

Entwicklungsspezifische Expression und mögliche funktionelle Bedeutung der Glukosetransporterisoformen in Präimplantationsembryonen des Rindes

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

angefertigt am Institut für Anatomie und Zellbiologie der
Medizinischen Fakultät und vorgelegt der Mathematisch-
Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg

von Robert Augustin
geboren am 23.10.1973 in Halle, Saale

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer
Prof. Dr. Heiner Niemann
Prof. Dr. Elmar Wahle

Halle, Saale im Mai 2001

verteidigt am 27. Juni 2001

1	<u>EINLEITUNG.....</u>	<u>1</u>
1.1	Die Entwicklung von Präimplantationsembryonen beim Rind	1
1.1.1	Embryonalentwicklung und -kultur <i>in vitro</i>	2
1.2	Der passive Glukosetransport - Glukosetransporter.....	3
1.2.1	Glukosetransporter 1.....	6
1.2.2	Glukosetransporter 2.....	7
1.2.3	Glukosetransporter 3.....	8
1.2.4	Glukosetransporter 4.....	9
1.2.5	Glukosetransporter 5.....	10
1.2.6	Glukosetransporter 8 = GlutX1	11
1.2.7	Glukosetransporter 9.....	12
1.2.8	Glukosetransporter 10	12
1.3	Der aktive, Natrium-abhängige Glukosetransport.....	13
1.4	Glukose und Glukosetransporter in Präimplantations-embryonen von Säugetieren	14
1.4.1	Das Energiesubstrat Glukose und die Entwicklung von Präimplantationsembryonen ...	14
1.4.2	Glukosetransporterisoformen in Präimplantationsembryonen.....	15
1.4.2.1	<i>Expressionsmuster, Lokalisation und Funktion</i>	15
1.4.2.2	<i>Funktionelle Studien zur Expression von Glukosetransporterisoformen in Präimplantationsembryonen</i>	17
1.4.3	Der aktive Glukosetransport in Präimplantationsembryonen.....	17
1.5	Effekt von Insulin auf Präimplantationsembryonen	18
1.6	Insulin und Glukosetransporter: Regulation und Signaltransduktion	19
1.7	Zielstellung der Arbeit.....	20
2	<u>MATERIAL UND METHODEN.....</u>	<u>21</u>
2.1	Klonierung und Sequenzierung boviner Glukosetransporter cDNA.....	21
2.1.1	Gesamt-RNA Extraktion aus Gewebe.....	21
2.1.2	Reverse Transkriptase Reaktion – cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA	22
2.1.3	Polymerase – Ketten – Reaktion (PCR)	22
2.1.3.1	<i>PCR - Primer</i>	22
2.1.3.2	<i>PCR - Reaktionsbedingungen</i>	23
2.1.4	Klonierung von DNA – Fragmenten und Sequenzierung	23
2.1.4.1	<i>Ligation und Transformation</i>	23
2.1.4.2	<i>Plasmidpräparation und Sequenzierung</i>	24
2.1.5	Sequenzanalyse und Datenbankvergleich	24
2.2	Proteinnachweis.....	25
2.2.1	Western Blot	25
2.2.1.1	<i>Proteinpräparation</i>	25
2.2.1.2	<i>Denaturierende SDS -Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>	25
2.2.1.3	<i>Immunoblot</i>	25
2.2.2	Immunhistochemie	26
2.3	Expression von Glukosetransportern in <i>in vitro</i> produzierten Präimplantationsembryonen des Rindes.....	27
2.3.1	Untersuchungsmaterial.....	27
2.3.2	<i>In-vitro</i> -Produktion von Rinderembryonen.....	27
2.3.2.1	<i>Eizellgewinnung</i>	27
2.3.2.2	<i>In-vitro-Maturation</i>	28
2.3.2.3	<i>In-vitro-Fertilisation</i>	28
2.3.2.3.1	<i>Spermienpräparation</i>	28
2.3.2.3.2	<i>Oozyten-Spermien-Kokultur</i>	29

2.3.2.4	<i>In-vitro-Kultur</i>	29
2.3.3	Lacmoidfärbung.....	29
2.3.4	Gewinnung 14 und 16 Tage alter Blastozysten	30
2.3.4.1	<i>Gewinnung von in vitro Embryonen nach IVM/IVF</i>	30
2.3.4.2	<i>Gewinnung von in vivo Embryonen</i>	30
2.3.5	Poly(A) ⁺ -RNA Isolation aus <i>in vitro</i> gewonnenen Oozyten und Präimplantationsembryonen	31
2.3.6	cDNA-Synthese aus Poly(A) ⁺ -RNA.....	31
2.3.7	Extraktion von Gesamt-RNA aus 14 und 16 Tage alten Blastozysten und cDNA-Synthese.....	32
2.3.8	PCR-Amplifikation von Glukosetransportern in Gameten und Präimplantationsembryonen des Rindes	32
2.3.9	<i>In-situ-Hybridisierung</i>	32
2.3.9.1	<i>Herstellung der Hybridisierungssonde – In-vitro-Transkription</i>	32
2.3.9.2	<i>Hybridisierung</i>	33
2.3.10	Immunhistochemie an Embryonen	33
2.3.10.1	<i>Lokalisation von Glut1- und Glut4-Protein an Schnitten 14 und 16 Tage alter Blastozysten</i>	33
2.3.10.2	<i>Whole-mount-Immunohistochemie an 8 Tage alten Blastozyten</i>	34
2.4	Quantifizierung von Glut1- und Glut4-Transkripten in <i>in vitro</i> produzierten und <i>in vivo</i> gewachsenen 14 und 16 Tage alten Rinderblastozysten	35
2.4.1	Herstellung der Standard-cRNA (Mimic)	35
2.4.2	Kompetitive RT-PCR	36
2.5	Insulinexposition <i>in vitro</i> produzierter Rinderembryonen	36
2.5.1	Effekt von Insulin auf die Expression von Glukosetransportern und Enzymen der Glykolyse	36
2.5.1.1	<i>In-vitro-Produktion der Blastozysten und Insulin-Exposition</i>	36
2.5.1.2	<i>Semiquantitative RT-PCR: Poly(A)⁺-RNA-Isolation und cDNA-Synthese aus Blastozysten unter Hinzufügen einer externen Standard-Poly(A)⁺-RNA</i>	37
2.5.2	Der Einfluß von Insulin auf die Embryonalentwicklung <i>in vitro</i>	38
2.5.2.1	<i>Differentialfärbung der Zellkerne des Trophoblasten und Embryoblasten</i>	38
2.6	Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung der Protein-kodierenden Sequenz des bovinen Glukosetransporters 3	39
2.7	Statistik	40
2.7.1	Statistische Auswertung des Einflusses von Insulin auf die relativen Transkriptmengen in 8 Tage alten Blastozysten	41
3	<u>ERGEBNISSE</u>	42
3.1	Sequenzanalysen	42
3.1.1	Glukosetransporter 2.....	42
3.1.2	Glukosetransporter 3.....	43
3.1.2.1	<i>Protein-kodierende Region des Glukosetransporters 3 (cds)</i>	44
3.1.3	Glukosetransporter 5.....	45
3.1.4	Glukosetransporter 8.....	46
3.1.5	Natrium-abhängiger Glukosetransporter SGLT-I	48
3.1.6	Phosphofruktokinase (EC 2.7.1.11).....	49
3.2	Untersuchungen zur Kreuzreaktivität von Antikörpern gegen Glukostransporter vom Rind mit Immunhistochemie und Western Blot	50
3.2.1	Glukosetransporter 1.....	51
3.2.2	Glukosetransporter 2.....	51
3.2.3	Glukosetransporter 3.....	52
3.2.4	Glukosetransporter 4.....	52
3.2.5	Glukosetransporter 5.....	53
3.2.6	Glukosetransporter 8.....	53
3.2.7	Natrium – abhängiger Glukosetransporter (SGLT-I).....	54

3.3	Expression der Glukosetransporterisoformen in <i>in vitro</i> produzierten Präimplantationsembryonen des Rindes.....	55
3.3.1	<i>In-vitro</i> -Produktion von Rinderembryonen.....	55
3.3.2	Nachweis von Glukosetransporter-RNA in Präimplantations-embryonen des Rindes <i>in vitro</i>	56
3.3.3	Lokalisation von Glut4-RNA in elongierten, 14 und 16 Tage alten Blastozysten mit In-situ-Hybridisierung	58
3.3.4	Quantifizierung der Transkriptmengen für Glut1 und Glut4 in 14 und 16 Tage alten <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Blastozysten.....	60
3.3.5	Immunhistochemischer Nachweis von Glut1 und Glut4 in Rinderblastozysten.....	61
3.4	Der Einfluß von Insulin auf die Expression von metabolisch relevanten Genen in 8 Tage alten Blastozysten.....	65
3.4.1	Insulinexposition von expandierten Blastozysten.....	65
3.4.2	Insulinexposition während der <i>In-vitro</i> -Kultur von Rinderembryonen	67
<u>4</u>	<u>DISKUSSION</u>	<u>70</u>
4.1	Expression von Glukosetransporterisoformen beim Rind.....	70
4.2	Bovine Glukosetransporter werden in Präimplantations-embryonen entwicklungsspezifisch exprimiert.....	71
4.2.1	Die Glukosetransporter 1 und 3.....	72
4.2.2	Die Insulin-sensiviten Glukosetransporter 4 und 8	73
4.2.3	Glukosetransporter 2.....	76
4.2.4	Glut5 - der Fruktosetransporter	77
4.2.5	SGLT-I – der aktive Glukosetransporter.....	79
4.3	Glukosetransporter 1- und 4-Expression in <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> gewachsenen Präimplantationsembryonen.....	80
4.4	Effekte von Insulin auf die Embryonalentwicklung <i>in vitro</i> und die Transkription von Glukosetransportern und Enzymen der Glykolyse in Rinderblastozysten.....	82
4.4.1	Kurzzeiteffekte.....	82
4.4.2	Langzeiteffekte	86
4.5	Glukosetransporter - Differenzierung und stressinduzierte Apoptose in Präimplantationsembryonen.....	88
<u>5</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>92</u>
<u>6</u>	<u>SUMMARY</u>	<u>95</u>
<u>7</u>	<u>ANHANG.....</u>	<u>98</u>
<u>8</u>	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</u>	<u>104</u>
<u>9</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u>	<u>106</u>

1 Einleitung

Die Entwicklung eines Säugetierembryos lässt sich grob in zwei Phasen unterteilen, einer Prä- und einer Postimplantationsphase. Der Abschnitt der Präimplantationsentwicklung umfasst die Zeitspanne von der Befruchtung der Eizelle bis zur Einnistung der geschlüpften Blastozyste in die Uterusschleimhaut, das Endometrium. Trotz der Kürze dieser z.B. beim Menschen nur etwa 5-7 Tage währenden Phase der Embryonalentwicklung erfolgen in dieser Zeit grundlegende entwicklungsbiologische Weichenstellungen. Dazu zählen u.a. die Aktivierung des embryonalen Genoms, der Wechsel von den totipotenten Blastomeren zu den pluripotenten Blastozysten, die Ausbildung von Zellkontakten und die Umstellung des Metabolismus auf eine Verwertung von Glukose. Ein programmgemäßes Durchlaufen dieser und zahlreicher weiterer zell- und molekularbiologischer Prozesse bestimmt die Entwicklungsfähigkeit des Embryos. Dabei spielt das Energiesubstrat Glukose eine wesentliche Rolle. Seine Aufnahme und Verfügbarkeit ist für den Embryo essentiell. Sie ist an die Expression von speziellen Transmembranproteinen, den Glukosetransportern gebunden. Die folgenden Kapitel sollen einen Einblick in die Entwicklung von Präimplantationsembryonen des Rindes, dem Untersuchungsobjekt der vorliegenden Arbeit, und eine Einführung in die Molekülklasse der Glukosetransporterproteine geben. Am Ende werden die bisher erlangten Erkenntnisse über die Expression dieser Proteine und deren Regulation und Funktion und die daraus abgeleitete Bedeutung für die Entwicklung von Präimplantationsembryonen dargestellt.

1.1 Die Entwicklung von Präimplantationsembryonen beim Rind

Rinder sind ganzjährig zyklisch (polyoestrisch), wobei ein Zyklus 21 Tage umfasst. Während des Oestrus vollzieht die im Follikel heranreifende Oozyte die erste Reifeteilung der Meiose. Die zweite Reifeteilung arretiert in der Metaphase II und wird erst nach der Befruchtung vollendet. Im Eileiter teilt sich der Embryo bis zum 8-Zellstadium. Dieses Entwicklungsstadium ist verbunden mit der Aktivierung des embryonalen Genoms (Telford et al., 1990) und einer Umstellung des Metabolismus von einer Laktat/Pyruvat- zur anaeroben Glukoseverwertung. Der Embryo gelangt über den Eileiteristhmus in das Uterushorn und erreicht dort etwa 5 bis 6 Tage nach

der Ovulation (post ovulation – p.o.) das Morula– bzw. nach etwa 6-8 Tagen p.o. das Blastozystenstadium. Das Erreichen des Stadiums der Blastozyste ist mit der Differenzierung des Embryos in zwei Zelllinien - den Embryoblast- (inner cell mass – ICM) und den Trophoblastzellen (im englischsprachigen Raum meist als Trophektoderm bezeichnet) - verbunden. Das Schlüpfen der Blastozyste aus der Zona pellucida am Tag 9 geht einher mit der Eingliederung des Embryoblasten in die Trophoblastzellen und dem Beginn der Ausbildung einer dritten Zellschicht, dem Endoderm, welches die Blastozystenhöhle auskleidet. Die Entwicklung von Präimplantationsembryonen bei Wiederkäuern und dem Schwein ist gekennzeichnet von einem Auswachsen (Elongation) der Trophoblastzellen in die Uterushörner. Im Unterschied zur erheblichen Verlängerung des Trophoblasten nimmt der Embryoblast kaum an Größe zu. Die Elongation beginnt am Tag 13 und ist mit weiteren Differenzierungen wie der Mesodermbildung am Tag 15 und der Ausbildung von Säulenzellen und bi- oder polynukleären Riesenzellen aus den Trophektodermzellen verbunden (Rüsse and Sinowatz, 1991). Die Erkennung und Aufrechterhaltung der Gravidität erfolgt während der Elongation (Tag 15) durch die Sezernierung von IFN-tau (auch bTP-1) (Cross and Roberts, 1991; Roberts et al., 1998). IFN-tau wird durch die Trophoblastzellen gebildet und inhibiert die uterine Ausschüttung von PGF_{2α} (Hansen et al., 1999). Die Rückbildung des Corpus luteum wird verhindert und eine kontinuierliche Progesteronausschüttung gewährleistet. Bis zum Tag 16 sind Rinderblastozysten noch transferierbar. Danach ist die maternale Erkennung der Gravidität erfolgt und die Implantation des Embryos beginnt zwischen dem 18. und 19. Tag (Rüsse and Sinowatz, 1991).

1.1.1 Embryonalentwicklung und -kultur *in vitro*

Oozyten (bzw. die Kumulus-Oozyten-Komplexe – KOK) für die Embryokultur *in vitro* können aus Schlachthofovarien (*in vitro*) oder *in vivo* durch Laparoskopie (Rath, 1993) gewonnen werden. *In vitro* werden Eizellen durch ein Aspirieren der Follikel (Sirard and Lambert, 1985), das „Slicen“ der Ovarien (Xu et al., 1992) oder durch Präparation aus intakten Follikeln (Pavlok et al., 1992) erhalten. Eine Reifung der Eizellen, bemessen vor allem am Erreichen des Metaphase II-Stadiums der Meiose, wird bei dem zumeist verwendeten Medium TC-199 (Bavister et al., 1992) durch Supplementierung mit Hormonen, FCS (Fukui and Ono, 1989) oder Wachstumsfaktoren bei Temperaturen zwischen 38-39°C und Luftsauerstoff sowie

5%CO₂ vorgenommen und dauert ca. 24h. Nach Reifung der Eizellen wird die Fertilisation entweder mit frisch gewonnenem (Lengwinat et al., 1990), bevorzugterweise jedoch mit tiefgefrorenem und zuvor gereinigtem Bullensperma durchgeführt. Übliche Methoden der Gewinnung motiler Spermien und einer Abtrennung von Gefriermitteln sind das „swim up“ (Parrish et al., 1985) und die Percollgradientenzentrifugation (Sapienza et al., 1993). Ein häufig eingesetztes Medium für die *In-vitro*-Fertilisation ist das TALP (Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate)-Medium (Bavister and Yanagimachi, 1977; Saeki et al., 1993), welches in Verbindung mit Kapazitierungs- bzw. Motilitätsfaktoren wie Heparin (Parrish et al., 1984), Penicillamin (Andrews and Bavister, 1989), Hypotaurin und Epinephrin (Leibfried and Bavister, 1982) eingesetzt wird. Nach etwa 18-20h Kokultur von Eizellen und Spermien werden die Eizellen von den umgebenden Kumuluszellen befreit (Hyaluronidase-Behandlung, Vortexen oder Pipettieren) und können dann bis zum Blastozystenstadium kultiviert werden, wobei unterschiedliche Kulturmedien und -techniken zum Einsatz kommen. Für kommerzielle Anwendungen werden insbesondere komplexe Kulturmedien wie das TCM-199, Ham's F-10 oder Menezo's B2-Medium in Verbindung mit Serum (FCS) oder in Kokultur mit somatischen Zellen wie z.B. bovinen Eileiterzellen verwendet. Die Fortschritte in der Embryokultur erlauben zunehmend den Einsatz definierter Medien, wobei das SOF-Medium (synthetic oviductal fluid) mit verschiedenen Modifikationen wie z.B. einer Supplementierung mit Serum, BSA, EDTA, oder auch PVA eingesetzt wird.

1.2 Der passive Glukosetransport - Glukosetransporter

Während Insulin, der wichtigste hormonelle Regulator des Glukosetransportes, bereits 1922 entdeckt wurde (Banting and Best, 1990; Bliss, 1982), wurde erst 1977 das Protein, welches den Transport der hydrophilen Glukose durch die Plasmamembran in die Zelle ermöglicht, isoliert (Kasahara and Hinkle, 1977). Die entsprechende cDNA des Proteins konnte 1985 kloniert werden und erlaubte Aussagen über die Struktur des Glukosetransporters (Mueckler et al., 1985). Neben dem aus Erythrozytenmembranen isoliertem Glukosetransporter 1 (Glut1) sind heute weitere zehn humane Isoformen bekannt, welche die Funktion des Glukosetransportes und strukturelle Eigenschaften vereinen, sich jedoch in ihrer Regulation, Kinetik und ihrem Expressionsmuster unterscheiden.

Gemeinsamkeiten der einzelnen Glukosetransporterisoformen sind gekennzeichnet durch die konservierten Regionen der Primärstruktur und die zwölf transmembranen Helices dieser Membranproteine (Abbildung 1-1). Sowohl das C– als auch N-terminale Ende dieser Proteine ist im Zytoplasma lokalisiert. Sequenzhomologien des C– und N- terminalen Endes weisen auf eine Dimerisierung von zwei, ursprünglich sechs transmembrane Helices umfassenden, Proteinen hin (Marger and Saier, 1993).

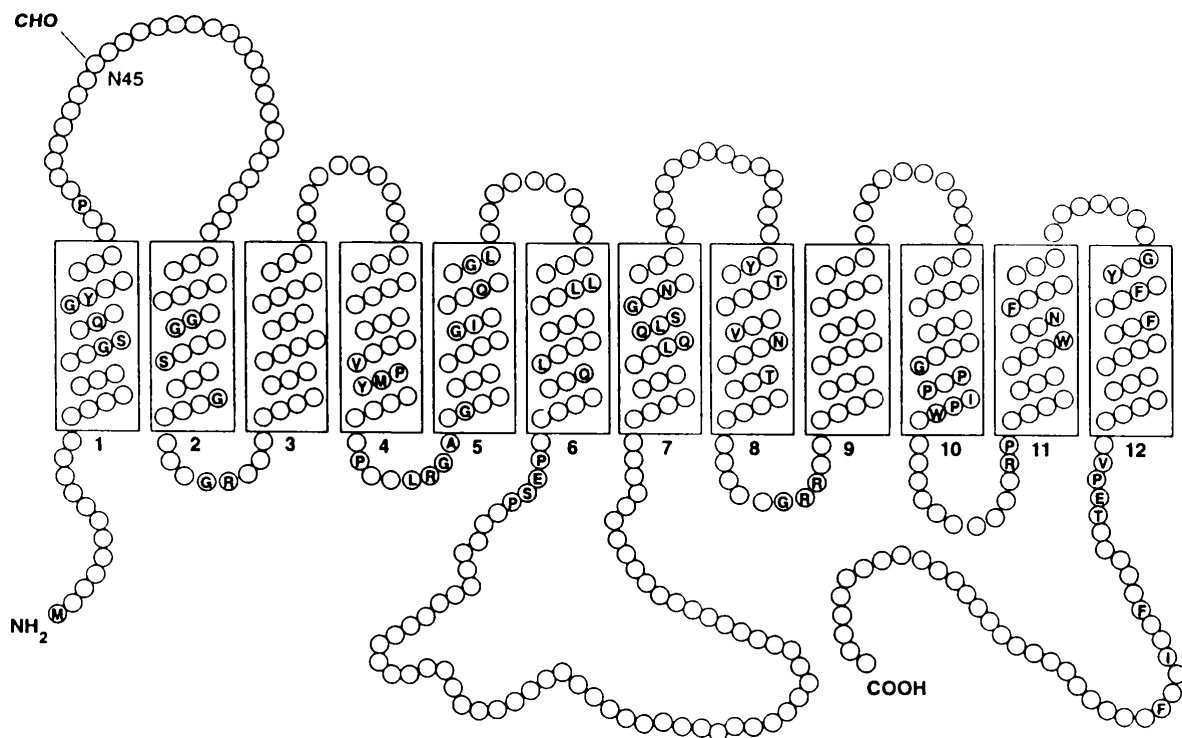
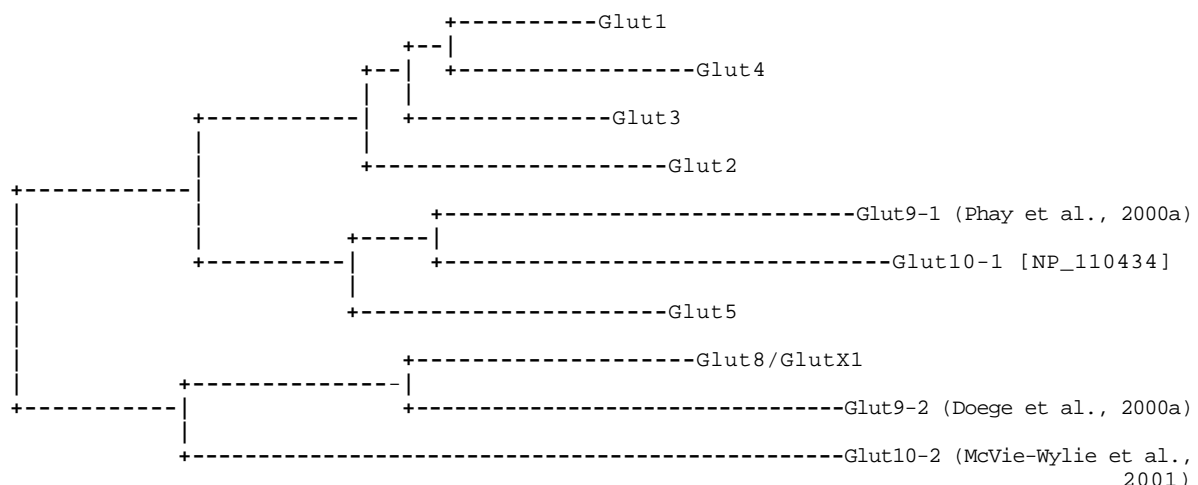


Abbildung 1-1 Strukturmodell der Glukosetransporterfamilie mit den 12 transmembranen Helices. Die mit dem Einbuchstabenkode bezeichneten Aminosäuren stellen die konservierten Bereiche zwischen den humanen Isoformen 1-5 dar. Die Glykosylierungsstelle der Transporter ist ebenfalls gekennzeichnet (N45) (nach: Gould, 1997).

Die Kenntnis der Glut1-cDNA-Sequenz ermöglichte anhand von Hybridisierungstechniken unter wenig stringenten Bedingungen („low stringent conditions“) die Klonierung weiterer Isoformen bis 1993: Glut2 (Fukumoto et al., 1988a; Thorens et al., 1988), Glut3 (Kayano et al., 1988; Nagamatsu et al., 1992), Glut4 (James et al., 1989) und Glut5 (Kayano et al., 1990). Eine Glut6-cDNA wurde als Pseudogen identifiziert (Kayano et al., 1990). Ein aus Leberzellen der Ratte isolierter Glut7 (Waddell et al., 1992), dem eine mikrosomale Lokalisation mit einer innerzellulären Glukosetransporterfunktion zugeschrieben wurde, stellte ein

Klonierungsartefakt dar (Burchell, 1998). Sowohl das Screenen von EST (expressed sequence tags)-Nukleotidsequenzdatenbanken als auch die Entschlüsselung des humanen Genoms ermöglichte die Klonierung und Sequenzierung neuer Glukosetransporterisoformen. Aufgrund der rasch aufeinanderfolgenden Klonierungs- und Sequenzierungsergebnisse ist die Nomenklatur bisher nicht geklärt. So sind der GlutX1 (Ibberson et al., 2000; Reagan et al., 2001) und Glut8 (Carayannopoulos et al., 2000; Doege et al., 2000b) identische Proteine, während der von den Arbeitsgruppen Phay et al. (Phay et al., 2000a) bzw. Doege et al. (Doege et al., 2000a) beschriebene Glut9 zwei verschiedene Transporter bezeichnet. Die publizierte Glut10-Sequenz (McVie-Wylie et al., 2001) unterscheidet sich von dem Glut10-Genbankeintrag der Gruppe Doege et al. (Accession Nr. NP_110434). Bis heute sind, mit Ausnahme des Klonierungsartefaktes Glut7 und dem Pseudogen Glut6, 10 Glukosetransporterisoformen bekannt. Ein Dendrogramm der Transporterproteinsequenzen ist in der Abbildung 1-2 dargestellt. Die Familie der Glukosetransporterproteine lässt sich aufgrund ihrer Primärstruktur in drei Untergruppen unterteilen. Vergleichbar zum Drosophila-Genom könnten möglicherweise in Säugern ebenfalls 12 Gene die Familie der Glukosetransporterproteine kodieren. Die Tabelle 1-1 fasst die Expressionsmuster der Glukosetransporterisoformen und ihre Michaelis-Menten-Konstanten (k_m) zusammen.



Isoform	Organe/Gewebe/Zellen	k_m -Wert in mM
Glut1	ubiquitär; Erythrozyten; Plazenta, Gehirn, Endothelzellen	6,9
Glut2	Leber, α -Zellen des Pankreas, Niere, Dünndarm	11,2
Glut3	Gehirn, Plazenta	1,4
Glut4	Skelettmuskel, Fettgewebe, Herz	4,6
Glut5	Dünndarm, Spermatozoen, Niere	6
Glut8	Testis, Skelettmuskel, Gehirn	2,4
Glut9-1	Niere, Leber	n.b.
Glut9-2	Gehirn, Milz, Leukozyten	n.b.
Glut10-1	Leber, Pankreas	n.b.
Glut10-2	n.b. (Sequenzdaten)	n.b.
SGLT-1	Dünndarm, Niere	0,1-0,8
SGLT-2	Niere	1,5-6

Tabelle 11 Übersicht der Expressionsmuster der Glukose- bzw. Fruktose(Glut5)transporterisoformen und ihrer Michaelis-Menten-Konstanten (k_m) (n.b. = nicht bekannt).

1.2.1 Glukosetransporter 1

Die humane cDNA, die den Glukosetransporter 1 kodiert, wurde 1985 durch die Arbeiten der Gruppe um Mueckler isoliert (Mueckler et al., 1985). In den darauffolgenden Jahren wurde die cDNA-Sequenz dieser Isoform für zahlreiche weitere Spezies beschrieben (u.a. Ratte: Birnbaum et al., 1986 Kaninchen: Asano et al., 2000; Rind: Boado and Pardridge, 1990; Schaf: Currie et al., 1997). Anhand der abgeleiteten Aminosäuresequenz wurden 12 transmembrane Helices vermutet, die später durch spektroskopische Methoden wie Zirkulardichroismus und Fouriertransformation bestätigt werden konnten (Alvarez et al., 1987; Chin et al., 1986; Jung et al., 1986). Der Glut1 wird in adulten Geweben ubiquitär exprimiert, wobei eine starke Expression in der Niere, dem Gehirn, in Erythrocyten und Blut-Gewebe-Grenzen wie der Blut/Hirn-Schranke, der Plazenta oder der Retina vorliegt (Boado and Pardridge, 1990; Currie et al., 1997; Farrell and Pardridge, 1991a; Farrell and Pardridge, 1991b; Harik et al., 1990; Takata et al., 1992; Takata et al., 1994). Neben einer schwachen Expression dieses Transporters in der Leber (Spolarics et al., 1993) ist der Glut1 in geringen Mengen auch in Geweben mit einem Insulin-sensitiven Glukosetransport wie dem Muskel- und Fettgewebe nachweisbar (Calderhead et al., 1990). Die ubiquitäre Verbreitung ist u.a. anhand der Kinetik des Glukosetransportes dieser Isoform zu erklären. Als eine Art „housekeeping“-Transporter ermöglicht der Glut1 aufgrund seines k_m -Wertes eine Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase einer Zelle sowohl unter normoglykämischen als auch hypoglykämischen Bedingungen (Gould, 1997). Hyperglykämie verursacht eine

reduzierte Glut1-Expression z.B. in Nierenzellen diabetischer Ratten (Dominguez et al., 1994) oder auch in humanen Trophoblastzellen (Hahn et al., 1998). Die Promotersequenzen des Glut1 Gens umfassen neben TATA- und CAT-Boxen, Serum-, Glucocorticoid- und cAMP-responsive Elemente sowie TRE- und sp1-Bindungsstellen. Diese Genstruktur erlaubt die Transkriptionskontrolle des Glut1 durch Wachstumsfaktoren und Hormone wie EGF, FGF (Hiraki et al., 1988), Insulin (Taha et al., 1999), IGF-I (Maher et al., 1989), PDGF (Rollins et al., 1988), TNF- α (Liong et al., 1999) oder TGF- β (Inoki et al., 1999). Onkogene wie src, abl (White et al., 1994), ras (Onetti et al., 1997) oder myc (Osthus et al., 2000) kontrollieren die Glut1-Expression und sind u.a. verantwortlich für eine erhöhte Proteinmenge in Tumorzellen (Smith, 1999). Der Glut1 ist auch involviert in eine Stress-induzierte Zellantwort (Wertheimer et al., 1991), ausgelöst durch Hypoxie (Chen et al., 2001; Kozlovsky et al., 1997a; Kozlovsky et al., 1997b), Kalzium-vermittelten (Dominguez et al., 1996; Quintanilla et al., 2000) oder osmotischen Stress (Barros et al., 1997).

1.2.2 Glukosetransporter 2

Die geringe Expression des Glut1 in Leberzellen und die Kinetik des Glukosetransportes in Hepatozyten ließ einen anderen Mechanismus des Transportes vermuten und führte durch das Screenen von cDNA-Banken zur Klonierung des Glut2 (Fukumoto et al., 1988b; Thorens et al., 1988). Im Gegensatz zum ubiquitär vorliegenden Glut1 wird diese Isoform spezifisch in Leberzellen, den Insulin-sezernierenden Zellen der Langerhans-Inseln (β -Zellen) sowie den Epithelzellen des Dünndarms und der Niere exprimiert. Der Glut2 weist die geringste Affinität aller Isoformen gegenüber Glukose auf und ermöglicht eine „low affinity–high capacity“ Kinetik des Glukosetransportes. Eine weitere Besonderheit dieser Isoform besteht in der ähnlich hohen Affinität für zwei Saccharide: Glukose und Fruktose. Die Lokalisation dieses Transporters in den basalen Membranen der Epithelzellen des Dünndarms und der Niere schafft die Voraussetzung für den zweiten Schritt des transepithelialen Transportes: die Freisetzung der durch die apikal lokalisierten Transporter SGLT-I und Glut5 aufgenommenen Glukose bzw. Fruktose an die Blutkapillaren. Die Bedeutung des Glut2 für die Glukose stimulierte Insulinsekretion der β -Zellen sowie den Glukosestoffwechsel von Hepatozyten konnte anhand des Glut2-knockout-Modells gezeigt werden (Guillam et al., 1997). Die Mäuse entwickeln eine Hyperglykämie, Hypoinsulinämie, haben einen erhöhten Glukagongehalt im

Plasma, weisen eine Glukosurie auf und sterben um die Zeit der Entwöhnung (Guillam et al., 1997). Die mit dem Ausschalten des Glut2-Gens verbundenen Stoffwechselstörungen sind u.a. auf den veränderten Glukagon- und Glukosestoffwechsel der Leberzellen (Thorens et al., 2000) und eine Störung der Glukose stimulierten Insulinsekretion der β -Zellen zurückzuführen (Burcelin et al., 2000a; Burcelin et al., 2000b; Guillam et al., 1998). In Glut2-defizienten Hepatozyten wurde ein Glukosetransport gemessen, der nicht auf eine Expression bisher beschriebener Isoformen beruhte und deshalb mit dem Vorliegen einer bisher unbekannten Isoform erklärt wurde (Burcelin et al., 2000a). Der vor allem in der Leber und im Pankreas exprimierte Glut10 wurde aufgrund seiner Lokalisation auf dem Chromosom 20 als Kandidatengenen für „non-insulin-dependent diabetes mellitus“ (NIDDM) postuliert (McVie-Wylie et al., 2001) und könnte möglicherweise eine Erklärung für den Glukosetransport in Hepatozyten bei Glut2-defizienten Mäuse bieten.

1.2.3 Glukosetransporter 3

Die humane cDNA einer dritten Isoform der Glukosetransporterfamilie wurde 1988 kloniert (Kayano et al., 1988). Auch in anderen Spezies wurden die entsprechenden cDNA dieser Isoform kloniert (Kaninchen: Asano et al., 1988 Hund: Borson et al., 1996 Ratte: Nagamatsu et al., 1993 Maus: Nagamatsu et al., 1992 Schaf: Bennett et al., 1995). Der Glut3 wird vor allem in neuronalem Gewebe, in der Plazenta und in geringen Mengen in Muskel-, Fett- und Nierengewebe exprimiert. Der Glut3 weist die höchste Glukoseaffinität der Glut-Isoformen auf. In Gehirnen von Ratten wird der Glut3 durch Stressoren wie z.B. Hypoxie über einen durch HIF1- α (Hypoxie inducible factor) vermittelten Signalweg (Royer et al., 2000) oder Hypoglykämie (Lee et al., 2000) in seiner Expression beeinflusst. Die Rolle des Glut3 im fetomaternalen Glukosetransport wurde unter diabetischen Zuständen der Hyperglykämie an Plazenten von Schafen (Das et al., 2000) und bei diabetischen Müttern untersucht (Sciullo et al., 1997), wobei beide Studien eine Herabregulation dieses Transporters nachweisen konnten. Die maligne Entartung von testikulären Keimzellen (Younes et al., 1997) und das Ehrlich-Karzinom (Au et al., 1997) sind mit einer erhöhten Expression des Glut3 verbunden.

Die Expression des Glut3 steht unter dem Einfluß von Insulin und wird über den Signaltransduktionsweg der MAP-Kinase reguliert (Taha et al., 1995; Taha et al.,

1997). Die Transkription des Glut3-Gens unterliegt u.a. den Transkriptionsfaktoren sp1 und sp3 (Rajakumar et al., 1998), Proteinen der Zinkfinger-Familie. Trotzdem der Glut3 in vielen Spezies beschrieben wurde, sind, im Vergleich zu den Transportern 1, 2 oder 4, bisher relativ wenige Studien über die spezifische Regulation und Funktion dieser Isoform vorgenommen worden.

1.2.4 Glukosetransporter 4

Die Arbeiten von Suzuki und Kono (1980) und Cushman und Wardzala (1980) konnten einen Insulin-stimulierten Glukosetransport in Adipozyten nachweisen, der mit der Translokation eines Glukosetransporterproteins aus intrazellulären Vesikeln in die Plasmamembran verbunden sein mußte. Die cDNA, welche das entsprechende Protein kodiert, wurde 1988 bzw. 1989 von mehreren voneinander unabhängig arbeitenden Arbeitsgruppen publiziert (Maus: Kaestner et al., 1989; Ratte: Birnbaum, 1989; James et al., 1988). Die Besonderheit dieser Isoform besteht in der Insulin-abhängigen, innerhalb von Minuten (Patki et al., 2001) ablaufenden Mobilisierung des Transporters aus intrazellulären Vesikeln und deren Translokation in die Plasmamembran. Sie resultiert z.B. in isolierten Adipozyten der Maus in einer bis zu 20fach erhöhten Glukoseaufnahme (Toyoda et al., 1987). Der Glut4 wird fast ausschließlich in Insulin-responsiven Geweben wie Fettgewebe, Skelett- und Herzmuskel exprimiert. Das Protein ist in der Niere (Heilig et al., 1995) und der Plazenta (Kainulainen et al., 1997; Xing et al., 1998) nachweisbar. Neben der Insulin-sensitiven Translokation des Glut4 erlaubt die Rekrutierung dieses Transporters aus intrazellulär vorliegenden Pools eine rasche Reaktion der Zelle auf metabolische Erfordernisse wie der Muskelkontraktion (Rodnick et al., 1992; Ryder et al., 2001; Tsao et al., 2001). Die Mobilisierung des Glut4 aus intrazellulären Vesikeln in Abhängigkeit von Insulin führte dazu, dass dieser Transporter sowohl aus rein funktioneller Sicht auf den Mechanismus der Translokation als auch in Zusammenhang mit Diabetes und der Regulation des Glukosehaushaltes von Fett- und Muskelgewebe gut charakterisiert ist.

Insulin aktiviert nach Bindung an seinen Rezeptor die PI3-Kinase, welche über den Signalweg der Proteinkinase B (oder auch Akt) die Exozytose des Glut4 in die Plasmamembran auslöst (Hernandez et al., 2001). Der Glut4 liegt intrazellulär in zwei verschiedenen Vesikelpopulationen vor, den Glut4-enthaltenden Vesikeln (GSV – Glut4 containing vesicles) und den „recycling endosoms“, wobei erstere primär für die

Insulin-abhängige Translokation des Glut4 verantwortlich zu sein scheinen (Pessin et al., 1999). Neuere Studien konnten zeigen, dass der Glut4 aus perinukleär lokalisierten GSV in Abhängigkeit vom Mikrotubulinetzwerk der Zelle in die Plasmamembran gelangt (Guilherme et al., 2000; Olson et al., 2001; Patki et al., 2001).

Die Existenz eines Insulin-sensitiven Glukosetransporters, dem Glut4, und die mit dem Krankheitsbild des Diabetes mellitus einhergehenden Stoffwechselstörungen, warfen die Frage auf, ob die Ausprägung dieser Krankheit mit einem veränderten Expressionsmuster dieser Isoform verbunden ist. Eine methodische Herangehensweise, um die Funktion des Glut4 zu untersuchen, war die Herstellung Glut4-defizienter Mäuse. Ein Ausschalten des Glut4-Gens zeigte, dass heterozygote Mäuse einen ausgeprägteren Phänotyp ausbilden als homozygote Mäuse (Charron et al., 1999; Katz et al., 1995; Stenbit et al., 1997). Während Glut4^{-/-}-Mäuse eine erhöhte Insulintoleranz aufweisen (Katz et al., 1995), entwickeln sie keinen Diabetes, wie es in Glut4^{+/-}-Mäusen beobachtet werden konnte (Charron and Katz, 1998; Stenbit et al., 1997). Überraschend war der Befund, dass Muskelzellen weiblicher Glut4-defizienter Tiere einen Insulin-abhängigen Glukosetransport zeigen, der nicht auf eine Expression der bisher bekannten Isoformen zurückgeführt werden konnte (Stenbit et al., 1996). Die Autoren dieser Studie postulierten die Expression einer weiteren, Insulin-abhängigen Isoform der Glukosetransporterfamilie, was mit der Klonierung des Glut8 bestätigt werden konnte (Carayannopoulos et al., 2000).

1.2.5 Glukosetransporter 5

Durch Bell und Kollegen wurde 1990 aus humanen Gewebe ein weiterer Glukosetransporter kloniert, der Glut 5 (Kayano et al., 1990). Das Protein weist nur eine geringe Homologie (40%) zu den bis zu diesem Zeitpunkt bekannten Isoformen (Glut1-4) auf und wurde später ebenfalls in Spezies wie der Ratte (Rand et al., 1993) und dem Kaninchen (Miyamoto et al., 1994) nachgewiesen. In Geweben wie dem Dünndarm (besonders Duodenum und Jejunum) und der Niere wird diese Isoform sehr stark exprimiert, während geringe Mengen des Proteins auch im Muskel - und Fettgewebe (Shepherd et al., 1992), im Hirn und in Spermatozoen (Burant et al., 1992) vorliegen. Der Befund einer apikalen Lokalisation des Glut5 in den Epithelzellen des Dünndarms und der Niere war zunächst überraschend (Davidson et al., 1992). Die Expression eines Glukosetransporters in den apikalen Membranen

könnte den paradoxen Effekt des Effluxes der aktiv (s.u. SGLT-I) durch diese Zellen aufgenommenen Glukose hervorrufen (Gould, 1997). Die Studien von Burant et al. zeigten jedoch, dass der Glut5 Fruktose transportiert (Burant et al., 1992).

Reguliert wird die Expression des Glut5 u.a. durch Fruktose (Burant et al., 1992; Inukai et al., 1993; Miyamoto et al., 1994), hohe Blutglukose (Corpe et al., 1996) und cAMP (Mahraoui et al., 1994). Der Glut5 wird über Signaltransduktionswege der PI3-Kinase und MAP-Kinase reguliert, wobei weniger die Expression als vielmehr die intrinsische Aktivität des Fruktosetransporters einer Änderung unterliegt (Helliwell et al., 2000).

1.2.6 Glukosetransporter 8 = GlutX1

Auf der Basis homologer Bereiche der Glukosetransportersequenzen 1-5 führte das Screenen von Nukleotidsequenzdatenbanken zur Klonierung des GlutX1 (Ibberson et al., 2000) bzw. Glut8 (Carayannopoulos et al., 2000; Doege et al., 2000b). Die Proteinsequenz des Glut8 besitzt hohe Homologien zu pflanzlichen und bakteriellen Transportern (vgl. Ibberson et al., 2000), während sie nur zu 29-32% mit den Isoformen von Säugetierarten übereinstimmt. Wesentliche Unterschiede zu den bisher beschriebenen Isoformen bestehen in der Glykosylierungsstelle des Glut8, die sich nicht zwischen den transmembranen Helices 6 und 7, sondern 9 und 10 befindet (Carayannopoulos et al., 2000; Ibberson et al., 2000). Gemeinsame Motive der Primärstruktur zwischen den Proteinen der Glukosetransporterfamilie wie GRR(K) oder EX₆(R/K) (Abbildung 1-1) kennzeichnen auch die Aminosäuresequenz des Glut8. Vergleichbar mit dem Glut4 weist der Glut8 ein Dileucin-Motiv im C-Terminus des Proteins auf. Dieses Motiv scheint für die intrazelluläre Lokalisation des Transporters verantwortlich zu sein. Die Funktionalität des Glukosetransporters liegt nach einer Translokation des Proteins in die Plasmamembran vor, wobei die Translokation nach einem Aminosäureaustausch (Ibberson et al., 2000) oder als Insulin-sensitiv nachgewiesen wurde (Carayannopoulos et al., 2000). Der Glut8 wird vor allem in Geweben wie Testis, Gehirn, Herz- und Skelettmuskel exprimiert. Der Nachweis dieser Isoform in adulten Rattentesti im Gegensatz zu präpubertalen, oestrogenbehandelten und maligne entarteten Rattenhoden weist auf eine hormonelle Regulation der Glut8-Expression hin (Doege et al., 2000b). Eine erhöhte Transkription des Glut8 konnte im Hippokampus diabetischer Mäuse gezeigt werden, wobei kein Effekt auf die Expression des Proteins vorlag (Reagan et al., 2001).

1.2.7 Glukosetransporter 9

Zwei nicht identische Glukosetransporterproteine wurden unter der Bezeichnung Glut9 publiziert (Doege et al., 2000a; Phay et al., 2000a). Die Arbeiten der Gruppe Phay beschreiben eine Glut9-Nukleotidsequenz mit 1620bp, die ein Protein mit 540 Aminosäuren kodiert. Die Isoform wird in der Niere, Leber und Plazenta transkribiert. Der Nachweis eines funktionellen Transporterproteins wurde bisher nicht vorgenommen.

Doege et al. (2000a) beschreiben die Expression einer Glukosetransporterisoform (Glut9) in lymphatischen Geweben wie Milz und peripheren Leukozyten sowie im Gehirn. Die Primärstruktur des Proteins zeigte eine hohe Homologie zu dem Glut8. Neben einer Glykosylierungsstelle zwischen den Helices 7 und 8 fehlt dieser Isoform das für die Substratbindung wichtige QLS-Motiv (Seatter et al., 1998). Das Protein ist durch das Vorliegen von zwei Argininpositionen in den Helices 7 und 8 gekennzeichnet (Doege et al., 2000a). Glukosetransport- und Cytochalasin B-Bindungsstudien wiesen für den Glut9 eine dem Glut2 ähnliche „low affinity-high capacity“ Kinetik nach (Doege et al., 2000a).

1.2.8 Glukosetransporter 10

Für zwei weitere Mitglieder der Proteine der Glukosetransporterfamilie liegen Nukleotidsequenzen vor. Beide Sequenzen wurden als Glut10 bezeichnet, wobei eine Glut10-Sequenz verbunden mit einer Expressionsstudie publiziert wurde (McVie-Wylie et al., 2001), während für die andere ein Genbankeintrag von Doege et al. (NP_110434) vorliegt.

Die Arbeitsgruppe um McVie-Wylie klonierte einen Glukosetransporter, der aufgrund seiner Lokalisation auf dem Chromosom 20q13.1 als Kandidatengen im Zusammenhang mit Diabetes mellitus diskutiert wurde. Die Studie beinhaltet einen Transkriptionsnachweis des Transporters, der vor allem in der Leber und im Pankreas exprimiert wird (McVie-Wylie et al., 2001). Es bleibt zu zeigen, ob ein Protein translatiert wird und welche Funktion dieser Isoform zukommt.

1.3 Der aktive, Natrium-abhängige Glukosetransport

Der aktive, an Natrium gekoppelte Transport von Glukose wurde 1961 beschrieben (Crane et al., 1961). Hediger und Koautoren konnten 1987 die cDNA des SGLT-I aus Dünndarm-RNA vom Kaninchen klonieren (Hediger et al., 1987). Neben dem SGLT-I wurde noch ein zweiter aktiver Glukosetransporter, der SGLT-2, durch Screenen einer humanen Nieren-cDNA-Bibliothek isoliert (Wells et al., 1992). Beide Isoformen unterscheiden sich in ihrem Expressionsmuster, der Kinetik des Glukosetransportes und der Substratspezifität. Während der SGLT-I zwei Natriumionen je Molekül Glukose transportiert, benötigt der SGLT-2 ein Natriumion für den Symport. Die Untersuchungen zur Kinetik des Natrium-gekoppelten Glukosetransportes wiesen einen „high affinity“- für den SGLT-I ($k_m = 0,1-0,8\text{mM}$) und „low affinity“-Mechanismus für den SGLT-2 ($k_m = 1,5-6\text{mM}$) nach. Während der SGLT-I sowohl im Dünndarm als auch in der Niere (proximaler Tubulus, S1-Bereich) vorkommt, ist der SGLT-2 ausschließlich in den S3-Bereichen der proximalen Tubuli lokalisiert. Der SGLT-I transportiert neben dem Substrat Glukose auch Galaktose, während der SGLT-2 nur eine Affinität gegenüber Glukose aufweist. Beide Isoformen ermöglichen den Zellen eine gegen den Konzentrationsgradienten gerichtete Aufnahme von Glukose. Sie sind in den apikalen Membranen der Epithelzellen des Dünndarms und der Nierentubuli lokalisiert und im Zusammenspiel mit dem in den Basalmembranen vorliegendem Glut2 für die Resorption der Glukose verantwortlich (Hediger and Rhoads, 1994). Der SGLT-I besitzt auch die Funktion einer Wasserpore (Loike et al., 1996). Patienten mit einem Defekt des Natrium-abhängigen Glukosetransportes zeigen eine durch gestörte Glukose-Galaktose-Resorption verursachte Diarrhoe, die mit einer Glukose-Galaktose-Diät behandelt werden kann (Turk et al., 1991). Streptocotozin-induzierter Diabetes führt bei Ratten zu einer Veränderung der Expression des SGLT-I sowohl in der Niere als auch im Dünndarm (Burant et al., 1994; Harris et al., 1986; Miyamoto et al., 1991; Yasuda et al., 1990). Neue Wege in der Behandlung von Diabetes mellitus setzen u.a. auf die Verwendung spezifischer Inhibitoren des SGLT-I (Arakawa et al., 2001; Tsujihara et al., 1999; Wagman and Nuss, 2001), um Krankheitsbilder wie diabetische Nephropathie, Proteinurie und Hyperglykämie der Niere zu kontrollieren (Burant et al., 1992).

1.4 Glukose und Glukosetransporter in Präimplantations-embryonen von Säugetieren

1.4.1 Das Energiesubstrat Glukose und die Entwicklung von Präimplantationsembryonen

Die Aktivierung des embryonalen Genoms in Präimplantationsembryonen von Säugern geht einher mit einer Umstellung des embryonalen Metabolismus von einer Pyruvat/Laktatverwertung zur Metabolisierung von Glukose (Rind: Javed and Wright, 1991; Khurana and Niemann, 2000). Geringe Mengen Glukose werden in frühen Teilungsstadien über den Pentosephosphatweg (PPP) metabolisiert, während mit der Aktivierung des embryonalen Genoms die Aktivität des Embden-Meyerhof-Parnas-Weges (EMP - Glykolyse) ansteigt (Rind: Javed and Wright, 1991; Rieger et al., 1992a; Rieger et al., 1992b). Die Umstellung des embryonalen Stoffwechsels von der Pyruvat/Laktatverwertung zum Glukosemetabolismus ist an die Aktivierung eines „Schrittmacherenzym“ der Glykolyse, der Phosphofruktokinase, gebunden (Barbehenn et al., 1974; Barbehenn et al., 1978).

Glukose vermindert die Entwicklungsfähigkeit von Embryonen in Spezies wie Mensch (Coates et al., 1999) oder Hamster (Ludwig et al., 2001), während die Embryonalentwicklung bei Maus (Biggers and McGinnis, 2001), Schaf (McGinnis and Youngs, 1992) oder Schwein (Hagen et al., 1991) an das Vorliegen des Energiesubstrates gebunden ist. Die Arbeiten von Chatot et al. (1994) und Martin und Leese (1995) an Embryonen der Maus zeigten, dass ohne das Vorliegen von Glukose während der ersten Reifeteilungen (zwischen 22 bis 96h nach hCG) keine Blastozystenentwicklung möglich ist. Bereits eine Kurzzeitexposition von 4-Zell-Embryonen mit Glukose von einer Minute führte zur Blastozystenentwicklung und weist neben einer metabolischen Funktion auch auf eine Signalwirkung der Glukose hin (Chatot et al., 1994). Verschiedene Glukosekonzentrationen wiesen keinen negativen Effekt der Glukose auf die Embryonalentwicklung der Maus nach (Biggers and McGinnis, 2001).

Untersuchungen an Rinderembryonen zeigten, dass Glukose möglicherweise essentiell für das Schlüpfen der Blastozysten ist (Renard et al., 1980). Glukoseaufnahme und Entwicklungsfähigkeit von Rinderblastozyten scheinen positiv zu korrelieren (Dorland et al., 1992). In dem definierten Kulturmedium SOF wirken sich geringe Glukosekonzentrationen von 1,5mM positiv auf die Blastozystenentwicklung aus (Brackett et al., 1997; Iwata et al., 1998). Eine Kultur

von Zygoten ohne Glukose für 24h und das anschließende Wachstum in einem Medium mit 1,5mM bzw. 3,0mM Glukose erhöhte die Blastozystenrate (Furnus et al., 1997), während hohe Konzentrationen von 4,5mM bzw. 5mM die Entwicklung hemmten (Furnus et al., 1997; Iwata et al., 1998).

1.4.2 Glukosetransporterisoformen in Präimplantationsembryonen

1.4.2.1 Expressionsmuster, Lokalisation und Funktion

Im Vergleich verschiedener Säugetierspezies ist die Expression von Glukosetransporterisoformen für Präimplantationsembryonen der Maus gut charakterisiert. Präimplantationsembryonen der Maus exprimieren die Glukosetransporter 1-3 und 8 (Aghayan et al., 1992; Carayannopoulos et al., 2000; Hogan et al., 1991; Schultz et al., 1992). Glut1-RNA und -Protein werden in den frühen Embryonalstadien der Maus von der Eizelle bis zur Blastozyste exprimiert (Hogan et al., 1991). Während die Glut2-RNA bereits ab dem 8-Zellstadium nachzuweisen ist (Schultz et al., 1992), wird das Protein erst ab dem Morulastadium translatiert (Hogan et al., 1991). Die Expression der Glut3-RNA und Glut3-Proteins beginnt ab dem 4-/6-Zellstadium (Pantaleon et al., 1997). Der Glut8 wurde in Blastozysten der Maus lokalisiert (Carayannopoulos et al., 2000). Daten über eine Expression in früheren Stadien liegen nicht vor. Während der Glut4 in Embryonalstadien der Maus nicht nachgewiesen werden konnte (Aghayan et al., 1992; Hogan et al., 1991; Schultz et al., 1992), wurde diese Isoform in embryonalen Stammzellen der Maus und den sogenannten „embryoid bodies“ nachgewiesen, wo eine nukleäre Lokalisation des Proteins gefunden wurde (Navarette Santos et al., 2000c). Untersuchungen zur Expression des Glut5 in Präimplantationsembryonen sind bisher nicht vorgenommen worden.

Die Lokalisation von Glukosetransportern in Präimplantationsembryonen der Maus ermöglichte Aussagen zur Bedeutung einzelner Isoformen für die Glukoseaufnahme und mögliche Mechanismen der Glukosebereitstellung für den Embryo (Carayannopoulos et al., 2000; Pantaleon et al., 1997; Pantaleon and Kaye, 1998). Die Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Kaye zeigten, dass der Glut3 die entscheidende Rolle bei der Aufnahme externer Glukose spielt (Pantaleon et al., 1997). Ein aus den Studien zur Lokalisation des Glut2 (Aghayan et al., 1992) sowie den Untersuchungen zur Funktion der Glut1 und Glut3 in Blastozysten der Maus (Pantaleon et al., 1997) entwickeltes schematisches Modell (Abbildung 1-3) fasst die

Daten zur Lokalisation der Glukosetransporterisoformenten zusammen (Pantaleon and Kaye, 1998). Die neueren Ergebnisse eines in den Trophektodermzellen zytoplasmatisch lokalisierten Glut8, der unter Insulineinfluss in die apikalen Plasmamembranen transloziert wird (Carayannopoulos et al., 2000), sind in dieser Darstellung noch nicht berücksichtigt. Der Glut3 ist in den apikalen Membranen der Trophektodermzellen lokalisiert und für die Aufnahme der maternalen Glukose verantwortlich (Pantaleon and Kaye, 1998). Der Glut1 scheint aufgrund seiner Lokalisation vor allem die Glukoseaufnahme der Embryoblastzellen zu regulieren (Pantaleon and Kaye, 1998). Die Funktion des Glut2, welcher in den basolateralen Membranen der Trophektodermzellen lokalisiert ist und uniform verteilt in Plasmamembranen der Embryoblastzellen vorliegt (Aghayan et al., 1992), ist ungeklärt (Pantaleon and Kaye, 1998). Mit dem Nachweis der Expression des Insulin-sensitiven Glut8 in Mausblastozysten (Carayannopoulos et al., 2000), konnten die Befunde einer Insulin-stimulierten Glukoseaufnahme von Blastozysten (Pantaleon and Kaye, 1996) erklärt werden.

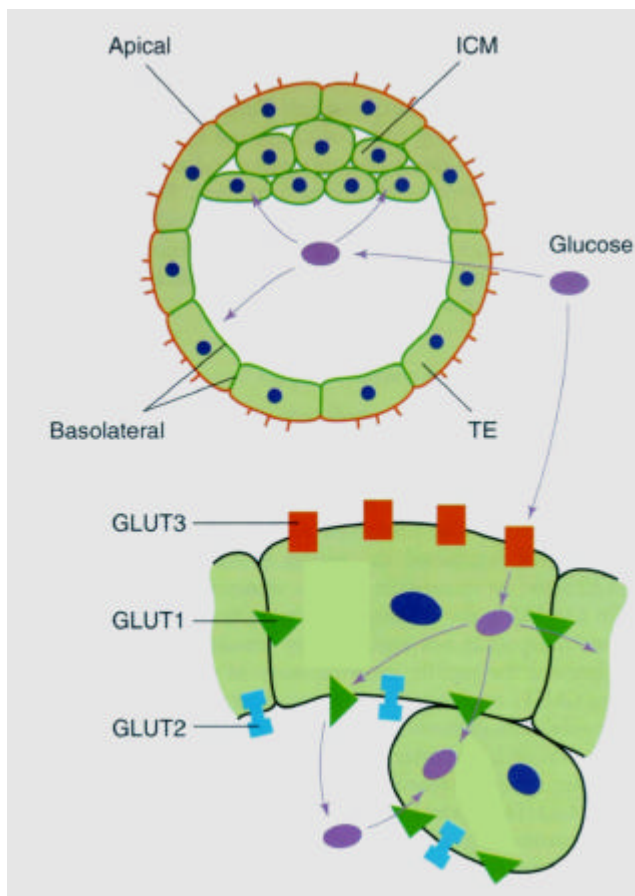


Abbildung 13 Schema des Modells für den Glukosetransport in Blastozysten der Maus. Der in den apikalen Zellmembranen der Trophektodermzellen (TE) lokalisierte Glut3 (orange) ist für die Aufnahme maternaler Glukose (violett) verantwortlich, während der Glut1 (grün) den Glukosetransport über die basolateralen Membranen reguliert. Die Funktion des Glut2 (hellblau), der ebenfalls in den basolateralen Membranen der Trophektoderm- und ICM-Zellen lokalisiert wurde, ist nicht geklärt (nach: Pantaleon and Kaye, 1998). Die Zellkerne sind blau dargestellt.

Die Ergebnisse zur Expression des Glut8 (Carayannopoulos et al., 2000) sind in dieser Darstellung nicht berücksichtigt.

Für frühe Embryonalstadien des Menschen (Dan-Goor et al., 1997) oder beim Schwein (Pantaleon et al., 2001) wurde die Expression des Glut1 nachgewiesen. Die Glukosetransporterproteine 1 und 3 werden in Kaninchenembryonen (Robinson et al., 1990) exprimiert. Transkripte des Glut1 sind in allen Stadien der Präimplantationsentwicklung bei Rinderembryonen nachweisbar (Lequarre et al., 1997; Navarrete Santos et al., 2000a). Der Insulin-sensitive Glut4 wird in elongierten Rinderblastozysten transkribiert (Navarrete Santos et al., 2000a).

1.4.2.2 Funktionelle Studien zur Expression von Glukosetransporterisoformen in Präimplantationsembryonen

Eine veränderte Expression von Glukosetransporterisoformen während der Entwicklung von Präimplantationsembryonen wurde bei einem Vergleich von *in vivo* mit *in vitro* Embryonen (Morita et al., 1994; Navarrete Santos et al., 2000a) bei einer Verwendung verschiedener Kulturmedien (Wrenzycki et al., 1999) oder beim Vorliegen von Hyperglykämie (Moley et al., 1998b) gefunden.

In vitro gewachsene Blastozysten der Maus weisen gegenüber *in vitro* produzierten Embryonen eine bis zu 50% reduzierte Transkription des Glut1 auf (Morita et al., 1994). In elongierten Stadien von *in vitro* produzierten 16 Tage alten Rinderblastozysten konnten im Gegensatz zu den *in vivo* gewachsenen Embryonen Glut4-Transkripte nachgewiesen werden (Navarrete Santos et al., 2000a).

Ein Vergleich der Glut1-Transkriptmengen von im SOF-Medium unter Zusatz von Polyvinylalkohol (PVA) oder Serum gewachsenen Embryonen zeigte eine signifikant erhöhte Expression des Transporters in 8-/16-Zellstadien der PVA-Gruppe.

Maternale Hyperglykämie resultierte in einer Herabregulation der Glut1-3 in Blastozysten der Maus (Moley et al., 1998b) und induzierte Apoptose (Moley et al., 1998b) über die BAX-vermittelte Apoptosekaskade durch eine verringerte Expression des Glut1 (Chi et al., 2000a).

1.4.3 **Der aktive Glukosetransport in Präimplantationsembryonen**

Das Vorliegen eines aktiven Mechanismus des Glukosetransportes in Präimplantationsembryonen ist umstritten. Indirekte Methoden wie Inhibitorstudien unter Verwendung von Phlorizin oder Messungen der Glukoseaufnahme in Natrium-freien Medien konnten keinen aktiven Glukosetransport nachweisen (Gardner and Leese, 1988; Gardner and Kaye, 1995). Dem widersprechen die Untersuchungen der

Arbeitsgruppe Wiley et al. (1991), die mit immunhistochemischen Methoden eine Lokalisation des Natrium-abhängigen Glukosetransporter in den apikalen Membranen früher Teilungsstadien von Mausembryonen zeigen konnte. Die Beobachtung einer mit Phlorizin inhibierbaren Expansion von Blastozysten weist ebenfalls auf die Expression eines aktiven Glukosetransporters hin (Wiley and Obasaju, 1989). Sie spricht weiterhin für eine mögliche Funktion eines gerichteten Flüssigkeitstransportes durch den SGLT-I (Loike et al., 1996; Loo et al., 1999).

1.5 Effekt von Insulin auf Präimplantationsembryonen

Rezeptoren für Insulin, IGF-I und IGF-II werden in Präimplantationsembryonen von Maus, Ratte, Kaninchen und dem Rind exprimiert (Herrler et al., 1998; Schultz et al., 1992; Zhang et al., 1994). Metabolische Kurzzeit- und mitogene Langzeiteffekte von Insulin (Shymko et al., 1999; Whitehead et al., 2000) konnten an Präimplantationsembryonen nachgewiesen werden.

Morulae und Blastozysten der Maus zeigen eine Insulin-stimulierte Proteinsynthese (Harvey and Kaye, 1988; Harvey and Kaye, 1991; Rao et al., 1990). In Schweineblastozysten wurden unter Insulineinfluss eine gesteigerte Proteinsynthese und Expansion der Embryonen nachgewiesen (Lewis et al., 1992). Insulin stimuliert die Glukoseaufnahme bei Mausblastozysten (Pantaleon and Kaye, 1996) und induziert die Translokation des Glut8 (Carayannopoulos et al., 2000). Neben den oben genannten Kurzzeiteffekten von Insulin konnten auch mitogene Langzeiteffekte wie erhöhte Zellzahlen bei Blastozysten der Maus (Harvey and Kaye, 1990) und des Rindes (Matsui et al., 1995) beobachtet werden. Eine Kultur von 2-Zell-Embryonen der Maus unter Insulinsupplementierung des Mediums resultierte in erhöhten Teilungs-, Kompaktierungs- und Blastozystenraten (Gardner and Kaye, 1991), wobei die erhaltenen Blastozysten vergleichbare Zellzahlen wie *in vivo* gewachsene Embryonen aufwiesen (Gardner and Kaye, 1991). Insulin bewirkt eine gesteigerte DNA- und RNA-Synthese in Blastozysten der Maus (Rao et al., 1990). Antiapoptotische Wirkungen von Insulin wurden für Kaninchenblastozysten beschrieben (Herrler et al., 1998). Einen Zusammenhang zwischen Insulin, Apoptose und Glukosetransport in Mausblastozysten konnten die Arbeiten von Chi et al. (2000) aufzeigen. Danach bewirkten hohe Insulin- und IGF-I-Konzentrationen eine Herabregulation des IGF-I-Rezeptors, was in einer reduzierten Glukoseaufnahme

des Embryos resultierte, die schließlich eine erhöhte Apoptose auslöste (Chi et al., 2000a; Chi et al., 2000b).

1.6 Insulin und Glukosetransporter: Regulation und Signaltransduktion

Die Mechanismen des Einflusses von Insulin auf die Expression und Translokation von Glukosetransportern sind für den Glut4 sehr gut charakterisiert. Für andere Glukosetransporterisoformentypen liegen hingegen nur wenige Daten einer Insulin-regulierten Transkriptions-, Translations- und Translokationskontrolle vor. Die Abbildung 1-4 fasst die Wege der Insulin/IGF-I-Signaltransduktionskaskade zusammen, die an einer Regulation der Glukosetransporterexpression (RNA und Protein) und –translokation beteiligt sind (nach: Taha and Klip, 1999).

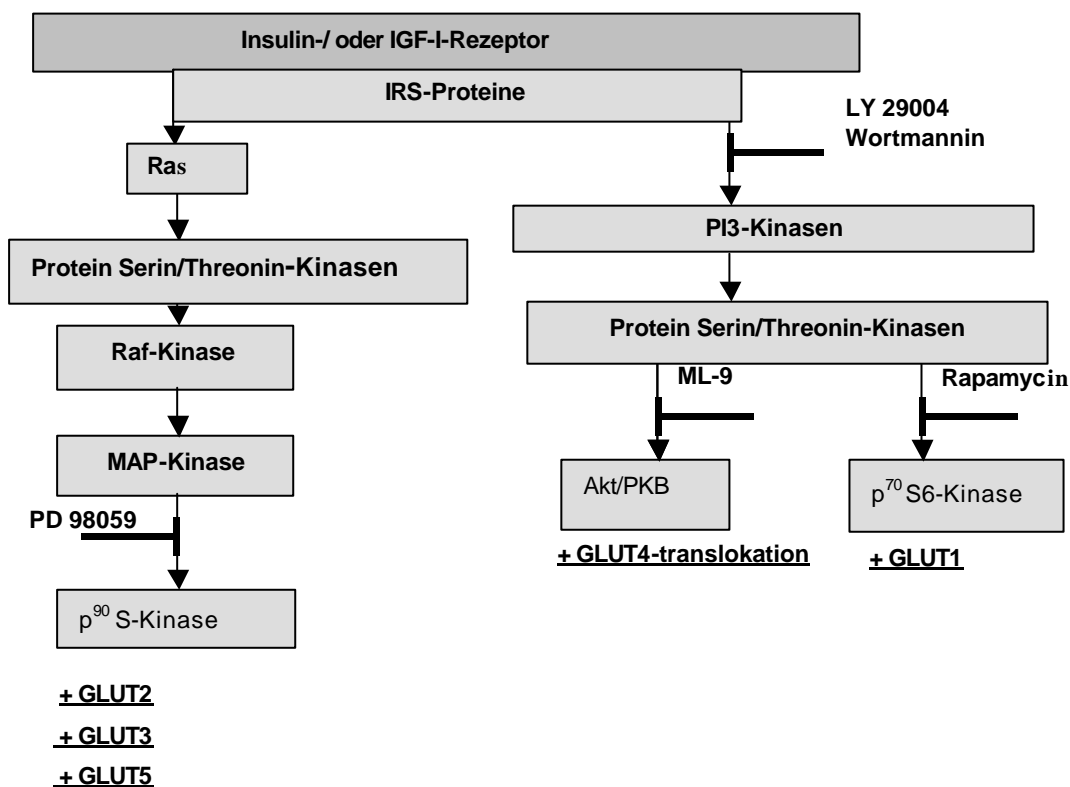


Abbildung 1-4 Verkürzte Darstellung der Insulin/IGF-I-Signaltransduktionswege, die an einer Regulation der Glukosetransporterexpression (RNA; Protein) und –translokation beteiligt sind (verändert nach: Taha and Klip, 1999).

Wie aus der Abbildung 1-4 hervorgeht, werden die einzelnen Glukosetransporterisoformentypen durch Insulin über verschiedene Signaltransduktionswege angesprochen. Der Glut4 wird sowohl in seiner

Transkription als auch Translokation über den PI3-Kinase vermittelten Signalweg der Akt/PKB kontrolliert (Hernandez et al., 2001). Die spezifische Regulation des Glut4 durch Insulin über die Aktivierung der Akt/PKB-Kinase konnte unter Verwendung des kürzlich beschriebenen Inhibitors ML-9 der Akt/PKB-Kinase (Smith et al., 2000) gezeigt werden (Hernandez et al., 2001).

Der Glut1 wird durch Insulin über die PI3-Kinase-abhängige $p^{70}S6$ -Kinase in seiner Expression und Translokation in die Plasmamembran beeinflusst (Taha et al., 1995; Taha et al., 1997). Eine Akt/PKB-vermittelte Signaltransduktion scheint ebenfalls die Expression des Glut1 zu regulieren (Barthel et al., 1999; Taha et al., 1999).

Der Signalweg der MAP-Kinase ist hingegen an der Regulation des Glut3 (Taha et al., 1995; Taha et al., 1997) und der Isoformen 2 und 5 beteiligt (Helliwell et al., 2000). Für den Glut8, der eine dem Glut4 vergleichbare Insulin-sensitive Translokation aufweist (Carayannopoulos et al., 2000), liegen bisher keine Daten über eine Regulation dieses Transporters durch Insulin/IGF-I-Signaltransduktionswege vor.

1.7 Zielstellung der Arbeit

Glukose ist essentiell für die Entwicklung von Präimplantationsembryonen (Chatot et al., 1994; Martin and Leese, 1995). Spezifische Glukosetransporterisoformen regulieren die Glukoseaufnahme der Zelle (Gould, 1997). Insulin kontrolliert die Transkription, Translation und Translokation der Glukosetransporterproteine (Taha and Klip, 1999) und nimmt Einfluß auf die Entwicklung von Präimplantationsembryonen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression von Glukosetransporterisoformen in den verschiedenen Entwicklungsstadien von Präimplantationsembryonen des Rindes zu untersuchen. Die entscheidende Grundlage dieser Arbeit bildete die Klonierung bisher unbekannter boviner Glukosetransporter-cDNA. Die Lokalisation von Glukosetransporterisoformen, eine vergleichende Betrachtung der Expression dieser Gene zwischen *in vivo* und *in vitro* gewachsenen Embryonen sowie Untersuchungen zur transkriptionellen Kontrolle dieser Gene durch Insulin wurden durchgeführt, um Aussagen zur Funktion und Regulation einzelner Isoformen in Präimplantationsembryonen des Rindes treffen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Klonierung und Sequenzierung boviner Glukosetransporter cDNA

Für die Studien zur Expression von Glukosetransportern während der Präimplantationsentwicklung von Rinderembryonen war es notwendig, die zu Untersuchungsbeginn noch unbekannten bovinen cDNA-Sequenzen für die einzelnen Isoformen zu ermitteln. Neben dem Screenen von cDNA-Banken und dem Einsatz verschiedener Hybridisierungsmethoden oder der Datenbankrecherche von Einträgen sogenannter „expressed sequence tags“ (EST) ist es auch möglich, unter Verwendung degenerierter PCR-Primer, welche unter Berücksichtigung konservierter Bereiche bekannter Sequenzen von verschiedenen Spezies konstruiert werden, das interessierende Transkript der entsprechenden Spezies mit RT-PCR zu amplifizieren und dessen Sequenz zu bestimmen.

2.1.1 Gesamt-RNA Extraktion aus Gewebe

Gesamt-RNA aus Geweben wurde durch Phenol/Chloroform-Extraktion (Chomczynski and Sacchi, 1987) unter Verwendung von Trizol (Life Technologies, Eggenstein) nach Angaben des Herstellers gewonnen. In Flüssigstickstoff gemörsertes Gewebe wurde nach Zugabe von 1mL Trizol mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Nach Hinzufügen von 0,2mL Chloroform wurde für 3min bei RT inkubiert und zur Trennung der wässrigen von der phenolischen Phase für 15min bei 13000g und 4°C zentrifugiert. Die in der wässrigen Phase vorliegende RNA wurde mit 0,5mL Isopropanol präzipitiert und für 20min mit 13000g bei 4°C sedimentiert. Das Pellet wurde nach dem Waschen mit 70%igen Ethanol sedimentiert, bei RT getrocknet und in 100µL DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert. Mögliche Kontamination der Gesamt-RNA mit genomischer DNA wurde durch einen DNase I Verdau entfernt: die in DEPC-Wasser vorliegende Gesamt-RNA wurde nach Zugabe von RNase-Inhibitor, NaOAc, MgSO₄ sowie 1U DNase I je µg RNA für 1h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Enzymreaktion erfolgte durch Hitzedenaturierung bei 80°C für 15min. Die RNA wurde mit 96%igem Ethanol und 3M NaOAc präzipitiert, nach Sedimentation mit 70%igen Ethanol gewaschen und abschließend in 100µL DEPC Wasser resuspendiert.

Die Konzentrationsbestimmung der erhaltenen Gesamt-RNA erfolgte mit einem UV-Photospektrometer (Pharmacia, Freiburg) durch Bestimmung der optischen Dichte bei 260nm (O.D. 1 = 40µg RNA/ mL).

2.1.2 Reverse Transkriptase Reaktion – cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA

In einem Reaktionsvolumen von 20µL wurden 3µg Gewebe Gesamt-RNA in komplementäre DNA (cDNA) unter Verwendung der Superscript II Reverse Transkriptase (Life Technologies) umgeschrieben:

RNA		xµL
oligo(dT) ₁₂₋₁₈ (500ng/µL)		1µL
dNTP Mix 10mM		1µL
DTT 0,1M		2µL
Superscript II		1µL
Wasser	ad	20µL

Die RNA wurde mit dem oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer bei 68°C für 2min präinkubiert. Nach dem Denaturierungsschritt wurden alle weiteren Reagenzien bei 4°C zugegeben und folgende Reaktionsbedingungen schlossen sich an: 10min bei 22°C, 1h bei 43 °C und 15min bei 50 °C. Das Reaktionsgemisch wurde mit Wasser ad 100µL aufgefüllt.

2.1.3 Polymerase – Ketten – Reaktion (PCR)

2.1.3.1 PCR - Primer

Degenerierte Primer zur Amplifikation unbekannter boviner cDNA-Sequenzen wurden auf der Basis der ausgewiesenen homologen Bereiche von „multiple alignments“ bekannter Sequenzen verschiedener Spezies mit Hilfe des Software Programms Gene Runner 3.0 konstruiert. Die Tabelle 2-1 (Anhang) fasst sowohl die degenerierten Primer, die zur Amplifikation unbekannter boviner cDNA-Sequenzen führten, als auch die rindspezifischen Primerpaare zusammen.

2.1.3.2 PCR - Reaktionsbedingungen

Die cDNA-Amplifikation erfolgte in 50µl Gesamtvolumen:

cDNA	xµL
Primer Mix je 25pM	1µL
dNTP Mix 10mM	1µL
Puffer 10x	5µL
MgCl ₂ 50mM	1,5µL
Wasser	xµL
Taq Polymerase (Life Technologies)	0,2µl

Die Reaktion wurde mit Öl überschichtet und in einem programmierbaren Heizblock der Firma Biometra unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung	94°C	3min	} x Zyklen
Denaturierung	94°	30sec	
Primerannealing	50-60°C	30sec	
Elongation	72°C	45sec	
Elongation	72°C	5min	

In Abhängigkeit der verwendeten Primer und der zu bearbeiteten Fragestellung wurden verschiedene Annealing-Temperaturen und Zyklenzahlen gewählt. Überprüft wurden die PCR-Amplifikate nach elektrophoretischer Trennung in einem Agarosegel (1,8%) mit Ethidiumbromid durch Visualisierung unter UV-Licht. Als Elektrophoresepuffer diente TAE (40mM Tris-Acetat, 1mM EDTA, pH 8,0).

2.1.4 **Klonierung von DNA – Fragmenten und Sequenzierung**

2.1.4.1 Ligation und Transformation

Durch Sequenzierung zu verifizierende PCR-Produkte wurden nach gelelektrophoretischer Trennung aus der Agarose mit dem Wizard Kit (Promega) gereinigt. Die Ligation der säulengereinigten PCR-Fragmente erfolgte in den pGEM-T-Vektor (Promega) nach den Angaben des Herstellers: 5-10µL DNA, 2µL Ligationspuffer, 50ng pGEM-T-Vektor, 1U T4 Ligase, Wasser ad 20µL bei 16°C über Nacht. Für die Transformation standen kompetente E. coli-XL-1Blue-Zellen zur Verfügung. Nach

Auftauen von 100 µL Zellsuspension für 10min bei 4°C und Zugabe von 10µL Ligationsansatz wurde der Ansatz für 20min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde 45s auf 42°C erwärmt, 2min auf Eis gestellt, mit 800µL LB-Medium (1% Pepton, 0,5% Hefe-Extrakt, 1% NaCl) versetzt und zur Vermehrung der Zellen für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde auf Agarplatten mit Selektionsmedium ausplattiert (LB-Medium mit 1,5% Agar, 50µg/mL Ampicillin, 40µg/mL X-Gal, 0,2mM IPTG) und über Nacht bei 37°C angezüchtet. Zellen weißer Einzelkolonien wurden in 3mL LB-Medium mit 50µg/mL Ampicillin überimpft und über Nacht bei 37°C vermehrt.

2.1.4.2 Plasmidpräparation und Sequenzierung

Plasmid-DNA wurde mit dem GFX *Micro* Plasmid Prep Kit (Amersham-Pharmacia, Freiburg) isoliert. Durch doppelten Restriktionsverdau des Plasmides mit geeigneten Enzymkombinationen wie *Apal/SacI* oder *NcoI/NotI* und anschließender Agarosegelelektrophorese wurde der Vektor auf die DNA-Insertion geprüft. Die Sequenzierung des klonierten DNA-Inserts erfolgte nach der Methode von Sanger (Sanger et al., 1977; Sanger et al., 1992) mit dem „ABI Prism Ready Reaction Dyedexoxy Terminator Sequencing Kit“ der Firma Applied Biosystems - Perkin Elmer. Durch den Einsatz von T7 bzw. sp6 Primer wurden beide DNA-Stränge des Inserts sequenziert. Ca. 0,5µg Plasmid DNA, 10pmol Primer, 8µL Dyedexoxy Terminator – Mix und Wasser ad 20µL wurden in einem Heizblock (Biometra Uno) für 28 Zyklen mit je 96°C für 30s, 45°C für 15s und 60°C für 4min inkubiert. Die DNA wurde mit 96%igem Ethanol und 8M Ammoniumacetat präzipitiert und das Pellet nach Trocknung unter Vakuum in 4µL Formamid (Ladepuffer) resuspendiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Probe wurde im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Medizinischen Fakultät der MLU mit einem ABI 373 der Firma Applied Biosystems – Perkin Elmer durchgeführt.

2.1.5 **Sequenzanalyse und Datenbankvergleich**

Die DNA-Sequenzdaten wurden mit dem „Basic Local Alignment Tool“ (BLAST) Programm des National Center for Biotechnology Information (NCBI) im BLASTn searchmode mit den Sequenzen der Datenbank verglichen. Unter Verwendung der Gene Runner 3.0 Software wurden die Proteinsequenzen der Nukleotide abgeleitet und ein Datenbankvergleich im BLASTp searchmode vorgenommen.

2.2 Proteinnachweis

Kommerziell erhältliche Glukosetransporter-Antikörper sind vorwiegend gegen Epitope der Proteine von Mensch oder Maus gerichtet. Zum Nachweis von Glukosetransporterproteinen in Rinderembryonen wurden verschiedene Antikörper auf Kreuzreaktivität mit Rinderprotein sowohl im Western Blot als auch mit der Immunhistochemie getestet. Eine Zusammenfassung der verwendeten Antikörper findet sich in Tabelle 2-2 (Anhang).

2.2.1 Western Blot

2.2.1.1 Proteinpräparation

Gewebeproben wurden in flüssigem Stickstoff gemörst und im Extraktionspuffer (PBS, 1% Nonidet NP-40, 0,5% Na-Deoxycholat, 0,1% SDS) mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Nach Zugabe von Phosphatase- und Protease-Inhibitoren (Sigma, Deisenhofen) wurden die Proben für 30min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer wurden bei 10000rpm sedimentiert und die Proteinkonzentration des Überstandes photometrisch bei 595nm mit dem „Biorad-Protein-Assay“ (Bradford, 1976) bestimmt.

2.2.1.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Eine denaturierende SDS-PAGE mit einem 10%igen Trenngel wurde für die Auftrennung der Proteine in einem Größenbereich von 20-80kDa genutzt. Die Proteinproben wurden 1:1 mit Ladepuffer (20% Glycerol, 5% SDS, 10µM DTT, 250mM Tris/HCl pH 6,8, 0,02% Bromphenolblau) gemischt und für 7min bei 95°C denaturiert. 20µg Gesamtprotein wurden je Bahn aufgetragen und gelelektrophoretisch getrennt (Laemmli, 1970).

2.2.1.3 Immunoblot

Nach gelelektrophoretischer Trennung erfolgte das Übertragen der Proteine auf eine Zellulosemembran (ECL Membran, Amersham-Pharmacia, Braunschweig) mit dem Semidry Blotsystem (Bio-Rad) für 45min bei 250mA und unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems. Die Effizienz des Transfers wurde durch reversible Proteinfärbung mit 0,1% Ponceau-S/7% Trichloressigsäure überprüft.

Anschließend wurden freie Bindungsstellen der Proteine durch Inkubation der Zellulosemembran in 5% Magermilch in TBST für 45min bei RT unter Schütteln blockiert. Nach kurzem Waschen der Membran in TBST erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers (verdünnt in 10%FCS in TBST) für 90min bei RT unter leichtem Schütteln. Die Membran wurde 2x5min in 10%FCS in TBST sowie 2x10min in TBST gewaschen und anschließend für 45min mit dem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (verdünnt in 10%FCS in TBST) inkubiert. Nach Waschen der Membran für 5min in 10% FCS in TBST, 10min TBST und abschließend für 10min in TBS wurden spezifisch markierte Proteinbanden durch Oxidation des Substrates Luminol mit „Enhanced Chemiluminescence“ (Amersham-Pharmacia, Braunschweig) detektiert und die Emission auf einem Röntgenfilm visualisiert.

2.2.2 Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbungen wurden an 5µm Schnitten paraffineingebetteter Gewebe durchgeführt. Nach Entparaffinieren in Xylol und Rehydration in einer absteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte in TBST (Tris-gepufferte Saline, pH 7,4; 0,1% TritonX-100) überführt. Endogene Peroxidasen wurden durch Behandlung mit 3% H₂O₂ in MeOH (20min) inaktiviert und nach Waschen in TBST unspezifische Wechselwirkungen der Antikörper mit 10% Ziegenserum und 3% BSA in TBST blockiert (30min). Im Anschluß wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper (in 3% BSA in TBST) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Waschen der Schnitte für 3x10min in TBST wurde ein „horse radish“-Peroxidase (HRP)-konjugierter-Sekundärantikörper für die Detektion spezifischer Immunreaktion verwendet (1h bei RT). Die Schnitte wurden für 2x5min in TBST, abschließend 5min in TBS gewaschen und die Immunreaktion mit dem Substrat Diaminobenzidin, welches nach Oxidation durch die Peroxidase polymerisiert und ein braunes Präzipitat bildet, visualisiert. Als Negativkontrolle wurden Ansätze ohne Inkubation mit dem Primärantikörper mitgeführt.

2.3 Expression von Glukosetransportern in *in vitro* produzierten Präimplantationsembryonen des Rindes

2.3.1 Untersuchungsmaterial

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden *in vitro* gewonnene Rinderoozyten und Embryonen eingesetzt. Die Embryonen wurden bis zum Blastozystenstadium am Tag 8 nach Befruchtung (p.i. – post insemination) *in vitro* kultiviert. Elongierte Blastozysten der Stadien Tag 14 und Tag 16 wurden nach *in vitro* Reifung und Befruchtung (IVM/IVF) von Rindereizellen gewonnen (s. 2.3.4).

2.3.2 *In-vitro*-Produktion von Rinderembryonen

Die Produktion von Embryonen *in vitro* (IVP) basiert im wesentlichen auf vier Schritten: der Eizellgewinnung, der Eizellreifung *in vitro* (IVM), der *In-Vitro*-Fertilisation (IVF) sowie der sich anschließenden *In-Vitro*-Kultur (IVC) der nach IVM/IVF erhaltenen Zygoten.

Die für die einzelnen IVP-Schritte eingesetzten Medien sind in der Tabelle 2-3 (Anhang) zusammengefasst. Wenn nicht anderweitig erwähnt, wurden alle für die IVP verwendeten Chemikalien von der Firma Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.3.2.1 Eizellgewinnung

Eizellen wurden aus Schlachthofovarien isoliert, welche kurz nach dem Schlachten der Tiere entnommen wurden. Die Ovarien stammten zumeist von Kühen und Färsen der Holstein-Rasse. Sie wurden in sterilen Flaschen in PBS mit Antibiotika und Antimykotika (cat#A5955) bei 37°C aufbewahrt. Innerhalb von 1-2 Stunden erfolgte der Transport in das Labor, wo die Ovarien zweimal mit frischem PBS gewaschen wurden. Für die Gewinnung der Eizellen wurde die Methode des „Slicen“ (Xu et al., 1992) angewendet. Der Kortex des Ovars wird mittels Rasierklingen mehrfach zerschnitten. Aus angeschnittenen Follikeln werden die Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK) frei und durch Waschen des Ovars in das „slicing“-Medium (Tabelle 2-3 - Anhang) gespült. Anschließend wurde das „slicing“-Medium zum Entfernen grober Gewebeteile durch ein Sieb gegeben. Nach 10 minütiger Sedimentation der KOK wurde der Überstand abgenommen und die verbleibende Suspension in 15 mL Falcon-Röhrchen gegeben. Nach wiederholter Sedimentation wurde das Pellet mit einer sterilen Glaspipette entnommen, in eine 90mm Petrischale überführt und mit

„slicing“-Medium verdünnt. Die Suche der KOK in der nunmehr vorliegenden Suspension erfolgte mit dem Stereomikroskop. Die KOK wurden nach morphologischen Kriterien wie Kumuluszellanordnung und Ooplasmastruktur klassifiziert (Leibfried and First, 1979). KOK mit nicht expandierten Kumuluszellen und einem homogenen Ooplasma (Klasse I und II) wurden selektiert, in TCM-D-Medium (Tabelle 2-3 – Anhang) überführt und anschließend in das Reifungsmedium gegeben. Die Eizellgewinnung war innerhalb von 2 Stunden nach Eintreffen der Ovarien im Labor abgeschlossen.

2.3.2.2 In-vitro-Maturation

Die Eizellreifung erfolgte in Gruppen von 30-40 KOK in 500µL Reifungsmedium (Tabelle 2-3 - Anhang), dem 10IU/mL PMSG und 5IU hCG (Suigonan – Intervet) hinzugefügt wurden. Die KOK wurden für 24h bei 39°C und 5% CO₂ kultiviert. Zwei Kriterien, die Expansion der Kumuluszellen und die Kernreifung (Anteil der Oozyten im Metaphase-II-Stadium der Meiose), dienten zur Beurteilung der Maturation *in vitro* (First et al., 1988; Sirard and First, 1988). Für die Kontrolle der Kernreifung wurden nach mechanischem Entfernen der Kumuluszellen die Oozyten in Ethanol mit Eisessig (3:1) über Nacht fixiert, anschließend auf Objektträger gebracht und die Chromosomen mit Lacmoid gefärbt.

2.3.2.3 In-vitro-Fertilisation

2.3.2.3.1 Spermienpräparation

Für die Fertilisation der Oozyten *in vitro* wurde tiefgefrorenes, auf Fertilität getestetes Bullensperma verwendet (Quelle: Institut für Tierzucht und Tierverhalten (FAL), Neustadt). Das bei 34°C für eine Minute im Wasserbad aufgetaute Sperma wurde unter dem Lichtmikroskop auf Motilität geprüft. Als Technik der Spermienpräparation zur Gewinnung hoch motiler Spermatozoen wurde die Percoll-Gradientenzentrifugation verwendet (Moohan and Lindsay, 1995; Mortimer, 1994; Van der Zwalm et al., 1991). Ein diskontinuierlicher Percollgradient von 45% und 90% wird mit dem aufgetauten Sperma überschichtet. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 600g wurde das Pellet mit 5mL TALP „Ca⁺⁺ free“ gewaschen und für 10min bei 200g sedimentiert. Das Spermienpellet wurde in IVF-Medium aufgenommen.

2.3.2.3.2 Oozyten-Spermien-Kokultur

Nach 24h Maturation *in vitro* wurden die Oozyten in TALP-Medium (Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate) gewaschen. Als Fertilisationsmedium diente IVF-TALP, welches durch Zugabe der Kapazitationsfaktoren Heparin, Hypotaurin und Epinephrin zum TALP-Medium hergestellt wurde. Die *In-vitro*-Fertilisation erfolgte durch gemeinsame Kultur von Oozyten und Spermien für 18-20h bei 39°C und 5%CO₂ in mit Öl überschichteten 100µL Tropfen IVF-TALP. Dabei wurden je Tropfen 15-20 Oozyten mit 1x10⁶ Spermien/mL kultiviert. Die Fertilisationsrate wurde durch Anfärben der Vorkerne einiger repräsentativer Zygoten mit Lacmoid ermittelt (s.u.).

2.3.2.4 In-vitro-Kultur

Die *In-Vitro*-Kultur der Rinderembryonen wurde in einem definierten Medium, dem „synthetic oviductal fluid“ (SOF, modifiziert nach Tervit et al 1972), vorgenommen. Die befruchteten Eizellen (Zygoten) wurden durch dreiminütiges Schütteln (Vortexen) in TCM-199-D von den umgebenden Kumuluszellen befreit. Sie wurden mehrfach in SOF gewaschen, in Gruppen von 6-8 in mit Öl überschichteten 30µL Tropfen Kulturmedium überführt und bei 39°C in einer Atmosphäre von 5%CO₂, 5%O₂ in N₂ kultiviert. Zur Aufrechterhaltung der Kulturbedingungen wurde eine „modular incubation chamber“ (billups-rothenberg, del Mar, CA) eingesetzt, welche, anstelle eines kontinuierlichen Gasflusses, einmalig begast und luftdicht verschlossen wurde. Die gesättigte Luftfeuchte der Kammer war durch eine wassergefüllte Petrischale gewährleistet.

Die Embryonen wurden auf diese Weise bis zum benötigten Entwicklungsstadium kultiviert. Als ein Kriterium der Kulturbedingungen diente die am Tag 8 p.i. bestimmte Blastozystenrate.

2.3.3 Lacmoidfärbung

Die Maturation- und Fertilisationsraten wurden durch Färbung der Chromosomen mit Lacmoid bestimmt. Die Eizellen bzw. Zygoten wurden von umgebenden Kumuluszellen befreit, in Ethanol mit Eisessig (3:1) über Nacht bei 4°C fixiert, auf Objektträger gebracht und anschließend für 10min in 1%iger Lacmoidlösung gefärbt (1g Lacmoid wird in 55 mL gelöst, für 5-10 min gekocht und anschließend mit 45 mL Eisessig aufgefüllt). Übermäßige Färbung wurde durch Inkubation in 10% Glycerol

und 45% Eisessig in Wasser ausgewaschen. Die Maturationsrate wurde in Prozent als Anzahl der Eizellen in der Metaphase II und Telophase I der Meiose mit sichtbaren Polkörperchen zur Gesamtzahl der eingesetzten Eizellen ermittelt (Sirard and First, 1988). Als Fertilisationsrate ist der prozentuale Anteil an normal fertilisierten Eizellen, dass heißt Zygoten mit zwei sichtbaren Vorkernen, gegenüber nicht fertilisierten Eizellen und Zygoten mit mehr als zwei Vorkernen bestimmt worden.

2.3.4 Gewinnung 14 und 16 Tage alter Blastozysten

2.3.4.1 Gewinnung von *in vitro* Embryonen nach IVM/IVF

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten 14 und 16 Tage alten elongierten Blastozysten wurden aus *in vitro* gereiften und fertilisierten Oozyten gewonnen. Als 2-/4-Zell-Embryonen wurden sie in abgebundene Schafeileiter übertragen und bis zum Blastozystenstadium am Tag 7 p.i. kultiviert. Anschließend wurden sie in synchronisierte Empfängerkühe transferiert. Am Tag 14 bzw. 16 p.i. konnten elongierte Blastozysten aus den Uteri der Empfängertiere gewonnen werden (Galli and Lazzari, 1996).

2.3.4.2 Gewinnung von *in vivo* Embryonen

Nach Superovulation von Färsen durch intramuskuläre Injektion von 1500IU PMSG (pregnant mare serum gonadotrophins, Folligon, Intervet UK Ltd, Cambridge, UK), in der Mitt-Lutealphase, gefolgt von 500µg Cloprostenol (Estrumate, Coopers Animal Health, Berkhamsted, UK) 48h später zur Auslösung der Luteolyse, wurden die Tiere zweimal nach dem Beginn der Brunst (nach 6-10 sowie 24h) künstlich besamt. (AI – artificial insemination). Durch mittventrale Laparotomie 14 und 16 Tage nach AI wurden die Embryonen gewonnen. Nach Spülen der Uterushörner mit je 40mL PBS, 1mM Glukose, 0,1% PVA und 0,5mM Pyruvat wurden die Embryonen mittels Stereomikroskop aus dem Spülmedium isoliert (Grealy et al., 1996; Kliem et al., 1998).

2.3.5 Poly(A)⁺-RNA Isolation aus *in vitro* gewonnenen Oozyten und Präimplantationsembryonen

Poly(A)⁺-RNA wurde mit Hilfe des Dynabeads mRNA Direct Kit isoliert (Dynal, Oslo). Die Proben wurden nach Zugabe von 20µL „Lysis/Binding buffer“ (0.1M Tris/HCl, pH 7.5; 0.5M LiCl; 10mM EDTA, pH 8.0; 1% LiDS; 5mM DTT) kräftig geschüttelt, kurz zentrifugiert und für 10min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 5µL der zuvor zweimal mit „Lysis/Binding buffer“ gewaschenen Dynabeads hinzugegeben. Die Hybridisierung zwischen der Poly(A)⁺-RNA und den oligo (dT)₂₅ besetzten Dynabeadpartikeln erfolgte für 5min bei leichtem Schütteln und RT. Mit Hilfe des „Dynal magnetic separator“ wurden die Dynabeads vom Lysispuffer abgetrennt und einmal mit 30µL Puffer A (10mM Tris/HCl, pH 7.5; 0.15M LiCl; 1mM EDTA; 0.1% LiDS) und anschließend zweimal mit demselben Volumen Puffer B (10mM Tris/HCl, pH 7.5; 0.15mM LiCl; 1mM EDTA) gewaschen. Nach magnetischer Separation wurden die Dynabeads in 11µL DEPC Wasser aufgenommen und die Poly(A)⁺-RNA bei 65°C für 2min von den Dynabeads eluiert. Die Separation der Dynabeads erfolgte bei 4°C und die RNA wurde nach Entnahme des Überstandes direkt für die cDNA-Synthese eingesetzt.

2.3.6 cDNA-Synthese aus Poly(A)⁺-RNA

Für die Reverse Transkription embryonaler Poly(A)⁺-RNA wurde der Gene Amp PCR Core Kit (Applied Biosystems – Perkin Elmer, Weiterstadt) verwendet:

Poly(A) ⁺ -RNA	11µL
Hexamer Random Primer 100µM	1µL
dNTP Mix 10mM	2µL
Puffer	2µL
MgCl ₂ 50mM	2µL
RNAse Inhibitor	1µL
MuLV Reverse Transkriptase	1µL

Um die Evaporation im letzten Schritt der Synthese zu verhindern, wurde das Reaktionsgemisch mit Öl überschichtet: 10min 25°C, 1h 42°C, 5min 99°C.

2.3.7 Extraktion von Gesamt-RNA aus 14 und 16 Tage alten Blastozysten und cDNA-Synthese

Die 14 und 16 Tage alten, elongierten Blastozysten lagen in 500µL Guanidiniumisothiocyanat (GTC) vor und wurden bei –80°C gelagert. Sie wurden nach dem Auftauen durch mehrmaliges Aufziehen mit einer 20G Kanülenspritze homogenisiert. Nach Hinzugabe von 100µL 2M Natriumacetat (pH 4), 500µL wassergesättigtem Phenol sowie 200µL Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) wurde geschüttelt und die RNA aus der wässrigen Phase nach Zentrifugation bei 13000 rpm für 15min zur Phasentrennung mit 1 Vol Isopropanol präzipitiert. Die weiteren Schritte der Phenol/Chloroform-Extraktion embryonaler Gesamt-RNA (Chomczynski and Sacchi, 1987) wurden wie unter Punkt 2.1.1 durchgeführt. Die Synthese der cDNA erfolgte im Anschluß wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben.

2.3.8 PCR–Amplifikation von Glukosetransportern in Gameten und Präimplantationsembryonen des Rindes

Die PCR-Amplifikation der bovinen Glukosetransporterisoformen wurde mit den in Tabelle 2-1 (s. Anhang) zusammengefassten spezifischen PCR-Primer durchgeführt. Embryonale cDNA wurde wie unter 2.1.3.2 beschrieben amplifiziert und die PCR-Produkte nach Agarosegelelektrophorese und Visualisierung unter UV-Licht ausgewertet.

2.3.9 *In-situ*-Hybridisierung

Die Lokalisation von Glut4-Transkripten in Rinderembryonen wurde an Paraffinschnitten elongierter *in vivo* Blastozysten (s. 2.3.4.2) der Stadien Tag 14 und Tag 16 durchgeführt.

2.3.9.1 Herstellung der Hybridisierungssonde – *In-vitro*-Transkription

Die Hybridisierungssonde (cRNA) wurde durch *In-vitro*-Transkription des pGEM-Vektors mit dem Glut4-Insert unter Einbau von Digoxigenin (DIG)-markiertem UTP hergestellt. Zuvor wurde das Plasmid durch Restriktion mit einem Enzym (NcoI oder NotI) linearisiert. Die Synthese der sense- bzw. antisense-cRNA erfolgte mit T7 oder sp6 RNA-Polymerase mit 2µL des linearisierten Plasmids, 1xTranskriptionspuffer, NTP Mix mit DIG-markiertem UTP mit Wasser ad 20µL für 30min bei 37°C. Die cRNA wurde durch Ethanolfällung gereinigt, das Präzipitat in 100µL DEPC

behandeltem Wasser aufgenommen und die Konzentration der DIG-markierten RNA-Sonde mit Dot-Blot-Analyse bestimmt.

2.3.9.2 Hybridisierung

Die Detektion von Glut4-RNA wurde an 5µm Schnitten paraffineingebetteter Embryonen durchgeführt, die auf zuvor silanisierten (3-amino-propyltriethoxysilane) Objektträgern fixiert wurden. Die Lokalisation von Transkripten mit *In-situ*-Hybridisierung benötigt drei Tage. Am ersten Tag werden die Schnitte in einer absteigenden Xylol-Alkohol-Reihe entparaffiniert. Nach dem Proteinverdau durch Proteinase K-Behandlung werden die Schnitte in Paraformaldehyd refixiert und über Nacht mit der Hybridisierungssonde inkubiert (Dig-markierte sense cRNA dient als Kontrolle). Die einzelnen Schritte bis zur Hybridisierung benötigen besondere Vorsicht vor RNase-Kontaminationen aller benutzten Reaktionsgefäße. Am zweiten Tag wird durch RNase-Behandlung der Schnitte die einzelsträngige RNA abgebaut. Die durch die spezifische Hybridisierungsreaktion doppelsträngige RNA bleibt erhalten. Mit einem Phosphatase-gekoppelten anti-DIG-Antikörper wird die doppelsträngige RNA über Nacht markiert. Am dritten Tag wurden zur Detektion der positiven Reaktion Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT) und 5-Brom-4-Chlor-Indolylphosphat (BCIP) als Substrate der alkalische Phosphatase auf die Schnitte gegeben. Durch die katalytische Aktivität des Enzyms wird die Phosphatgruppe des BCIP abgespalten. Gleichzeitig wird durch die Alkalische Phosphatase NBT reduziert. In dephosphorylierter Form erscheint BCIP blau, die reduzierte Form von NBT bildet einen violetten schwerlöslichen Niederschlag. Gemeinsam ergeben beide Farbstoffe ein blauviolettcs Präzipitat.

2.3.10 Immunhistochemie an Embryonen

2.3.10.1 Lokalisation von Glut1- und Glut4-Protein an Schnitten 14 und 16 Tage alter Blastozysten

Die Lokalisation des Glut1-Proteins wurde an Schnitten paraffineingebetteter, 14 und 16 Tage alter Blastozysten vorgenommen. Der Proteinnachweis wurde wie unter 2.2.2 beschrieben durchgeführt. Als Primärantikörper dienten der Glut1-Antikörper der Firma Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg (rabbit polyclonal, #sc-7903) in einer Verdünnung von 1:100. Für den Proteinnachweis des Glut4 wurde ein monoklonaler Glut4-Antikörper der Firma DPC, Bad Nauheim (Klon1F8, # BM 436),

in einer Verdünnung von 1:2500 verwendet. Mit einem HRP-konjugierten goat-anti-rabbit (Glut1) bzw. goat-anti-mouse (Glut4) Sekundärantikörper wurde die spezifische Immunreaktion nachgewiesen und mit dem Substrat Diaminobenzidin visualisiert.

2.3.10.2 Whole-mount-Immunohistochemie an 8 Tage alten Blastozyten

Der Nachweis des Glut1-Proteins am Gesamtembryo bei 8 Tage alten Blastozysten, wurde mit der Whole-mount-Immunohistochemie durchgeführt. Die Blastozysten wurden nach der *In-vitro*-Kultur in PBS gewaschen und es schlossen sich folgende Schritte an:

- | | | |
|--|----------|-----|
| • Waschen PBS/PVA | 2x 10min | RT |
| • Fixation in MeOH : PBS (1:1) | 2min | 4°C |
| MeOH : PBS (2:1) | 2min | 4°C |
| • PBS und 0,002% Triton | 2x10min | RT |
| • PBS, 0,01% Triton X-100, 1% BSA | | |
| • und 1% Ziegenserum | 45min | RT |
| • PBS/PVA | 3x10min | RT |
| • Primärantikörper in PBS, 0,01% Triton X-100, | | |
| • 1% BSA und 10% Ziegenserum | 60min | RT |
| • Waschen in PBS und 0,05% Tween | 3x10min | RT |
| • Sekundärantikörper goat – anti – rabbit | | |
| • FITC konjugiert | 30min | RT |
| • Waschen in PBS und 0,05% Tween | 3x10min | RT |

Die Blastozysten wurden anschließend zum Färben der Zellkerne für 10min in Propidiumiodid (10µg/mL in PBS mit 0,02% TritonX-100) inkubiert oder direkt in „Flourogard – mounting medium“ (Bio-Rad) auf Objektträgern fixiert. Die Auswertung der Immunreaktion erfolgte mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (TCS-System) der Firma Leica (Wetzlar, Deutschland). Als Negativkontrolle dienten Embryonen, die nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert worden waren.

2.4 Quantifizierung von Glut1- und Glut4-Transkripten in *in vitro* produzierten und *in vivo* gewachsenen 14 und 16 Tage alten Rinderblastozysten

Unterschiede zwischen 14 und 16 Tage alten und *in vitro* und *in vivo* gewachsenen Embryonen im Bezug auf die Transkription der Glukosetransportergene 1 und 4 wurden mit der kompetitiven RT-PCR untersucht.

Die kompetitive RT-PCR (cRT-PCR) ermöglicht die Quantifizierung spezifischer mRNA-Transkripte. Das Prinzip der cRT-PCR ist in Abbildung 2-1 (s. Anhang) dargestellt. Eine Standard-RNA, welche die gleichen PCR-Primerbindungsstellen wie das in seiner Quantität zu bestimmende Transkript enthält, wird vergleichbar einer Titration in verschiedenen Konzentrationen zur jeweils gleichen Menge der RNA-Probe gegeben (Schritt 1, Abbildung 2-1, Anhang). Nach RT-Reaktion wird durch PCR sowohl die Standard- als auch die Proben-cDNA amplifiziert. Da sich die Länge der Nukleotidsequenzen von Standard- und Proben-RNA unterscheiden, können die Amplikons nach PCR mit einem Agarosegel separiert und die Intensitäten als optische Dichte (O.D.) bestimmt werden.

2.4.1 Herstellung der Standard-cRNA (Mimic)

Die Standard-RNA für die Quantifizierung des Glut1 und Glut4 wurde durch Deletion der PCR-Produkte gewonnen. Es kamen zwei verschiedene Methoden zum Einsatz: (I) für den Glut1 wurde ein Restriktionsverdau mit anschließender Ligation genutzt (Abbildung 2-2a, Anhang); (II) der Glut4-Deletionsklon wurde durch PCR-Amplifikation mit einem internen Primer hergestellt (Abbildung 2-2B, Anhang). Nach Erhalt der deletierten DNA wurden diese in den pGEM-T-Vektor kloniert. Die erhaltenen Klone wurden durch Sequenzierung auf das Vorliegen der Deletion geprüft. Nach Linearisierung der Plasmide durch Restriktionsverdau (Glut1-Klon NotI, Glut4-Klon NcoI) wurde die DNA *in vitro* mit 20U T7- oder -sp6 Polymerase in Transkriptionspuffer mit je 1mM NTPs in cRNA umgeschrieben. Die Plasmid-DNA wurde anschließend durch 15 minütige DNaseI-Behandlung verdaut und die cRNA nach Phenol/Chlorform Extraktion präzipitiert. Das Pellet wurde in 70% Ethanol gewaschen, in DEPC behandeltem Wasser resuspendiert und die RNA-Konzentration photospektrometrisch bei 260nm bestimmt. Die Standard-RNA wurde anschließend in Serien von 10-, 5-, oder 3 facher Verdünnung aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.4.2 Kompetitive RT-PCR

Für die Reverse Transkriptase-Reaktion wurden 5-6 Aliquots embryonaler Gesamt-RNA (100ng für Glut1 bzw. 200ng für Glut4) mit entsprechenden Aliquots der Glut1- bzw. Glut4-Standard-cRNA-Verdünnungsreihen gemischt. Die cDNA wurde mit dem Superscript-RTII-kit (Life Technologies) unter Verwendung von 10pmol 3' antisense Primer (Glut1) bzw. 20pmol Hexamer Primer (Glut4) in einem Volumen von 20µL für 1h bei 42°C synthetisiert. Die Reaktion wurde nach Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 72°C für 15min auf 4°C gekühlt. Die erhaltenen cDNAs wurden unter folgenden PCR Bedingungen amplifiziert: 3min Denaturierung bei 94°C, 1min bei 94°C, 1min bei 57°C (Glut1) bzw. 60°C (Glut4) und 1min bei 72°C für 35 (Glut1) bzw. 40 (Glut4) Zyklen mit einem abschließenden Elongationsschritt von 5min bei 72°C. Die RT-PCR-Amplifikate der Proben- und Standard-RNA wurden elektrophoretisch in einem 1,8%igen Agarosegel getrennt. Photographien der Gele wurden densitometrisch mit der Scan Pack II Software (Biometra, Göttingen) ausgewertet. Nach Korrektur der Größenunterschiede zwischen Standard- und Proben-Amplifikat ($\text{Glut1}_{\text{Probe}} \text{O.D.} \times 0,8 / \text{O.D. Glut1}_{\text{Standard}}$ bzw. $\text{Glut4}_{\text{Probe}} \text{O.D.} \times 0,79 / \text{O.D. Glut4}_{\text{Standard}}$) wurden embryonale Transkripte für Glut1 und Glut4 bestimmt als die Menge an Standard-RNA, die ein Verhältnis von 1 zwischen Standard/Probe (Äquivalenzpunkt) ergab.

2.5 Insulinexposition *in vitro* produzierter Rinderembryonen

2.5.1 Effekt von Insulin auf die Expression von Glukosetransportern und Enzymen der Glykolyse

2.5.1.1 In-vitro-Produktion der Blastozysten und Insulin-Exposition

Untersuchungen zum Einfluß von Insulin auf die Transkription von Glukosetransportern und Enzymen der Glykolyse wurde an expandierten Blastozysten (s. 2.3.2) vorgenommen. Die Blastozysten wurden für 1, 2, oder 4h Stunden in SOF mit 10µg/mL Insulin kultiviert, wobei als Kontrolle Embryonen im gleichen Zeitschema ohne Insulin mitgeführt wurden. Die Embryonen wurden anschließend in PBS mit PVA gewaschen, einzeln in einem Volumen von 1µl in 0,5mL Eppendorf-Hütchen pipettiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.5.1.2 Semiquantitative RT-PCR: Poly(A)⁺-RNA-Isolation und cDNA-Synthese aus Blastozysten unter Hinzufügen einer externen Standard-Poly(A)⁺-RNA

Für die semiquantitative Analyse der Genexpression von Blastozysten nach Insulinexposition wurde als externer Standard rabbit Globin-Poly(A)⁺-RNA (Life Technologies) eingesetzt. Pro Embryo wurden 0,1pg (Konzentration 0,1pg/μL) Globin-Poly(A)⁺-RNA verwendet und zu Beginn der Extraktion mit dem „Lysis/Binding buffer“ hinzugegeben. Als Positivkontrollen für jede Extraktion wurde jeweils eine Probe Globin-mRNA separat (ohne Embryo) extrahiert sowie eine cDNA-Synthese von 0,1pg Globin-mRNA ohne Extraktion mitgeführt. Die cDNA-Synthese entsprach dem unter 2.3.5. beschriebenen Protokoll.

Blastozysten der Insulin- bzw. Kontrollgruppe wurden bzgl. der Transkription der Gene Glut1, 3, 8, Phosphofruktokinase und Hexokinase mit der semiquantitativen RT-PCR miteinander verglichen. Die exponentiell verlaufende Amplifikation einer Zielsequenz durch PCR ist nur dann quantitativ auswertbar, wenn diese im linearen Bereich der PCR-Reaktion durchgeführt wird. Entsprechend wurden die PCR-Bedingungen für jedes zu quantifizierende Gen mit embryonaler cDNA ermittelt (Tabelle 2-4). Die verwendeten Temperatur/Zeitabläufe der PCR entsprachen dem Protokoll unter 2.1.3.2. Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel elektrophoretisch getrennt und durch Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert. Mit einem Geldokumentationssystem (Bioprint; LFT-Labortechnik, Wasserburg, Deutschland) wurden die erhaltenen Bilder digital aufgenommen und die optische Dichte (O.D.) der einzelnen Amplikons mit dem Bio-1-D Programm der Firma LTF bestimmt. Da die Digitalisierung der Bilder in 250 Graustufen erfolgt, war darauf zu achten, daß während der Bildaufnahme keine Überexposition auftrat, um eine Auswertung der PCR-Produkte zu gewährleisten.

Gen	cDNA in μL	Zyklenzahl (X)
Globin	1	28
Aktin	1	26
Glut1	1	34
Glut3	3	40
Glut8	1	34
Phosphofruktokinase	3	40
Hexokinase	2	38

Tabelle 24 Zusammenfassung der für die semiquantitative RT-PCR verwendeten cDNA-Mengen und Zyklenzahlen. Die Bedingungen für jede zu amplifizierende cDNA wurden so gewählt, dass eine Amplifikation der PCR-Produkte im linearen Bereich der PCR gewährleistet war.

2.5.2 Der Einfluß von Insulin auf die Embryonalentwicklung *in vitro*

Nach der *In-vitro*-Fertilisation wurden die Zygoten bis zum Blastozystenstadium am Tag 8 p.i. in SOF mit 10µg/mL Insulin kultiviert. In jedem Experiment wurde eine Kontrollgruppe (*In-vitro*-Kultur in SOF) mitgeführt. Die unter dem Einfluß von Insulin kultivierten Embryonen wurden mit der Kontrollgruppe hinsichtlich Blastozystenrate, der Rate geschlüpfter Blastozysten, Gesamtzellzahl und Zellzahl der Embryoblast- (ICM) und Trophoblastzellen (Trophektoderm –TE) verglichen.

2.5.2.1 Differentialfärbung der Zellkerne des Trophoblasten und Embryoblasten

Die separate Bestimmung der Zellzahl von Tropho- und Embryoblasten von 8 Tage (p.i.) alten Blastozysten wurde mit einer Differentialfärbung durchgeführt. Diese Färbetechnik nutzt Fluoreszenzfarbstoffe und beruht auf der Kernfärbung lysierter Zellen durch Propidiumiodid und einer generellen Kernmarkierung letaler Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 (Handyside and Hunter, 1984; Stojkovic et al., 1998). Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS) bindet kovalent an Nterminale Amine, so auch von Phospholipidproteinen der Zellmembranen. Durch TNBS werden die Membranen der Trophektodermzellen durch die kovalente Bindung der Trinitrophenole an die Phospholipidproteine markiert. Ein Kaninchen anti-DNP-BSA-Antikörper erkennt neben den Dinitro– auch die Trinitrophenole und durch Zugabe von Meerschweinchen-Komplement lysieren die mit dem Antiserum markierten Zellen. Propidiumiodid färbt die Zellkerne der lysierten Zellen. Die nicht mit dem Antiserum markierten Zellen (Embryoblastzellen) werden nicht lysiert, sondern können nach Fixation des Embryos mit Hoechst 33342 kerngefärbt werden. Tight junctions verhindern ein Vordringen des Antiserums bis zum Embryoblasten.

Die Embryonen wurden nach der *In-vitro*-Kultur in TC-199 Medium gewaschen und die Zona pellucida durch Pronasebehandlung entfernt:

Zona pellucida mit Pronase bei 37°C verdauen.

- 2x Waschen in TCM-199-D
- Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS) 10 min 4°C
- 3x Waschen in TCM-199-D
- anti-DNP-BSA (rabbit anti-DNP-BSA Antikörper) 30 min 37°C
- Waschen in PBS/PVA
- Komplement (guinea pig complement serum)

- | | | |
|---|--------|------|
| • mit Propidiumiodid in PBS/PVA | 15 min | 37°C |
| • Waschen in PBS/PVA mit Propidiumjodid | | |
| • Fixation in 96% EtOH | 3 min | 4°C |
| • Färbung mit Hoechst 33342 | 10 min | 4°C |

Einbetten der Embryonen in Glycerol auf einem Objekträger.

Die im Fluoreszenzmikroskop pink erscheinenden Trophoblastzellen (Farbstoffe Propidiumiodid und Hoechst 33342) können gut von den blau markierten Embryoblastzellen (Farbstoff Hoechst 33342) unterschieden und ausgezählt werden (Abbildung 2-3).

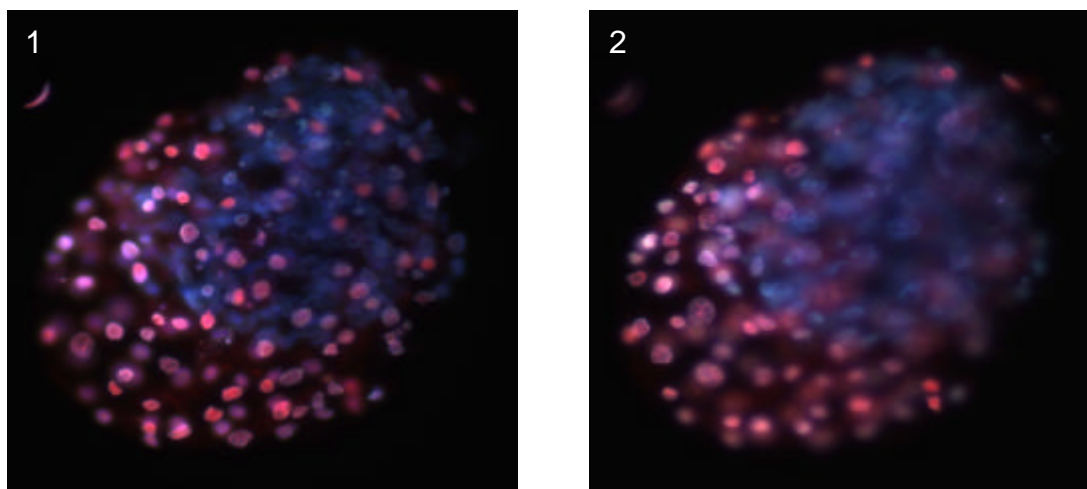


Abbildung 2-3 Beispiel einer Differentialfärbung der Embryo- und Trophoblastkerne einer Blastozyste. Dargestellt ist ein Embryo in zwei verschiedenen Fokusebenen (1, 2), wobei rote Kerne Trophoblast- und blaue Kerne Embryoblastzellen markieren.

2.6 Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung der Protein-kodierenden Sequenz des bovinen Glukosetransporters 3

Weiterführende Folgestudien sollen die spezifische Rolle des Glut3 während der Embryonalentwicklung *in vitro* bis zum Blastozystenstadium am Tag 8 (p.i.) u.a. anhand von Ausschaltexperimenten mit Antisense-Oligonukleotiden untersuchen. Antisense-Oligonukleotide unterdrücken die Translation eines ausgewählten Proteins durch Bindung an die mRNA. Um die Proteinsynthese zu verhindern werden die Oligonukleotide so konstruiert, dass Bereiche des Translationsstarts (5' Ende der cds) blockiert werden und auf diese Weise auch eine Synthese kurzer Peptide des jeweiligen Proteins unterbunden wird.

Für die geplanten Experimente ist deshalb die Kenntnis der proteinkodierenden Sequenz der bovinen Glut3-RNA (insbesondere der 5' Bereich mit Startcodon)

notwendig. Die vollständige Bestimmung einer unbekannten RNA-Sequenz kann u.a. durch Sequenzierung von PCR Produkten nach Amplifikation einer cDNA-Population mit der RACE (rapid amplification of cDNA ends)-Methode oder auch nach Datenbankrecherche unter Nutzung bereits bekannter cDNA-Teilsequenzen, sogenannter ESTs (expressed sequence tags), erfolgen.

Nach der Datenbankrecherche (BlastN search mode, Rubrik „other est“) unter Verwendung der Glut3 RNA-Sequenz vom Schaf konnten insgesamt fünf bovine cDNA Teilsequenzen gefunden werden, die hohe Homologien zur Schaf Glut3-RNA aufwiesen (Abbildung 2-4). Zwei dieser cDNA-Abschnitte lagen im Proteinkodierenden Bereich der RNA und dienten als Grundlage für die Konstruktion der PCR-Primer (BE899741; AV595992). Drei weitere Sequenzen codieren den 3' untranslatierten Bereich der bovinen Glut3-RNA (AW464247; BF040501; AU097957). Die Amplifikation der bovinen Glut3-cds erfolgte nach RNA-spezifischer Reverse Transkriptase-Reaktion boviner Gehirn-Poly(A)⁺-RNA mit dem rindspezifischen Glut3 3'-Primer.

Schaf Glut 3 mRNA-Sequenz

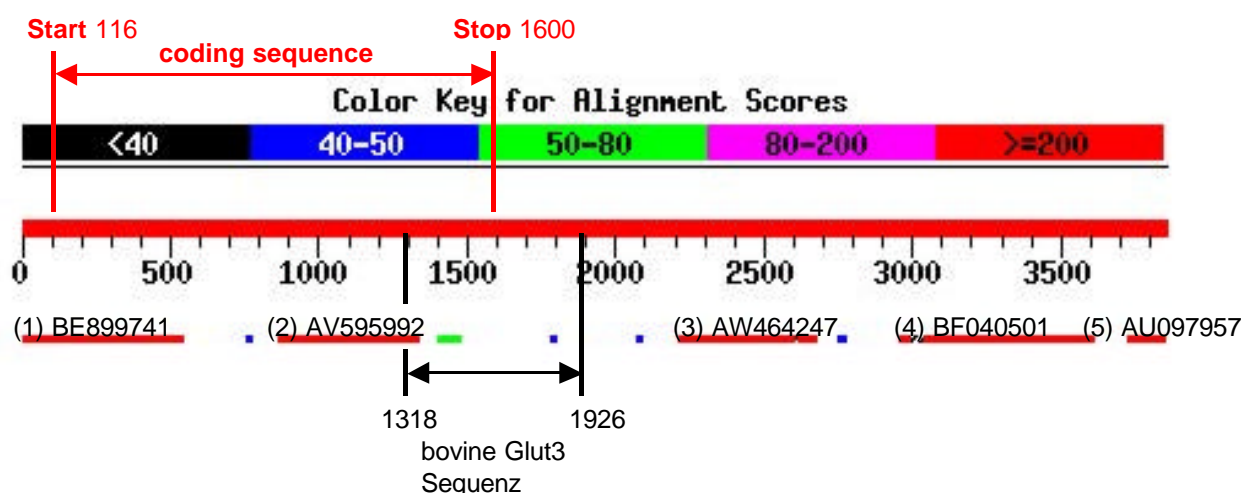


Abbildung 2-4 Darstellung der nach Datenbankvergleich erhaltenen bovinen EST (expressed sequence tags), die eine hohe Homologie zur Schaf Glut3-mRNA aufwiesen. Angegeben sind die Nummern der Datenbankeinträge (Accession number) für die fünf ausgewiesenen [(1) – (5)] bovinen EST.

2.7 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit dem Software Programm SPSS 10.0 vorgenommen. Statistische Signifikanzen wurden mit dem einfachen ANOVA-Modell (u.a. vgl. der Blastozystenanzahl von Insulin - Kontrollgruppe) oder univariaten

Modell (Einfluß von Insulin auf Transkription spezifischer Gene) getestet. Ein signifikanter Unterschied wurde ab dem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ angenommen.

2.7.1 Statistische Auswertung des Einflusses von Insulin auf die relativen Transkriptmengen in 8 Tage alten Blastozysten

Der Einfluß von Insulin auf die Expression von Glukosetransportern sowie metabolisch relevanten Enzymen der Glykolyse (wie Hexokinase und Phosphofruktokinase) wurde an expandierten Blastozysten untersucht. Die Embryonen wurden für 1, 2 oder 4 Stunden mit oder ohne Insulinzusatz kultiviert und die relativen Transkriptmengen der Gene an Einzelembryonen mit RT-PCR semiquantitativ bestimmt. Insgesamt wurden je Gruppe (Insulin bzw. Kontrolle) und Zeitreihe 10 Einzelembryonen ausgewertet. Es wurden für jede Expositionszeit mindestens zwei unabhängige Versuchswiederholungen durchgeführt, einschliesslich der *In-vitro*-Kultur der Embryonen. Eine Extraktion der Poly(A)⁺-RNA erfolgte für jeweils 3 Embryonen, wobei stets Blastozysten der Insulin- mit Embryonen der Kontrollgruppe parallel aufgearbeitet wurden. Für jede von einem Einzelembryo erhaltene cDNA konnten insgesamt sieben PCR-Reaktionen durchgeführt werden (Globin, Aktin, Glut1, Glut3, Glut8, Hexokinase, Phosphofruktokinase).

Die Transkriptmengen für die einzelnen Gene wurden als relative Einheiten auf die als externen Standard dienende Kaninchen-Globin-mRNA bezogen. Eine statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS 10.0. Verwendet wurde hierbei das univariate Modell zum Vergleich der Varianzen (I) beider Gruppen unter Einbeziehung der Versuchswiederholungen für jede einzelne Expositionszeit sowie (II) als Vergleich der Gruppen über die Expositionszeiten von 1 bis 4 Stunden. Der erste Ansatz gewährleistet den Vergleich der beiden Gruppen (Insulin bzw. Kontrolle) für jedes einzelne Gen pro Expositionszeit (1, 2 und 4 Stunden) unter Einbeziehung der Versuchswiederholungen. Im zweiten Modell wurde versucht, den Effekt der Gruppe (Insulin bzw. Kontrolle) für jedes untersuchte Gen als Zeitverlauf zu erfassen.

Der statistische Vergleich der relativen Transkriptmengen für die oben beschriebenen Gene zwischen der Kontrollgruppe und den unter Insulineinfluss kultivierten Embryonen wurde mit dem univariaten Modell unter Einbeziehung der Versuchswiederholung ausgewertet (s.o. – Modell I). Auch hier wurden für die Bestimmungen jeweils 10 Einzelembryonen jeder Gruppe ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Sequenzanalysen

Mit der RT-PCR konnte unter Verwendung degenerierter Primer, die in konservierten Bereichen von Glukosetransporter-RNA-Sequenzen verschiedener Spezies konstruiert wurden, bovine Glukosetransporter-cDNA amplifiziert und ihre Sequenzen ermittelt werden. Die Nukleotid- und die davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden in der Genbank des NCBI eingetragen. Die „Accession Number“ der jeweiligen bovinen Isoformen ist im Text und in den Tabellen der Homologievergleiche angegeben.

3.1.1 Glukosetransporter 2

Eine bovine Glut2-cDNA konnte nach PCR-Amplifikation unter Verwendung degenerierter Primer, die auf homologen Bereichen der Spezies Mensch, Ratte, Maus und Huhn beruhten, aus Lebergewebe kloniert werden (AF308828). Die 427 bp lange Nukleotidsequenz weist eine 90%ige Homologie zur humanen Glut2-RNA auf (Fukumoto et al., 1988a; Thorens et al., 1988 - Tabelle 3-1) und erstreckt sich über die Exons 6-8 des humanen Glut2-Gens (Takeda et al., 1993). Die bovine Nukleotidsequenz kodiert mit einer Homologie von 90% zum humanen Protein die Aminosäuren 259-400 (Abb. 3-1; Tabelle 3-1), welche die Sekundärstrukturen der zytoplasmatischen Schleife und der transmembranen Helices 7-9 des humanen Glut2-Proteins bilden.

Spezies	Homologie Glut2 (AF308828)					
	Nukleinsäure			Protein		
	bp	in %	Datenbankeintrag	AS	in %	Datenbankeintrag
Mensch	376/415	90	ref XM_003153.1	129/142	90	ref NP_000331.1
Maus	422	82	emb X16986.1	117/142	82	pir S05319
Ratte	225/266	84	ref NM_012879.1	117/142	82	pir S68362

Tabelle 3-1 Zusammenfassung der Homologievergleiche von Nukleotid- und Proteinsequenzen verschiedener Spezies mit dem bovinen Glut2.

		<-----Intrazellulärer Loop-----><-----TM7--	
RIND	1	SWKRLRGSDDITKDITEMRKEGEEASNEKKVSIQLFTNASYRQPILVALMLHAAQQFSG	60
Human	259	.L....Y.. <u>V</u> ...N....R.... <u>S</u> .. <u>Q</u> <u>S</u>V.....	318
Maus	258	.L.... <u>TE</u> .. <u>V</u> ...N.. <u>K</u> ...T.. <u>Q</u> ... <u>V</u> <u>D</u> .. <u>N</u>M.....	317
Ratte	257	.L.... <u>TE</u>N....K...T.. <u>Q</u> ... <u>V</u> <u>DPN</u>V.....L.....	316
		-----> <-----TM8-----> <-----TM9--	
RIND	61	INGIFYYSTSIFQTAGISQPVYATIGVGAVNTVFTAVSVFLVEKAGRRSLFLIGMSGMFV	120
Human	319 <u>K</u>M.....	378
Maus	318 <u>T</u> <u>I</u> .. <u>MI</u>L..... <u>T</u> ...T.. <u>I</u> ...F	377
Ratte	317 <u>I</u> .. <u>MI</u> ...C...L..... <u>T</u> ...A.. <u>I</u> ...F	376
		----->	
RIND	121	CAIFMSVGLVLLSKFPWMSYVS	142
Human	379 <u>N</u> ..S.....	400
Maus	378	.T..... <u>D</u> ..A.....	399
Ratte	377	.. <u>V</u> ... <u>L</u>D..T.....	398

Abbildung 3-1 Alignment der von boviner Glut2-cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz mit Glut2-Proteinen der Spezies mit den höchsten Homologien (.homologe Aminosäure, x konservativ substituierte Aminosäure)

3.1.2 Glukosetransporter 3

Für Untersuchungen zur Expression des Glukosetransporters 3 in Präimplantations-embryonen des Rindes konnte ein 601bp großes cDNA-Fragment nach RT-Reaktion aus boviner Gehirn-RNA amplifiziert und kloniert werden (AF308829). Die bovine Glut3-Nukleotidsequenz weist mit 95% eine hohe Homologie zum Glut3 vom Schaf auf (Bennett et al., 1995; Currie et al., 1997) und kodiert die Aminosäuren der transmembranen Helices 11 und 12 sowie den C-terminalen Bereich des Glut3-Proteins (Abbildung 3-2; Tabelle 3-2). Die amplifizierte cDNA umfasst neben dem Protein-kodierenden Bereich einen Teil der 3'-untranslatierten Region (utr – untranslated region) der RNA.

		<----- TM11 -----> <----- TM12 ----->	
RIND	3	VYCAELFGQGPRPAAMAVAGCSNWTSNFLVGLLFPSAAFYLGAYVFIVFTVFLVIFWVFT	62
Schaf	390T.....	446
Hund	390S..... <u>I</u> ..G.. <u>IV</u> ..L...	446
Kaninchen	297S.D..... <u>Y</u> <u>VI</u> ..A....A.. <u>FI</u> ..	351
		--><----- intrazelluläre C- terminale Domäne -->	
RIND	63	FFKVPETRGRTFEEITRAFEGQTGTGRGEKGPIMEMNSIQPTKDTNA	121
Schaf	447V.....	494
Hund	447G.DAN.A.... <u>V</u> ... <u>M</u> ..V.. <u>E</u> ..	492
Kaninchen	352 <u>D</u>AAEANK <u>L</u> G...T..... <u>IET</u> ..	397

Abbildung 3-2 Alignment der von boviner Glut3 cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz mit Glut3-Proteinen der Spezies mit den höchsten Homologien (.homologe Aminosäure, x konservativ substituierte Aminosäure)

Spezies	Homologie Glut3 (AF308829)					
	Nukleinsäure			Protein		
	bp	in %	Datenbankeintrag	AS	in %	Datenbankeintrag
Schaf	576/601	95	gb L39214.1	103/105	98	sp P47843
Hund	395/452	87	gb L35267.1	88/103	85	sp P47842
Kaninchen	297/335	88	gb AF117812.1	79/101	78	gb AAD26251.1

Tabelle 3-2 Zusammenfassung der Homologievergleiche von Nukleotid- und Proteinsequenzen verschiedener Spezies mit dem bovinen Glut3.

3.1.2.1 Protein-kodierende Region des Glukosetransporters 3 (cds)

Die Sequenzierung des 5' Bereiches der Protein-kodierenden Region (cds – coding sequence) der bovinen Glut3-RNA wurde anhand boviner EST-Sequenzen durchgeführt. Nach Datenbankrecherche konnten fünf EST-Sequenzen mit hoher Homologie zur ovinen Glut3-RNA gefunden werden (BE899741, AV595992, AW464247, BF040501, AU097957). Die Datenbankeinträge BE899741 und AV595992 liegen in der coding-Region, wobei ersterer auch 116bp der 5' untranslatierten Region überspannt. Anhand der klonierten bovinen Glut3-cDNA, welche die 3' cds und utr umfaßt, und den EST-Sequenzen BE899741 und AV595992 konnte die gesamte Protein-kodierende Nukleotidsequenz des bovinen Glut3 ermittelt werden (Abbildung 3-3; Tabelle 3-3).

RIND	1	MGTTKVTAPLIFAI	SVATIGSFQFGYNTGV	INAPEAIIKD	FLNYTLEERSEPP	SSVLLT	60
Schaf	1T.....	<u>I</u>T.....	60
Hund	1	...Q...VS...	<u>L</u> .. <u>I</u>T..... <u>K</u> .. <u>NL</u> .. <u>TE</u>	60
Mensch	1	...Q...PA....	<u>T</u>K... <u>E</u> .. <u>I</u> .. <u>K</u> .. <u>TD</u> <u>K</u> GNA.. <u>E</u>	60
RIND	61	SLWSLSVAIFSV	GGMIGSFVGLFVN	RFRGNSMLIV	NLLAIAGGCLMG	FCKIAESVEM	120
Schaf	61R.....	120
Hund	61R.....	<u>M</u>	<u>V</u>	<u>Q</u>	120
Mensch	61R..... <u>V</u> T...F...L.. <u>V</u> .. <u>K</u>	120
RIND	121	ILGRLLIIGLFC	GLCTGFVPMYIGE	ISPTALRGAF	GTNLQLGIVIGI	LVAQIFGLKV	180
Schaf	121	180
Hund	121	<u>M</u>	180
Mensch	121 <u>V</u>	<u>V</u>	<u>EF</u> .. <u>S</u>	180
RIND	181	EDLWPLLLGFT	ILPAIIQCAALP	FCPESPRFLLIN	RKEEEKAKEILQ	RLWGTEDVAQ	240
Schaf	181	240
Hund	181	<u>E</u>	<u>I</u> .. <u>VL</u> .. <u>S</u>N.....	<u>Q</u> .. <u>S</u>	240
Mensch	181	<u>E</u>	<u>L</u> .. <u>S</u>N.. <u>Q</u>	<u>Q</u> .. <u>S</u>	240
RIND	241	EMKDESMRMSQ	EKQVTVLELFR	APNYRQPIII	SIMLQLSQQLS	GINAVFYYSTG	300
Schaf	241	300
Hund	241 <u>A</u> .. <u>A</u> <u>SRS</u>	300
Mensch	241 <u>A</u> <u>VSS</u>	<u>V</u>	300

RIND	301	VQEPVYATIGAGVNTIFTVSVFLVERAGRRTLHLIGLGGMAFCSILMTISLLLLKDNYS	360
Schaf	301	360
Hund	301	<u>E</u> .. <u>I</u> <u>L</u> <u>M</u>V..... <u>N</u>	360
Mensch	301	.. <u>I</u> <u>L</u> <u>M</u>T.. <u>V</u> <u>N</u>	360
RIND	361	WMSFICIGAILVFVAFFEIGPGPIPWFIWAELFGQGPRPAAMAVAGCSNWTSNFLVGLLF	420
Schaf	361	420
Hund	361	.. <u>V</u>S.....	420
Mensch	361	G.. <u>V</u>S.....	420
RIND	421	PSAAFYLGAYVFIVFTVFLVIFWVFTFFKVPETRGRTFEEITRAFEGQTQTGRGEKGPI	480
Schaf	421	...T.....V.....	480
Hund	421 <u>I</u> ..G.. <u>IV</u> ..L.....G.DAN.A.....	480
Mensch	421H..... <u>I</u> ..G.. <u>IT</u> ..LA..... <u>D</u>AHGAD.SG.DGV	480
RIND	481	MEMNSIQPTKDTNA	494
Schaf	481	494
Hund	481	<u>V</u> ... <u>M</u> ..V.. <u>E</u> ..	492
Mensch	481 <u>E</u> ..A.. <u>E</u> ..	492

Abbildung 33 Proteinsequenz des bovinen Glukosetransporters 3. Alignment des bovinen mit Glut3-Proteinen verschiedener Spezies (.homologe Aminosäure, x konservativ substituierte Aminosäure).

Homologie Glut3 cds							
Spezies	Nukleinsäure			Spezies	Protein		
	bp	in %	Datenbankeintrag		AS	in %	Datenbankeintrag
Schaf	1732/1791	96	gb L39214.1	Schaf	488/492	98	sp P47843
Hund	1069/1230	86	gb L35267.1	Hund	441/492	89	sp P47842
Mensch	1343/1584	85	gb U25651.1	Mensch	424/492	86	NP_008862.1

Tabelle 3-3 Zusammenfassung der Alignments für die Nukleotid- und Aminosäuresäuresequenzen zwischen dem bovinen Glut3 und Spezies hoher Homologie.

3.1.3 Glukosetransporter 5

Ein bovines cDNA-Fragment von 617bp Länge, welches den bovinen Glukosetransporter 5 kodiert, konnte aus Dünndarm-cDNA nach PCR-Amplifikation kloniert werden (Abbildung 3-4). Die bovine Sequenz weist eine Homologie von 85-87% gegenüber der entsprechenden humanen Sequenz (Kayano et al., 1990) auf. Die bovine cDNA kodiert 204 Aminosäuren, welche die intrazelluläre Schleife und die transmembranen Helices 6-12 des Glukosetransporters 5 umfassen (Abbildung 3-4; Tabelle 3-4).

		<----intrazellulärer Loop----><----- TM7 ----->	
RIND	1	EDEAEKAVGFISVLKLFKMRSLRWQVISIIVLMAGQQLSGVNAIYYADQIYLSAGVNED	60
Human	253A..... <u>R</u> <u>LL</u>G.....P. <u>E</u>	312
Maus	252A.....W... <u>T</u> . <u>Q</u> <u>L</u> .. <u>M</u>KS.	311
Ratte	252A.....W... <u>R</u> . <u>Q</u> <u>L</u> .. <u>T</u>K <u>S</u> <u>N</u>	311
		<----- TM8 -----> <----- TM9 ----->	
RIND	61	DVQYVTAGTGAVNVLTITVCAIFVVELMGRRFLLLLGFSVCLTACCVLTGALALQDVISWM	120
Human	313	H..... <u>VM</u> . <u>F</u> .. <u>V</u> <u>L</u> ... <u>L</u> <u>I</u> .. <u>I</u>A..... <u>TV</u> ...	372
Maus	312 <u>FM</u> . <u>ILT</u> <u>W</u> <u>V</u> ... <u>T</u> .. <u>I</u> .. <u>L</u> ...A..... <u>NT</u>	371
Ratte	312 <u>FM</u> . <u>MVT</u> <u>W</u> ... <u>N</u> .. <u>I</u> ... <u>T</u> <u>I</u> ... <u>V</u> <u>NT</u>	371
		<----- TM10 -----> <----- TM11 ----->	
RIND	121	PYVSIACVISYVIGHALGPSIPALLVTEIFLQSSRPAAVMVAGTVHWLSNFTVGLVFPF	180
Human	373	.. <u>I</u> .. <u>V</u> <u>I</u> <u>S</u> . <u>F</u> .. <u>G</u> . <u>S</u> <u>I</u> ...	432
Maus	372	.. <u>I</u> .. <u>V</u> ... <u>V</u> <u>I</u> <u>IG</u> . <u>S</u> <u>I</u> ...	431
Ratte	372 <u>V</u> ... <u>V</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>S</u> .. <u>IG</u> . <u>S</u> <u>I</u> .. <u>I</u> ...	431
		<----- TM12 ----->	
RIND	181	IQVGLGAYSFVIFAVICLLTTIYI	204
Human	433	..E...P... <u>IV</u>	456
Maus	432	.. <u>M</u> ...P... <u>I</u> ... <u>T</u> .. <u>F</u>	455
Ratte	432P... <u>I</u> .. <u>I</u>	455

Abbildung 3-4 Alignment der von boviner Glut5-cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz mit Glut5-Proteinen der Spezies mit den höchsten Homologien (.homologe Aminosäure, x konservativ substituierte Aminosäure)

Spezies	Homologie Glut5 (AF308830)					
	Nukleinsäure			Protein		
	bp	in %	Datenbankeintrag	AS	in %	Datenbankeintrag
Mensch	140/163	85	ref XM_001557.1	182/204	84	ref NP_003030.1
	229/262	87				
Maus	136/160	82	ref NM_019741.1	161/204	84	ref NP_062715.1
	216/262	85				
Ratte	168/202	83	gb L05195.1	159/204	81	sp P43427 GTR5_
	222/262	84				

Tabelle 3-4 Zusammenfassung der Homologievergleiche von Nukleotid- und Proteinsequenzen verschiedener Spezies mit dem bovinen Glut5.

3.1.4 Glukosetransporter 8

Unter Verwendung heterologer Primer, auf der Basis der bekannten Glut8-RNA-Sequenzen von Mensch, Maus und Ratte konnte eine bovine Glut8-cDNA von 1012bp Länge aus Gehirn-RNA amplifiziert und kloniert werden (AF321324). Die Nukleotidsequenz des bovinen Glut8 weist eine Homologie von 87% zum humanen Glut8 auf (Carayannopoulos et al., 2000; Doege et al., 2000b; Ibberson et al., 2000). Die von der klonierten cDNA abgeleitete bovine Aminosäuresequenz kodiert mit einer

Homologie von 87% zum humanen Protein die transmembranen Helices 6-12 und umfasst weiterhin das C-terminale Ende des Glut8 (Abbildung 3-5 und Tabelle 3-5).

		<----- TM6 ----->	
RIND	1	ISEIAYPEVRGLLGSCVQLMVVTGILLAYLAGWVLEWRWLA VLGCVAPSFMLLLMCFMPE	60
Human	145 <u>A</u> <u>V</u> <u>P</u> .. <u>L</u>	204
Ratte	145 <u>A</u> <u>V</u> <u>P</u> .. <u>TL</u> <u>Y</u> ...	204
Maus	145 <u>A</u> <u>V</u> <u>P</u> .. <u>TL</u> <u>Y</u> ...	204
		<-----	
RIND	61	TPRFLLSQHKHQEAMAMQFLWG YAQGWEEPLGAQH QDFHVAQLRRPGVYKPFIIIGISL	120
Human	205 <u>T</u> .. <u>RR</u> <u>LR</u> <u>SE</u> <u>D</u> .. <u>I</u> .. <u>E</u> .. <u>S</u> .. <u>L</u> .. <u>L</u> .. <u>Q</u> .. <u>I</u> <u>V</u> ..	263
Ratte	205 <u>T</u> .. <u>QY</u> <u>LR</u> <u>SE</u> <u>V</u> .. <u>E</u> .. <u>G</u> .. <u>QL</u> .. <u>M</u> <u>H</u> .. <u>L</u> <u>C</u> .	264
Maus	205 <u>T</u> .. <u>QY</u> <u>LR</u> <u>SE</u> <u>V</u> .. <u>E</u> .. <u>G</u> .. <u>QL</u> .. <u>L</u> <u>I</u> .. <u>L</u>	264
		--- TM7 -----> <----- TM8 -----> <---	
RIND	121	MAFQQLSGVNAV MFYAETIFEEAKFKDSSLASV VVGVIQVLF TATAALIMDRAGRRLLT	180
Human	264 <u>V</u>	323
Ratte	265	.. <u>V</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>T</u> .. <u>I</u> <u>V</u> <u>K</u> .. <u>A</u>	324
Maus	265	.. <u>V</u> <u>I</u> <u>NS</u> <u>T</u> .. <u>I</u> <u>V</u>	324
		-- TM9 -----> <--- TM10--	
RIND	181	LSGVVMVFSTSAFGTYFKLTEGGPSNSSHVDLPALVSMEAADTNVGLAWLAVGNMCLFIA	240
Human	324 <u>A</u> <u>Q</u> .. <u>G</u> <u>AI</u> .. <u>S</u> .. <u>P</u> .. <u>AQ</u> .. <u>PV</u> .. <u>AS</u> <u>S</u>	383
Ratte	325 <u>I</u> <u>M</u> <u>QS</u> <u>G</u> .. <u>LV</u> .. <u>PI</u> .. <u>A</u> .. <u>P</u> .. <u>VHL</u> <u>S</u>	384
Maus	325 <u>I</u> <u>M</u> <u>QSL</u> <u>G</u> .. <u>-VP</u> .. <u>IAA</u> .. <u>PV</u> .. <u>VQ</u> <u>S</u>	383
		-----> <----- TM11-----> <- TM12 -	
RIND	241	GFAVGWGPWPWLLMSEIFPLHVKG VATGVCVLTNWFMAFLVTKEFSSLMEVLRPYGAFWL	300
Human	384 <u>I</u> <u>L</u>	443
Ratte	385 <u>I</u> <u>N</u> .. <u>I</u> .. <u>I</u>	444
Maus	384 <u>I</u> <u>V</u> .. <u>M</u>	443
		TM12 ----->< - intrazelluläre C - terminale Domäne	
RIND	301	ASAFCIFGVLF TFLACVPETKGKTLEQITAHFEGR	334
Human	444 <u>S</u> <u>F</u>	477
Ratte	445	<u>TA</u> <u>LS</u> <u>TF</u> <u>R</u>	478
Maus	444	<u>TA</u> <u>ALS</u> <u>TV</u> <u>R</u> <u>V</u>	477

Abbildung 3-5 Alignment der von boviner Glut8-cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz mit Glut8-Proteinen der Spezies mit den höchsten Homologien (.homologe Aminosäure, x konservativ substituierte Aminosäure)

Spezies	Homologie Glut8 (AF321324)					
	Nukleinsäure			Protein		
	bp	in %	Datenbankeintrag	AS	in %	Datenbankeintrag
Human	886/1110	87	ref XM_011828.1	293/334	87	ref XP_011828.1
Ratte	853/998	85	Emb AJ245935.1	277/334	82	emb CAB75729.1
Maus	541/692	86	gb AF232061.1	275/334	82	gb AAF78366.1
	298/336	88				

Tabelle 3-5 Zusammenfassung der Homologievergleiche von Nukleotid- und Proteinsequenzen verschiedener Spezies mit dem bovinen Glut8.

3.1.5 Natrium-abhängiger Glukosetransporter SGLT-I

Mit Hilfe von degenerierten Primern, konstruiert anhand konservativer Bereiche bekannter SGLT-I-RNA-Sequenzen von Kaninchen, Schaf und Mensch, wurde ein 552bp großes cDNA-Fragment der bovinen SGLT-I-Sequenz aus Nieren-RNA durch RT-PCR amplifiziert und kloniert (AF308831). Die bovine Sequenz weist eine Homologie von 97% zur ovinen RNA auf und kodiert 184 Aminosäuren, welche hoch homolog (97%) zu den Aminosäuren 218-401 des ovinen SGLT-I sind (Abbildung 3-6 und Tabelle 3-6). Innerhalb der insgesamt 14 transmembranen Helices des SGLT-I-Moleküls (Turk and Wright, 1997) kodiert die abgeleitete Aminosäuresequenz die Helices 6-9.

		--TM6 -->		<
RIND	1	LTGFAFHEVGGYGAFVTKYINAIPTVTSYGNTTIKAECYTPRADSFHIFRDPLKGDLPWP	60	
Schaf	218S..... <u>M</u> <u>V</u> .K.....	277	
Schwein	161D.. <u>IE</u> .. <u>M</u>I.D..I...K...A.....	220	
Human	218D.. <u>ME</u> .. <u>MK</u> <u>IV</u> .D... <u>FQEK</u>T.....	277	
		----- TM7 ----->		<----- TM8 -----
RIND	61	GLIFGLTIISLWYCTDQVIVQRCLSAKNMSHVKAGCIMGYLLKLLPMFLMVMPGMISRI	120	
Schaf	278 <u>M</u>	337	
Schwein	221	..T... <u>S</u> .. <u>LA</u> <u>V</u> ...F..... <u>VI</u> <u>V</u>	280	
Human	278	.F... <u>MS</u> .. <u>LT</u>G... <u>L</u> <u>M</u> .. <u>I</u>	337	
		>		<----- TM9 -----
RIND	121	LFTEKVACTVPSECENYCGTKVGCTNIAIPTLVVELMPNGLRGLMLSVMLASLMSSLTSI	180	
Schaf	338K.....	397	
Schwein	281	. <u>Y</u> .. <u>I</u>K..... <u>S</u> <u>I</u>	340	
Human	338	. <u>Y</u> .. <u>I</u> ..V.....K.....	397	
		----->		
RIND	181	FNSA	184	
Schaf	398	401	
Schwein	341	344	
Human	398	401	

Abbildung 36 Alignment der von boviner SGLT-I-cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz mit SGLT-I-Proteinen verschiedener Spezies (.homologe Aminosäure, x konservativ substituierte Aminosäure)

Spezies	Homologie SGLT-I (AF308831)					
	Nukleinsäure			Protein		
	bp	in %	Datenbankeintrag	AS	in %	Datenbankeintrag
Schaf	531/547	97	emb X82410.1	178/184	96	sp P53791
Schwein	491/549	89	gb M34044.1	161/184	87	sp AAA31122
Human	479/551	86	ref XM_009937.1	158/184	85	ref XM_009937.1

Tabelle 3-6 Zusammenfassung der Homologievergleiche von Nukleotid- und Proteinsequenzen verschiedener Spezies mit dem bovinen SGLT-I.

3.1.6 Phosphofruktokinase (EC 2.7.1.11)

Insulin und dessen Einfluß auf die Transkription metabolisch relevanter Gene in 8 Tage alten Rinderblastozysten wurde u.a. für das Glykolyseenzym Phosphofruktokinase (PFK) mit der semiquantitativen RT-PCR untersucht. Hierfür war die Klonierung der spezifischen bovinen Nukleotidsequenz der PFK notwendig. Anhand eines Vergleiches der Nukleotidsequenzen von Mensch, Kaninchen und Ratte wurden degenierte Primer in konservativen Bereichen konstruiert, die eine RT-PCR-Amplifikation einer 588bp großen cDNA aus boviner Muskel-RNA ermöglichten. Das amplifizierte Fragment kodiert mit einer 89%igen Homologie zur humanen RNA-Sequenz für die Phosphofruktokinase-I (EC 2.7.1.11.). Die abgeleitete Aminosäuresequenz umfasst die Domänen 7 und 8 des als Tetramer mit je zwei Untereinheiten vorliegenden Glykolyseenzym (Abbildung 3-7).

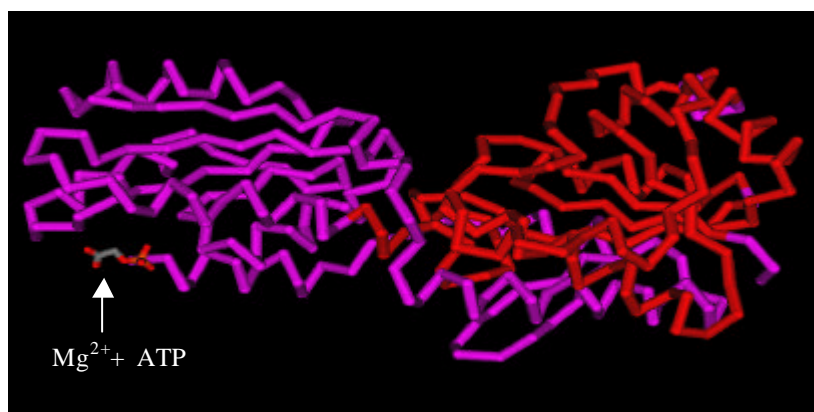


Abbildung 3-7 Strukturmodell einer Untereinheit des tetrameren Enzyms Phosphofruktokinase von *Bacillus stearothermophilus*. Die rot dargestellten Bereiche weisen die Bereiche des Alignments mit der bovinen Aminosäuresequenz aus.

RIND	1	RSFVNNWEVYKLLAHVRPPKSKSGSHTVAVMNVGAPPAGMNAAVRSTVRIGLIQGNRMLV	60
Human	376	... <u>M</u>V.....A..... <u>V</u> ..	435
Maus	376	... <u>M</u>V..G.L.....A..... <u>V</u> ..	435
Kaninchen	376	... <u>M</u> <u>I</u> ...AP.... <u>Y</u>A..... <u>V</u> ..	435
RIND	61	VHDFEGLAKGQIEEAGWSYVGWGTGQGGSKLGTKRTLPKKSFEQISANITKFNIQGLVI	120
Human	436	495
Maus	436 <u>N</u> L.....	495
Kaninchen	436P..... <u>S</u>	495
RIND	121	IGGFEAYTGGLLEMEGRKQYDELCIPFVVIPATVSNNVPGSDFSVGADTA	170
Human	496 <u>F</u>	545
Maus	496 <u>F</u> <u>I</u>	545
Kaninchen	496 <u>F</u>	545

Abbildung 3-8 Alignment der von boviner PFK-cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz mit PFK-Proteinen verschiedener Spezies (.homologe Aminosäure, x konservativ substituierte Aminosäure).

Homologie PFK							
Spezies	Nukleinsäure			Spezies	Protein		
	bp	in %	Datenbankeintrag		AS	in %	Datenbankeintrag
Human	451/505	89	gb U24183.1	Human	165/170	97	ref NP_000280.1
Hund	439/483	91	gb U25183.1	Maus	160/170	94	ref NP_067489.1
Ratte	435/505	86	gb U25651.1	Kaninchen	160/170	94	gb M14470

Tabelle 3-7 Zusammengefasster Homologievergleich der bovinen PFK-Nukleotid- und Aminosäuresequenzen mit verschiedenen Spezies hoher Übereinstimmung

3.2 Untersuchungen zur Kreuzreaktivität von Antikörpern gegen Glukotransporter vom Rind mit Immunhistochemie und Western Blot

Kommerziell erhältliche Antikörper sind gegen Epitope der Glukotransporterisoformen der Maus oder des Menschen gerichtet. Um eine Lokalisation von Glukotransporterproteinen in Präimplantationsembryonen des Rindes anhand immunhistochemischer Methoden vornehmen zu können, war durch Voruntersuchungen zu zeigen, ob die verwendeten Antikörper mit bovinen Glukotransporterproteinen kreuzreagieren. In Tabelle 3-8 sind die Ergebnisse der mit Western Blot und Immunhistochemie getesteten Antikörper zusammengefaßt.

Antigen	Firma/ Institut	Katalog Nummer	Western Blot		Immunhistochemie	
			Positivkontrolle	Rinderprotein	Positivkontrolle	Rindergewebe
Glut1	Santa Cruz Biochemicals	sc 1603	-	-	-	-
	Santa Cruz Biochemicals	sc 7903	-	-	+	+
Glut2	Chemicon	AB 1342	+	-	+	-
	Pharmakologie RWTH Aachen		+	+	nt	nt
Glut3	Chemicon	AB 1345	nt	nt	-	-
Glut4	Santa Cruz Biochemicals	sc 1608	-	-	-	-
	Santa Cruz Biochemicals	sc 7938	+	-	+	-
	Chemicon	AB 1346	+	-	+	-
	DPC	BM 436	+	+	+	nt
Glut5	Chemicon	AB 1041	-	-	-	-
Glut8	Pharmakologie RWTH Aachen		bei Überexpression in COS 7 Zellen	keine Überexpression möglich	unspezifisch	unspezifisch
	Gynäkologie Washington Universität St. Louis		kA	kA	nt	nt
SGLT-I	Chemicon	AB 1352	-	-	+	-

Tabelle 3-8: Aufstellung der Antikörper gegen Glukotransporter, die auf Kreuzreaktivität mit Rinderprotein mittels Immunhistochemie und/oder Western Blot getestet wurden (+ = positiv; - = negativ; nt = nicht getestet; kA = keine Aussage über Spezifität möglich)

3.2.1 Glukosetransporter 1

Zwei Antikörper der Firma Santa Cruz Biochemicals wurden auf Kreuzreaktivität mit bovinen Protein getestet. Der gegen den C-Terminus des humanen Glut1 gerichtete, in der Ziege erzeugte Antikörper (sc 1605) reagierte weder im Western Blot noch in der Immunhistochemie mit Protein der Positivkontrolle (Rattengewebe). Es war keine Kreuzreaktivität gegenüber bovinen Proteinen detektierbar, was den von Schultz et al. (1992) erhobenen Daten entspricht. Der im Kaninchen hergestellte, gegen die Aminosäuren 218-260 des humanen Glut1-Proteins gerichtete Antikörper (sc 7903) erbrachte im Western Blot keine spezifische Reaktion sowohl mit Proteinen der Positivkontrolle als auch mit Rinderprotein. Mit der Immunhistochemie konnte die Kreuzreaktivität des Antikörpers mit Rinderprotein gezeigt werden. Dieser Antikörper wurde für die Studien zur Lokalisation des Glut1 in Präimplantationsembryonen des Rindes verwendet.

3.2.2 Glukosetransporter 2

Die Studien von Schultz et al (1992) zur Expression der Glukosetransporterisoformen 1-4 in Präimplantationsembryonen der Maus und des Rindes zeigten, dass ein gegen die Aminosäuren des C-Terminus des murinen Glut2 gerichteter Antikörper nicht mit Rinderprotein kreuzreagiert. Daraufhin wurde ein Glut2-Antikörper der Firma Chemicon (AB1342), welcher als Epitope die Aminosäuren 40-55 der exoplasmatischen Schleife des humanen Proteins erkennt, auf Kreuzreaktivität mit Rinderprotein getestet. Für die als Positivkontrolle eingesetzten Gewebe von Maus bzw. Ratte konnten sowohl im Western Blot als auch mit der Immunhistochemie spezifische Färbungen erhalten werden. Eine Kreuzreaktivität mit bovinen Gewebe war nicht nachweisbar. Ein gegen den C-Terminus des humanen Glut2-Proteins gerichteter Antikörper (nicht kommerzieller, polyklonaler, durch Immunisierung von Kaninchen hergestellter Antikörper - Institut für Pharmakologie der RWTH Aachen) erbrachte im Western Blot spezifische Färbungen im Molekulargewichtsbereich von 53kDa für murine (Maus) als auch bovine Leberproteinextrakte (Abbildung 3-9). Proteinextrakte des Muskels der Maus und des Rindes, die als Negativkontrolle dienten, wiesen Färbungen im Molekulargewichtsbereich von 47-49kDa auf. Diese Größe stimmt nicht mit dem Molekulargewicht des Glut2 (53-61kDa) überein und stellt unspezifische Wechselwirkungen des Antikörpers mit Muskelproteinen dar.

Anhand der Ergebnisse, die mit dem Western Blot erhalten wurden, kann dieser Glut2-Antikörper in der Immunhistochemie mit bovinen Gewebe getestet werden.

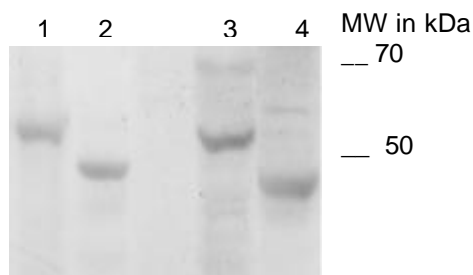


Abbildung 3-9 Immunreaktion des polyklonalen Glut2-Kaninchenserums (Verdünnung 1:250; Pharmakologie RWTH Aachen) detektiert mit „enhanced chemoluminescence“ (ECL) nach Inkubation mit HRP konjugierten goat-anti-rabbit Sekundärantikörper (1:8000). **Bahn 1** Maus – Leber **Bahn 2** Maus – Muskel **Bahn 3**: Rind –Leber **Bahn 4**: Rind – Muskel

3.2.3 Glukosetransporter 3

Der kommerziell erhältliche Kaninchen Glut3-Antikörper (Chemicon, AB1345) ist gegen 12 Aminosäuren des C-Terminus des humanen Proteins gerichtet (SIEPAKETTTNV). Aufgrund der sehr geringen Sequenzhomologien zwischen bovinen und humanen Glut3 in diesem Bereich (vgl. Abbildung 3-2), war nur eine geringe Wahrscheinlichkeit einer Kreuzreaktivität des verwendeten Antikörpers mit bovinen Protein zu erwarten. Es konnten nach Testung des Antikörpers mit Western Blot und Immunhistochemie keine Kreuzreaktivitäten des Antikörpers mit bovinem Protein nachgewiesen werden (vgl. auch Das et al., 1999).

3.2.4 Glukosetransporter 4

Vier verschiedene kommerziell erhältliche Glut4-Antikörper wurden auf Kreuzreaktivität mit bovinen Protein untersucht. Die von den Firmen Santa Cruz und Chemicon stammenden polyklonalen Antikörper (Tabelle 2-2) reagierten sowohl im Western Blot als auch in der Immunhistochemie positiv mit Kontrollgeweben der Ratte und Maus (außer sc 1608). Eine spezifische Immunreaktion mit Rinderprotein konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Mit dem von der Firma DPC erhältlichen monoklonalen Antikörper (Klon mAB 1F8; – James et al., 1988; James and Pilch, 1988) konnte im Western Blot eine Kreuzreaktivität mit Rinderprotein gezeigt werden (Abbildung 3-10). Das in Rinderproteinextrakten des Muskels und der Niere detektierte Protein liegt im Molekulargewichtsbereich von 43kDa. Die spezifische

Färbung und das Molekulargewicht des nachgewiesenen Proteins befinden sich in Übereinstimmung mit dem von James und Koautoren (1989) beschriebenen Daten über die Klonierung des Glut4 und seine Expression in Insulin-sensitiven Geweben der Ratte. Proteinextrakte von Rinderleber dienten als Negativkontrolle und zeigten keine Immunreaktion im Molekulargewichtsbereich des Glut4.

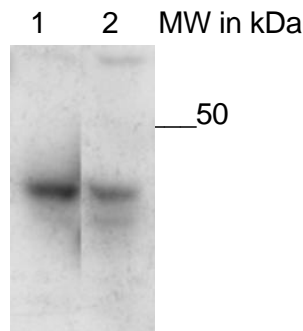


Abbildung 3-10 Immunreaktion des monoklonalen (Klon mAB 1F8) Glut4-Antikörpers (1:400; DPC BM 436) mit Rinderprotein nach „enhanced chemoluminescence“ (ECL) Detektion mit einem HRP-konjugierten goat-anti-mouse Sekundärantikörper (1:5000). **Bahn1:** Rind – Muskel **Bahn2:** Rind – Niere

3.2.5 Glukosetransporter 5

Ein polyklonaler rabbit-Glut5-Antikörper (12 Aminosäuren des C-Terminus des humanen Glut5; AB 1041, Chemicon) wurde mit Western Blot und Immunhistochemie auf Kreuzreaktivität mit Rinderprotein getestet. Beide Methoden konnten keinen Nachweis einer spezifischen Immunreaktion mit Proteinen der Niere und des Dünndarms erbringen. Um die Spezifität und Sensitivität der Immunreaktion des Western Blot zu erhöhen, wurde eine Konzentrierung von Glukosetransporterproteinen durch Präparation von „brush border membranes“ des Dünndarms und der Niere nach Malathi et al. (1979) vorgenommen. Auch unter Verwendung dieser Extraktionsmethode war die Detektion eines bovinen Proteins im Molekulargewichtsbereich des Glut5 mit dem eingesetzten Antikörper nicht möglich.

3.2.6 Glukosetransporter 8

Der in den Publikationen Thorens et al., Doege et al. sowie Carayannopoulos et al. im gleichen Jahr (2000) beschriebene Glut8 wird in Präimplantationsembryonen des Rindes exprimiert (Augustin et al., 2001). Für Studien zur Lokalisation dieses Insulin-sensitiven Glukosetransporters wurden zwei Antikörper auf Kreuzreaktivität mit

Rinderprotein untersucht. Sie stammten von der Arbeitsgruppe Prof. Joost (Institut für Pharmakologie, RWTH Aachen) und Prof. Moley (Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Washington University, St. Louis) und sind gegen Epitope des C-Terminus des humanen Glut8 gerichtet (Aminosäuren KGRTLEQVTAHFEGR bzw. LEQVTAHFEGR). Der von der Aachener Arbeitsgruppe eingesetzte Antikörper ermöglicht die Detektion des Glut8-Proteins nur nach Überexpression in COS-7 Zellen, wobei ein Nachweis des Proteins sowohl immunhistochemisch als auch im Western Blot möglich ist. Neuere Versuche der Gruppe erlaubten die Detektion des Glut8 in Testis der Maus anhand fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper mit einem Verstärkersystem (biotinylierter Sekundärantikörper und ein an Streptavidin gekoppelter Fluoreszenzfarbstoff). Jedoch scheint es sich hierbei um unspezifische Wechselwirkungen des Antikörpers zu handeln, wie weiterführende Untersuchungen der Gruppe in Aachen zeigten (persönl. Mitteilung – Frau Dr. Schürmann, März 2001).

Mit einem zweiten zur Verfügung stehenden polyklonalen Kaninchen Glut8-Antiserum (Carayannopoulos et al., 2000) konnten bisher keine Ergebnisse bezüglich einer Kreuzreaktivität nach Versuchen im Western Blot erzielt werden.

3.2.7 Natrium – abhängiger Glukosetransporter (SGLT-I)

Ein Kaninchen SGLT-I-Antiserum der Firma Chemicon (AB 1352) wurde auf Kreuzreaktivität mit Rinderprotein sowohl in der Immunhistochemie als auch im Western Blot getestet. Der Antikörper ist kreuzreaktiv mit verschiedenen Spezies (Ratte, Maus, Mensch, Kaninchen, Hund) und erkennt die Aminosäuren 402-420 der extrazellulären Schleife des Kaninchen-SGLT-I des Dünndarms. In der Immunhistochemie konnten spezifische Färbungen in den als Positivkontrolle verwendeten Nierenschnitten der Ratte erzielt werden, wohingegen in Rindergeweben keine Kreuzreaktivität nachgewiesen werden konnte. Der Einsatz des Antikörpers im Western Blot erbrachte keine spezifische Immunreaktion im erwarteten Größenbereich von 75kDa, sowohl in der Positivkontrolle als auch in Rinderproteinextrakten (Niere, Dünndarm). Um auszuschließen, dass es sich hierbei um Sensitivitätsprobleme der Immunreaktion und Detektion handelt, wurden Membranproteine der „brush border membranes“ der Niere und des Dünndarms im Western Blot eingesetzt. Ein Nachweis des SGLT-I war mit dem vorliegenden Antikörper auch hier nicht möglich.

3.3 Expression der Glukosetransporterisoformen in *in vitro* produzierten Präimplantationsembryonen des Rindes

3.3.1 *In-vitro*-Produktion von Rinderembryonen

Um die vorliegende Studien durchführen zu können, war es notwendig, die Rinderembryonenkultur *in vitro* in einem definierten Kulturmedium (SOF) zu etablieren und eine Optimierung der *In-vitro*-Kultur zu erzielen. Die Tabelle 3-9 fasst die dabei erreichten Ergebnisse bezüglich Maturations-, Fertilisations- und Blastozystenrate zusammen. Kulturen mit Fertilisationsraten von <60% oder Blastozystenraten <15% wurden nicht für weiterführende Versuche verwendet. Die Abbildung 3-11a zeigt eine fertilisierte Eizelle nach Färbung des Chromatins mit Lacmoid und Abbildung 3-11b Blastozysten (Tag 8 p.i.) nach 7 Tagen *In-vitro*-Kultur.

Die Testung verschiedener Maturations- und Fertilisationsprotokolle ergab, dass u.a. die Spermienpräparation und das verwendete Fertilisationsprotokoll einen erheblichen Einfluß auf die Fertilisations- und Blastozystenraten hat. Ein Vergleich der Spermienpräparationsmethoden „Swim-up“ und einer anschließenden Fertilisation der Oozyten in 100µl Microdrops mit der Percoll-Gradientenzentrifugation und einer Fertilisation in 300µL Medium in 4-well-dishes (Nunc, Roskilde, Dänemark) zeigte, dass die Gewinnung der motilen Spermien unter Verwendung von Percoll und eine Fertilisation in 300µL Medium in einer um durchschnittlich 10% höheren Fertilisationsrate resultierte.

Kulturrkriterien	in % der insgesamt kultivierten Oozyten
Maturationsraten	75-90%
Fertilisationsraten	60-88%
Blastozystenraten	15-37%

Tabelle 3-9 Zusammenfassung der Erfolgsraten in Prozent der eingesetzten Oozyten, wie sie mit dem unter 2.2. beschriebenen Protokoll erzielt wurden.

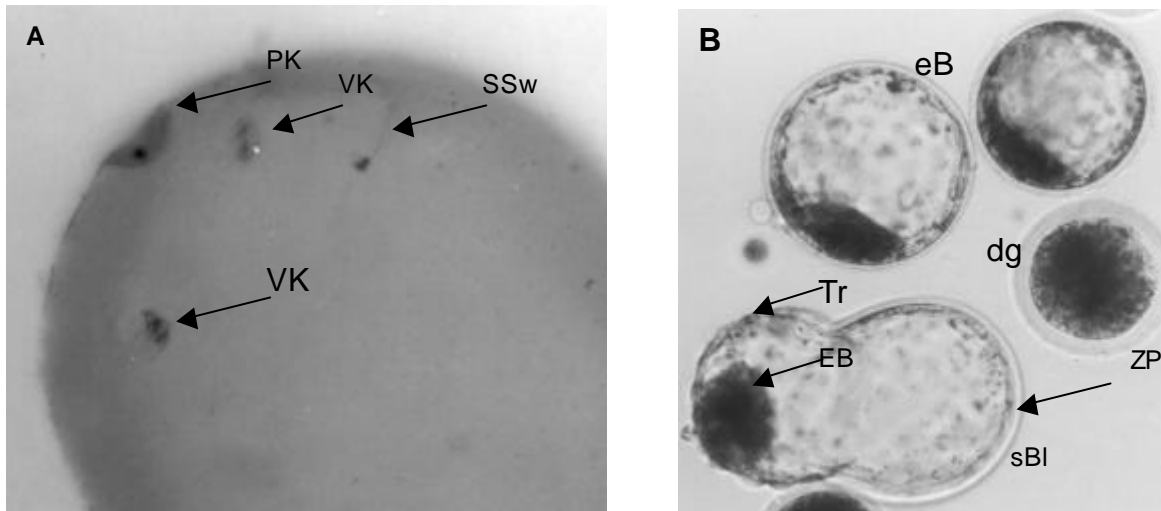


Abbildung 311 a) befruchtete Eizelle nach Chromatinfärbung mit Lacmoid PK – Polkörperchen, VK – Vorkern, SSw – Spermischwanz b) 8 Tage (p.i.) alte Blastozysten nach 7 Tagen *In-vitro*-Kultur eB – expandierte Blastozyste, sBL – schlüpfende Blastozyste, dg – degenerierter Embryo; Tr – Trophoblast, EB, Embryoblast, ZP – Zona pellucida

3.3.2 Nachweis von Glukosetransporter-RNA in Präimplantations-embryonen des Rindes *in vitro*

Mit genspezifischen Primern für die bovinen Glukosetransporter wurden Eizellen, gereifte Eizellen und Präimplantationsembryonen vom 2-/4-Zellstadium bis zu elongierten Blastozysten am Tag 16 auf die Expression der einzelnen Isoformen mit RT-PCR untersucht. Durch die Verwendung der Dynabeads für die Extraktion embryonaler mRNA aus den frühen Stadien bis zur geschlüpften Blastozyste, konnte mit geringen Mengen embryonaler RNA gearbeitet werden (Nachweis der Glukosetransporterexpression an Einzelblastozysten – entspricht >64 Zellen).

Das Expressionsmuster der Glukosetransporterisoformen ist in Tabelle 3-10 zusammengefaßt. Die Transkripte für die Glukosetransporter 1, 3, 8 und SGLT-I sind sowohl maternalen als auch embryonalen Ursprungs. Sie konnten in den Eizellen sowie in allen untersuchten Embryonalstadien nachgewiesen werden (Abbildung 3-12a-d). Für die Glukosetransporter 2 und 4 wurde eine Transkription erst in Blastozystenstadien nachgewiesen. Dabei ist der Glut2 ausschließlich in den späten, bereits elongierten Blastozysten am Tag 14 und 16 detektiert worden, wohingegen eine geringe Transkription für den Glut4 in gepoolten Tag 8-Blastozysten (p.i.) gezeigt werden konnte (Abbildung 3-12f und g). Der Glukosetransporter 5 wurde mit dem Beginn der Aktivierung des embryonalen Genoms ab dem 8-/16-Zellstadium (Telford et al., 1990) transkribiert (Abbildung 3-12e).

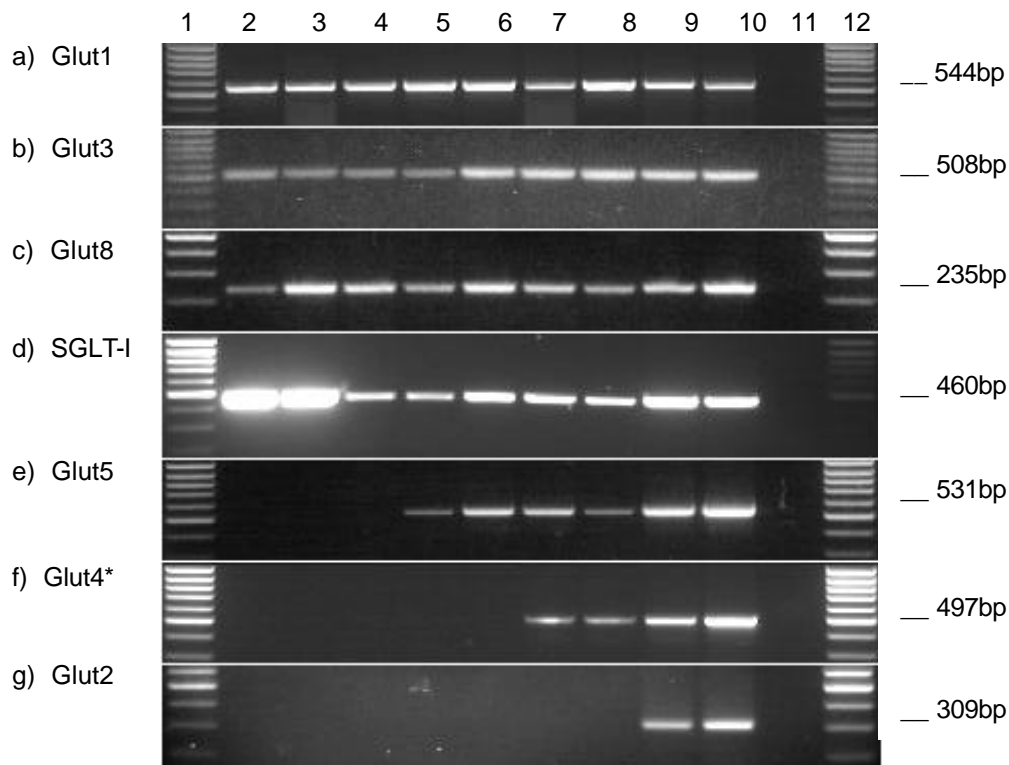


Abbildung 3-12 Expression der Glukosetransporterisoformen in Oozyten und Präimplantationsembryonen des Rindes *in vitro*. **Bahn 1/12:** 100bp Marker, **Bahn 2:** ungereifte Oozyten (n=40), **Bahn 3** gereifte Oozyten (n=40), **Bahn 4** 2-/4-Zellstadien (n=40), **Bahn 5** 8-/16-Zellstadien (n=20), **Bahn 6:** Morulae (n=6), **Bahn 7:** expandierte Blastozyste (n=1), **Bahn 8:** geschlüpfte Blastozyste (n=1), **Bahn 9:** elongierte Blastozyste Tag14, **Bahn 10:** elongierte Blastozyste Tag16.

*Die Transkription des Glut4 war nur in Pools expandierter (n=4) bzw. geschlüpfter Blastozysten (n=2) nachweisbar.

Gen	Oocyte	gereifte Oocyte	2-/4-Zell Embryo	8-/16-Zell Embryo	Morula	Blastozyste	geschlüpfte Blastozyste	d14 Blastozyste	d14 Blastozyste
Glut1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glut3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glut8	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SGLT-I	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glut 5	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Glut4	-	-	-	-	-	-/+ *	-/+ *	+	+
Glut2	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Tabelle 3-10. Zusammenfassung des Expressionsmusters der einzelnen Glukosetransporterisoformen in *in vitro* Präimplantationsembryonen des Rindes * Die Transkription des Glut4 war bei expandierten (n=4) und geschlüpften Blastozysten (n=2) nur beim Poolen mehrerer Blastozysten nachweisbar.

3.3.3 Lokalisation von Glut4-RNA in elongierten, 14 und 16 Tage alten Blastozysten mit In-situ-Hybridisierung

Die Transkription des Glut4 während der Präimplantationsentwicklung von Säugetierembryonen konnte erstmals in Rinderblastozysten mit RT-PCR nachgewiesen werden. Die Lokalisation und der Nachweis der Glut4-Transkripte in Embryonalzellen wurde mit der In-situ-Hybridisierung an Schnitten 14 (n=2) und 16 (n=3) Tag alter *in vivo* Blastozysten durchgeführt. Glut4-Transkripte konnten im Zytoplasma von Trophoblast- und Endodermzellen (primitives Endoderm) 14 Tage alter Embryonen nachgewiesen werden (Abbildung 3-13a). Die Transkripte waren spezifisch in den apikalen und basalen Bereichen der Trophoblastzellen lokalisiert. Da keine Schnitte von Blastozysten mit Keimscheibenbereichen vorlagen, kann keine Aussage zur Lokalisation und Transkription des Glut4 in Embryoblastzellen getroffen werden. Gegenüber 16 Tage alten Embryonen (Abbildung 3-13b) wiesen 14 Tage alte Blastozysten eine wesentlich intensivere Färbung auf (Abbildung 3-13a). Die mit der In-situ-Hybridisierung detektierte Tendenz einer höheren Glut4-mRNA-Menge in den 14 Tage alten Embryonen konnte unter Verwendung der kompetitiven RT-PCR bestätigt werden (Abschnitt 3.3.4)

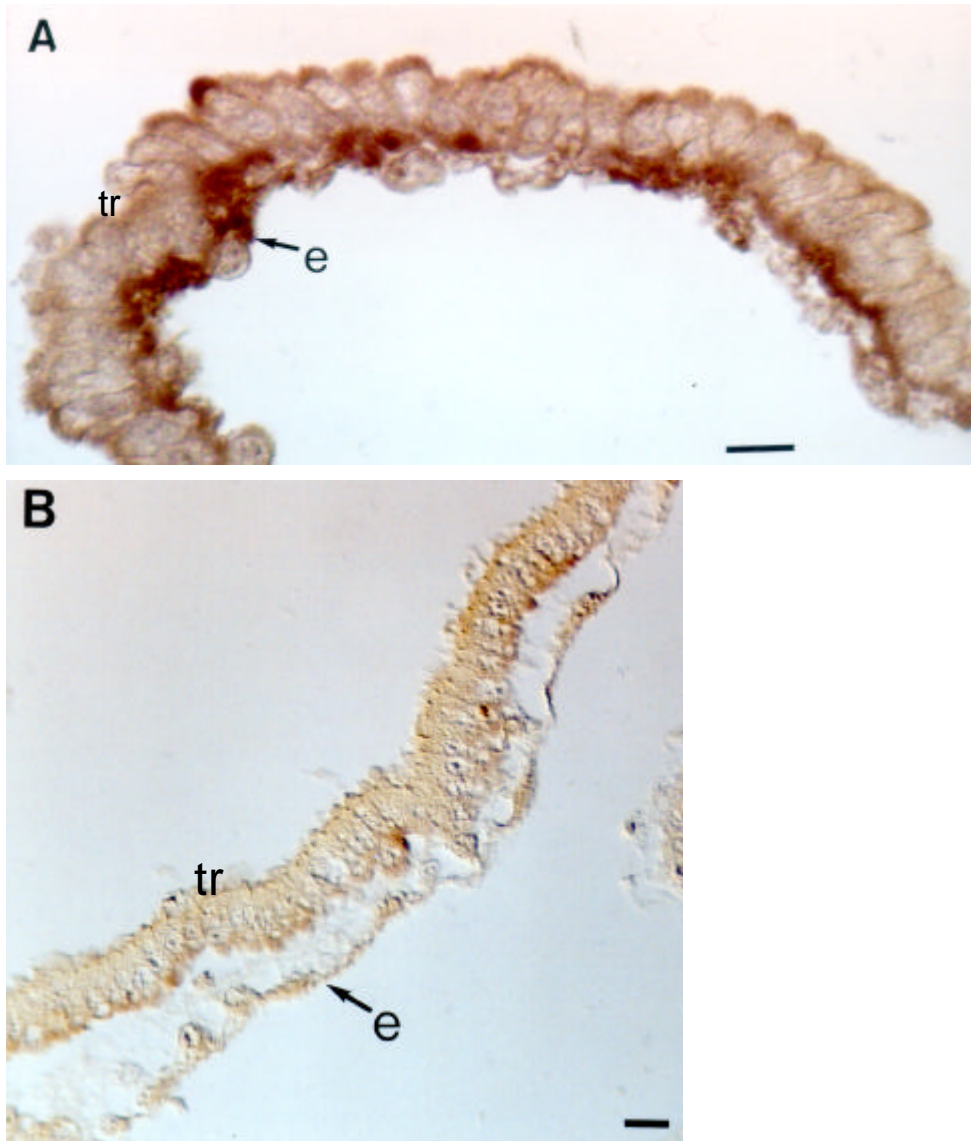


Abbildung 3-13 Glut4-In-situ-Hybridisierung von 14 (a) und 16 (b) Tage alten *in vivo* gewonnenen Blastozysten. Glut4-Transkripte sind im Zytoplasma sowohl von Endoderm (e) als auch Trophektodermzellen (tr) nachweisbar. Im Vergleich mit dem In-situ-Nachweis der Glut4-mRNA in 14 Tage alten Blastozysten war eine deutlich geringere Signalintensität in 16 Tage alten Blastozysten festzustellen.

3.3.4 Quantifizierung der Transkriptmengen für Glut1 und Glut4 in 14 und 16 Tage alten *in vitro* und *in vivo* Blastozysten

Mit kompetitiver PCR wurden die Transkriptmengen für die Glukosetransporter 1 und 4 in 14 und 16 Tage alten *in vivo* und *in vitro* Blastozysten bestimmt. Hintergrund dieser Analysen war es, eine mögliche Korrelation zwischen den Transkriptmengen beider Gene und dem Entwicklungsstadium der Blastozysten oder ihres Wachstums *in vivo* bzw. *in vitro* zu untersuchen. Es wurden insgesamt 5 Gruppen 14 Tage alter *in vivo* und *in vitro* Embryonen sowie drei 16 Tage alte *in vivo* und fünf 16 Tage alte *in vitro* Blastozysten ausgewertet (Tabelle 3-11). Voruntersuchungen zeigten, dass die Quantifizierung der Transkription des Glut1 bzw. Glut4 50 bzw. 200ng embryonale Gesamt-RNA je Aliquot Standard-RNA erforderte. Da für eine einzelne cRT-PCR fünf Messpunkte (fünf Konzentrationen der Verdünnungsreihe der Standard RNA) bestimmt wurden, war eine RNA Menge von mindestens 1,25µg je Embryo nötig. Für die Messung der Transkriptmengen an 14 Tage alten Embryonen wurden zwei Embryonen gepoolt, um über genügend Gesamt-RNA für die Durchführung der cRT-PCR insbesondere für den schwach exprimierten Glut4 zu verfügen.

Mit der Quantifizierung der Glut1-mRNA in den einzelnen Blastozystenstadien konnte eine höhere Transkription dieses Genes in 16 Tage gegenüber 14 Tage alten Embryonen nachgewiesen werden, wobei keine Unterschiede zwischen *in vivo* und *in vitro* gewachsenen Blastozysten gefunden wurden. Die absoluten Mengen lagen zwischen $29,2 \pm 7,6$ für d14 und $45,0 \pm 9,1 \times 10^6$ Molekülen/100ng Gesamt-RNA für d16 Blastozysten.

Der Glut4 wird deutlich stärker in 14 Tage alten gegenüber 16 Tage alten Blastozysten transkribiert. Ein Unterschied in den absoluten Transkriptmengen zwischen *in vivo* und *in vitro* Blastozysten war nicht nachweisbar. Jedoch fällt auf, daß in allen d16 *in vivo* Embryonen kein Glut4-Transkript detektiert werden konnte, wohingegen *in vitro* Embryonen gleichen Stadiums geringe Mengen dieses Gens exprimieren (Tabelle 3-11). Ein Vergleich der absoluten Transkriptmengen für die beiden Transporter zeigt eine etwa 1500 fach höhere Expression des Glut1 gegenüber dem Glut4, wobei festzustellen ist, dass eine große Variation zwischen den Einzelembryonen zu verzeichnen war.

	Embryonen- anzahl	Glut1 Amplifikat nach RT-PCR	Glut1 mRNA [pg/100ng total RNA]	Glut4 Amplifikat nach RT-PCR	Glut4 mRNA [fg/100ng total RNA]
<i>in vivo</i>					
d14	2	+	4,6	+	5
	2	+	6,4	+	65,9
	2	+	8,4	+	6,0
	1	+	19,6	+	nb
d16	1	+	14,4	-	
	1	+	5,6	-	
	1	+	12,1	-	
<i>in vitro</i>					
d14	2	+	0,8	+	3,9
	2	+	3,0	+	nb
	2	+	8,7	+	nb
	1	+	9,9	+	nb
d16					
	1	+	15,0	-	15,2
	1	+	7,5	+	<1
	1	+	23,0	-/+	<1
	1	+	5,3	-/+	
	1	+	nb	-	

Tabelle 3-11 Glut1- und 4mRNA-Expression und -Transkriptmengen in 14 und 16 Tage alten *in vivo* und *in vitro* Blastozysten (+ Transkript mit RT-PCR detektiert, - Transkript mit RT-PCR nicht detektiert, nb – nicht bestimmbar).

3.3.5 Immunhistochemischer Nachweis von Glut1 und Glut4 in Rinderblastozysten

Die Lokalisation des Glukosetransporter 1-Proteins wurde an Schnitten paraffineingebetteter 14 und Tag 16 alter Embryonen und mit der Whole-mount-Immunhistochemie an 8 Tage alten expandierten Blastozysten vorgenommen. Es zeigte sich, dass diese Isoform vor allem in den lateralen Membranen und im Zytoplasma der Trophoblastzellen vorkommt (Abbildung 3-14 und 3-15). Mit der Whole-mount-Immunhistochemie wurde der Glut1 auch in den Embryoblastzellen bei expandierten Blastozysten nachgewiesen (Abbildung 3-15).

Der immunhistochemische Nachweis des Glut4 in elongierten 14 und 16 Tage alten Blastozysten zeigte eine unterschiedliche Lokalisation des Proteins in Zellen der Keimscheibe und der Endoderm– sowie Trophoblastzellen (Abbildung 3-16a). Die Embryoblastzellen weisen eine ausgeprägte zytoplasmatische Färbung auf. In den Trophoblast– und Endodermzellen sind vor allem die Zellkerne angefärbt. Das Zytoplasma dieser Zellen ist nur schwach markiert.



Abbildung 3-14 Immunhistochemischer Nachweis des Glut1-Proteins an einer 14 Tage alten Blastozyste. Der Glut1 konnte in den lateralen Membranen der Trophoblasten (tr) lokalisiert werden. Die endodermalen Zellen (e) exprimieren keinen Glut1.

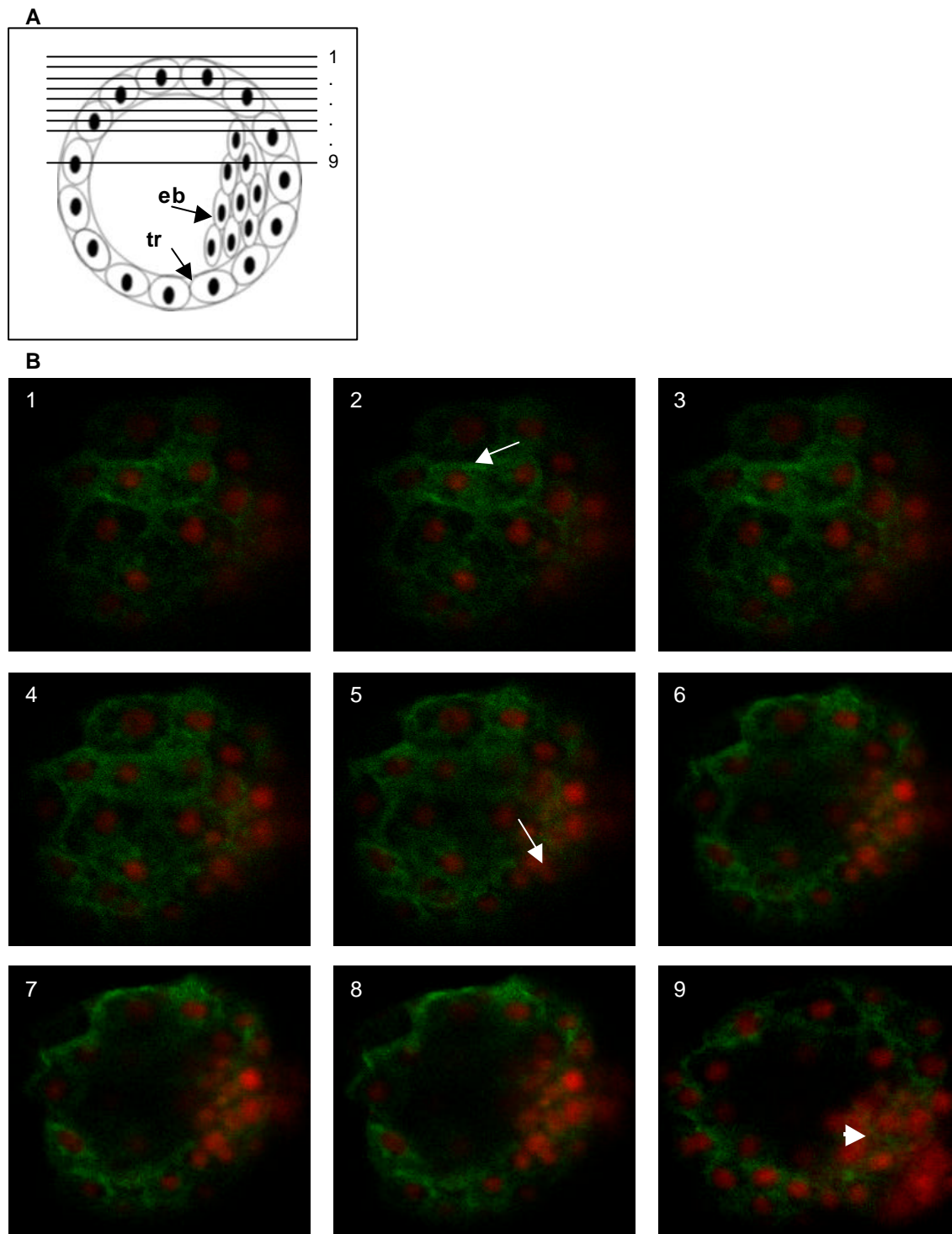


Abbildung 3-15 a) Schematische Darstellung der mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop erhaltenen Schnitte einer Blastozyste, wie sie unter b) dargestellt sind. b) Immunhistochemischer Nachweis des Glut1 am Gesamtembryo (whole mount). Gezeigt ist eine Auswahl von 9 mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop erhaltenen Schnitten. Grün dargestellt ist der durch einen FITC-markierten Sekundärantikörper detektierte Glut1, während die Zellkerne mit Propidiumiodid rot gegengefärbt sind. Die Whole-mount-Immunhistochemie zeigt, daß der Glut1 vor allem in lateralen Zellmembranen der Trophoblastzellen lokalisiert ist (Schnitt2 – Pfeil). Apikale Membranen der Trophoblastzellen zeigen keinen Glut1 (Schnitt5 – Pfeil), während in Embryoblastzellen eine Färbung vorliegt (Schnitt9 – Pfeilspitze).

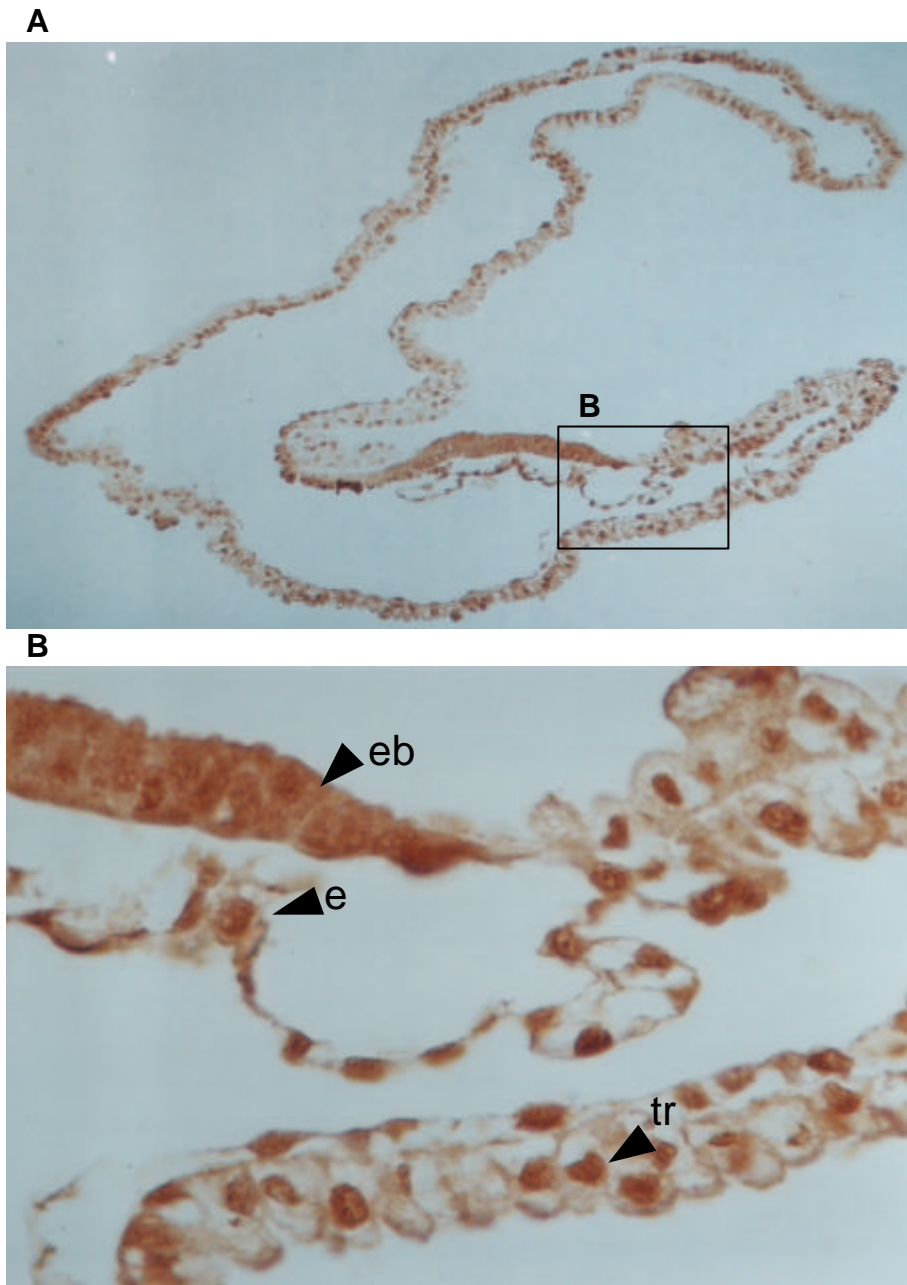


Abbildung 316 Immunhistochemische Lokalisation des Glut4 in einer 14 Tage alten Blastozyste. a) Übersichtsbild des Gesamtembryos b) Eine vor allem zytoplasmatische Färbung zeigen die Zellen der Keimscheibe (eb – Embryoblast). Die Zellen des Endoderms (e) und Trophoblasten (tr) weisen eine starke Kernfärbung auf, während das Zytoplasma negativ oder nur schwach positiv ist.

3.4 Der Einfluß von Insulin auf die Expression von metabolisch relevanten Genen in 8 Tage alten Blastozysten

3.4.1 Insulinexposition von expandierten Blastozysten

Der Vergleich der relativen Transkriptmengen wurde unter Verwendung des univariaten ANOVA-Tests unter Einbeziehung der Versuchswiederholungen durchgeführt (s. 2.7.1). Eine Stunde Insulinexposition resultierte im Vergleich zu Embryonen der Kontrollgruppe in einer signifikant erhöhten relativen Transkriptmenge für die Gene Glut3, Glut8, Hexokinase und Phosphofruktokinase. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt.

Ein Effekt des Insulins auf die Transkription der untersuchten Gene über den gesamten Expositionszeitraum (1-4 Stunden) wurde nicht gefunden (univariater ANOVA-Test unter Einbeziehung des Faktors Zeit – s. 2.7.1). Jedoch weist der Glut3 mit einem $p = 0,057$ die Tendenz einer relativ erhöhten Transkriptmenge über den gesamten Zeitraum auf. Im Vergleich zu den anderen untersuchten Genen wird dieser Transporter über den betrachteten Zeitraum am stärksten in seiner Expression durch Insulin verändert (Abbildung 3-17).

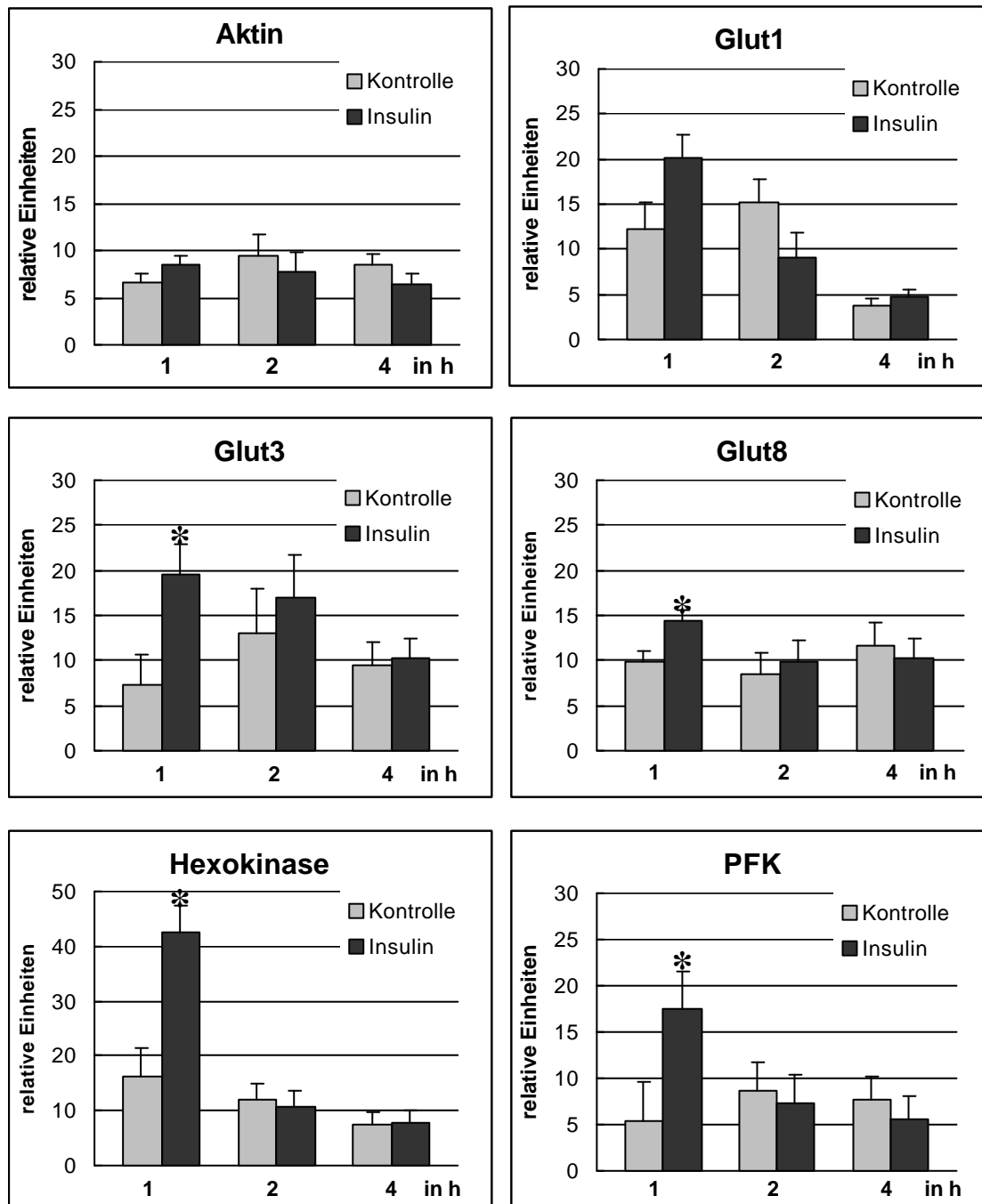


Abbildung 3-17 Diagramme zur Darstellung der relativen Transkriptmengen für die untersuchten Gene (s. Text) nach Insulinexposition expandierter Blastozysten für eine, zwei oder vier Stunden. Wiedergegeben sind in jedem Diagramm die Mittelwerte beider Gruppen mit dem entsprechenden Standardfehler für die einzelnen Expositionszeiten. Ein direkter Vergleich einer veränderten Transkription über die Zeit ist in dieser Darstellung nicht möglich, da die hier wiedergegebenen Daten nur eine Auswertung des Insulineffektes für einen Zeitraum beinhalten. Nach einer Stunde Insulin-supplementierter Kultur der Blastozysten wurden für die Gene Glut3, 8, Hexokinase und Phosphofruktokinase signifikante Unterschiede (gekennzeichnet mit *) in den relativen Transkriptmengen gefunden. Signifikante Unterschiede über den gesamten Untersuchungszeitraum waren nicht nachzuweisen. Jedoch zeigte sich für den Glut3 die Tendenz einer erhöhten relativen Transkriptmenge über den gesamten Expositionszeitraum ($p=0,057$).

3.4.2 Insulinexposition während der *In-vitro*-Kultur von Rinderembryonen

Um bestimmen zu können, ob Insulin auch einen Langzeiteffekt auf die Expression von Glukosetransportern und Gene der Glykolyseenzyme Hexokinase und Phosphofruktokinase ausübt, wurden Embryonen mit dem Beginn der *In-vitro*-Kultur vom Tag 1 p.i. bis zum Tag 8 p.i. mit bzw. ohne Zugabe von 10µg/mL Insulin kultiviert. Neben der Bestimmung der relativen Transkriptmengen für die unter 3.4.1 besprochenen Gene wurde der Insulineffekt an Parametern wie Blastozystenrate dem Anteil geschlüpfter Blastozysten, Blastozystenzellzahl und dem Verhältnis von Trophoblast -/Embryoblastzellzahl bemessen.

Für die Bestimmung der relativen Transkriptmengen wurden je Gruppe 10 geschlüpfte Blastozysten, aus zwei unabhängigen Versuchswiederholungen stammend, ausgewertet. Der Vergleich des Verhältnisses von Trophoblast- zu Embryoblastzellzahl wurde für 28 Blastozysten der Kontrollgruppe sowie 26 Embryonen der Insulingruppe vorgenommen. Eine Zusammenfassung der nach 10 unabhängigen *In-vitro*-Versuchen erhobenen Daten findet sich in Tabelle 3-12.

Kontrolle					Insulin				
Eizellen	Blastozysten		Geschlüpfte Blastozysten		Eizellen	Blastozysten		Geschlüpfte Blastozysten	
	Gesamt	in %	Gesamt	in %		Gesamt	in %	Gesamt	in %
749	180	24,0	51	28,3	628	150	23,8	68	45,3

Tabelle 3-12 Zusammenfassung der in 10 Versuchswiederholungen ermittelten Daten zum Einfluß von 10µg/mL Insulin auf die Blastozystenentwicklung nach 7 Tagen (durchschnittlich 168h) *In-vitro*-Kultur.

Die Auswertung der Kulturkriterien Blastozystenrate und Rate geschlüpfter Blastozysten wies einen signifikant erhöhten Prozentsatz ($p < 0,05$) geschlüpfter Embryonen in der Insulin- verglichen mit der Kontrollgruppe auf (Abbildung 3-18b). Im Gegensatz dazu blieb Insulin ohne Effekt auf die Blastozystenrate (Abbildung 3-18a).

Die Ergebnisse der Insulin- und Kontrollgruppe bezüglich der Blastozystenzellzahl und dem mit dem „Differential staining“ bestimmten Verhältnis zwischen Tropho- und Embryoblastenzellzahl zeigt Abbildung 3-20. Insulin bewirkt eine signifikante Erhöhung der Blastozystenzellzahl nach 7 Tagen *In-vitro*-Kultur (Abbildung 3-19a),

hat aber keinen Einfluss auf das Verhältnis der Zellen zwischen dem Tropho – und dem Embryoblasten (Abbildung 3-19b).

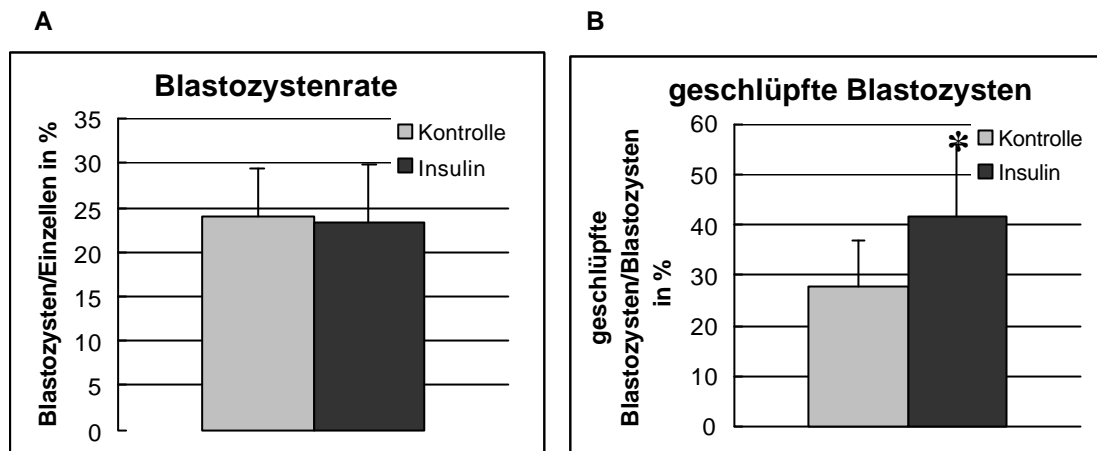


Abbildung 318 Blastozystenrate und Rate geschlüpfter Blastozysten (Tag8 p.i.) nach 7 Tagen *In-vitro*-Kultur mit bzw. ohne Insulin. Es zeigte sich kein Insulineffekt auf die Blastozystenrate (a), jedoch auf den Anteil der geschlüpften Embryonen (b). Einfacher ANOVA –Test ($p < 0,05$).

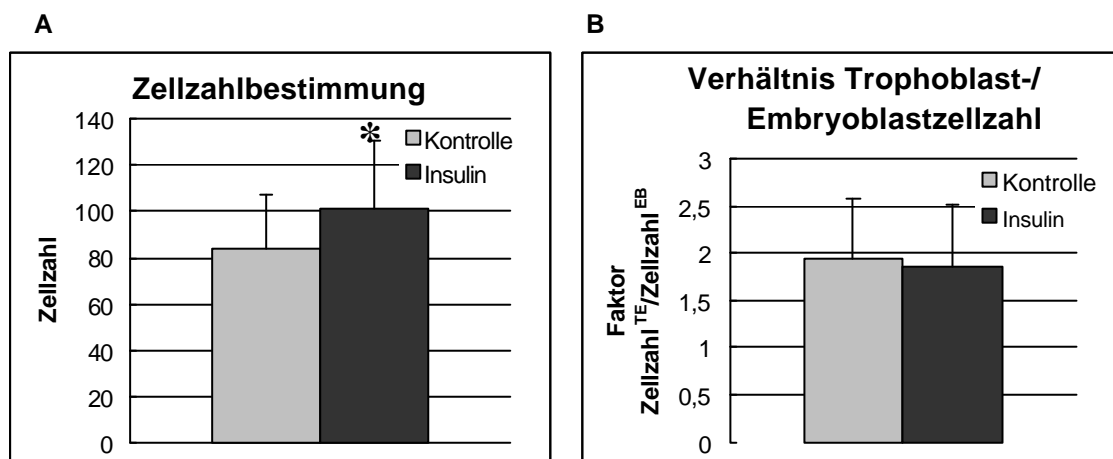


Abbildung 3-19 Insulineffekt auf die Zellzahl von Blastozysten und das Zellzahlverhältnis zwischen Trophoblast und Embryoblast. Während eine signifikant erhöhte Zellzahl nach Insulinkultur vorliegt (a), war kein Effekt des Insulins auf das Zellzahlverhältnis zwischen Trophoblastzellen und Embryoblasten nachzuweisen (b). Einfacher ANOVA Test ($p < 0,05$).

Der statistische Vergleich zwischen den relativen Transkriptmengen der einzelnen Gene beider Gruppen erfolgte mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse (Modell univariat) unter Einbeziehung der durchgeführten Versuchswiederholungen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen für die untersuchten Gene nachgewiesen werden (Abbildung 3-20). Jedoch war zu beobachten, dass, mit Ausnahme des Glut1, die relativen Transkriptmengen aller bestimmten Gene in der Insulingruppe höher ausfielen. Da diese Tendenz auch für das als internen Standard

mitgeführte „housekeeping gene“ Aktin vorliegt, scheinen die in der Insulingruppe relativ erhöhten Transkriptmengen auf die signifikant höhere Zellzahl der Blastozysten der Insulingruppe (s.u.) zurückzuführen zu sein.

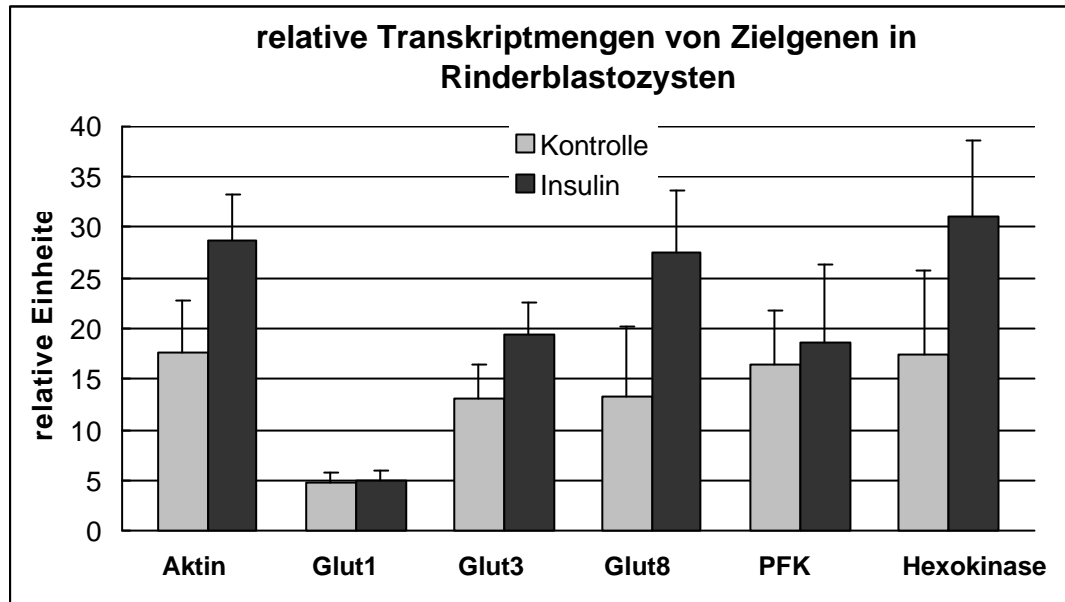


Abbildung 3-20 Semiquantitative Bestimmung der relativen Transkriptmengen durch RT-PCR bezogen auf den externen Standard Kaninchen-Globin-mRNA für die Gene Aktin, Glut1, Glut3, Glut8 , Hexokinase und Phosphofruktokinase in 8 Tage alten geschlüpften Blastozysten nach *In-vitro*-Kultur mit bzw. ohne 10µg/mL Insulin (Insulin bzw. Kontrolle).

4 Diskussion

4.1 Expression von Glukosetransporterisoformen beim Rind

Im Gegensatz zu dem mittlerweile entschlüsselten menschlichen Genom und den zahlreichen Genbankeinträgen für Spezies wie Maus und Ratte liegen nur wenige Sequenzdaten für die Spezies *Bos taurus* vor. Die Grundlage für die vorliegende Studie zur Expression von Glukostransporterisoformen in Präimplantationsembryonen des Rindes bildete die Klonierung und Sequenzierung boviner Glukosetransporter-cDNA. Bovine Sequenzen für die Isoformen 2, 3, 5 und 8 und den aktiven Transporter SGLT-I konnten mit PCR unter Verwendung degenerierter Primer amplifiziert und sequenziert werden. Während des Erstellens der Arbeit wurden die Sequenzen für die humanen Glukosetransporterisoformen 8 bis 10 publiziert (Carayannopoulos et al., 2000; Doege et al., 2000a; Doege et al., 2000b; Ibberson et al., 2000; McVie-Wylie et al., 2001; Phay et al., 2000a). Die Nukleotidsequenzen dieser Transporter wurden unter Zuhilfenahme von EST-Datenbanken ermittelt. Der Zugriff auf die mehr als 2 Millionen Einträge umfassende, rasant wachsende Datenbank erlaubt das schnelle Screenen nach homologen Teilsequenzen und die Klonierung neuer cDNA. Die in kurzem Zeitintervall erfolgte Publikation dieser neuen Isoformen, die eine geringe Homologie zu den bereits bekannten Glut-Proteinen aufweisen, zeigt die Vorteile dieser Methode im Finden unbekannter Sequenzen gegenüber bisher eingesetzten Methoden wie dem Screenen von cDNA Banken unter „low stringent conditions“, das u.a. zu Klonierungsartefakten wie dem Glut7 führte (Burchell, 1998).

Die im Rahmen dieser Arbeit klonierten bovinen Glukosetransporterisoformen 2, 3, 5 und der aktive Transporter SGLT-I weisen nur geringe Homologien zu humanen Nukleotid- und Proteinsequenzen auf. Dies erschwert den Nachweis oder gar eine Lokalisation der Proteine anhand immunoreaktiver Methoden, da kommerziell erhältliche Glut-Antikörper gemeinhin Epitope humaner oder muriner Proteine erkennen (Das et al., 1999; Ehrhardt and Bell, 1997).

Für weiterführende Studien zur Rolle der Glukosetransporter während der frühen Embryonalentwicklung beim Rind ist die Verwendung spezifischer Antikörper notwendig. Insbesondere RNA-Antisense-Oligonukleotidexperimente zur Repression einer Glut3-Translation bedingen den Nachweis der unterdrückten Proteinsynthese.

Die Kenntnis der Protein-kodierenden Sequenz des bovinen Glut3 ermöglicht sowohl die Konstruktion von Antisense-Oligonukleotiden als auch die Herstellung eines spezifischen Antikörpers.

4.2 Bovine Glukosetransporter werden in Präimplantations-embryonen entwicklungspezifisch exprimiert

Die vorliegende Studie erlaubt erstmals eine umfassende Betrachtung der Expression von Glukosetransporterisoformen während der Präimplantationsentwicklung von Säugetierembryonen. Es wurde gezeigt, dass Glukosetransporter während der Embryonalentwicklung beim Rind bis zur elongierten Blastozyste am Tag 16 stadienspezifisch exprimiert werden. Dabei liegen die Glukosetransporter 1, 3, 8 und SGLT-I als maternale Transkripte vor und sind in allen untersuchten Embryonalstadien nachweisbar. Mit der Aktivierung des embryonalen Genoms im 8-/16-Zellstadium (Telford et al., 1990) ist eine Transkription des Glukosetransporters 5 detektierbar, wohingegen die Isoformen 2 und 4 erst im Blastozystenstadium transkribiert werden. Während in Säugetierembryonen der Glukosetransporter 5 bisher nicht untersucht wurde und für den SGLT-I widersprüchliche Proteindaten und Inhibitorstudien vorliegen, wurden sowohl Expressionstudien als auch funktionelle Untersuchungen zur Rolle der Isoformen 1-4 sowie 8 in Präimplantationsembryonen der Maus durchgeführt (Aghayan et al., 1992; Hogan et al., 1991; Schultz et al., 1992; Carayannopoulos et al., 2000; Pantaleon et al., 1997; Pantaleon et al., 2001). Daten zur Expression von Glukosetransportern liegen auch für humane (Dan-Goor et al., 1997), Kaninchen (Robinson et al., 1990) und Präimplantationsembryonen des Rindes (Lequarre et al., 1997; Wrenzycki et al., 1998) vor. Allerdings beschränken sich die Untersuchungen an Kaninchen- und Rinderembryonen auf den Glukosetransporter 1 (Lequarre et al., 1997; Robinson et al., 1990; Wrenzycki et al., 1998). Erste Studien zur Expression der Glukosetransporter 2-4 in Rinderembryonen blieben aufgrund fehlender spezifischer Antikörper und PCR-Primer ohne Ergebnis (Schultz et al., 1992).

4.2.1 Die Glukosetransporter 1 und 3

Rinderblastozysten exprimieren den Glut1 in den lateralen Membranen der Trophoblast- und Embryoblastzellen (Abbildung 3-14 und 3-15). In Blastozysten der Maus wurde gezeigt, dass der Glut1 in den basolateralen Membranen der Trophoblastzellen lokalisiert ist und daher der Aufnahme der maternalen externen Glukose nicht zur Verfügung steht (Pantaleon et al., 1997; Pantaleon and Kaye, 1998). Vielmehr ist dem Glut3 aufgrund seiner Lokalisation in den apikalen Membranen der Trophoblastzellen diese Rolle zuzuschreiben. Die offenbar entscheidende Funktion des Glut3 für die Versorgung des Embryos mit Glukose bestätigt die Beobachtung einer um zirka 50% verringerten Blastozystenrate nach Kultur von 2-Zell-Embryonen unter Repression der Glut3-Translation durch Antisense-Oligonukleotide (Pantaleon et al., 1997).

Aufgrund der Lokalisation des Glut1 in den lateralen Membranen von Rinderblastozysten ist diese Isoform, vergleichbar mit den Blastozysten der Maus, nicht an einer Aufnahme externer Glukose beteiligt. Die konstitutive Expression des „high affinity“-Glukosetransporters 3 lässt vermuten, dass dieser Isoform in Rinderembryonen eine ähnlich entscheidende Rolle während der Embryonalentwicklung zukommt wie es für Blastozysten der Maus gezeigt werden konnte. Im Gegensatz zum embryonal kodierten Glut3 der Maus liegt diese Isoform im Rind bereits als maternales Transkript vor. An dieser Stelle sei darauf verwiesen, dass glukosetransporterdefiziente Mäuse bisher nur für die Glukosetransporter 2 und 4 hergestellt wurden (Charron and Katz, 1998; Dutour, 1996; Guillam et al., 2000; Guillam et al., 1997; Kadowaki, 2000). Beide Knockout-Modelle weisen keine phänotypisch veränderte Präimplantationsentwicklung auf. Da der Glut4 in Präimplantationsembryonen der Maus nicht exprimiert wird und dem Glut2 aufgrund seiner Lokalisation und Kinetik des Glukosetransportes keine entscheidende Bedeutung in der Bereitstellung externer Glukose für den Embryo zukommt (s.u.), müssen Untersuchungen unter Verwendung von Knockout-Modellen Aufschluss über die Funktion und Bedeutung anderer Glukosetransporterisoformen für die Glukosehomöostase bei Embryonen geben.

4.2.2 Die Insulin-sensiviten Glukosetransporter 4 und 8

In Embryonalstadien des Rindes werden zwei Insulin-sensitive Glukosetransporter exprimiert. Im Gegensatz zu dem ausschließlich in Blastozysten transkribierten Glut4 wird die Glut8-RNA in allen untersuchten Embryonalstadien gefunden.

In Präimplantationsembryonen der Maus werden Insulin- und IGF-Rezeptoren exprimiert. Der in Mausembryonen durch Insulin- und IGF-I-stimulierbare Glukosetransport (Pantaleon and Kaye, 1996), die Insulin-sensitive Translokation des Glut8 (Carayannopoulos et al., 2000) und eine erhöhte Apoptoserate von Mausblastozysten nach Einfluss hoher Insulin- und IGF-I-Konzentrationen (Chi et al., 2000b) zeigen das Vorliegen einer funktionellen Insulin/IGF-I-Signaltransduktionskaskade. Rinderembryonen exprimieren Transkripte für Insulin-, IGF-I- und IGF-II-Rezeptoren sowie die Liganden IGF-I und IGF-II (Schultz et al., 1992), wobei die entsprechenden RNA maternalen Ursprungs und später embryonal kodiert sind (Schultz et al., 1992). Daher lässt die konstitutive Expression des Glut8 vermuten, dass auch Präimplantationsembryonen des Rindes über eine funktionelle Insulin/IGF-I-Signalvermittlung und damit über einen Insulin-sensitiven Glukosetransport und -metabolismus verfügen. Aufgrund der wenigen Daten zum Glut8, sowohl in embryonalen als auch adulten Zellen, kann man über eine funktionelle Bedeutung dieses Transporters, insbesondere während der Embryonalentwicklung, derzeit nur spekulieren. Die starke Expression in allen untersuchten Embryonalstadien des Rindes in Verbindung mit der Insulin-Sensitivität (Carayannopoulos et al., 2000; Ibberson et al., 2000) sollte diese Isoform in weiteren Studien in einen funktionellen Zusammenhang mit Insulin und „Insulin like growth factors“ und der Embryonalentwicklung von Präimplantationsembryonen stellen.

Die Expression des Glut4 in Säugetierembryonen wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals nachgewiesen (Navarrete Santos et al., 2000a). Bisherige Untersuchungen an Präimplantationsembryonen verschiedener Spezies konnten keine Expression des Glut4 zeigen (Mensch: Dan-Goor et al., 1997 Maus: Aghayan et al., 1992; Schultz et al., 1992). Kompetitive RT-PCR und In-situ-Hybridisierung wiesen eine verstärkte Transkription des Glut4 in elongierten 14 Tage alten Blastozysten nach. Eine Besonderheit in der Entwicklung von Präimplantationsembryonen in Säugern wie Wiederkäuer und dem Schwein betrifft das als Elongation bezeichnete Auswachsen der Trophoblastzellen in die Uterushörner (Rüsse and Sinowatz, 1991).

Dieser im Hinblick auf Differenzierungsprozesse nur wenig charakterisierte Prozess ist mit der Ausbildung des Mesoderms am Tag 15 verbunden (Betteridge et al., 1980; Rüsse and Sinowatz, 1991). Unter anderem weisen eine verringerte Proteinsynthese (Morris et al., 2000), ein verändertes Expressionsmuster von Wachstumsfaktoren (Kliem et al., 1998) und der Synthesebeginn von Arachidonsäure als Prostaglandinvorstufe am Tag 14 (Menezo et al., 1982) auf eine nicht nur morphologische, sondern auch molekulare Differenzierung während der Elongation hin. Interessanterweise aktiviert Arachidonsäure in Adipozyten die Glukoseaufnahme durch Translokation und teilweise Neusynthese der Glukosetransporter 1 und 4 (Nugent et al., 2001) und könnte so eine mögliche Erklärung für die gezeigte hohe Expression des Glut4 in 14 Tage alten Blastozysten sein. Erste Untersuchungen zur Lokalisation des Glut4-Proteins zeigten Unterschiede zwischen Embryoblast-, Trophoblast- und Endodermzellen. Eine ausgeprägte zytoplasmatische Färbung weisen Zellen der Keimscheibe auf, während in Trophoblast- und Endodermzellen eine Kernmarkierung vorliegt (Abbildung 3-16). Die beobachtete Kernfärbung für den Glut4 ist derzeit nicht zu erklären. Eine unspezifische Immunreaktion kann ausgeschlossen werden, da einerseits im Western Blot eine Kreuzreaktivität des Antikörpers mit bovinen Protein gezeigt werden konnte, andererseits Kernfärbungen in Embryonalzellen bei anderen Spezies (6 Tage alte Kaninchenblastozysten) und in embryoid bodies der Maus (Navarrete Santos et al., 2000c) beobachtet wurden. Der in zwei Vesikelpools, den „early endosoms“ (Slot et al., 1997) und den „glut4 storage vesicles“ (GSV) (Rea and James, 1997), vorliegende Glut4 wird unter dem Einfluß von Insulin in die Zellmembran transloziert. Trotz zahlreicher Untersuchungen zur Regulation (Wang et al., 2000) und dem Mechanismus (Kupriyanova and Kandror, 2000; Millar et al., 1999) dieser Hormonantwort wurde eine Kern- oder Kernmembranlokalisation nicht beobachtet. Allerdings zeigten neuere Untersuchungen an 3T3-L1-Adipozyten eine Translokation Glut4-enthaltender Vesikel aus juxtanukleären Bereichen in die Zellmembran innerhalb von 5-7 min nach Insulin (Patki et al., 2001) bzw. konnte das „recycling“ des Glut4 aus perinukleären Kompartimenten gezeigt werden (Guilherme et al., 2000; Palacios et al., 2000).

Zwei verschiedene, parallel vorliegende Mechanismen der Insulin gesteuerten Glut4-Translokation werden postuliert: (I) die Rekrutierung des Glut4 aus „recycling endosoms“ (Abbildung 4-1a) und (II) die Verschmelzung der GSV mit der Zellmembran (Abbildung 4-1b) (Pessin et al., 1999; Simpson et al., 2001).

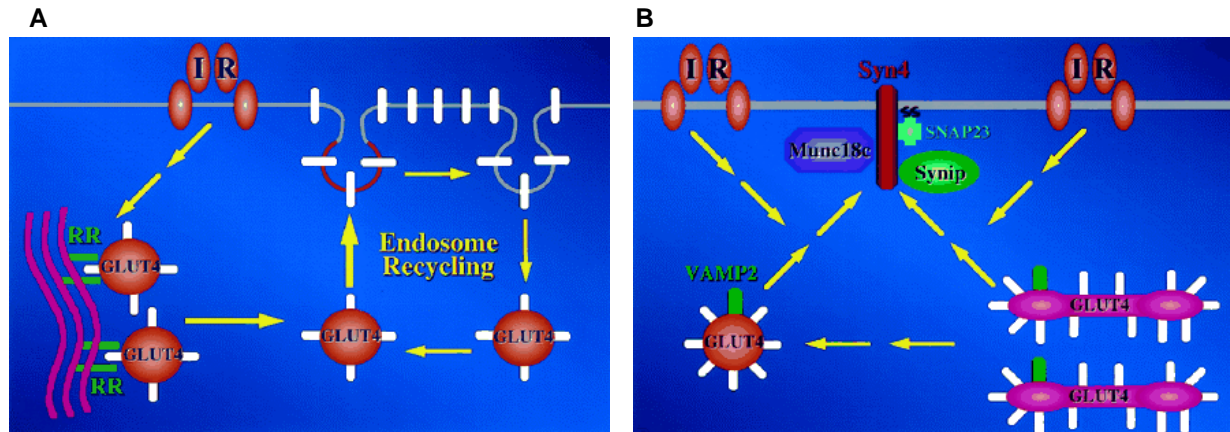


Abbildung 4-1 Schematische Darstellung der beiden für die insulinabhängige Glut4-Translokation postulierten Mechanismen. a) Glut4 wird durch Bindung an einen „Retention receptor“ (RR) dem konstitutiven Recycling von Endosomen entzogen. Insulin stimuliert die Freisetzung des Glut4 vom RR und Glut4-enhaltende Vesikel treten in das Recycling von Endosomen ein und akkumulieren an der Zellmembran. b) Synaptisches Modell der Glut4-Translokation. Kleine synaptische sowie tubovesikuläre Glut4-Vesikel enthalten das v-SNARE protein VAMP2. Insulinstimulation bewirkt die Bindung der Glut4-enhaltenden Vesikel an die Plasmamembran durch Interaktion von VAMP2 mit dem t-SNARE-Komplex bestehend aus Syntaxin4 und SNAP23. Die Proteine Munc18c und Synip üben eine inhibitorische bzw. stimulierende Funktion aus (nach: Pessin et al., 1999).

Letzterer Weg scheint hauptsächlich für die 10-bis 20-fach erhöhte Translokation des Glut4 nach Insulinstimulation verantwortlich zu sein (Pessin et al., 1999). Das Recycling von Membranen und Rezeptoren in die Zellmembran ist an zwei verschiedene Populationen von Endosomen, den „early“ und „recycling endosoms“, gebunden. Proteine der rab Familie der kleinen GTPasen, wie rab4, 5 und 11 regulieren die Membranorganisation und Kompartimentierung dieser Endo- und Exozytoseprozesse (Sonnichsen et al., 2000). Rab 11 enthaltende Endosomen sind vorwiegend in perizentriolären Bereichen lokalisiert (Sonnichsen et al., 2000). Rab11 reguliert die Kompartimentierung der „early endosoms“ in Verbindung mit dem Transport zum trans-Golgiapparat (trans-Golgi network –TGN) und wurde mit Glut4 enthaltenden Vesikeln kolokalisiert (Kessler et al., 2000). Bisher liegen kaum Daten über Endo- und Exozytosemechanismen und beteiligter Moleküle während der frühen Embryonalentwicklung vor (Heyner et al., 1989a; Rassoulzadegan et al., 2000). Antisense-Experimente an Embryonen von *Caenorhabditis elegans* zeigten, daß bei Ausschalten der Syntaxin-4 Synthese (Syntaxin: target membrane SNAP Rezeptor = t-SNARE) polynukleäre Embryonen entstanden, da Zytokinese und Zellkernverschmelzung gestört waren (Jantsch-Plunger and Glotzer, 1999). Syntaxin-4 ist u.a auch wesentlich an der Translokation von GSV zur Plasmamembran beteiligt

(Abbildung 4-1b). *Drosophila melanogaster*-Nullmutanten für das ROP-Gen, welches ein dem humanen Munc18 homologes Protein kodiert, wiesen eine dramatisch reduzierte Vesikelexozytose auf und waren in der späten Embryonalentwicklung letal (Harrison et al., 1994). Munc18c, eine Munc 18 Isoform, ist ebenso wie Syntaxin-4 am Glut4-Vesikeltransport zur Zellmembran beteiligt (Abbildung 4-1b). In Mausblastozysten stimuliert Insulin die Endozytose in Trophoblastzellen, wobei eine erhöhte Anzahl endozytotischer Vesikel sowie Membranfusionen beobachtet wurden (Dunlison et al., 1995).

Dass Glukosetransporter eine untypische Lokalisation in Embryonalzellen aufweisen zeigten neuere Studien an frühen Teilungsstadien der Maus. Der Glut1 wurde sowohl in „polyspermic oocytes“ als auch in Embryonen, die unter Glukoseentzug kultiviert wurden, im Zellkern gefunden (Pantaleon et al., 2001). Während der Kompaktierung und Blastozystenbildung war eine Kernlokalisierung des Glut1 nicht mehr nachweisbar. Stattdessen wurde der Glut1 in diesen Stadien, wie bereits zuvor beschrieben (Pantaleon et al., 1997), in den basolateralen Membranen der Trophoblasten sowie uniform in den Plasmamembranen der Embryoblastzellen gefunden (Pantaleon et al., 2001). Unter Einbeziehung der oben genannten Daten scheint die gefundene Lokalisation des Glut4 in elongierten Rinderblastozysten aufgrund der Unterschiede zwischen den Endoderm-, den Trophoblast- und den Embryoblastzellen (Abbildung 3- 16) und insbesondere wegen der ungewöhnlichen Kernlokalisierung in den Endoderm- und Trophoblastzellen darauf hinzuweisen, dass die Differenzierung embryonaler Zellen während der frühen Embryonalentwicklung mit einer Reorganisation und Kompartimentierung des vesikulären Transportes verbunden ist (Rassoulzadegan et al., 2000).

4.2.3 Glukosetransporter 2

Eine Expression des Glut2 wurde bisher nur in Präimplantationsembryonen der Maus beschrieben (Aghayan et al., 1992; Moley et al., 1998b; Schultz et al., 1992). In humanen Embryonen konnte mittels Western Blot kein Glut2 nachgewiesen werden (Dan-Goor et al., 1997). Während eine Transkription des Glut2 ab dem 8-Zellstadium (Schultz et al., 1992) bzw. 68h nach hCG-Injektion gefunden wurde (Moley et al., 1998b), ist das Protein erst in der Blastozyste detektierbar (Aghayan et al., 1992; Moley et al., 1998b). Elektronenmikroskopische Untersuchungen lokalisierten den Transporter in den basolateralen Membranen der Trophoblastzellen und zeigten eine

einheitliche Verteilung in den Plasmamembranen von Embryoblastzellen und eine Markierung zytoplasmatischer Vesikel in Embryoblastzellen (Aghayan et al., 1992). Aussagen über eine Lokalisation des Glut2 wurde in der Arbeit von Moley nicht getroffen. Die Lokalisation und eine damit verbundene Funktion dieses Transporters in Präimplantationsembryonen ist bisher nicht geklärt (Pantaleon and Kaye, 1998). In Rinderembryonen kann die ausschließlich in den elongierten 14 und 16 Tage alten Blastozysten nachgewiesene Expression des Glut2 im Zusammenhang mit der Trophoblastelongation diskutiert werden. Die Elongation ist gekennzeichnet durch eine Zelldifferenzierung. Die ab dem Schlüpfen der Blastozyste gebildeten endodermalen Zellen kleiden am Tag 10 die Blastozystenhöhle vollständig aus (Rüsse and Sinowatz, 1991). Am Tag 13 sind mesodermale Zellen bereits angelegt. Am Tag 14 werden aus der einschichtigen Zellschicht der Trophoblasten zwei Zelltypen, die Säulen- und die Riesenzellen, gebildet (Rüsse and Sinowatz, 1991). Im adulten Gewebe ist der Glut2 ausschließlich in den Basalmembranen der Epithelzellen von Niere und Dünndarm lokalisiert. Durch seine Eigenschaft, sowohl Glukose als auch Fruktose zu transportieren, katalysiert der Glut2 den zweiten Schritt der transepithelialen Aufnahme dieser Substrate: den Transport der im ersten Schritt durch SGLT-I konzentrierten Glukose bzw. durch passive Diffusion mit dem Glut5 aufgenommene Fruktose in die Kapillaren (Gould, 1997). Das Zusammenspiel der in adulten Epithelzellen apikal vorliegenden Transporter SGLT-I und Glut5 und dem in den Basalmembranen lokalisierten Glut2 ließe sich möglicherweise auch auf die embryonalen Zellen des Trophektoderms und Endoderms übertragen. Es scheint nicht überraschend, daß die Transporter SGLT-I und Glut5 wegen ihrer o.g. Kooperation bereits in frühen Teilungsstadien exprimiert werden, wohingegen der Glut2 erst mit der vollständigen Ausbildung eines Epithels (Trophektoderm) mit einer darunterliegenden Zelllage (Endoderm) nachzuweisen ist. Weiterführende Untersuchungen zur Rolle des Glut2 bedürfen der Lokalisation des Transporters mit einem spezifischen bovinen Antikörper.

4.2.4 Glut5 - der Fruktosetransporter

Die Expression des Glut5 wurde in dieser Arbeit erstmals in Präimplantationsstadien von Säugetierembryonen nachgewiesen. Im adulten Organismus wird der Glut5 in den apikalen Membranen der Epithelzellen des Dünndarms und der Niere exprimiert und dient dort der Aufnahme bzw. Resorption von Fruktose. Neben einer geringen

Expression in Muskel- und Nervengewebe (Hundal et al., 1998; Shepherd et al., 1992) ist der Glut5 auch in den Testis, insbesondere in den reifen Spermien, nachweisbar (Burant et al., 1992). In bovinen Embryonen konnten Glut5-Transkripte ab dem 8/16-Zellstadium detektiert werden. Dieses Embryonalstadium ist mit zwei für die weitere Entwicklung wichtigen Schritten verbunden: (I) der Aktivierung des embryonalen Genoms (Hyttel et al., 2000; Memili and First, 2000) und (II) dem sogenannten „glucose switch“, der Umstellung des Metabolismus von Laktat/Pyruvat auf die Verwertung von Glukose über den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (EMP-Weg) (Thompson et al., 1996). Beide Schritte liefern eine mögliche Erklärung dieser spezifischen, nur für diese Isoform gefundenen de novo-Synthese der Glut5-RNA im 8/16-Zellstadium. Die Aktivierung des embryonalen Genoms ist an das Vorhandensein von Ribose-5-phosphat für die RNA-Synthese gebunden. Ein funktioneller Glut5 könnte durch Bereitstellung von Fruktose einen erhöhten Bedarf an Ribose-5-phosphat durch Einfließen der Fruktose als Fruktose-6-phosphat in die Transaldolase- und Transketolasereaktion des Pentosephosphatzzyklus decken (Voet and Voet, 1995). Der nur in wenigen Geweben vorkommende Glut5 wird neben Epithelzellen der Niere und des Dünndarms nur in Zellen mit hoher metabolischer Aktivität wie Muskel- oder Gehirnzellen sowie malignen Zellen exprimiert (Shepherd et al., 1992; Zamora-Leon et al., 1996). Maligne Zellen zeichnen sich durch eine stark erhöhte Glukoseaufnahme und anaerobe Glukoseverwertung aus (Warburg and Dickens, 1930) und können u.a. auch aufgrund dieser Eigenschaft diagnostiziert werden (Phay et al., 2000b). Die Brustkrebszelllinien MCF-7 und MDA-468 exprimieren den Glut5, während diese Isoform in normalen Brustdrüsenzellen nicht vorkommt (Zamora-Leon et al., 1996). Es kann daher angenommen werden, dass der Beginn der Glut5 Expression im 8/16-Zellstadium der bovinen Embryogenese in Zusammenhang mit I) dem gestiegenen Bedarf an Nukleotiden und/oder II) einer beginnenden glykolytischen Aktivität zu sehen ist. Der Glukosemetabolismus ist in Präimplantationsembryonen verschiedener Spezies gut untersucht (für Rinderembryonen: Khurana and Niemann, 2000; Kim et al., 1993), während nur wenige Daten zum Energiesubstrat Fruktose und dessen Einfluß auf die Embryonalentwicklung vorliegen (Guyader-Joly et al., 1996; Ludwig et al., 2001; Sakkas et al., 1993). So sind Untersuchungen zu Effekten einer Fruktosesupplementierung glukosehaltiger Medien auf die Embryonalentwicklung *in vitro* bisher nicht durchgeführt worden. Die Embryonalentwicklung *in vivo* ist mit einer

Fruktoseexposition verbunden, da Fruktose Bestandteil der Uterusflüssigkeit ist (Casslen and Nilsson, 1984). Nach dem Nachweis der Glut5-Expression in frühen Teilungsstadien sollten nun weiterführende Studien u.a. den Einfluß einer Fruktosesupplementierung des Kulturmediums zum Ziel haben. Eine Möglichkeit des indirekten Nachweises aufgenommener Fruktose und deren Bedeutung als Lieferant für Ribose-5-phosphat durch Metabolisierung über den Pentosephosphatweg besteht in der Verwendung von [3-¹⁴C] Fruktose. Hierbei könnte ein Vergleich des Einbaus von Ribose-5-phosphat in DNA und RNA, generiert aus [3-¹⁴C] Fruktose oder aus [6-³H] Glukose, durchgeführt werden. Dies gäbe Aufschluß über den Syntheseweg der Ribose.

4.2.5 SGLT-I – der aktive Glukosetransporter

Das Vorliegen eines energieabhängigen, aktiven Mechanismus der Glukoseaufnahme in Präimplantationsembryonen ist umstritten. Der Einsatz von Phlorizin, einem effektiven Inhibitor des Natrium-gekoppelten aktiven Glukosetransportes (Lin et al., 1982; Sacktor, 1989), zeigte keine Auswirkungen auf die Glukoseaufnahme von Präimplantationsembryonen der Maus (Chi et al., 1993; Gardner and Leese, 1988) und des Menschen (Chi et al., 1993). Der Entzug von Natrium durch Austausch mit Cholin oder Kalium im Kulturmedium erbrachte in Studien an Embryonen verschiedener Spezies (Maus, Mensch, Kaninchen) ebenfalls keinen Hinweis auf einen energieabhängigen Glukosetransport bei Embryonen (Benos, 1981; Chi et al., 1993; Gardner and Leese, 1988). Untersuchungen mit einem SGLT-I-Antikörper konnten sowohl im Western Blot als auch in der Immunhistochemie in unbefruchteten Eizellen und Präimplantationsembryonen der Maus ein Antigen nachweisen (Wiley et al., 1991). Die Lokalisation des Antigens in apikalen Membranen bei einzelnen Blastomeren in frühen Teilungsstadien und eine maximale Expression in Morulae und während der Blastozystenbildung wurde im Zusammenhang mit der Ausbildung der apikal-basalen Zellpolarität und dem damit verbundenen gerichteten Stofftransport diskutiert (Wiley et al., 1991). Vorangegangene Untersuchungen derselben Arbeitsgruppe zur Wirkung von Phlorizin auf Präimplantationsembryonen der Maus hatten einen Dosis-abhängigen Effekt auf die Ausbildung und Akkumulation von Blastozystenhöhlenflüssigkeit nachweisen können. Geringe Dosen Phlorizin (10^{-6} M) begünstigten die Blastozoenbildung, während höhere Konzentrationen (10^{-4} M) sie verzögerten (Wiley

and Obasaju, 1989). Diese nicht näher charakterisierten Befunde der Hemmung der Blastozystenhöhlenbildung durch Phlorizin müssen im Zusammenhang mit neueren Untersuchungen zu Transporteigenschaften des SGLT-I diskutiert werden. Demnach agiert der SGLT-I nicht allein als ein an Natrium-gekoppelter Glukosetransporter, sondern ist auch in der Lage, Wasser (ca. 200 Moleküle/ Molekül Glukose/2 Natriumionen) zu transportieren (Loike et al., 1996; Loo et al., 1996). Die Funktion des SGLT-I als Wasserpumpe (Meinild et al., 2000) ist inhibierbar durch Phlorizin und durch den Entzug von Natrium, jedoch unabhängig von Glukose (Loike et al., 1996). Die Expression des SGLT-I in Präimplantationsembryonen scheint nicht notwendigerweise und ausschließlich mit einer Funktion als aktivem Glukosetransporter verbunden zu sein, sondern könnte auch dem gerichteten polarisierten Transport von Natrium und Wasser dienen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erste Voruntersuchungen zum Effekt von Phlorizin auf die Blastozystenbildung durchgeführt. Eine Inkubation von Rindermorulae mit 0,5mM Phlorizin hatte keine Auswirkungen auf die Blastozystenrate oder den Durchmesser der Embryonen. Aufgrund der nachgewiesenen hohen Expression des Transporters in Oozyten und frühen Teilungsstadien sollten Folgestudien eine Inhibierung des SGLT-I mit Phlorizin bereits ab dem Beginn der Embryokultur (20h p.i.) im Hinblick auf eine Störung der Ausbildung der Blastomerenpolarität beinhalten.

4.3 Glukosetransporter 1- und 4–Expression in *in vitro* und *in vivo* gewachsenen Präimplantationsembryonen

Die Produktion von Embryonen *in vitro* hat insbesondere bei landwirtschaftlichen Nutztieren eine volkswirtschaftliche Bedeutung. Optimierte IVP-Systeme, die eine Supplementierung des Kulturmediums mit Serum und/oder somatischen Zellen verwenden (Bavister, 2000), erzielen Blastozystenraten von 30-40% gereifter Oozyten, die z.T. für einen anschließenden Embryotransfer geeignet sind. Trotz zahlreicher Fortschritte in den Techniken der *In-vitro*-Kultur von Rinderembryonen unterscheiden sich *in vitro* produzierte in zahlreichen Parametern von *in vivo* Embryonen. So sind neben morphologischen Unterschieden wie Farbe, Größe oder Zellzahl, Stabilität der Zona pellucida und Widerstandsfähigkeit gegenüber Tiefgefrieren (Leibo and Loskutoff, 1993; Niemann, 1995) auch Diversitäten im embryonalen Metabolismus, bei der Aufnahme von Proteinen und nicht zuletzt in der Expression zahlreicher Gene nachweisbar (Niemann and Wrenzycki, 2000; Wrenzycki

et al., 2001). Die Unterschiede zwischen *in vitro* erzeugten und *in vivo* gewachsenen Embryonen zeigten sich ferner in höheren Abortraten, Komplikationen während des Verlaufes der Gravidität sowie im sogenannten „large calf syndrome“, dem signifikant erhöhten Geburtsgewicht und der Größe der Kälber (Hasler et al., 1995; Kruip and denDaas, 1997; Reichenbach et al., 1992). Jüngere Studien konnten zeigen, dass eine unterschiedliche Mediensupplementation während der Kultur *in vitro* signifikante Auswirkungen auf das Geburtsgewicht sowie die Laktatkonzentration im Serum der Kälber (Jacobsen et al., 2000) oder die Expression von IGF-II-RNA in Feten hat (Blondin et al., 2000).

Eine differentielle Genexpression zwischen *in vitro* und *in vivo* gewachsenen Embryonen einerseits und unter verschiedenen Bedingungen *in vitro* kultivierter Embryonen andererseits konnte in verschiedenen Spezies nachgewiesen werden (Maus: Ho et al., 1995; O'Neill, 1997; Stojanov et al., 1999, Rind: Eckert and Niemann, 1998; Wrenzycki et al., 1996; 1998; 1999; 2001 Kaninchen: Koerber et al., 1998; Navarrete Santos et al., 2000b). Auch Glukosetransporter werden differentiell in *in vitro* und *in vivo* gewonnen Embryonen exprimiert (Morita et al., 1994; Wrenzycki, April 2001 persönl. Mitteilung). Die Studien von Morita et al. (1994) zur Expression des Glut1 in Embryonen der Maus wiesen eine etwa 3 fach höhere Transkription dieses Gens in *in vivo* gegenüber *in vitro* Embryonen nach. Bei Rinderembryonen variiert die Transkription des Glut1 in Abhängigkeit von den gewählten Bedingungen der *In-vitro*-Kultur. 8/16-Zellstadien weisen eine signifikant höhere Transkription des Glut1 bei einer Kultur unter Verwendung von Polyvinylalkohol im Vergleich mit Serum-supplementierten Medium auf (Wrenzycki et al., 1999). Die in dieser Arbeit vorgenommene Quantifizierung von Transkripten des Glukosetransporters 1 in 14 und 16 Tage alten Blastozysten zeigte keine Unterschiede bezüglich der Transkriptmengen beider Gene zwischen *in vitro* und *in vivo* gewonnenen Embryonen. Ein Vergleich der Transkriptmengen zwischen 14 und 16 Tage alten Embryonen konnte eine erhöhte für den Glut1 und eine verringerte Transkription für den Glut4 nachweisen. Der Glut4 wird in 16 Tage alten *in vitro* Blastozysten schwach exprimiert, konnte jedoch in *in vivo* gewachsenen Embryonen nicht nachgewiesen werden (Tabelle 3-11). Dass *in vitro* und *in vivo* gewonnene Embryonen Glukosetransporter differentiell exprimieren, konnte durch neuere Untersuchungen bestätigt werden. Unabhängig von einer Supplementierung des Kulturmediums (SOF mit BSA oder Serumzusatz) weisen *in vitro* kultivierte

gegenüber *in vivo* Blastozysten eine erhöhte Transkription der Glukosetransporter 3 und 4 auf, wohingegen der Glut1 keine transkriptionelle Veränderung erfährt (persönl Mitteilung – Dr. C. Wrenzycki, April 2001).

4.4 Effekte von Insulin auf die Embryonalentwicklung *in vitro* und die Transkription von Glukosetransportern und Enzymen der Glykolyse in Rinderblastozysten

Die beiden wichtigsten Faktoren einer transkriptionellen sowie translationalen Kontrolle der Glukosetransporterexpression, Glukose und Insulin, beeinflussen ganz entscheidend die Entwicklung von Präimplantationsembryonen (Biggers and McGinnis, 2001; Chatot et al., 1994; Chi et al., 2000a; Pantaleon and Kaye, 1996; Rao et al., 1990). Ob die Expression embryonaler Glukosetransporter sowie metabolisch relevanter Gene dem Einfluß von Insulin unterliegt, wurde in dieser Arbeit für Transkripte der Glukosetransporter 1, 3 und 8 sowie zwei ausgewählten Enzymen der Glykolyse, der Phosphofruktokinase und der Hexokinase, untersucht. Eine Einbeziehung der Glut2 und 4 in die vorliegende Studie war nicht möglich, da diese Isoformen in 8 Tage alten Blastozysten nicht bzw. nur sehr gering exprimiert werden. Der Glut5 und der SGLT-I wurden nicht untersucht, da sie einerseits den Fruktosetransport betreffen und andererseits ein Insulineffekt auf einen aktiven Glukosetransport bisher nicht beschrieben wurde.

4.4.1 Kurzzeiteffekte

Die Insulinexposition von Blastozysten für 1 Stunde bewirkt eine Aktivierung der Transkription der Gene für Glut3, Glut8, Hexokinase und Phosphofruktokinase, wohingegen die Transkription des Glut1 nicht signifikant beeinflusst wird. Der Insulineffekt ist über einen Zeitraum von vier Stunden noch für den Glut3 nachweisbar, jedoch ohne statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,057$). Die Bewertung der transkriptionellen Veränderung der untersuchten Gene nach Insulinexposition wurde an Einzelblastozysten unter Verwendung einer externen Standard-mRNA vorgenommen. Diese Form der Standardisierung bedarf starker transkriptioneller Veränderungen, um signifikante Unterschiede zwischen den variablen Einzelembryonen zu erfassen. Der Einsatz einer externen Standard-RNA, im vorliegenden Falle Globin-mRNA vom Kaninchen, stellt eine vielfach verwendete und akzeptierte Methode dar, um relative Transkriptmengen mit semiquantitativer

RT-PCR bestimmen zu können (De Sousa et al., 1998; Lequarre et al., 2001; Watson et al., 2000; Wrenzycki et al., 2000).

Die nach Insulinexposition in ihrer Transkription hochregulierten Gene betreffen die für eine Aufnahme externer Glukose postulierten Glukosetransporter 3 und 8 und die Glykolyseenzyme Hexokinase und Phosphofruktokinase. Diese Ergebnisse weisen erstmals einen Einfluß von Insulin auf die Transkription von Glukosetransportern und metabolisch relevanten Genen in Präimplantationsembryonen nach. Die Betrachtung der Signaltransduktionskaskaden für Insulin/IGF-I (Abbildung 3-2) erlaubt eine gezielte Diskussion der gefundenen transkriptionellen Veränderungen für die untersuchten Gene.

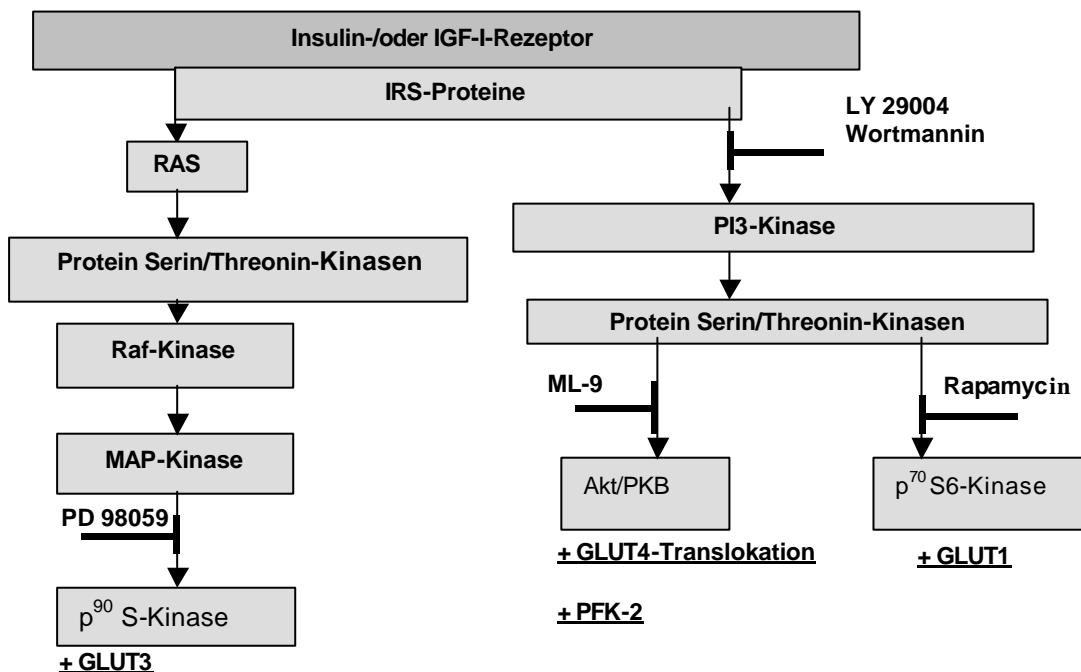


Abbildung 3-2 Elemente der Insulin/IGF-I-Signaltransduktionskaskade in Verbindung mit der Regulation von Glukosetransporterisofomen und der PFK-2.

Im wesentlichen können drei für eine metabolische Antwort entscheidende verschieden regulierte Kaskaden das Insulinsignal weitergeben: (I) die über das Ras-G-Protein und MAPK vermittelte (II) eine über PI3-Kinase und Aktivierung der Akt/PKB gerichtete sowie (III) die ebenfalls ausgehend von einer Phosphorylierung der PI3-Kinase gefolgte Aktivierung der p⁷⁰S6-Kinase. Die Aktivierung der Insulin/IGF-I-Signaltransduktionskaskade verändert u.a. spezifisch die Expression und Translokation einzelner Glukosetransporterisofomen. Dabei werden der Glut1 über den durch Rapamycin inhierbaren Weg (III) der p⁷⁰S6-Kinase, der Glut3 über den Ras–MAPK-Weg (I) (inhibierbar mit PD 98059) und die Phosphofruktokinase

sowie der Glut4 über den mit ML-9 bzw. Wortmannin und LY 29004 (PI3-Kinase) inhibierbaren Weg (II) der Akt/PKB reguliert (Taha and Klip, 1999; Smith et al., 2000). Die nach Insulinexposition unveränderte Glut1-Transkription in Rinderblastozysten weist darauf hin, dass eine embryonale Signaltransduktion vorliegt, die möglicherweise keine p⁷⁰S6-Kinaseaktivierung in Verbindung mit dem Glut1 beinhaltet. Neuere Untersuchungen an einer Hepatoma-Zelllinie zeigten zwar, dass eine Insulin-induzierte Glut1-Transkription auch über den Akt/PKB Signaltransduktionsweg gesteuert wird (Barthel et al., 1999), jedoch sind diese Studien an Zellen eines primär Glukoneogenese betreibenden Organs durchgeführt worden. Eine Übertragbarkeit einer durch Akt/PKB-vermittelten Regulation des Glut1 auf das Embryonalstadium der Blastozyste, welches durch eine hohe glykolytische Aktivität gekennzeichnet ist, scheint daher wenig wahrscheinlich. Das Onkogen h-Ras wird in bovinen Blastozysten exprimiert (Tetens et al., 2000). Die Insulin-induzierte Aktivierung der Glut3-Transkription deutet daraufhin, dass in bovinen Blastozysten eine funktionelle Insulin/IGF-I-Ras/MAPK-Signaltransduktionskaskade vorliegt, die für den beobachteten Effekt verantwortlich sein könnte. Die nach einer Stunde Insulinbehandlung leicht erhöhte Transkription des Glut8 lässt sich aufgrund fehlender Daten zur Transkriptionskontrolle, auch bei Annahme einer dem Glut4 vergleichbaren Regulation, nur schwer diskutieren. Die Regulation der Glut4-Transkription differiert zwischen *in vitro* Zellen und Geweben *in vivo* (Charron et al., 1999). Während Insulin-behandelte Tiere eine erhöhte Transkription der Transporter-RNA zeigen (Cusin et al., 1990; Postic et al., 1993), weisen 3T3-L-Adipozyten unter Insulineinfluss keine Änderung oder eine leicht verringerte Glut4-RNA-Menge auf (Flores-Riveros et al., 1993; Tordjman et al., 1989). Eine Kontrolle des Insulin regulierten Glukosetransportes erfolgt primär durch die Translokation des Glut4 in die Zellmembran (Pessin et al., 1999). An Embryonen der Maus konnte bereits eine vergleichbare Translokation des Glut8 gezeigt werden (Carayannopoulos et al., 2000), wobei jedoch die Frage nach dem Mechanismus und der Kontrolle der Hormonantwort noch nicht beantwortet werden konnte. Die oben diskutierten Befunde einer Insulin-sensitiven Transkriptionskontrolle spezifischer Glukosetransporterisofomen spricht für das Vorliegen einer funktionellen Insulin/IGF-I-Signaltransduktionskaskade in Rinderblastozysten. Dabei unterliegen die untersuchten Glukosetransporter-RNA wahrscheinlich einer über verschiedene Insulinsignalwege vermittelten Kontrolle. Die unterschiedlichen Auswirkungen von

Insulin auf die Transkription der Isoformen 1 und 3 in Blastozysten sprechen für eine mögliche Übertragbarkeit der Ergebnisse von Studien an L6-Muskelzellen, welche die verschiedenen, oben besprochenen Signalwege einer Insulin/IGF-I Signaltransduktion für die Regulation der Glut1- und Glut3-Expression nachweisen konnten (Taha et al., 1995).

Im Muskelgewebe stimuliert Insulin die Glykolyse durch Phosphorylierung und damit Aktivierung der 6-Phosphofruktokinase-2. Die Phosphofruktokinase-2 katalysiert die Synthese von Fruktose2,6-bisphosphat, welches den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glykolyse, die 6-Phosphofruktokinase-1 Reaktion, kontrolliert (Voet and Voet, 1995). Die Aktivierung der Glykolyse durch Insulin über die 6-Phosphofruktokinase-2 erfolgt über den mit Wortmannin, LY 29004 oder ML-9 hemmbaren Weg der PI3-Kinase und Akt/PKB-Phosphorylierungsreaktionen der Insulin/IGF-I Signaltransduktionskaskade (Deprez et al., 1997; Lefebvre et al., 1996). Unter Verwendung von Inhibitoren wie Wortmannin, LY 29004 oder ML-9 könnte gezeigt werden, ob dieser Weg einer insulininduzierten Glykolysesteigerung die Erhöhung der Transkriptionsraten für die Hexokinase I sowie 6-Phosphofruktokinase-2 in Insulin exponierten Rinderblastozysten verursacht.

Eine mögliche, von einer Betrachtung der Insulin/IGF-I-Signaltransduktionskaskade unabhängige Interpretation der Kurzzeiteffekte von Insulin auf die Transkription von Glukosetransportern in Rinderblastozysten erlauben auch bisher erhobene Daten zum Einfluß von Insulin während der frühen Embryonalentwicklung. Eine Insulinexposition über Zeiträume von 30min–4 h stimuliert die RNA-, DNA- (Heyner et al., 1989b; Rao et al., 1990) und Proteinsynthese (Harvey and Kaye, 1988; Harvey and Kaye, 1991), die Endozytose (Dunglison et al., 1995; Heyner et al., 1989a) und Glukoseaufnahme (Carayannopoulos et al., 2000; Pantaleon and Kaye, 1996). Insulinbehandelte Blastozysten der Maus weisen eine erhöhte Glukoseaufnahme auf, die nach etwa 40-80min ein Maximum erreicht (Pantaleon and Kaye, 1996). Bereits nach 30 min Insulinexposition ist die Translokation des Glut8 in die apikalen Membranen der Trophoblastzellen von Mausblastozysten vollständig abgeschlossen (Carayannopoulos et al., 2000). Da der Glut1, vergleichbar mit Embryonen der Maus (Pantaleon et al., 1997), nicht in den apikalen Membranen der Trophoblastzellen von Rinderblastozysten vorliegt und damit an der Aufnahme externer Glukose nicht beteiligt ist (s.a. 2.4.1), wäre eine weitere Steigerung der Glukoseaufnahme nur

durch eine Aktivierung der Transkription/Translation des Glut3 und/oder Glut8 möglich.

Weiterführende Studien zu dem in dieser Arbeit gezeigten Kurzzeiteffekt von Insulin auf die Transkription von Glukosetransportern und Enzymen der Glykolyse in Rinderblastozysten sollten mit anderen Untersuchungen gekoppelt werden wie Glukoseaufnahme Einsatz von Transkriptions- und Translationsinhibitoren wie z. B. Actinomycin D oder Cycloheximid, um die Mechanismen der Insulin-regulierten embryonalen Glukoseaufnahme- und Glukosetransporterexpression näher charakterisieren zu können. Die Arbeit an frühen Embryonalstadien ist stets mit einem Materialproblem verbunden. So können Studien über embryonale Insulin/IGF-I-Signaltransduktionskaskaden nicht wie in Zelllinien mit Methoden wie quantitativen Proteinnachweisen geführt werden. Denkbar wäre hingegen eine Inhibierung spezifischer Insulin/IGF-I-Signaltransduktionswege (Abbildung 3-2) in Verbindung mit anschließenden Glukoseaufnahmestudien und Untersuchungen der Glukosetransporterexpression.

4.4.2 Langzeiteffekte

Neben einer kurzfristigen Wirkung von Insulin auf die Transkription, die im Kap. 4.4.1 als sogenannte metabolische Kurzzeiteffekte dargestellt wurden, besitzt Insulin auch eine mitogene Wirkung, die am Ende der *In-vitro*-Kultur mit Insulinexposition untersucht wurden und als Langzeiteffekt bezeichnet wird. Langzeiteffekte von Insulin in Embryonen der Maus sind gekennzeichnet durch erhöhte Blastozystenraten und höhere Gesamt- und Embryoblastzellzahlen (Gardner and Kaye, 1991; Harvey and Kaye, 1990). Der proliferative Effekt einer Insulinexposition von Präimplantationsembryonen konnte in einem verstärkten Wachstum von Mäusefoeten nachgewiesen werden (Kaye and Gardner, 1999).

Der Einfluß von Insulin auf die Entwicklung von Präimplantationsembryonen des Rindes ist bisher wenig untersucht. Die *In-vitro*-Kultur von Rinderembryonen in SOF-Medium unter dem Einfluß von Insulin hatte keinen Effekt auf die Blastozystenrate (Matsui et al., 1995; Mihalik et al., 2000), resultierte jedoch in einer erhöhten Blastozystenzellzahl (Matsui et al., 1995). Die in dieser Arbeit gefundene signifikant erhöhte Rate geschlüpfter Blastozysten in Verbindung mit einer erhöhten Zellzahl der unter Insulineinfluß kultivierten Embryonen (Tabelle 3-12) könnte auf dem mitogenen

Langzeiteffekt von Insulin beruhen (Ish-Shalom et al., 1997). Die Insulinexposition von Rinderembryonen während der *In-vitro*-Kultur (Tag 1 p.i. – Tag 8 p.i.) hatte keinen Einfluss auf die relativen Transkriptmengen der untersuchten Gene (Abbildung 3-20). Insulin degradiert im Zellkulturmedium (Barthel et al., 1999). Es kann daher nicht vom Vorliegen einer biologisch wirksamen Insulinkonzentration zum Zeitpunkt einer stark steigenden glykolytischen Aktivität - und damit möglicherweise Insulinsensitivität - im Morula- (nach 96h) und frühen Blastozystenstadium (nach 168h – Tag 8) ausgegangen werden. Eine Degradation des Insulins während der *In-vitro*-Kultur könnte deshalb die Ursache für den Befund einer unveränderten Transkription für die untersuchten Gene darstellen. Die beobachteten mitogenen Effekte des Insulins während der Embryonalentwicklung werden schon früh, möglicherweise mit dem Beginn der Aktivierung des embryonalen Genoms im 8-/16-Zellstadium induziert und gingen nicht mit transkriptionellen Veränderungen der untersuchten Gene einher.

Der positive mitogene Langzeiteffekt des Insulins während der Embryokultur *in vitro* resultierte in einer erhöhten Blastozystenzellzahl und einem höheren Prozentsatz geschlüpfter Blastozysten. Beide Parameter sind Kriterien zur Beurteilung der Embryoqualität und dienen der Einschätzung eines *In-vitro*-Kultursystems (Gordon, 1994). Das Schlüpfen der Blastozyste aus der Zona pellucida ist essentiell für die Implantation der Blastozyste. Zwei Faktoren beeinflussen das Schlüpfen einer Blastozyste: (I) die Lyse der Zona Pellucida durch Substanzen, die entweder vom Reproduktionstrakt oder vom Embryo selbst sekretiert werden, und/oder (II) der durch die Expansion der Blastozyste ausgeübte Druck auf die Zona pellucida. In humanen IVF-Programmen wird das „assisted hatching“ erfolgreich eingesetzt, um die Schwangerschaftsraten nach Embryotransfer zu erhöhen (Mahadevan et al., 1998; Mansour et al., 2000). Die Verbesserung von *In-vitro*-Kultursystemen und der Einsatz definierter Kulturmedien könnte auch die Verwendung von Insulin vorsehen.

Mit der bereits angesprochenen Degradation von Insulin im Medium während der Kultur in Zellkulturmedien stellt sich die Frage, welchen Effekt eine spätere bzw. wiederholte Supplementierung mit Insulin z.B. im 8-/16-Zellstadium oder Blastozystenstadium erzielen könnte. Informationen über positive oder negative Effekte eines „Mehr-Schritt-Kultursystems“, dass heißt dem Wechsel des Kulturmediums während der Kultur, beziehen sich vor allem auf Untersuchungen zur Vermeidung einer Akkumulation von Ammonium im Kulturmedium (Gardner and Lane, 1993; Lane and Gardner, 1995). Diese Arbeiten konnten zeigen, dass ein

Wechsel des Kulturmediums mit erhöhten Blastozystenraten und Zellzahlen verbunden ist (Gardner et al., 1994). Für Rinderembryonen liegen keine Daten über die Verwendung einer erhöhten Glukosekonzentration und dem Einsatz von Insulin in Verbindung mit einem Wechsel des Kulturmediums zum Zeitpunkt der ersten Furchungsteilungen vor. Es sollte untersucht werden, inwieweit Insulin, auch in Kombination mit einer erhöhten Glukosekonzentration, die Embryonalentwicklung ab dem 8-/16-Zellstadium beeinflusst und so der veränderten metabolischen Aktivität und Substratanforderung des Embryos Rechnung trägt. Dieser experimentelle Ansatz ließe erwarten, dass auch metabolische Effekte im Sinne einer möglicherweise veränderten Expression metabolisch relevanter Gene nachzuweisen sind. In diesem Zusammenhang sollte die Expression der Na^+/K^+ -ATPase als einem Insulin-sensitivem System mitbetrachtet werden (Sweeney and Klip, 1998), da dieses Enzym ganz wesentlich durch die Etablierung eines gerichteten Stofftransportes an der Bildung und Expansion der Blastozyste beteiligt ist (Betts et al., 1997).

4.5 Glukosetransporter - Differenzierung und stressinduzierte Apoptose in Präimplantationsembryonen

Wie wir in den Kapiteln 3.3. und 3.4. sehen konnten, werden Glukosetransporter (I) entwicklungsspezifisch in Präimplantationsembryonen des Rindes exprimiert, sind spezifisch in den verschiedenen embryonalen Zellen lokalisiert und (II) werden in Blastozysten durch Insulin spezifisch in ihrer Transkription verändert.

Im nun folgenden Kapitel sollen Glukosetransporter und ihre Funktion in Präimplantationsembryonen unter dem Aspekt von Differenzierung und Stressantwort diskutiert werden. Verwendung finden sowohl Daten zur Regulation der Glukosetransporterexpression in adulten- als auch in embryonalen Zellen. Sie zeigen, dass Glukosetransporter eingebunden sind in das komplexe Flechtwerk der Zelldifferenzierung und in stressinduzierte Apoptosemechanismen. Die aufgrund ihrer Kinetik, Regulation und nicht zuletzt Funktion und Lokalisation im adulten Gewebe abgrenzbaren Glukosetransporterisoformen sind aller Wahrscheinlichkeit nach auch während der Embryonalentwicklung in zellbiologische Prozesse wie Differenzierung und Apoptosemechanismen bei embryonalen Zellen involviert.

Dass Zelldifferenzierung mit einer Verschiebung und/oder Veränderung des Expressionsmusters einzelner Glukosetransporterisoformen einhergeht, wurde bereits an Tumorzellen (North et al., 2000; Younes et al., 1997), Adipozyten

(Pederson and Rondinone, 2000) und Blutzellen (Malide et al., 1998) beobachtet. Tumorzellen zeichnen sich gegenüber normalen Zellen durch eine stark erhöhte glykolytische Aktivität aus – ein Merkmal, das für die Tumordiagnose eingesetzt werden kann (Musholt et al., 1997; Smith, 1998). Die Tumorgenese ist gekennzeichnet durch eine voranschreitende Dedifferenzierung der malignen Zellen. Diese ist verbunden mit einem steigenden Glukosebedarf der Zellen, der mit einer Veränderung des Expressionsmusters von Glukosetransporterisoformen einhergeht. Zahlreiche Untersuchungen an verschiedenen Krebszellarten wiesen u.a. eine erhöhte Expression des Glut1 nach (Brown and Wahl, 1993; North et al., 2000; Younes et al., 1995), wobei bei Darmkrebs eine positive Korrelation zwischen erhöhter Glut1-Expression und Schweregrad des Tumors gefunden wurde (Haber et al., 1998). Der Glut5 konnte mit immunhistochemischen Methoden nur in Brustkrebszellen, jedoch nicht in normalen Brustzellen lokalisiert werden (Zamora-Leon et al., 1996). Die Klonierung der neuen Glukosetransporter 9 und 10 ging von der Beobachtung aus, dass maligne Schilddrüsenzellen keinen der bisher bekannten Isoformen exprimieren (Musholt et al., 1997). Daher mussten andere Transporter für die mit fluoro –deoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) detektierte erhöhte Glukoseaufnahme der Zellen verantwortlich sein (Phay et al., 2000b). Rote Blutkörperchen einiger Spezies, wie Huhn oder Schwein, zeigen verglichen mit dem Menschen nur einen geringen Glukosetransport. Während der Differenzierung roter Blutkörperchen aus Knochenmarkszellen verlieren diese die Fähigkeit des Glukosetransportes durch Herabregulation des Glut1 (Johnstone et al., 1998). Die Differenzierung humaner Makrophagen aus Monozyten ist gekennzeichnet durch eine erhöhte Glut1-Expression, einer Herabregulation des Glut3 und einer verzögerten, jedoch mit fortschreitender Differenzierung ansteigenden Expression des Glut5. Dabei liess sich für die einzelnen Isoformen eine spezifische subzelluläre Lokalisation nachweisen (Malide et al., 1998). Die Differenzierung humaner Vorläuferzellen von Adipozyten ist verbunden mit einer de novo bzw. ansteigenden Expression des Glut4 und Proteinen der Insulin/IGF-I-Signaltransduktionskaskade (Hauner et al., 1998; Pederson and Rondinone, 2000).

Die in dieser Arbeit an Präimplantationsembryonen des Rindes gefundene stadienspezifische Expression der Glukosetransporterisoformen zeigt, dass die Transkription dieser Gene einer differentiellen Regulation während der Entwicklung unterworfen ist. Dass Glukosetransporterisoformen in Rinderembryonen nicht nur als

mögliche Differenzierungsmarker der Entwicklung, sondern auch für die einzelnen embryonalen Zelllinien dienen könnten, lässt der Nachweis des Glut1-Proteins in den Trophoblast- nicht jedoch in den Endodermzellen der elongierten Blastozysten vermuten (Abbildung 3-14). Die Lokalisation weiterer Glukosetransporterproteine in Präimplantationsembryonen des Rindes sollte daher neben dem Verständnis der Regulation des embryonalen Metabolismus auch unter dem Aspekt einer Beteiligung dieser Proteine an Differenzierungsprozessen betrachtet werden. Ein Hinweis auf eine Verbindung zwischen der Regulation von Differenzierungsprozessen der frühen Embryonalentwicklung und der Expression von Glukosetransportern stellt z.B. die transkriptionelle Kontrolle des Glut3 dar. Der Glut3 wurde als ein downstream Gen der Transkriptionsfaktoren Oct-3/4 beschrieben (Saijoh et al., 1996). Diese Transkriptionsfaktoren der POU-Familie werden in Mausblastozysten (dies gilt allerdings nicht für Rinderblastozysten (Kirchhof et al., 2000) ausschließlich im Embryoblasten exprimiert und sind an Differenzierungsprozessen pluripotenter embryonaler Stammzellen beteiligt (Niwa et al., 2000) .

In adulten Zellen wurde gezeigt, dass die Expression der Isoformen Glut1 und Glut3 z.B. durch Stressoren wie Hypoxie (Lin et al., 2000) , Streptozotocin-induzierten Diabetes (Reagan et al., 1999) und Hyperosmolarität (Taha et al., 1997) beeinflusst wird. Eine Überexpression des Glut1 reduziert die Hypoxie-induzierte Apoptose über die Inhibierung eines Stress-aktivierten Proteinkinasesignalweges (Lin et al., 2000). Nach einer Aktivierung humaner T-Zellen durch CD95 verlieren diese Zellen die Möglichkeit des Glukosetransportes und unterliegen dem Zelltod (Berridge et al., 1996).

Inwieweit sind Glukosetransporter an einer stressinduzierten Apoptose in Präimplantationsembryonen beteiligt? Hierzu sollen u.a. Befunde zur Rolle von Glukosetransportern speziell in Mäuseembryonen im Zusammenhang mit Apoptoseprozessen unter Stresszuständen wie Hyperglykämie und Hyperinsulinämie herangezogen und diskutiert werden. Drei verschiedene, teilweise überlappende Signalwege verbinden Apoptosemechanismen und Glukosetransport und -metabolismus: (I) Verminderter Glukosetransport resultiert in ATP-Mangel und stößt die mitochondriale Apoptosekaskade an (II) Reduzierte Glukoseaufnahme und verringerter Glukosemetabolismus führen zu oxidativem Stress, was über einen veränderten Redoxstatus der Zelle Apoptose verursachen kann (III) Intrazelluläre

Hyperglykämie und Hypoxie bewirken eine erhöhte HIF-1 α -Expression, wodurch p53 stabilisiert und eine p53-assoziierte Apoptose eingeleitet wird (Moley and Mueckler, 2000).

Hyperglykämie hervorgerufen durch Diabetes sowie Hyperinsulinämie in Verbindung mit dem „polycystic ovary syndrome“ (POS) führen beim Menschen zu Komplikationen während der frühen Embryonalentwicklung wie Fehlgeburten, Wachstumsstörungen oder gar Erbschäden (Balen et al., 1993; Greene, 1993; Mills et al., 1988; Sagle et al., 1988; Sutherland and Pritchard, 1987; Tulppala et al., 1993). Wie an Mäuseblastozysten gezeigt werden konnte, verursacht Hyperglykämie eine Herabregulation der Glukosetransporter 2 und 3 sowohl auf RNA- als auch Proteinebene (Moley et al., 1998a; Moley et al., 1998b) und induziert Apoptose durch eine erhöhte Expression von BAX, einem Apoptoseprotein der Bcl-2-Familie (Moley et al., 1998a). Wie neuere Untersuchungen unter Verwendung von BAX^{-/-} knockout Mäusen zeigten, resultiert eine verminderte Glukosetransporterexpression in einer erhöhten Expression von BAX, liegt damit upstream und ist die Ursache der aktivierten Apoptosekaskade (Chi et al., 2000a).

Die Insulin/IGF-I-Signaltransduktionskaskade ist durch eine Regulation der Proteinkinase B (Akt) an antiapoptotischen Prozessen beteiligt (Coffer et al., 1998). Die antiapoptotische Wirkung von Insulin und IGF-I während der frühen Embryonalentwicklung, konnte an Kaninchenblastozysten und humanen Embryonen nachgewiesen werden (Herrler et al., 1998; Spanos et al., 2000). Hohe Insulin- oder IGF-I-Konzentrationen hingegen bewirken in Mäuseblastozysten eine durch Herabregulation des IGF-I-Rezeptors erhöhte Apoptose (Chi et al., 2000b). Es gilt noch herauszufinden, inwieweit in Präimplantationsembryonen die Insulin/IGF-I-Signaltransduktionskaskade Einfluß auf die Expression von Glukosetransporterisoformen hat, und so einen programmierten Zelltod verursachen kann (Hardy, 1999). Die in diesem Abschnitt aufgezeigte Verbindung von Glukosetransporterexpression, Insulin/IGF-I-Signalvermittlung und Apoptose macht deutlich, dass Glukosetransporter nicht nur an Apoptoseprozessen während der frühen Embryonalentwicklung beteiligt sind, sondern eine durch verschiedene Stressoren veränderte Expression dieser Proteine vielmehr Apoptose induzieren kann.

5 Zusammenfassung

Die Aufnahme von Glukose in die Zelle erfolgt über Transmembranproteine - die Glukosetransporter - durch aktive (SGLT) und passive (Glut) Mechanismen. Verschiedene Isoformen der Glukosetransporter-Familie können anhand der Primärstruktur, spezifischer Transportkinetiken und dem Gewebeexpressionsmuster unterschieden werden. Insulin beeinflusst den Glukosetransport durch Regulation der Glukosetransporterexpression und -translokation. Für die Entwicklung von Säugetier-Präimplantationsembryonen ist die Verfügbarkeit von Glukose - und somit ihre Aufnahme - essentiell.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit dem Expressionsmuster von Glukosetransporterisoformen in Präimplantationsembryonen des Rindes. Grundlage war die Klonierung bisher nicht bekannter boviner Glukosetransporter-cDNA. Untersucht wurden die Glukosetransporter 1-5, 8 und der SGLT-I. Die Transkription dieser Gene wurde an *in vitro* gewonnenen Eizellen und Embryonen bis zum Stadium 16 Tage alter elongierter Blastozysten untersucht. Eine vergleichende Betrachtung der Glukosetransporterexpression zwischen *in vitro* und *in vivo* gewachsenen Embryonen wurde durch RNA-Quantifizierung der Glukosetransporter 1 und 4 an 14 und 16 Tage alten Blastozysten vorgenommen. Die Isoformen Glut1 und Glut4 in Rinderblastozysten mittels Immunhistochemie lokalisiert. An 8 Tage alten Blastozysten wurden Kurzzeiteffekte von Insulin (1, 2 und 4 Stunden nach Insulin-Supplementierung) auf die Transkription von Glut1, 3, 8 und die Glykolyseenzyme Hexokinase und Phosphofruktokinase untersucht. Mitogene Langzeiteffekte des Insulins (am Ende der ca. 168stündigen *In-vitro*-Kultur) wurden anhand von Kriterien wie Blastozystenrate, Rate der geschlüpften Blastozysten, Zellzahl und Bestimmung des TE/ICM-Zellzahlverhältnisses betrachtet.

Glukosetransporterisoformen werden in Präimplantationsembryonen des Rindes stadienspezifisch exprimiert. Transkripte der Isoformen 1, 3, 8 und SGLT-I sind maternalen Ursprungs und in allen untersuchten Embryonalstadien nachweisbar.

Der Glut5 wird mit dem Beginn der Aktivierung des embryonalen Genoms ab dem 8-/16-Zellstadium transkribiert. Die mRNA der Glukosetransporter 2 und 4 ist im Blastozystenstadium nachweisbar. Glut4-Transkripte sind bereits in expandierten

Blastozysten, von Glut2 hingegen erst in den untersuchten elongierten Stadien (14 und 16 Tage alt) zu finden.

Bei der Quantifizierung von Glut1- und Glut4-RNA in 14 und 16 Tage alten *in vitro* und *in vivo* gewachsenen Embryonen wurde eine verringerte Expression des Glut4 und eine gesteigerte Transkription des Glut1 bei 16 Tage alten verglichen mit 14 Tage alten Blastozysten gefunden. In 16 Tage alten *in vivo* Embryonen wurden keine Glut4-Transkripte detektiert, während eine schwache Expression dieses Transporters in *in vitro* Embryonen gleichen Stadiums vorliegt, was auf eine Entwicklungsverzögerung *in vitro* kultivierter Embryonen zurückzuführen sein könnte.

Das Glut1-Protein wurde in expandierten 8 Tage alten und in elongierten 14 und 16 Tage alten Blastozysten nachgewiesen. Es wurde im Zytoplasma und den lateralen Membranen der Trophektodermzellen lokalisiert. Embryoblastzellen exprimieren das Glut1-Protein ebenfalls, Endodermzellen nicht. Die Glut4-mRNA wurde bei 14 und 16 Tage alten Blastozysten mit In-situ-Hybridisierung nachgewiesen. Das Glut4-Protein wurde immunhistochemisch in 14 und 16 Tage alten Blastozysten in den Embryoblastzellen zytoplasmatisch und in den Endoderm- und Trophektodermzellen nukleär lokalisiert.

Die Supplementierung des Mediums mit 10µg/mL Insulin hatte keinen langfristigen Einfluß auf die Transkription der Gene Glut1, 3, 8, Hexokinase und Phosphofruktokinase. Die *In-vitro*-Kultur von Rinderembryonen unter Insulingabe resultierte in erhöhten Blastozystenzellzahlen und Raten geschlüpfter Blastozysten. Insulin beeinflusste jedoch die mRNA-Expression von Glukosetransporterisoformen und Glykolyseenzymen kurz nach dem Insulinzusatz. Eine erhöhte Transkription von Glut3, 8, Hexokinase und Phosphofruktokinase wurden nach einer einstündigen Inkubation von expandierten Blastozysten mit 10µg/mL Insulin nachgewiesen. Insulin hatte in der vorliegenden Studie somit einen Kurzzeiteffekt auf die Transkription einiger Gene und einen mitogenen Langzeiteffekt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit werfen neue Fragen auf, wie z.B. zu Ursache und Notwendigkeit eines so weiten Spektrums an Glukosetransporterisoformen bei Präimplantationsembryonen. Wird ein energieabhängiger Transport benötigt und wenn ja, warum und ab welchem Stadium? Unterscheiden sich der Mechanismus und die Regulation des embryonalen Glukosetransporters von dem in adulten Zellen? Gibt es einen Zusammenhang zwischen Differenzierung, Metabolismus und Glukosetransport? Neben diesen Fragen sollten weiterführende Studien versuchen aufzuzeigen, ob und inwieweit Zusammenhänge zwischen der Expression von Glukosetransporterisoformen, dem Glukosemetabolismus eines Embryos, den metabolischen und mitogenen Einflüssen von Insulin bzw. IGF-I und der Entwicklungskompetenz bzw. Vitalität eines Embryos bestehen. Ein besseres Verständnis dieser Zusammenhänge wird dazu beitragen, die frühe Embryonalentwicklung und die Entwicklung eines individuellen Embryos nicht nur nach morphologischen sondern auch nach molekularen Kriterien besser beschreiben und bemessen zu können.

6 Summary

Glucose transport across plasma membranes in mammalian cells is mediated by two different mechanisms: by an active, sodium-dependent transport (SGLT) which couples glucose uptake with Na⁺ influx against a concentration gradient, and by passive energy independent transport via facilitative glucose transporters (Glut). Different glucose transporter isoforms exist that share common structure features and differ in their substrate affinity and show a tissue specific expression pattern. Insulin effects glucose transport altering glucose transporter expression and – translocation.

The utilisation and transport of glucose as an energy substrate is essential for the development of the mammalian preimplantation embryo.

The recent work investigated the expression pattern of different glucose transporter isoforms in bovine preimplantation embryos. Bovine specific glucose transporter cDNA (Glut2, 3, 5, 8 and SGLT-I) were cloned and sequenced. The expression pattern of Glut1-5, 8 and SGLT-I were studied in in vitro derived oocytes and preimplantation embryos up to the elongated 16 days old blastocyst. Elongated 14 and 16 days old blastocysts derived in vitro or in vivo were compared for their mRNA-expression of the isoforms 1 and 4 using a competitive RT-PCR approach. The isoforms Glut1 and Glut4 were localised in bovine blastocysts by immunohistochemistry. In 8 days old expanded blastocysts short time effects of insulin (1, 2 and 4 hours) on the transcription for Glut1, 3, 8 and the glycolytic enzymes hexokinase and phosphofructokinase were investigated. Long term effects of insulin (after 168 hours of in vitro culture) on the transcription of glucose transporters and glycolytic enzymes and embryo culture criteria such as blastocyst and hatching rate, blastocyst cell number and ratio of trophectoderm to embryoblast cells were determined.

Glucose transporters are developmentally expressed in bovine preimplantation embryos. Transcripts for the isoforms 1, 3, 8 and SGLT-I are of maternal and embryonic origin and were found to be expressed in all stages investigated.

Glut5 transcription starts with the beginning of the embryonic genome activation at the 8-/16-cell stage. The mRNA expression for Glut2 and Glut4 were restricted to the

blastocyst stage. While Glut4 transcripts were detected in 8 days old expanded blastocysts, Glut2 expression was found only in the elongated 14 and 16 days old embryos.

The mRNA quantification for Glut1 and Glut4 in 14 and 16 days old *in vitro* and *in vivo* derived elongated blastocysts showed an increased Glut1 expression in 16 compared with 14 days old embryos, while Glut4 expression decreased. In 16 days old *in vivo* derived embryos no Glut4 expression was detectable. A weak expression of this isoform in *in vitro* grown embryos suggests, that compared to *in vivo* embryos these embryos show a delayed development.

Glut1 protein was localised by immunohistochemistry in 8 days and 14 and 16 days old elongated blastocysts in the cytoplasm and the lateral membranes of trophoctoderm cells. Embryoblastcells show Glut1 expression, while endodermcells do not express the Glut1 protein.

Glut4 transcripts were shown by in situ hybridisation in trophoctoderm- and endodermcells of 14 and 16 days old embryos. The Glut4 protein was localised by immunohistochemistry in 14 and 16 days old elongated blastocysts. In embryoblastcells Glut4 was localised in the cytoplasm while endoderm- and trophoctodermcells showed a nuclear staining.

Insulinsupplementation (10µg/mL) of embryo culture media did not have long term effects on the mRNA expression of Glut1, 3, 8 and hexokinase and phosphofructokinase. Blastocysts obtained from *in vitro* culture under insulinsupplementation did result in higher blastocyst cell number and hatching rates. Short time exposure of blastocyst to insulin increased the gene expression of Glut3, 8, hexokinase and phosphofructokinase in a time dependent manner. These data suggest a metabolic short time and mitogenic long term effect of insulin on *in vitro* derived bovine embryos.

The results of the present work raises new questions, e.g. about the need and reasons for the expression of such a variety of glucose transporter isoforms during preimplantation embryo development. Is there a need for an active, energy dependent mechanism of glucose transport for the embryo and if yes, why and from

which stage on? Do the mechanisms and regulations of embryonic glucose transporters differ from the ones known from adult cells? Is there a connection between differentiation, metabolism and glucose transport? Further studies should be undertaken to show, if there are connections between glucose transporter expression, glucose metabolism, metabolic and mitogenic effects of insulin and IGF-I and the developmental competence and viability of the embryo. A better understanding of these processes will achieve in advancements to characterise and describe the early development of the embryo not only by morphological but also by molecular criteria.

7 Anhang

Gen	heterologe Primerpaare – Amplifikation nicht bekannter boviner cDNAs (5'-3')	Größe in bp	genspezifische Primerpaare (5'-3')	Größe in bp
Glut1	-		F AGCGTCATCTTCATCCCAGC R CCACAATGCTCAGGTAGGAC	544
Glut2	F AGYTGGAA <u>R</u> AGRCT <u>M</u> AGAGG R TGCT <u>S</u> <u>A</u> SATAACTCATCC <u>A</u> <u>R</u> G	427	F AAAGAGGGGGAAGAAGCATC R GGCACAAACAAACATCCCAC	309
Glut3	F CATYCCCTGGTTTATTGTGGC R CARTYCCTCCTGAAATGAAG	580	F ATGGCAGTGGCTGGTTGTTC R TCCTGAGCTGAAGAGAATGTCC	508
Glut4	-		F CTCTCTTCCCCATTACTTCCAG R GAAGGCTGAGCAAGAGGACTGAG	497
Glut5	F AGGAGGATGAGGC <u>W</u> GAGAAG R TCTTCCC <u>R</u> TTTCATYCA <u>R</u> GTG	607	F CATCTCCATCATCGTCCTCA R GTAGATGGTGGTGAGGAGAC	531
Glut8	F ATCTCSGAAATCGCCTACCC R GGCTGTGAYTTGTTCCAGAGTC	986	F CCTTCATCATCGGCATCTCC R AGTCTTCCCTTTGGTCTCAG	632
SGLT-I	F CACYGCCCTYTACACAATYAC R TGGC <u>R</u> CTGTTGAAGATGGAG	550	F ATCAGGCCTCGCAGTCCATTG R ATGGTGCCTTCGTGACAAAATAC	460
Phospho fruktokinase	F GC <u>M</u> GGAGCTTY <u>RW</u> GAACAAC R GAT <u>R</u> AACAC <u>B</u> CGYCGCTTGGT	588	F ACTGCTTCCTGCCTTCCATC R CAACTGGGAGGTATACAAGC	404
Hexokinase	-		F GAACTATGTGGTGAAGCTGC R ATACTGTGGGTGCGTCTTGT	723

Tabelle 2-1: Zusammenstellung der verwendeten Primerpaare (F = Forward, R = Reverse), die für die PCR-Amplifikation der ausgewiesenen cDNA der entsprechenden Gene benutzt wurden. Die als heterologe Primer bezeichneten Oligonukleotide wurden für die PCR-Amplifikation unbekannter boviner cDNA-Sequenzen eingesetzt.

Antigen	Firma/ Institut	Katalog Nummer	Beschreibung/ Herkunft	Epitope	Bekannte Spezifität	Applikationen
Glut1	Santa Cruz Biochemicals	sc 1605	polyclonal/ Ziege	C-Terminus	Maus, Ratte, Mensch	WB, IP, IHC
	Santa Cruz Biochemicals	sc 7903	polyclonal/ Kaninchen	AS 218-260 der humanen Proteinseq.	Maus, Ratte, Mensch	WB, IP, IHC
Glut2	Chemicon	AB 1342	polyclonal/2< Kaninchen	Exoplasmat. loop (40-55AS) der Helices 1 und 2	Maus, Ratte, Mensch	WB, IP, E
	Pharmakologie RWTH Aachen		polyclonal/ Kaninchen	C-Terminus	Mensch	WB
Glut3	Chemicon	AB 1345	polyclonal/ Kaninchen	C-Terminus (12 AS)	Mensch	IHC, WB, E
Glut4	Santa Cruz Biochemicals	sc 1608	polyclonal/ Schaf		Maus, Ratte, Mensch	ICH, WB, IP
	Santa Cruz Biochemicals	sc 7938	polyclonal/ Kaninchen	AS 230-290 der humanen Proteinseq	Maus, Ratte, Mensch	WB, IP, IHC
	Chemicon	AB 1346	polyclonal/ Kaninchen	AS 498-509 der Mausproteinseq.	Maus, Ratte, Mensch	WB, IHC, E
	DPC	BM 436	monoclonal/ Ms IgG 1F8		Mensch, Affe, Ratte, Maus, Kaninchen, Huhn	IHC, IP, WB
Glut5	Chemicon	AB 1041	polyclonal/ Kaninchen	C-Terminus (12 AS)	Mensch	IHC, WB, DB
Glut8	Pharmakologie RWTH Aachen		polyclonal/ Kaninchen	C-Terminus	Mensch, Maus	WB bei Überexpression in COS-7 Zellen
	Gynäkologie Washington Universität St. Louis		polyclonal/ Kaninchen	C-Terminus	Maus	WB, ICH
SGLT-I	Chemicon	AB 1352	polyclonal/ Kaninchen	AS 402-420 der Kaninchenproteinseq.	Mensch, Maus, Ratte, Hund, Kaninchen, Schwein	WB, IP, E

Tabelle 22: Zusammenstellung der Antikörper gegen Glukosetransporter, die auf Kreuzreaktivität mit Rinderprotein mittels Immunohistochemie und/oder Western Blot getestet wurden (WB = Western blot, IP = Immunopräzipitation, IHC = Immunohistochemie).

IVM-Medium

- Medium M199 – C (Karbonat gepuffert)

M-199	# 3769	0.98	g
Kanamycin		0.0075	g
Sodium Bicarbonate		0.21	g
Cell Culture Water	# 3500	100	mL

IVF-Medien

- TALP – Calcium frei 10x
- TALP – Calcium frei
- Fert – TALP

	TALP Calcium frei 10x	TALP Calcium frei	
HEPES	2.38	0.476	g
Kanamycin	0.075	0.015	g
KCl	0.230	0.046	g
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.310	0.062	g
Na pyruvate	0.110	0.022	g
Na ₂ HPO ₄	0.040	0.008	g
NaCl	5.4	1.08	g
Na Laktat 60%	3700	740	µl
NaHCO ₃	2.1	0.420	g
PVA	-	0.200	
Wasser	100	200	mL

Fert TALP		
NaCl	0.6658	g
KCl	0.0239	g
NaHCO ₃	0.2100	g
NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	0.0041	g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.0294	g
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.0048	g
Penicillamin	0.0003	g
Na Laktat 60%	0.1860	g
Wasser	100	mL

Wasch-Medium und Slicing-Medium

- Medium M-199 – D (Hepes gepuffert)
- Slicing Medium - modifizierte PBS

M-199 Hepes		4.9	g
PVA		0.5	g
BSA Fraction V	# 3311	2.0	g
Penicillin		0.0275	g
Streptomycin		0.035	g
Heparin		0.005	g
Hepes 25mM		3.25	g
Wasser	# 3500	500	mL

Slicing Medium – mod. PBS	# 6650		
BSA	# 3311	0,5	g
Heparin		0,005	g
Wasser	# 3500	500	mL

IVC-Medium

- SOF (Synthetic Oviductal Fluid)

NaCl		0.63	g
KCl		0.0537	g
KH ₂ PO ₄		0.0163	g
NaHCO ₃		0.21	g
MgCl ₂ 6H ₂ O		0.00476	g
CaCl ₂ 2H ₂ O		0.025	g
Na Laktat 60%		0.062	µl
Glukose		0.027	g
Phenolrot		0.001	g
Wasser	# 3500	100	ml

vor jedem Gebrauch werden a 10mL Medium hinzugegeben:

essentielle Aminosäuren		200	µL
nicht essentielle Aminosäuren		100	µL
Pyruvat		36	µL
Glutamin		50	µL
Gentamycin		50	µl
BSA (fatty acid free)	# 8806	80	mg

Tabelle 23 Übersicht der für die *In-vitro*-Produktion von Rinderembryonen verwendeten Medien. Alle Chemikalien wurden von Sigma (Deisenhofen) bezogen. Für spezielle Reagenzien sind die Katalognummern (#) angegeben.

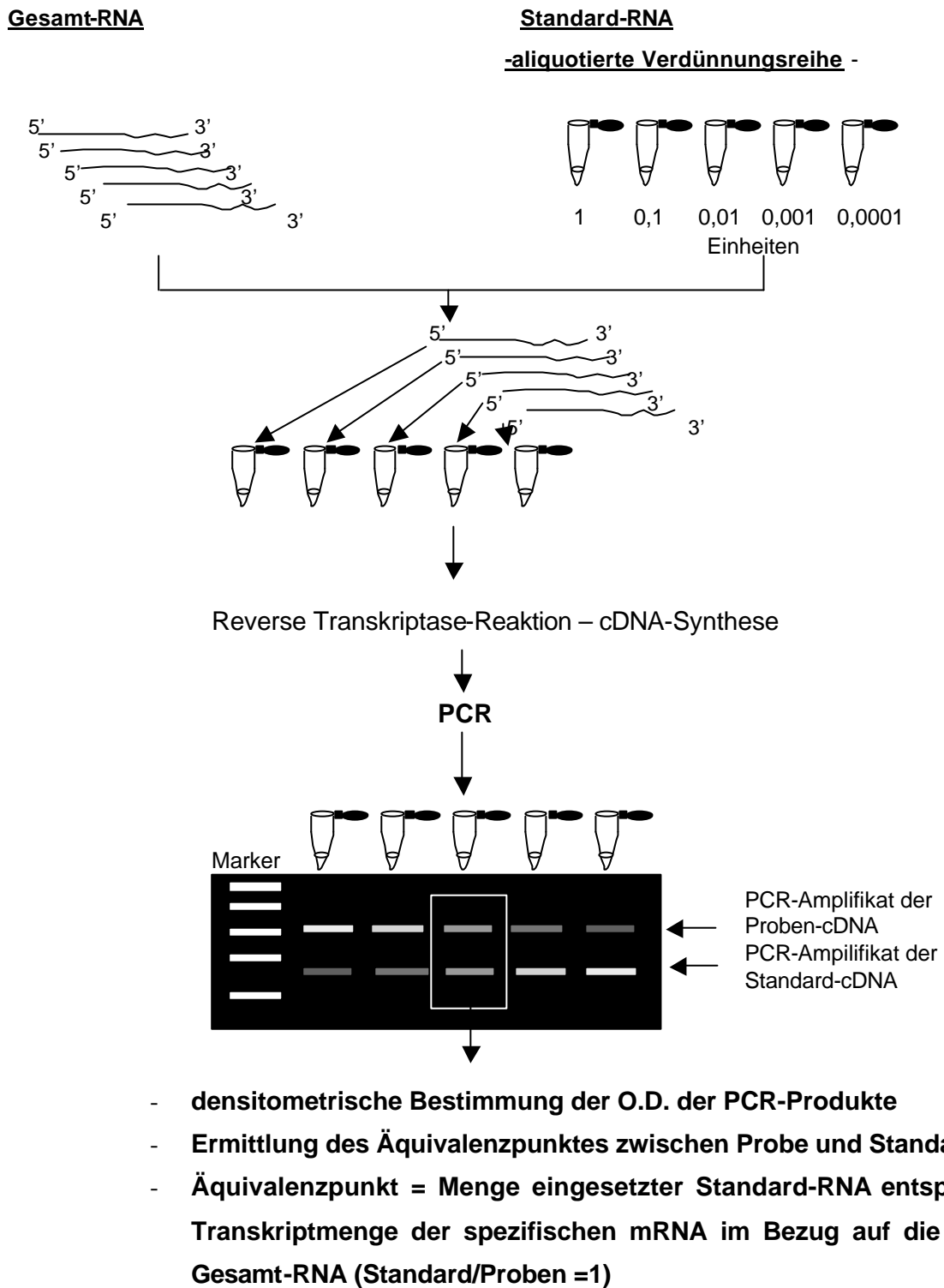


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der kompetitiven RT-PCR, wie sie zur Bestimmung der Transkriptmengen von Glut1 und Glut4 in 14 und 16 Tage alten *in vivo* und *in vitro* gewachsenen Blastozysten durchgeführt wurde.

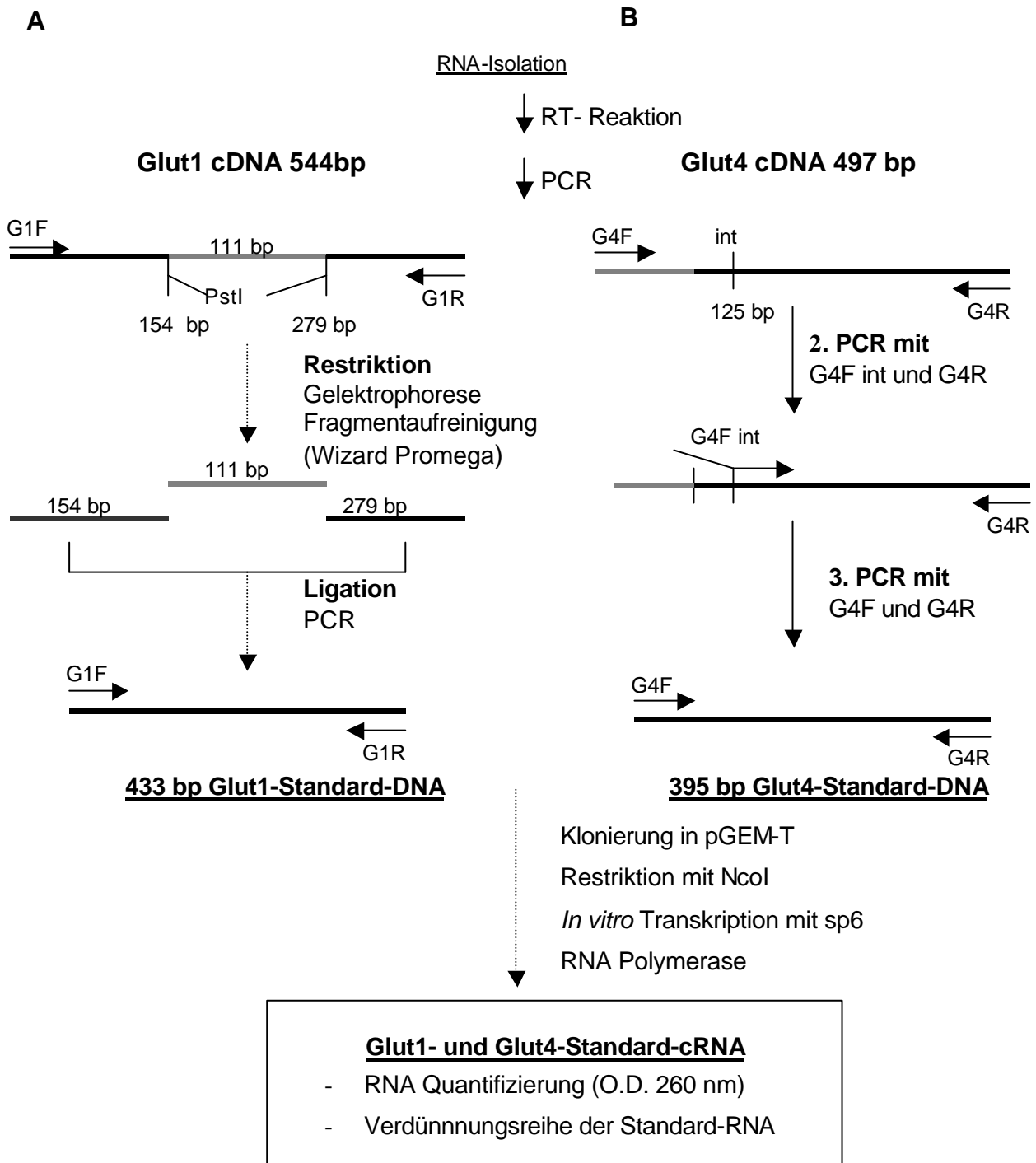


Abbildung 2-2 Schematische Darstellung für die Herstellung der Standard-RNA für den Glut1 (A) bzw. Glut4 (B). Die aus den Deletionsklonen durch *In-vitro*-Transkription erhaltenen Standard-cRNAs wurden nach Konzentrationsbestimmung am UV-Spektrophotometer in Aliquots einer definierten Verdünnungsreihe bei -80°C aufbewahrt und konnten später für die kompetitive RT-PCR eingesetzt werden.

8 Abkürzungsverzeichnis

BCIP	5-Brom-4-Chlor-Indolylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
cds	coding sequence
cRNA	komplementäre RNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	enhanced chemoluminescence
EST	expressed sequence tag
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Flouresceinisothiocyanat
Glut	Glukosetransporter
GSV	glut4 storage vesicle
HRP	horse radish peroxidase
IGF-I	insulin growth factor I
ICM	inner cell mass
IFN-tau	interferon-tau
IHC	Immunhistochemie
IVC	In-vitro-Kultur
IVF	In-vitro-Fertilisation
IVM	In-vitro-Reifung
kDa	Kilodalton
k_m	Michaelis-Menten Konstante
KOK	Kumulus – Oozyten – Komplexe
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsals
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBST	phosphatgepufferte Saline und TritonX-100
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	platelet derived growth factor
PFK	Phosphofruktokinase
PGF_{2α}	Prostaglandin F _{2α}
p.i.	post inseminationem
p.o.	post ovulationem
PVA	Polyvinylalkohol
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGLT	Natrium-abhängiger Glukosetransporter
SOF	synthetic oviductal fluid

TALP	Tyrode's Lactat Albumine Pyruvate
TGF-	transforming growth factor
TCM	tissue culture medium
TNBS	Trinitrobenzensulfonsäure
utr	untranslated region
WB	Western Blot
V_{max}	maximale Geschwindigkeit

9 Literaturverzeichnis

- Aghayan, M., L.V. Rao, R.M. Smith, L. Jarett, M.J. Charron, B. Thorens, and S. Heyner. 1992. Developmental expression and cellular localization of glucose transporter molecules during mouse preimplantation development. *Development*. 115:305-12.
- Alvarez, J., D.C. Lee, S.A. Baldwin, and D. Chapman. 1987. Fourier transform infrared spectroscopic study of the structure and conformational changes of the human erythrocyte glucose transporter. *J Biol Chem*. 262:3502-9.
- Andrews, J.C., and B.D. Bavister. 1989. Capacitation of hamster spermatozoa with the divalent cation chelators D-penicillamine, L-histidine, and L-cysteine in a protein-free culture medium. *Gamete Res*. 23:159-70.
- Arakawa, K., T. Ishihara, A. Oku, M. Nawano, K. Ueta, K. Kitamura, M. Matsumoto, and A. Saito. 2001. Improved diabetic syndrome in C57BL/KsJ-db/db mice by oral administration of the Na(+)-glucose cotransporter inhibitor T-1095. *Br J Pharmacol*. 132:578-86.
- Asano, T., A. Kanda, H. Katagiri, M. Nawano, T. Ogiwara, K. Inukai, M. Anai, Y. Fukushima, Y. Yazaki, M. Kikuchi, R. Hooshmand-Rad, C.H. Heldin, Y. Oka, and M. Funaki. 2000. p110beta is up-regulated during differentiation of 3T3-L1 cells and contributes to the highly insulin-responsive glucose transport activity. *J Biol Chem*. 275:17671-6.
- Asano, T., Y. Shibasaki, M. Kasuga, Y. Kanazawa, F. Takaku, Y. Akanuma, and Y. Oka. 1988. Cloning of a rabbit brain glucose transporter cDNA and alteration of glucose transporter mRNA during tissue development. *Biochem Biophys Res Commun*. 154:1204-11.
- Au, K.K., E. Liang, J.Y. Li, P.S. Li, C.C. Liew, T.T. Kwok, Y.M. Choy, C.Y. Lee, and K.P. Fung. 1997. Increases in mRNA levels of glucose transporters types 1 and 3 in Ehrlich ascites tumor cells during tumor development. *J Cell Biochem*. 67:131-5.
- Augustin, R., P. Pocar, A. Navarrete Santos, C. Wrenzycki, F. Gandolfi, H. Niemann, and B. Fischer. 2001. Glucose transporter expression is developmentally regulated in in vitro derived bovine preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev*:in press
- Balen, A.H., S.L. Tan, J. MacDougall, and H.S. Jacobs. 1993. Miscarriage rates following in-vitro fertilization are increased in women with polycystic ovaries and reduced by pituitary desensitization with buserelin. *Hum Reprod*. 8:959-64.
- Banting, F.G., and C.H. Best. 1990. Pancreatic extracts. 1922. *J Lab Clin Med*. 115:254-72.
- Barbehenn, E.K., R.G. Wales, and O.H. Lowry. 1974. The explanation for the blockade of glycolysis in early mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 71:1056-60.
- Barbehenn, E.K., R.G. Wales, and O.H. Lowry. 1978. Measurement of metabolites in single preimplantation embryos; a new means to study metabolic control in early embryos. *J Embryol Exp Morphol*. 43:29-46.
- Barros, L.F., S.A. Baldwin, and M. Griffiths. 1997. Rapid activation of GLUT1 by osmotic stress. *Biochem Soc Trans*. 25:485S.
- Barthel, A., S.T. Okino, J. Liao, K. Nakatani, J. Li, J.P. Whitlock, and R.A. Roth. 1999. Regulation of GLUT1 gene transcription by the serine/threonine kinase Akt1. *J Biol Chem*. 274:20281-6.
- Bavister, B.D. 2000. Interactions between embryos and the culture milieu. *Theriogenology*. 53:619-26.
- Bavister, B.D., T.A. Rose-Hellekant, and T. Pinyopummintr. 1992. Development of in vitro matured/in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology*. 37:127-146.
- Bavister, B.D., and Yanagimachi. 1977. The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro. *Biol Reprod*. 16:228-37.
- Bennett, B.L., C.G. Prosser, and M.R. Grigor. 1995. Isolation of cDNAs and tissue specific expression of ovine glucose transporters. *Biochem Mol Biol Int*. 37:9-16.
- Benos, D.J. 1981. Developmental changes in epithelial transport characteristics of preimplantation rabbit blastocysts. *J Physiol*. 316:191-202.
- Berridge, M.V., A.S. Tan, K.D. McCoy, M. Kansara, and F. Rudert. 1996. CD95 (Fas/Apo-1)-induced apoptosis results in loss of glucose transporter function. *J Immunol*. 156:4092-9.
- Betteridge, K.J., M.D. Eaglesome, G.C. Randall, and D. Mitchell. 1980. Collection, description and transfer of embryos from cattle 10--16 days after oestrus. *J Reprod Fertil*. 59:205-16.
- Betts, D.H., D.J. MacPhee, G.M. Kidder, and A.J. Watson. 1997. Ouabain sensitivity and expression of Na/K-ATPase alpha- and beta- subunit isoform genes during bovine early development. *Mol Reprod Dev*. 46:114-26.
- Biggers, J.D., and L.K. McGinnis. 2001. Evidence that glucose is not always an inhibitor of mouse preimplantation development in vitro. *Hum Reprod*. 16:153-163.

- Birnbaum, M.J., H.C. Haspel, and O.M. Rosen. 1986. Cloning and characterization of a cDNA encoding the rat brain glucose transporter protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:5784-8.
- Birnbaum, M.J. 1989. Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein. *Cell.* 57:305-15.
- Bliss, M. 1982. The discovery of insulin. University of Chicago Press, Chicago. 304 , [16] of plates pp.
- Blondin, P., P.W. Farin, A.E. Crosier, J.E. Alexander, and C.E. Farin. 2000. In vitro production of embryos alters levels of insulin-like growth factor-II messenger ribonucleic acid in bovine fetuses 63 days after transfer. *Biol Reprod.* 62:384-9.
- Boado, R.J., and W.M. Pardridge. 1990. The brain-type glucose transporter mRNA is specifically expressed at the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun.* 166:174-9.
- Borson, N.D., W.L. Salo, and L.R. Drewes. 1996. Canine brain glucose transporter 3: gene sequence, phylogenetic comparisons and analysis of functional sites. *Gene.* 168:251-6.
- Brackett, B.G., L. Keskinetepe, A.A. Simplicio, and G.C. Luvoni. 1997. Influences of culture components on the development of bovine blastocysts in defined conditions. *Theriogenology.* 47:274-274.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
- Brown, R.S., and R.L. Wahl. 1993. Overexpression of Glut-1 glucose transporter in human breast cancer. An immunohistochemical study. *Cancer.* 72:2979-85.
- Burant, C.F., S. Flink, A.M. DePaoli, J. Chen, W.S. Lee, M.A. Hediger, J.B. Buse, and E.B. Chang. 1994. Small intestine hexose transport in experimental diabetes. Increased transporter mRNA and protein expression in enterocytes. *J Clin Invest.* 93:578-85.
- Burant, C.F., J. Takeda, E. Brot-Laroche, G.I. Bell, and N.O. Davidson. 1992. Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5. *J Biol Chem.* 267:14523-6.
- Burcelin, R., M. del Carmen Munoz, M.T. Guillam, and B. Thorens. 2000a. Liver hyperplasia and paradoxical regulation of glycogen metabolism and glucose-sensitive gene expression in GLUT2-null hepatocytes. Further evidence for the existence of a membrane-based glucose release pathway. *J Biol Chem.* 275:10930-6.
- Burcelin, R., W. Dolci, and B. Thorens. 2000b. Portal glucose infusion in the mouse induces hypoglycemia: evidence that the hepatoportal glucose sensor stimulates glucose utilization. *Diabetes.* 49:1635-42.
- Burchell, A. 1998. A re-evaluation of GLUT 7. *Biochem J.* 331:973.
- Calderhead, D.M., K. Kitagawa, L.I. Tanner, G.D. Holman, and G.E. Lienhard. 1990. Insulin regulation of the two glucose transporters in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 265:13801-8.
- Carayannopoulos, M.O., M.M. Chi, Y. Cui, J.M. Pingsterhaus, R.A. McKnight, M. Mueckler, S.U. Devaskar, and K.H. Moley. 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.
- Casslen, B., and B. Nilsson. 1984. Human uterine fluid, examined in undiluted samples for osmolality and the concentrations of inorganic ions, albumin, glucose, and urea. *Am J Obstet Gynecol.* 150:877-81.
- Charron, M.J., and E.B. Katz. 1998. Metabolic and therapeutic lessons from genetic manipulation of GLUT4. *Mol Cell Biochem.* 182:143-52.
- Charron, M.J., E.B. Katz, and A.L. Olson. 1999. GLUT4 gene regulation and manipulation. *J Biol Chem.* 274:3253-6.
- Chatot, C.L., J. Lewis-Williams, I. Torres, and C.A. Ziomek. 1994. One-minute exposure of 4cell mouse embryos to glucose overcomes morula block in CZB medium. *Mol Reprod Dev.* 37:407-12.
- Chen, C., N. Pore, A. Behrooz, F. Ismail-Beigi, and A. Maity. 2001. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem.* 276:9519-25.
- Chi, M.M., J.K. Manchester, R. Basuray, S. Mahendra, R.C. Strickler, D.B. McDougal, and O.H. Lowry. 1993. An unusual active hexose transport system in human and mouse preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:10023-5.
- Chi, M.M., J. Pingsterhaus, M. Carayannopoulos, and K.H. Moley. 2000a. Decreased glucose transporter expression triggers BAX-dependent apoptosis in the murine blastocyst. *J Biol Chem.* 275:40252-7.
- Chi, M.M., A.L. Schlein, and K.H. Moley. 2000b. High insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-regulation of the IGF-1 receptor. *Endocrinology.* 141:4784-92.
- Chin, J.J., E.K. Jung, and C.Y. Jung. 1986. Structural basis of human erythrocyte glucose transporter function in reconstituted vesicles. *J Biol Chem.* 261:7101-4.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156-9.

- Coates, A., A.J. Rutherford, H. Hunter, and H.J. Leese. 1999. Glucose-free medium in human in vitro fertilization and embryo transfer: a large-scale, prospective, randomized clinical trial. *Fertil Steril*. 72:229-32.
- Coffer, P.J., J. Jin, and J.R. Woodgett. 1998. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J*. 335:1-13.
- Corpe, C.P., M.M. Basaleh, J. Affleck, G. Gould, T.J. Jess, and G.L. Kellett. 1996. The regulation of GLUT5 and GLUT2 activity in the adaptation of intestinal brush-border fructose transport in diabetes. *Pflugers Arch*. 432:192-201.
- Crane, R.K., D. Miller, and I. Bihler. 1961. In *Membrane Transport and Metabolism*. A. Kleinzeller and A. Kotyk, editors. Academic Press, New York. 439-449.
- Cross, J.C., and R.M. Roberts. 1991. Constitutive and trophoblast-specific expression of a class of bovine interferon genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:3817-21.
- Currie, M.J., N.S. Bassett, and P.D. Gluckman. 1997. Ovine glucose transporter-1 and -3: cDNA partial sequences and developmental gene expression in the placenta. *Placenta*. 18:393-401.
- Cushman, S.W., and L.J. Wardzala. 1980. Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J Biol Chem*. 255:4758-62.
- Cusin, I., J. Terrettaz, F. Rohner-Jeanrenaud, N. Zarjevski, F. Assimacopoulos-Jeannet, and B. Jeanrenaud. 1990. Hyperinsulinemia increases the amount of GLUT4 mRNA in white adipose tissue and decreases that of muscles: a due for increased fat depot and insulin resistance. *Endocrinology*. 127:3246-8.
- Dan-Goor, M., S. Sasson, A. Davarashvili, and M. Almagor. 1997. Expression of glucose transporter and glucose uptake in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod*. 12:2508-10.
- Das, U.G., J. He, R.A. Ehrhardt, W.W. Hay, Jr., and S.U. Devaskar. 2000. Time-dependent physiological regulation of ovine placental GLUT-3 glucose transporter protein. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 279:R2252-61.
- Das, U.G., R.E. Schroeder, W.W. Hay, and S.U. Devaskar. 1999. Time-dependent and tissue-specific effects of circulating glucose on fetal ovine glucose transporters. *Am J Physiol*. 276:R809-17.
- Davidson, N.O., A.M. Hausman, C.A. Ifkovits, J.B. Buse, G.W. Gould, C.F. Burant, and G.I. Bell. 1992. Human intestinal glucose transporter expression and localization of GLUT5. *Am J Physiol*. 262:C795-800.
- De Sousa, P.A., M.E. Westhusin, and A.J. Watson. 1998. Analysis of variation in relative mRNA abundance for specific gene transcripts in single bovine oocytes and early embryos. *Mol Reprod Dev*. 49:119-30.
- Deprez, J., D. Vertommen, D.R. Alessi, L. Hue, and M.H. Rider. 1997. Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades. *J Biol Chem*. 272:17269-75.
- Doege, H., A. Bocianski, H.G. Joost, and A. Schurmann. 2000a. Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes. *Biochem J*. 350 Pt 3:771-6.
- Doege, H., A. Schurmann, G. Bahrenberg, A. Brauers, and H.G. Joost. 2000b. GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *J Biol Chem*. 275:16275-80.
- Dominguez, J.H., K. Camp, L. Maianu, H. Feister, and W.T. Garvey. 1994. Molecular adaptations of GLUT1 and GLUT2 in renal proximal tubules of diabetic rats. *Am J Physiol*. 266:F283-90.
- Dominguez, J.H., B. Song, S. Liu-Chen, M. Qulali, R. Howard, C.H. Lee, and J. McAteer. 1996. Studies of renal injury. II. Activation of the glucose transporter 1 (GLUT1) gene and glycolysis in LLC-PK1 cells under Ca²⁺ stress. *J Clin Invest*. 98:395-404.
- Dorland, M., T.A.M. Kruip, and J.A. van der Donk. 1992. Assessing day 7 bovine embryo viability by measuring the rate of nutrient uptake. *J Reprod Fertil, Abstract Series*. 9:27.
- Dunglison, G.F., S.D. Jane, T.F. McCaul, J.E. Chad, T.P. Fleming, and P.L. Kaye. 1995. Stimulation of endocytosis in mouse blastocysts by insulin: a quantitative morphological analysis. *J Reprod Fertil*. 105:115-23.
- Dutour, A. 1996. Knockout mice lacking GLUT4 glucose transporters. *Eur J Endocrinol*. 134:421-2.
- Eckert, J., and H. Niemann. 1998. mRNA expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) and its receptor subunits glycoprotein 130 and LIF-receptor-beta in bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Mol Hum Reprod*. 4:957-65.
- Ehrhardt, R.A., and A.W. Bell. 1997. Developmental increases in glucose transporter concentration in the sheep placenta. *Am J Physiol*. 273:R1132-41.

- Farrell, C.L., and W.M. Pardridge. 1991a. Blood-brain barrier glucose transporter is asymmetrically distributed on brain capillary endothelial luminal and abluminal membranes: an electron microscopic immunogold study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:5779-83.
- Farrell, C.L., and W.M. Pardridge. 1991b. Ultrastructural localization of blood-brain barrier-specific antibodies using immunogold-silver enhancement techniques. *J Neurosci Methods*. 37:103-10.
- First, N.L., M.L. Leibfried-Rutledge, and M.A. Sirard. 1988. Cytoplasmic control of oocyte maturation and species differences in the development of maturational competence. *Prog Clin Biol Res*. 267:1-46.
- Flores-Riveros, J.R., J.C. McLenithan, O. Ezaki, and M.D. Lane. 1993. Insulin down-regulates expression of the insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) gene: effects on transcription and mRNA turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:512-6.
- Fukui, Y., and H. Ono. 1989. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in-vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J Reprod Fertil*. 86:501-6.
- Fukumoto, H., S. Seino, H. Imura, Y. Seino, and G.I. Bell. 1988a. Characterization and expression of human HepG2/erythrocyte glucose- transporter gene. *Diabetes*. 37:657-61.
- Fukumoto, H., S. Seino, H. Imura, Y. Seino, R.L. Eddy, Y. Fukushima, M.G. Byers, T.B. Shows, and G.I. Bell. 1988b. Sequence, tissue distribution, and chromosomal localization of mRNA encoding a human glucose transporter-like protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85:5434-8.
- Furnus, C.C., D.G. deMatos, A.G. Martinez, and M. Matkovic. 1997. Effect of glucose on embryo quality and pos-thaw viability of in-vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*. 47:481-490.
- Galli, C., and G. Lazzari. 1996. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Animal Reproduction Science*. 42:371-379.
- Gardner, D.K., and M. Lane. 1993. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol Reprod*. 48:377-85.
- Gardner, D.K., M. Lane, A. Spitzer, and P.A. Batt. 1994. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol Reprod*. 50:390-400.
- Gardner, D.K., and H.J. Leese. 1988. The role of glucose and pyruvate transport in regulating nutrient utilization by preimplantation mouse embryos. *Development*. 104:423-9.
- Gardner, H.G., and P.L. Kaye. 1991. Insulin increases cell numbers and morphological development in mouse pre-implantation embryos in vitro. *Reprod Fertil Dev*. 3:79-91.
- Gardner, H.G., and P.L. Kaye. 1995. Characterization of glucose transport in preimplantation mouse embryos. *Reprod Fertil Dev*. 7:41-50.
- Gordon, I.R. 1994. Laboratory production of cattle embryos. CAB International, Wallingford. XIX, 640 s. pp.
- Gould, G.W. 1997. Facilitative glucose transporters. R.G. Landes, Austin. 235 s. pp.
- Grealy, M., M.G. Diskin, and J.M. Sreenan. 1996. Protein content of cattle oocytes and embryos from the two-cell to the elongated blastocyst stage at day 16. *J Reprod Fertil*. 107:229-33.
- Greene, M.F. 1993. Prevention and diagnosis of congenital anomalies in diabetic pregnancies. *Clin Perinatol*. 20:533-47.
- Guilherme, A., M. Emoto, J.M. Buxton, S. Bose, R. Sabini, W.E. Theurkauf, J. Leszyk, and M.P. Czech. 2000. Perinuclear localization and insulin responsiveness of GLUT4 requires cytoskeletal integrity in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*. 275:38151-9.
- Guillam, M.T., E. Hummler, E. Schaerer, J.I. Yeh, M.J. Birnbaum, F. Beermann, A. Schmidt, N. Deriaz, B. Thorens, and J.Y. Wu. 1997. Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islet development in mice lacking Glut-2. *Nat Genet*. 17:327-30.
- Guillam, M.T., R. Burcelin, and B. Thorens. 1998. Normal hepatic glucose production in the absence of GLUT2 reveals an alternative pathway for glucose release from hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:12317-21.
- Guillam, M.T., P. Dupraz, and B. Thorens. 2000. Glucose uptake, utilization, and signaling in GLUT2-null islets. *Diabetes*. 49:1485-91.
- Guillam, M.T., E. Hummler, E. Schaerer, J.I. Yeh, M.J. Birnbaum, F. Beermann, A. Schmidt, N. Deriaz, B. Thorens, and J.Y. Wu. 1997. Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islet development in mice lacking Glut-2. *Nat Genet*. 17:327-30.
- Guyader-Joly, C., C. Khatchadourian, and Y. Menezo. 1996. Comparative glucose and fructose incorporation and conversion by in vitro produced bovine embryos. *Zygote*. 4:85-91.
- Haber, R.S., A. Rathan, K.R. Weiser, A. Pritsker, S.H. Itzkowitz, C. Bodian, G. Slater, A. Weiss, and D.E. Burstein. 1998. GLUT1 glucose transporter expression in colorectal carcinoma: a marker for poor prognosis. *Cancer*. 83:34-40.

- Hagen, D.R., R.S. Prather, M.M. Sims, and N.L. First. 1991. Development of one-cell porcine embryos to the blastocyst stage in simple media. *J Anim Sci.* 69:1147-50.
- Hahn, T., S. Barth, U. Weiss, W. Mosgoeller, and G. Desoye. 1998. Sustained hyperglycemia in vitro down-regulates the GLUT1 glucose transport system of cultured human term placental trophoblast: a mechanism to protect fetal development? *Faseb J.* 12:1221-31.
- Handyside, A.H., and S. Hunter. 1984. A rapid procedure for visualising the inner cell mass and trophectoderm nuclei of mouse blastocysts in situ using polynucleotide-specific fluorochromes. *J Exp Zool.* 231:429-34.
- Hansen, T.R., K.J. Austin, D.J. Perry, J.K. Pru, M.G. Teixeira, and G.A. Johnson. 1999. Mechanism of action of interferon-tau in the uterus during early pregnancy. *J Reprod Fertil Suppl.* 54:329-39.
- Hardy, K. 1999. Apoptosis in the human embryo. *Rev Reprod.* 4:125-34.
- Harik, S.I., R.N. Kalaria, L. Andersson, P. Lundahl, and G. Perry. 1990. Immunocytochemical localization of the erythroid glucose transporter: abundance in tissues with barrier functions. *J Neurosci.* 10:3862-72.
- Harris, R.C., B.M. Brenner, and J.L. Seifter. 1986. Sodium-hydrogen exchange and glucose transport in renal microvillus membrane vesicles from rats with diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 77:724-33.
- Harrison, S.D., K. Broadie, J. van de Goor, and G.M. Rubin. 1994. Mutations in the Drosophila Rop gene suggest a function in general secretion and synaptic transmission. *Neuron.* 13:555-66.
- Harvey, M.B., and P.L. Kaye. 1988. Insulin stimulates protein synthesis in compacted mouse embryos. *Endocrinology.* 122:1182-4.
- Harvey, M.B., and P.L. Kaye. 1990. Insulin increases the cell number of the inner cell mass and stimulates morphological development of mouse blastocysts in vitro. *Development.* 110:963-7.
- Harvey, M.B., and P.L. Kaye. 1991. Mouse blastocysts respond metabolically to short-term stimulation by insulin and IGF-1 through the insulin receptor. *Mol Reprod Dev.* 29:253-8.
- Hasler, J.F., W.B. Henderson, P.J. Hurtgens, Z.Q. Jin, A.D. McCauley, S.A. Mower, B. Neely, L.S. Shuey, J.E. Stokes, and S.A. Trimmer. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology.* 43:141-152.
- Hauner, H., K. Rohrig, M. Spelleken, L.S. Liu, and J. Eckel. 1998. Development of insulin-responsive glucose uptake and GLUT4 expression in differentiating human adipocyte precursor cells. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 22:448-53.
- Hediger, M.A., M.J. Coady, T.S. Ikeda, and E.M. Wright. 1987. Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co- transporter. *Nature.* 330:379-81.
- Hediger, M.A., and D.B. Rhoads. 1994. Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters. *Physiol Rev.* 74:993-1026.
- Heilig, C., C. Zaloga, M. Lee, X. Zhao, B. Riser, F. Brosius, and P. Cortes. 1995. Immunogold localization of high-affinity glucose transporter isoforms in normal rat kidney. *Lab Invest.* 73:674-84.
- Helliwell, P.A., M. Richardson, J. Affleck, and G.L. Kellett. 2000. Regulation of GLUT5, GLUT2 and intestinal brush-border fructose absorption by the extracellular signal-regulated kinase, p38 mitogen- activated kinase and phosphatidylinositol 3kinase intracellular signalling pathways: implications for adaptation to diabetes. *Biochem J.* 350 Pt 1:163-9.
- Hernandez, R., T. Teruel, and M. Lorenzo. 2001. Akt mediates insulin induction of glucose uptake and up-regulation of GLUT4 gene expression in brown adipocytes. *FEBS Lett.* 494:225-31.
- Herrler, A., C.A. Krusche, and H.M. Beier. 1998. Insulin and insulin-like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. *Biol Reprod.* 59:1302-10.
- Heyner, S., L.V. Rao, L. Jarett, and R.M. Smith. 1989a. Preimplantation mouse embryos internalize maternal insulin via receptor- mediated endocytosis: pattern of uptake and functional correlations. *Dev Biol.* 134:48-58.
- Heyner, S., R.M. Smith, and G.A. Schultz. 1989b. Temporally regulated expression of insulin and insulin-like growth factors and their receptors in early mammalian development. *Bioessays.* 11:171-6.
- Hiraki, Y., O.M. Rosen, and M.J. Birnbaum. 1988. Growth factors rapidly induce expression of the glucose transporter gene. *J Biol Chem.* 263:13655-62.
- Ho, Y., K. Wigglesworth, J.J. Eppig, and R.M. Schultz. 1995. Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: augmentation by amino acids and analysis of gene expression. *Mol Reprod Dev.* 41:232-8.
- Hogan, A., S. Heyner, M.J. Charron, N.G. Copeland, D.J. Gilbert, N.A. Jenkins, B. Thorens, and G.A. Schultz. 1991. Glucose transporter gene expression in early mouse embryos. *Development.* 113:363-72.
- Hundal, H.S., F. Darakhshan, S. Kristiansen, S.J. Blakemore, and E.A. Richter. 1998. GLUT5 expression and fructose transport in human skeletal muscle. *Adv Exp Med Biol.* 441:35-45.

- Hyttel, P., J. Laurincik, D. Viuff, T. Fair, V. Zakhartchenko, C. Rosenkranz, B. Avery, D. Rath, H. Niemann, P.D. Thomsen, K. Schellander, H. Callesen, E. Wolf, R.L. Ochs, and T. Greve. 2000. Activation of ribosomal RNA genes in preimplantation cattle and swine embryos. *Anim Reprod Sci.* 60-61:49-60.
- Ibberson, M., M. Uldry, and B. Thorens. 2000. GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *J Biol Chem.* 275:4607-12.
- Inoki, K., M. Haneda, S. Maeda, D. Koya, and R. Kikkawa. 1999. TGF-beta 1 stimulates glucose uptake by enhancing GLUT1 expression in mesangial cells. *Kidney Int.* 55:1704-12.
- Inukai, K., T. Asano, H. Katagiri, H. Ishihara, M. Anai, Y. Fukushima, K. Tsukuda, M. Kikuchi, Y. Yazaki, and Y. Oka. 1993. Cloning and increased expression with fructose feeding of rat jejunal GLUT5. *Endocrinology.* 133:2009-14.
- Ish-Shalom, D., C.T. Christoffersen, P. Vorwerk, N. Sacerdoti-Sierra, R.M. Shymko, D. Naor, and P. De Meyts. 1997. Mitogenic properties of insulin and insulin analogues mediated by the insulin receptor. *Diabetologia.* 40 Suppl 2:S25-31.
- Iwata, H., S. Akamatsu, N. Minami, and M. Yamada. 1998. Effects of antioxidants on the development of bovine IVM/IVF embryos in various concentrations of glucose. *Theriogenology.* 50:365-375.
- Jacobsen, H., M. Schmidt, P. Hom, P.T. Sangild, T. Greve, and H. Callesen. 2000. Ease of calving, blood chemistry, insulin and bovine growth hormone of newborn calves derived from embryos produced in vitro in culture systems with serum and co-culture or with PVA. *Theriogenology.* 54:147-58.
- James, D.E., R. Brown, J. Navarro, and P.F. Pilch. 1988. Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein. *Nature.* 333:183-5.
- James, D.E., and P.F. Pilch. 1988. Fractionation of endocytic vesicles and glucose-transporter-containing vesicles in rat adipocytes. *Biochem J.* 256:725-32.
- James, D.E., M. Strube, and M. Mueckler. 1989. Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature.* 338:83-7.
- Jantsch-Plunger, V., and M. Glotzer. 1999. Depletion of syntaxins in the early *Caenorhabditis elegans* embryo reveals a role for membrane fusion events in cytokinesis. *Curr Biol.* 9:738-45.
- Javed, M.H., and R.W. Wright. 1991. Determination of pentose phosphate and Embden-Meyerhof pathway activities in bovine embryos. *Theriogenology.* 335:1029-1037.
- Johnstone, R.M., A. Mathew, M.S. Setchenska, M. Grdisa, and M.K. White. 1998. Loss of glucose transport in developing avian red cells. *Eur J Cell Biol.* 75:66-77.
- Jung, E.K., J.J. Chin, and C.Y. Jung. 1986. Structural basis of human erythrocyte glucose transporter function in reconstituted system. Hydrogen exchange. *J Biol Chem.* 261:9155-60.
- Kadowaki, T. 2000. Insights into insulin resistance and type 2 diabetes from knockout mouse models. *J Clin Invest.* 106:459-65.
- Kaestner, K.H., R.J. Christy, J.C. McLenithan, L.T. Braiterman, P. Cornelius, P.H. Pekala, and M.D. Lane. 1989. Sequence, tissue distribution, and differential expression of mRNA for a putative insulin-responsive glucose transporter in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:3150-4.
- Kainulainen, H., T. Jarvinen, and P.K. Heinonen. 1997. Placental glucose transporters in fetal intrauterine growth retardation and macrosomia. *Gynecol Obstet Invest.* 44:89-92.
- Kasahara, M., and P.C. Hinkle. 1977. Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes. *J Biol Chem.* 252:7384-90.
- Katz, E.B., A.E. Stenbit, K. Hatton, R. DePinho, and M.J. Charron. 1995. Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4. *Nature.* 377:151-5.
- Kayano, T., C.F. Burant, H. Fukumoto, G.W. Gould, Y.S. Fan, R.L. Eddy, M.G. Byers, T.B. Shows, S. Seino, and G.I. Bell. 1990. Human facilitative glucose transporters. Isolation, functional characterization, and gene localization of cDNAs encoding an isoform (GLUT5) expressed in small intestine, kidney, muscle, and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT6). *J Biol Chem.* 265:13276-82.
- Kayano, T., H. Fukumoto, R.L. Eddy, Y.S. Fan, M.G. Byers, T.B. Shows, and G.I. Bell. 1988. Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. Sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues. *J Biol Chem.* 263:15245-8.
- Kaye, P.L., and H.G. Gardner. 1999. Preimplantation access to maternal insulin and albumin increases fetal growth rate in mice. *Hum Reprod.* 14:3052-9.
- Kessler, A., E. Tomas, D. Immler, H.E. Meyer, A. Zorzano, and J. Eckel. 2000. Rab11 is associated with GLUT4-containing vesicles and redistributes in response to insulin. *Diabetologia.* 43:1518-27.
- Khurana, N.K., and H. Niemann. 2000. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biol Reprod.* 62:847-56.

- Kim, J.H., K. Niwa, J.M. Lim, and K. Okuda. 1993. Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids on development of in vitro-matured, in vitro-fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. *Biol Reprod.* 48:1320-5.
- Kirchhof, N., J.W. Carnwath, E. Lemme, K. Anastassiadis, H. Scholer, and H. Niemann. 2000. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biol Reprod.* 63:1698-705.
- Kliem, A., F. Tetens, T. Klonisch, M. Grealy, and B. Fischer. 1998. Epidermal growth factor receptor and ligands in elongating bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev.* 51:402-12.
- Koerber, S., A.N. Santos, F. Tetens, A. Kuchenhoff, and B. Fischer. 1998. Increased expression of NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2 (ND2) in preimplantation rabbit embryos cultured with 20% oxygen concentration. *Mol Reprod Dev.* 49:394-9.
- Kozlovsky, N., A. Rudich, R. Potashnik, and N. Bashan. 1997a. Reactive oxygen species activate glucose transport in L6 myotubes. *Free Radic Biol Med.* 23:859-69.
- Kozlovsky, N., A. Rudich, R. Potashnik, Y. Ebina, T. Murakami, and N. Bashan. 1997b. Transcriptional activation of the Glut1 gene in response to oxidative stress in L6 myotubes. *J Biol Chem.* 272:33367-72.
- Kruip, T.A.M., and J.H.G. denDaas. 1997. In vitro produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology.* 47:43-52.
- Kupriyanova, T.A., and K.V. Kandror. 2000. Cellugyrin is a marker for a distinct population of intracellular Glut4- containing vesicles. *J Biol Chem.* 275:36263-8.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.
- Lane, M., and D.K. Gardner. 1995. Removal of embryo-toxic ammonium from the culture medium by in situ enzymatic conversion to glutamate. *J Exp Zool.* 271:356-63.
- Lee, D.H., M.Y. Chung, J.U. Lee, D.G. Kang, and Y.W. Paek. 2000. Changes of glucose transporters in the cerebral adaptation to hypoglycemia. *Diabetes Res Clin Pract.* 47:15-23.
- Lefebvre, V., M.C. Mechin, M.P. Louckx, M.H. Rider, and L. Hue. 1996. Signaling pathway involved in the activation of heart 6-phosphofructo-2- kinase by insulin. *J Biol Chem.* 271:22289-92.
- Leibfried, L., and N.L. First. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci.* 48:76-86.
- Leibfried, M.L., and B.D. Bavister. 1982. Effects of epinephrine and hypotaurine on in-vitro fertilization in the golden hamster. *J Reprod Fertil.* 66:87-93.
- Leibo, S.P., and N.M. Loskutoff. 1993. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology.* 43:81-97.
- Lengwinat, T., S. Blottner, A. Wersuhn, and C. Pitra. 1990. A comparison of the pregnancy rate, using fresh or frozen bull semen, after in vitro maturation and fertilization of non ovulated cattle oocytes. *Monatshefte für Veterinärmedizin.* 45:345-347.
- Lequarre, A.S., J.M. Feugang, O. Malhomme, I. Donnay, A. Massip, F. Dessy, and A. Van Langendonck. 2001. Expression of Cu/Zn and Mn superoxide dismutases during bovine embryo development: influence of in vitro culture. *Mol Reprod Dev.* 58:45-53.
- Lequarre, A.S., B. Grisart, B. Moreau, N. Schuurbijs, A. Massip, and F. Dessy. 1997. Glucose metabolism during bovine preimplantation development: analysis of gene expression in single oocytes and embryos. *Mol Reprod Dev.* 48:216-26.
- Lewis, A.M., P.L. Kaye, R. Lising, and R.D. Cameron. 1992. Stimulation of protein synthesis and expansion of pig blastocysts by insulin in vitro. *Reprod Fertil Dev.* 4:119-23.
- Lin, J.T., K.D. Hahn, and R. Kinne. 1982. Synthesis of phlorizin derivatives and their inhibitory effect on the renal sodium/D-glucose cotransport system. *Biochim Biophys Acta.* 693:379-88.
- Lin, Z., J.M. Weinberg, R. Malhotra, S.E. Merritt, L.B. Holzman, and F.C. Brosius, 3rd. 2000. GLUT-1 reduces hypoxia-induced apoptosis and JNK pathway activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 278:E958-66.
- Liong, E., S.K. Kong, K.K. Au, J.Y. Li, G.Y. Xu, Y.L. Lee, T.T. Kwok, Y.M. Choy, C.Y. Lee, and K.P. Fung. 1999. Inhibition of glucose uptake and suppression of glucose transporter 1 mRNA expression in L929 cells by tumour necrosis factor-alpha. *Life Sci.* 65:L215-20.
- Loike, J.D., S. Hickman, K. Kuang, M. Xu, L. Cao, J.C. Vera, S.C. Silverstein, and J. Fischbarg. 1996. Sodium-glucose cotransporters display sodium- and phlorizin-dependent water permeability. *Am J Physiol.* 271:C1774-9.
- Loo, D.D., B.A. Hirayama, A.K. Meinild, G. Chandy, T. Zeuthen, and E.M. Wright. 1999. Passive water and ion transport by cotransporters. *J Physiol.* 518:195-202.
- Loo, D.D., T. Zeuthen, G. Chandy, and E.M. Wright. 1996. Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:13367-70.
- Ludwig, T.E., M. Lane, and B.D. Bavister. 2001. Differential effect of hexoses on hamster embryo development in culture. *Biol Reprod.* 64:1366-74.

- Mahadevan, M.M., M.M. Miller, M.O. Maris, and D. Moutos. 1998. Assisted hatching of embryos by micromanipulation for human in vitro fertilization: UAMS experience. *J Ark Med Soc.* 94:529-31.
- Maher, F., S. Clark, and L.C. Harrison. 1989. Chronic stimulation of glucose transporter gene expression in L6 myocytes mediated via the insulin-like growth factor-1 receptor. *Mol Endocrinol.* 3:2128-35.
- Mahraoui, L., J. Takeda, J. Mesonero, I. Chantret, E. Dussaulx, G.I. Bell, and E. Brot-Laroche. 1994. Regulation of expression of the human fructose transporter (GLUT5) by cyclic AMP. *Biochem J.* 301:169-75.
- Malathi, P., H. Preiser, P. Fairclough, P. Mallett, and R.K. Crane. 1979. A rapid method for the isolation of kidney brush border membranes. *Biochim Biophys Acta.* 554:259-63.
- Malide, D., T.M. Davies-Hill, M. Levine, and I.A. Simpson. 1998. Distinct localization of GLUT-1, -3, and -5 in human monocyte-derived macrophages: effects of cell activation. *Am J Physiol.* 274:E516-26.
- Mansour, R.T., C.A. Rhodes, M.A. Aboulghar, G.I. Serour, and A. Kamal. 2000. Transfer of zona-free embryos improves outcome in poor prognosis patients: a prospective randomized controlled study. *Hum Reprod.* 15:1061-4.
- Marger, M.D., and M.H. Saier, Jr. 1993. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci.* 18:13-20.
- Martin, K.L., and H.J. Leese. 1995. Role of glucose in mouse preimplantation embryo development. *Mol Reprod Dev.* 40:436-43.
- Matsui, M., Y. Takahashi, M. Hishinuma, and H. Kanagawa. 1995. Stimulatory effects of insulin on the development of bovine embryos fertilized in vitro. *J Vet Med Sci.* 57:331-6.
- McGinnis, L.K., and C.R. Youngs. 1992. In vitro development of ovine embryos in CZB medium. *Theriogenology.* 37:559-569.
- McVie-Wylie, A.J., D.R. Lamson, and Y.T. Chen. 2001. Molecular cloning of a novel member of the glut family of transporters, slc2a10 (glut10), localized on chromosome 20q13.1: a candidate gene for niddm susceptibility. *Genomics.* 72:113-7.
- Meinild, A.K., D.D. Loo, A.M. Pajor, T. Zeuthen, and E.M. Wright. 2000. Water transport by the renal Na(+)-dicarboxylate cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol.* 278:F777-83.
- Memili, E., and N.L. First. 2000. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote.* 8:87-96.
- Menezo, Y., J.P. Renard, B. Delobel, and J.F. Pageaux. 1982. Kinetic study of fatty acid composition of day 7 to day 14 cow embryos. *Biol Reprod.* 26:787-90.
- Mihalik, J., P. Rehak, and J. Koppel. 2000. The influence of insulin on the in vitro development of mouse and bovine embryos. *Physiol Res.* 49:347-54.
- Millar, C.A., A. Shewan, G.R. Hickson, D.E. James, and G.W. Gould. 1999. Differential regulation of secretory compartments containing the insulin-responsive glucose transporter 4 in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Biol Cell.* 10:3675-88.
- Mills, J.L., J.L. Simpson, S.G. Driscoll, L. Jovanovic-Peterson, M. Van Allen, J.H. Aarons, B. Metzger, F.R. Bieber, R.H. Knopp, L.B. Holmes, and et al. 1988. Incidence of spontaneous abortion among normal women and insulin- dependent diabetic women whose pregnancies were identified within 21 days of conception. *N Engl J Med.* 319:1617-23.
- Miyamoto, K., K. Hase, Y. Taketani, H. Minami, T. Oka, Y. Nakabou, and H. Hagihira. 1991. Diabetes and glucose transporter gene expression in rat small intestine. *Biochem Biophys Res Commun.* 181:1110-7.
- Miyamoto, K., S. Tatsumi, A. Morimoto, H. Minami, H. Yamamoto, K. Sone, Y. Taketani, Y. Nakabou, T. Oka, and E. Takeda. 1994. Characterization of the rabbit intestinal fructose transporter (GLUT5). *Biochem J.* 303:877-83.
- Moley, K.H., M.M. Chi, C.M. Knudson, S.J. Korsmeyer, and M.M. Mueckler. 1998a. Hyperglycemia induces apoptosis in pre-implantation embryos through cell death effector pathways. *Nat Med.* 4:1421-4.
- Moley, K.H., M.M. Chi, and M.M. Mueckler. 1998b. Maternal hyperglycemia alters glucose transport and utilization in mouse preimplantation embryos. *Am J Physiol.* 275:E38-47.
- Moley, K.H., and M.M. Mueckler. 2000. Glucose transport and apoptosis. *Apoptosis.* 5:99-105.
- Moohan, J.M., and K.S. Lindsay. 1995. Spermatozoa selected by a discontinuous Percoll density gradient exhibit better motion characteristics, more hyperactivation, and longer survival than direct swim-up. *Fertil Steril.* 64:160-5.
- Morita, Y., O. Tsutsumi, Y. Oka, and Y. Taketani. 1994. Glucose transporter GLUT1 mRNA expression in the ontogeny of glucose incorporation in mouse preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun.* 199:1525-31.

- Morris, D.G., M.G. Diskin, and J.M. Sreenan. 2000. Protein synthesis and phosphorylation by elongating 13-15-day-old cattle blastocysts. *Reprod Fertil Dev.* 12:39-44.
- Mortimer, D. 1994. Sperm recovery techniques to maximize fertilizing capacity. *Reprod Fertil Dev.* 6:25-31.
- Mueckler, M., C. Caruso, S.A. Baldwin, M. Panico, I. Blench, H.R. Morris, W.J. Allard, G.E. Lienhard, and H.F. Lodish. 1985. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science.* 229:941-5.
- Musholt, T.J., P.B. Musholt, F. Dehdashti, and J.F. Moley. 1997. Evaluation of fluorodeoxyglucose-positron emission tomographic scanning and its association with glucose transporter expression in medullary thyroid carcinoma and pheochromocytoma: a clinical and molecular study. *Surgery.* 122:1049-60; discussion 1060-1.
- Nagamatsu, S., J.M. Kornhauser, C.F. Burant, S. Seino, K.E. Mayo, and G.I. Bell. 1992. Glucose transporter expression in brain. cDNA sequence of mouse GLUT3, the brain facilitative glucose transporter isoform, and identification of sites of expression by in situ hybridization. *J Biol Chem.* 267:467-72.
- Nagamatsu, S., H. Sawa, K. Kamada, Y. Nakamichi, K. Yoshimoto, and T. Hoshino. 1993. Neuron-specific glucose transporter (NSGT): CNS distribution of GLUT3 rat glucose transporter (RGT3) in rat central neurons. *FEBS Lett.* 334:289-95.
- Navarrete Santos, A., R. Augustin, G. Lazzari, C. Galli, J.M. Sreenan, and B. Fischer. 2000a. The insulin-dependent glucose transporter isoform 4 is expressed in bovine blastocysts. *Biochem Biophys Res Commun.* 271:753-60.
- Navarrete Santos, A., S. Korber, G. Kullertz, G. Fischer, and B. Fischer. 2000b. Oxygen stress increases prolyl cis/trans isomerase activity and expression of cyclophilin 18 in rabbit blastocysts. *Biol Reprod.* 62:1-7.
- Navarrete Santos, A., A.M. Wobus, R. Augustin, and B. Fischer. 2000c. The insulin-dependent glucose transporter 4 shows a nuclear localisation in mouse embryonic stem cell-derived embryoid bodies. *J Reprod Fertil.* Abstract Series 26:10.
- Niemann, H. 1995. Advances in cryopreservation of bovine oocytes and embryos derived in vitro and in vitro. In *Reprod and Anim Breed: Advances and strategies.* G. Enne, G.F. Greppi, and A. Lauria, editors. Elsevier Biofutur. 117-128.
- Niemann, H., and C. Wrenzycki. 2000. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology.* 53:21-34.
- Niwa, H., J. Miyazaki, and A.G. Smith. 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet.* 24:372-6.
- North, P.E., M. Waner, A. Mizeracki, and M.C. Mihm, Jr. 2000. GLUT1: a newly discovered immunohistochemical marker for juvenile hemangiomas. *Hum Pathol.* 31:11-22.
- Nugent, C., J.B. Prins, J.P. Whitehead, J.M. Wentworth, V.K. Chatterjee, and S. O'Rahilly. 2001. Arachidonic Acid Stimulates Glucose Uptake in 3T3-L1 Adipocytes by Increasing GLUT1 and GLUT4 Levels at the Plasma Membrane. EVIDENCE FOR INVOLVEMENT OF LIPOXYGENASE METABOLITES AND PEROXISOME PROLIFERATOR- ACTIVATED RECEPTOR gamma. *J Biol Chem.* 276:9149-57.
- Olson, A.L., A.R. Trumbly, and G.V. Gibson. 2001. Insulin-mediated glut4 translocation is dependent on the microtubule network. *J Biol Chem.* 276:10706-14.
- O'Neill, C. 1997. Evidence for the requirement of autocrine growth factors for development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Biol Reprod.* 56:229-37.
- Onetti, R., J. Baulida, and A. Bassols. 1997. Increased glucose transport in ras-transformed fibroblasts: a possible role for N-glycosylation of GLUT1. *FEBS Lett.* 407:267-70.
- Osthus, R.C., H. Shim, S. Kim, Q. Li, R. Reddy, M. Mukherjee, Y. Xu, D. Wonsey, L.A. Lee, and C.V. Dang. 2000. Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem.* 275:21797-800.
- Palacios, S., V.V. Lalioti, S. Martinez-Arca, S. Chattopadhyay, and I.I. Sandoval. 2000. Recycling of the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4: Access of surface internalized GLUT4 molecules to the perinuclear storage compartment is mediated by the Phe5GlnGlnIle8 motif. *J Biol Chem.* 275:12121-12127.
- Pantaleon, M., M.B. Harvey, W.S. Pascoe, D.E. James, and P.L. Kaye. 1997. Glucose transporter GLUT3: ontogeny, targeting, and role in the mouse blastocyst. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3795-800.
- Pantaleon, M., and P.L. Kaye. 1996. IGF-I and insulin regulate glucose transport in mouse blastocysts via IGF-I receptor. *Mol Reprod Dev.* 44:71-6.
- Pantaleon, M., and P.L. Kaye. 1998. Glucose transporters in preimplantation development. *Rev Reprod.* 3:77-81.

- Pantaleon, M., J.P. Ryan, M. Gil, and P.L. Kaye. 2001. An unusual subcellular localization of glut1 and link with metabolism in oocytes and preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod.* 64:1247-54.
- Parrish, J.J., J.L. Parrish, and N.L. First. 1984. Effect of swim-up separation and heparin in bovine sperm capacitation. *Biol Reprod.* 30, Suppl.1:211.
- Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish, and N.L. First. 1985. In vitro fertilization of bovine oocytes using heparin treated and swim-up separated frozen-thawed bovine semen is repeatable and results in high frequencies of fertilization. *Theriogenology.* 23:216.
- Patki, V., J. Buxton, A. Chawla, L. Lifshitz, K. Fogarty, W. Carrington, R. Tuft, and S. Corvera. 2001. Insulin action on GLUT4 traffic visualized in single 3T3-L1 adipocytes by using ultra-fast microscopy. *Mol Biol Cell.* 12:129-41.
- Pavlok, A., A. Lucas-Hahn, and H. Niemann. 1992. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol Reprod Dev.* 31:63-7.
- Pederson, T., and C.M. Rondinone. 2000. Regulation of proteins involved in insulin signaling pathways in differentiating human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 276:162-8.
- Pessin, J.E., D.C. Thurmond, J.S. Elmendorf, K.J. Coker, and S. Okada. 1999. Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! Location! Location! *J Biol Chem.* 274:2593-6.
- Phay, J.E., H.B. Hussain, and J.F. Moley. 2000a. Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family, SLC2A9 (GLUT9). *Genomics.* 66:217-20.
- Phay, J.E., H.B. Hussain, and J.F. Moley. 2000b. Strategy for identification of novel glucose transporter family members by using internet-based genomic databases. *Surgery.* 128:946-51.
- Postic, C., A. Leturque, F. Rencurel, R.L. Printz, C. Forest, D.K. Granner, and J. Girard. 1993. The effects of hyperinsulinemia and hyperglycemia on GLUT4 and hexokinase II mRNA and protein in rat skeletal muscle and adipose tissue. *Diabetes.* 42:922-9.
- Quintanilla, R.A., O.H. Porras, J. Castro, and L.F. Barros. 2000. Cytosolic [Ca(2+)] modulates basal GLUT1 activity and plays a permissive role in its activation by metabolic stress and insulin in rat epithelial cells. *Cell Calcium.* 28:97-106.
- Rajakumar, R.A., S. Thamocharan, R.K. Menon, and S.U. Devaskar. 1998. Sp1 and Sp3 regulate transcriptional activity of the facilitative glucose transporter isoform-3 gene in mammalian neuroblasts and trophoblasts. *J Biol Chem.* 273:27474-83.
- Rand, E.B., A.M. Depaoli, N.O. Davidson, G.I. Bell, and C.F. Burant. 1993. Sequence, tissue distribution, and functional characterization of the rat fructose transporter GLUT5. *Am J Physiol.* 264:G1169-76.
- Rao, L.V., M.L. Wikarczuk, and S. Heyner. 1990. Functional roles of insulin and insulinlike growth factors in preimplantation mouse embryo development. *In Vitro Cell Dev Biol.* 26:1043-8.
- Rassoulzadegan, M., B.S. Rosen, I. Gillot, and F. Cuzin. 2000. Phagocytosis reveals a reversible differentiated state early in the development of the mouse embryo. *Embo J.* 19:3295-303.
- Rath, D. 1993. Current status of ultrasound-guided retrieval of bovine oocytes. *Embryo Transfer Newsletter.* 11:10-15.
- Rea, S., and D.E. James. 1997. Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. *Diabetes.* 46:1667-77.
- Reagan, L.P., A.M. Magarinos, L.R. Lucas, A. van Bueren, A.L. McCall, and B.S. McEwen. 1999. Regulation of GLUT-3 glucose transporter in the hippocampus of diabetic rats subjected to stress. *Am J Physiol.* 276:E879-86.
- Reagan, L.P., N. Gorovits, E.K. Hoskin, S.E. Alves, E.B. Katz, C.A. Grillo, G.G. Piroli, B.S. McEwen, and M.J. Charron. 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.
- Reichenbach, H.D., J. Liebrich, U. Berg, and G. Brem. 1992. Pregnancy rates and births after unilateral or bilateral transfer of bovine embryos produced in vitro. *J Reprod Fertil.* 95:363-70.
- Renard, J.P., A. Philippon, and Y. Menezo. 1980. In-vitro uptake of glucose by bovine blastocysts. *J Reprod Fertil.* 58:161-4.
- Rieger, D., N.M. Loskutoff, and K.J. Betteridge. 1992a. Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured in vitro. *J Reprod Fertil.* 95:585-95.
- Rieger, D., N.M. Loskutoff, and K.J. Betteridge. 1992b. Developmentally related changes in the uptake and metabolism of glucose, glutamine and pyruvate by cattle embryos produced in vitro. *Reprod Fertil Dev.* 4:547-57.
- Roberts, R.M., L. Liu, Q. Guo, D. Leaman, and J. Bixby. 1998. The evolution of the type I interferons. *J Interferon Cytokine Res.* 18:805-16.
- Robinson, D.H., P.R. Smith, and D.J. Benos. 1990. Hexose transport in preimplantation rabbit blastocysts. *J Reprod Fertil.* 89:1-11.

- Rodnick, K.J., R.C. Piper, J.W. Slot, and D.E. James. 1992. Interaction of insulin and exercise on glucose transport in muscle. *Diabetes Care*. 15:1679-89.
- Rollins, B.J., E.D. Morrison, P. Usher, and J.S. Flier. 1988. Platelet-derived growth factor regulates glucose transporter expression. *J Biol Chem*. 263:16523-6.
- Royer, C., J Lachuer, G. Crouzoulon, J. Roux, J. Peyronnet, J. Mamet, J. Pequignot, and Y. Dalmaz. 2000. Effects of gestational hypoxia on mRNA levels of Glut3 and Glut4 transporters, hypoxia inducible factor-1 and thyroid hormone receptors in developing rat brain. *Brain Res*. 856:119-28.
- Rüsse, I., and F. Sinowatz. 1991. Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. Paul Parey, Berlin. 478 s. pp.
- Ryder, J.W., L. Gilbert, and J.R. Zierath. 2001. Skeletal muscle and insulin sensitivity: pathophysiological alterations. *Front Biosci*. 6:D154-63.
- Sacktor, B. 1989. Sodium-coupled hexose transport. *Kidney Int*. 36:342-50.
- Saeki, K., Y. Nagao, M. Hoshi, and H. Kainuma. 1993. In vitro fertilization of bovine oocytes in a protein-free medium and subsequent development to the blastocyst stage. *Theriogenology*. 39:302.
- Sagle, M., K. Bishop, N. Ridley, F.M. Alexander, M. Michel, R.C. Bonney, R.W. Beard, and S. Franks. 1988. Recurrent early miscarriage and polycystic ovaries. *Bmj*. 297:1027-8.
- Saijoh, Y., H. Fujii, C. Meno, M. Sato, Y. Hirota, S. Nagamatsu, M. Ikeda, and H. Hamada. 1996. Identification of putative downstream genes of Oct-3, a pluripotent cell-specific transcription factor. *Genes Cells*. 1:239-52.
- Sakkas, D., F. Urner, Y. Menezo, and G. Leppens. 1993. Effects of glucose and fructose on fertilization, cleavage, and viability of mouse embryos in vitro. *Biol Reprod*. 49:1288-92.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74:5463-7.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1992. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology*. 24:104-8.
- Sapienza, F., G. Verheyen, H. Tournaye, R. Janssens, I. Pletincx, M. Derde, and A. Van Steirteghem. 1993. An auto-controlled study in in-vitro fertilization reveals the benefit of Percoll centrifugation to swim-up in the preparation of poor-quality semen. *Hum Reprod*. 8:1856-62.
- Schultz, G.A., A. Hogan, A.J. Watson, R.M. Smith, and S. Heyner. 1992. Insulin, insulin-like growth factors and glucose transporters: temporal patterns of gene expression in early murine and bovine embryos. *Reprod Fertil Dev*. 4:361-71.
- Sciullo, E., G. Cardellini, M.G. Baroni, P. Torresi, A. Buongiorno, P. Pozzilli, and F. Fallucca. 1997. Glucose transporter (Glut1, Glut3) mRNA in human placenta of diabetic and non-diabetic pregnancies. *Early Pregnancy*. 3:172-82.
- Seatter, M.J., S.A. De la Rue, L.M. Porter, and G.W. Gould. 1998. QLS motif in transmembrane helix VII of the glucose transporter family interacts with the C-1 position of D-glucose and is involved in substrate selection at the exofacial binding site. *Biochemistry*. 37:1322-6.
- Shepherd, P.R., E.M. Gibbs, C. Wesslau, G.W. Gould, and B.B. Kahn. 1992. Human small intestine facilitative fructose/glucose transporter (GLUT5) is also present in insulin-responsive tissues and brain. Investigation of biochemical characteristics and translocation. *Diabetes*. 41:1360-5.
- Shymko, R.M., E. Dumont, P. De Meyts, and J.E. Dumont. 1999. Timing-dependence of insulin-receptor mitogenic versus metabolic signalling: a plausible model based on coincidence of hormone and effector binding. *Biochem J*. 339:675-83.
- Simpson, F., J.P. Whitehead, and D.E. James. 2001. GLUT4--at the cross roads between membrane trafficking and signal transduction. *Traffic*. 2:2-11.
- Sirard, M.A., and N.L. First. 1988. In vitro inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biol Reprod*. 39:229-34.
- Sirard, M.A., and R.D. Lambert. 1985. In vitro fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. *Biol Reprod*. 33:487-94.
- Slot, J.W., G. Garruti, S. Martin, V. Oorschot, G. Posthuma, E.W. Kraegen, R. Laybutt, G. Thibault, and D.E. James. 1997. Glucose transporter (GLUT-4) is targeted to secretory granules in rat atrial cardiomyocytes. *J Cell Biol*. 137:1243-54.
- Smith, T.A. 1998. FDG uptake, tumour characteristics and response to therapy: a review. *Nucl Med Commun*. 19:97-105.
- Smith, T.A. 1999. Facilitative glucose transporter expression in human cancer tissue. *Br J Biomed Sci*. 56:285-92.
- Smith, U., E. Carvalho, E. Mosialou, F. Beguinot, P. Formisano, and C. Rondinone. 2000. PKB inhibition prevents the stimulatory effect of insulin on glucose transport and protein translocation but not the antilipolytic effect in rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 268:315-20.

- Sonnichsen, B., S. De Renzis, E. Nielsen, J. Rietdorf, and M. Zerial. 2000. Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol.* 149:901-14.
- Spanos, S., D.L. Becker, R.M. Winston, and K. Hardy. 2000. Anti-apoptotic action of insulin-like growth factor-I during human preimplantation embryo development. *Biol Reprod.* 63:1413-20.
- Spolarics, Z., P.H. Pekala, G.J. Bagby, and J.J. Spitzer. 1993. Brief endotoxemia markedly increases expression of GLUT1 glucose transporter in Kupffer, hepatic endothelial and parenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 193:1211-5.
- Stenbit, A.E., R. Burcelin, E.B. Katz, T.S. Tsao, N. Gautier, M.J. Charron, and Y. Le Marchand-Brustel. 1996. Diverse effects of Glut 4 ablation on glucose uptake and glycogen synthesis in red and white skeletal muscle. *J Clin Invest.* 98:629-34.
- Stenbit, A.E., T.S. Tsao, J. Li, R. Burcelin, D.L. Geenen, S.M. Factor, K. Houseknecht, E.B. Katz, and M.J. Charron. 1997. GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. *Nat Med.* 3:1096-101.
- Stojanov, T., S. Alechna, and C. O'Neill. 1999. In-vitro fertilization and culture of mouse embryos in vitro significantly retards the onset of insulin-like growth factor-II expression from the zygotic genome. *Mol Hum Reprod.* 5:116-24.
- Stojkovic, M., M. Buttner, V. Zakhartchenko, G. Brem, and E. Wolf. 1998. A reliable procedure for differential staining of in vitro produced bovine blastocysts: comparison of tissue culture medium 199 and Menezo's B2 medium. *Anim Reprod Sci.* 50:1-9.
- Sutherland, H.W., and C.W. Pritchard. 1987. Increased incidence of spontaneous abortion in pregnancies complicated by maternal diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol.* 156:135-8.
- Suzuki, K., and T. Kono. 1980. Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77:2542-5.
- Sweeney, G., and A. Klip. 1998. Regulation of the Na⁺/K⁺-ATPase by insulin: why and how? *Mol Cell Biochem.* 182:121-33.
- Taha, C., and A. Klip. 1999. The insulin signaling pathway. *J Membr Biol.* 169:1-12.
- Taha, C., Z. Liu, J. Jin, H. Al-Hasani, N. Sonenberg, and A. Klip. 1999. Opposite translational control of GLUT1 and GLUT4 glucose transporter mRNAs in response to insulin. Role of mammalian target of rapamycin, protein kinase b, and phosphatidylinositol 3-kinase in GLUT1 mRNA translation. *J Biol Chem.* 274:33085-91.
- Taha, C., Y. Mitumoto, Z. Liu, E.Y. Skolnik, and A. Klip. 1995. The insulin-dependent biosynthesis of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in L6 muscle cells is mediated by distinct pathways. Roles of p21ras and pp70 S6 kinase. *J Biol Chem.* 270:24678-81.
- Taha, C., T. Tsakiridis, A. McCall, and A. Klip. 1997. Glucose transporter expression in L6 muscle cells: regulation through insulin- and stress-activated pathways. *Am J Physiol.* 273:E68-76.
- Takata, K., T. Kasahara, M. Kasahara, O. Ezaki, and H. Hirano. 1992. Localization of erythrocyte/HepG2-type glucose transporter (GLUT1) in human placental villi. *Cell Tissue Res.* 267:407-12.
- Takata, K., T. Kasahara, M. Kasahara, O. Ezaki, and H. Hirano. 1994. Immunolocalization of glucose transporter GLUT1 in the rat placental barrier: possible role of GLUT1 and the gap junction in the transport of glucose across the placental barrier. *Cell Tissue Res.* 276:411-8.
- Takeda, J., T. Kayano, H. Fukumoto, and G.I. Bell. 1993. Organization of the human GLUT2 (pancreatic beta-cell and hepatocyte) glucose transporter gene. *Diabetes.* 42:773-7.
- Telford, N.A., A.J. Watson, and G.A. Schultz. 1990. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev.* 26:90-100.
- Tetens, F., A. Kliem, G. Tscheudschilsuren, A. Navarrete Santos, and B. Fischer. 2000. Expression of proto-oncogenes in bovine preimplantation blastocysts. *Anat Embryol (Berl).* 201:349-55.
- Thompson, J.G., R.J. Partridge, F.D. Houghton, C.I. Cox, and H.J. Leese. 1996. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *J Reprod Fertil.* 106:299-306.
- Thorens, B., M.T. Guillam, F. Beermann, R. Burcelin, and M. Jaquet. 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.
- Thorens, B., H.K. Sarkar, H.R. Kaback, and H.F. Lodish. 1988. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. *Cell.* 55:281-90.
- Tordjman, K.M., K.A. Leingang, D.E. James, and M.M. Mueckler. 1989. Differential regulation of two distinct glucose transporter species expressed in 3T3-L1 adipocytes: effect of chronic insulin and tolbutamide treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:7761-5.
- Toyoda, N., J.E. Flanagan, and T. Kono. 1987. Reassessment of insulin effects on the V_{max} and K_m values of hexose transport in isolated rat epididymal adipocytes. *J Biol Chem.* 262:2737-45.

- Tsao, T.S., J. Li, K.S. Chang, A.E. Stenbit, D. Galuska, J.E. Anderson, J.R. Zierath, R.J. McCarter, and M.J. Charron. 2001. Metabolic adaptations in skeletal muscle overexpressing GLUT4: effects on muscle and physical activity. *Faseb J.* 15:958-969.
- Tsujihara, K., M. Hongu, K. Saito, H. Kawanishi, K. Kuriyama, M. Matsumoto, A. Oku, K. Ueta, M. Tsuda, and A. Saito. 1999. Na(+)-glucose cotransporter (SGLT) inhibitors as antidiabetic agents. 4. Synthesis and pharmacological properties of 4'-dehydroxyphlorizin derivatives substituted on the B ring. *J Med Chem.* 42:5311-24.
- Tulppala, M., U.H. Stenman, B. Cacciato, and O. Ylikorkala. 1993. Polycystic ovaries and levels of gonadotrophins and androgens in recurrent miscarriage: prospective study in 50 women. *Br J Obstet Gynaecol.* 100:348-52.
- Turk, E., and E.M. Wright. 1997. Membrane topology motifs in the SGLT cotransporter family. *J Membr Biol.* 159:1-20.
- Turk, E., B. Zabel, S. Mundlos, J. Dyer, and E.M. Wright. 1991. Glucose/galactose malabsorption caused by a defect in the Na+/glucose cotransporter. *Nature.* 350:354-6.
- Van der Zwalm, P., G. Bertin-Segal, L. Geerts, C. Debauche, and R. Schoysman. 1991. Sperm morphology and IVF pregnancy rate: comparison between Percoll gradient centrifugation and swim-up procedures. *Hum Reprod.* 6:581-8.
- Voet, D., and J.G. Voet. 1995. Biochemistry. Wiley, New York. XVII, 1361 s. pp.
- Waddell, I.D., A.G. Zomerschoe, M.W. Voice, and A. Burchell. 1992. Cloning and expression of a hepatic microsomal glucose transport protein. Comparison with liver plasma-membrane glucose-transport protein GLUT 2. *Biochem J.* 286:173-7.
- Wagman, A.S., and J.M. Nuss. 2001. Current therapies and emerging targets for the treatment of diabetes. *Curr Pharm Des.* 7:417-50.
- Wang, L., H. Hayashi, K. Kishi, L. Huang, A. Hagi, K. Tamaoka, P.T. Hawkins, and Y. Ebina. 2000. Gi-mediated translocation of GLUT4 is independent of p85/p110alpha and p110gamma phosphoinositide 3kinases but might involve the activation of Akt kinase. *Biochem J.* 345 Pt 3:543-55.
- Warburg, O., and F. Dickens. 1930. The Metabolism of tumours : investigations from the Kaiser Wilhelm Institute for biology, Berlin-Dahlem. Constable, London. xxviii, 327 s. pp.
- Watson, A.J., P. De Sousa, A. Caveney, L.C. Barcroft, D. Natale, J. Urquhart, and M.E. Westhusin. 2000. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. *Biol Reprod.* 62:355-64.
- Wells, R.G., A.M. Pajor, Y. Kanai, E. Turk, E.M. Wright, and M.A. Hediger. 1992. Cloning of a human kidney cDNA with similarity to the sodium-glucose cotransporter. *Am J Physiol.* 263:F459-65.
- Wertheimer, E., S. Sasson, E. Cerasi, and Y. Ben-Neriah. 1991. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 belongs to the glucose- regulated protein family of stress-inducible proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:2525-9.
- White, M.K., J.D. DeVente, P.J. Robbins, D.M. Canupp, M.W. Mayo, L.S. Steelman, and J.A. McCubrey. 1994. Differential regulation of glucose transportert expression in hematopoietic cells by oncogenic transformation and cytokine stimulation. *Oncol Rep.* 1:17-26.
- Whitehead, J.P., S.F. Clark, B. Urso, and D.E. James. 2000. Signalling through the insulin receptor. *Curr Opin Cell Biol.* 12:222-8.
- Wiley, L.M., J.E. Lever, C. Pape, and G.M. Kidder. 1991. Antibodies to a renal Na+/glucose cotransport system localize to the apical plasma membrane domain of polar mouse embryo blastomeres. *Dev Biol.* 143:149-61.
- Wiley, L.M., and M.F. Obasaju. 1989. Effects of phlorizin and ouabain on the polarity of mouse 4 cell/16- cell stage blastomere heterokaryons. *Dev Biol.* 133:375-84.
- Wrenzycki, C., P. De Sousa, E.W. Overstrom, R.T. Duby, D. Herrmann, A.J. Watson, H. Niemann, D. O'Callaghan, and M.P. Boland. 2000. Effects of superovulated heifer diet type and quantity on relative mRNA abundances and pyruvate metabolism in recovered embryos. *J Reprod Fertil.* 118:69-78.
- Wrenzycki, C., D. Herrmann, J.W. Carnwath, and H. Niemann. 1996. Expression of the gap junction gene connexin43 (Cx43) in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *J Reprod Fertil.* 108:17-24.
- Wrenzycki, C., D. Herrmann, J.W. Carnwath, and H. Niemann. 1998. Expression of RNA from developmentally important genes in preimplantation bovine embryos produced in TCM supplemented with BSA. *J Reprod Fertil.* 112:387-98.
- Wrenzycki, C., D. Herrmann, J.W. Carnwath, and H. Niemann. 1999. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Mol Reprod Dev.* 53:8-18.

- Wrenzycki, C., D. Herrmann, L. Keskinetepe, A. Martins, Jr., S. Sirisathien, B. Brackett, and H. Niemann. 2001. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Hum Reprod.* 16:893-901.
- Xing, A.Y., J.C. Challier, J. Lepercq, M. Cauzac, M.J. Charron, J. Girard, and S. Hauguel-de Mouzon. 1998. Unexpected expression of glucose transporter 4 in villous stromal cells of human placenta. *J Clin Endocrinol Metab.* 83:4097-101.
- Xu, K.P., B.R. Yadav, R.W. Rorie, L. Plante, K.J. Betteridge, and W.A. King. 1992. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized in vitro and co-cultured with bovine oviducal epithelial cells. *J Reprod Fertil.* 94:33-43.
- Yasuda, H., T. Kurokawa, Y. Fujii, A. Yamashita, and S. Ishibashi. 1990. Decreased D-glucose transport across renal brush-border membrane vesicles from streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochim Biophys Acta.* 1021:114-8.
- Younes, M., R.W. Brown, D.R. Mody, L. Fernandez, and R. Laucirica. 1995. GLUT1 expression in human breast carcinoma: correlation with known prognostic markers. *Anticancer Res.* 15:2895-8.
- Younes, M., L.V. Lechago, J.R. Somoano, M. Mosharaf, and J. Lechago. 1997. Immunohistochemical detection of Glut3 in human tumors and normal tissues. *Anticancer Res.* 17:2747-50.
- Zamora-Leon, S.P., D.W. Golde, Concha, II, C.I. Rivas, F. Delgado-Lopez, J. Baselga, F. Nualart, and J.C. Vera. 1996. Expression of the fructose transporter GLUT5 in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:1847-52.
- Zhang, X., G.M. Kidder, A.J. Watson, G.A. Schultz, and D.T. Armstrong. 1994. Possible roles of insulin and insulin-like growth factors in rat preimplantation development: investigation of gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Reprod Fertil.* 100:375-80.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich gern all den Menschen danken, die zum Entstehen und Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt insbesondere den Personen, die Anteil daran hatten, dass ich mich mit einem der wohl faszinierendsten Objekte (wenn auch klein und unspektakulär erscheinend) wissenschaftlicher Untersuchungen beschäftigt habe, nämlich dem Leben in seiner frühen Form - den durch die Verschmelzung der beiden Gameten entstandenen Embryonen.

Ich danke Herrn Prof. Fischer für die zahlreichen Anregungen, die Betreuung und vor allem die stete Unterstützung und Förderung dieser Arbeit. Weiterhin möchte ich mich dafür bedanken, dass es mir durch sein Engagement mehrfach ermöglicht wurde, für das Entstehen dieser Arbeit wichtige Erfahrungen durch Aufenthalte in anderen Forschungseinrichtungen zu sammeln.

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn Prof. Niemann, Frau Dr. Wrenzycki und Herrn Prof. Gandolfi, die entscheidend dazu beigetragen haben, dass das oben beschriebene Interesse geweckt wurde und die hier vorliegende Arbeit in dieser Form entstehen konnte.

Ganz besonders Bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Paola Pocar. Die produktive Zusammenarbeit, die wertvollen Hinweise und immerwährende Hilfsbereitschaft verhalfen so manchem Schlachthoftag über dem Stereomikroskop doch noch zum Erfolg.

Für die Hilfestellungen und zahlreichen Hinweise, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich bei Frau Anne Navarrete Santos bedanken.

Viemals bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Silke Kietz, Frau Dr. Sabine Hombach-Klonisch, Herrn PD Dr. Thomas Klonisch, Frau Erin Groothey, Frau Ina Meinicke und Herrn Dr. Frank Tetens, bei denen ich immer ein offenes Ohr für Fragen, Interesse an der Arbeit und Diskussionsfreude vorfand.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Michaela Kirstein, Frau Sylke Vogt, Frau Elisabeth Schlüter und Frau Christine Fröhlich für die tatkräftige Unterstützung und Hilfe beim Management des Laboralltags.

Frau Dr. Schürmann und Herrn Prof. Joost möchte ich für die Hilfsbereitschaft und den für mich lehrreichen Aufenthalt in ihrem Labor danken.

Vielen Dank schulde ich den Gutachtern dieser Arbeit, Herrn Prof. Dr. Dr. B. Fischer, Herrn Prof. Dr. H. Niemann und Herrn Prof. Dr. E. Wahle.

Angaben zur Person und zum Bildungsgang

Angaben zur Person

Name	Robert Augustin
Geburtstag	23.10.1973
Geburtsort	Halle, Saale
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig, ein Kind: Julius Heinrich (geb. 18.04.2000)

Bildungsgang

1980-1988	Besuch der Oberschule „Heinrich Heine“
1989-1992	Besuch des Gymnasiums Latina „August-Herrmann-Francke“
1992-1997	Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1997	Diplomprüfung; Diplomarbeit am Institut für Biochemie in der Abteilung Ökologische und Pflanzenbiochemie zum Thema „Zur Induktion von MT-I/II durch das Schwermetall Cadmium im Hyphomyceten <i>Heliscus lugdunensis</i> “
1998 bis heute	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Halle, den 17.05.2001

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Die Stellen der Arbeit die anderen Werken in Wort, Bild oder dem Sinn nach entnommen sind, wurden als Entlehnung kenntlich gemacht.

Halle, Saale, den 16. Mai 2001