

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

Die Rolle der insulinartigen Wachstumsfaktoren in der  
embryo-maternalen Kommunikation

**H a b i l i t a t i o n s s c h r i f t**

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat., rer. medic. habil.

vorgelegt der

Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von: **Dr. rer. nat. Anne Navarrete Santos**

geboren am 17. Juni 1966 in Lutherstadt Wittenberg

Gutachter/in

1. Prof. Dr. Jörg Dötsch
2. Prof. Dr. Heiner Niemann
3. Prof. Dr. Eckhard Wolf

Datum der Verteidigung: 17. April 2012

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Molekulare Grundlagen und Vorkommen des Insulin-IGF-Rezeptor-Systems (IIRS) beim Säugetierembryo und im weiblichen Reproduktionstrakt .....</b>	<b>7</b>
2.1	Einteilung des IIRS.....	7
2.1.1	Insulin, IGF1 und 2 .....	8
2.1.2	Insulin-, IGF1- und IGF2- Rezeptoren .....	13
2.2	Die Expression von Insulin- und IGF-Rezeptoren in Kaninchenembryonen während der Präimplantationsentwicklung.....	15
<b>3</b>	<b>Signaltransduktion des IIRS in der Blastozyste.....</b>	<b>16</b>
3.1	Die Insulin und IGF-abhängige Signaltransduktion und die Regulation von Insulin/IGF1-Zielgenen im Embryoblasten und Trophoblasten der Kaninchenblastozyste .....	19
3.2	Der insulinstimulierte Glukosetransport in embryonalen Zellen .....	19
3.3	Die Expression von Glukosetransportern in Blastozysten und embryonalen Stammzellen .....	20
<b>4</b>	<b>Wechselwirkung des maternalen und embryonalen IIRS .....</b>	<b>21</b>
4.1	Auswirkung eines maternalen Diabetes mellitus auf den Präimplantationsembryo .....	25
4.2	Das Kaninchen als Versuchstiermodell eines Diabetes Typ 1 in der Frühschwangerschaft .....	27
4.3	Auswirkung eines Diabetes mellitus auf die frühe Embryogenese und das Insulin-IGF-Rezeptor System (IIRS) beim Kaninchen .....	30
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>31</b>
<b>6</b>	<b>Anlagen .....</b>	<b>37</b>
6.1	Lebenslauf.....	37

6.2	Erklärung.....	38
6.3	Danksagung.....	39
6.4	Thematisch relevante eigene Publikationen im Anhang.....	40
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Navarrete Santos A, Tonack S, Kirstein M, Kietz S, Fischer B (2004) Two insulin-responsive glucose transporter isoforms and the insulin receptor are developmentally expressed in rabbit preimplantation embryos. REPRODUCTION 128: 503-16</li> </ul>	...41
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Navarrete Santos A, Tonack S, Kirstein M, Pantaleon M, Kaye P, Fischer B (2004) Insulin acts via mitogen-activated protein kinase phosphorylation in rabbit blastocysts. REPRODUCTION 128: 517-26</li> </ul>	...42
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Navarrete Santos A, Ramin N, Tonack S, Fischer B (2008) Cell lineage specific signalling of insulin and insulin like growth factor (IGF1) in rabbit blastocysts, ENDOCRINOLOGY 149: 515-24</li> </ul>	...43
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Navarrete Santos A, Augustin R, Lazzari G, Galli C, Sreenan JM, Fischer B (2000) The insulin-dependent glucose transporter isoform 4 is expressed in bovine blastocysts. BIOCHEM BIOPH RES COMMUN 271: 753-60</li> </ul>	...44
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Augustin R, Pocar P, Navarrete Santos A, Wrenzycki C, Gandolfi F, Niemann H, Fischer B (2001) Glucose transporter expression is developmentally regulated in in vitro derived bovine preimplantation embryos. MOL REPROD DEV 60: 370-76</li> </ul>	...45
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Tonack S, Fischer B, Navarrete Santos A (2004) Expression of the insulin-responsive glucose transporter isoform 4 in blastocysts of C57/BL6 mice. ANAT EMBRYOL 208: 225-30</li> </ul>	...46
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Fischer B, Navarrete Santos A (2003) Glukose, Insulin und Glukosetransporter: Bedeutung und Weichenstellung für die Embryonalentwicklung. Reproduktionsmedizin 19: 195-201</li> </ul>	...47
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Tonack S, Rolletschek A, Wobus AM, Fischer B, Navarrete Santos A (2006) Differential expression of glucose transporter isoforms during embryonic stem cell differentiation. Differentiation 74: 499-509</li> </ul>	..49
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Tonack S, Ramin N, Garimella S, Rao R, Seshagiri PB, Fischer B, Navarrete Santos A (2009) Expression of glucose transporter isoforms and of the insulin receptor during hamster preimplantation embryo development. Ann Anat 191: 485-95</li> </ul>	..50
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Fischer S, Navarrete Santos A, Thieme R, Ramin N, Fischer B (2010) Adiponectin Stimulates Glucose Uptake in Rabbit Blastocysts. BIOL REPROD 83: 859-65</li> </ul>	..51
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ramin N, Thieme R, Fischer S, Schindler M, Schmidt T, Fischer B, Navarrete Santos A. (2010) Maternal diabetes impairs gastrulation and insulin and IGF-I receptor expression in rabbit blastocysts. Endocrinology, 151: 4158-67</li> </ul>	..52
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Thieme R, Ramin N, Fischer S, Püschel B, Bernd Fischer and Navarrete Santos A (2011) Gastrulation in rabbit blastocysts depends on insulin and the insulin-like-growth-factor 1, Mol Cell Endo, Im Druck</li> </ul>	..53

## 1 Einleitung

Die Entwicklung eines Embryos wird durch endogene und exogene Faktoren bestimmt. Zu den endogenen Regulationsmechanismen gehören die genetische und epigenetische Programmierung der Zellproliferation, die die Toti-, Pluri- und Omnipotenz der Zelle determinieren. Von außen wird der Embryo über das mütterliche Gewebe mit Glukose, Aminosäuren, Sauerstoff, Wachstumsfaktoren und Hormonen versorgt. Sie steuern den embryonalen Substrat- und Energiestoffwechsel. Der Embryo tritt so in eine enge Wechselwirkung mit dem mütterlichen Stoffwechsel. Der wechselseitige molekulare Austausch und die enge Kommunikation zwischen Mutter und Embryo sind zudem durch vom Embryo produzierte Hormone und Metabolite gekennzeichnet.

Die Signale, die die Entwicklung des frühen Embryos steuern, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Es laufen jeweils sowohl in den embryonalen als auch in den uterinen Zellen selbstgesteuerte Differenzierungsprozesse, die entweder autokrin auf die Ursprungszelle selbst oder parakrin zwischen den benachbarten Zellenverbänden wechselwirken. Die maternalen Gewebe unterliegen zusätzlich einem zentralen endokrinen Einfluss, der den mütterlichen Stoffwechsel koordiniert. Die Regelkreise greifen ineinander und bilden ein Netzwerk, das es dem Embryo ermöglicht, einerseits zu wachsen und sich zu entwickeln (Differenzierung), andererseits sich an die Umgebung anzupassen (Adaptation) und mit ihr in Wechselwirkung (Interaktion) zu treten.

### **Wie wird das komplexe Netzwerk von Differenzierung und Stoffwechsel in der Präimplantationsphase über Insulin und Glukose koordiniert, um den Bedürfnissen des Embryos gerecht zu werden?**

In einer In-vitro-Kultur kann sich ein Säugetierembryo autonom bis zum Blastozystenstadium, also bis zur Implantation, entwickeln. Wichtig für die Entwicklung ist u. a. die richtige Zusammensetzung des Kulturmediums, das die notwendigen Nährstoffe wie Glukose oder Pyruvat und alle essentiellen Aminosäuren enthalten muss. Neben den Substraten für den embryonalen Stoffwechsel müssen dem Medium auch maternale Wachstumsfaktoren, in Form von Serumzusätzen oder einer Zell-Co-Kultur, beigegeben werden.

In der Reproduktionstechnologie von Rindern und Schafen wird ein bedeutender Anteil der Nachkommen mittels In-vitro-Fertilisation (IVF) bzw. komplett als In-vitro-Produktion (IVP, in vitro gereifte Gameten) erzeugt. Trotz der methodisch genauen Anpassung der Kulturbedingungen bei IVF und IVP an die Verhältnisse in Eileiter und Uterus, ist die Entwicklung in vitro meist schlechter als in vivo, und resultiert nach einem Transfer der Embryonen in eine geringere

Schwangerschafts- oder Geburtenrate. Außerdem kommt es bei IVF generierten Embryonen zum *large offspring* Syndrom, z.B. zur Geburt übergroßer Kälber (Young et al. 1998). Eine mögliche Ursache für die schlechtere Entwicklung in vitro ist die fehlende Abstimmung zwischen Embryo und maternaler Umgebung, die zur Störung der Kinetik der Embryogenese führt. Als Mediatoren der Abstimmung kommen zum einen Wachstumsfaktoren in Frage, die zentrale Prozesse wie das Nährstoffangebot der Mutter und lokale wie die Mitogenese und Stoffwechseladaptation des Embryos miteinander koordinieren. Zum anderen können auch die Stoffwechselprodukte und Metabolite der Mutter fehlen oder im Überschuss vorhanden sein. So ist zum Beispiel die embryonale Verfügbarkeit von Glukose von entscheidender Bedeutung für die Differenzierung zur Blastozyste. Über den Glukosestoffwechsel der Mutter, der durch die Hormone Insulin und Glucagon reguliert wird, wird auch die Verfügbarkeit der Glukose für den Embryo gewährleistet. Auf zellulärer Ebene koordiniert Insulin alle anabolen Stoffwechselwege und ist wie kein anderes Hormon in der Lage, die Biosynthese und damit Wachstum zu forcieren.

In meiner Forschungsarbeit steht zentral die Frage nach der Regulation dieser embryo-maternalen Interaktionen. Dazu habe ich am experimentellen Modell der Präimplantationsentwicklung hauptsächlich beim Kaninchen, aber auch bei Maus und Hamster und an embryonalen Stammzellen, geforscht. Die Embryogenese des Kaninchens ist ein geeignetes Modell für den Menschen, um molekulare Untersuchungen an Präimplantationsembryonen durchzuführen. Im Vergleich zu anderen Tiermodellen, insbesondere der Nager, weist das Kaninchen einen höheren phylogenetischen Verwandtschaftsgrad zum Menschen auf. Kaninchenembryonen bieten auf Grund der Größe und Morphologie der Keimscheibe Vorteile im experimentellen Arbeiten. Die Gastrulation ähnelt der beim Menschen beginnt aber bereits vor der Implantation und ist so einer detaillierten Analyse gut zugänglich.

Die Forschungsergebnisse sind als wissenschaftliche Artikel erschienen und wurden von mir auf Tagungen vorgestellt. Sie bilden die Grundlage dieser kumulativen Habilitationsschrift.

Sie beschreiben

- **die Expression von Insulin- und IGF-Rezeptoren während der Präimplantationsentwicklung des Kaninchens,**

(Publiziert in: Navarrete Santos A, Tonack S, Kirstein M, Kietz S, Fischer B (2004) Two insulin-responsive glucose transporter isoforms and the insulin receptor are developmentally expressed in rabbit preimplantation embryos. REPRODUCTION 128: 503-16)

- **die insulin- und IGF-abhängige Signaltransduktion und die Regulation von Insulin/IGF1-Zielgenen im Embryoblasten und Trophoblasten der Kaninchenblastozyste,**

Publiziert in: Navarrete Santos A, Tonack S, Kirstein M, Pantaleon M, Kaye P, Fischer B (2004) Insulin acts via mitogen-activated protein kinase phosphorylation in rabbit blastocysts. REPRODUCTION 128: 517-26,

Navarrete Santos A, Ramin N, Tonack S, Fischer B (2008) Cell lineage specific signalling of insulin and insulin like growth factor (IGF1) in rabbit blastocysts, ENDOCRINOLOGY 149: 515-24.

- **den insulinregulierten Glukosestoffwechsel und die Expression der Glukosetransporter in Blastozysten und embryonalen Stammzellen,**

Publiziert in: Navarrete Santos A, Augustin R, Lazzari G, Galli C, Sreenan JM, Fischer B (2000) The insulin-dependent glucose transporter isoform 4 is expressed in bovine blastocysts. BIOCHEM BIOPH RES COMMUN 271: 753-60,

Tonack S, Fischer B, Navarrete Santos A (2004) Expression of the insulin-responsive glucose transporter isoform 4 in blastocysts of C57/BL6 mice. ANAT EMBRYOL 208: 225-30,

Fischer B, Navarrete Santos A (2003) Glukose, Insulin und Glukosetransporter: Bedeutung und Weichenstellung für die Embryonalentwicklung. REPRODUKTIONSMEDIZIN 19: 195-201,

Tonack S, Rolletschek A, Wobus AM, Fischer B, Navarrete Santos A (2006) Differential expression of glucose transporter isoforms during embryonic stem cell differentiation. DIFFERENTIATION 74: 499-509,

Tonack S, Ramin N, Garimella S, Rao R, Seshagiri PB, Fischer B, Navarrete Santos A. (2009) Expression of glucose transporter isoforms and of the insulin receptor during hamster preimplantation embryo development. ANN ANAT 191: 485-95.

- **und die Auswirkung eines Diabetes mellitus auf die frühe Embryogenese und das Insulin-IGF-Rezeptor-System (IIRS) in der Kaninchenblastozyste.**

Publiziert in: Ramin N, Thieme R, Fischer S, Schindler M, Schmidt T, Fischer B, Navarrete Santos A (2010) Maternal diabetes impairs gastrulation and insulin and IGF-I receptor expression in rabbit blastocysts. ENDOCRINOLOGY, 151: 4158-67.

Den wissenschaftlichen Aufsätzen vorangestellt sind eine integrative Darstellung der in den jeweiligen Artikeln untersuchten Komponenten der embryo-maternalen Interaktion unter besonderer Berücksichtigung der insulinartigen Wachstumsfaktoren und eine wissenschaftliche Einordnung der erzielten Ergebnisse. Begonnen wird mit einer Rekapitulation der molekularen Grundlagen und des Vorkommens des Insulin-IGF-Rezeptor-Systems (IIRS) bei Säugetierembryonen und im Reproduktionstrakt. Die nächsten Kapitel beschäftigen sich mit der Funktion und Signaltransduktion des IIRS unter physiologischen Entwicklungsbedingungen. Die Wechselwirkung der maternalen und embryonalen Regulation des IIRS wird anhand der Kaninchenblastozyste behandelt. Der letzte Abschnitt dieser integrativen Darstellung ist der Auswirkung eines maternalen Diabetes mellitus auf den Präimplantationsembryo gewidmet.

## 2 Molekulare Grundlagen und Vorkommen des Insulin-IGF-Rezeptor-Systems (IIRS) beim Säugetierembryo und im weiblichen Reproduktionstrakt

Die insulinartigen Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren bilden das Insulin-IGF-Rezeptor-System (IIRS). In der Embryogenese stehen die Mutter und der Embryo über dieses System in direkter Wechselwirkung.

### 2.1 Einteilung des IIRS

Zu den Mitgliedern der Insulinfamilie gehören Insulin und die insulinähnlichen Wachstumsfaktoren (*insulin like growth factor*, IGF) 1 und 2. Sie sind einsträngige Polypeptide mit hoher Sequenzhomologie untereinander und zum Proinsulin. Auf Grund ihrer Ähnlichkeit in der Peptidstruktur binden die Polypeptide nicht nur an den jeweils zugeordneten Rezeptor, sondern, wenn auch mit geringer Affinität, an die der anderen Mitglieder der Insulin-/IGF-Rezeptorfamilie (Denley et al. 2005, Übersichtsartikel).

Durch die differentielle Expression der Insulin- und IGF-Rezeptoren in den verschiedenen Zelltypen, insbesondere in den Zelllinien Embryoblast und Trophoblast, wird die spezifische Zellreaktion auf den Wachstumsfaktorstimulus eingeleitet.

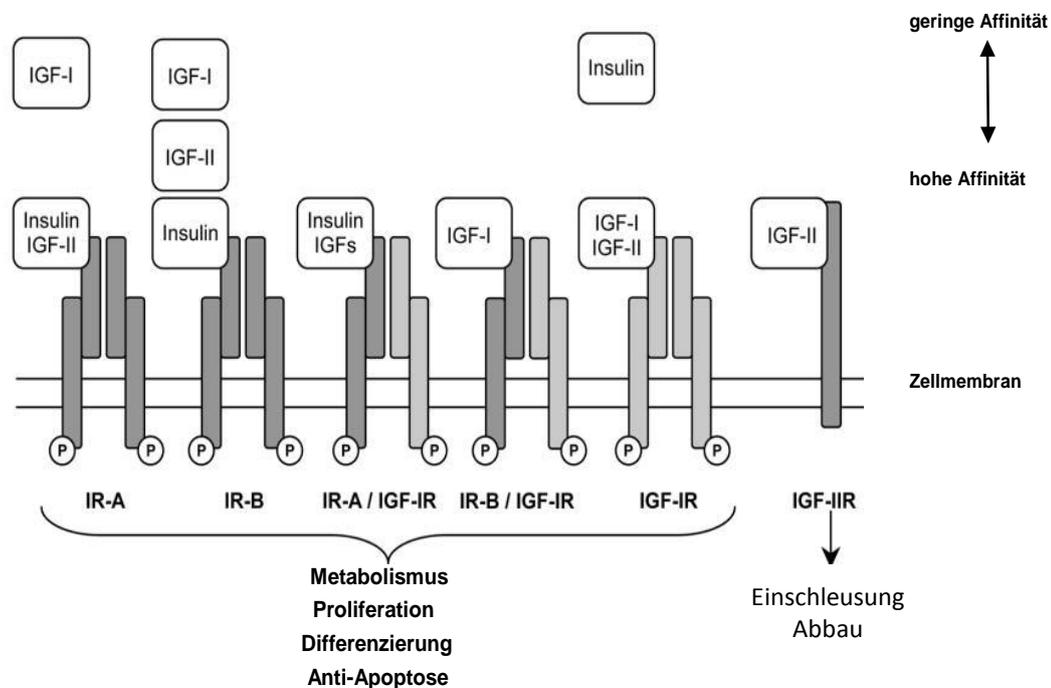
Der Insulin- und der IGF1-Rezeptor (IR, IGF1-R) sind sich in ihrer Struktur sehr ähnlich. Auch die Nukleotidsequenz des humanen Insulinrezeptors (IR) zeigt eine hohe Homologie mit dem IGF1-Rezeptor (Ullrich et al. 1985, 1986). Beide Rezeptoren sind Tetramere und bestehen aus jeweils zwei identischen alpha- (Mw=135kDa) und beta-Untereinheiten (Mw=95kDa), die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Die beta-Untereinheiten durchziehen die Zellmembran und beinhalten die Tyrosinkinasedomäne, die nach Ligandenbindung an der alpha-Untereinheit aktiviert wird.

Die Konservierung des IR-Gens ist hoch, und so können bei vielen Säugetieren homologe Gene nachgewiesen werden. Die Übereinstimmung der Nukleotidsequenz des humanen und des Kaninchen-IR beträgt ca. 85% auf DNA und 95% auf Proteinebene (siehe Navarrete Santos et al. 2004a). Durch alternative mRNA-Prozessierung des IR-Gens ergeben sich zwei Splicevarianten des IR, die Isoformen A und B, die unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu den Liganden aufweisen (Abb. 1).

Der IGF2-Rezeptor dagegen unterscheidet sich strukturell vom IR/IGF1-R durch eine relativ lange extrazelluläre Domäne und eine kurze Transmembran-Zytoplasmadomäne ohne Tyrosinkinaseaktivität. Damit ähnelt er vom Aufbau den Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren, die den lysosomalen Abbau gebundener Liganden einleiten.

### 2.1.1 Insulin, IGF1 und 2

Die Liganden des IIRS, Insulin, IGF1 und 2, sind in hohem Maße geeignet, als molekulare Mediatoren im embryo-maternalen Dialog zu wirken. Durch ihre mitogenen Eigenschaften können sie einerseits die Kinetik der embryonalen Entwicklung direkt regulieren, andererseits koordinieren sie durch ihre systemische Wirkung die Anpassung der Stoffwechselprozesse des Embryos und der Mutter. Sie spielen deshalb eine entscheidende Rolle bei der Adaptation des embryonalen Stoffwechsels an die Ernährungssituation der Mutter.



**Abbildung 1:** Übersicht über das Insulin-IGF-Rezeptor-System (IIRS) mit der schematischen Darstellung der Bindungsaffinitäten von Liganden und Rezeptoren

Der Insulinrezeptor (IR) existiert in zwei Isoformen: IR-A und IR-B. IR-B ist für die klassische metabolische Insulinantwort verantwortlich. IGF1 (IGF-I) und IGF2 (IGF-II) binden an ihn nur mit geringer oder mittlerer Affinität. IR-A hat eine hohe Affinität zu Insulin und IGF2, und nur eine schwache zu IGF1. IGF1R (IGF-IR) bindet beide IGFs und aktiviert die anabolische Aktivität; Insulin aktiviert den Rezeptor nur in sehr hohen Konzentrationen. Der Hybridrezeptor IR-A/IGF1R (IR-A/IGF-IR) bindet Insulin und IGFs mit gleicher Affinität, während an die IR-B/IGF1R-Heterodimere (IR-B/IGF-IR) ausschließlich IGF1 bindet. IGF2R (IGF-IIR) bindet exklusiv IGF2 und ermöglicht seine Einschleusung und Abbau (modifiziert aus Chao und D'Amore, 2008).

Die insulinartigen Wachstumsfaktoren (IGF) sind phylogenetisch weit verbreitet. So kommen zum Beispiel bereits bei Pilzen, Wirbellosen, Insekten, niederen Wirbeltieren und bei Vögeln insulinverwandte Moleküle vor, die in ihrer Struktur und in ihren Eigenschaften konserviert sind (Übersicht in Mattson, 1988). IGF sind bei Säugetieren und bei den Vögeln in die Embryogenese involviert.

Bei Säugern ist Insulin der Hauptregulator des Blutglukosespiegels und der zellulären Glukoseverwertung. Es wird ausschließlich von Beta-Zellen des Pankreas synthetisiert und ungebunden in der Blutbahn transportiert. Insulin stimuliert in der Zelle die Biosynthese von Glykogen und Fetten. Es koordiniert über den Glukoseumsatz die Glykolyse und die oxidative Phosphorylierung und damit die Hauptprozesse zur Energiegewinnung (ATP-Synthese) in der Zelle.

Der Präimplantationsembryo ist nicht in der Lage, selbst Insulin zu synthetisieren. Insulin wird endokrin über das Blut in das uterine Sekret abgegeben und erreicht so den Embryo. Die Bindung von Insulin und IGF an die Oberfläche von Mausembryonen wurde bereits 1988 von Mattson und Mitarbeitern beschrieben (Mattson et al. 1988). Insulin ist auch bei den Kaninchenblastozysten *in utero* nachweislich an der Oberfläche und im Zytoplasma von Embryo- und Trophoblastzellen vorhanden. In einer kurzzeitigen In-vitro-Kultur der Blastozysten nach der Entnahme aus dem Uterus verringert sich die Insulinmenge. Nach 10 Stunden Kultur in insulinfreiem Medium ist kein Insulin mehr nachweisbar. Bei Kaninchenblastozysten gibt es keine transkriptionelle Aktivität des Insulingens (Ramin et al. 2010).

Im Unterschied zu Insulin werden IGFs von den meisten Geweben und Zelltypen selbst produziert. Der Hauptsyntheseort für IGFs ist die Leber. In Mäusen mit einer Leber-spezifischen Stilllegung des IGF1-Gens reduziert sich der Serumwert des „zirkulierenden“ IGF1 auf ca. 25% (Yakar et al. 1999), was den Beitrag der IGF1-Synthese aus Nicht-Leber Geweben verdeutlicht. Wenn die Synthese des für den IGF1-Komplex notwendigen Faktors ALS (IGF1-IGFBP3-ALS) in Mäusen zusätzlich zur hepatischen IGF1-Synthese ausgeschaltet wird, reduziert sich die Menge des „zirkulierenden“ IGF1 auf nur noch 5% (Yakar et al. 2002). Für den Präimplantationsembryo bedeutet das, dass IGFs in das Tuben- und Uterussektret sowohl endokrin als auch parakrin abgegeben werden und damit einer zentralen und lokalen Regulation unterliegen (Velazquez et al. 2009, Übersichtsartikel).

Die zentrale Regulation wird vom Wachstumshormon (GH), die lokale Synthese durch gewebespezifische Faktoren, die wiederum ovariellem Östrogen unterliegen, transkriptionell gesteuert. Der größte Anteil des wirksamen IGF1 tritt aus dem Blutkreislauf über die Sekrete in

Tube und Uterus an den Embryo heran (Wathes et al. 2003; Sudo et al. 2007). Die Serum-IGF1-Konzentration ist im Tagesverlauf relativ konstant (Herrler et al. 1997, Sudo et al. 2007). Während der Schwangerschaft nimmt die IGF1-Konzentration im Blutserum kontinuierlich zu und erreicht im letzten Drittel der Schwangerschaft die 3fache Konzentration verglichen mit den Serumwerten nichtschwangerer Frauen. Im Unterschied dazu bleibt die IGF2-Konzentration nahezu gleich (Gargosky et al. 1990).

Bei Kaninchen steigen sowohl die IGF1- als auch die IGF2-Konzentration bis zum Tag 20-23 der Gravidität (Graviditätsdauer insgesamt 30 bis 31 Tage) an. Besonders steil ist der Anstieg von IGF2 mit ca. 0,08µg/ml an Tag 0 auf 16µg/ml an Tag 23 (Nason et al. 1996). Für IGF1 beträgt die Konzentration am Beginn der Gravidität ca. 0,5µg/ml (Tag 0) mit einem maximalen Serumwert von ca. 0,83µg/ml am Tag 21. Für beide Wachstumsfaktoren beginnt der signifikante Anstieg erst nach der Implantation mit der Ausbildung einer funktionellen Plazenta (Nason et al. 1996).

Aufgrund der gewebespezifischen Synthese und Regulation der IGFs und ihrer Bindeproteine korrelieren die Serumwerte nicht immer mit der lokalen Konzentration. Bisher gibt es keine Angaben über die IGF-Konzentrationen im Uterus. Der Nachweis der Eigensynthese im Uterus und in der Tuba uterina wurde in vielen Säugetieren und dem Menschen erbracht. Auch im Uterus des Kaninchens werden die Transkripte beider Liganden exprimiert (Schindler, Navarrete unveröffentlicht).

IGFs werden für den Transport durch Bindeproteine stabilisiert (IGF-bindende Proteine, IGFBP). Die wirksame Konzentration der IGFs ist nicht einfach zu bestimmen, da ihre Bioverfügbarkeit neben der endokrinen und parakrinen Synthese auch von der Bindung an die IGFBP abhängig ist. Bisher unterscheidet man 6 IGFBP, die entweder mit gleicher oder höherer Affinität als die Rezeptoren an IGF binden (Hwa et al. 1999, Übersichtsartikel). In gebundener Form sind IGF inaktiv. Die Aktivierung erfolgt durch die proteolytische Abspaltung der Bindeproteine, wodurch über die entsprechende Verfügbarkeit der IGFBP-Proteasen eine weitere regulatorische Ebene der IGFs hinzukommt. Die IGFBP werden von vielen Geweben zelltypabhängig synthetisiert, was die Vorhersage ihrer lokalen und tatsächlich wirksamen Konzentration zusätzlich kompliziert. Die IGFBP 3, 5 und 6 stabilisieren den Transport von IGF im Blutkreislauf und sind dadurch für die endokrine Wirksamkeit der IGFs mitbestimmend, wobei IGFBP3 der Hauptbindepartner für das zirkulierende IGF1 ist. IGFBP 2 und 4 haben eher autokrine und parakrine Funktionen (Allan et al. 2001). IGFBP1 kommt in der Blastozyste (Corps et al. 1990), in Granulosazellen (Mondschein et al., 1990, 1991) und im Endometrium (Geisert et al. 1991) vor und konnte bereits 1984 in hohen Konzentrationen als Bestandteil der Amnionflüssigkeit beim Menschen nachgewiesen und isoliert

werden (Drop et al. 1984 a,b). Bei Mäusen sind 70-80% des zirkulierenden IGF1 gebunden und bilden einen ternären Proteinkomplex von ca. 150kDa aus IGF1, dem Bindungsprotein-3 und der zugehörigen säurelabilen Untereinheit (ALS). Weitere 15% bilden einen binären Komplex aus IGF1 und dem IGFBP3 oder 5. So stabilisiert, hat IGF1 eine Halbwertszeit von 10-16 Stunden. Als freie Form mit einer drastisch kurzen Halbwertszeit kommen ca. 5% des IGF1 vor.

Die klassische Funktion der IGFs ist die pränatale und postnatale Wachstumsstimulation. Der Verlust der IGF-Synthese führt in beiden Fällen zu fetaler Wachstumsretardierung (Liu et al. 1993, Baker et al. 1993, Powell-Braxton et al. 1993). IGF1-null-mutante Mäuse sind stark wachstumsretardiert und sterben häufig schon vor der Geburt (95%ige perinatale Mortalität). Die überlebenden Tiere sind infertil und entwicklungsgestört, mit vielfältigen Defekten in den Organsystemen. Auch die IGF2-null-Mutanten werden zu klein geboren (60% des Wildtyps), sind aber lebens- und entwicklungsfähig und wachsen nach der Geburt normal. Eine weitere, wichtige Funktion des IGF1 ist die Regulation der Apoptose während der Morphogenese. Durch einen lokalen Überschuss bzw. Mangel an IGF1 und den IGFBPs wird die Apoptose inhibiert bzw. forciert (Allan et al. 2000, 2001).

Ursprünglich wurde angenommen, dass es einen Wechsel von IGF2 zu IGF1 in der Wachstumsregulation gäbe, da hauptsächlich IGF2 während der Embryogenese weit verbreitet ist (Bhaumick und Bala, 1987). Versuche bei Mäusen, bei denen die IGF2-Synthese durch genetische Mutation ausgeschaltet ist, beweisen, dass IGF2 im Gegensatz zu IGF1 nicht essentiell für die Entwicklung oder das Überleben ist (DeChiara et al. 1990, 1991, Powell-Braxton et al. 1993).

IGF1 und 2 werden als autokrin/parakrin- wirkende Faktoren vom Präimplantationsembryo selbst synthetisiert. Die meisten Nachweise dazu wurden durch Transkriptdetektion mittels PCR geführt und sind als Übersicht in Tabelle 1 zusammengefasst (Tab. 1). Die IGF2-Transkription bleibt von der Eizelle über die Zygote bis zum Blastozystenstadium in allen untersuchten Säugetierspezies erhalten. Dagegen ist die IGF1-Expression vom Stadium der Embryonalentwicklung und der Spezies abhängig. Beim Kaninchen ist die Genaktivität für IGF1 erst ab dem expandierten Blastozystenstadium (Tag 6) deutlich gesteigert. Die IGF-Transkripte sind im Embryoblasten und Trophoblasten nicht gleich verteilt. Die IGF-Synthese ist mit ca. 80% der Gesamtmenge hauptsächlich eine Leistung des Embryoblasten (Ramin, Dissertation 2009). Die Bestimmung des IGF1-Peptides der Blastozyste mittels ELISA ergibt eine mittlere Menge von ca. 4,9ng IGF1, wobei die Werte zwischen 1ng bis 8,9ng variieren können (Thieme, Navarrete Santos unveröffentlicht). Zusätzlich zur autokrinen Stimulation der Embryoblastzelle ist auch über den Kontakt zwischen

Embryo- und Trophoblastzellen und den Austausch über die Blastozystenhöhlenflüssigkeit eine parakrine Wirkung der IGFs zu vermuten.

**Tabelle 1:** Vergleich der Expression der insulinartigen Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren in Präimplantationsembryonen verschiedener Säugetierspezies

Transkripte	Oozyte	2-Zellstadium	8-Zellstadium und Morula	Blastozyste
<b>Insulin</b>				
Mensch	-	-	-	-
Maus	-	-	-	-
Kaninchen	-	-	-	-
<b>IGF1</b>				
Mensch	-	-	-	-
Maus	-/+*	-/+*	-/+*	-/+*
Rind	+	+	+	+
Ratte	-	-	-	-
Kaninchen			+	+
<b>IGF2</b>				
Mensch	+	+	+	+
Maus	-	+	+	+
Rind	+	+	+	+
Ratte	+	+	+	+
Kaninchen			+	+
<b>IR</b>				
Mensch	+	-	+	+
Maus	-	-	+	+
Rind	+	+	+	+
Ratte	+	+	+	+
Kaninchen			-	+
Hamster			+	+
<b>IGF1-R</b>				
Mensch	+	+	+	+
Maus			+	+
Rind	+	+	+	+
Ratte	+	+	-	+
Kaninchen			+	+
<b>IGF2-R</b>				
Mensch	+	+	+	+
Maus		+	+	+
Rind	+	+	+	+
Ratte	+	+	+	+
Kaninchen			+	+

(+) Transkript vorhanden, (-) Transkript nicht vorhanden, IR Insulinrezeptor, IGF *insulin like growth factor*, IGF1-R IGF1-Rezeptor, IGF2-R IGF2-Rezeptor

(Mensch, Lighten et al.1998 ; Maus, Rappolee et al. 1992; Bolton et al. 1984; Heyner et al. 1989a, b; \*Maus, Doherty et al. 1994, Inzunza et al. 2010; Rind, Watson et al., 1992 ; Ratte, Zhang et al. 1994; Hamster, Tonack et al. 2009; Kaninchen, Navarrete Santos et al. 2004 b, Navarrete Santos et al. 2008, Ramin et al. 2010)

Beim Kaninchen ist die IGF-Transkription im Uterus und in der Blastozyste von Insulin abhängig. Bei einem experimentell induzierten Insulindefizit wird die parakrine IGF-Produktion forciert, was zu einem generellen Anstieg des IGF1 in der Blastozyste führt (Ramin et al. 2010, siehe auch Kapitel 4, Abb. 5).

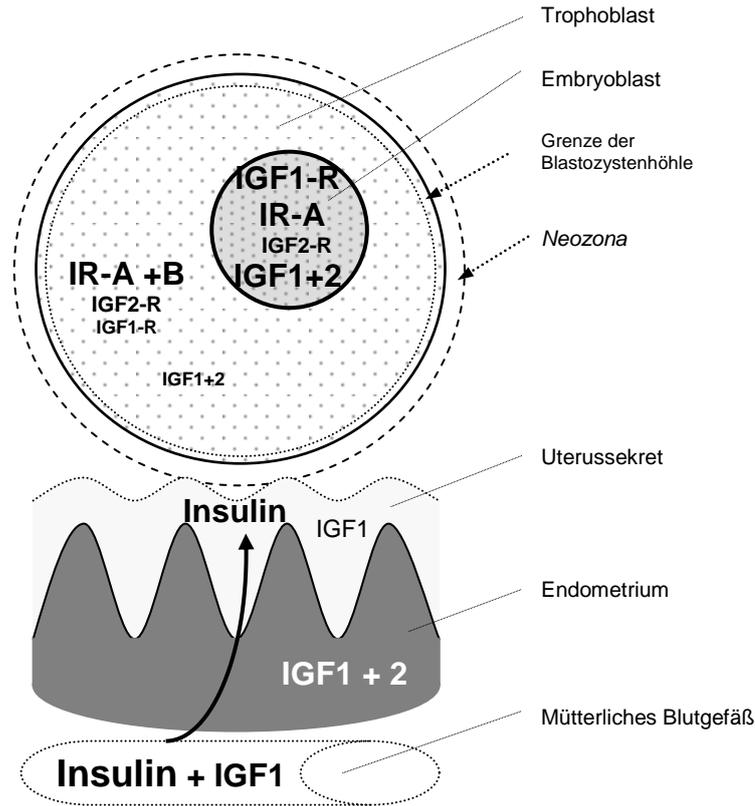
### 2.1.2 Insulin-, IGF1- und IGF2- Rezeptoren

Die Wirkungen von Insulin und der IGFs sind rezeptorabhängig. In allen untersuchten Säugetierspezies werden der IR und die IGF-Rezeptoren während der Präimplantationsentwicklung vom Embryo und den embryonalen Geweben der *Tuba uterina* und des Uterus exprimiert (Tab. 1).

Eine Besonderheit stellt die Prozessierung des Insulinrezeptors dar, der mit zwei Isoformen IR-A und IR-B in unterschiedlicher Anordnung in der Blastozyste vertreten ist. Die beiden Isoformen zeigen ein spezifisches Verteilungsmuster im Embryoblasten und Trophoblasten der Kaninchenblastozyste (Navarrete Santos et al. 2008). Der Anteil der Isoform A beträgt 80-100% an der Gesamtexpression, was eine Erklärung für die starke mitogene Wirkung des Insulins in embryonalen Zellen ist. Die Isoform B ist mit einem Anteil von ca. 20% ausschließlich im Trophoblasten vorhanden. Zusätzlich zu den drei Tyrosinkinase-Homorezeptoren (IR-A, IR-B, IGF1-R) ist aufgrund der Strukturhomologie von IR und IGF1-R die Bildung von Hybridrezeptoren mit  $\alpha\beta\text{IR-A} \times \alpha\beta\text{IGF1-R}$  bzw.  $\alpha\beta\text{IR-B} \times \alpha\beta\text{IGF1-R}$  möglich (Abb.1). Die Bindung des Liganden findet an der  $\alpha$ -Untereinheit statt und ist sowohl vom Rezeptortyp als auch von der Konzentration des Liganden abhängig. An die Homorezeptoren binden die jeweiligen namensgebenden Liganden mit hoher Affinität. Den Hybridrezeptor  $\alpha\beta\text{IR-A} \times \alpha\beta\text{IGF1-R}$  binden Insulin, IGF1 und 2, wohingegen an den  $\alpha\beta\text{IR-B} \times \alpha\beta\text{IGF1-R}$ -Hemirezeptor nur IGF1 binden kann. IGF2 kann sowohl IR-A als auch IGF1-R aktivieren (Pandini et al. 1999, 2002, 2003, 2004).

Die Kaninchenblastozyste ist aufgrund ihrer Größe und dem Implantationszeitpunkt nach Beginn der Gastrulation ein geeignetes Modell, die Rezeptorexpression während der Präimplantationsphase zu untersuchen. Bereits ab dem Morulastadium wird beim Kaninchen die IGF2-Rezeptor-RNA synthetisiert, wohingegen die beiden Tyrosinkinase-Rezeptoren IR und IGF1-R erst ab dem Blastozystenstadium am 4 Tag *post coitum* (*p.c.*) exprimiert werden (Navarrete Santos et al. 2008). Ab Tag 4 *p.c.* befindet sich die Kaninchenblastozyste bereits im Uterus und es setzt ein massives Zellwachstum ein, bei dem sich die Zellzahlen von Embryoblast und Trophoblast proportional erhöht.

Die Ausstattung des Embryoblasten und des Trophoblasten mit IR und IGF-R ist verschieden (Abb.2). Während der Embryoblast eine hohe Expression des IR-A und des IGF1R aufweist, synthetisiert der Trophoblast dagegen hauptsächlich den Insulinrezeptor mit beiden Isoformen und nur geringe Mengen IGF1-R. Am Tag 6 *p.c.* verfügt die Kaninchenblastozyste über das komplette IIRS mit den Rezeptoren und Liganden (Abb. 2).



**Abbildung 2:** Schema einer 6 Tage alten Kaninchenblastozyste des Stadiums 0/1 im Uterus mit der spezifischen Expressionsverteilung der Liganden und Rezeptoren des IIRS

In der Abbildung wird die Expression der Liganden Insulin, IGF1 und 2, und der Insulin- und IGF-Rezeptoren den embryonalen und uterinen Geweben zugeordnet. Für Insulin, IGF1, IR und IGF1-R wurde sowohl die Transkriptionsmenge und als auch die Proteinmenge quantifiziert und die Lokalisation bestimmt. Die Angaben zu IGF2, IGF2-R und zu den IR-Isoformen A und B (IR-A, IR-B) im Trophoblasten beruhen ausschließlich auf Transkriptnachweisen und -quantifizierung. Die Schriftgröße des jeweiligen Moleküls verdeutlicht die Menge des Rezeptors bzw. des Liganden, wobei große, fette Schriftzeichen für eine starke Expression und kleinere für eine minimale Expression stehen. (IR, Insulinrezeptor, IGF-R, IGF-Rezeptor)

Die frühen Gastrulationsereignisse erfolgen beim Kaninchen vor der Implantation ab dem 6. Entwicklungstag und werden morphologisch in 7 Entwicklungsstadien (Stadium 0-7, Viebahn et al. 1995) eingeteilt. Morphologisch sichtbar kommt es im Embryoblasten im Stadium 1 zur Ausbildung eines vorderen Randbogens (VRB) und im Stadium 2 zu einer erweiterten posterioren Gastrulaextension, die dem Bereich der mesodermalen Zelllage entspricht. Kurz vor der Implantation erreicht die Blastozyste das Stadium 3, in dem der Embryoblast elongiert und Primitivstreifen und -knoten sichtbar werden.

Das Expressionsmuster der Rezeptoren ist nicht starr, sondern verändert sich entwicklungsabhängig mit der Gastrulation. Die mRNA-Synthese des IGF1-R wird im Stadium 2 transient induziert und der Rezeptor ist insbesondere im Bereich des vorderen Randbogens

lokalisiert. Während der frühen Gastrulation nimmt die Insulinrezeptorexpression insbesondere im Trophoblasten zu (Ramin, Dissertation 2009). Die zeitliche und zelllinienspezifische Expression der Rezeptoren legt nahe, dass die Regulation ihrer Genaktivität während der Zelldifferenzierung von entwicklungspezifischen Transkriptionsfaktoren gesteuert wird.

## **2.2 Die Expression von Insulin- und IGF-Rezeptoren in Kaninchenembryonen während der Präimplantationsentwicklung**

Verweis auf den Anhang Seiten 41-55. Das Kapitel wurde beschrieben und publiziert im Manuskript:

Navarrete Santos A, Tonack S, Kirstein M, Kietz S, Fischer B (2004) Two insulin-responsive glucose transporter isoforms and the insulin receptor are developmentally expressed in rabbit preimplantation embryos. REPRODUCTION 128: 503-16

### 3 Signaltransduktion des IIRS in der Blastozyste

Die Aufklärung der Signalwege, die die Glukoseaufnahme und die Insulinsensitivität im Embryo regulieren, ist notwendig, um die Subfertilität von Frauen mit Stoffwechselstörungen wie Diabetes mellitus oder dem Polyzystischen Ovarsyndrom (PCO) zu verstehen und zu therapieren.

Insulin und IGF haben in ihrer Signalwirkung viele Gemeinsamkeiten. Durch die Ligandenbindung wird die Autophosphorylierung der Rezeptoren ausgelöst. Die Phosphorylierung wird auf die Insulinrezeptorsubstrate (IRS) und weitere komplementierende Proteine übertragen, die zur Aktivierung des PI3-Kinase- und des Ras/MAPK-kinase-Signalweges führen können (White 2006, Übersichtsartikel).

Als zentrales Molekül der PI3-Kinase-Signalkaskade wird die Proteinkinase B (PKB/AKT) bei einer Aktivierung durch Insulin und IGF innerhalb weniger Minuten phosphoryliert. Ausgehend von dieser AKT-Aktivierung werden dann der insulinabhängige Glukosetransporter GLUT4 transloziert und damit die Glukoseaufnahme gesteigert, die zelluläre Glykogensynthese forciert und die Proteinsynthese gesteigert. Des Weiteren wird die Apoptose inhibiert und der Zellzyklus beschleunigt. Zu den durch Insulin regulierten AKT-Substraten gehören die Transkriptionsfaktoren CREB, FOXO und mTOR, das Signalmolekül GSK-3 und die Apoptose- und Zellzyklusregulatoren mdm2, Bad und p21 (Sale und Sale, 2008, Übersichtsartikel).

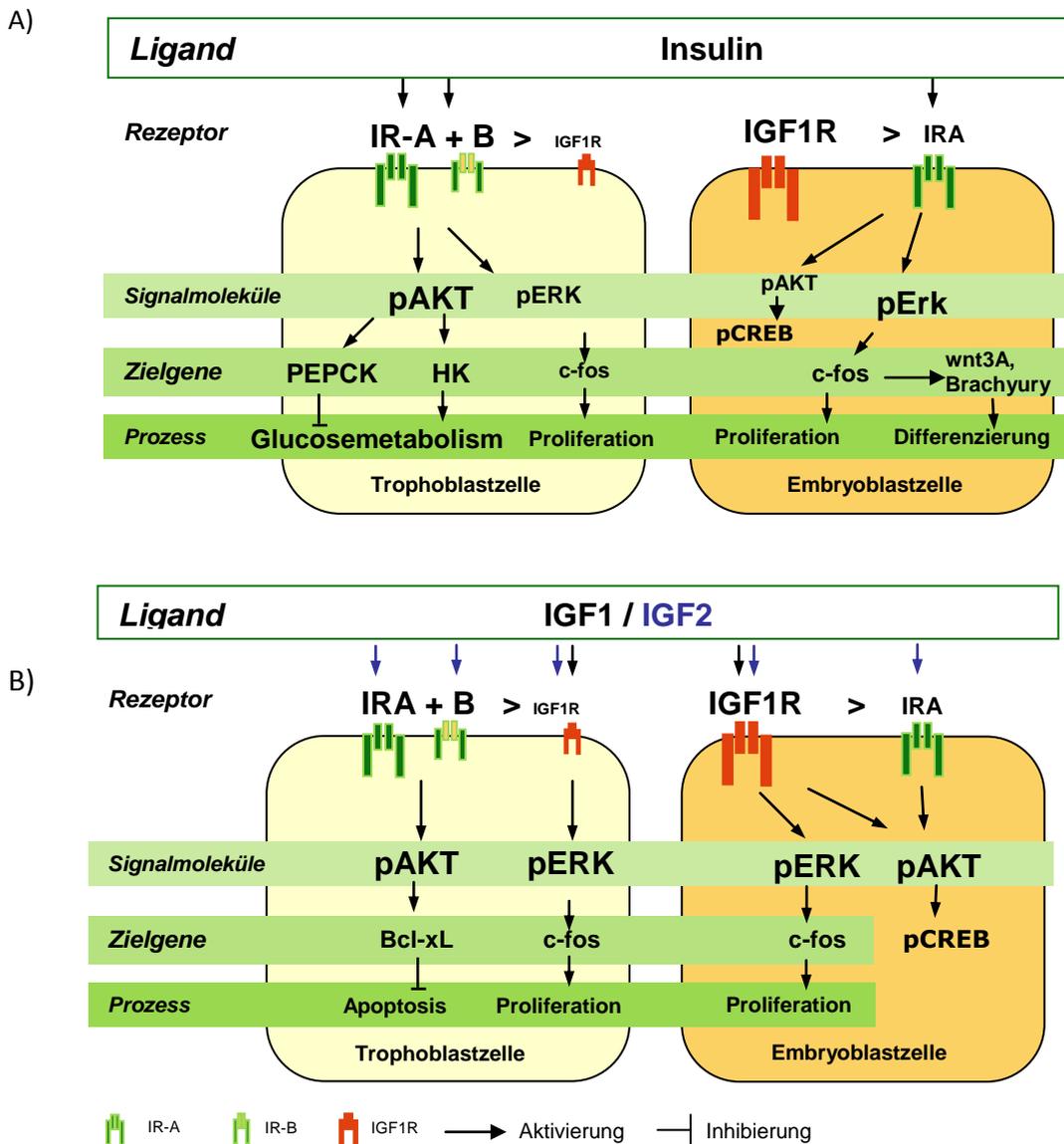
Im Gegensatz zum PI3/AKT-Kinase-Signalweg führt die insulinabhängige Aktivierung der Ras/MAPK-Kaskade nicht zur Steigerung des Kohlenhydratstoffwechsels, der Glykogensynthese oder der Akkumulation von cAMP, sondern zur Regulation der Mitogenese und Zelldifferenzierung. Die Kaskade verläuft über das Schlüsselmolekül *extracellular activated kinase* (ERK), die wiederum als Substrate verschiedene Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel Elk-1, SRC-1, c-fos, c-jun, c-myc, Pax6, NFAT, MEF-2 und STAT3 aktiviert (Krishna und Narang, 2008, Übersichtsartikel). Elk-1 ist das bestuntersuchte Zielmolekül von ERK. Durch seine Aktivierung wird sowohl die mRNA als auch das Protein von c-fos stabilisiert. C-fos wiederum initiiert als Transkriptionsfaktor die Aktivierung bestimmter Gene, die für die Proliferation und Differenzierung von Zellen notwendig sind.

In ihren physiologischen Konzentrationen erzielen Insulin, IGF1 und 2 trotz ihrer Gemeinsamkeiten durchaus divergente Zellreaktionen. Diese Divergenz wird durch die Expression der Rezeptoren in der Zelle, deren verschiedenen Bindungseffizienzen zu den Liganden und die Präferenz der Rezeptoren für bestimmte intrazelluläre Signalmoleküle wie zum Beispiel die Insulinrezeptorsubstrate (IRS) bedingt. Die Geschwindigkeit der Autophosphorylierungsreaktion

nach der Ligandenbindung bestimmt ganz wesentlich, welche der beiden Signalkaskaden, der PI3-K/AKT-Kinase- oder die Ras/MAPK/ ERK-abhängige Weg, in der Zelle abläuft.

Untersuchungen zu Insulin- und IGF-Signalwegen an Präimplantationsembryonen sind wegen der geringen Mengen an Untersuchungsmaterial schwierig. Eine Zuordnung der Abläufe der IGF-abhängigen Signalwegsaktivierung im Embryoblasten und Trophoblasten, wie wir sie in Kaninchen durchgeführt haben, ist bisher einmalig und macht die Vorteile der Kaninchenblastozyste als Untersuchungsobjekt deutlich. Die „Kartierung“ der Rezeptoren im Embryoblasten und Trophoblasten ergibt ein Gesamtbild der Rezeptorpräsentation im Blastozystenstadium. Ausgehend davon und durch die weitere, zelllinienspezifische Analyse der AKT- und ERK-Phosphorylierung und deren Zielgenaktivierung nach Insulin- bzw. IGF1- und IGF2-Stimulation, lassen sich Rückschlüsse auf die Funktion des IIRS im Embryoblasten oder Trophoblasten ziehen. Die Ergebnisse zur Signaltransduktion der insulinartigen Wachstumsfaktoren in der Kaninchenblastozyste wurden schematisch in Abbildung 3 zusammengefasst. Die Wirkungen von Insulin und IGF im Embryoblasten und Trophoblasten sind unterschiedlich. Die Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels findet nur durch Insulin und auch nur in den Trophoblastzellen über den PI3-K/AKT-Signalweg statt. Eine Aktivierung von AKT gibt es nachweislich auch durch IGF1 und 2 in den Embryoblastzellen. Sie führt dort aber nicht zur Regulation der metabolischen Markergene Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) und Hexokinase (Navarrete Santos et al. 2008).

Die Zielgene einer IGF-abhängigen AKT-Aktivierung im Embryoblasten sind zurzeit noch nicht bekannt. Der Transkriptionsfaktor CREB wird durch Insulin und beide IGFs PI3-K/AKT-abhängig phosphoryliert und ist hauptsächlich im Embryoblasten exprimiert (Schindler, Navarrete Santos, unveröffentlicht). Die CREB-Phosphorylierung in der Blastozyste korreliert mit der Unterdrückung der Genexpression von Adiponektin. Eine noch zu überprüfende Hypothese ist, ob die Synthese des Hormons Adiponektin durch die insulinartigen Wachstumsfaktoren in der Blastozyste reguliert wird. In der Zellkultur von 3T3-L1-Adipozyten wurde die Regulation des Adiponektingens durch CREB bereits nachgewiesen, allerdings steigert pCREB dort die Adiponektintranskription (Kim et al. 2010).



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der (A) insulin- und (B) IGF-abhängigen Signalwege in Embryo- und Trophoblastzellen der Kaninchenblastozyste

Die Darstellung gibt eine Übersicht über die experimentell bestätigten Moleküle im PI3-K/AKT- und im RAS/MAPK/ERK-Signalweg. Dafür wurden 6 Tage alte Kaninchenblastozysten *in vitro* mit Insulin, IGF1 oder 2 kultiviert und die Phosphorylierung von Poteinkinase B (pAKT), der *extracellular activated kinase* (pERK), der *cAMP response element binding protein* (pCREB) und die Transkription der Hexokinase (HK), Phosphoenolpyruvat-Carboxygenase (PEPCK), der Transkriptionsfaktoren c-fos und Brachyury, des *wingless-type MMTV type 3A* (WNT3A) und des Anti-Apoptoseproteins Bcl-xL bestimmt. Die Abbildung erfasst publizierte Daten zu Insulin (Navarrete Santos et al. 2004b), IGF1 (Navarrete Santos et al. 2008) und unveröffentlichte Ergebnisse zu IGF2 (Dr. Nicole Ramin, Dissertation, 2009) und CREB (Maria Schindler, Anne Navarrete Santos, unveröffentlicht). (IR; Insulinrezeptor, IGF1R; IGF1-Rezeptor)

Die Bedeutung Insulins als Wachstums- und Differenzierungsfaktor für den Embryo wird während der Gastrulation der Keimscheibe besonders deutlich. Insulin nimmt über die Ras/MAPK-Signalkaskade direkten Einfluss auf die Ausbildung des Mesoderms und stimuliert die Expression von wnt3A und des mesodermalen Transkriptionsfaktors Brachyury (Thieme et al. 2011, in Revision).

### **3.1 Die Insulin und IGF-abhängige Signaltransduktion und die Regulation von Insulin/IGF1-Zielgenen im Embryoblasten und Trophoblasten der Kaninchenblastozyste**

Verweis auf den Anhang Seiten 55-75. Das Kapitel wurde beschrieben und publiziert in den Manuskripten:

Navarrete Santos A, Tonack S, Kirstein M, Pantaleon M, Kaye P, Fischer B (2004) Insulin acts via mitogen-activated protein kinase phosphorylation in rabbit blastocysts. REPRODUCTION 128: 517-26

Navarrete Santos A, Ramin N, Tonack S, Fischer B (2008) Cell lineage specific signalling of insulin and insulin like growth factor (IGF1) in rabbit blastocysts, ENDOCRINOLOGY 149: 515-24

### **3.2 Der insulinstimulierte Glukosetransport in embryonalen Zellen**

Die wichtigste Kohlenhydratquelle, mit der der Embryo versorgt werden muss und die über die Mutter zum Embryo transportiert wird, ist Glukose. Die Bedeutung von Glukose und den Glukosetransportproteinen in Präimplantationsembryonen haben wir in einem Übersichtsartikel beschrieben (Fischer und Navarrete Santos, 2003). Auf diesen Artikel wird hier als Einleitung verwiesen. Im nachfolgenden Abschnitt soll auf die besondere Bedeutung des insulinabhängigen Glukosetransports eingegangen werden.

Die Glukosetransporter werden in der Präimplantationsentwicklung abhängig vom Entwicklungsstadium exprimiert (Augustin et al. 2003). Sie bleiben auch in der embryonalen Zelldifferenzierung für den jeweiligen Zelltyp spezifisch (Tonack et al. 2006). Bei Muskelzellen und Adipozyten wird die Glukoseaufnahme durch die insulininduzierte Translokation des Glukosetransporters 4 in die Plasmamembran gesteigert. Deshalb liegt es nahe, auch bei der insulinresistenten Blastozyste einen solchen Mechanismus zu vermuten. Wie wir beim Rind, beim Kaninchen und auch der Maus zeigen konnten, ist der insulinabhängige GLUT4 in der expandierten Blastozysten nachweisbar (Navarrete Santos et al. 2000, Navarrete Santos et al. 2004 a, Tonack et al. 2004). Dagegen gibt es auch Spezies wie den Hamster, die keine Expression

von GLUT4 aufweisen (Tonack et al. 2009), oder die Maus, bei der die Expression in der Präimplantationsblastozyste abhängig vom Mausstamm ist (Tonack et al. 2004). Dass Insulin und auch IGF1 die Glukoseaufnahme in der Mausblastozyste in vitro steigern, wurde bereits 1996 durch Pantaleon und Kaye bewiesen. Beim Kaninchen dagegen wird nur die GLUT4-Transkription durch Insulin gesteigert, nicht die Glukoseaufnahme selbst (Navarrete Santos et al. 2004 a). Die insulinabhängige GLUT4-Translokation wie in Muskel- und Fettzellen findet hier nicht statt. In der Kaninchenblastozyste werden die Translokation des GLUT4 und eine Steigerung der Glukoseaufnahme durch ein weiteres embryo-maternales Hormon, durch Adiponektin, ausgelöst (Fischer et al. 2010).

### **3.3 Die Expression von Glukosetransportern in Blastozysten und embryonalen Stammzellen**

Verweis auf den Anhang Seiten 83-132. Das Kapitel wurde beschrieben und publiziert in den Manuskripten:

Navarrete Santos A, Augustin R, Lazzari G, Galli C, Sreenan JM, Fischer B (2000) The insulin-dependent glucose transporter isoform 4 is expressed in bovine blastocysts. *BIOCHEM BIOPH RES COMMUN* 271: 753-760

Augustin R, Pocar P, Navarrete Santos A, Wrenzycki C, Gandolfi F, Niemann H, Fischer B (2001) Glucose transporter expression is developmentally regulated in in vitro derived bovine preimplantation embryos. *MOL REPROD DEV* 60: 370-376

Tonack S, Fischer B, Navarrete Santos A (2004) Expression of the insulin-responsive glucose transporter isoform 4 in blastocysts of C57/BL6 mice. *ANAT EMBRYOL* 208: 225-30

Fischer B, Navarrete Santos A (2003) Glukose, Insulin und Glukosetransporter: Bedeutung und Weichenstellung für die Embryonalentwicklung. *REPRODUKTIONSMEDIZIN* 19: 195-201

Tonack S, Rolletschek A, Wobus AM, Fischer B, Navarrete Santos A (2006) Differential expression of glucose transporter isoforms during embryonic stem cell differentiation. *DIFFERENTIATION* 74: 499-509

Tonack S, Ramin N, Garimella S, Rao R, Seshagiri PB, Fischer B, Navarrete Santos A (2009) Expression of glucose transporter isoforms and of the insulin receptor during hamster preimplantation embryo development. *ANN ANAT* 191: 485-95

Fischer S, Navarrete Santos A, Thieme R, Ramin N, Fischer B (2010) Adiponectin Stimulates Glucose Uptake in Rabbit Blastocysts. *BIOL REPROD* 83: 859-65

#### 4 Wechselwirkung des maternalen und embryonalen IIRS

Die maternalen IGFs sind die bestimmenden Faktoren in der fötalen Wachstumsregulation. Das wird durch die positive Korrelation der IGF-Konzentrationen im Blutserum der Mutter und dem Geburtsgewicht der Föten deutlich. Im Tierversuch resultiert sowohl eine von außen zugeführte als auch eine endogene Erhöhung der IGF-Konzentration der Mutter in einer Steigerung des fötalen Wachstums (Übersichtsartikel, Sferruzzi-Perri 2010). Da Insulin, IGFs und auch das Wachstumshormon (GH) nicht die Plazenta passieren können (Davenport et al. 1990), erklärt sich der Wachstumseffekt aber nicht, wie anzunehmen wäre, mit einer direkten Wirkung der IGFs auf die fötalen Gewebe. Er wird indirekt über das Nährstoffangebot und Stoffwechselprodukte der Mutter und die Regulation der Plazentafunktion übertragen. Der humane Fötus selbst ist in der Lage, IGF1 und 2 und bereits in der 11. Entwicklungswoche Insulin zu produzieren (Reiher et al. 1983).

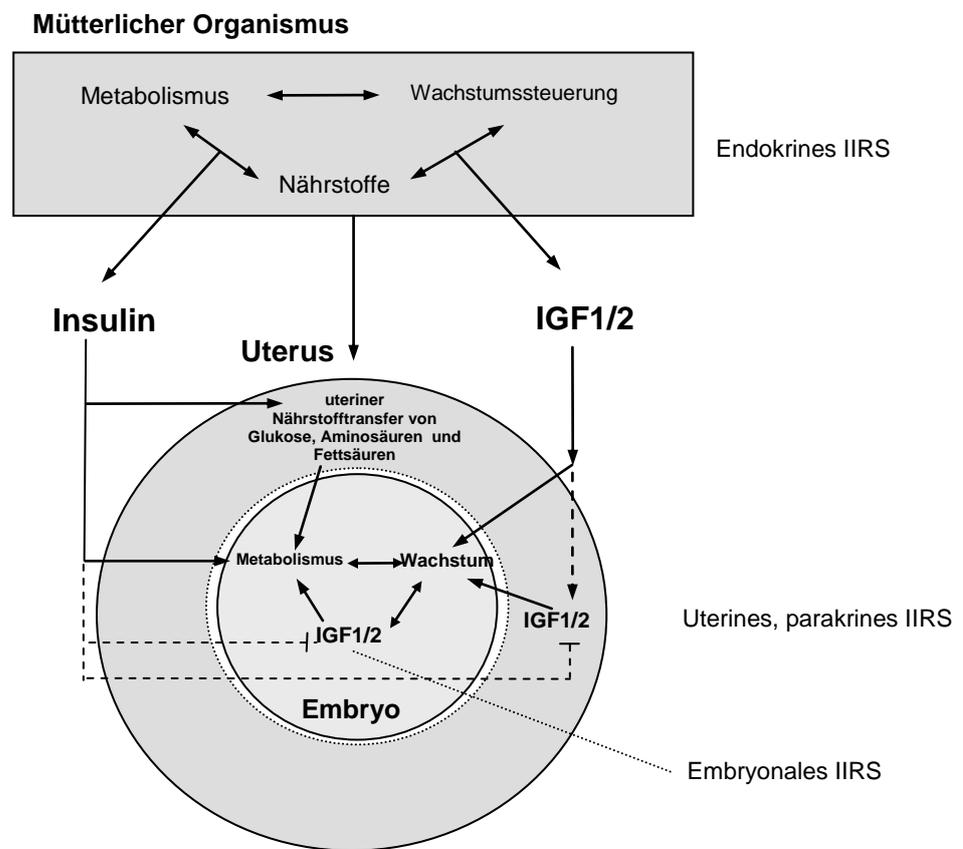
Im besonderen Fall der frühen Embryogenese gibt es die zugleich abgrenzende und verbindende Plazenta zwischen Embryo und Mutter noch nicht. Hier erreichen Insulin und die maternalen IGF aus dem Blutkreislauf über das Uterussekret den Embryo. Zusätzlich wird im Uterus IGF lokal produziert (Abb. 2). In dieser Phase der Entwicklung wirken Insulin und die IGF direkt als Mediatoren zwischen Stoffwechsel und der hormonellen Regulation der Mutter einerseits und dem Wachstum und Differenzierung des Embryos andererseits. Das IIRS verbindet sowohl die Kinetik der frühen Embryonalentwicklung als auch die Stoffwechselprozesse von Mutter und Embryo miteinander.

Zwischen dem mütterlichen und dem embryonalen IIRS ergeben sich drei regulatorische Ebenen,

- die zentrale, maternale Regulation von Insulin (durch die glukoseabhängige Synthese im Pankreas) und der IGFs (hauptsächlich durch die Wachstumshormon-abhängige Synthese in der Leber) = **endokrines IIRS**
- die lokale, maternale Regulation durch parakrines IGF im Uterus = **parakrines, uterines IIRS**
- und lokale, embryonale Regulation durch autokrines/parakrines IGF = **parakrines, embryonales IIRS**

Diese Ebenen sind miteinander eng verknüpft. Während die hormonellen Regelkreise zwischen IGF1 und GH innerhalb eines Organismus schon recht gut verstanden sind, sind die Wechselwirkungen in der Zeit der Präimplantationsphase noch weitgehend unklar. Das liegt zum einen an der kurzen Zeitspanne mit nur geringen Mengen an Untersuchungsmaterial, der

divergenten Regulation der zirkulierenden und lokalen IGFs, und zum anderen an ethischen Gründen, die Untersuchungen an humanen Embryonen unterbinden. In verschiedenen Tiermodellen wird deshalb der Zusammenhang rekonstruiert, wobei die Besonderheiten der frühen Embryogenese der verschiedenen Säugetierspezies berücksichtigt werden müssen. Wie andere endokrine Regelkreise unterliegt das IIRS-System einer Rückkopplungskontrolle zwischen der Konzentration der Liganden und der Expression der Rezeptoren in den Zielzellen.



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Wechselwirkungen des IIRS zwischen Mutter und Blastozyste

Durchgezogene Linie = Wirkungen außerhalb des IIRS auf Biosynthese, Nährstofftransport, Proliferation und Differenzierung, gestrichelte Linie = Rückkopplungsregulation innerhalb des IIRS

Das Zusammenspiel von Insulin und IGF ist in der Funktion synergistisch, und gewährleistet eine Kopplung vom Nährstoffangebot der Mutter mit der metabolischen Regulation und dem Wachstum des Embryos. Dabei erfüllt Insulin als metabolischer Sensor eine übergeordnete Rolle (Abb. 4). Das wird dadurch deutlich, dass Insulin die lokale IGF-Synthese inhibiert. Ein Verlust an mütterlichem Insulin wie zum Beispiel durch einen Diabetes mellitus Typ 1 steigert sowohl die uterine als auch die embryonale IGF-Synthese und somit die lokale Konzentration von IGF. Beim Kaninchen ist Insulin der Regulator der IGF-Transkription im Uterus und in Blastozysten. Bei einem Mangel an Insulin wird die IGF-Transkription forciert, was zu einem Anstieg (ca. 1,6-fach) des IGF1 in der Blastozyste führt (Thieme, Schindler unveröffentlicht, 2011). Durch einen Diabetes der Mutter wird sowohl die hepatische als auch die uterine IGF-Synthese verändert, was sich auf das embryonale IIRS auswirkt (Ramin et al. 2010, siehe auch Kapitel 4.1.).

Aus der daraus resultierenden Erhöhung der lokalen IGF1-Menge ist erklärbar, dass sich die Embryonen trotz Insulinmangel bei einem Diabetes mellitus oder in Fastenzeiten entwickeln, wobei es aber aufgrund der unterschiedlichen Potenz der Liganden zu Divergenzen in der Entwicklungsgeschwindigkeit kommt. Kaninchenblastozysten aus diabetischen Mäusen sind in ihrer Entwicklung um ca. 5-12 Stunden verzögert. Ihre Gastrulation beginnt verspätet. In der In-vitro-Kultur ist nur unter Zugabe von Insulin und IGF1 die Gastrulationsinitiation des Embryoblasten möglich, wobei dabei Insulin zu einer deutlich schnelleren Entwicklung führt als IGF1 (Thieme et al. 2011 in Revision)

Die Stellvertreter des Insulins in seiner Funktion als Proliferationsfaktor sind die autokrin/parakrin-wirkenden IGFs. Hier sei das Bild „einer Familie“ erlaubt, in der entweder ein großer „Bruder“ (symbolisiert hier Insulin) oder, wenn der große Bruder nicht da ist, die zwei kleineren Brüder (symbolisch für IGF1 und IGF2) einen „Karren“ (symbolisch für die Blastozyste) anschieben. Mit diesem Bild kann man sich den wesentlichen Inhalt der Familienbande zwischen Insulin und IGFs und ihren Beitrag zur Blastozystenreifung und Gastrulation verdeutlichen.

Den proliferativen „Schub“ (proliferative Wirkung) erbringen die IGFs aber nur bzw. zum größten Teil im Embryoblasten. Bedingt durch die zelltypabhängige Synthese der Rezeptoren und dem großen Anteil der Liganden in den Embryoblastzellen (Abb. 1) bleibt deren Wirkung im Wesentlichen auf die Keimscheibe konzentriert.

Worin Insulin durch die IGFs nicht vertreten werden kann, ist die Regulation des Stoffwechsels und die Aufrechterhaltung der Energiebalance in der Trophoblastzelle. Unsere derzeitige Arbeitshypothese ist, dass unter Insulinmangel das IIRS ein weiteres Hormon als Stellvertreter einschaltet. Es wird dort gebraucht, wo die metabolische Funktion des Insulins wegfällt und die

Energiesynthese umgestellt werden muss. Im Falle der Blastozyste ist diese Funktion des Insulins vorrangig im Trophoblasten zu vertreten.

Ein Hormon, das den Glukose- und Fettstoffwechsel kontrolliert und damit als potentieller "Stellvertreter" und Vermittler in Frage käme, wäre Adiponektin. Seine Funktion in der frühen Embryogenese ist bisher beim Menschen wenig untersucht. In der Kaninchenblastozyste wird Adiponektin im Blastozystenstadium im Trophoblasten und Embryoblasten exprimiert (Schmidt et al. 2008, Fischer et al. 2010), während die Adiponektinrezeptoren (ADIPO-R) 1 und 2 hauptsächlich im Trophoblasten vorhanden sind (Schmidt et al. 2008). Die Verteilung der Adiponektinrezeptoren wurde von uns anhand der ADIPO-R-RNA-Mengen im Embryoblasten und Trophoblasten abgeleitet. Eine Aussage zur ADIPO-R-Proteinmenge fehlt in Ermangelung geeigneter Nachweisverfahren. Im Uterussekret und im Endometrium gravider Kaninchen ist Adiponektin vorhanden (Schmidt et al. 2008). Bemerkenswert ist, dass in der In-vitro-Kultur von Kaninchenembryonen Adiponektin die Glukoseaufnahme über GLUT4 im Trophoblasten steigern kann (Fischer et al. 2010).

Die Regulation der Adiponektinsynthese ist eng mit dem IIRS verknüpft. Der potentielle molekulare Schalter ist der Transkriptionsfaktor CREB, der durch Insulin und IGF in der Blastozyste phosphoryliert wird (Abb. 3, Schindler, Navarrete Santos unveröffentlicht). Das Adiponektin enthält eine CREB-Bindungsstelle im Promotorbereich und kann deshalb als Zielgen der CREB-artigen Transkriptionsfaktoren angenommen werden (Ling et al. 2009). Bei der langfristigen In-vitro-Stimulation mit Insulin und IGF1 von Blastozysten beobachten wir im Unterschied zur In-vitro-Adipozytenkultur (Kim et al. 2010) eine inverse Korrelation der CREB-Phosphorylierung (Zunahme) und der embryonalen Adiponektinsynthese (Abnahme). Eine inhibitorische Genregulation durch CREB wird über den *activating transcription factor* (ATF) 3 vermittelt (Ling et al. 2009). ATF 3 wird in der Kaninchenblastozyste mit CREB koexprimiert (Schindler, Navarrete unveröffentlicht.) Die Zusammenhänge der embryonalen Adiponektinsynthese werden von uns derzeit untersucht. Die Expressionsmuster von CREB und ATF 3 und die Effekte der In-vitro-Stimulation mit Insulin, IGF und Adiponektin unterstützen unsere Arbeitshypothese, dass Adiponektin bei Insulinmangel die metabolische Regulation des Trophoblasten steuert und dass die Adiponektinsynthese im Trophoblasten über die parakrine IGF-Synthese vermittelt wird.

Die Wechselwirkungen des IIRS zwischen Mutter und Embryo ermöglichen dem Embryo, sich auf die äußeren Bedingungen optimal einzustellen. Die „Kommunikation“ durch das glukoseregulierte Insulin der Mutter und seine Rückkopplungsregulation zum lokalen IGF-System passen den

Metabolismus des Embryos an die Nährstoffverfügbarkeit und die daraus resultierenden Wachstums- und Entwicklungsgeschwindigkeit an.

#### **4.1 Auswirkung eines maternalen Diabetes mellitus auf den Präimplantationsembryo**

Die endokrine Kopplung des mütterlichen Stoffwechsels an das embryonale Wachstum stellt ein wirksames System in der Anpassung des Embryos an die Entwicklungsbedingungen *in utero* dar. Es birgt aber dann ein Risiko für den Embryo, wenn die Kopplung und damit die „Fernsteuerung“ des embryonalen und die Synchronisierung des maternalen und embryonalen Metabolismus ausfällt. Eine Störung in der Insulinverfügbarkeit tritt zum Beispiel beim Diabetes mellitus auf.

Diabetes mellitus ist eine Erkrankung des endokrinen IIRS. Das Leitsymptom des Diabetes mellitus ist die Hyperglykämie. Bedingt wird ein Diabetes mellitus durch einen absoluten oder relativen Mangel an oder einen Sensitivitätsverlust gegenüber Insulin, was dann zur Störung des Glukosemetabolismus führt.

Beim Diabetes mellitus Typ 1 (DT1) wird ein absoluter Insulinmangel durch eine autoimmune Zerstörung der Beta-Zellen hervorgerufen, die meist bei Patienten im jugendlichen Alter bis zu 30 Jahren im Zusammenhang mit einer viralen Infektion auftritt. Etwa 10% der diabetischen Erkrankungen entfallen auf DT1. 90% der diagnostizierten Fälle sind Erkrankungen des Diabetes mellitus Typ 2 (DT2), der durch eine Insulinresistenz und einen relativen Insulinmangel charakterisiert ist.

DT2 tritt häufig im späteren Erwachsenenalter auf und ist meist mit Übergewicht und dem Metabolischen Syndrom verbunden. Im Jahr 2007 lag die Diabetesprävalenz in Deutschland bei 8,9%, d.h. zu diesem Zeitpunkt gab es allein in Deutschland über 7 Mio. Menschen, die wegen eines Diabetes mellitus behandelt wurden (alle Zahlenangaben zu Deutschland aus dem „Deutschen Gesundheitsbericht Diabetes 2010“, diabetesDE 2009). Am Diabetes Typ 1 sind zurzeit ca. 350.000 Menschen (5–10%) erkrankt, davon sind ca. 15.000 Kinder und Jugendliche im Alter bis zu 14 Jahren. Jährlich werden zwischen 2.100 und 2.300 Neuerkrankungen in dieser Altersgruppe registriert. Insgesamt zählen 80.000 Erwachsene im Alter bis 40 Jahre als Diabetiker. Wie der Report der Deutschen Diabetes Gesellschaft schreibt, gehen ca. 0,8% der Schwangerschaften mit einem DT1 oder 2 (prägestational) einher, was pro Jahr rechnerisch einer Zahl von ca. 5.400 Kindern von diabetischen Müttern (bezogen auf die Geburtenrate 2009) entspricht. In den USA wird bei ca. 2-10% der schwangeren Frauen ein Gestationsdiabetes

diagnostiziert (National Diabetes Fact Sheet, USA, 2011), wobei noch eine weitaus höhere Anzahl vermutet wird, da beim Einsatz genauerer Analytik der Wert in internationalen Studien bei ca. 18% der Schwangerschaften liegt (National Diabetes Fact Sheet, USA, 2011).

Bevor 1922 die Insulintherapie zur Behandlung des Diabetes mellitus eingeführt wurde, galten Diabetikerinnen als infertil. Mit der Insulintherapie konnten die Erfolgchancen auf eine Schwangerschaft deutlich verbessert werden. Die Schwangerschaftsrate von diabetischen Frauen in den USA liegt heute bei 90% (ADA, 2007). Trotz der medizinischen Betreuung diabetischer Mütter kommt es in ca. 15% der Schwangerschaften zu Abort oder Frühgeburt und bei 9-20% der Kinder werden kongenitale Erkrankungen und Fehlbildungen festgestellt (Casson et al. 1997, Penney et al. 2003, Verheijen et al. 2005). Eine metabolische Störung wird bei ca. 45% der Neugeborenen diabetischer Mütter diagnostiziert (Yang et al. 2006). Der Diabetes der Mutter stellt ein Gesundheitsrisiko für das Kind dar.

Untersuchungen, die die Ursachen der gestörten embryo-maternalen Interaktion bei Diabetikerinnen klären können, sind an menschlichen Embryonen oder an Schwangeren aus ethischen Gründen nicht möglich. Durch diabetische Versuchstiermodelle können die Auswirkungen eines mütterlichen Diabetes und dessen Tragweite für Gesundheit der Nachkommen genauer untersucht werden. Insbesondere bei Mäusen gibt es durch die Stilllegung einzelner Gene (*knockout*, KO) und die Generierung transgener Mauslinien die Möglichkeit, den Beitrag bestimmter Moleküle zu diabetogenen Stoffwechselstörungen aufzuklären (Plum et al. 2005, Übersichtsartikel).

Eines der ersten Moleküle war der Insulinrezeptor, dessen vollständiger IR-*knockout* in den ersten Lebenstagen zum Tod durch eine diabetische Ketoazidose führt (Accili et al. 1996, Joshi et al. 1996). Der heterozygote IR-*knockout* dagegen ist lebensfähig und entwickelt keinen Diabetes mellitus, was beweist, dass eine 50%ige Expression des IR ausreichend ist, um die Blutglukoseregulation zu sichern (Accili et al. 1996). Durch gewebeabhängige IR-Knockoutmodelle z.B. FIRKO (fettspezifischer IRKO) oder MIRKO (muskelspezifischer IRKO), wird die organspezifische Funktion bei der Entstehung des Diabetes deutlich (Plum et al. 2005, Übersichtsartikel). Neben den „kleinen“ Versuchstieren sind auch transgene Linien bei Schweinen in der Entwicklung, bei denen im Großtiermodell die Entstehung einer diabetischen Stoffwechselstörung nachgestellt und erforscht wird (Aigner et al. 2010, Renner et al. 2010).

Zur Generierung der diabetischen Tiermodelle in der Präimplantationsentwicklung werden verschiedene Ausgangssituationen genutzt. Einerseits besteht die Möglichkeit der Induktion eines Diabetes durch die Zerstörung der Beta-Zellen durch chemische Stoffe wie Alloxan und Streptozotocin (experimenteller DT1) (Lenzen 2007). Andererseits kann der Diabetes durch die Fütterung der Versuchstiere mit hochkalorischen Diäten (experimenteller DT2) ausgelöst werden. Neben dem experimentellen Ansatz gibt es auch den genetischen, bei dem die Tiere aufgrund ihrer genetischen Linie spontan einen diabetischen Phänotyp entwickeln (Ratte: DeHertogh et al. 1992, Lea et al., 1996, Hamster: Funaki and Mikamo, 1983; Maus: Moley et al. 1991, Moley et al. 1999, Colton et al. 2003), oder durch eine selektive Mutation bestimmter Gene (Ratte: Chieri et al. 1969, Vercheval et al. 1990, Maus: Diamond et al. 1989) diabetisch werden.

Bei Versuchstieren mit einem Diabetes mellitus ist die Anzahl der Embryonen deutlich verringert (Vercheval et al. 1990, DeHertogh et al. 1992, Lea et al. 1996, Ramin et al. 2010). In direkter Korrelation dazu wird auch eine niedrigere Follikelzahl gezählt (Chang et al. 2005, Ramin et al. 2010), was nahelegt, dass durch den Diabetes mellitus die Eizellreifung gestört ist. Zusätzlich ist der Anteil an fehlgebildeten Embryonen in diabetischen Mäusen deutlich erhöht (Pampfer et al. 1997). Im Blastozystenstadium weist der Embryo aus diabetischen Mäusen insgesamt 15-20% weniger Zellen auf, wobei die Reduktion zu 2/3 die Embryoblastzellen betrifft. Dieser Zellverlust wird auf eine Erhöhung der apoptotischen Zellen durch die hyperglycämische Glukosekonzentration und Glukosemetabolite zurückgeführt (Pampfer et al. 1997).

#### **4.2 Das Kaninchen als Versuchstiermodell eines Diabetes Typ 1 in der Frühschwangerschaft**

Eine Untersuchung der komplexen Zusammenhänge zwischen Mutter und Embryo in isolierten Systemen, z.B. Zellkultur oder Embryonenkultur, ist nicht möglich und begründet die Notwendigkeit von Tiermodellen. Mit den Untersuchungen an Blastozysten aus diabetischen Kaninchen wurden erstmalig die maternale Stoffwechselstörung durch den DT1 und Entwicklung, Stoffwechsel und Gastrulation der Säugetierblastozyste in einem Reproduktionsmodell miteinander verknüpft.

Der DT1 wurde bei den Kaninchen experimentell durch die diabetogene Chemikalie Alloxan induziert (Ramin et al. 2010). Alloxan wird auch bei anderen Versuchstieren zur Erzeugung eines experimentellen DT1 eingesetzt, da es selektiv nur die pankreatischen Beta-Zellen zerstört und keinen Effekt auf die anderen Inselzellen zeigt (Hansen et al. 2007, Lengyel et al. 2008). Im Blut hat Alloxan nur eine kurze Halbwertszeit von 1,5min. Es zerfällt in nicht-toxische Produkte und wird über die Nieren ausgeschieden. Alloxan entfaltet seinen toxischen Effekt auf die Beta-Zellen

im Pankreas durch die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die bei der Reduktion des Alloxan entstehen. Durch die hohe intrazelluläre Konzentration der ROS wird die Nekrose, der provozierte Zelltod, der Beta-Zellen eingeleitet.

Die Versuchsbedingungen wurden so gewählt, dass die Kaninchen einen Blutglukosewert von 14-24mmol/L über den gesamten Zeitraum der Gravidität hatten, wobei den Tieren während der Fütterungsphasen ca. 1-2 IU Insulin s.c. gespritzt wurden. Im Uterussekret diabetischer Kaninchen spiegeln sich die Änderungen im Nährstoffangebot korrespondierend zu den mütterlichen Serumwerten wider. Die Insulinkonzentration ist gering und im Uterus nicht nachweisbar, während sich die Glukosekonzentration um das 3fache erhöht.

Wie bei Patientinnen mit einem Diabetes mellitus zeigen auch diabetische Kaninchen Fertilitätsstörungen. Sie haben deutlich weniger Präimplantationsembryonen als normoglykämische Kontrollen. Blastozysten aus diabetischen Kaninchen sind in ihrem Glukosestoffwechsel gestört und in ihrer Gastrulationsentwicklung verzögert (Ramin et al. 2010).

Eine Ursache für die Entwicklungsstörung ist der Mangel an Insulin, dessen Wirkung als endokriner, mitogener Wachstumsfaktor nur zum Teil durch das lokale, parakrine IGF-System ausgleichend werden kann. Kompensatorisch zum Verlust des Insulins und endokrinen IGF1 (durch die stoffwechselbedingte Inhibition der Leber-IGF1-Synthese) wird im Uterus und in der Blastozyste die Synthese von IGF1 und 2 induziert (Schindler, Mühleck, Navarrete Santos, unveröffentlicht, Abb. 5).

Die Initiation der Mesodermentwicklung durch die Transkriptionsfaktoren Brachyury und der wnt3A-Signalkaskade sind in Kaninchenblastozysten insulinabhängig (Thieme et al. 2011, in Revision). In den diabetischen Embryonen erfolgt dieser erste Gastrulationsschritt verzögert. Obwohl die IGF1-Menge im Uterussekret diabetischer Muttertiere nachweisbar ansteigt, kann IGF1 die Wirkung von Insulin in der Gastrulation nicht vollständig ersetzen. Diese Beobachtung im „diabetischen Kaninchenmodell“ wird durch In-vitro-Stimulationsversuche bestätigt. Auch dabei wird durch Zusatz von Insulin im Medium eine deutlich bessere Entwicklung erreicht als durch IGF1 (Thieme et al. 2011 in Revision).

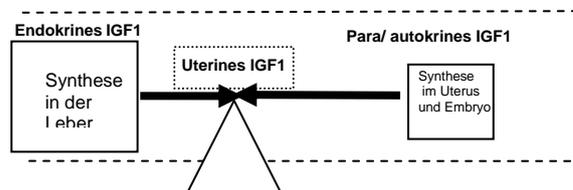
### Abb. 5 IGF1-Balance im graviden Uterus

Das Schema verdeutlicht die Bereitstellung von endokrinem und parakrinem IGF1 im Uterus während der Präimplantationsphase (beim Kaninchen).

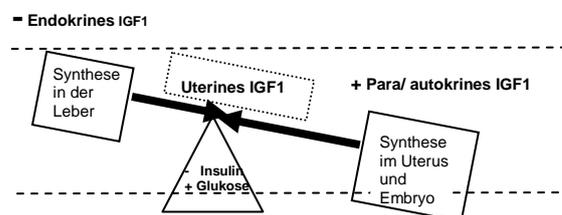
In (A) sind die Verhältnisse im stoffwechselgesunden Muttertier dargestellt, bei der das endokrine IGF1 (Synthese in der Leber) wesentlich zur uterinen IGF1-Verfügbarkeit beiträgt.

(B) Im Falle eines experimentellen Diabetes mellitus Typ 1 (DT1) wird die hepatische IGF1-Synthese inhibiert, was sich im Abfall der maternalen Serumwerte ausdrückt. Kompensatorisch für den Verlust von Insulin und Leber-IGF1 steigt die embryonale und uterine Syntheserate für IGF1 an. Der Blastozyste einer diabetischen Mutter weist eine höhere IGF1-Konzentration auf als Blastozysten aus stoffwechselgesunden Müttern.

#### A) Gesunde Schwangerschaft



#### B) DT1- Schwangerschaft



Gleichzeitig mit der gesteigerten embryonalen IGF-Synthese geht die Herabregulation des IR und der IGF1-Rezeptorexpression einher, was zur Einschränkung der Rezeptivität und der Aktivierbarkeit des Signalkaskaden führt (Ramin et al. 2010). Obwohl dem diabetesbedingten Insulinmangel der Mutter ein relativer Überschuss an IGF im Uterus entgegengesetzt wird, bleibt das IIRS des Embryos durch den Rezeptormangel gestört. Diese Dysregulation könnte die Ursache für die verzögerte Entwicklung und die Erhöhung der Apoptoserate in Blastozysten aus diabetischen Versuchstieren sein (Ramin et al. 2010).

Die metabolische Adaptation des Embryos erscheint unter diabetischen Bedingungen mit Insulinmangel und Glukoseüberschuss besonders schwierig. Der Glukosemetabolismus ist durch die Inhibition der insulinabhängigen Enzyme (Hexokinase, PEPCK) empfindlich gestört (Ramin et al. 2010). Die Anpassung des Embryos und die Sicherung der Nährstoffversorgung über das IGF1-Adiponektin-CREB-System unter diabetischen Entwicklungsbedingungen könnten einen potentiellen Ausgleich schaffen. Diese Hypothese untersuchen wir zurzeit im Tierversuchsmodell.

Bekannterweise wird der engen Überwachung und Blutzuckerkontrolle diabetischer Frauen während der Schwangerschaftsbetreuung viel Aufmerksamkeit gewidmet. Die Erkenntnisse über die Effekte eines Diabetes mellitus auf die früheste Schwangerschaftsphase verdeutlichen die

dringende Notwendigkeit der intensiven Abklärung und vorkonzeptionellen Beratung von Frauen mit einem Risiko für Diabetes mellitus.

#### **4.3 Auswirkung eines Diabetes mellitus auf die frühe Embryogenese und das Insulin-IGF-Rezeptor System (IIRS) beim Kaninchen**

Verweis auf den Anhang Seiten 132-166. Das Kapitel wurde beschrieben und publiziert in den Manuskripten:

Ramin N, Thieme R, Fischer S, Schindler M, Schmidt T, Fischer B, Navarrete Santos A (2010) Maternal diabetes impairs gastrulation and insulin and IGF-I receptor expression in rabbit blastocysts. *ENDOCRINOLOGY*, 151: 4158-67

Thieme R, Ramin N, Fischer S, Püschel B, Bernd Fischer, Navarrete Santos A (2011) Gastrulation in rabbit blastocysts depends on insulin and the insulin-like-growth-factor 1, *Mol Cell Endo*, Im Druck

## 5 Literaturverzeichnis

- Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, Asico LD, José PA, Taylor SI, Westphal H (1996) Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet* 12: 106-9
- Aigner B, Rathkolb B, Herbach N, Hrabé de Angelis M, Wanke R, Wolf E (2008) Diabetes models by screen for hyperglycemia in phenotype-driven ENU mouse mutagenesis projects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E232-240
- Allan GJ, Flint DJ, Darling SM, Geh J, Patel K (2000) Altered expression of insulin-like growth factor-1 and insulin like growth factor binding proteins-2 and 5 in the mouse mutant Hypodactyly (Hd) correlates with sites of apoptotic activity. *Anat Embryol (Berl)* 202: 1-11
- Allan GJ, Flint DJ, Patel K (2001) Insulin-like growth factor axis during embryonic development. *Reproduction* 122: 31-9, Review
- Augustin R, Pocar P, Navarrete Santos A, Wrenzycki C, Gandolfi F, Niemann H, Fischer B (2001) Glucose transporter expression is developmentally regulated in in vitro derived bovine preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 60: 370-376
- Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A (1993) Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 75: 73-82
- Bhaumick B, Bala RM (1987) Receptors for insulin-like growth factors I and II in developing embryonic mouse limb bud. *Biochim Biophys Acta* 927: 117-28
- Bolton VN, Oades PJ, Johnson MH (1984) The relationship between cleavage, DNA replication, and gene expression in the mouse 2-cell embryo. *J Embryol Exp Morphol* 79: 139-63
- Bowman CJ, Streck RD, Chapin RE (2010) Maternal-placental insulin-like growth factor (IGF) signaling and its importance to normal embryo-fetal development. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 89: 339-49
- Casson IF, Clarke CA, Howard CV, McKendrick O, Pennycook S, Pharoah PO, Platt MJ, Stanisstreet M, van Velszen D, Walkinshaw S (1997) Outcomes of pregnancy in insulin dependent diabetic women: results of a five year population cohort study. *BMJ* 315: 275-8
- Chang AS, Dale AN, Moley KH (2005) Maternal diabetes adversely affects preovulatory oocyte maturation, development, and granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 146: 2445-53
- Chao W, D'Amore PA (2008) IGF2: epigenetic regulation and role in development and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 19: 111-20
- Chieri RA, Pivetta OH, Foglia VG (1969) Altered ovulation pattern in experimental diabetes. *Fertil Steril* 20: 661-6
- Colton SA, Humpherson PG, Leese HJ, Downs SM (2003) Physiological changes in oocyte-cumulus cell complexes from diabetic mice that potentially influence meiotic regulation. *Biol Reprod.* 69: 761-70
- Corps AN, Brigstock DR, Littlewood CJ, Brown KD (1990) Receptors for epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on preimplantation trophoderm of the pig. *Development* 110:221-7
- Davenport ML, Clemmons DR, Miles MV, Camacho-Hubner C, D'Ercole AJ, Underwood LE (1990) Regulation of serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF binding proteins during rat pregnancy. *Endocrinology* 127: 1278-86

- DeChiara TM, Efstratiadis A and Robertson EJ (1990) A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 345: 78–80
- DeChiara TM, Robertson EJ and Efstratiadis A (1991) Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* 64: 849–859
- De Hertogh R, Vanderheyden I, Pampfer S, Robin D, Delcourt J (1992) Maternal insulin treatment improves pre-implantation embryo development in diabetic rats. *Diabetologia* 35: 406-408
- Denley A, Cosgrove LJ, Booker GW, Wallace JC, Forbes BE (2005) Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:421-39
- Deutschen Gesundheitsbericht Diabetes 2010, Kirchheim-Verlag, diabetesDE Download <http://profi.diabetesde.org/gesundheitsbericht/2010/> ; ISSN 1614-824X
- Diamond MP, Moley KH, Pellicer A, Vaughn WK, DeCherney AH (1989) Effects of streptozotocin- and alloxan-induced diabetes mellitus on mouse follicular and early embryo development. *J Reprod Fertil* 86: 1-10
- Doherty AS, Temeles GL, Schultz RM (1994) Temporal pattern of IGF-I expression during mouse preimplantation embryogenesis. *Mol Reprod Dev* 37: 21-26
- Drop SL, Kortleve DJ, Guyda HJ (1984 a) Isolation of a somatomedin-binding protein from preterm amniotic fluid: development of a radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 59: 899-907
- Drop SL, Kortleve DJ, Guyda HJ, Posner BI (1984 b) Immunoassay of a somatomedin-binding protein from human amniotic fluid: levels in fetal, neonatal, and adult sera. *J Clin Endocrinol Metab* 59: 908-15
- Fischer B, Navarrete Santos A (2003) Glukose, Insulin und Glukosetransporter: Bedeutung und Weichenstellung für die Embryonalentwicklung. *Reproduktionsmedizin* 19: 195-201
- Fischer S, Navarrete Santos A, Thieme R, Ramin N, Fischer B (2010) Adiponectin stimulates glucose uptake in rabbit Blastocysts. *Biol Reprod* 83: 859-65
- Funaki K, Mikamo K (1983) Developmental-stage-dependent teratogenic effects of maternal spontaneous diabetes in the chinese hamster. *Diabetes* 32: 637-643
- Gargosky SE, Moyses KJ, Walton PE, Owens JA, Wallace JC, Robinson JS & Owens PC (1990) Circulating levels of insulin-like growth factors increase and molecular forms of their serum binding proteins change with human pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun* 170: 1157–1163
- Geisert RD, Lee CY, Simmen FA, Zavy MT, Fliss AE, Bazer FW, Simmen RC (1991) Expression of messenger RNAs encoding insulin-like growth factor-I, -II, and insulin-like growth factor binding protein-2 in bovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Biol Reprod.* 45: 975-83
- Hansen PS, Clarke RJ, Buhagiar KA, Hamilton E, Garcia A, White C, Rasmussen HH (2007) Alloxan-induced diabetes reduces sarcolemmal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump function in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: 1070-7
- Herrler A, Einspanier R, Beier HM (1997) Binding of IGF-I to preimplantation rabbit embryos and their coats. *Theriogenology* 47: 1595-607
- Heyner S, Rao LV, Jarett L, Smith RM (1989 a) Preimplantation mouse embryos internalize maternal insulin via receptor-mediated endocytosis: pattern of uptake and functional correlations *Dev Biol* 134: 48-58

- Heyner S, Smith RM, Schultz GA (1989 b) Temporally regulated expression of insulin and insulin-like growth factors and their receptors in early mammalian development. *Bioessays* 11: 171-6. Review
- Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG (1999) The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 20: 761-87 Review
- Inzunza J, Danielsson O, Lalitkumar PG, Larsson O, Axelson M, Töhönen V, Danielsson KG, Stavreus-Evers A (2010) Selective insulin-like growth factor-I antagonist inhibits mouse embryo development in a dose-dependent manner. *Fertil Steril* 93: 2621-6
- Joshi RL, Lamothe B, Cordonnier N, Mesbah K, Monthieux E, Jami J, Bucchini D (1996) Targeted disruption of the insulin receptor gene in the mouse results in neonatal lethality. *EMBO J* 15: 1542-7
- Kaye P (1997) Preimplantation growth factor physiology. *Rev Reprod* 2: 121-127
- Kim HB, Kim WH, Han KL, Park JH, Lee J, Yeo J, Jung MH (2010) cAMP-response element binding protein (CREB) positively regulates mouse adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 391: 634-9
- Krishna M, Narang H (2008) The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci* 65: 3525-44
- Lea RG, McCracken JE, McIntyre SS, Smith W, Baird JD (1996) Disturbed development of the preimplantation embryo in the insulin-dependent diabetic BB/E rat. *Diabetes* 45: 1463-1470
- Lengyel C, Virág L, Kovács PP, Kristóf A, Pacher P, Kocsis E, Koltay ZM, Nánási PP, Tóth M, Kecskeméti V, Papp JG, Varró A, Jost N (2008) Role of slow delayed rectifier K<sup>+</sup>-current in QT prolongation in the alloxan-induced diabetic rabbit heart. *Acta Physiol (Oxf)* 192: 359-68
- Lenzen S (2007) Alloxan and streptozotocin diabetes. *Endokrinologie III*, 64, 119-39
- Lighten AD, Hardy K, Winston RM, Moore GE (1997) Expression of mRNA for the insulin-like growth factors and their receptors in human preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 47: 134-139
- Ling F, Li J, Chen Y, Du H, Mei Y, Mo D, Wang C (2009) Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the pig adiponectin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 381: 236-40
- Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A (1993) Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75: 59-72
- Mattson BA, Rosenblum IY, Smith RM, Heyner S (1988) Autoradiographic evidence for insulin and insulin-like growth factor binding to early mouse embryos. *Diabetes* 37: 585-589
- Moley KH (1999) Diabetes and preimplantation events of embryogenesis. *Semin Reprod Endocrinol* 17: 137-51, Review
- Moley KH, Vaughn WK, DeCherney AH, Diamond MP (1991) Effect of diabetes mellitus on mouse pre-implantation embryo development. *J Reprod Fertil* 93: 325-32
- Mondschein JS, Etherton TD, Hammond JM (1991) Characterization of insulin-like growth factor-binding proteins of porcine ovarian follicular fluid. *Biol Reprod* 44: 315-20
- Mondschein JS, Smith SA, Hammond JM (1990) Production of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) by porcine granulosa cells: identification of IGFBP-2 and -3 and regulation by hormones and growth factors. *Endocrinology* 127: 2298-306

- Nason KS, Binder ND, Labarta JI, Rosenfeld RG & Gargosky SE (1996) IGF-II and IGF-binding proteins increase dramatically during rabbit pregnancy. *J Endocrinol* 148: 121–130
- Navarrete Santos A, Augustin R, Lazzari G, Galli C, Sreenan JM, Fischer B (2000) The insulin-dependent glucose transporter isoform 4 is expressed in bovine blastocysts. *Biochem Biophys Res Commun* 271: 753-760
- Navarrete Santos A, Ramin N, Tonack S, Fischer B (2008) Cell lineage specific signalling of insulin and insulin like growth factor (IGF1) in rabbit blastocysts, *Endocrinology* 149: 515-24
- Navarrete Santos A, Tonack S, Kirstein M, Kietz S, Fischer B (2004 a) Two insulin-responsive glucose transporter isoforms and the insulin receptor are developmentally expressed in rabbit preimplantation embryos. *Reproduction* 128: 503-16
- Navarrete Santos A, Tonack S, Kirstein M, Pantaleon M, Kaye P, Fischer B (2004 b) Insulin acts via mitogen-activated protein kinase phosphorylation in rabbit blastocysts. *Reproduction* 128: 517-26
- Pampfer S, Vanderheyden I, McCracken JE, Vesela J, De Hertogh R (1997) Increased cell death in rat blastocysts exposed to maternal diabetes in utero and to high glucose or tumor necrosis factor-alpha in vitro. *Development* 124: 4827-36
- Pandini G, Conte E, Medico E, Sciacca L, Vigneri R, Belfiore A (2004) IGF-II binding to insulin receptor isoform A induces a partially different gene expression profile from insulin binding. *Ann N Y Acad Sci* 1028: 450-6
- Pandini G, Frasca F, Mineo R, Sciacca L, Vigneri R, Belfiore A (2002) Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *J Biol Chem* 277: 39684-39695
- Pandini G, Medico E, Conte E, Sciacca L, Vigneri R, Belfiore A (2003) Differential gene expression induced by insulin and insulin-like growth factor-II through the insulin receptor isoform A. *J Biol Chem* 278: 42178-89
- Pandini G, Vigneri R, Costantino A, Frasca F, Ippolito A, Fujita-Yamaguchi Y, Siddle K, Goldfine ID; Belfiore A (1999) Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor overexpression in breast cancers leads to insulin/IGF-I hybrid receptor overexpression: evidence for a second mechanism of IGF-I signaling. *Clin Cancer Res* 5: 1935-1944
- Penney GC, Mair G, Pearson DW (2003) Outcomes of pregnancies in women with type 1 diabetes in Scotland: a national population-based study. *BJOG* 110:315-8
- Plum L, Wunderlich FT, Baudler S, Krone W, Bruning JC (2005) Transgenic and knockout mice in diabetes research: novel insights into pathophysiology, limitations, and perspectives. *Physiology* 20: 152–161
- Powell-Braxton L, Hollingshead P, Warburton C, Dowd M, Pitts-Meek S, Dalton D, Gillett N, Stewart TA (1993) IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes Dev* 7: 2609-17
- Qi L, Saberi M, Zmuda E, Wang Y, Altarejos J, Zhang X, Dentin R, Hedrick S, Bandyopadhyay G, Hai T, Olefsky J, Montminy M (2009) Adipocyte CREB Promotes Insulin Resistance in Obesity. *Cell Metabolism* 9: 277–286
- Ramin N (2009) Dissertation "Expression und Signaltransduktion des Insulin-/IGF-Rezeptorsystems in Blastozysten des Kaninchens", Halle, Univ., Naturwissenschaftliche Fakultät III, Diss., online publiziert: [digital.bibliothek.unihalle.de/hs/content/titleinfo/232051](http://digital.bibliothek.unihalle.de/hs/content/titleinfo/232051)

- Ramin N, Thieme R, Fischer S, Schindler M, Schmidt T, Fischer B, Navarrete Santos A (2010) Maternal diabetes impairs gastrulation and insulin and IGF-I receptor expression in rabbit blastocysts. *ENDOCRINOLOGY* 151: 4158-67
- Rappolee DA, Sturm KS, Behrendtsen O, Schultz GA, Pedersen RA, Werb Z (1992) Insulin-like growth factor II acts through an endogenous growth pathway regulated by imprinting in early mouse embryos. *Genes Dev* 6: 939-952
- Reiher H, Fuhrmann K, Noack S, Woltanski KP, Jutzi E, Hahn von Dorsche H, Hahn HJ. (1983) Age-dependent insulin secretion of the endocrine pancreas in vitro from fetuses of diabetic and nondiabetic patients. *Diabetes Care* 6: 446-51
- Renner S, Fehlings C, Herbach N, Hofmann A, von Waldthausen DC, Kessler B, Ulrichs K, Chodnevskaia I, Moskalenko V, Amselgruber W, Göke B, Pfeifer A, Wanke R, Wolf E (2010) Glucose intolerance and reduced proliferation of pancreatic beta-cells in transgenic pigs with impaired glucose-dependent insulinotropic polypeptide function. *Diabetes* 59: 1228-38
- Sale EM, Sale GJ (2008) Protein kinase B: signalling roles and therapeutic targeting *Cell Mol Life Sci* 65: 113-27
- Schmidt T, Fischer S, Tsikolia N, Navarrete Santos A, Rohrbach S, Ramin N, Thieme R, Fischer B (2008) Expression of adipokines in pre-and periimplantation rabbit and mice embryos. *Histochem Cell Biol* 129: 817-25
- Sferruzzi-Perri AN, Owens JA, Pringle KG, Roberts CT (2011) The neglected role of insulin-like growth factors in the maternal circulation regulating fetal growth *J Physiol.* 589: 7-20, review
- Sudo N, Shimizu T, Kawashima C, Kaneko E, Tetsuka M, Miyamoto A (2007) Insulin-like growth factor-I (IGF-I) system during follicle development in the bovine ovary: relationship among IGF-I, type 1 IGF receptor (IGFR-1) and pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A). *Mol Cell Endocrinol* 264: 197-203
- Tonack S, Fischer B, Navarrete Santos A (2004) Expression of the insulin-responsive glucose transporter isoform 4 in blastocysts of C57/BL6 mice. *Anat Embryol* 208: 225-30
- Tonack S, Ramin N, Garimella S, Rao R, Seshagiri PB, Fischer B, Navarrete Santos A (2009) Expression of glucose transporter isoforms and of the insulin receptor during hamster preimplantation embryo development. *Ann Anat* 191: 485-495
- Tonack S, Rolletschek A, Wobus AM, Fischer B, Navarrete Santos A (2006) Differential expression of glucose transporter isoforms during embryonic stem cell differentiation. *Differentiation* 74: 499-509
- Velazquez MA, Zaraza J, Oropeza A, Webb R, Niemann H (2009) The role of IGF1 in the in vivo production of bovine embryos from superovulated donors. *Reproduction* 137: 161-80, Review
- Vercheval M, De Hertogh R, Pampfer S, Vanderheyden I, Michiels B, De Bernardi P, De Meyer R (1990) Experimental diabetes impairs rat embryo development during the preimplantation period. *Diabetologia* 33: 187-91
- Verheijen EC, Critchley JA, Whitelaw DC, Tuffnell DJ (2005) Outcomes of pregnancies in women with pre-existing type 1 or type 2 diabetes, in an ethnically mixed population. *BJOG* 112: 1500-3
- Viebahn C, Mayer B, Hrabe de Angelis M (1995) Signs of the principle body axes prior to primitive streak formation in the rabbit embryo. *Anat Embryol (Berl)* 192: 159-169

- Wathes DC, Taylor VJ, Cheng Z, Mann GE (2003) Follicle growth, corpus luteum function and their effects on embryo development in postpartum dairy cows. *Reprod Suppl* 61: 219-37. Review
- Watson AJ, Hogan A, Hahnel A, Wiemer KE, Schultz GA (1992) Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *Mol Reprod Dev* 31: 87-95
- White MF (2006) Regulating insulin signaling and beta-cell function through IRS proteins. *Can J Physiol Pharmacol* 84: 725-37, Review
- Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D (1999) Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7324-9
- Yakar S, Rosen CJ, Beamer WG, Ackert-Bicknell CL, Wu Y, Liu JL, Ooi GT, Setser J, Frystyk J, Boisclair YR, LeRoith D (2002) Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J Clin Invest* 110: 771-81
- Yang J, Cummings EA, O'connell C, Jangaard K (2006) Fetal and neonatal outcomes of diabetic pregnancies. *Obstet Gynecol* 108: 644-50
- Young LE, Sinclair KD, Wilmut I (1998) Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod* 3: 155-63
- Zhang X, Kidder GM, Watson AJ, Schultz GA, Armstrong DT (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: 375-380

## 6 Anlagen

### 6.1 Lebenslauf

Dr. rer. nat. Anne Navarrete Santos

geboren am 17. 06. 1966 in Lutherstadt-Wittenberg

verheiratet mit Dr. Alexander Navarrete Santos, 2 Töchter

#### Schulbildung und Studium

---

1972-1980	Polytechnische Oberschule in Zahna
1980-1983	Erweiterte Oberschule „Philipp Melanchthon“ in Wittenberg
1983-1984	12. Klasse und Abitur an der ABF „W. Ulbricht“ der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in Halle
1984-1989	Studium der Biochemie an der Lomonossow-Universität in Moskau an der Biologischen Fakultät, Fachbereich Bioorganische Chemie  Abschluss des Studiums mit Staatsexamen und Diplomarbeit, Praktische Ausbildung am Schemjakin-Institut für Bioorganische Chemie in der AG J. A. Ovshnikov

#### Berufstätigkeit

---

1989-1993	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich Biologie, Institut für Mikrobiologie
1990-1991	DAAD-Stipendiatin am Engelhardt Institut für Molekularbiologie in Moskau
1994-1996	Mutterschafts- und Erziehungsurlaub mit Tochter Anabel
seit 4/ 1996	Wissenschaftliche Assistentin im Institut für Anatomie und Zellbiologie an der MLU Halle-Wittenberg in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Dr. Bernd Fischer
7/ 2000	Abschluss der Promotion
6/ 2003 bis 6/ 2004	Mutterschafts- und Elternzeit mit Tochter Amelie
3/ 2009	Qualifikation und Abschlussprüfung zur Fachanatomin

Halle, den 17. Juni 2011

## 6.2 Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Ein Habilitationsverfahren wurde bislang an einer anderen Fakultät oder Universität weder eröffnet noch beantragt. Frühere Habilitationsverfahren an der Martin-Luther-Universität sind meinerseits nicht unternommen worden.

Halle, den 17. Juni 2011

Dr. rer. nat. Anne Navarrete Santos

### 6.3 Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei all denjenigen, die mir auf meinem bisherigen akademischen Weg mit Rat und Tat zur Seite standen und damit direkt oder indirekt zum Gelingen der Habilitation beigetragen haben.

Herrn Professor Dr. Dr. Bernd Fischer, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, danke ich für die uneingeschränkte Unterstützung in meiner Forschungsarbeit und in meiner Weiterbildung zur Fachanatomin. In unserer langjährigen gemeinsamen Arbeit habe ich insbesondere die Diskussionsfreude und die stetig fordernde und fördernde Aufmunterung schätzen gelernt, die mir die Motivation für diese Arbeit gegeben hat. In seinem Engagement in der Lehre und in der Forschung ist er für mich ein Vorbild.

Meinem Mann, Dr. rer. nat. Alexander Navarrete Santos, danke ich von ganzem Herzen, da er immer für mich da war. Er hat mich auch als wissenschaftlicher Partner stets unterstützt. Danke für die gute Zusammenarbeit in den Stammzellprojekten und die fachliche Hilfe bei der Etablierung der FACS-Sortierung von Adipozyten. Seine Kritik ist für mich ein ehrlicher Maßstab und sein Lob die größte Anerkennung in meiner Forschung.

Meinen ehemaligen Diplomandinnen und Doktorandinnen, Dr. Sarah Tonack und Dr. Nicole Ramin, danke ich für die ausgezeichnete wissenschaftliche Zusammenarbeit und die Freundschaft und Verbundenheit über die gemeinsame Zeit hinaus.

Meinen aktiven Diplomanden und Doktorandinnen aus der Arbeitsgruppe insbesondere Dipl.-Biochem. René Thieme, Dipl.- Ernährungswissenschaftlerinnen Julia Knelangen und Maria Schindler, Dipl.-Biol. Sünje Fischer und Dipl.-Ernährungswissenschaftler Ronald Biemann bin ich besonders für die kreative und produktive Zusammenarbeit der letzten Jahre in den gemeinsamen Projekten dankbar.

Meinen Kolleginnen Michaela Kirstein, Sabine Schrötter, Evelyn Axmann und Franziska Knöfel bin ich auf besondere Weise verbunden. Wir haben viele Probleme im Labor- und Forschungsalltag gemeinsam gemeistert. Ohne diese Mithilfe hätte ich meine Ziele nicht erreicht.

Denjenigen Mitarbeitern und Kollegen am Institut für Anatomie und Zellbiologie der MLU, die mich mit ihrer Diskussionsbereitschaft oder praktischen Hilfe bei der Verwirklichung dieser Arbeit unterstützt haben und die ich nicht namentlich erwähnt habe, möchte ich auf das Herzlichste danken.

Für die Bereitstellung der finanziellen Mittel zur Umsetzung der experimentellen Arbeiten danke ich der Medizinischen Fakultät und dem Wilhelm-Roux-Programm, der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Forschungsförderung der Europäischen Union und dem Deutschen Akademischen Austauschdienst.

Last but not least gilt mein ganz besonderer Dank meiner Familie und Freunden Anabel, Amelie, Sieglinde, Carla, Hannelore, Jürgen, Axel, Conny, Karin, Guido, Geli und Andrej, die mich mit ihrem immerwährenden, liebevollen Verständnis durch die letzten Jahre begleitet haben.

#### 6.4 Thematisch relevante eigene Publikationen im Anhang

Navarrete Santos A, Tonack S, Kirstein M, Kietz S, Fischer B (2004) Two insulin-responsive glucose transporter isoforms and the insulin receptor are developmentally expressed in rabbit preimplantation embryos. REPRODUCTION 128: 503-16

Navarrete Santos A, Tonack S, Kirstein M, Pantaleon M, Kaye P, Fischer B (2004) Insulin acts via mitogen-activated protein kinase phosphorylation in rabbit blastocysts. REPRODUCTION 128: 517-26

Navarrete Santos A, Ramin N, Tonack S, Fischer B (2008) Cell lineage specific signalling of insulin and insulin like growth factor (IGF1) in rabbit blastocysts, ENDOCRINOLOGY 149: 515-24

Navarrete Santos A, Augustin R, Lazzari G, Galli C, Sreenan JM, Fischer B (2000) The insulin-dependent glucose transporter isoform 4 is expressed in bovine blastocysts. BIOCHEM BIOPH RES COMMUN 271: 753-60

Augustin R, Pocar P, Navarrete Santos A, Wrenzycki C, Gandolfi F, Niemann H, Fischer B (2001) Glucose transporter expression is developmentally regulated in in vitro derived bovine preimplantation embryos. MOL REPROD DEV 60: 370-76

Tonack S, Fischer B, Navarrete Santos A (2004) Expression of the insulin-responsive glucose transporter isoform 4 in blastocysts of C57/BL6 mice. ANAT EMBRYOL 208: 225-30

Fischer B, Navarrete Santos A (2003) Glukose, Insulin und Glukosetransporter: Bedeutung und Weichenstellung für die Embryonalentwicklung. Reproduktionsmedizin 19: 195-201

Tonack S, Rolletschek A, Wobus AM, Fischer B, Navarrete Santos A (2006) Differential expression of glucose transporter isoforms during embryonic stem cell differentiation. Differentiation 74: 499-509

Tonack S, Ramin N, Garimella S, Rao R, Seshagiri PB, Fischer B, Navarrete Santos A (2009) Expression of glucose transporter isoforms and of the insulin receptor during hamster preimplantation embryo development. Ann Anat 191: 485-95

Fischer S, Navarrete Santos A, Thieme R, Ramin N, Fischer B (2010) Adiponectin Stimulates Glucose Uptake in Rabbit Blastocysts. BIOL REPROD 83: 859-65

Ramin N, Thieme R, Fischer S, Schindler M, Schmidt T, Fischer B, Navarrete Santos A. (2010) Maternal diabetes impairs gastrulation and insulin and IGF-I receptor expression in rabbit blastocysts. Endocrinology, 151: 4158-67

Thieme R, Ramin N, Fischer S, Püschel B, Bernd Fischer and Navarrete Santos A (2011) Gastrulation in rabbit blastocysts depends on insulin and the insulin-like-growth-factor 1, Mol Cell Endo, Im Druck

## Anhang

**Die Manuskripte aus dem Anhang werden durch die Herausgeber online publiziert. Sie sind unter den angegebenen DOI-Links erreichbar.**

**Two insulin-responsive glucose transporter isoforms and the insulin receptor are developmentally expressed in rabbit preimplantation embryos**

Navarrete Santos A, Tonack S, Kirstein M, Kietz S, Fischer B (2004)

REPRODUCTION 128: 503-16

**DOI:10.1530/rep.1.00203**

<http://dx.doi.org/10.1530/rep.1.00203> Online version via [www.reproduction-online.org](http://www.reproduction-online.org)

### Abstract

Glucose is the most important energy substrate for mammalian blastocysts. Its uptake is mediated by glucose transporters (GLUT). In muscle and adipocyte cells insulin stimulates glucose uptake by activation of the insulin receptor (IR) pathway and translocation of GLUT4. GLUT4 is expressed in bovine preimplantation embryos. A new insulin-responsive isoform, GLUT8, was recently described in mouse blastocysts. Thus, potentially, two insulin-responsive isoforms are expressed in early embryos. The mechanism of insulin action on embryonic cells, however, is still not clear. In the present study expression of IR, GLUT1, 2, 3, 4, 5 and 8 was studied in rabbit preimplantation embryos using RT-PCR, Western blotting and immunohistochemistry. The rabbit mRNA sequences for the complete coding region of IR, GLUT4 and a partial GLUT8 sequence were determined by RACE-PCR and sequencing. GLUT4 was expressed in 3-day-old morulae and in 4- and 6-day-old blastocysts. IR and GLUT8 transcripts were detectable only in blastocysts. Blastocysts also expressed GLUT1 and 3, but not GLUT2 and 5. Transcript numbers of GLUT4 and 8 were higher in trophoblast than in embryoblast cells. Translation of IR, GLUT4 and 8 proteins in blastocysts was confirmed by Western blotting. GLUT4 was localized mainly in the membrane and in the perinuclear region in trophoblast cells while in embryoblast cells its localization was predominantly in the perinuclear cytoplasm. The possible function(s) of two insulin-responsive isoforms, GLUT4 and GLUT8, in rabbit preimplantation embryos needs further investigation. It may not necessarily be linked to insulin-stimulated glucose transport.

**Insulin acts via mitogen-activated protein kinase phosphorylation in rabbit blastocysts**

Navarrete Santos A, Tonack S, Kirstein M, Pantaleon M, Kaye P, Fischer B (2004)

REPRODUCTION 128: 517-26

**DOI:10.1530/rep.1.00204**

<http://dx.doi.org/10.1530/rep.1.00204> Online version via [www.reproduction-online.org](http://www.reproduction-online.org)

**Abstract**

The addition of insulin during in vitro culture has beneficial effects on rabbit preimplantation embryos leading to increased cell proliferation and reduced apoptosis. We have previously described the expression of the insulin receptor (IR) and the insulin-responsive glucose transporters (GLUT) 4 and 8 in rabbit preimplantation embryos. However, the effects of insulin on IR signaling and glucose metabolism have not been investigated in rabbit embryos. In the present study, the effects of 170 nM insulin on IR, GLUT4 and GLUT8 mRNA levels, Akt and Erk phosphorylation, GLUT4 translocation and methyl glucose transport were studied in cultured day 3 to day 6 rabbit embryos. Insulin stimulated phosphorylation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) Erk1/2 and levels of IR and GLUT4 mRNA, but not phosphorylation of the phosphatidylinositol 3-kinase-dependent protein kinase, Akt, GLUT8 mRNA levels, glucose uptake or GLUT4 translocation. Activation of the MAPK signaling pathway in the absence of GLUT4 translocation and of a glucose transport response suggest that in the rabbit preimplantation embryo insulin is acting as a growth factor rather than a component of glucose homeostatic control.

**Cell lineage specific signalling of insulin and insulin like growth factor (IGF1) in rabbit blastocysts**

Navarrete Santos A, Ramin N, Tonack S, Fischer B (2008)

ENDOCRINOLOGY 149: 515-24

**DOI: 10.1210/en.2007-0821**<http://dx.doi.org/10.1210/en.2007-0821>**Abstract**

The insulin/IGF system plays a critical role in embryo growth and development. We have investigated the expression of insulin receptor (IR) and IGF-I receptor (IGF-IR) and the activation of their downstream pathways in rabbit 6-d-old blastocysts. IR was expressed in embryoblast (Em, inner cell mass) and trophoblast (Tr) cells, whereas IGF-IR was localized mainly in Em. Isoform A (IR-A) represents the main insulin isoform in blastocysts and was found in Em and Tr cells. IR-B was detectable only in Tr. IR/IGF-IR signaling pathways were analyzed after stimulation with insulin (17 nm) or IGF-I (1.3 nm) in cultured blastocysts. Insulin stimulated Erk1/2 in Em and Tr and Akt in Tr but not in Em. IGF-I activated both kinases exclusively in Em. The target genes c-fos (for MAPK kinase-1/Erk signaling) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK, for PI3K/Akt signaling) were also specifically regulated. Insulin down-regulated PEPCK RNA amounts in Tr by activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. Expression of c-fos by insulin and IGF-I was different with respect to time and fortitude of expression, mirroring again the specific IR and IGF-IR expression patterns in Em and Tr. Taken together, we show that IGF-I acts primarily mitogenic, an effect that is cell lineage-specifically restricted to the Em. By contrast, insulin is the growth factor of the Tr stimulating mitogenesis and down-regulating metabolic responses. As soon as blastocyst differentiation in Em and Tr has been accomplished, insulin and IGF-I signaling is different in both cell lineages, implying a different developmental impact of both growth factors.

**The insulin-dependent glucose transporter isoform 4 is expressed in bovine blastocysts.**

Navarrete Santos A, Augustin R, Lazzari G, Galli C, Sreenan JM, Fischer B (2000)

BIOCHEM BIOPH RES COMMUN 271: 753-60

**DOI:10.1006/bbrc.2000.2646**

<http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2000.2646>

**Abstract**

We have investigated the expression of two glucose transporter isoforms, Glut1 and 4, in 14- and 16-day-old bovine blastocysts (d14, d16) using RT-PCR, competitive RT-PCR and in situ hybridization. The blastocysts were grown in vivo or had been produced in vitro. Glut1 mRNA was detected in all blastocysts studied, Glut4 in all d14 blastocysts, but only in a few d16 blastocysts. Glut4 mRNA was localized in trophoblast and endoderm cells. Glut1 mRNA increased from d14 to d16 while Glut4 transcription was down-regulated in d16 blastocysts. The mRNA amounts varied between 0.8 to 23 pg and 3.9 to 65 fg per 100 ng embryonic RNA for Glut1 and Glut4, respectively, displaying a 100- to 1500-fold lower expression of Glut4 compared with Glut1 during blastocyst elongation. This is the first report on the expression of the insulin-sensitive Glut4 isoform in mammalian preimplantation embryos.

**Glucose transporter expression is developmentally regulated in in vitro derived bovine preimplantation embryos**

Augustin R, Pocar P, Navarrete Santos A, Wrenzycki C, Gandolfi F, Niemann H, Fischer B (2001).

MOL REPROD DEV 60: 370-76

**DOI: 10.1002/mrd.1099**

<http://dx.doi.org/10.1002/mrd.1099>

**Abstract**

Glucose is readily taken up and utilized by preimplantation embryos from different species. However, a comprehensive analysis of the glucose transporter expression throughout preimplantation development is still missing. Here, we have investigated the expression of facilitative glucose transporters (Glut1–5 and 8) and sodium-dependent-glucose transporter (SGLT-I) in bovine oocytes and preimplantation embryos up to d16 of development, using RT-PCR and immunohistochemistry. The embryos were produced in vitro by IVM–IVF. Glut1, Glut3, Glut8, and SGLT-I were expressed in all stages studied. Glut4 transcripts were first detected at the blastocyst stage. Glut2 expression was restricted to the period of blastocyst elongation at d14 and d16. Transcription of the fructose transporter Glut5 started at the 8-/16-cell stage. Our results show a distinct expression pattern for glucose transporters during bovine embryo development in vitro indicating specialized functions for these isoforms at different developmental stages in bovine embryos.

**Expression of the insulin-responsive glucose transporter isoform 4 in blastocysts of C57/BL6 mice**

Tonack S, Fischer B, Navarrete Santos A (2004)

ANAT EMBRYOL 208: 225-30

**DOI: 10.1007/s00429-004-0388-z**

<http://dx.doi.org/10.1007/s00429-004-0388-z>

**Abstract**

Glucose is the most important energy substrate for mammalian blastocysts. In preimplantation embryos glucose uptake is mainly mediated by facilitative glucose transporter molecules (GLUT). Employing RT-PCR in 3.5-day-old mouse blastocysts of strain C57/BL6 we have investigated the expression of the GLUT isoforms 1-4 and 8. We could not only detect GLUT 1, 3 and 8 but, in contrast to earlier studies, also the insulin-responsive isoform 4. GLUT2 was not expressed. The specificity for GLUT4 amplification was verified by sequence analysis. GLUT4 protein was localized by immunohistochemistry with two GLUT4 antibodies. It was found in ICM and trophoblast cells in the cytoplasmic compartment with a strong perinuclear staining. This is the first report on the expression of the insulin-sensitive GLUT4 isoform in mouse preimplantation embryos.

## **Glukose, Insulin und Glukosetransporter: Bedeutung und Weichenstellung für die Embryonalentwicklung**

Fischer B, Navarrete Santos A (2003)

REPRODUKTIONSMEDIZIN 19: 195-201

**DOI: 10.1007/s00444-003-0412-4**

<http://dx.doi.org/10.1007/s00444-003-0412-4>

Online publiziert: 19.August 2003 © Springer-Verlag 2003

### Abstract

Ab dem Blastozystenstadium ist Glukose das Hauptenergiesubstrat für Embryonen der Säugetiere und des Menschen. Sie wird zur Energiegewinnung und für die Glykosylierung von embryonalen Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren benötigt. Die ATP-Synthese erfolgt sowohl über die Glykolyse als auch über den Zitratzyklus mit oxidativer Phosphorylierung in der Atmungskette. In den meisten Spezies scheint nur wenig Glukose über den Pentosephosphatzyklus verwertet zu werden. Der unter dem Aspekt der Energiegewinnung weniger effiziente anaerobe Abbau von Glukose zu Laktat soll für die Aufrechterhaltung des zyttoplasmatischen Redoxpotenzials wichtig sein und stellt gleichzeitig eine Anpassung an die relativ niedrige Sauerstoffkonzentration im Uterussekret während der Blastozystenentwicklung dar. Die Glukosekonzentration im Uterussekret der Frau scheint in etwa der im Blut zu entsprechen. Hohe Glukosegehalte führen in vivo (in Diabetes mellitus-Tiermodellen) wie in vitro zu Entwicklungsretardierungen, einem Anstieg in der Apoptoserate und zu erhöhter embryonaler Mortalität. Ein völliger Entzug der Glukose ohne Substitution anderer Energieträger lässt eine Entwicklung über das Blastozystenstadium hinaus nicht zu. Glukose wird über in der Zellmembran lokalisierte Glukosetransporterproteine (GLUT) energieunabhängig in die Zelle aufgenommen. Analysiert man die bei Präimplantationsembryonen vorkommenden GLUT-Isoformen, dann wird deutlich, dass fast alle derzeit bekannten Isoformen gebildet werden und dass das Expressionsmuster zell-, stadien- und speziesspezifisch variiert. Eine besondere Rolle für die blastozytäre Glukoseaufnahme kommt vermutlich dem Zusammenspiel der Isoformen GLUT3 und GLUT1 zu. Beide Isoformen werden von Blastozysten der bisher untersuchten Spezies (Maus, Ratte, Kaninchen, Rind) gebildet. Es stellt sich die Frage, warum neben diesen Isoformen, die die Glukoseaufnahme sichern können, noch mindestens 4 weitere Isoformen, davon 2 Glukosetransporter, die insulinabhängig reguliert werden (GLUT4, GLUT8), bei Blastozysten vorkommen. Unser derzeitiger Kenntnisstand zu dieser Frage lässt sich wie folgt zusammenfassen. An der Sicherstellung der Glukoseaufnahme bei Blastozysten können neben GLUT3/1 weitere Isoformen beteiligt sein. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass die Glukosetransporter neben der Glukoseaufnahme weitere, derzeit noch nicht näher bekannte entwicklungsbiologische Funktionen ausüben. Die insulinähnlichen Wachstumsfaktoren (Insulin, IGF-1, IGF-2) und ihre

Rezeptoren sind wichtige Elemente der embryo-maternalen Kommunikation in der Frühschwangerschaft. Von einigen Spezies werden für Insulin zellspezifische Effekte mit einer vornehmlich auf die Embryoblastzellen gerichteten Wirkung berichtet. Da sich die Konzentration von Glukose und der insulinähnlichen Wachstumsfaktoren und die Expression der Glukosetransporter gegenseitig beeinflussen, kann es bei unphysiologischen Konzentrationen zu einer Störung der Blastozystenentwicklung und einer deletären Weichenstellung für die weitere Prä- und Postimplantationsentwicklung kommen. Insofern könnten sie als Einflussgröße bei der sog. Barker-Hypothese eine Rolle spielen.

Glucose is the main energy substrate for blastocysts. It is utilized for ATP and macromolecule synthesis by glycolysis and the citric acid cycle. The less efficient utilization of glucose by anaerobic glycolysis may serve two purposes: lactate production for the maintenance of cytoplasmic redox equilibrium and adaptation to the low oxygen concentration in the uterine cavity during blastocyst development. In humans, the glucose concentration in uterine secretions seems to be in the same range as in blood. However, a more detailed analysis, especially in women with metabolic disorders, is still lacking. High glucose concentrations in vivo (animal models for diabetes mellitus) and in vitro lead to retardation of development, increased apoptosis, and higher embryonic mortality. Glucose deprivation without substitution of other energy nutrients does not allow development beyond the blastocyst stage in mammals. Glucose uptake by preimplantation embryos is accomplished by energy-independent facilitative transporter molecules, the glucose transporters (GLUT). Almost all presently known GLUT isoforms have been detected in preimplantation embryos, many of them in a cell-, stage-, and species-specific expression pattern. Most likely, the transport of maternal glucose into blastocysts is performed by the cooperative action of GLUT3 and GLUT1. Both isoforms are expressed in blastocysts from the species studied so far (mouse, rat, rabbit, cow). Therefore the question arises as to why, besides these two isoforms, at least four other isoforms are present in preimplantation embryos. Among them are the two insulin-sensitive isoforms GLUT4 and GLUT8. It is reasonable to speculate that GLUTs also exert developmental functions which are independent from glucose transport. These functions, however, are not yet clear. Glucose transporter expression is influenced by glucose and insulin-like growth factors (insulin, IGF-1, IGF-2). These IGFs and their receptors are essential parts of the embryo-maternal communication in early pregnancy. Well-known feedback mechanisms exist between the concentrations of glucose and IGFs and between them and GLUT expression. Because specific effects of IGFs on embryoblast cells have been reported, nonphysiological concentrations of glucose and IGFs may disturb the fine-tuned allocation of embryoblast and trophoblast cells during blastocyst formation and development, thus exerting a deleterious effect on pre- and postimplantation embryo development. Such effects may be taken into consideration when discussing the Barker hypothesis.

---

**Differential expression of glucose transporter isoforms during embryonic stem cell differentiation**

Tonack S, Rolletschek A, Wobus AM, Fischer B, Navarrete Santos A (2006)

Differentiation 74: 499-509

DOI: 10.1111/j.1432-0436.2006.00091.x

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-0436.2006.00091.x>

**Abstract**

In mouse blastocysts six facilitative glucose transporter isoforms (GLUT)1-4, 8 and 9 are expressed. We have used the mouse embryonic stem (ES) cell line D3 and spontaneously differentiating embryoid bodies (EB) to investigate GLUT expression and the influence of glucose during differentiation of early embryonic cells. Both ES cells and EBs (2d-20d) expressed GLUT1, 3, and 8, whereas the isoforms 2 and 4 were detectable exclusively in EBs. Differentiation-associated expression of GLUT was analyzed by double staining with stage-specific embryonic antigen (SSEA-1), cytokeratins (CK18, 19), nestin, and desmin. Similar to trophoblast cells in mouse blastocysts the outer cell layer of endoderm-like cells showed a high GLUT3 expression in early EBs. In 20-day-old EBs no GLUT3 protein and only minor GLUT3 mRNA amounts could be detected. A minimal glucose concentration of 5 mM applied during 2 and 8 days of EB culture resulted in up-regulated GLUT4, Oct-4 and SSEA-1 levels and a delay in EB differentiation. We conclude that GLUT expression depends on cellular differentiation and that the expression is modulated by glucose concentration. The developmental and glucose-dependent regulation of GLUT strongly suggests a functional role of glucose and glucose transporters in ES cell differentiation and embryonic development.

**Expression of glucose transporter isoforms and of the insulin receptor during hamster preimplantation embryo development**

Tonack S, Ramin N, Garimella S, Rao R, Seshagiri PB, Fischer B, Navarrete Santos A (2009)

Ann Anat 191: 485-95

**DOI: 10.1016/j.aanat.2009.06.002**

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aanat.2009.06.002>

**Abstract**

During preimplantation development, embryos of many species are known to express up to five isoforms of the facilitative glucose transporter proteins (GLUT). Development of hamster blastocysts is inhibited by glucose. We therefore investigated GLUT isoform and insulin receptor (IR) expression in hamster preimplantation embryos cultured in glucose-free medium from the 8-cell stage onwards. We show that GLUT1, 3 and 8 mRNA are constitutively expressed from the 8-cell to the blastocyst stage. The IR is expressed from the morula stage onwards. Messenger RNA of the insulin-responsive GLUT4 was not detected at any stage. GLUT1 and 3 were localised by immunocytochemistry. GLUT1 was expressed in both embryoblast and trophoblast, in the latter, mainly in basal and lateral membranes directed towards the blastocoel and embryoblast. GLUT3 was exclusively localised in the apical membrane of trophoblast cells. We show that hamster preimplantation embryos express several GLUT isoforms thus closely resembling embryos of other mammalian species. Despite endogenous IR expression, the insulin-sensitive isoform GLUT4 was not expressed, indicating that the insulin-mediated glucose uptake known from classical insulin target cells may not be relevant for hamster blastocysts.

**Adiponectin stimulates glucose uptake in rabbit blastocysts**

Fischer S, Navarrete Santos A, Thieme R, Ramin N, Fischer B (2010)

BIOL REPROD 83: 859-65

DOI: 10.1095/biolreprod.110.084665

<http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.110.084665>**Abstract**

Since the discovery of adipokines, the adipose tissue is no longer considered to be an inactive fat storage. It secretes a variety of bioactive molecules, which regulate body metabolism and energy homeostasis. One of these molecules is the adipokine adiponectin. In different tissues, adiponectin triggers metabolic effects through the adenosine monophosphate-activated protein kinase (PRKA), which is a master regulator in glucose and lipid metabolism. Recent studies point to a role for adiponectin in reproduction. Adiponectin and its receptors are present in female reproductive tract during pregnancy, and the preimplantation embryo is fully equipped with adiponectin. Here, we show that both receptor isoforms, ADIPOR1 and ADIPOR2, are expressed in 6-day-old rabbit blastocysts. To investigate the signaling pathway of adiponectin in preimplantation embryos, rabbit blastocysts were cultured in vitro and stimulated with adiponectin. Supplementation of adiponectin (1 µg/ml) enhanced PRKA alpha 1/2 (PRKAA1/2) phosphorylation and decreased expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (PCK2), a key regulator of gluconeogenesis. Inhibition of PRKAA1/2 by Compound C (10 µM) restored PCK2 transcription. Adiponectin enhanced embryonic glucose uptake and led to a translocation of solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4 (SLC2A4), previously known as GLUT4. We conclude that adiponectin influences the glucose metabolism of rabbit blastocysts via the phosphorylation of PRKAA1/2, which in turn results in a decrease of gluconeogenesis and an increase in glycolysis. The regulatory influence of adiponectin on glucose metabolism of blastocysts may be of specific interest in pathophysiological situations, such as obesity during pregnancy.

---

**Maternal diabetes impairs gastrulation and insulin and IGF-I receptor expression in rabbit blastocysts**

Ramin N, Thieme R, Fischer S, Schindler M, Schmidt T, Fischer B, Navarrete Santos A. (2010)

Endocrinology 151: 4158-67

**DOI: 10.1210/en.2010-0817**

<http://dx.doi.org/10.1210/en.2010-0817>

**Abstract**

Women with type 1 diabetes are subfertile. Diabetes negatively affects pregnancy by causing early miscarriage and poor prenatal outcomes. In this study we examine consequences of maternal type 1 diabetes on early embryo development, metabolic gene expression, and the pattern of insulin receptor (IR) and IGF-I receptor (IGF-IR) distribution in rabbit blastocysts. In female rabbits, type 1 diabetes was induced by alloxan treatment. Six-day-old blastocysts were recovered and assessed for receptor distribution and metabolic gene expression. In vitro culture of blastocysts was performed in medium containing 1 mM, 10 mM, or 25 mM glucose, simulating normo- and hyperglycemic developmental condition in vitro. The fertility rate of the diabetic rabbits clearly mirrored subfertility with a drop in blastocyst numbers by 40% (13.3 blastocysts in diabetic vs. 21.9 in control females). In blastocysts onset and progression of gastrulation was delayed and expression of IR and IGF-IR and their metabolic target genes (hexokinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase), both in vivo and in vitro, was down-regulated. The amount of apoptotic cells in the embryonic disc was increased, correlating closely with the reduced transcription of the bcl-x(L) gene. Blastocyst development is clearly impaired by type 1 diabetes during early pregnancy. Insulin-stimulated metabolic genes and IR and IGF-IR are down-regulated, resulting in reduced insulin and IGF sensitivity and a delay in development. Dysregulation of the IGF system and embryonic glucose metabolism are potential reasons for diabetogenous subfertility and embryopathies and start as soon as during the first days of life.

**Gastrulation in rabbit blastocysts depends on insulin and the insulin-like-growth-factor 1**

Thieme R, Ramin N, Fischer S, Püschel B, Bernd Fischer and Navarrete Santos A (2011)

Mol Cell Endocrinol 348: 112-9

DOI: 10.1016/j.mce.2011.07.044

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.044>**Abstract**

Insulin and insulin-like-growth-factor 1 (IGF1) are components of the uterine secretions. As potent growth factors they influence early embryo development. The underlying molecular mechanisms are largely unknown. Here we report on the effects of insulin and IGF1 on early gastrulation in rabbit blastocysts. We have studied blastocysts grown in vivo in metabolically healthy rabbits, in rabbits with type 1 diabetes and in vitro in the presence or absence of insulin or IGF1. Embryonic disc morphology and expression of Brachyury, Wnt3a and Wnt4 were analysed by qPCR and IHC.

Pre-gastrulated blastocysts (stage 0/1) cultured with insulin or IGF1 showed a significantly higher capacity to form the posterior mesoderm and primitive streak (stage 2 and 3) than blastocysts cultured without growth factors. In gastrulating blastocysts the levels of the mesoderm-specific transcription factor Brachyury and the Wnt signalling molecules Wnt3a and Wnt4 showed a stage-specific expression pattern with Brachyury transcripts increasing from stage 0/1 to 3. Wnt4 protein was found spread over the whole embryoblast. Insulin induced Wnt3a, Wnt4 and Brachyury expression in a temporal- and stage-specific pattern. Only blastocysts cultured with insulin reached the Wnt3a, Wnt4 and Brachyury expression levels of stage 2 in vivo blastocysts, indicating that insulin is required for Wnt3a, Wnt4 and Brachyury expression during gastrulation. Insulin-induced Wnt3a and Wnt4 expression preceded Brachyury. Wnt3a-induced expression could be depleted by MEK1 inhibition (PD98059). Involvement of insulin in embryonic Wnt3a expression was further shown in vivo with Wnt3a expression being notably down regulated in stage 2 blastocysts from rabbits with type 1 diabetes.

Blastocysts grown in diabetic rabbits are retarded in development, a finding which supports our current results that insulin is highly likely required for early mesoderm formation in rabbit blastocysts by inducing a distinct spatiotemporal expression profile of Wnt3a, Wnt4 and Brachyury.