

Transport i wykorzystanie glukozy we wczesnym rozwoju zarodkowym

MARTA WASIELAK, KATARZYNA KAMIŃSKA, MAREK BOGACKI

Pracownia Biologii Zarodka Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn

Wasielak M., Kamińska K., Bogacki M.

Transport and glucose utilization during early embryonic development

Summary

Glucose transport and utilization play a crucial role during preimplantation development of the embryo, especially during the transition into the blastocyst stage. In the earlier developmental stages embryos do not use glucose as the main fuel but prefer more oxidized sources of energy such as pyruvate and lactate. The increased glucose transport indicated in mouse, bovine, porcine, rat, rabbit and human blastocysts is probably caused by the elevated energetic demands resulting from the morphological changes occurring in this stage of development. Moreover, the decreased glucose transport causes apoptotic in blastocyst cells resulting in further malformations of the fetus and even miscarriages. Glucose is transported into the embryo mainly by the membrane glucose transporters glycoproteins (GLUTs) GLUT 1, 2, 3, 4, 8, 9 that are specifically expressed during preimplantation development. GLUT 1, 2, 3, 9 are expressed in the cell membranes while GLUT 4 and 8 – insulin/IGF-I dependent transporters – are localized intracellularly and translocated into the membrane in response to insulin action. Contrary to the above mentioned transporters amongst which GLUT 1 is expressed as early as in oocytes, the expression of GLUT 4 and 8 begins from the blastocyst stage. The increased expression of glucose transporters on the blastocyst stage and especially the specific localization in blastocyst cells indicate their important role in preimplantation development.

Keywords: glucose transport, preimplantation development, blastocyst

Glukoza jest głównym substratem energetycznym dla większości żywych komórek. Ponadto stanowi podstawowe źródło węgla dla wielu substancji komórkowych, tj. cukrów złożonych, aminokwasów czy lipidów.

Glukoza odgrywa istotną rolę we wczesnym rozwoju zarodkowym, począwszy od momentu fuzji gamet i zapłodnienia (32), jednakże jej transport i wykorzystanie jako głównego substratu energetycznego wzrasta szczególnie na etapie formowania się blastocysty. W warunkach *in vivo* glukoza dostarczana jest zarodkom w wydzielinach komórek nabłonkowych jajowodu i macicy. Znaczny wzrost wykorzystania glukozy w stadium blastocysty odnotowano w zarodkach mysich (13), bydłych (31), świńskich (30), szczurzych (3), króliczych (29) i ludzkich (10). Wynika to najprawdopodobniej ze wzmożonych potrzeb energetycznych zarodka na tym etapie, spowodowanych nasiloną proliferacją komórek, która prowadzi do wyodrębnienia się pierwszej warstwy epitelialnej oraz pojawienia się wypełnionej płynem jamki blastocysty zwanej blastocelem (4, 25). Przeciwnie, spadek transportu glukozy, zarówno podstawowego, jak i stymulowanego działaniem insuliny powodował wzmożoną apoptozę w komórkach blastocysty myszy, co było przyczyną malformacji płodów bądź też skutkowało niedonośzeniem ciąży (6, 21, 22). Podczas bardzo wczesnych faz rozwojowych głównym źródłem energetycznym dla za-

rodków są bardziej utlenione związki, takie jak pirogronian i mleczan (9, 15, 26). Mysie zarodki na etapie pierwszego podziału zarodkowego wykorzystują tylko pirogronian, podczas gdy na etapie kolejnego metabolizują pirogronian i mleczan w równym stopniu (25). Glukoza jako główny substrat energetyczny zaczyna być niezbędna dopiero od momentu kompaktacji i formowania się blastocysty. Sugerowano, że spowodowane jest to zablokowaniem szlaku glikolizy przed kompaktacją (24), jednakże w kolejnych badaniach wykazano, że to najprawdopodobniej transport glukozy jest czynnikiem odpowiedzialnym za wykorzystywanie glukozy jako głównego źródła energii przez zarodki we wczesnych stadiach rozwojowych (25). Przejście z metabolizmu pirogronianu na metabolizm glukozy związane jest ze wzrostem ekspresji mRNA heksokinazy, enzymu odpowiedzialnego za fosforylację glukozy wewnątrz komórki (17). Stwierdzono wyraźny wzrost aktywności heksokinazy podczas formowania się blastocysty w zarodkach bydłych (27), mysich (12) i ludzkich (19), co związane było z wzmożonym wykorzystywaniem glukozy przez te zarodki. Pobór glukozy przez zarodki bydłce produkowane *in vitro* wzrasta sukcesywnie od stadium 2-komórkowego, aż do stadium wykluwającej się blastocysty. Natomiast wzrost metabolizmu następuje dwuetapowo, po raz pierwszy, gdy uruchamiany jest genom zarodkowy (8/16 komórek) i po raz

kolejny na etapie kompaktacji (28). Możliwe jest, że blok w rozwoju zarodków bydłych obserwowany *in vitro* na etapie 8/16 komórek powodowany jest właśnie zaburzeniami w wykorzystaniu glukozy przez zarodki.

Wykazano, że wysokie koncentracje glukozy w medium hodowlanym mogą hamować rozwój zarodków mysich na wczesnych etapach rozwojowych (5, 29). Natomiast próby hodowli zarodków świńskich w mediach o niskiej zawartości glukozy (KSOM, G1.1/2.1) dawały znacznie słabsze rezultaty niż wówczas, gdy zarodki hodowano w medium NCSU-23, w którym koncentracja glukozy wynosiła 5,5 mmol/l (8, 18), podczas gdy koncentracja glukozy w jajowodzie świni wynosi tylko ok. 0,17 mmol glukozy/litr. Ta wyraźna preferencja glukozy przez zarodki świńskie jest nietypowa w świetle wyżej zaprezentowanych danych dotyczących zarodków mysich. Potencjalnym wytłumaczeniem tego zjawiska może być udział glukozy w metabolizmie lipidów, których zarodki świńskie zawierają znacznie więcej w porównaniu do zarodków innych gatunków zwierząt gospodarskich (20).

Transportery glukozy

Kluczowym momentem w wykorzystaniu glukozy jest jej transport przez błonę komórkową, który powinien odbywać się z prędkością dopasowaną do wymagań energetycznych komórki. Glukoza może być transportowana przez błony komórkowe na drodze dwóch mechanizmów:

- przez zależne od jonów Na^+ kanały błonowe, tzw. SGLT (sodium coupled glucose transporters); transport glukozy do wnętrza komórki skorelowany jest z kotransportem jonów Na^+ , który odbywa się wbrew gradientowi stężeń dzięki funkcjonowaniu pompy sodowo-potasowej (24),

- przez niezależne od jonów Na^+ transportery glukozy (GLUT – glucose transporters glycoproteins) (34).

Wykorzystanie selektywnych inhibitorów transportu glukozy wykazało, że pobór glukozy przez przedimplantacyjne zarodki warunkowany jest przede wszystkim funkcjonowaniem niezależnych od jonów sodu transporterów glukozy (14).

Transportery glukozy są białkami o wielkości 500 aminokwasów. Każda z izoform zbudowana jest z 12 wysoce konserwatywnych transbłonowych domen (tworzących tzw. domenę wewnątrzbłonową, stanowiącą ok. 50% masy białka), domeny cytoplazmatycznej (stanowiącej ok. 35% masy białka) i domeny zewnątrzkomórkowej. W dome-

nie cytoplazmatycznej wyróżnia się końce: aminowy i karbonylowy oraz dużą centralną pętlę między wewnątrzbłonowymi domenami 6 i 7. Część zewnątrzkomórkowa składa się z dużej glikozylowanej pętli zlokalizowanej między wewnątrzbłonowymi domenami 1 i 2. Domeny pozabłonowe wykazują znaczne zróżnicowanie w sekwencji aminokwasowej, co wskazuje na ich istotną rolę w tkankowo specyficznej regulacji funkcji poszczególnych izoform GLUT (16).

Ekspresja poszczególnych izoform GLUT w rozwoju przedimplantacyjnym

Najbardziej rozpowszechnioną spośród wszystkich izoform transporterów glukozy, występujących w rozwoju przedimplantacyjnym zarodków jest GLUT 1. GLUT 1 ulega ekspresji w mysich i ludzkich oocytach oraz w zarodkach kolejnych stadiów rozwojowych (1, 11, 23). W blastocystach mysich zlokalizowano go w bocznych i podstawnych błonach komórek trofoektodermi oraz w błonach komórek wewnętrznej masy komórkowej, co najprawdopodobniej umożliwia pobieranie/transport glukozy z blastocelu. Począwszy od stadium 4-6-komórkowego i 8-komórkowego wykazano ekspresję, odpowiednio, GLUT 3 i GLUT 2 w zarodkach mysich (1, 11), podczas gdy w zarodkach ludzkich ekspresja tego transportera wykryta została dopiero na etapie blastocysty (7). W stadium moruli i blastocysty stwierdzono ekspresję pozostałych transporterów glukozy, odgrywających istotną rolę w rozwoju przedimplantacyjnym, tj. zależnych od insuliny GLUT 4 (7) i GLUT 8 (4). GLUT 3 ulega ekspresji na zewnętrznej powierzchni błonowej komórek trofoektodermi, natomiast zarówno GLUT 4, jak i 8 występują wewnątrzkomórkowo. Korelacja między niskim poziomem/aktywnością heksokinazy (2) i blokiem w wykorzystywaniu i/lub transporcie glukozy obserwowanym przed uformowaniem się blastocysty wynika najprawdopodobniej z niewystarczającej zdolności GLUT 1 do transportu glukozy i heksokinazy do produkcji glukozo-6-fosforanu. Pojawienie się GLUT 3 w momencie kompaktacji odzwierciedla wzrastającą zależność rozwijającej się blastocysty od glukozy (24). Ekspresja zależnych od insuliny transporterów glukozy GLUT 4 i 8 na etapie blastocysty potwierdza fakt, że dopiero od pewnego momentu w rozwoju embrionalnym pobieranie glukozy przez zarodki zależne jest od działania insuliny i tak np. receptory insuliny w zarodkach mysich wykryte zostały dopiero na etapie zarodka 8-komórkowego. Pinto i in. (26) wykazali wysoką ekspresję GLUT 8 w mysich blastocystach. W stanie podstawowym GLUT 8 zlokalizowany jest wewnątrzkomórkowo, jednakże na skutek działania insuliny bądź IGF-I przemieszcza się do błony komórkowej i ulega ekspresji w błonie podstawnej komórek trofoektodermi (24, 25). Wspomniana translokacja związana jest ze wzrostem poboru glukozy pod wpływem insuliny, przy czym sygnał przekazywany jest przez receptor dla IGF-I. Dodatkowo skorelowane jest to czasowo z przejściem zarodka z jajowodu do macicy, gdzie stwierdza się 10-krotnie wyższą koncentrację IGF-I i insuliny (26). Wykazano, że zaprzestanie stymulacji GLUT 8 przez IGF-I upośledzało transport glukozy do komórek, co powodowało wzrost apoptozy w komórkach blastocysty myszy

Tab. 1. Ekspresja poszczególnych izoform GLUT na kolejnych etapach rozwoju zarodkowego, na przykładzie zarodków mysich

	Oocyt	Zygota	Zarodek 2-kom.	Zarodek 4-kom.	Zarodek 8-kom.	Blastocysta
GLUT 1	+	+	+	+	+	+
GLUT 2	–	–	–	–	+	+
GLUT 3	–	–	–	+	+	+
GLUT 4	–	–	–	–	+	+
GLUT 8	–	–	–	–	+	+
GLUT 9	–	+	+	+	+	+

(7). Podobnie, zahamowanie szlaku sygnalizacyjnego insulina/IGFI miało skutki w postaci wzmożonej apoptozy w blastocystach i było przyczyną resorpcji zarodków. Sugeruje to, że, być może, GLUT 8 powstał jako dodatkowy, antyapoptotyczny mechanizm w blastocystyce, aby maksymalnie zwiększyć pobór glukozy w tym krytycznym momencie, gdy zarodek zmienia główne źródło energetyczne z pirogronianu na glukozę w związku ze zwiększonym zapotrzebowaniem na energię. W rozwoju przedimplantacyjnym ekspresji ulega również kolejny funkcjonalny transporter glukozy – GLUT 9, który u myszy pojawia się już na etapie zygoty (4). U myszy zidentyfikowano dwie dodatkowe izoformy GLUT 9 (GLUT9a^(Δ209-316) i GLUT9b^(NH2b/Δ209-316)) nie występujące u człowieka. Transporter ten na wczesnych etapach podziałowych zarodka występuje w błonie komórkowej, jednakże w stadium blastocysty przemieszcza się do wnętrza komórki. Zmiana lokalizacji może sugerować, że GLUT 9 odgrywa rolę w dostarczaniu glukozy rozwijającym się zarodkom przed kompaktacją. Związana z postępującym rozwojem zmiana lokalizacji GLUT9 może być także spowodowana różnicowaniem się komórek zarodka na etapie blastocysty, gdyż z wcześniejszych badań autorów wynika, że GLUT 9 w blastocystach zlokalizowany był głównie w komórkach trofoektodermi (4). Komórki trofoektodermi i totipotenne komórki wężła zarodkowego różnią się pod względem metabolicznym i najprawdopodobniej GLUT 9 odgrywa szczególną rolę w komórkach trofoektodermi, inną od obserwowanej w nieodróżnionych jeszcze zarodkach, dlatego też dochodzi do jego translokacji. W oparciu o metody Western Blot i RT-PCR stwierdzono występowanie w rozwoju przedimplantacyjnym u myszy tylko krótszej izoformy GLUT 9b^(NH2b/Δ209-316). Wykazano również, że insulina nie ma wpływu na lokalizację GLUT 9, co wskazuje, że GLUT 4 i GLUT 8 są jedynymi transporterami, które w stanie podstawowym znajdują się wewnątrz komórki i dopiero na skutek działania insuliny przemieszczają się do błony komórkowej.

Podsumowując, zmiany w wykorzystywaniu glukozy w toku rozwoju embrionalnego wskazują na specyficzną korelację między metabolizmem glukozy a ekspresją jej transporterów na poszczególnych etapach rozwoju zarodkowego. Wydaje się, że niska koncentracja glukozy w macicy, a przede wszystkim wzrost zapotrzebowania na glukozę, nasilający się w stadium blastocysty sprawia, że wzmacnia się ekspresja transporterów glukozy na tym etapie. Jednakże czynnikiem krytycznym nie jest ich liczba, ale specyficzna lokalizacja. Poszczególne izoformy transporterów ulegają ekspresji w określonych przedziałach komórkowych, spełniając swoje indywidualne funkcje.

Piśmiennictwo

1. Aghayan M., Rao L. V., James D. E.: Differential sorting of two glucose transporter molecules during mouse preimplantation development. *Development* 1992, 115, 305-312.
2. Ayabe T., Tsutsumi O., Taketani T.: Hexokinase activity in mouse embryo developed in vivo and in vitro. *Hum. Reprod.* 1994, 9, 347-351.
3. Brison D. R., Leese H. J.: Energy metabolism in late preimplantation rat embryos. *J. Reprod. Fertil.* 1991, 93, 245-251.
4. Carayannopoulos M. O., Schlein A., Wyman A., Chi M., Keembiyehetty C., Moley K. H.: GLUT 9 is differentially expressed and targeted in the preimplantation embryo. *Endocrinology* 2004, 145, 1435-1443.
5. Chatot C. L., Ziomek C. A., Bavister B. D., Lewis J. Z., Torres H. J.: An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 1989, 86, 679-688.

6. Chi M., Pingsterhaus J. M., Carayannopoulos M. O., Moley K. M.: Decreased glucose transporter expression triggers BAX-dependent apoptosis in the murine blastocyst. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 40252-40257.
7. Dan-Goor M., Sasson S., Davarashvili A., Almogor M.: Expression of glucose transporter and glucose uptake in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum. Reprod.* 1997, 12, 2508-2510.
8. Gandhi A. P., Lane M., Gardner D. K., Krisler R. L.: Substrate utilization in porcine embryos cultured in NCSU-23 and G 1.2/2.2 sequential culture media. *Mol. Reprod. Dev.* 2001, 58, 269-275.
9. Gardner D. K., Leese H. J.: Non-invasive measurement of nutrient uptake by single cultured pre-implantation embryos. *Hum. Reprod.* 1986, 1, 25-27.
10. Goot A. J., Hardy K., Winston R. M., Leese H. J.: Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate formation by single human preimplantation embryo. *Hum. Reprod.* 1990, 5, 104-108.
11. Hogan A., Heyner S., Charron M. J., Copeland N. G., Gilbert D. J., Jenkins N. A., Thorens B., Schultz G.: Glucose transporter gene expression in early mouse embryos. *Development* 1991, 113, 363-372.
12. Hooper M. K., Leese H. J.: Activity of hexokinase in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Biochem. Soc. Trans.* 1989, 17, 546-547.
13. Houghton F. D., Thompson J. G., Kennedy C., Leese H. J.: Oxygen consumption and energy metabolism in the early mouse embryo. *Mol. Reprod. Dev.* 1996, 44, 476-485.
14. Jung C. Y.: The facilitative glucose transport and insulin action. *Exp. Mol. Med.* 1996, 28, 153-160.
15. Leese H. J., Barton A. M.: Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *J. Reprod. Fertil.* 1984, 72, 9-13.
16. Leppens-Luisier G., Urner F., Sakkas D.: Facilitated glucose transporters play a crucial role throughout mouse preimplantation embryo development. *Hum. Reprod.* 2001, 16, 1229-1236.
17. Lequarre A. S., Grisart B., Moreau B., Schuurbiens N., Massip A., Dessy F.: Glucose metabolism during bovine preimplantation development: analysis of gene expression in single oocytes and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 1997, 48, 216-226.
18. Machaty Z., Day B. N., Prather R. S.: Development of early porcine embryos in vitro and in vivo. *Biol. Reprod.* 1998, 59, 451-455.
19. Martin K. L., Hardy K., Winston R. M. L., Leese H. J.: Activity of enzymes of energy metabolism in single human preimplantation embryos. *J. Reprod. Fertil.* 1993, 99, 259-266.
20. McEvoy T. G., Coull G. D., Broadbent P. J., Hutchinson J. S., Speake B. K.: Fatty acid composition of lipids in immature pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.* 2000, 118, 163-170.
21. Moley K. H., Chi M., Mueckler M.: Maternal hyperglycemia alters glucose transport and utilization in mouse preimplantation embryos. *Am. J. Physiol.* 1998, 275, E38-E47.
22. Moley K. H., Chi M. M.-Y., Knudson C. M., Korsmeyer S. J., Mueckler M. M.: Hyperglycemia induces apoptosis in preimplantation embryos via cell death effector pathways. *Nat. Med.* 1998, 12, 1412-1424.
23. Morita Y., Tsutsumi O., Hosova I., Taketani Y., Oka Y., Kato T.: Expression and possible function of glucose transporter protein GLUT 1 during preimplantation mouse development from oocytes to blastocyst. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992, 188, 8-15.
24. Pantaleon M., Kaye P.: Glucose transporters in preimplantation development. *Rev. Reprod.* 1998, 3, 77-81.
25. Pantaleon M., Ryan J. P., Gil M., Kaye P. L.: An unusual subcellular localization of GLUT1 and link with metabolism in oocytes and preimplantation mouse embryos. *Biol. Reprod.* 2001, 64, 1247-1254.
26. Pinto A. B., Carayannopoulos M. O., Hoehn A., Dowd L., Moley K. H.: Glucose transporter 8 expression and translocation are critical for murine blastocyst survival. *Biol. Reprod.* 2002, 66, 1729-1733.
27. Rieger D., Loskutoff N. M., Betteridge K. J.: Developmentally related changes in the uptake and metabolism of glucose, glutamine and pyruvate by cattle embryos produced in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* 1992, 4, 547-557.
28. Sakkas D., Urner F., Menezo Y., Leppens G.: Effects of glucose and fructose on fertilization, cleavage and viability of mouse embryos in vitro. *Biol. Reprod.* 1993, 49, 1288-1292.
29. Sturmey R. G., Leese H. J.: Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. *Reproduction* 2003, 126, 197-204.
30. Swain J. E., Bormann C. L., Krisher R. L.: Development and viability of in vitro derived porcine blastocyst cultured in NCSU-23 and G1.2/2.2 sequential medium. *Theriogenology* 2001, 56, 459-469.
31. Thompson J. G., Partridge J., Houghton F. D., Cox C. I., Leese H. J.: Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 1996, 106, 299-306.
32. Urner F., Saakas D.: Glucose participates in sperm-oocyte fusion in the mouse. *Biol. Reprod.* 1996, 55, 917-922.
33. Wales R. G., Edirisinghe W. R.: Volume of fluid and concentration of cations and energy substrates in the uteri of mice during early pseudopregnancy. *Reprod. Fertil. Dev.* 1989, 1, 171-178.
34. Wheeler T. J., Hinkle P. C.: The glucose transporter of mammalian cells. *Ann. Rev. Phys.* 1985, 47, 503-517.

Adres autora: Marta Wasielek, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn; e-mail: marta@pan.olsztyn.pl