

Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften  
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III  
(Dekan: Prof. Dr. P. Wycisk)  
der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Expression und Signaltransduktion  
des Insulin-/IGF-Rezeptorsystems in Blastozysten des Kaninchens**

**Dissertation**

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

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Trophologie (Dr. troph.)

vorgelegt von

Diplom-Ernährungswissenschaftlerin Nicole Ramin  
geboren am 18.03.1980 in Merseburg

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer  
PD Dr. habil. Robert Ringseis  
Prof. Dr. Matthias Blüher

Verteidigung am 06.04.2009

Halle (Saale) 2009

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1</b>	<b>Einleitung.....1</b>
1.1	Zielstellung der Arbeit.....1
1.2	Das Insulin-/IGF-System.....2
1.2.1	Insulin.....3
1.2.2	IGF1 und IGF2.....4
1.3	Die Insulin (IR) und <i>Insulin-like growth factor</i> -Rezeptoren (IGF-R).....5
1.3.1	Der Insulinrezeptor.....6
1.3.2	Die Insulinrezeptor-Isoformen.....7
1.3.3	IGF1-R.....9
1.3.4	Hybridrezeptoren.....10
1.3.5	IGF2-R.....11
1.4	IR, IGF1-R, IGF2-R, Insulin, IGF1 und IGF2 in Präimplantationsembryonen.....11
1.5	Signalwege im Präimplantationsembryo.....12
1.6	Bedeutung der Glukose für den Präimplantationsembryo.....14
1.7	Präimplantationsentwicklung des Kaninchens.....15
1.7.1	Differenzierung der Keimscheibe.....16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....19</b>
2.1	Versuchstiere.....19
2.1.1	Versuchstierhaltung.....19
2.2	Gewinnung der Präimplantationsembryonen.....19
2.3	Mikrosektion von Blastozysten.....20
2.4	Embryonenkultur.....20
2.5	Zellkultur.....22
2.6	Molekularbiologische Methoden.....22
2.6.1	RNA-Isolierung aus Geweben.....22
2.6.2	RNA-Isolierung aus Zellen.....23
2.6.3	mRNA-Isolierung aus Embryonen.....23
2.6.4	RNA-Konzentrationsbestimmung.....24
2.6.5	DNase Verdau.....24
2.6.6	cDNA-Synthese.....25
2.6.7	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....26

2.6.7.1	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	26
2.6.7.2	<i>Nested</i> PCR	27
2.6.7.3	<i>Real Time</i> PCR	28
2.6.8	RNA- und DNA-Gelelektrophorese	30
2.6.9	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	30
2.6.10	Klonierung von PCR-Fragmenten	30
2.6.10.1	Ligation der PCR-Fragmente	30
2.6.10.2	Herstellung der kompetenten Bakterienzellen	31
2.6.10.3	Transformation	31
2.6.10.4	Plasmid-Isolation aus <i>E. coli</i>	32
2.6.10.5	Restriktion	33
2.6.10.6	Glycerinkultur	33
2.6.10.7	Sequenzierung	33
2.6.10.8	Herstellung des DNA-Plasmid-Standards	34
2.7	Immunhistochemische Methoden (IHC)	34
2.7.1	Anfertigung der Schnitte	34
2.7.2	Immunhistochemie an Paraffinschnitten	35
2.7.3	<i>Whole Mount</i> Immunhistochemie	36
2.7.3.1	<i>Whole Mount</i> Immunhistochemie mit DAB-Detektion	37
2.7.3.2	<i>Whole Mount</i> Immunhistochemie mit fluoreszierendem Sekundärantikörper	38
2.7.4	Immunhistochemie an separierten Embryoblasten (Keimscheiben)	38
2.7.5	Hämalaunfärbung	38
2.8	Proteinchemie	39
2.8.1	Proteinisolation	39
2.8.2	Proteinquantifizierung (Biorad-Assay)	39
2.8.3	Auftrennung der Proteine durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
2.8.4	<i>Western Blot</i> Analyse	41
2.8.4.1	Hybridisierung mit dem spezifischen Antikörper	42
2.8.4.2	Abwaschen der Nylonmembran	43
2.9	Statistische Analysen	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
3.1	Expression der Liganden IGF1, IGF2 und Insulin in der Kaninchenblastozyste	45

3.1.1	IGF1 und IGF2 .....	45
3.1.2	Insulin.....	47
3.1.3	Insulinnachweis in Blastozysten nach <i>in vitro</i> Kultur .....	49
3.2	Expression des IR und der IGF-R in der Kaninchenblastozyste .....	50
3.2.1	Lokalisation des IR in der Kaninchenblastozyste.....	50
3.2.2	Expression der IR-Isoformen in Blastozysten und Geweben des Kaninchens.....	51
3.2.3	Expression des IGF1-R und IGF2-R in Blastozysten und Geweben des Kaninchens.....	53
3.2.4	Proteinexpression und Lokalisation des IGF1-R in Kaninchenblastozysten.....	55
3.2.5	Proteinexpression des IGF2-R in Kaninchenblastozysten.....	56
3.3	Aktivierung von Signalwegen in Kaninchenblastozysten in der <i>in vitro</i> Kultur durch Insulin und IGF1 .....	56
3.3.1	Bestimmung der im Kaninchenembryo wirksamen Konzentrationen von Insulin und IGF1 .....	56
3.3.2	Aktivierung des MAPK/Erk-Signalsystems in Kaninchenblastozysten.....	57
3.3.3	Aktivierung des MAPK/Erk-Signalsystems in separierten Embryoblasten und Trophoblasten .....	58
3.3.4	Quantifizierung des MAPK/Erk-Zielgens c-fos.....	59
3.3.5	Aktivierung des PI3-K/Akt-Signalweges in Kaninchenblastozysten .....	61
3.3.6	Aktivierung des PI3-K/Akt-Signalsystems in separierten Embryoblasten und Trophoblasten.....	62
3.3.7	Quantifizierung des PI3-K/Akt-Zielgens PEPCK.....	63
3.3.8	Quantifizierung des PI3-K/Akt-Zielgens HK.....	64
3.3.9	Quantifizierung des PI3-K/Akt-Zielgens Bcl-x(L).....	66
3.4	Wirkung des <i>Insulin-like growth factor 2</i> (IGF2) auf Kaninchenblastozysten.....	68
3.4.1	Aktivierung des MAPK/Erk- und PI3-K/Akt-Signalweges durch IGF2 in Kaninchenblastozysten .....	68
3.4.2	Aktivierung des MAPK/Erk- und PI3-K/Akt-Signalwegs durch IGF2 in separierten Embryoblastzellen und Trophoblastzellen.....	69
3.5	Regulation metabolischer Stoffwechselwege durch Glukose in der Kaninchenblastozyste.....	71
3.5.1	Transkriptionelle Regulation von IR und IGF1-R durch niedrige und hohe Glukosekonzentrationen.....	71
3.5.2	Transkriptionelle Regulation von PEPCK und HK durch niedrige und hohe Glukosekonzentratione.....	72

3.5.3	Wirkung von Insulin auf PEPCK und HK in definierten Glukosekonzentrationen.....	73
3.6	Einfluss von Insulin und IGF1 auf die Differenzierung des Präimplantationsembryos.....	75
3.6.1	Expression des IR in 6 Tage alten Kaninchenblastozysten während der frühen Gastrulation.....	75
3.6.2	Expression und Lokalisation des IGF1-R in 6 Tage alten Kaninchenblastozysten während der frühen Gastrulation.....	76
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>78</b>
4.1	Expression des IR/IGF-R-Systems in Blastozysten.....	78
4.1.1	Expression und Lokalisation des IR und seiner Isoformen.....	78
4.1.2	Expression und Lokalisation des IGF1-R.....	79
4.1.3	Expression und Lokalisation des IGF1-R während der Keimscheibenentwicklung.....	80
4.1.4	Expression des IGF2-R.....	81
4.2	Einfluss von Wachstumsfaktoren auf Präimplantationsembryonen.....	82
4.2.1	Expression und Lokalisation von Insulin in Blastozysten.....	82
4.2.2	Expression von IGF1 und IGF2 in Blastozysten.....	83
4.3	Aktivierung von Signalwegen durch Insulin und die IGFs.....	85
4.3.1	Regulation von Wachstum durch IGF1 und IGF2.....	86
4.3.2	Regulation von Wachstum und Glukosestoffwechsel durch Insulin.....	87
4.3.3	Regulation von Bcl-x(L).....	88
4.4	Zusammenfassung: Aktivierung von Signalwegen nach Insulin-, IGF1- und IGF2-Stimulation.....	89
4.5	Einfluss von Glukose auf die Blastozyste.....	91
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>93</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>V</b>
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	V
7.2	Tabellenverzeichnis.....	VI
7.3	Abkürzungsverzeichnis.....	VI
7.4	Geräte- und Softwareverzeichnis.....	X
7.5	Chemikalien- und Verbrauchsmaterialienverzeichnis.....	XI
7.6	Beispiel für die Auswertung der <i>Real Time</i> PCR nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode.....	XVI
7.7	Akt/Erk Phosphorylierung in MCF7-Zellen.....	XX

# 1 Einleitung

## 1.1 Zielstellung der Arbeit

Maternale-embryonale Interaktionen sind für die zeitgerechte Entwicklung des Embryos und für die Implantation notwendig. Es ist bekannt, dass maternale Diäten mit modifizierten Kalorienzahlen oder gezielten Veränderungen bestimmter Nährstoffe (Protein-, Lipid- oder Kohlenhydratgehalt) die Embryonal- und Fetalentwicklung beeinflussen und zu veränderten Phänotypen der Nachkommen führen können. Diese können sich vielfältig äußern z.B. in veränderter Zusammensetzung der Muskulatur, Steigerung des Blutdrucks, kardialen Fehlbildungen, Fettsucht und/oder Diabetes und Verhaltensstörungen. Die genauen Pathomechanismen für diese Veränderungen sind nicht bekannt. Als Auslöser werden vor allem i) epigenetische Modifikationen der DNA der Nachkommen und dadurch resultierende Veränderungen von Genexpressionsmustern und ii) metabolischer Stress diskutiert. Der Einfluss von Diäten auf die Entwicklung der Nachkommen betrifft bereits die Präimplantationsphase und erstreckt sich nach neueren Untersuchungen auch auf die Oozytenentwicklung vor der Befruchtung (Fleming 2004; Jungheim und Moley 2008; Watkins 2008).

Der britische Wissenschaftler Professor David J.P. Barker hat auf Grund epidemiologischer Untersuchungen zu Beginn der 1990er Jahre die nach ihm benannte Hypothese formuliert, der zufolge es einen Zusammenhang zwischen dem Geburtsgewicht und dem Risiko für Erkrankungen im Erwachsenenalter gibt. Je niedriger das Geburtsgewicht, desto höher ist die Anfälligkeit, am metabolischen Syndrom, beispielsweise Diabetes mellitus Typ 2 oder Adipositas, zu leiden. Diese Barker-Hypothese wurde inzwischen in Tiermodellen experimentell untermauert (Langley-Evans 1997; Kwong 2000; Kwong 2006; Mallinson 2007).

Eine besondere Rolle für den Energiestoffwechsel und bei der Regulation der frühen embryonalen Entwicklung haben Glukose, Insulin und die Wachstumsfaktoren IGF1 und IGF2. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkungsweise des IR/IGF-R-Systems auf die Blastozyste vor der Implantation zu untersuchen. Die molekularen Signalwege und die zellspezifischen Auswirkungen im Embryoblasten (Em) und Trophoblasten (Tr) standen dabei im Vordergrund. Dazu wurden neben der Expression und Lokalisation des IR/IGF-R-Systems in Blastozysten des Kaninchens (*Oryctolagus cuniculus*) die aktivierten Signalwege (PI3-K/Akt; MAPK/Erk) nach Insulin- und IGF-Stimulation untersucht. Als Endpunkte dienten die Expressionsdaten von Zielgenen, die für wichtige Entwicklungsprozesse im Embryo kennzeichnend sind, wie c-fos (Mitose), PEPCK, HK (Stoffwechsel) und Bcl-x(L) (Anti-

Apoptose). Des Weiteren wurde die Transkription der Stoffwechsel-regulierenden Enzyme PEPCCK und HK unter variierenden Glukosekonzentrationen und gleichzeitiger Insulin- bzw. IGF1-Stimulation *in vitro* ermittelt.

Ein besonderer Aspekt der vorliegenden Arbeit war die Analyse der Insulin- und IGF-Wirkungen in Embryoblast und Trophoblast. Diese beiden Blastozyst-Zelllinien bestimmen in spezifischer Weise die weitere prä- und postimplantäre Embryonalentwicklung. Die Kaninchenblastozyste am Tag 6 p.c. eignet sich mit ca. 4000 Zellen besonders für die Untersuchung zelllinienspezifischer Effekte des IR/IGF-R-Systems. Weitere Vorteile sind die exakte Bestimmung des Blastozystenalters, da die Ovulation durch die Paarung ausgelöst wird. Der Beginn der ersten Gastrulationsereignisse vor der Implantation kann dadurch zeitlich und entwicklungspezifisch untersucht werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es erstmals nachzuweisen, dass die Wachstumsfaktoren des IR/IGF-R-Systems und Glukose in den Zelllinien Embryoblast und Trophoblast unterschiedliche molekulare Reaktionen induzieren. Grundlage dieser molekularen Effekte ist die zelllinienspezifische Expression der Rezeptoren des Insulin/IGF-Systems.

## 1.2 Das Insulin-/IGF-System

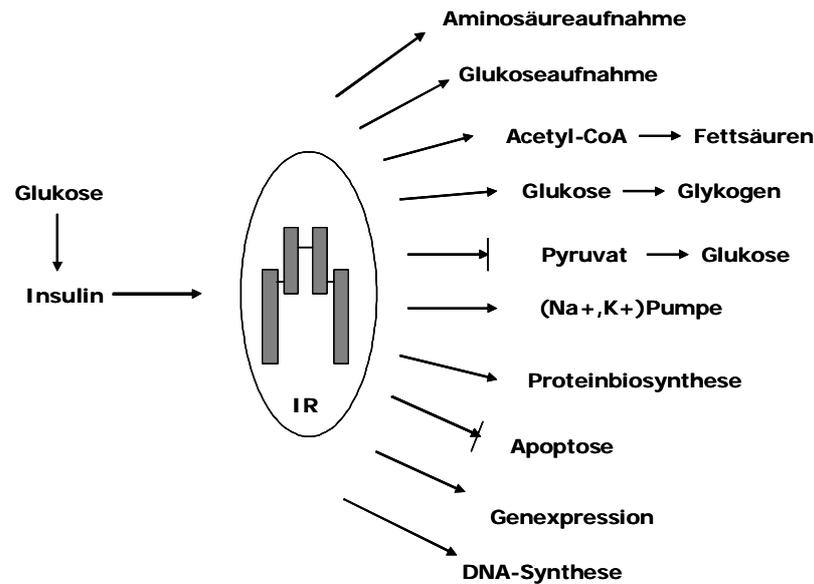
Das Hormon Insulin, die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (*insulin-like growth factors*, IGF), deren Rezeptoren (Insulinrezeptor, IR; *insulin-like growth factor receptor*, IGF-R) und Bindeproteine gehören zum IR/IGF-R-System, das eine essentielle Bedeutung für die Regulation von Entwicklung, Wachstum und Stoffwechsel hat. Sie steuern mitogene, proliferative und anti-apoptotische Prozesse auf zellulärer Ebene. Insulin reguliert im Wechselspiel mit anderen Hormonen den Glukosemetabolismus des Organismus. Ein „intaktes“ IR/IGF-R-System während der Prä- und Postimplantationsphase von Säugetierembryonen ist Voraussetzung für die zeitgerechte Entwicklung von Embryo und Fetus. Ist das System auf maternaler oder embryonaler Seite gestört, kommt es zu Fehlregulationen, die sich auf die Entwicklung des Embryos oder Feten negativ auswirken können. Beeinflusst wird das IR/IGF-R-System auch durch exogene Faktoren, wie Mangel- und Überernährung der Mutter und Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder das Polyzystische Ovar-Syndrom (PCO). Diabetikerinnen weisen z.B. Subfertilität, gehäufte Frühaborte, eine verzögerte Entwicklung der Feten oder Fehlbildungen der Nachkommen auf (Tulppala 1993; Rosenn 1994; Katagiri 1996; Reece und Eriksson 1996; Pinto 2002).

Die Entwicklung und Reifung des Organismus wird zu einem wesentlichen Anteil von Hormonen gesteuert, die ihre Wirkung über autokrine, parakrine oder endokrine Mechanismen vermitteln. Neben dem eigentlichen Wachstumshormon, dem Somatotropin, sind weitere Substanzen identifiziert worden, die modulierend in den Zellzyklus eingreifen und Zellteilung, -wachstum und -proliferation beeinflussen. Dazu zählen die in dieser Arbeit untersuchten Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren 1 und 2 (IGF1 und IGF2), auch als Somatomedine bezeichnet, der *nerve growth factor* (NGF), *epidermal growth factor* (EGF), *transforming growth factor* (TGF), *fibroblast growth factor* (FGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF), Erythropoietin (EPO), mehrere Interleukine und das Plazentalaktogen (PL).

### 1.2.1 Insulin

Das Hormon Insulin vermittelt neben seiner klassischen metabolen Wirkung positive Effekte auf das embryonale Zellwachstum und wird somit zu den Wachstumshormonen gezählt (Gebert und Thomas 1992; Kiess 1993; Greenstein und Raue 1996; Hürter 1997; Thomas 2000). Eine maternale Hyperinsulinämie beispielsweise führt zu einem gesteigerten fetalen Wachstum und zur Insulinresistenz der Nachkommen (Myers und White 1996).

Das Peptidhormon Insulin wird mit den IGFs, den Relaxinen, den Bombyxinen und den *Molluscan Insulin-like Peptides* (MIPs) in eine Familie verwandter Proteine bzw. Peptide eingeordnet (Murray-Rust 1992). Die Aufklärung der Peptidstruktur des 5734 Da großen Proteohormons gelang bereits 1950 Friedrich Sanger (Sanger 1950; 1959). Der stärkste Sekretionsreiz für Insulin ist eine hohe Konzentration von Glukose im Blut. Insulin zirkuliert als Monomer ohne Proteinbindung im Blut. Seine biologische Halbwertszeit beträgt etwa 10-30min. Abgebaut wird es in fast allen Geweben, hauptsächlich jedoch in Leber und Niere (Greenstein und Raue 1996; Hürter 1997; Thomas 2000). Insulin verbessert den Influx von Nährstoffen und induziert Stoffwechselabläufe, die der Energiegewinnung und -erhaltung dienen (Gebert und Thomas 1992; Myers und White 1996; Hürter 1997); (Abb. 1).



**Abb. 1 Regulation verschiedener physiologischer Prozesse durch Insulin**

Insulin bindet an den Insulinrezeptor (IR). Die Bindung und Aktivierung des IR führt zur Steigerung (→) bzw. Hemmung (↔) der gelisteten zellulären Prozesse (modifiziert nach (Myers und White 1996).

### 1.2.2 IGF1 und IGF2

Die IGFs sind einkettige Polypeptide, die zu 62% Prozent homolog zueinander sind und in ihrer Struktur dem Proinsulin ähneln (Kiess 1993; Greenstein und Raue 1996; Stolecke 1997; Thomas 2000). Sie wurden früher auch als Somatomedine C und A, *nonsuppressible insulin like activity* oder *multiplication-stimulating activity* bezeichnet. Die IGFs sind Produkte von verschiedenen Genen (IGF1 von Chromosom 12, IGF2 von Chromosom 11). Die A- und B-Kette sind über Disulfidbrücken und das C-Peptid (*Connecting Peptide*) miteinander verbunden. Anders als beim Insulin, behalten sie ihr C-Peptid und besitzen eine D-Kette am C-terminalen Ende der A-Kette (Daughaday und Rotwein 1989; Sussenbach 1992). Der Hauptsyntheseort beider IGFs ist die Leber (Murphy 1987; Lowe 1988; Iranmanesh und Veldhuis 1992; Daughaday 2000). Die Expression des 7650 Da großen IGF1 wird durch das Somatotropin (STH, GH) gesteuert (Copeland 1980; Mathews 1986). Die Serumkonzentration des IGF1 ist stark alters- und entwicklungsabhängig. Die fetale Phase zeichnet sich durch geringe IGF1-Konzentrationen aus, die während der ersten Jahre nach der Geburt langsam ansteigen (Furlanetto 1977; Clemmons und Van Wyk 1984; Gluckman 1995; Li 1999). Die Konzentration hat ihren Höhepunkt zur Pubertät und sinkt dann mit zunehmendem Alter allmählich ab (Clemmons und Van Wyk 1984; Ranke 1988). Bei Kleinwüchsigen werden oft niedrige IGF1-Plasmaspiegel gefunden (Baserga 1997a). Hormone wie z.B. Testosteron und Glukokortikoide stimulieren die IGF1-Synthese, während Nährstoffmangel (Unterernährung,

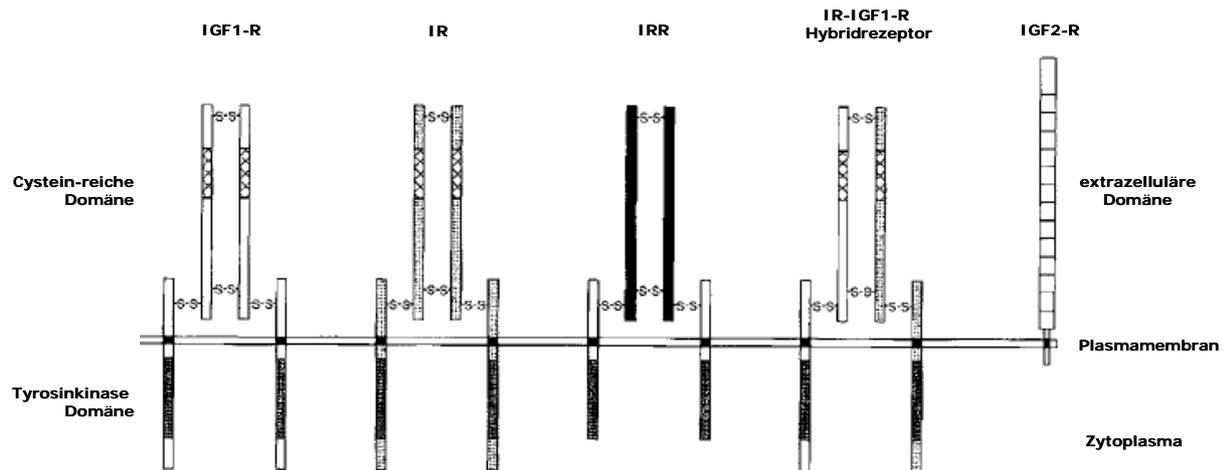
Hungern und Fasten) zur Hemmung der Bildung führt (Fowden 2003). Außerdem schwankt der IGF1-Spiegel bei pathologischen Erkrankungen wie Leberzirrhose (Zapf 1978), Nierenversagen (Goldberg 1982) oder Diabetes mellitus (Ashton 1983).

IGF2 ist ca. 7,5 kDa groß und besteht aus 67 Aminosäuren und wird Somatotropin-unabhängig in der Leber, in embryonalem Gewebe und in Tumoren gebildet. Hohe IGF2-Konzentrationen werden vor allem fetal gemessen (Gluckman und Butler 1983; Mesiano 1987). IGF2 gilt aus diesem Grund als bedeutender fetaler Wachstumsfaktor (Jones und Clemmons 1995; Allan 2001). Wenige Monate nach der Geburt sinkt der IGF2-Spiegel (Luna 1983), bleibt beim Menschen, im Gegensatz zur Maus, jedoch postnatal erhalten (Lee 1990). Im weiteren Lebensverlauf ändert sich der IGF2-Spiegel kaum noch.

Über den Blutkreislauf werden die IGFs an ihre Erfolgsorgane, z.B. Muskel (Delafontaine 1998), Ovar (Vendola 1999) oder Gehirn (Bondy 1992), transportiert. Dabei sind die IGFs vorrangig an Bindeproteine (IGFBP) gebunden (Sara und Hall 1990; Rotwein 1991) und liegen, anders als Insulin, nicht frei vor. Durch die Bindung an IGFBP werden die IGFs vor proteolytischem Abbau geschützt. Dadurch verlängert sich die Halbwertszeit auf 12 bis 16h, während freies IGF nur eine kurze Halbwertszeit von 4-20min besitzt (Duan 2002; Bach 2005).

### **1.3 Die Insulin (IR) und *Insulin-like growth factor*-Rezeptoren (IGF-R)**

Die biologische Wirkung von Insulin und den IGFs wird über die Bindung an spezifische membranständige Rezeptorproteine vermittelt. Die entsprechenden Rezeptoren sind der Insulinrezeptor (IR), der *Insulin-like growth factor* 1-Rezeptor (IGF1-R) und der IGF2/Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (IGF2-R) (Abb. 2). Der IR und IGF1-R zählen zu der Gruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren. Zu dieser gehört außerdem der Insulinrezeptor-*related*-Rezeptor (IRR). Eine geringere Strukturverwandtschaft besteht zu den Familien der EGF/HER2/HER3/Xmrk-, PDGF/CSF-1/c-kit- und FGF/flg/bek-Tyrosinkinase-Rezeptoren (Kleinjung 1996). Für die Aktivierung der EGF-R- und FGF-R-Familie ist eine Dimerisierung der Untereinheiten notwendig, während die IR-Familie kovalent verknüpfte  $\alpha$ - $\beta$  Dimere bildet (Lee und Pilch 1994; De Meyts 2004). Alle Tyrosinkinase-Rezeptoren haben gemeinsam, dass die Bindung des Liganden zur Autophosphorylierung von Tyrosylresten in der intrazellulären Rezeptordomäne führt. Sie zählen somit zu den ligandenaktivierten Tyrosinkinasen mit Autophosphorylierung.



**Abb. 2 Struktur der IGF-Rezeptoren**

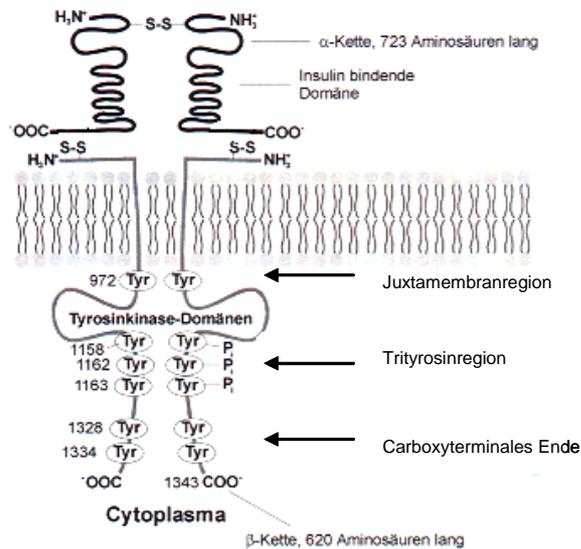
*Insulin-like growth factor* 1-Rezeptor (IGF1-R), Insulinrezeptor (IR) und Insulinrezeptor-*related* Rezeptor (IRR) sind heterotetramere Komplexe, wobei dem IRR eine zytoplasmatische Domäne fehlt. Die Hybride sind Hemirezeptoren aus IR und IGF1-R. Der IGF2-R ist ein Homomer, ist strukturell mit den anderen abgebildeten Rezeptoren nicht verwandt und hat keine Tyrosinkinaseaktivität (modifiziert nach (LeRoith 1995).

### 1.3.1 Der Insulinrezeptor

Der IR zeigt eine hohe Homologie zum IGF1-R sowohl in der Exon-Intron-Organisation, der intrazellulären Prozessierung als auch in der Tertiärstruktur der Proteine (Czech 1982; Ebina 1985; Ullrich 1985; Ullrich 1986; Abbott 1992). Die höchste Homologie zeigen die  $\beta$ -Untereinheiten, während die  $\alpha$ -Untereinheiten nur 47-67% identisch sind. Trotz ihrer Gemeinsamkeiten sind beide Rezeptoren Produkte von verschiedenen Genen. Das Gen des humanen IR liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 19 und besteht aus 22 Exons und 21 Introns. Damit umspannt es einen Bereich von mehr als 120 Kilobasen (kb) (Seino 1989). Der IR ist eine membranständige heterotetramere Tyrosinkinase, die aus 2  $\alpha$ - und 2  $\beta$ -Untereinheiten besteht, welche über Disulfidbrücken verknüpft sind. Die  $\beta$ -Untereinheit verankert den Rezeptor in der Membran (Transmembrandomäne) und trägt in ihrem zytoplasmatischem Anteil die Tyrosylgruppen für die Autophosphorylierung.

Nach der Ligandenbindung an den IR werden im zytoplasmatischen Teil Phosphatgruppen auf Tyrosylreste der  $\beta$ -Untereinheit übertragen und es kommt zur Autophosphorylierung. Die Tyrosylreste werden nach ihrer Lage in 3 Gruppen zusammengefasst: die Juxtamembran-, die Trityrosinregion und das Carboxyterminale Ende (Abb. 3). Die Juxtamembranregion ist mit der Rezeptorinternalisierung verbunden (Duckworth 1998), während die Trityrosinregion für die Stimulierung der Tyrosinkinaseaktivität von Bedeutung ist. Die Funktion der ebenfalls phosphorylierten carboxyterminalen Tyrosylreste wird in der Verstärkung des Insulinsignals vermutet (Bernier 2000). Zusätzlich zum Tyrosin sind auch Serin- und

Threoninphosphorylierungen an der Regulierung der Rezeptoraktivität beteiligt (Feener 1994; Liu und Roth 1994; Tennagels 2001).



**Abb. 3 Schematische Darstellung des Insulinrezeptors**  
modifiziert nach (Linnemann M 1999).

### 1.3.2 Die Insulinrezeptor-Isoformen

Der Insulinrezeptor wird in zwei Isoformen exprimiert, die durch alternatives Spleißen generiert werden. Alternatives Spleißen ist ein wichtiger molekularer Mechanismus, der die Proteindiversität eines einzigen Gens erhöht, da verschiedene Formen von mRNA aus einem prä-mRNA-Molekül gebildet werden. Dieser Mechanismus verläuft meistens über den Ausschluss oder die Einbeziehung eines oder mehrerer Exons. Weitere Beispiele für alternativ gespleißte Proteine sind beispielsweise Fibronectin, die Gonadotropinrezeptoren oder die Proteinkinase C. Durch alternatives Spleißen des Exons 11 können zwei Isoformen des IR gebildet werden, die sich in der C-terminalen Sequenz der  $\alpha$ -Untereinheit unterscheiden. Die IR-Isoform B (IR-B) enthält ein zusätzliches Exon 11, das mit 36 Nukleotiden für 12 Aminosäuren kodiert (Seino und Bell 1989). Bei der IR-Isoform A (IR-A) fehlt das Exon 11 (Ex 11), so dass das Produkt 12 Aminosäuren verkürzt ist (Abb. 4).

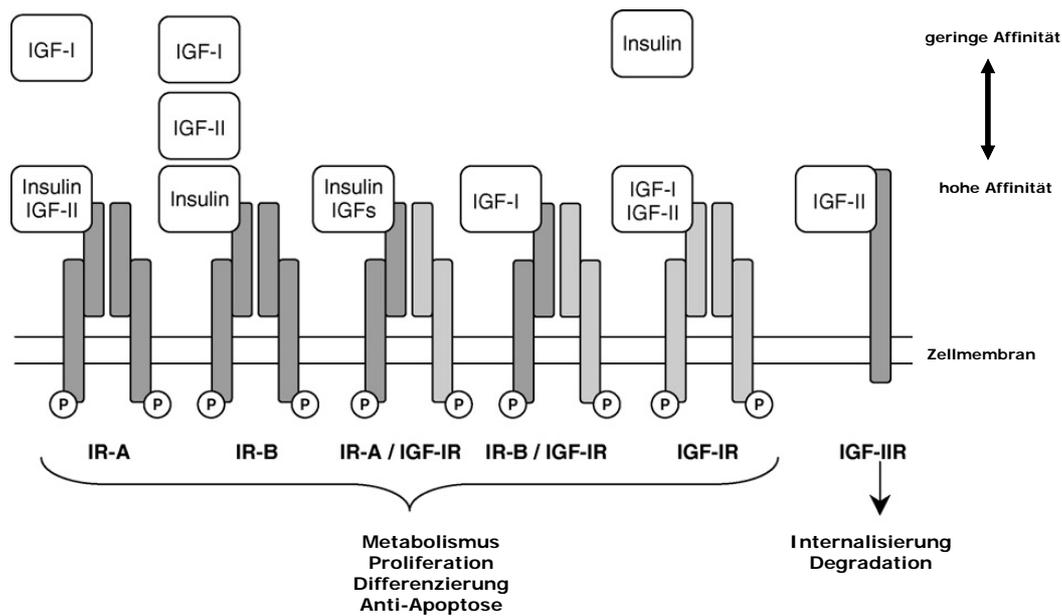
	Exon 10	Exon 11	Exon 12
O. cuniculus IR-A	EESFRKTFEDYLNHVVFVP	-----	RPSRKRRSLGEVNNVTAAAPTV
O. cuniculus IR-B	EESFRKTFEDYLNHVVFVP	<b>RKTSSGSGAENT</b>	RPSRKRRSLGEVNNVTAAAPTV
		+   +	+
H. sapiens IR-B	EESFRKTFEDYLNHVVFVP	<b>RKTSSGTGAEDP</b>	RPSRKRRSLGDVGNVTVAVPTV

**Abb. 4 Aminosäure-Sequenz des IR**

im Bereich des Exon 11 der Insulinrezeptor-Isoformen A (IR-A) und B (IR-B) von *Oryctolagus cuniculus* und des Menschen (Übereinstimmung = I ; Fehlen einer Aminosäure = - ; Aminosäuren mit gleicher Eigenschaft = +). Die Abkürzungen für die Aminosäuren finden sich im Anhang im Abkürzungsverzeichnis (aus (Navarrete Santos 2008).

Beide Isoformen binden Insulin mit hoher Affinität. IR-A zeigt eine zweifach höhere Neigung (Mosthaf 1990; Yamaguchi 1993) und zeichnet sich, im Vergleich zu IR-B, durch eine gesteigerte Internalisierungsrate aus (Vogt 1991; Yamaguchi 1991). Dagegen vermittelt die Isoform B das Insulinsignal effizienter als IR-A, da er eine höhere Kinaseaktivität aufweist (Kellerer 1992; Kosaki 1995). Diese funktionell unterschiedlichen Eigenschaften sind begründet durch die verschiedene Sequenz und Struktur der Isoformen. Ein in der Isoform B identifiziertes Phosphopeptid E, welches nicht in der Isoform A gefunden wurde, ist möglicherweise in die gesteigerte Kinaseaktivität involviert (Kosaki 1995). Die IGFs können ebenfalls an die beiden IR-Isoformen binden, wenn auch mit geringerer Affinität als an ihre eigenen Rezeptoren oder als Insulin (Frasca 1999). Eine Ausnahme ist die Isoform A, die auf IGF2 mit ähnlicher hoher Bindung des Liganden reagiert wie der IGF1-R (Frasca 1999; Sciacca 2003) (Abb. 5).

Die mRNA-Menge beider IR-Isoformen ist gewebsspezifisch verteilt (Moller 1989; Goldstein und Dudley 1990; Serrano 2005). Klassische Insulin-sensitive Gewebe, wie die Leber oder das Fett- und Muskelgewebe, weisen einen hohen Anteil der Isoform B auf, während die Isoform A vor allem in fetalen Geweben, im zentralen Nervensystem, in pankreatischen  $\beta$ -Zellen und hämatopoetischen Zellen exprimiert wird (Moller 1989; Sesti 1992; Kosaki 1995); (Frasca 1999; Sciacca 1999; Vella 2001). Die Expression beider Isoformen ist von der Zelldifferenzierung abhängig. In Präadipocyten ist IR-A die hauptsächliche Isoform. Seine Menge nimmt während der Differenzierung zu Adipozyten ab, während die Menge der Isoform B ansteigt (Serrano 2005). Ein ähnlicher Differenzierungseffekt auf die anteilige Expression beider Isoformen konnte auch in humanen HepG2-Hepatoblastom-Zellen nachgewiesen werden (Kosaki und Webster 1993; Pandini 2002).



**Abb. 5 Übersicht über das Insulin-/IGF-R-System**

Bindungsaffinitäten von Insulin, IGF1 und IGF2 an die Insulinrezeptor-Isoformen A (IR-A) und B (IR-B), den *Insulin-like growth factor*-Rezeptor 1 (IGF1-R), deren Hybridrezeptoren aus IR-A und IR-B mit dem IGF1-R und den *Insulin-like growth factor*-Rezeptor 2 (IGF2-R) (modifiziert nach (Chao und D'Amore 2008).

### 1.3.3 IGF1-R

Der IGF1-R wird in fast allen Geweben und Zelltypen exprimiert. Nur in der Leber, dem Syntheseort des IGF1-Peptides, ist keine Rezeptor-RNA nachweisbar (Bondy 1990).

Er besitzt strukturell den selben Aufbau wie der IR. Die Tyrosinkinase-Domäne und die juxtamembrane Domäne weisen mit einer Homologie von 84% bzw. 61% die größte Ähnlichkeit zum IR auf (Baserga 1997a; Baserga 1997b). Der IGF1-R bindet IGF1 und IGF2 mit annähernd gleicher Affinität, wohingegen Insulin nur 100-fach schwächer an den IGF1-R bindet (Abb. 5) (LeRoith 1995; Lighten 1998; Frasca 1999; Denley 2005). In IR-defizienten Muskelzellen und bei unphysiologisch hohen Konzentrationen kann Insulin seine Wirkung auch über den IGF1-R vermitteln (Baudry 2001). Modifikationen bei der RNA-Translation führen zu zwei mRNA-Vorläufern des IGF1-R (Yee 1989; Abbott 1992), die Unterschiede in der IGF1- bzw. IGF2-Bindung und variierende Signaltransduktionen bedingen (Condorelli und Smith 1993; Condorelli 1994; LeRoith 1995). Auch Proteinmodifikation durch Glykosylierungen führen zu Unterschieden in der IGF-Bindung (Alexandrides und Smith 1989; Garofalo und Rosen 1989; Garofalo und Barenton 1992; Alexandrides 1993; Moss und Livingston 1993).

Eine verstärkte Expression des IGF1-R und seiner Liganden konnte in vielen verschiedenen Tumortypen wie Bronchialkarzinomen, Brust- und Prostatakarzinomen, Hepatomen, Kolon-

und Pankreastumoren sowie in Meningiomen und Gliomen nachgewiesen werden (Macaulay 1992). Eine Blockierung der IGF1-R-Expression oder eine Reduktion der IGF1-R-Menge resultiert *in vivo* in einer massiven Apoptose von Tumorzellen (Resnicoff 1995a; Resnicoff 1995b). Der IGF1-R vermittelt Signale für zelluläres Wachstum (Russell 1984), Differenzierung (Liu 1993) und Apoptose (McCubrey 1991; Harrington 1994; Sell 1995). In IR-defizienten Muskelzellen übernimmt er ebenfalls metabolische Funktionen und tritt als alternativer Rezeptor zum IR auf (Baudry 2001).

#### 1.3.4 Hybridrezeptoren

Aufgrund der hohen Homologie des IR und IGF1-R sind sie in der Lage, Hybridrezeptoren auszubilden (Abb. 5). Sie entstehen durch Verknüpfung einer  $\alpha$ - $\beta$ -Untereinheit des IR-Dimers mit einer  $\alpha$ - $\beta$ -Untereinheit des IGF1-R. Diese gemischten Heterodimere werden als Insulin/IGF1-Hybridrezeptoren (Hybrid-R) bezeichnet (Soos 1990; Kasuya 1993; Seely 1995). In vielen Geweben sind die Hybridrezeptoren der vorherrschende Rezeptorsubtyp, so zum Beispiel zu 40% in Leber und Milz, 70% in der Plazenta und 85-90% in Skelettmuskel und Herz (Baillyes 1997). Das Resultat einer Überexpression von IR und IGF1-R ist die verstärkte Bildung von Hybridmolekülen (Papa 1990; Papa 1993; Belfiore 1999; Pandini 1999). Funktionell verhalten sich die Hybridrezeptoren ähnlich dem IGF1-R, da sie hauptsächlich IGF1 binden (Abb. 5). Die Bindungsaffinität der Hybridrezeptoren zu IGF1 entspricht ungefähr der des IGF1-R, wohingegen Insulin im Vergleich zu IR, zu den Hybridrezeptoren nur eine zehnfach geringere Affinität aufweist (Frattali und Pessin 1993; Soos 1993).

Bei der Betrachtung von IR/IGF1-R-Hybriden muss beachtet werden, dass beide Isoformen des IR in der Lage sind, die Dimerisierung mit dem IGF1-Rezeptor einzugehen. Man unterscheidet daher Hybrid-R<sup>A</sup>, wenn die involvierte Isoform IR-A ist oder Hybrid-R<sup>B</sup>, wenn es sich um die Isoform B handelt. Beide Isoformen sind im gleichen Maße fähig, Dimerisierungen mit dem IGF1-Rezeptor einzugehen (Yamaguchi 1993). Die relative Menge der IR-Isoformen bestimmen die funktionellen Eigenschaften der Hybridrezeptoren (Pandini 2002). In Tumorgewebe und undifferenzierten Zellen wird hauptsächlich Hybrid-R<sup>A</sup> gebildet (Frasca 1999; Pandini 2002). Dadurch kommt es zu einem Wandel des Insulinsignals in ein IGF1-Signal (Pandini 2002). Da IGF1 vor allem mitogene und anti-apoptotische Effekte vermittelt, kann dieser Signalweg eine wesentliche Rolle bei Krebserkrankungen spielen.

### 1.3.5 IGF2-R

Der IGF2-R ist ein Homomer mit einem Molekulargewicht von 270 kDa (Morgan 1987; Lobel 1988; Oshima 1988), welches keine interne Tyrosinkinaseaktivität besitzt. Er wird deshalb nicht zu der Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren gezählt. Der IGF2-R ist auch bekannt als Kationen-unabhängiger Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (Brown 2008) und besitzt separate Bindungsstellen für IGF2 und Phosphomannosyl-Reste an der extrazellulären Region (Kiess 1988; Oshima 1988; Schmidt 1995) (Abb. 5). Er ist für die Markierung lysosomaler Proteine zuständig und endozytiert extrazelluläre lysosomale Proteine (Ghosh 2003). Der IGF2-R befindet sich in gelöster Form im Blutplasma und reguliert dort die Verfügbarkeit des IGF2 (Lobel 1988; Oshima 1988; Scott und Weiss 2000). Bis zu 40% des IGF2 werden so durch den Rezeptor gebunden (Gelato 1989; Gallaher 1994). Diese Bindung führt vorrangig zur Bereinigung von IGF2 aus dem Plasma bzw. aus Geweben und zu seiner Degradation (Haig und Graham 1991; O'Dell und Day 1998; Han und Carter 2000; Dahms und Hancock 2002; Scott und Firth 2004). Damit ist der IGF2-R ein Antagonist des IGF2 und reguliert die biologische Verfügbarkeit und die Aktivität des Peptides, die vornehmlich über den IGF1-R vermittelt wird (Oates 1998).

### 1.4 IR, IGF1-R, IGF2-R, Insulin, IGF1 und IGF2 in Präimplantationsembryonen

Der IR wird während der Präimplantationsphase bei Mensch (Lighten 1997), Ratte (Zhang 1994), Schaf (Watson 1994), Rind (Watson 1992), Maus (Rappolee 1992) und Kaninchen (Navarrete Santos 2004a) exprimiert. In den genannten Spezies ist der IR in der Blastozyste nachweisbar, bei Rind, Schaf und Ratte sogar schon ab der befruchteten Oozyte. Der IGF1-R ist bei Ratte (Zhang 1994), Rind (Watson 1992), Schaf (Watson 1994) und Mensch (Lighten 1997) ab der befruchteten Oozyte, beim Kaninchen in Morulae und Blastozysten (Navarrete Santos 2008) und bei der Maus ab dem Blastozystenstadium nachweisbar (Rappolee 1992). Der IGF2-R wird von Ratte, Rind und Mensch ab der befruchteten Oozyte gebildet, in der Maus erst ab dem 2-Zellembryo (Kaye 1997).

Präimplantationsembryonen besitzen nachweislich keine eigene Insulinsynthese, wohingegen IGF1 bei Maus (Doherty 1994), Rind (Watson 1992) und Schaf (Watson 1994) schon von der befruchteten Oozyte gebildet wird. IGF2 wird in allen untersuchten Spezies ab dem 2-Zellstadium exprimiert (Kaye 1997).

## 1.5 Signalwege im Präimplantationsembryo

Die Präimplantationsphase ist geprägt von Prozessen, die die Entwicklung des Embryos vorantreiben. Zu diesen gehören unter anderem die Aktivierung des embryonalen Genoms, die Ausbildung enger Zellkontakte (Kompaktierung), Differenzierung in zwei pluripotente Zelllinien (Blastozystenbildung) und die Ausbildung der Körperachsen (Sutherland und Calarco-Gillam 1983; Collins und Fleming 1995; Memili 1998; Fleming 2000; Schier 2001; Watson und Barcroft 2001). Die zellulären Vorgänge, die diese Prozesse auslösen und regulieren, rücken immer mehr in den Fokus der Forschung. Die Aktivierung des IR/IGF1-R-Systems durch ihre Liganden resultiert in einer Phosphorylierungskaskade, die von der Tyrosinkinasedomäne beginnend über intrazelluläre Signalmoleküle fortgesetzt wird. Zu den Signalwegen, die eine zentrale Rolle in der embryonalen Entwicklung spielen, gehören nach derzeitigem Wissensstand: *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3-K)/Akt, *Wingless*(Wnt)/ $\beta$ -Katenin, *Notch*, *bone morphogenetic protein* (BMP)-Smad, Hedgehog und *Janus-activated kinase/signal transducer and activator of transcription* (JAK-STAT) (Cadigan und Nusse 1997; Cormier 2004; Wang 2004a; Wang 2004b; Riley 2005). Ihre Aktivität ist abhängig vom Stadium, in dem sich der Embryo befindet, und bedient sich verschiedener Signalmoleküle (Zhang 2007).

Zwei Signalwege stehen in der vorliegenden Arbeit im Vordergrund: der MAPK/Erk-Signalweg und die PI3-K/Akt-Signalkaskade. MAPKs gehören einer Familie von Proteinkinasen an, die in den meisten Organismen von Hefe bis Mensch hoch konserviert sind (Widmann 1999). Die MAPK-Signalkaskade kann in vier Wege, je nach involvierten Molekülen, unterteilt werden: *extracellular signal-regulated protein kinase* 1 und 2 (Erk1/2), Jun N-terminal kinase (JNK), p38 und Erk5/MAPK1-Signalweg. Sie spielen eine wichtige Rolle während der Differenzierung von Embryo und Plazenta (Mudgett 2000; Fernandez-Serra 2004; Wang 2004b; Daoud 2005). Die Aktivierung dieser Moleküle stimuliert direkt oder indirekt spezifische Transkriptionsfaktoren, die dann die Mitose, Zellproliferation oder Differenzierungsschritte forcieren (Field 1992; Wang 1992). Einer dieser Transkriptionsfaktoren ist c-fos, der im Komplex mit c-jun (AP-1 Komplex) Zellwachstum fördert.

Der PI3-K/Akt-Signalweg ist ein wichtiges Signalnetz des Insulin- und IGF-Systems. IGF1 vermittelt seine anti-apoptotischen Signale in Rat1-, COS-7-Zellen (Kulik 1997), Neuronen (D'Mello 1997) und einer Reihe weiterer Zellen, z.B. Keimzellen, Fibroblasten und Muskelzellen (Adams 2000), über die PI3-K und ist von Akt abhängig (Gagnon 2001). In Tumorzellen führt ein Fehlen des IGF1-R zu gesteigerter Apoptose, während die

Überexpression des Rezeptors Apoptose verhindert (Resnicoff 1995a). Über den PI3-K-Signalweg werden vorrangig metabolische und anti-apoptotische Signale vermittelt. An zentraler Stelle steht das Molekül Akt, das nach Initiation der Autophosphorylierung der Tyrosinkinase-Rezeptoren über weitere Zwischenmoleküle zu phospho-Akt (p-Akt) phosphoryliert und damit aktiviert wird. Akt wird in mehreren Isoformen in vielen Geweben exprimiert (Bellacosa 1993). Die Moleküle sind in Zellmigration, -differenzierung und Apoptoseregulation involviert (Franke 1997). Im humanen Endometrium wird Akt über die PI3-K durch IGF1 aktiviert (Toyofuku 2006). Die Phosphorylierung von Akt führt unter Einbeziehung weiterer Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren zur Regulation des Stoffwechsels und der Apoptose. Die in dieser Arbeit gewählten Zielgene des PI3-K/Akt-Signalweges sind die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK), die Hexokinase (HK) und das anti-apoptotische Bcl-x(L).

PEPCK ist ein glukoneogenetisches Schlüsselenzym, welches die Umkehrreaktion der Glykolyse vom Oxalacetat zum Phosphoenolpyruvat katalysiert. In adulten Leberzellen wird PEPCK durch cAMP aktiviert und durch Insulin gehemmt (Barthel und Schmoll 2003). Die Regulation durch Insulin erfolgt über den Transkriptionsfaktor FoxO, dessen Phosphorylierung über den PI3-K/Akt-Weg zur Abnahme der PEPCK-Transkriptmenge führt. Die Hexokinase ist das Enzym des 1. glykolytischen Reaktionsschrittes, bei der Glukose phosphoryliert und die Glukoseverwertung eingeleitet wird. Beide Enzyme, HK und PEPCK, haben die Funktion, Glukose als Energiesubstrat bereitzustellen und werden je nach vorhandener Glukosekonzentration in der Zelle aktiviert.

In der Regulation der Apoptose steht im Signalweg von Akt das pro-apoptotische Molekül BAD. Dieses wird durch anti-apoptotische Faktoren phosphoryliert (Datta 1997; del Peso 1997; Kulik und Weber 1998) und dadurch die Heterodimerisierung mit Bcl-2 oder Bcl-x(L) blockiert (Adams und Cory 1998). Die durch die Phosphorylierung von BAD in freier Form vorliegenden anti-apoptotischen Moleküle Bcl-2 und Bcl-x(L) schützen die Zelle vor dem programmierten Zelltod.

## 1.6 Bedeutung der Glukose für den Präimplantationsembryo

Die Energiegewinnung in Säugetierembryonen wird durch verschiedene Stoffwechselwege gesichert und ist abhängig von Spezies und vom Entwicklungsstadium des Embryos. Vor der Kompaktierung werden als Substrate hauptsächlich Laktat und Pyruvat verbraucht, während Glukose erst ab der Blastozystenbildung metabolisiert wird [Mensch (Wales 1987; Dan-Goor 1997), Maus (Leese und Barton 1984; Gardner und Leese 1988; Martin und Leese 1995), Ratte (Dufrasnes 1993), Kaninchen (Pike 1981), Rind (Thompson 1996; Khurana und Niemann 2000), Schaf (Gardner 1993), Schwein (Flood und Wiebold 1988)]. In Schweine- und Rinderembryonen steigt der Glukoseverbrauch zwischen dem 1-/ 2-Zellstadium und dem Blastozystenstadium um das ca. 150-300fache an (Flood und Wiebold 1988; Khurana und Niemann 2000). Glukose, Laktat und Pyruvat dienen zur Energiegewinnung durch die Glykolyse, über den Zitratzyklus und durch oxidative Phosphorylierung. Ein weiterer Weg ist der Pentosephosphatweg zur Erzeugung von Pentosezuckern für die Nukleinsäuresynthese. Der Wechsel von Pyruvat zu Glukose ist begleitet von einem Wechsel vom aeroben zum anaeroben Stoffwechsel, vermutlich bedingt durch die sauerstoffarme Umgebung, in der sich der Embryo vor und während der Implantation im Uterus entwickelt (Leese 1989; Fischer und Bavister 1993). Sind diese Stoffwechselwege im Embryo gestört, kann es zu Implantationsstörungen oder Organmissbildungen kommen, die unter Umständen in prä- bzw. postnataler Sterblichkeit resultieren (Johnson 2003).

Glukose ist ein polares Molekül, welches über Transporterproteine in die Zelle aufgenommen wird. Diese sind entweder aktive Natrium-Glukose-Kotransporter (SGLT) oder energieunabhängige passive Glukosetransporter (GLUT). Der Präimplantationsembryo ist mit mindestens drei GLUTs ausgestattet, die entwicklungspezifisch exprimiert werden (Fischer und Navarrete Santos 2003). Die Rate der Glukoseaufnahme durch den Embryo liegt dabei im pM-Bereich (Robinson 1990; Brison und Leese 1994; Donnay und Leese 1999; Martin und Leese 1999). Die Glukosekonzentration im menschlichen Eileiter liegt bei 0,5 und 2,3mM (Gardner 1996) und im Uterus zwischen 5,2-5,7mM (Casslen und Nilsson 1984). Im Kaninchenuterus liegt die Glukosekonzentration bei 0,4-1mM (Lutwak-Mann 1962). Im diabetischen Tiermodell der Maus mit erhöhten Glukosekonzentrationen im Blut kommt es zu einer Verringerung des Glukosetransports (Moley 1998b), einer gesteigerten Apoptoserate und einer erhöhten Anzahl von fetalen Resorptionen und Fehlbildungen (Moley 1998a; Chi 2000). Embryonen von diabetischen Ratten weisen geringere Blastozystenbildungsraten und Zellzahlen, insbesondere im Embryoblasten, auf (Pampfer 1990; Vercheval 1990; Dufrasnes 1993). Auch der Entzug von Glukose führt zu einer verringerten Blastozystenbildung bis hin

zum Entwicklungsarrest (Bavister 1999; Leppens-Luisier 2001). Vor der Implantation führt eine erhöhte Glukosekonzentration zu Wachstumsverzögerungen, während nach der Implantation vermehrt kongenitale Fehlbildungen auftreten (Miodovnik 1986; Lucas 1989; Rosenn 1990; Eriksson 1991; Rosenn 1994; Moley 1996; Reece und Eriksson 1996; Yang 2006; Pearson 2007).

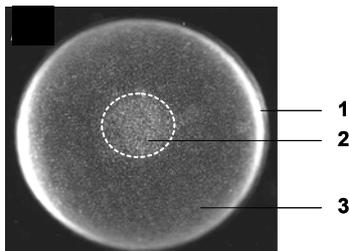
### 1.7 Präimplantationsentwicklung des Kaninchens

Die Embryonalentwicklung beginnt mit der Befruchtung der Oozyte durch ein Spermatozoon im Eileiter und der daraus resultierenden Bildung der Zygote. Ovulation und Befruchtung der Oozyte erfolgen ca. 10-14 Stunden nach der Begattung (*post coitum*, p.c.). Während der Furchungsteilungen wandert der Embryo den Eileiter hinab und gelangt in den Uterus. Die 1. Furchungsteilung zum Zweizellstadium beginnt ca. 22-24 Stunden p.c. Diese Teilung setzt sich in einer Reihe totaläqualer, nicht synchroner Teilungen fort, die zur Bildung der Morula nach ca. 60 Stunden (Tag 2,5 p.c.) führt. Die Aktivierung des embryonalen Genoms erfolgt im Kaninchen im 8-16-Zellstadium (36-44 Stunden p.c.) (Brunet-Simon 2001). Die Morula besteht aus 32-64 annähernd gleichgroßen Zellen (Blastomeren). Am Tag 3 p.c. kompaktiert sich die Morula und es bildet sich ein zentraler flüssigkeitsgefüllter Hohlraum, die Blastozystenöhle, die sich stetig vergrößert. Am Tag 4 p.c. haben sich fast alle Embryonen zur Blastozyste entwickelt (Gottschewski und Zimmermann 1973). Neben den kontinuierlich ablaufenden Mitosen kommt es zur ersten Zelldifferenzierung. Es formieren sich die Zellen des Embryoblasten (Embryonalknoten, Keimscheibe, *inner cell mass*), aus dem der eigentliche Embryo entsteht und Zellen des Trophoblasten (*trophectoderm*). Dieser ist später zusammen mit maternalem Gewebe an der Bildung der Plazenta beteiligt. Weiterhin wird die Bildung des embryonalen und extraembryonalen Entoderms eingeleitet, einer einlagigen Zellschicht unter dem Embryoblasten bzw. Trophoblasten. Etwa ab Tag 5,5 bis Tag 6 befindet sich der Kaninchenembryo im Stadium der expandierten Blastozyste (Abb. 6).

Die über dem Embryoblast liegenden Trophoblastzellen werden als Rauber'sche Trophoblastschicht bezeichnet (Rauber 1875). Diese Zellen beginnen ab dem Tag 6 p.c. zu degenerieren und sind einen Tag später vollständig verschwunden (Mootz 1979), wobei die Degeneration bei Embryonen gleicher Stadien unterschiedlich schnell abläuft (Williams und Biggers 1990; Tscheudschilsuren 1999). Der Kaninchenembryo ist von embryonalen azellulären Hüllen umgeben: der Zona pellucida und einer Mukoproteinschicht. Die Zona pellucida löst sich im Uterus auf und neue Hüllen wie Neozona oder Gloiolemma entstehen (Bövinger 1963; Denker und Gerdes 1979; Fischer 1991). Sie werden kurz vor der

Implantation durch Proteinase verdaut, um den Weg für die Trophoblastinvasion in das Endometriumepithel freizumachen (Denker 1977).

Der Kaninchenembryo unterliegt einer Reihe von mitotischen Teilungen, die nach Tag 3 p.c. eine Anzahl von 128 Zellen, nach 6 Tagen bereits ca.  $4 \times 10^3$  Zellen erreichen (Daniel 1965; Alliston und Pardee 1973). Der Anstieg der Zellzahl geht einher mit der Zunahme des Proteingehaltes von  $0,16 \mu\text{g}$  Protein im 1-Zellstadium auf ca.  $7 \mu\text{g}$  in der Blastozyste am Tag 6 bzw.  $50 \mu\text{g}$  am späten Tag 7 (Morgan und Kane 1993). Im Vergleich dazu hat die Mausblastozyste zum Zeitpunkt der Implantation weniger als 100 Zellen und nur 20-40ng Protein (Schiffner und Spielmann 1976). Im Laufe des 6,5. Tages p.c. lagert sich die Kaninchenblastozyste an der antimesometrialen Seite des Endometriums, gegenüber dem späteren Implantationsort, an und etwa am 7. Tag p.c. kommt es zur endgültigen Implantation in das mütterliche Gewebe, womit die Präimplantationsentwicklung abgeschlossen ist.



**Abb. 6 Kaninchenblastozyste am Tag 6 p.c.**

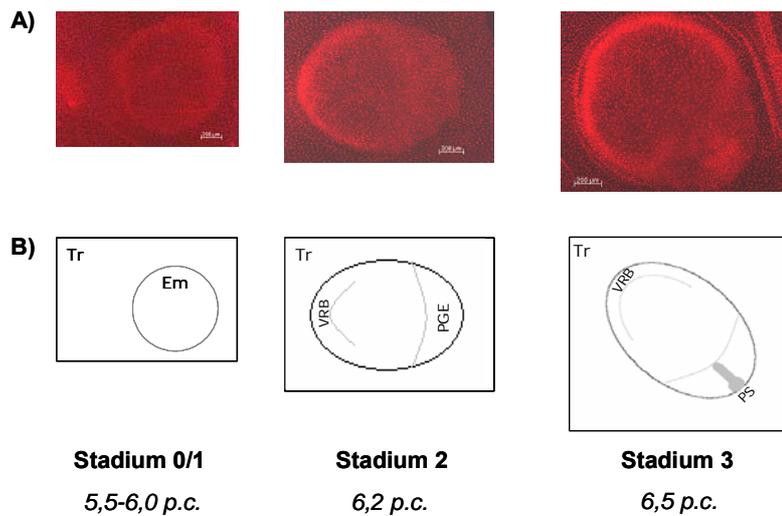
mit extrazellulären Hüllen (1), Embryoblast (2) und Trophoblast (3)  
(nach (Idkowiak 2004b))

### 1.7.1 Differenzierung der Keimscheibe

6 Tage nach der Befruchtung befindet sich der Kaninchenembryo im Blastozystenstadium. Die Keimscheibe ist vom Trophoblasten deutlich abgrenzbar (Abb. 6). Aufgrund der planen Morphologie der Keimscheibe, der späten Implantation und der durchschnittlichen Größe von  $2,8 \text{mm}$  (Daniel 1964) ist die Kaninchenblastozyste für entwicklungsbiologische Untersuchungen besonders geeignet (Yang und Foote 1987; Viebahn 1995). Zwischen Embryonen des Menschen und des Kaninchens finden sich viele Ähnlichkeiten. Neben der planen Morphologie der Keimscheibe während der Gastrulation (Viebahn 1999), ist die Entwicklung der embryonalen und extraembryonalen Gewebe annähernd gleich. Die frühen Gastrulationsereignisse beim Kaninchen erfolgen vor der Implantation ab dem 6. Entwicklungstag und ermöglichen daher eine morphologische Beurteilung der Keimscheibe unter der Stereolupe und eine Einteilung in definierte Entwicklungsstadien (Stadien 0-7), die von Viebahn und Co-Autoren entwickelt wurde (Viebahn 1995). Fünf Stadien können von der undifferenzierten Keimscheibe bis zum Zeitpunkt der Implantation unterschieden werden (Viebahn 1995). Als Stadium 0 wird die nach außen hin locker abgegrenzte Keimscheibe mit

homogenen Zellen ohne morphologische Unterschiede eingeteilt. Im Stadium 1 erkennt man den vorderen Randbogen (VRB), der aus einer Verdichtung der Zellen am anterioren Pol entlang der Embryoblast-Trophoblast-Grenze besteht (Abb. 7). Der VRB stellt das erste Differenzierungsmerkmal einer posterior-anterioren Orientierung dar. Er liegt dem sich später entwickelnden Primitivstreifen gegenüber. Der VRB grenzt sich in den nachfolgenden Stadien noch deutlicher ab. Im Stadium 2 erkennt man die posteriore Gastrulaextension (PGE), die auf Grund der geringeren Zelldichte im posterioren Bereich heller erscheint. Der VRB und die PGE begrenzen die anterior-posterior Ausdehnung der Keimscheibe (Abb. 7). Damit wird die Ausbildung der Körperachsen in der Keimscheibe noch vor der Ausbildung des Primitivstreifens sichtbar. Die elongierte Keimscheibe mit erkennbarem Primitivstreifen ist kennzeichnend für das Stadium 3 (Abb. 7). Der Primitivstreifen weitet sich von posterior nach anterior aus. Im Stadium 3 beginnt der Embryo mit der Anlagerung an die Uteruswand. Das Stadium 4 ist durch die Vollendung der Primitivstreifenbildung und der Anlage des Primitivknoten (Hensen-Knoten) am posterioren Pol charakterisiert (Hensen 1876).

Zu Beginn der Gastrulation entwickeln sich aus der Keimscheibe zwei Gewebeschichten, die als Epiblast (äußere Zellschicht) und Hypoblast (innere Zellschicht) bezeichnet werden. Dabei entwickelt sich der Hypoblast aus Zellen, die der Blastozystenöhle anliegen, und nicht aus Epiblastzellen. Der Primitivstreifen des Stadiums 3 bildet sich im posterioren Teil der Keimscheibe (PGE) durch Einwanderung von Mesodermzellen zwischen Epi- und Hypoblast (Viebahn 2002). Diese migrierenden Epiblast-Zellen werden im anterioren Teil der Keimscheibe, dem VRB, gebildet. Die Bildung des Mesoderms des Kaninchens kann anhand der Expression des Markers Brachyury bestimmt werden. Brachyury wird ab dem Stadium 2 deutlich im posterioren Bereich der Keimscheibe, der PGE, exprimiert (Viebahn 2002). Im anterioren Bereich dagegen wird die Brachyury-Expression durch DKK1, Cer1 und Lefty unterdrückt (Idkowiak 2004a). Somit findet dort keine Mesoderminduktion statt.



**Abb. 7** Aufsicht auf die Keimscheiben (Em) von Kaninchenblastozysten im Stadium 0/1, 2 und 3 mit angrenzenden Trophoblastzellen (Tr)

Aufsicht auf die Kaninchenkeimscheiben angefärbt mit dem fluoreszierenden Kernfarbstoff 7-AAD (rot) (A) und schematische Darstellung (B) der entsprechenden Stadien. Stadium 0/1 ist gekennzeichnet durch eine homogene Kernverteilung in der Keimscheibe (Em), Stadium 2 durch die Bildung des vorderen Randbogens (VRB) und die posteriore Gastrulaextension (PGE) und Stadium 3 durch den Primitivstreifen (PS). Unter den Stadien ist das durchschnittliche Entwicklungsalter in Tag nach der Verpaarung (post coitum, p.c.) angegeben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Die geschlechtsreifen New Zealand ZiKa Hybrid-Kaninchen wurden von der Firma R. Krieg aus Niederwünsch (Sachsen-Anhalt) bezogen.

#### 2.1.1 Versuchstierhaltung

Die für die Untersuchungen vorgesehenen Kaninchen (Körpergewicht von 3,5 bis 4,5kg) wurden in institutseigenen Versuchsterräumen in Einzelkäfigen und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12:12 Stunden gehalten. Gefüttert wurden die Tiere mit handelsüblichem Trockenfutter (REIKA Kraftfutter); Wasser stand *ad libitum* zur Verfügung. Zwischen dem Eintreffen der Versuchstiere aus dem Zuchtbetrieb und dem Beginn der Versuche lagen drei Wochen zur Eingewöhnung.

### 2.2 Gewinnung der Präimplantationsembryonen

Zur Steigerung der Embryonenzahl wurden die Spenderkaninchen mit 150U subkutan injiziertem Pferdeserum-Gonadotropin (PMSG) stimuliert und drei Tage nach der Stimulation mit zwei fertilen Böcken gepaart. Um die Auslösung der Ovulation zu unterstützen wurden nach der Verpaarung 75U humanes Choriongonadotropin (hCG) in die *Vena auricularis lateralis* injiziert. 3, 4 und 6 Tage (3d, 4d, 6d) nach der Paarung (*post coitum, p.c.*) wurden die Spenderkaninchen durch Injektion einer Überdosis Pentobarbital getötet und nach Eröffnung der Karotiden entblutet. Die Eileiter und die Uterii wurden anschließend entnommen und die Embryonen mit sterilfiltriertem Spülmedium (basales synthetisches Medium (BSM II) mit 0,1% BSA) unter einer halbsterilen Werkbank aus dem Eileiter (3d, 4d *p.c.*) bzw. dem Uterus (4d, 6d *p.c.*) ausgespült (Maurer 1978).

#### BSM II

Basal Synthetic Medium (BSM)	7,64	g/l
NaHCO <sub>3</sub>	2,1	g/l
Glucose	1,8	g/l
Penicillin	0,061	g/l
Streptomycin	0,15	g/l

Um die Embryonen von anhängenden Gewebe- und Sekretresten zu befreien, wurden sie mindestens zweimal in frischem Spülmedium gewaschen. Die Embryonen von drei Spendertieren wurden gesammelt und zufällig auf die Versuchsgruppen verteilt. Dadurch wurde eine randomisierte Zuteilung der Embryonen der einzelnen Spendertiere, auf die Versuchsgruppen gewährleistet. Die Keimscheiben der 6 Tage alten Blastozysten wurden anschließend morphologisch beurteilt und dem entsprechenden Entwicklungsstadium

zugeordnet (siehe Kapitel 1.7.1, Abb. 7). Die Bildung des VRB in Stadium 1 ist nur schwach erkennbar und kann zu Verwechslungen von Stadium 0 und 1 führen. Um diesen systematischen Fehler auszuschließen wurden Blastozysten im Stadium 0 und 1 einer Versuchsgruppe zugeteilt (Stadium0/1), während Stadium 2 und 3 zweifelsfrei unter der Stereolupe zugeordnet werden konnten und eigenständige Versuchsgruppen bilden. Die Embryonen wurden entweder zur *in vivo* Analyse oder für die *in vitro* Kultur (siehe Kapitel 2.4) verwendet. Die Blastozysten wurden als Gesamtemryo oder separiert in Embryoblast und Trophoblast untersucht. Die embryonalen Hüllen wurden mechanisch entfernt. Für die RNA-Isolierung und die Proteingewinnung wurden die *in vivo* Blastozysten in PBS-Puffer bzw. 100µl RIPA-Puffer aufgenommen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert oder für die Immunhistochemie in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert.

#### PBS (phosphate buffered saline (pH 7,4))

Natriumchlorid (NaCl)	8,00g
Kaliumchlorid (KCl)	0,20g
Di-Natriumhydrogenphosphat	1,44g
<u>Kalium-di-hydrogenphosphat</u>	<u>0,24g</u>
<i>Aqua dest.</i>	ad 1L

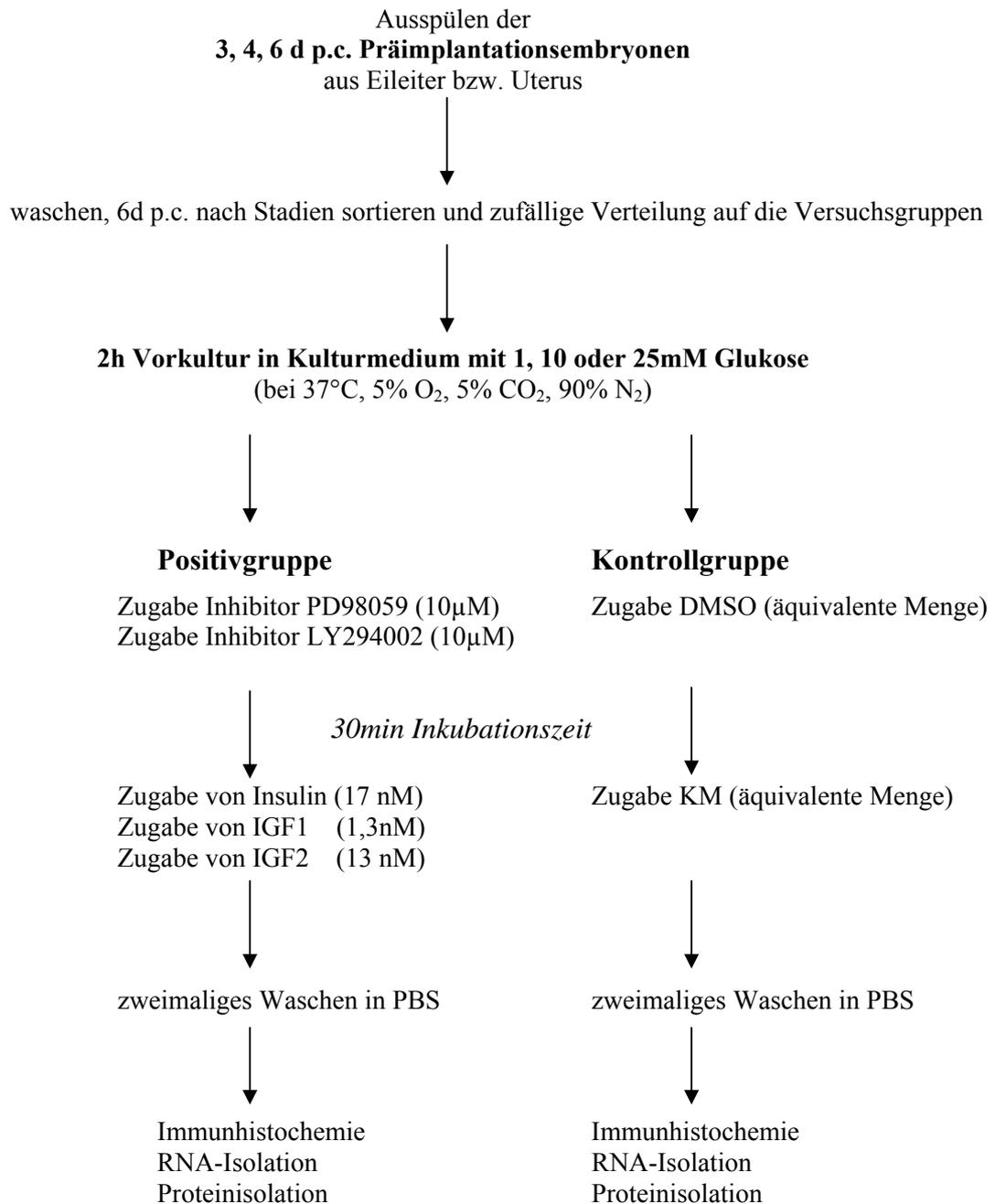
### **2.3 Mikrosektion von Blastozysten**

Die Separation der beiden Zelllinien der Blastozyste wurde mechanisch mit Hilfe von Pinzette und Schere in kaltem PBS, dem 0,1% PVA zugegeben worden war, durchgeführt. Unter der Stereolupe wurden die Blastozystenhüllen unter zu Hilfenahme eines Wolframdrahtes und der Pinzetten vorsichtig entfernt. Anschließend wurde die Keimscheibe aus dem Trophoblast-Zellverband herauspräpariert. Bei dieser Technik ist das Anhaften von Trophoblastzellen am Embryoblasten wahrscheinlich, weil weiträumig geschnitten wird und/oder die über dem Embryoblasten liegenden Trophoblastzellen (Rauber'sche Trophoblastschicht), erst ab dem Tag 6 *p.c.* degenerieren.

### **2.4 Embryonenkultur**

Die nach ihrem Entwicklungsstadium vorsortierten Blastozysten wurden kurzzeitig an das Kulturmedium (BSM II mit 1,5% BSA, s. Kapitel 2.2) adaptiert (Fischer 1987) und anschließend zufällig auf die Versuchsgruppen mit minimal 4 bis maximal 10 Embryonen in Kulturgefäße mit 3,9ml Kulturmedium aufgeteilt. Die *in vitro* Kultur erfolgte in einem Inkubator mit 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 90% N<sub>2</sub> bei 37°C. Nach einer zweistündigen Vorkultur in serum- und insulinfreiem Medium wurden dem Medium Insulin (17nM), IGF1 (1,3nM) oder IGF2 (13nM), gelöst in 100µl, direkt in die Kulturschalen zu den Blastozysten zugegeben. Die Konzentrationen sind abhängig von der spezifischen Ligand-Rezeptor-Interaktion (siehe

Kapitel 4.3.1 & 4.3.2) und der Responsivität der Zielgene (siehe Kapitel 3.3.1 & 3.4) gewählt. Den korrespondierenden Kontrollen wurde nur das Mediumvolumen zugefügt. Die Zugabe der Inhibitoren LY294002 (10 $\mu$ M) und PD98059 (10 $\mu$ M) erfolgte 30min vor der Stimulation mit Insulin, IGF1 bzw. IGF2. Im Anschluss an die dann beginnende Kultur, wurden die Embryonen zweimal in kaltem, sterilen PBS-Puffer gewaschen und wie unter Kapitel 2.2. beschrieben für die verschiedenen Versuche aufgearbeitet.



**Abb. 8** Schematische Darstellung des Ablaufs der *in vitro* Kultur

## 2.5 Zellkultur

Neben Kaninchenembryonen wurden die Zelllinien RK13 und MCF7 zur Versuchsstandardisierung und für Vorversuche analysiert. Bei der Zelllinie RK13 handelt es sich um eine Nierenzelllinie des Kaninchens, die aus einem 5 Wochen alten Kaninchen gewonnen wurde. MCF7-Zellen (Michigan Cancer Foundation) sind eine häufig verwendete humane Brustkarzinom-Zelllinie, die 1970 aus dem Pleuraerguss einer Patientin isoliert wurde. Beide Zelllinien wurden bei einer Temperatur von 37°C, 20% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> in unten genannten Medien kultiviert.

Für die Stimulation mit Insulin und den Wachstumsfaktoren wurden ca. 70%-80% konfluente Zellen genutzt. Nach Inkubation der Zellen in verschiedenen Zeitintervallen wurden die Zellen zweimal mit PBS-Puffer gespült. Zur RNA-Isolierung wurden sie in 800µl LyseD-Puffer vom Kulturgefäß abgelöst und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Für die Proteinisolation wurden die Zellen in 800µl RIPA-Puffer aufgenommen.

### Kulturmedium für RK 13-Zellen

MEM (Minimal <i>Eagle</i> Medium)	500	ml
FKS	50	ml
Glutamin	6	ml
Penicillin/Streptomycin	6	ml

### Kulturmedium für MCF7-Zellen

MEM Earle	500	ml
FKS	50	ml
1mM Natriumpyruvat	5	ml
Insulin ( <i>bovine</i> , 4µg/ml)	100	ml

## 2.6 Molekularbiologische Methoden

### 2.6.1 RNA-Isolierung aus Geweben

Die Kaninchengewebe wurden sofort nach dem Töten der Spendertiere entnommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Das Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff zermörsert, in 800µl LyseD-Puffer aufgenommen und mit einem Ultraturax homogenisiert. Anschließend wurden 80µl 2M Natriumacetat (pH 4,0), 800µl Phenol und 200µl Chloroform zu jeder homogenisierten Gewebeprobe gegeben, kräftig geschüttelt und bei Raumtemperatur für 20min inkubiert. Danach wurden die Proben 25min bei 13000rpm und 10°C zentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Die RNA-Fällung erfolgte durch Zugabe von 1 Volumen kaltem Isopropanol, 30 minütiger Inkubation bei -20°C und darauf folgender 30 minütiger

Zentrifugation bei 13000rpm und 4°C. Das erhaltene RNA-Pellet wurde zwei- bis dreimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50µl DEPC-*Aqua dest.* aufgenommen.

#### LyseD-Puffer

Guanidiniumthiocyanathydrochlorid	4M
Natriumcitrat	25 mM
Natriumlaurosylosarcosinat	17 mM
β-Mercaptoethanol	100 mM

(erst unmittelbar vor Gebrauch der Lösung hinzugeben)

#### DEPC-*Aqua dest.*

1ml Diethylpyrocarbonat (0,1% DEPC) wurde in einen Liter *Aqua dest.* gegeben und für 4h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Lösung zweimal autoklaviert. Alle wässrigen Lösungen für die RNA-Isolierung wurden mit DEPC-*Aqua dest.* hergestellt.

### **2.6.2 RNA-Isolierung aus Zellen**

Für die Isolierung von RNA wurden ca. 70%-80% konfluente Zellen genutzt. Die Zellen wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS-Puffer von Mediumresten befreit und dann in 800µl LyseD-Puffer aufgenommen. Das Zelllysate wurde mit einer Spritze (0,45x12mm, 26G) durch mehrmaliges Aufziehen und Ausstoßen homogenisiert. Um zu kontrollieren, ob die RNA nach der Isolierung intakt war wurde 1µg RNA der entsprechenden Probe auf ein 1,2%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Anschließend wurde die RNA-Isolierung wie unter Kapitel 2.6.1 beschrieben weitergeführt.

### **2.6.3 mRNA-Isolierung aus Embryonen**

Aus den vollständigen Blastozysten bzw. separiertem Embryoblast und Trophoblast wurde die Gewinnung von mRNA mittels dem Dynabeads<sup>®</sup> mRNA Direct™ Kit durchgeführt (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Dynabeads<sup>®</sup> sind magnetische Polyesterol-Perlen und verfügen über kovalent an die Oberfläche gebundene Oligo(dT)<sub>25</sub> Reste, an die die mRNA mit ihrem Poly-A-Schwanz bindet. Die bei -80°C in PBS gelagerten Embryonen wurden aufgetaut, bei 13000rpm für 10min zentrifugiert und der überschüssige PBS-Puffer abgenommen. Die Embryonen wurden in 100µl Lysis-Puffer resuspendiert und bei Raumtemperatur für 15min auf einem Schüttler inkubiert. Parallel dazu wurden die Dynabeads<sup>®</sup> mit Hilfe eines *Magnetic Particle Concentrator* (DynaL MPC<sup>®</sup>) in Lysispuffer gewaschen. Pro Embryo wurden 10µl gewaschene Dynabeads<sup>®</sup> zum Lysat gegeben. Das Lysat wurde zweimal mit Waschpuffer A und dreimal mit Waschpuffer B (je 30µl) im *Magnetic Particle Concentrator* gewaschen. Die mRNA wurde in 11µl DEPC-*Aqua dest.* durch Erhitzen auf 65°C in einem Thermocycler von den Oligo(dT)<sub>25</sub> Resten der Dynabeads<sup>®</sup> gelöst. Um ein erneutes Verbinden der mRNA mit den Dynabeads<sup>®</sup> zu verhindern, wurde die

Probe umgehend in den *Magnetic Particle Concentrator* auf Eis gestellt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

<i>Lösungen</i>		<i>Lysispuffer</i>	<i>Bindepuffer</i>
LiCl	(8M)	6,25 ml	12,5 ml
EDTA	(0,5M)	186,1 mg	400 µl
Tris/HCl	(1M, pH7,5)	10 ml	2 ml
SDS	(10%)	500 mg	—
DTT	(0,1M)	38,56 mg	—

<i>Lösungen</i>		<i>Waschpuffer A</i>	<i>Waschpuffer B</i>
LiCl	(8M)	1,875 ml	1,875 ml
EDTA	(0,5M)	200 µl	200 µl
Tris/HCl	(1M, pH7,5)	1 ml	1 ml
SDS	(10%)	1 ml	—

#### 2.6.4 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte mittels Absorptionsmessung bei  $\lambda=260\text{nm}$  am Photospektrometer. Dafür wurde die RNA 1:50 mit DEPC-*Aqua dest.* verdünnt. Eine Absorption von 1,0 bei 260nm entspricht dabei einer Konzentration von 40µg/ml RNA. Eine eventuell auftretende Proteinverunreinigung wurde durch gleichzeitige Messung bei  $\lambda=280\text{nm}$  festgestellt. Der Quotient aus gemessener optischer Dichte bei 260nm und 280nm sollte zwischen 1,7-2,0 liegen. Zur Kontrolle der intakten RNA wurde anschließend 1µg RNA auf ein 1,2%iges Agarosegel aufgetragen.

#### 2.6.5 DNase-Verdau

Um Reste genomischer DNA in der präparierten RNA auszuschließen, wurde die isolierte RNA aus Geweben und Zellen für 30min mit DNaseI bei 37°C behandelt. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung des Enzyms (75°C für 10min) abgeschlossen.

#### Ansatz pro 30µg RNA-Probe:

DNaseI/RNase frei	(10U/µg RNA)	1 µl
RNase Inhibitor	(40U/µg RNA)	0,5 µl
Natriumacetat	(3M, pH 5,2)	2,5 µl
MgSO <sub>4</sub>	(0,1M)	4,5 µl
DEPC- <i>Aqua dest.</i>		ad 50 µl

### 2.6.6 cDNA-Synthese

Die isolierte RNA wurde mittels Reverser Transkriptase (RT) in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, welche als Matrize für eine anschließende Polymerase Kettenreaktion (PCR) diene. Für die cDNA-Synthese von Geweben und Zellen wurden 3µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die RNA wurde mit 1µl *Random Primer* (50pM) versetzt und mit DEPC-*Aqua dest.* auf 12µl aufgefüllt.

Nach 10 Minuten Inkubation zur Primeranlagerung bei 70°C im Thermocycler, wurden auf Eis hinzupipettiert:

5x RT-Puffer		4µl
DTT	(0,1M)	2µl
dNTP	(10mM)	1µl
Superscript II	(200U/µl)	1µl

Die cDNA-Synthese erfolgte im Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

- 1.) 22°C 10min
- 2.) 42°C 50min
- 3.) 70°C 15min

Nach der Reaktion wurde der 20µl-Ansatz auf 100µl mit DEPC-*Aqua dest.* aufgefüllt und bei -20°C gelagert.

Für die cDNA-Synthese im Embryo wurde die gesamte Menge isolierter mRNA eingesetzt.

#### Reaktionsansatz für 1 Probe

10x PCR-Puffer	(Mg frei)	2 µl
MgCl <sub>2</sub>	(50mM)	2 µl
dNTP	(10mM)	2 µl
<i>Random Primer</i>	(50pM)	1 µl
Superscript II	(200U/µl)	0,5 µl
RNAse-Inhibitor	(40U/µg RNA)	0,2 µl
DEPC- <i>Aqua dest.</i>		1,3 µl

Die cDNA-Synthese erfolgte im Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

- 1.) 25°C 10min
- 2.) 42°C 60min
- 3.) 99°C 5min

Nach der Reaktion wurden die Proben von Gesamtblastozysten mit 80µl DEPC-*Aqua dest.* auf 100µl aufgefüllt und bei -20°C gelagert. Die Embryoblast- und Trophoblastproben wurden auf 50µl mit DEPC-*Aqua dest.* aufgefüllt.

## 2.6.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

### 2.6.7.1 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Um die Effizienz der durchgeführten cDNA-Synthese zu kontrollieren, wurde eine Kontroll-PCR mit den *housekeeping*-Genen Aktin oder GAPDH durchgeführt. Bei erfolgreicher cDNA-Synthese wurden die Zielgene mittels spezifischer Primer amplifiziert. Die Bezeichnung und Sequenzen der Primer, mit den entsprechenden *Annealing*-Temperaturen und Größen der resultierenden PCR Produkte sind in Tabelle 1 gelistet. In die PCR wurden 4µl cDNA und 46µl Mastermix eingesetzt.

Für eine Standardreaktion wurde folgender Mastermix gewählt:

10xPCR Puffer	(Mg frei)	5	µl
MgCl <sub>2</sub>	(50mM)	1,5	µl
Primer <i>forward</i>	(10pM)	1	µl
Primer <i>reverse</i>	(10pM)	1	µl
dNTP	(10mM)	1	µl
Taq DNA-Polymerase	(5U/µl)	0,2	µl
<i>Aqua dest.</i>		36,3	µl

Die PCR wurde in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- 1.) 94°C            4 min
- 2.) 94°C            1 min            Denaturierung
- 3.) 60°C            1 min            Primer-*Annealing*
- 4.) 72°C            1 min            Kettenverlängerung
- 5.) 39-fache Wiederholung ab Schritt 2.)
- 6.) 72°C            10 min
- 7.) 4°C              ∞

Denaturierung, Primer-*Annealing* und Kettenverlängerung wurden in 40 Zyklen wiederholt.

Die *Annealing*-Temperatur wurde den optimalen Bedingungen der einzelnen Primer angepasst (Tabelle 1). Nach erfolgter PCR wurden die Produkte, je nach zu erwartender Fragmentlänge, auf ein 1,8% bis 2,2%iges Agarosegel aufgetragen (siehe Kapitel 2.6.8).

**Tabelle 1** Verwendete Primer und Oligonukleotidsequenzen mit *Annealing*temperaturen (AT[°C]) und Größe der resultierenden PCR-Produkte (FG[bp])

Primername		Anzahl der Basenpaare	Sequenz 5'→3'	AT[°C]	FG[bp]
rabAktin	forward	22	ATC CTC ACG GAG CGC GGC TAC A	60	450
	reverse	24	GCT TCT CCT TGA TGT CCC GCA CGA		
rabBcl-x1	forward	16	GGT ATT GGT GGG ATC G	60	113
	reverse	16	TGT TGC CGT ATC CAC A		
rabc-fos	forward	21	CAA CGA CCC GGA GCC TAA GCC	60	95
	reverse	24	TGC TGG GAA CAG GAA GTC ATC GAA		
rabGAPDH	forward	19	GCC GCT TCT TCT CGT GCA G	60	144
	reverse	24	ATG GAT CAT TGA TGG CGA CAA CAT		
rabHK	forward	24	ATG GGC ATG AAG GGC GTG TC	60	201
	reverse	24	CAC CAC AGC AAC CAC ATC CAG G		
rabIGF1	forward	24	TGG TGG ATG CTC TTC AGT TCG TGT	60	237
	reverse	24	GCT GAT ACT TCT GAG TCT TGG GCA		
rabIGF2	forward	21	TGG AAG AAC TTG CCC ACG GAG	60	286
	reverse	20	GCT GCA TTG CTG CTT ACC GC		
rabIGF1-R	forward	22	CCC AAG CTC ACG GTC ATC ACT G	60	347
	reverse	22	ATG GGC TTC TCC TCC AAG GTC C		
rabIGF2-R	forward	22	CGG CAT GGC AAC CTG TAT GAC C	60	127
	reverse	22	TGT CGA TGG TCG GGC AGA TGT C		
rabIR	forward	19	CCT GAA GGA GGT GGA GGA G	60	150/186
	reverse	19	GAG AAT CCT GGG ACT GTG G		
rabIRnested	forward	20	AAG ACC GAC TCC CAG ATC CT	62	235
	reverse	20	TTG TTC ACC ACC TTC TCG AA		
rabPEPCK	forward	21	CTG CGG CCT CCA AAG ATG ATG	60	143
	reverse	22	CCC TGG AAA CCT GGT GAC AAG G		

### 2.6.7.2 Nested PCR

Die direkte Amplifizierung des IR mit beiden Isoformen ist im Einzelembryo nur unter hohem Probeneinsatz möglich. Um die Sensitivität der Detektion zu steigern (bis Faktor 4) wurde eine Zwei-Schritt-PCR oder *nested* PCR durchgeführt. Dazu wurde eine erste PCR mit Gen-spezifischen Primern (rabIRnested, Tabelle 1), die die Zielnukleotide weiträumig erfassen, unter Standardbedingungen durchgeführt. Danach wurden 5µl dieser PCR-Reaktion als *Template* in eine zweite PCR eingesetzt. Für die Amplifikationen wurde ein spezifisches Primerpaar (rabIR, Tabelle 1) eingesetzt, dessen Bindungsstellen innerhalb des amplifizierten DNA-Fragments aus der ersten PCR lagen. Für die 2. sich anschließende PCR wurden 5µl des PCR-Produktes aus der 1. PCR in einem Reaktionsansatz von 50µl eingesetzt. Der Mastermix beinhaltete:

10xPCR Puffe	(Mg frei)	4,5	µl
MgCl <sub>2</sub>	(50 mM)	1,35	µl
<i>Primer forward</i>	(10 pm)	1	µl
<i>Primer reverse</i>	(10 pm)	1	µl
dNTP	(10 mM)	1,0	µl
Taq DNA-Polymerase	(5U/µl)	0,2	µl
<i>Aqua dest.</i>		36	µl

Die PCR erfolgte wie in Kapitel 2.6.7.1 beschrieben. Mit einem Einsatz von 4µl embryonaler cDNA bzw. 3µl cDNA aus Kaninchengewebe wurde der IR spezifisch nachgewiesen. Das amplifizierte Produkt war durch die Lage der Primer so gewählt, dass es den Bereich des Exon 11 überspannte. Die resultierenden PCR-Produkte von 150bp für IR-A und 186bp für IR-B wurden im 3-3,5% Metaphorgele (siehe Kapitel 2.6.8) separiert und anhand der Größen zugeordnet. Zur Bestimmung der relativen Isoformenmenge in Geweben und Embryonen wurde die Gesamtexpression (beide Fragmente = 100 %) auf die der Isoformen bezogen.

### 2.6.7.3 Real Time PCR

Die *Real Time* PCR dient der Quantifizierung spezifischer cDNA. Diese Technik erlaubt eine quantitative Echtzeitanalyse der amplifizierten cDNA-Fragmente über die Messung von laserinduzierten Fluoreszenzsignalen. Der fluoreszierende Farbstoff *SYBR<sup>®</sup> Green* lagert sich interkalierend in doppelsträngige DNA ein. Der Vorteil gegenüber der RT-PCR liegt im hohen Probendurchsatz und der Quantifizierung auch bei wenig Ausgangsmaterial. Die Amplifikation von cDNA wurde im DNA Engine Opticon<sup>®</sup> 2 System (MJ Research, München, Deutschland) mit verschiedenen Primerpaaren durchgeführt (Tabelle 2). Als interne Referenz der eingesetzten cDNA-Menge diente das *housekeeping*-Gen GAPDH.

**Tabelle 2** Verwendete Primer für die *Real time* PCR und Oligonukleotidsequenzen mit Größe der resultierenden PCR-Produkte (FG[bp])

Primernamen		Anzahl der Basenpaare	Sequenz 5'→3'	FG [bp]
rabBcl-x(L)	forward	16	GGT ATT GGT GAG TCG GAT CG	113
	reverse	16	TGT TGC CGT AGA GTT CCA CA	
rabc-fos	forward	21	CAA CGA CCC GGA GCC TAA GCC	95
	reverse	24	TGC TGG GAA CAG GAA GTC ATC GAA	
rabGAPDH	forward	19	GCC GCT TCT TCT CGT GCA	144
	reverse	24	ATG GAT CAT TGA TGG CGA CAA CAT	
rabHK	forward	24	ACA GCA ACC ACA TCC AGG TCA AAC	118
	reverse	24	TTC TCC TCA AGT GGA CGA AAG GCT	
rabIGF1-R	forward	21	CCC AAG CTC ACG GTC ATC ACT G	347
	reverse	20	ATG GGC TTC TCC TCC AAG GTC C	
rabIGF2-R	forward	22	CGG CAT GGC AAC CTG TAT GAC C	127
	reverse	22	TGT CGA TGG TCG GGC AGA TGT C	
rabIR	forward	19	CCT GAA GGA GGT GGA GGA G	150/186
	reverse	19	GAG AAT CCT GGG ACT GTG G	
rabPEPCK	forward	21	CTG CGG CCT CCA AAG ATG ATG	143
	reverse	22	CCC TGG AAA CCT GGT GAC AAG G	

Die cDNA-Menge von Embryonen betrug pro Reaktion 3  $\mu$ l. Zur cDNA wurden je 10  $\mu$ l *SYBR*<sup>®</sup> *Green* Mastermix, je 1  $\mu$ l *Primer forward* (10pM) und *reverse* (10pM) zugegeben und der Ansatz mit *Aqua dest.* bis zu einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l aufgefüllt. Jede Probe wurde als Doppelbestimmung untersucht. Zur Überprüfung des Reaktionsmixes wurde eine Wasserkontrolle mitgeführt.

Die PCR erfolgte in 40 Zyklen bei folgendem Programm:

- 1.) 50°C            2 min            Initialisierung
- 2.) 95°C            10 min
- 3.) 95°C            20 s            Denaturierung
- 4.) 60°C            60 s            Primer-*Annealing* und Kettenverlängerung
- 5.) Plattendetektion
- 6.) *39-fache Wiederholung ab Schritt 3.)*
- 7.) *Erstellen der Schmelzkurve von 60°C bis 90°C in 0,5°C Intervallen*
- 8.) 4°C             $\infty$

Als Bemessungsstandard wurde eine Plasmid-DNA mitgeführt, die das entsprechende PCR-Produkt enthielt und mit den gleichen Primern unter gleichen *Real Time* PCR-Bedingungen amplifiziert wurde (Herstellung des Plasmidstandards siehe Kapitel 2.6.10.8.). Die Plasmide wurden in einer Verdünnungsreihe von  $10^2$ – $10^8$  Moleküle mit einer Menge von 3  $\mu$ l eingesetzt. Zur Quantifizierung wurde der  $C_T$ -Wert der Proben ermittelt. Der  $C_T$ -Wert bezeichnet die Zyklenzahl, bei welcher die Fluoreszenzintensität einen vorher festgelegten Schwellenwert überschreitet. Dazu war es notwendig, die Regressionsgeraden der *Real Time* PCR-Amplifikationen für jedes zu quantifizierende Gen zu ermitteln. Zusätzlich wurde der  $C_T$ -Bereich bestimmt, in dem die Amplifikation annähernd linear verläuft (Beispiel Kapitel 7.6, Abb. 42).

Zur Berechnung der relativen Transkriptmengen wurden die Messdaten nach der vergleichenden  $C_T$ -Methode ( $\Delta\Delta C_T$ -Methode) ausgewertet (Pfaffl 2004). Dafür wird die Differenz ( $\Delta C_T$ ) zwischen dem  $C_T$ -Wert für das Zielgen und dem  $C_T$ -Wert für das *housekeeping*-Gen gebildet. Die  $\Delta C_T$ -Werte von Kontrollgruppen ohne Zugabe von Stimulantien wurden als Bezugspunkt für die Berechnung des  $\Delta\Delta C_T$ -Wertes genutzt. Der  $\Delta\Delta C_T$ -Wert ist die Differenz des  $\Delta C_T$ -Wertes der Probe und des  $\Delta C_T$ -Mittelwertes der Kontrollgruppe. Der negative  $\Delta\Delta C_T$ -Wert wird als Exponent zur Basis 2 potenziert, um die relative mRNA-Expression der stimulierten Zellen und Embryonen zu erhalten. Ein Berechnungsbeispiel nach der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode ist im Anhang Kapitel 7.6 gegeben.

### 2.6.8 RNA- und DNA-Gelelektrophorese

RNA-, DNA- und Plasmid-Fragmente wurden nach Zugabe von 0,15 Volumen Ladepuffer auf 1,2% bis 2,2%igen Agarosegelen bzw. 3 bis 3,5%igen Metaphorgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die RNA bzw. DNA wurde durch Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und mittels Videokamera und Computer-unterstützter Bildbearbeitung (BioCaptMW, LTF Labortechnik, Wasserburg) dokumentiert. Eine densitometrische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Bio 1D der Firma LTF Labortechnik (Wasserburg).

#### Agarosegel

Agarose	1,2-2,2	g
1xTAE Puffer	100	ml
Ethidiumbromid (50µg/ml)	3	µl

Die Agarose wurde in 1xTAE Puffer aufgeköcht. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurde Ethidiumbromid zugegeben.

#### 10x TAE-Puffer (pH 8,0)

Tris	48,4	g
Essigsäure	11,4	g
EDTA (0,5 M)	20,0	ml

#### 6x Ladepuffer (100 ml)

Glycerol	30	ml
Bromphenolblau	0,25	g
1xTAE Puffer	70	ml

Die Komponenten wurden in 1l Wasser gelöst.

#### Metaphorgel

Metaphor Agarose	3-3,5	g
1xTBE Puffer	100	ml
Ethidiumbromid[50µg/ml]	2	µl

#### 5xTBE-Puffer

TRIS	54	g
Borsäure	27,5	g
EDTA (0,5M)	20	ml
<i>Aqua dest.</i>	80	ml

Die Agarose wurde in 5xTBE-Puffer im 100°C heißen Wasserbad gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurde Ethidiumbromid zugegeben.

### 2.6.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Fragmentgröße wurde anhand eines mitgeführten Größenmarkers bestimmt. Um PCR-Produkte zu sequenzieren bzw. klonieren zu können, wurde das DNA-Fragment unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Quia *Quick Gel Extraction* Kit (Quiagen, Hilden).

### 2.6.10 Klonierung von PCR-Fragmenten

#### 2.6.10.1 Ligation der PCR-Fragmente

Für die Ligation wurde der pGEMT-Vektor der Firma Promega (Mannheim) genutzt. Pro Reaktion wurden 8µl gereinigtes PCR-Produkt (siehe Kapitel 2.6.9) eingesetzt. Die Klonierung mittels pGEMT-Vektor ist für PCR-Produkte optimiert, die einen 3'-A-Überhang besitzen, wie es nach RT-PCR mit der Taq-DNA-Polymerase der Fall ist. Der Vektor verfügt über einen komplementären 3'-T-Überhang, was die Ligation effizienter macht.

Ansatz:

Vektor	1 $\mu$ l
2x <i>Rapid Ligation Buffer</i>	10 $\mu$ l
T4 DNA-Ligase (1U)	1 $\mu$ l
PCR-Produkt	8 $\mu$ l

Die Reaktion wurde über Nacht bei 10°C durchgeführt und direkt am nächsten Tag zur Transformation eingesetzt oder bei 20°C gelagert.

**2.6.10.2 Herstellung der kompetenten Bakterienzellen**

Eine Bakterienkultur wurde in 2ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator wachengelassen. 100 $\mu$ l dieser Kultur wurden in 10ml LB-Medium überimpft und nochmals bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,3 wachengelassen. Dann wurden wiederum 5ml in eine 100ml Kultur überimpft und bei einer OD<sub>550</sub> von 0,5 in 4 vorgekühlte 30ml Corex-Röhrchen aufgeteilt. Es wurde für 5min bei 4000rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 7,5ml kaltem *transformation buffer* I (TFBI) durch vorsichtiges Schwenken resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (5min, 4000rpm, 4°C) wurde das Pellet in 1ml kaltem TFBII gelöst. Die Suspension wurde in kalte 1,5ml Eppendorf-Tubes à 100 $\mu$ l aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

TFBI (pH 5,8)

Manganchlorid	50 mM
Rubidiumchlorid	100 mM
Glycerin	15 %
Calciumchlorid	10 mM
Kaliumacetat	30 mM

TFBII

MOPS pH 7,0	10mM
Calciumchlorid	75mM
Rubidiumchlorid	10mM
Glycerin	15%

Die Lösungen wurden bei -20°C gelagert.

**2.6.10.3 Transformation**

Die rekombinanten Plasmide wurden in kompetente E.coli X1 *blue* transformiert und auf Agarplatten mit LB-Medium ausgestrichen. Für die Herstellung von Agarplatten wurden vor dem Autoklavieren noch 15g/l Agar hinzugefügt. Das feste LB-Medium wurde erwärmt bis es flüssig war und langsam wieder abgekühlt. Kurz vor dem Ausgießen wurde zu 200ml LB-Agar folgendes hinzugegeben: 2ml Ampeicillin, 400 $\mu$ l X-Gal und 40 $\mu$ l IPTG.

LB-Medium (Luria-Bertani, pH 6,4-7,5)

Pepton	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
<u>Natriumchlorid</u>	<u>10 g</u>
<i>Aqua dest.</i>	ad 1l

Stocklösungen:

Ampecillin:	50mg/ml
X-Gal:	20mg/ml in Dimethylformamid
IPTG:	200mg/ml in <i>Aqua dest.</i>

Die kompetenten Zellen wurden 20min auf Eis aufgetaut, der gesamte Ligationsansatz hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Es erfolgte eine weitere Inkubation für 20min auf Eis. Im Wasserbad wurden die Zellen für 45sek bei 42°C erhitzt und 2min auf Eis abgekühlt. Nun wurden sie mit 400µl LB-Medium (ohne Ampecillin) für 1 Stunde bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden sie in 50, 100 oder 200µl auf Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht im Inkubator bei 37°C wachengelassen.

Selektion der positiven Klone (Blau-Weiß-Selektion):

Transformierte Bakterien, welche den pGEMT-Vektor enthalten, sind ampecillinresistent und besitzen überdies eine funktionsfähige β-Galaktosidase, die im Wirtstamm *E.coli* XL1 *blue* deletiert wurde. pGEMT-rekombinante Bakterien setzen X-Gal enzymatisch um und bilden Galaktose und den blauen Farbstoff 5-Bromo-4-Chloro-3-Indol, durch den die Kolonien blau erscheinen. Der Einbau des DNA-Fragmentes in die *multiple cloning site* (liegt innerhalb eines 5' Abschnitts des lacZ-Gens) zerstört das Leseraster des lacZ-Gens. Dadurch kann keine funktionsfähige β-Galaktosidase mehr gebildet werden, so dass die betreffenden Bakterienkolonien in Gegenwart von X-Gal farblos (weiß) bleiben. IPTG dient als Induktor für die β-Galaktosidase. Es kann durch die β-Galaktosidase nicht umgesetzt werden, wird somit nicht verstoffwechselt und liegt dauerhaft als Induktor vor.

**2.6.10.4 Plasmid-Isolation aus *E.coli***

Die weißen Kolonien wurden von den Selektionsplatten mit einer sterilen 200µl Pipettenspitze abgenommen und in 3ml LB-Medium mit Ampecillin (0,1mg/ml) über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Plasmidisolierung wurde mit dem GFX Micro Plasmid Prep Kit (GE Healthcare, München) nach dem Prinzip der alkalischen Lyse durchgeführt. 2ml einer Übernachtskultur wurden in einem 2ml Reaktionsgefäß für 1min bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die DNA nach dem Herstellerprotokoll eluiert.

### 2.6.10.5 Restriktion

Um den Klonierungserfolg und die Größe des Inserts zu kontrollieren, wurden die rekombinanten Plasmide durch Restriktion mit zwei Endonukleasen (ApaI und SacI) geschnitten.

#### Ansatz

ApaI (5U)	1 $\mu$ l
SacI (5U)	1 $\mu$ l
PufferB+	1 $\mu$ l
<u>Plasmid bzw. PCRProdukt</u>	<u>5 <math>\mu</math>l</u>
<i>Aqua dest.</i>	ad. 10 $\mu$ l

Es wurden die Enzyme ApaI und SacI eingesetzt, für die es je eine spezifische Schnittstelle in der *multiple cloning site* des pGEMT-Vektors gibt. Der Restriktionsverdau der Plasmide erfolgte 60min bei 37°C in einem vom Hersteller definierten Puffer. Der gesamte Ansatz wurde auf ein 1,8%iges Agarosegel aufgetragen (siehe Kapitel 2.6.8) und ausgewertet. Die erhaltenen Fragmente sind ca. 80bp länger als das eigentliche PCR-Produkt, da mit dem Restriktionsverdau auch ein Teil des Vektors mit ausgeschnitten wird.

### 2.6.10.6 Glycerinkultur

Rekombinierte Klone können für unbestimmte Zeit als Glycerinkultur gelagert werden. Man gibt in ein 2ml Reaktionsgefäß 0,6ml der Übernachtskultur und fügt 0,4ml Glycerin hinzu. Dieses wird gut gemischt, für 15min auf Eis inkubiert und dann bei -80°C eingefroren.

### 2.6.10.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten erfolgte mit dem BigDye<sup>®</sup> Terminator v 1.1 *Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Forster City, USA).

#### Ansatz:

BigDye <sup>®</sup> Terminator v 1.1 <i>CycleSequencing</i>	2,0 $\mu$ l
BigDye <sup>®</sup> Terminator v 1.1 v 3.1 <i>5x Sequencing Buffer</i>	1,5 $\mu$ l
T7.2 Primer (5pM)	0,5 $\mu$ l
Plasmid	1,5 $\mu$ l
<i>Aqua dest.</i>	3,5 $\mu$ l

Die Reaktion erfolgte im Thermocycler mit folgendem Standardprogramm:

- 1.) 96°C 1min Denaturierung
- 2.) 96°C 10sek Denaturierung
- 3.) 55°C 15sek Primer-*Annealing*
- 4.) 60°C 4min Kettenverlängerung
- 5.) 25-fache *Wiederholung ab Schritt 3.*)
- 6.) 4°C  $\infty$

Bei der direkten Sequenzierung von PCR-Produkten musste gegebenenfalls die *Annealing*-Temperatur angepasst werden. Nach der Sequenzierungsreaktion wurde das Produkt aufgereinigt. Dafür wird 1µl 3M Natriumacetat (pH 5,2) und 40µl 96%iges Ethanol zum Reaktionsansatz gegeben und 30min bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert. Im Anschluss wurde zweimal mit 70%igen Ethanol gewaschen (400µl bzw. 100µl) und für 20 bzw. 10min bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert. Die Proben wurden 5min vakuumgetrocknet (SpeedVac). Die automatische Auftrennung am ABI 3100 *Genetic Analyzer C* der Firma Applied Biosystems wurde durch den Sequenzierservice des Zentrums für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der medizinischen Fakultät vorgenommen. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit der Software GeneRunner® v. 3.05. Die Sequenzanalyse erfolgte über das *Nucleotid Basic Local Alignment Search Programm* (BLASTn).

#### **2.6.10.8 Herstellung des DNA-Plasmid-Standards**

Die PCR-Produkte der Zielgene wurden kloniert und sequenziert. Die Konzentration der Plasmide wurde in Doppelbestimmungen spektrophotometrisch ermittelt. Für jedes Plasmid wurde eine Verdünnungsreihe in 10er Schritten von  $\frac{1}{3} 10^8 - \frac{1}{3} 10^2$  Molekülen in H<sub>2</sub>O als DNA-Standard für die *Real Time* PCR hergestellt, aliquotiert und bei -20° C gelagert.

### **2.7 Immunhistochemische Methoden (IHC)**

Die Lokalisation von IR, IGF1-R und Insulin wurde durch immunhistochemische Untersuchungen an Gewebeschnitten und Embryonen untersucht. Die Embryonen wurden dafür im Ganzen (*Whole Mount*) oder als ausgeschnittene Keimscheiben untersucht (Mikrosektion siehe Kapitel 2.3).

#### **2.7.1 Anfertigung der Schnitte**

##### Silanisierung der Objektträger:

Damit die Präparate auf dem Objektträger besser haften, wurden diese zuvor beschichtet. Dazu wurden die sauberen Objektträger 2min in 2% APES getaucht, in Wasser gespült und danach bei Raumtemperatur getrocknet.

##### Fixierung und Einbettung:

Die Gewebe wurden für 68 Stunden in Bouin-Lösung fixiert. Anschließend wurden die fixierten Gewebe in Paraffin eingebettet. Die Einbettung erfolgte am automatischen Einbeter nach folgendem Protokoll:

Ethanol 70% → 80% → 90% → 96% → 2x Isopropanol → 2x Xylol; je 1 Stunde pro Lösungsmittel.

*In vivo* und kultivierte Embryonen/Keimscheiben wurden zweimal in kaltem PBS gewaschen und 2-24h in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Anschließend wurden sie direkt in die IHC eingesetzt oder nach Dehydrierung über eine Methanolreihe (70%, 70%, 100%, je 5min) in 100% Methanol bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die Lagerung hatte keinen Einfluss auf die Qualität der Immunhistochemie.

#### BouinLösung:

Pikrinsäure (gesättigt)	75 ml
Formaldehyd	25 ml
Essigsäure (konzentriert)	5 ml (erst kurz vor Gebrauch dazugegeben)

#### Anfertigen von Paraffinschnitten:

Die Gewebe wurden mit einem Mikrotom in 5µm dünne Schnitte geschnitten und auf Objektträger plaziert. Die Schnitte auf den Objektträgern wurden mindestens 2 Stunden bei 40°C getrocknet.

### **2.7.2 Immunhistochemie an Paraffinschnitten**

Paraffinschnitte von Leber und Pankreas des Kaninchens wurden vor dem Einsatz in die IHC für 2-24 Stunden bei 60°C entparaffiniert und anschließend zweimal in Xylol und einer absteigenden Ethanolreihe von 95% → 80% → 75% → 50% → 25% → *Aqua dest.* (je 5 min) rehydriert. Für die IHC mit Anti-IR wurde das Antigen durch einen Pepsin-Verdau für 20 min bei 37°C demaskiert. Die Reaktion wurde in Leitungswasser abgestoppt. Die Objektträger wurden 3x mit PBS/Tween-Puffer gewaschen. Die endogenen Peroxidasen wurden durch Inkubation in 3% Wasserstoffperoxid/Methanol blockiert. Danach wurde erneut in PBS/Tween gewaschen. Unspezifische Antikörper-Wechselwirkungen wurden durch Inkubation mit 10%igem Ziegen Serum in PBS/Tween für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur unterdrückt. Die Bindung des Primärantikörpers erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Danach wurden die Objektträger 2x 5min und 3x 30min in PBS/Tween gewaschen. Die Bindung des *horseradish* Peroxidase (HRP)-gekoppelten *goat anti mouse* Sekundärantikörpers (EnVision™+ / HRP Goat Anti Mouse IgG, DAKO, Hamburg, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:1 in PBS erfolgte für 2h. Danach wurden die Objektträger 2x 5min und 4x 30min mit PBS/Tween gewaschen. Zur Detektion wurde das Substrat Diaminobenzidin (DAB) zugegeben, dass nach Umsatz ein braunes, unlösliches Präzipitat ergibt. Die Reaktion wurde lichtmikroskopisch verfolgt und bei sichtbarem Niederschlag abgestoppt. Als Kontrollen wurden Gewebeschnitte ohne Primärantikörper mit 1% BSA/PBST inkubiert, aber ansonsten gleich behandelt. Die Zellkerne wurden teilweise mit Hämalaun gegengefärbt (siehe Kapitel 2.7.5). Nach Entwässern der Schnitte in einer

aufsteigenden Alkoholreihe folgte die Einbettung mit DPX. Die IHC-Reaktion wurde am Lichtmikroskop (Zeiss, Software Axiovision 2.05) ausgewertet und dokumentiert.

#### PBS und PBS/Tween-Puffer (pH 7,4)

NaCl	8	g
KCl	0,2	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	1,8	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24	g
<u>Aqua dest.</u>		ad 1L

Zur Herstellung von PBST wurde auf 1l PBS 1ml Tween 20 zugeben.

**Tabelle 3** Verwendete Antikörper in der IHC

Primär-antikörper	Verdünnung	Firma (Katalog-Nr.#)	Sekundär-antikörper	Verdünnung	Firma
IR α-Subunit	1:100 in 1%BSA/PBS	Chemikon (#1138)	Alexa fluor <sup>®</sup> 488 Goat Anti Mouse	1:300 in PBS	Molecular Probes
IGF1-R α-Subunit	1:100 in 0,05%PVA/PBS	Santa Cruz (#sc-463)	Alexa fluor <sup>®</sup> 488 Goat Anti Mouse	1:300 in PBS	Molecular Probes
Insulin	1:100 in 1%BSA/PBS	Sigma (#12018)	Goat Anti Mouse HRP-konjugiert	1:1 in PBS	DAKO

### 2.7.3 Whole Mount Immunhistochemie

Für die *Whole Mount* Immunhistochemie (IHC) wurden 6 Tage alte Kaninchenblastozysten verwendet. Die Blastozysten wurden einen Tag nach Fixierung in 4% PFA (Kapitel 2.4) direkt verwendet oder über eine Methanolreihe von 25% → 50% → 75% → 100% entwässert und in 100 % Methanol bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Vor dem Einsatz in der IHC wurden die Embryonen je 5min über eine absteigende Methanolreihe von 75% → 50% → 25% rehydriert. Anschließend wurden sie in PBS mit PVA (0,05%) überführt. Nach mechanischem Entfernen der extrazellulären Blastozystenhüllen mittels Mikroschere und Pinzette wurden die Embryonen in die IHC eingesetzt.

#### PBS mit PVA (pH 7,4)

NaCl	8	g
KCl	0,2	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	1,8	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24	g
<u>PVA</u>	0,5	g
<u>Aqua dest.</u>		ad 1L

### 2.7.3.1 Whole Mount Immunhistochemie mit DAB-Detektion

Die in 4% PFA fixierten Embryonen wurden zweimal in kaltem PBS gewaschen. Gelagerte Embryonen in 100% Methanol wurden über eine Methanolreihe entwässert und in PBS gewaschen. Anschließend wurde die Blastozystenhülle mit feinen Pinzetten entfernt. Das IR-Epitop wurde durch einen Andau mit einer Pepsinlösung (pH 2,0) für 20min bei 37°C demaskiert. Anschließend wurde mit PBS/Tween zweimal für 5min gewaschen. Zur Blockierung endogener Peroxidasen wurden die Embryonen für 15min bei Raumtemperatur in 3% Wasserstoffperoxid/Methanol inkubiert und anschließend dreimal je 5min bei Raumtemperatur in PBS/Tween gewaschen. Vor der Reaktion mit dem Antikörper wurden unspezifische Ladungen mit 10% Ziegenserum für 1h bei Raumtemperatur abgeblockt. Danach wurden die Embryonen mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert (Tabelle 3). Als Kontrolle dienten Embryonen, die ohne den Primärantikörper, aber ansonsten gleich behandelt wurden. Am nächsten Tag wurden die Blastozysten zweimal für 5min und dreimal für 30min mit 0,05% PVA/PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Danach wurden die Embryonen für 1h bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Im anschließenden Waschschrift von zweimal 5min und dreimal 30min mit 0,05% PVA/PBS (Raumtemperatur) wurde der überschüssige Sekundärantikörper entfernt. Die Detektion der positiven Immunreaktion erfolgte mit dem Substrat DAB unter Sichtkontrolle am Lichtmikroskop. Die Farbreaktion wurde bei sichtbarem Niederschlag nach ca. 10min durch Umsetzen der Embryonen in *Aqua dest.* gestoppt. Anschließend erfolgte eine Kernfärbung mit Hämalaun (siehe Kapitel 2.7.5). Nach der Überführung der Blastozysten in *Aqua dest.* wurden sie auf silanisierten Objektträgern mit Moviol eingebettet. Die Farbreaktionen wurden am Lichtmikroskop ausgewertet und dokumentiert.

#### Pepsinlösung (pH 2,0)

HCl conc. (31%)	291,67	µl
Pepsin (0,2mg/ml)	25	µl
<i>Aqua dest.</i>	10	ml

#### Moviol

Glycerol	6	g
Moviol <sup>®</sup> 4-88 Reagent	2,4	g
Tris/HCL 0,2M pH 8,5	12	ml
<i>Aqua dest.</i>	6	ml

In einem 50ml Polypropylenröhrchen wurde das Glycerol eingewogen, mit dem Moviol versetzt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde der Tris-Puffer zugegeben und das Gemisch auf 53°C erwärmt, bis sich das Moviol gelöst hatte. Nach Zentrifugation bei 4000-5000rpm für 20min wurde die Moviol-Lösung in Aliquots bei 20°C gelagert.

### **2.7.3.2 Whole Mount Immunhistochemie mit fluoreszierendem Sekundärantikörper**

Die Blockierung unspezifischer Ladungen und die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgen wie unter Kapitel 2.7.3.1 beschrieben. Als zweiter Antikörper wurde ein Fluoreszenz-markierter Sekundärantikörper verwendet (Tabelle 3). Die Kernfärbung erfolgte zeitgleich mit dem Farbstoff 7-AAD in einer Verdünnung von 1:50. Nach einer Inkubationszeit von 90-120min wurden die Embryonen mit 0,05% PVA/PBS gründlich gewaschen und anschließend in Moviol auf einem Objektträger eingedeckt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) und am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica Microsystems, Heidelberg, Deutschland).

### **2.7.4 Immunhistochemie an separierten Embryoblasten (Keimscheiben)**

Nach dem Ausspülen der Blastozysten aus dem Uterus des Kaninchens und zweimaligem waschen wurden sie in 4% PFA für mindestens 2 Stunden fixiert und mit PBS-Puffer gewaschen. Unter einer Stereolupe und mit Hilfe einer feinen Pinzette und Schere wurde anschließend die Keimscheibe ausgeschnitten. Die Keimscheiben wurden sofort für die IHC genutzt oder nach Dehydrierung über eine aufsteigende Methanolreihe in 100% Methanol bei -20°C gelagert. Die IHC erfolgte mit HRP-gekoppeltem oder Fluoreszenz-markiertem Sekundärantikörper wie im Kapitel 2.7.3.1 und 2.7.3.2 beschrieben.

### **2.7.5 Hämalaunfärbung**

Die Zellkerne der Embryonen und Gewebe wurden nach IHC mittels DAB-Detektion mit Hämalaun gegengefärbt. Dafür wurden die Schnitte für 5min bzw. Embryonen für 1min in Hämalaun (nach Mayer) inkubiert, anschließend 20min mit Leitungswasser fließend gewässert und 1min in *Aqua dest.* gespült.

#### Hämalaun nach Mayer (saurer Hämalaun)

1g Hämatoxylin wurde in 10ml absolutem Ethanol gelöst und auf 1l mit *Aqua dest.* aufgefüllt. Anschließend wurden 0,17g Natriumiodat und 50g Kalium-Aluminium-Sulfat zugegeben und sorgfältig gemischt. Nach vollständiger Lösung wurden 50g Chloralhydrat und 0,1g Zitronensäure zugefügt. Die Lösung ist mehrere Monate haltbar.

## 2.8 Proteinchemie

### 2.8.1 Proteinisolation

#### aus Geweben und Zellen

Die Gewebe wurden mit einem Mörser in flüssigem Stickstoff homogenisiert und in 800µl kaltem RIPA-Puffer aufgenommen, gemischt und für 30min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit 800µl kaltem RIPA-Puffer versetzt und von ihren Zellkulturflaschen mit Hilfe eines Schabers gelöst. Die Gewebe wurden mittels Ultraturrax homogenisiert. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Aufziehen und Ausstoßen mit einer Spritze aufgebrochen (0,45x12mm, 26G). Nach sorgfältigem Mischen wurden die Suspensionen für weitere 30min auf Eis inkubiert und anschließend für 20min bei 14000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt.

#### aus Embryonen

Die Embryonen wurden in kaltem PBS gewaschen und die Hüllen mechanisch entfernt, um eine Verfälschung der Proteingehalte durch Hüllproteine auszuschließen. Anschließend wurden sie mit 200µl kaltem RIPA-Puffer versetzt. Die Embryonen wurden mit einer Spritze (0,45x12mm, 26G) homogenisiert und für 30min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 20min bei 4°C und 14000rpm wurde der Überstand abgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt.

#### RIPA-Puffer

5x PBS	20 ml
Igepal Ca-630	1 ml
10% SDS	1 ml
Natrium-Deoxycholat	0,5 g
Aqua dest.	ad 100 ml

Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Dem RIPA-Puffer wurde vor dem Einsatz frisch Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (2µl/100µl) und Proteinkinase-Inhibitor-Cocktail (2µl/100µl) zugegeben.

### 2.8.2 Proteinquantifizierung (Biorad-Assay)

Die Proteinmenge wurde mit dem Bradford-Reagenz in einem doppelten Messansatz bestimmt.

#### Ansatz

Proteinlösung	1 µl
Aqua dest.	800 µl
Bradford-Reagenz	200 µl

Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und die Absorption nach 5min Inkubation gegen einen Leerwert (800µl Wasser+200µl Bradford-Reagenz) bei 560nm am Spektrometer vermessen.

Die Proteinmenge konnte anhand einer Eichkurve ermittelt werden, die mit bekannten Konzentrationen von BSA in RIPA-Puffer erstellt worden war.

### **2.8.3 Auftrennung der Proteine durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Bei diesem Verfahren werden Proteine nach ihrer Molekülgröße in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt. Die Proteine wurden vor der Trennung mit dem anionischen Detergenz SDS denaturiert. Die Trennung des Proteingemisches fand im Trenngel statt. Ein aufgelagertes Sammelgel konzentrierte die Proben auf eine möglichst kleine Bande. Als Sammelgel wurde ein niedrig vernetztes Polyacrylamidgel verwendet.

#### Herstellung des Proteingels

Acrylamidlösungen polymerisieren nach Zugabe von 10%igem Ammoniumpersulfat (APS) und TEMED aus. Das Trenngel wurde bis auf  $\frac{3}{4}$  der Höhe in vorgefertigte Gelkassetten (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach der Polymerisation des Gels wurde das H<sub>2</sub>O abgeschüttet und mit einem Filterpapier Flüssigkeitsreste am oberen Gelrand abgetupft. Das Sammelgel wurde bis zur oberen Kassettenkante gegossen, wobei zur Ausbildung der Ladetaschen ein Kamm an dessen Oberkante eingesetzt wird. Nachdem das Sammelgel polymerisiert war, wurde der Kamm entfernt, und die Ladetaschen gründlich mit Elektrophoreselaufpuffer gespült. Das fertige Gel wurde in eine NOVEX Elektrophoresekammer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) eingesetzt, die mit Elektrophoreselaufpuffer aufgefüllt wurde.

#### Probenaufbereitung und Separation

10-30µg der aufzutrennenden Proteinproben wurden mit 8µl 5x SDS-Ladepuffer versetzt und auf ein Endvolumen von 40µl mit Elektrophoreselaufpuffer aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben für 10min bei 75°C im Wasserbad denaturiert, in die Taschen des Sammelgels geladen und eine Spannung von 120V angelegt. Nachdem die Proben die Trennschicht des Sammelgels durchlaufen hatten, wurde die Spannung auf 180V erhöht. Die Auftrennung wurde gestoppt, sobald der SDS-Ladepuffer aus dem Trenngel ausgewandert war. Als Größenvergleich wurden die Proteinmarker Bio-Rad *Broad-Range* und Fermentas *Prestained Protein Ladder* verwendet.

SDS Gel

<i>Lösungen</i>	<i>Trenngel(10%)</i>	<i>Sammelgel (4%)</i>
Wasser	4,0 ml	2,4 ml
Acrylamid 30%	3,3 ml	0,5 ml
Tris/HCl 1,5M (pH 8,8)	2,5 ml	—
Tris/HCl 1M (pH 6,8)	—	1 ml
SDS 10%	0,1 ml	0,04 ml
APS 10%	0,1 ml	0,04 ml
TEMED	0,004 ml	0,006 ml
$\Sigma$	10 ml	4 ml

10x Laufpuffer nach Lämmli

Glycin 2,5M (pH 8,3)	144,25 g
Tris/HCl 250mM (pH 6,8)	30,25 g
SDS 10%	10 g
<i>Aqua dest.</i>	ad 1l

5x SDS-Ladepuffer

Tris/HCl 1M (pH 6,8)	15,62 ml
Mercaptoethanol	5 ml
SDS 10%	5 g
Bromphenolblau	2,5 g
<u>Glycerol</u>	<u>25 ml</u>
<i>Aqua dest.</i>	ad 50 ml

**2.8.4 Western Blot Analyse**

Die im Acrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dazu wurden 5 Faserpolster und die Nitrozellulose benötigt, welche in der Größe des Trenngels zurechtgeschnitten und für 5min in Transferpuffer getränkt wurden. Anschließend wurden die einzelnen Komponenten luftblasenfrei folgendermaßen übereinander gelegt:

Kathode (+ Pol)

3 Filter in Puffer1 getränkt

2 Filter in Puffer2 getränkt

Nitrocellulose-Membran

SDS-Gel

3 Filter in Puffer3 getränkt

Anode (- Pol)

Puffer für den Western Blot

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

Der Blot erfolgte unter Kühlung bei 10°C mit der Biometra Blot-Apparatur (Göttingen, Deutschland) bei einer Spannung von 150-200mA für 90-120min. Nach dem Blotten wurden die transferierten Proteine auf der Membran mit Ponceau S angefärbt, eine Kopie der Proteinauftrennung angefertigt und die Position der Proteine des Molekulargewichtsmarkers auf der Nitrozellulosemembran markiert. Durch Waschen mit 0,1% Tween/TBS wurde die Nitrozellulose wieder vollständig entfärbt.

#### 2.8.4.1 Hybridisierung mit dem spezifischen Antikörper

Die freien Proteinbindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran wurden durch 60minütige Inkubation in 0,1% Tween/TBS mit 5% Magermilchpulver blockiert. Anschließend wurde die Nitrozellulose mit 0,1% Tween/TBS gewaschen und mit dem entsprechend verdünnten Antikörper (Tabelle 4) bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Nitrozellulose 2x 5min und 3x 10min mit 0,1% Tween/TBS gewaschen und der entsprechende Sekundärantikörper für 1–2h bei Raumtemperatur zugegeben (Tabelle 4). Nicht gebundener Sekundärantikörper wurde durch Waschen mit 0,1% Tween/TBS für 3x 10min entfernt. Vor der Detektionsreaktion wurde die Membran durch 2x 5min waschen in TBS umgepuffert.

#### TBS und TBS/Tween-Puffer

Tris/HCl pH7,5	10 ml
NaCl	5,8 g
<i>Aqua dest.</i>	ad 1l

Zur Herstellung von 0,1% Tween/TBS wurde auf 1l TBS 1ml Tween 20 zugeben.

**Tabelle 4** Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für die *Western Blot* Analyse

Primär-antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma (Katalog-Nr.#)	Sekundär-antikörper	Verdünnung	Firma
β-Aktin	<i>Mouse</i>	1:40.000 in 5%Milch/TBST	Sigma (#A5441)	Goat Anti Mouse HRP-konjugiert	1:50.000 in 3%BSA/TBST	DAKO
IGF1-R	<i>Rabbit</i>	1:1000 in 5%Milch/TBST	Santa Cruz (#sc-713)	Goat Anti Rabbit HRP-konjugiert	1:8000 in 1%BSA/TBST	DAKO
IGF2-R	<i>Goat</i>	1:500 in 3%BSA/TBST	Santa Cruz (#sc-14410)	Donkey Anti Goat HRP-konjugiert	1:10.000 in 3%BSA/TBST	Dianova
Phospho-Akt	<i>Rabbit</i>	1:800 in 5%Milch/TBST	Cell Signaling Technology (#9271)	Goat Anti Rabbit HRP-konjugiert	1:12.000 in 3%BSA/TBST	DAKO
Phospho-Erk	<i>Mouse</i>	1:2000 in 5%Milch/TBST	Cell Signaling Technology (#9106)	Goat Anti Mouse HRP-konjugiert	1:50.000 in 3%BSA/TBST	DAKO

### Nachweis der immunologisch markierten Proteine

Der Proteinnachweis erfolgte über eine chemilumineszente Reaktion, die von der an den Sekundärantikörper gekoppelten *horseradish* Peroxidase (HRP) katalysiert wird. Dazu wurde auf die Nitrozellulosemembran das Immobilon *Western Detection Reagents* (Millipore, Schwalbach, Deutschland) gegeben. Die Anwendung erfolgte jeweils nach Angaben des Herstellers. Die Entwicklung der Chemilumineszenzreaktion erfolgte über eine Röntgenfilmentwicklung oder über eine CCD-Kameraaufnahme am ChemiDoc-It *Imaging System* (UVP, Cambridge, UK). Zur Quantifizierung wurden die Röntgenfilme eingescannt.

### Quantifizierung der detektierten Proteine

Um die detektierten Proteine zu quantifizieren, wurden die Blots mit der Labworks-Software (UVP, Cambridge, UK) densitometrisch ausgewertet. Der Wert des spezifischen Proteins (OD) wurde mit dem Wert für  $\beta$ -Aktin verrechnet, um Mengenunterschiede bei der Proteinbeladung auszugleichen. Für die Phosphorylierung von Erk wurden die relativen Mengen für Erk1 und Erk2 wie oben beschrieben berechnet. Da sich die Ergebnisse für beide Moleküle gleichen, wurden nur die Berechnungen für phospho-Erk1 graphisch dargestellt.

#### **2.8.4.2 Abwaschen der Nylonmembran**

Die hybridisierten Antikörper können wieder von der Membran gelöst (*stripping*) und die Membran für eine erneute Antikörperreaktion genutzt werden. Dazu wurde die Membran für 30min bei 75°C im Hybridisierungsöfen mit *Stripping*-Puffer inkubiert und danach für 3x 5min in 0,1% Tween/TBS gewaschen. Im Anschluß wurde die Membran erneut durch Inkubation in 0,1% Tween/TBS mit 5% Magermilchpulver blockiert und mit einem spezifischen Primärantikörper hybridisiert.

#### Stripping-Puffer

SDS	10%	20	ml
Tris/HCl	1M, pH6,8	12,5	ml
Mercaptoethanol		700	$\mu$ l
<i>Aqua dest.</i>		66,8	ml

## 2.9 Statistische Analysen

Für die statistischen Auswertungen der Daten wurde das Programm Microsoft Excel verwendet. Die Daten wurden mit t-Test auf ihre Signifikanz analysiert. Die verschiedenen Signifikanzniveaus werden wie folgt gekennzeichnet: Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  kleiner 5% als  $p \leq 0,05$  und kleiner 1% als  $p \leq 0,01$ . Die Mittelwerte der Messungen wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (Mw  $\pm$  SEM) angegeben. Die IR-Isoformen A und B wurden relativ zur Expression der Gesamtmenge beider Produkte (100%) bezogen. Dasselbe Vorgehen wurde für die Untersuchungen der Rezeptor- und Ligandenexpression im Embryoblasten und Trophoblasten herangezogen.

Es wurden folgende Symbole verwendet: Mw = Mittelwert, SEM = Standardfehler des Mittelwertes,  $n$  = Zahl der Proben,  $N$  = Zahl der unabhängigen Versuche

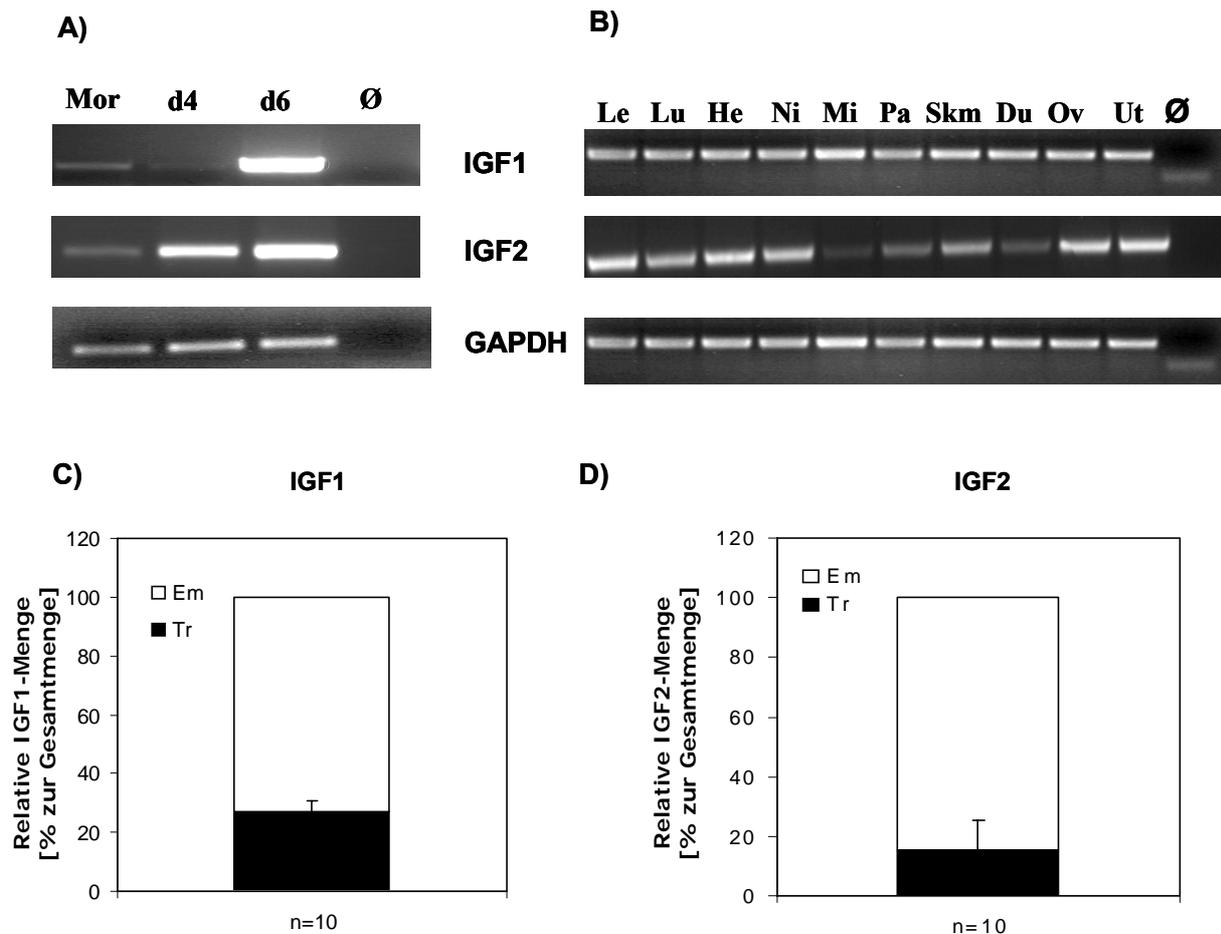
### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Expression der Liganden IGF1, IGF2 und Insulin in der Kaninchenblastozyste**

##### **3.1.1 IGF1 und IGF2**

IGF1 und IGF2 werden als parakrine Faktoren von einer Vielzahl von Zellen synthetisiert. Die Expression während der Embryonalentwicklung wurde in Morulae, frühen Blastozysten am Tag 4 (d4) und expandierten Blastozysten am Tag 6.0 (d6.0) untersucht. Des Weiteren wurde die Verteilung der Liganden in Embryoblast- und Trophoblastzellen der Tag 6.0 Blastozyste analysiert.

IGF1 und IGF2 waren ab dem Morulastadium nachweisbar. IGF1 war erst in Blastozysten stark exprimiert, während IGF2 ab der frühen Blastozyste (Tag 4) bis zum Tag 6 kontinuierlich zunahm (Abb. 9 A). In Blastozysten am Tag 6.0 wurde die Verteilung von IGF1 und IGF2 in Embryoblast- und Trophoblastzellen untersucht (Abb. 9 C, D). Die mRNA beider Liganden war hauptsächlich im Embryoblasten zu finden: IGF1 zu 73% und IGF2 zu 85%, während sie im Trophoblasten nur 27% bzw. 15% ausmachten. Zum Vergleich wurde die Expression in verschiedenen Kaninchengeweben untersucht. IGF1 war gleichmäßig in allen untersuchten Geweben exprimiert. IGF2 war zwar in allen Geweben exprimiert, jedoch in Milz, Pankreas und Dünndarm in geringeren Mengen nachweisbar (Abb. 9 B).



**Abb. 9** Expression von IGF1 und IGF2 in Präimplantationsembryonen und Geweben des Kaninchens

Agarosegele mit RT-PCR-Produkten des *Insulin-like growth factors* 1 (IGF1) und -2 (IGF2) in Präimplantationsembryonen (**A**) und in Geweben (**B**) des Kaninchens. Die Verteilung [%] nach *Real Time* PCR in Embryoblast (Em) und Trophoblast (Tr) von *in vivo* Blastozysten am Tag 6.0 ist in **C** (IGF1) und **D** (IGF2) dargestellt.

**A)** IGF1- und IGF2-Expression in Morulae (Mor), frühen Blastozysten am Tag 4 (d4) und expandierten Blastozysten am Tag 6 (d6.0).  
(N=2, n=4)

**B)** IGF1- und IGF2-Expression in Leber (Le), Lunge (Lu), Herz (He), Niere (Ni), Milz (Mi), Pankreas (Pa), Skelettmuskel (Skm), Dünndarm, (Du), Ovar (Ov) und Uterus (Ut)  
(N=2, n=1)

Ø = PCR-Kontrollreaktion ohne cDNA (Negativkontrolle)

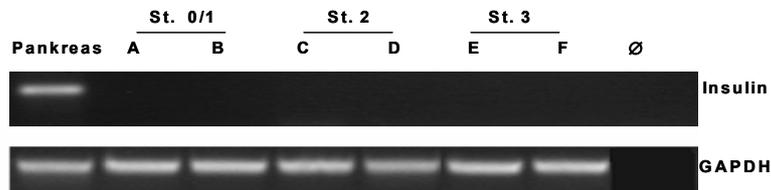
**C)** Verteilung der IGF1-mRNA [%] in Embryoblast (Em) und Trophoblast (Tr)

**D)** Verteilung der IGF2-mRNA [%] in Embryoblast (Em) und Trophoblast (Tr)

In Abb C und D ist das Ergebnis von 10 individuellen Blastozysten (n=10) dargestellt, welches nach Abgleich gegen GAPDH der gleichen Proben ermittelt wurde (Mw ± SEM).

### 3.1.2 Insulin

Die Frage der Insulinpräsenz in der 6 Tage alten Blastozyste des Kaninchens wurde durch RT-PCR und Immunhistochemie geklärt. Untersucht wurden Gesamtblastozysten im Stadium 0/1, 2 und 3 (Abb. 10). Pankreasgewebe vom Kaninchen diente als Positivprobe. In keinem der untersuchten Stadien der Keimscheibenentwicklung war RNA für Insulin nachweisbar.

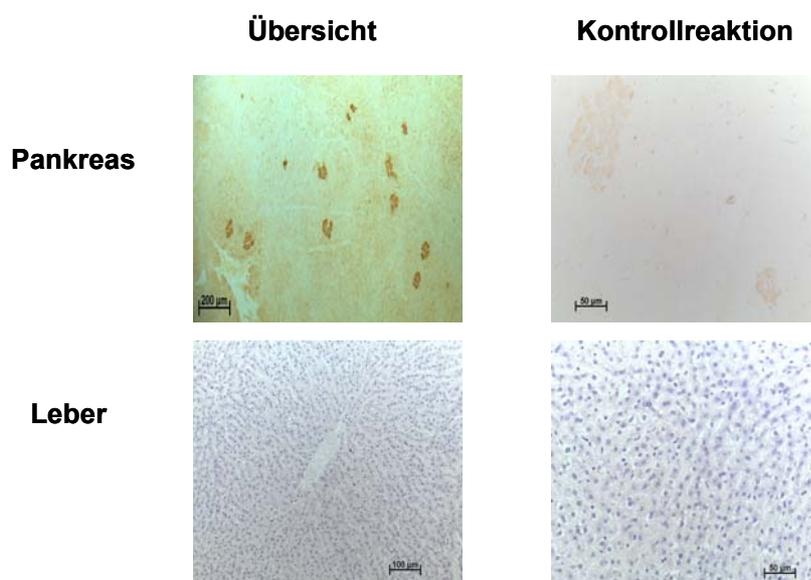


**Abb. 10 Expression von Insulin in Kaninchenblastozysten der Entwicklungsstadien 0/1, 2 und 3**

Agarosegel mit RT-PCR-Produkten des Insulins in 6 Tage alten *in vivo* Kaninchenblastozysten des Stadium 0/1 (**A, B**), Stadium 2 (**C, D**) und Stadium 3 (**E, F**). Gezeigt sind 2 Blastozysten pro Stadium von insgesamt 4 individuellen Untersuchungen (n=4). Pankreasgewebe diente als Positivkontrolle.

Ø = PCR-Kontrollreaktion ohne cDNA (Negativkontrolle), n=4

Für die Immunhistochemie wurde ein monoklonaler Mausantikörper genutzt, der gegen das humane Insulinprotein generiert wurde (Mouse Anti Insulin mAb, Sigma, Tabelle 3). Um eine Bindung des Antikörpers an die IGFs auszuschließen wurde die IHC an Pankreas- (Insulinproduzent) und Leberschnitten (IGF-Produzent) vom Kaninchen getestet (Abb. 11). Der benutzte monoklonale Antikörper erkannte spezifisch Insulin in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas. Die Leberschnitte färbten sich nicht an. Damit kann eine Kreuzreaktivität des Antikörpers mit den IGFs ausgeschlossen werden (Abb. 11).



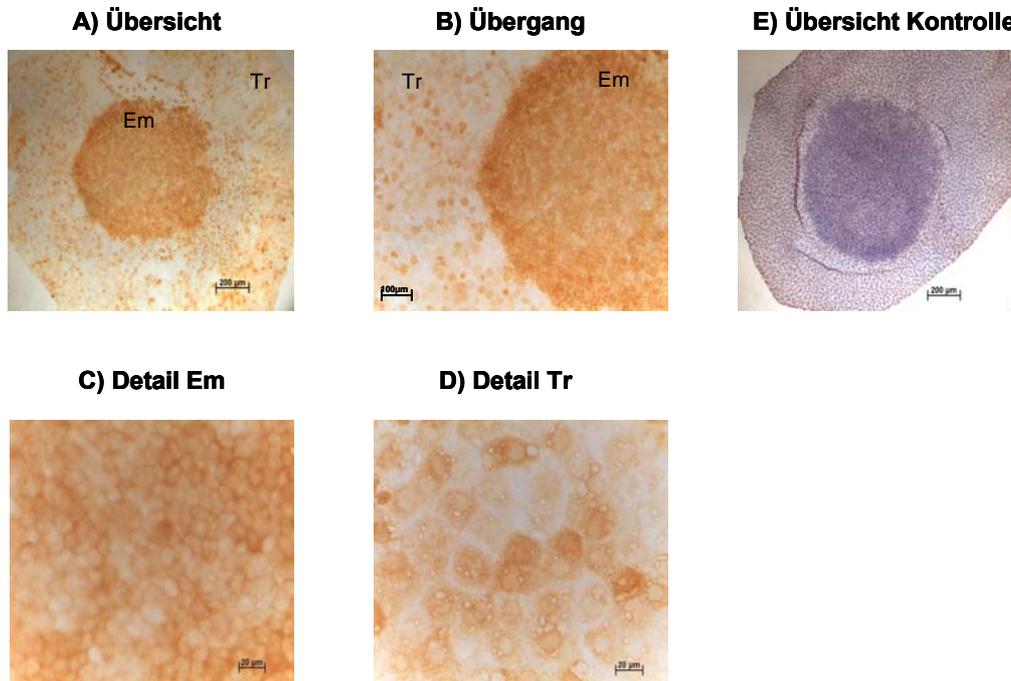
**Abb. 11 Lokalisation von Insulin in Pankreas und Leber des Kaninchens**

Detektion des Insulins mittels IHC im Pankreas und in der Leber (Übersicht) des Kaninchens.

Die Kontrollreaktion wurde ohne 1. Antikörper durchgeführt. In der Leber erfolgte eine Kerngegenfärbung mit Hämalaun (blau).

Maßstab = 50-200 $\mu$ m, n = 4

In Blastozysten war das Insulinprotein im Embryoblasten und Trophoblasten nachweisbar (Abb. 12). Die Lokalisation war in allen untersuchten Blastozysten zytoplasmatisch und kernnah.



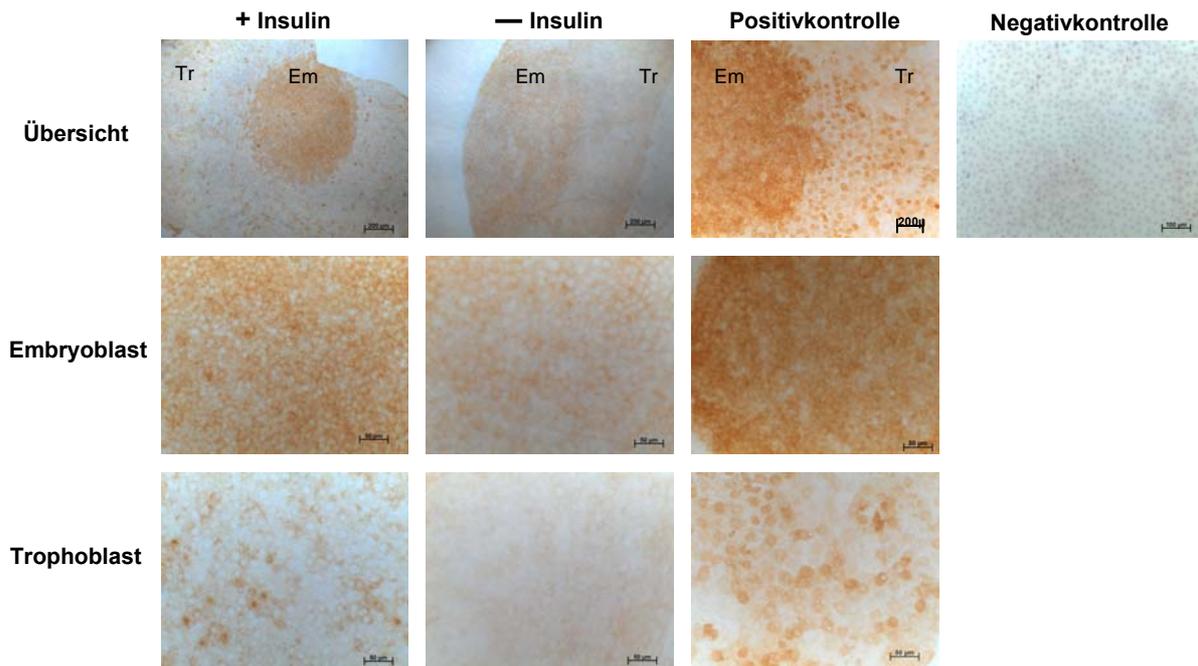
**Abb. 12 Lokalisation von Insulin in Kaninchenblastozysten**

*Whole Mount* IHC in 6 Tage alten *in vivo* Kaninchenblastozysten. Dargestellt ist eine Übersichtsfärbung der Blastozyste (A), Detaildarstellungen des Embryoblasten (Em, C) und des Trophoblasten (Tr, D), sowie der Übergang zwischen beiden (B). In (E) ist die IHC-Kontrollreaktion ohne 1. Antikörper abgebildet, in der die Kerne durch Hämalaun (blau) gegengefärbt wurden. Die dargestellte IHC an einer Blastozyste steht repräsentativ für 9 untersuchte Blastozysten (n=9).

Maßstab=50-200μm, n=9

### 3.1.3 Insulinnachweis in Blastozysten nach *in vitro* Kultur

6 Tage alte Blastozysten wurden für 10 Stunden in Kulturmedium mit und ohne Insulin kultiviert. Anschließend wurde die Lokalisation von Insulin mittels IHC untersucht (Abb. 13). Es war eine signifikant verringerte Signalintensität in Blastozysten ohne Insulin zu erkennen. Diese war sowohl im Embryoblasten als auch im Trophoblasten zu beobachten. Im Vergleich dazu war bei Blastozysten mit Insulin die IHC-Färbung deutlich und gleich der in der *in vivo* Blastozyste.



**Abb. 13** Nachweis von Insulin in Kaninchenblastozysten *in vivo* und nach *in vitro* Kultur

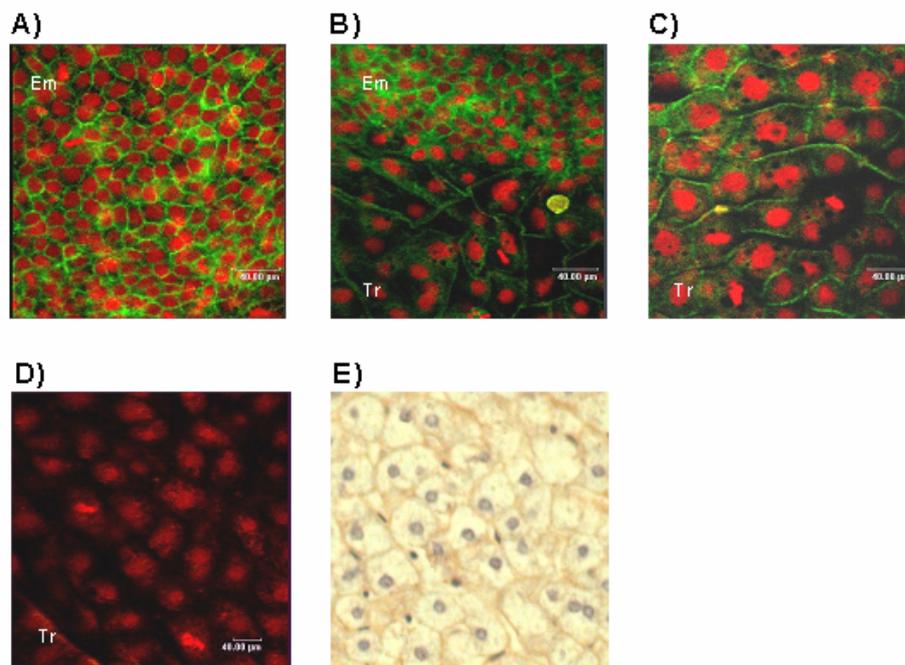
IHC in 6 Tage alten Kaninchenblastozysten nach 10-stündiger *in vitro* Kultur. Dem Kulturmedium wurde einmalig 17nM Insulin zugegeben (+Insulin) oder ohne Insulin kultiviert (-Insulin). Gezeigt sind die Gesamtansicht einer Blastozyste (Übersicht) sowie Detailaufnahmen des Embryoblasten (Em) und Trophoblasten (Tr), repräsentativ für 8 untersuchte Blastozysten (n=8). Als Positivkontrolle dienten Embryonen, die frisch aus dem Uterus ausgespült wurden. Die Negativkontrolle bezeichnet die IHC-Kontrollreaktion ohne 1. Antikörper, deren Kerne mit Hämalaun gegengefärbt sind.  
Maßstab=50-200µm, n=8

### 3.2 Expression des IR und der IGF-R in der Kaninchenblastozyste

#### 3.2.1 Lokalisation des IR in der Kaninchenblastozyste

Aus Voruntersuchungen war bekannt, dass der IR ab dem Blastozystenstadium auf mRNA- und Proteinebene nachweisbar ist (Navarrete Santos 2004 a).

Um die Lokalisation des IR in Embryoblast und Trophoblast zu klären, wurde eine *Whole mount* Immunhistochemie (siehe Kapitel 2.7.3) an 6 Tage alten Blastozysten durchgeführt. Der IR ist in Embryoblast- und in Trophoblastzellen membranständig lokalisiert (Abb. 14 A-C). In einigen wenigen Zellen des Embryoblasten und Trophoblasten war das Signal auch im Zytoplasma zu finden. Die Kerne aller Zellen waren IR-negativ. Als Positivkontrolle wurden Gewebeschnitte von der Kaninchenleber mitgeführt, in denen der IR in der Hepatozytenmembran liegt (Abb. 14 E).



**Abb. 14 Lokalisation des IR in Kaninchenblastozysten**

Die Detektion des IR durch *Whole mount* IHC an 6 Tage alten *in vivo* Blastozysten des Kaninchens erfolgte mit FITC-markiertem (grün, **A-D**) oder mit HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (braun, **E**). Gezeigt ist das Ergebnis einer Blastozyste aus insgesamt 7 Untersuchungen (n=7). Die Kerne wurden mit 7-AAD (rot) oder Hämalaun (blau) gegengefärbt.

Maßstab=40µm, n=7

**A)** Detailansicht des Embryoblasten(Em)

**B)** Detailansicht des Embryoblasten (Em) und des angrenzenden Trophoblasten (Tr)

**C)** Detailansicht des Trophoblasten (Tr)

**D)** IHC-Kontrollreaktion ohne 1. Antikörper (Negativkontrolle)

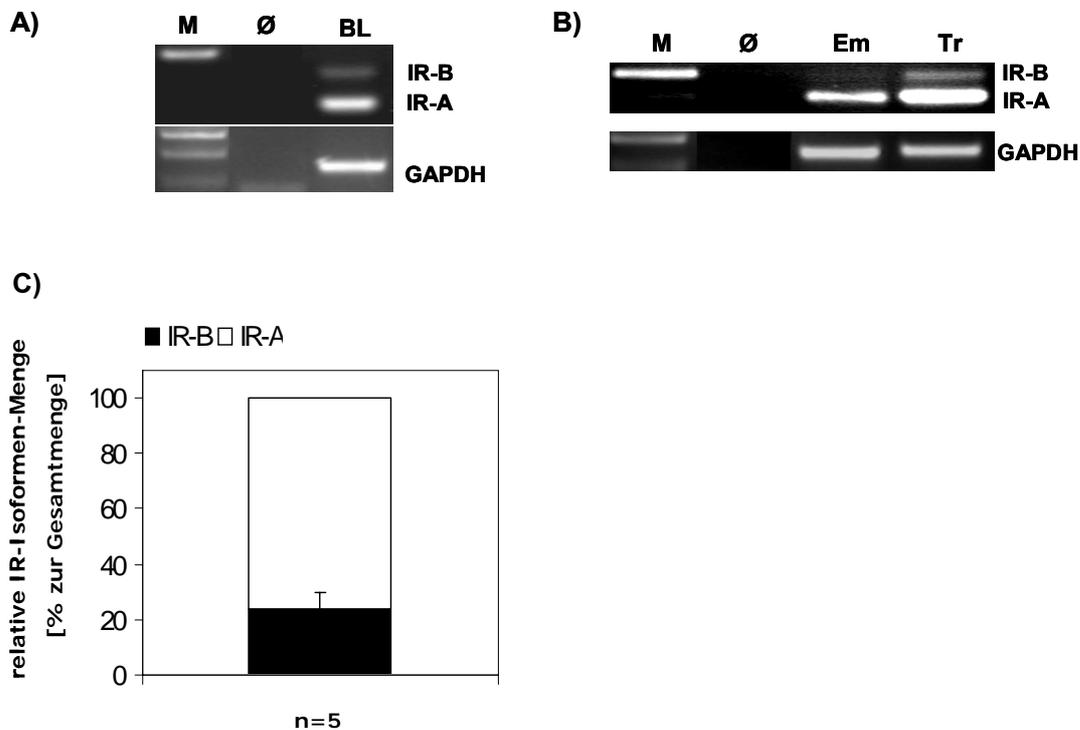
Zweikanalbild des IR (grün) und der gefärbten Kerne (rot)

**E)** DAB-Markierung der Membran in Hepatozyten. Die Kerne wurden mit Hämalaun gegengefärbt (blau).

### 3.2.2 Expression der IR-Isoformen in Blastozysten und Geweben des Kaninchens

Eine Untersuchung zur Proteinlokalisierung der IR-Isoformen in der Blastozyste war bis zum Abschluss der Arbeit auf Grund des Fehlens eines Isoformen-spezifischen Antikörpers nicht möglich.

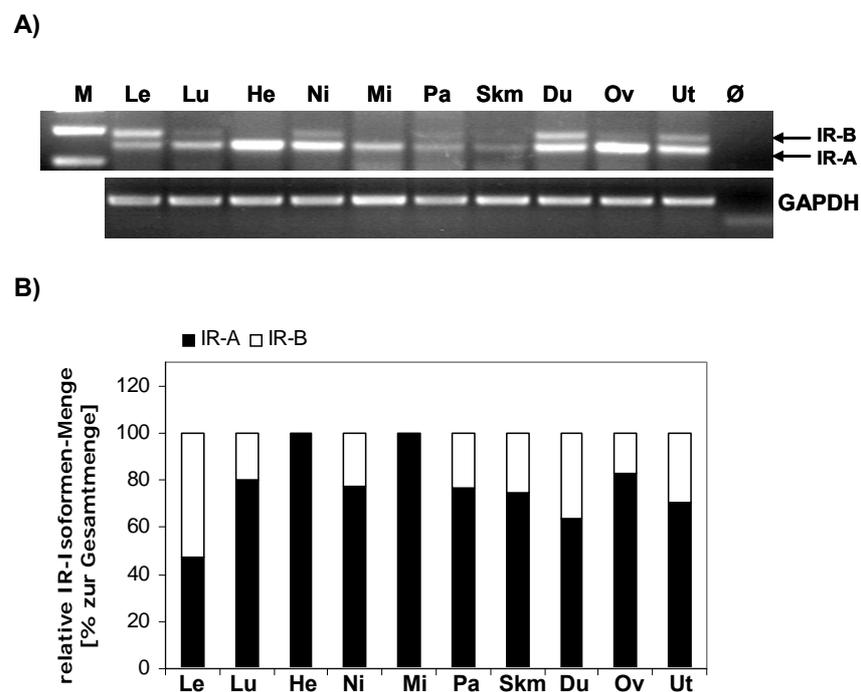
Die Analyse der quantitativen Transkriptverteilung für die Isoformen A und B in *in vivo* Blastozysten am Tag 6.0 beruht auf *nested* RT-PCR. Die Kaninchenblastozyste exprimiert sowohl IR-A als auch IR-B, wobei IR-A die mengenmäßig deutlich vorherrschende Isoform ist (Abb. 15 A): IR-A ca. 76 % und IR-B ca. 24 % (Abb. 15 C). Die Untersuchung von Embryoblast und Trophoblast ergab, dass im Embryoblasten nur die Isoform A, nicht aber IR-B nachweisbar ist. Im Trophoblasten dagegen sind sowohl IR-A als auch IR-B vorhanden, mit der Isoform A als dominante Isoform (Abb. 15 B).



**Abb. 15 Expression der IR-Isoformen in Kaninchenblastozysten**

Agarosegel mit den spezifischen RT-PCR-Produkten der Isoform A (IR-A, 150bp) und Isoform B (IR-B, 186bp) in (A) 6 Tage alten *in vivo* Blastozysten (BL) und (B) Embryoblast (Em) und Trophoblast (Tr). Nach Abgleich gegen GAPDH der gleichen Proben wurde die relative Menge [%] der IR-Isoformen A und B berechnet (Mw ± SEM, n=5).

Für den Nachweis der IR-Isoformen in Kaninchengewebe wurden neben Lunge, Herz, Niere, Pankreas, Milz, Ovar und Uterus metabolisch aktive Gewebe wie Leber, Dünndarm und Skelettmuskel untersucht. Mit Ausnahme von Herz und Milz sind in allen untersuchten Geweben sowohl IR-A- als auch IR-B-Transkripte nachweisbar (Abb. 16 A). Dabei war die Isoform A mit 65-83% der Gesamtmenge meist stärker exprimiert als IR-B mit nur 17-35% (Abb. 16 B). Die Ausnahmen stellen Herzmuskel und Milz dar, in denen nur IR-A nachweisbar war (Abb. 16 A und B). Im Lebergewebe war IR-B mit ca. 55% die vorherrschende Isoform.



**Abb. 16 Expression der IR-Isoformen in Kaninchengewebe**

Agarosegel (A) der untersuchten Kaninchengewebe Leber (Le), Lunge (Lu), Herz (He), Niere (Ni), Milz (Mi), Pankreas (Pa), Skelettmuskel (Skm), Dünndarm, (Du), Ovar (Ov) und Uterus (Ut) mit der Isoform A (IR-A, 150 bp) und IR-B (186 bp). Die entsprechende densitometrische Auswertung (B) zeigt die Verteilung der Isoformen [%] nach Normalisierung gegen GAPDH der gleichen Proben.

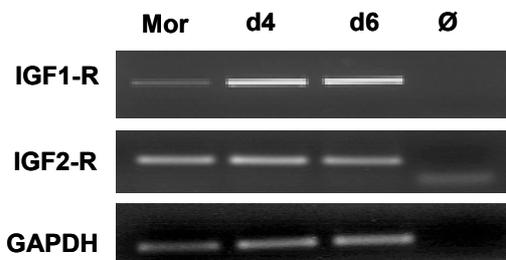
M = 100 bp DNA-Marker

Ø = PCR-Kontrollreaktion ohne cDNA (Negativkontrolle), N=2, n=1

### 3.2.3 Expression des IGF1-R und IGF2-R in Blastozysten und Geweben des Kaninchens

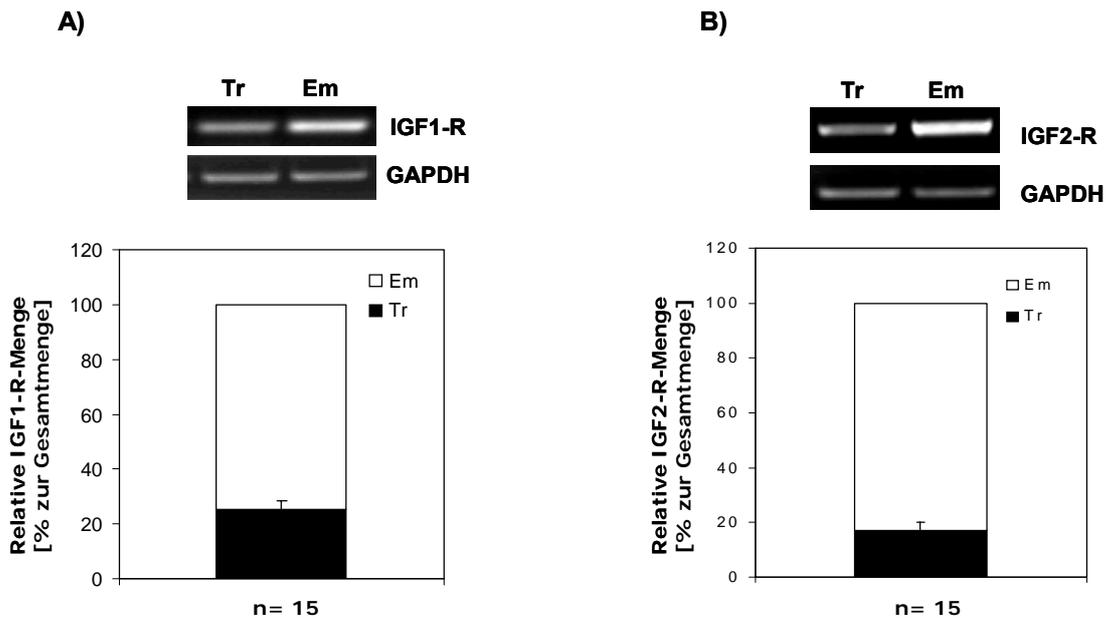
Um zu bestimmen, ab welchem Entwicklungsstadium der IGF1-R und IGF2-R exprimiert werden, wurden Morulae (Mor), frühe Blastozysten vom Tag 4 p.c. (d4) und expandierte Blastozysten vom Tag 6 p.c. (d6) mittels RT-PCR untersucht. IGF1-R-Transkripte kamen in allen untersuchten Embryonen vor und zeigten ab dem Blastozystenstadium eine deutlich stärkere Expression. Der IGF2-R wies ein gleichbleibend hohes Niveau in allen Stadien auf (Abb. 17). Die Quantifizierung der Transkriptmengen in Embryoblast- und Trophoblastzellen zeigte, dass beide Rezeptoren hauptsächlich im Embryoblasten exprimiert waren. Sie stellten mit 75% für IGF1-R und 83% für IGF2-R den Hauptteil im Embryoblasten, während es im Trophoblasten nur 25% bzw. 17% der Gesamtmenge waren (Abb. 18).

Für die Expressionsanalyse der IGF1- und IGF2-Rezeptoren wurden die gleichen Kaninchengewebe verwendet wie für die RT-PCR des Insulinrezeptors. Während der Rezeptor für IGF2 gleichmäßig in allen Geweben nachweisbar ist, war der IGF1-R gewebespezifisch verteilt. Eine geringe Expression wurde vor allem in der Leber gefunden. Hohe Transkriptmengen zeigten Herz, Niere und Dünndarm, Ovar und Uterus. Im Gegensatz dazu stehen die Gewebeproben von Lunge, Milz, Pankreas und Skelettmuskel, die im Vergleich ein geringeres Signal zeigten (Abb. 19).



**Abb. 17 Expression von IGF1-R und IGF2-R in Präimplantationsembryonen des Kaninchens**

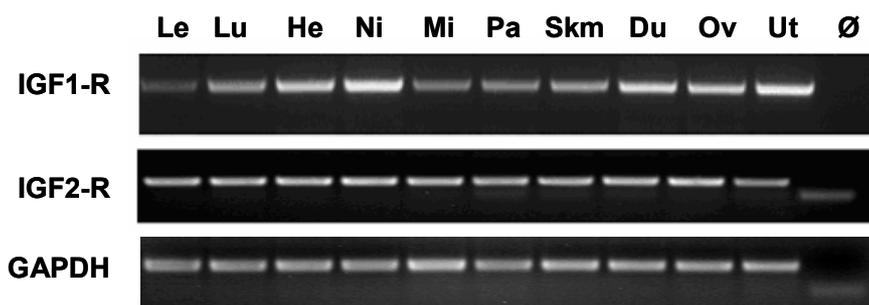
Auftrennung der RT-PCR-Produkte des IGF1-R und IGF2-R im Agarosegel für Morulae (Mor), frühe Blastozyste (d4) und expandierte Blastozyste (d6)  
 Ø = PCR-Kontrollreaktion ohne cDNA (Negativkontrolle), N=2, n=4



**Abb. 18** Expression des IGF1- und IGF2-Rezeptors in Embryoblast und Trophoblast von Kaninchenblastozysten

Agarosegel und relative Transkriptmengen [%] für IGF1-R (**A**) und IGF2-R (**B**) in 6 Tage alten *in vivo* Blastozysten des Kaninchens separiert in Embryoblast (Em) und Trophoblast (Tr). Durch densitometrische Auswertung wurde die relative Rezeptormenge ( $Mw \pm SEM$ ) für 15 individuelle Blastozysten ( $n=15$ ), nach Abgleich gegen GAPDH der gleichen Proben, berechnet.

$n=15$



**Abb. 19** Expression von IGF1-R und IGF2-R in Kaninchengeweben

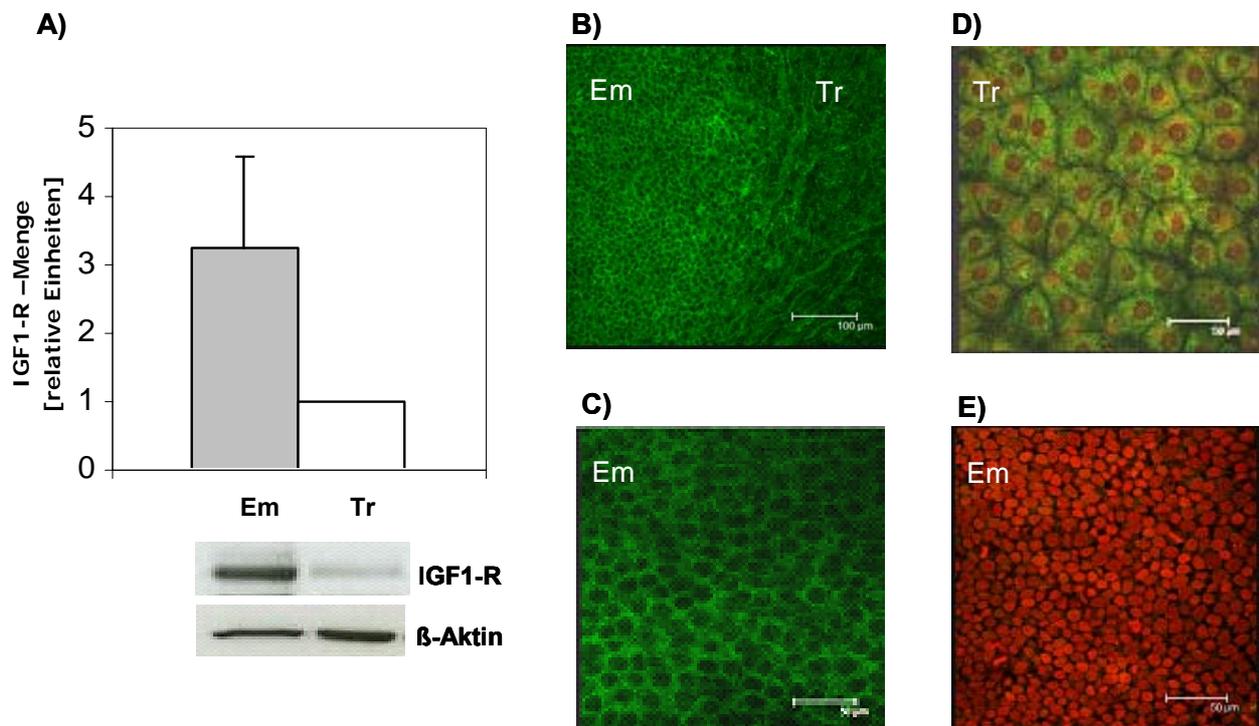
Auftrennung der RT-PCR-Produkte des IGF1-R und IGF2-R im Agarosegel von Leber (Le), Lunge (Lu), Herz (He), Niere (Ni), Milz (Mi), Pankreas (Pa), Skelettmuskel (Skm), Dünndarm (Du), Ovar (Ov) und Uterus (Ut).

Ø = PCR-Kontrollreaktion ohne cDNA (Negativkontrolle),  $N=2$ ,  $n=1$

### 3.2.4 Proteinexpression und Lokalisation des IGF1-R in Kaninchenblastozysten

Der Embryoblast weist eine 3-fach höhere IGF1-R-Proteinmenge auf als der Trophoblast (Abb. 20 A). Dieses Ergebnis aus dem *Western Blot* entspricht der Mengenverteilung der Transkripte nach der *Real Time PCR*.

Die Lokalisation des IGF1-R in *in vivo* Blastozysten (d6.0) wurde durch *Whole Mount* Immunhistochemie und anschließender konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Im Embryoblasten ist der Rezeptor membranständig lokalisiert (Abb. 20 B, C), im Trophoblasten ist er dagegen im Zytoplasma zu finden und die Membranen sind nur teilweise gefärbt (Abb. 20 B, D). Die Kerne sind IGF1-R negativ.



**Abb. 20** Nachweis des IGF1-R-Poteins mittels *Western Blot* und IHC in Kaninchenblastozysten

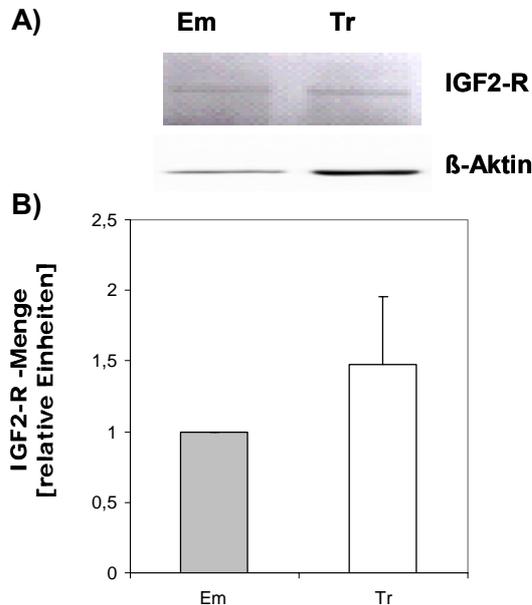
Nachweis des IGF1-R im *Western Blot* und anschließender densitometrischer Analyse (A) der relativen Rezeptormenge in *in vivo* Embryoblast (Em) und Trophoblast (Tr) nach Abgleich gegen  $\beta$ -Aktin ( $M_w \pm SEM$ ). Der *Western Blot* stellt das Ergebnis von 3 unabhängigen Experimenten ( $N=3$ ) mit je 10 Blastozysten pro Experiment dar ( $n=10$ ).

Die Lokalisation des IGF1-R (grün) wurde mittels *Whole Mount* IHC und anschließender konfokaler Laserscanning Mikroskopie (B-E;  $n=10$ ) in 6 Tage alten *in vivo* Kaninchenblastozysten detektiert. Gezeigt sind, repräsentativ für 8 untersuchte Blastozysten ( $n=8$ ), die Übersicht über die IGF1-R-Verteilung (B), die Detailansicht des Embryoblasten (C) und Trophoblasten (D) und die IHC-Kontrollreaktion ohne 1. Antikörper (E, Negativkontrolle).

Die Kernfärbung erfolgte mit 7-AAD (rot). Maßstab=100 $\mu$ m (B) bzw. 50 $\mu$ m (C-E),  $n=8$

### 3.2.5 Proteinexpression des IGF2-R in Kaninchenblastozysten

Die Proteinexpression des IGF2-R wurde in Embryoblast und Trophoblast mittels *Western Blot* untersucht (Abb. 21). Das IGF2-R-Protein wird sowohl im Embryoblasten als auch im Trophoblasten gebildet. In beiden Zelllinien ist die Rezeptormenge annähernd gleich.



**Abb. 21** Relative Menge des IGF2-R in *in vivo* Blastozysten des Kaninchens

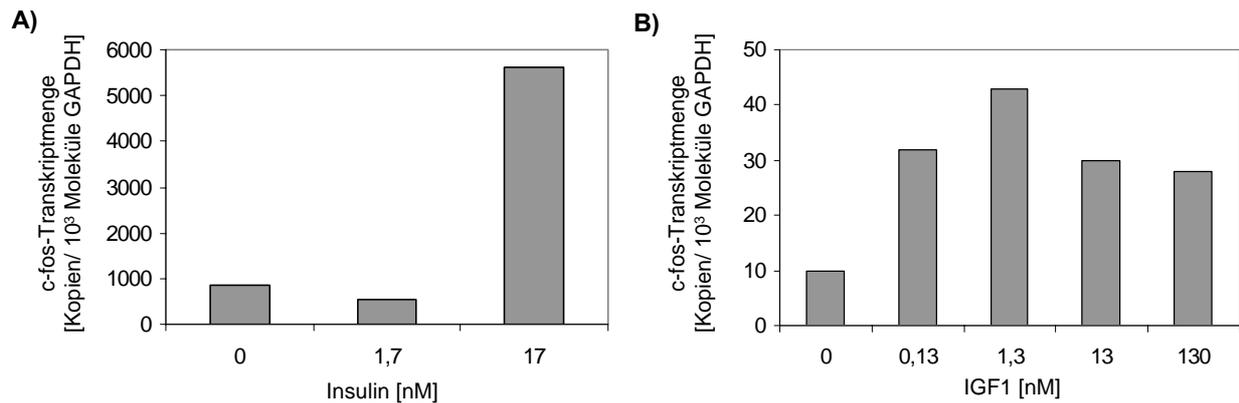
Nachweis des IGF2-R im *Western Blot* (A) und anschließender densitometrischer Analyse (B) der relativen Rezeptormenge in *in vivo* Embryoblast (Em) und Trophoblast (Tr) nach Abgleich gegen  $\beta$ -Aktin ( $M_w \pm SEM$ ). Der Western Blot stellt das Ergebnis von 2 unabhängigen Experimenten ( $N=2$ ) mit je 10 Blastozysten pro Experiment dar ( $n=10$ ).

### 3.3 Aktivierung von Signalwegen in Kaninchenblastozysten in der *in vitro* Kultur durch Insulin und IGF1

#### 3.3.1 Bestimmung der im Kaninchenembryo wirksamen Konzentrationen von Insulin und IGF1

In einer Studie von Herrler et al. in Kaninchenembryonen (Herrler 1998) wurden 1,7-170nM Insulin eingesetzt. IGF1 wurde in Konzentrationen zwischen 0,013nM und 130nM (Byrne 2002; Pinto 2002) verwendet. Diese Untersuchungen und die physiologischen Konzentrationen (siehe Kapitel 4.3.1 & 4.3.2) dienen als Ausgangspunkt für die Analyse der im Kaninchenembryo wirksamen Konzentrationen von Insulin und IGF1 *in vitro*.

Die 6 Tage alten Kaninchenblastozysten wurden für 30 Minuten mit 0,13-130nM IGF1 bzw. 10min mit 1,7-170nM Insulin kultiviert. Als Kriterium der Insulin- und IGF1-Wirkung wurde die Induktion von c-fos bewertet (Abb. 22). Der größte Anstieg von c-fos wurde bei 17nM Insulin bzw. 1,3nM IGF1 gemessen. Diese Konzentrationen entsprechen physiologisch relevanten Konzentrationen und wurden in allen nachfolgenden *in vitro* Stimulationsversuchen angewendet.

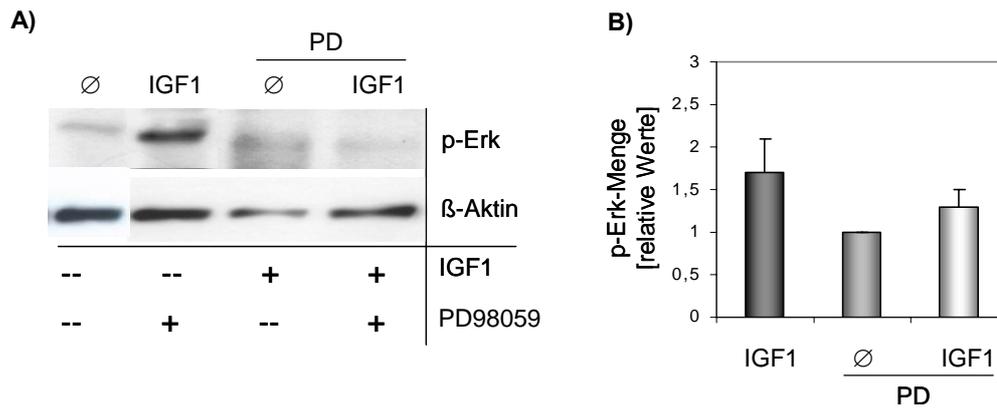


**Abb. 22** Transkriptmengen von c-fos in Kaninchenblastozysten nach Stimulation mit verschiedenen Insulin- und IGF1-Konzentrationen

Quantifizierung der Transkriptmengen für c-fos [Kopien/10<sup>3</sup> Moleküle GAPDH] in der *Real Time* PCR nach 10 minütiger Insulin- (**A**) und 30 minütiger IGF1-Behandlung (**B**) in verschiedenen Konzentrationen [nM]. Die c-fos-Mengen wurden nach Abgleich gegen GAPDH der selben Proben ermittelt. Das Experiment wurde in einem Versuch durchgeführt (N=1) mit je 5 Blastozysten pro Versuchsgruppe (n=5).  
N=1, n=5

### 3.3.2 Aktivierung des MAPK/Erk-Signalsystems in Kaninchenblastozysten

In der 6 Tage alten kultivierten Kaninchenblastozyste findet durch Insulin bereits nach 10min eine maximale Phosphorylierung von Erk1/2 (phospho-Erk, p-Erk) statt (Navarrete Santos 2004b). In der vorliegenden Arbeit konnte nach 10 Minuten auch für IGF1 (1,3nM) eine gesteigerte Phosphorylierung von Erk1/2 nachgewiesen werden (Abb. 23). Wurde vor der IGF1-Stimulation der spezifische MAPK-Inhibitor PD98059 zugegeben, war ein Anstieg von phospho-Erk durch IGF1 nicht mehr messbar. Daraus lässt sich ableiten, dass in der Blastozyste die Erk-Phosphorylierung durch IGF1 über den MAPK-Signalweg vermittelt wird.



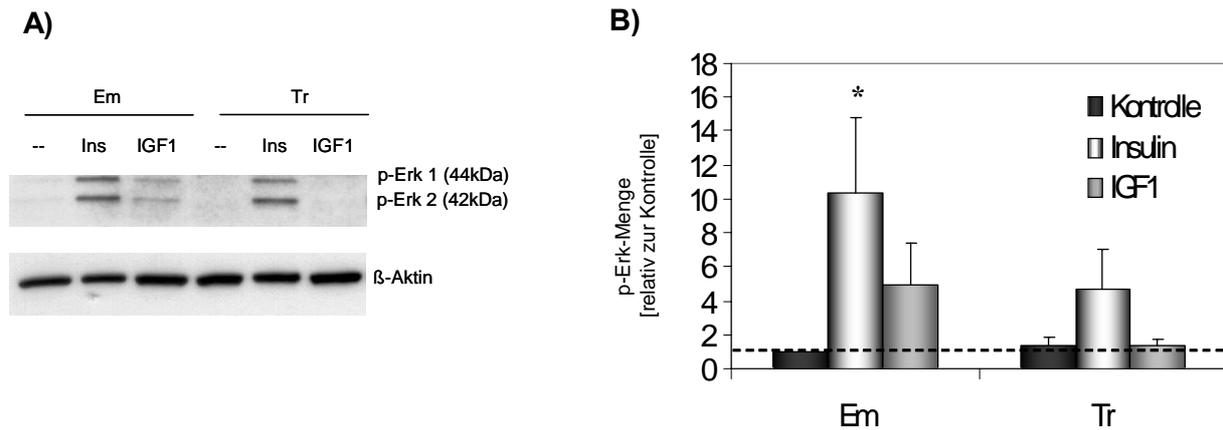
**Abb. 23 Phosphorylierung von Erk nach IGF1-Stimulation**

*Western Blot* (A) und densitometrische Auswertung (B) der Phosphorylierung von Erk (p-Erk) in kultivierten Blastozysten nach Behandlung mit 1,3nM IGF1 für 10min (IGF1) oder vorheriger Blockierung des MAPK-Signalwegs durch PD98059 und anschließender IGF1-Stimulation (PD+IGF1). Als Kontrolle dienten Blastozysten, die nur mit Medium (∅) oder dem Inhibitor PD98059 (PD ∅) inkubiert wurden. Der Grad der Phosphorylierung wurde relativ zur PD-Kontrolle (PD ∅) nach Abgleich gegen β-Aktin der gleichen Probe berechnet ( $M_w \pm SEM$ ). Das Experiment wurde in zwei unabhängigen Versuchen durchgeführt (N=2) mit je 10 Blastozysten pro Versuchsgruppe (n=10).  
N=2, n=10

### 3.3.3 Aktivierung des MAPK/Erk-Signalsystems in separierten Embryoblasten und Trophoblasten

Zur Diskriminierung der Wirkung von Insulin und IGF1 in den Zelllinien Embryoblast und Trophoblast wurden 6 Tage alte Blastozysten nach Zugabe der Wachstumsfaktoren für 10 Minuten kultiviert, anschließend die beiden Zelllinien separiert und das Protein isoliert (siehe Kapitel 2.8.1). Anschließend wurde ein *Western Blot*-Phosphorylierungsassay mit 10μg Embryoblast- und Trophoblastprotein durchgeführt (Abb. 24).

Im Trophoblasten erhöhte Insulin die phospho-Erk-Menge ca. 3,5-fach. Nach IGF1-Stimulation blieb die phospho-Erk-Menge auf dem Niveau der Kontrolle und zeigte somit in dieser Zelllinie keinen Effekt. Der Wachstumsfaktor IGF1 wirkte nur im Embryoblasten und hatte einen Anstieg um das ca. 5-fache zur Folge. Die stärkste Phosphorylierung bewirkte Insulin mit einer signifikanten 10-fachen Steigerung im Embryoblasten.



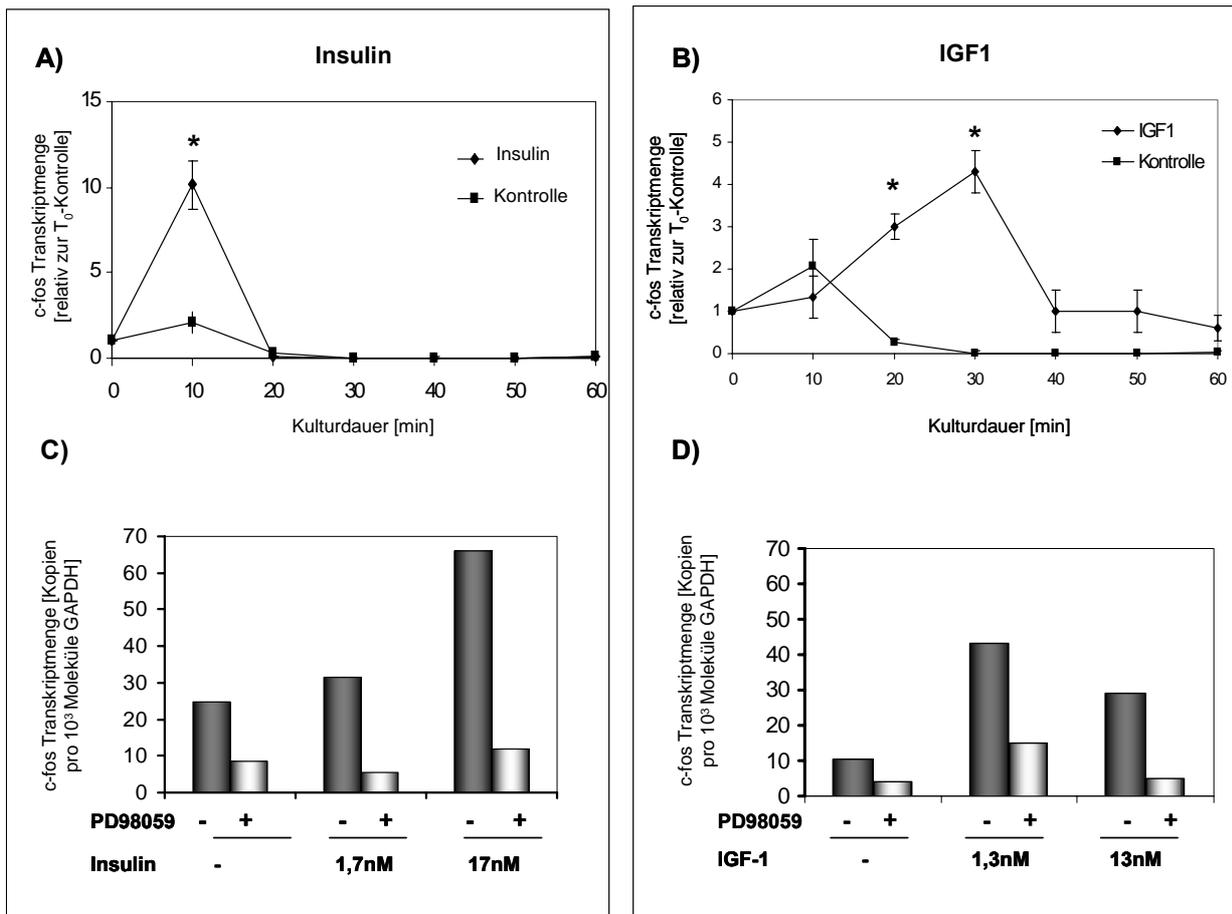
**Abb. 24 Phosphorylierung von Erk durch Insulin und IGF1 in Embryoblast (Em) und Trophoblast (Tr)**

*Western Blot* (A) und densitometrische Auswertung (B) der Phosphorylierung von Erk1/2 (p-Erk1/2) in 6 Tage alten Kaninchenblastozysten, separiert in Embryoblast (Em) und Trophoblast (Tr), nach Stimulation mit Insulin (Ins) oder IGF1 für 10min. Als Kontrolle ( $\emptyset$ ) dienten Blastozysten, denen ein äquivalentes Volumen Kulturmedium ohne Insulin/IGF1 zugegeben wurde. Der Anstieg der Phosphorylierung wurde relativ zur Embryoblast-Kontrolle in 3 unabhängigen Experimenten (N=3) mit je 10 Blastozysten pro Versuchsgruppe (n=10) nach Abgleich gegen  $\beta$ -Aktin der gleichen Proben ermittelt (Mw  $\pm$  SEM).

N=3, n=10, \*  $p \leq 0,05$

### 3.3.4 Quantifizierung des MAPK/Erk-Zielgens c-fos

6 Tage alte Blastozysten wurden mit Insulin bzw. IGF1 für 10 bis 60 Minuten kultiviert und anschließend die induzierte c-fos-Menge mittels *Real Time* PCR in Gesamtblastozysten (Abb. 25), und im Embryoblasten und Trophoblasten gemessen (Abb. 26). Beide Hormone führten zu einem Anstieg der c-fos-mRNA: Insulin nach 10min, IGF1 nach 30min Stimulation (Abb. 25 A, B). Durch eine Blockierung des Signalweges mit dem MAPK-spezifischen Inhibitor PD98059 konnte gezeigt werden, dass die c-fos-Induktion durch Insulin und IGF1 vom MAPK-Signalweg abhängig ist (Abb. 25 C, D). Der *in vitro* Kultur wurde PD98059 (PD+) oder nur Kulturmedium (PD-) für 30min zugesetzt. Anschließend wurde mit Insulin (1,7nM; 17nM) und IGF1 (1,3nM; 13nM) stimuliert oder als Kontrolle Kulturmedium zugegeben (Insulin/IGF1 -). Die Zugabe von 17nM Insulin führt zu einer ca. 3-fachen Steigerung der c-fos-Menge, die durch vorherige Zugabe von PD98059 blockiert wurde (Abb. 25 C). Dieselbe MAPK-abhängige Aktivierung der c-fos-Transkription konnte unter Einsatz von 1,3 und 13nM IGF1 beobachtet werden, nicht jedoch in der PD98059 Gruppe (Abb. 25 D). Beide Wachstumsfaktoren wirken somit auf den mitogenen Transkriptionsfaktor c-fos über den MAPK-Signalweg.



**Abb. 25 c-fos-Transkriptmenge in Kaninchenblastozysten nach Inhibition mit einem MAPK-spezifischen Inhibitor und Stimulation mit Insulin und IGF1**

*Real Time* PCR-Auswertung zur relativen Änderung der Transkriptmenge nach Insulin- (A) bzw. IGF1-Stimulation (B) für 10-60min in 6 Tage alten Kaninchenblastozysten. Die Ergebnisse aus 2 individuellen Versuchen (N=2) mit je 10 Blastozysten pro Versuchsgruppe (n=10) wurden gegen GAPDH normalisiert und auf die T<sub>0</sub>-Kontrolle bezogen (Mw ± SEM). N=2, n=10; \*p ≤ 0,05.

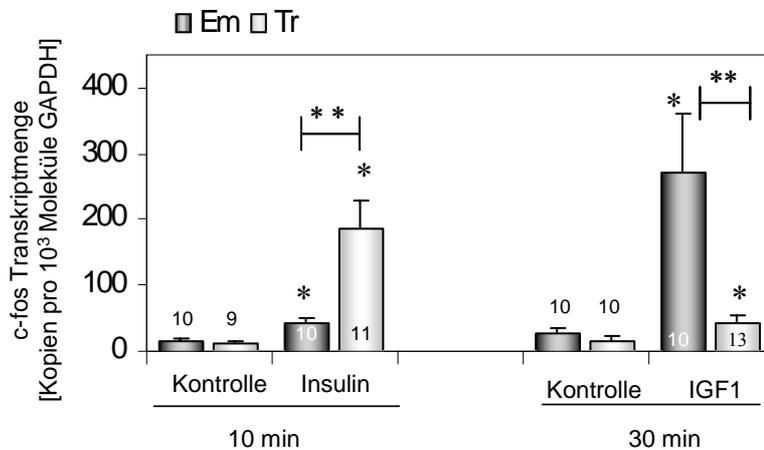
In (C) und (D) ist die Wirkung der MAPK-Blockierung mit dem spezifischen Inhibitor PD98059 und der anschließenden 10 minütigen Stimulation mit Insulin und IGF1 in unterschiedlichen Konzentrationen (nM) dargestellt. Der Anstieg der c-fos-Menge wurde nach Abgleich gegen GAPDH ermittelt [Kopien/10<sup>3</sup> Moleküle GAPDH].

N=1, n=5

Nach der beobachteten Steigerung der c-fos-mRNA durch Insulin und IGF1 in Gesamblastozysten wurde die Aktivierung des MAPK-Signalwegs in Embryoblast- und Trophoblastzellen analysiert.

Die Untersuchung ergab eine signifikante Steigerung unter Insulin und IGF1 in beiden Kompartimenten (Abb. 26). Während Insulin jedoch mit einer 14-fachen Erhöhung hauptsächlich im Trophoblasten und nur mit einem geringeren Wirkungsgrad im Embryoblasten die c-fos-Transkription stimulierte (3-fach), hatte die Zugabe von IGF1 vor

allein im Embryoblasten eine Erhöhung von c-fos zur Folge (12-fach). Im Trophoblasten fiel die Wirkung mit der 2-fachen Steigerung der Transkriptmenge schwächer aus (Abb. 26).



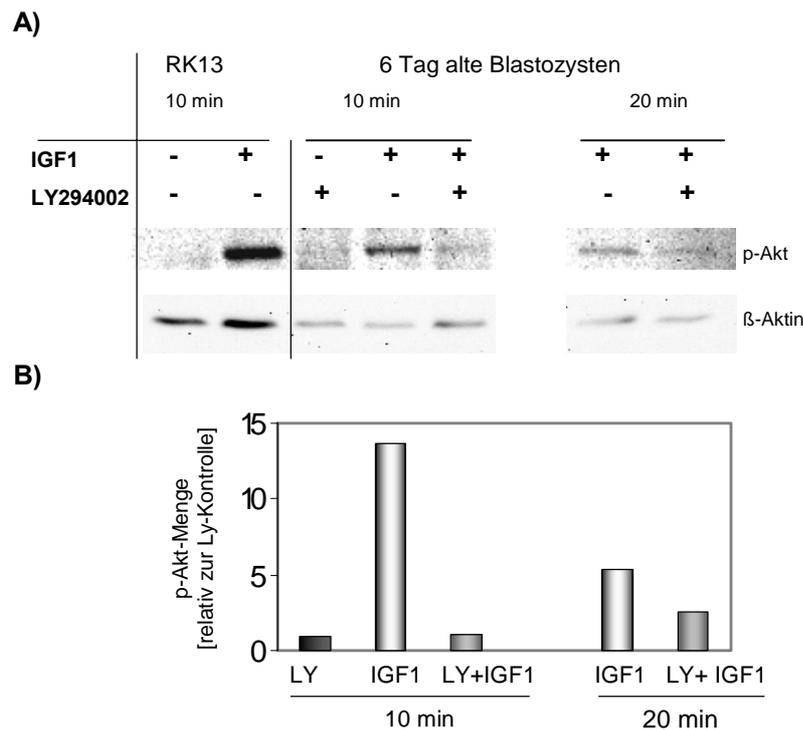
**Abb. 26 Quantifizierung von c-fos-Transkripten nach Insulin- und IGF1-Stimulation in Embryoblast (Em) und Trophoblast (Tr)**

Quantifizierung der c-fos mRNA-Menge [Kopien/10<sup>3</sup> Moleküle GAPDH] mittels *Real Time* PCR nach Stimulation von 6 Tage alten Kaninchenblastozysten mit Insulin für 10min bzw. IGF1 für 30min. Als Kontrolle dienten Blastozysten, die mit einer äquivalenten Menge Kulturmedium ohne Insulin/IGF1 für dasselbe Zeitintervall inkubiert wurden. Der Anstieg der c-fos-mRNA wurde zur Kontrolle durch Abgleich gegen GAPDH ermittelt (Mw ± SEM).

N=3, Gesamtzahl eingesetzter Embryonen (n) = s. Diagrammsäule; \*p ≤ 0,05, \*\*p ≤ 0,01

### 3.3.5 Aktivierung des PI3-K/Akt-Signalweges in Kaninchenblastozysten

Metabolische Reaktionen als Antwort auf eine Insulinstimulation werden vorrangig über den PI3-K-Signalweg vermittelt. An zentraler Stelle steht das Molekül Akt, das nach Aktivierung der Tyrosinkinase-Rezeptoren phosphoryliert wird (phospho-Akt, p-Akt). Eine Kultivierung von 6 Tage alten Kaninchenblastozysten mit Insulin von 10 bis 120 Minuten hatte kein erhöhtes p-Akt-Signal zur Folge (Navarrete Santos 2004b). Die Wirkung des Wachstumsfaktors IGF1 auf die Phosphorylierung von Akt in 6 Tage alten Kaninchenblastozysten wurde in der vorliegenden Arbeit nach 10 und 20min Stimulation untersucht. Die phospho-Akt-Menge erhöhte sich mehr als das 10-fache nach 10min und ca. 5-fach nach 20min IGF1-Stimulation. Das pAkt-Signal konnte nach dem Gebrauch des PI3-K spezifischen Inhibitors LY294002 nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 27).



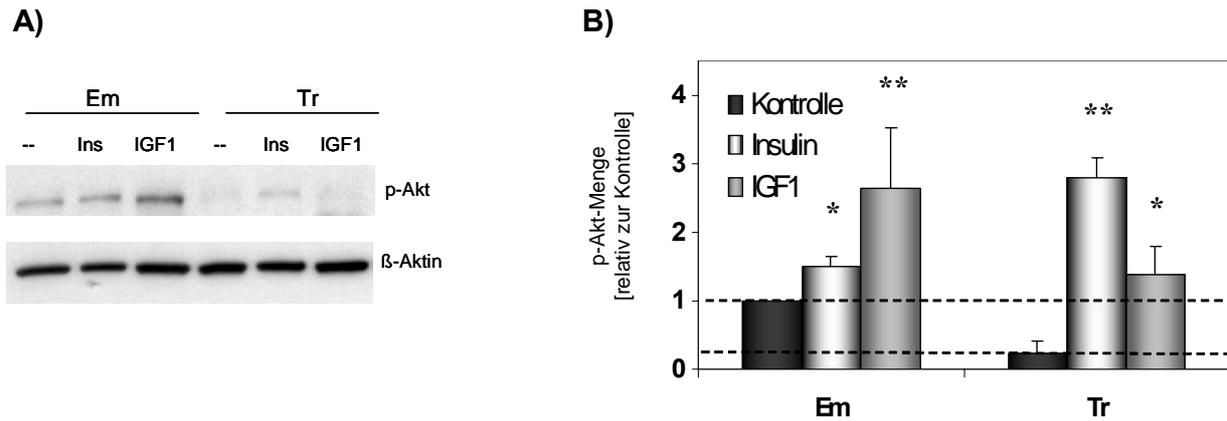
**Abb. 27 Phosphorylierung von Akt nach IGF1-Stimulation und Blockierung mit einem PI3-K Inhibitor**

*Western Blot* (A) und densitometrische Auswertung (B) der Phosphorylierung von Akt (p-Akt) in RK13-Zellen (RK13) und 6 Tage alten Kaninchenblastozysten nach Kultur mit 1,3nM IGF1 für 10 und 20min (IGF1) oder vorheriger Blockierung des PI3-K-Signalwegs durch LY294002 und anschließender IGF1-Stimulation (LY+IGF1). Als Kontrolle dienten Blastozysten, die nur mit dem Inhibitor LY294002 kultiviert wurden (LY). Der Grad der Phosphorylierung wurde relativ zur LY-Kontrolle (LY) nach Abgleich gegen  $\beta$ -Aktin ermittelt. Das Experiment wurde in einem Versuch durchgeführt (N=1) mit je 10 Blastozysten pro Versuchsgruppe (n=10).

N=1, n=10

### 3.3.6 Aktivierung des PI3-K/Akt-Signalsystems in separierten Embryoblasten und Trophoblasten

Beide Wachstumsfaktoren bewirken nach einer 10 minütigen Stimulation eine Steigerung der Phosphorylierung (Abb. 28). Akt ist im Trophoblasten deutlich weniger phosphoryliert als im Embryoblasten. Insulin hat in beiden Zelllinien signifikanten Einfluss auf die Phosphorylierung von Akt. Vor allem im Trophoblasten kommt es zu einer Erhöhung von phospho-Akt (11-fach). Im Embryoblasten ist die Steigerung mit 1,5-facher Menge dagegen deutlich geringer. IGF1 führt zu einem 2,6-fachen Anstieg des Akt-Phospho-Signals im Embryoblasten und einer ca. 6-fachen Steigerung im Trophoblasten.



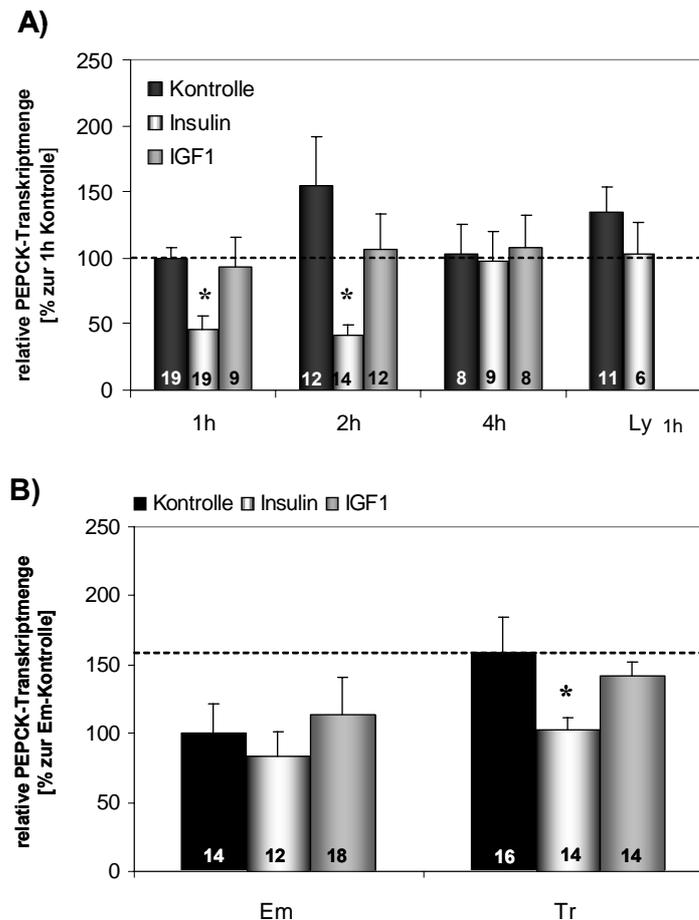
**Abb. 28** Phosphorylierung von Akt durch Insulin und IGF1 in Embryoblast (Em) und Trophoblast (Tr)

*Western Blot* (A) und densitometrische Auswertung (B) der Phosphorylierung von Akt (p-Akt) in 6 Tage alten Kaninchenblastozysten nach Stimulation mit Insulin (Ins) und IGF1 für 10min. Als Kontrolle (∅) dienten Blastozysten, denen ein äquivalentes Volumen Kulturmedium ohne Insulin/IGF1 zugegeben wurde. Der relative Anstieg der Phosphorylierung wurde relativ zur Embryoblast-Kontrolle in 3 unabhängigen Experimenten (N=3) mit je 10 Blastozysten pro Versuchsgruppe (n=10) nach Abgleich gegen β-Aktin der gleichen Proben ermittelt (Mw ± SEM). N=3, n=10, \* p ≤ 0,05, \*\*p ≤ 0,01

### 3.3.7 Quantifizierung des PI3-K/Akt-Zielgens PEPCK

Um die Aktivierung von Zielgenen im IR/IGF1-R/PI3-K-Signalweg zu untersuchen, wurden zwei Schlüsselenzyme der Glukosehomöostase, Hexokinase (HK) und Phosphoenolpyruvatkarboxykinase (PEPCK), und das anti-apoptotische Molekül Bcl-x(L) analysiert. HK und PEPCK sind Schlüsselenzyme der Glykolyse bzw. Glukoneogenese. Für beide ist Insulin als Regulator in adulten Zellen bekannt.

Die PEPCK-Transkriptmenge zeigte eine zeitabhängige signifikante Abnahme nach 1 bzw. 2 Stunden Kultur mit Insulin. Nach 4 Stunden erreichte sie wieder das Niveau der Kontrolle. Durch vorherige Inkubation mit dem PI3-K-spezifischen Inhibitor LY294002 wurde die Verringerung der PEPCK-mRNA blockiert (Abb. 29 A). Die Wirkung von Insulin beschränkte sich auf den Trophoblasten, der auf Stimulation mit einer signifikanten Verringerung der Transkriptmenge reagierte, während im Embryoblasten keine Regulation durch Insulin nachweisbar war (Abb. 29 B). IGF1 wirkte sich nicht signifikant auf die PEPCK-Transkripte aus. Die Ergebnisse in Gesamtblastozysten lassen sich auf die beiden Zelllinien der Blastozyste übertragen: In isolierten Embryoblast- und Trophoblastzellen wurde ebenfalls kein Einfluss von IGF1 nachgewiesen (Abb. 29 B).



**Abb. 29 Relative PEPCK-RNA-Mengen in Kaninchenembryonen nach Insulin- und IGF1-Stimulation im Gesamtembryo und im Embryoblasten und Trophoblasten**

- A) Die Quantifizierung der PEPCK-RNA-Menge [%] erfolgte für Gesamtembryonen mittels *Real Time* PCR nach Stimulation 6 Tage alter Kaninchenblastozysten mit Insulin und IGF1 für 1 (1h), 2 (2h) und 4 Stunden (4h). Zur Analyse der PI3-K-Abhängigkeit wurden Embryonen für 1h mit dem Inhibitor LY294002 und Insulin kultiviert (LY1h). Der Wert der 1h Kontrolle entspricht 100% der Transkriptmenge.
- B) Die Wirkung der Wachstumsfaktoren auf die Transkription [%] im Embryoblasten (Em) und Trophoblasten (Tr) wurde ebenfalls mittels *Real Time* PCR nach 1h Insulin- und IGF1-Stimulation untersucht. Der Wert des Embryoblasten entspricht 100% der Transkriptmenge.

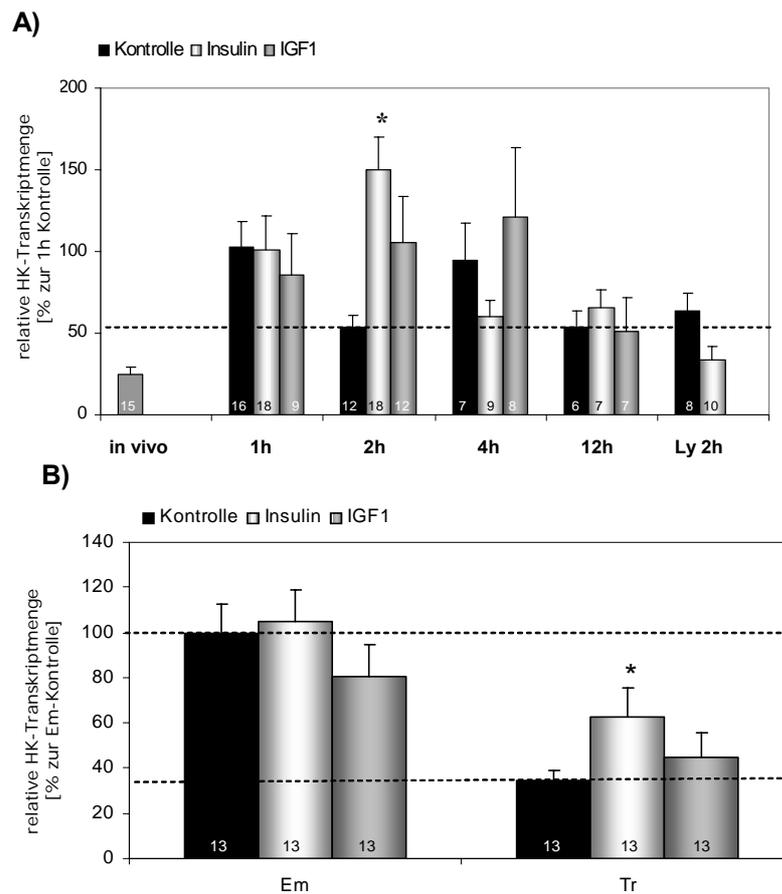
Als Kontrolle dienen in beiden Versuchen Blastozysten, die mit einer äquivalenten Menge Kulturmedium ohne Insulin/IGF1 für die gleichen Zeitintervalle inkubiert wurden. Die relative PEPCK-RNA-Menge [%] wurde durch Abgleich gegen GAPDH der gleichen Proben ermittelt (Mw  $\pm$  SEM).

N=3, Gesamtzahl eingesetzter Embryonen (n) = s. Diagrammsäule; \*p  $\leq$  0,05

### 3.3.8 Quantifizierung des PI3-K/Akt-Zielgens HK

Die Hexokinase zeigte eine Zunahme der Transkription nach 1h *in vitro* Kultur. Sie näherte sich dem *in vivo* Ausgangsniveau nach 12 Stunden wieder an (Abb. 30 A). Die Hexokinase-mRNA in der Blastozyste war durch Zugabe von Insulin nach zweistündiger Inkubation deutlich gesteigert und fiel nach 4 und 12 Stunden wieder ab. Die PI3-K-Inhibierung durch

LY294002 verhinderte diese Zunahme. IGF1 führt nach 2 Stunden Inkubation ebenfalls zu einer Erhöhung der HK, jedoch nicht statistisch signifikant (Abb. 30 A). In separierten Embryoblasten und Trophoblasten war im Embryoblasten keine Veränderung messbar, während es im Trophoblasten zu einer signifikanten Erhöhung der HK-RNA durch Insulin kam. Wie schon bei der PEPCK, reagierte nur der Trophoblast mit einer Steigerung der HK-Expression (Abb. 30 B).



**Abb. 30 Relative HK-RNA-Menge in Kaninchenblastozysten nach Insulin- und IGF1-Stimulation im Gesamtembryo und im Embryoblasten und Trophoblasten**

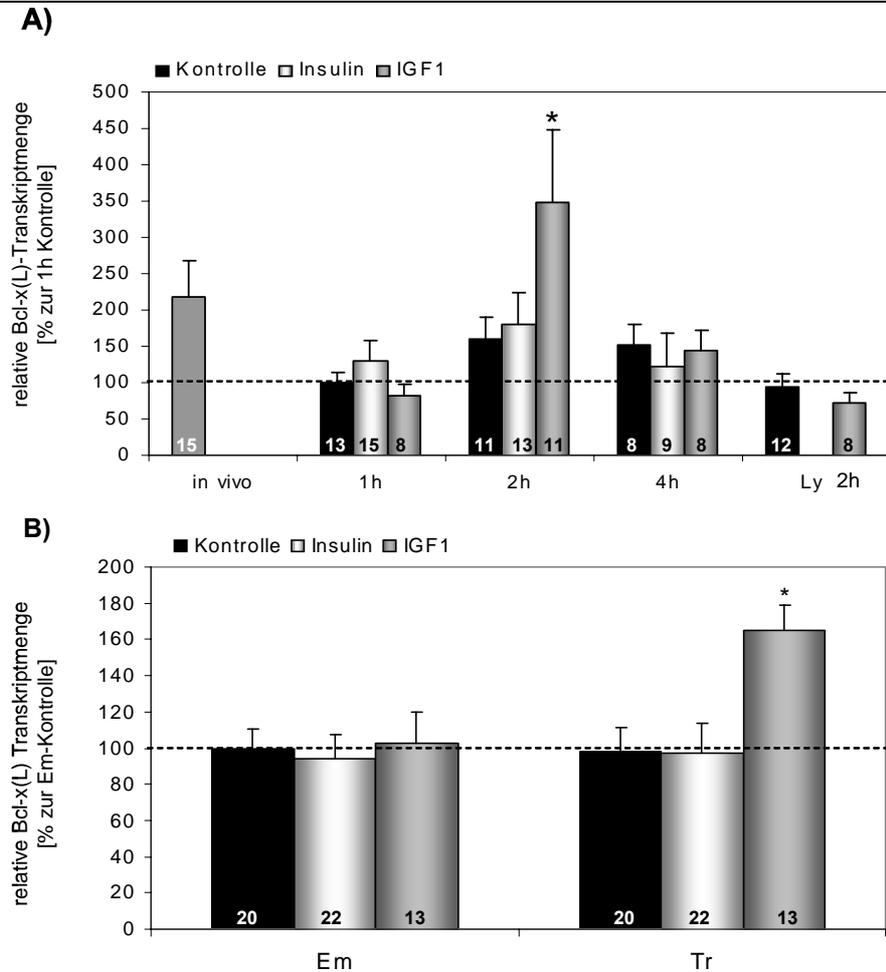
- A)** Die Quantifizierung der HK-RNA-Menge [%] erfolgte für Gesamtembryonen mittels *Real Time* PCR nach Stimulation 6 Tage alter Kaninchenblastozysten mit Insulin und IGF1 für 1 (1h), 2 (2h), 4 (4h) und 12 Stunden (12h). Zur Analyse der PI3-K-Abhängigkeit wurden Embryonen für 2h mit dem Inhibitor LY294002 und Insulin kultiviert (Ly2h). Der Wert der 1h Kontrolle entspricht 100% der Transkriptmenge.
- B)** Die Wirkung der Wachstumsfaktoren auf die Transkription [%] im Embryoblasten (Em) und Trophoblasten (Tr) wurde ebenfalls mittels *Real Time* PCR nach 2h Insulin- und IGF1-Stimulation untersucht. Der Wert des Embryoblasten entspricht 100% der Transkriptmenge.

Als Kontrolle dienten in beiden Versuchen Blastozysten, die mit einer äquivalenten Menge Kulturmedium ohne Insulin/IGF1 für die gleichen Zeitintervalle inkubiert wurden. Die relative HK-RNA-Menge [%] wurde durch Abgleich gegen GAPDH der gleichen Proben ermittelt ( $Mw \pm SEM$ ).

N=3, Gesamtzahl eingesetzter Embryonen (n) = s. Diagrammsäule; \*p < 0,05

### 3.3.9 Quantifizierung des PI3-K/Akt-Zielgens Bcl-x(L)

Mittels *Real Time* PCR wurde die Transkriptmenge von Bcl-x(L) in *in vivo* Embryonen ohne Kultur und nach 1-4 Stunden Kultur mit den entsprechenden Wachstumsfaktoren untersucht (Abb. 31). *In vivo* Embryonen besitzen eine signifikant höhere Menge anti-apoptisches Bcl-x(L) (ca. 2-fach) als Embryonen nach einer *in vitro* Kultur, die auch nach 4h nicht das Niveau der *in vivo* Embryonen erreichte. Die Zugabe von IGF1 für 1-4h zeigte eine signifikante Steigerung der Transkriptmenge nach 2h Stimulation, die nach 4h wieder das Niveau der Kontrolle erreichte. Die Inhibierung der PI3-K bewirkte die Blockierung des IGF1-induzierten Bcl-x(L) Anstiegs. Eine Insulinstimulation hatte keinen Effekt auf Bcl-x(L) in Kaninchenblastozysten (Abb. 31 A). Bei der Einzelbestimmung in Embryoblast und Trophoblast hatte IGF1 nur im Trophoblasten eine signifikante Steigerung der Bcl-x(L)-mRNA zur Folge. Insulin zeigte wie in den Gesamtblastozysten keinen Effekt (Abb. 31 B).



**Abb. 31 Relative Bcl-x(L)-RNA-Menge in Kaninchenblastozysten nach Insulin- und IGF1-Stimulation im Gesamtembryo und im Embryoblasten und Trophoblasten**

- A)** Die Quantifizierung der Bcl-x(L)-RNA-Menge [%] erfolgte für Gesamtembryonen mittels *Real Time* PCR nach Stimulation 6 Tage alter Kaninchenblastozysten mit Insulin und IGF1 für 1 (1h), 2 (2h) und 4 Stunden (4h). Zur Analyse der PI3-K-Abhängigkeit wurden Embryonen mit dem Inhibitor LY294002 und für 2h mit IGF1 kultiviert (Ly 2h). Der Wert der 1h Kontrolle entspricht 100% der Transkriptmenge.
- B)** Die Wirkung der Wachstumsfaktoren auf die Transkription [%] im Embryoblasten (Em) und Trophoblasten (Tr) wurde ebenfalls mittels *Real Time* PCR nach 2h Insulin- und IGF1-Stimulation untersucht. Der Wert des Embryoblasten entspricht 100% der Transkriptmenge.

Als Kontrolle dienten in beiden Versuchen Blastozysten, die mit einer äquivalenten Menge Kulturmedium ohne Insulin/IGF1 für die gleichen Zeitintervalle inkubiert wurden. Die relative Bcl-(xL)-RNA-Menge [%] wurde durch Abgleich gegen GAPDH der gleichen Proben ermittelt (Mw  $\pm$  SEM).

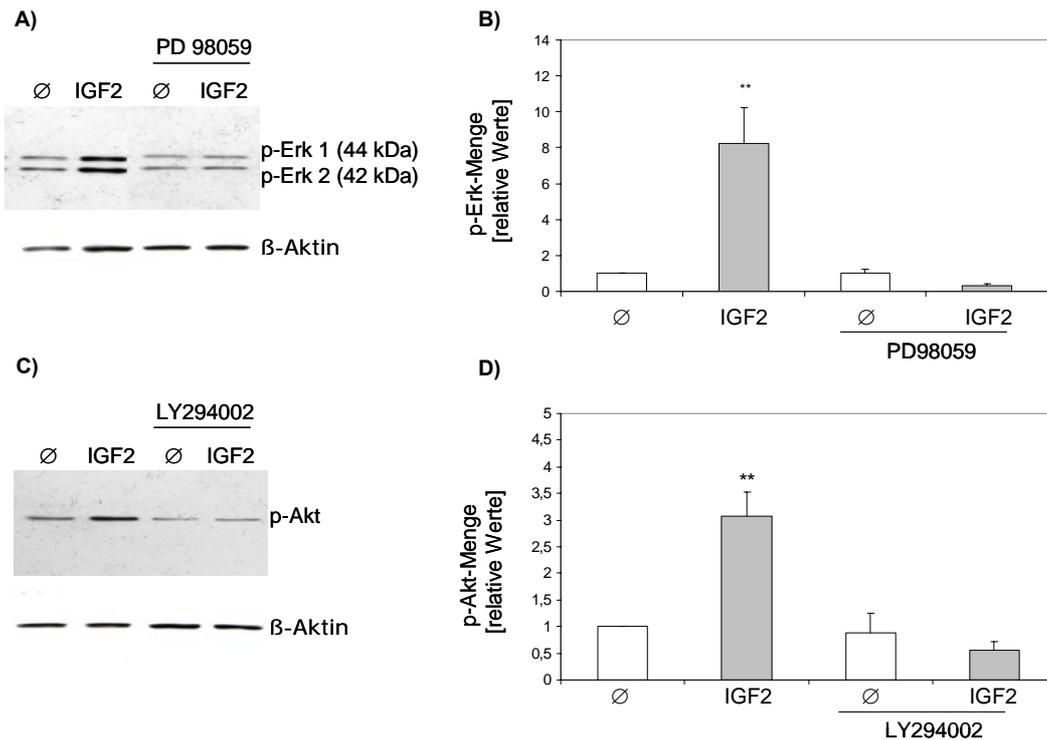
N=3, Gesamtzahl eingesetzter Embryonen (n) = s. Diagrammsäule; \*p  $\leq$  0,05

### **3.4 Wirkung des *Insulin-like growth factor 2* (IGF2) auf Kaninchenblastozysten**

Rekombinantes IGF2 wurde in einer Konzentration von 13 nM für 15min zuerst an der humanen Brustkrebszelllinie MCF7 auf die Phosphorylierung von Erk und Akt im *Western Blot* getestet. Es wurde eine signifikante Erhöhung der p-Erk- (ca. 7-fach) und der p-Akt-Menge um das ca. 10-fache beobachtet (siehe Kapitel 7.7). Daher wurde die Konzentration von 13nM auch für die Aktivierung der Signalwege MAPK und PI3-K in Blastozysten eingesetzt.

#### **3.4.1 Aktivierung des MAPK/Erk- und PI3-K/Akt-Signalweges durch IGF2 in Kaninchenblastozysten**

In der vorliegenden Arbeit konnte nach 15 Minuten für IGF2 (13nM) eine gesteigerte Phosphorylierung von Erk1/2 in Kaninchenblastozysten nachgewiesen werden (Abb. 32 A, B). Wurde vor der IGF2-Stimulation der spezifische MAPK-Inhibitor PD98059 zugegeben, war der 8-fache Anstieg der Phosphoylierung nicht mehr messbar. Daraus lässt sich ableiten, dass in der Blastozyste die Erk-Phosphorylierung durch IGF2 über den MAPK-Signalweg vermittelt wird. Auch die phospho-Akt-Menge in Kaninchenblastozysten erhöhte sich um das 3-fache nach 15min IGF2-Stimulation. Das p-Akt-Signal konnte nach dem Gebrauch des PI3-K spezifischen Inhibitors LY294002 nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 32 C, D).

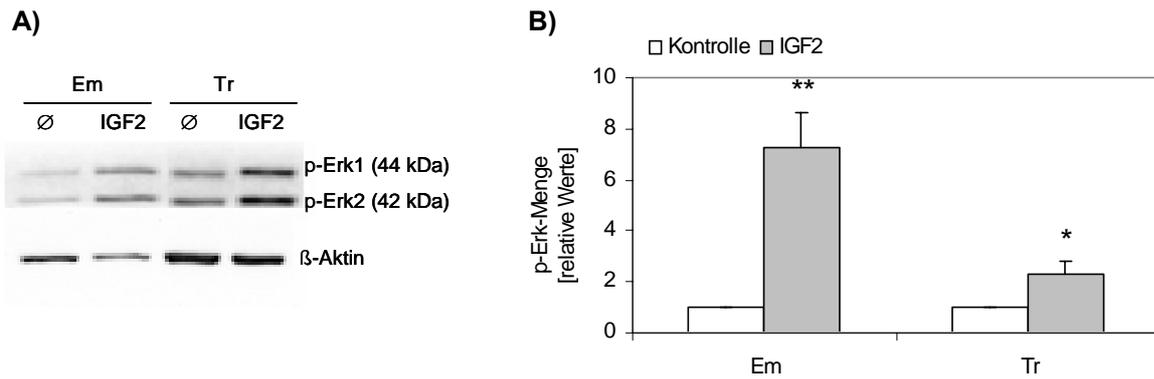


**Abb. 32 Phosphorylierung von Erk und Akt nach IGF2-Stimulation und Blockierung mit einem MAPK- oder PI3-K-Inhibitor**

*Western Blot* (A, C) und densitometrische Auswertung (B, D) der Phosphorylierung von Erk (p-Erk 1/2) und Akt (p-Akt) in 6 Tage alten Kaninchenblastozysten nach Kultur mit 13nM IGF2 für 15min (IGF2) oder vorheriger Blockierung des MAPK- Signalwegs durch PD98059 bzw. des PI3-K-Signalwegs durch LY294002 und anschließender IGF2-Stimulation (PD/Ly IGF2). Als Kontrolle dienten Blastozysten, die nur mit Kulturmedium (∅) oder den Inhibitoren PD98059 (PD ∅) bzw. LY294002 (Ly ∅) kultiviert wurden. Der Grad der Phosphorylierung wurde relativ zur Kontrolle (∅) nach Abgleich gegen β-Aktin ermittelt. Das Experiment wurde in zwei unabhängigen Versuchen durchgeführt (N=2) mit je 10 Blastozysten pro Versuchsgruppe (n=10), \*\*p ≤ 0,01

### 3.4.2 Aktivierung des MAPK/Erk- und PI3-K/Akt-Signalwegs durch IGF2 in separierten Embryoblastzellen und Trophoblastzellen

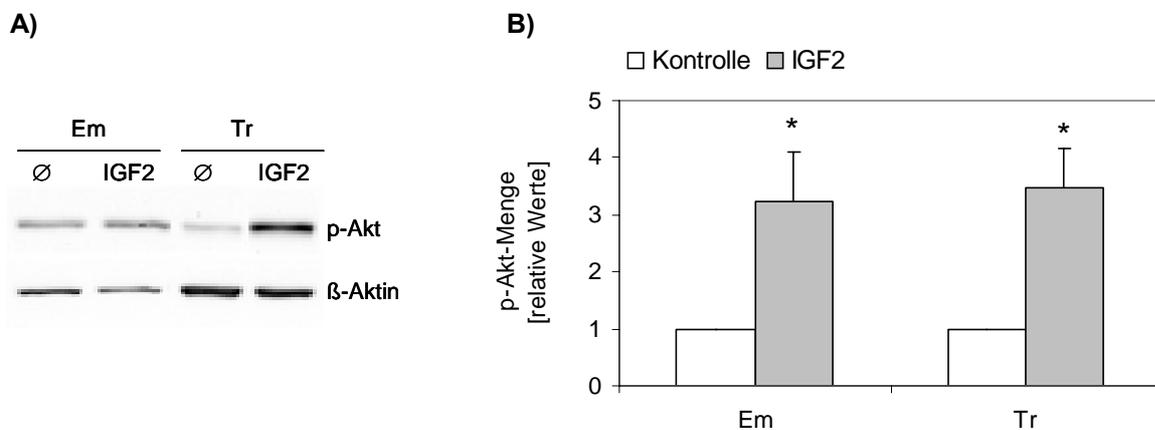
Kaninchenblastozysten am Tag 6.0 p.c. wurden für 15min mit 13nM IGF2 kultiviert, anschließend in Embryoblast und Trophoblast getrennt und mit spezifischen Antikörpern auf p-Erk (Abb. 33) und p-Akt (Abb. 34) im *Western Blot* untersucht. IGF2 führte in beiden Zelllinien zur Phosphorylierung von Erk. Im Embryoblasten kam es zu einem 7-fachen Anstieg und im Trophoblast zu einem ca. 2-fachen Anstieg von p-Erk (Abb. 33). Auch die Phosphorylierung von Akt wurde durch IGF2 in Embryoblast- und Trophoblastzellen induziert. In beiden Zelllinien zeigte sich eine Zunahme um das 3-fache (Abb. 34).



**Abb. 33 Phosphorylierung von Erk durch IGF2 in Embryoblast und Trophoblast**

*Western Blot* (A) und densitometrische Auswertung (B) der Phosphorylierung von Erk1/2 (p-Erk) in 6 Tage alten Kaninchenblastozysten, separiert in Embryoblast (Em) und Trophoblast (Tr), nach Stimulation mit IGF2 für 15min. Als Kontrolle (∅) dienen Blastozysten, denen ein äquivalentes Volumen Kulturmedium ohne Insulin/IGF1 zugegeben wurde. Der relative Anstieg der Phosphorylierung wurde in 3 unabhängigen Experimenten (N=3) mit je 10 Blastozysten pro Versuchsgruppe (n=10) nach Abgleich gegen β-Aktin der gleichen Proben ermittelt (Mw ± SEM). Die relative p-Erk-Menge der Kontrollblastozysten wurde für Em und Tr gleich 1 gesetzt.

N=3, n=10; \*p ≤ 0,05, \*\*p ≤ 0,01



**Abb. 34 Phosphorylierung von Akt durch IGF2 in Embryoblast und Trophoblast**

*Western Blot* (A) und densitometrische Auswertung (B) der Phosphorylierung von Akt (p-Akt) in 6 Tage alten Kaninchenblastozysten, separiert in Embryoblast (Em) und Trophectoderm (Tr), nach Stimulation mit IGF2 für 15min. Als Kontrolle (∅) dienen Blastozysten, denen ein äquivalentes Volumen Kulturmedium ohne Insulin/IGF1 zugegeben wurde. Der relative Anstieg der Phosphorylierung wurde in 3 unabhängigen Experimenten (N=3) mit je 10 Blastozysten pro Versuchsgruppe (n=10) durch Abgleich gegen β-Aktin der gleichen Proben ermittelt (Mw ± SEM). Die relative p-Akt-Menge der Kontrollblastozysten wurde für Em und Tr gleich 1 gesetzt.

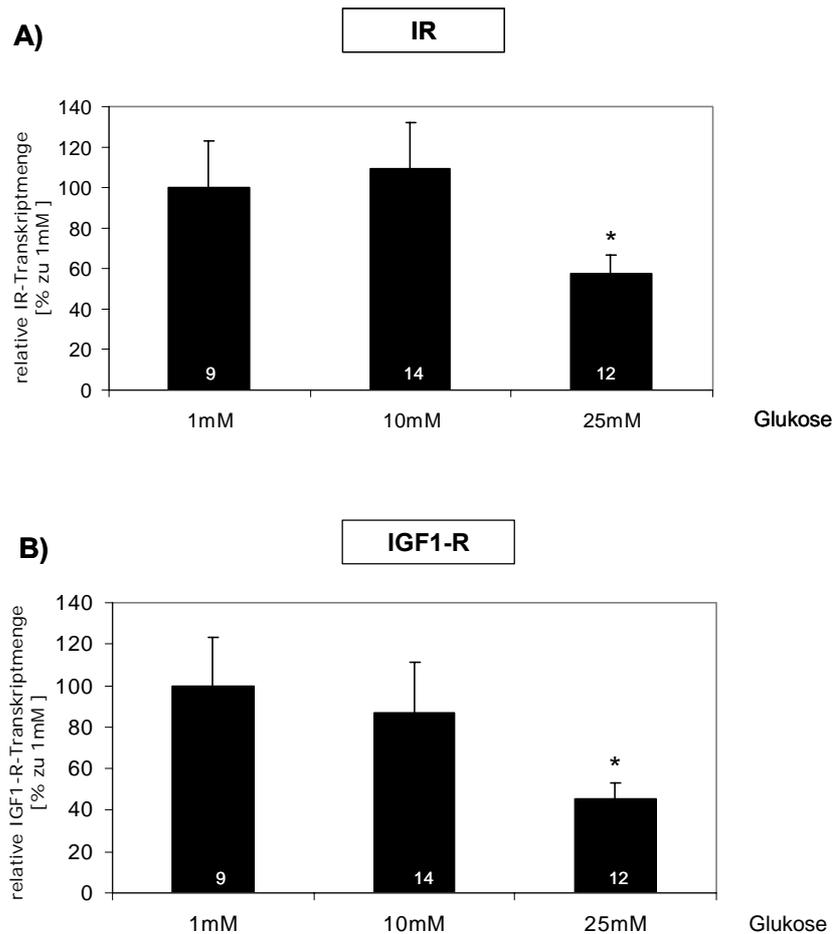
N=3, n=10; \* p < 0,05

### **3.5 Regulation metaboler Stoffwechselwege durch Glukose in der Kaninchenblastozyste**

Die Rolle verschiedener Glukosekonzentrationen (1mM, 10mM und 25mM) in Kombination mit Insulin/IGF1 und die Auswirkungen auf den Glukosestoffwechsel im Embryo ist Gegenstand der in diesem Kapitel beschriebenen Untersuchungen.

#### **3.5.1 Transkriptionelle Regulation von IR und IGF1-R durch niedrige und hohe Glukosekonzentrationen**

Die Bedingungen der *in vitro* Kultur von Kaninchenembryonen wurden 1978 von Maurer et al. etabliert. Sie verwendeten eine Konzentration der Glukose im Kulturmedium von 10mM, welche damit deutlich höher lag als die gemessene Konzentration von 0,4-1mM im Kaninchenuterus (Lutwak-Mann 1962). In der Kultur entwickelten sich die Embryonen aber unter 10mM Glukose am besten. In der vorliegenden Arbeit wurden die Kaninchenblastozysten mit 1mM, 10mM und 25mM Glukose kultiviert. Dabei wurde der „Glukosereiz“ nur für 3 Stunden gesetzt, um die unmittelbare Reaktion auf die IR- und IGF1-R-Expression analysieren zu können (Abb. 35). Beide Rezeptoren zeigten keine Veränderung bei niedriger (1mM) Glukose, wohingegen bei der hohen Glukosekonzentration (25mM) die Transkriptmengen des IR um 47%, die des IGF1-R um 65% signifikant reduziert waren (Abb. 35).



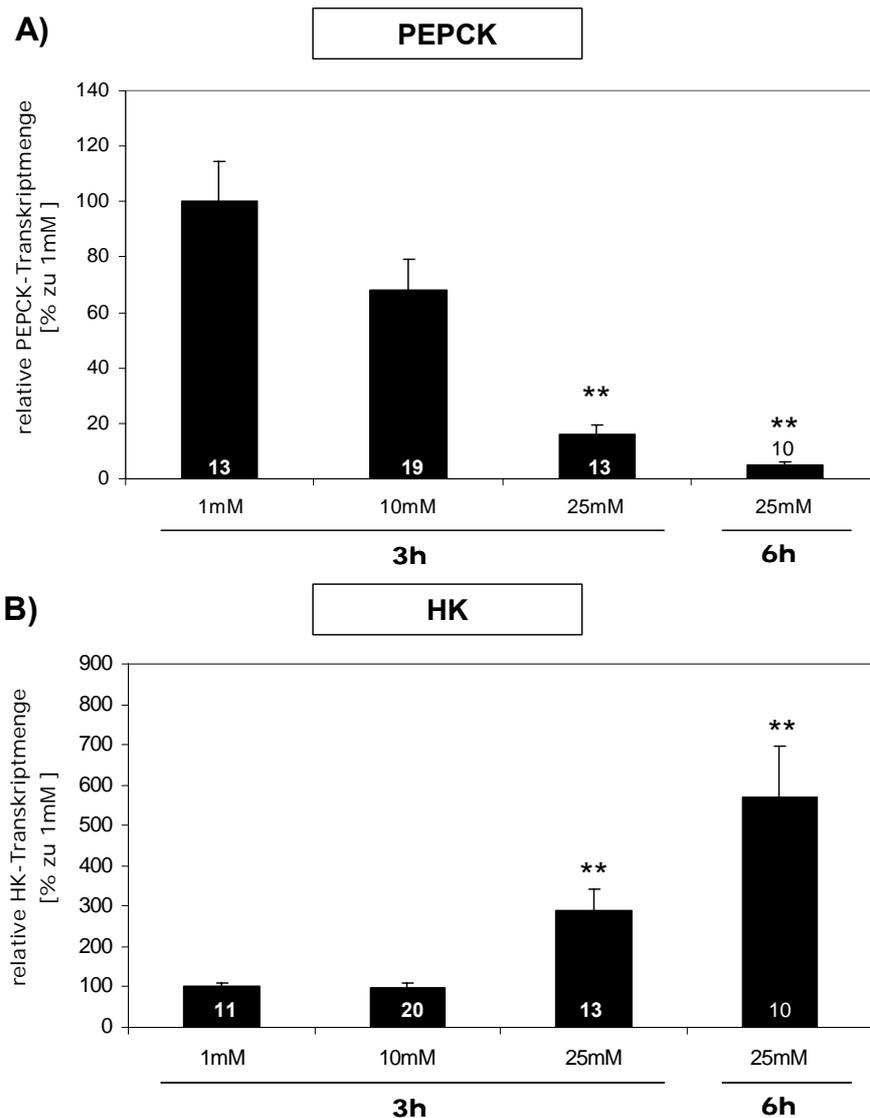
**Abb. 35 Quantifizierung der IR- und IGF1-R-Transkriptmenge von Blastozysten kultiviert in 1mM, 10mM oder 25mM Glukose**

6 Tage alte Kaninchenblastozysten wurden für 3 Stunden in 1mM, 10mM und 25mM Glukose kultiviert. Mittels *Real Time* PCR wurde anschließend die IR- (A) und IGF1-R-Transkriptmenge [%] (B) quantifiziert. Die IR- und IGF1-R-Menge wurde nach Abgleich gegen GAPDH der gleichen Proben ermittelt (Mw  $\pm$  SEM). Die Werte der Blastozysten, die mit 1mM Glukose kultiviert wurden, entsprechen 100% der Transkriptmenge. N=3, Gesamtzahl eingesetzter Embryonen (n) = s. Diagrammsäulen, \*p  $\leq$  0,05

### 3.5.2 Transkriptionelle Regulation von PEPCK und HK durch niedrige und hohe Glukosekonzentrationen

In Blastozysten, die mit abfallenden Glukosekonzentrationen von 1-25mM kultiviert wurden, nahm die PEPCK-Menge konzentrationsabhängig ab (Abb. 36 A). Im Vergleich zu 1mM Glukose kam es zu einer signifikanten Abnahme um 40% unter 10mM Glukose, die unter 25mM Glukose nochmals um 52% reduziert wurde (Abb. 36 A).

Im Gegensatz dazu zeigt die HK-RNA bei einer Konzentration von 25mM Glukose eine signifikante Zunahme auf 250%, während die Transkriptmenge unter 1mM und 10mM Glukose unverändert blieb (Abb. 36 B).



**Abb. 36 Quantifizierung der PEPCK- und HK-Transkriptmenge von Blastozysten kultiviert in 1mM, 10mM oder 25mM Glukose**

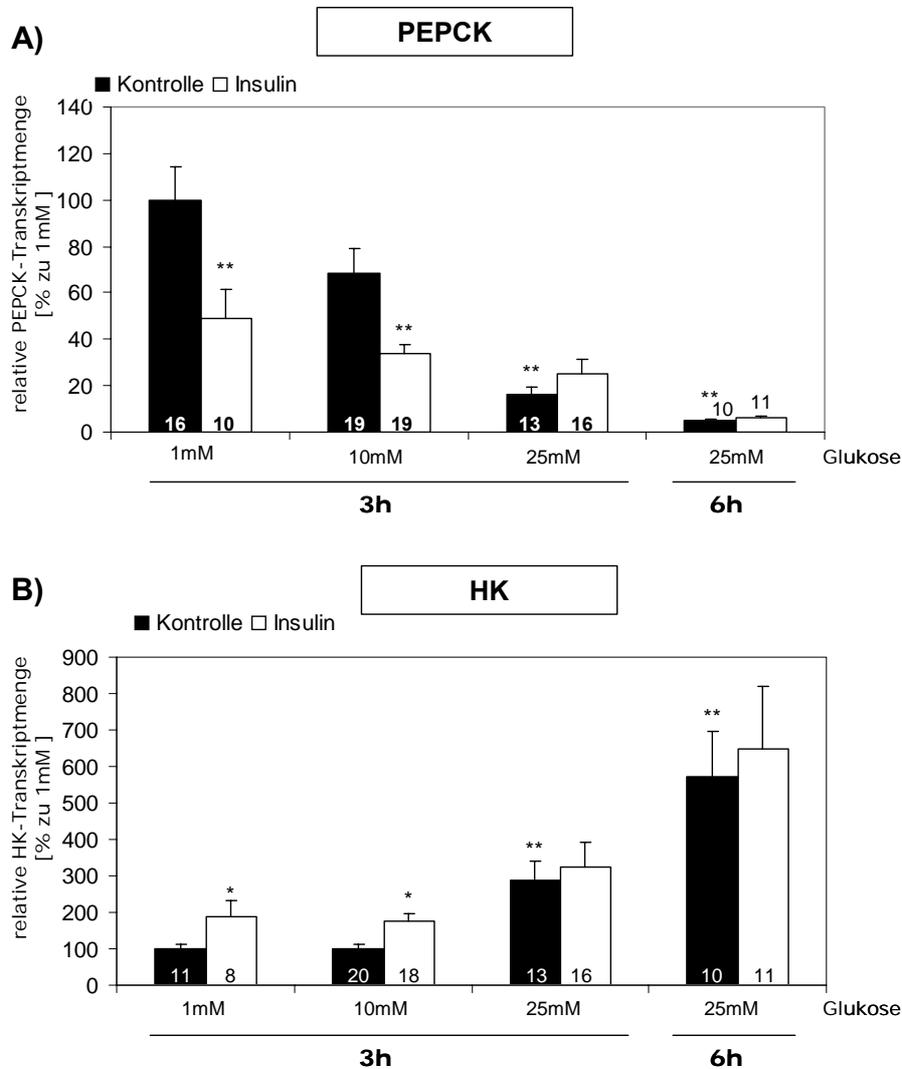
6 Tage alte Kaninchenblastozysten wurden für 3 bzw. 6 Stunden in 1mM, 10mM und 25mM Glukose kultiviert. Mittels *Real Time* PCR wurde die PEPCK- (A) und HK-Transkriptmenge [%] (B) quantifiziert. Die PEPCK- und HK-Menge wurden nach Abgleich gegen GAPDH der gleichen Proben ermittelt ( $M_w \pm SEM$ ). Die Werte der Blastozysten, die mit 1mM Glukose kultiviert wurden, entsprechen 100% der Transkriptmenge.

N=3, Gesamtzahl eingesetzter Embryonen (n) = s. Diagrammsäulen; \*\* $p \leq 0,01$

### 3.5.3 Wirkung von Insulin auf PEPCK und HK in definierten Glukosekonzentrationen

Zur Analyse des kombinierten Effekts von Insulin und Glukose wurden Kaninchenblastozysten für 2 Stunden mit 1mM, 10mM oder 25mM Glukose kultiviert, denen anschließend Insulin für eine weitere Stunde zugegeben wurde (siehe Kapitel 2.4). Unter 1mM und 10mM Glukose kam es durch Insulin zu einer signifikanten Reduktion der PEPCK-Transkriptmenge. Blastozysten kultiviert in hoher Glukose wiesen eine sehr geringe PEPCK-Menge auf, die durch Zugabe von Insulin nicht weiter reduziert wurde (Abb. 37 A).

Die HK-Transkriptmenge stieg bei 25mM Glukose an. Ein signifikanter Effekt auf die RNA-Menge zeigte sich nach Zugabe von Insulin nur bei einer Kultur in 1mM und 10mM Glukose. Hier führte Insulin zu einer Steigerung der HK-RNA-Menge (Abb. 37 B).



**Abb. 37 Quantifizierung der PEPCK- und HK-Transkriptmenge in Blastozysten nach Insulin und IGF1-Zugabe in 1mM, 10mM oder 25mM Glukose-haltigen Kulturmedien**

6 Tage alte Kaninchenblastozysten wurden für 2 Stunden in 1mM, 10mM oder 25mM Glukose kultiviert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Insulin oder IGF1 für 1 bzw. 4 Stunden. Den Kontrollen wurde die äquivalente Menge Kulturmedium ohne Insulin zugegeben. Mittels *Real Time* PCR wurde die PEPCK- (A) und HK-Transkriptmenge [%] (B) quantifiziert. Die PEPCK- und HK-Menge wurden nach Abgleich gegen GAPDH der gleichen Proben ermittelt ( $M_w \pm SEM$ ). Die Werte der Kontrollblastozysten, die mit 1mM Glukose kultiviert wurden, entsprechen 100% der Transkriptmenge.

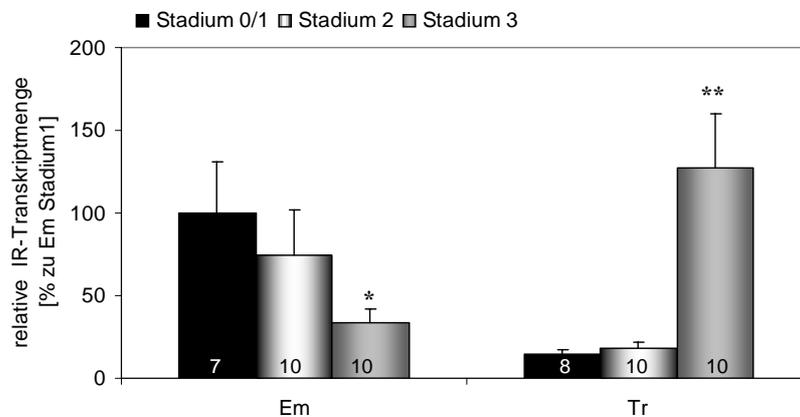
N=3, Gesamtzahl eingesetzter Embryonen (n) = s. Diagrammsäulen; \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$

### 3.6 Einfluss von Insulin und IGF1 auf die Differenzierung des Präimplantationsembryos

Um zu klären, ob sich die Insulin-/IGF1-Wirkung während der frühen Gastrulation verändert, wurden die Expression der jeweiligen Rezeptoren und die Zielgenaktivierung in verschiedenen Keimscheibenstadien bestimmt.

#### 3.6.1 Expression des IR in 6 Tage alten Kaninchenblastozysten während der frühen Gastrulation

Die Expression des IR in Embryoblast und Trophoblast der Stadien 0/1, 2 und 3 wurde mittels *Real Time* PCR in *in vivo* Embryonen quantifiziert (Abb. 38). Die Expression wurde relativ zu Stadium 0/1 bestimmt. Der IR ist in allen Stadien nachweisbar. Im Verlauf der Differenzierung kommt es in der Keimscheibe bis zum Stadium 3 zu einer Abnahme des Rezeptors auf 34%. Die IR-RNA wird im Trophoblasten im Stadium 0/1 mit 14% deutlich niedriger exprimiert als im Embryoblasten mit 100% (Abb. 38). Anschließend kommt es jedoch im Stadium 3 zu einer signifikanten Steigerung um 112%. Damit weist der Trophoblast mit 127% schließlich ein höheres Niveau auf, als der Embryoblast im Stadium 0/1 (Abb. 38).



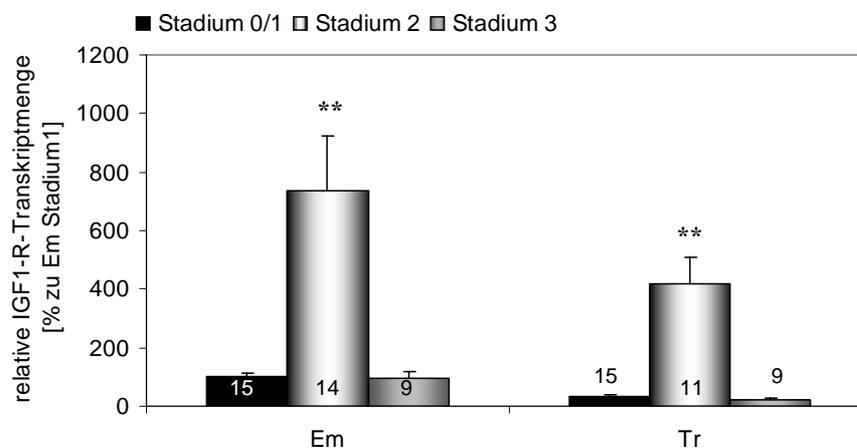
**Abb. 38 IR- RNA-Mengen in Kaninchenblastozysten der Entwicklungsstadien 0/1, 2 und 3**

*In vivo* Kaninchenblastozysten der Stadien 0/1, 2 und 3 wurden in Embryoblast (Em) und Trophoblast (Tr) separiert und mittels *Real Time* PCR auf die Expression des IR analysiert. Die RNA-Mengen des IR [%] wurden von 7-10 individuellen Blastozysten nach Abgleich gegen GAPDH der gleichen Proben ermittelt (Mw ± SEM). Die Werte des Em im Stadium 0/1 entsprechen 100% der Transkriptmenge.

Gesamtzahl eingesetzter Embryonen (n) = s. Diagrammsäulen; \*p ≤ 0,05; \*\*p ≤ 0,01

### 3.6.2 Expression und Lokalisation des IGF1-R in 6 Tage alten Kaninchenblastozysten während der frühen Gastrulation

Embryoblastzellen zeigten in allen Stadien eine höhere IGF1-R-Expression als der Trophoblast. Im Stadium 1 beträgt die IGF1-R-Menge im Trophoblasten nur 33% der des Embryoblasten. Im Stadium 2 kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Transkriptmenge sowohl im Embryoblasten (7-fach) als auch um das ca. 12-fache im Trophoblasten, die dann im Stadium 3 wieder auf das Niveau des Stadiums 1 zurückfällt (Abb. 39).



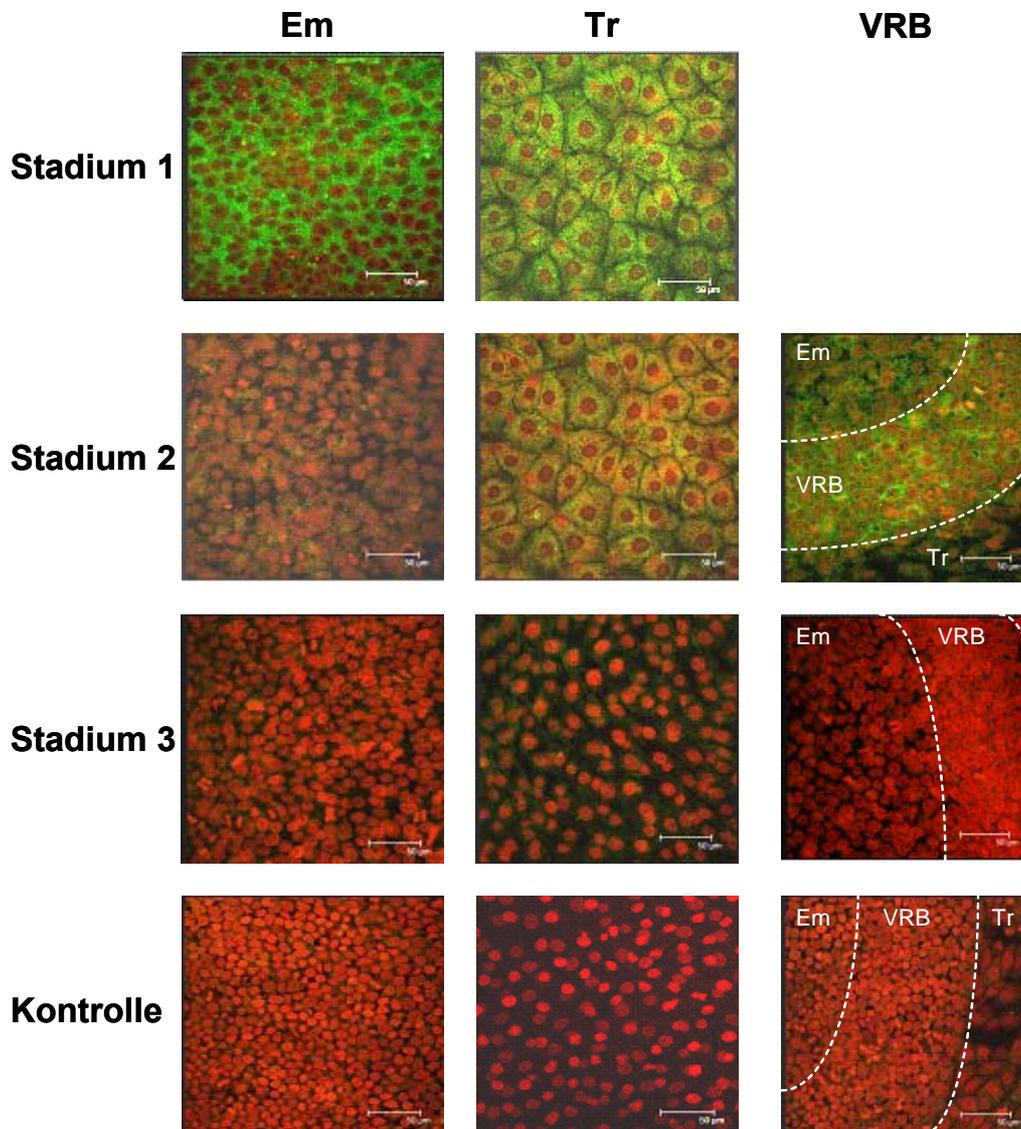
**Abb. 39 IGF1-R-Menge in Kaninchenblastozysten der Entwicklungsstadien 0/1, 2 und 3**

*In vivo* Kaninchenblastozysten der Stadien 0/1, 2 und 3 wurden in Embryoblast (Em) und Trophoblast (Tr) separiert und mittels *Real Time* PCR die RNA-Menge des IGF1-R analysiert. Die RNA-Menge des IGF1-R [%] wurde von 9-15 individuellen Blastozysten nach Abgleich gegen GAPDH der gleichen Proben ermittelt ( $Mw \pm SEM$ ). Die Werte des Em im Stadium 0/1 entsprechen 100% der Transkriptmenge.

Gesamtzahl eingesetzter Embryonen (n) = s. entsprechender Diagrammbalken, \*\*p ≤ 0,01

Die Lokalisation des IGF1-R in *in vivo* Blastozysten am Tag 6 wurde durch Immunhistochemie an Keimscheiben (siehe Kapitel 2.7.4 und Tabelle 3) und anschließender konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht (Abb. 40). Der mRNA-Anstieg des IGF1-R spiegelt sich bei der IHC nicht in einem generellen Zuwachs des IGF1-R-Signals im Stadium 2 wieder, sondern in einer Lokalisationsänderung des Rezeptors. Die Fluoreszenz zeigt im Stadium 1 im Embryoblasten einen membranständigen Rezeptor. Die Kerne haben kein positives Signal und sind IGF1-R negativ. Im Trophoblasten ist der Rezeptor hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert. Vereinzelt sind Membranfärbungen erkennbar. Im Stadium 2 sind im zentral gelegenen Teil der Keimscheibe nur noch vereinzelte

membranständige Fluoreszenzsignale nachweisbar. Die vorrangige Membranfärbung ist im Bereich des vorderen Randbogens detektierbar. Im Stadium 3 ist sowohl im Embryoblasten als auch im Trophoblasten keine Markierung des Rezeptors mehr nachweisbar.



**Abb. 40** Lokalisation des IGF1-R in Kaninchenblastozysten der Entwicklungsstadien 0/1, 2 und 3

Detektion des IGF1-R (grün) mittels IHC an Keimscheiben und anschließender konfokaler Laser –Scanning-Mikroskopie in je fünf (n=5) 6 Tage alten *in vivo* Kaninchenblastozysten. Untersucht wurden Embryoblastzellen (Em), Trophoblastzellen (Tr) und die Zellen des vorderen Randbogens (VRB) im Stadium 0/1, 2 und 3. Die Kontrolle ist die IHC-Kontrollreaktion ohne Primärantikörper (Negativkontrolle). Die Kernfärbung erfolgte mit 7-AAD (rot). Maßstab=50µm, n=5

## 4 Diskussion

### 4.1 Expression des IR/IGF-R-Systems in Blastozysten

Der Säugetier-Präimplantationsembryo ist ein Insulin-sensitives Gewebe, belegt durch die Expression des Insulin/IGF-Systems und die molekularen Reaktionen auf Insulin und die IGFs. Eine Besonderheit ist die Zelllinien-spezifische Rezeptorausstattung der Blastozyste. Sie ist für Wachstum und Differenzierung und die Interaktion zwischen Mutter und Embryo im Uterus von entscheidender Bedeutung.

#### 4.1.1 Expression und Lokalisation des IR und seiner Isoformen

Die Expression des IR in Präimplantationsembryonen ist abhängig vom Entwicklungsstadium. Beim Kaninchen sind erste Transkripte des IR ab der frühen Blastozyste detektierbar (Tag 3 p.c. und 4 p.c.). Im Morulastadium ist der IR mittels RT-PCR nicht nachweisbar, was nicht ausschließt, dass nicht doch eine minimale Anzahl von IR-Transkripten vorhanden ist, deren Menge unterhalb der methodischen Nachweisgrenze liegt (Navarrete Santos 2004a). Das Vorhandensein des IR-Proteins ist durch einen *Western Blot* an 6 Tage alten Blastozysten des Kaninchens nachgewiesen worden (Navarrete Santos 2004a).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass im Embryoblasten ausschließlich IR-A, im Trophoblasten beide IR-Isoformen exprimiert werden (Tabelle 5). Während der frühen Gastrulation der Kaninchenblastozyste am Tag 6 kommt es innerhalb eines Tages zur Abnahme der IR-RNA im Embryoblasten, während die Transkripte im Trophoblasten ansteigen. Differenzierungsabhängige Veränderungen des IR wurden bereits in Fibroblasten (3T3-L1, IM9) nachgewiesen. In beiden Zelllinien kommt es zu einer Zunahme der IR-Menge, wenn die Differenzierung zu Adipozyten oder Lymphozyten über Dexamethason-Gabe eingeleitet wurde (McDonald und Goldfine 1988; Kosaki und Webster 1993). Dabei änderte sich nicht nur die Quantität des IR, sondern es kommt auch zu einer Verschiebung in der Expression der IR-Isoformen A und B. In undifferenzierten Zellen wie embryonalen Zellen, fötalen Geweben, hämatopoetischen Zellen und Krebszellen ist IR-A die Hauptisoform (Sell 1994; Frasca 1999; Sciacca 1999; Vella 2001; Pandini 2002). Mit zunehmender Differenzierung geht die Expression von IR-A zurück und IR-B wird die vorrangige Isoform (Kosaki und Webster 1993; Frasca 1999). Die in Kaninchenblastozysten gezeigte Isoformenveränderung des IR bei frühen Gastrulationsstadien könnte durch die quantitative Zunahme des Rezeptors oder die Änderung des alternativen Spleiß-Vorganges bedingt sein. Diese Anpassung des Embryos ist vermutlich funktionell bedingt und könnte ein Stellglied in der Entwicklungskette bis zur Implantation sein, um wichtige metabolische Leistungen zu sichern.

**Tabelle 5** Expression (+) des IR/IGF-R-Systems in Embryoblast und Trophoblast von 6 Tage alten Kaninchenblastozysten. (keine Detektion = ---)

	Embryoblast			Trophoblast		
IR-A	+++	---	Insulin	---	+++	IR-A
IR-B	---				+	IR-B
IGF1-R	+++	+++	IGF1	+	+	IGF1-R
IGF2-R	+++	+++	IGF2	+	+++	IGF2-R

Aus der Zelltyp-spezifischen Expression der zwei Rezeptorvarianten lassen sich divergente Funktionen des IR in der Kaninchenblastozyste ableiten. Während in beiden Zelllinien mitogene Signale über IR-A aktiviert werden können, ist die metabolische Isoform B nur im Trophoblasten vorhanden. In adulten Geweben wurden spezifische Effekte bedingt durch die Isoform-Expression nachgewiesen (Leibiger 2001). Die Expression der IR-Isoformen wurde unter anderem in Kaninchen- (Navarrete Santos 2008), Ratten- (Goldstein und Dudley 1990; Serrano 2005), Schaf- (McGrattan 1998) und humanen Geweben beschrieben (Moller 1989). Vor allem in Insulin-sensitiven humanen Geweben wie Leber, Muskel und Adipozyten überwiegt die Isoform B und vermittelt Signale, die vorrangig metabolischer Natur sind. (Moller 1989; Sesti 1992; Kosaki 1995). In mitogenen Geweben dagegen überwiegt IR-A (Moller 1989; Sciacca 2003). Die divergierenden Insulinwirkungen sind abhängig von den 12 Aminosäuren des Exons 11. Diese sind ein spezifisches Leitmotiv einerseits für die Lokalisation der Isoformen in der Plasmamembran, andererseits für die Bindungsaffinitäten der Liganden (Uhles 2003). Die Mutation von zwei Aminosäuren im Bereich des Exon 11 führte zu einem Lokalisationswechsel und zu einer Funktionsänderung des IR-B. Die Funktion des IR ist daher eng mit seiner Lokalisation verknüpft.

#### 4.1.2 Expression und Lokalisation des IGF1-R

Der IGF1-R wird sowohl in embryonalen (Kaye 1997; Hardy und Spanos 2002) und fetalen (Fernandez 2007) als auch in adulten Geweben exprimiert. Die Verteilung des Rezeptors im humanen adulten Gewebe ist nahezu ubiquitär. In den Insulin-sensitiven Kaninchengeweben Leber, Pankreas und Skelettmuskel wird der Rezeptor nur in geringen Mengen exprimiert. In den Reproduktionsgeweben Ovar und Uterus, aber auch im Dünndarm fällt eine besonders

hohe IGF1-R-Transkriptmenge auf. Diese Gewebe, charakterisiert durch häufige Zellabstoßung und –neubildung, sind somit besonders sensitiv für die IGFs und deren proliferative und mitogene Eigenschaften.

Die Bedeutung des IGF1-R in der embryonalen Entwicklung wird durch Gen-*Knock-Out* Studien in Mäusen deutlich. Die Ausschaltung des Rezeptors führt zur deutlichen Wachstumsretardierung (um 55%) und zu multiplen Fehlbildungen. Kurz nach der Geburt sterben diese Mäuse auf Grund von respiratorischen Störungen (Liu 1993; Rother und Accili 2000). Der IGF1-R ist in beiden Zelllinien der Blastozyste detektierbar, wobei im Embryoblasten, im Vergleich zum Trophoblasten, die dreifach höhere Menge vorhanden ist (Tabelle 5). Diese spezifische Lokalisation lässt vermuten, dass die IGFs hauptsächlich im Embryoblasten ihre mitogenen Signalwirkungen entfalten.

#### **4.1.3 Expression und Lokalisation des IGF1-R während der Keimscheibenentwicklung**

Die frühe Gastrulationsphase, die beim Kaninchen noch vor der Implantation abläuft, kann in drei verschiedene Stadien eingeteilt werden, die auf gut erkennbaren morphologischen Veränderungen der Keimscheibe beruhen (Viebahn 1995). Während dieser frühen Phasen sind Veränderungen der IGF1-R-Expression beobachtbar. Während Stadium 1 und 3 annähernd gleiche Transkriptmengen in Embryoblast und Trophoblast zeigen, kommt es im Stadium 2 zu einer Zunahme der Rezeptormenge in beiden Zelllinien. Differenzierungen sind mit einer starken Veränderung des IGF1-R auf mRNA-Ebene verbunden. So kommt es in multipotenten Osteoblastzellen (Jia und Heersche 2002) und Osteosarkomzellen (Viereck 2007) während der Differenzierung zu einer Abnahme, und in Myoblasten (Tollefsen 1989) zu einer Zunahme der IGF1-R-RNA. Die Änderung der Rezeptor-Expression in der Kaninchenkeimscheibe im Stadium 2 ist begleitet von einer regionalen Veränderung. Die Lokalisation beschränkt sich exklusiv auf den Bereich des vorderen Randbogens (VRB) der Keimscheibe. Die beobachtete Konzentrierung des IGF1-R lässt einen Zusammenhang mit der von Viebahn und Co-Autoren (2002) beobachteten vermehrten Zellproliferation in diesem Bereich vermuten. Zellen aus dem VRB migrieren in den Bereich der posterioren Gastrulaextension (PGE), deren Zellen im Unterschied zum VRB kaum proliferieren. Dadurch kommt es zur Elongation der PGE und Ausbildung des Primitivstreifens (Viebahn 2002). Die Assoziation der IGF1-R-Lokalisation mit der vermehrten Proliferation im VRB lässt eine stadiengerechte Steuerung der Zellteilung und Migration dieser Zellen unter Beteiligung der IGFs vermuten. IGF1 ist in Säugerembryonen als Mediator proliferativer Prozesse bekannt (Paria und Dey 1990; Harvey und Kaye 1992; Lighten 1998; Martin 1998; Spanos 2000) und ist in Pankreas-, Endothel- sowie Krebszellen als Auslöser von

Zellmigration beschrieben worden (Grant 1987; Stracke 1989; Klemke 1994; Doerr und Jones 1996). Eine Stimulation von Nervenzellen mit IGF1 führt z.B. zum MAPK-vermittelten Auswachsen von Neuriten (Kim 1997) und zur Migration vaskulärer glatter Muskelzellen (Imai und Clemmons 1999).

#### 4.1.4 Expression des IGF2-R

IGF2 vermittelt seine mitogenen und proliferativen Effekte über den IGF1-R und IR-A. Wird IGF2 nicht in ausreichendem Maße degradiert, steigt die IGF2-Menge an und der IGF1-R wird mit letalen Folgen überstimuliert. Die Kontrolle des IGF2-Spiegels über seine Degradation erfolgt durch den IGF2-R (siehe Kapitel 1.3.5). IGF2-R-*Knock-Out*-Mäuse haben erhöhte IGF2-Konzentrationen und weisen eine erhöhte fetale Wachstumsrate um 40% auf (Lau 1994). Die Mäuse sterben perinatal auf Grund gravierender kardialer Fehlbildungen. Eine zusätzliche Reduktion des IGF1-R resultiert in normalem Wachstum (Rother und Accili 2000), was die Beteiligung des IGF1-R an den IGF2-Wirkungen experimentell belegt.

In Präimplantationsembryonen des Kaninchens ist das IGF2-R-Protein gleichmäßig auf beide Zelllinien der Blastozyste verteilt. IGF2-R-Transkripte sind jedoch im Embryoblasten zu 83%, im Trophoblasten nur zu 17% exprimiert. Diese Diskrepanz zwischen RNA-Expression und endgültiger Proteinmenge könnte durch eine Unterdrückung der RNA-Translation erklärbar sein. Bei *Drosophila melanogaster* wird die mRNA, die initial ubiquitär über den Embryo verteilt ist, später auf bestimmte Regionen beschränkt, in denen dann die RNA zu Protein umgesetzt wird (Bashirullah 1999). Dieser Proteinrestriktion liegt eine Repression der RNA-Translation zu Grunde (Bergsten und Gavis 1999).

Es gibt widersprüchliche Ergebnisse, ob und wie IGF2 über den IGF2-R wirkt. Es gibt Verfechter, die IGF2-induzierte Signale ausschließen (Roth 1988; Nielsen 1992), während andere Arbeitsgruppen IGF2-Signale, vermittelt über den IGF2-R, beschreiben (Kojima 1988; Minniti 1992; Ikezu 1995; McKinnon 2001). Ein IGF2-Analogen, das nur über den IGF2-R wirkt, verdünnte die Trophoblastschicht in der Plazenta. Dadurch verringerte sich die Diffusionsbarriere, was zum Anstieg der fetalen Aminosäurekonzentration und des Glukosetransfers zum Fetus führte (Sferruzzi-Perri 2008). Jedoch bestimmt die Konzentration des IGF2 seine Bindung und nachfolgende Signalwirkungen. Nur im pM-Bereich wirkt IGF2 über den IGF2-R, ansonsten über den IGF1-R (Mathieu 1990; Minniti 1992). Mit der gewählten IGF2-Konzentration von 13nM finden die in dieser Arbeit beobachteten Signaltransduktionen über den IGF1-R statt.

## 4.2 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf Präimplantationsembryonen

Der Verlust spezifischer Wachstumsfaktoren kann zu einer negativen Beeinflussung embryonalen Wachstums führen oder sogar letal sein. Embryonen von Mäusen, defizient für *leukaemia inhibitory factor* (LIF) oder *epidermal growth factor receptor* (EGF-R) implantieren nicht (Stewart 1992; Threadgill 1995). Nachkommen von Mäusen, denen *colony stimulating factor 1* (CSF-1) oder *transforming growth factor alpha* (TGF-alpha) fehlen, sind zwar in der Lage, ihre Präimplantationsentwicklung abzuschließen und zu implantieren, aber sie haben signifikant weniger Zellzahlen und eine gesteigerte Apoptoserate im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Pollard 1997; Brison und Schultz 1998). Doch auch das Überangebot von Wachstumsfaktoren (z.B. IGF1 bzw. IGF2) kann die Entwicklung des Embryos/Fetus nachhaltig beeinflussen und zum *Large Offspring Syndrom* (LOS) führen oder sich in Krankheiten wie Beckwith-Wiedemann oder Angelman-Syndrom äußern (Fleming 2004). Eine ausgewogene Balance zwischen Angebot und Nachfrage der Wachstumsfaktoren muss gegeben sein, um eine optimale Entwicklung der Nachkommen zu gewährleisten.

Wachstumsfaktoren werden dem Säugetierembryo im Uterus durch die Mutter zur Verfügung gestellt oder von ihm selbst produziert. Einige sind somit abhängig von der mütterlichen Produktion bzw. der biologisch wirksamen Menge im Eileiter und Uterus. Zu den vom Präimplantationsembryo selbst gebildeten Faktoren gehören unter anderem IGF1, IGF2, *epidermal growth factor* (EGF), *transforming growth factor* (TGF) und *platelet derived growth factor* (PDGF) (Hardy und Spanos 2002).

Zur ersten Gruppe, der von der Mutter zur Verfügung gestellten Faktoren, gehört das Insulin.

### 4.2.1 Expression und Lokalisation von Insulin in Blastozysten

Eine Anzahl von Nichtsäugern wie z.B. der Seeigel sind in der Lage, in der frühen Embryogenese Insulin zu produzieren (de Pablo 1988). Säugetierembryonen dagegen können Insulin nicht selbst erzeugen (Mensch; (Lighten 1997); Maus (Heyner 1989; Schultz 1992); Rind (Schultz 1992). Auch in der Kaninchenblastozyste ist kein Transkript für Insulin nachweisbar (Tabelle 5). Das Protein ist jedoch in Embryoblast- und Trophoblastzellen vorhanden. Im Verlauf einer *in vitro* Kultur ohne das Hormon kam es zu einer Verringerung des Proteins im Vergleich zu *in vivo* Embryonen. Kaninchenblastozysten sind somit in der Lage, Insulin aus dem Uterussektret der Mutter aufzunehmen und zu verbrauchen. Dass maternales Insulin aus Eileiter und Uterus dem Embryo durch Endozytose zur Verfügung gestellt wird, wurde bereits vor ca. 20 Jahren für Mausembryonen belegt (Heyner 1989; Schultz 1992).

Das aus dem Uterus endozytierte Insulin wirkt auf den Kaninchenembryo über den IR, der auf der Zelloberfläche der Blastozyste nachgewiesen wurde (Tabelle 5). Im Kaninchen wird am Tag 6.2 die Gastrulation initiiert, ein Prozess, der nur durch Insulin eingeleitet werden kann (Thieme 2007; Thieme 2008). Andererseits führt eine Behandlung von graviden Kaninchen, Ratten und Mäusen mit Insulin über einen längeren Zeitraum zu kongenitalen Veränderungen (Lichtenstein 1951; Chomette 1955; Smithberg und Runner 1963; Hannah und Moore 1971). Ein Überschuss und ein Mangel an Insulin sind entwicklungsschädigend. Insulin ist ein Hormon, dessen Konzentration bzw. Verfügbarkeit während der ganzen Pränatalzeit eng kontrolliert werden muss. Dies zeigen auch Nachkommen, die perinatal einer Hyperinsulinämie ausgesetzt wurden. Sie sind prädisponiert im späteren Leben an Übergewicht und diabetogenen Störungen zu erkranken (Aerts 1990; Doerner und Plagemann 1994; Kohlhoff 1997). Ein IR-KO führt zu Nachkommen, die im Wachstum verzögert sind (Taylor 1992; Accili 1995). Des Weiteren haben sie einen erhöhten Insulinspiegel, der, vermittelt über den IGF1-R, eine Hypoglykämie bedingt. Ein Insulinmangel jedoch, wie beim Diabetes mellitus Typ 1, hat eine Hyperglykämie zur Folge. Paradoxe Weise verursacht dies einen verminderten Glukosetransport, bedingt durch eine Verminderung von GLUTs, und einen Abfall intraembryonal verfügbarer Glukose. Die Folge ist eine erhöhte Apoptoserate, die Fehlbildungen an Embryonen von diabetischen Mäusen erklären kann (Moley 1996; Moley 1998a; Moley 1998b; Chi 2000).

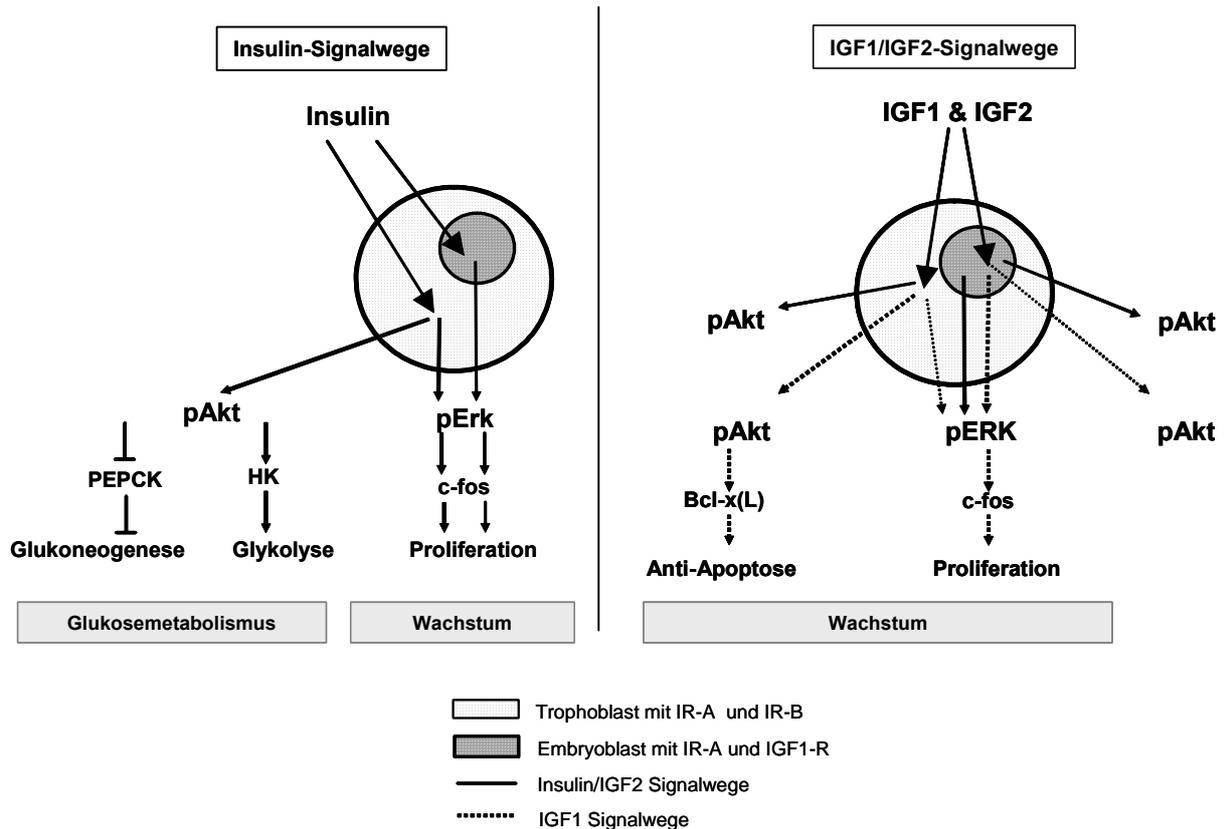
#### **4.2.2 Expression von IGF1 und IGF2 in Blastozysten**

Die IGFs regulieren Wachstum und Entwicklung während der Embryogenese und Differenzierung in vielen adulten Geweben (Sara und Hall 1990; Blakesley 1996; Scalia 2001). Zwergwuchs mit Skelett- und Muskelunterentwicklung wie z.B. beim Laron-Syndrom sind durch einen IGF1-Mangel bedingt, ausgelöst durch Deletionen im *Growth-Hormon* Rezeptorgen (Amselem 1989). IGF1-Null-Mäuse sind klein (~ 60% der Normalgröße) und sterben oft nach der Geburt. Die lebensfähigen sind stark geschädigt und leiden an Wachstumsverzögerungen, Entwicklungsdefekten in Organen wie Gehirn, Lunge, Knochen und Muskel, und sind infertil (Powell-Braxton 1993; Rother und Accili 2000; Butler und LeRoith 2001). IGF2-Null-Mäuse sind zwar lebensfähig und fertil, erreichen aber nur 60% der Normalgröße zum Zeitpunkt der Geburt (DeChiara 1990). In der postnatalen Periode wachsen sie jedoch normal, was auf eine vorrangige Rolle von IGF2 für intrauterines Wachstum schließen lässt (Baker 1993; Rother und Accili 2000). Ein Doppel-*Knock-Out* von IGF1 und IGF2 führt zu Nachkommen, die nur 30% der Normalgröße erreichen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die IGFs ab dem Morulastadium nachgewiesen. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass der Beginn der Expression bereits eher stattfindet, in frühere Stadien, die nicht untersucht wurden. Eine hohe Transkriptmenge wird in der sechs Tage alten Blastozyste gemessen, hauptsächlich im Embryoblasten (Tabelle 5). Das IGF1-Expressionsmuster in Präimplantationsembryonen ist Spezies-spezifisch. Das Transkript ist in Rinderembryonen ab der Oozyte nachweisbar (Watson 1992; Schultz 1993). In humanen Embryonen gibt es keine Eigensynthese von IGF1 (Lighten 1997). Widersprüchliche Daten gibt es zur Maus. Einerseits konnte in Mausembryonen keine IGF1-Transkription nachgewiesen werden (Schultz 1992), während andererseits eine Expression ab der Oozyte gezeigt wurde (Doherty 1994). IGF2 wird in bovinen und humanen Embryonen während der gesamten Präimplantationsphase gebildet, in der Maus ab dem 2-Zell-Stadium (Kaye 1997; Hardy und Spanos 2002). Die erwähnten Spezies unterscheiden sich im Implantationstyp und -zeitpunkt (Dey 2004) sowie der Morphologie und dem Beginn der Gastrulation. Dadurch bedingt sind unterschiedliche Ansprüche der Spezies an Menge und Art des Wachstumsfaktors, was sich im Zeitpunkt, an dem der Faktor ausgeschüttet wird, widerspiegelt.

### 4.3 Aktivierung von Signalwegen durch Insulin und die IGFs

Die Phosphorylierung der PI3-K- und MAPK-Signalkaskade wurde in dieser Arbeit nach Insulin- und IGF-Stimulationen untersucht und über die Expression von Zielgenen – c-fos, PEPCK, HK und Bcl-x(L) – weiterverfolgt. Die Signalkaskaden in der Kaninchenblastozyste, die auf den vorliegenden und früheren Studien basieren (Navarrete Santos 2004a; Navarrete Santos 2004b; Navarrete Santos 2008), sind in der Abbildung 41 zusammengefasst dargestellt.



**Abb. 41 Wirkung von Insulin und den IGFs in der Kaninchenblastozyste.**

Schematische Skizzierung der Rezeptoranordnung für die Insulinrezeptor-Isoform A (IR-A) und B (IR-B) sowie den *Insulin-like growth factor1*-Rezeptor (IGF1-R) in der 6 Tage alten Kaninchenblastozyste. Zusammengefasst sind die verschiedenen molekularen Effekte von Insulin und den IGFs auf Embryoblast und Trophoblast. Insulin reguliert die Proliferation und Trophoblast-spezifisch den Glukosemetabolismus. IGF1 wirkt hauptsächlich auf den Embryoblasten und induziert proliferative Effekte. Im Trophoblasten ist er für die Regulation der Apoptose zuständig. Auch IGF2 wirkt auf beide Zelllinien. Im Embryoblasten werden vorrangig MAPK/Erk-Signalwege aktiviert, im Trophoblasten die PI3-K/Akt-Signalkaskade.

### 4.3.1 Regulation von Wachstum durch IGF1 und IGF2

In Mausblastozysten ist die Transzytose maternalen IGFs durch den Trophoblasten zum Embryoblasten mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen belegt (Smith 1993; Kaye und Harvey 1995; Markham und Kaye 2003). Dabei ist der IGF1-R im Trophoblasten von Maus- und Rinderembryonen zytoplasmatisch lokalisiert (Schultz 1992; Markham und Kaye 2003). Dies deckt sich mit der Lokalisation im Kaninchen und führt zu der Annahme, dass der IGF1-R im Trophoblasten vorrangig für die Transzytose der IGFs verantwortlich ist, während er in der Keimscheibe deren mitogene Signale vermittelt. Dafür spricht auch die dominante Produktion der IGFs im Embryoblasten (Tabelle 5) und deren MAPK-abhängige Induktion von *c-fos* (Abb. 41, Tabelle 6). Die Phosphorylierung des IGF1-R durch IGF1 und IGF2 erfolgt ab einem  $EC_{50}$  von 1,6-2,4nM (Baker 1993; LeRoith 1995; Lighten 1998; Frasca 1999). An den IR dagegen binden sie erst ab einem  $EC_{50}$  über 20nM (Blakesley 1996; Frasca 1999; Denley 2004; Denley 2005). Die gewählten IGF-Konzentrationen von 1,3nM und 13nM für die *in vitro* Kultur liegen im optimalen Bereich für eine Liganden-spezifische Interaktion mit dem IGF1-R.

Eine Besonderheit von IGF2 ist seine hohe Affinität zur Isoform A des Insulinrezeptors, während IR-B nur sehr schwach auf eine Stimulation reagiert (Frasca 1999; Sciacca 2003; Denley 2004). Die  $EC_{50}$  liegen bei 2,0-3,4nM für IR-A und von >20nM für IR-B (Frasca 1999). Die Konzentration von 13nM IGF2 entspricht der Bindungskonzentration an IGF1-R und IR-A. Im Trophoblasten vom Kaninchen ist IR-A die vorrangige Isoform, im Embryoblasten sogar die einzige Form des IR. In Verbindung mit dem hohen Transkriptionsniveau von IGF2 im Embryoblasten spricht dies für einen autokrinen/parakrinen Signalweg über IR-A und IGF1-R, der das Wachstum vor allem im Embryoblasten reguliert (Abb. 41).

#### 4.3.2 Regulation von Wachstum und Glukosestoffwechsel durch Insulin

Die Kaninchenblastozyste nimmt mütterliches Insulin auf. Ausgehend vom charakteristischen Expressionsmuster der IR-Isoformen im Embryoblasten und Trophoblasten (Tabelle 5) leiten sich unterschiedliche Signalwirkungen des Insulins in den Zelllinien des Präimplantationsembryos ab. Das Wachstum wird in beiden Zelllinien induziert, jedoch zu einem höheren Maß im Trophoblasten. Die Wirkung von Insulin auf den mitogenen Signalweg korreliert mit der Expression des IR, insbesondere der Isoform A (Abb. 41, Tabelle 6). Die Autophosphorylierung von IR-A und IR-B durch Insulin liegt bei einer  $EC_{50}$  Konzentration von 0,6-0,8nM. An den IGF1-R dagegen bindet es erst ab einem  $EC_{50}$  von über 30nM (Frasca 1999). Die gewählte Konzentration von 17nM Insulin schließt somit eine Kreuzreaktion mit dem IGF1-R aus. Die Aktivierung des MAPK-Signalweges nach Insulinstimulation wurde bereits in Embryonen des Kaninchens (Navarrete Santos 2004b; Navarrete Santos 2008), der Maus (Wang 2004b) und des Rindes (Madan 2005) nachgewiesen. Auch die Insulin-bedingte Zunahme der Proliferation wurde in Präimplantationsembryonen beschrieben (Harvey und Kaye 1990; Herrler 1998). Die Ergebnisse im Kaninchen belegen, dass die Induktion der MAPK-Signalkaskade und des Transkriptionsfaktors c-fos ein Weg ist, über den Insulin seine proliferative Wirkung erzielen kann.

Der aktive PI3-K/Akt-Signalweg wurde in Mausblastozysten nachgewiesen. PI3-K und Akt werden ab dem 1-Zellstadium bis zum Blastozystenstadium exprimiert (Riley 2005). Nach Insulinstimulation erfolgt eine Glukoseaufnahme, die durch Zugabe eines PI3-K-Inhibitors blockiert werden konnte (Riley 2005). In kultivierten Kaninchenblastozysten ist in Gesamtembryonen zwar ein Anstieg, aber kein signifikant höheres phospho-Akt-Signal nachweisbar (Navarrete Santos 2004b). Die in dieser Arbeit getrennt durchgeführte Analyse von Embryoblast und Trophoblast ergibt eine signifikante Steigerung von phospho-Akt. Diese ist bei einer Gesamtembryoanalyse durch die relativ hohe Ausgangsmenge an phospho-Akt im unbehandelten Embryo nicht messbar, jedoch durch Insulin aktivierbar. Als Resultat werden Schlüsselenzyme der Glykolyse stimuliert und der Glukoneogenese inhibiert, und zwar ausschließlich im Trophoblasten (Abb. 41, Tabelle 6). Dieser spezifische Insulineffekt ist erklärbar durch die Anwesenheit der Isoform B im Trophoblasten, welche als Vermittler vorrangig metaboler Signalwege durch Insulin charakterisiert ist (Sciaccia 2003). Die PI3-K-abhängige HK/PEPCK- Transkription wurde bereits in Zelllinien beschrieben (Osawa 1996; Barthel und Schmoll 2003). Aus Arbeiten an Maus- und humanen Blastozysten ist die erhöhte HK-Transkription und Enzymaktivität bekannt (Martin 1993; Houghton 1996). Die

Aktivitätszunahme ist begründet durch die erhöhte Glukoseverwertung der Blastozyste über den Weg der Glykolyse (Leese 1993). Auch im Kaninchenembryo nimmt der Glukoseverbrauch ab dem Blastozystenstadium zu (Fridhandler 1961). In früheren Stadien wird die Energieversorgung des Embryos hauptsächlich über Pyruvat und Laktat gedeckt (Fridhandler 1961). Dabei nutzt der Kaninchenembryo anfangs vorrangig den Pentosephosphatweg und erst mit der Kompaktierung nimmt die Glykolyse zu. Die CO<sub>2</sub>-Produktion aus Glukose ist in den beiden Zelllinien Embryoblast und Trophoblast vergleichbar hoch (Robinson und Benos 1991). Der steigende Glukoseverbrauch der Blastozyste könnte mit der Vorbereitung der Blastozyste auf die Implantation zusammenhängen. Die Bereitstellung von Glukose über den Weg der Glukoneogenese ist ein denkbarer weiterer Mechanismus, um den eventuell steigenden Energiebedarf des Embryos zu diesem Zeitpunkt zu sichern. Dafür spricht die Expression des Schlüsselenzyms PEPCCK und dessen Regulation durch Insulin.

#### **4.3.3 Regulation von Bcl-x(L)**

Die Wirkung von Insulin und IGF1 als Gegenspieler des programmierten Zelltodes (Apoptose) wurde in Zelllinien (Raff 1992; Granerus 1995), in Embryonen des Kaninchens (Herrler 1998), des Menschen (Spanos 2000), der Maus (Brison 2000; Byrne 2002; Riley 2005) und des Rindes (Byrne 2002; Augustin 2003) beschrieben. Sie wirken über den PI3-K-Signalweg (Gluckman 1992; Rodriguez-Tarduchy 1992; Harrington 1994; Jurisicova 1998). Der Schutz vor Apoptose ist über die Inhibierung von Caspasen oder die Heraufregulation von DNA-Reparaturenzymen sowie über die Expression von anti-apoptotischen (Bcl-2, Bcl-x(L)) oder pro-apoptotischen Molekülen (BAD, Bax) denkbar. In neuronalen und hämatopoetischen Zelllinien wurde die Apoptose durch IGF1 über die Reduzierung von Bcl-2 verhindert (Singleton 1996; Minshall 1997). Des Weiteren erhöht IGF1 die Expression von Bcl-x(L)-mRNA und -Protein (Parrizas und LeRoith 1997; Leverrier 1999). In Kaninchenblastozysten wird das anti-apoptotische Bcl-x(L) in Trophoblastzellen nur durch IGF1 induziert (Abb. 41, Tabelle 6). Die anti-apoptotische Wirkung von Insulin ist in Präimplantationsembryonen jedoch bereits beschrieben worden (Herrler 1998; Augustin 2003), muss aber nicht über eine Transkriptänderung von Bcl-x(L) erfolgen (Augustin 2003). Denkbar ist, dass Insulin seinen regulativen Effekt über andere Moleküle ausübt. So wirken Insulin und IGF1 auch durch die Blockierung des pro-apoptotischen Moleküls BAD oder die Regulation von Bcl-2 und Bax (Datta 1997; Minshall 1997; Adams und Cory 1998; Jurisicova 1998; Tamatani 1998).

Nicht erklärt werden kann, warum IGF1 über den IGF1-R divergente Signalwirkungen in Embryoblast (Akt → ?) und Trophoblast (Akt → Bcl-x(L)) induziert. Ein Grund könnte die Einbeziehung verschiedener *downstream* Moleküle sein, wie es bereits für Insulin und IGF1 bekannt ist (Amoui 2001). Die Insulinrezeptorsubstrate (IRS) und Akt, zwei zentrale Moleküle der Signalkaskade von Insulin und IGF, werden in mehreren Isoformen exprimiert. Während IRS1 und Akt1 vorrangig mitogen wirken und *Knock-Outs* wachstumsretardiert sind (Tamemoto 1994; Chen 2001; Cho 2001b), hat Akt 2 eine metabolische Präferenz (Cho 2001a) und ein IRS2-*Knock-Out* entwickelt eine periphere Insulinresistenz (Withers 1998). Des Weiteren könnten verschiedene Tyrosinreste an den IRS phosphoryliert werden, wodurch in die weitere Signalkaskade verschiedene Moleküle einbezogen werden (Amoui 2001). Ein Auslöser könnte die Bildung von Hybrid-Rezeptoren sein, die die Signalwirkung der Liganden modulieren (siehe Kapitel 1.3.4). Denkbar wäre auch, dass durch Modifikationen bei der RNA-Translation des IGF1-R verschiedene Signalwege aktiviert werden (siehe Kapitel 1.3.3).

#### **4.4 Zusammenfassung: Aktivierung von Signalwegen nach Insulin-, IGF1- und IGF2-Stimulation**

Das komplexe Netzwerk von Insulin, IGF1, IGF2 sowie IR und IGF-R in Embryonen wurde in den letzten Jahren immer weiter entwirrt und offengelegt. In dieser Arbeit wurde erstmals die divergente Wirkung von Insulin und IGF1 in Embryoblast und Trophoblast beschrieben und die Aktivierung der Signalwege mit der Rezeptorausstattung korreliert (Abb. 41, Tabelle 6). Insulin ist der Mediator mitogener und metabolischer Signale. IGF1 und 2 dagegen vermitteln hauptsächlich mitogene proliferative Signale.

Im Embryoblasten werden vorrangig durch die IGFs der MAPK/Erk- und PI3-K/Akt-Signalweg aktiviert. In dieser Zelllinie wird über phospho-Erk der wachstumsfördernde Transkriptionsfaktor c-fos durch IGF2 induziert. Die Zielgene, die nach Akt-Phosphorylierung transkribiert werden, sind nicht bekannt, ausgeschlossen werden können jedoch PEPCK, HK und Bcl-x(L).

Im Trophoblasten war die Aktivierung des MAPK/Erk-Signalweges durch Insulin nachweisbar. Dies resultierte in einer Erhöhung der c-fos-Transkriptmenge, welche die im Embryoblasten weit übersteigt (Abb. 41, Tabelle 6). Die IGFs dagegen haben diesen Transkriptionsfaktor im Trophoblasten nur gering induziert. Diese Effekte werden über den IR-A und IGF1-R vermittelt.

Auch die PI3-K/Akt wird im Trophoblast aktiviert. Dies resultiert nach IGF1-Stimulation in anti-apoptotischen Prozessen, im Fall des Insulin in metabolischen Ereignissen. Dieser

Trophoblast-spezifische metabolische Effekte können mit der Expression des IR-B im Trophoblasten verknüpft werden. Damit stellt sich der Trophoblast als Gewebe dar, welches auf exogene und endogene Signale ansprechbar ist, um den Glukosemetabolismus zu regulieren.

Diese diffizile Regulation durch die Wachstumsfaktoren könnte begründet sein durch die entwicklungsbiologischen Funktionen, für die die Zelllinien der Blastozyste programmiert sind: Der Embryoblast besteht aus pluripotenten Zellen, die den späteren eigentlichen Embryo bilden. Er wird vom Trophoblasten umgeben, der sich in extraembryonale Gewebe differenziert, die für die Plazentation verantwortlich sind. Er schirmt die Zellen des Embryoblasten bis zur Implantation vom Uterusmilieu ab und reguliert die Zusammensetzung der Blastozystenflüssigkeit über transzellulären Transport (Borland 1977; Pampfer 2000). Damit ist er verantwortlich für die Zusammensetzung des Mikromilieus und Nährstoffreservoirs, dem der Embryoblast ausgesetzt ist. Auch Hexosen wie Glukose werden durch den Trophoblasten transportiert (Robinson 1990) und durch beide Zelllinien in gleichem Umfang verbraucht (Robinson und Benos 1991). Doch nur der Trophoblast, der für den Transport verantwortlich ist und in hohem Maße ATP produziert (Houghton 2006), ist die Zelllinie, die durch Insulin reguliert wird. Damit wird die Glukosehomöostase in der Blastozystenflüssigkeit gewährleistet und eine konstante Energieversorgung des Embryoblasten garantiert, um die weitere Entwicklung, wie die Gastrulation der Keimscheibe zu sichern.

**Tabelle 6** Überblick über die Aktivierung der IR/IGF1-R-Signalwege durch Insulin, IGF1 und IGF2 in der Kaninchenblastozyste. (n.b. = nicht bekannt)

		Rezeptor	Signalmolekül	Zielgen
Insulin	Em	IR-A	Erk	c-fos
			Akt	n.b.
	Tr	IR-A	Erk	<b>c-fos</b>
		IR-B	Akt	<b>PEPCK, HK</b>
		Rezeptor	Signalmolekül	Zielgen
IGF1	Em	IGF1-R	Erk	<b>c-fos</b>
			Akt	n.b.
	Tr	IGF1-R	Erk	c-fos
			Akt	Bcl-x(L)
		Rezeptor	Signalmolekül	Zielgen
IGF2	Em	IGF2-R	Erk	n.b.
			Akt	n.b.
	Tr	IGF2-R	Erk	n.b.
			Akt	n.b.

#### 4.5 Einfluss von Glukose auf die Blastozyste

Die Kultur von Mausembryonen in hohen Glukosekonzentrationen (52mM) hatte eine 7-fache Zunahme der intrazellulären Glukosemenge in der Blastozyste zur Folge (Moley 1996). Präimplantationsembryonen sind in der Lage, Schwankungen der Glukosekonzentrationen zu tolerieren, so lange sie sich in einem physiologischen Bereich bewegen. Dies zeigen Untersuchungen von Brison et al. (Brison 1993), in denen nach einer Kultur in Medium mit moderat hohen (5,5mM) und niedrigen Glukosekonzentrationen (1mM) normale Nachkommen zur Welt kamen. Schwankungen, die die Grenzen der eben genannten Glukosekonzentrationen überschreiten, führen jedoch zu Zelltod, Fehlbildungen oder Entwicklungsstillstand (Moley 1998a; Bavister 1999; Chi 2000; Leppens-Luisier 2001).

Ab dem Blastozystenstadium gewinnt die Energieversorgung des Embryos über Glukose immer mehr an Bedeutung (Leese und Barton 1984; Gardner und Leese 1986). Dabei spielt der glykolytische Signalweg und sein Schlüsselenzym Hexokinase (HK) eine entscheidende Rolle (Martin und Leese 1995). Zur Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase und zur Energiebereitstellung spielt neben dem Abbau von Glukose die Bereitstellung von Glukose eine zentrale Rolle. Diese wird im adulten Organismus durch die Glukoneogenese garantiert, die, als regulatorischer Gegenspieler der Glykolyse, Glukose zur Verfügung stellt. Eines der Schlüsselenzyme der Glukoneogenese, PEPCK, und das Enzym der Glykolyse, HK, werden vom Kaninchenembryo exprimiert. Beide werden in ihrer Transkriptmenge durch Glukose verändert. Mit steigenden Glukosekonzentrationen von 1mM, 10mM und 25mM sinkt die PEPCK-Transkription, während sich die HK-Expression erhöht. Der Kaninchenembryo ist in der Lage, sich an steigende Glukosekonzentrationen zu adaptieren. Die Erhöhung der Hexokinase ist durch das *Carbohydrate response element* (ChORE) denkbar. Dieses bindet den Transkriptionsfaktor *ChORE binding protein* (ChREBP). Dieser Prozess wird unter niedrigen Glukosekonzentrationen inhibiert (Li 2008). Bei hohen Glukosekonzentrationen wird diese Inhibierung aufgehoben und die transkriptionellen Regulationen von Signalwegen der Lipogenese und Glykolyse durch ChREBP können stattfinden (Foufelle 1998; Meugnier 2007). Ein Mechanismus der PEPCK-Reduzierung könnte die Regulation des Transkriptionsfaktors FoxO1 durch Glukose sein. Eine Kultur von Mausinsulinoma-Zellen in steigender Glukosemenge bis 25mM führte zur Phosphorylierung von FoxO1 und zur Translokation vom Kern ins Zytoplasma. Diese Translokation hatte einen Stopp der PEPCK-Transkription zur Folge (Martinez 2006).

Auch Insulin bewirkt in adulten Zellen über FoxO1 die Reduktion der PEPCK-Menge und die Hemmung der Glukoneogenese (Barthel und Schmoll 2003). Die Kultur von Blastozysten in 1

und 10mM Glukose mit Zugabe von Insulin führt zur Abnahme der PEPCK-Menge und Zunahme der Hexokinasemenge. Unter 25mM Glukose sind bei beiden Schlüsselenzymen keine signifikanten Veränderungen nach Insulingabe zu verzeichnen, weder bei der PEPCK noch der HK. Diese verminderte Insulinsensitivität unter hohen Glukosekonzentrationen könnte begründet sein durch die Reduktion der IR- und IGF1-R-Expression um ca. 40%. In Zelllinien wurde gezeigt, dass in Kultur mit hohen Glukosekonzentrationen die Kinaseaktivität des IR erniedrigt ist (Berti 1994; Ide 1994). Hohe Glukosekonzentrationen bewirken eine Aktivierung von Proteinkinase C (PKC), welche eine Serin/Threonin-Phosphorylierung des IR und IRS1 zur Folge hatte. Dadurch war die Kinaseaktivität des Rezeptors vermindert und die Signaltransduktion in Richtung IRS1 und PI3-K unterbrochen (Nelson 2002). Dies legt den Schluss nahe, dass neben niedrigen IR-Mengen, der Verlust der Insulinsensitivität mit unterbrochener Signalkaskade ein endokriner Regulationsmechanismus bei Kaninchenblastozysten ist. Diese Regulation war bisher nicht bekannt. Unter diabetischen Entwicklungsbedingungen kann dem eine große entwicklungspathologische Bedeutung zukommen. Dies betrifft die frühe Embryonalentwicklung und die Gastrulation. Entwicklungszeiten und -stadien, in denen der Mutter häufig ihre Schwangerschaft noch gar nicht bekannt ist.

## 5 Zusammenfassung

Der Säugetierembryo kann sich innerhalb bestimmter Toleranzgrenzen an die Nähr- und Wirkstoffkonzentration im Uterusmilieu oder in einer *in vitro* Kultur adaptieren. Die molekularen Prozesse, die diese Adaptation ermöglichen, haben nach derzeitigen Kenntnisstand längerfristige Auswirkungen auf die fetale und postnatale Entwicklung. Eine mögliche Folge der Anpassung des Embryos an pathophysiologische Entwicklungsbedingungen *in utero* ist die Prädisposition für Stoffwechselerkrankungen im Erwachsenenalter (Barkerthese). Eine sensible Phase für die Determinierung von Zellen und Geweben – auch in Hinsicht auf den zellulären Stoffwechsel – ist die Präimplantationszeit, insbesondere die Differenzierung von Embryoblast und Trophoblast im Verlaufe der Blastozystenbildung und -entwicklung. Wichtige relevante Stellglieder in dieser Phase der Embryonalentwicklung sind Stoffwechsel-regulierende Hormone und Wachstumsfaktoren wie Insulin und die *Insulin-like-growth-factors* (IGFs) sowie das Glukoseangebot.

Das Anliegen der vorliegenden Arbeit kann in vier Zielstellungen unterteilt werden. Zuerst wurde die Expression und Lokalisation von Insulin, IGF1, IGF2 und deren Rezeptoren in Embryoblast und Trophoblast untersucht, gefolgt von der Analyse der Aktivierung von Signalwegen (MAPK/Erk, PI3-K/Akt) nach Insulin- oder IGF-Stimulation. Als funktionelle Endpunkte wurden die Auswirkungen dieser Stimulation auf die Expression von Genen, die für die Regulation von Proliferation (c-fos), Glukosemetabolismus (PEPCK, HK) oder Apoptose (Bcl-x(L)) wichtig sind, bestimmt. Schließlich wurde die Anpassung der Blastozyste an veränderte Glukosekonzentrationen auf molekularer Ebene untersucht.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

### **IGF1 und IGF2 sind Wachstumsfaktoren des Embryoblasten**

IGF1 und IGF2 und die IGF-Rezeptoren werden hauptsächlich im Embryoblasten exprimiert. Dies spricht für auto- und parakrine Regulationswege des IGF-Systems in dieser Zelllinie. Der IGF1-R ist im Embryoblasten in der Zellmembran lokalisiert, im Trophoblasten hingegen hauptsächlich im Zytoplasma. Durch Stimulation mit den IGFs werden der MAPK/Erk-Signalweg und das mitogene Zielgen c-fos vor allem im Embryoblasten induziert. Der Trophoblast ist vorrangig für den Transport der IGFs verantwortlich.

### **Die Expression und Lokalisation des IGF1-R in der Keimscheibe ist abhängig vom Gastrulationsstadium**

Im Gastrulationsstadium 2 kommt es in der Keimscheibe zu einer kurzzeitigen Zunahme der IGF1-R-Transkription. Diese ist begleitet von einer Verschiebung der Lokalisation der

IGF1-R positiven Zellen vom gesamten Embryoblasten auf den Bereich des vorderen Randbogens (VRB). Dies steht wahrscheinlich im Dienst einer vermehrten Zellbildung im VRB, von dem aus die Zellen anschließend in den posterioren Bereich der Keimscheibe (posteriore Gastrulaextension, PGE) migrieren.

### **Insulin wirkt als Wachstumsfaktor und als Trophoblast-spezifischer Regulator des Glukosemetabolismus**

Insulin wird nicht von der Kaninchenblastozyste exprimiert, wird jedoch aus dem Uterussekret der Mutter aufgenommen. Der Insulinrezeptor ist im Embryoblasten und Trophoblasten in der Zellmembran nachweisbar.

In 6 Tage alten *in vivo* Blastozysten ist IR-A die Hauptisoform des Insulinrezeptors und wird sowohl im Embryoblasten als auch im Trophoblasten exprimiert. Über diese Isoform induziert Insulin das mitogene Zielgen c-fos.

Ausschließlich im Trophoblasten reguliert Insulin den Glukosemetabolismus. Dies korreliert mit der Expression der Isoform B des IR, welche nur im Trophoblasten der Kaninchenblastozyste nachweisbar ist.

### **Glukose reguliert transkriptionell ihren eigenen Metabolismus**

Der Embryo ist Glukose-sensitiv und reagiert auf variierende Glukosekonzentrationen mit einer Adaptation der Transkription des glykolytischen (HK) oder glukoneogenetischen (PEPCK) Schlüsselenzyms. Steigende Glukosewerte erhöhen die HK-RNA und senken die PEPCK-Transkriptmenge. Hohe Glukosekonzentrationen verringern die Insulinsensitivität der Kaninchenblastozyste.

In der vorliegenden Arbeit konnte in der Kaninchenblastozyste eine Zelllinien-spezifisch unterschiedliche Wirkung von Insulin und den IGFs nachgewiesen werden.

Die erzielten Ergebnisse dienen der weiteren Aufklärung der Regulationsmechanismen von Hormonen und Wachstumsfaktoren während der embryonalen Frühentwicklung. Entwicklungsverzögerungen und Embryopathien sind Folgen gestörter Funktionen der Gewebe, die sich aus den beiden Zelllinien der Blastozyste ableiten. Die vorliegende Arbeit zeigt am Beispiel der Kaninchenblastozyste, dass Insulin, IGF und Glukose die Blastozyste spezifisch beeinflussen. Übertragen auf den Menschen heißt das, dass bereits in einer frühen Phase der Ontogenese der Grundstock für die fetale und postnatale Entwicklung des Embryos gelegt wird – in einer Phase, in der den meisten Frauen ihre Schwangerschaft noch gar nicht bekannt ist.

## 5 Summary

The process of blastocyst formation leads to the differentiation of the first embryonic cell lineages embryoblast (ICM) and trophoblast. These cells are the origin of all tissues and organs of the body. During blastocyst formation and development many molecular processes proceed in closest proximity and subtle timely order within a tiny area and short time window. They are controlled, amongst others, by maternal hormones like insulin and the insulin-like growth factors (IGFs). Also the supply with nutrients, especially of glucose, is critical for embryo development. Interruption of these signalling networks may result in deleterious molecular, metabolic and/or developmental dysregulations and to spontaneous abortions and congenital malformations. A potential result of embryo adjustment to pathophysiological developmental conditions *in utero* is the predisposition for metabolic diseases in adult life (Barker these of “Foetal origins of adult diseases”).

In the rabbit blastocyst, separated in embryoblast and trophoblast, expression and localisation of insulin, IGF1, IGF2 and their receptors was studied, followed by the analysis of receptor signal transduction (MAPK/Erk, PI3-K/Akt) after insulin and IGF stimulation. As functional endpoints, marker genes were investigated which are involved in the regulation of growth (c-fos), glucose metabolism (PEPCK; HK) or apoptosis (Bcl-x(L)). Finally, the adaptation of the rabbit blastocyst to various glucose concentrations was examined.

The results can be summarised as follows:

### **IGF1 and IGF2 are the growth factors of the embryoblast**

IGF1, IGF2 and their receptors are mainly expressed in the embryoblast. In this cell lineage the IGF1-R is located in the cell membrane and the IGFs stimulated the activation of MAPK/Erk pathway and c-fos. In the trophoblast IGF1-R is mainly located in the cytoplasm and seems to be responsible for the transcellular transport of the IGFs.

### **Expression and localisation of IGF1-R in the embryoblast depends on the stage of gastrulation**

In stage 2 of gastrulation IGF1-R transcription is transiently enhanced in the embryoblast. This is accompanied by a restriction of the receptor to the cells of the anterior marginal crescent (AMC). In the AMC the receptor most likely mediates cell proliferation and, subsequently, migration of AMC cells to the posterior region of the embryonic disc (posterior gastrula extension, PGE).

**Insulin acts as a growth factor and trophoblast-specific regulator of glucose metabolism**

Insulin is not expressed by the rabbit blastocyst but is absorbed from the uterine fluid. The IR is located in the cell membranes of embryoblast and trophoblast.

In day 6 *in vivo* blastocysts IR-A is the main isoform of the IR and is expressed in embryoblast and trophoblast cells. Insulin induced the mitogenic transcription factor c-fos most likely by isoform A.

Insulin regulates the glucose metabolism solely in the trophoblast. This correlates well with the restricted expression of IR-B, which is detectable only in trophoblast cells of the rabbit blastocyst.

**Glucose regulates its own metabolism via transcriptional changes**

The embryo is glucose sensitive and reacts to variations in glucose concentration with transcriptional adaptation of glycolytic (hexokinase, HK) or gluconeogenic (phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK) key enzymes. Rising glucose concentrations increased HK RNA and decreased the transcription of PEPCK. High glucose concentrations reduced the insulin sensitivity of the rabbit blastocyst.

Vital for embryo growth and development are adequate endocrine and paracrine regulation and access to metabolic substrates. The few days of preimplantation embryo development are extremely sensitive to hormonal dysregulation and changes in the supply of nutrients. The present work shows specific effects of insulin, IGFs and glucose on the two cell lineages of the blastocyst. It is likely that metabolic factors do not influence only immediate events during preimplantation embryo development, like blastocyst morphogenesis, but also the fetal and postnatal phenotype. Thus, prenatal developmental conditions and metabolic factors can predispose for pathophysiological alterations later in life. Due to this impact on pre- and postnatal embryo development the stage of preimplantation needs special attention.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abbott AM;Bueno R;Pedrini MT;Murray JM;Smith RJ. 1992. Insulin-like growth factor I receptor gene structure. *J Biol Chem* 267(15):10759-10763.
- Accili D. 1995. Molecular defects of the insulin receptor gene. *Diabetes Metab Rev* 11(1):47-62.
- Adams JM;Cory S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281(5381):1322-1326.
- Adams TE;Epa VC;Garrett TP;Ward CW. 2000. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci* 57(7):1050-1093.
- Aerts L;Holemans K;van Assche F. 1990. Maternal diabetes during pregnancy: consequences for the offspring. *Diab Metab Rev* 6:147-167.
- Alexandrides TK;Chen JH;Bueno R;Giorgino F;Smith RJ. 1993. Evidence for two insulin-like growth factor I receptors with distinct primary structure that are differentially expressed during development. *Regul Pept* 48(1-2):279-290.
- Alexandrides TK;Smith RJ. 1989. A novel fetal insulin-like growth factor (IGF) I receptor. Mechanism for increased IGF I- and insulin-stimulated tyrosine kinase activity in fetal muscle. *J Biol Chem* 264(22):12922-12930.
- Allan GJ;Flint DJ;Patel K. 2001. Insulin-like growth factor axis during embryonic development. *Reproduction* 122(1):31-39.
- Alliston CW;Pardee NR. 1973. Variability of embryonic development in the rabbit at 19 to 168 hours after mating. *Lab Anim Sci* 23(5):665-670.
- Amoui M;Craddock BP;Miller WT. 2001. Differential phosphorylation of IRS-1 by insulin and insulin-like growth factor I receptors in Chinese hamster ovary cells. *J Endocrinol* 171(1):153-162.
- Amselem S;Duquesnoy P;Attree O;Novelli G;Bousnina S;Postel-Vinay MC;Goossens M. 1989. Laron dwarfism and mutations of the growth hormone-receptor gene. *N Engl J Med* 321(15):989-995.
- Ashton IK;Dorman TL;Pocock AE;Turner RC;Bron AJ. 1983. Plasma somatomedin activity and diabetic retinopathy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 19(1):105-110.
- Augustin R;Pocar P;Wrenzycki C;Niemann H;Fischer B. 2003. Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced in vitro. *Reproduction* 126(1):91-99.
- Bach LA;Headey SJ;Norton RS. 2005. IGF-binding proteins--the pieces are falling into place. *Trends Endocrinol Metab* 16(5):228-234.
- Baillyes EM;Nave BT;Soos MA;Orr SR;Hayward AC;Siddle K. 1997. Insulin receptor/IGF-I receptor hybrids are widely distributed in mammalian tissues: quantification of individual receptor species by selective immunoprecipitation and immunoblotting. *Biochem J* 327 ( Pt 1):209-215.
- Baker J;Liu JP;Robertson EJ;Efstratiadis A. 1993. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 75(1):73-82.
- Barthel A;Schmoll D. 2003. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(4):E685-692.
- Baserga R;Hongo A;Rubini M;Prisco M;Valentinis B. 1997a. The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1332(3):F105-126.
- Baserga R;Resnicoff M;D'Ambrosio C;Valentinis B. 1997b. The role of the IGF-I receptor in apoptosis. *Vitam Horm* 53:65-98.
- Bashirullah A;Halsell SR;Cooperstock RL;Kloc M;Karaiskakis A;Fisher WW;Fu W;Hamilton JK;Etkin LD;Lipshitz HD. 1999. Joint action of two RNA degradation pathways controls the timing of maternal transcript elimination at the midblastula transition in *Drosophila melanogaster*. *Embo J* 18(9):2610-2620.
- Baudry A;Lamothe B;Bucchini D;Jami J;Montarras D;Pinset C;Joshi RL. 2001. IGF-1 receptor as an alternative receptor for metabolic signaling in insulin receptor-deficient muscle cells. *FEBS Lett* 488(3):174-178.
- Bavister BD. 1999. Glucose and culture of human embryos. *Fertil Steril* 72(2):233-234.
- Belfiore A;Pandini G;Vella V;Squatrito S;Vigneri R. 1999. Insulin/IGF-I hybrid receptors play a major role in IGF-I signaling in thyroid cancer. *Biochimie* 81(4):403-407.

- Bellacosa A;Franke TF;Gonzalez-Portal ME;Datta K;Taguchi T;Gardner J;Cheng JQ;Testa JR;Tsichlis PN. 1993. Structure, expression and chromosomal mapping of c-akt: relationship to v-akt and its implications. *Oncogene* 8(3):745-754.
- Bergsten SE;Gavis ER. 1999. Role for mRNA localization in translational activation but not spatial restriction of nanos RNA. *Development* 126(4):659-669.
- Bernier M;Kole HK;Montrose-Rafizadeh C;Kole S. 2000. Discrete region of the insulin receptor carboxyl terminus plays key role in insulin action. *J Cell Biochem* 78(1):160-169.
- Berti L;Mosthaf L;Kroder G;Kellerer M;Tippmer S;Mushack J;Seffer E;Seedorf K;Haring H. 1994. Glucose-induced translocation of protein kinase C isoforms in rat-1 fibroblasts is paralleled by inhibition of the insulin receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 269(5):3381-3386.
- Blakesley VA;Scrimgeour A;Esposito D;Le Roith D. 1996. Signaling via the insulin-like growth factor-I receptor: does it differ from insulin receptor signaling? *Cytokine Growth Factor Rev* 7(2):153-159.
- Bondy C;Werner H;Roberts CT, Jr.;LeRoith D. 1992. Cellular pattern of type-I insulin-like growth factor receptor gene expression during maturation of the rat brain: comparison with insulin-like growth factors I and II. *Neuroscience* 46(4):909-923.
- Bondy CA;Werner H;Roberts CT, Jr.;LeRoith D. 1990. Cellular pattern of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and type I IGF receptor gene expression in early organogenesis: comparison with IGF-II gene expression. *Mol Endocrinol* 4(9):1386-1398.
- Borland RM;Biggers JD;Lechene CP. 1977. Studies on the composition and formation of mouse blastocoele fluid using electron probe microanalysis. *Dev Biol* 55(1):1-8.
- Bövinger BG. 1963. Implantationsmechanismen. In: Hartmann CC, editor. Conference on physiological mechanism concerned with conception. Oxford, London, New York, Paris: Pergamon Verlag. pp 321-396.
- Brison DR. 2000. Apoptosis in mammalian preimplantation embryos: regulation by survival factors. *Hum Fertil (Camb)* 3(1):36-47.
- Brison DR;Hewitson LC;Leese HJ. 1993. Glucose, pyruvate, and lactate concentrations in the blastocoel cavity of rat and mouse embryos. *Mol Reprod Dev* 35(3):227-232.
- Brison DR;Leese HJ. 1994. Blastocoel cavity formation by preimplantation rat embryos in the presence of cyanide and other inhibitors of oxidative phosphorylation. *J Reprod Fertil* 101(2):305-309.
- Brison DR;Schultz RM. 1998. Increased incidence of apoptosis in transforming growth factor alpha-deficient mouse blastocysts. *Biol Reprod* 59(1):136-144.
- Brown J;Delaine C;Zaccheo OJ;Siebold C;Gilbert RJ;van Boxel G;Denley A;Wallace JC;Hassan AB;Forbes BE;Jones EY. 2008. Structure and functional analysis of the IGF-II/IGF2R interaction. *Embo J* 27(1):265-276.
- Brunet-Simon A;Henrion G;Renard JP;Duranton V. 2001. Onset of zygotic transcription and maternal transcript legacy in the rabbit embryo. *Mol Reprod Dev* 58(2):127-136.
- Butler AA;LeRoith D. 2001. Minireview: tissue-specific versus generalized gene targeting of the *igf1* and *igf1r* genes and their roles in insulin-like growth factor physiology. *Endocrinology* 142(5):1685-1688.
- Byrne AT;Southgate J;Brison DR;Leese HJ. 2002. Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. *Mol Reprod Dev* 62(4):489-495.
- Cadigan KM;Nusse R. 1997. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 11(24):3286-3305.
- Casslen B;Nilsson B. 1984. Human uterine fluid, examined in undiluted samples for osmolarity and the concentrations of inorganic ions, albumin, glucose, and urea. *Am J Obstet Gynecol* 150(7):877-881.
- Chao W;D'Amore PA. 2008. IGF2: Epigenetic regulation and role in development and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 19(2):111-120.
- Chen WS;Xu PZ;Gottlob K;Chen ML;Sokol K;Shiyanova T;Roninson I;Weng W;Suzuki R;Tobe K;Kadowaki T;Hay N. 2001. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the *Akt1* gene. *Genes Dev* 15(17):2203-2208.
- Chi MM;Pingsterhaus J;Carayannopoulos M;Moley KH. 2000. Decreased glucose transporter expression triggers BAX-dependent apoptosis in the murine blastocyst. *J Biol Chem* 275(51):40252-40257.

- Cho H;Mu J;Kim JK;Thorvaldsen JL;Chu Q;Crenshaw EB, 3rd;Kaestner KH;Bartolomei MS;Shulman GI;Birnbaum MJ. 2001a. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* 292(5522):1728-1731.
- Cho H;Thorvaldsen JL;Chu Q;Feng F;Birnbaum MJ. 2001b. Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem* 276(42):38349-38352.
- Chomette G. 1955. Entwicklungsstörungen nach Insulinschock beim trächtigen Kaninchen. *Beitr Path Anat* 115(3):439-451.
- Clemmons DR;Van Wyk JJ. 1984. Factors controlling blood concentration of somatomedin C. *Clin Endocrinol Metab* 13(1):113-143.
- Collins JE;Fleming TP. 1995. Epithelial differentiation in the mouse preimplantation embryo: making adhesive cell contacts for the first time. *Trends Biochem Sci* 20(8):307-312.
- Condorelli G;Buono R;Smith RJ. 1994. Two alternatively spliced forms of the human insulin-like growth factor I receptor have distinct biological activities and internalization kinetics. *J Biol Chem* 269(11):8510-8516.
- Condorelli L;Smith RJ. 1993. Two alternatively spliced forms of the IGF-1 receptor have distinct biological activities and internalization kinetics. *Exp Clin Endocrinol* 101:95-97.
- Copeland KC;Underwood LE;Van Wyk JJ. 1980. Induction of immunoreactive somatomedin C human serum by growth hormone: dose-response relationships and effect on chromatographic profiles. *J Clin Endocrinol Metab* 50(4):690-697.
- Cormier S;Vandormael-Pournin S;Babinet C;Cohen-Tannoudji M. 2004. Developmental expression of the Notch signaling pathway genes during mouse preimplantation development. *Gene Expr Patterns* 4(6):713-717.
- Czech MP. 1982. Structural and functional homologies in the receptors for insulin and the insulin-like growth factors. *Cell* 31(1):8-10.
- Dahms NM;Hancock MK. 2002. P-type lectins. *Biochim Biophys Acta* 1572(2-3):317-340.
- Dan-Goor M;Sasson S;Davashvili A;Almagor M. 1997. Expression of glucose transporter and glucose uptake in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod* 12(11):2508-2510.
- Daniel JC, Jr. 1965. Studies on the Growth of 5-Day-Old Rabbit Blastocysts in Vitro. *J Embryol Exp Morphol* 13:83-95.
- Daniel JCJ. 1964. Early growth of rabbit trophoblast. *The American Naturalist* 98(899):85-98.
- Daoud G;Amyot M;Rassart E;Masse A;Simoneau L;Lafond J. 2005. ERK1/2 and p38 regulate trophoblasts differentiation in human term placenta. *J Physiol* 566(Pt 2):409-423.
- Datta SR;Dudek H;Tao X;Masters S;Fu H;Gotoh Y;Greenberg ME. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91(2):231-241.
- Daughaday WH. 2000. Growth hormone axis overview--somatomedin hypothesis. *Pediatr Nephrol* 14(7):537-540.
- Daughaday WH;Rotwein P. 1989. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev* 10(1):68-91.
- De Meyts P;Palsgaard J;Sajid W;Theede AM;Aladdin H. 2004. Structural biology of insulin and IGF-1 receptors. *Novartis Found Symp* 262:160-171; discussion 171-166, 265-168.
- de Pablo F;Chambers SA;Ota A. 1988. Insulin-related molecules and insulin effects in the sea urchin embryo. *Dev Biol* 130(1):304-310.
- DeChiara TM;Efstratiadis A;Robertson EJ. 1990. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 345(6270):78-80.
- del Peso L;Gonzalez-Garcia M;Page C;Herrera R;Nunez G. 1997. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278(5338):687-689.
- Delafontaine P. 1998. Growth factors and vascular smooth muscle cell growth responses. *Eur Heart J* 19 Suppl G:G18-22.
- Denker HW. 1977. The role of proteinases, and blockage of implantation by proteinase inhibitors. Berlin: Springer Verlag.
- Denker HW;Gerdes HJ. 1979. The dynamic structure of rabbit blastocyst coverings. I. Transformation during regular preimplantation development. *Anat Embryol (Berl)* 157(1):15-34.

- Denley A;Bonython ER;Booker GW;Cosgrove LJ;Forbes BE;Ward CW;Wallace JC. 2004. Structural determinants for high-affinity binding of insulin-like growth factor II to insulin receptor (IR)-A, the exon 11 minus isoform of the IR. *Mol Endocrinol* 18(10):2502-2512.
- Denley A;Cosgrove LJ;Booker GW;Wallace JC;Forbes BE. 2005. Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine Growth Factor Rev* 16(4-5):421-439.
- Dey SK;Lim H;Das SK;Reese J;Paria BC;Daikoku T;Wang H. 2004. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev* 25(3):341-373.
- D'Mello SR;Borodezt K;Soltoff SP. 1997. Insulin-like growth factor and potassium depolarization maintain neuronal survival by distinct pathways: possible involvement of PI 3-kinase in IGF-1 signaling. *J Neurosci* 17(5):1548-1560.
- Doerner G;Plagemann A. 1994. Perinatal hyperinsulinism as possible predisposing factor for diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life. *Horm Metab Res* 26:213-221.
- Doerr ME;Jones JI. 1996. The roles of integrins and extracellular matrix proteins in the insulin-like growth factor I-stimulated chemotaxis of human breast cancer cells. *J Biol Chem* 271(5):2443-2447.
- Doherty AS;Temeles GL;Schultz RM. 1994. Temporal pattern of IGF-I expression during mouse preimplantation embryogenesis. *Mol Reprod Dev* 37(1):21-26.
- Donnay I;Leese HJ. 1999. Embryo metabolism during the expansion of the bovine blastocyst. *Mol Reprod Dev* 53(2):171-178.
- Duan C. 2002. Specifying the cellular responses to IGF signals: roles of IGF-binding proteins. *J Endocrinol* 175(1):41-54.
- Duckworth WC;Bennett RG;Hamel FG. 1998. Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev* 19(5):608-624.
- Dufresnes E;Vanderheyden I;Robin D;Delcourt J;Pampfer S;De Hertogh R. 1993. Glucose and pyruvate metabolism in preimplantation blastocysts from normal and diabetic rats. *J Reprod Fertil* 98(1):169-177.
- Ebina Y;Ellis L;Jarnagin K;Edery M;Graf L;Clauser E;Ou JH;Masiarz F;Kan YW;Goldfine ID;et al. 1985. The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell* 40(4):747-758.
- Eriksson UJ;Borg LA;Forsberg H;Styrud J. 1991. Diabetic embryopathy. Studies with animal and in vitro models. *Diabetes* 40 Suppl 2:94-98.
- Feener EP;Shiba T;Hu KQ;Wilden PA;White MF;King GL. 1994. Characterization of phorbol ester-stimulated serine phosphorylation of the human insulin receptor. *Biochem J* 303 ( Pt 1):43-50.
- Fernandez E;Martin MA;Fajardo S;Escriva F;Alvarez C. 2007. Increased IRS-2 content and activation of IGF-I pathway contribute to enhance beta-cell mass in fetuses from undernourished pregnant rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292(1):E187-195.
- Fernandez-Serra M;Consales C;Livigni A;Arnone MI. 2004. Role of the ERK-mediated signaling pathway in mesenchyme formation and differentiation in the sea urchin embryo. *Dev Biol* 268(2):384-402.
- Field SJ;Johnson RS;Mortensen RM;Papaioannou VE;Spiegelman BM;Greenberg ME. 1992. Growth and differentiation of embryonic stem cells that lack an intact c-fos gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(19):9306-9310.
- Fischer B. 1987. Development retardation in cultured preimplantation rabbit embryos. *J Reprod Fertil* 79(1):115-123.
- Fischer B;Bavister BD. 1993. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil* 99(2):673-679.
- Fischer B;Mootz U;Denker HW;Lambertz M;Beier HM. 1991. The dynamic structure of rabbit blastocyst coverings. III. Transformation of coverings under non-physiological developmental conditions. *Anat Embryol (Berl)* 183(1):17-27.
- Fischer B;Navarrete Santos A. 2003. Glukose, Glukosetransporter und Insulin: Bedeutung und Weichenstellung in der frühen Embryonalentwicklung und für Wachstum und Entwicklung. *Reproduktionsbiologie* 19:195-201.
- Fleming TP;Ghassemifar MR;Sheth B. 2000. Junctional complexes in the early mammalian embryo. *Semin Reprod Med* 18(2):185-193.
- Fleming TP;Kwong WY;Porter R;Ursell E;Fesenko I;Wilkins A;Miller DJ;Watkins AJ;Eckert JJ. 2004. The embryo and its future. *Biol Reprod* 71(4):1046-1054.

- Flood MR;Wiebold JL. 1988. Glucose metabolism by preimplantation pig embryos. *J Reprod Fertil* 84(1):7-12.
- Foufelle F;Girard J;Ferre P. 1998. Glucose regulation of gene expression. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1(4):323-328.
- Fowden AL. 2003. The insulin-like growth factors and feto-placental growth. *Placenta* 24(8-9):803-812.
- Franke TF;Kaplan DR;Cantley LC. 1997. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 88(4):435-437.
- Frasca F;Pandini G;Scalia P;Sciacca L;Mineo R;Costantino A;Goldfine ID;Belfiore A;Vigneri R. 1999. Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol* 19(5):3278-3288.
- Frattali AL;Pessin JE. 1993. Relationship between alpha subunit ligand occupancy and beta subunit autophosphorylation in insulin/insulin-like growth factor-1 hybrid receptors. *J Biol Chem* 268(10):7393-7400.
- Fridhandler L. 1961. Pathways of glucose metabolism in fertilized rabbit ova at various pre-implantation stages. *Exp Cell Res* 22:303-316.
- Furlanetto RW;Underwood LE;Van Wyk JJ;D'Ercole AJ. 1977. Estimation of somatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay. *J Clin Invest* 60(3):648-657.
- Gagnon A;Dods P;Roustan-Delattour N;Chen CS;Sorisky A. 2001. Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate is required for insulin-like growth factor 1-mediated survival of 3T3-L1 preadipocytes. *Endocrinology* 142(1):205-212.
- Gallaher BW;Oliver MH;Eichhorn K;Kessler U;Kiess W;Harding JE;Gluckman PD;Breier BH. 1994. Circulating insulin-like growth factor II/mannose-6-phosphate receptor and insulin-like growth factor binding proteins in fetal sheep plasma are regulated by glucose and insulin. *Eur J Endocrinol* 131(4):398-404.
- Gardner DK;Lane M;Batt P. 1993. Uptake and metabolism of pyruvate and glucose by individual sheep preattachment embryos developed in vivo. *Mol Reprod Dev* 36(3):313-319.
- Gardner DK;Lane M;Calderon I;Leeton J. 1996. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril* 65(2):349-353.
- Gardner DK;Leese HJ. 1986. Non-invasive measurement of nutrient uptake by single cultured pre-implantation mouse embryos. *Hum Reprod* 1(1):25-27.
- Gardner DK;Leese HJ. 1988. The role of glucose and pyruvate transport in regulating nutrient utilization by preimplantation mouse embryos. *Development* 104(3):423-429.
- Garofalo RS;Barenton B. 1992. Functional and immunological distinction between insulin-like growth factor 1 receptor subtypes in KB cells. *J Biol Chem* 276:11470-11475.
- Garofalo RS;Rosen OM. 1989. Insulin and insulinlike growth factor 1 (IGF-1) receptors during central nervous system development: expression of two immunologically distinct IGF-1 receptor beta subunits. *Mol Cell Biol* 9(7):2806-2817.
- Gebert G;Thomas C. 1992. *Endokrines System*. Stuttgart, New York: Schattauer.
- Gelato MC;Rutherford C;Stark RI;Daniel SS. 1989. The insulin-like growth factor II/mannose-6-phosphate receptor is present in fetal and maternal sheep serum. *Endocrinology* 124(6):2935-2943.
- Ghosh P;Dahms NM;Kornfeld S. 2003. Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(3):202-212.
- Gluckman P;Klempt N;Guan J;Mallard C;Sirimanne E;Dragunow M;Klempt M;Singh K;Williams C;Nikolics K. 1992. A role for IGF-1 in the rescue of CNS neurons following hypoxic-ischemic injury. *Biochem Biophys Res Commun* 182(2):593-599.
- Gluckman PD. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins. In: Hanson MA, Spencer JAD, Rodeck CH, editors. *Fetus and Neonate*. Cambridge: Cambridge University Press. pp 97-116.
- Gluckman PD;Butler JH. 1983. Parturition-related changes in insulin-like growth factors-I and -II in the perinatal lamb. *J Endocrinol* 99(2):223-232.

- Goldberg AC;Trivedi B;Delmez JA;Harter HR;Daughaday WH. 1982. Uremia reduces serum insulin-like growth factor I, increases insulin-like growth factor II, and modifies their serum protein binding. *J Clin Endocrinol Metab* 55(6):1040-1045.
- Goldstein BJ;Dudley AL. 1990. The rat insulin receptor: primary structure and conservation of tissue-specific alternative messenger RNA splicing. *Mol Endocrinol* 4(2):235-244.
- Gottschewski GHM;Zimmermann W. 1973. Embryonalentwicklung des Hauskaninchens, Normogenese und Teratogenese. Hannover: M&H Sharper Verlag.
- Granerus M;Schofield P;Bierke P;Engstrom W. 1995. Growth factors and apoptosis in development. The role of insulin like growth factor I and TGFbeta1 in regulating cell growth and cell death in a human teratocarcinoma derived cell line. *Int J Dev Biol* 39(5):759-764.
- Grant M;Jerdan J;Merimee TJ. 1987. Insulin-like growth factor-I modulates endothelial cell chemotaxis. *J Clin Endocrinol Metab* 65(2):370-371.
- Greenstein B;Raue F. 1996. Endokrinologie. Berlin, Wien: Blackwell Wissenschaftsverlag.
- Haig D;Graham C. 1991. Genomic imprinting and the strange case of the insulin-like growth factor II receptor. *Cell* 64(6):1045-1046.
- Han VK;Carter AM. 2000. Spatial and temporal patterns of expression of messenger RNA for insulin-like growth factors and their binding proteins in the placenta of man and laboratory animals. *Placenta* 21(4):289-305.
- Hannah R;Moore K. 1971. Effects of fasting and insulin on skeletal development in rats. *Teratology* 4(2):135-139.
- Hardy K;Spanos S. 2002. Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. *J Endocrinol* 172(2):221-236.
- Harrington EA;Bennett MR;Fanidi A;Evan GI. 1994. c-Myc-induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines. *Embo J* 13(14):3286-3295.
- Harvey MB;Kaye PL. 1990. Insulin increases the cell number of the inner cell mass and stimulates morphological development of mouse blastocysts in vitro. *Development* 110(3):963-967.
- Harvey MB;Kaye PL. 1992. Insulin-like growth factor-1 stimulates growth of mouse preimplantation embryos in vitro. *Mol Reprod Dev* 31(3):195-199.
- Hensen V. 1876. Beobachtungen über die Befruchtung und Entwicklung des Kaninchens und des Meerschweinchens. *Anat Entwickl Gesch* 1:213-273, 353-432.
- Herrler A;Krusche CA;Beier HM. 1998. Insulin and insulin-like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. *Biol Reprod* 59(6):1302-1310.
- Heyner S;Rao LV;Jarett L;Smith RM. 1989. Preimplantation mouse embryos internalize maternal insulin via receptor-mediated endocytosis: pattern of uptake and functional correlations. *Dev Biol* 134(1):48-58.
- Houghton FD. 2006. Energy metabolism of the inner cell mass and trophectoderm of the mouse blastocyst. *Differentiation* 74(1):11-18.
- Houghton FD;Sheth B;Moran B;Leese HJ;Fleming TP. 1996. Expression and activity of hexokinase in the early mouse embryo. *Mol Hum Reprod* 2(10):793-798.
- Hürter P. 1997. Langerhans-Inseln des Pankreas. In: Stolecke H, editor. *Endokrinologie des Kindes- und Jugendalters*. 3 ed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer. pp 231-252.
- Ide R;Maegawa H;Kikkawa R;Shigeta Y;Kashiwagi A. 1994. High glucose condition activates protein tyrosine phosphatases and deactivates insulin receptor function in insulin-sensitive rat 1 fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 201(1):71-77.
- Idkowiak J;Weisheit G;Plitzner J;Viebahn C. 2004a. Hypoblast controls mesoderm generation and axial patterning in the gastrulating rabbit embryo. *Dev Genes Evol* 214(12):591-605.
- Idkowiak J;Weisheit G;Viebahn C. 2004b. Polarity in the rabbit embryo. *Semin Cell Dev Biol* 15(5):607-617.
- Ikezu T;Okamoto T;Giambarella U;Yokota T;Nishimoto I. 1995. In vivo coupling of insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor to heteromeric G proteins. Distinct roles of cytoplasmic domains and signal sequestration by the receptor. *J Biol Chem* 270(49):29224-29228.
- Imai Y;Clemmons DR. 1999. Roles of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways in stimulation of vascular smooth muscle cell migration and deoxyribonucleic acid synthesis by insulin-like growth factor-I. *Endocrinology* 140(9):4228-4235.

- Iranmanesh A;Veldhuis JD. 1992. Clinical pathophysiology of the somatotropic (GH) axis in adults. *Endocrinol Metab Clin North Am* 21(4):783-816.
- Jia D;Heersche JN. 2002. Expression of insulin-like growth factor system constituents in differentiating rat osteoblastic cell populations. *Growth Horm IGF Res* 12(6):399-410.
- Johnson MT;Mahmood S;Patel MS. 2003. Intermediary metabolism and energetics during murine early embryogenesis. *J Biol Chem* 278(34):31457-31460.
- Jones JJ;Clemmons DR. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 16(1):3-34.
- Jungheim ES;Moley KH. 2008. The impact of type 1 and type 2 diabetes mellitus on the oocyte and the preimplantation embryo. *Semin Reprod Med* 26(2):186-195.
- Juriscova A;Latham KE;Casper RF;Varmuza SL. 1998. Expression and regulation of genes associated with cell death during murine preimplantation embryo development. *Mol Reprod Dev* 51(3):243-253.
- Kasuya J;Paz IB;Maddux BA;Goldfine ID;Hefta SA;Fujita-Yamaguchi Y. 1993. Characterization of human placental insulin-like growth factor-I/insulin hybrid receptors by protein microsequencing and purification. *Biochemistry* 32(49):13531-13536.
- Katagiri S;Moon YS;Yuen BH. 1996. The role for the uterine insulin-like growth factor I in early embryonic loss after superovulation in the rat. *Fertil Steril* 65(2):426-436.
- Kaye PL. 1997. Preimplantation growth factor physiology. *Rev Reprod* 2(2):121-127.
- Kaye PL;Harvey MB. 1995. The role of growth factors in preimplantation development. *Prog Growth Factor Res* 6(1):1-24.
- Kellerer M;Lammers R;Ermel B;Tippmer S;Vogt B;Obermaier-Kusser B;Ullrich A;Haring HU. 1992. Distinct alpha-subunit structures of human insulin receptor A and B variants determine differences in tyrosine kinase activities. *Biochemistry* 31(19):4588-4596.
- Khurana NK;Niemann H. 2000. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biol Reprod* 62(4):847-856.
- Kiess W. 1993. Diabetes mellitus im Kindesalter. In: Kruse K, editor. *Pädiatrische Endokrinologie*. Stuttgart: Ferdinand Enke. pp 188-223.
- Kiess W;Blickenstaff GD;Sklar MM;Thomas CL;Nissley SP;Sahagian GG. 1988. Biochemical evidence that the type II insulin-like growth factor receptor is identical to the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* 263(19):9339-9344.
- Kim B;Leventhal PS;Saltiel AR;Feldman EL. 1997. Insulin-like growth factor-I-mediated neurite outgrowth in vitro requires mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 272(34):21268-21273.
- Kleinjung J. 1996. *Insulin-Rezeptor Wechselwirkungen [Dissertation]*. Aachen: RWTH.
- Klemke RL;Yebra M;Bayna EM;Cheresh DA. 1994. Receptor tyrosine kinase signaling required for integrin alpha v beta 5-directed cell motility but not adhesion on vitronectin. *J Cell Biol* 127(3):859-866.
- Kohlhoff R;Harder T;Plagemann A;Rohdo W;Doerner G. 1997. Observations on body weight and metabolism in newborn infants of mothers with different types of diabetes during pregnancy. *Endocrine Regulations* 31:73-78.
- Kojima I;Nishimoto I;Iiri T;Ogata E;Rosenfeld R. 1988. Evidence that type II insulin-like growth factor receptor is coupled to calcium gating system. *Biochem Biophys Res Commun* 154(1):9-19.
- Kosaki A;Pillay TS;Xu L;Webster NJ. 1995. The B isoform of the insulin receptor signals more efficiently than the A isoform in HepG2 cells. *J Biol Chem* 270(35):20816-20823.
- Kosaki A;Webster NJ. 1993. Effect of dexamethasone on the alternative splicing of the insulin receptor mRNA and insulin action in HepG2 hepatoma cells. *J Biol Chem* 268(29):21990-21996.
- Kulik G;Klippel A;Weber MJ. 1997. Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol Cell Biol* 17(3):1595-1606.
- Kulik G;Weber MJ. 1998. Akt-dependent and -independent survival signaling pathways utilized by insulin-like growth factor I. *Mol Cell Biol* 18(11):6711-6718.

- Kwong WY;Miller DJ;Ursell E;Wild AE;Wilkins AP;Osmond C;Anthony FW;Fleming TP. 2006. Imprinted gene expression in the rat embryo-fetal axis is altered in response to periconceptional maternal low protein diet. *Reproduction* 132(2):265-277.
- Kwong WY;Wild AE;Roberts P;Willis AC;Fleming TP. 2000. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development* 127(19):4195-4202.
- Langley-Evans SC. 1997. Hypertension induced by foetal exposure to a maternal low-protein diet, in the rat, is prevented by pharmacological blockade of maternal glucocorticoid synthesis. *J Hypertens* 15(5):537-544.
- Lau MM;Stewart CE;Liu Z;Bhatt H;Rotwein P;Stewart CL. 1994. Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. *Genes Dev* 8(24):2953-2963.
- Lee J;Pilch PF. 1994. The insulin receptor: structure, function, and signaling. *Am J Physiol* 266(2 Pt 1):C319-334.
- Lee JE;Pintar J;Efstratiadis A. 1990. Pattern of the insulin-like growth factor II gene expression during early mouse embryogenesis. *Development* 110(1):151-159.
- Leese HJ. 1989. Energy metabolism of the blastocyst and uterus at implantation. In: Yoshinaga K, editor. *Blastocyst implantation*. New York: Adams. pp 39-44.
- Leese HJ;Barton AM. 1984. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *J Reprod Fertil* 72(1):9-13.
- Leese HJ;Conaghan J;Martin KL;Hardy K. 1993. Early human embryo metabolism. *Bioessays* 15(4):259-264.
- Leibiger B;Leibiger IB;Moede T;Kemper S;Kulkarni RN;Kahn CR;de Vargas LM;Berggren PO. 2001. Selective insulin signaling through A and B insulin receptors regulates transcription of insulin and glucokinase genes in pancreatic beta cells. *Mol Cell* 7(3):559-570.
- Leppens-Luisier G;Urner F;Sakkas D. 2001. Facilitated glucose transporters play a crucial role throughout mouse preimplantation embryo development. *Hum Reprod* 16(6):1229-1236.
- LeRoith D;Werner H;Beitner-Johnson D;Roberts CT, Jr. 1995. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 16(2):143-163.
- Leverrier Y;Thomas J;Mathieu AL;Low W;Blanquier B;Marvel J. 1999. Role of PI3-kinase in Bcl-X induction and apoptosis inhibition mediated by IL-3 or IGF-1 in Baf-3 cells. *Cell Death Differ* 6(3):290-296.
- Li J;Gilmour RS;Saunders JC;Dauncey MJ;Fowden AL. 1999. Activation of the adult mode of ovine growth hormone receptor gene expression by cortisol during late fetal development. *Faseb J* 13(3):545-552.
- Li MV;Chen W;Poungvarin N;Imamura M;Chan L. 2008. Glucose-mediated transactivation of carbohydrate response element-binding protein requires cooperative actions from Mondo conserved regions and essential trans-acting factor 14-3-3. *Mol Endocrinol* 22(7):1658-1672.
- Lichtenstein H;Guest G;Warkany J. 1951. Abnormalities in offspring of white rats given protamine zinc insulin during pregnancy. *Proc Soc Exp Biol Med* 78:398-402.
- 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(2):134-139.
- Lighten AD;Moore GE;Winston RM;Hardy K. 1998. Routine addition of human insulin-like growth factor-I ligand could benefit clinical in-vitro fertilization culture. *Hum Reprod* 13(11):3144-3150.
- Linnemann M KM. 1999. *Biochemie für Mediziner*. Braunschweig/Wiesbaden: Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH.
- Liu F;Roth RA. 1994. Identification of serines-967/968 in the juxtamembrane region of the insulin receptor as insulin-stimulated phosphorylation sites. *Biochem J* 298 ( Pt 2):471-477.
- 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(1):59-72.
- Lobel P;Dahms NM;Kornfeld S. 1988. Cloning and sequence analysis of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* 263(5):2563-2570.

- Lowe WL, Jr.;Lasky SR;LeRoith D;Roberts CT, Jr. 1988. Distribution and regulation of rat insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acids encoding alternative carboxyterminal E-peptides: evidence for differential processing and regulation in liver. *Mol Endocrinol* 2(6):528-535.
- Lucas MJ;Leveno KJ;Williams ML;Raskin P;Whalley PJ. 1989. Early pregnancy glycosylated hemoglobin, severity of diabetes, and fetal malformations. *Am J Obstet Gynecol* 161(2):426-431.
- Luna AM;Wilson DM;Wibbelsman CJ;Brown RC;Nagashima RJ;Hintz RL;Rosenfeld RG. 1983. Somatomedins in adolescence: a cross-sectional study of the effect of puberty on plasma insulin-like growth factor I and II levels. *J Clin Endocrinol Metab* 57(2):268-271.
- Lutwak-Mann C. 1962. Glucose, lactic acid and bicarbonate in rabbit blastocyst fluid. *Nature* 193:653-654.
- Macaulay VM. 1992. Insulin-like growth factors and cancer. *Br J Cancer* 65(3):311-320.
- Madan P;Calder MD;Watson AJ. 2005. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) blockade of bovine preimplantation embryogenesis requires inhibition of both p38 and extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathways. *Reproduction* 130(1):41-51.
- Mallinson JE;Sculley DV;Craigon J;Plant R;Langley-Evans SC;Brameld JM. 2007. Fetal exposure to a maternal low-protein diet during mid-gestation results in muscle-specific effects on fibre type composition in young rats. *Br J Nutr* 98(2):292-299.
- Markham KE;Kaye PL. 2003. Growth hormone, insulin-like growth factor I and cell proliferation in the mouse blastocyst. *Reproduction* 125(3):327-336.
- Martin KL;Barlow DH;Sargent IL. 1998. Heparin-binding epidermal growth factor significantly improves human blastocyst development and hatching in serum-free medium. *Hum Reprod* 13(6):1645-1652.
- Martin KL;Hardy K;Winston RM;Leese HJ. 1993. Activity of enzymes of energy metabolism in single human preimplantation embryos. *J Reprod Fertil* 99(1):259-266.
- Martin KL;Leese HJ. 1995. Role of glucose in mouse preimplantation embryo development. *Mol Reprod Dev* 40(4):436-443.
- Martin KL;Leese HJ. 1999. Role of developmental factors in the switch from pyruvate to glucose as the major exogenous energy substrate in the preimplantation mouse embryo. *Reprod Fertil Dev* 11(7-8):425-433.
- Martinez SC;Cras-Meneur C;Bernal-Mizrachi E;Permutt MA. 2006. Glucose regulates Foxo1 through insulin receptor signaling in the pancreatic islet beta-cell. *Diabetes* 55(6):1581-1591.
- Mathews LS;Norstedt G;Palmiter RD. 1986. Regulation of insulin-like growth factor I gene expression by growth hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(24):9343-9347.
- Mathieu M;Rochefort H;Barenton B;Prebois C;Vignon F. 1990. Interactions of cathepsin-D and insulin-like growth factor-II (IGF-II) on the IGF-II/mannose-6-phosphate receptor in human breast cancer cells and possible consequences on mitogenic activity of IGF-II. *Mol Endocrinol* 4(9):1327-1335.
- Maurer RR. 1978. Advances in rabbit embryo culture. In: Daniel JC, Jr., editor. *Methods in mammalian reproduction*. New York: Academic Press. pp 259-272.
- McCubrey JA;Steelman LS;Mayo MW;Algate PA;Dellow RA;Kaleko M. 1991. Growth-promoting effects of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on hematopoietic cells: overexpression of introduced IGF-1 receptor abrogates interleukin-3 dependency of murine factor-dependent cells by a ligand-dependent mechanism. *Blood* 78(4):921-929.
- McDonald AR;Goldfine ID. 1988. Glucocorticoid regulation of insulin receptor gene transcription in IM-9 cultured lymphocytes. *J Clin Invest* 81(2):499-504.
- McGrattan PD;Wylie AR;Bjourson AJ. 1998. A partial cDNA sequence of the ovine insulin receptor gene: evidence for alternative splicing of an exon 11 region and for tissue-specific regulation of receptor isoform expression in sheep muscle, adipose tissue and liver. *J Endocrinol* 159(3):381-387.
- McKinnon T;Chakraborty C;Gleeson LM;Chidiac P;Lala PK. 2001. Stimulation of human extravillous trophoblast migration by IGF-II is mediated by IGF type 2 receptor involving inhibitory G protein(s) and phosphorylation of MAPK. *J Clin Endocrinol Metab* 86(8):3665-3674.
- Memili E;Dominko T;First NL. 1998. Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 51(1):36-41.

- Mesiano S;Young IR;Baxter RC;Hintz RL;Browne CA;Thorburn GD. 1987. Effect of hypophysectomy with and without thyroxine replacement on growth and circulating concentrations of insulin-like growth factors I and II in the fetal lamb. *Endocrinology* 120(5):1821-1830.
- Meugnier E;Rome S;Vidal H. 2007. Regulation of gene expression by glucose. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10(4):518-522.
- Minniti CP;Kohn EC;Grubb JH;Sly WS;Oh Y;Muller HL;Rosenfeld RG;Helman LJ. 1992. The insulin-like growth factor II (IGF-II)/mannose 6-phosphate receptor mediates IGF-II-induced motility in human rhabdomyosarcoma cells. *J Biol Chem* 267(13):9000-9004.
- Minshall C;Arkins S;Straza J;Conners J;Dantzer R;Freund GG;Kelley KW. 1997. IL-4 and insulin-like growth factor-I inhibit the decline in Bcl-2 and promote the survival of IL-3-deprived myeloid progenitors. *J Immunol* 159(3):1225-1232.
- Miodovnik M;Mimouni F;Tsang RC;Ammar E;Kaplan L;Siddiqi TA. 1986. Glycemic control and spontaneous abortion in insulin-dependent diabetic women. *Obstet Gynecol* 68(3):366-369.
- Moley KH;Chi MM;Knudson CM;Korsmeyer SJ;Mueckler MM. 1998a. Hyperglycemia induces apoptosis in pre-implantation embryos through cell death effector pathways. *Nat Med* 4(12):1421-1424.
- Moley KH;Chi MM;Manchester JK;McDougal DB;Lowry OH. 1996. Alterations of intraembryonic metabolites in preimplantation mouse embryos exposed to elevated concentrations of glucose: a metabolic explanation for the developmental retardation seen in preimplantation embryos from diabetic animals. *Biol Reprod* 54(6):1209-1216.
- Moley KH;Chi MM;Mueckler MM. 1998b. Maternal hyperglycemia alters glucose transport and utilization in mouse preimplantation embryos. *Am J Physiol* 275(1 Pt 1):E38-47.
- Moller DE;Yokota A;Caro JF;Flier JS. 1989. Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man. *Mol Endocrinol* 3(8):1263-1269.
- Mootz U. 1979. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an der implantationsbereiten Blastozyste des Kaninchens. *Verh Anat Ges* 73:435-444.
- Morgan DO;Edman JC;Standring DN;Fried VA;Smith MC;Roth RA;Rutter WJ. 1987. Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature* 329(6137):301-307.
- Morgan PM;Kane MT. 1993. Protein content of rabbit embryos: one cell to peri-implantation blastocyst. *J Reprod Fertil* 97(1):101-106.
- Moss AM;Livingston JN. 1993. Distinct beta-subunits are present in hybrid insulin-like-growth-factor-I receptors in the central nervous system. *Biochem J* 294 ( Pt 3):685-692.
- Mosthaf L;Grako K;Dull TJ;Coussens L;Ullrich A;McClain DA. 1990. Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing. *Embo J* 9(8):2409-2413.
- Mudgett JS;Ding J;Guh-Siesel L;Chartrain NA;Yang L;Gopal S;Shen MM. 2000. Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(19):10454-10459.
- Murphy LJ;Bell GI;Duckworth ML;Friesen HG. 1987. Identification, characterization, and regulation of a rat complementary deoxyribonucleic acid which encodes insulin-like growth factor-I. *Endocrinology* 121(2):684-691.
- Murray-Rust J;McLeod AN;Blundell TL;Wood SP. 1992. Structure and evolution of insulins: implications for receptor binding. *Bioessays* 14(5):325-331.
- Myers MG, Jr.;White MF. 1996. Insulin signal transduction and the IRS proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:615-658.
- Navarrete Santos A;Ramin N;Tonack S;Fischer B. 2008. Cell lineage-specific signaling of insulin and insulin-like growth factor I in rabbit blastocysts. *Endocrinology* 149(2):515-524.
- Navarrete Santos A;Tonack S;Kirstein M;Kietz S;Fischer B. 2004a. Two insulin-responsive glucose transporter isoforms and the insulin receptor are developmentally expressed in rabbit preimplantation embryos. *Reproduction* 128(5):503-516.
- Navarrete Santos A;Tonack S;Kirstein M;Pantaleon M;Kaye P;Fischer B. 2004b. Insulin acts via mitogen-activated protein kinase phosphorylation in rabbit blastocysts. *Reproduction* 128(5):517-526.
- Nelson BA;Robinson KA;Buse MG. 2002. Defective Akt activation is associated with glucose- but not glucosamine-induced insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282(3):E497-506.

- Nielsen FC. 1992. The molecular and cellular biology of insulin-like growth factor II. *Prog Growth Factor Res* 4(3):257-290.
- Oates AJ;Schumaker LM;Jenkins SB;Pearce AA;DaCosta SA;Arun B;Ellis MJ. 1998. The mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor (M6P/IGF2R), a putative breast tumor suppressor gene. *Breast Cancer Res Treat* 47(3):269-281.
- O'Dell SD;Day IN. 1998. Insulin-like growth factor II (IGF-II). *Int J Biochem Cell Biol* 30(7):767-771.
- Osawa H;Sutherland C;Robey RB;Printz RL;Granner DK. 1996. Analysis of the signaling pathway involved in the regulation of hexokinase II gene transcription by insulin. *J Biol Chem* 271(28):16690-16694.
- Oshima A;Nolan CM;Kyle JW;Grubb JH;Sly WS. 1988. The human cation-independent mannose 6-phosphate receptor. Cloning and sequence of the full-length cDNA and expression of functional receptor in COS cells. *J Biol Chem* 263(5):2553-2562.
- Pampfer S. 2000. Apoptosis in rodent peri-implantation embryos: differential susceptibility of inner cell mass and trophoblast cell lineages--a review. *Placenta* 21 Suppl A:S3-10.
- Pampfer S;de Hertogh R;Vanderheyden I;Michiels B;Vercheval M. 1990. Decreased inner cell mass proportion in blastocysts from diabetic rats. *Diabetes* 39(4):471-476.
- Pandini G;Frasca F;Mineo R;Sciaccia 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(42):39684-39695.
- 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(7):1935-1944.
- Papa V;Gliozzo B;Clark GM;McGuire WL;Moore D;Fujita-Yamaguchi Y;Vigneri R;Goldfine ID;Pezzino V. 1993. Insulin-like growth factor-I receptors are overexpressed and predict a low risk in human breast cancer. *Cancer Res* 53(16):3736-3740.
- Papa V;Pezzino V;Costantino A;Belfiore A;Giuffrida D;Frittitta L;Vannelli GB;Brand R;Goldfine ID;Vigneri R. 1990. Elevated insulin receptor content in human breast cancer. *J Clin Invest* 86(5):1503-1510.
- Paria BC;Dey SK. 1990. Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(12):4756-4760.
- Parrizas M;LeRoith D. 1997. Insulin-like growth factor-1 inhibition of apoptosis is associated with increased expression of the bcl-xL gene product. *Endocrinology* 138(3):1355-1358.
- Pearson DW;Kernaghan D;Lee R;Penney GC. 2007. The relationship between pre-pregnancy care and early pregnancy loss, major congenital anomaly or perinatal death in type I diabetes mellitus. *Bjog* 114(1):104-107.
- Pfaffl M. 2004. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 1.
- Pike IL. 1981. Comparative studies of embryo metabolism in early pregnancy. *J Reprod Fertil Suppl* 29:203-213.
- Pinto AB;Schlein AL;Moley KH. 2002. Preimplantation exposure to high insulin-like growth factor I concentrations results in increased resorption rates in vivo. *Hum Reprod* 17(2):457-462.
- Pollard JW. 1997. Role of colony-stimulating factor-1 in reproduction and development. *Mol Reprod Dev* 46(1):54-60; discussion 60-51.
- 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(12B):2609-2617.
- Raff MC. 1992. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356(6368):397-400.
- Ranke MB;Blum WF;Bierich JR. 1988. Clinical relevance of serum measurements of insulin-like growth factors and somatomedin binding proteins. *Acta Paediatr Scand Suppl* 347:114-126.
- 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(6):939-952.
- Rauber. 1875. Die erste Entwicklung des Kaninchens. *Sitzungsber Naturfor Gesell Leipzig* 10:103-109.

- Reece EA;Eriksson UJ. 1996. The pathogenesis of diabetes-associated congenital malformations. *Obstet Gynecol Clin North Am* 23(1):29-45.
- Resnicoff M;Abraham D;Yutanawiboonchai W;Rotman HL;Kajstura J;Rubin R;Zoltick P;Baserga R. 1995a. The insulin-like growth factor I receptor protects tumor cells from apoptosis in vivo. *Cancer Res* 55(11):2463-2469.
- Resnicoff M;Burgaud JL;Rotman HL;Abraham D;Baserga R. 1995b. Correlation between apoptosis, tumorigenesis, and levels of insulin-like growth factor I receptors. *Cancer Res* 55(17):3739-3741.
- Riley JK;Carayannopoulos MO;Wyman AH;Chi M;Ratajczak CK;Moley KH. 2005. The PI3K/Akt pathway is present and functional in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* 284(2):377-386.
- Robinson DH;Benos DJ. 1991. Glucose metabolism in the trophoctoderm and inner cell mass of the rabbit embryo. *J Reprod Fertil* 91(2):493-499.
- Robinson DH;Smith PR;Benos DJ. 1990. Hexose transport in preimplantation rabbit blastocysts. *J Reprod Fertil* 89(1):1-11.
- Rodriguez-Tarduchy G;Collins MK;Garcia I;Lopez-Rivas A. 1992. Insulin-like growth factor-I inhibits apoptosis in IL-3-dependent hemopoietic cells. *J Immunol* 149(2):535-540.
- Rosenn B;Miodovnik M;Combs CA;Khoury J;Siddiqi TA. 1994. Glycemic thresholds for spontaneous abortion and congenital malformations in insulin-dependent diabetes mellitus. *Obstet Gynecol* 84(4):515-520.
- Rosenn B;Miodovnik M;Dignan PS;Siddiqi TA;Khoury J;Mimouni F. 1990. Minor congenital malformations in infants of insulin-dependent diabetic women: association with poor glycemic control. *Obstet Gynecol* 76(5 Pt 1):745-749.
- Roth RA. 1988. Structure of the receptor for insulin-like growth factor II: the puzzle amplified. *Science* 239(4845):1269-1271.
- Rother KI;Accili D. 2000. Role of insulin receptors and IGF receptors in growth and development. *Pediatr Nephrol* 14(7):558-561.
- Rotwein P. 1991. Structure, evolution, expression and regulation of insulin-like growth factors I and II. *Growth Factors* 5(1):3-18.
- Russell WE;Van Wyk JJ;Pledger WJ. 1984. Inhibition of the mitogenic effects of plasma by a monoclonal antibody to somatomedin C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(8):2389-2392.
- Sanger F. 1950. Some chemical investigations on the structure of insulin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 14:153-160.
- Sanger F. 1959. Chemistry of insulin; determination of the structure of insulin opens the way to greater understanding of life processes. *Science* 129(3359):1340-1344.
- Sara VR;Hall K. 1990. Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol Rev* 70(3):591-614.
- Scalia P;Heart E;Comai L;Vigneri R;Sung CK. 2001. Regulation of the Akt/Glycogen synthase kinase-3 axis by insulin-like growth factor-II via activation of the human insulin receptor isoform-A. *J Cell Biochem* 82(4):610-618.
- Schier AF. 2001. Axis formation and patterning in zebrafish. *Curr Opin Genet Dev* 11(4):393-404.
- Schiffner J;Spielmann H. 1976. Fluorometric assay of the protein content of mouse and rat embryos during preimplantation development. *J Reprod Fertil* 47(1):145-147.
- Schmidt B;Kiecke-Siensen C;Waheed A;Brulke T;von Figura K. 1995. Localization of the insulin-like growth factor II binding site to amino acids 1508-1566 in repeat 11 of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *J Biol Chem* 270(25):14975-14982.
- Schultz GA;Hahnel A;Arcellana-Panlilio M;Wang L;Goubau S;Watson A;Harvey M. 1993. Expression of IGF ligand and receptor genes during preimplantation mammalian development. *Mol Reprod Dev* 35(4):414-420.
- Schultz GA;Hogan A;Watson AJ;Smith RM;Heyner S. 1992. Insulin, insulin-like growth factors and glucose transporters: temporal patterns of gene expression in early murine and bovine embryos. *Reprod Fertil Dev* 4(4):361-371.
- Sciacca L;Costantino A;Pandini G;Mineo R;Frasca F;Scalia P;Sbraccia P;Goldfine ID;Vigneri R;Belfiore A. 1999. Insulin receptor activation by IGF-II in breast cancers: evidence for a new autocrine/paracrine mechanism. *Oncogene* 18(15):2471-2479.

- Sciacca L;Prisco M;Wu A;Belfiore A;Vigneri R;Baserga R. 2003. Signaling differences from the A and B isoforms of the insulin receptor (IR) in 32D cells in the presence or absence of IR substrate-1. *Endocrinology* 144(6):2650-2658.
- Scott CD;Firth SM. 2004. The role of the M6P/IGF-II receptor in cancer: tumor suppression or garbage disposal? *Horm Metab Res* 36(5):261-271.
- Scott CD;Weiss J. 2000. Soluble insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor inhibits DNA synthesis in insulin-like growth factor II sensitive cells. *J Cell Physiol* 182(1):62-68.
- Seely BL;Reichart DR;Takata Y;Yip C;Olefsky JM. 1995. A functional assessment of insulin/insulin-like growth factor-I hybrid receptors. *Endocrinology* 136(4):1635-1641.
- Seino S;Bell GI. 1989. Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 159(1):312-316.
- Seino S;Seino M;Nishi S;Bell GI. 1989. Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(1):114-118.
- Sell C;Baserga R;Rubin R. 1995. Insulin-like growth factor I (IGF-I) and the IGF-I receptor prevent etoposide-induced apoptosis. *Cancer Res* 55(2):303-306.
- Sell SM;Reese D;Ossowski VM. 1994. Insulin-inducible changes in insulin receptor mRNA splice variants. *J Biol Chem* 269(49):30769-30772.
- Serrano R;Villar M;Martinez C;Carrascosa JM;Gallardo N;Andres A. 2005. Differential gene expression of insulin receptor isoforms A and B and insulin receptor substrates 1, 2 and 3 in rat tissues: modulation by aging and differentiation in rat adipose tissue. *J Mol Endocrinol* 34(1):153-161.
- Sesti G;Marini MA;Montemurro A;Condorelli L;Borboni P;Haring HU;Ullrich A;Goldfine ID;De Pirro R;Lauro R. 1992. Evidence that two naturally occurring human insulin receptor alpha-subunit variants are immunologically distinct. *Diabetes* 41(1):6-11.
- Sferruzzi-Perri AN;Owens JA;Standen P;Roberts CT. 2008. Maternal Insulin-like Growth Factor-II Promotes Placental Functional Development Via the Type 2 IGF Receptor in the Guinea Pig. *Placenta* 29(4):347-355.
- Singleton JR;Dixit VM;Feldman EL. 1996. Type I insulin-like growth factor receptor activation regulates apoptotic proteins. *J Biol Chem* 271(50):31791-31794.
- Smith RM;Garside WT;Aghayan M;Shi CZ;Shah N;Jarett L;Heyner S. 1993. Mouse preimplantation embryos exhibit receptor-mediated binding and transcytosis of maternal insulin-like growth factor I. *Biol Reprod* 49(1):1-12.
- Smithberg M;Runner M. 1963. Teratogenic effects of hypoglycemic treatments in inbred strains of mice. *Am J Anat* 113:479-489.
- Soos MA;Field CE;Siddle K. 1993. Purified hybrid insulin/insulin-like growth factor-I receptors bind insulin-like growth factor-I, but not insulin, with high affinity. *Biochem J* 290 ( Pt 2):419-426.
- Soos MA;Whittaker J;Lammers R;Ullrich A;Siddle K. 1990. Receptors for insulin and insulin-like growth factor-I can form hybrid dimers. Characterisation of hybrid receptors in transfected cells. *Biochem J* 270(2):383-390.
- Spanos S;Becker DL;Winston RM;Hardy K. 2000. Anti-apoptotic action of insulin-like growth factor-I during human preimplantation embryo development. *Biol Reprod* 63(5):1413-1420.
- Stewart CL;Kaspar P;Brunet LJ;Bhatt H;Gadi I;Kontgen F;Abbondanzo SJ. 1992. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 359(6390):76-79.
- Stolecke H. 1997. Physiologie des Längenwachstums. In: Stolecke H, editor. *Endokrinologie des Kindes- und Jugendalters*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer. pp 289-316.
- Stracke ML;Engel JD;Wilson LW;Rechler MM;Liotta LA;Schiffmann E. 1989. The type I insulin-like growth factor receptor is a motility receptor in human melanoma cells. *J Biol Chem* 264(36):21544-21549.
- Sussenbach JS;Steenbergh PH;Holthuisen P. 1992. Structure and expression of the human insulin-like growth factor genes. *Growth Regul* 2(1):1-9.
- Sutherland AE;Calarco-Gillam PG. 1983. Analysis of compaction in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* 100(2):328-338.
- Tamatani M;Ogawa S;Nunez G;Tohyama M. 1998. Growth factors prevent changes in Bcl-2 and Bax expression and neuronal apoptosis induced by nitric oxide. *Cell Death Differ* 5(10):911-919.

- Tamemoto H;Kadowaki T;Tobe K;Yagi T;Sakura H;Hayakawa T;Terauchi Y;Ueki K;Kaburagi Y;Satoh S;et al. 1994. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372(6502):182-186.
- Taylor SI. 1992. Lilly Lecture: molecular mechanisms of insulin resistance. Lessons from patients with mutations in the insulin-receptor gene. *Diabetes* 41(11):1473-1490.
- Tennagels N;Telting D;Parvaresh S;Maassen JA;Klein HW. 2001. Identification of Ser(1275) and Ser(1309) as autophosphorylation sites of the human insulin receptor in intact cells. *Biochem Biophys Res Commun* 282(2):387-393.
- Thieme R;Ramin N;Fischer B;Navarrete Santos A. 2008. Wnt4 expression depends on insulin and IGF1 in the rabbit blastocysts. Abstract International Meeting of the "Anatomische Gesellschaft" Innsbruck, Austria. p DOI 10.3337/anatges.2008.0005.
- Thieme R;Ramin N;Viebahn C;Plitzner J;Fischer B;Navarrete Santos A. 2007. Gastrulation depends on insulin in the rabbit blastocyst. Abstract Annual Meeting of the "Anatomische Gesellschaft" Würzburg, Germany. p DOI 10.3337/anatges.2007.0004.
- Thomas L. 2000. Insulin, C-Peptid, Proinsulin. In: Thomas L, editor. *Labor und Diagnose*. 5 ed. Frankfurt/Main: TH-Books-Verl.-Ges. pp 152-158.
- Thompson JG;Partridge RJ;Houghton FD;Cox CI;Leese HJ. 1996. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *J Reprod Fertil* 106(2):299-306.
- Threadgill DW;Dlugosz AA;Hansen LA;Tennenbaum T;Lichti U;Yee D;LaMantia C;Mourton T;Herrup K;Harris RC;et al. 1995. Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 269(5221):230-234.
- Tollefsen SE;Lajara R;McCusker RH;Clemmons DR;Rotwein P. 1989. Insulin-like growth factors (IGF) in muscle development. Expression of IGF-I, the IGF-I receptor, and an IGF binding protein during myoblast differentiation. *J Biol Chem* 264(23):13810-13817.
- Toyofuku A;Hara T;Taguchi T;Katsura Y;Ohama K;Kudo Y. 2006. Cyclic and characteristic expression of phosphorylated Akt in human endometrium and decidual cells in vivo and in vitro. *Hum Reprod* 21(5):1122-1128.
- Tscheudschilsuren G;Kuchenhoff A;Klonisch T;Tetens F;Fischer B. 1999. Induction of arylhydrocarbon receptor expression in embryoblast cells of rabbit preimplantation blastocysts upon degeneration of Rauber's polar trophoblast. *Toxicol Appl Pharmacol* 157(2):125-133.
- Tulppala M;Stenman UH;Cacciatori B;Ylikorkala O. 1993. Polycystic ovaries and levels of gonadotrophins and androgens in recurrent miscarriage: prospective study in 50 women. *Br J Obstet Gynaecol* 100(4):348-352.
- Uhles S;Moede T;Leibiger B;Berggren PO;Leibiger IB. 2003. Isoform-specific insulin receptor signaling involves different plasma membrane domains. *J Cell Biol* 163(6):1327-1337.
- Ullrich A;Bell JR;Chen EY;Herrera R;Petruzzelli LM;Dull TJ;Gray A;Coussens L;Liao YC;Tsubokawa M;et al. 1985. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 313(6005):756-761.
- Ullrich A;Gray A;Tam AW;Yang-Feng T;Tsubokawa M;Collins C;Henzel W;Le Bon T;Kathuria S;Chen E;et al. 1986. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *Embo J* 5(10):2503-2512.
- Vella V;Sciacca L;Pandini G;Mineo R;Squatrito S;Vigneri R;Belfiore A. 2001. The IGF system in thyroid cancer: new concepts. *Mol Pathol* 54(3):121-124.
- Vendola K;Zhou J;Wang J;Bondy CA. 1999. Androgens promote insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-I receptor gene expression in the primate ovary. *Hum Reprod* 14(9):2328-2332.
- 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(4):187-191.
- Viebahn C. 1999. The anterior margin of the mammalian gastrula: comparative and phylogenetic aspects of its role in axis formation and head induction. *Curr Top Dev Biol* 46:63-103.
- 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(2):159-169.

- Viebahn C;Stortz C;Mitchell SA;Blum M. 2002. Low proliferative and high migratory activity in the area of Brachyury expressing mesoderm progenitor cells in the gastrulating rabbit embryo. *Development* 129(10):2355-2365.
- Viereck V;Siggelkow H;Pannem R;Bräulke T;Scharf JG;Kubler B. 2007. Alteration of the insulin-like growth factor axis during in vitro differentiation of the human osteosarcoma cell line HOS 58. *J Cell Biochem* 102(1):28-40.
- Vogt B;Carrascosa JM;Ermel B;Ullrich A;Haring HU. 1991. The two isoforms of the human insulin receptor (HIR-A and HIR-B) follow different internalization kinetics. *Biochem Biophys Res Commun* 177(3):1013-1018.
- Wales RG;Whittingham DG;Hardy K;Craft IL. 1987. Metabolism of glucose by human embryos. *J Reprod Fertil* 79(1):289-297.
- Wang QT;Piotrowska K;Ciemerych MA;Milenkovic L;Scott MP;Davis RW;Zernicka-Goetz M. 2004a. A genome-wide study of gene activity reveals developmental signaling pathways in the preimplantation mouse embryo. *Dev Cell* 6(1):133-144.
- Wang Y;Wang F;Sun T;Trostinskaia A;Wyggle D;Puschek E;Rappolee DA. 2004b. Entire mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway is present in preimplantation mouse embryos. *Dev Dyn* 231(1):72-87.
- Wang ZQ;Ovitt C;Grigoriadis AE;Mohle-Steinlein U;Ruther U;Wagner EF. 1992. Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature* 360(6406):741-745.
- Watkins AJ;Wilkins A;Cunningham C;Perry VH;Seet MJ;Osmond C;Eckert JJ;Torrens C;Cagampang FR;Cleal J;Gray WP;Hanson MA;Fleming TP. 2008. Low protein diet fed exclusively during mouse oocyte maturation leads to behavioural and cardiovascular abnormalities in offspring. *J Physiol* 586(8):2231-2244.
- Watson AJ;Barcroft LC. 2001. Regulation of blastocyst formation. *Front Biosci* 6:D708-730.
- 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(2):87-95.
- Watson AJ;Watson PH;Arcellana-Panlilio M;Warnes D;Walker SK;Schultz GA;Armstrong DT;Seamark RF. 1994. A growth factor phenotype map for ovine preimplantation development. *Biol Reprod* 50(4):725-733.
- Widmann C;Gibson S;Jarpe MB;Johnson GL. 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79(1):143-180.
- Williams BS;Biggers JD. 1990. Polar trophoblast (Raubers' layer) of the rabbit blastocyst. *Anat Rec* 227(2):211-222.
- Withers DJ;Gutierrez JS;Towery H;Burks DJ;Ren JM;Previs S;Zhang Y;Bernal D;Pons S;Shulman GI;Bonner-Weir S;White MF. 1998. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391(6670):900-904.
- Yamaguchi Y;Flier JS;Benecke H;Ransil BJ;Moller DE. 1993. Ligand-binding properties of the two isoforms of the human insulin receptor. *Endocrinology* 132(3):1132-1138.
- Yamaguchi Y;Flier JS;Yokota A;Benecke H;Backer JM;Moller DE. 1991. Functional properties of two naturally occurring isoforms of the human insulin receptor in Chinese hamster ovary cells. *Endocrinology* 129(4):2058-2066.
- Yang J;Cummings EA;O'Connell C;Jangaard K. 2006. Fetal and neonatal outcomes of diabetic pregnancies. *Obstet Gynecol* 108(3 Pt 1):644-650.
- Yang XZ;Foote RH. 1987. Production of identical twin rabbits by micromanipulation of embryos. *Biol Reprod* 37(4):1007-1014.
- Yee D;Lebovic GS;Marcus RR;Rosen N. 1989. Identification of an alternate type I insulin-like growth factor receptor beta subunit mRNA transcript. *J Biol Chem* 264(36):21439-21441.
- Zapf J;Rinderknecht E;Humbel RE;Froesch ER. 1978. Nonsuppressible insulin-like activity (NSILA) from human serum: recent accomplishments and their physiologic implications. *Metabolism* 27(12):1803-1828.
- 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(2):375-380.
- Zhang Y;Yang Z;Wu J. 2007. Signaling pathways and preimplantation development of mammalian embryos. *Febs J* 274(17):4349-4359.

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Regulation verschiedener physiologischer Prozesse durch Insulin.....	4
Abb. 2	Struktur der IGF-Rezeptoren.....	6
Abb. 3	Schematische Darstellung des Insulinrezeptors.....	7
Abb. 4	Aminosäure-Sequenz des IR.....	8
Abb. 5	Übersicht über das Insulin-/IGF-R-System.....	9
Abb. 6	6 Tage alte Kaninchenblastozyste.....	16
Abb. 7	Aufsicht auf die Keimscheiben (Em) von Kaninchenblastozysten im Stadium 0/1, 2 und 3 mit angrenzenden Trophoblastzellen (Tr).....	18
Abb. 8	Schematische Darstellung des Ablaufs der <i>in vitro</i> Kultur.....	21
Abb. 9	Expression von IGF1 und IGF2 in Präimplantationsembryonen und Geweben des Kaninchens.....	46
Abb. 10	Expression von Insulin in Kaninchenblastozysten der Entwicklungsstadien 0/1, 2 und 3.....	47
Abb. 11	Lokalisation von Insulin in Pankreas und Leber des Kaninchens.....	47
Abb. 12	Lokalisation von Insulin in Kaninchenblastozysten.....	48
Abb. 13	Nachweis von Insulin in Kaninchenblastozysten <i>in vivo</i> und nach <i>in vitro</i> Kultur.....	49
Abb. 14	Lokalisation des IR in Kaninchenblastozysten.....	50
Abb. 15	Expression der IR-Isoformen in Kaninchenblastozysten.....	51
Abb. 16	Expression der IR-Isoformen in Kaninchengeweben.....	52
Abb. 17	Expression von IGF1-R und IGF2-R in Präimplantationsembryonen des Kaninchens.....	53
Abb. 18	Expression des IGF1- und IGF2-Rezeptors in Embryoblast und Trophoblast von Kaninchenblastozysten.....	54
Abb. 19	Expression von IGF1-R und IGF2-R in Kaninchengeweben.....	54
Abb. 20	Nachweis des IGF1-R-Poteins mittels Western Blot und IHC in Kaninchenblastozysten.....	55
Abb. 21	Relative Menge des IGF2-R in <i>in vivo</i> Blastozysten des Kaninchens.....	56
Abb. 22	Transkriptmengen von c-fos in Kaninchenblastozysten nach Stimulation mit verschiedenen Insulin- und IGF1-Konzentrationen.....	57
Abb. 23	Phosphorylierung von Erk nach IGF1-Stimulation.....	58
Abb. 24	Phosphorylierung von Erk durch Insulin und IGF1 in Embryoblast und Trophoblast.....	59
Abb. 25	c-fos-Transkriptmenge in Kaninchenblastozysten nach Inhibition mit einem MAPK- spezifischen Inhibitor und Stimulation mit Insulin und IGF1.....	60
Abb. 26	Quantifizierung von c-fos-Transkripten nach Insulin- und IGF1-Stimulation in Embryoblast und Trophoblast.....	61
Abb. 27	Phosphorylierung von Akt nach IGF1-Stimulation und Blockierung mit einem PI3-K Inhibitor....	62
Abb. 28	Phosphorylierung von Akt durch Insulin und IGF1 in Embryoblast und Trophoblast.....	63
Abb. 29	Relative PEPCK-RNA-Mengen in Kaninchenembryonen nach Insulin- und IGF1-Stimulation im Gesamtembryo und im Embryoblasten und Trophoblasten.....	64
Abb. 30	Relative HK-RNA-Menge in Kaninchenblastozysten nach Insulin- und IGF1-Stimulation im Gesamtembryo und im Embryoblasten und Trophoblasten.....	65

Abb. 31	Relative Bcl-x(L)-RNA-Menge in Kaninchenblastozysten nach Insulin- und IGF1- Stimulation im Gesamtembryo und im Embryoblasten und Trophoblasten .....	67
Abb. 32	Phosphorylierung von Erk und Akt nach IGF2-Stimulation und Blockierung mit einem MAPK- oder PI3-K-Inhibitor .....	69
Abb. 33	Phosphorylierung von Erk durch IGF2 in Embryoblast und Trophoblast .....	70
Abb. 34	Phosphorylierung von Akt durch IGF2 in Embryoblast und Trophoblast .....	70
Abb. 35	Quantifizierung der IR- und IGF1-R-Transkriptmenge von Blastozysten kultiviert in 1mM, 10mM oder 25mM Glukose .....	72
Abb. 36	Quantifizierung der PEPCK- und HK-Transkriptmenge von Blastozysten kultiviert in 1mM, 10mM oder 25mM Glukose .....	73
Abb. 37	Quantifizierung der PEPCK- und HK-Transkriptmenge in Blastozysten nach Insulin und IGF1- Zugabe in 1mM, 10mM oder 25mM Glukose-haltigen Kulturmedien .....	74
Abb. 38	IR- RNA-Mengen in Kaninchenblastozysten der Entwicklungsstadien 0/1, 2 und 3 .....	75
Abb. 39	IGF1-R-Menge in Kaninchenblastozysten der Entwicklungsstadien 0/1, 2 und 3 .....	76
Abb. 40	Lokalisation des IGF1-R in Kaninchenblastozysten der Entwicklungsstadien 0/1, 2 und 3 .....	77
Abb. 41	Wirkung von Insulin und den IGFs in der Kaninchenblastozyste .....	85
Abb. 42	Modell eines Amplifikationsdiagramms der <i>Real Time</i> PCR. ....	XVII
Abb. 43	Phosphorylierung von Erk und Akt nach IGF2-Stimulation in MCF7-Zellen .....	XX

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verwendete Primer und Oligonukleotidsequenzen .....	27
Tabelle 2	Verwendete Primer für die <i>Real time</i> PCR und Oligonukleotidsequenzen .....	28
Tabelle 3	Verwendete Antikörper in der IHC .....	36
Tabelle 4	Verwendete Primär- und Sekundäntikörper für die <i>Western Blot</i> Analyse. ....	42
Tabelle 5	Expression des IR/IGF-R-Systems in Embryoblast und Trophoblast von 6 Tage alten Kaninchenblastozysten .....	79
Tabelle 6	Überblick über die Aktivierung der IR/IGF1-R-Signalwege durch Insulin, IGF1 und IGF2 in der Kaninchenblastozyste .....	90
Tabelle 7	Berechnung des $\Delta C_T$ -Wertes .....	XVIII
Tabelle 8	Berechnung des $\Delta\Delta C_T$ -Wertes und der relativen mRNA-Menge .....	XVIII
Tabelle 9	Berechnung der relativen Werte .....	XIX

## 7.3 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Akt	Protein-Kinase B (PKB)
amc	<i>anterior marginal crescent</i> , vorderer Randbogen, (VRB)
AP-1	Aktivatorprotein-1
APES	3(Triethoxysilyl)propylamin
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
$AT$ °C	<i>Annealing</i> temperatur
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
BSM II	Basales Synthetisches Medium II
bek	<i>bacterially expressed kinase</i>

cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cer1	Cerberus 1
ChORE	<i>Carbohydrate response element</i>
ChREBP	<i>ChORE binding protein</i>
c-kit	<i>stem cell factor</i>
CSF	<i>Colony stimulating factor</i>
CT	<i>Cycle Treshold</i>
d	Tag
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DKK	Dickkopf
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotid-Triphosphat
DPX	Einbettmedium für IHC
DTT	Dithiothreitol
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermiswachstumsfaktor, <i>epidermal growth factor</i>
EGF-R	Epidermiswachstumsfaktor-Rezeptor, <i>epidermal growth factor receptor</i>
<i>EGR-1</i>	<i>Early growth response-1</i>
Em	Embryoblast
ER	<i>Endoplasmatisches Retikulum</i>
Erk1/2	<i>extracellular signal regulated kinase 1/2</i>
EPO	Erythropoietin
Ex 11	Exon 11
FG	Fragmentlänge
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor, <i>fibroblast growth factor</i>
FGF-R	Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor, <i>fibroblast growth factor receptor</i>
FKS	fötale Kälberserum
flg	<i>fillagrin</i>
FoxO	<i>Forkhead boxO</i> Transkriptionsfaktor
g	Gramm
G	Gauche
GAPDH	Glycerolaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GH	Somatotropin, Somatotropes Hormon (STH), <i>growth hormone</i>
GLUT	Glukosetransporter
h	Stunde
hCG	humanes Choriongonadotropin
HER	Heregulin
HK	Hexokinase
HRP	Meerrettichperoxidase, <i>horseradish peroxidase</i>
Hybrid-R	Hybrid-Rezeptor
Hybrid-R <sup>A</sup>	Hybrid-Rezeptor der Isoform A
Hybrid-R <sup>B</sup>	Hybrid-Rezeptor der Isoform B
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor, <i>insulin-like growth factor</i>
IGFBP	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-Bindeprotein, <i>insulin-like growth factor binding protein</i>

IGF-R	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-Rezeptor, <i>Insulin-like growth factor receptor</i>
IHC	Immunhistochemie
IPTG	Isopropylthio- $\beta$ -D-galactosid
IR	Insulinrezeptor
IR-A	Insulinrezeptor-Isoform A
IR-B	Insulinrezeptor-Isoform B
IRR	Insulinrezeptor- <i>related</i> Rezeptor
IRS	Insulinrezeptor-Substrat, <i>insulin receptor substrate</i>
JAK-STAT	<i>Janus-activated kinase/signal transducer and activator of transcription</i>
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
K	Kalium
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
kg	Kilogramm
<i>KLSM</i>	<i>konfokal Laser Scanning Mikroskop</i>
KM	Kulturmedium
KO	<i>Knock-Out</i>
L	Liter
LIF	<i>leukaemia inhibitory factor</i>
LOS	<i>Large Offspring Syndrom</i>
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEM	Minimal <i>Eagle</i> Medium
min	Minute
MIP	<i>molluscan insulin-like peptides</i>
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MOPS	<i>(N-Morpholino)propanesulfonic acid</i>
mRNA	messenger RNA
Mw	Mittelwert
Na	Natrium
ng	Nanogramm
NGF	<i>nerve growth factor</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
p-Akt	phosphoryliertes Akt, phospho-Akt
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung, <i>phosphat buffered saline</i>
PBST	Phosphat buffered Saline + Tween
p.c.	<i>post coitum</i>
PCO	Polyzystisches Ovarsyndrom
PCR	Polymerase Kettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	Blutplättchenwachstumsfaktor, <i>platelet-derived growth factor</i>
PEPCK	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase
p-Erk	phosphoryliertes Erk, phospho-Erk
PFA	Paraformaldehyd
PGE	posteriore Gastrulaextension

---

PI 3-K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKC	Proteinkinase C
PL	Plazentalaktogen
pM	Picomolar
PMSG	<i>pregnant mare serum gonadotropin</i>
PS	Primitivstreifen
PVA	Polyvinylalkohol
rab	Kaninchen, <i>rabbit</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per million</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SEM	Standardfehler
SGLT	Natrium-Glukose-Kotransporter
STH	Somatotropin, Somatotropes Hormon, <i>growth hormone</i> (GH)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung, <i>Tris buffered saline</i>
TEMED	Tetra-Ethyl-Methyl-Ethylen-Diamin
TFB	<i>transformation buffer</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Tr	Trophoblast
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	<i>Unit</i>
V	<i>Volt</i>
VRB	vorderer Randbogen, <i>anterior marginal crescent</i> (amc)
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid
Xmrk	Xiphorus maculatus (protooncogene) gen for receptor tyrosine kinase
7-AAD	7-Amino-Aktinomycin
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromolar
$^{\circ}$ C	Grad Celcius

Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

**7.4 Geräte- und Softwareverzeichnis****Geräte**

ABI-PRISM 5700 <i>Sequence Detection</i> System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Agarosegel-Dokumentationsgerät	LTF Labortechnik, Wasserburg, Deutschland
Axiocam Digitalkamera	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Brutschrank BB6060	Haereus, Hanau, Deutschland
ChemiDoc-It <i>Imaging</i> System	UVP, Cambridge, UK
Fluoreszenzmikroskop Axioplan	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Gelkammer	Biometra, Göttingen, Deutschland
halbsterile Werkbank	Haereus, Hanau, Deutschland
konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	Leica Microsystems, Heidelberg, Deutschland
Kühlzentrifugen	Haereus, Hanau, Deutschland
Mikrotom	Medizinische Diagnostik-Methoden GmbH, Giessen, Deutschland
NOVEX Gelkammern	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DNA Engine Opticon <sup>®</sup> 2 System	MJ Research, München, Deutschland
Stereomikroskop	Carl Zeiss, Jena, Deutschland

Thermocycler TRIO-Thermoblock,	Biometra, Göttingen, Deutschland
Ultra-Turrax T25	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG – IKA Labortechnik, Staufen, Germany
UV/VIS Spektrometer	Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland
Western Blot Apparatur	Biometra, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge Biofuge	Haereus, Hanau, Deutschland

### Software

Bio1D Software	LTF, Wasserburg, Deutschland
BioCaptMW	LTF, Wasserburg, Deutschland
Generunner Software 3.05	Hastings Software Inc., USA
Software Axiovision 2.05	Zeiss, Jena, Deutschland

### 7.5 Chemikalien- und Verbrauchsmaterialienverzeichnis

5xRT-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
7-Amino-Actinomycin-D (7-AAD)	Molecular Probes, Eugene, USA
8-(4-Chlorophenylthio)adenosine <sup>3',5'</sup> - cyclic monophosphate sodium salt (cAMP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
10x PCR-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck KG, Darmstadt, Deutschland
Ampecillin	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
<i>Basal synthetic medium II</i>	Seromed, Berlin, Deutschland
BigDye <sup>®</sup> Terminator v1.1. Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Bovine serum albumin (BSA)	Fluka, Seelze, Deutschland
Borsäure	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bradford Reagenz	BioRad, München, Deutschland
Bromphenolblau	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Calciumchlorid	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Chlorhydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

---

Chloroform	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
D-(+)-Glukose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)	Sigma Research Genetics, Taufkirchen, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma Research Genetics, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DNase I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
DNA ladder 1Kb Gene Ruler	Fermentas GmbH. St. Leon-Rot, Deutschland
dNTP (100mM)	Fermentas GmbH. St. Leon-Rot, Deutschland
DPX	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DTT	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dynabeads <sup>®</sup> Oligo(dT) <sub>25</sub>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
e-Amino-n-Caprinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Einwegspritze	Omnifix, B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Eisessig	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
fötales Kälberserum (FKS) ausgewählte Charge	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
GFX Micro Plasmid Prep Kit	GE Healthcare, München, Deutschland
Glycerol	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Guanidiniumthiocyanat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Hefe-Extrakt	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
humanes Choriongonadotropin (hCG)	Bayer Schering Pharma, Berlin, Deutschland
Hybond-ECL Nitrocellulose Membran	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Hyperfilm ECL (18x24 cm)	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Igepal Ca-630	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Immobilon Western Detection Reagenz	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Insulin (bovin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
<i>Insulin-like growth factor 1</i> (IGF1)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
<i>Insulin-like growth factor 2</i> (IGF2)	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isoprpylthio- $\beta$ -D-galactosid (IPTG)	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumacetat	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Kalium-Aluminium-Sulfat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kalium-di-hydrogenphosphat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Lithiumchlorid	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Magnesiumchlorid	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Magnesiumsulfat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mangan(II)chlorid-dihydrat (Manganchlorid)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Metaphore Agarose	FMC, Rockland, USA
Methanol (100%)	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
MEM Earle Medium	Biochrom, Berlin, Deutschland
Minimal Eagle Medium	Biochrom, Berlin, Deutschland
MOPS (3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

---

Moviol® 4-88	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natrium-Deoxycholat	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumiodat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumlaurosylysarcosinat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat	Biochrom, Berlin, Deutschland
Oligonukleotide	Biomers, Ulm, Deutschland
Paraffin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PBS	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin	GIBCO, Karlsruhe, Deutschland
Pentobarbital	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Pepsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Pepton	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
pGEMT-Vektor Kit	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Phenol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Phosphatase-Inhibitor	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Protease-Inhibitor	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Pikrinsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>Pregnant Mare Serum Gonadotropin(PMSG)</i>	Intervet, Unterschleißheim, Deutschland
Polyvinylalkohol (PVA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Proteinmarker <i>broad-range</i> Marker	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Proteinmarker <i>prestained protein ladder</i>	Fermentas GmbH. St. Leon-Rot,

---

	Deutschland
Quia Quick Gel Extraction Kit	Quiagen GmbH, Hilden, Germany
<i>random</i> Primer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
REIKA GmbH Kraftfutter	Reinsdorfer Kraftfutterwerk, Reinsdorf, Deutschland
Restriktionsenzyme	Fermentas GmbH. St. Leon-Rot, Deutschland
Restriktionspuffer	Fermentas GmbH. St. Leon-Rot, Deutschland
RNAse-Inhibitor	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Rubidiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (36%)	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Sodium-dodecyl-sulfat (SDS)	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
SYBR Green <sup>®</sup> Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tetra-Ethyl-Methyl-Ethylen-Diamin (TEMED)	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tris-Base	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tris/HCl	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Trypsin	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
X-GAL	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ziegenserum	Dianova, Hamburg, Deutschland
Zitronensäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

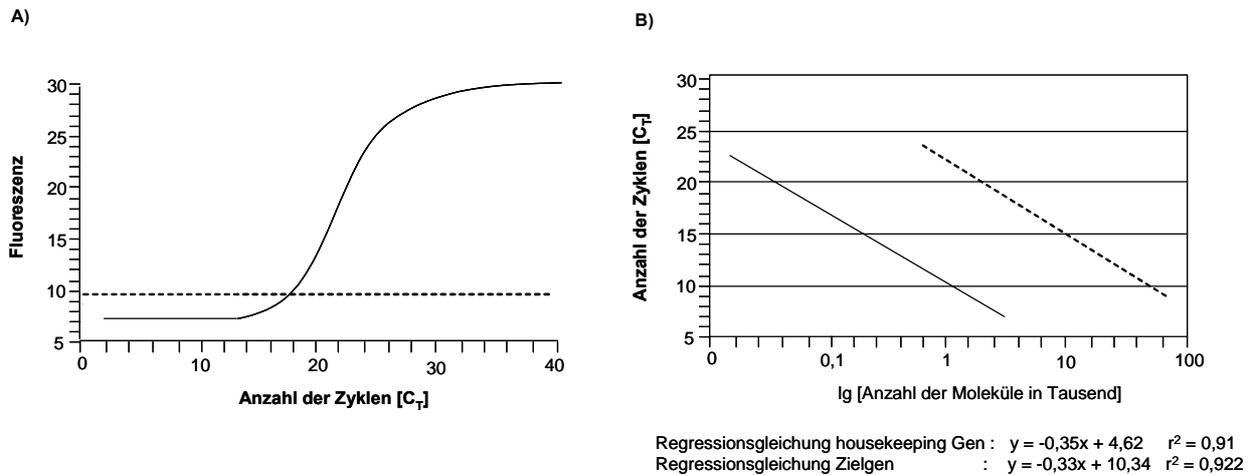
## Antikörperverzeichnis

Alexa fluor <sup>®</sup> 488 Goat Anti Mouse	Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland
Donkey Anti Goat, HRP-konjugiert	Dianova, Hamburg, Deutschland
Goat Anti Mouse, HRP-konjugiert	Dako, Hamburg, Deutschland
Goat Anti Rabbit, HRP-konjugiert	Dako, Hamburg, Deutschland
Mouse Anti $\beta$ -Aktin mAb Isotyp IgG1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Mouse Anti IGF1-R $\alpha$ (2C8) mAb Isotyp IgG1	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Rabbit Anti IGF1-R $\beta$ (C-20) pAb Isotyp IgG	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Goat Anti IGF2-R (C-15) pAb Isotyp IgG	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Mouse Anti Insulin mAb Isotyp IgG1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Mouse Anti IR ( $\alpha$ - Subunit) mAb Isotyp IgG1	Chemicon, Hampshire, UK
Mouse Anti phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) mAb	Cell Signaling Technology, Schwalbach, Deutschland
Rabbit Anti PEPCK pAb	AG Prof. Christ, Halle, Deutschland
Rabbit Anti phospho-Akt (ser 473) pAb	Cell Signaling Technology; Schwalbach, Deutschland

### 7.6 Beispiel für die Auswertung der *Real Time* PCR nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode

Bei der *Real Time* PCR wird durch den PCR-Zyklus bestimmt, bei welchem die Amplifikation des PCR-Produktes erstmals detektiert werden kann. Je höher die Kopienzahl des Zielgens in der PCR ist, desto eher kann eine Amplifikation und ein Anstieg in der Fluoreszenz beobachtet werden. Abbildung 42 zeigt ein Beispiel für ein Amplifikationsdiagramm. In diesem Diagramm wird das Fluoreszenzsignal (y-Achse) gegen die Zyklenzahl aufgetragen (x-Achse). Im Anfangsbereich der PCR gibt es kaum Änderungen des Fluoreszenzsignals. Diese Intensität wird als *baseline* bezeichnet. Ein Anstieg des Signals über die *baseline* zeigt eine Akkumulation des PCR Produktes. Eine gewählte feste Fluoreszenz (*threshold*) kann nun oberhalb der *baseline* gelegt werden. Der Parameter *cycle threshold* ( $C_T$ ) ist definiert als der Zyklus, in dem die Fluoreszenz den *threshold* überschreitet. In der Wasserkontrolle (*no template*) steigt das Fluoreszenzsignal nicht an. Ein Diagramm des Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge für verschiedene Verdünnungen gegen den  $C_T$  ergibt eine lineare Gerade (Abb. 42). Diese Gerade bestimmt den  $C_T$ -Bereich, in welchem ein linearer Zusammenhang zwischen Fluoreszenz und *Template* Menge besteht. Dieser Bereich muss für jedes Gen bestimmt werden. Bei der Anwendung der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode kommt diesen Geraden eine wichtige weitere Bedeutung zu. Da hier die Expression eines Standardgens (hier

GAPDH) mit den anderen Genen (hier HK) verglichen wird, müssen die Anstiege der Geraden vergleichbar sein



**Abb. 42 Modell eines Amplifikationsdiagramms der *Real Time* PCR.**

- A)** Dargestellt ist exemplarisch die Fluoreszenzkurve einer Probe, die mittels *Real Time* PCR amplifiziert wurde. Die Fluoreszenzintensität (Fluoreszenz) ist gegen die Anzahl der durchlaufenen Zyklen ( $C_T$ ) dargestellt. Der *threshold* (--) bestimmt den Zyklus bei dem es zur Akkumulation des PCR-Produktes kommt.
- B)** Standardkurve für ein *housekeeping* Gen (---) und ein Zielgen (—). Von einer Plasmidstandard-Konzentrationsreihe wurden die  $C_T$ -Werte ermittelt und gegen den logarithmischen Konzentrationswert (lg) aufgetragen. Die lineare Regression ( $r^2$ ) und die Anstiege der Kurven (Regressionsgleichung) wurden errechnet und miteinander verglichen.

Nach der Einstellung der PCR-Bedingungen können die Expressionen nach der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode verglichen werden. Als Vergleichsprobe dienten in der vorliegenden Arbeit Kontrollen die nicht stimuliert und unter Standardbedingungen kultiviert wurden. Im folgenden Abschnitt soll ein Beispiel zur Berechnung der Transkriptmenge von HK gezeigt werden. Zuerst wird der  $C_T$  Wert für das Standardgen GAPDH bestimmt. In der folgenden PCR-Reaktion wird der  $C_T$  Wert für HK bestimmt. Die erste Berechnung ist die Differenz der  $C_T$ -Werte zwischen dem Zielgen GAPDH und dem Standardgen, es resultiert  $\Delta C_T$  (Tabelle 7). Als nächstes wird der Mittelwert der  $\Delta C_T$  Werte der Kontrolle berechnet (MW3). Dieser Mittelwert gilt als Bezugspunkt für die  $\Delta\Delta C_T$ -Berechnung.

**Tabelle 7 Berechnung des  $\Delta C_T$ -Wertes**

	Probe	$C_T$ GAPDH	MW 1	$C_T$ HK	MW 2	$\Delta C_T$	MW 3 $\Delta C_T$ Kontrolle
Kontrolle	1	12,887	12,8745	16,22	16,622	3,7475	4,05
		12,862		17,024			
	2	13,083	13,161	17,168	17,2485	4,0875	
		13,239		17,329			
3	12,736	12,9615	17,655	17,673	4,7115		
	13,187		17,691				
4	13,36	13,709	16,959	17,3705	3,6615		
	14,058		17,782				
Insulin	1	15,533	15,463	16,598	16,7515	1,2885	
		15,393		16,905			
	2	16,164	16,071	16,689	16,564	0,493	
		15,978		16,439			
3	16,717	16,707	17,679	17,669	0,962		
	16,697		17,659				
4	14,54	14,855	16,06	16,18	1,325		
	15,17		16,3				

$$(C_T \text{ HK}) - (C_T \text{ GAPDH}) = \Delta C_T$$

MW 1 = Mittelwert der  $C_T$ -Werte für GAPDH je Probe

MW 2 = Mittelwert der  $C_T$ -Werte für HK je Probe

MW 3 = Mittelwert der  $\Delta C_T$ -Werte aller Kontrollen

Die Differenz der  $\Delta C_T$  Werte mit MW 3 ergibt  $\Delta \Delta C_T$  (Tabelle 8). Um die relative mRNA-Expression der stimulierten Proben zu erhalten wird nun der negative  $\Delta \Delta C_T$ -Wert als Exponent zur Basis 2 potenziert (Tabelle 8). Anschließend wird der Mittelwert der relativen mRNA von Kontrollproben und stimulierten Proben (Insulin) gebildet (MW 4).

**Tabelle 8 Berechnung des  $\Delta \Delta C_T$ -Wertes und der relativen mRNA-Menge**

	Probe	$\Delta C_T$	MW 3 $\Delta C_T$ Kontrolle	$\Delta \Delta C_T$	relative mRNA	MW 4
Kontrolle	1	3,75	4,05	-0,30	1,23	1,04
		4,09		0,04	0,98	
	3	4,71		0,66	0,63	
		4		3,66	-0,39	
Insulin	1	1,29		-2,76	6,79	8,43
		2		0,49	-3,56	
	3	0,96		-3,09	8,51	
		4		1,33	-2,73	

$$(\Delta C_T) - (\text{MW3}) = \Delta \Delta C_T$$

$$2^{-\Delta \Delta C_T} = \text{relative mRNA Expression}$$

MW 4 = Mittelwert der relativen mRNA der Kontrollen und Insulin-stimulierten Proben

Zur besseren Vergleichbarkeit der Versuche werden die relativen Werte berechnet indem man den relativen mRNA-Werten für jede Probe mit dem Mittelwert der relativen mRNA (MW4) dividiert (Tabelle 9).

**Tabelle 9 Berechnung der relativen Werte**

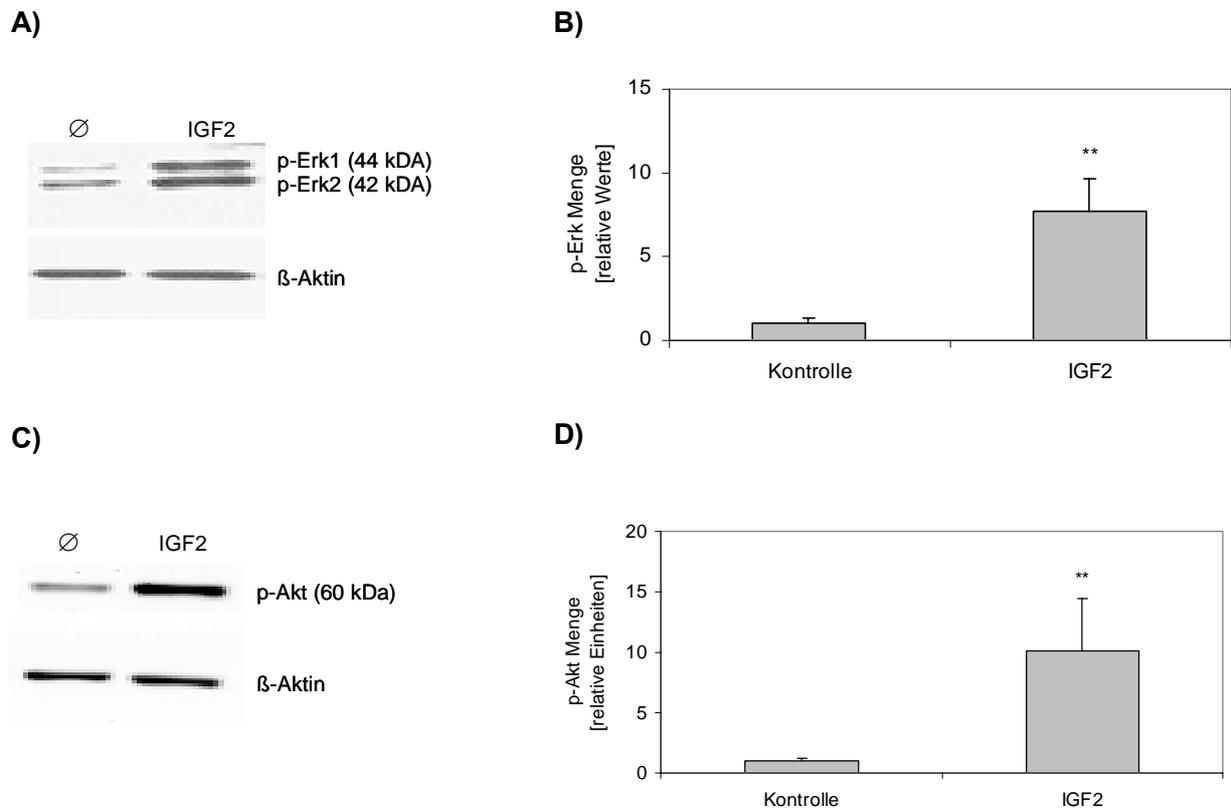
	Probe	relative mRNA	MW 4	relative Werte	MW 5
Kontrolle	1	1,23	1,04	1,19	1,00
	2	0,98		0,94	
	3	0,63		0,61	
	4	1,31		1,26	
Insulin	1	6,79	8,43	6,54	8,1
	2	11,79		11,35	
	3	8,51		8,20	
	4	6,62		6,37	

mRNA Probe/ MW 4 = relative Werte

MW 5 ist der Mittelwert der relativen Werte der Kontrollen und der stimulierten Proben (Insulin).

### 7.7 Akt/Erk Phosphorylierung in MCF7-Zellen

Zum Test der Wirksamkeit wurde rekombinantes IGF2 in der Konzentration 13nM für 15min an der humanen Brustkrebszelllinie MCF7 eingesetzt. Anschließend wurde die Proteinisolierung durchgeführt und die Phosphorylierung von Erk und Akt im *Western Blot* untersucht (Abb. 43). Der Kontrolle wurde nur Medium zugegeben. Nach IGF2-Stimulation resultierte eine signifikante Erhöhung der p-Erk-Menge (ca. 7 –fach). Auch die Phosphorylierung von Akt stieg um das ca. 10 –fache an. Mit der Konzentration von 13nM IGF2 wurden 6 Tage alte Kaninchenembryonen auf die Aktivierung der Signalwege MAPK und PI3-K untersucht.



#### Abb. 43 Phosphorylierung von Erk und Akt nach IGF2-Stimulation

*Western Blot* und densitometrische Auswertung der Phosphorylierung von Erk (p-Erk1/2, **A**, **B**) und Akt (p-Akt, **C**, **D**) in kultivierten MCF7-Zellen nach Behandlung mit 13nM IGF2 für 15min (IGF2). Als Kontrolle (Ø) dienen MCF7-Zellen, denen eine äquivalente Menge Kulturmedium zugeben wurde. Der Grad der Phosphorylierung wurde relativ zur Kontrolle nach Abgleich gegen  $\beta$ -Aktin der gleichen Probe berechnet ( $M_w \pm SEM$ ). Das Experiment wurde in zwei unabhängigen Versuchen durchgeführt (N=2).

\*\* $p \leq 0,01$

**Curriculum vitae****Persönliche Daten**

Geburtsdatum 18. März 1980  
Geburtsort Merseburg, Deutschland  
Nationalität deutsch

**Hochschullaufbahn**

seit Dezember 2008 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der TU München  
Lehrstuhl für Ernährungsmedizin  
Else Kröner-Fresenius-Zentrum für Ernährungsmedizin  
Freising-Weihenstephan

Okt 2005-Nov 2008 Promotionsstudium der Ernährungswissenschaften  
am Institut für Anatomie und Zellbiologie  
(Abschluss Dr. troph.)

2001 – 2005 Studium der Ernährungswissenschaften  
Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg  
(Abschluss Dipl. Ernährungswissenschaftlerin)

Diplomarbeit Charakterisierung der Expression von Insulinrezeptor-Isoformen  
in RL-Zellen und Präimplantationsembryonen von *Oryctolagus  
cuniculus*

1998 – 2001 Studium der Biologie  
Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg

**Auslandsaufenthalt**

Okt – Nov 2005 Department of Molecular Reproduction, Development and  
Genetics  
Prof. Polani B. Seshagiri  
Indian Institute of Science  
Bangalore, Indien

**Stipendium**

Okt 2005 – Okt 2007 Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetzes des  
Landes Sachsen-Anhalt

**Praktikum**

Feb – April 2003 Bundesforschungsanstalt für Ernährung (BfEL)  
Karlsruhe, Deutschland

**Begleitende  
Nebentätigkeiten**

Apr 2003 – Feb 2004 Wissenschaftliche Hilfskraft  
Institut für Ernährungswissenschaften  
Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg

Okt 2006 – Juni 2007 Wissenschaftliche Hilfskraft  
Institut für Ernährungswissenschaften  
Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg

**Besondere Kenntnisse**

Fortbildungen

Sachkundenachweis nach § 4 des Tierschutzgesetzes

Sachkundenachweis nach § 5 der  
Chemikalienverbotsverordnung

Intensivkurs „Grundlagen der Säuger-Zell- und Gewebekultur  
und aktuelle Aspekte der Stammzellforschung“

Teile dieser Arbeit sind in folgende Veröffentlichungen, Vorträge und Poster eingegangen:

Zeitschriftenartikel

**Cell lineage-specific signalling of insulin and insulin like growth factor (IGF) 1 in rabbit blastocysts**

Nicole Ramin, Anne Navarrete Santos, Sarah Tonack and Bernd Fischer, *Endocrinology*. 2008; 149(2):515-24

**Expression of adipokines in preimplantation rabbit and mice embryos**

Schmidt T, Fischer S, Tsikolia N, Navarrete Santos A, Rohrbach S, Ramin N, Thieme R, Fischer B.

*Histochem Cell Biol*. 2008, 129:817-825

**Die Xenobiotika-Exposition stellt ein zu wenig beachtetes Risiko der Embryonalentwicklung vor der Implantation dar**

Bernd Fischer, Anne Navarrete Santos, Nicole Ramin und Thomas Schmidt, *J.*

*Reproduktionsmed. Endokrinol* 2008; 5 (1), 4-9

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

Nicole Ramin, Sarah Tonack, Sireesha Garimella, Rajnish Rao, Polani B. Seshagiri, Bernd Fischer and Anne Navarrete Santos, *submitted to Annals of Anatomy*

Veröffentlichte Beiträge

*Poster*

**Regulatory effect of insulin and glucose on the gluconeogenic enzyme phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) in rabbit blastocysts**

Nicole Ramin, Anne Navarrete Santos and Bernd Fischer, 102<sup>nd</sup> International Meeting of the "Anatomische Gesellschaft" March 30- April 02, 2007, Giessen, Germany, DOI 10.3337/anatges.2007.0001

**Expression of adipokines in pre- and periimplantation rabbit embryos**

Sünje Fischer, Anne Navarrete Santos, Nicole Ramin, Bernd Fischer, *Annual Conference of the Society for Reproduction and Fertility (SRF)*, June 29- July 01, 2008, Edinburgh, United Kingdom, [www.srf-reproduction.org/meetings/conf2008/progabstractbook.pdf](http://www.srf-reproduction.org/meetings/conf2008/progabstractbook.pdf)

**Gastrulation depends on insulin in the rabbit blastocyst**

René Thieme, Nicole Ramin, Christoph Viebahn, Juliane Plitzner, Bernd Fischer and Anne Navarrete Santos, *Annual Meeting of the „Anatomische Gesellschaft“, September 26-28, 2007, Würzburg, Germany DOI 10.3337/anatges.2007.0004*

**Embryoblast- und Trophoblast-spezifische Signalwege von Insulin und IGF-1 in Kaninchenblastozysten**

Anne Navarrete Santos, Nicole Ramin, Sarah Tonack und Bernd Fischer *Annual Meeting of the „Anatomische Gesellschaft“, September 27-29, 2006, Würzburg, Germany, DOI 10.3337/anatges.2006.0003*

**Expression of adiponectin and its receptors in rabbit blastocysts**

Sünje Fischer, Thomas Schmidt, Nicole Ramin, Anne Navarrete Santos, René Thieme and Bernd Fischer, *Annual Meeting of the „Anatomische Gesellschaft“, September 26-28, 2007, Würzburg, Germany, DOI 10.3337/anatges.2007.0004*

Nichtveröffentlichte Beiträge*Vorträge***Signalling of growth factors in rabbit blastocysts depends on specific receptor expression in embryoblast and trophoblast cells**

Nicole Ramin, Anne Navarrete Santos and Bernd Fischer, *Annual Conference of the Society for Reproduction and Fertility (SRF), June 29- July 01, 2008, Edinburgh, United Kingdom*

**Expression of insulin growth factors in embryoblast and trophoblast of rabbit preimplantation embryos**

Nicole Ramin, Anne Navarrete Santos, Sarah Tonack and Bernd Fischer, *XXII Bilateral Symposium Halle-Posznan April, 2007, Halle, Germany*

**Expression of insulin receptor isoforms and IGF1-receptor in embryoblast and trophoblast of rabbit preimplantation embryos**

N Ramin, A Navarrete Santos, S Tonack and B Fischer, *40<sup>th</sup> Annual Meeting Physiology and Pathology of Reproduction February, 2007, Berlin, Germany*

*Poster***Metabolic and mitogenic effects of insulin and IGF1 in embryoblast and trophoblast of the rabbit blastocyst**

N Ramin, A Navarrete Santos and B Fischer, *2<sup>nd</sup> International Meeting on Mammalian Embryogenomics, October 17-20, 2007, Paris, France*

**Effects of insulin and insulin-like growth factor 1 on cell signalling in the embryoblast and trophoblast of rabbit blastocysts**

Anne Navarrete Santos, René Thieme, Nicole Ramin, Juliane Plitzner, Christoph Viebahn and Bernd Fischer *4<sup>th</sup> International Conference on the Female Reproductive Tract, June 8-11, 2007, Frauenchiemsee, Germany*

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiemit erkläre ich an Eides Statt, dass ich mich mit der vorliegenden Dissertation erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe und die Arbeit weder in gleicher noch ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt habe. Diese Arbeit habe ich selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Alle wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Des Weiteren erkläre ich, dass keine Strafverfahren gegen mich anhängig sind.

Halle (Saale), den

---

Nicole Ramin

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer möchte ich an dieser Stelle für die Ermöglichung meiner Promotion am Institut für Anatomie und Zellbiologie danken. Durch Motivation und Kritik an richtiger Stelle hat er Selbstvertrauen vermittelt und mich zu selbstständiger Arbeit angeregt. Seine immerwährende Diskussionsfreude war ein steter Quell neuer Ideen und Denkansätze.

Mein besonderer Dank gilt auch Fr. Dr. Anne Navarrete Santos, der guten Seele der Arbeitsgruppe. Sie begleitete mich beständig durch diese Arbeit und hatte immer ein offenes Ohr, sowohl für fachliche als auch private Freuden und Sorgen. Ihre ruhige, besonnene und kritische Analyse von gewonnenen Ergebnissen hat mich gelehrt Dinge zu hinterfragen, alles aus mehreren Perspektiven zu betrachten und nichts als gegeben zu akzeptieren.

Des Weiteren möchte ich mich bei den MTAs Michaela Kirstein, Elisabeth Schlüter und Sabine Schrötter bedanken für die hilfreiche Unterstützung bei Laborarbeiten und den Ideenreichtum bei auftretenden Schwierigkeiten.

Ebenso danke ich allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe und den Kollegen des Instituts für die dauernde Hilfsbereitschaft, die freundliche Unterstützung und das sehr gute Arbeitsklima.

Die vorliegende Arbeit wurde durch die Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt, durch DFG-Projekte (Fi301-6 und Na418/4-2), durch das Roux-Programm der Medizinischen Fakultät und durch den DAAD finanziell unterstützt.