

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

**Fettstoffwechsel in Blastozysten adipöser und nicht-adipöser Mäuse**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)  
vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Cornelia Alice Irene Königsdorf  
geboren am 23.10.1984 in Hanau

Gutachter: 1. Herr Prof. Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer  
2. Herr Prof. Dr. med. Blüher  
3. Frau Prof. Dr. habil. oec. troph. Stangl

Datum der Verteidigung: 11.10.2011

## Referat

Adipositas als Teil des Symptomenkomplexes „Metabolisches Syndrom“ rückt neben seinen immensen medizinischen und ökonomischen Problemen und Implikationen immer mehr unter dem Aspekt Fruchtbarkeit, Fortpflanzung und metabolische Programmierung von Nachkommen übergewichtiger Frauen in den Mittelpunkt wissenschaftlichen und gesellschaftspolitischen Interesses.

Die vorliegende Arbeit dient der Untersuchung des Fettstoffwechsels in Präimplantationsembryonen und frühester Veränderungen des Fettstoffwechsels in Blastozysten von adipösen NZO- und normalgewichtigen C57Bl/6-Mäusen, die am Tag 3,5 der Entwicklung, kurz vor Beginn der Implantation, gewonnen und untersucht wurden. Zunächst wurde dazu die cDNA der Blastozysten mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion qualitativ auf das Vorhandensein verschiedener Marker des anabolen und katabolen Lipidmetabolismus, der Cholesterolsynthese und des Fettsäuretransportes hin untersucht. Qualitativ ergab sich lediglich ein Unterschied zwischen beiden Mausstämmen im Fehlen des Retinoid-X-Rezeptors gamma in Blastozysten des NZO-Mausstammes.

Im nächsten Schritt wurden die Marker semiquantitativ mittels densitometrischer Messungen der PCR-Banden verglichen. Hierbei zeigten sich bei dem Fettsäuretransportprotein FATP4 und der Fettsäure-Synthase auf Transkriptionsebene sowie in der Regulation der Cholesterolsynthese Unterschiede zwischen beiden Mausstämmen, die in ihrer Zusammenschau Hinweise auf metabolische Veränderungen schon in diesem frühen Stadium der Entwicklung bei Adipositas der Mutter und damit eine metabolische „Fehlprogrammierung“ geben.

Inhalt

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Hintergrund.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Tiermodelle .....</b>	<b>2</b>
1.2.1 NZO.....	2
1.2.2 C57Bl/6.....	4
<b>1.3 Charakterisierung der untersuchten Parameter .....</b>	<b>4</b>
1.3.1 Anabole und katabole Marker des Lipidmetabolismus und der Glukoneogenese in Blastozysten.....	4
1.3.2 FATPs, ACS und CD36 .....	6
1.3.3 PPAR/RXR .....	7
1.3.4 FABPs .....	11
1.3.5 SREBP/INSIG und HMG-CoA-Reduktase/LDL-Rezeptor: Cholesterol- Metabolismus .....	12
1.3.6 Perilipin/Adipophilin.....	13
<b>1.4 Zielstellung.....</b>	<b>15</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Versuchstiere und Blastozystengewinnung .....</b>	<b>16</b>
2.1.1 Versuchstiere.....	16
2.1.2 Tierhaltung.....	16
2.1.3 Hormonelle Stimulation der Mäuse .....	16
2.1.4 Gewinnung der Blastozysten .....	17
<b>2.2 cDNA-Gewinnung .....</b>	<b>17</b>
2.2.1 RNA-Isolierung .....	17
2.2.2 Umschreibung der RNA in cDNA (Reverse Transkriptase-Reaktion) .....	19
<b>2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....</b>	<b>20</b>
<b>2.4 Auftrennung von DNA/RNA durch Gelelektrophorese.....</b>	<b>21</b>
<b>2.5 Isolation der DNA-Banden aus Agarosegel und Gelaufreinigung.....</b>	<b>22</b>

<b>2.6</b>	<b>Sequenzierungs-PCR und Fällung der DNA .....</b>	<b>22</b>
<b>2.7</b>	<b>Densitometrische Quantifikation der PCR-Banden mit <i>BIO-1D</i>.....</b>	<b>24</b>
<b>2.8</b>	<b>Materialien.....</b>	<b>24</b>
2.8.1	Chemikalien.....	24
2.8.2	Enzyme.....	26
2.8.3	Oligonukleotide .....	26
2.8.4	Geräte.....	27
2.8.5	Verbrauchsmaterialien .....	27
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Nachweis von Markern des Lipidstoffwechsels und der Glukoneogenese in Blastozysten (Tag 3,5) von NZO- und C57Bl/6-Mäusen.....</b>	<b>28</b>
3.1.1	Qualitativer Nachweis mittels PCR.....	28
3.1.2	Semiquantitativer Nachweis: Densitometrische Analyse der PCR-Banden ..	28
<b>3.2</b>	<b>Nachweis der FATPs und der Acyl-CoA-Synthetase in Blastozysten (Tag 3,5) von NZO- und C57Bl/6-Mäusen .....</b>	<b>29</b>
3.2.1	Qualitativer Nachweis mittels PCR.....	29
3.2.2	Semiquantitativer Nachweis: Densitometrische Analyse der PCR-Banden ..	29
<b>3.3</b>	<b>Nachweis der PPARs, der RXRs und der Prostaglandin-I<sub>2</sub>-Synthase in Blastozysten (Tag 3,5) von NZO- und C57Bl/6-Mäusen .....</b>	<b>30</b>
3.3.1	Qualitative Analyse mittels PCR.....	30
3.3.2	Semiquantitativer Nachweis: Densitometrische Analyse der PCR-Banden ..	31
<b>3.4</b>	<b>Nachweis von FABP1, 3 und 4 in Blastozysten (Tag 3,5) von NZO- und C57Bl/6-Mäusen .....</b>	<b>31</b>
3.4.1	Qualitativer Nachweis mittels PCR.....	31
3.4.2	Semiquantitativer Nachweis: Densitometrische Analyse der PCR-Banden ..	31
<b>3.5</b>	<b>Nachweis von INSIG1/ 2, SREBP1/ 2, LDL-Rezeptor und HMG-CoA- Reduktase in Blastozysten (Tag 3,5) von NZO- und C57Bl/6-Mäusen .....</b>	<b>31</b>
3.5.1	Qualitativer Nachweis mittels PCR.....	31
3.5.2	Semiquantitativer Nachweis: Densitometrische Analyse der PCR-Banden ..	32
<b>3.6</b>	<b>Nachweis von Perilipin und Adipophilin in Blastozysten (Tag 3,5) von NZO- und C57Bl/6-Mäusen .....</b>	<b>33</b>

3.6.1	Qualitativer Nachweis mittels PCR.....	33
3.6.2	Semiquantitativer Nachweis: Densitometrische Analyse der PCR-Banden ..	33
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Methodik.....</b>	<b>34</b>
4.1.1	Tiermodelle.....	34
4.1.2	Densitometrische Analyse.....	34
<b>4.2</b>	<b>Stoffwechselwege in Blastozysten.....</b>	<b>35</b>
4.2.1	Fettsäure-, Triglycerid- und Cholesterol-Aufnahme.....	35
4.2.2	Fettsäure-Transport.....	35
4.2.3	Fettsäure-Bindungsproteine.....	36
4.2.4	Beta-Oxidation.....	36
4.2.5	Fettsäuresynthese.....	37
4.2.6	Glukoneogenese.....	38
4.2.7	Cholesterol-Metabolismus.....	38
4.2.8	Regulation von Stoffwechselwegen: PPARs/RXR.....	39
4.2.9	RXR gamma-Defizienz.....	40
4.2.10	Prostaglandine und PPAR delta.....	41
4.2.11	Perilipin und Adipophilin.....	42
<b>4.3</b>	<b>Vergleich der NZO- und C57Bl/6-Blastozysten.....</b>	<b>42</b>
4.3.1	Ergebnisse des semiquantitativen Vergleichs.....	43
4.3.2	Cholesterol-Metabolismus: Veränderte Regulation in Blastozysten der NZO-Mäuse?.....	45
<b>4.4</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>46</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>TABELLEN- UND ABBILDUNGSANHANG.....</b>	<b>62</b>
<b>7.1</b>	<b>Übersicht Primersequenzen.....</b>	<b>62</b>
<b>7.2</b>	<b>Ergebnisse: PCR-Banden der untersuchten Marker.....</b>	<b>64</b>

7.2.1	Marker des Lipidstoffwechsels und der Glukoneogenese in Blastozysten von NZO- und C57Bl/6-Mäusen .....	64
7.2.2	FATPs und Acyl-CoA-Synthetase in Blastozysten von NZO- und C57Bl/6-Mäusen .....	65
7.2.3	Fettsäure-Bindungsproteine in Blastozysten von NZO- und C57Bl/6-Mäusen.....	65
7.2.4	PPARs, RXRs und Prostaglandin- $I_2$ -Synthase in Blastozysten von NZO- und C57Bl/6-Mäusen.....	66
7.2.5	Cholesterol-Metabolismus in Blastozysten von NZO- und C57Bl/6-Mäusen	67
7.2.6	Adipophilin und Perilipin in Blastozysten von NZO- und C57Bl/6-Mäusen....	67
<b>7.3</b>	<b>Ergebnisse: Densitometrische Messungen .....</b>	<b>68</b>
7.3.1	Anabole und katabole Stoffwechselwege in Blastozysten von NZO- und C57Bl/6-Mäusen.....	68
7.3.2	FATPs und Acyl-CoA-Synthetase .....	69
7.3.3	PPARs, RXRs und Prostaglandin- $I_2$ -Synthase .....	70
7.3.4	FABPs .....	71
7.3.5	Perilipin, Adipophilin.....	71
7.3.6	Cholesterol-Metabolismus.....	72
<b>8</b>	<b>THESEN.....</b>	<b>73</b>

Abkürzungsverzeichnis

<b>ACC</b>	Acetyl-CoA-Carboxylase
<b>ACO</b>	Acyl-CoA-Oxidase
<b>ACS</b>	Acyl-CoA-Synthetase
<b>ART</b>	Assistierte Reproduktion
<b>ATGL</b>	Adipose Triglyceride lipase
<b>BI6</b>	Mausstamm C57BI/6
<b>BMI</b>	Body-Mass-Index
<b>C57BI/6</b>	C57BI/6-Mausstamm
<b>CD 36</b>	Cluster of differentiation No. 36
<b>cDNA</b>	Complementary DNA
<b>CPT</b>	Carnitin-Palmitoyl-Transferase
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonate
<b>dNTPs</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<b>EÄ</b>	Embryonenäquivalente
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid
<b>FABP</b>	Fatty acid-binding protein
<b>FATP</b>	Fatty acid transport protein
<b>FSS</b>	Fettsäure-Synthase
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase
<b>GTC</b>	Guanidiniumthiocyanat
<b>hCG</b>	Humanes Choriongonadotropin
<b>HDL</b>	High-density lipoprotein
<b>HMG-CoA-Reduktase</b>	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A- Reduktase
<b>HSL</b>	Hormonsensitive Lipase
<b>INSIG</b>	Insulin-induced gene
<b>IU</b>	International unit
<b>IVF</b>	In-Vitro-Fertilisation
<b>KHK</b>	Koronare Herzkrankheit
<b>LCPUFAS</b>	Long-chain-poly-unsaturated fatty acids
<b>LDL-Rezeptor</b>	Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor
<b>LPL</b>	Lipoproteinlipase
<b>PEPCK</b>	Phosphoenolpyruvat Carboxykinase

<b>NIDDM</b>	Non insulin dependent diabetes mellitus
<b>NZO</b>	New Zealand Obese-Mausstamm
<b>OCTN2</b>	Organic cation/carnitine transporter 2
<b>PAT-Proteine</b>	Lipid-Tropfen-assozierte Proteine
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PCR</b>	Polymerase-Ketten-Reaktion
<b>PKA</b>	Proteinkinase A
<b>PMSG</b>	Pregnant Mare Serum Gonadotropin
<b>PPARs</b>	Peroxisome proliferator-activated receptors
<b>PPRE</b>	PPAR-response-element
<b>PVA</b>	Polyvinylalkohol
<b>RXR</b>	Retinoid X receptor
<b>SCAP</b>	SREBP cleavage activating protein
<b>SDS</b>	Sodium Dodecyl Sulphate
<b>SRE</b>	Sterol regulatory element
<b>SREBP</b>	Sterol regulatory element-binding protein
<b>T3, 4</b>	Schilddrüsenhormone Trijodthyronin und Thyroxin
<b>TAE-Puffer</b>	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<b>TZD</b>	Thiazolidinedione

Abbildungverzeichnis

<b>Abbildung 1</b> NZO-Mausstamm.....	3
<b>Abbildung 2</b> Überblick über Fettsäurezufuhr sowie anabole und katabole Stoffwechselwege in einer Zelle. ....	5
<b>Abbildung 3</b> Überblick über PPAR-Signalweg und Zielgene .....	8
<b>Abbildung 4</b> Prinzip der DNA-Sequenzierung nach der Dideoxy-Methode. ....	23
<b>Abbildung 5</b> Densitometrische Messungen: Fettsäure-Synthase .....	29
<b>Abbildung 6</b> Densitometrische Messungen: FATP4 .....	30
<b>Abbildung 7</b> PCR-Banden von RXR gamma in Blastozysten des C57Bl/6- Mausstammes.....	30
<b>Abbildung 8</b> PCR-Banden von RXR gamma in verschiedenen Geweben adulter Tiere des NZO- und C57Bl/6-Mausstammes. ....	31

<b>Abbildung 9</b> Mittelwerte der GAPDH-korrigierten densitometrischen Messungen von SREBP1 im Verhältnis zu INSIG1 und 2 in NZO- und C57Bl/6-Blastozysten.....	32
<b>Abbildung 10</b> Mittelwerte der GAPDH-korrigierten densitometrischen Messungen von SREBP2 im Verhältnis zu INSIG1 und 2 in NZO- und C57Bl/6-Blastozysten.....	32
<b>Abbildung 11</b> In Mausblastozysten nachgewiesene Marker des Lipidmetabolismus: Aufnahme von Fettsäuren über Fettsäuretransporter (FATPs) und intrazellulärer Transport.....	36
<b>Abbildung 12</b> In Mausblastozysten nachgewiesene Marker des Lipidmetabolismus: Überblick über katabole Metabolisierung von Fettsäuren. ....	37
<b>Abbildung 13</b> In Mausblastozysten nachgewiesene Marker des Lipidmetabolismus: Cholesterol-Aufnahme und Regulation. ....	39
<b>Abbildung 14</b> Möglicher Mechanismus zur Regulation der Fettsäure-Homöostase in Blastozysten von NZO-Mäusen. ....	45
<b>Abbildung 15</b> PCR-Banden von Markern des Lipidstoffwechsels und der Glukoneogenese in Blastozysten des NZO- und C57Bl/6-Mausstammes.....	64
<b>Abbildung 16</b> PCR-Banden von FATP1-5 und der Acyl-CoA-Synthetase (ACS) in Blastozysten des NZO- und C57Bl/6-Mausstammes. ....	65
<b>Abbildung 17</b> PCR-Banden von FABP3 und 4 in Blastozysten des NZO- und C57Bl/6-Mausstammes. ....	65
<b>Abbildung 18</b> PCR-Banden von PPAR alpha/ gamma/ delta, Prostaglandin-I <sub>2</sub> -Synthase und RXR alpha/ beta in Blastozysten des NZO- und C57Bl/6-Mausstammes .....	66
<b>Abbildung 19</b> PCR-Banden von INSIG1/2, SREBP1/2, HMG-CoA-Reduktase und des LDL-Rezeptors in Blastozysten des NZO- und C57Bl/6-Mausstammes.....	67
<b>Abbildung 20</b> PCR-Banden von Adipophilin und Perilipin in Blastozysten des NZO- und C57Bl/6-Mausstammes. ....	67
<b>Abbildung 21</b> Densitometrische Messungen von Markern des Lipidstoffwechsels und der Glukoneogenese.....	68
<b>Abbildung 22</b> Densitometrische Messungen: FATP1-5.....	69
<b>Abbildung 23</b> Densitometrische Messungen: PPARs, RXRs und Prostaglandin-I <sub>2</sub> -Synthase.....	70
<b>Abbildung 24</b> Densitometrische Messungen: FABP3 und 4.....	71
<b>Abbildung 25</b> Densitometrische Messungen: Perilipin und Adipophilin .....	71
<b>Abbildung 26</b> Densitometrische Messungen: Cholesterol-Metabolismus .....	72

## 1 Einleitung

### 1.1 Hintergrund

Im Jahre 2010 wurde der Physiologe Professor Robert Geoffrey Edwards von der Universität Cambridge (UK) mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet. Er ist einer der ersten Pioniere der Assistierte Reproduktion (*ART*) und somit Wegbereiter für die Erfüllung des Kinderwunsches bei ungewollt kinderlosen Paaren. 2002 schätzte das *International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART, de Mouzon et al., 2002)* die Zahl der durch diese Methoden geborenen Kinder weltweit auf 219.000 bis 246.000.

Ein häufiger Grund für Infertilität und Sterilität ist das *Polyzystische Ovarialsyndrom (PCO)* der Frau, das häufig mit Adipositas, Hyperandrogenämie und Hyperinsulinämie einhergeht. Häufig entwickeln die Betroffenen im weiteren Verlauf klassische Symptome des Metabolischen Syndroms, wie Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie und Koronare Herzkrankheit (KHK) (Vignesh und Mohan, 2007). Das mütterliche Körpergewicht beeinflusst dabei zwar nicht die Qualität der durch ART erzeugten Embryonen, wohl aber sinkt die Schwangerschaftsrate und Anzahl der Lebendgeburten mit steigendem Body-Mass-Index (Bellver et al., 2010).

Durch Assistierte Reproduktionsverfahren gezeugte Kinder weisen später erhöhte systolische sowie diastolische Blutdruckwerte und Triglyceridwerte auf (Sakka et al., 2010). Bei Mäusen wurden veränderte Glukoseutilisation und erhöhtes Körpergewicht bei durch ART erzeugten Tieren im Gegensatz zu ihren auf „natürlichem“ Wege entstandenen Artgenossen festgestellt (Scott et al., 2010).

Laut Ernährungsbericht 2008 der Deutschen Gesellschaft für Ernährung sind in Deutschland im Alter zwischen 14 und 80 Jahren 50% der Frauen und 68% der Männer übergewichtig (Body-Mass-Index  $> 25 \text{ kg/m}^2$ ). Neben den gesundheitlichen Folgen für den Einzelnen wirkt sich Adipositas ebenso auf die wirtschaftliche Situation aus – rund 6% der Ausgaben des Gesundheitswesens in der Europäischen Union sind auf direkte Folgen des Übergewichts zurückzuführen (Europäische Ministerkonferenz der WHO zur Bekämpfung der Adipositas. Bericht über die Konferenz. (2007), S.22).

Diese Daten offenbaren die Dringlichkeit, mit der Pathogenese, Prophylaxe und Therapie der Adipositas wissenschaftlich zu untersuchen sind.

Im Zentrum des Interesses steht dabei auch die pränatale Programmierung von Stoffwechselerkrankungen (metabolische Programmierung). So erhöht eine maternale pränatale Hyperglykämie im Rahmen eines Gestationsdiabetes das Risiko für die Entwicklung kindlichen Übergewichts (Hillier et al., 2007; Simerly, 2008). Weiterhin spielen mütterliche Spiegel von Glukose, Leptin und inflammatorischen Zytokinen eine Rolle in der Genese der Adipositas (Sullivan und Grove, 2010). Eine fettreiche Ernährung während der Schwangerschaft kann die hypothalamische Entwicklung des Feten verändern und steht im Verdacht, hierdurch spätere Verhaltensveränderungen, wie eine erhöhte Nahrungsaufnahme und Vorliebe für fettreiche Speisen, auszulösen (Chang et al., 2008).

Der maternale metabolische Status beeinflusst demnach entscheidend die Stoffwechselsituation der Nachkommen. Nicht geklärt ist, ab welchem Entwicklungsalter die spätere metabolische Fehlprogrammierung beginnt. Durch die Untersuchung von Präimplantationsembryonen im Blastozystenstadium kann ein Organismus untersucht werden, der ganz am Anfang der Ontogenese steht. Die Blastozyste verfügt zwar über einen eigenständigen Metabolismus, ist aber direkt abhängig vom maternalen Stoffwechsel und dem sie umgebenden uterinen Milieu. Veränderungen in einem so frühen Stadium der Entwicklung, beispielsweise im Lipidmetabolismus, ließen somit bereits auf früheste Fehlprägungen im adipösen Organismus schließen und hätten dadurch klinische Bedeutung, unter anderem für die Ernährungsberatung potentieller Mütter und Schwangerer oder die Embryonenkultivierung bei Verfahren der Assistierte Reproduktion.

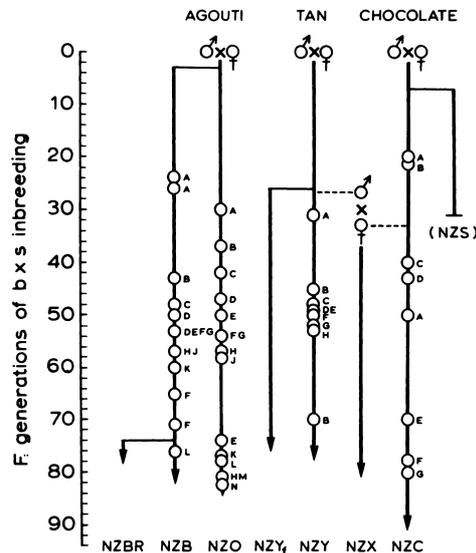
### 1.2 Tiermodelle

#### 1.2.1 NZO

Um Komponenten des Metabolischen Syndroms zu untersuchen, eignet sich die *New Zealand Obese* (NZO)-Maus als gut untersuchtes und etabliertes Mausmodell. Sie entstammt ursprünglich einer Gruppe zufallsverpaarter Mäuse, die 1930 durch W. H. Hall aus den *Imperial Cancer Research Fund Laboratories* Mill Hill, London, an die Universität der Otago Medical School, Neuseeland, gebracht wurden. Ab 1948 wurden dann im Krebsforschungsinstitut der Universität von Otago jeweils Tiere mit ähnlicher Fellfarbe gekreuzt und weitergezüchtet.

Ab der dritten Generation (F3) wurden jeweils Tiere mit agoutifarbenem (graue Wildfarbe) Fell Inzucht-verpaart. Die aus dieser Population abstammende F10-Generation wies adipöse Tiere auf, die in den nächsten fünf Generationen selektiert

und weiter Inzucht-verpaart wurden. Diese adipösen Tiere werden seitdem als *New Zealand Obese* (NZO)-Stamm weitergeführt. Andere Stämme aus der agoutifarbenen Linie sind die NZB- und NZBR-Mäuse, die unter anderem als Modelltiere zur Erforschung der hämolytischen Anämie dienen (Bielschowsky und Goodall, 1970).



**Abbildung 1** NZO-Mausstamm.

Bielschowsky M, Goodall CM (1970) Origin of Inbred NZ Mouse Strains. *Cancer Research* 30, 834-836. p834.

Typisch für die NZO-Maus ist, neben ihrem adipösen Phänotyp (40% Fettanteil am Gesamtkörpergewicht im Alter von 6 Monaten) und der Hypercholesterinämie, die Entwicklung von Typ 2-Diabetes mit Insulinresistenz, Hyperinsulinämie und Glukoseintoleranz (Giesen et al., 2003; Chankiewitz, 2006; Jürgens et al., 2006), was sie auch als diabetisches Tiermodell interessant macht. Schon seit längerem wird ein Autoimmungeschehen als Ursache der diabetogenen Stoffwechsellage angesehen (Melez et al., 1980; Haskell et al., 2002). In der Pathogenese der Hypercholesterinämie scheinen mehrere genetische Besonderheiten eine Rolle zu spielen (Coleman et al., 1978; Giesen et al., 2003), unter anderem eine genetische Veränderung des Leptinrezeptors (Kluge et al., 2000). Als vaskulärer Folgeschaden der Hyperinsulinämie und metabolischen Entgleisung weisen die Tiere zudem eine Hypertonie auf (Ortlepp et al., 2000).

Auf biochemischer Ebene sind in adulten Tieren Hyperinsulinämie-assoziierte Anstiege der Transkriptraten von Enzymen der Lipolyse und Lipogenese, der Glykolyse aber auch der Glukoneogenese beschrieben worden, die sich zudem durch eine fettreiche

Diät verstärkten. Dies spricht für eine Entkopplung der Insulin-Effekte auf den Glukose- und Fettstoffwechsel (Becker et al., 2004).

Auch im Verhalten der NZO-Mäuse finden sich Auffälligkeiten, die an der Genese der Adipositas beteiligt zu sein scheinen: Neben einer erhöhten Nahrungsaufnahme zeigen sie eine deutlich verringerte physische Aktivität (Jürgens et al., 2006). Besonders häufig treten in den NZO-Inzuchtstämmen bösartige Lymphome der Peyer-Plaques sowie Duodenum- und Lungen-Karzinome auf, was diesen Mausstamm auch für die Krebsforschung interessant macht (Goodall et al., 1973).

### 1.2.2 C57Bl/6

Dieser Inzuchtstamm hat seinen Ursprung 1921, als Clearance Little ein Geschwisterpaar aus der Maus-Zucht von Abby Lathrop verpaarte. Die Nachkommen des Weibchens mit der Kennung 57 und dem Männchen 52 sind der Beginn der Zuchtlinien C57Bl, C57L und C57BR. 1937 wurden die Stämme 6 und 10 separiert. Ihre Fellfarbe ist schwarz (Bl). C57Bl/6 ist seitdem einer der meistgenutzten Inzuchtstämme.

## 1.3 Charakterisierung der untersuchten Parameter

### 1.3.1 Anabole und katabole Marker des Lipidmetabolismus und der Glukoneogenese in Blastozysten

Im Folgenden sollen Marker verschiedener Stoffwechselwege vorgestellt werden, auf deren Vorhandensein die cDNA der Blastozysten von NZO- und C57Bl/6-Mäusen untersucht wurde.

Beta-Oxidation: Sie bereitet den schrittweisen Abbau der Fettsäuren zu Acetyl-CoA

sowie  $\text{FADH}_2$  und  $\text{NADH}/\text{H}^+$  zur Energiegewinnung in Form von Adenosin-Triphosphat (ATP) über den Citratzyklus und die Atmungskette. Daran beteiligt sind:

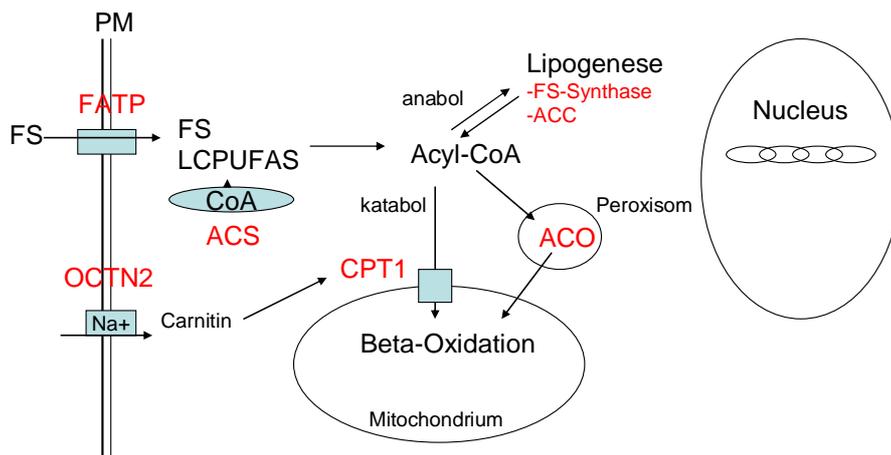
- Acyl-CoA-Synthetase (ACS): Verestert Fettsäuren ATP-abhängig mit Coenzym A und aktiviert sie somit.
- Acyl-CoA-Oxidase (ACO): Erstes Enzym der Beta-Oxidation langkettiger Fettsäuren; befindet sich in Peroxisomen (Varanasi et al., 1994).
- Carnitin-Palmitoyl-Transferase (CPT): Überträgt den Acyl-Rest von Coenzym A auf Carnitin, ein Molekül, das die Mitochondrienmembran passieren kann. Das Enzym ist somit für den Zufluss der Fettsäuren zur mitochondrialen Beta-Oxidation zuständig (Königshoff M, Brandenburger T: Kurzlehrbuch Biochemie, 1. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart/ New York, 2004, S.56)

- OCTN2 (*Organic cation/carnitine transporter*): Natrium-abhängiger Transporter, der organische Kationen und Carnitin in die Zelle befördert (Ohashi R et al., 2002).

Fettsäuresynthese: Die Fettsäure-Synthase (FSS) ist ein zytosolischer Multienzymkomplex, der unter anderem durch Insulin reguliert und durch SREBP1 induziert wird (Oem et al., 2008). Die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Fettsäurebiosynthese (Lin et al., 2006).

Lipoproteinlipase (LPL): Sie spaltet Triglyceride in Fettsäuren und Glycerin und ermöglicht so die Aufnahme der Fettsäuren in die Zellen. Eine Defizienz dieses Enzyms führt zu Hypertriglyceridämie (Barbagallo et al., 2004).

Glukoneogenese: Die mitochondriale Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (mitochPEPCK) fungiert als Schlüsselenzym des Synthesevorgangs.



**Abbildung 2** Überblick über Fettsäurezufuhr sowie anabole und katabole Stoffwechselwege in einer Zelle.

Fettsäuretransport: FATP (*Fatty acid transport protein*); Natrium/Carnitin-Transporter: OCTN2 (*organic cation/carnitine transporter*); Fettsäure-Veresterung mit CoA (Coenzym A): ACS (*Acyl-CoA-Synthetase*); Zufuhr zur Beta-Oxidation: CPT1 (*Carnitin-Palmitoyl-Transferase*); Beta-Oxidation: ACO (*Acyl-CoA-Oxidase*); Fettsäure-Synthese: Fettsäure-Synthase und ACC (*Acetyl-CoA-Carboxylase*). PM=Plasmamembran, FS=Fettsäuren, LCPUFAS= *Long-chain-poly-unsaturated fatty acids*.

### 1.3.2 FATPs, ACS und CD36

Fettsäuren sind essentiell für viele intrazelluläre Prozesse, sowohl als Metabolite, strukturelle Komponenten aber auch als Liganden intrazellulärer Signalmoleküle und Enzyme, wie beispielsweise den PPARs und der Proteinkinase C (Stahl, 2004).

Vor allem langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren (LCPUFAS) werden von extern in die Zelle aufgenommen. Dies kann zum einen bis zu einer Länge von 10 C-Atomen durch Diffusion geschehen. Dieser Prozess ist jedoch in seiner Kapazität limitiert und geschieht nicht entgegen einem ansteigenden Konzentrationsgradienten. Daher existieren aktive Transportsysteme, die Fettsäuretransportproteine (FATPs). Sie sind Mitglieder der Transporterfamilie der *Solute Carrier Family 27* und werden auch als ACSVL bezeichnet (*enzyme with very long-chain acyl-CoA synthetase activity*), da sie als Co-Enzym die Aktivität der Acyl-CoA-Synthetase benötigen. Diese verestert die Fettsäuren nach dem Transport über die Plasmamembran mit aktiviertem Coenzym A (CoA), sodass die Fettsäuren nun nicht mehr durch Diffusion aus der Zelle entweichen können (Coe et al., 1999). In dieser aktivierten Form können die Substrate nun verschiedenen Stoffwechselwegen zugeführt werden.

Eine weitere Koexistenz der FATPs ergibt sich für FAT/CD36 (*Fatty acid translocase*). Dieses Oberflächenmolekül bindet freie Fettsäuren und führt es anschließend den aktiven Transportern zu. Somit erleichtert es die Fettsäureaufnahme (Fisher et al., 2005).

LCPUFAS und ihre Transportsysteme sind für die embryonale Frühentwicklung wichtig. So zeigen befruchtete Eizellen, die sich über das 4-Zell-Stadium hinaus entwickeln können, eine höhere Konzentration an langkettigen ungesättigten Fettsäuren als jene, die in ihrer Entwicklung zurückbleiben (Haggarty et al., 2006). In humanen Trophoblastzellen konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass LCPUFAS selbst die zelluläre Fettsäureaufnahme regulieren können (Johnsen et al., 2009).

In Mammalia werden sechs Isoformen der FATPs beschrieben, FATP1 bis 6, in der Maus allerdings lediglich die Isoformen 1 bis 5. Sie werden gewebsspezifisch exprimiert. Beispielsweise wird FATP1 vermehrt im Fettgewebe, Skelettmuskel, Hirn und Herz gebildet. Zusätzlich besteht bei FATP1 eine Kolokalisation mit GLUT4. Es besteht eine insulinsensitive Translokation beider Transportsysteme in die Plasmamembran (Stahl et al., 2002). FATP4 wird vorwiegend im Intestinum exprimiert und dient hier der Resorption der Fettsäuren in die Enterozyten.

FATP1 und 4 spielen zudem eine Rolle bei der Entstehung von Adipositas und Insulinresistenz. So zeigt sich im FATP1-*knock-out*-Modell eine Protektion gegenüber der metabolischen Entgleisung (Wu et al., 2006). Für FATP4 ist die Datenlage nicht ganz so eindeutig. Es zeigt sich aber eine erhöhte Expression im Fettgewebe adipöser

Mäuse, sodass auch hier ein Zusammenhang mit Adipositas vermutet wird (Fisher et al., 2005). Auch für FATP5, dem in der Leber vorherrschenden Transportsystem, zeigt sich bei *knock-out*-Mäusen ein Schutz vor Gewichtszunahme im Mastversuch, begründbar durch eine verringerte Nahrungsaufnahme und erhöhten Energieverbrauch (Hubbard et al., 2006).

Ob die FATPs sich dabei nur an der Zellmembran befinden oder ob sie auch eine Aktivität im Zellplasma oder an intrazellulären Membransystemen aufweisen, ist noch nicht eindeutig geklärt. So wird für FATP2 als ebenfalls vorwiegend hepatischem Transportmolekül sowohl eine peroxisomale als auch plasmamembranale Lokalisation diskutiert (Falcon et al., 2010), für FATP1 an der Plasmamembran und für FATP6 am Sarkolemm (Stahl, 2004).

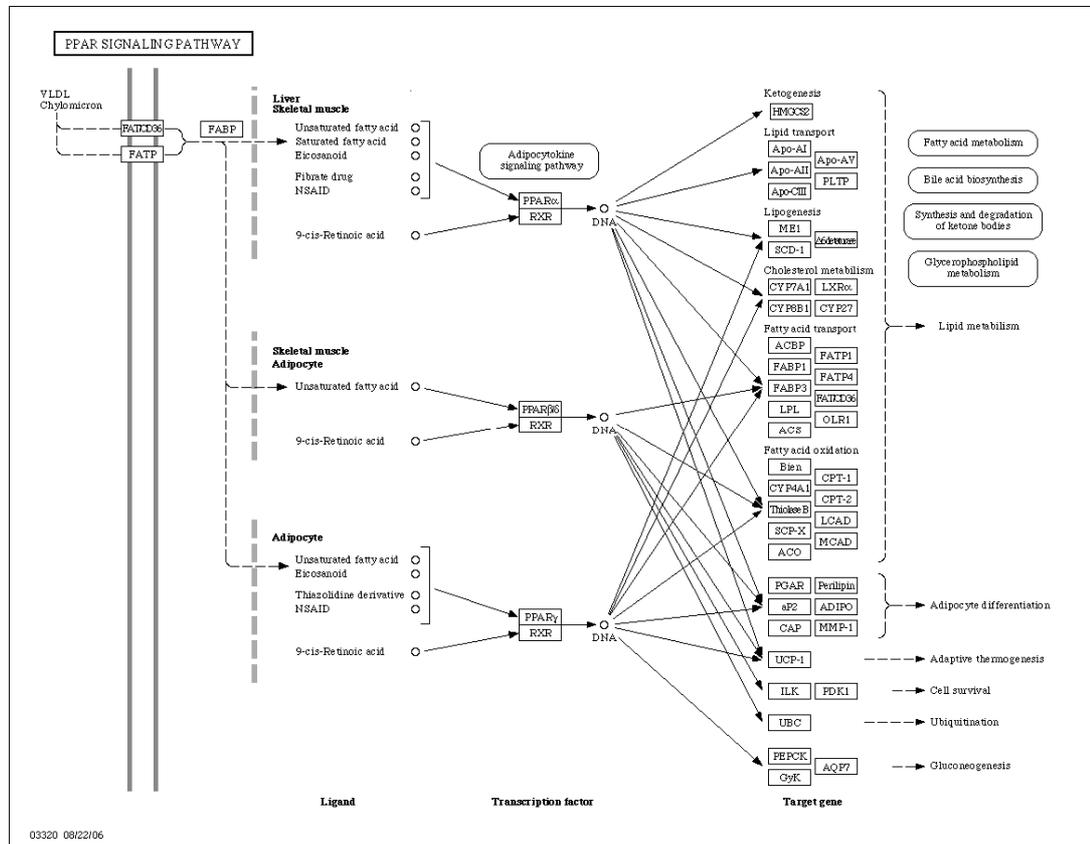
Die Regulation der FATPs geschieht durch unterschiedliche Mechanismen: Zum einen erhöht ein größeres Substratangebot den Einbau der Fettsäuretransporter, zum anderen hat Insulin einen Einfluss darauf (s.o.). Der entscheidende Signalmechanismus aber führt über die *Peroxisome proliferator-activated receptors*, kurz PPARs. Diese intrazellulären Signalmoleküle besitzen unter anderem Rezeptoren für Fettsäuren und Prostaglandine. Sie bilden auf ein Signal hin Heterodimere mit den *Retinoid-X-Rezeptoren* (RXRs). Diese Verbindung kann anschließend im Nukleus als Transkriptionsfaktor für Gene mit einer entsprechenden *PPAR*-Response-Region fungieren (Schoonjans et al., 1996a). Zielgene sind dabei unter anderem die FATPs im Sinne eines positiven Feedbacks (Schaiff et al., 2005), aber auch andere Marker des Fettstoffwechsels, des Lipidtransports, der Acyl-CoA-Synthetase-Aktivität und der adipogenen Differenzierung (Schoonjans et al., 1996b).

### 1.3.3 PPAR/RXR

Die *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs) sind eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die viele Prozesse des Lipidstoffwechsels, des Lipidtransportes, der Adipozyten-Differenzierung und der Glukose-Homöostase regulierend beeinflussen. Sie gehören zur Superfamilie der Steroidrezeptoren und existieren in drei Formen: PPAR alpha, beta/delta und gamma. PPAR gamma wiederum existiert in zwei Unterformen, PPAR gamma 1 und 2. Um als Transkriptionsfaktor im Nukleus aktiv zu werden, bilden die PPARs Heterodimere mit den RXRs. Liganden der PPARs sind hierbei sowohl LCPUFAS als auch einige Eicosanoide, Fibrate und Tiazolidinedione (TZDs), auch als Glitazone bezeichnet. Sowohl Fibrate als auch TZDs finden in ihrer Funktion als PPAR-Agonisten pharmakologische Verwendung in der Behandlung von Insulinresistenz und Hyperlipidämie (Vidal et al., 2005). Pharmakologisch wird die Gabe von Agonisten aller drei PPAR-Isoformen, sogenannte Pan-PPAR-Agonisten wie

das Präparat *Bezafibrate* (PPAR alpha+gamma+delta-Agonist), im Mastversuch als wirkungsvoller angesehen als die Gabe eines selektiven Agonisten einer Isoform (PPAR alpha- oder gamma-Agonist). Sie vermindern Gewichtszunahme und die Entwicklung von Glukose-Intoleranz effektiver als beispielsweise *Rosiglitazone*, ein selektiver PPAR-gamma-Agonist. Die gleichzeitige Aktivierung aller drei Isoformen schützt somit besser vor der Entwicklung eines Metabolischen Syndroms während einer Mastdiät als alleinige PPAR-alpha- oder -gamma-Aktivierung. Dies findet in der Forschung zur medikamentösen Therapie von Insulinresistenz und metabolischer Entgleisung Beachtung (Fernandes-Santos et al., 2009).

Die Zielgene dieser Transkriptionsfaktoren sind vielfältig. Die folgende Abbildung 3 gibt einen Überblick über deren Bandbreite. Viele der in dieser Arbeit untersuchten Marker sind Zielgene der PPAR/RXR-Dimere.



**Abbildung 3** Überblick über PPAR-Signalweg und Zielgene.

([http://apropos.mcw.edu/kegg\\_pathways/03320](http://apropos.mcw.edu/kegg_pathways/03320)), Kegg ID 03320., abgerufen am 04.02.2011.

PPAR alpha wird vor allem in der Leber und in der Skelettmuskulatur exprimiert; PPAR gamma dagegen in erster Linie im Fettgewebe (Aléman et al., 2004).

Die Funktionen von PPAR alpha sind neben der Induktion der zellulären Peroxisomen-Produktion die Induktion von Enzymen und Proteinen der Beta-Oxidation. PPAR alpha stimuliert dabei vor allem die hepatische Fettsäure-Oxidation und stellt somit in einer katabolen Stoffwechsellage die Energieversorgung anderer Gewebe sicher. Hierdurch erklärt sich die Bedeutung von PPAR alpha beim Fasten (Kersten et al., 1999).

Klinische Anwendung findet die Funktion von PPAR alpha durch den pharmakologischen Einsatz der Fibrate, die als Agonisten dieser Transkriptionsfaktoren wirken. Durch die agonistische Aktivierung kommt es zu einer Senkung der Triglyceridkonzentration und zu einer Erhöhung der HDL-Spiegel (*High density-Lipoprotein*). Besonders Patienten mit Metabolischem Syndrom profitieren von diesem Wirkmechanismus, allerdings nur als *second-line*-Therapie in Kombination mit anderen Pharmaka (Remick et al., 2008).

PPAR gamma ist neben dem Glukose- und Lipidmetabolismus vor allem in Kombination mit RXR alpha an der Adipozyten-Differenzierung und der zellulären Lipidakkumulation beteiligt (siehe Kapitel 1.3.6) (Metzger et al., 2005; Schaiff et al., 2005). PPAR gamma-Aktivierung führt dabei unter anderem zu einem Anstieg von FATP4 und Adipophilin in humanen Trophoblastzellen (Schaiff et al., 2005), sodass diesem Transkriptionsfaktor eine wichtige Bedeutung bei der Regulation von Fettsäure-Transport und zellulärem Fettspeicher während der Embryogenese zugesprochen werden muss. Das Heterodimer PPAR gamma/RXR alpha erhöht weiterhin die Transkriptionen von humanem Choriongonadotropin beta und spielt in vitro eine Rolle bei der Trophoblast-Differenzierung (Tarrade et al., 2001). PPAR gamma/RXR alpha-Dimere sind zudem Ziele der Thiazolidinedione (TZDs) oder Glitazone, die in der Therapie des Nicht-Insulin-abhängigen Diabetes mellitus (NIDDM) eingesetzt werden. PPAR gamma-Stimulation führt dabei zu einer Zunahme der Adipozyten-Differenzierung und der Zahl kleiner Adipozyten. Sie senkt die Adipozyten-Hypertrophie, was wiederum die Insulinresistenz der Zellen senkt (Terauchi et al., 2007). Allerdings führt im Tiermodell auch eine moderate funktionelle Antagonisierung von PPAR gamma/RXR zu einem Schutz vor der Entwicklung von Adipositas und Diabetes mellitus während einer Mastdiät (Kadowaki et al., 2001). PPAR gamma besitzt somit sowohl protektive als auch begünstigende Effekte im Hinblick auf die Entwicklung eines Metabolischen Syndroms. Neue Studien erhärten den Verdacht, dass PPAR gamma mit seinem Heterodimerpartner RXR alpha als Regulator von Adiponectin wirkt und auch über diesen Weg eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des Metabolischen Syndroms spielt (Kouidhi et al., 2010).

PPAR delta wirkt als Transkriptions-Repressor auf zweierlei Art: Zum einen reduziert PPAR delta die allgemeine Transkriptionsrate einer Zelle, zum anderen reduziert er insbesondere die Zielgene der anderen PPAR-Isoformen, PPAR alpha und gamma. So blockiert eine PPAR delta-Aktivierung im Zellversuch die PPAR gamma-induzierte Expression der Acyl-CoA-Oxidase sowie der Adipogenese und wirkt dadurch sowohl anti-lipidoxidativ als auch anti-lipogenetisch (Shi et al., 2002). PPAR delta kann somit als Gegenspieler von PPAR alpha und gamma angesehen werden, da die  $\frac{PPAR\ delta}{PPAR\ alpha\ und\ PPAR\ gamma}$ -Ratio bestimmend für deren Aktivität ist (Shi et al., 2002). Weiterhin greift PPAR delta in die zelluläre Cholesteroll-Homöostase ein, indem es das *insulin-induced gene 1* (INSIG1) induziert und so die Aktivierung von SREBP1 unterdrückt (Qin et al., 2008). Es wirkt somit auch über diesen Mechanismus anti-lipogenetisch über die Unterdrückung der Cholesteroll-Synthese (siehe Kapitel 1.3.5). PPAR delta kommt in der Embryogenese als Rezeptor für Prostaglandin-I<sub>2</sub> (Prostazyklin) eine Bedeutung zu. Über den PPAR delta-Mechanismus erhöht Prostazyklin das Hatching-Potential von Maus-Embryonen. Somit ist PPAR delta ein mögliches therapeutisches Ziel in der ART (Huang et al., 2003, 2007) und fungiert als wichtiger Faktor während der Implantation und frühen Dezidualisation (Pakrasi et al., 2008).

Es existieren drei Formen der *Retinoid-X-Rezeptoren*, RXR alpha, beta und gamma. Wie oben beschrieben, dienen sie als Bestandteile der PPAR/RXR-Transkriptionsfaktoren der Expressionsinduktion vieler Stoffwechsellmarker. Als hochaffiner Ligand fungiert 9-cis-Retinsäure. Sie können sowohl Homodimere untereinander als auch, neben den PPARs, Heterodimere mit RARs (*retinoic acid receptors*), Thyreoid-Hormon-Rezeptoren, Vitamin D-Rezeptoren oder anderen nukleären Faktoren bilden (Willy et al., 1995; Nohara et al., 2009).

Während das Expressionsmuster von RXR beta nahezu ubiquitär erscheint, zeigt RXR gamma eine unterschiedliche Verteilung seiner Transkriptionsraten: Der Rezeptor ist vor allem im Skelettmuskel, im Herzmuskel, einigen Teilen des Gehirns und in Adipozyten vertreten. RXR alpha wird vermehrt in Leber, Niere, Epidermis und im Intestinum exprimiert (Shulman et al., 2005; Nohara et al., 2009).

Verschiedene *knock-out*-Mausmodelle haben ergeben, dass ein einziges funktionsfähiges RXR-alpha-Allel in RXR gamma -/-/RXR beta -/-/RXR alpha +/- Mäusen für eine normale Entwicklung und postnatales Überleben genügt. Die Tiere können sich, trotz reduziertem Gewicht und Körpergröße, regelrecht bis ins Erwachsenenalter entwickeln. (Krezel et al., 1996; Mark et al., 1997) Dies spricht für eine hohe funktionelle Redundanz innerhalb der RXRs.

RXR alpha  $-/-$  Embryonen zeigen dagegen eine schwere kardiale Fehlbildung, die in vivo an Tag 14,5 der Entwicklung letal endet. Dies zeigt die entscheidende Rolle von RXR alpha in der Kardiogenese (Gruber et al., 1996). Dagegen überleben RXR beta-defiziente Nachkommen. Die männlichen Tiere weisen jedoch Störungen der Spermatogenese auf (Kastner et al., 1996). Homozygote RXR gamma  $-/-$  Mäuse dagegen zeigen keine Veränderungen gegenüber dem Wildtyp, weder in ihrem Phänotyp, ihrer Fertilität, ihrem Wachstum noch im Verhalten (Krezel et al., 1996).

Weiterhin ist bekannt, dass die *Familiäre Kombinierte Hyperlipidämie*, eine genetische Stoffwechselerkrankung, unter anderem durch einen genetischen Defekt im RXR-Gen bedingt ist (Pei et al., 2000).

#### 1.3.4 FABPs

Die *Fatty acid-binding proteins*, kurz FABPs, sind Transportmoleküle, die am Lipid-Transport innerhalb der Zelle beteiligt sind. Sie binden neben freien Fettsäuren auch deren CoA-Derivate, Bilirubin, organische Anionen und andere kleine Moleküle. Sie sind somit für den Transport zwischen den Zellorganellen und damit für die Zufuhr der Metabolite zu den verschiedenen Stoffwechselwegen verantwortlich.

Es gibt sieben verschiedene Isoformen dieser Fettsäure-Bindungsproteine, die gewebsspezifisch exprimiert werden: FABP1 (hepatisch), FABP2 (intestinal), FABP3 (muskulär, kardial), FABP4 (Fettgewebe), FABP5 (epidermal), FABP6 (ileal), FABP7 (zervikal). Für FABP3 ist bekannt, dass ein Polymorphismus in seiner Genstruktur mit der Genese von Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert ist (Shin et al., 2003). Ebenso geht eine partielle Reduktion von FABP3 in Mäusen, die einer fettreichen Diät ausgesetzt wurden, mit einer Normalisierung der Insulinsensitivität einher (Shearer et al., 2005).

FABP4 könnte als biologischer Marker für die metabolische Entgleisung bei Diabetes-Patienten eingesetzt werden, da die FABP4-Spiegel im Plasma positiv mit BMI, Triglycerid-Level, Blut-Glukose und Insulin-Spiegel korrelieren. Invers korreliert ihr Wert mit der HDL-Konzentration. FABP4 steigt demnach mit der Anzahl der Komponenten des Metabolischen Syndroms und der Insulin-Resistenz (Xu A et al., 2006; Haluzík et al., 2008; Vural et al., 2008). Ebenso ist FABP4 an der Pathogenese von Koronarer Herzkrankheit und Arteriosklerose beteiligt (Cabré et al., 2008). Weiterhin ist bekannt, dass Hypoxie in humanen Trophoblastzellen zu einer Induktion von FABP1, 3, 4 und 5 führt und dies wiederum die Lipid-Akkumulation fördert (Biron-Shental et al., 2007).

### 1.3.5 SREBP/INSIG und HMG-CoA-Reduktase/LDL-Rezeptor: Cholesterol-Metabolismus

Das Zusammenspiel von *sterol regulatory element-binding protein* (SREBP) und *Insulin-induced gene* (INSIG) ist essentiell für die zelluläre Cholesterol-Homöostase.

Beeinhaltet eine Zelle genügend Cholesterol, so verhindert INSIG am Endoplasmatischen Retikulum die Abschnürung eines SREBP/SCAP-Komplexes (SCAP= *SREBP cleavage activating protein*) in einem Transportvesikel. Zudem induziert INSIG den proteosomalen Abbau der HMG-CoA-Reduktase (Sever et al., 2003). Fällt die zelluläre Cholesterol-Konzentration, so gelangt der SREBP/SCAP-Komplex zum Golgi-Apparat, wo er die proteolytische Freisetzung der Transkriptionsfaktoren S1P und S2P induziert. Diese Transkriptionsfaktoren bewirken nun im Nukleus die Transkription von Genabschnitten mit einer SRE-Region (*sterol regulatory element*), so die HMG-CoA-Reduktase und der LDL-Rezeptor (*Low-density-lipoprotein-receptor*) (Ikonen, 2008). Die *Insulin-induced genes*, kurz INSIGs, nehmen somit eine zentrale Rolle im zellulären Cholesterol-Metabolismus ein. Eine Überexpression von INSIG1 und 2 in übergewichtigen *Zucker diabetic fatty rats* wirkt durch Reduktion der SREBP-Aktivität der Lipogenese entgegen (Takaishi et al., 2004). In Mäusen, die einer fettreichen Diät unterzogen wurden, ist die Aktivität von INSIG1 ebenfalls erhöht (Li et al., 2003). Eine homozygote Ausschaltung der INSIGs führt dagegen zu einem starken Anstieg der Cholesterol- und Fettsäure-Synthese (Engelkind et al., 2005).

Auch PPAR alpha und gamma haben Einfluss auf die Aktivität von INSIG1. Fibrate und TZDs als PPAR alpha- und gamma-Agonisten erhöhen die INSIG1-Expression und unterdrücken die Aktivität von SREBP1 (König et al., 2009). Sie wirken dadurch auch über diesen Mechanismus der Lipogenese entgegen. Weiterhin greift PPAR delta in die zelluläre Cholesterol-Homöostase ein, indem es das *insulin-induced-gene 1* (INSIG1) induziert und so die Aktivierung von SREBP1 unterdrückt (Qin et al., 2008). Es wirkt somit über diesen Mechanismus anti-lipogenetisch über die Unterdrückung der Cholesterol-Synthese. Neben Cholesterol stabilisieren auch ungesättigte Fettsäuren das *insulin-induced gene 1* und erhöhen somit die Inhibierung der SREBPs (Lee et al., 2008). Auch die adipogene Differenzierung wird durch INSIG1 beeinflusst. INSIG1 blockiert in Präadipozyten die adipogene Differenzierung und verhindert unter anderem die Steigerung der PPAR gamma-Expression (Li et al., 2003).

Auch bei den SREBPs sind zwei Isoformen bekannt, SREBP1 und 2. Sie sind zu 47% identisch (Hua et al., 1995). SREBP2 kann SREBP1 bei der hepatischen Cholesterol-Synthese allerdings mit höherer Potenz ersetzen, was eine exzessive Cholesterol-

Synthese zur Folge hat (Shimano et al., 1997). Ebenfalls ist für SREBP2 eine Mutation bekannt, die mit einer Hypercholesterinämie assoziiert sein soll (Muller et al., 2002).

Zielgene der durch den SREBP/SCAP-Komplex freigesetzten Transkriptionsfaktoren sind sowohl das Schlüsselenzym der Cholesterolsynthese, die HMG-CoA-Reduktase, als auch der LDL-Rezeptor. Dieser Rezeptor bindet an das Apolipoprotein 100 auf den *low density*-Lipoproteinen und sorgt somit für die Aufnahme von über die Nahrung aufgenommenem Cholesterin. Der LDL-Rezeptor ist bei Blastozysten der Maus vorhanden und somit an der Zufuhr von Cholesterin zum embryonalen Metabolismus beteiligt (Sato et al., 2003).

Auch die HMG-CoA-Reduktase ist essentiell für die embryonale Entwicklung: Während heterozygote HMG-CoA-Reduktase-*knock-out*-Mäuse eine normale Entwicklung und Fertilität erreichen, ist die homozygote Defizienz des Enzyms letal und auch durch die erhöhte Zufütterung von Mevalonat an die Muttertiere nicht kompensierbar (Ohashi K et al., 2003). Bekannt ist, dass Präimplantationsembryonen bereits die Fähigkeit besitzen, aufgenommenes Mevalonat, eine Hydroxyfettsäure, deren Anion Teil der Biosynthese des Cholesterins ist, in Membranlipide wie Cholesterin und Lanosterin umzuwandeln. Sie können somit ihre Membraneigenschaften metabolisch beeinflussen (Pratt, 1982).

Embryonale Gewebe benötigen höhere Cholesterin-Konzentrationen als adulte, weswegen die Ratio von SREBP und SCAP zu INSIG in embryonalen Geweben zwei- bis sechsfach gegenüber adulten Geweben erhöht ist. Hinzu kommt, dass die Suppression von SREBP durch Cholesterin im Sinne eines *lack of response* erniedrigt ist (Yao et al., 2007).

#### 1.3.6 Perilipin/Adipophilin

Perilipin und Adipophilin (*Adipose differentiation-related protein*) gehören zusammen mit TIP 47 (*Tail-interacting protein*) zu den sogenannten PAT-Proteinen, die allesamt an der Reifung von intrazellulären Lipidtröpfchen beteiligt sind (Straub et al., 2008). Sie haben unterschiedliche Expressionsmuster, ihre Expression im Fettgewebe ist ihnen jedoch gemeinsam (Dalen et al., 2004). Die Funktion von Perilipin besteht in einem Schutz der intrazellulären Lipiddepots vor der lipolytischen Metabolisierung. Unter basalen Bedingungen befindet sich Perilipin, neben anderen Proteinen wie der ATGL (*adipose triglyceride lipase*), auf der Oberfläche der Lipidtröpfchen, während sich lipolytische Enzyme, wie die HSL (*Hormon-sensitive Lipase*), im Cytosol befinden. Nach einem lipolytischen Signal werden HSL und Perilipin durch die Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert. In diesem Zustand kann die HSL nun, gebunden an FABPs, zur Oberfläche des Lipiddepots gelangen, um dort Triglyceride zu hydrolysieren und sie

somit zellulären Stoffwechselwegen zuführbar zu machen (Tansey et al., 2004; Miyoshi et al., 2006; Xu C et al., 2006).

Induziert wird Perilipin unter anderem durch PPAR gamma/RXR-Heterodimere (siehe Kapitel 1.3.3). Ein Anstieg von Perilipin während einer pharmakologischen Therapie von Diabetes mellitus Typ 2 mit PPAR gamma-Agonisten kann neben dem Effekt der Insulin-Sensibilisierung auch die reduzierte basale Lipolyse und die Gewichtszunahme der Patienten erklären (Dalen et al., 2004).

Im Tiermodell konnte eine Reduktion von Perilipin neben einer erhöhten Expression von Adipophilin in übergewichtigen Ratten gegenüber normalgewichtigen festgestellt werden (Dalen et al., 2004). Ebenso konnte im Zellkulturmodell festgestellt werden, dass eine Herabregulierung der PAT-Proteine dazu führt, dass in einer Zelle statt mehreren kleinen, wenige große Lipidtropfen entstehen. Begleitet wurde dies durch eine erhöhte Lipolyse und der Entwicklung einer Insulinresistenz. Die Defizienz der PAT-Proteine, die relativ zur Quantität ektopischen Fettgewebes auftrat, könnte somit zelluläre Dysfunktionen in der Pathogenese von Adipositas und Diabetes bedingen (Bell et al., 2008). Auch andere Daten zeigen eine Assoziation von Adipositas mit erniedrigtem Perilipin-Protein sowie erhöhter basaler Lipolyse (Wang et al., 2003). Perilipin-null-Mäuse weisen darüber hinaus einen erhöhten Fettsäurespiegel und eine Insulin-Resistenz auf (Zhai et al., 2010). Eine Resistenz gegenüber Adipositas unter Mastdiät ergibt sich dagegen bei Perilipin-Überexpression (Miyoshi et al., 2010). Ebenso ist ein Polymorphismus des Perilipin-Gens PLIN bekannt, der mit Adipositas einhergeht (Tai et al., 2007). Dagegen gibt es andere Beobachtungen, die einen Perilipin-Anstieg mit dem Grad der Zunahme des Body-Mass-Index zeigen (Kern et al., 2004). Hier steht somit eine endgültige Aussage über die Verbindung der Perilipin-Spiegel mit Adipositas noch aus, wenn auch neuere Daten eine Assoziation von niedrigen Perilipin-Werten im adipösen Organismus favorisieren.

Adipophilin ist ebenso wie Perilipin ein Protein, das sich auf der Oberfläche von zellulären Lipiddepots befindet und diese vor Lipolyse schützt (Heid et al., 1998).

Im Zellkulturmodell konnte durch eine erhöhte Adipophilin-Expression eine Abnahme der ATGL und anderer Lipasen mit der Folge einer reduzierten Triglycerid-Verstoffwechslung beobachtet werden (Listenberger et al., 2007). Besonders während einer Nahrungskarenz wird vermehrt Adipophilin induziert und umgibt vor allem neu-synthetisierte Lipiddepots (Dalen et al., 2006). Allerdings ist die Adipozyten-Differenzierung durch eine Adipophilin-Defizienz nicht beeinträchtigt (Chang et al., 2006). Reguliert wird Adipophilin zum einen durch PPAR alpha, zum anderen ist es auch Zielgen von PPAR gamma/RXR-Heterodimeren (Bildirici et al., 2003; Dalen et al., 2006). Sowohl Adipophilin als auch Perilipin werden in fetalen Membranen exprimiert,

was eine Beteiligung an Lipidspeicher-Prozessen während der embryonalen Entwicklung vermuten lässt (Meadows et al., 2005).

#### 1.4 Zielstellung

Determinanten, die in Mäusen mit der Pathogenese von Adipositas und Metabolischem Syndrom assoziiert sind, sind Gegenstand vieler Arbeiten (Wang et al., 2003; Kern et al., 2004; Xu A et al., 2006; Haluzík et al., 2008; Vural et al., 2008). Sie beschäftigen sich allerdings mit Messungen von Parametern in adulten Tieren oder in Zellkulturen. Untersuchungen von Stoffwechselstörungen beim Mutterorganismus und deren Auswirkungen auf die frühe Embryonalentwicklung sind von zunehmendem Interesse und wichtig sowohl für das Verständnis von Subfertilität im adipösen menschlichen Organismus, als auch von einer möglichen metabolischen Prägung der Nachkommen. Aus dem diabetischen Tiermodell liegen Ergebnisse für den Kohlehydratstoffwechsel vor. So sind die Glukosetransporter des embryonalen Organismus im diabetischen Muttertier in ihrer Expression und Aktivität verändert (Sciullo et al., 1997; Moley et al., 1998; Ramin et al., 2010) und tragen somit vermutlich zu fetaler Makrosomie und prädiabetischer Stoffwechsellage bei. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von Präimplantationsembryonen im Hinblick auf den Lipidstoffwechsel. Blastozysten von NZO- und C57Bl/6-Mäusen wurden zur RNA-Isolierung sowie anschließender cDNA-Synthese gewonnen, um nachfolgend die Expression der in Kapitel 1.3 beschriebenen Parameter zu untersuchen. Hierbei sollte ein möglichst breites und umfassendes Spektrum an Markern abgedeckt werden: Enzyme des anabolen und katabolen Lipidmetabolismus, Marker des Lipidtransportes und der adipogenen Differenzierung sowie intrazelluläre Regulatoren verschiedener Fett- und Cholesterol-Stoffwechselwege.

Im ersten Schritt wurde ein qualitativer Vergleich beider Blastozysten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) gezogen. Im zweiten Schritt erfolgte dann eine semiquantitative Auswertung der gewonnenen Daten zwischen Blastozysten von NZO- und C57Bl/6-Mäusen in Form densitometrischer Analysen der PCR-Banden und Abgleich mit der konsekutiv exprimierten Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Aktivitätsmarker.

Es handelt sich um eine breit angelegte Übersicht, die Grundlage für weitere, gezielte Untersuchungen ist, um ein umfassendes Bild über den Lipidmetabolismus in Präimplantationsembryonen von adipösen und normalgewichtigen Mäusen und über etwaige Stoffwechselveränderungen in Richtung metabolischer Programmierung zu gewinnen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere und Blastozystengewinnung

#### 2.1.1 Versuchstiere

Mäuse der Linien NZO –*New Zealand Obese*- und C57Bl/6.

#### 2.1.2 Tierhaltung

Die Mäuse wurden bei konstantem Tag-Nacht-Rhythmus von 12:12 Stunden in den Versuchsterräumen des Zentrums für Grundlagenforschung (ZMG) der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg gehalten. Dabei wurden männliche und weibliche Tiere getrennt gehalten und nur über Nacht zur Verpaarung zusammengesetzt.

#### 2.1.3 Hormonelle Stimulation der Mäuse

Weibliche Mäuse wurden an Tag 1 um 14 Uhr mit je 7,0 IU PMSG (*Pregnant Mare Serum Gonadotropin*) sowie an Tag 3 um 16 Uhr mit je 7,5 IU hCG (*humanes Choriongonadotropin*) behandelt. Dazu wurden den Tieren die Hormone, in NaCl (0,9%) gelöst, intraperitoneal appliziert. Die Verpaarung wurde ebenfalls an Tag 3 vorgenommen, sodass Mitternacht des dritten Tages als Nullpunkt des Blastozystenalters festgelegt wurde. Am nächsten Morgen um 7 Uhr wurden die Tiere auf eine Paarung hin untersucht. Die gedeckten Tiere wiesen hierbei einen Vaginalpfropf, den sogenannten „Plug“, auf. Am Morgen des 7. Tages, des Tötungszeitpunktes, befanden sich die Embryonen am Tag 3,5 ihrer Entwicklung, was bei der Maus dem Blastozystenstadium entspricht.

hCG-Stimulationslösung: 7 µl Stammlösung [1IU/µl]  
+ 193 µl NaCl (0,9%)

PMSG-Stimulationslösung: 7µl Stammlösung [1IU/µl]  
+ 300µl NaCl (0,9%)

#### 2.1.4 Gewinnung der Blastozysten

Zur Tötung der Tiere wurde eine luftdichte Kammer mit Trockeneis genutzt, das bei Zugabe warmen Wassers rasch Kohlenmonoxid bildete. Zur Sicherheit folgte eine zervikale Dislokation.

Die Tiere wurden anschließend steril präpariert, um ihnen die beiden Uterushörner und Gewebeproben entnehmen zu können. Organgewebe wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Die entnommenen Uteri wurden bis zur weiteren Präparation in Kulturschalen in  $200\mu\text{l}$  PBS (1%) bei  $37^{\circ}\text{C}$  verwahrt. Unter dem Mikroskop wurden dann die Uterushörner sorgfältig von umgebendem Fettgewebe gereinigt und das Ovar entfernt. Vom Ende des entfernten Ovars aus wurden die Uterushörner mithilfe einer Tuberkulinspritze mit aufgezogenen  $250\mu\text{l}$  1%igem PBS mit 0,05% PVA gespült. Die Spülflüssigkeit wurde in sterilen Zellkulturschalen mit konvexem Innenzylinder aufgefangen und anschließend auf das Vorhandensein von Blastozysten hin untersucht. Die aufgefundenen Embryonen wurden zweimal in frischem PBS/PVA gewaschen, um Reste von Uterusflüssigkeit und Endometrium zu entfernen. Abschließend wurden alle Blastozysten in einer möglichst geringen Menge Flüssigkeit in ein  $0,5\text{ml}$  Reaktionsgefäß aufgenommen und anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur RNA-Isolierung tiefgefroren.

PBS/PVA-Spüllösung:

PBS	9,55g
PVA	0,59mg
Aqua dest.	1 l

## 2.2 cDNA-Gewinnung

### 2.2.1 RNA-Isolierung

Für das Arbeiten mit RNA ist es notwendig, dass alle Gefäße und Lösungen frei von RNAsen sind. Deshalb wurde bei der RNA-Isolierung ausschließlich DEPC-behandeltes Aqua dest. (DEPC- $\text{H}_2\text{O}$ ) verwendet (0,1% DEPC in Aqua dest., 2h Inkubation und anschließende Autoklavierung). Alle wässrigen Lösungen wurden mit DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  hergestellt. Mit DEPC lassen sich Histidinreste zu N-Carboxyhistidinresten modifizieren, da dieses kovalent an primäre und sekundäre Amine bindet. Alle Glasgefäße wurden bei  $180^{\circ}\text{C}$  hitz ebehandelt, Kunststoff wurde autoklaviert.

Für die Isolierung der RNA aus Mäuseblastozysten wurde aufgrund der geringen Zellanzahl von nur 20-40 Zellen pro Embryo die Methode der mRNA-Bindung an magnetische Partikel (Dynabeads® mRNA Direct TM Kit) verwendet.

Die eingefrorenen Blastozysten wurden aufgetaut und 10min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der überschüssige PBS-Puffer wurde abpipettiert. Danach wurden die Blastozysten in 150µl *Lysis*-Puffer aufgenommen, resuspendiert und anschließend für 10min auf einem Schüttler inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Dynabeads zweimal mit *Lysis-Binding*-Puffer gewaschen. Pro Probe wurden 10µl Dynabeads zugegeben und für weitere 10min auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Reaktionsgefäße in den *Magnetic Particle Concentrator* (DynaL MPC ®) gestellt, zweimal mit 100µl Waschpuffer A und dreimal mit 100µl Waschpuffer B gewaschen. Um die mRNA von den Dynabeads zu lösen, wurden diese in 11µl DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert und anschließend im Thermocycler 3min auf 65°C erhitzt. Da ein erneutes Binden der Poly-(A)-Schwänze an die Dynabeads verhindern werden musste, wurden die Gefäße sofort auf Eis gestellt und der Überstand in ein neues 0,5ml Reaktionsgefäß überführt.

Lysis-Puffer (50ml):		Waschpuffer A (100ml):	Waschpuffer B (100ml):
8MLiCl	3,125ml	1,87ml	1,87ml
EDTA	186,10mg	37,22mg	37,22mg
Tris	605,70mg	121,14mg	121,14mg
SDS	500mg	100mg	
DTT	38,56mg		

Für die RNA-Isolierung aus Geweben wurde das Organ oder Gewebe gefroren, unter Zugabe von flüssigem Stickstoff gemörsert, in einem 2ml Reaktionsgefäß in 800µl GTC-Lösung aufgenommen und mit dem Ultraturax 1min auf höchster Stufe homogenisiert. Im Anschluss wurden 80µl 2M Natriumacetat, 800µl Phenol und 160µl Chloroform zugegeben. Die Substanzen wurden gemischt und anschließend 20min auf Eis inkubiert. Um eine Phasentrennung zu erhalten, wurden die Proben 25min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Durch die Zugabe von 1 Volumen kaltem Isopropanol, der gleichen Menge Flüssigkeit wie der vorhandene Überstand, wurde die RNA bei 20°C für 20min gefällt. Nach einer Zentrifugation für 30min bei 13.000 rpm und 4°C wurde das erhaltene Pellet dreimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach der Lufttrocknung in 50µl DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert. Zur Kontrolle wurden 0,5µg RNA auf ein 1,2%iges Agarosegel aufgetragen.

GTC-Lösung:

Guanidiniumthiocyanathydrochlorid	4M
βMercaptoethanol	100mM (direkt vor Gebrauch zugeben)
Natriumcitrat	25mM
Natriumlaurosylsarcosinat	17Mm

Der RNA-Extraktion wurde ein DNase-Verdau angeschlossen, um Rückstände genomischer DNA zu entfernen.

3M Natriumacetat pH 5,2	1,7µl
0,1M Magnesiumsulfat	2,5µl
RNA-Probe	x µl
DNase 1 (10U/µl)	0,5µl
RNase-Inhibitor	0,5µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 50µl

Die Substanzen wurden hierbei für 30min bei 37°C und für 10min bei 70°C inkubiert.

Anschließend wurde die RNA-Konzentration der jeweiligen Probe per UV-Spektroskopie überprüft. Hierzu wurde der Mittelwert einer Doppelbestimmung als Referenzwert genutzt. Zur Messung wurden 98µl DEPC-H<sub>2</sub>O mit 2µl der Probe (1:50) in einem 0,5ml Reaktionsgefäß gemischt und anschließend in die Messküvette überführt. Die Messung erfolgte bei Wellenlängen von 260 sowie 280nm. Der Quotient aus der Absorption beider Wellenlängen (OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>) lässt einen Rückschluss auf den Gehalt der RNA zu und sollte 1,7 bis 2,0 betragen. So konnte eine Bewertung der RNA-Qualität erfolgen.

### 2.2.2 Umschreibung der RNA in cDNA (Reverse Transkriptase-Reaktion)

Für die RT-Reaktion wurde die aus Blastozysten isolierte RNA mit folgenden Agenzien gemischt:

10x PCR Puffer	2µl
50mM MgCl <sub>2</sub>	2µl
10mM dNTPs	2µl
Randomprimer	1µl
RT	0,5µl
RNase-Inhibitor	0,2µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	1,3µl

Anschließend wurde der Ansatz für 3min bei 65°C, für 10min bei 25°C, für 60min bei 42°C und abschließend für 5min bei 99°C inkubiert. In diesen Zyklen konnte die RT die Blastozysten-RNA in komplementäre cDNA umschreiben.

Die cDNA wurde nachfolgend je nach Menge der eingesetzten Blastozysten mit DEPC-H<sub>2</sub>O aufgefüllt, sodass 5µl cDNA stets einem Embryonenäquivalent entsprachen. Das Ergebnis wurde anschließend durch eine Kontroll-PCR mit GAPDH verifiziert.

Für die RT-Reaktion von RNA aus Geweben konnte anhand der RNA-Konzentrationsbestimmung die benötigte Menge der RNA-Probe für den Einsatz von 3µg RNA für die cDNA-Synthese errechnet werden. Diese Menge an RNA-Probe wurde mit 1µl Random-Primer versetzt und anschließend auf 12µl mit PCR-H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Das Gemisch wurde für 5min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden hinzu pipettiert:

5x Puffer	4µl
0,1M DTT	2µl
10mM dNTP	1µl
RT	0,5µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	0,5µl

Es wurde weiterhin in folgenden Schritten inkubiert:

- 10 min 25°C
- 50 min 42°C
- 10 min 70°C

Die cDNA wurde nun mit 70µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Das Ergebnis der cDNA-Synthese wurde durch eine Kontroll-PCR mit 18s und anschließender Auftrennung durch Gelelektrophorese verifiziert (Einsatz von 2µl cDNA).

### 2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der Amplifikation von kurzen Abschnitten der (c)DNA durch die *Taq-Polymerase*, eine DNA-Polymerase, die ursprünglich aus dem hitzebeständigen Bakterium *Thermus aquaticus* stammt. Der Leserahmen der Polymerase wird durch die zugegebenen Primer festgelegt, sodass immer nur der Abschnitt des gewünschten DNA-Abschnittes amplifiziert wird.

Die Substanzen der PCR wurden auf Eis pipettiert, um einen vorzeitigen und fehlerhaften Beginn der Reaktionen zu verhindern. Der Standard-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

10xPCR Puffer (-MgCl <sub>2</sub> )	2,5µl
50mM MgCl <sub>2</sub>	1,0µl
10mM dNTP	0,75µl
Primer forward	0,75µl

Primer reverse	0,75µl	
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,4µl	
cDNA	x µl	DEPC-H <sub>2</sub> O ad 20µl

Das Substanzgemisch wurde anschließend kurz herunterzentrifugiert und in den vorgeheizten Thermocycler gestellt (*hot start*).

Das Thermoprotokoll lautete:

3min	94°C	DNA-Denaturierung
40 Zyklen		
1min	94°C	DNA-Denaturierung
1min	60°C	Primer-Annealing (individuell, je nach Primer)
1min	72°C	Elongation
10min	72°C	Endelongation
Pause	4°C	Kühlung

#### 2.4 Auftrennung von DNA/RNA durch Gelelektrophorese

DNA (PCR-Produkte) oder RNA wurden in einem 1-2,2%igen Agarosegel anhand ihrer Größe und Ladung aufgetrennt. Das elektromagnetische Feld, das in der mit 1xTAE-Puffer gefüllten Gelkammer erzeugt wurde, sorgte dafür, dass sich die negativ geladene DNA/RNA in Richtung der Anode bewegte. Die Größe des Fragments bestimmte die Wanderungsgeschwindigkeit und konnte später anhand eines mitgeführten DNA-Größenmarkers zugeordnet werden. Es wurden 10µl DNA mit 2µl Ladepuffer versetzt, auf das Gel aufgetragen und anschließend durch Anlegen von 90Volt aufgetrennt. Bei einem RNA-Gel wurde die Gelkammer zuvor für 45min mit 3%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung vorbehandelt. Es wurde ausschließlich TAE-Puffer mit DEPC-H<sub>2</sub>O verwendet. Anschließend konnte das Gel unter UV-Licht betrachtet und mithilfe der BioCaptMW Software (Vilber, Marne La Vallee Cedex) dokumentiert und ausgewertet werden.

Agarosegel:

1-2,2g	Agarose
100ml	1xTAE-Puffer
3 µl	Ethidiumbromid (50µg/ml), erst nach dem Erhitzen zugeben.

10xTAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) pH 8,0 :

Tris-Base	242g	
Eisessig	57,1ml	
EDTA (0,5M,pH 8,0)	100ml	Aqua dest. ad 5 l

6xDNA-Ladepuffer:

Glycerin	3ml
1x TAE	7ml
Xylenyanol	0,25g

## 2.5 Isolation der DNA-Banden aus Agarosegel und Gelaufreinigung

Die PCR-Banden wurden unter UV-Licht mithilfe eines Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Gelblöcke eingeschmolzen und die DNA mithilfe des *Quiagen QIQuick Gel Extraktion Kit* laut Protokoll extrahiert. Somit konnte das amplifizierte PCR-Produkt der Sequenzierung zugeführt werden.

Protokoll:

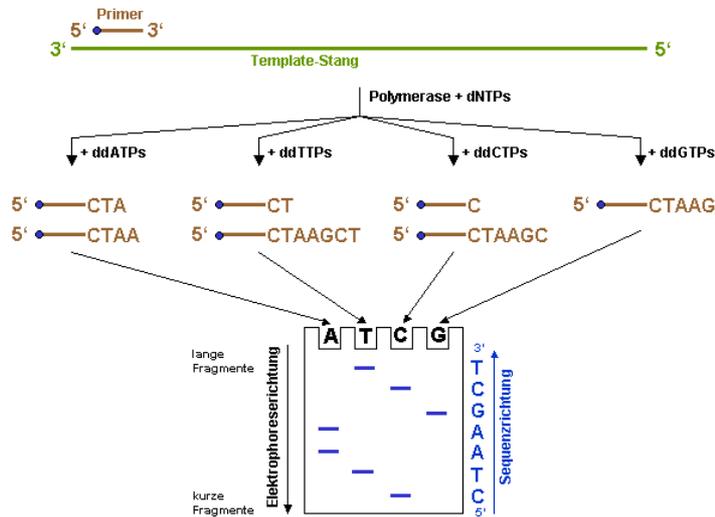
QG-Puffer	3 Teile des Gelblocks (mg) in $\mu$ l
Erhitzen und Einschmelzen des Geles	50°C
Isopropanol	Einfaches des Gelblocks (mg) in $\mu$ l
5min auf Eis	
Überführung auf Quia-Quick-Trennsäule	
Zentrifugation	1min bei 13.000 rpm, Durchlauf verwerfen.
QG-Puffer	500 $\mu$ l
Zentrifugation (s.o.)	
Puffer-PE-Ethanol	750 $\mu$ l
2x Zentrifugation (s.o.)	

Eluieren der DNA aus Trennsäule in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß in 35 $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O. Zur Kontrolle der Gelaufreinigung wurde im Anschluss eine Kontroll-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurden 5 $\mu$ l DNA-Eluat mit 2 $\mu$ l Ladepuffer aufgetragen.

## 2.6 Sequenzierungs-PCR und Fällung der DNA

Die Sequenzierungs-PCR dient der linearen Amplifikation des vorhandenen PCR-Produktes mit nur einem Primer (Didesoxymethode nach Sanger) und nutzt das Prinzip des Kettenabbruchs durch fluoreszenzmarkierte ddNTPs. Diese besitzen keine 3'-Hydroxygruppe für die Verknüpfung mit der Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids und bewirken so durch ihren Einbau einen Stopp der Verlängerung des neusynthetisierten Stranges durch die Polymerase. In der Folge entstehen DNA-

Fragmente unterschiedlicher Länge, die in jedem Ansatz stets mit dem gleichen ddNTP enden. Durch elektrophoretische Auftrennung und Anregung zur Fluoreszenz (durch DNA-Sequenzierservice, ZMG-Labor der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) kann dann ein Chromatogramm erstellt werden und die Sequenz des DNA-Teilabschnitts ermittelt werden.



**Abbildung 4** Prinzip der DNA-Sequenzierung nach der Didesoxy-Methode.  
<http://de.wikipedia.org/wiki/DNA-Sequenzierung>, abgerufen am 04.02.2011.

Hierzu wurde das Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) genutzt.

Auf Eis wurden pipettiert:

Sequencing Puffer	10µl
Sequencing Enzyme	2µl
Forward Primer	2µl
DNA-Eluat	3µl
Reinstwasser	4µl

Das Thermoprotokoll lautete:

- 96°C 1min
- 25 Wiederholungen:
- 96°C 10sec
- 50°C 5sec
- 60°C 10min
- Pause 4°C

Fällung:

125mM EDTA            2µl

3M Na-Acetat            2µl

96% Ethanol            50µl

vortexen, für 15min dunkel inkubieren bei Raumtemperatur

Zentrifugieren            30min, 6000 rpm, 4°C

70% Ethanol            70µl

Zentrifugieren            10min, 6000 rpm, 4°C

Die DNA befand sich nun als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes. Der Überstand wurde abpipettiert, das Pellet im Anschluss bei 70°C getrocknet und bis zum Versand bei 4°C gelagert.

## 2.7 Densitometrische Quantifikation der PCR-Banden mit *BIO-1D*

Die dokumentierten Gel-Fotografien wurden der Analyse durch das Programm *BIO-ID Version 99* (Vilber, Hochdorf/Winkel) unterzogen. Hierbei wurde die Intensität der einzelnen Banden als Volumen oder Summe der Pixel einer DNA-Bande ermittelt. Anschließend wurde das Volumen eines Markers auf den entsprechenden Wert der GAPDH-Referenz dieses cDNA-Pools bezogen:

$$\text{Volumen Marker X (Pool Nx) / Volumen GAPDH (Pool Nx) = Verhältnis Marker / GAPDH}$$

Die Bandenintensität der jeweiligen Marker wurde an mindestens 2 Blastozystenpools ermittelt. Anschließend wurden Mittelwert und Standardabweichung der jeweiligen Marker/GAPDH-Verhältnisse berechnet. Die ermittelten Daten wurden einem statistischen Signifikanztest (t-Test für unabhängige Stichproben mit 95%-Konfidenzintervall) unterzogen.

## 2.8 Materialien

### 2.8.1 Chemikalien

Agarose	Biozym, Oldendorf
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Fluka, Seelze
BSA	Fluka, Seelze

Buffer-PE-Ethanol	Qiagen, Hilden
Calziumchlorid	Serva, Heidelberg
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Citronensäure	Serva, Heidelberg
DAB	Research Genetics
dATP	Fermentas, St. Leon-Rot
dCTP	Fermentas, St. Leon-Rot
dGTP	Fermentas, St. Leon-Rot
dTTP	Fermentas, St. Leon-Rot
DEPC	SigmaAldrich, Taufkirchen
DPX	Merck, Darmstadt
Dynabeads®Oligo(dT)25	Invitrogen, Karlsruhe
DTT	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Glukose	Serva, Heidelberg
Glycerin	Serva, Heidelberg
Guanidiniumthiocyanat	Serva, Heidelberg
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
hCG	SigmaAldrich, Taufkirchen
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
IPTG	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Serva, Heidelberg
Kaliumaluminiumsulfat	Merck, Darmstadt
Lithiumchlorid	Serva, Heidelberg
Magnesiumchlorid	Serva, Heidelberg
Magnesiumsulfat	Serva, Heidelberg
Manganchlorid	Serva, Heidelberg
βMercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Serva, Heidelberg
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe

Natriumhydrogencarbonat	Serva, Heidelberg
Natriumiodat	Merck, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat	Roth, Karlsruhe
Paraffin	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS	Biochrom, Berlin
PCR-Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
Penicillin	Gibco, Karlsruhe
Pentobarbitol	SigmaAldrich, Taufkirchen
Pepton	Roth, Karlsruhe
Phenol	SigmaAldrich, Taufkirchen
PMSG	SigmaAldrich, Taufkirchen
QG-Puffer	Qiagen, Hilden
PVA	SigmaAldrich, Taufkirchen
Streptomycin	Gipco, Karlsruhe
Randomprimer	Roche, Mannheim
RNase-Inhibitor	Promega, Mannheim
Tween 20	SigmaAldrich, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
XGal	Roth, Karlsruhe
Xylen	Merck, Darmstadt
Ziegenserum	Dianova, Hamburg

### 2.8.2 Enzyme

Cycle Sequencing Enzyme v1.1	Applied Biosystems, Darmstadt
DNase I	Roche, Mannheim
Restriction enzymes	New England Biolabs, Frankfurt
Superscript II, RT	Invitrogen, Karlsruhe
T4 DNA Ligase	Promega, Mannheim
Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.8.3 Oligonukleotide

Die spezifischen Primersequenzen wurden unter Nutzung des unter <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi> verfügbaren Programms

Primer3 von Sequenzen aus der Datenbank des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Nucleotide&itool=toolbar>) abgeleitet. Alle

Oligonukleotide wurden bei Biomers, Ulm bestellt. Die PCR-Produkte aller Primer wurden aus dem Agarosegel extrahiert, aufgereinigt und durch eine Sequenzierungs-PCR amplifiziert. Das entstandene Produkt wurde in einem Reaktionsgefäß gefällt und anschließend beim DNA-Sequenzierservice, ZMG-Labor, sequenziert. Die Sequenzen wurden anschließend unter <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> auf Ihre Übereinstimmung mit den bekannten Maus-Gen-Sequenzen hin kontrolliert. Die tabellarische Auflistung aller Primer befindet sich im Anhang, Kapitel 7.1.

#### 2.8.4 Geräte

Biofuge 13	Heraeus, Hanau
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Biometra T 3000 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Brutschrank Haereus BB6060	Haereus, Hanau
Gelkammer AgagelMaxi	Biometra, Göttingen
Gelkammer AgagelMini	Biometra, Göttingen
Mikrowelle	Panasonic, Wiesbaden
Schüttler GFL 3000	GFL, Burgwedel
Spektrophotometer	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Thermocycler	Biometra, Göttingen
UltraTurax T25	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG IKA – Labortechnik, Staufen
Vortex IKA MS 3 digital	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG IKA – Labortechnik, Staufen
Waage BP210S	Sartorius, Göttingen
Waage BP3100S	Sartorius, Göttingen
Zeiss Stemi 2000	Carl Zeiss, Jena

#### 2.8.5 Verbrauchsmaterialien

Organkulturschalen mit Innenzylinder	Falcon, Becton Dickinson Labware, USA
Kulturschalen	Greiner Bioone, Frickenhausen
Tuberkulinspritzen 1ml BD PlastikpakTm	Becton Dickinson Labware, USA
Pipettenspitzen	Biozym, Hessisch-Oldendorf

### 3 Ergebnisse

An jeweils zwei verschiedenen Blastozysten-cDNA-Pools (N=2; gepoolte Blastozysten gleichen Alters aus verschiedenen Muttertieren) wurde die Expression der Marker überprüft. Für RXR gamma wurde der Nachweis an drei Blastozystenpools erbracht (N=3). Für eine Vergleichbarkeit der beiden Mausstämmen wurde bei jeder PCR die gleiche Menge cDNA der NZO- oder C57Bl/6-Blastozysten verwendet. Anschließend wurde das Ergebnis der PCR mithilfe einer Gelelektrophorese überprüft und dokumentiert. Alle Ergebnisse wurden durch Sequenzierung verifiziert. Die densitometrische Quantifikation der PCR-Banden wurde mittels t-Test auf statistisch signifikante Unterschiede geprüft.

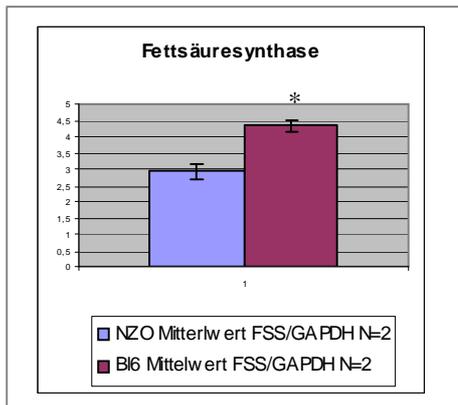
#### 3.1 Nachweis von Markern des Lipidstoffwechsels und der Glukoneogenese in Blastozysten (Tag 3,5) von NZO- und C57Bl/6-Mäusen

##### 3.1.1 Qualitativer Nachweis mittels PCR

Alle untersuchten Stoffwechselmarker kataboler (Acyl-CoA-Oxidase, Carnitin-Palmitoyl-Transferase, OCTN2), und anaboler Marker des Lipidmetabolismus (Fettsäure-Synthase, Acetyl-CoA-Carboxylase), der zellulären Lipid-Aufnahme (Lipoproteinlipase) und der Glukoneogenese (mitochondriale PEPCK) konnten in Blastozysten vom Tag 3,5 in beiden Mausstämmen nachgewiesen werden (Abbildung 15). Somit kann es als gesichert angesehen werden, dass die anabolen und katabolen Prozesse des Lipidmetabolismus sowie der Glukoneogenese bereits in Präimplantationsembryonen mit den gleichen Enzymen und Stoffwechselwegen vonstatten gehen wie in adulten Zellen.

##### 3.1.2 Semiquantitativer Nachweis: Densitometrische Analyse der PCR-Banden

Die ermittelten Daten der Marker für anabole und katabole Stoffwechselwege, außer der Fettsäure-Synthase, weisen nach statistischer Überprüfung keine signifikanten Unterschiede der Transkriptraten in Blastozysten von NZO- und C57Bl/6-Mäusen auf (Abbildung 21). Die Fettsäure-Synthase wird in C57Bl/6-Embryonen statistisch signifikant vermehrt transkribiert (Abbildung 5).



**Abbildung 5** Densitometrische Messungen aus PCR-Banden der *Fettsäure-Synthase* von Blastozysten des NZO- (lila) und C57Bl/6-Mausstammes (Bl6, violett). Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der GAPDH-korrigierten Lichtintensitäten aus je N=2 Versuchen mit Standardabweichung. t-Test für unabhängige Stichproben signifikant ( $p=0,049$ ; 95%-Konfidenzintervall [-2,83] - [-0.009]).

### 3.2 Nachweis der FATPs und der Acyl-CoA-Synthetase in Blastozysten (Tag 3,5) von NZO- und C57Bl/6-Mäusen

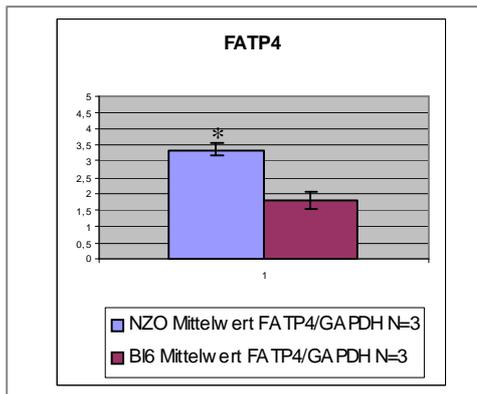
#### 3.2.1 Qualitativer Nachweis mittels PCR

FATP1 bis 5 konnten in Blastozysten vom Tag 3,5 der Entwicklung in beiden Mausstämmen nachgewiesen werden (Abbildung 16). FATP6 konnte nicht detektiert werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Bei Translation der Transkripte in FATP können die Blastozysten beider Mausstämme zu diesem Zeitpunkt ihrer Entwicklung die fünf verschiedenen Isoformen der Fettsäure-Transportproteine nutzen, um aus dem externen Milieu vor allem langkettige, ungesättigte Fettsäuren in ihre Zellen aufzunehmen.

Die Acyl-CoA-Synthetase konnte ebenfalls in beiden Mausstämmen nachgewiesen werden (Abbildung 16). CD 36 allerdings konnte mithilfe des Verfahrens der PCR nicht detektiert werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

#### 3.2.2 Semiquantitativer Nachweis: Densitometrische Analyse der PCR-Banden

Für FATP4 ergab die statistische Überprüfung eine signifikant höhere Transkriptionsrate in Präimplantationsembryonen der NZO-Mäuse (Abbildung 6). Für FATP1, 2, 3 und 5 sowie die Acyl-CoA-Synthetase ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 22).

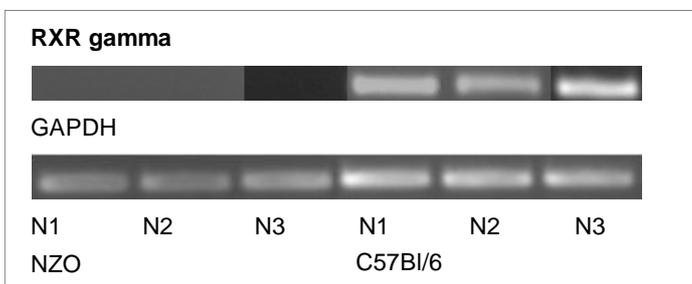


**Abbildung 6** Densitometrische Messungen aus PCR-Banden des *Fatty acid transport proteins 4* (FATP4) von Blastozysten des NZO- (lila) und C57Bl/6-Mausstammes (Bl6, violett). Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der GAPDH-korrigierten Lichtintensitäten aus je N=3 Versuchen mit Standardabweichung. t-Test für unabhängige Stichproben signifikant ( $p=0,004$ ; 95% Konfidenzintervall [0,85]-[2,22]).

### 3.3 Nachweis der PPARs, der RXRs und der Prostaglandin- $I_2$ -Synthase in Blastozysten (Tag 3,5) von NZO- und C57Bl/6-Mäusen

#### 3.3.1 Qualitative Analyse mittels PCR

In der cDNA der Blastozysten beider Mausstämme lassen sich Transkripte von PPAR alpha und PPAR gamma sowie von PPAR delta und der Prostaglandin- $I_2$ -Synthase nachweisen. Transkripte von RXR alpha und beta lassen sich in der cDNA der Blastozysten beider Stämme an Tag 3,5 nachweisen (Abbildung 18). RXR gamma dagegen wird zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung nur in Blastozysten des C57Bl/6-Stammes, nicht aber in Blastozysten der adipösen NZO-Mäuse exprimiert (Abbildung 7). Im adulten Organismus wird dieser Marker jedoch in beiden Mausstämmen exprimiert (Abbildung 8).



**Abbildung 7** PCR-Banden des *Retinoid X receptor gamma* (RXR gamma) in Blastozysten des C57Bl/6-Mausstammes. Die PCR an Blastozysten des NZO-Mausstammes erbrachte kein nachweisbares Amplifikat. Aufgetragen gegen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).



**Abbildung 8** PCR-Banden des *Retinoid X receptor gamma* (RXR gamma) in verschiedenen Geweben adulter Tiere des NZO- und C57Bl/6-Mausstammes.

### 3.3.2 Semiquantitativer Nachweis: Densitometrische Analyse der PCR-Banden

Die Transkriptaten der PPARs, RXRs und der Prostaglandin- $I_2$ -Synthase in Blastozysten der NZO- und C57Bl/6-Mäuse unterscheiden sich nicht statistisch signifikant (Abbildung 23).

### 3.4 Nachweis von FABP1, 3 und 4 in Blastozysten (Tag 3,5) von NZO- und C57Bl/6-Mäusen

#### 3.4.1 Qualitativer Nachweis mittels PCR

In der cDNA der Blastozysten beider Mausstämme konnte FABP1 nicht detektiert werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Dagegen wurden die Fettsäure-Bindungsproteine 3 und 4 in beiden Mausstämmen nachgewiesen (Abbildung 17).

#### 3.4.2 Semiquantitativer Nachweis: Densitometrische Analyse der PCR-Banden

Die Transkriptaten der Fettsäure-Bindungsproteine 3 und 4 in Blastozysten der NZO- und C57Bl/6-Mäuse unterscheiden sich statistisch nicht signifikant (Abbildung 24).

### 3.5 Nachweis von INSIG1/ 2, SREBP1/ 2, LDL-Rezeptor und HMG-CoA-Reduktase in Blastozysten (Tag 3,5) von NZO- und C57Bl/6-Mäusen

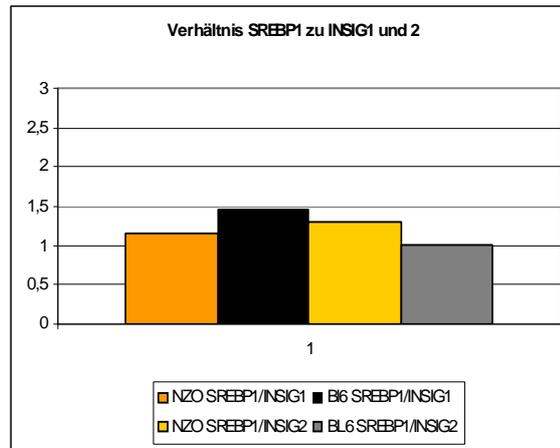
#### 3.5.1 Qualitativer Nachweis mittels PCR

In der cDNA der Blastozysten (Tag 3,5) beider Mausstämme konnten sowohl INSIG1 und 2 als auch SREBP1 und 2 nachgewiesen werden. Ebenso wurden die Zielgene der durch SREBP freigesetzten Transkriptionsfaktoren, die HMG-CoA-Reduktase sowie der LDL-Rezeptor, in der cDNA der Blastozysten beider Mausstämme nachgewiesen (Abbildung 19).

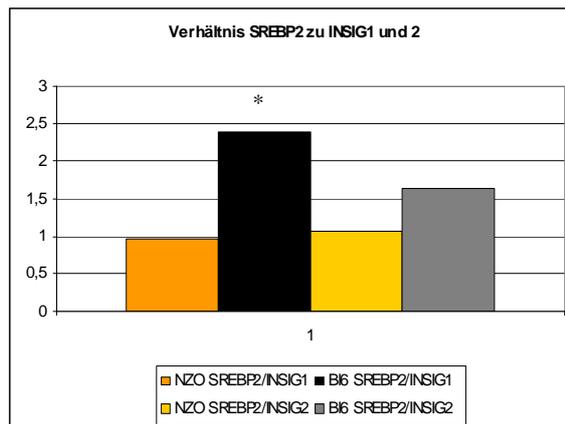
### 3.5.2 Semiquantitativer Nachweis: Densitometrische Analyse der PCR-Banden

Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Transkriptionsraten der untersuchten Marker in Blastozysten der beiden Mausstämme (Abbildung 26).

Um aber die Verhältnisse der Transkriptionsraten der SREBPs zu den INSIGs in Blastozysten eines Mausstammes zu verdeutlichen, wurden die Mittelwerte der GAPDH-korrigierten Intensitäten der PCR-Banden von SREBP1 und 2 jeweils mit denen der INSIGs verglichen. Ein Verhältnis über eins würde demnach auf ein Überwiegen des jeweiligen SREBP über INSIG1 oder 2 und damit auf eine Tendenz zur Cholesterolsynthese hindeuten, eine Ratio kleiner eins Richtung Hemmung der Synthese in den Präimplantationsembryonen des jeweiligen Mausstammes.



**Abbildung 9** Mittelwerte der GAPDH-korrigierten densitometrischen Messungen von SREBP1 im Verhältnis zu INSIG1 und 2 in Blastozysten des NZO- (gelb) und C57Bl/6-Mausstammes (Bl6, schwarz). t-Test bei einer Stichprobe ohne Signifikanz.



**Abbildung 10** Mittelwerte der GAPDH-korrigierten densitometrischen Messungen von SREBP2 im Verhältnis zu INSIG1 und 2 in Blastozysten des NZO- (gelb) und C57Bl/6-Mausstammes (Bl6, schwarz). Verhältnis von SREBP2 zu INSIG1 in Blastozysten der C57Bl/6-Embryonen im t-Test bei einer Stichprobe signifikant von 1 verschieden ( $p=0,001$ ; 95%-Konfidenzintervall [0,86]-[1,94]).

Während das Verhältnis von SREBP1 zu INSIG1 und 2 (Abbildung 9) in beiden Mausstämmen ungefähr bei eins liegt und somit ausgeglichen ist, sieht es bei SREBP2 (Abbildung 10) anders aus: Bei ebenfalls ausgeglichenem Verhältnis von SREBP2 zu INSIG1 und 2 in den Blastozysten der NZO-Mäuse zeigt sich in den C57Bl/6-Embryonen eine erhöhte Ratio von SREBP2 zu beiden INSIGs. Dabei ist das Verhältnis von SREBP2 zu INSIG1 statistisch signifikant auf das 2,4fache erhöht.

### 3.6 Nachweis von Perilipin und Adipophilin in Blastozysten (Tag 3,5) von NZO- und C57Bl/6-Mäusen

#### 3.6.1 Qualitativer Nachweis mittels PCR

Sowohl Perilipin als auch Adipophilin konnte in Blastozysten (Tag 3,5) beider Mausstämme nachgewiesen werden (Abbildung 20).

#### 3.6.2 Semiquantitativer Nachweis: Densitometrische Analyse der PCR-Banden

Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in den Transkriptionsraten von Perilipin und Adipophilin in Blastozysten beider Mausstämme nachgewiesen werden (Abbildung 25).

## 4 Diskussion

### 4.1 Methodik

#### 4.1.1 Tiermodelle

Wie in der Einleitung beschrieben, entspringt der NZO-Mausstamm einer Inzuchtverpaarung übergewichtiger Tiere. Vergleichbaren Ursprungs sind die *New Zealand black*-Mäuse (NZB), die Autoimmundefizienzen aufweisen und beispielsweise als Modell zur Erforschung des Lupus erythematodes dienen. In der vorliegenden Arbeit wurden als Vergleichsgruppe Tiere des C57Bl/6-Stammes verwendet, da es einen sog „Wildtyp“ der NZO-Maus, der normalgewichtig wäre, nicht gibt. Es handelt sich bei dem NZO-Mausstamm um ein polygenetisch verändertes Tiermodell. Klassische „Adipositas“-Gene, die einen direkten Vergleich zu den NZO-Mäusen zuließen, gibt es nicht. C57Bl/6-Mäuse zeichnen sich durch einen unauffälligen Phänotyp hinsichtlich Adipositas aus. Sowohl NZB- als auch C57Bl/6-Mäuse wurden bereits in anderen Studien als Kontrollgruppen zum NZO-Stamm verwendet, wenn auch mit anderen Zielstellungen als in der vorliegenden Arbeit (Shellie et al, 2005; Jürgens et al, 2006).

#### 4.1.2 Densitometrische Analyse

Alle durchgeführten densitometrischen Quantifizierungen wurden jeweils an N=2 oder N=3 Stichproben durchgeführt. Es sollten Unterschiede der Transkriptionsmengen der untersuchten Marker in Blastozysten von NZO- und C57Bl/6-Mäusen aufgezeigt werden. Durch die niedrige Stichprobenzahl müssen die gezeigten signifikanten Unterschiede vorsichtig interpretiert werden. Dies gilt ebenso für die Marker, für die keine signifikant unterschiedlichen Transkriptionsraten ermittelt werden konnten. Die Genauigkeit der Aussagen würde sich mit einer höheren Zahl an Wiederholungen, die aufgrund der aufwändigen Materialgewinnung in dieser Arbeit nicht durchführbar waren, erhöhen. Dennoch ergeben sich aus dieser Arbeit sowohl Hinweise auf Stoffwechselfparameter, deren weitere Quantifizierung aussichtsreich wäre, als auch auf bereits zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung veränderte Stoffwechselsituationen in Präimplantationsembryonen adipöser Mäuse.

## 4.2 Stoffwechselwege in Blastozysten

Blastozysten am Tag 3,5 der Entwicklung stellen einen Zellverband dar, der ohne direkte Zufuhr von Nährstoffen über den maternalen Blutweg überleben und sich weiterentwickeln muss. Zum einen steht ihm dabei die Aufnahme von energieliefernden Molekülen, wie beispielsweise Fettsäuren, aus dem ihn umgebenden uterinen Milieu zur Verfügung. Dabei ist er angewiesen auf dessen Angebot und Zusammensetzung. Zum anderen besteht die Möglichkeit, Eigensynthese zu betreiben, um somit Energielieferanten und Ausgangsmoleküle für weitere anabole Prozesse selbst zu produzieren. Der Energiegewinnung dient die Fettsäureverbrennung, die Beta-Oxidation. Weiterhin bedarf es in diesem Organismus Signalmolekülen, die die Stoffwechselprozesse je nach Bedarf regulieren und gegebenenfalls äußere Einflüsse kompensieren.

### 4.2.1 Fettsäure-, Triglycerid- und Cholesterol-Aufnahme

Neben der Eigensynthese stehen der Blastozyste einige Mechanismen zur Verfügung, aus dem externen Milieu Fettsäuren, Triglyceride und Cholesterol in die Zelle aufzunehmen und sie den verschiedenen Stoffwechselwegen zuzuführen. Dazu gehören die Fettsäuretransportproteine (FATPs), Acyl-CoA-Synthetase und FABPs für die Fettsäuren sowie LDL-Rezeptor und Lipoproteinlipase für die Triglyceride und das Cholesterol. Alle diese Marker konnten auf Transkriptionsebene detektiert werden.

### 4.2.2 Fettsäure-Transport

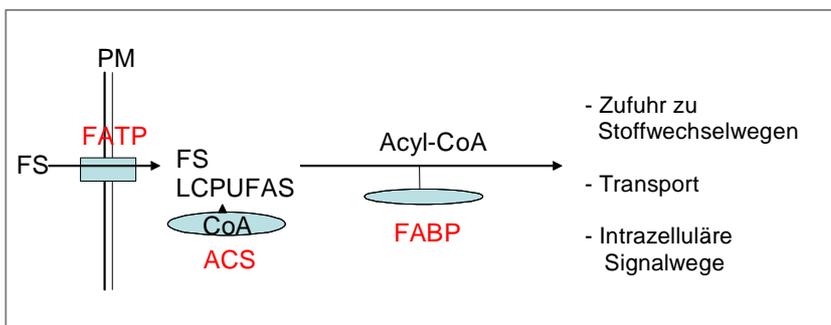
Die untersuchten Blastozysten beider Mausstämme weisen Transkripte der Fettsäuretransporter 1-5 auf. FATP6 konnte nicht detektiert werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Dies entspricht den Angaben aus der Literatur, wonach bei Mäusen nur die Isoformen 1 bis 5 exprimiert werden (Stahl et al., 2004). Präimplantationsembryonen nehmen somit aktiv Fettsäuren in ihre Zellen auf, wobei eine unterschiedliche Präferenz bezüglich der Fettsäuren in verschiedenen Entwicklungsstadien besteht. Humane Embryonen, die sich über das 4-Zell-Stadium hinaus entwickeln, weisen höhere Konzentrationen an Linolsäure und Ölsäure auf, in späteren Entwicklungsstadien werden vermehrt hoch ungesättigte Fettsäuren aufgenommen (Haggarty et al., 2006).

Heterozygote FATP4-*knock-out*-Mäuse konnten durch Verpaarung keine homozygoten Nachkommen (FATP4 *-/-*) hervorbringen. Der Fettsäuretransporter 4 wurde an endodermalen Strukturen von Wild-Typ-Mäusen (FATP4 *+/+*) lokalisiert und scheint eine wichtige Rolle während der embryonalen Entwicklung zu haben (Gimeno et al., 2003).

Neben den FATPs spielen in der späteren embryonalen Entwicklung die Acyl-CoA-Synthetase und die Fettsäure-Bindungsproteine (FABPs) eine Rolle bei der Aufnahme von Fettsäuren über die feto-maternale-Einheit (Dutta-Roy, 2000; Weedon-Feekjaer et al., 2010). Da sie zu einem ontogenetisch späteren Zeitpunkt diese Aufgaben erfüllen, ist es wahrscheinlich, dass diese Moleküle neben den Fettsäure-Transportern auch zur Aufnahme und dem intrazellulären Transport von Fettsäuren in die Zellen von Blastozysten beitragen.

#### 4.2.3 Fettsäure-Bindungsproteine

Neben der Fettsäure-Aufnahme aus dem maternalen Stoffwechsel tragen die FABPs (vor allem FABP1) auch zur Differenzierung und Entwicklung von embryonalen Stammzellen bei (Schroeder et al., 2001). FABP4 ist allgemein als Marker des Metabolischen Syndroms im adulten Organismus bekannt (siehe 1.3.4). Unter hypoxischen Bedingungen steigern die FABPs in humanen Trophoblastzellen die Lipid-Akkumulation und werden zudem selbst gesteigert gebildet (Biron-Shental et al., 2007). Somit kommen den Fettsäure-Bindungsproteinen 3 und 4, die in dieser Arbeit nachgewiesen wurden, neben dem zellulären Lipidtransport vermutlich auch regulatorische Eigenschaften im Blastozysten-Organismus zu.



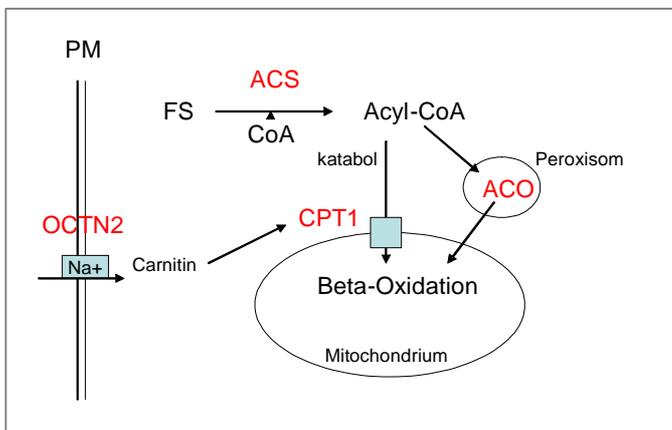
**Abbildung 11** In Mausblastozysten nachgewiesene Marker des Lipidmetabolismus (rot markiert): Aufnahme von Fettsäuren über Fettsäuretransporter (FATPs) und intrazellulärer Transport.

Fettsäuren (FS) und langkettige ungesättigte Fettsäuren (LCPUFAS) werden mithilfe der FATPs über die Plasmamembran (PM) transportiert und durch die Acyl-CoA-Synthetase (ACS) verestert. Sie können dann mithilfe von Fettsäure-Bindungsproteinen (FABPs) gebunden werden, die selbst verschiedene zelluläre Funktionen erfüllen.

#### 4.2.4 Beta-Oxidation

Die Fettsäureverbrennung dient der Energiegewinnung in Form von Adenosin-Triphosphat (ATP). Die in dieser Arbeit untersuchten Marker dieses Stoffwechselweges

(Acyl-CoA-Synthetase, Acyl-CoA-Oxidase, Carnitin-Palmitoyl-Transferase) konnten an Blastozysten am Tag 3,5 in beiden Mausstämmen auf Transkriptionsebene nachgewiesen werden. Dieser Stoffwechselweg scheint für Präimplantationsembryonen essentiell zu sein, da die Inhibierung der Carnitin-Palmitoyl-Transferase als Zufuhr-Shuttle zur Beta-Oxidation die Entwicklung der Blastozysten negativ beeinflusst. Die Zufuhr von L-Carnitin dagegen verbessert das Entwicklungspotential der Blastozysten und kann sogar einen Mangel an Kohlehydraten durch eine höhere Beta-Oxidations-Rate ausgleichen (Dunning et al., 2010). Dies stärkt die Bedeutung des ebenfalls nachgewiesenen *organic cation/carnitine-transporters* (OCTN2). Störungen in der Metabolisierung langkettiger Fettsäuren führen beim Menschen zu Frühgeburtlichkeit, intrauteriner Wachstumsverzögerung und intrauterinem Fruchttod (Oey et al., 2006). Daher ist dieser Stoffwechselweg essentiell für die frühe embryonale und weitere Entwicklung.



**Abbildung 12** In Mausblastozysten nachgewiesene Marker des Lipidmetabolismus (rot markiert): Überblick über katabole Metabolisierung von Fettsäuren.

Fettsäure-Aktivierung/Veresterung: Acyl-CoA-Synthetase (ACS); Carnitin-Zufuhr über Plasmamembran (PM): OCTN2 (*organic cation/carnitine transporter*); Zufuhr zur Beta-Oxidation: CPT1 (*Carnitin-Palmitoyl-Transferase*); Beta-Oxidation: ACO (*Acyl-CoA-Oxidase*).

#### 4.2.5 Fettsäuresynthese

Neben dem katabolen Lipidmetabolismus ist ebenso die Fettsäuresynthese in Präimplantationsembryonen bedeutsam. In der vorliegenden Arbeit konnten Transkripte der Fettsäure-Synthase und der Acetyl-CoA-Carboxylase in Blastozysten beider Mausstämmen nachgewiesen werden. In Fettsäure-Synthase-*knock-out*-Mäusen können keine homozygoten Nachkommen (FSS *-/-*) gezüchtet werden und die Geburtenrate von heterozygoten Tieren (FSS *+/-*) ist geringer als die des Wildtypes. Diese Verluste sind zudem nicht durch vermehrtes Zufüttern von Fettsäuren reversibel.

(Chirala et al., 2003). Ebenso führt ein *knock-out* der Acetyl-CoA-Carboxylase 1 zu embryonalem Absterben am Tag 8,5 der Entwicklung (Abu-Elheiga et al., 2005). Somit ist die Fettsäuresynthese im Blastozystenstadium voll funktionsfähig und für die Entwicklung des Embryos essentiell.

#### 4.2.6 Glukoneogenese

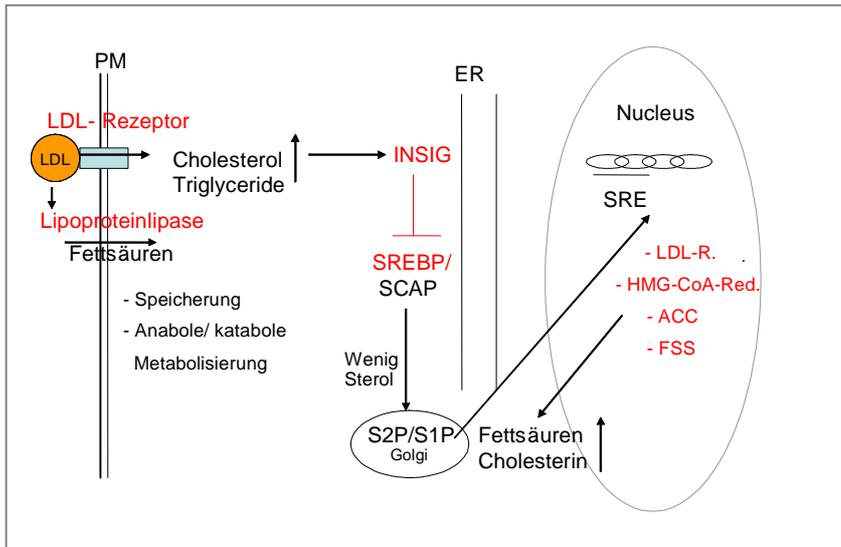
Die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) ist das Schlüsselenzym der Glukoneogenese und gibt der Blastozyste die Möglichkeit der eigenen Synthese von Kohlehydraten zur Energiegewinnung oder Speicherung. Sie wird in Kaninchen-Blastozysten reguliert durch Adiponectin und Insulin (Fischer et al., 2010; Ramin et al., 2010).

#### 4.2.7 Cholesterol-Metabolismus

Die Cholesterol-Synthese ist für Blastozysten essentiell. Eine Hemmung der HMG-CoA-Reduktase führt zu einer Inhibierung der Entwicklung ab dem 32-Zell-Stadium (Surani et al., 1983). Cholesterol ist Bestandteil embryonaler Membranen und kann ab dem 8-Zell-Stadium von Präimplantationsembryonen selbst synthetisiert werden (Pratt et al., 1980). Folge einer verminderten Cholesterol-Synthese-Aktivität ist das Smith-Lemli-Opitz-Syndrom, was mit einer fetalen Entwicklungsverzögerung einhergeht (Yao et al., 2007).

Reguliert wird die Cholesterol-Homöostase einer Zelle über die die *Sterol regulatory element-binding proteins 1 und 2* (SREBP1/2) sowie die *Insulin-induced genes 1 und 2* (INSIG1/2), deren Transkripte in dieser Arbeit ebenfalls in Blastozysten beider untersuchten Mausstämmen nachgewiesen wurden. Ihre Bedeutung für den Blastozysten-Organismus soll in Kapitel 4.3.2 diskutiert werden.

Neben Komponenten der Cholesterol-Synthese und deren Regulation konnten in Blastozysten beider Mausstämmen der LDL-Rezeptor und die Lipoproteinlipase nachgewiesen werden. Beide Marker dienen der Aufnahme und Verwertung von Triglyceriden und Cholesterol aus dem externen Milieu. In Präimplantationsembryonen der Maus ist der LDL-Rezeptor auch, wie in dieser Arbeit gezeigt, nachweisbar (Sato et al., 2003). Der Nachweis von LDL-Rezeptor und Lipoproteinlipase in humanen fetalen Membranen (Trophoblast, Amnion) späterer Entwicklungsstadien (Huter et al., 1997) lässt vermuten, dass die embryonale Entwicklung von Beginn an auf den Zufluss externen Cholesterols und Triglyceriden angewiesen ist und diese Zufuhr, zunächst aus dem Uterussekret, später aus der maternalen Zirkulation, bis zum Ende der Schwangerschaft nutzt.



**Abbildung 13** In Mausblastozysten nachgewiesene Marker des Lipidmetabolismus (rot markiert): Cholesterol-Aufnahme und Regulation.

Aufnahme von *Low-density-Lipoproteins* (LDL) über LDL-Rezeptor und Lipoproteinlipase. Aufgenommenes Cholesterol kann Expression der *Insulin-induced genes* (INSIGs) induzieren, die wiederum die *Sterol regulatory element-binding proteins* (SREBPs) hemmen. Diese aktivieren zusammen mit *SREBP cleavage activating protein* (SCAP) die Freisetzung der Transkriptionsfaktoren S1/2P. Diese aktivieren im Nucleus das Sterol-regulatory element (SRE), daraufhin werden anabole Enzyme (LDL-Rezeptor, HMG-CoA-Reduktase, Acetyl-CoA-Carboxylase, Fettsäure-Synthase) vermehrt transkribiert, sodass der Cholesterol- und Fettsäuregehalt der Zelle steigt.

#### 4.2.8 Regulation von Stoffwechselwegen: PPARs/RXR

Wie in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, handelt es sich bei den *peroxisome proliferator-activated receptors* und den *Retinoid X-Rezeptoren* um Signalmoleküle, die viele Stoffwechselwege regulieren können. In dieser Arbeit wurden Transkripte von RXR alpha und beta sowie PPAR alpha, beta/delta und gamma in Blastozysten beider Mausstämmen sowie RXR gamma nur in C57Bl/6-Blastozysten nachgewiesen. Die Funktion von PPARs und RXRs in Präimplantationsembryonen ist bereits untersucht worden. Bekannt ist, dass sowohl PPAR gamma als auch PPAR delta essentiell für die Entwicklung von Embryonen und der placentaren Funktion sind, da ein *knock-out* einer der beiden PPARs jeweils zu embryonaler Letalität zu einem frühen Zeitpunkt der Entwicklung führt (Barak et al., 1999; Nadra et al., 2006). Ebenso werden den RXRs eine große Bedeutung für das Entwicklungspotential von Embryonen zugeschrieben. Embryonen, die „qualitativ gut“ klassifiziert wurden, enthalten signifikant mehr Transkripte von RXR alpha und beta als „qualitativ schlechte“ (Mamo et al., 2005). Ein

Beispiel für die Rolle der PPARs in der embryonalen Entwicklung ist die Tatsache, dass über PPAR gamma/RXR-Agonisten sowohl die Expression von FATP4 also auch von Adipophilin in plazentaren Trophoblastzellen steigerbar ist und somit zum Fettsäure-Transport und zur Lipidakkumulation beiträgt (Schaiff et al., 2005). Somit wäre denkbar, dass diese Signal- und Regulationsmechanismen auch in ontogenetisch früheren Stadien wie in Präimplantationsembryonen Einfluss auf die verschiedenen Stoffwechselwege nehmen.

#### 4.2.9 RXR gamma-Defizienz

In Blastozysten der NZO-Mäuse konnte, im Gegensatz zu denen der C57Bl/6-Mäuse, keine Transkripte von RXR gamma detektiert werden. Im adulten NZO-Organismus wurde der Marker jedoch in verschiedenen Geweben nachgewiesen. Dies wirft die Frage nach der Bedeutung dieser temporären Defizienz auf.

Adulte RXR gamma-null-Mäuse weisen neben einem unveränderten Phänotyp eine Thyroid- und Vitamin A-Resistenz auf, was sich klinisch durch einen erhöhten T4-Plasmaspiegel und einen erhöhten Stoffwechselumsatz im Muskelgewebe auszeichnet. Durch den Funktionsausfall von RXR gamma am Pinealorgan kommt es zu einer zentralen Resistenz gegenüber den Schilddrüsenhormonen, was sich auf das Hungergefühl und Essverhalten auswirken kann. Die erhöhte Metabolisierungsrate kann durch die erhöhten T4-Werte und durch eine erhöhte Nahrungsaufnahme zu erklären sein. Die RXR gamma-Defizienz löst dabei keine Hochregulation der anderen RXRs aus (Brown et al., 2000). RXR gamma-defiziente Mäuse weisen zudem erhöhte Triglycerid-Spiegel im Plasma sowie eine erhöhte Lipoprotein-Lipase-Aktivität im Muskelgewebe während Nahrungskarenz auf. Diese Tiere nehmen in einem Mastversuch über 14 Tage weniger an Gewicht zu als ihre Wildtyp-Verwandten, weisen aber auch geringere Mengen an Leptin auf (Haugen et al., 2004). Die reduzierten Leptin-Spiegel können hierbei zu einem Wegfall der Hemmung des Hungergefühles und somit zu erhöhter Nahrungsaufnahme führen.

Eine Mutation im humanen RXR gamma-Gen ist assoziiert mit einer familiären kombinierten Hyperlipidämie (HCHL). Bei diesen Patienten führen eine reduzierte LPL-Aktivität und Störungen im Lipoprotein-Stoffwechsel zu den erhöhten Triglycerid-Spiegeln im Plasma. Der teilweise Funktionsausfall des RXR gamma-Gens kann hier zwar nicht als alleinige pathogene Ursache angesehen werden, ist aber wohl Teil des metabolischen Entgleisungsprozesses (Nohara et al., 2009). Daher könnte auch der Ausfall des RXR gamma-Transkriptes in der cDNA der NZO-Blastozysten an Tag 3,5 zwar keine alleinige Ursache, wohl aber ein möglicher und ontogenetisch sehr früher Faktor in der Genese der veränderten Stoffwechselsituation bei diesen Tieren sein.

In anderen Spezies gibt es ebenfalls Beispiele für einen Ausfall von RXR gamma. So kann dieser Marker auch in bovinen Blastozysten auf Transkriptionsebene nicht oder nur in manchen Embryonen nachgewiesen werden (Mohan et al., 2002; Mamo et al., 2005). Allerdings wird RXR gamma zum Teil in sehr frühen Entwicklungsstadien detektiert und korreliert dann positiv mit dem Entwicklungspotential der Embryonen, ähnlich wie die höheren Transkriptionsraten von RXR alpha und beta in „qualitativ guten“ Embryonen. RXR gamma könnte somit als Qualitätsmerkmal von Embryonen angesehen werden (Mamo et al., 2005) und der Wegfall des RXR gamma-Transkriptes in NZO-Blastozysten ein möglicher Hinweis auf ein vermindertes Entwicklungspotential sein.

In diesem Zusammenhang könnte eine Analyse der Fruchtbarkeit der beiden Mausstämmen aufschlussreich sein. Leider liegen von den NZO-Mäusen nicht genug aussagefähige Daten vor. Die durchschnittliche Anzahl der Blastozysten pro Tier, die in dieser Arbeit ermittelt wurde, unterscheidet sich in beiden Mausstämmen nicht voneinander (Ergebnisse nicht gezeigt). Die bekannte Wurfgröße der NZO-Mäuse schwankt zwischen 1-12 Nachkommen und ist somit nicht wesentlich anders als in den C57Bl/6-Mäusen. Es gibt jedoch eine größere Anzahl an Weibchen, die bei gesicherter Fertilität des Männchens nicht schwanger werden (Bielschowsky et al., 1956).

Zu klären bleibt, inwieweit sich der Ausfall von RXR gamma in diesem frühen Entwicklungsstadium auf den späteren Organismus und dessen Entwicklung auswirkt und zu welchem Zeitpunkt die Expression dieses Markers in den Embryonen wieder einsetzt. In adulten Tieren ist RXR gamma nachweisbar. Dies spricht dafür, dass bei den NZO-Mäusen keine vollständige RXR gamma-Defizienz vorliegt, dass aber die Expression entweder später als an Tag 3,5 (wieder) beginnt oder dass zu diesem Zeitpunkt die Quantität des Transkriptes unterhalb der Nachweisgrenze der PCR-Methode liegt. Zu beachten ist weiterhin die mögliche Austauschbarkeit der drei RXR-Isoformen unter in-vitro Bedingungen, da hierbei alle PPARs mit RXR alpha, beta und gamma Dimere bilden können (Mohan et al., 2002). Somit bleibt zu klären, welche entwicklungsphysiologische Bedeutung der funktionelle Ausfall von RXR gamma hat.

Festzuhalten ist, dass an Tag 3,5 die Entwicklung der NZO-Embryonen ohne oder mit einer sehr geringen Menge an transkribiertem RXR gamma vonstatten gehen muss, während alle Komponenten des PPAR-Signalweges inklusive RXR gamma in C57Bl/6-Blastozysten detektierbar sind.

#### 4.2.10 Prostaglandine und PPAR delta

Transkripte von PPAR delta und der Prostaglandin- $I_2$ -Synthase wurden in Blastozysten beider Mausstämmen nachgewiesen. Bekannt ist, dass Prostaglandin  $I_2$  (Prostazyklin)

via PPAR delta Einfluss nimmt auf das Entwicklungspotential von Präimplantationsembryonen, die Implantation und die Dezidualisation (Lim et al., 1999; Cammas et al., 2006; Pakrasi et al., 2008; Gillio-Meina et al., 2009). Da Prostazyklin einen positiven Einfluss auf die Entwicklung hat, ist die Detektion der PGI<sub>2</sub>-Synthase in Blastozysten mitsamt des Rezeptors PPAR delta nicht verwunderlich. Bei normaler Funktion können Blastozysten womöglich selbst ihr Entwicklungspotential unterstützen.

#### 4.2.11 Perilipin und Adipophilin

Perilipin und Adipophilin sind in ihrer Funktion als PAT-Proteine, die zelluläre Lipidspeicher vor Lipolyse schützen, (siehe Kapitel 1.3.6) sowohl in Oozyten bekannt, als auch in humanen fetalen Membranen (Trophoblast, Chorion, Amnion) nachgewiesen worden. In Oozyten reguliert Perilipin die Nutzung der Lipidspeicher während der Eizellreifung (Yang et al., 2010), in fetalen Membranen sind die zellulären Lipidtropfen je nach Lokalisation von unterschiedlichen PAT-Proteinen umgeben, sodass ihnen unterschiedliche Funktionen zugeschrieben werden (Ackermann et al., 2007). In humanen Trophoblastzellen ist die Expression von Adipophilin während der Differenzierung erhöht und wird durch PPAR gamma/RXR-Agonisten heraufreguliert (Bildirici et al., 2003). Ebenfalls in Trophoblastzellen stimulieren sowohl Insulin als auch Fettsäuren die Expression von Adipophilin und erhöhen somit die Lipidakkumulation in den Zellen (Elchalal et al., 2005).

Der Nachweis der Transkripte von Perilipin und Adipophilin an Blastozysten am Tag 3,5 der Entwicklung lässt vermuten, dass auch zu diesem Zeitpunkt Lipidspeicherung und –nutzung durch diese Proteine reguliert werden.

#### 4.3 Vergleich der NZO- und C57Bl/6-Blastozysten

Mittels densitometrischer Methoden wurde eine semiquantitative Analyse von Blastozysten der adipösen NZO- und der C57Bl/6-Mäuse für die untersuchten Marker durchgeführt. Die Betrachtung des Stoffwechsels in einem adipösen Organismus, verglichen mit einem normalgewichtigen, wirft die Frage nach der Beeinflussbarkeit der Embryonalentwicklung durch den maternalen Stoffwechsel und nach der metabolischen Programmierbarkeit des Embryos auf.

Im diabetischen Tiermodell konnte unlängst gezeigt werden, dass diese veränderte Stoffwechsellage zu Veränderungen im Glukose- und Aminosäureangebot im Uterussekret von Kaninchen führt. Ebenso zeigt sich eine verminderte Fertilitätsrate und eine erhöhte Apoptoserate ihrer Blastozysten (Ramin et al., 2010). Auch die maternale Ernährung hat Folgen auf die embryonale Entwicklung. Eine maternale

Hyperlipidämie, ausgelöst durch fettreiche Diät, mit verändertem uterinen Milieu im adipösen Organismus, wurde in bovinen Embryonen-Kulturen nachgestellt und eine verminderte Entwicklungsfähigkeit der Embryonen nachgewiesen. Dabei führte der Zusatz von cholesterol- und fettsäurereichem maternalen Serum zum Kulturmedium von bovinen Zygoten zu einer reduzierten Anzahl an weiterentwickelten Embryonen im Blastozystenstadium und zu einer Verminderung der Zellzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ebenso konnten erhöhte Transkripte von Apoptose-Markern in den behandelten Embryonen nachgewiesen werden (Leroy et al., 2010).

Eine starke Zufuhr von Omega-3 mehrfach ungesättigten Fettsäuren perikonzeptionell vermindert ebenso das Entwicklungspotential von Präimplantationsembryonen (Wakefield et al, 2008). Eine Hyperglykämie während der Schwangerschaft korreliert mit der Ausprägung von kindlicher Adipositas (Hillier et al., 2007). Ebenso konnte im Mausmodell durch Überernährung der Muttertiere während der Schwangerschaft eine Verhaltensänderung der Nachkommen gezeigt werden, die neben Hyperphagie auch verminderte körperliche Aktivität und später einen adipösen Phänotyp aufweisen (Sullivan und Grove, 2010). Auch der maternale Protein-Stoffwechsel hat Einfluss auf die frühe embryonale Entwicklung. Eine Protein-Mangelernährung während der Perikonzeptionsperiode führt in Ratten zu einer Reduktion der essentiellen Aminosäuren in der maternalen Zirkulation und zu einer verminderten Zellzahl in Blastozysten. Postnatal zeigen die Nachkommen Veränderungen des körperlichen Wachstums und hypertensive Blutdruckwerte (Fleming et al., 2004). Eine solche Mangelernährung beeinflusst auch direkt den fetalen Stoffwechsel durch Induktion einiger hepatischer Stoffwechsellmarker, wie beispielsweise der hepatischen PEPCCK (Kwong et al., 2007).

Resümierend ist festzustellen, dass die maternale metabolische Situation, beispielsweise im adipösen oder diabetischen Organismus, entscheidend Einfluss nimmt auf die Entwicklung und Prägung des embryonalen und späteren kindlichen Stoffwechsels.

#### 4.3.1 Ergebnisse des semiquantitativen Vergleichs

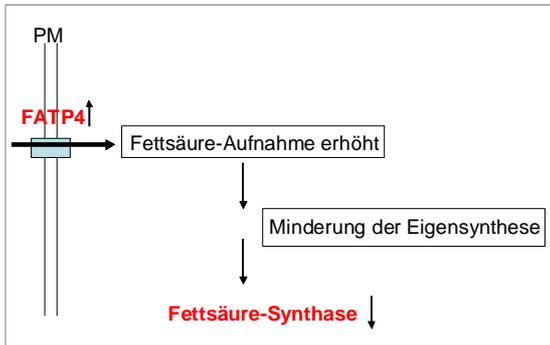
Das wichtigste Ergebnis der vergleichenden Quantifizierung der untersuchten Stoffwechsellparameter ist die signifikant erhöhte Transkriptionsrate von FATP4 in Präimplantationsembryonen der adipösen NZO-Mäuse (Abbildung 6). Auch die anderen untersuchten Fettsäuretransporter weisen dieselbe Tendenz auf, für sie konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Populationen gezeigt werden. Dies gilt ebenso für die Transkripte des Fettsäure-Bindungsproteins 4 in NZO-

Embryonen, die tendenziell erhöht zu sein scheinen. Hier wären weitere Untersuchungen notwendig, um Unterschiede deutlicher zu charakterisieren.

Bekannt ist, dass in plazentarem Gewebe übergewichtiger Mutterschafe FATP1 und 4 sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene gegenüber normalgewichtigen Tieren erhöht sind. Gleichzeitig sind Cholesterol- und Triglyceridwerte in maternalem und fetalem Blut erhöht. (Zhu et al., 2010). Ebenso führt beim Menschen eine vermehrte Zufuhr von Docosahexaensäure (eine mehrfach ungesättigte Omega-3-Fettsäure) in der zweiten Hälfte der Schwangerschaft zu erhöhten Fettsäure-Konzentrationen im maternalen sowie dem Nabelschnurblut. Die ermittelte Konzentration korreliert dabei positiv mit der Expression von FATP1 und 4 an plazentaren Membranen (Larqué et al., 2006). Es gibt also einen Zusammenhang zwischen Fettsäure-Angebot und Expression der Fettsäuretransportproteine.

Eine vermehrte Transkription von FATP4 in Blastozysten der NZO-Mäuse impliziert nun die Frage nach dem auslösenden Mechanismus. Da die Blastozyste nicht direkt durch die maternale Zirkulation versorgt wird, könnte ein Grund in einem veränderten Fettsäure-Angebot des Uterussekretes der NZO-Mäuse liegen, ähnlich der veränderten Aminosäure- und Glukosezusammensetzung im Uterussekret des diabetischen Kaninchens (Ramin et al., 2010). Dies sollte durch Untersuchungen des uterinen Milieus im adipösen Organismus weitergehend analysiert werden und könnte klinische Relevanz in der Kultur von Embryonen bei Methoden der assistierten Reproduktion erlangen.

Ein weiteres Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist die, wenn auch nur grenzwertig signifikant, niedrigere Transkriptrate der Fettsäure-Synthase in NZO-Präimplantationsembryonen ( $p=0,049$ ) (Abbildung 5). Es ist bekannt, dass die Fettsäure-Synthase im Fettgewebe des adulten adipösen Organismus vermehrt transkribiert wird und eine Rolle in der Genese von Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 spielt (Berndt et al., 2007). Diese Veränderung scheint sich demnach nicht auf die frühe embryonale Entwicklung übertragen zu lassen. Ein möglicher Grund für die verminderte Transkription der FSS und damit der eigenen Fettsäure-Synthese der NZO-Blastozysten könnte in der oben beschriebenen höheren Expression von FATP4 und damit einem höheren Influx von Fettsäuren aus dem externen Milieu sein. Somit wäre die Verminderung der Fettsäure-Synthese ein sinnvoller Kompensationsmechanismus, um die zelluläre Homöostase zu regulieren.



**Abbildung 14** Möglicher Mechanismus zur Regulation der Fettsäure-Homöostase in Blastozysten von NZO-Mäusen. (FATP= Fettsäuretransportprotein, PM=Plasmamembran).

#### 4.3.2 Cholesterol-Metabolismus: Veränderte Regulation in Blastozysten der NZO-Mäuse?

Die Regulation der Cholesterol-Synthese über INSIG/SREBP unterliegt im fetalen Organismus einer Dysregulation. Eine Cholesterol-induzierte Synthese-Senkung im Sinne einer Produkthemmung fällt im Gegensatz zu adulten in fetalen Zellen marginal aus. Dies ist bedingt durch eine konstitutionelle Expression von SREBP2 durch einen *lack of response* auf der Ebene der INSIGs, die normalerweise die Cholesterol-Synthese vermindern. Die Folge ist, dass eine optimale Versorgung des Feten mit Cholesterol gewährleistet ist (Yao et al., 2007). Dieses Überwiegen von SREBP2 über die INSIGs spiegelt sich in dem in Kapitel 3.5.2 gezeigten Diagramm (Abbildung 10) in Embryonen der C57Bl/6-Mäuse durch ein auf das 2,4fache erhöhtes Verhältnis von SREBP2 zu INSIG1 wider. In den NZO-Blastozysten scheinen die Verhältnisse von SREBP2 zu INSIG1 und 2 dagegen ausgeglichen. Dies ist ein Hinweis auf eine mögliche Veränderung in der Regulation der zellulären Cholesterol-Homöostase und könnte in der Folge zu einem Minderangebot von Cholesterol während der embryonalen Entwicklung führen, auch wenn zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung in dieser Arbeit kein quantitativer Unterschied der Transkriptmenge der durch SREBP2 induzierten HMG-CoA-Reduktase festgestellt werden konnte. In der weiteren Entwicklung könnte es jedoch, aufgrund der Bedeutung des Cholesterols als Komponente von Zellmembranen und als Substrat für Signalmoleküle, zu intrauteriner Wachstumsverzögerung und zu einer Beeinträchtigung von Signalwegen kommen.

#### 4.4 Ausblick

Diese Arbeit bietet einen breiten Überblick über Fettstoffwechselfparameter in Blastozysten. Aufgrund der großen Anzahl an untersuchten Parametern war eine eingehende Untersuchung einzelner Marker nicht durchführbar. Daher ist diese Arbeit die Basis für weitergehende Untersuchungen der Parameter, die durch diesen Überblick als aussagekräftig herausgearbeitet wurden.

Dazu muss im ersten Schritt die Aussagekraft der quantitativen Analyse durch weitere Stichproben ergänzt und durch andere Analysemethoden, beispielsweise durch *Real-Time-PCR*, verifiziert werden. Ebenso muss eine Überprüfung der potentiellen Funktionalität der auf Transkriptionsebene nachgewiesenen Parameter auf Proteinebene durch *Western-Blot* erfolgen. Vielversprechend wäre insbesondere die weitere Analyse und Quantifizierung der Fettsäuretransportproteine, insbesondere FATP4, der Fettsäure-Synthase, der Marker des Cholesterometabolismus (SREBPs/INSIGs, HMG-CoA-Reduktase, LDL-Rezeptor), aber auch von FABP4, Perilipin und Adipophilin als gut untersuchter Marker der adipösen Dysregulation im adulten Organismus. Im abschließenden Versuchsteil müssten die funktionellen Auswirkungen der gezeigten veränderten Stoffwechselsituation in Form von langfristigen Auswirkungen auf die metabolische Entwicklung verifiziert werden. Schließlich wären Untersuchungen von Interesse, die vor allem aufgrund der aufwändigen Materialgewinnung in dieser Arbeit nicht durchgeführt werden konnten:

- Untersuchungen von Embryonen des NZO-Stammes zu früheren/ späteren Zeitpunkten und Detektion des Zeitpunktes, an dem RXR gamma (wieder) nachweisbar ist.
- Vergleichende Messungen der Zusammensetzung des Uterussekretes beider Mausstämme mit der Frage nach qualitativen und quantitativen Unterschieden bei wichtigen Komponenten des Lipidstoffwechsels.
- Kultivierungsversuche von NZO-Blastozysten in „Mangel-Nährmedien“ nach Analyse des physiologischen Milieus mit anschließendem Embryonentransfer und Untersuchung der langfristigen Folgen auf die Entwicklung und Stoffwechselsituation der Nachkommen.
- Vergleich des Phosphorylierungsstatus von Hormonsensitiver Lipase und Perilipin/Adipophilin als Gegenspieler der Aktivierung und Inhibierung der Lipolyse in NZO- sowie C57Bl/6-Embryonen.
- Weitere Untersuchungen des SREBP/INSIG-Signalweges und des Cholesterometabolismus in NZO-Embryonen.

5 Zusammenfassung

Ein breites Spektrum wichtiger Parameter des Fettsäure- und Cholesterolmetabolismus ist in Blastozysten der Maus am Tag 3,5 der Ontogenese beim NZO- und C57Bl/6-Stamm auf Transkriptionsebene nachweisbar. Einziger statistisch nachweisbarer Unterschied zwischen Blastozysten beider Stämme besteht in dem Fehlen des RXR gamma-Signalmoleküls in NZO-Blastozysten zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung. Da dieser Marker in verschiedenen Geweben adulter NZO-Mäuse nachweisbar ist, muss hier von einer transienten Defizienz ausgegangen werden.

In der semiquantitativen Analyse konnte eine signifikant erhöhte Transkriptionsmenge von FATP4 in Präimplantationsembryonen der NZO-Mäuse gegenüber denen des C57Bl/6-Mausstammes ermittelt werden. Dagegen ist die Fettsäure-Synthese in NZO-Embryonen signifikant erniedrigt. Dies spricht für eine vermehrte Aufnahme von Fettsäuren aus dem uterinen Milieu in NZO-Blastozysten und in der Folge für eine Produkthemmung der zellulären Fettsäure-Eigensynthese.

Weiterhin konnte ein Unterschied in der Cholesterol-Synthese-Regulation in Blastozysten beider Mausstämme gezeigt werden. Während in C57Bl/6-Embryonen das Verhältnis von SREBP2 zu INSIG1 auf das 2,4fache erhöht ist ( $p=0,001$ ), ist es in NZO-Embryonen ausgeglichen. Dies könnte in der Folge zu einer verminderten Cholesterol-Synthese in Blastozysten des NZO-Mausstammes führen.

Festzuhalten ist, dass der Fettsäure- und Cholesterol-Metabolismus in Blastozysten der Maus mit den gleichen Enzymen und Signalmolekülen vonstatten geht wie im adulten Organismus. Auch wenn es noch weiterer Quantifizierungen bedarf, zeigen sich Unterschiede in den Transkriptionsmengen einzelner Stoffwechselmarker in Blastozysten adipöser und nicht-adipöser Muttertiere. Dies ist ein Hinweis auf eine frühe metabolische Prägung von Präimplantationsembryonen im adipösen maternalen Organismus.

## Summary

Lipid metabolism parameters were studied in day 3.5 blastocysts from NZO (obese mice) and C57/Bl6 mice (normal weight) by RT-PCR: Acyl-CoA oxidase (ACOX), carnitine palmitoyl transferase (CPT), organic cation/carnitine transporter (OCTN2), fatty acid synthase (FAS), Acyl-CoA carboxylase (ACC), lipoprotein lipase (LPL), Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), fatty acid transport protein 1-5 (FATP), acyl-CoA synthetase (ACS), fatty acid-binding protein (FABP), peroxisome proliferator-activated receptor alpha, beta/delta and gamma (PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ ), retinoid x receptor alpha and beta, (RXR $\alpha$ , RXR $\beta$ ), prostaglandin I<sub>2</sub> (prostacyclin) synthase (PTGIS), insulin-induced gene-1 and -2 (INSIG-1, INSIG-2), sterol regulatory element-binding protein-1 and -2 (SREBP-1, SREBP-2), hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, low density lipoprotein receptor (LDLR), adipophilin, perilipin.

The only obvious difference between both strains was the lack of the *RXR gamma* (*RXR $\gamma$* ) transcript in NZO blastocysts. In adult NZO mice, *RXR gamma* is detectable in most tissues. Thus, there is a transient lack of *RXR gamma* transcription in NZO mice during preimplantation embryo development.

In a semiquantitative analysis, a higher transcription rate of *FATP4* ( $p=0.004$ ) and a lower of *fatty-acid synthase* ( $p=0.049$ ) was found in NZO blastocysts, suggesting that preimplantation embryos in an obese organism have a higher uptake of fatty acids from the uterine milieu than those in a non-obese mother.

Furthermore, a modification of the cholesterol-synthesis regulation was found in NZO blastocysts. Whereas the ratio of SREBP2/INSIG1 was upregulated in embryos of the C57Bl/6 strain ( $p=0.001$ ), the ratio was balanced in the NZO blastocysts. This dysregulation could contribute to a reduced cholesterol synthesis.

*Conclusion:* In mice blastocysts, enzymes and signal molecules of the fatty acid and cholesterol metabolism closely resemble those been known to be expressed postnatally. However, transcript rates of a few parameters differ between blastocysts from obese and non-obese mothers (*RXR gamma*, *FATP4*, *FAS*), indicating an early target for *metabolic imprinting* during preimplantation embryo development in this species.

6 Literaturverzeichnis

**Alemán G**, Torres N, Tovar AR (Review, 2004) Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in obesity and insulin resistance development.

Rev Invest Clin 56(3):351-67.

**Abu-Elheiga L**, Matzuk MM, Kordari P, Oh W, Shaikenov T, Gu Z, Wakil SJ (2005) Mutant mice lacking acetyl-CoA carboxylase 1 are embryonically lethal.

Proc Natl Acad Sci U S A 102(34):12011-6.

**Ackerman WE** 4th, Robinson JM, Kniss DA (2007) Association of PAT proteins with lipid storage droplets in term fetal membranes. Placenta 28(5-6):465-76.

**Barak Y**, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM (1999) PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. Mol Cell. 4(4):585-95.

**Barbagallo CM**, Averna MR, Citarrella R, Rizzo M, Amato M, Noto D, Pugliese A, Cefalù AB, Galluzzo A, Giordano C (2004) Transient chylomicronemia preceding the onset of insulin-dependent diabetes in a young girl with no humoral markers of islet autoimmunity. Eur J Endocrinol 150(6):831-6.

**Becker W**, Kluge R, Kantner T, Linnartz K, Korn M, Tschank G, Plum L, Giesen K, Joost HG (2004) Differential hepatic gene expression in a polygenic mouse model with insulin resistance and hyperglycemia: evidence for a combined transcriptional dysregulation of gluconeogenesis and fatty acid synthesis.

J Mol Endocrinol 32(1):195-208.

**Bell M**, Wang H, Chen H, McLenithan JC, Gong DW, Yang RZ, Yu D, Fried SK, Quon MJ, Londos C, Sztalryd C (2008) Consequences of lipid droplet coat protein downregulation in liver cells: abnormal lipid droplet metabolism and induction of insulin resistance. Diabetes 57(8):2037-45.

**Bellver J**, Ayllón Y, Ferrando M, Melo M, Goyri E, Pellicer A, Remohí J, Meseguer M (2010) Female obesity impairs in vitro fertilization outcome without affecting embryo quality. Fertil Steril. 93(2):447-54.

**Berndt J**, Kovacs P, Ruschke K, Klötting N, Fasshauer M, Schön MR, Körner A, Stumvoll M, Blüher M (2007) Fatty acid synthase gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes.

Diabetologia 50(7):1472-80.

**Bielschowsky M**, Bielschowsky F, Lindsay D (1956) A new strain of mice with a high incidence of mammary cancers and enlargement of the pituitary.

Br J Cancer 10(4):688-99.

- Bielschowsky M, Goodall CM (1970)** Origin of Inbred NZ Mouse Strains. *Cancer Res* 30, 834-836, p834.
- Bildirici I, Roh CR, Schaiff WT, Lewkowski BM, Nelson DM, Sadovsky Y (2003)** The lipid droplet-associated protein adipophilin is expressed in human trophoblasts and is regulated by peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma/retinoid X receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 88(12):6056-62.
- Biron-Shental T, Schaiff WT, Ratajczak CK, Bildirici I, Nelson DM, Sadovsky Y (2007)** Hypoxia regulates the expression of fatty acid-binding proteins in primary term human trophoblasts. *Am J Obstet Gynecol* 197(5):516.e1-6.
- Brown NS, Smart A, Sharma V, Brinkmeier ML, Greenlee L, Camper SA, Jensen DR, Eckel RH, Krezel W, Chambon P, Haugen BR (2000)** Thyroid hormone resistance and increased metabolic rate in the RXR-gamma-deficient mouse. *J Clin Invest* 106(1):73-9.
- Cabr e A, L azaro I, Girona J, Manzanares JM, Marim on F, Plana N, Heras M, Masana L (2008)** Plasma fatty acid binding protein 4 is associated with atherogenic dyslipidemia in diabetes. *J. Lipid Res.* 49(8):1746-51.
- Cammas L, Reinaud P, Bordas N, Dubois O, Germain G, Charpigny G (2006)** Developmental regulation of prostacyclin synthase and prostacyclin receptors in the ovine uterus and conceptus during the peri-implantation period. *Reproduction* 131(5):917-27.
- Chang BH, Li L, Paul A, Taniguchi S, Nannegari V, Heird WC, Chan L (2006)** Protection against fatty liver but normal adipogenesis in mice lacking adipose differentiation-related protein. *Mol. Cell. Biol* 26(3):1063-76
- Chang GQ, Gaysinskaya V, Karatayev O, Leibowitz SF (2008)** Maternal high-fat diet and fetal programming: increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity. *J Neurosci* 28(46):12107-19.
- Chankiewicz E, Peschke D, Herberg L, Bazwinsky I, M uhlbauer E, Br omme HJ, Peschke E (2006)** Did the gradual loss of GLUT2 cause a shift to diabetic disorders in the New Zealand obese mouse (NZO/HI)? *Exp Clin Endocrinol Diabetes*.114(5):262-9.
- Chirala SS, Chang H, Matzuk M, Abu-Elheiga L, Mao J, Mahon K, Finegold M, Wakil SJ (2003)** Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die in utero. *The Proc Natl Acad Sci U S A* 100(11):6358-63.
- Coe NR, Smith AJ, Frohnert BI, Watkins PA, Bernlohr DA (1999)** The fatty acid

transport protein (FATP1) is a very long chain acyl-CoA synthetase.

J Biol Chem. 274(51):36300-4.

**Coleman DL** (1978) Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia* 14(3):141-8.

**Dalen KT**, Schoonjans K, Ulven SM, Weedon-Fekjaer MS, Bentzen TG, Koutnikova H, Auwerx J, Nebb HI (2004) Adipose tissue expression of the lipid droplet-associating proteins S3-12 and perilipin is controlled by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes*. 53(5):1243-52.

**Dalen KT**, Ulven SM, Arntsen BM, Solaas K, Nebb HI (2006) PPARalpha activators and fasting induce the expression of adipose differentiation-related protein in liver. *J. Lipid Res* 47(5):931-43.

**Dunning KR**, Cashman K, Russell DL, Thompson JG, Norman RJ, Robker RL (2010) Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. *Biol Reprod* 83(6):909-18.

**Dutta-Roy AK** (2000) Cellular uptake of long-chain fatty acids: role of membrane-associated fatty-acid-binding/transport proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 57(10):1360-72.

**Elchalal U**, Schaiff WT, Smith SD, Rimon E, Bildirici I, Nelson DM, Sadovsky Y (2005) Insulin and fatty acids regulate the expression of the fat droplet-associated protein adipophilin in primary human trophoblasts. *Am J Obstet Gynecol.* 193(5):1716-23.

**Engelking LJ**, Liang G, Hammer RE, Takaishi K, Kuriyama H, Evers BM, Li WP, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS (2005) Schoenheimer effect explained-feedback regulation of cholesterol synthesis in mice mediated by Insig proteins. *J Clin Invest* 115(9):2489-98.

**Ernährungsbericht 2008.** Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V. DGEinfo 1/2009 – Forschung, Klinik, Praxis. Kapitel: Ernährungssituation in Deutschland. Abgerufen am 04.02.2011 unter <http://www.dge.de/modules.php?name=News&file=article&sid=914>

**Europäische Ministerkonferenz der WHO** zur Bekämpfung der Adipositas. Bericht über die Konferenz. (2007), S.22.

**Falcon A**, Doege H, Fluit A, Tsang B, Watson N, Kay MA, Stahl A (2010) FATP2 is a hepatic fatty acid transporter and peroxisomal very long-chain acyl-CoA synthetase. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 299(3):E384-93.

**Fernandes-Santos C**, Carneiro RE, Mendonca LD, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA (2009) Pan-PPAR agonist beneficial effects in overweight mice fed a

high-fat high-sucrose diet. *Nutrition* 25(7-8):818-27.

**Fischer S**, Santos AN, Thieme R, Ramin N, Fischer B (2010) Adiponectin stimulates glucose uptake in rabbit blastocysts. *Biol Reprod* 83(5):859-65.

**Fisher RM**, Gertow K (2005) Fatty acid transport proteins and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol.*16(2):173-8

**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):1046-54.

**Giesen K**, Plum L, Kluge R, Ortlepp J, Joost HG (2003) Diet-dependent obesity and hypercholesterolemia in the New Zealand obese mouse: identification of a quantitative trait locus for elevated serum cholesterol on the distal mouse chromosome 5. *Biochem Biophys Res Commun.* 304(4):812-7

**Gillio-Meina C**, Phang SH, Mather JP, Knight BS, Kennedy TG (2009) Expression patterns and role of prostaglandin-endoperoxide synthases, prostaglandin E synthases, prostacyclin synthase, prostacyclin receptor, peroxisome proliferator-activated receptor delta and retinoid x receptor alpha in rat endometrium during artificially-induced decidualization. *Reproduction* 137(3):537-52.

**Gimeno RE**, Hirsch DJ, Punreddy S, Sun Y, Ortegon AM, Wu H, Daniels T, Stricker-Krongrad A, Lodish HF, Stahl A (2003) Targeted deletion of fatty acid transport protein-4 results in early embryonic lethality. *J Biol Chem.* 278(49):49512-6.

**Goodall CM**, Bielschowsky M, Forster DR, D'Ath EF (1973) Oncological and survival reference data for NZO-B1 inbred mice. *Lab Anim.* 7(1):65-71.

**Gruber PJ**, Kubalak SW, Pexieder T, Sucov HM, Evans RM, Chien KR (1996) RXR alpha deficiency confers genetic susceptibility for aortic sac, conotruncal, atrioventricular cushion, and ventricular muscle defects in mice. *J Clin Invest* 98(6):1332-43.

**Haggarty P**, Wood M, Ferguson E, Hoad G, Srikantharajah A, Milne E, Hamilton M, Bhattacharya S (2006) Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos. *Hum. Reprod.* 21(3):766-73.

**Haluzík M**, Anderlová K, Doležalová R, Adamíková A, Haluzíková D, Housová J, Svačina S, Haluzík M (2008) Serum adipocyte fatty acid binding protein levels in patients with type 2 diabetes mellitus and obesity: the influence of fenofibrate treatment. *Physiol Res.* 58(1):93-9.

**Haskell BD**, Flurkey K, Duffy TM, Sargent EE, Leiter EH (2002) The diabetes-

prone NZO/HILt strain. I. Immunophenotypic comparison to the related NZB/BINJ and NZW/LacJ strains. *Lab Invest* 82(7):833-42.

**Haugen** BR, Jensen DR, Sharma V, Pulawa LK, Hays WR, Krezel W, Chambon P, Eckel RH (2004) Retinoid X receptor gamma-deficient mice have increased skeletal muscle lipoprotein lipase activity and less weight gain when fed a high-fat diet. *Endocrinology* 145(8):3679-85.

**Heid** HW, Moll R, Schwetlick I, Rackwitz HR, Keenan TW (1998) Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tiss. Res.* 294(2):309-21.

**Hillier** TA, Pedula KL, Schmidt MM, Mullen JA, Charles MA, Pettitt DJ (2007) Childhood obesity and metabolic imprinting: the ongoing effects of maternal hyperglycemia. *Diabetes Care* 30(9):2287-92.

[http://apropos.mcw.edu/kegg\\_pathways/03320](http://apropos.mcw.edu/kegg_pathways/03320)), Kegg ID 03320. abgerufen am 04.02.2011.

<http://de.wikipedia.org/wiki/DNA-Sequenzierung>, abgerufen am 04.02.2011.

**Hua** X, Wu J, Goldstein JL, Brown MS, Hobbs HH (1995) Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13. *Genomics* 10;25(3):667-73.

**Huang** JC, Wun WS, Goldsby JS, Wun IC, Falconi SM, Wu KK (2003) Prostacyclin enhances embryo hatching but not sperm motility. *Hum. Reprod.* 18(12):2582-9.

**Huang** JC, Wun WS, Goldsby JS, Wun IC, Noorhasan D, Wu KK (2007) Stimulation of embryo hatching and implantation by prostacyclin and peroxisome proliferator-activated receptor delta activation: implication in IVF. *Hum. Reprod.* 22(3):807-14.

**Hubbard** B, Doege H, Punreddy S, Wu H, Huang X, Kaushik VK, Mozell RL, Byrnes JJ, Stricker-Krongrad A, Chou CJ, Tartaglia LA, Lodish HF, Stahl A, Gimeno RE (2006) Mice deleted for fatty acid transport protein 5 have defective bile acid conjugation and are protected from obesity. *Gastroenterology.* 130(4):1259-69.

**Huter** O, Wolf HJ, Schnetzer A, Pfaller K (1997) Lipoprotein lipase, LDL receptors and apo-lipoproteins in human fetal membranes at term. *Placenta* 18(8):707-15.

**Ikonen** E (2008) Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 125-138

**International** Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology, de Mouzon J, Lancaster P, Nygren KG, Sullivan E, Zegers-Hochschild F, Mansour R, Ishihara O, Adamson D (2002) World collaborative report on Assisted Reproductive Technology, 2002. Hum. Reprod. 24(9):2310-20.

**Johnsen** GM, Weedon-Fekjaer MS, Tobin KA, Staff AC, Duttaroy AK (2009) Long-chain polyunsaturated fatty acids stimulate cellular fatty acid uptake in human placental choriocarcinoma (BeWo) cells. Placenta 30(12):1037-44.

**Jürgens** HS, Schürmann A, Kluge R, Ortmann S, Klaus S, Joost HG, Tschöp MH (2006) Hyperphagia, lower body temperature, and reduced running wheel activity precede development of morbid obesity in New Zealand obese mice. Physiol. Genomics 25(2):234-41.

**Kadowaki** T (2001) PPAR gamma agonist and antagonist.

Folia Pharmacol. Jpn. 118(5):321-6.

**Kastner** P, Mark M, Leid M, Gansmuller A, Chin W, Grondona JM, Décimo D, Krezel W, Dierich A, Chambon P (1996) Abnormal spermatogenesis in RXR beta mutant mice. Genes Dev 10(1):80-92.

**Kern** PA, Di Gregorio G, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G (2004) Perilipin Expression in Human Adipose Tissue Is Elevated with Obesity.

J Clin Endocrinol Metab 89(3):1352–1358

**Kersten** S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. J Clin Invest 103(11):1489-98.

**Kluge** R, Giesen K, Bahrenberg G, Plum L, Ortlepp JR, Joost HG (2000) Quantitative trait loci for obesity and insulin resistance (Nob1, Nob2) and their interaction with the leptin receptor allele (LeprA720T/T1044I) in New Zealand obese mice. Diabetologia 43(12):1565-72.

**König** B, Koch A, Spielmann J, Hilgenfeld C, Hirche F, Stangl GI, Eder K (2009) Activation of PPARalpha and PPARgamma reduces triacylglycerol synthesis in rat hepatoma cells by reduction of nuclear SREBP-1. Eur J Pharmacol 605(1-3):23-30.

**Königshoff** M, Brandenburger T: Kurzlehrbuch Biochemie, 1. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart/ New York, 2004, S.56.

**Kouidhi** S, Jarbouï S, Marrakchi R, Clerget Froidevaux MS, Seugnet I, Abid H, Bchir F, Brahem M, Demeneix B, Guissouma H, Elgaaied AB (2010) Adiponectin expression and metabolic markers in obesity and type 2 diabetes. J Endocrinol Invest. 2010 Jul 22.

**Krezel** W, Dupé V, Mark M, Dierich A, Kastner P, Chambon P (1996) RXR

gamma null mice are apparently normal and compound RXR alpha +/-/  
RXR beta -/-/RXR gamma -/- mutant mice are viable.

Proc Natl Acad Sci U S A 93(17):9010-4.

**Kwong** WY, Miller DJ, Wilkins AP, Dear MS, Wright JN, Osmond C, Zhang J, Fleming TP (2007) Maternal low protein diet restricted to the preimplantation period induces a gender-specific change on hepatic gene expression in rat fetuses. Mol Reprod Dev 74(1):48-56.

**Larqué** E, Krauss-Etschmann S, Campoy C, Hartl D, Linde J, Klingler M, Demmelmair H, Caño A, Gil A, Bondy B, Koletzko B (2006) Docosahexaenoic acid supply in pregnancy affects placental expression of fatty acid transport proteins. Am J Clin Nutr 84(4):853-61.

**Lee** JN, Zhang X, Feramisco JD, Gong Y, Ye J (2008) Unsaturated fatty acids inhibit proteasomal degradation of Insig-1 at a postubiquitination step. J Biol Chem. 283(48):33772-83.

**Leroy** JL, Van Hoeck V, Clemente M, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Van Soom A, Uytterhoeven M, Bols PE (2010) The effect of nutritionally induced hyperlipidaemia on in vitro bovine embryo quality. Hum. Reprod. 25(3):768-78.

**Li** J, Takaishi K, Cook W, McCorkle SK, Unger RH (2003) Insig-1 "brakes" lipogenesis in adipocytes and inhibits differentiation of preadipocytes. The Proc Natl Acad Sci U S A 100(16):9476-81.

**Lim** H, Gupta RA, Ma WG, Paria BC, Moller DE, Morrow JD, DuBois RN, Trzaskos JM, Dey SK (1999) Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta. Genes Dev 13(12):1561-74.

**Lin** TW, Melgar MM, Kurth D, Swamidass SJ, Purdon J, Tseng T, Gago G, Baldi P, Gramajo H, Tsai SC (2006) Structure-based inhibitor design of AccD5, an essential acyl-CoA carboxylase carboxyltransferase domain of Mycobacterium tuberculosis. Proc Natl Acad Sci U S A 103(9):3072-7.

**Listenberger** LL, Ostermeyer-Fay AG, Goldberg EB, Brown WJ, Brown DA (2007) Adipocyte differentiation-related protein reduces the lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover. J. Lipid Res 48(12):2751-61.

**Mamo** S, Ponsuksili S, Wimmers K, Gilles M, Schellander K. (2005) Expression of retinoid X receptor transcripts and their significance for developmental competence in in vitro-produced pre-implantation-stage bovine embryos. Reprod Domest Anim 40(2):177-83.

**Mark** M, Kastner P, Ghyselinck NB, Krezel W, Dupé V, Chambon P (1997)

Genetic control of the development by retinoic acid.

C R Seances Soc Biol Fil. 191(1):77-90.

**Meadows** JW, Pitzer B, Brockman DE, Myatt L (2005) Expression and localization of adipophilin and perilipin in human fetal membranes: association with lipid bodies and enzymes involved in prostaglandin synthesis.

J Clin Endocrinol Metab 90(4):2344-50.

**Melez** KA, Harrison LC, Gilliam JN, Steinberg AD (1980) Diabetes is associated with autoimmunity in the New Zealand obese (NZO) mouse.

Diabetes 29(10):835-40.

**Metzger** D, Imai T, Jiang M, Takukawa R, Desvergne B, Wahli W, Chambon P (2005) Functional role of RXRs and PPARgamma in mature adipocytes. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 73(1):51-8.

**Miyoshi** H, Souza SC, Endo M, Sawada T, Perfield JW 2nd, Shimizu C, Stancheva Z, Nagai S, Strissel KJ, Yoshioka N, Obin MS, Koike T, Greenberg AS (2010) Perilipin overexpression in mice protects against diet-induced obesity.

J. Lipid Res 51(5):975-82.

**Miyoshi** H, Souza SC, Zhang HH, Strissel KJ, Christoffolete MA, Kovsan J, Rudich A, Kraemer FB, Bianco AC, Obin MS, Greenberg AS (2006) Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms.

J Biol Chem. 281(23):15837-44.

**Mohan** M, Malayer JR, Geisert RD, Morgan GL (2002) Expression patterns of retinoid X receptors, retinaldehyde dehydrogenase, and peroxisome proliferator activated receptor gamma in bovine preattachment embryos.

Biol Reprod. 66(3):692-700.

**Moley** KH, Chi MM, Mueckler MM (1998) Maternal hyperglycemia alters glucose transport and utilization in mouse preimplantation embryos.

Am J Physiol Endocrinol Metab 275(1 Pt 1):E38-47.

**Muller** PY, Miserez AR (2002) Identification of mutations in the gene encoding sterol regulatory element binding protein (SREBP)-2 in hypercholesterolaemic subjects. Am J Med Genet 39(4):271-5.

**Nadra** K, Anghel SI, Joye E, Tan NS, Basu-Modak S, Trono D, Wahli W, Desvergne B (2006) Differentiation of trophoblast giant cells and their metabolic functions are dependent on peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta.

Mol. Cell. Biol 26(8):3266-81.

**Nohara** A, Kobayashi J, Mabuchi H (2009) Retinoid X receptor heterodimer

variants and cardiovascular risk factors.

J Atherosclerosis Thromb 16(4):303-18.

**Oem JK**, Jackel-Cram C, Li YP, Zhou Y, Zhong J, Shimano H, Babiuk LA, Liu Q (2008) Activation of sterol regulatory element-binding protein 1c and fatty acid synthase transcription by hepatitis C virus non-structural protein 2.

J Gen Virol 89(5):1225-30.

**Oey NA**, Ruitter JP, Attié-Bitach T, Ijlst L, Wanders RJ, Wijburg FA (2006) Fatty acid oxidation in the human fetus: implications for fetal and adult disease.

J Inherit Metab Dis. 29(1):71-5.

**Ohashi K**, Osuga J, Tozawa R, Kitamine T, Yagyu H, Sekiya M, Tomita S, Okazaki H, Tamura Y, Yahagi N, Iizuka Y, Harada K, Gotoda T, Shimano H, Yamada N, Ishibashi S (2003) Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase gene.

J Biol Chem 278(44):42936-41.

**Ohashi R**, Tamai I, Inano A, Katsura M, Sai Y, Nezu J, Tsuji A (2002) Studies on functional sites of organic cation/carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5) using a Ser467Cys mutant protein. J Pharmacol Exp Ther. 302(3):1286-94.

**Ortlepp JR**, Kluge R, Giesen K, Plum L, Radke P, Hanrath P, Joost HG (2000) A metabolic syndrome of hypertension, hyperinsulinaemia and hypercholesterolaemia in the New Zealand obese mouse.

Eur J Clin Invest. 30(3):195-202.

**Pakrasi PL**, Jain AK (2008) Cyclooxygenase-2 derived PGE2 and PGI2 play an important role via EP2 and PPARdelta receptors in early steps of oil induced decidualization in mice. Placenta 29(6):523-30.

**Pei W**, Baron H, Müller-Myhsok B, Knoblauch H, Al-Yahyaee SA, Hui R, Wu X, Liu L, Busjahn A, Luft FC, Schuster H (2000) Support for linkage of familial combined hyperlipidemia to chromosome 1q21-q23 in Chinese and German families. Clin Genet. 57(1):29-34.

**Pratt HP** (1982) Preimplantation mouse embryos synthesize membrane sterols. Dev Biol. 89(1):101-10.

**Pratt HP**, Keith J, Chakraborty J (1980) Membrane sterols and the development of the preimplantation mouse embryo. J Embryol Exp Morphol. 60:303-19.

**Qin X**, Xie X, Fan Y, Tian J, Guan Y, Wang X, Zhu Y, Wang N (2008) Peroxisome proliferator-activated receptor-delta induces insulin-induced gene-1 and suppresses hepatic lipogenesis in obese diabetic mice.

Hepatology 48(2):432-41

- Ramin N**, Thieme R, Fischer S, Schindler M, Schmidt T, Fischer B, Navarrete Santos A (2010) Maternal diabetes impairs gastrulation and insulin and IGF-I receptor expression in rabbit blastocysts. *Endocrinology* 151(9):4158-67.
- Remick J**, Weintraub H, Setton R, Offenbacher J, Fisher E, Schwartzbard A (2008) Fibrate therapy: an update. *Cardiol Rev.* 16(3):129-41
- Sakka SD**, Loutradis D, Kanaka-Gantenbein C, Margeli A, Papastamataki M, Papassotiriou I, Chrousos GP (2010) Absence of insulin resistance and low-grade inflammation despite early metabolic syndrome manifestations in children born after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 94(5):1693-9.
- Sato N**, Kawamura K, Fukuda J, Honda Y, Sato T, Tanikawa H, Kodama H, Tanaka T (2003) Expression of LDL receptor and uptake of LDL in mouse preimplantation embryos. *Mol Cell Endocrinol.* 202(1-2):191-4
- Schaiff WT**, Bildirici I, Cheong M, Chern PL, Nelson DM, Sadovsky Y (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and retinoid X receptor signaling regulate fatty acid uptake by primary human placental trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab.* 90(7):4267-75.
- Schoonjans K**, Staels B, Auwerx J (1996b) The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta.* 1302(2):93-109.
- Schoonjans K**, Watanabe M, Suzuki H, Mahfoudi A, Krey G, Wahli W, Grimaldi P, Staels B, Yamamoto T, Auwerx J (1996a) PPARalpha and PPAR gamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J.* 15(19):5336-48.
- Schroeder F**, Atshaves BP, Starodub O, Boedeker AL, Smith RR 3rd, Roths JB, Foxworth WB, Kier AB (2001) Expression of liver fatty acid binding protein alters growth and differentiation of embryonic stem cells. *Mol Cell Biochem* 219(1-2):127-38.
- Sciullo E**, Cardellini G, Baroni MG, Torresi P, Buongiorno A, Pozzilli P, Fallucca F (1997) Glucose transporter (Glut1, Glut3) mRNA in human placenta of diabetic and non-diabetic pregnancies. *Early Pregnancy* 3(3):172-82.
- Scott KA**, Yamazaki Y, Yamamoto M, Lin Y, Melhorn SJ, Krause EG, Woods SC, Yanagimachi R, Sakai RR, Tamashiro KL (2010) Glucose parameters are altered in mouse offspring produced by assisted reproductive technologies and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod* 83(2):220-7.
- Sever N**, Yang T, Brown MS, Goldstein JL, DeBose-Boyd RA (2003) Accelerated degradation of HMG CoA reductase mediated by binding of insig-1 to

its sterol-sensing domain. *Mol Cell*. 11(1):25-33.

**Shearer J**, Fueger PT, Bracy DP, Wasserman DH, Rottman JN (2005) Partial gene deletion of heart-type fatty acid-binding protein limits the severity of dietary-induced insulin resistance. *Diabetes* 54(11):3133-9.

**Shellie RA**, Welthagen W, Zrostliková J, Spranger J, Ristow M, Fiehn O, Zimmermann R (2005) Statistical methods for comparing comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry results: metabolomic analysis of mouse tissue extracts. *J Chromatogr A*. 1086(1-2):83-90.

**Shi Y**, Hon M, Evans RM (2002) The peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$ , an integrator of transcriptional repression and nuclear receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(5): 2613–2618.

**Shimano H**, Shimomura I, Hammer RE, Herz J, Goldstein JL, Brown MS, Horton JD (1997) Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene. *J Clin Invest* 100(8):2115-24.

**Shin HD**, Kim LH, Park BL, Jung HS, Cho YM, Moon MK, Lee HK, Park KS (2003) Polymorphisms in fatty acid-binding protein-3 (FABP3) – putative association with type 2 diabetes mellitus. *Hum Mutat*. 22(2):180.

**Shulman AI**, Mangelsdorf DJ (2005) Retinoid x receptor heterodimers in the metabolic syndrome. *N Engl J Med*. 353(6):604-15.

**Simerly RB** (2008) Hypothalamic substrates of metabolic imprinting. *Physiol Behav*. 94(1):79-89.

**Stahl A** (2004) A current review of fatty acid transport proteins (SLC27). *Pflugers Arch*. 447(5):722-7.

**Stahl A**, Evans JG, Pattel S, Hirsch D, Lodish HF (2002) Insulin causes fatty acid transport protein translocation and enhanced fatty acid uptake in adipocytes. *Dev Cell*. 2(4):477-88.

**Straub BK**, Stoeffel P, Heid H, Zimbelmann R, Schirmacher P (2008) Differential pattern of lipid droplet-associated proteins and de novo perilipin expression in hepatocyte steatogenesis. *Hepatology* 47(6):1936-46.

**Sullivan EL**, Grove KL (2010) Metabolic imprinting in obesity. *Forum Nutr*. 63:186-94.

**Surani MA**, Kimber SJ, Osborn JC (1983) Mevalonate reverses the developmental arrest of preimplantation mouse embryos by Compactin, an inhibitor of HMG Co A reductase. *J Embryol Exp Morphol*. 75:205-23.

**Tai ES**, Ordovas JM (2007) The role of perilipin in human obesity and

insulin resistance. *Curr Opin Lipidol.* 18(2):152-6.

**Takaishi K**, Duplomb L, Wang MY, Li J, Unger RH (2004) Hepatic insig-1 or -2 overexpression reduces lipogenesis in obese Zucker diabetic fatty rats and in fasted/refed normal rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(18):7106-11.

**Tansey JT**, Sztalryd C, Hlavin EM, Kimmel AR, Londos C (2004) The central role of perilipin a in lipid metabolism and adipocyte lipolysis. *IUBMB Life.* 56(7):379-85.

**Tarrade A**, Schoonjans K, Guibourdenche J, Bidart JM, Vidaud M, Auwerx J, Rochette-Egly C, Evain-Brion D (2001) PPAR gamma/RXR alpha heterodimers are involved in human CG beta synthesis and human trophoblast differentiation. *Endocrinology* 142(10):4504-14.

**Terauchi Y** (2007) PPARgamma and metabolic syndrome. *Rinsho Byori* 55(5):447-51.

**Varanasi U**, Chu R, Chu S, Espinosa R, LeBeau MM, Reddy JK (1994) Isolation of the human peroxisomal acyl-CoA oxidase gene: organization, promoter analysis, and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(8):3107-11.

**Vidal H** (2005) [PPAR receptors: recent data] *Ann Endocrinol (Paris)*. 66(2 Pt 2):1S5-9.

**Vignesh JP**, Mohan V (2007) Polycystic ovary syndrome: a component of metabolic syndrome? *J Postgrad Med.* 53(2):128-34.

**Vural B**, Atalar F, Ciftci C, Demirkan A, Susleyici-Duman B, Gunay D, Akpinar B, Sagbas E, Ozbek U, Buyukdevrim AS (2008) Presence of fatty-acid-binding protein 4 expression in human epicardial adipose tissue in metabolic syndrome. *Cardiovasc Pathol.* 17(6):392-8.

**Wakefield SL**, Lane M, Schulz SJ, Hebart ML, Thompson JG, Mitchell M (2008) Maternal supply of omega-3 polyunsaturated fatty acids alter mechanisms involved in oocyte and early embryo development in the mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 294(2):E425-34.

**Wang Y**, Sullivan S, Trujillo M, Lee MJ, Schneider SH, Brolin RE, Kang YH, Werber Y, Greenberg AS, Fried SK (2003) Perilipin expression in human adipose tissues: effects of severe obesity, gender, and depot. *Obes Res.* 11(8):930-6

**Weedon-Fekjaer MS**, Dalen KT, Solaas K, Staff AC, Duttaroy AK, Nebb HI (2010) Activation of LXR increases acyl-CoA synthetase activity through direct regulation of ACSL3 in human placental trophoblast cells. *J. Lipid Res* 51(7):1886-96.

**Willy PJ**, Umesono K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA, Mangelsdorf DJ

(1995) LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev* 19(9):1033-45.

**Wu Q**, Ortegon AM, Tsang B, Doege H, Feingold KR, Stahl A (2006) FATP1 is an insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity. *Mol. Cell. Biol.* 26(9):3455-67

**Xu A**, Wang Y, Xu JY, Stejskal D, Tam S, Zhang J, Wat NM, Wong WK, Lam KS (2006) Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin Chem.* 52(3):405-13.

**Xu C**, He JH, Xu GH (2006) Perilipin associated with lipid droplets regulates lipolysis. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* 37(3):221-4.

**Yang X**, Dunning KR, Wu LL, Hickey TE, Norman RJ, Russell DL, Liang X, Robker RL (2010) Identification of perilipin-2 as a lipid droplet protein regulated in oocytes during maturation. *Reprod Fertil Dev.* 22(8):1262-71.

**Yao L**, Jenkins K, Horn PS, Lichtenberg MH, Woollett LA (2007) Inability to fully suppress sterol synthesis rates with exogenous sterol in embryonic and extraembryonic fetal tissues. *Biochim Biophys Acta.* 1771(11):1372-9.

**Zhai W**, Xu C, Ling Y, Liu S, Deng J, Qi Y, Londos C, Xu G (2010) Increased lipolysis in adipose tissues is associated with elevation of systemic free fatty acids and insulin resistance in perilipin null mice. *Horm Metab Res.* 42(4):247-53.

**Zhu MJ**, Ma Y, Long NM, Du M, Ford SP (2010) Maternal obesity markedly increases placental fatty acid transporter expression and fetal blood triglycerides at midgestation in the ewe.

*Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 299(5):R1224-31.

7 Tabellen- und Abbildungsanhang

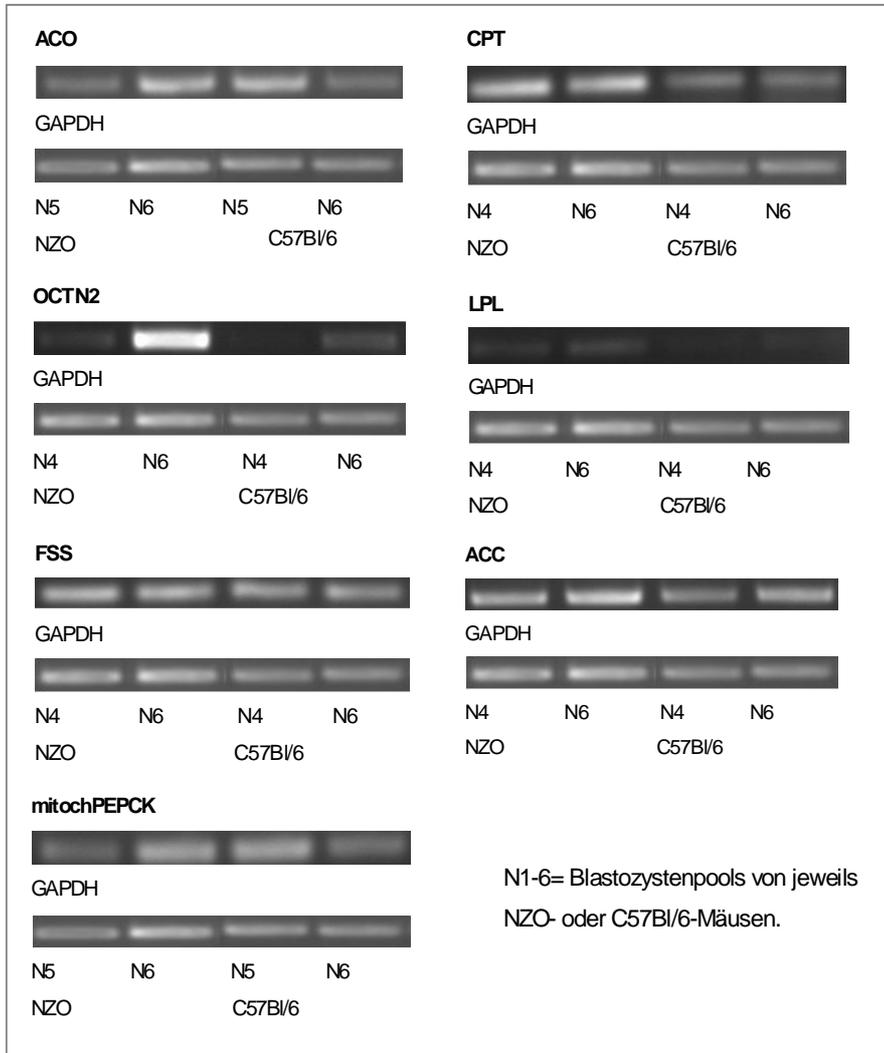
7.1 Übersicht Primersequenzen

Primername	Genbank Acc. Number	Basen	Sequenz 5'-3'	T[C]	Fragment [bp]
ACC fw	XR_033425.1	20	GCCTTCCTGACAAACGAG	60	235
ACC rev		20	TGACTGCCGAAACATCTCTG		
ACO fw	NM_015729.2	20	CAGGAAGAGCAAGGAAGTGG	60	189
ACO rev		19	CCTTTCTGGCTGATCCCAT		
ACS fw	NM_153807.2	20	GGAGCAGAAGGCTGGTAGTG		300
ACS rev		20	TCCAGCTCTGCAGGGTAGAT		
Adipophilin fw	AF_443203.1	16	GGAGTGAAGGCATCG	60	171
Adipophilin rev		16	TGGCATGTAGGAGCTG		
CPT1 fw	NM_013495.1	20	GATGTGGACCTGCATTCCCTT	60	89
CPT1 rev		20	TCCTTGTAATGTGCGAGCTG		
CD 36 fw	NM_007643.3	20	GCTTGCAACTGTCAGCACAT	60	292
CD 36 rev		20	GAGCTATGCAGCATGGAACA		
FABP1 fw	NM_017399.2	20	GTCAGCTGTGAAAGGAAGC	60	285
FABP1 rev		20	GTCTCCAGTTCGCACTCCTC		
FABP1 nested fw	NM_017399.2	20	TGCCACCATGAACTTCTCCG	62,5	96
FABP1 nested rev		20	TGAACTATTGCGGACCACT		
FABP3 fw	NM_010174.1	20	CATCGAGAAGAACGGGGATA	60	239
FABP3 rev		20	TGCCATGAGTGAGAGTCAGG		
FABP4 fw	NM_024406.1	20	TGGAAGCTTGCTCCAGTGA	60	282
FABP4 rev		20	TCGACTTTCATCCCACCTC		
FATP1 fw	NM_011977.3	16	TGGCTGCTCTAATGTC	60	124
FATP1 rev		16	AGCAGAACTTGGCTCT		
FATP2 fw	NM_011978.2	16	CGGCCAGGAATCTAT	60	100
FATP2 rev		16	AAAGCTAAAGCAACCA		
FATP3 fw	NM_011988.1	16	AGGCTGCTCGAGTCAT	61	175
FATP3 rev		16	AACTTGGGTTCCACCAC		
FATP4 fw	NM_011989.2	16	CTGTTCTCCATGCTGA	60	226
FATP4 rev		16	TGGCGCTGTAATTGAA		
FATP5 fw	NM_009512.1	16	TGGGCAGAAGCAGCA T	60	123
FATP5 rev		16	GCCGTGACTTGCTTGT		
FATP6 fw	NM_001081072.1	20	GGTCACGGTCTGGATAAGT	60	109
FATP6 rev		20	CGAGGAGTGGTTCCAGGAGAG		
FSS fw	NM_007988.3	17	TGCTCCAGCTGCAGGC	60	109
FSS rev		20	GCCCGGTAGCTCTGGGTGTA		
GAPDH fw	XM_001473623.1	20	ACCCAGAAGACTGTGGATGG	60	172
GAPDH rev		20	ACACATTGGGGGTAGGAACA		
HMG-CoA-R fw	NM_008255.1	20	TGGAGATCATGTGCTGCTTC	60	248
HMG-CoA-R rev		20	GCGACTATGAGCGTGAACAA		
INSIG1 fw	NM_153526.3	20	GTGGAGCTTGCAATCTGTGA	60	234
INSIG1 rev		20	CTTCTCCGGAATAGCTCGTG		
INSIG2 fw	NM_133748.1	20	TTCTGGTAGGTCACGTTT	60	212
INSIG2 rev		20	TTACACTCTGGCTGGTGAC		
LDL-R fw	NM_010700.2	20	CAGCTCTGTGTGAACCTGGA	57	271
LDL-R rev		20	TCAGGGCGCTGTAGATCTTT		
LPL fw	XM_001476462.1	20	GTCCAAGTATTGGGATCCAG	60	186
LPL rev		20	AGCAGGGAGTCAATGAAGAG		
OCTN2 fw	NM_011396.2	20	ACAGTATCCCCTGGGAGACG	60	213
OCTN2 rev		20	ACACCAGGTCCCCTCTGTC		
PEPCK mito fw	NM_028994.2	20	TTGGAGAGAATGCTCGTGTG	60	150
PEPCK mito rev		20	TGGAGAACAGCTGACTGGTG		
Perilipin fw	NM_175640.1	20	GATCGCCTCTGAACTGAAGG	60	225
Perilipin rev		20	CTTCTCGATGCTTCCCAGAG		
PG-I2-Synth fw	NM_008968.3	20	GACAGCATGCCTGTGCTAGA	60	273
PG-I2-Synth rev		20	GCCGTTTCCCCTCTTTGTAA		
PPAR alpha fw	NM_011144.3	20	ATGCCAGTACTGCCGTTTTT	60	220
PPAR alpha rev		20	GGCCTTGACCTTGTTTCATGT		
PPAR delta fw	NM_011145.3	20	TGGAGCTCGATGACAGTGAC	60	161
PPAR delta rev		20	GTACTGGCTGTGAGGGTGGT		
PPAR gamma fw	NM_011146.2	16	GATGGAAGACCCGATT	60	116
PPAR gamma rev		17	AACCATTGGGCTCTTG		
RXR alpha fw	XM_001477331.1	20	GGTGGTGTCTGTGGACAGTG	60	202

RXR alpha rev		20	ACTAAGGCACCTGCTCCTGA		
RXR beta fw	NM_011306.3	20	CTGCAAGGGTTTCTTCAAGC	60	239
RXR beta rev		20	ATCCTGTCCACAGGCATCTC		
RXR gamma fw	NM_009107.2	20	TCCTCCAGGAATCAACTTGG	60	234
RXR gamma rev		20	TGAAGAAGCCTTTGCAACCT		
RXR g nested fw	NM_009107.2	21	AGCTCCCAGCTAAATGTGGTC	60	174
RXR g nested rev		20	TGTACACACAGTAGTGCTTC		
SREBP1 fw	NM_011480.2	20	CCCTGTGTGTACTGGCCTTT	60	292
SREBP1 rev		20	TTGCGATGTCTCCAGAAGTG		
SREBP2 fw	NM_033218.1	20	GCGGAGGAGAAAATCCTACC	60	252
SREBP2 rev		20	GCAGTACAGGCTCTCCTTGG		
18s fw		21	AGAAACGGCTACACATCCAA	60	89
18s rev		27	CCTGTATTGTTATTTTTCGTCAC T		

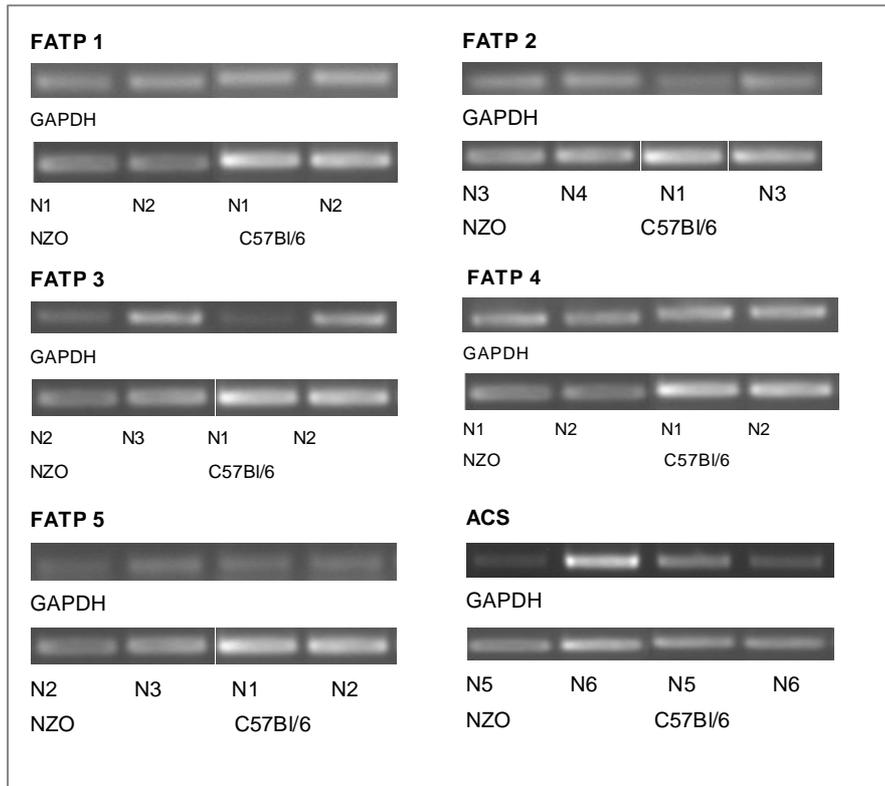
7.2 Ergebnisse: PCR-Banden der untersuchten Marker

7.2.1 Marker des Lipidstoffwechsels und der Glukoneogenese in Blastozysten von NZO- und C57Bl/6-Mäusen



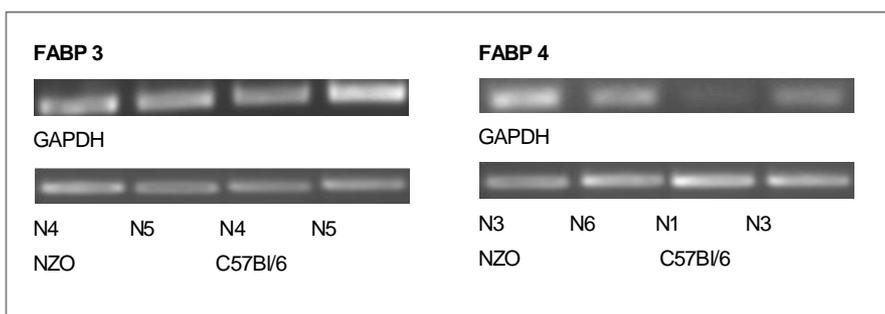
**Abbildung 15** PCR-Banden der *Acyl-CoA-Oxidase* (ACO), *Carnitin-Palmitoyl-Transferase* (CPT), *Fettsäure-Synthase* (FSS), *Acetyl-CoA-Carboxylase* (ACC) und der *Mitochondrialen Phosphoenolpyruvat Carboxykinase* (mitochPEPCK) in Blastozysten des NZO- und C57Bl/6-Mausstammes. Aufgetragen gegen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

7.2.2 FATPs und Acyl-CoA-Synthetase in Blastozysten von NZO- und C57Bl/6-Mäusen



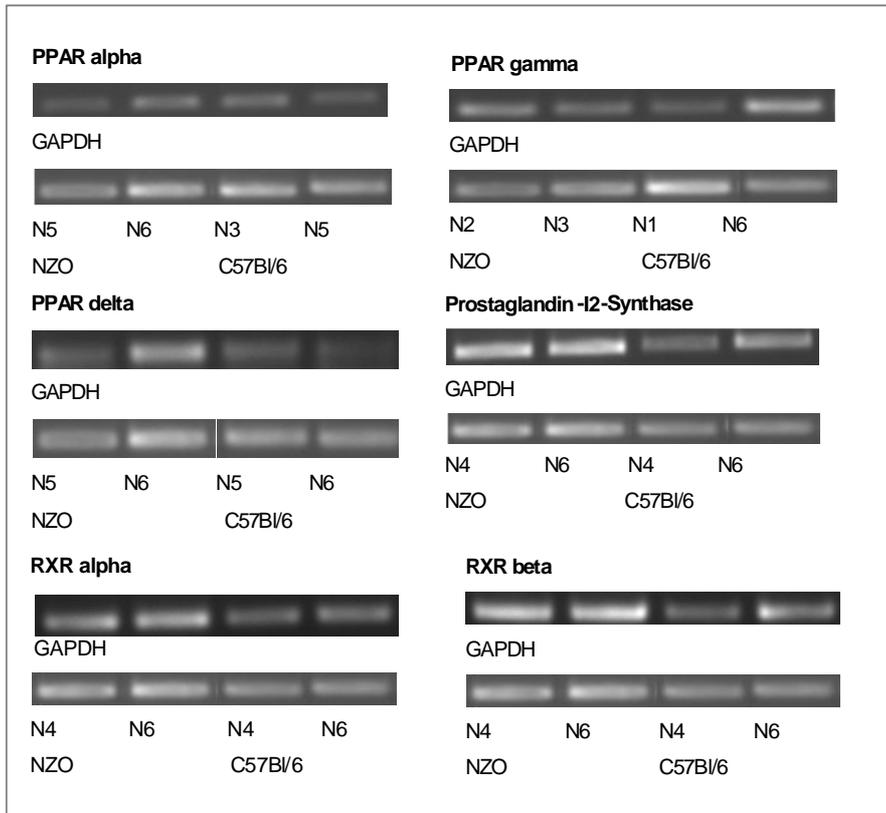
**Abbildung 16** PCR-Banden der *Fatty acid transport proteins 1-5* (FATP1-5) und der *Acyl-CoA-Synthetase* (ACS) in Blastozysten des NZO- und C57Bl/6-Mausstammes. Aufgetragen gegen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

7.2.3 Fettsäure-Bindungsproteine in Blastozysten von NZO- und C57Bl/6-Mäusen



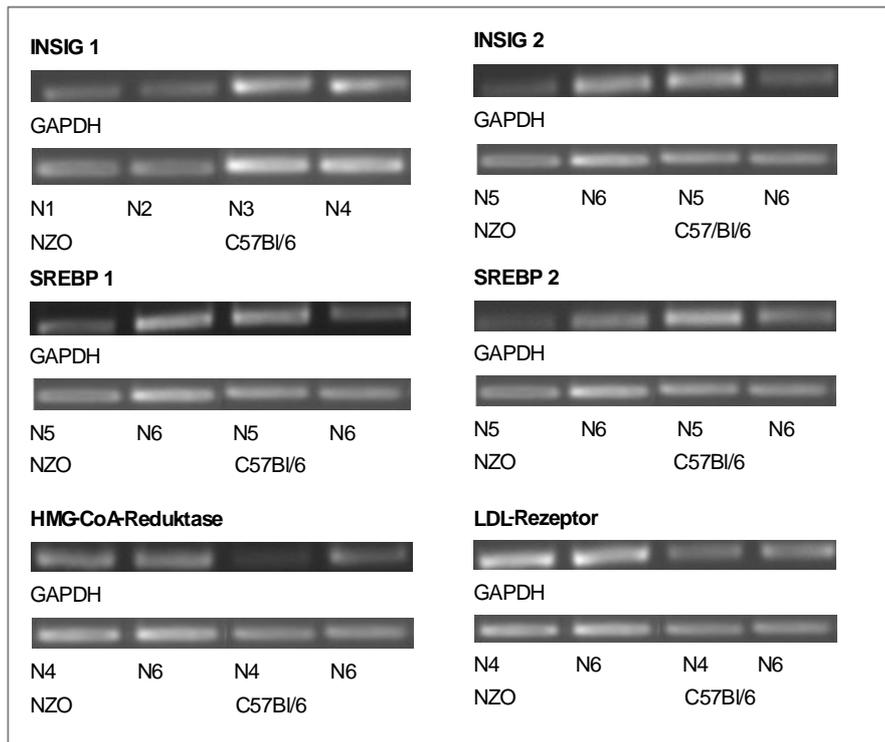
**Abbildung 17** PCR-Banden der *Fatty acid-binding proteins 3 und 4* (FABP3/4) in Blastozysten des NZO- und C57Bl/6-Mausstammes. Aufgetragen gegen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

7.2.4 PPARs, RXRs und Prostaglandin-I<sub>2</sub>-Synthase in Blastozysten von NZO- und C57Bl/6-Mäusen



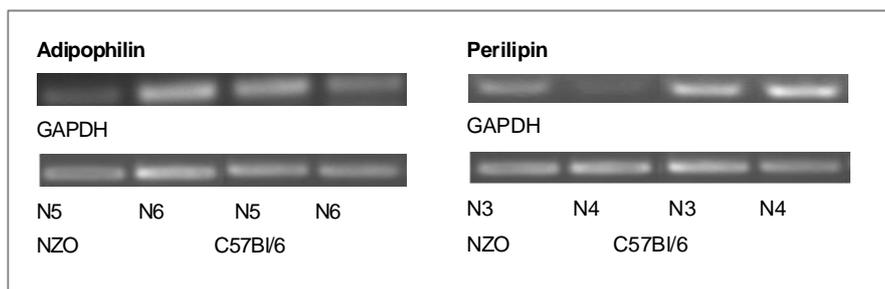
**Abbildung 18** PCR-Banden der *Peroxisome proliferator-activated receptors* (PPAR) *alpha/ gamma/ delta*, *Prostaglandin-I<sub>2</sub>-Synthase* und der *Retinoid X receptors* (RXR) *alpha/ beta* in Blastozysten des NZO- und C57Bl/6-Mausstammes. Aufgetragen gegen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

7.2.5 Cholesterol-Metabolismus in Blastozysten von NZO- und C57Bl/6-Mäusen



**Abbildung 19** PCR-Banden der *Insulin-induced genes 1 und 2* (INSIG1/2), *Sterol regulatory element-binding proteins 1 und 2* (SREBP1/2), *3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase* (HMG-CoA-Reduktase) und des *LDL-Rezeptors* in Blastozysten des NZO- und C57Bl/6-Mausstammes. Aufgetragen gegen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

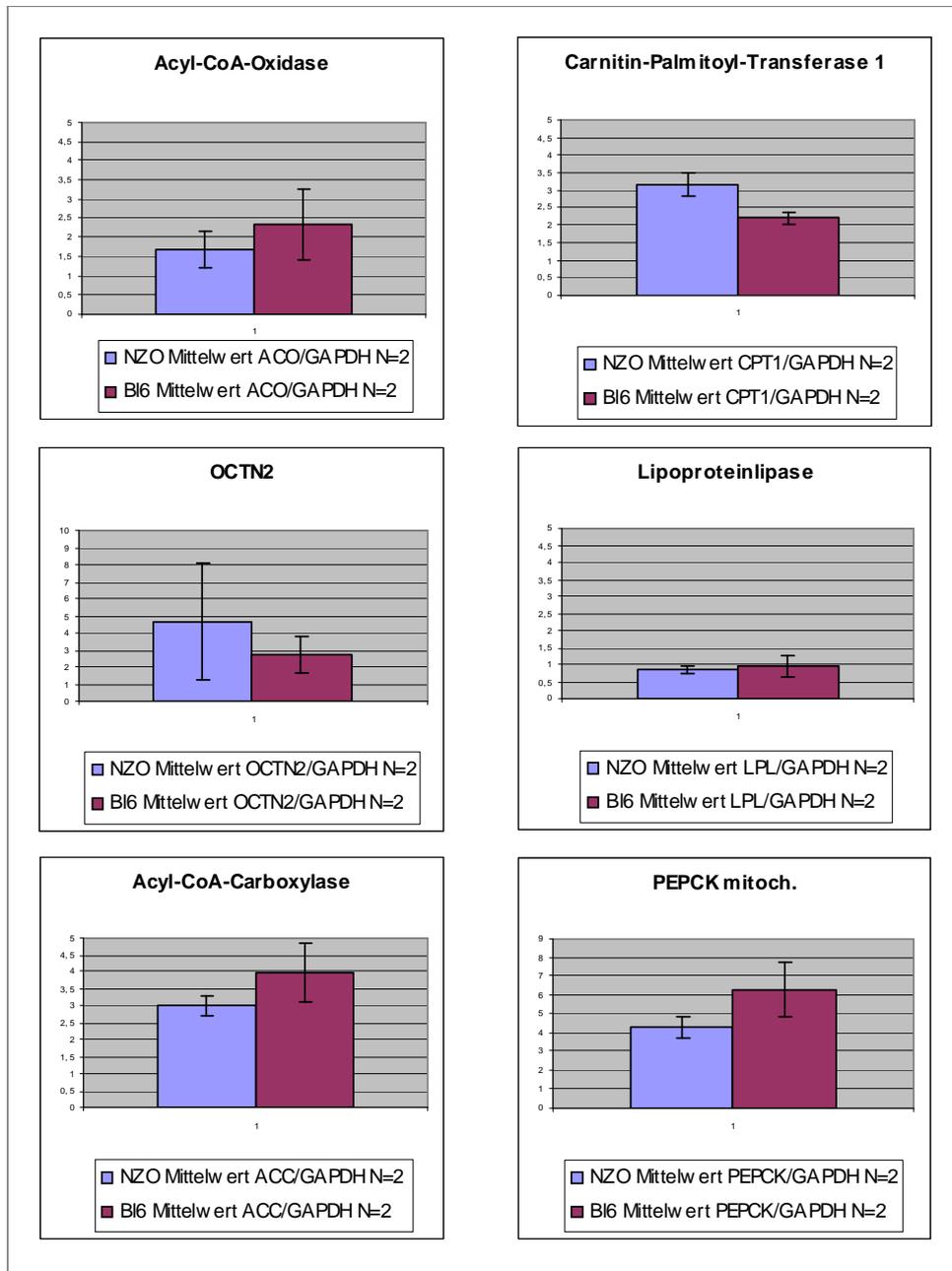
7.2.6 Adipophilin und Perilipin in Blastozysten von NZO- und C57Bl/6-Mäusen



**Abbildung 20** PCR-Banden des *Adipophilins* und *Perilipins* in Blastozysten des NZO- und C57Bl/6-Mausstammes. Aufgetragen gegen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

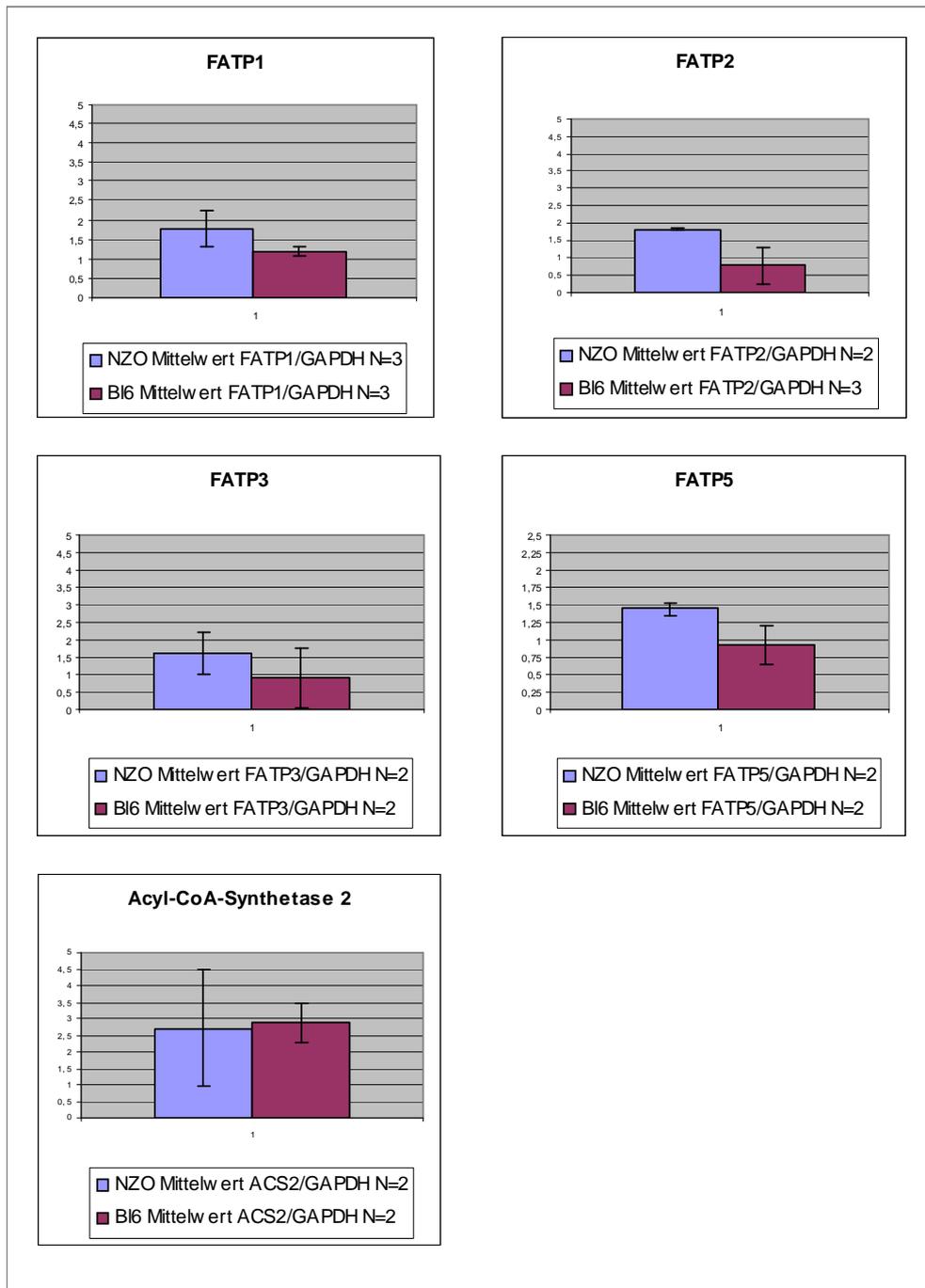
7.3 Ergebnisse: Densitometrische Messungen

7.3.1 Anabole und katabole Stoffwechselwege in Blastozysten von NZO- und C57Bl/6-Mäusen



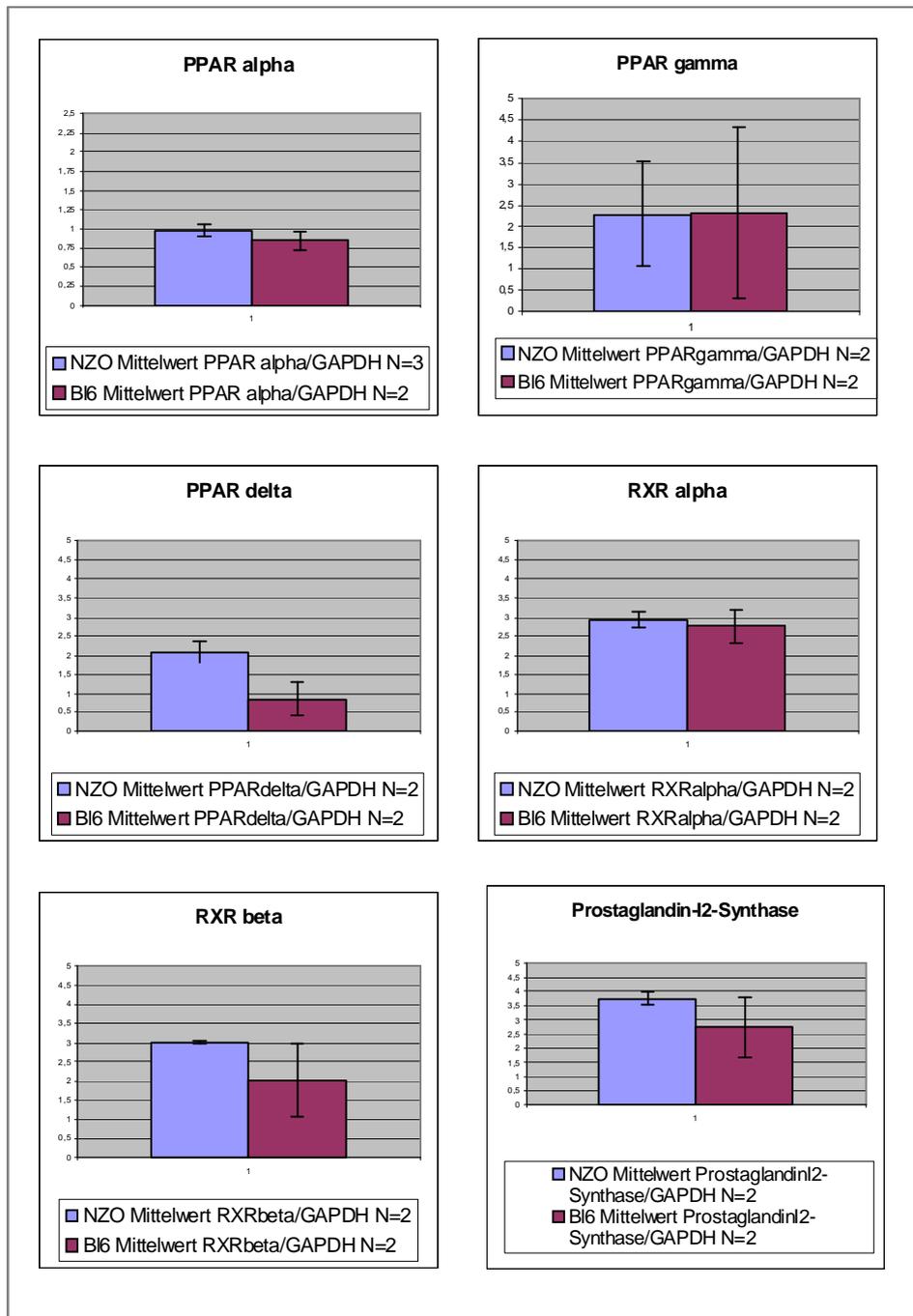
**Abbildung 21** Densitometrische Messungen aus PCR-Banden der *Acyl-CoA-Oxidase*, der *Carnitin-Palmitoyl-Transferase (CPT)*, des *Organic cation/carnitine transporter 2 (OCTN2)*, der *Lipoproteinlipase (LPL)*, der *Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC)* und der *Mitochondrialen Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (mitochPEPCK)* von Blastozysten des NZO- (lila) und C57Bl/6-Mausstammes (Bl6, violett). Die Diagramme zeigen die Mittelwerte der GAPDH-korrigierten Lichtintensitäten aus je N=2 Versuchen mit Standardabweichung. t-Test für unabhängige Stichproben nicht signifikant.

7.3.2 FATPs und Acyl-CoA-Synthetase



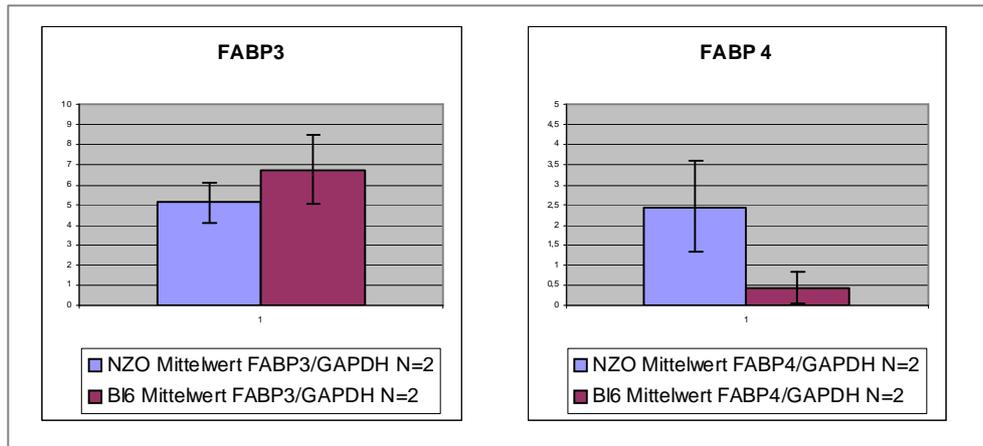
**Abbildung 22** Densitometrische Messungen aus PCR-Banden der *Fatty acid transport proteins 1-5* (FATP1-5) von Blastozysten des NZO- (lila) und C57Bl/6-Mausstammes (Bl6, violett). Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der GAPDH-korrigierten Lichtintensitäten aus je N=2 bzw. N=3 Versuchen mit Standardabweichung. t-Test für unabhängige Stichproben nicht signifikant.

7.3.3 PPARs, RXRs und Prostaglandin- $I_2$ -Synthase



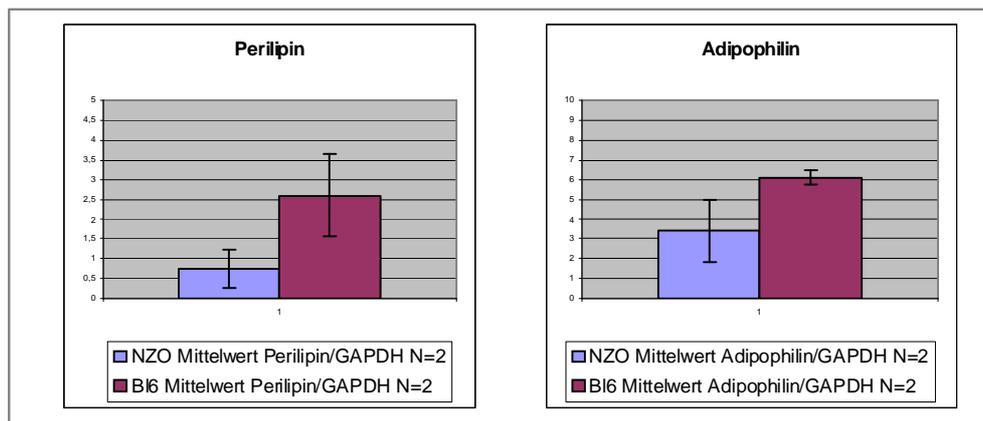
**Abbildung 23** Densitometrische Messungen aus PCR-Banden der *Peroxisome proliferator-activated receptors* (PPAR) alpha, beta und gamma; der *Retinoid X receptors* (RXR) alpha und beta sowie der *Prostaglandin- $I_2$ -Synthase* von Blastozysten des NZO- (lila) und C57Bl/6-Mausstammes (Bl6, violett). Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der GAPDH-korrigierten Lichtintensitäten aus je N=2 bzw. N=3 Versuchen mit Standardabweichung. t-Test für unabhängige Stichproben nicht signifikant.

7.3.4 FABPs



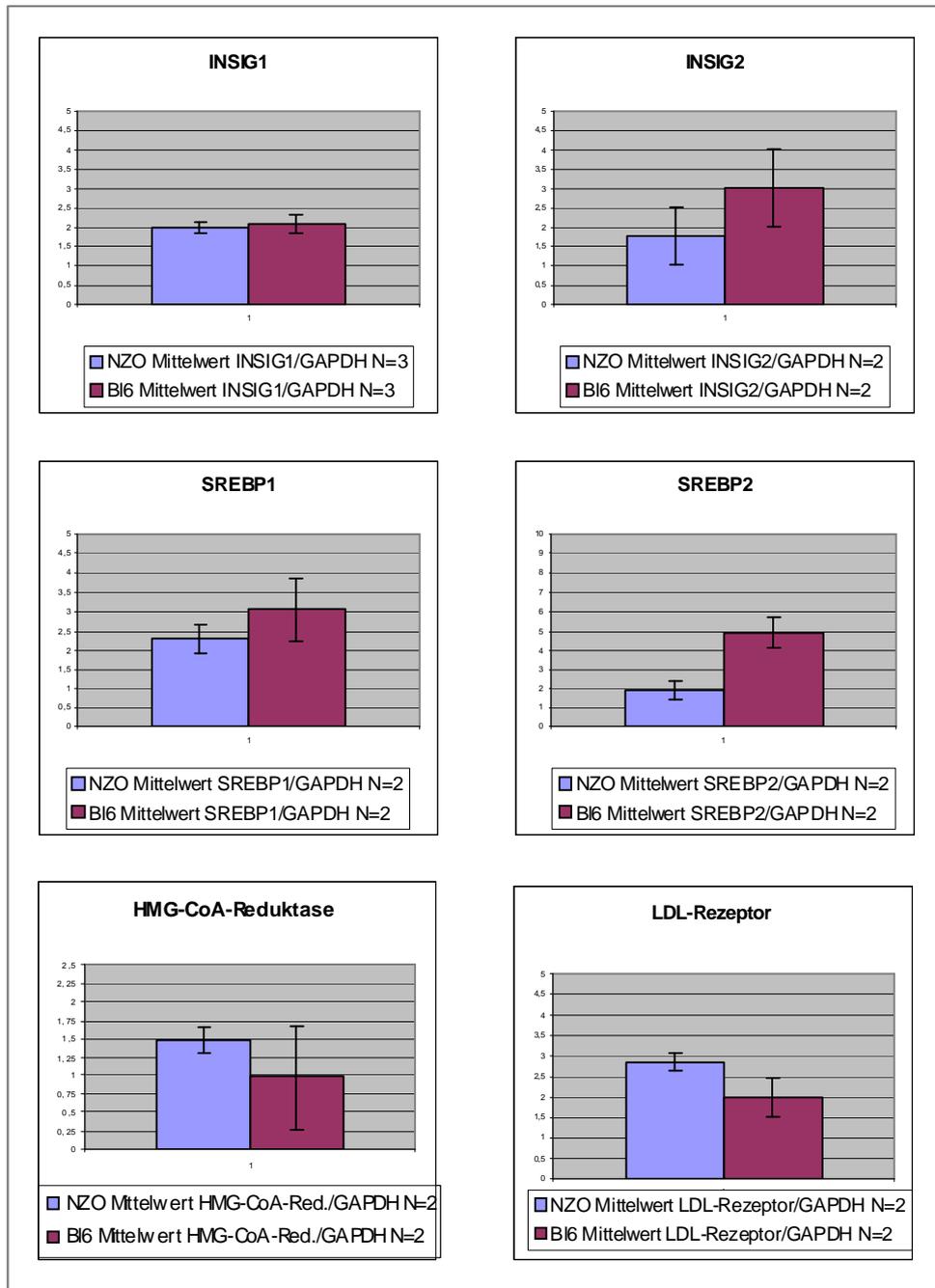
**Abbildung 24** Densitometrische Messungen aus PCR-Banden der *Fatty acid-binding proteins* (FABP) 3 und 4 von Blastozysten des NZO- (lila) und C57Bl/6-Mausstammes (Bl6, violett). Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der GAPDH-korrigierten Lichtintensitäten aus je N=2 Versuchen mit Standardabweichung. t-Test für unabhängige Stichproben nicht signifikant.

7.3.5 Perilipin, Adipophilin



**Abbildung 25** Densitometrische Messungen aus PCR-Banden von *Perilipin* und *Adipophilin* von Blastozysten des NZO- (lila) und C57Bl/6-Mausstammes (Bl6, violett). Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der GAPDH-korrigierten Lichtintensitäten aus je N=2 Versuchen mit Standardabweichung. t-Test für unabhängige Stichproben nicht signifikant.

7.3.6 Cholesterol-Metabolismus



**Abbildung 26** Densitometrische Messungen aus PCR-Banden des *Insulin-induced genes* (INSIG) 1 und 2; der *Sterol regulatory element-binding proteins* (SREBP) 1 und 2; der HMG-CoA-Reduktase und des *Low-Density-Lipoprotein-Rezeptors* (LDL-Rezeptor) von Blastozysten des NZO- (lila) und C57Bl/6-Mausstammes (Bl6, violett). Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der GAPDH-korrigierten Lichtintensitäten aus je N=2 bzw. N=3 Versuchen mit Standardabweichung. t-Test für unabhängige Stichproben nicht signifikant.

8 Thesen

1. Alle wichtigen Marker von anabolen und katabolen Prozessen des Lipidmetabolismus sowie der Glukoneogenese sind bei 3,5 Tage alten Blastozysten der Maus auf Transkriptionsebene nachweisbar. Somit finden diese Stoffwechselwege in embryonalen Zellen höchstwahrscheinlich mit den gleichen Enzymen statt wie in adulten.
2. Bei einem Vergleich von Blastozysten aus adipösen (NZO) und normalgewichtigen (C57Bl/6) Mausstämmen zeigen sich nur wenige Unterschiede (s.u.).
3. Mausblastozysten weisen die Isoformen 1 bis 5 der Fettsäuretransportproteine (FATPs) auf und können somit langkettige Fettsäuren aus dem externen mütterlichen Milieu aufnehmen.
4. In Blastozysten beider Mausstämmen können ferner nachgewiesen werden: Acyl-CoA-Oxidase, Carnitin-Palmitoyl-Transferase, OCTN2, Acyl-CoA-Synthetase, Prostaglandin- $I_2$ -Synthase, PEPCK, die Fettsäure-Bindungsproteine FABP3 und 4, SREBP/INSIG (Regulatoren des Cholesteroll-Metabolismus) sowie deren Erfolgsmoleküle HMG-CoA-Reduktase und LDL-Rezeptor, Fettsäure-Synthase, Acetyl-CoA-Carboxylase und die anti-lipolytischen Moleküle Adipophilin und Perilipin.
5. Während in Blastozysten der C57Bl/6-Mäuse alle Komponenten des PPAR/RXR-Signalweges nachweisbar sind, ist RXR gamma in NZO-Blastozysten auf Transkriptionsebene nicht detektierbar. Hier zeigt sich zwischen beiden Stämmen ein Unterschied in der frühen Ontogenese.
6. In Blastozysten von adipösen NZO-Mäusen wird FATP4 vermehrt transkribiert, möglicherweise bedingt durch eine veränderte Zusammensetzung des Uterussekretes.
7. Die Fettsäure-Synthase wird in NZO-Präimplantationsembryonen vermindert exprimiert, möglicherweise infolge einer Produkthemmung durch erhöhten Fettsäure-Influx über FATP4.
8. Das Verhältnis von SREBP2 zu INSIG1 ist in C57Bl/6-Embryonen im Sinne eines *lack of response* auf das 2,4fache erhöht. In NZO-Embryonen ist das Verhältnis ausgeglichen. Dies ist ein Hinweis auf eine veränderte Regulation des Cholesteroll-Metabolismus in Blastozysten der adipösen NZO-Mäuse.
9. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Voraussetzungen für eine frühe metabolische Prägung bereits bei Präimplantationsembryonen im adipösen maternalen Organismus gegeben sind.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Cornelia Alice Irene Königsdorf  
Geburtsdaten: 23.10.1984 in Hanau  
Adresse: Reilstraße 31, 06114 Halle  
Eltern: Edith und Winfried Königsdorf

### Schulische Ausbildung/Studium

1991-1995 Grundschule in Rothenbergen  
1995-2004 Grimmelshausen-Gymnasium Gelnhausen,  
Abschluss: Abitur, Note: 1,5  
10/2004- 10/2010 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-  
Universität Halle-Wittenberg. Abschluss: „gut“

### Berufliche Erfahrungen

Famulaturen: Innere Medizin, Gynäkologie,  
Reproduktionsmedizin

### Praktisches Jahr:

August- Dezember 2009 Krankenhaus St. Elisabeth und St. Barbara, Halle  
Fachbereich: Innere Medizin/ Nephrologie  
Dezember 2009 – März 2010 Kantonsspital Münsterlingen, Kanton Thurgau,  
Schweiz. Fachbereich: Gynäkologie und  
Geburtshilfe  
März 2010- Juli 2010 Diakonie-Krankenhaus, Halle  
Fachbereich: Allgemein- und Viszeralchirurgie

### Weitere Tätigkeiten

10/ 2006- 12/2006 Studentische Hilfskraft im Präparierkurs für  
Humanmediziner  
11/ 2007 - 03/ 2008 Studentische Hilfskraft zur Betreuung des  
Mikroskopierkurses für Naturwissenschaftler  
Seit 2007 Promotion im Institut für Anatomie und Zellbiologie  
Doktorvater: Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer  
Seit 2007 Betreuung des Lokalprojektes „Mit Sicherheit  
Verliebt“ zur AIDS-Prävention

Halle/Saale, den

---

10 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Halle/ Saale, den \_\_\_\_\_

11 Erklärung über frühere Promotionsversuche

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

## 12 Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei allen Menschen bedanken, die mich auf meinem Weg, im Studium wie im Privaten, unterstützt und mir Kraft gegeben haben.

Besonderer Dank gilt hierbei meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Dr. agr. Fischer, durch den ich überhaupt erst das Wagnis „Experimentelle Doktorarbeit als Medizinstudent“ eingegangen bin. Seine offene und ehrliche Art machten mir deutlich, dass viel Arbeit auf mich zukommen würde, dass ich mich aber jederzeit auf sein Wort und seine Unterstützung verlassen konnte. Ich habe die Betreuung meiner Promotion durch ihn als sehr herzlich empfunden und bin sehr dankbar für diese Erfahrung und das mir zugestandene Vertrauen.

Des Weiteren möchte ich meinen „Mitreitern“ aus der AG Fischer danken. Ich habe mich als „Medi“ in euren Reihen immer sehr wohl gefühlt, ihr hattet immer ein offenes Ohr für mich und habt euch Zeit für mich genommen. Besonderen Dank gilt hierbei Christine Fröhlich für ihre immer herzliche Art, ihr ehrliches Interesse an ihren Mitmenschen und ihre unermüdliche Hilfe- einfach als gute Seele des Labors.

Weiterer Dank gilt Frau Dr. Anne Navarrete Santos für ihre freundliche Betreuung und Beratung sowie Michaela Kirstein als „Maus-Blastozysten-cDNA-Fee“. Auch möchte ich Sünje Fischer für ihre geduldige Unterstützung in dringenden „Primer-/PCR/-Vortrags-“ Notfällen danken sowie für eine schöne Zeit im kleinen Büro, den immer währenden Einsatz für den Ficus und nette Gespräche über „Äbbelwoi“ und „Spundekäs“. Ebenso möchte ich Bernadette Harwardt für ihre Hilfe, sogar an Wochenenden, bei den Mäusen danken. Juliane Schmidt, meiner „Mäusekollegin“, René Thieme und allen anderen vielen Dank für eine schöne Zeit.

Meinen Eltern möchte ich danken, für alles, was sie mir ermöglicht haben und dafür, dass sie aus mir den Menschen gemacht haben, der ich jetzt bin.

Ihr seid meine Helden!

Meinen Freunden danke ich für die wundervollen gemeinsamen (Studien-)Jahre, für alle gemeinsam durchlernten Abende im Juridicum, für den Cocktail danach, die Gespräche zum Mut machen und die liebevolle Integration als „Wessitante“- es war und ist spitze mit euch!

Josefine Wallentin danke ich für vieles, vor allem für eine Freundschaft für´s Leben.

Zuletzt gilt mein Dank meinem Freund und Partner Andreas Raschke. Es ist sicher nicht immer einfach mit mir, aber du unterstützt mich ohne Wenn und Aber.

Du bist mein großes Glück.

Ich freue mich auf unsere Zukunft, ich liebe dich.