a8*^{-/-}-Maus beschrieben. Mit Hilfe des Cre/LoxP-Systems hatte die Gruppe Exon 10 des *Slc2a8*-Gens mit LoxP-sites flankiert und durch Verpaarung mit Mäusen, in denen die Cre-Rekombinase unter einem ubiquitären Promotor exprimiert wurde, ausgeschnitten. Neben der verringerten Zahl an geborenen *Slc2a8*^{-/-}-Nachkommen aus heterozygoten Verpaarungen, beschrieben die Autoren eine erhöhte Zellproliferation im Gyrus dentatus nach BrdU (Brom-Desoxyuridin)-Injektion, wobei sie keinen Einfluss auf die Erinnerungsleistung der Tiere im Morris Wasserlabyrinth (*water maze*) und im *homing board task* messen konnten. Für das Herz der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse wurden keine Unterschiede in der Größe oder der Morphologie beobachtet, wohl aber Veränderungen des Rhythmus, bedingt durch eine verlängerte P-Wellendauer, nachgewiesen. Die Autoren vermuteten einen Defekt im arteriellen Reizleitungssystem als Ursache, auch wenn sie keine Störungen in der Na_v1.5 Na⁺-Kanal- oder Connexinexpression messen konnten (Membrez *et al.*, 2006).

Um zu untersuchen, ob Störungen in der Fertilität der männlichen und/oder der weiblichen *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse die Ursache für die verringerte Anzahl an *Slc2a8*^{-/-}-Nachkommen ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene homozygote Verpaarungen angesetzt und über einen Zeitraum von sechs Monaten hinsichtlich ihrer Nachkommen beobachtet. Mit Hilfe eines solchen Versuchsansatzes konnte bereits die vollständige Infertilität homozygoter männlicher *Transaldolase*^{-/-} (*Tal*^{-/-})-Mäuse (Perl *et al.*, 2006) sowie die eingeschränkte Fertilität der β -Glucosidase 2^{-/-} (*Gba2*^{-/-})- (Yildiz *et al.*, 2006) als auch der sauren Sphingomyelinase^{-/-} (*Asm*^{-/-})-Mäuse (Butler *et al.*, 2002) nachgewiesen werden.

Da aber weder *Slc2a8*^{-/-}-Männchen noch *Slc2a8*^{-/-}-Weibchen die Wurfzahl und -größe im Vergleich zu einer homozygoten *Slc2a8*^{+/+}-Kontrollverpaarung beeinflusst haben (vergl. Tab. 3.2), kann angenommen werden, dass beide Geschlechter fertil sind. Diese Vermutung wurde auch von Membrez *et al.* (2006) nach der Verpaarung von *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen mit *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen postuliert. Die Autoren vermuteten daher, dass aufgrund einer partiellen embryonalen Letalität weniger *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse geboren wurden. Würde diese Hypothese zutreffen, hätten die Autoren aber auch innerhalb der Verpaarungen heterozygoter Mäuse mit *knockout*-Mäusen eine geringere Anzahl an *Slc2a8*^{-/-}-Nachkommen beobachten müssen. Dies war allerdings nicht der Fall und stimmt mit den Ergebnissen dieser Arbeit innerhalb der homozygoten Verpaarungen überein.

Die geringere Anzahl an *Slc2a8*^{-/-}-Nachkommen aus heterozygoten Verpaarungen (vergl. Tab. 3.1) führt daher zu der Schlussfolgerung, dass die *Slc2a8*^{-/-}-Spermien zwar prinzipiell funktionsfähig sind, sie aber in direkter Konkurrenz mit *Slc2a8*^{+/+}-Spermien dennoch einen Nachteil haben und seltener eine erfolgreiche Befruchtung auslösen können (vergl. Tab. 3.1). Da zwischen der Verpaarung von *Slc2a8*^{-/-}-Männchen mit *Slc2a8*^{-/-}- oder *Slc2a8*^{+/+}-Weibchen keine Unterschiede in der Anzahl der Nachkommen festgestellt wurden (vergl. Tab. 3.2), scheint die Funktion der Oozyte in den *Slc2a8*^{-/-}-Weibchen nicht gestört zu sein.

4.2.2 Rolle von GLUT8 in der Spermienfunktion

Die Analyse der Spermien mittels CASA (*computer assisted sperm analysis*) zeigte, dass *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse zwar eine vergleichbare Spermienzahl wie ihre *Slc2a8*^{+/+}-Geschwister besaßen, die Anzahl bewegungsfähiger Spermien aber um die Hälfte verringert war (vergl. Abb. 3.4A&B). Aufgrund dieses Ergebnisses ließ sich die gemessene Reduktion im Hodengewicht der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse unter SD-2-Diät im Vergleich zu ihren *Slc2a8*^{+/+}-Geschwistern (vergl. Tab. 3.3) nicht auf Unterschiede in der Spermienzahl zurückführen, wie in anderen *knockout*-Modellen z.B. der *Arl4*^{-/-}-Maus (Schürmann *et al.*, 2002b). Da außerdem unter der HFD-2-Diät kein geringeres Hodengewicht der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse messbar war, ist es denkbar, dass der Effekt des Hodengewichts durch eine unsaubere Präparation und/oder Messung zustande kam. Da indes die Überlebensrate der *Slc2a8*^{-/-}-Spermien, die mit Hilfe des Lebendfarbstoffs SYBR14 ermittelt wurde (vergl. Abb. 3.4C), nicht beeinträchtigt war, muss die verminderte Motilität eine andere Ursache haben.

4.2.2.1 Einfluss von GLUT8 auf den Spermienaufbau

In Spermien ist die Fähigkeit der Fortbewegung ein komplexer Prozess, der an vielen unterschiedlichen Stellen störungsanfällig ist. Am offensichtlichsten sind morphologische Veränderungen, die durch Defekte in der Spermienreifung zustande kommen. Für die Kopfreion des Spermatozoon wurden beispielsweise vakuolisierte Zellkerne oder falsch lokalisierte Mitochondrien beschrieben (Lalouette *et al.*, 1996; Bouchard *et al.*, 2000; Yildiz *et al.*, 2006). Im Mittelteil ist häufig die axonemale Struktur betroffen. Beschrieben wurden beispielsweise die Abwesenheit der äußeren oder der inneren Dynein-Arme (Escalier und David, 1984). Defekte im Mittelteil verursachen oft Knicke und/oder Windungen im Spermenschwanz, die einen negativen Einfluss auf die Fortbewegungsfähigkeit haben und normalerweise zu vollkommener Infertilität oder zumindest zu eingeschränkter Fertilität führen (Butler *et al.*, 2002).

Die mikroskopische Analyse des Hodengewebes der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse erbrachte keine morphologischen Unterschiede zu ihren *Slc2a8*^{+/+}-Geschwistern (vergl. Abb. 3.5) und auch die Untersuchung der Nebenhodenreifung mittels *Pisum-sativum*-Agglutinin (vergl. Abb. 3.7) blieb ohne Befund. Die elektronenmikroskopische Analyse zeigte den charakteristischen

Aufbau der *Slc2a8*^{-/-}-Spermatiden mit normaler Morphologie des Spermienkopfes und der korrekten Anordnung der Mitochondrien um die Axonema. Auch im Spermischwanz waren keine Knicke oder Windungen zu beobachten. Allerdings wurde in einigen späten Spermatiden eine unzureichende mitochondriale Kondensation im Mittelteil gesehen (vergl. Abb. 3.6F).

4.2.2.2 Einfluss von GLUT8 auf die Glykosylierung von Lipiden und Proteinen in den Testes

Die Glykokalyx der Spermien besteht aus Glykolipiden und Glykoproteinen. Ihr wird eine wichtige Funktion in der Kapazitation, der Motilität, der Akrosomreaktion und der Penetration der *zona pellucida* (Glashaut) zugesprochen (Schröter *et al.*, 1999; Flesch und Gadella, 2000). Um zu prüfen, ob Unterschiede in der Glykosylierung von Proteinen oder Lipiden die verminderte Anzahl motiler *Slc2a8*^{-/-}-Spermien verursachen, wurde die Glykokalyx näher untersucht.

Dass keine Unterschiede in der PAS-Färbung der Hodenschnitte zwischen *Slc2a8*^{-/-}- und *Slc2a8*^{+/+}-Mäusen gesehen wurden (vergl. Abb. 3.5), ist ein Hinweis auf einen normalen Glykolipid-Stoffwechsel in den *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen. Die Proteinglykosylierung wurde mit Hilfe von Meerrettichperoxidase-konjugiertem Concanavalin A aus *Canavalia ensiformis* untersucht. Mit diesem Lektin ergab sich kein unterschiedliches Bandenmuster der Hodenproben von *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Tieren (vergl. Abb. 3.12). Da Lektine aus verschiedenen Pflanzen unterschiedliche Kohlenhydratstrukturen binden, ist das identische Bandenmuster kein Beweis für eine vollständig korrekte Proteinglykosylierung in den *Slc2a8*^{-/-}-Tieren, sondern nur ein Hinweis, der durch Verwendung weiterer Lektine, die im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Verfügung standen, überprüft werden könnte.

4.2.2.3 Funktion von GLUT8 in der Glucoseaufnahme von Spermien

Für die Messung der Glucoseaufnahme wurden nur Spermien verwendet, die selbständig aus den Nebenhoden ausgeschwommen sind. Vom Reifungsgrad her hatten sie also bereits die Nebenhodenreifung, in der die Fähigkeit zur Fortbewegung ausgebildet wird, abgeschlossen und entsprachen ejakulationsfähigen Spermatozoen, die für ihren nächsten Reifungsschritt, die Kapazitation, Glucose benötigten (Hoppe, 1976; Fraser und Quinn, 1981). In der Aufnahme von [¹⁴C]-2-Desoxyglucose wurde kein Unterschied zwischen *Slc2a8*^{-/-}- und *Slc2a8*^{+/+}-Spermatozoen ermittelt (vergl. Abb. 3.8), woraus sich schließen lässt, dass GLUT8 nicht für die Glucoseaufnahme in Spermien benötigt wird. Dieses Ergebnis wurde erwartet, da in Spermien GLUT3 vorherrschend exprimiert wird (Haber *et al.*, 1993; Urner und Sakkas, 1999; Simpson *et al.*, 2008) und es außerdem unwahrscheinlich schien, dass ein intrazellulär lokalisierter Transporter für die Glucoseaufnahme von Bedeutung ist. Dieses Ergebnis bestätigt die Hypothese, dass GLUT8 eine intrazelluläre

Funktion erfüllt und nicht durch einen Glucose-Stimulus an die Plasmamembran transloziert wird.

4.2.2.4 Rolle von GLUT8 in der Energieversorgung von Spermien

Die verminderte Anzahl bewegungsfähiger *Slc2a8*^{-/-}-Spermien hängt wahrscheinlich mit der im Elektronenmikroskop beobachteten, unvollständigen mitochondrialen Kondensation zusammen (vergl. Abb. 3.6F).

Dass die mitochondriale Kondensation der Spermien einen Einfluss auf die Fertilität hat, wurde bereits an der *Pmca4*^{-/-} (Plasmamembran Ca²⁺-ATPase 4)-Maus gezeigt (Okunade *et al.*, 2004). Bei dieser Maus führte eine übermäßige mitochondriale Kondensation zu einer Kalzium-Überladung im Hauptstück, wodurch die Spermien nicht mehr in der Lage waren in die hyperaktivierte Motilität überzugehen. Die normale Motilität dagegen war nicht beeinflusst. Es gibt Hinweise, dass Kalzium den Schwingungsverlauf des Flagellums moduliert, was die hyperaktivierte Motilität erst ermöglicht (Ho *et al.*, 2002; Ho und Suarez, 2003). Neben der Hyperaktivierung (Suarez *et al.*, 1993) ist Kalzium außerdem ein wichtiger Regulator für die Tyrosin-Phosphorylierung verschiedener muriner Spermien-Proteine mit einer relativen molekularen Masse von 4.000-12.000, die die Kapazitation einleitet (Visconti *et al.*, 1995; Visconti und Kopf, 1998). Es wird vermutet, dass Kalzium über die Bindung an Calmodulin (CaM) agiert, da CaM-Antagonisten in der Lage waren die Hyperaktivierung, die Akrosomreaktion und die Motilität zu hemmen (Si und Olds-Clarke, 2000; Zeng und Tulsani, 2003). Auch Antagonisten der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase (CaMK) führten zu einer reduzierten Zahl motiler Spermien sowie zu einem verringerten ATP-Gehalt der Spermien (Marin-Briggiler *et al.*, 2005).

In der CaM-Expression konnten keine Unterschiede zwischen den *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Tieren beobachtet werden (vergl. Abb. 3.10), was darauf hindeutet, dass die verringerte Motilität sowie die geringere ATP-Produktion der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse nicht auf Störungen in der CaM-abhängigen Proteinkinase zurückzuführen sind. Die bereits erwähnten infertilen *Tal*^{-/-}-Männchen zeigten sowohl intrazellulär als auch mitochondrial reduzierte Kalziumkonzentrationen (Perl *et al.*, 2006), was bei der *Slc2a8*^{-/-}-Maus ebenfalls nicht beobachtet wurde (vergl. Abb. 3.11A&B). Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass die Hyperaktivierung der Spermien GLUT8-unabhängig ist und auch die Akrosomreaktion und die Fusion des Spermiums mit der Eizelle in den *Slc2a8*^{-/-}-Tieren vermutlich nicht beeinträchtigt sind. Was wiederum für eine Lokalisation von GLUT8 im Mittelteil des Spermatozoon spricht, wie von Kim und Moley (2007) sowie von unserer Gruppe (Stefan Schmidt, Dissertation, 2007) postuliert wurde und im Widerspruch zu der von Gomez *et al.* (2006) vermuteten Lokalisation von GLUT8 im Akrosom steht. Auch frühere Arbeiten unserer Gruppe hatten eine akrosomale Lokalisation von GLUT8 beschrieben (Schürmann *et al.*, 2002a); dieser Befund

war vermutlich das Resultat einer unspezifischen Reaktion des damals verwendeten Antikörpers.

Neben Störungen in der Mitochondrienkondensation wurde in den Spermien der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse ein reduziertes mitochondriales Membranpotential und eine verminderte ATP-Produktion im direkten Vergleich mit den Spermien ihrer *Slc2a8*^{+/+}-Geschwister beobachtet (vergl. Abb. 3.9). Die Rolle der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien für die ATP-Versorgung von Spermien wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Die ATP-Produktionsrate der Atmungskette ist zwar höher als die der Glykolyse (Mukai und Okuno, 2004), es wurde aber von einigen Arbeitsgruppen bezweifelt, dass das ATP aus dem Mittelteil allein durch Diffusion in ausreichenden Mengen entlang des Hauptteils transportiert werden kann, wo es für die Dynein-ATPase des Axonema benötigt wird (Turner, 2006). Da im Hauptteil von Spermien in der Ringfaserscheide verschiedene glykolytische Enzyme beschrieben wurden, wie die Hexokinase, die Lactat-Dehydrogenase und die spermien-spezifische Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH-S) (Bradley *et al.*, 1996; Westhoff und Kamp, 1997; Travis *et al.*, 1998), wurde von einigen Gruppen vermutet, dass die Glykolyse entlang des Spermischwanzes bedeutender für die Energieversorgung von Spermien ist als die oxidative Phosphorylierung, da sie direkt an dem Ort stattfindet, wo das ATP benötigt wird (Turner, 2006; Miki, 2007). Auf der anderen Seite wurde von Nevo und Rikmenspoel (1970) sowie von Adam und Wei (1975) die Diffusionsrate von ATP entlang des Schwanzes von Stier- und Seeigelspermien als ausreichend berechnet. Für die längeren Spermien von Nagetieren postulierte Ford (2006) einen Adenylat-Kinase-*shuttle*, welcher in Seeigelspermien bereits nachgewiesen wurde (Tombes und Shapiro, 1987). Die Glykolyse-Theorie wurde durch die Deletion von GAPDH-S und hodenspezifischem Cytochrom c (Cyt c_T) untermauert. Das Ausschalten von GAPDH-S in Mäusen führte zu vollständiger Infertilität in Folge von Motilitätsstörungen der Spermien. Die *Gapdhs*^{-/-}-Mäuse zeigten einen stark reduzierten ATP-Gehalt, ohne dass der mitochondriale Sauerstoffverbrauch sich änderte (Miki *et al.*, 2004).

Cytochrom c ist ein Protein der Atmungskette, das für die oxidative Phosphorylierung essentiell ist. Die *Cyt c_T*^{-/-}-Mäuse zeigten ebenfalls verringerte ATP-Mengen in den Spermien und wie bei der *Slc2a8*^{-/-}-Maus war die Zahl bewegungsfähiger Spermien stark reduziert. Aber im Gegensatz zur *Gapdhs*^{-/-}-Maus führte die Deletion von Cytochrom c, wie auch die Deletion von *Slc2a8*, nicht zu einem totalen Fertilitätsverlust (Narisawa *et al.*, 2002). Daraus schlossen die Autoren, dass die oxidative Phosphorylierung nicht essentiell für die ATP-Versorgung von Spermien ist, die Glykolyse dagegen schon (Miki, 2007).

Da mittels qRT-PCR kein Unterschied in der Expression von GAPDH-S zwischen *Slc2a8^{+/+}*- und *Slc2a8^{-/-}*-Mäusen beobachtet wurde (vergl. Abb. 3.10), ist zu vermuten, dass die Glykolyse entlang des Schwanzes in den *Slc2a8^{-/-}*-Mäusen funktionsfähig ist.

Für eine essentielle Rolle der oxidativen Phosphorylierung in der Spermienmotilität sprechen die Ergebnisse von Ford und Harrison, die in Stier- und Eberspermien (1985; 1986) nach Hemmung der Glykolyse durch α -Chlorohydrin keinen Effekt auf die Spermienmotilität beobachten konnten. Dieses Ergebnis wurde von Tanaka *et al.* (2004) auch für Maus-spermien publiziert und steht im Widerspruch zu der von Miki *et al.* (2004) beschriebenen totalen Infertilität der *Gapdhs^{-/-}*-Maus.

Auch Nakada *et al.* (2006) konnten in Mäusen nachweisen, dass eine gestörte mitochondriale Atmung zu einer stark reduzierten Zahl motiler Spermien führte. Ferner wurde gezeigt, dass die Vorwärtsmotilität von Spermien von der Bildung reaktiver Sauerstoff-intermediate (ROI) in der Atmungskette der Mitochondrien abhängig war (Fisher und Aitken, 1997), was für eine essentielle Rolle der Mitochondrienfunktion in der Bewegungsfähigkeit von Spermien spricht. Marchetti *et al.* (2002, 2004) zeigten, dass die Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials für die Fertilität von Spermien notwendig war, da ein reduziertes mitochondriales Membranpotential zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führte, was einen Verlust der Bewegungsfähigkeit der Spermien nach sich zog. Die Autoren postulierten daher, dass das mitochondriale Membranpotential einen sensitiven Marker für die Qualität von Spermien darstellt.

Die Überprüfung der Expression von *Glutathionperoxidase* (GSH-Peroxidase) und γ -*Glutamyltranspeptidase* (GGT), zwei Proteinen, die für die Abwehr von oxidativem Stress wichtig sind (Markey *et al.*, 1998; Walker *et al.*, 2006), zeigte keine Unterschiede in Hoden von *Slc2a8^{+/+}*- und *Slc2a8^{-/-}*-Mäusen (vergl. Abb. 3.10), woraus sich schließen lässt, dass die verringerte Motilität nicht auf erhöhten oxidativen Stress in den *Slc2a8^{-/-}*-Spermien zurückzuführen ist.

Da in die Analyse des mitochondrialen Membranpotentials und der ATP-Produktion der *Slc2a8^{-/-}*-Mäuse (vergl. Abb. 3.9) sowohl motile als auch immotile Spermien eingeflossen waren, liegt die Vermutung nahe, dass die Spermien, die eine mangelhafte mitochondriale Kondensation zeigten auch ein unzureichendes mitochondriales Potential besaßen und daraufhin nicht genug ATP produzieren konnten, um sich fortzubewegen. Das würde bedeuten, dass entgegen der Hypothese von Turner (2006) und Miki (2007) die ATP-Produktion der Glykolyse entlang des Schwanzes in den *Slc2a8^{-/-}*-Spermien nicht ausreicht, um ihre Motilität aufrecht zu halten. In den *Slc2a8^{-/-}*-Spermien war die Glucoseaufnahme nicht vermindert (vergl. Abb. 3.8), so dass die ATP-Produktion durch die Glykolyse

vermutlich nicht reduziert ist. GLUT8 scheint daher in den Spermien für einen bisher unbekanntem intrazellulären Transportprozess wichtig zu sein, der einen Einfluss auf die Funktion der Mitochondrien und die ATP-Produktion hat.

4.3 Funktion von GLUT8 im Gehirn

4.3.1 Lokalisation von GLUT8 im Gehirn

In der qRT-PCR wurde neben der hohen *Slc2a8*-Expression in den Testes auch eine starke Expression im Gehirn beobachtet (vergl. Abb. 3.2). Um die Funktion von GLUT8 im Gehirn zu untersuchen, wurde zunächst seine Lokalisation analysiert. Mittels qRT-PCR und Immunhistochemie wurde eine starke Expression im Hippocampus nachgewiesen, aber auch geringere Mengen in Hypothalamus, Thalamus, Cortex, Amygdala und Gyrus dentatus (vergl. Abb. 3.13A&B). Diese Ergebnisse stimmen mit der Verteilung von GLUT8 im Gehirn der Ratte überein, wo der Transporter hauptsächlich in den Körnerzellen des Gyrus dentatus und in den Pyramidenzellen der CA1-CA4-Region des Hippocampus gefunden wurde. Auch im Cortex und im Thalamus wurden schwächere Signale beobachtet (Reagan *et al.*, 2001; Ibberson *et al.*, 2002). In der Immunhistochemie (vergl. Abb. 3.13B) ließ sich deutlich die intrazelluläre Lokalisation von GLUT8 im Zellkörper und in den apikalen Dendriten der Nervenzellen zeigen, die auch von Reagan *et al.* (2001) im Rattengehirn beschrieben wurde. In den axonalen und dendritischen Fortsätzen der Zellen wurde kein GLUT8 nachgewiesen, was dafür spricht, dass der Transporter im Gehirn eine andere Funktion ausübt als GLUT3 und GLUT4, die beide hauptsächlich in den Bereichen der neuronalen Signalübertragung vorlagen (Sankar *et al.*, 2002).

4.3.2 Einfluss von GLUT8 auf die Hippocampusfunktion

Die *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse zeigten im direkten Vergleich zu ihren *Slc2a8*^{+/+}-Geschwistern eine signifikant gesteigerte körperliche Aktivität im infraMot-System (TSE-Systems GmbH, Bad Homburg) sowie eine ebenfalls signifikant erhöhte freiwillige Aktivität im *Running-Wheel*-System (TSE-Systems GmbH). Diese Ergebnisse stützen die von Stefan Schmidt im Rahmen seiner Doktorarbeit (2007) beschriebene Hyperaktivität der *Slc2a8*^{-/-}-Tiere im *modified hole board*-Test (Schmidt *et al.*, 2008b). Dieser Test ermöglicht die Untersuchung verschiedenster unconditionierter Verhaltensparameter wie Bewegungsmuster, Erkundungs-, Lern- und Sozialverhalten (Ohl *et al.*, 2001). Im Rahmen dieses Tests wurde in den *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen außerdem eine geringere Risikobereitschaft und ein gesteigertes Angstverhalten diagnostiziert (Schmidt *et al.*, 2008b).

Der Hippocampus, der im Gehirn die stärkste *Slc2a8*-Expression aufwies, reagiert sehr sensitiv auf Unterversorgungen in Form von Sauerstoff (Hypoxie) und Glucose (Hypoglykämie) (Ng *et al.*, 1989; Chalmers *et al.*, 1991). Er spielt unter anderem eine

wichtige Rolle in der Regulation von Angstverhalten (Bannerman *et al.*, 2003). Außerdem wurde sowohl in Mäusen als auch in Ratten beobachtet, dass Läsionen im Hippocampus zu einer Hyperaktivität der Tiere führten (Bannerman *et al.*, 2001; Bardgett *et al.*, 2003). Der Grad der Hyperaktivität korrelierte dabei direkt mit der Größe bzw. dem Umfang der Läsion (Goddyn *et al.*, 2006). Aufgrund dieser Beobachtungen liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die Hyperaktivität und das gesteigerte Angstverhalten der *Slc2a8*^{-/-}-Tiere auf Störungen in der Energieversorgung des Hippocampus zurückzuführen sind.

Da GLUT8 aber auch in weiteren Gehirnregionen exprimiert wird, kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass eventuell Störungen in einem anderen Gehirnareal die Hyperaktivität in den *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen auslöste oder es sich sogar um einen additiven Effekt von mehreren Arealen handelte. Die von Membrez *et al.* (2006) beschriebene gesteigerte Zellproliferation im Gyrus dentatus der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse spricht allerdings ebenfalls für eine Beteiligung des Hippocampus an der beobachteten Hyperaktivität.

Da GLUT8 auch im Gehirn intrazellulär lokalisiert vorlag (vergl. Abb. 3.13B), ist es unklar, wie der Transporter die Glucosehomöostase des Gehirns beeinflussen kann. Für die von Ibberson *et al.* (2002) postulierte Translokation des Transporters durch Exozytose der intrazellulären präsynaptischen Vesikel und sekretorischen Granula gibt es bisher keine Belege. Außerdem konnte in keiner der Verteilungsanalysen ein Plasmamembransignal für GLUT8 nachgewiesen werden, weder unter physiologischen Bedingungen noch in einem Diabetes-Modell (Reagan *et al.*, 2001; Ibberson *et al.*, 2002; Sankar *et al.*, 2002).

Es wäre möglich, dass GLUT8 eine Rolle in der Glykogenspeicherung des Gehirns spielt. Im Vergleich mit der Leber und dem Skelettmuskel kann das Gehirn nur wenig Glykogen speichern (Nelson *et al.*, 1968). Es wird vermutet, dass das Glykogen dem Gehirn als Energielieferant in Zeiten von erhöhtem Energiebedarf dient, da die Glykogenspiegel während der Schlafphase akkumulieren und während der Wachphase mobilisiert werden (Brown, 2004). Besonders für das sich entwickelnde Gehirn ist Glucose die Hauptenergiequelle. Die Speicherung von Glucose in Form von Glykogen wurde im embryonalen Gehirn sowohl für Astrozyten als auch für Neurone beschrieben (Koski *et al.*, 1993). Mit dem Stillen des Neugeborenen beginnt die Umstellung seines Energiemetabolismus und die Fähigkeit zur Gluconeogenese entsteht (Ferré *et al.*, 1986). Zu diesem Zeitpunkt sinken die Glykogenspiegel im Gehirn, speziell in den Neuronen. Daher wird vermutet, dass Glykogen besonders wichtig für die Gehirnentwicklung ist.

Da in den Gehirnen der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse direkt nach ihrer Geburt und damit vor der Umstellung des Energiemetabolismus, kein Unterschied im Glykogenspiegel beobachtet wurde, erfolgt die Gehirnentwicklung ungestört. In der adulten Maus waren die Glykogenspiegel zu gering, um sie mit den zur Verfügung stehenden Methoden nachzuweisen. Es ist

daher wenig wahrscheinlich, dass die beobachtete Hyperaktivität der *Slc2a8*^{-/-}-Tiere durch eine Störung im Glykogenstoffwechsel des adulten Hippocampus verursacht wurde.

Eine weitere Möglichkeit für GLUT8 die Glucosehomöostase des Hippocampus zu regulieren, ist die von Piroli *et al.* (2002) postulierte Vermutung, dass der Transporter im rauen endoplasmatischen Reticulum (rER) lokalisiert ist und Glucosemoleküle, die während der Proteinglykosylierung anfallen, aus dem rER ins Zytosol transportiert. Allerdings wurde in CHO-Zellen mittels Immunogold-Färbung kein Signal für GLUT8 im ER ausgemacht (Augustin *et al.*, 2005) und auch die Überprüfung der Proteinglykosylierung mittels Concanavalin A erbrachte keine Unterschiede im Bandenmuster zwischen *Slc2a8*^{-/-}- und *Slc2a8*^{+/+}-Mäusen (Daten nicht dargestellt), was gegen eine Funktion von GLUT8 in der Glykosylierung von Proteinen am rER spricht.

Aufgrund des hochkonservierten [DE]XXXL[LI]-Sortierungssignals für späte Endosomen und Lysosomen von GLUT8 ist die von Augustin *et al.* (2005) postulierte Hypothese am wahrscheinlichsten. Die Autoren vermuten, dass GLUT8 Zuckerderivate, die in den Lysosomen während des Abbaus von Glykoproteinen und Aminoglykanen entstehen, durch lysosomale/endosomale Membranen transportiert und somit die Wiederverwertung dieser Zucker ermöglicht. Möglicherweise dienen diese rückgeführten Zucker den Zellen als zusätzliche Energiequelle, so dass es durch die Deletion von *Slc2a8* zu moderaten Störungen in der Energieversorgung kommt, die im Falle des hochsensitiven Hippocampus Verhaltensveränderungen auslösen.

4.4 Funktion von GLUT8 in der Regulierung der Energie- und Glucosehomöostase des Körpers

4.4.1 Einfluss von GLUT8 auf die Körpergewichtsentwicklung

Die Verabreichung von verschiedenen Diäten in unterschiedlichen Rückkreuzungsgenerationen erbrachte ein leicht und nicht signifikant reduziertes Körpergewicht der männlichen *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu ihren *Slc2a8*^{+/+}-Wurfgeschwistern. In der N3-Generation war der Unterschied größer unter der HFD-1-Diät (Altromin GmbH & Co. KG, Lage; 35 Kalorienprozent aus Fett, 48 Kalorienprozent aus Kohlenhydraten, 17 Kalorienprozent aus Protein), als unter der SD-1-Kontrolldiät (13 Kalorienprozent aus Fett, 67 Kalorienprozent aus Kohlenhydraten, 20 Kalorienprozent aus Protein). Die Analyse der *Slc2a8*^{-/-}-Männchen auf einem reineren genetischen Hintergrund des C57BL/6J-Stamms (N7) zeigte die Gewichtsreduktion sowohl unter der HFD-2-Diät (*Research Diets* New Brunswick, NJ, USA; 60 Kalorienprozent aus Fett, 20 Kalorienprozent aus Kohlenhydraten, 20 Kalorienprozent aus Protein) als auch unter der SD-2-Kontrolldiät (10 Kalorienprozent aus Fett, 70 Kalorienprozent aus Kohlenhydraten, 20 Kalorienprozent aus Protein), wobei auch hier die Differenz unter der HFD-2-Diät stärker ausgeprägt war. Da die SD-2-Diät trotz des

geringeren Fettgehalts einen ähnlichen Kaloriengehalt wie die HFD-1- und die SD-1-Diät aufwies (3,85 zu 3,65 zu 3,52 kcal/g entsprechend), scheint die Kaloriendichte der Diät einen größeren Einfluss auf die Körpergewichtsentwicklung auszuüben als der Fettgehalt.

Die von Membrez *et al.* (2006) generierte *Slc2a8*^{-/-}-Maus befand sich ebenfalls auf einem C57BL/6J-Hintergrund, zeigte aber keinen Unterschied im Körpergewicht zwischen den Genotypen. Leider machte die Gruppe weder Angaben zur Zusammensetzung der von Ihnen verabreichten Diät noch wurde ersichtlich, in welcher Rückkreuzungsgeneration sie die Deletion von *Slc2a8* analysierten, was einen Vergleich der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Daten erschwert.

Die leichte Differenz im Körpergewicht der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse ließ sich keinem bestimmten Gewebetyp zuordnen, sondern scheint ein additiver Effekt zu sein, der durch eine marginale Reduktion aller untersuchten Gewebe entstand (vergl. Abb. 3.17 und Tab. 3.3). Auch die Körperlänge der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse war im Vergleich zu ihren *Slc2a8*^{+/+}-Geschwistern leicht reduziert.

Im Zusammenhang mit der gesteigerten Aktivität (Abb. 3. 14) lässt das reduzierte Körpergewicht der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse einen erhöhten Energieumsatz der Tiere vermuten. Die Analyse des Energieumsatzes in der indirekten Kalorimetrie erbrachte allerdings keine Unterschiede zwischen den Genotypen (Abb. 3.19). Der Grund dafür liegt wahrscheinlich im Messsystem. Das Oxymax Lab Animal Monitoring System (Columbus Instruments, Columbus, OH, USA) ist darauf ausgelegt auch den direkten Energieverbrauch der Mäuse zu bestimmen, indem die Fäzes gesammelt werden. Die Mäuse sitzen daher nicht auf Sägespäne, wie sie es gewohnt sind, sondern auf einem Plastikgitter, durch das die Fäzes durchfallen und gesammelt werden. Auf diesem Gitter war es den Mäusen unangenehm sich zu bewegen. Zusätzlich waren die Messboxen so klein, dass die *Slc2a8*^{-/-}-Tiere keine Möglichkeit hatten ihre Hyperaktivität zu zeigen. Daher wurde in diesem Versuch tatsächlich nur der Ruheumsatz der Mäuse gemessen, in dem kein Unterschied zwischen den Genotypen ermittelt werden konnte.

Wenn der Energieumsatz der Tiere in einem System gemessen worden wäre, das ihnen Bewegungsmöglichkeiten gegeben hätte, wäre wahrscheinlich ein erhöhter Aktivitätsumsatz der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse gemessen worden. Leider stand ein solches System im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Verfügung.

4.4.2 Rolle von GLUT8 in der Regulation der Nahrungsaufnahme

Die Analyse der Nahrungsaufnahme der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse ergab nur eine geringfügig, nicht signifikant niedrigere Futteraufnahme im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern (vergl. Abb. 3.18). Die Nahrungsaufnahme wird vor allem im Hypothalamus reguliert. Aktiv an der Regulation beteiligt sind der ventromediale Hypothalamus (VMH) und der laterale Hypo-

thalamus (LHA). Ratten, denen der VMH, bestehend aus dem *Nucleus ventromedialis* (VMN) und dem *Nucleus arcuatus* (ARC) sowie der *Nucleus paraventricularis* (PVN) experimentell entfernt wurden, zeigten eine erhöhte Nahrungsaufnahme, die in Fettleibigkeit resultierte (Borg *et al.*, 1994; Tokunaga *et al.*, 1986). Ratten, deren LHA zerstört wurde zeigten dagegen ein reduziertes Körpergewicht (Leibowitz *et al.*, 1984). Diesen Effekten liegt die Existenz von Glucose-sensitiven-Neuronen im Hypothalamus zugrunde, deren Aktivität vom Plasmaglucoosespiegel abhängig ist. Man unterscheidet zwischen so genannten Glucose-responsiven-Neuronen, die durch Glucose aktiviert werden und Glucose-sensitiven-Neuronen, deren Aktivität durch Glucose gehemmt wird (Anand *et al.*, 1964; Levin, 2006). Beide Neuronentypen sind durch die Ausschüttung verschiedener Neuropeptide aktiv an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt. Die Glucose-responsiven POMC (Pro-Opiomelanocortin)/CART (Kokain- und Amphetamin-reguliertes Transkript)-Neurone setzen die Neuropeptide α -MSH (α -Melanozyten-stimulierendes Hormon), CART, CRH (Corticotropin-freisetzendes Hormon) und TRH (Thyrotropin-freisetzendes Hormon) frei, welche einen negativen Effekt auf die Nahrungsaufnahme ausüben (Tsuji und Bray, 1989). Die Glucose-sensitiven NPY (Neuropeptid Y)/AgRP (Agouti-verwandtes Protein)-Neurone schütten in Abwesenheit von Glucose die Neuropeptide NPY, AgRP, ORX (Orexin) und MCH (Melanin-konzentrierendes Hormon) aus, was in einer gesteigerten Nahrungsaufnahme resultiert (Brady *et al.*, 1990; Schwartz *et al.*, 2000).

Es wird vermutet, dass das *Glucose-sensing* in den Glucose-responsiven- als auch in den Glucose-sensitiven-Neuronen vergleichbar mit dem *Glucose-sensing* in den β -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas abläuft (Rutter, 2001). Dort wird die Glucose durch GLUT2 in die β -Zelle aufgenommen und durch die Glucokinase phosphoryliert. Die Phosphorylierung durch die Glucokinase ist der erste Schritt der Glykolyse, die letztendlich einen Anstieg der ATP-Konzentration bewirkt. ATP wiederum aktiviert die Schließung der ATP-abhängigen K^+ -Kanäle, was zur Erhöhung des Membranpotentials führt. Dadurch öffnen sich die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle, Ca^{2+} strömt in die Zelle und löst die Exozytose von Insulin aus. Da GLUT2 im Gehirn überwiegend in Astrozyten und Gliazellen exprimiert wird (Leloup *et al.*, 1994), kann er nicht wie in der β -Zelle am *Glucose-sensing* der Neurone im Gehirn beteiligt sein. Der primäre Kandidat für diese Funktion ist der neuronale GLUT3 (vergl. Abschnitt 1.11.3), der von allen GLUTs die höchste Expression im Gehirn zeigt. Aber auch GLUT8, dessen Expression im Gehirn am zweithöchsten ist, könnte diese Aufgabe übernehmen, da er in den Neuronen des Hypothalamus vorlag (vergl. Abb. 3.13). Die nur marginal verringerte Nahrungsaufnahme der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse (vergl. Abb. 3.18) und das nur leicht reduzierte Körpergewicht der *Slc2a8*^{-/-}-Tiere (vergl. Abb. 3.16) zeigt allerdings, dass GLUT8 nicht am *Glucose-sensing* des Gehirns beteiligt ist.

4.4.3 Funktion von GLUT8 in der Regulation des Blutglucosespiegels

Die Untersuchung der metabolischen Parameter in Woche 15 und 16 ergab im gefasteten Zustand unter der SD-2-Diät signifikant um 15% verringerte Blutglucosespiegel der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu ihrem *Slc2a8*^{+/+}-Wurfgeschwistern (vergl. Tab. 3.4). Mäuse, die unter der HFD-2-Diät gehalten wurden zeigten denselben Trend und auch im gefütterten Zustand war der Blutzuckerspiegel der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse unter beiden Diäten leicht, aber nicht signifikant erniedrigt. Da keine Unterschiede im Glykogengehalt der Lebern gefütterter oder nüchterner Mäuse zwischen den Genotypen vorlagen (vergl. Abb. 3.20), kann eine Störung im Glucosestoffwechsel der Leber als Ursache ausgeschlossen werden. Auch die Untersuchung der Glykogenspiegel des Skelettmuskels (Quadrizeps) erbrachte keine Unterschiede zwischen den Genotypen (Daten nicht dargestellt), was auch eine Rolle von GLUT8 im Glykogenstoffwechsel des Gehirns (vergl. Abschnitt 4.3.2) eher unwahrscheinlich erscheinen lässt. Die Arbeitsgruppe um Membrez *et al.* (2006) konnte in ihren *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen keine Veränderung in den Blutglucosespiegeln gefütterter, nüchterner und sechs Stunden erneut gefütterter Tiere beobachten. Da die Autoren keine Angaben zu der von Ihnen verwendeten Diät und der von Ihnen analysierten Rückkreuzungsgeneration der *Slc2a8*-Deletion auf C57BL/6J machten, können diese Befunde nicht mit den in dieser Arbeit ermittelten Blutglucosespiegeln (C57BL/6J, N7) verglichen werden. Außerdem konnten die Autoren weder Unterschiede in der Glucosetoleranz ermitteln, die sie mit Hilfe eines *intraperitonealen* Glucosetoleranztest analysiert hatten, noch in den Nüchtern-Insulinspiegeln, woraus sie schlossen, dass GLUT8 keine essentielle Funktion in der Glucosehomöostase ausübt (Membrez *et al.*, 2006).

4.4.4 Rolle von GLUT8 im Fettstoffwechsel des Körpers

Aufgrund des starken Expressionsanstiegs von *Slc2a8* während der Differenzierung von 3T3-L1-Fibroblasten zu Adipozyten und der spezifischen Expressionsreduktion bei Hypoglykämie, die ebenfalls nur in 3T3-L1-Adipozyten auftrat (Scheepers *et al.*, 2001), wurde eine spezifische Funktion von GLUT8 in der Regulation des Glucosemetabolismus von Fettzellen postuliert, die möglicherweise für die Adipozytendifferenzierung essentiell ist. Da die *Slc2a8*-mRNA-Expression im weißen Fettgewebe im Vergleich zum Skelettmuskel und zur Leber sehr gering war (vergl. Abb. 3.2) und mittels Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) im Rahmen dieser Arbeit nur eine marginale Reduktion des Körperfettgehalts der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse ermittelt wurde (vergl. Abb. 3.17), erscheint eine notwendige Rolle von GLUT8 in der Adipozytendifferenzierung eher unwahrscheinlich. Auch histologisch waren keine Unterschiede im Fettgewebe von *Slc2a8*^{-/-}-Tieren und ihren *Slc2a8*^{+/+}-Geschwistern zu ermitteln (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus konnte Stefan Schmidt im Rahmen seiner Doktorarbeit (2007) keine Störungen in der Adipozytendifferenzierung aus *Slc2a8*^{-/-}-MEF

(embryonale Maus-Fibroblasten) beobachten, so dass der Anstieg der *Slc2a8*-mRNA-Menge während der Adipozytendifferenzierung nicht essentiell für diesen Prozess zu sein scheint.

Die Analyse der Blutparameter erbrachte allerdings unter der HFD-2-Diät signifikant erniedrigte Triglyceridwerte in den *Slc2a8*^{-/-}-Tieren im gefütterten (35% niedriger im Vergleich zu *Slc2a8*^{+/+}-Geschwistern) als auch im nüchternen Zustand (20% niedriger im Vergleich zu *Slc2a8*^{+/+}-Geschwistern) (vergl. Tab. 3.4). Dieselbe Tendenz zeigte sich unter der SD-2-Diät. Da innerhalb eines oralen Fettoleranztests kein Unterschied in der Triglycerid-*clearance* zwischen *Slc2a8*^{-/-}- und *Slc2a8*^{+/+}-Mäusen beobachtet wurde (vergl. Abb. 3.21), scheinen die verminderten Plasma-Triglyceridspiegel der *Slc2a8*^{-/-}-Tiere nicht durch eine verminderte Resorption aus dem Darmlumen zu entstehen. Möglicherweise ist durch das Fehlen von GLUT8 die Gluconeogenese gestört. Dafür spricht, dass die verminderten Blutzuckerspiegel der *Slc2a8*^{-/-}-Tiere nur nach einer langen Fastenperiode von 15 h über Nacht beobachtet wurden. Die Überprüfung des Blutglucoseverlaufs über den Tag, nachdem den Tieren morgens um 7 Uhr das Futter entzogen wurde, erbrachte keine Unterschiede zwischen den Genotypen (Daten nicht dargestellt), was ein weiterer Hinweis auf eine funktionsfähige Glykogenolyse ist.

Da das Free Glycerol Determination Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) nicht exklusiv den Triglyceridgehalt misst, sondern nach Spaltung der Triglyceride der Gesamt-Glycerin-gehalt nachgewiesen wurde, kann nicht sicher geschlossen werden, dass der Triglyceridgehalt in den *Slc2a8*^{-/-}-Tieren erniedrigt ist. Die *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse könnten auch einen verringerten Glycerin-gehalt aufweisen. Im Zusammenhang mit den reduzierten gefasteten Blutglucosespiegeln in den *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen wäre es dann denkbar, dass GLUT8 neben Glucose, Fructose und Galactose (Ibberson *et al.*, 2000) auch Glycerin transportieren kann. Der Transport von Glycerin ist in der Literatur für eine Unterklasse der Aquaporine, die so genannten Aquaglykoporine, beschrieben (Rojek *et al.*, 2008). Im Gegensatz zum intrazellulären GLUT8 transportieren sie Glycerin über die Plasmamembran. Die Gluconeogenese aus Glycerin läuft intrazellulär vorwiegend im Zytoplasma ab. Erst Glucose-6-Phosphat wird über den Glucose-6-Phosphat-Translokator in das raue endoplasmatische Reticulum (rER) transportiert, wo die Glucose-6-Phosphatase es zu Glucose umwandelt, die über einen bisher unbekanntem Transportmechanismus wieder aus dem ER heraus transportiert wird (Salway, 2000). Dass GLUT8 den Transport von Glucose aus dem ER katalysiert ist eher unwahrscheinlich, zum einen da GLUT8 ein hoch konserviertes Sortierungssignal für Lysosomen und späte Endosomen besitzt (Augustin *et al.*, 2005) und nur wenige Arbeitsgruppen eine Lokalisation des Transporters im ER beschrieben haben (Piroli *et al.*, 2002; Widmer *et al.*, 2005) und zum anderen, da dieser Transportweg auch für die Glykogenolyse essentiell ist. Wenn durch die Deletion von *Slc2a8* keine Glucose mehr aus dem ER transportiert werden würde, müsste die *Slc2a8*^{-/-}-Maus eine massive Störung in

der Regulation der Glucosehomöostase zeigen. Eine Rolle der Lysosomen und/oder späten Endosomen in der Gluconeogenese wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben.

4.4.5 Einfluss von GLUT8 auf die Lebensdauer

Die Analyse der Lebenserwartung der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse ergab eine leicht erhöhte Lebensspanne im direkten Vergleich zu ihren *Slc2a8*^{+/+}-Geschwistern, wobei die Tierzahl in diesem Versuch zu gering war, um ein signifikantes Ergebnis zu erhalten. Die Analyse sollte mit einer größeren Tierzahl reproduziert werden, was im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war. Zusammen mit dem geringfügig verminderten Körpergewicht, der marginal geringeren Körperlänge und den verringerten Plasma-Triglycerid- und Blutglucosespiegeln gibt die höhere Lebenserwartung einen Hinweis auf eine leichte Nährstoffunterversorgung in den *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen. Dass eine reduzierte Energieaufnahme, die nicht zu einer deutlichen Mangelernährung führt, das Leben von Ratten verlängert, ist bereits seit mehr als 70 Jahren bekannt (McCay *et al.*, 1989). Seitdem wurde diese Beobachtung auch für viele weitere Spezies bestätigt (Martin *et al.*, 2007). Welcher Mechanismus hinter diesem Phänomen steht ist bis heute unklar, da eigentlich zu erwarten wäre, dass die Limitierung von Kalorien für den Organismus physiologischer Stress bedeutet. Für Mäuse und Ratten wurde gezeigt, dass die erhöhte Lebenserwartung durch Kalorienrestriktion mit verringerter Körpergröße und -gewicht einherging. Die Tiere bildeten weniger Körperfett aus und sämtliche essentiellen Organe waren kleiner als bei *ad libitum* gefütterten Tieren (Weindruch und Sohal, 1997). Außerdem wurde beschrieben, dass eine kalorienreduzierte Nahrungsaufnahme die Aktivität von Nagetieren steigert, was möglicherweise durch den Bedarf der Futtersuche ausgelöst wurde (Hart und Turturro, 1998). Der Phänotyp der durch eine reduzierte Energieaufnahme ausgelöst wird, stimmt in vielen Punkten mit dem Phänotyp der *Slc2a8*^{-/-}-Maus überein, was einen Zusammenhang sehr wahrscheinlich macht.

Eine Möglichkeit, wie das Fehlen von GLUT8 die Energieaufnahme beeinträchtigen könnte, wurde aktuell von der Arbeitsgruppe Romero *et al.* (2009) publiziert. Die Gruppe hat die Expression von GLUT8 im Darm untersucht und fand den Transporter sowohl in Duodenum, Jejunum und Ileum als auch im Colon. Interessanterweise beobachtete die Gruppe in allen vier untersuchten Darmabschnitten drei zusätzliche Spleiß-Varianten von GLUT8, aus denen keine funktionellen Glucosetransporter hervorgingen und die auch die Glucoseaufnahme von GLUT8 in transfizierten 3T3-L1-Zellen nicht beeinflussten. In den Hoden konnte die Gruppe diese Spleiß-Varianten dagegen nicht nachweisen, die Überprüfung weiterer Organe steht noch aus. Die Autoren vermuten, dass die verkürzten Proteine eventuell an der Regulation der Genexpression von *Slc2a8* im Darm beteiligt sein könnten.

Die höchste *Slc2a8*-Expression im Darm wurde im Colon ermittelt, wo bisher keine weiteren Transporter der GLUT-Familie nachgewiesen wurden. Daher vermuteten die Autoren eine wichtige Funktion von GLUT8 im Colon. Da die Zuckeraufnahme aus der Nahrung bereits im Dünndarm durch SGLT1 und GLUT2/GLUT5 stattfindet (Wright *et al.*, 2007), kann diese Funktion allerdings nicht in der Nährstoffaufnahme in die Colonozyten liegen.

Wahrscheinlicher ist, dass GLUT8 an einem intrazellulären lysosomalen/endosomalen Wiederaufbereitungsprozess von Zuckerderivaten degradierter Glykoproteine beteiligt ist (Augustin *et al.*, 2005), der möglicherweise im Colon, wahrscheinlicher aber in Geweben, die eine höhere *Slc2a8*-Expression aufweisen, wie Gehirn, speziell Hippocampus, Leber und Skelettmuskel stattfindet bzw. für diese Gewebe wichtig ist (siehe Abschnitt 4.3.2). Es wäre zu postulieren, dass die Störung dieses Transportprozesses zu einer leichten Nährstoffunterversorgung des Körpers führt. Da die *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse lebensfähig sind, scheint dieser Transportprozess nicht überlebenswichtig zu sein, es sei denn, er könnte teilweise von einem anderen Transporter kompensiert werden.

Die Überprüfung der ATP-Spiegel von Leber und Skelettmuskel (vergl. Abb. 3.22) zeigte im Gegensatz zu den Spermatozoen keine Unterschiede zwischen den *Slc2a8*^{-/-}- und *Slc2a8*^{+/+}-Mäusen, woraus sich schließen lässt, dass GLUT8 in den Spermien eine andere intrazelluläre Funktion übernimmt, als im restlichen Organismus. Spermien sind stark differenzierte Zellen, die transkriptionelle, funktionelle als auch zelluläre Unterschiede im Vergleich zu anderen Zellen des Organismus zeigen (Oliva *et al.*, 2009), was eine spezifische intrazelluläre Funktion von GLUT8 in Spermien durchaus realistisch erscheinen lässt. Die unerwartet geringen Auswirkungen der *Slc2a8*-Deletion auf den Phänotyp der Mäuse sowie ihre Lebensfähigkeit machte das konditionale Ausschalten des *Slc2a8*-Gens unter einem spezifischen Cre-Rekombinase-Promotor unnötig.

5 Zusammenfassung

Der ubiquitär exprimierte, multifunktionale Glucosetransporter GLUT8 gehört zur Klasse III der Familie der passiven Glucosetransporter, die aus insgesamt 14 Proteinen besteht. Die fünf Mitglieder der Klasse III unterscheiden sich strukturell leicht von den Mitgliedern der Klasse I und II (Joost und Thorens, 2001). GLUT8 besitzt ein N-terminales Dileucin-Motiv, das Teil eines [DE]XXXL[LI] Motivs ist, welches für die Sortierung des Transporters in späte Endosomen und Lysosomen verantwortlich ist (Augustin *et al.*, 2005). Da bis heute kein Signal identifiziert wurde, das eine Translokation des Transporters zur Plasmamembran auslöst, wird eine intrazelluläre Funktion von GLUT8 vermutet (Widmer *et al.*, 2005). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die intrazelluläre Funktion des Transporters in der Regulation der Glucosehomöostase des Körpers durch Analyse einer *Slc2a8-knockout*-Maus untersucht.

Die homozygote Deletion des Transporters erbrachte lebensfähige Nachkommen, die sich augenscheinlich nicht von ihren Wildtyp-Geschwistern unterschieden. Allerdings wurde bei Verpaarungen heterozygoter Mäuse eine verminderte Anzahl an *Slc2a8*^{-/-}-Nachkommen beobachtet, die signifikant von der erwarteten Mendel'schen Verteilung abwich. Da *Slc2a8* die höchste mRNA-Expression in den Testes aufwies und die Überprüfung der Fertilität mittels verschiedener homozygoter Verpaarungen eine Störung der weiblichen Fortpflanzungsfähigkeit ausschloss, wurden die Spermatozoen der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse eingehender untersucht. Als Ursache für die verringerte Anzahl von *Slc2a8*^{-/-}-Geburten wurde eine verminderte Prozentzahl motiler *Slc2a8*^{-/-}-Spermien ermittelt, die durch eine unzureichende mitochondriale Kondensation in den Spermien bedingt war. Diese Veränderung war mit einem reduzierten mitochondrialen Membranpotential assoziiert, was eine verminderte ATP-Produktion nach sich zog. Somit scheint GLUT8 in den Spermien an einem intrazellulären Transportprozess beteiligt zu sein, der einen Einfluss auf die oxidative Phosphorylierung der Mitochondrien ausübt.

Im Gehirn wurde *Slc2a8* besonders stark im Hippocampus exprimiert, der in der Regulation von körperlicher Aktivität, Explorationsverhalten, Erinnerungs- und Lernprozessen sowie Angst- und Stressreaktionen eine Rolle spielt. Außerdem wurde GLUT8 im Hypothalamus nachgewiesen, der unter anderem an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt ist. Die *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse zeigten im Vergleich zu ihren *Slc2a8*^{+/+}-Geschwistern eine signifikant gesteigerte körperliche Aktivität, die zusammen mit der von Membrez *et al.* (2006) publizierten erhöhten Zellproliferation im Hippocampus auf eine Nährstoffunterversorgung dieses Areals hindeutet. Die Nahrungsaufnahme war in Abwesenheit von GLUT8 nicht verändert, was zusammen mit dem nur geringfügig niedrigeren Körpergewicht der *Slc2a8*^{-/-}-

Mäuse eine Funktion von GLUT8 im Glucose-sensing der Glucose-sensitiven Neurone des Gehirns ausschließt.

Das leicht reduzierte Körpergewicht der *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse ließ sich keinem bestimmten Organ- oder Gewebetyp zuordnen, sondern schien durch eine marginale Gewichtsreduktion aller untersuchten Gewebe bedingt zu sein. Zusammen mit den erniedrigten Blutglucosespiegeln und der anscheinend gesteigerten Lebenserwartung zeigten die *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse Symptome einer leichten Nährstoffunterversorgung. GLUT8 scheint daher am Transport von Zuckerderivaten, die während des lysosomalen/endosomalen Abbaus von Glykoproteinen anfallen, beteiligt zu sein. Die so wiederaufbereiteten Zucker dienen dem Körper offenbar als zusätzliche Energiequelle.

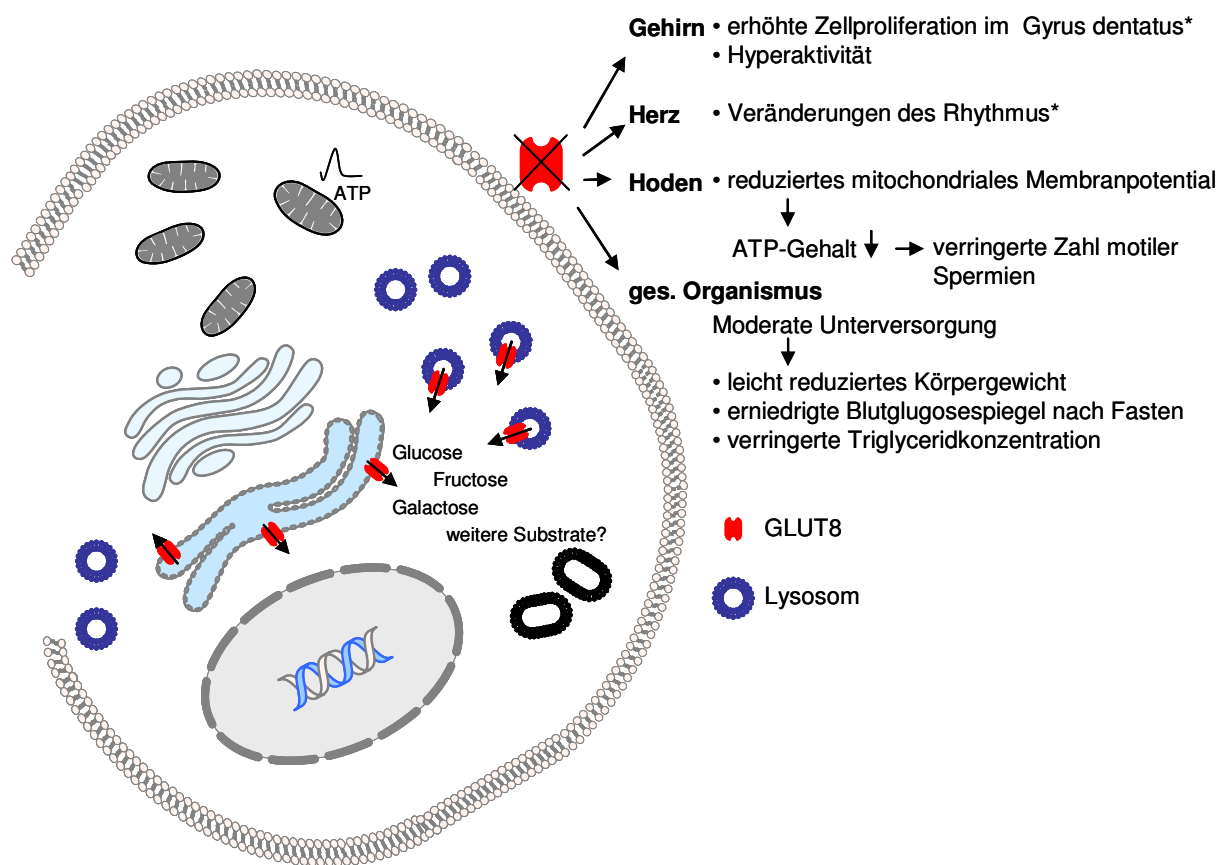


Abb. 5.1. Intrazelluläre Lokalisation von GLUT8 und Phänotyp der *Slc2a8*^{-/-}-Maus.

Zusammenfassung des Phänotyps der *Slc2a8*^{-/-}-Maus in Zusammenhang mit der Lokalisation von GLUT8 in der Zelle. Verändert nach Schmidt *et al.*, 2009b.*Phänotypische Veränderungen in der *Slc2a8*^{-/-}-Maus, die von Membrez *et al.* (2006) identifiziert wurden.

6 Summary

The family of facilitative glucose transporters consists of 14 different members in human, which are divided into three classes (Joost and Thorens, 2001). The class III family member GLUT8 contains an amino-terminal dileucine sorting signal, which is part of the highly conserved [DE]XXXL[LI] motif responsible for the localization of GLUT8 in lysosomes and late endosomes (Augustin *et al.*, 2005). To date there is no stimulus known, which translocates the transporter to the plasma membrane, therefore an intracellular function rather than at the cell surface is considered (Widmer *et al.*, 2005). The aim of the present dissertation was to analyze the intracellular role of GLUT8 in the regulation of whole body glucose homeostasis, by the characterization of the corresponding knockout mice (*Slc2a8*^{-/-}).

Slc2a8^{-/-} mice were viable and showed no obvious disparity to their wild-type littermates. However, analysis of the offspring distribution of heterozygous mating provided a reduced number of born *Slc2a8*^{-/-} offspring which differed significantly from the expected Mendelian distribution. Because *Slc2a8* mRNA is expressed at highest levels in the testis and the female *Slc2a8*^{-/-} mice showed no alterations in fertility, we further investigated the function of *Slc2a8*^{-/-} spermatozoa. An impaired mitochondrial condensation in the *Slc2a8*^{-/-} spermatozoa, which was associated with decreased ATP levels resulted in a reduced number of motile *Slc2a8*^{-/-} sperm, which appeared to be responsible for the reduced number of born *Slc2a8*^{-/-} offspring. Therefore in sperm cells GLUT8 seems to be important for an intracellular transport process, which exerts an influence on the oxidative phosphorylation in the mitochondria.

In the brain *Slc2a8* is expressed at highest levels in the hippocampus, which is important for the regulation of physical activity, exploration behaviour, memory and learning as well as anxiety related behaviour. Additionally, GLUT8 was detected in the hypothalamus, which is amongst others involved in the regulation of food intake. The *Slc2a8*^{-/-} mice showed a significant increase in locomotor activity, which indicates a moderate undersupply of the hippocampus area. According to this finding the group of Membrez *et al.* (2006) observed a raised cell proliferation in the hippocampus of *Slc2a8*^{-/-} mice. The fact that no alterations in food intake and only a moderate reduction in body weight was detected in *Slc2a8*^{-/-} mice, indicates that GLUT8 is not important for the hypothalamic glucose sensing.

The marginal decreased body weight of the *Slc2a8*^{-/-} mice appeared to be associated with a slightly reduced weight of different tissues. Together with the lowered blood glucose concentrations and the apparently enhanced lifespan, the *Slc2a8*^{-/-} mice showed symptoms of a moderate undersupply comparable to caloric restriction. Thus, we hypothesize that

GLUT8 is important for the transport of sugar derivatives which arise during lysosomal/endosomal degradation of glycoproteins. These recycled sugars may serve as an additional energy source in the cell.

7 Abbildungsverzeichnis

	Seite	
Abb. 1.1	Entwicklungsstadien der Keimzellreifung in den Hoden.	6
Abb. 1.2	Aufbau eines Spermatozoon.	8
Abb. 1.3	Generierung des <i>knockout</i> -Konstrukts.	12
Abb. 2.1	Zeitplan der phänotypischen Charakterisierung der <i>Slc2a8</i> ^{-/-} -Mäuse.	36
Abb. 3.1	Nachweis der drei Genotypen <i>Slc2a8</i> ^{+/+} , <i>Slc2a8</i> ^{+/-} und <i>Slc2a8</i> ^{-/-} mittels PCR.	41
Abb. 3.2	Fehlende <i>Slc2a8</i> -mRNA- und GLUT8-Expression in Geweben von <i>Slc2a8</i> ^{-/-} -Mäusen.	42
Abb. 3.3	mRNA-Gehalt verschiedener Glucosetransporter im Hodengewebe von <i>Slc2a8</i> ^{+/+} - und <i>Slc2a8</i> ^{-/-} -Mäusen.	43
Abb. 3.4	Bestimmung der Spermienanzahl und -motilität.	45
Abb. 3.5	Überprüfung der Morphologie der <i>Slc2a8</i> ^{-/-} -Spermien.	46
Abb. 3.6	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Hodenschnitten.	47
Abb. 3.7	Untersuchung der Spermienreifung durch die Färbung des Akrosoms mittels <i>Pisum-sativum</i> -Agglutinin.	48
Abb. 3.8	Untersuchung der Glucoseaufnahme der <i>Slc2a8</i> ^{-/-} -Spermien.	49
Abb. 3.9	Bestimmung des ATP-Gehalts und des mitochondrialen Membranpotentials von <i>Slc2a8</i> ^{+/+} - und <i>Slc2a8</i> ^{-/-} -Spermien.	50
Abb. 3.10	m-RNA Spiegel verschiedener, für die Spermienmotilität wichtiger Gene in Hoden von <i>Slc2a8</i> ^{+/+} - und <i>Slc2a8</i> ^{-/-} -Mäusen.	51
Abb. 3.11	Bestimmung der intrazellulären und der mitochondrialen Kalziumkonzentration von <i>Slc2a8</i> ^{+/+} - und <i>Slc2a8</i> ^{-/-} -Spermien.	52
Abb. 3.12	Analyse des Glykosylierungsmusters von Hodenproteinen der <i>Slc2a8</i> ^{-/-} -Maus.	53
Abb. 3.13	Expression von GLUT8 im Gehirn.	54
Abb. 3.14	Bestimmung der körperlichen Aktivität von <i>Slc2a8</i> ^{+/+} - und <i>Slc2a8</i> ^{-/-} -Mäusen.	55
Abb. 3.15	Glykogenspiegel im Gehirn von 1-2 Tage alten <i>Slc2a8</i> ^{+/+} - und <i>Slc2a8</i> ^{-/-} -Mäusen.	57
Abb. 3.16	Körpergewichtsentwicklung der <i>Slc2a8</i> ^{+/+} - und <i>Slc2a8</i> ^{-/-} -Mäuse unter verschiedenen Diäten.	58
Abb. 3.17	Körperzusammensetzung der <i>Slc2a8</i> ^{+/+} - und <i>Slc2a8</i> ^{-/-} -Mäuse im Alter von 14 Wochen.	59

Abb. 3.18	Untersuchung der Futter- und Wasseraufnahme der <i>Slc2a8^{+/-}</i> - und <i>Slc2a8^{-/-}</i> -Mäuse.	61
Abb. 3.19	Energieumsatz der <i>Slc2a8^{+/-}</i> - und <i>Slc2a8^{-/-}</i> -Mäuse im Alter von sieben Wochen.	62
Abb. 3.20	Bestimmung der Glykogenspiegel in den Lebern von <i>Slc2a8^{+/-}</i> - und <i>Slc2a8^{-/-}</i> -Mäusen.	64
Abb. 3.21	Untersuchung der Plasma-Triglyceridkonzentration der <i>Slc2a8^{+/-}</i> - und <i>Slc2a8^{-/-}</i> -Mäuse im oralen Fettoleranztest.	65
Abb. 3.22	Bestimmung des ATP-Gehalts in Lebern und Quadrizeps von <i>Slc2a8^{+/-}</i> - und <i>Slc2a8^{-/-}</i> -Mäusen.	66
Abb. 5.1	Intrazelluläre Lokalisation von GLUT8 und Phänotyp der <i>Slc2a8^{-/-}</i> -Maus.	85

8 Tabellenverzeichnis

		Seite
Tab. 2.1	Verwendete Mausdiäten.	21
Tab. 2.2	PCR-Protokoll.	23
Tab. 3.1	Verteilung der Genotypen (<i>Slc2a8^{+/+}</i> , <i>Slc2a8^{-/-}</i> , <i>Slc2a8^{+/-}</i>) von insgesamt 714 Nachkommen (F2N3) aus <i>Slc2a8^{+/+}</i> x <i>Slc2a8^{+/-}</i> -Verpaarungen.	44
Tab. 3.2	Bestimmung der Fertilität mittels Analyse der Nachkommen homozygoter Verpaarungen.	44
Tab. 3.3	Messung der Organgewichte von <i>Slc2a8^{+/+}</i> - und <i>Slc2a8^{-/-}</i> -Mäusen.	60
Tab. 3.4	Metabolische Parameter der <i>Slc2a8^{+/+}</i> - und <i>Slc2a8^{-/-}</i> -Mäuse.	63

9 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AgRP	Agouti-verwandtes Protein
AM	Acetoxymethyl
<i>Aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
ARC	<i>Nucleus arcuatus</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
α -MSH	α -Melanozyten-stimulierendes Hormon
bp	Basenpaar(e)
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium-Ion
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CaM	Calmodulin
CaMK	Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase
CART	Kokain- und Amphetamin-reguliertes Transkript
CASA	<i>computer assisted sperm analyzer</i>
CCCP	Carbonyl-Cyanid-3-Chlorophenylhydrazon
cDNA	komplementäre DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cre	<i>causes recombination</i>
CRH	Corticotropin-freisetzendes Hormon
ct	<i>threshold cycle</i>
Cu	Kupfer
Cyt c _T	hodenspezifisches Cytochrom c
d	Tag(e)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat

dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Reticulum
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
<i>et al.</i>	und andere
EtOH	Ethanol
FA	freie Fettsäuren
FTT	Fettoleranztest
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Außendurchmesser
G-1-P	Glycerol-1-Phosphat
GAPDH	Glyceraldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
GAPDH-S	spermienspezifische Glyceraldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
gefloxt	von <i>loxP-sites</i> flankiert
GGT	<i>γ-Glutamyltranspeptidase</i>
GLUT	passiver Glucosetransporter
Glut1-DS	<i>Glut1 deficiency syndrome</i>
GSH-Peroxidase	<i>Glutathionperoxidase</i>
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HFD-1	Hochfettdiät von Altromin
HFD-2	Hochfettdiät von Research Diets
HRP	Meerrettichperoxidase
HSVtk	<i>Herpes simplex-Virus-Thymidinkinasegen</i>
HMIT	Protonen-Myoinositol-Symporter
ICM	innere Zellmasse
IgG	Immunglobulin G

JC-1	5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethylbenzimidazolocarbo cyanin- Iodid
K ⁺	Kalium-Ion
kb	Kilobase(n)
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
<i>ko</i>	<i>knockout</i>
kV	Kilovolt
LH	luteinisierendes Hormon
LHA	lateraler Hypothalamus
LL	Dialanin
loxP	<i>locus of crossing over of P1 recombinase</i>
M	Molarität (mol/l)
mA	Milliampere
MCH	Melaninkonzentrierendes Hormon
mCi	Millicurie
MEF	embryonale Maus-Fibroblasten
MetOH	Methanol
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mHB	<i>modified hole board</i>
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol/l	Millimol pro Liter
MnCl ₂	Manganchlorid
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
N	Anzahl
N	Rückkreuzungsgeneration
N-Terminus	Amino-Terminus

Na ⁺	Natrium-Ion
NaCl	Natriumchlorid
NADH	reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanz
NPY	Neuropeptid Y
ORX	Orexin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	<i>Periodic acid Schiff</i>
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
POMC	Pro-Opiomelanocortin
PSA	<i>Pisum-sativum</i> -Agglutinin
PVN	<i>Nucleus paraventricularis</i>
%	Prozent
q	langer Chromosomenarm
qRT-PCR	quantitative RT-PCR
®	registriertes Warenzeichen
rER	raues endoplasmatisches Reticulum
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	reaktive Sauerstoffintermediate
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>real time</i> PCR
SD-1	Standarddiät von Altromin
SD-2	Standarddiät von Research Diets
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler
SGLT	Natrium-abhängige Glucosetransporter

S-Phase	Interphase
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus Aquaticus</i>
TBS	trisgepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TG	Triglyceride
TRH	Thyrotropin-freisetzendes Hormon
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
™	Trademark
U	Unit
V	Volt
vergl.	vergleiche
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
VMH	ventromedialer Hypothalamus
VMN	<i>Nucleus ventromedialis</i>
W	Watt
ZNS	zentrales Nervensystem

10 Literaturverzeichnis

- Abel, E. D., Peroni, O., Kim, J. K., Kim, Y. B., Boss, O., Hadro, E., Minnemann, T., Shulman, G. I., and Kahn, B. B. (2001). Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 409, 729-33.
- Adam, D. E., and Wei, J. (1975). Mass transport of ATP within the motile sperm. *J Theor Biol* 49, 125-45.
- Aghayan, M., Rao, L. V., Smith, R. M., Jarett, L., Charron, M. J., Thorens, B., and Heyner, S. (1992). Developmental expression and cellular localization of glucose transporter molecules during mouse preimplantation development. *Development* 115, 305-12.
- Aitken, R. J., Nixon, B., Lin, M., Koppers, A. J., Lee, Y. H., and Baker, M. A. (2007). Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Asian J Androl* 9, 554-64.
- Anand, B. K., Chhina, G. S., Sharma, K. N., Dua, S., and Singh, B. (1964). Activity of Single Neurons in the Hypothalamic Feeding Centers: Effect of Glucose. *Am J Physiol* 207, 1146-54.
- Augustin, R., Riley, J., and Moley, K. H. (2005). GLUT8 contains a [DE]XXXL[LI] sorting motif and localizes to a late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic* 6, 1196-212.
- Ausubel, F. M., Brent, R., and Kingstone, R. E. (1995). *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley Interscience, New York.
- Bannerman, D. M., Lemaire, M., Beggs, S., Rawlins, J. N., and Iversen, S. D. (2001). Cytotoxic lesions of the hippocampus increase social investigation but do not impair social-recognition memory. *Exp Brain Res* 138, 100-9.
- Bannerman, D. M., Grubb, M., Deacon, R. M., Yee, B. K., Feldon, J., and Rawlins, J. N. (2003). Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behav Brain Res* 139, 197-213.
- Bardgett, M. E., Boeckman, R., Krochmal, D., Fernando, H., Ahrens, R., and Csernansky, J. G. (2003). NMDA receptor blockade and hippocampal neuronal loss impair fear conditioning and position habit reversal in C57Bl/6 mice. *Brain Res Bull* 60, 131-42.
- Bedford, J. M. (2008). Puzzles of mammalian fertilization--and beyond. *Int J Dev Biol* 52, 415-26.
- Behr, R., Sackett, S. D., Bochkis, I. M., Le, P. P., and Kaestner, K. H. (2007). Impaired male fertility and atrophy of seminiferous tubules caused by haploinsufficiency for Foxa3. *Dev Biol* 306, 636-45.
- Bell, G. I., Kayano, T., Buse, J. B., Burant, C. F., Takeda, J., Lin, D., Fukumoto, H., and Seino, S. (1990). Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* 13, 198-208.
- Bliss, T. V., and Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-9.

- Borg, W. P., During, M. J., Sherwin, R. S., Borg, M. A., Brines, M. L., and Shulman, G. I. (1994). Ventromedial hypothalamic lesions in rats suppress counterregulatory responses to hypoglycemia. *J Clin Invest* 93, 1677-82.
- Bouchard, M. J., Dong, Y., McDermott, B. M., Jr., Lam, D. H., Brown, K. R., Shelanski, M., Bellve, A. R., and Racaniello, V. R. (2000). Defects in nuclear and cytoskeletal morphology and mitochondrial localization in spermatozoa of mice lacking nectin-2, a component of cell-cell adherens junctions. *Mol Cell Biol* 20, 2865-73.
- Bradley, M. P., Geelan, A., Leitch, V., and Goldberg, E. (1996). Cloning, sequencing, and characterization of LDH-C4 from a fox testis cDNA library. *Mol Reprod Dev* 44, 452-9.
- Brady, L. S., Smith, M. A., Gold, P. W., and Herkenham, M. (1990). Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNAs in food-restricted and food-deprived rats. *Neuroendocrinology* 52, 441-7.
- Brown, A. M. (2004). Brain glycogen re-awakened. *J Neurochem* 89, 537-52.
- Burant, C. F., and Davidson, N. O. (1994). GLUT3 glucose transporter isoform in rat testis: localization, effect of diabetes mellitus, and comparison to human testis. *Am J Physiol* 267, R1488-95.
- Butler, A., He, X., Gordon, R. E., Wu, H. S., Gatt, S., and Schuchman, E. H. (2002). Reproductive pathology and sperm physiology in acid sphingomyelinase-deficient mice. *Am J Pathol* 161, 1061-75.
- Campbell, N. A., and Reece, J. B. (2003). *Biologie* (6 ed.). Spektrum Akademischer Verlag, Berlin.
- Carayannopoulos, M. O., Chi, M. M., Cui, Y., Pingsterhaus, J. M., McKnight, R. A., Mueckler, M., Devaskar, S. U., and Moley, K. H. (2000). GLUT8 is a glucose transporter responsible for insulin-stimulated glucose uptake in the blastocyst. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7313-8.
- Carayannopoulos, M. O., Schlein, A., Wyman, A., Chi, M., Keembiyehetty, C., and Moley, K. H. (2004). GLUT9 is differentially expressed and targeted in the preimplantation embryo. *Endocrinology* 145, 1435-43.
- Chalmers, J., Risk, M. T., Kean, D. M., Grant, R., Ashworth, B., and Campbell, I. W. (1991). Severe amnesia after hypoglycemia. Clinical, psychometric, and magnetic resonance imaging correlations. *Diabetes Care* 14, 922-5.
- Charron, M. J., and Katz, E. B. (1998). Metabolic and therapeutic lessons from genetic manipulation of GLUT4. *Mol Cell Biochem* 182, 143-52.
- Cheeseman, C. (2008). GLUT7: a new intestinal facilitated hexose transporter. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E238-41.
- Chi, M. M., Pingsterhaus, J., Carayannopoulos, M., and Moley, K. H. (2000). Decreased glucose transporter expression triggers BAX-dependent apoptosis in the murine blastocyst. *J Biol Chem* 275, 40252-7.
- Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M., and Strober, W. (1995). *Current Protocols in Immunology*. Wiley Interscience, New York.
- Cross, N. L. (1998). Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod* 59, 7-11.

- Doege, H., Schürmann, A., Bahrenberg, G., Brauers, A., and Joost, H. G. (2000). GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *J Biol Chem* 275, 16275-80.
- Doetschman, T., Gregg, R. G., Maeda, N., Hooper, M. L., Melton, D. W., Thompson, S., and Smithies, O. (1987). Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 330, 576-8.
- Drews, U. (2006). *Taschenatlas Embryologie*. Thieme, Stuttgart.
- Escalier, D., and David, G. (1984). Pathology of the cytoskeleton of the human sperm flagellum: axonemal and peri-axonemal anomalies. *Biol Cell* 50, 37-52.
- Ferré, P., Decaux, J. F., Issad, T., and Girard, J. (1986). Changes in energy metabolism during the suckling and weaning period in the newborn. *Reprod Nutr Dev* 26, 619-31.
- Fisher, H. M., and Aitken, R. J. (1997). Comparative analysis of the ability of precursor germ cells and epididymal spermatozoa to generate reactive oxygen metabolites. *J Exp Zool* 277, 390-400.
- Flesch, F. M., and Gadella, B. M. (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta* 1469, 197-235.
- Ford, W. C., and Harrison, A. (1985). The presence of glucose increases the lethal effect of alpha-chlorohydrin on ram and boar spermatozoa in vitro. *J Reprod Fertil* 73, 197-206.
- Ford, W. C., and Harrison, A. (1986). The concerted effect of alpha-chlorohydrin and glucose on the ATP concentration in spermatozoa is associated with the accumulation of glycolytic intermediates. *J Reprod Fertil* 77, 537-45.
- Ford, W. C. (2006). Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? *Hum Reprod Update* 12, 269-74.
- Fraser, L. R., and Quinn, P. J. (1981). A glycolytic product is obligatory for initiation of the sperm acrosome reaction and whiplash motility required for fertilization in the mouse. *J Reprod Fertil* 61, 25-35.
- Ganguly, A., McKnight, R. A., Raychaudhuri, S., Shin, B. C., Ma, Z., Moley, K., and Devaskar, S. U. (2007). Glucose transporter isoform-3 mutations cause early pregnancy loss and fetal growth restriction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292, E1241-55.
- Gardner, D. K., and Leese, H. J. (1986). Non-invasive measurement of nutrient uptake by single cultured pre-implantation mouse embryos. *Hum Reprod* 1, 25-7.
- Gawlik, V., Schmidt, S., Scheepers, A., Wennemuth, G., Augustin, R., Aumuller, G., Moser, M., Al-Hasani, H., Kluge, R., Joost, H. G., and Schürmann, A. (2008). Targeted disruption of *Slc2a8* (GLUT8) reduces motility and mitochondrial potential of spermatozoa. *Mol Membr Biol* 25, 224-35.
- Goddyn, H., Leo, S., Meert, T., and D'Hooge, R. (2006). Differences in behavioural test battery performance between mice with hippocampal and cerebellar lesions. *Behav Brain Res* 173, 138-47.
- Gomez, O., Romero, A., Terrado, J., and Mesonero, J. E. (2006). Differential expression of glucose transporter GLUT8 during mouse spermatogenesis. *Reproduction* 131, 63-70.

- Gordon, J. W., Scangos, G. A., Plotkin, D. J., Barbosa, J. A., and Ruddle, F. H. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 7380-4.
- Gould, G. W., and Holman, G. D. (1993). The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem J* 295 (Pt 2), 329-41.
- Guillam, M. T., Hummler, E., Schaerer, E., Yeh, J. I., Birnbaum, M. J., Beermann, F., Schmidt, A., Deriaz, N., and Thorens, B. (1997). Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islet development in mice lacking Glut-2. *Nat Genet* 17, 327-30.
- Haber, R. S., Weinstein, S. P., O'Boyle, E., and Morgello, S. (1993). Tissue distribution of the human GLUT3 glucose transporter. *Endocrinology* 132, 2538-43.
- Hart, R. W., and Turturro, A. (1998). Evolution and dietary restriction. *Exp Gerontol* 33, 53-60.
- Ho, H. C., Granish, K. A., and Suarez, S. S. (2002). Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca²⁺ and not cAMP. *Dev Biol* 250, 208-17.
- Ho, H. C., and Suarez, S. S. (2003). Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biol Reprod* 68, 1590-6.
- Hogan, A., Heyner, S., Charron, M. J., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Thorens, B., and Schultz, G. A. (1991). Glucose transporter gene expression in early mouse embryos. *Development* 113, 363-72.
- Honey, R. C., Marshall, V. J., McGregor, A., Futter, J., and Good, M. (2007). Revisiting places passed: sensitization of exploratory activity in rats with hippocampal lesions. *Q J Exp Psychol (Colchester)* 60, 625-34.
- Hoppe, P. C. (1976). Glucose requirement for mouse sperm capacitation in vitro. *Biol Reprod* 15, 39-45.
- Ibberson, M., Uldry, M., and Thorens, B. (2000). GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *J Biol Chem* 275, 4607-12.
- Ibberson, M., Riederer, B. M., Uldry, M., Guhl, B., Roth, J., and Thorens, B. (2002). Immunolocalization of GLUTX1 in the testis and to specific brain areas and vasopressin-containing neurons. *Endocrinology* 143, 276-84.
- Joost, H. G., and 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, 247-56.
- Kahn, B. B. (1992). Facilitative glucose transporters: regulatory mechanisms and dysregulation in diabetes. *J Clin Invest* 89, 1367-74.
- Kaiser, N., Leibowitz, G., and Nesher, R. (2003). Glucotoxicity and beta-cell failure in type 2 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab* 16, 5-22.
- Katz, E. B., Stenbit, A. E., Hatton, K., DePinho, R., and Charron, M. J. (1995). Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4. *Nature* 377, 151-5.

- Keck, C., Neulen, J., Behre, H., and Breckwoldt, M. (2002). *Endokrinologie Reproduktionsmedizin Andrologie* (2 ed.). Thieme, Stuttgart.
- Kim, J. K., Zisman, A., Fillmore, J. J., Peroni, O. D., Kotani, K., Perret, P., Zong, H., Dong, J., Kahn, C. R., Kahn, B. B., and Shulman, G.I. (2001). Glucose toxicity and the development of diabetes in mice with muscle-specific inactivation of GLUT4. *J Clin Invest* 108, 153-60.
- Kim, S.T., and Moley, K. H. (2007). The expression of GLUT8, GLUT9a, and GLUT9b in the mouse testis and sperm. *Reprod Sci* 14, 445-55.
- Kokk, K., Veräjänkorka, E., Wu, X. K., Tapfer, H., Poldoja, E., and Pöllänen, P. (2004). Immunohistochemical detection of glucose transporters class I subfamily in the mouse, rat and human testis. *Medicina* 40, 156-60.
- Koski, K. G., Lanoue, L., and Young, S. N. (1993). Restriction of maternal dietary carbohydrate decreases fetal brain indoles and glycogen in rats. *J Nutr* 123, 42-51.
- Kotani, K., Peroni, O. D., Minokoshi, Y., Boss, O., and Kahn, B. B. (2004). GLUT4 glucose transporter deficiency increases hepatic lipid production and peripheral lipid utilization. *J Clin Invest* 114, 1666-75.
- Kuehn, M. R., Bradley, A., Robertson, E. J., and Evans, M. J. (1987). A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. *Nature* 326, 295-8.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5
- Lakso, M., Sauer, B., Mosinger, B., Jr., Lee, E. J., Manning, R. W., Yu, S. H., Mulder, K. L., and Westphal, H. (1992). Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6232-6.
- Lalouette, A., Lablack, A., Guenet, J. L., Montagutelli, X., and Segretain, D. (1996). Male sterility caused by sperm cell-specific structural abnormalities in ebouriffe, a new mutation of the house mouse. *Biol Reprod* 55, 355-63.
- Leese, H. J., and Barton, A. M. (1984). Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *J Reprod Fertil* 72, 9-13.
- Leibowitz, S. F., Roossin, P., and Rosenn, M. (1984). Chronic norepinephrine injection into the hypothalamic paraventricular nucleus produces hyperphagia and increased body weight in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 21, 801-8.
- Leloup, C., Arluison, M., Lepetit, N., Cartier, N., Marfaing-Jallat, P., Ferré, P., and Pénicaud, L. (1994). Glucose transporter 2 (GLUT 2): expression in specific brain nuclei. *Brain Res* 638, 221-6.
- Levin, B. E. (2006). Metabolic sensing neurons and the control of energy homeostasis. *Physiol Behav* 89, 486-9.
- Lisinski, I., Schürmann, A., Joost, H. G., Cushman, S. W., and Al-Hasani, H. (2001). Targeting of GLUT6 (formerly GLUT9) and GLUT8 in rat adipose cells. *Biochem J* 358, 517-22.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-8.

- Marchetti, C., Obert, G., Deffosez, A., Formstecher, P., and Marchetti, P. (2002). Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum Reprod* 17, 1257-65.
- Marchetti, C., Jouy, N., Leroy-Martin, B., Defossez, A., Formstecher, P., and Marchetti, P. (2004). Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. *Hum Reprod* 19, 2267-76.
- Marin-Briggiler, C. I., Jha, K. N., Chertihin, O., Buffone, M. G., Herr, J. C., Vazquez-Levin, M. H., and Visconti, P. E. (2005). Evidence of the presence of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV in human sperm and its involvement in motility regulation. *J Cell Sci* 118, 2013-22.
- Markey, C. M., Rudolph, D. B., Labus, J. C., and Hinton, B. T. (1998). Oxidative stress differentially regulates the expression of gamma-glutamyl transpeptidase mRNAs in the initial segment of the rat epididymis. *J Androl* 19, 92-9.
- Martin, B., Golden, E., Egan, J. M., Mattson, M. P., and Maudsley, S. (2007). Reduced energy intake: the secret to a long and healthy life? *IBS J Sci* 2, 35-39.
- McCall, A. L., Van Bueren, A. M., Moholt-Siebert, M., Cherry, N. J., and Woodward, W. R. (1994). Immunohistochemical localization of the neuron-specific glucose transporter (GLUT3) to neuropil in adult rat brain. *Brain Res* 659, 292-7.
- McCay, C. M., Crowell, M. F., and Maynard, L. A. (1989). The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935. *Nutrition* 5, 155-71; discussion 172.
- McEwen, B. S., and Reagan, L. P. (2004). Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *Eur J Pharmacol* 490, 13-24.
- McLean, D. J., Jones, L. G., Jr., and Froman, D. P. (1997). Reduced glucose transport in sperm from roosters (*Gallus domesticus*) with heritable subfertility. *Biol Reprod* 57, 791-5.
- Membrez, M., Hummler, E., Beermann, F., Haefliger, J. A., Savioz, R., Pedrazzini, T., and Thorens, B. (2006). GLUT8 is dispensable for embryonic development but influences hippocampal neurogenesis and heart function. *Mol Cell Biol* 26, 4268-76.
- Miki, K., Qu, W., Goulding, E. H., Willis, W. D., Bunch, D. O., Strader, L. F., Perreault, S. D., Eddy, E. M., and O'Brien, D. A. (2004). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16501-6.
- Miki, K. (2007). Energy metabolism and sperm function. *Soc Reprod Fertil Suppl* 65, 309-25.
- Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S. A., Panico, M., Blench, I., Morris, H. R., Allard, W. J., Lienhard, G. E., and Lodish, H. F. (1985). Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 229, 941-5.
- Mueckler, M., and Makepeace, C. (2006). Transmembrane segment 12 of the Glut1 glucose transporter is an outer helix and is not directly involved in the transport mechanism. *J Biol Chem* 281, 36993-8.
- Mukai, C., and Okuno, M. (2004). Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol Reprod* 71, 540-7.

- Nakada, K., Sato, A., Yoshida, K., Morita, T., Tanaka, H., Inoue, S., Yonekawa, H., and Hayashi, J. (2006). Mitochondria-related male infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15148-53.
- Nakazawa, K., Quirk, M. C., Chitwood, R. A., Watanabe, M., Yeckel, M. F., Sun, L. D., Kato, A., Carr, C. A., Johnston, D., Wilson, M. A., and Tonegawa, S. (2002). Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. *Science* 297, 211-8.
- Narisawa, S., Hecht, N. B., Goldberg, E., Boatright, K. M., Reed, J. C., and Millan, J. L. (2002). Testis-specific cytochrome c-null mice produce functional sperm but undergo early testicular atrophy. *Mol Cell Biol* 22, 5554-62.
- Nelson, S. R., Schulz, D. W., Passonneau, J. V., and Lowry, O. H. (1968). Control of glycogen levels in brain. *J Neurochem* 15, 1271-9.
- Nevo, A. C., and Rikmenspoel, R. (1970). Diffusion of ATP in sperm flagella. *J Theor Biol* 26, 11-8.
- Ng, T., Graham, D. I., Adams, J. H., and Ford, I. (1989). Changes in the hippocampus and the cerebellum resulting from hypoxic insults: frequency and distribution. *Acta Neuropathol* 78, 438-43.
- Ohl, F., Holsboer, F., and Landgraf, R. (2001). The modified hole board as a differential screen for behavior in rodents. *Behav Res Methods Instrum Comput* 33, 392-7.
- Ohtsuki, S., Kikkawa, T., Hori, S., and Terasaki, T. (2006). Modulation and compensation of the mRNA expression of energy related transporters in the brain of glucose transporter 1-deficient mice. *Biol Pharm Bull* 29, 1587-91.
- Okunade, G. W., Miller, M. L., Pyne, G. J., Sutliff, R. L., O'Connor, K. T., Neumann, J. C., Andringa, A., Miller, D. A., Prasad, V., Doetschman, T., Paul, R. J., and Shull, G. E. (2004). Targeted ablation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4. *J Biol Chem* 279, 33742-50.
- Oliva, R., de Mateo, S., and Estanyol, J. M. (2009). Sperm cell proteomics. *Proteomics* 9, 1004-17.
- Orban, P. C., Chui, D., and Marth, J. D. (1992). Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6861-5.
- Pantaleon, M., Harvey, M. B., Pascoe, W. S., James, D. E., and Kaye, P. L. (1997). Glucose transporter GLUT3: ontogeny, targeting, and role in the mouse blastocyst. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3795-800.
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., and First, N. L. (1989). Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol Reprod* 41, 683-99.
- Perl, A., Qian, Y., Chohan, K. R., Shirley, C. R., Amidon, W., Banerjee, S., Middleton, F. A., Conkrite, K. L., Barcza, M., Gonchoroff, N., Suarez, S. S., and Banki, K. (2006). Transaldolase is essential for maintenance of the mitochondrial transmembrane potential and fertility of spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 14813-8.
- Petersen, C., and Söder, O. (2006). The sertoli cell—a hormonal target and ‘super’ nurse for germ cells that determines testicular size. *Horm Res* 66, 153-61.

- Pinto, A. B., Carayannopoulos, M. O., Hoehn, A., Dowd, L., and Moley, K. H. (2002). Glucose transporter 8 expression and translocation are critical for murine blastocyst survival. *Biol Reprod* 66, 1729-33.
- Piroli, G. G., Grillo, C. A., Hoskin, E. K., Znamensky, V., Katz, E. B., Milner, T. A., McEwen, B. S., Charron, M. J., and Reagan, L. P. (2002). Peripheral glucose administration stimulates the translocation of GLUT8 glucose transporter to the endoplasmic reticulum in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 452, 103-14.
- Ragozzino, M. E., Pal, S. N., Unick, K., Stefani, M. R., and Gold, P. E. (1998). Modulation of hippocampal acetylcholine release and spontaneous alternation scores by intrahippocampal glucose injections. *J Neurosci* 18, 1595-601.
- Ramalho-Santos, J., Moreno, R. D., Wessel, G. M., Chan, E. K., and Schatten, G. (2001). Membrane trafficking machinery components associated with the mammalian acrosome during spermiogenesis. *Exp Cell Res* 267, 45-60.
- Reagan, L. P., Gorovits, N., Hoskin, E. K., Alves, S. E., Katz, E. B., Grillo, C. A., Piroli, G. G., McEwen, B. S., and Charron, M. J. (2001). Localization and regulation of GLUTx1 glucose transporter in the hippocampus of streptozotocin diabetic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2820-5.
- Redkar, A. A., and Olds-Clarke, P. J. (1999). An improved mouse sperm-oocyte plasmalemma binding assay: studies on characteristics of sperm binding in medium with or without glucose. *J Androl* 20, 500-8.
- Rojek, A., Praetorius, J., Frokiaer, J., Nielsen, S., and Fenton, R. A. (2008). A current view of the mammalian aquaglyceroporins. *Annu Rev Physiol* 70, 301-27.
- Romero, A., Gomez, O., Terrado, J., and Mesonero, J. E. (2009). Expression of GLUT8 in mouse intestine: Identification of alternative spliced variants. *J Cell Biochem*
- Rutter, G. A. (2001). Nutrient-secretion coupling in the pancreatic islet beta-cell: recent advances. *Mol Aspects Med* 22, 247-84.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-4.
- Salway, J. G. (2000). *Routenplaner Stoffwechsel*. Thieme, Stuttgart.
- Sandoval, I. V., Martinez-Arca, S., Valdueza, J., Palacios, S., and Holman, G. D. (2000). Distinct reading of different structural determinants modulates the dileucine-mediated transport steps of the lysosomal membrane protein LIMP2 and the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4. *J Biol Chem* 275, 39874-85.
- Sankar, R., Thamocharan, S., Shin, D., Moley, K. H., and Devaskar, S. U. (2002). Insulin-responsive glucose transporters-GLUT8 and GLUT4 are expressed in the developing mammalian brain. *Brain Res Mol Brain Res* 107, 157-65.
- Sato, M., and Mueckler, M. (1999). A conserved amino acid motif (R-X-G-R-R) in the Glut1 glucose transporter is an important determinant of membrane topology. *J Biol Chem* 274, 24721-5.

- Scheepers, A., Doege, H., Joost, H. G., and Schürmann, A. (2001). Mouse GLUT8: genomic organization and regulation of expression in 3T3-L1 adipocytes by glucose. *Biochem Biophys Res Commun* 288, 969-74.
- Scheepers, A. (2003). Charakterisierung der genomischen Organisation, Expression und Funktion der Glucosetransporter GLUT8 und GLUT11, Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Abteilung Pharmakologie, Universität Potsdam, Potsdam.
- Scheepers, A., Joost, H. G., and Schürmann, A. (2004). The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 28, 364-71.
- Schmidt, R. F., Thews, G., and Lang, F. (2000). *Physiologie des Menschen* (28 ed.). Springer-Verlag, Berlin.
- Schmidt, S. (2007). Die Rolle von Glucosetransportern der GLUT-Familie für die Glucosehomöostase und als Glucosensoren, Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Abteilung Pharmakologie, Universität Potsdam, Potsdam.
- Schmidt, S., Richter, M., Montag, D., Sartorius, T., Gawlik, V., Hennige, A. M., Scherneck, S., Himmelbauer, H., Lutz, S. Z., Augustin, R., Kluge, R., Ruth, P., Joost, H. G., and Schürmann, A. (2008a). Neuronal functions, feeding behavior, and energy balance in *Slc2a3*^{+/-} mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E1084-94.
- Schmidt, S., Gawlik, V., Holter, S. M., Augustin, R., Scheepers, A., Behrens, M., Wurst, W., Gailus-Durner, V., Fuchs, H., Hrabe de Angelis, M., Kluge, R., Joost, H. G., and Schürmann, A. (2008b). Deletion of glucose transporter GLUT8 in mice increases locomotor activity. *Behav Genet* 38, 396-406.
- Schmidt, S., Hommel, A., Gawlik, V., Augustin, R., Junicke, N., Florian, S., Richter, M., Walther, D. J., Montag, D., Joost, H. G., and Schürmann, A. (2009a). Essential role of glucose transporter GLUT3 for post-implantation embryonic development. *J Endocrinol* 200, 23-33.
- Schmidt, S., Joost, H. G., and Schürmann, A. (2009b). GLUT8, the enigmatic intracellular hexose transporter. *Am J Physiol Endocrinol Metab*
- Schmidt, U., Briese, S., Leicht, K., Schürmann, A., Joost, H. G., and Al-Hasani, H. (2006). Endocytosis of the glucose transporter GLUT8 is mediated by interaction of a dileucine motif with the beta2-adaptin subunit of the AP-2 adaptor complex. *J Cell Sci* 119, 2321-31.
- Schröter, S., Osterhoff, C., McArdle, W., and Ivell, R. (1999). The glycocalyx of the sperm surface. *Hum Reprod Update* 5, 302-13.
- Schürmann, A., Keller, K., Monden, I., Brown, F. M., Wandel, S., Shanahan, M. F., and Joost, H. G. (1993). Glucose transport activity and photolabelling with 3-[¹²⁵I]iodo-4-azidophenethylamido-7-O-succinyldeacetyl (IAPS)-forskolin of two mutants at tryptophan-388 and -412 of the glucose transporter GLUT1: dissociation of the binding domains of forskolin and glucose. *Biochem J* 290 (Pt 2), 497-501.
- Schürmann, A., Doege, H., Ohnimus, H., Monser, V., Buchs, A., and Joost, H. G. (1997). Role of conserved arginine and glutamate residues on the cytosolic surface of glucose transporters for transporter function. *Biochemistry* 36, 12897-902.

- Schürmann, A., Axer, H., Scheepers, A., Doege, H., and Joost, H. G. (2002a). The glucose transport facilitator GLUT8 is predominantly associated with the acrosomal region of mature spermatozoa. *Cell Tissue Res* 307, 237-42.
- Schürmann, A., Koling, S., Jacobs, S., Saftig, P., Krauss, S., Wennemuth, G., Kluge, R., and Joost, H. G. (2002b). Reduced sperm count and normal fertility in male mice with targeted disruption of the ADP-ribosylation factor-like 4 (Arl4) gene. *Mol Cell Biol* 22, 2761-8.
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Jr., Seeley, R. J., and Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661-71.
- Shin, B. C., McKnight, R. A., and Devaskar, S. U. (2004). Glucose transporter GLUT8 translocation in neurons is not insulin responsive. *J Neurosci Res* 75, 835-44.
- Si, Y., and Olds-Clarke, P. (2000). Evidence for the involvement of calmodulin in mouse sperm capacitation. *Biol Reprod* 62, 1231-9.
- Simpson, I. A., Dwyer, D., Malide, D., Moley, K. H., Travis, A., and Vannucci, S. J. (2008). The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E242-53.
- Srinivas, S. R., Gopal, E., Zhuang, L., Itagaki, S., Martin, P. M., Fei, Y. J., Ganapathy, V., and Prasad, P. D. (2005). Cloning and functional identification of slc5a12 as a sodium-coupled low-affinity transporter for monocarboxylates (SMCT2). *Biochem J* 392, 655-64.
- Stanford, W. L., Cohn, J. B., and Cordes, S. P. (2001). Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. *Nat Rev Genet* 2, 756-68.
- Stenbit, A. E., Tsao, T. S., Li, J., Burcelin, R., Geenen, D. L., Factor, S. M., Houseknecht, K., Katz, E. B., and Charron, M. J. (1997). GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. *Nat Med* 3, 1096-101.
- Suarez, S. S., Varosi, S. M., and Dai, X. (1993). Intracellular calcium increases with hyperactivation in intact, moving hamster sperm and oscillates with the flagellar beat cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4660-4.
- Tanaka, H., Takahashi, T., Iguchi, N., Kitamura, K., Miyagawa, Y., Tsujimura, A., Matsumiya, K., Okuyama, A., and Nishimune, Y. (2004). Ketone bodies could support the motility but not the acrosome reaction of mouse sperm. *Int J Androl* 27, 172-7.
- Thomas, K. R., and Capecchi, M. R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51, 503-12.
- Thorens, B., Guillam, M. T., Beermann, F., Burcelin, R., and Jaquet, M. (2000). Transgenic reexpression of GLUT1 or GLUT2 in pancreatic beta cells rescues GLUT2-null mice from early death and restores normal glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* 275, 23751-8.
- Tokunaga, K., Fukushima, M., Kemnitz, J. W., and Bray, G. A. (1986). Comparison of ventromedial and paraventricular lesions in rats that become obese. *Am J Physiol* 251, R1221-7.
- Tombes, R. M., and Shapiro, B. M. (1987). Enzyme termini of a phosphocreatine shuttle. Purification and characterization of two creatine kinase isozymes from sea urchin sperm. *J Biol Chem* 262, 16011-9.

- Tonack, S., Fischer, B., and Navarrete Santos, A. (2004). Expression of the insulin-responsive glucose transporter isoform 4 in blastocysts of C57/BL6 mice. *Anat Embryol (Berl)* 208, 225-30.
- Toshimori, K. (2003). Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. *Microsc Res Tech* 61, 1-6.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4
- Travis, A. J., Foster, J. A., Rosenbaum, N. A., Visconti, P. E., Gerton, G. L., Kopf, G. S., and Moss, S. B. (1998). Targeting of a germ cell-specific type 1 hexokinase lacking a porin-binding domain to the mitochondria as well as to the head and fibrous sheath of murine spermatozoa. *Mol Biol Cell* 9, 263-76.
- Travis, A. J., Tutuncu, L., Jorgez, C. J., Ord, T. S., Jones, B. H., Kopf, G. S., and Williams, C. J. (2004). Requirements for glucose beyond sperm capacitation during in vitro fertilization in the mouse. *Biol Reprod* 71, 139-45.
- Tsujii, S., and Bray, G. A. (1989). Acetylation alters the feeding response to MSH and beta-endorphin. *Brain Res Bull* 23, 165-9.
- Turner, R. M. (2006). Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod Fertil Dev* 18, 25-38.
- Urner, F., and Sakkas, D. (1999). A possible role for the pentose phosphate pathway of spermatozoa in gamete fusion in the mouse. *Biol Reprod* 60, 733-9.
- Urner, F., Leppens-Luisier, G., and Sakkas, D. (2001). Protein tyrosine phosphorylation in sperm during gamete interaction in the mouse: the influence of glucose. *Biol Reprod* 64, 1350-7.
- Visconti, P. E., Bailey, J. L., Moore, G. D., Pan, D., Olds-Clarke, P., and Kopf, G. S. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121, 1129-37.
- Visconti, P. E., and Kopf, G. S. (1998). Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* 59, 1-6.
- Walker, M. J., Rylett, C. M., Keen, J. N., Audsley, N., Sajid, M., Shirras, A. D., and Isaac, R. E. (2006). Proteomic identification of *Drosophila melanogaster* male accessory gland proteins, including a pro-cathepsin and a soluble gamma-glutamyl transpeptidase. *Proteome Sci* 4, 9.
- Wandel S., Schürmann, A., Becker, W., Summers, S. A., Shanahan, M. F., and Joost, H. G. (1994). Substitution of conserved tyrosine residues in helix 4 (Y143) and 7 (Y293) affects the activity, but not IAPS-forskolin binding, of the glucose transporter GLUT4. *FEBS Lett* 348, 114-8.
- Wang, D., Pascual, J. M., Yang, H., Engelstad, K., Mao, X., Cheng, J., Yoo, J., Noebels, J. L., and De Vivo, D. C. (2006). A mouse model for Glut-1 haploinsufficiency. *Hum Mol Genet* 15, 1169-79.
- Weindruch, R., and Sohal, R. S. (1997). Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Caloric intake and aging. *N Engl J Med* 337, 986-94.

- Weir, J. B. (1949). New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *J Physiol* 109, 1-9.
- Westhoff, D., and Kamp, G. (1997). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is bound to the fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *J Cell Sci* 110 (Pt 15), 1821-9.
- Widmer, M., Uldry, M., and Thorens, B. (2005). GLUT8 subcellular localization and absence of translocation to the plasma membrane in PC12 cells and hippocampal neurons. *Endocrinology* 146, 4727-36.
- Wood, I. S., and Trayhurn, P. (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* 89, 3-9.
- Wright, E. M., Hirayama, B. A., and Loo, D. F. (2007). Active sugar transport in health and disease. *J Intern Med* 261, 32-43.
- Xu, X., Li, C., Garrett-Beal, L., Larson, D., Wynshaw-Boris, A., and Deng, C. X. (2001). Direct removal in the mouse of a floxed neo gene from a three-loxP conditional knockout allele by two novel approaches. *Genesis* 30, 1-6.
- Yanagimachi, R. (2009). Germ cell research: a personal perspective. *Biol Reprod* 80, 204-18.
- Yildiz, Y., Matern, H., Thompson, B., Allegood, J. C., Warren, R. L., Ramirez, D. M., Hammer, R. E., Hamra, F. K., Matern, S., and Russell, D. W. (2006). Mutation of beta-glucosidase 2 causes glycolipid storage disease and impaired male fertility. *J Clin Invest* 116, 2985-94.
- Zeng, H. T., and Tulsiani, D. R. (2003). Calmodulin antagonists differentially affect capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation of mouse sperm components. *J Cell Sci* 116, 1981-9.
- Zhou, Y., Kaye, P. L., and Pantaleon, M. (2004). Identification of the facilitative glucose transporter 12 gene *Glut12* in mouse preimplantation embryos. *Gene Expr Patterns* 4, 621-31.
- Zisman, A., Peroni, O. D., Abel, E. D., Michael, M. D., Mauvais-Jarvis, F., Lowell, B. B., Wojtaszewski, J. F., Hirshman, M. F., Virkamaki, A., Goodyear, L. J., Kahn, C. R., and Kahn, B. B. (2000). Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat Med* 6, 924-8.

11 Anhang

Slc2a8-mRNA-Expression [$2^{-\Delta\Delta C_t}$] in verschiedenen Geweben von *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen (Werte zu Abb. 3.2A)

Genotyp	Muskel	weißes Fett	Leber	Hoden	Gehirn
<i>Slc2a8</i> ^{+/+}	3.863,6 ± 612	156,5 ± 20	1.308,0 ± 145	5.385,3 ± 1020	1.889,0 ± 421
<i>Slc2a8</i> ^{-/-}	24,0 ± 5	0,1 ± 0,01	3,34 ± 1	0,9 ± 0,2	4,2 ± 1,7

Rel. mRNA-Expression verschiedener Glucosetransporter im Hodengewebe von *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen (Abb. 3.3)

Genotyp	<i>Slc2a8</i>	<i>Slc2a1</i>	<i>Slc2a3</i>	<i>Slc2a5</i>	<i>Slc2a6</i>
<i>Slc2a8</i> ^{+/+}	1,14 ± 0,2	1,01 ± 0,06	1,01 ± 0,06	1,06 ± 0,05	1,03 ± 0,1
<i>Slc2a8</i> ^{-/-}	0	0,94 ± 0,08	0,94 ± 0,05	0,76 ± 0,14	0,9 ± 0,07

Spermienanzahl und -motilität von *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen (Abb. 3.4)

Genotyp	Spermienanzahl x10 ⁶ /ml	% motile Spermien	% lebende Spermien
<i>Slc2a8</i> ^{+/+}	8,78 ± 1,4	60,25 ± 2,1	33,48 ± 9,8
<i>Slc2a8</i> ^{-/-}	7,26 ± 1,5	31,0 ± 7,8	31,89 ± 5,7

Glucoseaufnahme der *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Spermien (Abb. 3.8)

Genotyp	[14C]-DOG-Aufnahme nmol/min/10 ⁶ Spermien
<i>Slc2a8</i> ^{+/+}	0,089 ± 0,01
<i>Slc2a8</i> ^{-/-}	0,088 ± 0,01

ATP-Gehalt und mitochondriales Membranpotential von *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Spermien (Abb. 3.9)

Genotyp	µM ATP/µg Protein	% mit JC-1 rot gefärbte Spermien
<i>Slc2a8</i> ^{+/+}	0,78 ± 0,15	70,06 ± 4,1
<i>Slc2a8</i> ^{-/-}	0,39 ± 0,11	48,29 ± 7,3

Rel. m-RNA-Expression verschiedener für die Spermienmotilität wichtiger Gene in Hoden von *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen (Abb. 3.10)

Genotyp	<i>Gapdh-S</i>	<i>Calmodulin</i>	<i>GGT</i>	<i>GSH-Peroxidase</i>
<i>Slc2a8</i> ^{+/+}	1,01 ± 0,05	1,03 ± 0,11	1,04 ± 0,13	1,01 ± 0,06
<i>Slc2a8</i> ^{-/-}	1,03 ± 0,03	0,85 ± 0,03	1,12 ± 0,08	0,99 ± 0,03

Intrazelluläre und mitochondriale Kalziumkonzentration von *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Spermien (Abb. 3.11)

Genotyp	% Fluo3 gefärbte Spermien	% Rhod2 gefärbte Spermien
<i>Slc2a8</i> ^{+/+}	50,85 ± 2,3	54,89 ± 1,9
<i>Slc2a8</i> ^{-/-}	48,58 ± 3,4	51,68 ± 1,8

Slc2a8-Expression [$2^{-\Delta\Delta Ct}$] in verschiedenen Gehirnregionen von *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen (Abb. 3.13)

Genotyp	Amygdala	Hippocampus	Hypothalamus
<i>Slc2a8</i> ^{+/+}	2.015,6 ± 32	1.621,9 ± 154	2.831,5 ± 22
<i>Slc2a8</i> ^{-/-}	1,27 ± 0,5	0,31 ± 0,06	0,48 ± 0,1

Körperliche Aktivität der *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse (Abb. 3.14)

Genotyp	IR-MOT Impulse/h			Laufрад Meter/h		
	24h	Tag	Nacht	24h	Tag	Nacht
<i>Slc2a8</i> ^{+/+}	25.739,9 ± 629	6.580,8 ± 398	44.975,5 ± 1.387	24,11 ± 2,8	2,25 ± 0,3	45,97 ± 5,6
<i>Slc2a8</i> ^{-/-}	31.493,7 ± 1.745	5.509,1 ± 881	57.478,3 ± 3.607	49,22 ± 4,6	2,99 ± 0,9	95,45 ± 9,7

Glykogenspiegel im Gehirn von 1-2 Tage alten *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäusen (Abb. 3.15)

Genotyp	Glucose aus Glykogen mg/dL/50mg Gehirn
<i>Slc2a8</i> ^{+/+}	11,20 ± 0,7
<i>Slc2a8</i> ^{-/-}	12,76 ± 1,0

Körpergewichtsentwicklung der *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse (Abb. 3.16)

N3 SD-1

Genotyp	LW 5	LW 6	LW 7	LW 8	LW 9	LW 10	LW 11	LW 12
<i>Slc2a8</i> ^{+/+}	18,00 ± 0,4 g	20,16 ± 0,4 g	21,84 ± 0,5 g	23,00 ± 0,5 g	24,32 ± 0,6 g	25,19 ± 0,7 g	26,28 ± 0,7 g	27,34 ± 0,6 g
<i>Slc2a8</i> ^{-/-}	18,01 ± 0,5 g	20,11 ± 0,5 g	21,67 ± 0,5 g	22,66 ± 0,5 g	23,76 ± 0,6 g	24,69 ± 0,7 g	25,86 ± 0,8 g	26,74 ± 0,6 g

Genotyp	LW 13	LW 14	LW 15
<i>Slc2a8</i> ^{+/+}	27,63 ± 0,6 g	28,41 ± 0,6 g	29,00 ± 0,6 g
<i>Slc2a8</i> ^{-/-}	27,30 ± 0,6 g	27,99 ± 0,6 g	28,42 ± 0,6 g

N3 HFD-1

Genotyp	LW 5	LW 6	LW 7	LW 8	LW 9	LW 10	LW 11	LW 12
<i>Slc2a8</i> ^{+/+}	18,30 ± 0,4 g	21,05 ± 0,3 g	22,31 ± 0,3 g	24,98 ± 0,3 g	26,07 ± 0,3 g	26,94 ± 0,3 g	28,26 ± 0,3 g	28,74 ± 0,3 g
<i>Slc2a8</i> ^{-/-}	17,66 ± 0,5 g	20,55 ± 0,4 g	22,87 ± 0,4 g	24,07 ± 0,5 g	25,14 ± 0,5 g	26,12 ± 0,5 g	27,29 ± 0,5 g	27,36 ± 0,4 g

Genotyp	LW 13	LW 14	LW 15
<i>Slc2a8</i> ^{+/+}	29,45 ± 0,3 g	30,19 ± 0,3 g	30,97 ± 0,3 g
<i>Slc2a8</i> ^{-/-}	28,18 ± 0,4 g	28,80 ± 0,4 g	29,85 ± 0,4 g

N7 SD-2

Genotyp	LW 4	LW 5	LW 6	LW 7	LW 8	LW 9	LW 10	LW 11
<i>Slc2a8</i> ^{+/+}	12,84 ± 0,5 g	17,13 ± 0,5 g	19,71 ± 0,4 g	20,95 ± 0,4 g	22,32 ± 0,4 g	23,26 ± 0,4 g	24,31 ± 0,4 g	24,90 ± 0,4 g
<i>Slc2a8</i> ^{-/-}	12,27 ± 0,5 g	16,45 ± 0,5 g	18,84 ± 0,4 g	20,41 ± 0,5 g	21,54 ± 0,5 g	22,36 ± 0,5 g	23,22 ± 0,6 g	23,83 ± 0,6 g

Genotyp	LW 12	LW 13	LW 14	LW 15	LW 16
<i>Slc2a8</i> ^{+/+}	25,57 ± 0,4 g	25,90 ± 0,4 g	26,54 ± 0,4 g	26,91 ± 0,4 g	27,05 ± 0,4 g
<i>Slc2a8</i> ^{-/-}	24,32 ± 0,7 g	24,76 ± 0,5 g	25,16 ± 0,6 g	25,67 ± 0,6 g	26,09 ± 0,6 g

N7 HFD-2

Genotyp	LW 4	LW 5	LW 6	LW 7	LW 8	LW 9	LW 10	LW 11
<i>Slc2a8</i> ^{+/+}	13,99 ± 0,9 g	18,22 ± 0,5 g	21,38 ± 0,5 g	23,36 ± 0,5 g	25,23 ± 0,5 g	26,64 ± 0,6 g	27,95 ± 0,6 g	29,17 ± 0,7 g
<i>Slc2a8</i> ^{-/-}	13,69 ± 0,7 g	18,21 ± 0,6 g	21,07 ± 0,4 g	22,69 ± 0,4 g	24,39 ± 0,4 g	25,33 ± 0,5 g	26,67 ± 0,7 g	27,9 ± 0,7 g

Genotyp	LW 12	LW 13	LW 14	LW 15	LW 16
<i>Slc2a8</i> ^{+/+}	30,10 ± 0,7 g	31,04 ± 0,8 g	32,02 ± 0,8 g	33,07 ± 0,9 g	33,80 ± 1,0g
<i>Slc2a8</i> ^{-/-}	28,57 ± 0,7 g	29,18 ± 0,8 g	29,75 ± 0,8 g	30,82 ± 0,9 g	31,73 ± 0,8 g

Körperzusammensetzung der *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse im Alter von 14 Wochen (Abb. 3.17)

Genotyp	SD-2		HFD-2	
	Fettmasse	fettfreie Masse	Fettmasse	fettfreie Masse
<i>Slc2a8</i> ^{+/+}	2,83 ± 0,2 g	19,52 ± 0,3 g	6,66 ± 0,9 g	22,07 ± 0,4 g
<i>Slc2a8</i> ^{-/-}	2,58 ± 0,1 g	18,68 ± 0,4 g	4,93 ± 0,8 g	21,31 ± 0,4 g

Futter- und Wasseraufnahme der *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse (Abb. 3.18)

Genotyp	Futteraufnahme in g/Tag	Wasseraufnahme in g/Tag
<i>Slc2a8</i> ^{+/+}	4,12 ± 0,1	5,02 ± 0,1
<i>Slc2a8</i> ^{-/-}	4,18 ± 0,1	5,20 ± 0,2

Respiratorischer Quotient und Energieumsatz der *Slc2a8*^{+/+}- und *Slc2a8*^{-/-}-Mäuse (Abb. 3.19)

Genotyp	RQ (VCO ₂ /VO ₂)			Energieumsatz (kJ/Tag/kg)		
	24h	Tag	Nacht	24h	Tag	Nacht
<i>Slc2a8</i> ^{+/+}	0,91 ± 0,01	0,89 ± 0,01	0,92 ± 0,02	62,25 ± 2,0	61,87 ± 1,8	62,51 ± 2,4
<i>Slc2a8</i> ^{-/-}	0,91 ± 0,01	0,88 ± 0,01	0,93 ± 0,02	60,50 ± 1,3	61,27 ± 1,4	59,70 ± 1,6

Glykogenspiegel in Lebern von *Slc2a8^{+/+}*- und *Slc2a8^{-/-}*-Mäusen (Abb. 3.20)

Genotyp	SD-2 mg/dL/50mg Leber		HFD-2 mg/dL/50mg Leber	
	nüchtern	gefüttert	nüchtern	gefüttert
<i>Slc2a8^{+/+}</i>	4,94 ± 0,7	900,00 ± 56	9,22 ± 2,0	481,79 ± 51
<i>Slc2a8^{-/-}</i>	7,21 ± 1,2	872,00 ± 92	10,51 ± 3,1	490,36 ± 55

Triglycerid-Verlauf im oralen Fettoleranztest (Abb. 3.21)

SD-2

Genotyp	basal µg/ml	2 h µg/ml	3 h µg/ml	4 h µg/ml	6 h µg/ml	12 h µg/ml
<i>Slc2a8^{+/+}</i>	263,97 ± 20,5	412,70 ± 56,1	428,55 ± 59,4	337,96 ± 33,2	332,19 ± 30,3	219,35 ± 17,6
<i>Slc2a8^{-/-}</i>	304,23 ± 24,9	381,74 ± 56,7	388,54 ± 41,4	341,23 ± 25,0	325,93 ± 26,0	241,86 ± 19,5

HFD-2

Genotyp	basal µg/ml	2 h µg/ml	3 h µg/ml	4 h µg/ml	6 h µg/ml	12 h µg/ml
<i>Slc2a8^{+/+}</i>	383,68 ± 23,9	1.285,18 ± 157,5	922,47 ± 154,6	537,92 ± 64,2	463,18 ± 43,1	314,42 ± 35,5
<i>Slc2a8^{-/-}</i>	354,86 ± 20,8	1.330,12 ± 167,9	926,57 ± 141,7	513,41 ± 69,4	452,49 ± 52,9	319,62 ± 29,8

ATP-Gehalt in Lebern und Quadrizeps von *Slc2a8^{+/+}*- und *Slc2a8^{-/-}*-Mäusen (Abb. 3.22)

Leber

Genotyp	SD-2 µM ATP/100 mg Leber		HFD-2 µM ATP/100 mg Leber	
	nüchtern	gefüttert	nüchtern	gefüttert
<i>Slc2a8^{+/+}</i>	0,17 ± 0,1	21,08 ± 4,2	4,22 ± 0,5	18,29 ± 3,0
<i>Slc2a8^{-/-}</i>	0,12 ± 0,06	28,03 ± 2,6	3,85 ± 0,9	16,77 ± 1,6

Quadrizeps

Genotyp	SD-2 µM ATP/100 mg Muskel		HFD-2 µM ATP/100 mg Muskel	
	nüchtern	gefüttert	nüchtern	gefüttert
<i>Slc2a8^{+/+}</i>	173,97 ± 19,5	248,22 ± 22,0	240,88 ± 11,4	243,28 ± 7,9
<i>Slc2a8^{-/-}</i>	174,05 ± 25,4	276,61 ± 18,0	236,00 ± 9,4	253,85 ± 14,4

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die durch ihre Unterstützung maßgeblich zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Dr. H.-G. Joost danke ich für die Bereitstellung des sehr interessanten Themas, die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen im Labor, seine stete Diskussionsbereitschaft und die Unterstützung meiner Arbeit.

Mein spezieller Dank gilt Frau Prof. Dr. A. Schürmann für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit, ihre ständige Gesprächsbereitschaft sowie ihre wertvollen Ideen und Anregungen, die mir besonders in den schwierigeren Phasen eine große Hilfe waren.

Außerdem danke ich dem DFG Graduiertenkolleg 1208 „Hormonal Regulation of Energy Metabolism, Body Weight and Growth“ für die finanzielle Unterstützung der Arbeit in den Jahren 2006-2008, die Finanzierung nationaler und internationaler Kongressteilnahmen und die umfassende wissenschaftliche Ausbildung „über den eigenen Tellerrand hinaus“.

Herrn Dr. R. Kluge danke ich besonders für die Einführung und Unterstützung in die tierexperimentellen Arbeiten. Für die Hilfestellung bei der Zucht und Haltung der Mäuse möchte ich allen Mitarbeitern des Max-Rubner-Laboratoriums danken, im Besonderen Frau J. Krause und Frau J. Mattern.

Mein Dank gilt außerdem unserem Kooperationspartner Herrn Prof. Dr. G. Wennemuth von der Phillips-Universität Marburg für die CASA- und EM-Analyse der Spermien.

Bei der gesamten Abteilung Pharmakologie bedanke ich mich für das gute Arbeitsklima und die unzähligen großen und kleinen Hilfestellungen während meiner Laborzeit. Für die Einweisung in diverse Arbeitstechniken danke ich Dr. R. Augustin und Dr. S. Schmidt. Bei Tanja Dreja und Alexandra Chadt möchte ich mich für die zahlreichen Gespräche bedanken (inklusive dem kulinarischen Beiwerk), die nach missglückten Versuchen für die nötige Motivation sorgten. Außerdem danke ich meinen ehemaligen Bürokollegen Deike Hesse und Alexander Jaschke, sowie meinen derzeitigen Bürokollegen Sina Tischer, Farshad Mirhashemi und Oliver Kluth für die aufmunternde, erfrischende Arbeitsatmosphäre. Nadja Schulz danke ich für die gute Zusammenarbeit in „Raum 171“ und Daniel Kaiser für die Versorgung mit den aktuellsten Publikationen.

Abschließend gilt mein besonderer Dank meinem Verlobten Jan Behrens sowie meinen Eltern Fred und Bärbel Gawlik und meiner Schwester Janina Gawlik, die mich während meiner gesamten Doktorandenzeit motiviert und unterstützt haben und mir diesen Weg ermöglichten.

Publikationen

Originalarbeiten

Gawlik, V., Schmidt, S., Scheepers, A., Wennemuth, G., Augustin, R., Aumüller, G., Moser, M., Al-Hasani, H., Kluge, R., Joost, H. G., Schürmann, A. (2008). Targeted disruption of *Slc2a8* (GLUT8) reduces motility and mitochondrial potential of spermatozoa. *Mol Membr Biol.* 25(3):224-35

Schmidt, S., Gawlik, V., Hölter, S. M., Augustin, R., Scheepers, A., Behrens, M., Wurst, W., Gailus-Durner, V., Fuchs, H., Hrabé de Angelis, M., Kluge, R., Joost, H. G., Schürmann, A. (2008). Deletion of glucose transporter GLUT8 in mice increases locomotor activity. *Behav Genet.* 38(4):396-406. Epub 2008 May 7

Schmidt, S., Richter, M., Montag, D., Sartorius, T., Gawlik, V., Hennige, A. M., Scherneck, S., Himmelbauer, H., Lutz, S. Z., Augustin, R., Kluge, R., Ruth, P., Joost, H. G., Schürmann, A. (2008). Neuronal functions, feeding behavior, and energy balance in *Slc2a3^{+/-}* mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 295(5):E1084-94. Epub 2008 Sep 9

Schmidt, S., Hommel, A., Gawlik, V., Augustin, R., Junicke, N., Florian, S., Richter, M., Walther, D. J., Montag, D., Joost, H. G., Schürmann, A. (2009). Essential role of glucose transporter GLUT3 for post-implantation embryonic development. *J Endocrinol.* 200(1):2333. Epub 2008 Oct 23

Als Abstract publizierte Kongressvorträge

Gawlik, V., Schmidt, S., Scheepers, A., Wennemuth, G., Augustin, R., Moser, M., Al-Hasani, H., Joost, H. G., Schürmann, A. (2008). Targeted disruption of *Slc2a8* (GLUT8) reduces ATP levels and mitochondrial potential of spermatozoa. *Endocrine Abstracts* 16 S14.4

Als Abstract publizierte Posterpräsentationen

Gawlik, V., Schmidt, S., Scheepers, A., Wennemuth, G., Augustin, R., Moser, M., Al-Hasani, H., Joost, H. G., Schürmann, A. (2008). Targeted disruption of *Slc2a8* (GLUT8) reduces ATP levels and mitochondrial potential of spermatozoa. *Diabetologie & Stoffwechsel* 3: S10

Weitere Kongressvorträge

Targeted disruption of *Slc2a8* (GLUT8) reduces motility and mitochondrial potential of spermatozoa. 08. August 2007; FASEB Summer Research Conferences Glucose Transporter Biology, Snowmass Village, Colorado, USA.

Targeted disruption of *Slc2a8* (GLUT8) reduces mitochondrial potential of spermatozoa and increases locomotor activity. 22. November 2008. Göttinger Transportertage 2008, Göttingen.

Weitere Posterpräsentationen

The physiological role of the glucose transporter 8 (GLUT8) – regulation of glucose metabolism and energy homeostasis. Bregenz Summer School on Endocrinology: Nuclear Receptors in Health & Disease, Bregenz, Österreich. 22.-26. Juli 2007.

Targeted disruption of *Slc2a8* (GLUT8) reduces motility and mitochondrial potential of spermatozoa. FASEB Summer Research Conferences Glucose Transporter Biology, Snowmass Village, Colorado, USA. 04.-09. August 2007.

Targeted disruption of *Slc2a8* (GLUT8) reduces motility and mitochondrial potential of spermatozoa. Symposium Genetics and Pathophysiology of Type 2 Diabetes, Potsdam. 14.-15. Februar 2008.

Die Deletion des Glucosetransporters GLUT8 in Mäusen führt zu einer gesteigerten Bewegungsaktivität. 24. Jahrestagung Deutsche Adipositas-Gesellschaft, Freiburg. 16.-18. Oktober 2008.

Deletion of glucose transporter GLUT8 in mice increases locomotor activity. NuGOweek 2008, Potsdam. 02.-05. September 2008.

Lebenslauf

Zur Person:

Name	Verena Behrens (geb. Gawlik)
Geburtsdatum	05.09.1979
Geburtsort	Bremen
Familienstand	verheiratet
Anschrift	Erich-Weinert-Straße 10, 14478 Potsdam

Schulischer Werdegang:

1986 – 1990	Grundschule „Fährer Flur“ Vegesack
1990 – 1992	Orientierungsstufe „Gerhard-Rohlf-Schulzentrum“ Vegesack
1992 – 1996	Gymnasium „Gerhard-Rohlf-Schulzentrum“ Vegesack
1996 – 1999	Oberstufe „Gymnasium Vegesack“

Studium:

1999 – 2005	Studium der Biologie an der „Carl von Ossietzky Universität“ Oldenburg
2005	Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Neuroanatomie der Universität Oldenburg unter Leitung von Prof. Dr. Janssen-Bienhold Thema : „Nachweis von Zonula Occludens-1 (ZO-1) in der Vertebratenretina: Identifikation von Interaktionspartnern“
August 2005	Abschluss des Biologiestudiums mit Diplom in den Prüfungsfächern Zellbiologie, Zoophysikologie und Ökologie

Promotion:

seit Januar 2006	Doktorarbeit am Deutschen Institut für Ernährungsforschung, Abteilung Pharmakologie unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. H.-G. Joost als Stipendiatin des DFG-Graduiertenkollegs 1208 „Hormonal Regulation of Energy Metabolism, Body Weight and Growth“
------------------	---

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Hochschule eingereicht.

Bergholz-Rehbrücke, im April 2009