

Der Einfluss eines maternalen Diabetes mellitus Typ 1 auf Entwicklungskompetenz und Stoffwechseladaptation bei Kaninchenblastozysten

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Diplom-Biochemiker René Thieme

geb. am 22. September 1983 in Torgau

Gutachter/in

1. Professor Dr. Gerd-Joachim Krauß
2. Professor Dr. Dr. Bernd Fischer
3. Professor Dr. Susanne Ulbrich

Datum der Verteidigung: 03. April 2014

Inhalt

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	6
2.1.	Auswirkungen maternaler Stoffwechselstörungen auf die Pränatalentwicklung	6
2.1.1.	Epidemiologie und Ätiologie maternaler Stoffwechselstörungen	6
2.1.2.	Glukose- und Aminosäureversorgung des Präimplantationsembryos	8
2.2.	Das Kaninchen als embryologisches Modell	11
2.2.1.	Die Präimplantationsentwicklung des Kaninchens	12
2.2.2.	Die Gastrulation in der Kaninchenblastozyste und ihre molekulare Steuerung	13
2.3.	Die Rolle des IGF-Insulin-Rezeptorsystems während der Präimplantationsentwicklung	16
2.3.1.	Verteilung und Charakterisierung des IGF-Insulin-Rezeptorsystems und seiner Liganden während der Präimplantationsentwicklung	16
2.3.2.	Die Signalkaskade des IGF-Insulin-Rezeptorsystems	18
2.3.3.	Die Liganden des IGF-Insulin-Rezeptorsystems	19
2.3.4.	Die intrazelluläre Signaltransduktion des IGF-Systems im Embryo	20
3.	Ausblick – Langzeitfolgen einer embryonalen und fetalen Fehlversorgung	22
4.	Ergebnisse	25
4.1.	Induktion und Etablierung eines experimentellen Diabetes mellitus Typ 1 im Kaninchen	25
4.2.	Publikation 1: Ramin and Thieme <i>et al.</i> 2010 <i>Endocrinology</i> , 151(9):4158-4167	27
4.3.	Publikation 2: Thieme <i>et al.</i> 2012 <i>Molecular and Cellular Endocrinology</i> , 348(1):112-119	29
4.4.	Publikation 3: Thieme <i>et al.</i> 2012 <i>Molecular and Cellular Endocrinology</i> , 358(1):96-103	31
4.5.	Publikation 4: Fischer <i>et al.</i> 2010 <i>Biology of Reproduction</i> , 83:359-365	33
4.6.	Publikation 5: Llobat <i>et al.</i> 2011 <i>Reproduction Domestic Animals</i> , 47(2):281-287	35
5.	Stand der Veröffentlichung und Darlegung des Eigenanteils	37

6. Literaturverzeichnis	39
7. Anhang	I
Abbildungsverzeichnis	I
Abkürzungen	I
Publikations- und Beitragsliste	III
Curriculum vitae	VI
Eidesstattliche Erklärung	IX
Danksagung	X

1. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie sich ein maternaler Diabetes mellitus Typ 1 auf die Präimplantationsentwicklung von Säugetierembryonen auswirkt. Das Kaninchen wurde als Tiermodell gewählt. Aus langjährigen Untersuchungen war bekannt, dass Kinder von Frauen mit Diabetes mellitus zum Teil schwerwiegende kardiale und neurologische Fehlbildungen aufweisen können. Ein maternaler Diabetes mellitus kann ferner Ursache für eine erhöhte Abort- und Frühgeborenenrate sein. Nicht außer Acht zu lassende Befunde sind, dass bei Kindern diabetischer Mütter das Risiko, im Erwachsenenalter selbst an Diabetes mellitus, dem Metabolischen Syndrom oder Herz-Kreislauferkrankungen zu leiden, deutlich erhöht ist.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass diabetesinduzierte Veränderungen nicht erst mit der Fetalentwicklung einhergehen, wenn der Fetus über die Plazenta mit dem maternalen Blutkreislauf in Kontakt steht, sondern bereits in der Frühschwangerschaft, während der ersten Entwicklungstage. In diesem Stadium ist die Kaninchenblastozyste vermutlich das am besten geeignete embryologische Modell für die humane Entwicklung.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in sieben wissenschaftlichen Publikationen in international anerkannten „peer-reviewed“ Zeitschriften erschienen und wurden von mir auf Tagungen in Form von Vorträgen und Postern vorgestellt (siehe Anhang). Sie bilden die Grundlage dieser kumulativen Dissertation und werden im Einleitungs- und Ergebnisteil erörternd dargestellt. Die Arbeiten beschäftigen sich mit der Charakterisierung des maternalen Milieus bei diabetischen Kaninchen (Blut und Uterussekret). Mittels molekularbiologischer Methoden konnte die Glukose-, IGF1-, IGF2- und Insulinkonzentration im Uterusmilieu und systemisch im Blutkreislauf detektiert und quantifiziert werden. Diese Messungen sind notwendige Grundlagen zum Verständnis der embryo-maternalen Interaktionen und der Adaptation des Embryos an die pathologische Stoffwechselsituation der Mutter. Der embryonale Stoffwechsel ist von der Verfügbarkeit von mütterlichen Nährstoffen, wie Glukose, essentiellen Aminosäuren und Hormonen wie Insulin, IGF1 und IGF2, die ihn über das Uterussekret erreichen, abhängig.

Die in der vorliegenden Dissertation zusammengestellten Ergebnisse beschreiben:

- das uterine Milieu während der Präimplantationsentwicklung des Kaninchens und den Einfluss eines maternalen insulinpflichtigen Diabetes mellitus

„Maternal diabetes impairs gastrulation and insulin and IGF-I receptor expression in rabbit blastocysts.“

Publiziert in: Ramin und Thieme et al. 2010 *Endocrinology*, 151(9):4158-4167

„Adiponectin stimulates glucose uptake in rabbit blastocysts.“

Publiziert in: Fischer et al. 2010 *Biology of Reproduction*, 83:359-365

„Insulin growth factor adjustment in preimplantation rabbit blastocysts and uterine tissues in response to maternal type 1 diabetes.“

Publiziert in: Thieme et al. 2012b *Molecular and Cellular Endocrinology*, 358(1):96-103

„mRNA expression in rabbit blastocyst and endometrial tissue of candidate gene involved in the gestation.“

Publiziert in: Llobat et al. 2011 *Reproduction in Domestic Animals*, 47(2):281-287

Während der Präimplantationsphase hat der Embryo noch keinen direkten Kontakt zum mütterlichen Blutkreislauf. Dieser wird erst nach der Implantation mit der Ausbildung der Plazenta vollzogen. Bis zu diesem Zeitpunkt ist der Embryo von einem Flüssigkeitsfilm umgeben, welcher von den Epithelzellen des Eileiters bzw. des Uterus abgegeben wird. Dieser Flüssigkeitsfilm enthält eine Reihe von Nährstoffen, wie Zucker, Aminosäuren, Fettsäuren, Vitamine und Hormone, die für die optimale Versorgung des Embryos notwendig sind. Er spiegelt aber auch pathophysiologische Zustände wider, da er ein Abbild der mütterlichen Stoffwechselsituation wiedergibt. So ist die Glukosekonzentration im Uterussekret von diabetischen Kaninchen um das 3,5fache gesteigert (von 0,5 mM auf 1,75 mM). Diese Erhöhung spiegelt exakt die Erhöhung wider, die auch im Blut diabetischer Tiere zu beobachten ist (von ca. 6 mM auf 22 mM). Ebenso ist die Konzentration an den aliphatischen verzweigt-kettigen Aminosäuren L-Leucin, L-Isoleucin und L-Valin im Blut und im Uterussekret diabetischer Tiere erhöht (Thieme *et al.* 2009). Das Hormon Adiponektin spielt ebenfalls eine zentrale Rolle für den embryonalen Stoffwechsel. Es ist in der Lage, den Glukosestoffwechsel des Embryos zu regulieren und ist mit seiner inhibitorischen Wirkung auf die PEPCK an der Stoffwechselhomöostase des Embryos maßgeblich beteiligt (Fischer *et al.* 2010).

- den Einfluss eines insulinpflichtigen Diabetes mellitus auf das systemische und lokale IGF-Rezeptor-System

„Maternal diabetes impairs gastrulation and insulin and IGF-I receptor expression in rabbit blastocysts.“

Publiziert in: Ramin und Thieme et al. 2010 *Endocrinology*, 151(9):4158-4167

„*Insulin growth factor adjustment in preimplantation rabbit blastocysts and uterine tissues in response to maternal type 1 diabetes.*“

Publiziert in: Thieme et al. 2012b *Molecular and Cellular Endocrinology*, 358(1):96-103

Insulin und seine beiden verwandten Hormone IGF1 und IGF2 gehören zu einer Gruppe von Wachstumsfaktoren, die bereits sehr früh in der Embryogenese von entscheidender Bedeutung sind. Dies machen vor allem die Null-Mutation in Mäusen deutlich, welche mit einem deutlich geringeren Wachstum, und im Falle von IGF1 mit einer Letalität der Feten einhergehen.

Durch einen maternalen Diabetes mellitus wird eine ganze Reihe von Schaltpunkten im IGF-Rezeptor-System verstellt. Diese sind im Kaninchen bereits während der Präimplantationsphase messbar. Als zentraler Mediator fehlt den Embryonen aus diabetischen Tieren Insulin. Dieses lässt sich normalerweise auf der Oberfläche von Tag 6 Blastozysten immunhistochemisch nachweisen (Ramin *et al.* 2010). IGF1 ist ebenfalls stark in seiner Verfügbarkeit eingeschränkt. In diabetischen Tieren kommt es zum Abfall der systemischen IGF1-Konzentration im Blut (Thieme *et al.* 2012b). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die hepatische IGF1-Synthese ebenfalls herabgesetzt ist. Lokal im Uterus kommt es dagegen zu einer Gegensteuerung. Die Liganden IGF1 und IGF2 sind sowohl im Endometrium als auch in Embryonen auf mRNA-Ebene gesteigert (Thieme *et al.* 2012b). Die Wachstumsverzögerung und verspätete Mesoderminduktion in Embryonen aus diabetischen Tieren zeigt aber, dass die lokale Gegenregulation von IGF1 und IGF2 nicht in der Lage ist, das fehlende Insulin komplett zu ersetzen. In Embryonen aus diabetischen Tieren sind der Insulin- und der IGF1-Rezeptor vermindert exprimiert (Ramin *et al.* 2010). Somit sind die Embryonen nicht nur durch die verringerte Verfügbarkeit an Insulin, IGF1 und IGF2 in ihrer Entwicklung beeinträchtigt, sondern auch durch eine herabgesetzte Rezeptivität. Bei intrazellulären Signalkaskaden in Embryonen zeigte sich unter diabetischen Entwicklungsbedingungen, dass der Gesamtproteingehalt der Signalproteine Akt und Erk1/2 in Blastozysten aus diabetischen Tieren stark abnimmt. Dies ließ sich mit *in vitro* durchgeführten Versuchen nachstellen, bei denen Embryonen aus diabetischen Tieren mit Insulin oder IGF1 stimuliert und mit solchen aus gesunden Tieren verglichen wurden. Dabei zeigten sich eine verminderte Aktivierung (Phosphorylierung) von Erk2 bei Blastozysten, die aus diabetischen Tieren stammten (Thieme *et al.* 2012b).

- die insulinabhängige Gastrulation im Kaninchenembryo und deren Beeinflussung durch einen maternalen insulinpflichtigen Diabetes mellitus

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

Publiziert in: Ramin und Thieme et al. 2010 *Endocrinology*, 151(9):4158-4167

„Gastrulation in rabbit blastocysts depends on insulin and the insulin-like-growth-factor 1.“

Publiziert in: Thieme et al. 2012a *Molecular and Cellular Endocrinology*, 348(1):112-119

Im Rahmen der durchgeführten Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sich ein maternaler insulinpflichtiger Diabetes mellitus bereits sehr früh auf die ersten entscheidenden Zelldifferenzierungsschritte im Embryo auswirkt. Embryonen aus diabetischen Tieren sind am Tag 6 in ihrer Entwicklung zum Beginn der Gastrulation verzögert (Ramin *et al.* 2010). Die Initiation der Gastrulation lässt sich bei Kaninchenembryonen makroskopisch gut beurteilen, da die so genannte Gastrula Extension (Stadium 2) im posterioren Bereich der Keimscheibe ein klarer Beweis dafür ist (Viebahn *et al.* 1995, Viebahn *et al.* 2002). Wenn man Prägastrulationsembryonen des Stadiums 1 aus stoffwechselgesunden Tieren einer 12stündigen *in vitro* Kultivierung unterzieht, erreichen nur solche das Stadium 2, die mit Insulin oder IGF1 kultiviert worden waren, nicht jedoch solche, die ohne Wachstumsfaktoren kultiviert wurden (Thieme *et al.* 2012a). Dies ist ein starkes Indiz dafür, dass Insulin für die Initiation des Mesoderms ein notwendiger und starker Promotor ist. Molekular konnte die Rolle von Insulin bei der Initiation der Gastrulation weiter aufgeklärt werden. Die Gastrulations- und Mesoderminduktion wurde an Hand der entwicklungspezifischen Marker *Brachyury*, *Wnt3a* und *Wnt4* untersucht. Deren Expressionshöhe korreliert eng mit dem jeweiligen Entwicklungsstadium der Kaninchenblastozyste am Tag 6. Die beiden Wnt-Signalmoleküle *Wnt3a* und *Wnt4* sind in Embryonen aus diabetischen Tieren im Stadium 2 stark vermindert exprimiert, wohingegen *Wnt3a* und *Wnt4* in Embryonen aus stoffwechselgesunden Tieren mit der Initiation des Mesoderms stark ansteigen (Thieme *et al.* 2012a). *Wnt3a* und *Wnt4* sind in der Lage, *Brachyury*, den bedeutendsten Transkriptionsfaktor während der Mesoderminduktion, zu initiieren (Arnold *et al.* 2000). *In vitro* konnte weiterhin gezeigt werden, dass *Wnt3a* durch die Zugabe von Insulin ins Kulturmedium in seiner Transkriptmenge gesteigert werden kann. Wenn man einen spezifischen Inhibitor des Insulinsignalwegs, PD98059, einsetzt, der die Signalweitergabe auf der Stufe der Erk1/2 verhindert, bleibt der insulinvermittelte Anstieg von *Wnt3a* aus (Thieme *et al.* 2012a). Aus den beiden publizierten Arbeiten wird deutlich, dass ein mütterlicher Diabetes schon früh in die Embryogenese eingreift und die Weichen für spätere Fehlbildungen wie kongenitale Herzfehlbildungen stellen könnte. Die für diese Entwicklungsstörungen ursächlichen Fehlregulationen sind oft mesodermalen Ursprungs und gehen mit Fehlsteuerungen des Wnt-Signalwegs einher (Pavlinkova *et al.* 2008; Pavlinkova *et al.* 2009).

Resümiert man die erwähnten Befunde, dann wird deutlich, dass die Einflussnahme eines Diabetes mellitus auf die Embryonalentwicklung nicht nur vielschichtig ist, sondern gezeigt am IGF-

Signalsystem bereits während der frühen Embryogenese die Stoffwechselhomöostase im Embryo nachhaltig stört.

2. Einleitung

2.1. Auswirkungen maternaler Stoffwechselstörungen auf die Pränatalentwicklung

Neben genetischen Ursachen für Embryopathien können auch Umwelteinflüsse die Entwicklung eines Organismus negativ beeinflussen. Zu diesen zählen Faktoren wie Umweltgifte (PCBs, Phthalate, Dioxine etc.), psychischer Stress, Medikamente, Alkohol- und Nikotinkonsum, Infektionen sowie Stoffwechselerkrankungen der Mutter (Diabetes mellitus Typ1 und Typ 2, Adipositas, Unterernährung etc.). Folgeerkrankungen treten häufig erst im Erwachsenenalter auf, ein Umstand, der unter dem Begriff „*Developmental Origin of Health and Disease* - DOHaD“ zusammengefasst wird. Er umfasst präkonzeptionelle, pränatale und neonatale Einflüsse auf die weitere Entwicklung des Kindes.

2.1.1. Epidemiologie und Ätiologie maternaler Stoffwechselstörungen

Veränderungen im mütterlichen Nährstoff- und Hormonhaushalt können eine Schwangerschaft nachhaltig negativ beeinflussen. Zu den häufigsten Formen dieser Erkrankung zählen Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2, Gestationsdiabetes, Adipositas und das polyzystische Ovarsyndrom (PCOS). Aber auch ein akuter Nährstoffmangel kann weitreichende Folgen für das sich entwickelnde Kind haben. Dabei treten die negative Einflüsse nicht immer direkt auf, sondern zeigen sich erst nach Jahren oder Jahrzehnten im Erwachsenenalter. Dies bedeutet, dass die aufgetretenen unphysiologischen Veränderungen während der Schwangerschaft ein „Gedächtnis“ für die Störung in den embryonalen Zellen hinterlassen (Gluckman *et al.* 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Störung der Frühschwangerschaft bei einem Diabetes mellitus Typ 1 der Mutter untersucht. Deshalb sollen hier im Detail die Auswirkungen eines Diabetes mellitus während der Schwangerschaft erläutert werden.

Diabetes mellitus Typ 1 ist durch ein Fehlen des in den pankreatischen beta-Zellen gebildeten Insulins gekennzeichnet. Nach derzeitigem Wissensstand gelten genetische Determinanten, in deren Folge es zu einer Autoimmunantwort des Körpers gegen die insulinproduzierenden Zellen im Pankreas kommt, als Auslöser der Krankheit. Die Folge ist ein dramatischer Anstieg des Blutglukosespiegels. Ein Diabetes mellitus Typ 2 hingegen ist multifaktoriell, wobei genetische Anlagen auch hier eine Rolle spielen können. Der Diabetes mellitus Typ 2 ist vielschichtig mit unterschiedlichen Formen und Ursachen. Seine Facetten reichen von einer Beeinträchtigung der Insulinwirkung bis hin zum Absterben der insulinproduzierenden Zellen mit fortschreitender Erkrankungsdauer. Dann muss auch bei dieser Erkrankungsform Insulin substituiert werden. Mit der Novellierung der Leitlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) sind die in Tabelle 1 dargestellten Formen des Diabetes zu

unterscheiden (DDG 2011). Grundsätzlich gilt die Definition, dass ein Diabetes mellitus von einer chronischen Hyperglykämie charakterisiert ist, deren Ursache in einer gestörten Insulinsekretion oder Insulinwirkung liegt (DDG 2011).

Tabelle 1: Klassifikation des Diabetes mellitus nach den Leitlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft

Diabetes mellitus Typ 1	Diabetes mellitus Typ 2	andere spezifische Diabetes Typen	Gestationsdiabetes
<ul style="list-style-type: none"> - beta-Zellzerstörung, die zu einem absoluten Insulinmangel führt - meist immunologisch vermittelt 	<ul style="list-style-type: none"> - kann sich von einer vorwiegenden Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis zu einem vorwiegend sekretorischen Defekt mit Insulinresistenz erstrecken - ist häufig assoziiert mit anderen Problemen eines sogenannten metabolischen Syndroms 	<ul style="list-style-type: none"> - Erkrankungen des exokrinen Pankreas (z. B. Pankreatitis, zystische Fibrose, Hämochromatose) - Endokrinopathien (z. B. Cushing-Syndrom, Akromegalie, Phäochromozytom) - medikamentös-chemisch induziert (z. B. Glukokortikoide, Neuroleptika, alpha-Interferon, Pentamidin) - genetische Defekte der β-Zell-Funktion (z. B. MODY-Formen) - genetische Defekte der Insulinwirkung - andere genetische Syndrome, die mit einem Diabetes assoziiert sein können - Infektionen 	<ul style="list-style-type: none"> - Erstmals während der Schwangerschaft aufgetretene oder diagnostizierte Glukosetoleranzstörung.

(nach Praxisleitlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft 2011)

Frauen mit einem unbehandelten Diabetes mellitus sind subfertil. Das sich entwickelnde Kind kann Embryo- und Fetopathien, insbesondere Herzfehlbildungen, entwickeln. Typische Folgen sind aber auch Plazentainsuffizienz, eine erhöhte Abortrate, Präeklampsie und Großwuchs (Casson *et al.* 1997; Penney *et al.* 2003; Verheijen *et al.* 2005; Yang *et al.* 2006). Ob und welche dieser Schwangerschaftskomplikationen eintreten, hängt vom Schwangerschaftszeitpunkt und der Einstellung des Diabetes ab. Frühe Embryopathien (Herz, Knochen- und Nierenfehlbildungen) entstehen, wenn der Blutzucker in den ersten Wochen nach Eintreten der Schwangerschaft zu hoch ist. Wenn der Blutzucker dagegen eher zum Ende der Schwangerschaft pathologisch hoch ist, kommt es zu makrosomen Neugeborenen mit einem Geburtsgewicht >4000g. Ab der 11. Schwangerschaftswoche kann der menschliche Fetus bereits selbst Insulin produzieren. Der Fetus ist ab der 17. Schwangerschaftswoche in der Lage, die Insulinsekretion glukoseabhängige zu steuern (Reiher *et al.* 1983; Weiss 2002). Ein Überangebot an Nährstoffen in Form von Glukose kann dann vom Fetus selbst verwerten werden, wodurch er überdurchschnittlich wächst und Fettdepots anlegt. Weltweit leiden ca. 285 Millionen Menschen an Diabetes. In Deutschland leiden ca. 1% der schwangeren Frauen an einem Diabetes mellitus Typ 1 oder Typ 2 (präkonzeptioneller Diabetes). Im Jahr 2011 wurden bei 4,4% aller Schwangeren ein Gestationsdiabetes festgestellt (DeutscheDiabetesHilfe 2013). Ein Gestationsdiabetes bildet sich meist ab dem Ende des 2.

Trimenons aus. Die Prävalenz für diese schwangerschaftsbedingte Erkrankung steigt seit Jahren rasant an und hat sich zuletzt von 1,47% im Jahr 2002 auf 4,4% im Jahr 2011 erhöht (DeutscheDiabetesHilfe 2013). Somit zählt der Gestationsdiabetes zu den am häufigsten auftretenden Schwangerschaftskomplikationen. Es wird daher empfohlen, zwischen der 24. und 28. Schwangerschaftswoche einen oralen Glukosetoleranztest durchzuführen. Nur hierdurch kann eine flächendeckende Vorsorge zur Entdeckung und Behandlung dieser Erkrankung erzielt werden. Die Komplikationen, welche sich aus einem nicht entdeckten Gestationsdiabetes ergeben, sind denen ähnlich, die bei einem schlecht eingestellten Diabetes mellitus Typ 1 oder Typ 2 auftreten. Durch eine Behandlung aller drei Formen des Diabetes lassen sich die jeweiligen Risiken stark senken, erreichen aber immer noch nicht das Niveau von stoffwechselgesunden Schwangeren.

Zur Aufklärung molekularbiologischer Mechanismen, die zur Entstehung von diabetesassoziierten Embryopathien beitragen, wurden Versuche an graviden Mäusen und Kaninchen durchgeführt, auch, um exemplarisch frühe molekulare Ursachen für diabetesinduzierte Herzfehlbildungen zu finden. Die Mäuse litten an einem experimentell induzierten insulinabhängigen Diabetes. Schon mit der Anlage des Herzens am Tag 8 der Entwicklung war eines der wichtigsten Signalgeber-Systeme der Herzausbildung, das Wnt-Signalsystem, stark beeinträchtigt (Pavlinkova *et al.* 2008). Mittels vergleichender mRNA Analysen von Herzen mit definierten Fehlbildungen und solchen von Nachkommen aus stoffwechselgesunden Mäusen konnte gezeigt werden, dass das Wnt-Signalsystem auf allen Ebenen der zellulären Verarbeitung gestört ist, vom Liganden, Rezeptor bis hin zur intrazellulären Signalverarbeitung (Pavlinkova *et al.* 2009). Im Kaninchen konnten wir am Tag 6 der Entwicklung eine verzögerte Mesoderminduktion beobachten (Ramin *et al.* 2010; Thieme *et al.* 2012a). Durch diese in der Maus und im Kaninchen durchgeführten Arbeiten wird deutlich, wie früh sich diabetesinduzierte Herzfehlbildungen manifestieren und dass diese vermutlich von Anfang an von einer Fehlregulation des Wnt-Signalwegs begleitet sind.

2.1.2. Glukose- und Aminosäureversorgung des Präimplantationsembryos

Sowohl der Embryo als auch später der Fetus werden von der Mutter über die Plazenta mit allen benötigten Nährstoffen versorgt. Die bereitgestellte Hauptenergiequelle ist dabei Glukose. Ebenfalls werden alle anderen benötigten Stoffe, wie Fettsäuren, Aminosäuren, Vitamine und Mikronährstoffe (Spurenelemente), zur Verfügung gestellt. Die ausgewogene Zusammensetzung aller Nährstoffe ist die Grundlage für eine zeitgerechte und normale Entwicklung des Kindes.

Nach der Befruchtung der Eizelle und in den ersten Tagen seiner Entwicklung befindet sich der Embryo im Eileiter umgeben vom Mikromilieu des vom Epithel sezernierten Sekretes. Die Hauptenergiequellen des Embryos während dieser Zeit sind Pyruvat und Laktat. Glukose dient erst

mit Erreichen des Uterus, ab dem Blastozystenstadium, als Hauptenergiequelle. Der Wechsel von anaerobem zu aerobem Stoffwechsel ist eine gemeinsame Eigenschaft aller Säugerembryonen (Mensch (Dan-Goor *et al.* 1997; Wales *et al.* 1987), Maus (Gardner *et al.* 1988; Leese *et al.* 1984; Martin *et al.* 1995), Ratte (Dufrasnes *et al.* 1993), Kaninchen (Pike 1981), Rind (Khurana *et al.* 2000; Thompson *et al.* 1996), Schaf (Gardner *et al.* 1993), Schwein (Flood *et al.* 1988)). Zwei Faktoren bedingen die Stoffwechsellumstellung von Pyruvat und Laktat zu Glukose. Einerseits begünstigt die sauerstoffarme Umgebung im Eileiter den anaeroben Stoffwechsel (Fischer *et al.* 1993; Leese 1989). Andererseits erfordert die Bildung und Aufrechterhaltung einer flüssigkeitsgefüllten Blastozystenhöhle gegenüber dem Uterussekret sowie die Aufrechterhaltung von Membranpotentialen einen gesteigerten Energiebedarf. Ab diesem Stadium proliferieren die Zellen aktiv und unterliegen nicht wie zuvor nur der Furchung. Hierdurch vervielfacht sich der ATP-Bedarf mit der Kompaktierung der Blastozyste exponentiell, der nur durch die Verstoffwechslung von Glukose im Zitratzyklus erbracht werden kann.

Bei der Untersuchung der frühen Embryogenese beim Kaninchen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit insbesondere zwei Nährstoffe und deren Stoffwechsel im Embryo genauer betrachtet: Glukose und die essentiellen verzweigtkettigen Aminosäuren L-Valin, L-Leucin und L-Isoleucin (BCAAs). Sie sollen in den folgenden Abschnitten näher besprochen werden.

Beim Menschen beträgt die Glukosekonzentration im Eileiter 0,5 – 2,3 mM (Gardner *et al.* 1996) und im Uterus 5,2 – 5,7 mM (Casslén *et al.* 1984). Im Kaninchen findet man im Uterus eine Glukosekonzentration von 0,4 - 1mM (Lutwak-Mann 1962), die auf ca. 1,75 mM ansteigt, wenn ein Diabetes mellitus Typ 1 beim Muttertier induziert worden war (Ramin *et al.* 2010).

Als polares Molekül ist Glukose nicht in der Lage, die Zellmembran zu passieren. Sie wird mit Hilfe mehrerer Transporter ins Zellinnere gebracht. Hierfür finden sich zwei verschiedene Systeme, ein energieabhängiger Natrium-Glukose-Transport (SGLT), und ein energieunabhängiger passiver Transport (GLUT). Die drei Haupttransporter, welche vom Präimplantationsembryo exprimiert werden, sind GLUT1, GLUT3 und GLUT4, welche schon ab dem Morulastadium nachweisbar sind (Maus (Aghayan *et al.* 1992; Pantaleon *et al.* 1998), Kaninchen (Navarrete Santos *et al.* 2004a; Robinson *et al.* 1990), Rind (Augustin *et al.* 2001; Lequarre *et al.* 1997)). GLUT8 ist im Kaninchen und der Maus ab dem Blastozystenstadium exprimiert (Carayannopoulos *et al.* 2000; Navarrete Santos *et al.* 2004a). Entgegen einiger Studien in Mausembryonen ist der GLUT2 in Kaninchenpräimplantationsembryonen nicht vorhanden (Moley *et al.* 1998a). GLUT4 ist *in vitro* insulin- und adiponektinabhängig aktivierbar und transloziert in die Zellmembran (Fischer *et al.* 2010; Navarrete Santos *et al.* 2004b). *In vitro* ist eine Steigerung der Glukoseaufnahme nur nach Adiponektinstimulation vorhanden, nicht nach Insulin (Fischer *et al.* 2010; Navarrete Santos *et al.* 2004b). Dies legt ein enges Zusammenspiel beider Hormone bei der Steuerung der Glukoseaufnahme

nahe, bei deren synergistischen Wirkung der GLUT4 zur Zellmembran gesteuert wird, um den Embryo mit Glukose zu versorgen. In diabetischen Embryonen ist die mRNA-Expression sowie die Translokation des insulinabhängigen GLUT4 in die Zellmembran im Embryoblasten stark verringert (Thieme *et al.* 2012c).

Von besonderer Bedeutung sind auch die drei essentiellen verzweigtkettigen aliphatischen Aminosäuren L-Leucin, L-Isoleucin und L-Valin. Der Embryo benötigt sie nicht nur zur Synthese eigener Proteine, sondern auch als Signalmoleküle. L-Leucin, L-Isoleucin und L-Valin sind in der Lage, den mTOR-Signalweg zu aktivieren (Tokunaga *et al.* 2004). Der mTOR-Signalweg spielt neben der aminosäurevermittelten Steuerung der Energiehomöostase eine zentrale Rolle in der Aktivierung der Proteinbiosynthese, indem mTOR bei der Initiation der Translation eine Schlüsselrolle einnimmt. Das „*mammalian target of rapamycin*“ (mTOR), eine Proteinkinase, vermittelt die Translationsinitiation über die Kontrolle des *mRNA-cappings*, indem es die S6K1 und das RNA-*cap*-bindende Protein 4E-BP1 phosphoryliert. Daraufhin dissoziiert dieses von der mRNA und gibt sie zur Translation frei. Mittels Mutationsstudien des mTOR-Gens in der Maus konnte die zentrale Rolle von mTOR während der Embryogenese gezeigt werden. Die Nullmutante für mTOR ist letal. Mausembryonen, welche eine heterozygote Mutation für mTOR aufwiesen, sterben kurz nach der Implantationsphase ab. Der Grund hierfür wird in einer verminderten Zellproliferation der embryonalen und extraembryonalen Gewebe gesehen (Murakami *et al.* 2004). Im Kaninchenembryo konnte die mTOR-Phosphorylierung nach einer Stimulation mit L-Leucin *in vitro* gezeigt werden und so der funktionelle Nachweis der mTOR-Aktivierung erbracht werden. L-Leucin vermittelte einen 1,8fachen Anstieg des aktivierten (phosphorylierten) mTORs (Gürke *et al.* 2012).

Im uterinen Lumen des Rindes konnte ein Anstieg dieser drei essentiellen Aminosäuren während der ersten Tage der Gravidität beobachtet werden (Groebner *et al.* 2011b). Ebenfalls im Rind konnte gezeigt werden, dass in Tieren, bei denen eine *in vitro* Befruchtung durchgeführt wurde, diese essentiellen Aminosäuren im uterinen Lumen in verringerter Menge im Vergleich zu natürlich trächtigen Tieren vorzufinden waren (Groebner *et al.* 2011a). Diese Befunde verdeutlichen, dass das uterine Milieu durch von außen durchgeführte Interventionen gestört werden kann. Die direkten und indirekten Folgen, die aus einer solchen gestörten embryo-maternalen Kommunikation hervorgehen, sind meist nicht mittelbar zu sehen. Oft manifestieren sich die Folgen einer gestörten embryo-maternalen Kommunikation erst im späteren Verlauf des Lebens eines Individuums, indem sie Erkrankungen hervorrufen, die als „*Developmental Origin of Health and Disease*“ bezeichnet werden (Gluckman *et al.* 2008).

Im diabetischen Kaninchen konnte mittels einer HPLC-basierten Analyseverfahren die Konzentration aller proteinogenen Aminosäuren (außer L-Prolin) im Plasma, im Sekret des uterinen Lumens und in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit gemessen werden. In allen drei untersuchten Flüssigkeiten zeigte

sich bei diabetischen Tieren für L-Leucin, L-Isoleucin und L-Valin ein Anstieg in der Konzentration um das ca. 3,5fache (Thieme *et al.* 2009). Alle anderen untersuchten Aminosäuren unterschieden sich in ihrer Konzentration in diabetischen Tieren nicht von denen aus stoffwechselgesunden Tieren. Die Ursache für den Anstieg der drei BCAAs ist in einer verminderten Abbaurate zu sehen (Herman *et al.* 2010). Ihre Erhöhung kann nicht mit einer allgemeinen Proteolyse erklärt werden, da in diesem Fall alle Aminosäuren in ihrer Konzentration erhöht sein müssten. BCAA-abbauende Enzyme (*Bcat2*, *Bckdha*, *Dbt* and *Did*) konnten bei Kaninchenembryonen nachgewiesen werden. Diese Enzyme sind im Fettgewebe und im Embryo diabetischer Mütter verringert exprimiert (Gürke *et al.* 2012).

2.2. Das Kaninchen als embryologisches Modell

Seit mehr als zwei Jahrhunderten wird die Embryogenese des Kaninchens untersucht und für die Klärung von entwicklungsphysiologischen Fragestellungen bei Säugern genutzt. Im 19. Jahrhundert konzentrierte man sich hauptsächlich auf morphologische Gesichtspunkte und spezievergleichende Analysen. Bereits 1876 wurde durch Viktor Hensen der Nodalknoten, auch *Hensens-Node* oder Primitivknoten genannt, im Kaninchen beschrieben (Hensen 1876). In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts folgte durch Arbeiten von Waddington eine funktionelle Charakterisierung des Nodalknoten und seine Bedeutung für die Entwicklung der Neuralleiste (Waddington *et al.* 1933). Heute ist das Kaninchen ein Versuchstier der aktuellen molekularbiologischen und biotechnologischen Forschung.

Die Sequenzierung des Kaninchengenoms ergab, dass seine DNA dem Menschen ontogenetisch näher steht als die anderer forschungsrelevanter Spezies wie Maus oder Ratte. Während der Präimplantationsphase ist die Embryogenese des Kaninchens mit einer planaren Keimscheibe und dem hämochorealen Plazentationstypus vergleichbar mit der des Menschen.

Ein weiterer Vorteil des Kaninchens gegenüber anderen Säugern ist die Größe des Blastozyste kurz vor der Implantation. Sie erreicht einen Durchmesser von ca. 2 mm am Tag 6 *post coitum* (p.c.). Diese Größe und die genaue Kenntnis der Keimscheibenmorphologie ermöglicht die Betrachtungen der Kaninchenblastozyste mit Hilfe einer Lupenvergrößerung. Die Größe und die damit verbundene Anzahl an Zellen ist ein großer Vorteil für molekularbiologische Analysen, bei denen eine bestimmte Mindestmenge an Zellmaterial erforderlich ist. Bei Kaninchenblastozysten sind RNA- und Proteinanalysen an einem individuellen Embryo ohne Verfahren der Einzelzellanalytik möglich. Die Größenzunahme spiegelt sich vor allem in der Proteinmenge des Embryos wider. Diese erhöht sich vom 1-Zellstadium von 0,16 µg auf ca. 7-10 µg Protein in Blastozyste am Tag 6 der Entwicklung (Morgan *et al.* 1993). Allein der Embryoblast einer 6 Tage alten Blastozyste umfasst ca. 2000 Zellen (Ramin *et al.* 2010). Dagegen hat der gesamte Mausembryo im vergleichbaren Entwicklungsstadium (Tag 3,5) gerade einmal 35 Zellen. Die Vorteile des Kaninchenembryos nutzend, wurden in dieser

Arbeit Untersuchungen an Einzelembryonen durchgeführt, die neue Erkenntnisse über die molekularen und biochemischen Vorgänge in der frühen Säugerembryogenese ermöglichten.

2.2.1. Die Präimplantationsentwicklung des Kaninchens

Die Präimplantationsphase im Kaninchen umfasst die Zeit von der Befruchtung bis zur Implantation am Tag 6,8 p.c. (Denker 1977).

Kaninchen ovulieren induziert (nach dem Deckakt) und unterliegen keinem ovariellen Zyklus. Durch Furchung entsteht innerhalb von 10-14 Stunden nach der Befruchtung das Zweizellstadium. Durch totaläquale, nicht synchrone Teilungen der Blastomeren entsteht am Tag 2,5 p.c. eine Morula, die aus 32-64 Zellen aufgebaut ist. Die Furchung dient dazu, ein ausgeglichenes Kern-Plasma-Verhältnis in den Blastomeren zu schaffen, welches für die Aufnahme von embryoeigenen Stoffwechselaktivitäten notwendig ist. Zur Aktivierung des embryonalen Genoms kommt es im Kaninchen zwischen dem 8- und 16-Zellstadium (Brunet-Simon *et al.* 2001). Beim Übertritt vom Eileiter in den Uterus am Tag 3 bis 4 der Entwicklung erfolgt die Blastozystenbildung. Wobei es vorher, am Tag 3 p.c., zur Kompaktierung kommt und sich im Inneren der dicht aneinander gedrängten Blastomeren ein flüssigkeitsgefüllter Hohlraum bildet (Gottschewski *et al.* 1973).

Mit der Entstehung der Blastozyste kommt es nicht nur zur weiteren Vergrößerung der Zellzahl, sondern auch zum ersten Differenzierungsprozess in den Embryoblasten (Embryonalknoten, Keimscheibe, *inner cell mass*), aus dem der eigentliche Embryo entsteht, und in die Zellen des Trophoblasten (*trophectoderm*). Die Zellen des Trophoblasten sind für die spätere Implantation des Embryos und die Ausbildung der Plazenta verantwortlich. Sie sind epitheliale Barrieren zum Uterussekret hin und üben vielfältige Transportaufgaben für Nährstoffe zum Embryoblasten hin aus. Bis zum 8-Zellstadium, also vor der Kompaktierung der Morula, sind die Blastomeren totipotent, was heißt, dass aus jeder einzelnen Blastomere ein neuer Organismus entstehen kann. Mit der Blastozystenbildung entstehen mit dem Embryoblasten und dem Trophoblasten differenzierte Gewebe. Die Zellen des Embryoblasten weisen noch das Merkmal der Pluripotenz auf, was ihnen ermöglicht, in alle drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Endoderm) zu differenzieren.

In der Maus wurden für die Embryoblast-Trophoblast-Determinierung zwei Transkriptionsfaktoren besonders gut charakterisiert, Oct4 als Pluripotenzmarker im Embryoblasten und Cdx2 als Differenzierungsmarker des Trophoblasten (Niwa *et al.* 2000; Rosner *et al.* 1991). Mit der Differenzierung wird Oct4 sehr schnell in den Trophoblastzellen herunter reguliert. Dabei kommt die antagonistische Wirkung zwischen Oct4 und Cdx2/Eomesodermin zum Tragen, die sich gegenseitig hemmen und so die Differenzierung des Trophoblasten auf der einen Seite und die Erhaltung der

Pluripotenz im Embryoblasten auf der anderen Seite absichern (Babaie *et al.* 2007; Nichols *et al.* 1998).

Die Zellen der Blastozyste sind nicht schutzlos ihrer Umgebung ausgesetzt. Sie werden von einer extrazellulären Hülle der *Zona pellucida* und einer Mukoproteinschicht umgeben, welche sich im Laufe der Entwicklung im Uterus auflöst und von der Neozona ersetzt wird (Böving 1963; Denker *et al.* 1979; Fischer *et al.* 1991). Die Hauptbestandteile der extrazellulären Hüllen sind stark glykosylierte, vernetzte Proteine, die eine Schutzfunktion für den sich entwickelnden Embryo einnehmen (Herrler *et al.* 1999).

Mit dem proteolytischen Abbau der Neozona am Tag 6,5 *p.c.* und der Anhaftung der Blastozyste auf der antimesometrialen Seite des Uterus wird die Präimplantationsphase abgeschlossen und es folgt die Implantation. Die Herausbildung der Plazenta, welche die Versorgung des Embryos übernimmt, ist beim Kaninchen ein mehrtägiger Prozess, der aber an dieser Stelle nicht weiter erläutert werden soll.

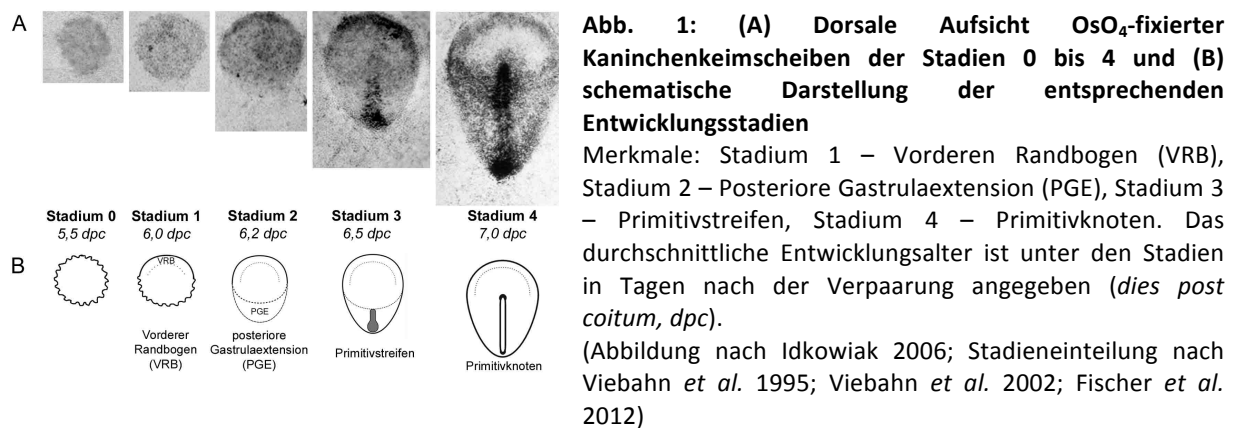
2.2.2. Die Gastrulation in der Kaninchenblastozyste und ihre molekulare Steuerung

Alle Informationen, die für den Bauplan des erwachsenen Organismus nötig sind, sind im Zellkern in der DNA abgespeichert. Die Entwicklung des Organismus bedarf daher eines feinabgestimmten Ablesens dieser Information um Prozesse wie Wachstum, Formgebung, Differenzierung und Musterbildung zu gewährleisten. Einer der ersten bedeutenden Schritte während dieser Form- und Mustergebung ist die Gastrulation. Diese beschreibt den Prozess der Keimscheibendifferenzierung in die drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm, aus denen sich im weiteren Verlauf der Entwicklung alle Organe eines Organismus ableiten.

Am Tag 6,0 *p.c.* ist die Keimscheibe des Kaninchens durch zwei Zellschichten charakterisiert, dem Epiblasten und dem Hypoblasten. Zur Klassifizierung der einzelnen Gastrulationsstadien lässt sich die Einteilung nach Viebahn *et al.* 1995 heranziehen, welche den Übergang von einer undifferenzierten Keimscheibe am Tag 5,5 *p.c.* bis zur Implantation am Tag 6,8 *p.c.* in 5 Stadien beschreibt (Abb. 1; (Fischer *et al.* 2012)). Das Stadium 0 am Tag 5,5 *p.c.* ist durch eine nicht scharf abgegrenzte Keimscheibe charakterisiert, welche eng mit dem sie umgebenden Trophoblastgewebe verzahnt ist. Im weiteren Verlauf grenzt sich die Keimscheibe gegenüber dem umgebenden Trophoblasten scharf ab und erreicht das Stadium 1 am Tag 6,0 *p.c.*. Im anterioren Bereich der Keimscheibe bildet sich der vordere Randbogen aus. Dieser erscheint im Durchlicht dunkler, da die Zellen in diesem Bereich stark proliferieren und dichter liegen. Im weiteren Verlauf der Entwicklung wird der Vordere Randbogen noch deutlicher sichtbar. Erste Strukturen des Mesoderms zeigen sich am Tag 6,2 *p.c.* in der Posterioren Gastrulaextension (PGE), in der es zu einem Proliferationsstopp kommt (Viebahn *et al.*

2002). Als sichtbare morphologische und makroskopisch erkennbare Struktur erstreckt sich vom posterioren Pol aus longitudinal der Primitivstreifen, der im Nodalknoten endet (Bellairs 1986; Viebahn *et al.* 1995). Dieser entwickelt sich beim Übergang vom Stadium 2 (Tag 6,2 *p.c.*) zum Stadium 3 (Tag 6,5 *p.c.*).

Der Hypoblast nimmt in der Entstehung des Mesoderms eine entscheidende Rolle ein, da er essentielle Signalgeberfunktion für die Orientierung der Achsenausrichtung hat. Von ihm gehen Signale aus, die im anterioren Bereich der Keimscheibe die Mesoderminduktion unterdrücken und im posterioren Bereich diese forcieren (Idkowiak *et al.* 2004). Zur Entwicklung des Mesoderms in der Kaninchenkeimscheibe wandern Zellen, die Basalmembran durchbrechend, aus der proliferativen Zone des Vorderen Randbogens zwischen Epiblasten und Hypoblasten in den posterioren Bereich der Keimscheibe ein. Die Zellen dieser Region selbst unterliegen zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung einem Proliferationsstopp, wodurch sie im Durchlicht heller erscheinen (siehe Abb. 1).



Die hauptsächlich im anterioren Bereich zuständigen Signalmoleküle zur Unterdrückung der Mesodermdifferenzierung sind das Wnt-Signalweg-antagonisierende Dickkopf-1 Protein (Glinka *et al.* 1998), das *Bone-morphogenic-protein* (BMP)- und das Nodal-antagonisierende *Cerberus* Protein (Belo *et al.* 1997; Biben *et al.* 1998; Pearce *et al.* 1999). Sie sind an der Ausbildung der Kopfstruktur beteiligt.

Im Kaninchen kann die Gastrulation und die Rolle verschiedener signalgebender Moleküle durch eine Hypoblastenresektion *in vitro* untersucht werden. Wenn die durch die Hypoblastenresektion nötigen antagonistischen Signalmoleküle wie Dickkopf-1 fehlen, wird der mesodermspezifische Transkriptionsfaktor *Brachyury* auch im anterioren Bereich der Keimscheibe induziert (Idkowiak *et al.* 2004). Im posterioren Bereich der Keimscheibe wird die *Brachyury*-mRNA-Expression durch den Wnt-Signalweg forciert. Dabei wirken die Wnt-Signalmoleküle Wnt1, Wnt3a und Wnt4 protektiv und sind in der Lage, *Brachyury* zu induzieren (Arnold *et al.* 2000).

Die Wnt-Moleküle umfassen eine Familie von 19 strukturell ähnlichen sekretierten Proteinen, welche posttranslational modifiziert werden. Sie weisen Glykosilierungen sowie einen Palmitylrest auf und

wirken als parakrine Faktoren in der frühen Embryogenese, wo sie hauptsächlich an ihre spezifischen Rezeptoren, die als *Frizzled*-Rezeptoren bezeichnet werden, binden (Bhanot *et al.* 1996). Die Rezeptoraktivierung kann zwei verschiedene intrazelluläre Antworten hervorrufen, den kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalweg.

Der kanonische Wnt-Signalweg zeichnet sich durch die Inaktivierung der Glykogensynthasekinase-3beta aus, welche für den Abbau des Strukturproteins beta-Catenin verantwortlich ist (Aberle *et al.* 1997; Latres *et al.* 1999; Liu *et al.* 1999a). Wird beta-Catenin nicht dem Proteasom zugeführt und abgebaut, akkumuliert es und fungiert als Teil eines Transkriptionsfaktorkomplexes, welcher in der Lage ist, *Brachyury* und damit die Mesodermdifferenzierung zu initialisieren.

Der zweite nicht-kanonische Wnt-Signalweg verläuft über einen Phospholipase-C-Ca²⁺-abhängigen Mechanismus (Lange *et al.* 2006). Neben dem Wnt-Signalweg konnten eine Aktivierung des *Fibroblast-growth-factor*-(FGF)- (Rosa *et al.* 1988) und des *Transforming-growth-factor*-(TGF)-beta-Signalwegs (Slack *et al.* 1987) während der Ausbildung des Mesoderms festgestellt werden. Zusammen wirkt ihre Aktivierung synergistisch auf die Mesodermdifferenzierung und -spezifizierung. So ist FGF für die Aufrechterhaltung der *Brachyury*-Expression und der terminalen Differenzierung des Mesoderms (z.B. in Muskelzellen) von entscheidender Bedeutung (Amaya *et al.* 1993; Northrop *et al.* 1994).

Während der Induktion des posterioren Mesoderms nimmt der Transkriptionsfaktor *Brachyury* eine Schlüsselfunktion ein. Bei Mausembryonen, bei denen das *Brachyury*-Gen stillgelegt wurde, kommt es zu einer Fehlbildung und Störung in der Gastrulation (Dobrovolskaia-Zavadskaja 1927). Die Embryonen weisen Defizite in der Ausbildung des Notochord auf, die Ausbildung der Somiten und die Anlage der Rechts-Links-Achse sind gestört (Naiche *et al.* 2005; Yanagisawa *et al.* 1981).

Brachyury ist in seiner Form und Funktion hoch konserviert. Es trägt zur Induktion des Mesoderms in *Xenopus* (Smith *et al.* 1991), Zebrafisch (Schulte-Merker *et al.* 1994a; Schulte-Merker *et al.* 1994b), Maus (Inman *et al.* 2006; Kispert *et al.* 1994), Kaninchen (Viebahn *et al.* 1995), Huhn (Kispert *et al.* 1995; Liu *et al.* 2003) und Mensch (Edwards *et al.* 1996) bei, was eine gemeinsame Funktion von *Brachyury* während der Evolution nahe legt. *Brachyury* gehört der Gruppe der T-Box Transkriptionsfaktoren an (Herrmann *et al.* 1990). Seine biologische Funktion als Transkriptionsfaktor wird über ein sequenzspezifisches DNA-Motiv (5'-TCACACCT-3') vermittelt (Kispert *et al.* 1993; Kispert *et al.* 1994; Pflugfelder *et al.* 1992). In *Embryoid bodies* (aus embryonalen Stammzellen *in vitro* erzeugte embryoähnliche Zellaggregate) konnten mittels *Chip-chip* Analyse einige Zielfaktoren von *Brachyury* bestimmt werden. Dazu gehören *Axin2*, ein negativer Regulator des Wnt-Signalwegs, *Wnt3a* und *FGF8* (Evans *et al.* 2012). Diese Ergebnisse konnten mittels *ChIP-qPCR* in humanen embryonalen Stammzellen verifiziert werden.

Bei den molekularen Signalkaskaden geht man davon aus, dass es in Embryonen eine Induktion von *Brachyury* durch den Wnt-Signalweg gibt. Diese Induktion selbst ist durch eine *Feedback*-Regulation mit dem eigenen Aktivator induktiv gekoppelt. Weiterhin ist *Brachyury* an eine Vielzahl von Signalwegen angebunden, z.B. *Mitogene-activated-proteine-kinase*-, *Januskinase*-, *TGFbeta*-, *Hedgehog*-, *FGF*- und *G-Protein*-gekoppelte Signalwege. Bei der Analyse dieser *Brachyury*-Zielgene ergaben sich noch weitere Signalmolekülen (*Gabra1*, *Gfra1* und *Gbln3*). Diese Gruppe spielt vor allem in der Organisation des Zytoskelets eine entscheidende Rolle und spielt damit in der Morphogenese und Musterausprägung eine wichtige Rolle (Evans *et al.* 2012).

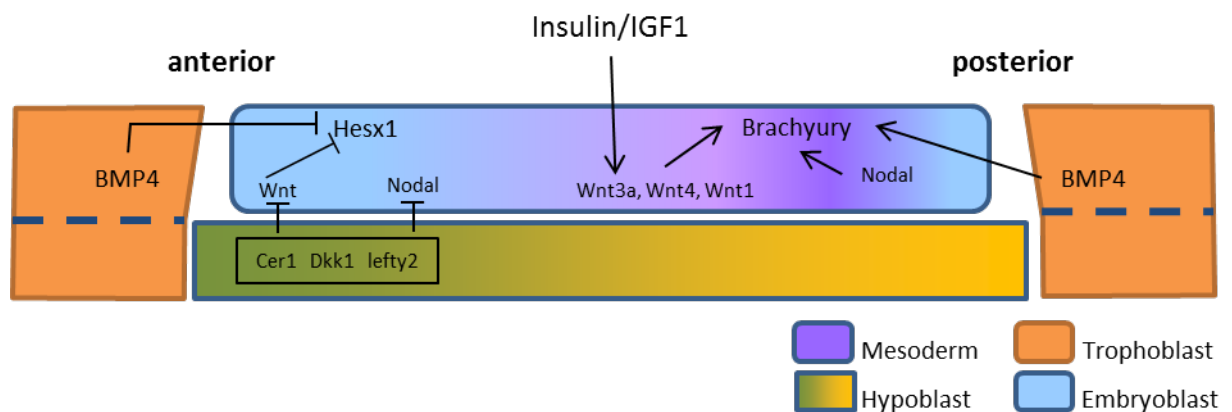


Abb. 2: Molekulare Steuerung der Mesoderminduktion in der planaren Kaninchenkeimscheibe

Exemplarisch ist eine für Säuger typische Keimscheibe abgebildet. Im medialen sagitalen Schnitt ist eine durch den Hypoblasten verursachte Gradientenausbildung zu sehen. Im anterioren Bereich der Keimscheibe kommt es durch die antagonisierenden Signalmoleküle Cerberus, Dickkopf1 und Lefty2 zu Unterdrückung der Mesoderminduktion und damit zur Kopfanlage. Im posterioren Bereich forcieren Wnt-Signalmoleküle (Wnt3a, Wnt4 und Wnt1), Nodal und BMP4 die Mesoderminduktion durch ihre aktivierende Wirkung auf den mesodermspezifischen Transkriptionsfaktor *Brachyury*. Insulin und IGF1 haben dabei eine induktive Wirkung auf Wnt3a und Wnt4 und sind für die Induktion des Mesoderms mitverantwortlich. (Beddington *et al.* 1999; Idkowiak 2006)

2.3. Die Rolle des IGF-Insulin-Rezeptorsystems während der Präimplantationsentwicklung

Die frühe Embryonalentwicklung ist eine Zeitspanne, in der eine Reihe von Proliferationsschritten und ersten Differenzierungsprozessen stattfinden und gesteuert werden müssen. Das IGF-Signalsystem nimmt dabei eine zentrale Rolle ein.

2.3.1. Verteilung und Charakterisierung des IGF-Insulin-Rezeptorsystems und seiner Liganden während der Präimplantationsentwicklung

Der frühe Embryo ist von exogenen und endogenen Faktoren abhängig. Zu den exogenen gehört Insulin. Seine beiden verwandten Hormone IGF1 und IGF2 können sowohl von der Mutter bereitgestellt als auch vom Embryo selbst produziert werden. Insulin stammt ausschließlich von der

Mutter. Die IGF1- und IGF2-Expression des frühen Embryos konnte in vielen Säugerspezies nachgewiesen werden (Maus (Doherty *et al.* 1994; Inzunza *et al.* 2010), Rind (Watson *et al.* 1992), Kaninchen (Navarrete Santos *et al.* 2008; Navarrete Santos *et al.* 2004b; Ramin *et al.* 2010), Mensch (Lighten *et al.* 1998)). Dies unterstreicht die generelle Bedeutung dieser Wachstumsfaktoren während der frühen Säugerembryonalentwicklung.

In einer Vielzahl von *in vitro* Untersuchungen wurden positive Effekte von Insulin und den IGFs auf die Embryonalentwicklung beschrieben. Dabei ist zu unterstreichen, dass ein zu Viel auch hier negative Effekte haben kann. Die Wirkung ist dosisabhängig. So konnte in *in vitro* Kulturen von Rinderembryonen gezeigt werden, dass supraphysiologische Konzentrationen von IGF1 zu einer Erhöhung der Apoptoserate führen, aus der wiederum eine verminderte Blastozystenbildungsrate resultierte (Velazquez *et al.* 2009).

Der Embryo ist in der Lage, auf Insulin- und IGF-abhängige Signalwege spezifisch zu reagieren, da die einzelnen Liganden Insulin, IGF1 und IGF2 eine unterschiedliche Affinität zu ihren jeweiligen Rezeptoren haben (Chao *et al.* 2008). In seiner Rezeptorausstattung sind Embryoblast und Trophoblast verschieden und auf die Funktion und Anforderung der jeweiligen Zelllinie abgestimmt (Navarrete Santos *et al.* 2008). Dabei werden der IGF1R sowie der IR in seinen zwei Isoformen A und B vom Präimplantationsembryo exprimiert. Im Kaninchen wird die Isoform B des IR im Trophoblasten exprimiert und steuert dort hauptsächlich metabolische Signalprozesse. Im Embryoblasten sind nur der IGF1R und die Isoform A des IR lokalisiert (Navarrete Santos *et al.* 2008). Insgesamt gesehen nimmt der IR-A mit 80% der Gesamtmenge den Hauptanteil des vorhandenen Insulinrezeptoren in 6 Tage alten Kaninchenblastozyste ein.

Während IGF1 und IGF2 auch vom Embryo selbst gebildet werden können (Kaye 1997; Lighten *et al.* 1997; Telford *et al.* 1990a; Telford *et al.* 1990b; Thieme *et al.* 2012b), wird Insulin während dieser Entwicklungsphase ausschließlich durch die Mutter zur Verfügung gestellt (Chi *et al.* 2000; Lighten *et al.* 1998; Ramin *et al.* 2010).

Insulin gelangt während der frühen Embryonalentwicklung über seine systemische Verbreitung in der Mutter zum Embryo. Es wird durch Transzytose aus dem mütterlichen Blut über das Endometrium ins Uterussekret geschleust (Heyner *et al.* 1989; Schultz *et al.* 1992).

IGF1 und IGF2 sind ebenfalls systemisch im Blut der Mutter vorhanden und werden dort von höhermolekularen Bindeproteinen (IGFBPs) stabilisiert oder destabilisiert, womit deren Halbwertszeit reguliert wird (Yakar *et al.* 1999). Die Hauptquelle des IGFs ist die mütterliche Leber (Schwander *et al.* 1983). Neben dem zirkulierenden IGFs wird ein Teil auch lokal im Zielgewebe vor Ort synthetisiert, so auch vom Endometrium. Im menschlichen Eileiter findet man eine IGF1-Konzentration von 8 nM und im Uterussekret eine leicht höhere von ca. 11 nM vor (Lighten *et al.* 1998). Der IGF2-Spiegel bleibt während der Schwangerschaft beim Menschen unverändert. Im Kaninchen, welches eine Tragzeit

von ca. 30 Tagen hat, steigen IGF1 und IGF2 an. IGF2 zeigt im Vergleich zum IGF1 sogar einen überaus deutlicheren Anstieg um das 200fache von 0,08 µg/ml auf 16 µg/ml, wohingegen IGF1 lediglich einen Anstieg um das 1,66fache von 0,5 µg auf 0,83 µg/ml am Ende der 3. Gestationswoche zeigt (Nason *et al.* 1996). Transkriptanalysen im Embryoblasten und Trophoblasten ergaben, dass die Hauptsynthese des IGF1 und des IGF2 vom Embryoblasten geleistet wird. Der IGF1-Proteingehalt in der Blastozyste beträgt ca. 5 ng pro Embryo (Thieme *et al.* 2012b). In einer Vielzahl von Studien konnte gezeigt werden, dass ein zu geringer IGF1-Spiegel während der Schwangerschaft zu einem geringeren Geburtsgewicht führt (Liu *et al.* 1998; Liu *et al.* 1999b; Liu *et al.* 1993; Powell-Braxton *et al.* 1993a; Powell-Braxton *et al.* 1993b). Des Weiteren steigt das Risiko an der Ausbildung von Typ 2 Diabetes mellitus und kardiovaskulären Erkrankungen im Erwachsenenalter (Vaessen *et al.* 2001).

2.3.2. Die Signalkaskade des IGF-Insulin-Rezeptorsystems

Molekular sind die Rezeptoren des IGF-Systems und ihre Liganden eng miteinander verwandt. Die Rezeptoren gehören zur Familie der Tyrosinkinaserzeptoren und sind strukturell ähnlich aufgebaut. Die Rezeptoren des IGF-Systems sind Dimere, wobei auch das Vorkommen von Hybridrezeptoren beschrieben ist, sogenannte Hemirezeptoren. Bei ihnen werden je eine Domäne vom Insulin- und die jeweils andere vom IGF1-Rezeptor beigesteuert (LeRoith *et al.* 1995). Der N-Terminus stellt dabei die Bindedomäne für den jeweiligen Liganden dar. Intrazellulär befindet sich der Carboxyterminus, an dem nach Ligandenbindung eine Autophosphorylierung an Tyrosinresten stattfindet (Tyrosinkinasedomäne). Vom Insulinrezeptor sind zwei Transkriptvarianten bekannt. Er kommt in den Isoformen A und B vor, welche sich im Exon 11 um 12 Aminosäuren unterscheiden. Die beiden Isoformen entstehen auf Grund alternativer *Splice*-Varianten. Vom IGF1-Rezeptor hingegen ist nur eine Transkriptvariante bekannt.

Die Aktivierung des IGF1R und IR initiieren eine Autophosphorylierung an der Tyrosinkinasedomäne, welche wiederum die nachgeschalteten Signalkaskaden in Gang setzt. Anders als der IR und der IGF1R, deren Aktivierung eine intrazelluläre Signalkaskade vermitteln, führt die Bindung von IGF2 an den IGF2R zu keiner Aktivierungskaskade. Membranständig ist der Rezeptor in der Lage, IGF2 zu binden. Intrazellulär bindet er Mannose-6-Phosphat-gebundene Proteine im trans-Golgi Netzwerk. Der IGF2R besitzt keine intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne und vermittelt durch die Bindung von IGF2 dessen Abbau, in dem der IGF2-IGF2R-Komplex dem lysosomalen Abbau in der Zelle zugeführt wird.

2.3.3. Die Liganden des IGF-Insulin-Rezeptorsystems

Es sind sechs IGF-Bindeproteine (IGFBP) bekannt. In gebundener Form sind die IGFs inaktiv; sie können nur in ihrer freien Form den entsprechenden Rezeptor binden. Dafür ist eine proteolytische Abspaltung des IGFs vom Bindeprotein notwendig. Die Verfügbarkeit der entsprechenden Proteasen stellt so neben der transkriptionellen Regulation eine weitere Ebene in der Regulation der IGF-Verfügbarkeit dar. Die IGFBPs können nach ihrem Vorkommen in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Das IGFBP1, 3, 5 und 6 binden vorrangig im zentralen Blutkreislauf, während IGFBP2 und 4 eher eine lokale autokrine bzw. parakrine Funktion besitzen (Allan *et al.* 2001). Beim Menschen konnten das IGFBP1 in einer Vielzahl von reproduktionsassoziierten Geweben detektiert werden (Blastozyste (Corps *et al.* 1990), Granulosazellen (Mondschein *et al.* 1990; Mondschein *et al.* 1991), Endometrium (Geisert *et al.* 1991) und Amnionflüssigkeit (Drop *et al.* 1984a; Drop *et al.* 1984b)). Der größte Teil des IGF1 wird von IGFBP1 gebunden, welches zusammen mit der zugehörigen säurelabilen Untereinheit (ALS) einen ternären Proteinkomplex bildet. Durch die bindenproteinvermittelte Stabilisierung des IGF1 erhöht sich seine Halbwertszeit auf 10-16 Stunden. Um den Anteil der lebervermittelten IGF1-Synthese zu verdeutlichen, konnte mittels einer leberspezifischen Stilllegung des IGF1-Gens in Mäusen eine Reduktion des IGF1-Spiegels um 75% erzielt werden (Yakar *et al.* 1999). Wenn zusätzlich auch noch das am Stabilisierungskomplex beteiligte ALS ausgeschaltet wurde, waren nur noch 5% der ursprünglichen IGF1-Menge detektierbar (Yakar *et al.* 2002). Die Relevanz und Bedeutung der beiden Wachstumsfaktoren IGF1 und IGF2 konnte an Hand der *knock-out* Mutanten der beiden Gene gezeigt werden. Die IGF1-null-Mutante weist einen wesentlich stärkeren Phänotyp als die IGF2-null-Mutante auf. Die Deletion des IGF1-Gens führt zu einer starken Entwicklungsstörung, welche zu einer 95%igen perinatalen Mortalität führt. Die überlebenden Tiere sind in ihrem Wachstum stark verzögert und infertil. IGF2-null-Mutanten kommen mit einem 60%igen geringeren Geburtsgewicht zur Welt, sind aber in der Lage, das Entwicklungsdefizit postnatal aufzuholen (Baker *et al.* 1993; Liu *et al.* 1993; Powell-Braxton *et al.* 1993a; Powell-Braxton *et al.* 1993b). Der Vergleich dieser beiden Null-Mutanten deutet auf eine unterschiedliche physiologische Bedeutung während der pränatalen Entwicklung hin und zeigt, dass das Vorhandensein von IGF2 kein essenzieller Faktor für die pränatale Entwicklung ist. Die übergeordnete Instanz, welche die IGF-Synthese steuert, ist das Somatotropin (*Growth Hormon (GH)*). Dieses ist ein Peptidhormon, welches von den α -Zellen des Hypophysenvorderlappens gebildet und sekretiert wird. Die Synthese des IGF1 in der Leber ist direkt abhängig vom Vorhandensein dieses Hormons (Schwander *et al.* 1983). So ist die IGF1-Synthese in Diabetes mellitus Typ 2-Patienten zum Beispiel um 55% reduziert, was mit dem direkten Abfall im GH-Level zu erklären ist (Colao *et al.* 2008; Shishko *et al.* 1994).

2.3.4. Die intrazelluläre Signaltransduktion des IGF-Systems im Embryo

Im Zentrum der Insulin- und IGF-vermittelten Signalantwort stehen zwei Signalmoleküle, die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) und die Mitogen-Aktivierende-Protein-Kinase (MAPK). Nach der Rezeptoraktivierung kommt es zur Phosphorylierung von PI3K oder MAPK, was in einer Aktivierung der beiden Signalwege resultiert. Als Folge des Insulin/IGF-Stimulus konnte eine Aktivierung von c-fos sowohl im Embryoblasten als auch im Trophoblasten beobachtet werden, was so nur in Kaninchenblastozyste, bei denen der Embryoblast und Trophoblast gut zu trennen sind, möglich ist (Navarrete Santos *et al.* 2008; Navarrete Santos *et al.* 2004b). In beiden Blastozystenkompartimenten führt die Aktivierung der MAPK durch Insulin, IGF1 und IGF2 zur c-fos Induktion. C-fos ist ein Transkriptionsfaktor und wirkt proliferationssteigernd. Nach Insulinstimulation steigt die Expression des antiapoptotischen Faktors bcl(x)-L an (Ramin *et al.* 2010), was mit einer Reduktion der Apoptoserate korreliert (Herrler *et al.* 1998). Die Apoptose ist dabei auch in Embryonen ein normaler Vorgang, bei dem abnormale Zellen eliminiert werden und Morphogenese möglich wird. Ein maternaler Diabetes mellitus ist aber von einer Zunahme an apoptotischen Prozessen im Embryo gekennzeichnet, die über das Normalmaß hinausgehen (Moley *et al.* 1998b; Ramin *et al.* 2010). In humanen und Rinderembryonen konnte ebenfalls die positive Wirkung von IGF1 auf die Proliferation gezeigt werden (Lighten *et al.* 1998; Velazquez *et al.* 2012). Supraphysiologische IGF1-Konzentrationen hingegen sind mit einer verminderten Blastozystenqualität im Rind verbunden (Velazquez *et al.* 2011).

Die Mesoderminduktion ist von Insulin abhängig. Nachdem bekannt war, dass Wnt3a in der Lage ist, *Brachyury* zu induzieren (Arnold *et al.* 2000), konnte hier erstmals ein Zusammenhang zwischen Insulin und einer gesteigerten Expression des Transkriptionsfaktors *Brachyury* und seinem Regulator Wnt3a aufgezeigt werden (Thieme *et al.* 2012a).

Die Wirkung von Insulin auf die PI3K ist ebenfalls zelllinienspezifisch und in Embryoblast und Trophoblast unterschiedlich. Dabei wird im Trophoblasten hauptsächlich der Glukosemetabolismus reguliert. Es kommt zur Induktion der Hexokinase (Glykolyse) und einer Herabregulation der PEPCK (Glukoneogenese). Hierdurch wird gewährleistet, dass die vom Trophoblasten aufgenommene Glukose metabolisiert werden kann bzw., dass der Trophoblast in der Lage ist, in Glukosemangelzuständen diese selbst zu generieren. Auf Grund dieser Regulationsmechanismen kann der Embryo auf seine ihn umgebende Stoffwechselsituation reagieren. Ihm dient dabei unter anderem Insulin, was die Glukoseaufnahme fördert und die Expression der Hexokinase, einem der Schlüsselenzyme der Glykolyse, steigert, als Sensor. In Embryonen aus diabetischen Tieren konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von Insulin zu einer gesteigerten PEPCK-Expression und damit zu einer Steigerung der Glukoneogeneseleistung führt (Ramin *et al.* 2010). Damit verfügt der

Präimplantationsembryo über die gleichen regulatorischen Mechanismen, wie sie in differenzierten Geweben wie der Leber des ausgewachsenen Organismus vorhanden sind. Der genaue Regulationsmechanismus, welcher zur veränderten Expression der PEPCK führt, ist noch nicht molekular aufgeklärt. Höchstwahrscheinlich sind die Transkriptionsfaktoren C/ERB β und FoxO1 gute Kandidaten, da sie als direkte Regulatoren der PEPCK beschrieben sind (Croniger *et al.* 1997; Puigserver *et al.* 2003) und ebenfalls selbst durch Glukose gesteuert werden können (Housley *et al.* 2008; Kuo *et al.* 2008).

Embryonen aus diabetischen Tieren weisen gegenüber denen aus stoffwechselgesunden Tieren eine verminderte Insulin- und IGF1-Rezeptor-Expression auf (Ramin *et al.* 2010). Dies lässt den Schluss zu, dass die Rezeptivität von Embryonen aus diabetischen Tieren für Insulin, IGF1 und IGF2 stark eingeschränkt sein muss. Lokal wird die Synthese der IGFs durch das GH gewebespezifisch gesteuert, da die IGFs im Gegensatz zu Insulin von vielen verschiedenen Zelltypen gebildet werden können (Schwander *et al.* 1983). Dies zeigt sich in der lokalen Anpassung der von IGF1 und IGF2 im Endometrium und im Embryo selbst, wo sie unter diabetischen Bedingungen in ihrer Expression erhöht sind (Thieme *et al.* 2012b). Kultiviert man 6 Tage alte Kaninchenembryonen mit Insulin oder IGF1, so zeigen sie sowohl nach 1 h wie auch nach 12 h eine verminderte Expression des IR und IGF1R und deren Liganden IGF1 und IGF2. Sowohl der IR als auch der IGF1R und deren Liganden IGF1 und IGF2 unterliegen einem direkten Rückkopplungsmechanismus, der sowohl *in vivo* als auch *in vitro* insulin- und IGF1-abhängig ist.

3. Ausblick – Langzeitfolgen einer embryonalen und fetalen Fehlversorgung

Seit den ersten Beobachtungen von Professor David Barker, der eine Verbindung zwischen geringem Geburtsgewicht und einem erhöhten Risiko, im Erwachsenenalter an Herz-Kreislaufkrankungen zu leiden, fand, wird diesem Bereich der Forschung zunehmend Beachtung geschenkt.

Aufbauend auf den Arbeiten von David Barker hat sich die so genannte Barker-Hypothese entwickelt, die zunehmend und zutreffend als „*Developmental Origin of Health and Disease - DOHaD*“ bezeichnet wird (Gluckman *et al.* 2008). Hierbei steht der Zusammenhang zwischen intrauteriner Prägung und Erkrankungen im Erwachsenenalter im Vordergrund. Ziel ist es, die Veränderungen in den Zellen und die beteiligten Mechanismen aufzudecken, die mit den Spätfolgen im Zusammenhang stehen. Von zentralem Interesse sind dabei epigenetische Veränderungen, die zu einer veränderten Genaktivität führen können. Dabei kommt es zu Modifikationen der DNA, die die Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Solch eine Modifikation ist die Methylierung eines Cytosins, wenn diesem ein Guanosin folgt (CpG). Die Methylierung wird von spezifischen Enzymen, den DNA-Methyltransferasen (DNMT1, 3a und 3b), durchgeführt. Bereits im frühen Embryo sind diese Enzyme exprimiert (Maus (Jahner *et al.* 1982; Okano *et al.* 1999), Mensch (Xie *et al.* 1999), Kaninchen (Thieme *et al.* eigene Befunde)). Die Präimplantationsphase ist eine sehr vulnerable Zeit, um ein pathologisches Methylierungsmuster zu determinieren, da in den meisten Säugerspezies während dieser Zeit die De-Methylierung des elterlichen Genoms stattfindet (Okano *et al.* 1999). Bei der anschließenden Re-Methylierung kann es dann durch äußere Umwelteinflüsse zu einem falsch angelegten Muster kommen, welches auf die Tochterzellen weiter gegeben wird. Eine Methylierung mehrerer CpGs führt zu einer erschwerten Zugänglichkeit der DNA, da sich der Grad der Verpackung der DNA erhöht und somit das Ablesen von Genen unterdrückt wird. Meist sind CpG-Inseln in Bereichen von Promotoren lokalisiert, um dort regulatorisch aktiv zu werden und die Expression von Genen mitzusteuern. Die Methylierung der CpG-Inseln bewirkt posttranslationelle Veränderungen an den Histonen durch Acetylierungen, Methylierungen, Ubiquitylierungen und Phosphorylierungen. Das Muster dieser Modifikationen bestimmt, wie kompakt bzw. wie zugänglich die DNA für Transkriptionsprozesse ist.

Die in dieser Arbeit gezeigten und veröffentlichten Ergebnisse passen in das heutige Bild des durch vorgeburtlich verursachte Fehlprogrammierungen erhöhten Risikos für Zivilisationskrankheiten, wie Diabetes mellitus Typ 2 und Herz-Kreislaufkrankungen, im Erwachsenenalter. Das Beispiel des diabetischen Kaninchenmodells, bei dem diabetesinduzierte Veränderungen im Metabolismus und im Reifegrad des Embryos schon sehr zeitig in der Entwicklung aufgezeigt werden können, legt nahe, dass die Präimplantationsentwicklung ein sehr vulnerables Zeitfenster für die Ausprägung von epigenetischen Fehlprogrammierungen ist. Zusammenfassend zeigen Embryonen aus diabetischen

Müttern eine verminderte Aktivierung der Insulin-IGF-Achse, die in einer verminderten Aktivierung der MAPK mündet. Als deutlich sichtbares Merkmal der diabetesinduzierten Veränderung lassen sich eine vermehrte Anzahl an apoptotischen Zellen im Embryoblasten und eine verzögerte Reife der Blastozyste beobachten. Die folgenden Beispiele sollen exemplarisch zeigen, dass unphysiologische Stoffwechsellagen während der Entwicklung mit weitreichenden Konsequenzen für das gesamte fortlaufende Leben einhergehen können. Solche Veränderungen durch entgleiste Stoffwechsellagen der Mutter werden oft durch Modifizierungen an DNA und Histonen mitbestimmt (Jiménez-Chillarón *et al.* 2012). Am Beispiel der Differenzierung und Entstehung der pankreatischen beta-Zelle konnte molekular aufgeklärt werden, dass der mütterliche Ernährungszustand eng mit dessen epigenetischer Konstitution assoziiert ist (Ozanne *et al.* 2011). Tiere, welche pränatal einer Niedrigproteindiät ausgesetzt waren, zeigten eine verminderte Expression antioxidativer Enzyme in der pankreatischen beta-Zelle. Es ist bekannt, dass die pankreatische beta-Zelle *per se* eine schlechte Ausstattung an dieser Enzymklasse besitzt (Jorns *et al.* 1997). Die vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in Tieren, deren Mütter eine Niedrigproteindiät erhalten haben, führt zu einer Erhöhung des oxidativen Stresses. Des Weiteren konnte eine direkte epigenetische Veränderung der transkriptionellen Aktivität von Hnf4a detektiert werden, die unter der Niedrigproteindiät der Mutter zu einem verminderten Ablesens von Hnf4a führt. Dabei ist das Muster der Histone am Hnf4a-Promoter dahingehend verändert, dass dieser blockiert ist und die DNA nicht mehr abgelesen werden kann. Ein Verlust von Hnf4a ist direkt mit der Entstehung eines Diabetes mellitus verbunden (Sandovici *et al.* 2011).

Weiterhin konnte ein Zusammenhang zwischen einer maternalen Niedrigproteindiät, dem daraus resultierenden verringerten Geburtsgewicht und einer Erhöhung des Blutdrucks im Erwachsenenalter bei Mäusen gezeigt werden (Watkins *et al.* 2011; Watkins *et al.* 2008).

Neben den langfristigen Folgen einer mütterlichen Fehlversorgung *in utero* gibt es auch direkte Konsequenzen für das Kind. So hat eine Überversorgung mit Glukose ein starkes Wachstum des Feten zur Folge. Ist das Neugeborene für seinen Entwicklungszeitraum zu groß, spricht man von „*large for gestational age - LGA*“. Dem gegenüber steht die chronische Unterversorgung des Fetus, die sich im Zustand des „*small for gestational age - SGA*“ manifestiert. Eine ernährungsbedingte Unterversorgung tritt hauptsächlich in Regionen auf, in denen die Versorgung mit Lebensmitteln limitiert ist (meist Entwicklungs- und Schwellenländer). Neben einer akuten nährstoffbedingten Unterversorgung können auch eine Plazentainsuffizienz und organische Erkrankungen der Mutter dazu führen, dass ein Kind sich nicht seinem Entwicklungsstand entsprechend entwickelt (intrauteriner Wachstumsverzögerung - *IUGR*).

Nimmt man diese und andere Ergebnisse der aktuellen Forschung zusammen, ergibt sich ein mehr und mehr komplettes Bild der Prägung während der Pränatalentwicklung. Zukünftig soll und muss die

Erforschung der Beeinflussung der embryonalen, fetalen und frühkindlichen Entwicklung weiter vorangetrieben werden. Sie muss das Ziel haben, Erkenntnisse zur Vermeidung schädlicher Expositionen während der Schwangerschaft zu identifizieren und zu charakterisieren sowie Präventions-, Aufklärungs- und Behandlungsmaßnahmen zu entwickeln. Auch muss den paternalen Ursachen der epigenetischen Prägung Beachtung beigemessen werden. Wie aktuelle Ergebnisse aus der Gruppe von Professor Julie Owens in Ratten gezeigt haben, verändert sich der Metabolismus der weiblichen Nachkommen, wenn der Vater eine chronische fettreiche Ernährung erhalten hatte (Ng *et al.* 2010).

4. Ergebnisse

Die Entwicklung, Etablierung und Validierung gravider diabetischer Kaninchen war eine wesentliche Voraussetzung und ein Bestandteil der dieser Arbeit zu Grunde liegenden Originalpublikationen. Ein solches Modell war bis dato für das Kaninchen mit seinen reproduktionsbiologischen Spezifika und Vorteilen in der Literatur nicht beschrieben. Daher wird die Entwicklung, Etablierung und Validierung dieses Modells im nächsten Abschnitt ausführlich erläutert und beschrieben.

4.1. Die Induktion und Etablierung eines experimentellen Diabetes mellitus Typ 1 im Kaninchen

In geschlechtsreifen weiblichen Kaninchen wurde mit Hilfe der Chemikalie Alloxan (2,4,5,6-Tetraoxypyrimidin) experimentell ein insulinabhängiger Diabetes mellitus induziert. Diese Form des Diabetes ist mit der eines Diabetes mellitus Typ 1 vergleichbar. Die Induktion des Diabetes beruht auf der selektiven toxischen Wirkung des Alloxans auf die insulinproduzierenden beta-Zellen des Pankreas (Gorus *et al.* 1982; Lenzen *et al.* 1991). Die Erzeugung des diabetischen Zustandes in den Tieren verläuft dabei in 4 Phasen. In der ersten Phase, etwa 2 – 6 Stunden nach der Injektion des Alloxans, kommt es zu einem Anstieg des Blutglukosespiegels. Dies geschieht als Folge des Sekretionsstopps von Insulin aus den pankreatischen beta-Zellen. Phase 2 ist durch einen Abfall des Blutglukosespiegels gekennzeichnet, der auf der Ausschüttung des gesamten intrazellulären granularen Insulins beruht. Die beta-Zellen des Pankreas werden nekrotisch. In der 3. Phase steigt die Blutglukosekonzentration durch den Verbrauch des freigesetzten Insulins wieder an und die Tiere entwickeln eine Hyperglykämie. Die 4. Phase, in der das Plateau der Hyperglykämie erreicht wird, ist dann zusätzlich durch eine Hypoinsulinämie gekennzeichnet. Die insulinproduzierenden Zellen des Pankreas sind zu diesem Zeitpunkt abgestorben und es kommt zu keiner nennenswerten Insulinausschüttung mehr.

Die Wirkung des Alloxans beruht auf mehreren toxikologischen Eigenschaften. Seine Sensitivität wird durch die Aufnahme durch den Glukosetransporter 2 bedingt, der außer in den insulinproduzierenden Zellen des Pankreas auch in der Niere und im Dünndarmepithel exprimiert wird. Nach der Aufnahme des Alloxans in die beta-Zelle kommt es dort zur Akkumulation und im ersten Schritt zur Inhibierung der Glukokinase (Hexokinase IV), dem zentralen Glukosesensor. Im weiteren Verlauf kommt es zur Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies (Munday 1988; Winterbourn *et al.* 1989), worin der eigentliche Pathogenitätsmechanismus des Alloxans liegt. Die pankreatische beta-Zelle ist nur unzureichend in der Lage, Sauerstoffradikale abzubauen. Dadurch wird die Zelle so weitgehend geschädigt, dass dies zum nekrotischen Zelltod führt (Jorns *et al.* 1997). Im weiteren Verlauf wurden die Tiere durch die Gabe geringer körporgewichtsabhängiger Insulinmengen auf

einen stabilen Blutglukosspiegel von ca. 20 mM eingestellt (Abb. 3). Die Gabe von Insulin war nötig, da die Tiere anderenfalls in einen ketoazidotischen Zustand verfallen und sterben würden. Die Etablierung und Einstellung des experimentellen Diabetes und die Verpaarung der diabetischen Kaninchen wurde im Manuskript Ramin und Thieme *et al.* 2010 zusammengefasst und publiziert.

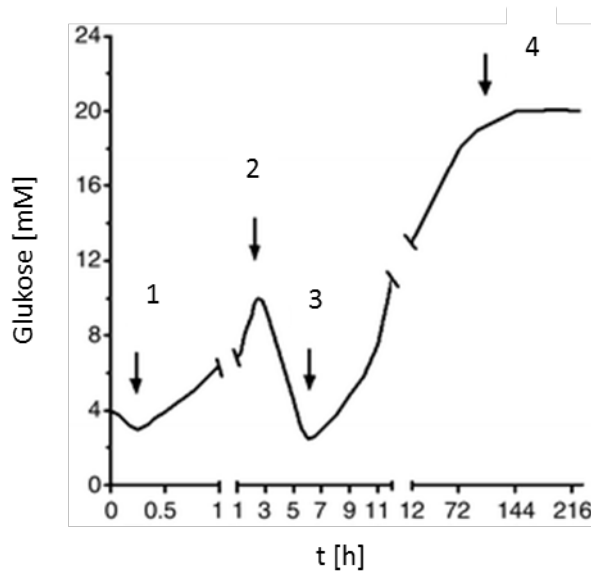


Abb. 3: Zeitlicher Verlauf der Blutglukosekonzentration nach Alloxangabe in Kaninchen

Die Chemikalie Alloxan wird benutzt, um bei Versuchstieren einen experimentellen Diabetes mellitus zu erzeugen. Die Wirkung von Alloxan verläuft in vier Phasen (1-4, siehe Text) und resultiert ca. 36-48h nach Injektion in einer stabilen Hyperglykämie mit Blutglukosekonzentrationen von 16-22 mM. (nach Lenzen 2008)

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

4.2. Publikation 1: Ramin und Thieme *et al.* 2010 *Endocrinology*, 151(9):4158-4167

Maternal Diabetes Impairs Gastrulation and Insulin and IGF-I Receptor Expression in Rabbit Blastocysts

Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss eines experimentell induzierten insulinpflichtigen maternalen Diabetes mellitus auf die Reproduktion des Kaninchens und frühe Embryonalentwicklung untersucht. Mit molekularbiologischen Methoden wurden Embryogenese, Expression zentraler metabolischer Enzyme und das IGF-Rezeptor-System in 6 Tage alten Blastozysten untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Fertilitätsrate (16,0 Corpora lutea in diabetischen vs. 27,5 in Kontrolltieren) als auch die Anzahl der Blastozysten (13,3 Blastozysten in diabetischen vs. 21,9 in Kontrolltieren) pro Tier deutlich herabgesetzt war. Der Blutglukosespiegel war um das 3,5fache auf ca. 20 mM angestiegen. Im Uterussekret stieg die Glukosekonzentration ebenfalls von 0,5 mM um das 3,5fache auf 1,75 mM an. Die Insulinkonzentration konnte mittels ELISA in den Seren diabetischer Tiere bestimmt werden und lag bei 15 pM, die von stoffwechselgesunden Tieren bei 90 pM. An der Oberfläche von Embryonen aus diabetischen Tieren konnte durch immunohistochemische Detektionsverfahren kein Insulin detektiert werden. In den Kontrolltieren war die Detektion für Insulin stark positiv. Der Präimplantationsembryo ist am Tag 6 der Entwicklung nicht in der Lage, selbst Insulin zu synthetisieren. Dies konnte mittels spezifischer RT-PCR an 6 Tage alten Blastozysten gezeigt werden.

Die mikroskopischen Begutachtung der Blastozyste und deren morphologische Einteilung in Gastrulationsstadien an Hand ihres Entwicklungsstandes am Tag 6,0 ergab einen verzögerten Reifungszustand mit einem verspäteten Einsetzen der Gastrulation in diabetischen Tieren. In Blastozysten aus diabetischen Tieren war die Expression des Insulin- und des IGF1-Rezeptors sowie die ihrer metabolischen Zielgene, Hexokinase (HK) und Phosphoenolpyruvatkarboxygenase (PEPCK), herabgesetzt. Der Zusammenhang zwischen der Expressionsminderung bestimmter metabolischer Markergene und der Glukosekonzentration konnte *in vitro* nachgestellt und nachgewiesen werden.

Die Anzahl an apoptotischen Zellen im Embryoblasten war deutlich erhöht, wohingegen die Gesamtzellzahl pro Embryoblast gleich war. Die erhöhte Apoptoserate korrelierte eng mit der reduzierten mRNA-Expression des antiapoptotischen Gens bcl-x(L).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Metabolismus des Embryos schon früh in der Ontogenese durch einen maternalen Diabetes mellitus Typ 1 gestört ist, was sich in einer beeinträchtigten Entwicklungskompetenz widerspiegelt. Dies legt nahe, dass sich diabetesinduzierte

Embryo- und Fetopathien schon früh in der Embryogenese manifestieren und die ersten Differenzierungsschritte während der Präimplantationsentwicklung einen weitreichenden Einfluss auf pathologische Veränderungen wie Herzfehlbildungen und Plazentainsuffizienzen, wie sie bei Diabetikerinnen beschrieben sind, haben können.

Maternal Diabetes Impairs Gastrulation and Insulin and IGF-I Receptor Expression in Rabbit Blastocysts

Nicole Ramin*, René Thieme*, Sünje Fischer, Maria Schindler, Thomas Schmidt, Bernd Fischer, Anne Navarrete Santos (2010) *Endocrinology* 151(9):4158-4167

* - beide Autoren sind gleichberechtigte Erstautoren

DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/en.2010-0187>

Online-Version via: <http://press.endocrine.org/journal/endo>

Abstract

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

4.3. Publikation 2: Thieme et al. 2012 *Molecular and Cellular Endocrinology*, 348(1):112-119

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

Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Mesodermbildung unter dem Einfluss eines maternalen Diabetes mellitus Typ 1 untersucht. Dazu wurden Blastozysten diabetischer Mütter mit solchen verglichen, die *in vitro* mit Insulin oder IGF1 kultiviert worden waren. Die Morphologie des Embryoblasten wurde unter dem Stereomikroskop charakterisiert und die Expression der Entwicklungsmarker *Brachyury*, *Wnt3a* und *Wnt4* wurden mittels qRT-PCR bestimmt. So konnte die zeitliche Abfolge der *Brachyury*-Expression und seiner Signalgeber *Wnt3a* und *Wnt4* während der Induktion des Mesoderms molekular charakterisiert werden.

Mit Insulin oder IGF1 kultivierte Prägastrulationsblastozysten im Stadium 0/1 zeigten eine gesteigerte Entwicklungsrate in das Stadium 2 oder 3 im Vergleich mit Blastozysten, die ohne Wachstumsfaktoren kultiviert worden waren. Für den mesodermspezifischen Transkriptionsfaktor *Brachyury* und die Wnt-Signalmoleküle *Wnt3a* und *Wnt4* konnte eine stadienspezifische Expression gezeigt werden. Die Expression von *Brachyury* steigt mit fortlaufender Gastrulation vom Stadium 0/1 zum Stadium 3 an. Das *Wnt4*-Protein konnte mittels Immunhistochemie sowohl im Embryoblasten als auch im Trophoblasten detektiert werden. Lediglich Blastozysten, welche mit Insulin kultiviert wurden, erreichten das *Brachyury*-, *Wnt3a*- und *Wnt4*-mRNA-Expressionsniveau von Stadium-2-*in-vivo*-Blastozysten, was den Schluss nahe legt, dass Insulin die mRNA-Expression dieser Gene während der Gastrulation steigert. Die insulinvermittelte Induktion von *Wnt3a* konnte mittels des MEK1-spezifischen Inhibitors PD98059 unterdrückt werden. Die *Wnt3a*-mRNA-Expression in Stadium 2-Blastozysten aus diabetischen Tieren war dann zum Zeitpunkt der Induktion des Mesoderms deutlich reduziert.

Blastozysten aus diabetischen Tieren zeigen eine verzögerte Entwicklung. Die hier dargestellten Daten untermauern die Hypothese, dass die frühe Induktion des Mesoderms insulinabhängig ist. Diese Insulinabhängigkeit beweist eine direkte Einflussnahme eines mütterlichen Hormons auf die embryonale Differenzierung und erklärt, warum ein diabetesverursachter Insulinmangel die frühe Embryogenese stört.

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

René Thieme, Nicole Ramin, Sünje Fischer, Bernd Püschel, Bernd Fischer, Anna Navarrete Santos (2012) *Molecular and Cellular Endocrinology* 348(1):112-119

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

Online-Version via: <http://www.journals.elsevier.com/molecular-and-cellular-endocrinology>

Abstract

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

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

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

4.4. Publikation 3: Thieme et al. 2012b Molecular and Cellular Endocrinology, 358(1):96-103

Insulin growth factor adjustment in preimplantation rabbit blastocysts and uterine tissues in response to maternal type 1 diabetes

Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Adaptation des Insulin-IGF-Rezeptor-Systems bei 6 Tage alten Präimplantationsembryonen des Kaninchens an einen insulinpflichtigen maternalen Diabetes mellitus Typ 1 untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass in diabetischen Tieren nicht nur eine diabetesbedingte Depletion des Insulins auftritt, sondern zusätzlich die hepatische (systemische) IGF1-Synthese herabgesetzt ist. Im Gegenzug ist die Expression von IGF1 und IGF2 im Endometrium diabetischer Kaninchen um das 7,5 bzw. 2fache und in Embryonen diabetischer Tiere um das 7,5 bzw. 5fache gesteigert. Die Exposition mit Insulin oder IGF1 *in vitro* führt zu einer Verringerung der Expression des Insulin- und IGF1-Rezeptors und ihrer Liganden IGF1 und IGF2. Blastozysten aus diabetischen Tieren wiesen eine deutlich geringere absolute Proteinmenge an den intrazellulären Signalmolekülen Akt und Erk1/2 auf. Der relative Aktivierungsgrad unterschied sich aber nicht von dem der Kontrollblastozysten. Wenn Blastozysten aus diabetischen Tieren *in vitro* für 10 Minuten mit Insulin oder IGF1 stimuliert wurden, zeigten sie eine deutlich geringere Sensitivität für IGF1, was sich in einer verminderten Aktivierung (Phosphorylierung) von Erk2 widerspiegelte.

Bei einem maternalen Diabetes mellitus Typ 1 stellt sich das Insulin-IGF-Rezeptor-System bereits in der Frühschwangerschaft auf den Insulinmangel ein und beeinträchtigt dadurch die embryo-maternale Kommunikation. Das Endometrium und die Blastozyste selbst produzieren in diabetischen Tieren mehr IGF1 und IGF2, was aber nicht ausreicht, um den Verlust des systemischen Insulins und des IGF1 zu kompensieren. Blastozysten aus diabetischen Tieren sind trotz des Anstiegs der lokalen IGF-Synthese entwicklungsverzögert.

Insulin growth factor adjustment in preimplantation rabbit blastocysts and uterine tissues in response to maternal type 1 diabetes

René Thieme*, Maria Schindler*, Nicole Ramin, Sünje Fischer, Britta Mühleck, Bernd Fischer, Anne Navarrete Santos (2012) *Molecular and Cellular Endocrinology* 358(1):96-103

* - beide Autoren sind gleichberechtigte Erstautoren

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2012.03.007>

Online-Version via: <http://www.journals.elsevier.com/molecular-and-cellular-endocrinology>

Abstract

Insulin-like growth factors (IGFs) are well-known regulators of embryonic growth and differentiation. IGF function is closely related to insulin action. IGFs are available to the preimplantation embryo through maternal blood (endocrine action), uterine secretions (paracrine action) and by the embryo itself (autocrine action). In rabbit blastocysts, embryonic IGF1 and IGF2 are specifically strong in the embryoblast (ICM). Signalling of IGFs and insulin in blastocysts follows the classical pathway with Erk1/2 and Akt kinase activation.

The aim of this study was to analyse signalling of IGFs in experimental insulin dependent diabetes (exp IDD) in pregnancy, employing a diabetic rabbit model with uterine hypoinsulinemia and hyperglycaemia. Exp IDD was induced in female rabbits by alloxan treatment prior to mating. At 6 days p.c., the maternal and embryonic IGFs were quantified by RT-PCR and ELISA.

In pregnant females, hepatic IGF1 expression and IGF1 serum levels were decreased while IGF1 and IGF2 were increased in endometrium. In blastocysts, IGF1 RNA and protein was approx. 7.5-fold and 2-fold higher, respectively, than in controls from normoglycemic females. In cultured control blastocysts supplemented with IGF1 or insulin in vitro for 1 or 12 h, IGF1 and insulin receptors as well as IGF1 and IGF2 were downregulated. In cultured T1D blastocysts activation of Akt and Erk1/2 was impaired with lower amounts of total Akt and Erk1/2 protein and a reduced phosphorylation capacity after IGF1 supplementation.

Our data show that the IGF axis is severely altered in embryo-maternal interactions in exp IDD pregnancy. Both, the endometrium and the blastocyst produce more IGF1 and IGF2. The increased endogenous IGF1 and IGF2 expression by the blastocyst compensates for the loss of systemic insulin and IGF. However, this counterbalance does not fill the gap of the reduced insulin/IGF sensitivity, leading to a developmental delay of blastocysts in exp IDD pregnancy.

4.5. Publikation 4: Fischer *et al.* 2010 *Biology of Reproduction*, 83:359-365

Adiponectin Stimulates Glucose Uptake in Rabbit Blastocysts

Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Publikation konnte gezeigt werden, dass Adiponektin nicht nur ein reines Fettgewebshormon ist, sondern auch eine reproduktionsbiologische Bedeutung und Funktion in der Embryonalentwicklung hat. Bekannt war, dass Adiponektin eine regulatorische Funktion in der Stoffwechselsteuerung und in der Energiehomeostase besitzt. Es wirkt über seine Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 und aktiviert das Adenosin-Monophosphat-Aktivierungs-Enzym (AMPK).

Wir konnten zeigen, dass beide Rezeptorisoformen (AdipoR1 und AdipoR2) im 6 Tage alten Präimplantationsembryo des Kaninchens exprimiert werden. Folglich reagieren Kaninchenblastozysten auf eine Adiponektinstimulation *in vitro*. Hierzu wurden sie mit 1 µg/mL Adiponektin stimuliert. Mittels Western Blot Analyse konnte eine gesteigerte Phosphorylierung der AMPK festgestellt werden. Weiterhin führte die Stimulation zu einer Inhibierung der Expression der PEPCK. Dies zeigt, dass Adiponektin bereits im Präimplantationsembryo in der Lage ist, den Glukosestoffwechsel und die Energiehomöostase aufrecht zu erhalten. Nach Inhibierung der AMPK mittels des spezifischen Inhibitors *Compound C* (10 µM) konnte wieder eine gesteigerte PEPCK mRNA-Menge detektiert werden. Adiponektin war weiterhin in der Lage, die Glukoseaufnahme zu steigern und vermittelte die Translokation des Glukosetransporters 4 in die Zellmembran. Die Aufnahme von Glukose wurde mittels tritiummarkierter 3-O-Methyl-Glukose bestimmt.

Die Untersuchungen belegen, dass neben Insulin auch Adiponektin ein Regulator des embryonalen Stoffwechsels ist. Die Signalvermittlung von Adiponektin in Embryonen ist AMPK-vermittelt. Adiponektin wirkt synergistisch mit Insulin und ist in der Lage, die Glykolyse zu forcieren und die Glukoneogenese einzuschränken.

Adiponectin Stimulates Glucose Uptake in Rabbit Blastocysts

Sünje Fischer, Anne Navarrete Santos, René Thieme, Nicole Ramin, Bernd Fischer (2010) *Biology of Reproduction* 83(5):859-865

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

Online-Version via: <http://www.biolreprod.org/>

Abstarct

Since the discovery of adipokines, the adipose tissue is no longer considered to be an inactive fat storage. It secretes a variety of bioactive molecules, which regulate body metabolism and energy homeostasis. One of these molecules is the adipokine adiponectin. In different tissues, adiponectin

triggers metabolic effects through the adenosine monophosphate-activated protein kinase (PRKA), which is a master regulator in glucose and lipid metabolism. Recent studies point to a role for adiponectin in reproduction. Adiponectin and its receptors are present in female reproductive tract during pregnancy, and the preimplantation embryo is fully equipped with adiponectin. Here, we show that both receptor isoforms, ADIPOR1 and ADIPOR2, are expressed in 6-day-old rabbit blastocysts. To investigate the signaling pathway of adiponectin in preimplantation embryos, rabbit blastocysts were cultured in vitro and stimulated with adiponectin. Supplementation of adiponectin (1 µg/ml) enhanced PRKA alpha 1/2 (PRKAA1/2) phosphorylation and decreased expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (*PCK2*), a key regulator of gluconeogenesis. Inhibition of PRKAA1/2 by Compound C (10 µM) restored *PCK2* transcription. Adiponectin enhanced embryonic glucose uptake and led to a translocation of solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4 (SLC2A4), previously known as GLUT4. We conclude that adiponectin influences the glucose metabolism of rabbit blastocysts via the phosphorylation of PRKAA1/2, which in turn results in a decrease of gluconeogenesis and an increase in glycolysis. The regulatory influence of adiponectin on glucose metabolism of blastocysts may be of specific interest in pathophysiological situations, such as obesity during pregnancy.

4.6. Publikation 5: Llobat et al. 2012 Reprod Dom Anim, 47(2):281-287

mRNA Expression in Rabbit Blastocyst and Endometrial Tissue of Candidate Gene Involved in Gestational Losses

Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche kommerzielle Kaninchenlinien miteinander verglichen. Sie unterscheiden sich auf Grund ihrer Größe und Reproduktion. Bei *New Zealand White Hybriden* waren zwei Linien gezüchtet worden (Linie A und B), wobei letztere auf Grundlage ihrer hohen Gewichtszunahme bis zur Schlachtreife selektiert wurde. Linie B hat eine wesentlich geringere Anzahl an Nachkommen. Die embryo-maternale Kommunikation während der Präimplantationsphase wurde untersucht. Ziel war es, mögliche Störfaktoren während der Embryonalentwicklung zu finden. Es zeigte sich, dass Linie B eine embryonale Verlustrate von 22,4% am Tag 12 der Entwicklung im Vergleich zu 9,5% bei der Linie A aufwies. Am 6. Tag *p.c.* konnte eine Reduktion der IGF2R-mRNA in Blastozysten und im Endometrium der Linie B detektiert werden. Die weiteren Mitglieder des IGF-Rezeptorsystems (IGF1, IGF2 und IGF1R) unterschieden sich weder in den untersuchten Blastozysten noch im Endometrium. In Tag 6 Blastozyste wurden weiterhin die Transkripte folgender Gene untersucht: Oct4, erbB3, TGFβ3, VEGF und INFγ. Die mRNA-Expression war in Embryonen beider Kaninchenlinien gleich.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass zwischen zwei Linien von *New Zealand White Hybriden* ein Unterschied in der Expression des IGF2R gefunden wurde, dieser aber nicht die reduzierte Blastozystenbildung in der Linie B allein erklären kann. Die Ausweitung der Transkriptomanalyse könnte ein Startpunkt sein, um neue reproduktionsrelevante Zielgene zu erkennen und zu charakterisieren.

mRNA Expression in Rabbit Blastocyst and Endometrial Tissue of Candidate Gene Involved in Gestational Losses

Lola Llobat, Francisco Marco-Jiménez, David S. Penaranda, René Thieme, Anne Navarrete Santos, José S. Vicente (2012) *Reproduction in Domestic Animals* 47(2):281-287

DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01855.x>

Online-Version via: <http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/%28ISSN%291439-0531>

Abstarct

Gestation is a complex process that involves different growth factors, cytokines and adhesion proteins related with embryo development, cellular differentiation and proliferation, embryo-endometrium interaction, angiogenesis, maternal-embryonic recognition and growth development

of placenta and embryos. In this study, we examine pre-implantational (at 6 days of gestation) and gestational (at 12 days and total from ovulation to birth) losses in two rabbit lines selected by different criteria (post-weaning daily gain and litter size) and the pattern of a set of candidate transcripts, at 6 days of gestation, related with embryo development and implantation process, such as *Oct-4*, epidermal growth factor receptor 3 (*erbB3*), Transforming Growth Factor β 2, Vascular Endothelial Growth Factor and Interferon γ and related with insulin-like growth factors signalling as insulin growth factors I and II and their receptors in rabbit blastocysts and endometrial tissue. Similar pre-implantational losses were obtained in both lines. However, the gestational losses of the line selected by post-weaning daily gain clearly mirrored an increase in losses by 50% at 12 days and at birth (22.4 vs 9.5 and 50.2 vs 25.4, respectively, between line selected by post-weaning daily gain and line selected by litter size). In blastocysts and endometrial tissue at 6 days of gestation qRT-PCR assays indicated that the mean insulin-like growth factor (*IGF-*I**R) mRNA expression was down-regulated in line selected by post-weaning daily gain. Dysregulation of the *IGF-*I**R could be potential reasons for induced gestational losses. We conclude that *IGF-*I**R gene expression in blastocyst and endometrial tissue at 6th day of gestation tends to decline in line selected by post-weaning daily gain. The functional significance related with gestational losses is uncertain.

5. Stand der Veröffentlichung und Darlegung des Eigenanteils

Publikation 1:

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):4158-4167

Eigenanteil: Etablierung und Validierung des diabetischen Kaninchenmodells sowie Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente, die den Abbildungen 1B-E, 2A, 3A-C, 4B-C, 5C-F zu Grunde liegen. Verfassen des Manuskripts und Bearbeitung während des Revisionsprozesses.

Publikation 2:

Thieme R, Ramin N, Fischer S, Püschel B, Fischer B, Navarrete Santos A. 2012. Gastrulation in rabbit blastocysts depends on insulin and insulin-like-growth-factor 1. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 348:112-119

Eigenanteil: Planung, Durchführung und Auswertung aller dieser Arbeit zu Grunde liegenden Experimente. Verfassen des Manuskripts und Bearbeitung während des Revisionsprozesses.

Publikation 3:

Thieme R, Schindler M, Ramin N, Fischer S, Mühleck B, Fischer B, Navarrete Santos A. 2012. Insulin growth factor adjustment in preimplantation rabbit blastocysts and uterine tissues in response to maternal type 1 diabetes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 358(1):96-103

Eigenanteil: Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente, die den Abbildungen 1A-B, 5A-C zugrunde liegen, Auswertung der Experimente, welche den Abbildungen 2, 3, 4 und 6 zu Grunde liegen. Verfassen des Manuskripts und Bearbeitung während des Revisionsprozesses.

Publikation 4:

Fischer S, Navarrete Santos A, Thieme R, Ramin N, Fischer B. 2010. Adiponectin Stimulates Glucose Uptake in Rabbit Blastocysts. *Biology of Reproduction*, 83:359-365

Eigenanteil: Mitarbeit an der Planung und Auswertung der diesem Manuskript zu Grunde liegenden Experimente sowie Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente, welche der Abbildung

1D-E, 3 und 4 zu Grunde liegen. Mitarbeit an der Verfassung des Manuskripts und maßgebliche Bearbeitung während des Revisionsprozesses.

Publikation 5:

Llobat L, Marco-Jiménez F, Penaranda DS, Thieme R, Navarrete Santos A, Vincente JS. 2012. mRNA Expression in Rabbit Blastocyst and Endometrial Tissue of Candidate Gene Involved in Gestational Losses. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(2):281-287

Eigenanteil: Planung, Etablierung und Auswertung der Experimente, die den Abbildungen 3 und 4 zu Grunde liegen.

6. Literaturverzeichnis

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., Kemler, R. (1997) [beta]-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* **16**(13), 3797-3804.
- Aghayan, M., Rao, L.V., Smith, R.M., Jarett, L., Charron, M.J., Thorens, B., Heyner, S. (1992) Developmental expression and cellular localization of glucose transporter molecules during mouse preimplantation development. *Development* **115**(1), 305-312.
- Allan, G., Flint, D., Patel, K. (2001) Insulin-like growth factor axis during embryonic development. *Reproduction* **122**(1), 31-39.
- Amaya, E., Stein, P., Musci, T., Kirschner, M. (1993) FGF signalling in the early specification of mesoderm in *Xenopus*. *Development* **118**(2), 477-487.
- Arnold, S.J., Stappert, J., Bauer, A., Kispert, A., Herrmann, B.G., Kemler, R. (2000) Brachyury is a target gene of the Wnt/[beta]-catenin signaling pathway. *Mechanisms of Development* **91**(1-2), 249-258.
- Augustin, R., Pocar, P., Navarrete Santos, A., Wrenzycki, C., Gandolfi, F., Niemann, H., Fischer, B. (2001) Glucose transporter expression is developmentally regulated in in vitro derived bovine preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development* **60**(3), 370-376.
- Babaie, Y., Herwig, R., Greber, B., Brink, T.C., Wruck, W., Groth, D., Lehrach, H., Burdon, T., Adjaye, J. (2007) Analysis of Oct4-Dependent Transcriptional Networks Regulating Self-Renewal and Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS* **25**(2), 500-510.
- Baker, D., Liu, J., Robertson, E., Efstratiadis, A. (1993) Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* **75**(1), 73-82.
- Beddington, R.S.P., Robertson, E.J. (1999) Axis Development and Early Asymmetry in Mammals. *Cell* **96**(2), 195-209.
- Bellairs, R. (1986) The primitive streak. *Anat. Embryol. (Berl)*. **174**(1), 1-14.
- Belo, J.A., Bouwmeester, T., Leyns, L., Kertesz, N., Gallo, M., Follettie, M., De Robertis, E.M. (1997) Cerberus-like is a secreted factor with neuralizing activity expressed in the anterior primitive endoderm of the mouse gastrula. *Mechanisms of Development* **68**(1-2), 45-57.
- Bhanot, P., Brink, M., Samos, C.H., Hsieh, J.-C., Wang, Y., Macke, J.P., Andrew, D., Nathans, J., Nusse, R. (1996) A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* **382**(6588), 225-230.
- Biben, C., Stanley, E., Fabri, L., Kotecha, S., Rhinn, M., Drinkwater, C., Lah, M., Wang, C.C., Nash, A., Hilton, D., Ang, S.L., Mohun, T., Harvey, R.P. (1998) Murine Cerberus Homologue mCer-1: A Candidate Anterior Patterning Molecule. *Developmental Biology* **194**(2), 135-151.
- Böving, B. (1963) Implantationmechanism. *C.C Hartmann Conference on physiological mechanism concerned with conception Pergamon Verlag Oxford London NY Paris*, 321-396.
- Brunet-Simon, A., Henrion, G., Renard, J.P., Duranthon, V. (2001) Onset of zygotic transcription and maternal transcript legacy in the rabbit embryo. *Molecular Reproduction and Development* **58**(2), 127-136.

Carayannopoulos, M.O., Chi, M.M.-Y., Cui, Y., Pingsterhaus, J.M., McKnight, R.A., Mueckler, M., Devaskar, S.U., Moley, K.H. (2000) GLUT8 is a glucose transporter responsible for insulin-stimulated glucose uptake in the blastocyst. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**(13), 7313-7318.

Casslén, B., Nilsson, B. (1984) Human uterine fluid, examined in undiluted samples for osmolarity and the concentrations of inorganic ions, albumin, glucose, and urea. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **150**(7), 877-81.

Casson, I., Clarke, C., Howard, C., McKendrick, O., Pennycook, S., Pharoah, P., Platt, M., Stanisstree, M., van Velszen, D., Walkinshaw, S. (1997) Outcomes of pregnancy in insulin dependent diabetic women: results of a five year population cohort study. *BMJ.* **315**(7103), 275-278.

Chao, W., D'Amore, P.A. (2008) IGF2: Epigenetic regulation and role in development and disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **19**(2), 111-120.

Chi, M.M.-Y., Schlein, A.L., Moley, K.H. (2000) High Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) and Insulin Concentrations Trigger Apoptosis in the Mouse Blastocyst via Down-Regulation of the IGF-1 Receptor. *Endocrinology* **141**(12), 4784-4792.

Colao, A., Di Somma, C., Cascella, T., Pivonello, R., Vitale, G., Grasso, L.F.S., Lombardi, G., Savastano, S. (2008) Relationships between serum IGF1 levels, blood pressure, and glucose tolerance: an observational, exploratory study in 404 subjects. *European Journal of Endocrinology* **159**(4), 389-397.

Corps, A.N., Brigstock, D.R., Littlewood, C.J., Brown, K.D. (1990) Receptors for epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on preimplantation trophoderm of the pig. *Development* **110**(1), 221-227.

Croniger, C., Trus, M., Lysek-Stupp, K., Cohen, H., Liu, Y., Darlington, G.J., Poli, V., Hanson, R.W., Reshef, L. (1997) Role of the Isoforms of CCAAT/Enhancer-binding Protein in the Initiation of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (GTP) Gene Transcription at Birth. *Journal of Biological Chemistry* **272**(42), 26306-26312.

Dan-Goor, M., Sasson, S., Davarashvili, A., Almagor, M. (1997) Expression of glucose transporter and glucose uptake in human oocytes and preimplantation embryos. *Human Reproduction* **12**(11), 2508-2510.

DDG (2011) 'Praxis Leitlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft.'

Denker, H. (1977) Implantation. The role of proteinases, and blockage of implantation by proteinase inhibitors. *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* **53**(3-123).

Denker, H., Gerdes, H. (1979) The dynamic structure of rabbit blastocyst coverings. I. Transformation during regular preimplantation development. *Anat. Embryol. (Berl).* **157**(1), 15-34.

DeutscheDiabetesHilfe (2013) Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes. http://www.diabetesde.org/fileadmin/users/Patientenseite/PDFs_und_TEXTE/Infomaterial/Diabetes_Gesundheitsbericht_2013.pdf.

Dobrovolskaia-Zavadskaia, N. (1927) Sur la mortification spontanée de la queue chez la souris nouveau-née et sur l'existence d'un caractère (facteur) héréditaire "non-viable". *C. R. Seance Soc. Biol.* **97**, 114– 116.

- Doherty, A.S., Temeles, G.L., Schultz, R.M. (1994) Temporal pattern of IGF-I expression during mouse preimplantation embryogenesis. *Mol. Reprod. Dev.* **37**(1), 21-26.
- Drop, S.L.S., Kortleve, D.J., Guyda, H.J. (1984a) Isolation of a Somatomedin-Binding Protein from Preterm Amniotic Fluid. Development of a Radioimmunoassay. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **59**(5), 899-907.
- Drop, S.L.S., Kortleve, D.J., Guyda, H.J., Posner, B.I. (1984b) Immunoassay of a Somatomedin-Binding Protein from Human Amniotic Fluid: Levels in Fetal, Neonatal, and Adult Sera. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **59**(5), 908-915.
- Dufresnes, E., Vanderheyden, I., Robin, D., Delcourt, J., Pampfer, S., De Hertogh, R. (1993) Glucose and pyruvate metabolism in preimplantation blastocysts from normal and diabetic rats. *Journal of Reproduction and Fertility* **98**(1), 169-177.
- Edwards, Y.H., Putt, W., Lekoape, K.M., Stott, D., Fox, M., Hopkinson, D.A., Sowden, J. (1996) The human homolog T of the mouse T(Brachyury) gene; gene structure, cDNA sequence, and assignment to chromosome 6q27. *Genome Research* **6**(3), 226-233.
- Evans, A.L., Faial, T., Gilchrist, M.J., Down, T., Vallier, L., Pedersen, R.A., Wardle, F.C., Smith, J.C. (2012) Genomic Targets of Brachyury (T) in Differentiating Mouse Embryonic Stem Cells. *PLoS ONE* **7**(3), e33346.
- Fischer, B., Bavister, B.D. (1993) Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *Journal of Reproduction and Fertility* **99**(2), 673-679.
- Fischer, B., Chavatte-Palmer, P., Viebahn, C., Navarrete Santos, A., Duranthon, V. (2012) Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction* **144**(1), 1-10.
- Fischer, B., Mootz, U., Denker, H., Lambertz, M., Beier, H. (1991) The dynamic structure of rabbit blastocyst coverings. III. Transformation of coverings under non-physiological developmental conditions. *Anat. Embryol. (Berl)*. **183**(1), 17-27.
- Fischer, S., Navarrete Santos, A., Thieme, R., Ramin, N., Fischer, B. (2010) Adiponectin Stimulates Glucose Uptake in Rabbit Blastocysts. *Biology of Reproduction* **83**(5), 859-65.
- Flood, M.R., Wiebold, J.L. (1988) Glucose metabolism by preimplantation pig embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* **84**(1), 7-12.
- Gardner, D., Lane, M., Batt, P. (1993) Uptake and metabolism of pyruvate and glucose by individual sheep preattachment embryos developed in vivo. *Mol. Reprod. Dev.* **36**(3), 313-9.
- Gardner, D.K., Lane, M., Calderon, I., Leeton, J. (1996) Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil. Steril.* **65**(2), 349-53.
- Gardner, D.K., Leese, H.J. (1988) The role of glucose and pyruvate transport in regulating nutrient utilization by preimplantation mouse embryos. *Development* **104**(3), 423-429.
- Geisert, R.D., Lee, C.Y., Simmen, F.A., Zavy, M.T., Fliss, A.E., Bazer, F.W., Simmen, R.C. (1991) Expression of messenger RNAs encoding insulin-like growth factor-I, -II, and insulin-like growth factor binding protein-2 in bovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Biology of Reproduction* **45**(6), 975-983.

- Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A.P., Blumenstock, C., Niehrs, C. (1998) Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* **391**(6665), 357-362.
- Gluckman, P.D., Hanson, M.A., Cooper, C., Thornburg, K.L. (2008) Effect of In Utero and Early-Life Conditions on Adult Health and Disease. *New England Journal of Medicine* **359**(1), 61-73.
- Gorus, F., Malaisse, W., Pipeleers, D. (1982) Selective uptake of alloxan by pancreatic B-cells. *Biochem. J.* **208**(2), 513-515.
- Gottschewski, G., Zimmermann, W. (1973) Embryonalentwicklung des Hauskaninchens, Normogenese und Teratogenese. *Hannover:M&H Sharper Verlag*.
- Groebner, A., Zakhartchenko, V., Bauersachs, S., Rubio-Aliaga, I., Daniel, H., Büttner, M., Reichenbach, H., Meyer, H., Wolf, E., Ulbrich, S. (2011a) Reduced amino acids in the bovine uterine lumen of cloned versus in vitro fertilized pregnancies prior to implantation. *Cell Reprogram.* **13**(5), 403-10.
- Groebner, A.E., Rubio-Aliaga, I., Schulke, K., Reichenbach, H.D., Daniel, H., Wolf, E., Meyer, H.H.D., Ulbrich, S.E. (2011b) Increase of essential amino acids in the bovine uterine lumen during preimplantation development. *Reproduction* **141**(5), 685-695.
- Gürke, J., Thieme, R., Schindler, M., Fischer, S., Hirche, F., Fischer, B., Navarrete Santos, A. (2012) Altered amino acid metabolism in preimplantation embryos from diabetic rabbits. *Reproduction in Domestic Animals* **47**(s2), 26.
- Hensen, V. (1876) Beobachtungen über die Befruchtung und Entwicklung des Kaninchens und des Meerschweinchens. *Z. Anat. Entwickl. Gesch.* **1**, 213-273; 353-432.
- Herman, M.A., She, P., Peroni, O.D., Lynch, C.J., Kahn, B.B. (2010) Adipose Tissue Branched Chain Amino Acid (BCAA) Metabolism Modulates Circulating BCAA Levels. *Journal of Biological Chemistry* **285**(15), 11348-11356.
- Herrler, A., Beier, H. (1999) New molecular and functional aspects of the zona pellucida during early embryonic development. *Reproduktionsmedizin* **15**(4), 268-275.
- Herrler, A., Krusche, C.A., Beier, H.M. (1998) Insulin and Insulin-like Growth Factor-I Promote Rabbit Blastocyst Development and Prevent Apoptosis. *Biol. Reprod.* **59**(6), 1302-1310.
- Herrmann, B.G., Labeit, S., Poustka, A., King, T.R., Lehrach, H. (1990) Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature* **343**(6259), 617-622.
- Heyner, S., Rao, L.V., Jarett, L., Smith, R.M. (1989) Preimplantation mouse embryos internalize maternal insulin via receptor-mediated endocytosis: Pattern of uptake and functional correlations. *Developmental Biology* **134**(1), 48-58.
- Housley, M.P., Rodgers, J.T., Udeshi, N.D., Kelly, T.J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Puigserver, P., Hart, G.W. (2008) O-GlcNAc Regulates FoxO Activation in Response to Glucose. *Journal of Biological Chemistry* **283**(24), 16283-16292.
- Idkowiak, J. (2006) Untersuchungen zu Signalzentren der Achsenbildung während der Gastrulation im Kaninchen. *Dissertation*.

Idkowiak, J., Weisheit, G., Plitzner, J., Viebahn, C. (2004) Hypoblast controls mesoderm generation and axial patterning in the gastrulating rabbit embryo. *Development Genes and Evolution* **214**(12), 591-605.

Inman, K.E., Downs, K.M. (2006) Localization of Brachyury (T) in embryonic and extraembryonic tissues during mouse gastrulation. *Gene Expression Patterns* **6**(8), 783-793.

Inzunza, J., Danielsson, O., Lalitkumar, P.G., Larsson, O., Axelson, M., Töhönen, V., Danielsson, K.G., Stavreus-Evers, A. (2010) Selective insulin-like growth factor-I antagonist inhibits mouse embryo development in a dose-dependent manner. *Fertility and Sterility* **93**(8), 2621-2626.

Jahner, D., Stuhlmann, H., Stewart, C.L., Harbers, K., Lohler, J., Simon, I., Jaenisch, R. (1982) De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis. *Nature* **298**(5875), 623-628.

Jiménez-Chillarón, J.C., Díaz, R., Martínez, D., Pentinat, T., Ramón-Krauel, M., Ribó, S., Plösch, T. (2012) The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. *Biochimie* **94**(11), 2242-2263.

Jorns, A., Munday, R., Tiedge, M., Lenzen, S. (1997) Comparative toxicity of alloxan, N-alkylalloxans and ninhydrin to isolated pancreatic islets in vitro. *Journal of Endocrinology* **155**(2), 283-293.

Kaye, P.L. (1997) Preimplantation growth factor physiology. *Rev. Reprod.* **2**(2), 121-127.

Khurana, N.K., Niemann, H. (2000) Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived in vitro or in vivo. *Theriogenology* **54**(2), 313-326.

Kispert, A., Herrmann, B. (1993) The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein. *EMBO J.* **12**(12), 4898-4899.

Kispert, A., Herrmann, B.G. (1994) Immunohistochemical Analysis of the Brachyury Protein in Wild-Type and Mutant Mouse Embryos. *Developmental Biology* **161**(1), 179-193.

Kispert, A., Ortner, H., Cooke, J., Herrmann, B.G. (1995) The Chick Brachyury Gene: Developmental Expression Pattern and Response to Axial Induction by Localized Activin. *Developmental Biology* **168**(2), 406-415.

Kuo, M., Zilberfarb, V., Gangneux, N., Christeff, N., Issad, T. (2008) O-glycosylation of FoxO1 increases its transcriptional activity towards the glucose 6-phosphatase gene. *FEBS Letters* **582**(5), 829-834.

Lange, C., Mix, E., Rateitschak, K., Rolfs, A. (2006) Wnt Signal Pathways and Neural Stem Cell Differentiation. *Neurogenerative Disease* **3**(1-2), 76-86.

Latres, E., Chiaur, D., Pagano, M. (1999) The human F box protein bold beta-Trcp associates with the Cul1/Skp1 complex and regulates the stability of bold beta-catenin. *Oncogene* **18**(4), 849-854.

Leese, H. (1989) Energy metabolism of the blastocyst and uterus at implantation. In: Yoshinaga K, editor. *Blastocyst implantation*. New York: Adams. pp 39-44.

Leese, H.J., Barton, A.M. (1984) Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* **72**(1), 9-13.

- Lenzen, S., Munday, R. (1991) Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. *Biochemical Pharmacology* **42**(7), 1385-1391.
- Lequarre, A.S., Grisart, B., Moreau, B., Schuurbiens, N., Massip, A., Dessy, F. (1997) Glucose metabolism during bovine preimplantation development: Analysis of gene expression in single oocytes and embryos. *Molecular Reproduction and Development* **48**(2), 216-226.
- LeRoith, D., Werner, H., Beitner-Johnson, D., Roberts, A.T. (1995) Molecular and Cellular Aspects of the Insulin-Like Growth Factor I Receptor. *Endocrine Reviews* **16**(2), 143-163.
- Lighten, A., Hardy, K., Winston, R., Moore, G. (1997) Expression of mRNA for the insulin-like growth factors and their receptors in human preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development* **47**(2), 134-139.
- Lighten, A., Moore, G., Winston, R., Hardy, K. (1998) Routine addition of human insulin-like growth factor-I ligand could benefit clinical in-vitro fertilization culture. *Hum. Reprod.* **13**(11), 3144-3150.
- Liu, C., Kato, Y., Zhang, Z., Do, V.M., Yankner, B.A., He, X. (1999a) β -Trcp couples β -catenin phosphorylation-degradation and regulates Xenopus axis formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**(11), 6273-6278.
- Liu, C., Nakamura, E., Knezevic, V., Hunter, S., Thompson, K., Mackem, S. (2003) A role for the mesenchymal T-box gene Brachyury in AER formation during limb development. *Development* **130**(7), 1327-1337.
- Liu, J.-L., Grinberg, A., Westphal, H., Sauer, B., Accili, D., Karas, M., LeRoith, D. (1998) Insulin-Like Growth Factor-I Affects Perinatal Lethality and Postnatal Development in a Gene Dosage-Dependent Manner: Manipulation Using the Cre/loxP System in Transgenic Mice. *Molecular Endocrinology* **12**(9), 1452-1462.
- Liu, J.-L., LeRoith, D. (1999b) Insulin-Like Growth Factor I Is Essential for Postnatal Growth in Response to Growth Hormone. *Endocrinology* **140**(11), 5178-5184.
- Liu, J., Baker, J., Perkins, A., Robertson, E., Efstratiadis, A. (1993) Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* **75**(1), 59-72.
- Lutwak-Mann, C. (1962) Glucose, lactic acid and bicarbonate in rabbit blastocyst fluid. *Nature* **193**, 653-654.
- Martin, L., Leese, H. (1995) Role of glucose in mouse preimplantation embryo development. *Mol. Reprod. Dev.* **40**(4), 436-43.
- Moley, K.H., Chi, M.M.-Y., Mueckler, M.M. (1998a) Maternal hyperglycemia alters glucose transport and utilization in mouse preimplantation embryos. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **275**(1), E38-47.
- Moley, K.H., Chi, M.M.Y., Knudson, C.M., Korsmeyer, S.J., Mueckler, M.M. (1998b) Hyperglycemia induces apoptosis in pre-implantation embryos through cell death effector pathways. *Nat Med* **4**(12), 1421-1424.
- Mondschein, J., Smith, S., Hammond, J. (1990) Production of Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins (IGFBPs) by Porcine Granulosa Cells: Identification of IGFBP-2 and -3 and Regulation by Hormones and Growth Factors. *Endocrinology* **127**(5), 2298-2306.

- Mondschein, J.S., Etherton, T.D., Hammond, J.M. (1991) Characterization of insulin-like growth factor-binding proteins of porcine ovarian follicular fluid. *Biology of Reproduction* **44**(2), 315-320.
- Morgan, P.M., Kane, M.T. (1993) Protein content of rabbit embryos: one cell to peri-implantation blastocyst. *Journal of Reproduction and Fertility* **97**(1), 101-106.
- Munday, R. (1988) Dialuric acid autoxidation. Effects of transition metals on the reaction rate and on the generation of "active oxygen" species. *Biochem. Pharmacol.* **37**(3), 409-13.
- Murakami, M., Ichisaka, T., Maeda, M., Oshiro, N., Hara, K., Edenhofer, F., Kiyama, H., Yonezawa, K., Yamanaka, S. (2004) mTOR Is Essential for Growth and Proliferation in Early Mouse Embryos and Embryonic Stem Cells. *Mol. Cell. Biol.* **24**(15), 6710-6718.
- Naiche, L., Harrelson, Z., Kelly, R., Papaioannou, V. (2005) T-Box Genes In Vertebrate Development. *Annual Review of Genetics* **39**, 219-239.
- Nason, K.S., Binder, N.D., Labarta, J.I., Rosenfeld, R.G., Gargosky, S.E. (1996) IGF-II and IGF-binding proteins increase dramatically during rabbit pregnancy. *Journal of Endocrinology* **148**(1), 121-130.
- Navarrete Santos, A., Ramin, N., Tonack, S., Fischer, B. (2008) Cell Lineage-Specific Signaling of Insulin and Insulin-Like Growth Factor I in Rabbit Blastocysts. *Endocrinology* **149**(2), 515-524.
- Navarrete Santos, A., Tonack, S., Kirstein, M., Kietz, S., Fischer, B. (2004a) Two insulin-responsive glucose transporter isoforms and the insulin receptor are developmentally expressed in rabbit preimplantation embryos. *Reproduction* **128**(5), 503-516.
- Navarrete Santos, A., Tonack, S., Kirstein, M., Pantaleon, M., Kaye, P., Fischer, B. (2004b) Insulin acts via mitogen-activated protein kinase phosphorylation in rabbit blastocysts. *Reproduction* **128**(5), 517-526.
- Ng, S.-F., Lin, R.C.Y., Laybutt, D.R., Barres, R., Owens, J.A., Morris, M.J. (2010) Chronic high-fat diet in fathers programs [bgr]-cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* **467**(7318), 963-966.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., Smith, A. (1998) Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4. *Cell* **95**(3), 379-391.
- Niwa, H., Miyazaki, J., Smith, A. (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics* **24**(372-376).
- Northrop, J.L., Kimelman, D. (1994) Dorsal-Ventral Differences in Xcad-3 Expression in Response to FGF-Mediated Induction in Xenopus. *Developmental Biology* **161**(2), 490-503.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., Li, E. (1999) DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell* **99**(3), 247-257.
- Ozanne, S., Sandovici, I., Constância, M. (2011) Maternal diet, aging and diabetes meet at a chromatin loop. *Aging* **3**(5), 548-554.
- Pantaleon, M., Kaye, P. (1998) Glucose transporters in preimplantation development. *Rev. Reprod.* **3**(2), 77-81.

- Pavlinkova, G., Salbaum, J.M., Kappen, C. (2008) Wnt signaling in caudal dysgenesis and diabetic embryopathy. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* **82**(10), 710-719.
- Pavlinkova, G., Salbaum, M., Kappen, C. (2009) Maternal diabetes alters transcriptional programs in the developing embryo. *BMC Genomics* **10**(274).
- Pearce, J.J.H., Penny, G., Rossant, J. (1999) A Mouse Cerberus/Dan-Related Gene Family. *Developmental Biology* **209**(1), 98-110.
- Penney, G.C., Mair, G., Pearson, D.W.M., Group, S.D.i.P. (2003) Outcomes of pregnancies in women with type 1 diabetes in Scotland: a national population-based study. *BJOG* **110**(3), 315-318.
- Pflugfelder, G.O., Roth, H., Poeck, B. (1992) A homology domain shared between Drosophila optomotor-blind and mouse Brachyury is involved in DNA binding. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **186**(2), 918-925.
- Pike, I. (1981) Comparative studies of embryo metabolism in early pregnancy. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **29**, 203-13.
- Powell-Braxton, L., Hollingshead, P., Giltinan, D., Pitts-Meek, S., Stewart, T. (1993a) Inactivation of the IGF-I Gene in Mice Results in Perinatal Lethality. *Annals of the New York Academy of Sciences* **692**(1), 300-301.
- Powell-Braxton, L., Hollingshead, P., Warburton, C., Dowd, M., Pitts-Meek, S., Dalton, D., Gillett, N., Stewart, T.A. (1993b) IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes & Development* **7**(12b), 2609-2617.
- Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J., Walkey, C.J., Yoon, J.C., Oriente, F., Kitamura, Y., Altomonte, J., Dong, H., Accili, D., Spiegelman, B.M. (2003) Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1[alpha] interaction. *Nature* **423**(6939), 550-555.
- 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.
- Reiher, H., Fuhrmann, K., Noack, S., Woltanski, K.-P., Jutzi, E., Dorsche, H.H.v., Hahn, H.-J. (1983) Age-dependent Insulin Secretion of the Endocrine Pancreas In Vitro from Fetuses of Diabetic and Nondiabetic Patients. *Diabetes Care* **6**(5), 446-451.
- Robinson, D.H., Smith, P.R., Benos, D.J. (1990) Hexose transport in preimplantation rabbit blastocysts. *Journal of Reproduction and Fertility* **89**(1), 1-11.
- Rosa, F., Roberts, A.B., Danielpour, D., Dart, L.L., Sporn, M.B., Dawid, I.B. (1988) Mesoderm induction in amphibians: the role of TGF-beta 2-like factors. *Science* **239**(4841), 783-785.
- Rosner, M.H., De Santo, R.J., Arnheiter, H., Staudt, L.M. (1991) Oct-3 is a maternal factor required for the first mouse embryonic division. *Cell* **64**(6), 1103-1110.
- Sandovici, I., Smith, N.H., Nitert, M.D., Ackers-Johnson, M., Uribe-Lewis, S., Ito, Y., Jones, R.H., Marquez, V.E., Cairns, W., Tadayyon, M., O'Neill, L.P., Murrell, A., Ling, C., Constância, M., Ozanne, S.E. (2011) Maternal diet and aging alter the epigenetic control of a promoter-enhancer interaction at the Hnf4a gene in rat pancreatic islets. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**(13), 5449-5454.

Schulte-Merker, S., Hammerschmidt, M., Beuchle, D., Cho, K.W., De Robertis, E.M., Nusslein-Volhard, C. (1994a) Expression of zebrafish gooseoid and no tail gene products in wild-type and mutant no tail embryos. *Development* **120**(4), 843-852.

Schulte-Merker, S., van Eeden, F.J., Halpern, M.E., Kimmel, C.B., Nusslein-Volhard, C. (1994b) no tail (ntl) is the zebrafish homologue of the mouse T (Brachyury) gene. *Development* **120**(4), 1009-1015.

Schultz, G., Hogan, A., Watson, A., Smith, R., Heyner, S. (1992) Insulin, insulin-like growth factors and glucose transporters: temporal patterns of gene expression in early murine and bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development* **4**(4), 361-371.

Schwander, J.C., Hauri, C., Zapf, J., Froesch, E.R. (1983) Synthesis and Secretion of Insulin-Like Growth Factor and Its Binding Protein by the Perfused Rat Liver: Dependence on Growth Hormone Status. *Endocrinology* **113**(1), 297-305.

Shishko, P.I., Dreval, A.V., Abugova, I.A., Zajarny, I.U., Goncharov, V.C. (1994) Insulin-like growth factors and binding proteins in patients with recent-onset type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: Influence of diabetes control and intraportal insulin infusion. *Diabetes Research and Clinical Practice* **25**(1), 1-12.

Slack, J., Darlington, B., Heath, J., Godsave, S. (1987) Mesoderm induction in early *Xenopus* embryos by heparin-binding growth factors. *Nature* **326**(6109), 197 - 200.

Smith, J.C., Price, B.M.J., Green, J.B.A., Weigel, D., Herrmann, B.G. (1991) Expression of a xenopus homolog of Brachyury (T) is an immediate-early response to mesoderm induction. *Cell* **67**(1), 79-87.

Telford, N.A., Hogan, A., Franz, C.R., Schultz, G.A. (1990a) Expression of genes for insulin and insulin-like growth factors and receptors in early postimplantation mouse embryos and embryonal carcinoma cells. *Molecular Reproduction and Development* **27**(2), 81-92.

Telford, N.A., Watson, A.J., Schultz, G.A. (1990b) Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: A comparison of several species. *Molecular Reproduction and Development* **26**(1), 90-100.

Thieme, R., Fischer, S., Schindler, M., Fischer, B., Navarrete Santos, A. (2012c) An experimental insulin dependent diabetes model to investigate diabetic dysfunctions in early pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology* **67**(s2), 3-4.

Thieme, R., Ramin, N., Fischer, S., Püschel, B., Fischer, B., Navarrete Santos, A. (2012a) Gastrulation in rabbit blastocysts depends on insulin and insulin-like-growth-factor 1. *Molecular and Cellular Endocrinology* **348**(1), 112-119.

Thieme, R., Schindler, M., Ramin, N., Fischer, S., Hirche, F., Fischer, B., Navarrete Santos, A. (2009) Effects of diabetes type 1 on the preimplantation uterine milieu in rabbits. *ISBN: 978-0-9563694-0-6*, p117.

Thieme, R., Schindler, M., Ramin, N., Fischer, S., Mühleck, B., Fischer, B., Navarrete Santos, A. (2012b) Insulin growth factor adjustment in preimplantation rabbit blastocysts and uterine tissues in response to maternal type 1 diabetes. *Molecular and Cellular Endocrinology* **358**(1), 96-103.

- Thompson, J.G., Partridge, R.J., Houghton, F.D., Cox, C.I., Leese, H.J. (1996) Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* **106**(2), 299-306.
- Tokunaga, C., Yoshino, K.-i., Yonezawa, K. (2004) mTOR integrates amino acid- and energy-sensing pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **313**(2), 443-446.
- Vaessen, N., Heutink, P., Janssen, J.A., Witteman, J.C.M., Testers, L., Hofman, A., Lamberts, S.W.J., Oostra, B.A., Pols, H.A.P., van Duijn, C.M. (2001) A Polymorphism in the Gene for IGF-I. *Diabetes* **50**(3), 637-642.
- Velazquez, M.A., Hadelér, K.G., Herrmann, D., Kues, W.A., Rémy, B., Beckers, J.F., Niemann, H. (2012) In vivo oocyte IGF-1 priming increases inner cell mass proliferation of in vitro-formed bovine blastocysts. *Theriogenology* **78**(3), 517-527.
- Velazquez, M.A., Hermann, D., Kues, W.A., Niemann, H. (2011) Increased apoptosis in bovine blastocysts exposed to high levels of IGF1 is not associated with downregulation of the IGF1 receptor. *Reproduction* **141**(1), 91-103.
- Velazquez, M.A., Zaraza, J., Oropeza, A., Webb, R., Niemann, H. (2009) The role of IGF1 in the in vivo production of bovine embryos from superovulated donors. *Reproduction* **137**(2), 161-180.
- Verheijen, E.C.J., Critchley, J.A., Whitelaw, D.C., Tuffnell, D.J. (2005) Outcomes of pregnancies in women with pre-existing type 1 or type 2 diabetes, in an ethnically mixed population. *BJOG* **112**(11), 1500-1503.
- Viebahn, C., Mayer, B., Hrabé de Angelis, M. (1995) Signs of the principle body axes prior to primitive streak formation in the rabbit embryo. *Anat. Embryol. (Berl)*. **192**(2), 159-69.
- Viebahn, C., Stortz, C., Mitchell, S.A., Blum, M. (2002) Low proliferative and high migratory activity in the area of Brachyury expressing mesoderm progenitor cells in the gastrulating rabbit embryo. *Development* **129**(10), 2355-2365.
- Waddington, C., Waterman, A. (1933) The Development in vitro of Young Rabbit Embryos. *J. Anat.* **67**(Pt 3), 355-370.
- Wales, R.G., Whittingham, D.G., Hardy, K., Craft, I.L. (1987) Metabolism of glucose by human embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* **79**(1), 289-297.
- Watkins, A.J., Lucas, E.S., Wilkins, A., Cagampang, F.R.A., Fleming, T.P. (2011) Maternal Periconceptional and Gestational Low Protein Diet Affects Mouse Offspring Growth, Cardiovascular and Adipose Phenotype at 1 Year of Age. *PLoS ONE* **6**(12), e28745.
- Watkins, A.J., Wilkins, A., Cunningham, C., Perry, V.H., Seet, M.J., Osmond, C., Eckert, J.J., Torrens, C., Cagampang, F.R.A., Cleal, J., Gray, W.P., Hanson, M.A., Fleming, T.P. (2008) Low protein diet fed exclusively during mouse oocyte maturation leads to behavioural and cardiovascular abnormalities in offspring. *The Journal of Physiology* **586**(8), 2231-2244.
- Watson, A.J., Hogan, A., Hahnel, A., Schultz, G.A., Wiemer, K.E. (1992) Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *Mol. Reprod. Dev.* **31**(2), 87-95.
- Weiss, P. (2002) Diabetes und Schwangerschaft. *Springer Wien*.

Winterbourn, C.C., Munday, R. (1989) Glutathione-mediated redox cycling of alloxan: Mechanisms of superoxide dismutase inhibition and of metal-catalyzed OH formation. *Biochemical Pharmacology* **38**(2), 271-277.

Xie, S., Wang, Z., Okano, M., Nogami, M., Li, Y., He, W.-W., Okumura, K., Li, E. (1999) Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene* **236**(1), 87-95.

Yakar, S., Liu, J., Stannard, B., Butler, A., Accili, D., Sauer, B., D., L. (1999) Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**(13), 7324-7329.

Yakar, S., Rosen, C., Beamer, W., Ackert-Bicknell, C., Wu, Y., Liu, J., Ooi, G., Setser, J., Frystyk, J., Boisclair, Y., LeRoith, D. (2002) Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J Clin Invest* **110**(6), 771-781.

Yanagisawa, K.O., Fujimoto, H., Urushihara, H. (1981) Effects of the Brachyury (T) mutation on morphogenetic movement in the mouse embryo. *Developmental Biology* **87**(2), 242-248.

Yang, J., Cummings, E.A., O'Connell, C., Jangaard, K. (2006) Fetal and Neonatal Outcomes of Diabetic Pregnancies. *Obstet. Gynecol.* **108**(3), 644-650.

7. Anhang

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: (A) Dorsale Aufsichten Osmiumoxid-fixierter Kaninchenkeimscheiben der Stadien 0 bis 4 und (B) schematische Darstellung der entsprechenden Stadien

Abbildung 2: Molekulare Steuerung der Mesoderminduktion in der planaren Kaninchenkeimscheibe

Abbildung 3: Zeitlicher Verlauf der Blutglukosekonzentration nach Alloxangabe in Kaninchen

Tabelle 1: Klassifikation des Diabetes mellitus nach den Leitlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft

Abkürzungsverzeichnis

AdipoR	Adiponektin-Rezeptor
Akt	Protein Kinase B (PKB)
ALS	säurelabile Untereinheit (<i>Acid labile subunit</i>)
AMPK	5' Adenosinemonophosphat-aktivierte Proteinkinase
ATP	Adenosintriphosphat
Bcat2	<i>Branched chain amino-acid transaminase 2, mitochondrial</i>
Bckdha	<i>Branched chain keto acid dehydrogenase E1, alpha</i>
BMP	<i>Bone-morphogenic-protein</i>
C	Cytosin
Cdx2	<i>Caudal-type homeobox transcription factor 2</i>
c-fos	Aktivatorprotein 1
Dbt	Dihydrolipoamide- <i>branched chain</i> -Transacylase E2
Dld	Dihydrolipoamiddehydrogenase
DOHaD	<i>Developmental Origin of Health and Disease</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
EGF	<i>Endothel-growth-factor</i>
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
erbB	<i>Epidermal-growth-factor-receptor</i>
Erk	<i>Extracellular-signal-regulated kinases</i>
FGF	<i>Fibroblast-growth-factor</i>
FoxO1	<i>Forkhead</i> Transkriptionsfaktor O1
g	Gramm
G	Guanosin
GH	<i>Growth hormone</i>
GSK3beta	Glykogensynthasekinase 3 beta
GLUT	Glukosetransporter
HK	Hexokinase
IGF	<i>Insulin-like-growth-factor</i>
IGFBP	<i>Insulin-like-growth-factor</i> bindendes Protein
IGF1	<i>Insulin-like-growth-factor 1</i>
IGF1R	<i>Insulin-like-growth-factor 1</i> Rezeptor

IGF2	<i>Insulin-like-growth-factor 2</i>
IGF2R	<i>Insulin-like-growth-factor 2</i> Rezeptor
INF	Interferon
IR	Insulinrezeptor
JNK	Januskinase
MAPK	Mitogen aktivierende Proteinkinase
MEK1	Mitogen aktivierende Proteinkinasekinase 1
mm	Millimeter
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
Oct4	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
qRT-PCR	quantitative Reverse-Transkriptase-Polymersekettreaktion
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCOS	Polycystrisches Ovarsyndrom
PCR	Polymersaekettenreaktion
PEPCK	Phosphoenol-Pyruvatkarboxygenase
PDGF	<i>Platelet-derived-growth-factor</i>
PGE	Posteriore Gastrulaextension
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PLC	Phospholipase C
p.c.	<i>post coitum</i>
SGLT	<i>Sodium-dependent glucose cotransporters</i>
TGFbeta	<i>Transforming-growth-factor beta</i>
VEGF	<i>Vascular-endothelial-growth-factor</i>
VRB	Vorderer Randbogen
vs.	versus
Wnt	<i>Wingless-type MMTV integration site family</i>

Publikations- und Beitragsliste:

Peer-Review Originalpublikationen

Schmidt, T., Fischer, S., Tsikolia, N., Navarrete Santos, A., Rohrbach, S., Ramin, N., **Thieme, R.**, Fischer, B. (2008) Expression of adipokines in preimplantation rabbit and mice embryos. *Histochem. Cell. Biol.* 129:817-25

Ramin, N.*, **Thieme, R.***, Fischer, S., Schindler, M., Schmidt, T., Fischer, B., Navarrete Santos, A. (2010) Maternal diabetes impairs gastrulation and insulin and IGF1 receptor expression in rabbit blastocysts. *Endocrinology* 151(9):4158-4167

Fischer, S., Navarrete Santos, A., **Thieme, R.**, Ramin, N., Fischer, B. (2010) Adiponectin stimulates glucose uptake in rabbit blastocysts. *Biol. Reprod.* 83:859-865

Llobat, L., Marco-Jiménez, F., Peñaranda, D.S., **Thieme, R.**, Navarrete Santos, A., Vicente, J.S. (2012) mRNA Expression in Rabbit Blastocyst and Endometrial Tissue of Candidate Gene Involved in Gestational Losses. *Reprod. Dom. Anim.* 47:281-287

Thieme, R., Ramin, N., Fischer, S., Püschel, B., Fischer, B., Navarrete Santos, A., (2012a) Gastrulation in rabbit blastocysts depends on insulin and the insulin-like-growth-factor 1. *Mol. Cell. Endocrinol.* 348:112-119

Thieme, R.*, Schindler, M.*, Ramin, N., Fischer, S., Mühleck, B., Fischer, B., Navarrete Santos, A. (2012b) Insulin growth factor adjustment in preimplantation rabbit blastocysts and uterine tissues in response to maternal type 1 diabetes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 358:96-103

Schindler, M.*, Fischer, S.*, **Thieme, R.**, Fischer, B., Navarrete Santos, A. (2013) cAMP responsive element binding protein – a vital link in embryonic hormonal adaptation. *Endocrinology* 154(6):2208-21

* - geteilte Erstautorenschaft

Publizierte Abstracts – Vorträge

Thieme, R., Ramin, N., Fischer, B., Navarrete Santos, A. (2008) Wnt4 expression depends on insulin and IGF1 in the rabbit blastocysts. 103. Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft, 14. – 17. März 2008, Innsbruck, Österreich, DOI 10.3337/anatges.2008.0005

Thieme, R., Ramin, N., Fischer, S., Fischer, B., Navarrete Santos, A (2009) Decreased number of blastocysts and altered embryonic gene expression in alloxan induced diabetic rabbits. 42. Jahrestagung über Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, gleichzeitig 34. Veterinär-humanmedizinische Gemeinschaftstagung, 26. – 27. Februar 2009, Leipzig, Deutschland, *Reproduction in Domestic Animals: Volume 44 Issue s1*; DOI 10.1111/j.1439-0531.2009.01350.x

Thieme, R., Schindler, M., Ramin, N., Fischer, S., Hirche, F., Fischer, B., Navarrete Santos, A. (2010) An *in vivo* diabetes type 1 rabbit model to study embryonic dysfunction under hyperglycaemia. 43. Jahrestagung Physiologie u. Pathologie der Fortpflanzung, gleichzeitig 35. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, 24. – 26. Februar 2010, München, Deutschland, *Reproduction in Domestic Animals: Volume 45 Issue s1*; DOI 10.1111/j.1439-0531.2009.01589.x

Thieme, R., Schindler, M., Fischer, S., Fischer, B., Navarrete Santos, A. (2010) Mesoderm differentiation is delayed due to type 1 diabetes and induced by insulin in preimplantation rabbit

blastocysts. Third General Conference of Maternal Interaction With Gametes and Embryo - GEMINI - COST Action FA0702, 1. – 2. Oktober 2010, Soustons, Frankreich; ISBN: 978-0-9563694-5-1, Seite 18

Thieme, R., Schindler, M., Fischer, S., Fischer, B., Navarrete Santos, A. (2010) Insulinabhängige Induktion der Gastrulation in 6 Tage alten Kaninchenblastozysten. 10. Treffen des Arbeitskreises Molekularbiologie der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin (DGGEF), 5. – 6. November 2010, Düsseldorf, Deutschland, Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie 8(1):36

Thieme, R., Fischer, S., Schindler, M., Püschel, B., Fischer, B., Navarrete Santos, A. (2011) Insulin accelerates mesoderm induction via Wnt signalling in preimplantation rabbit blastocysts. 7th World Congress on Developmental Origin of Health and Disease, 18. – 21. September 2011, Portland, Oregon, USA, J of DOHaD 2(S1) pp02

Gürke, J., **Thieme, R.,** Schindler, M., Fischer, S., Hirche, F., Fischer, B., Navarrete Santos, A. (2012) Altered amino acid metabolism in preimplantation embryos from diabetic rabbits. 45. Jahrestagung Physiologie u. Pathologie der Fortpflanzung, gleichzeitig 37. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, 29. Februar – 02. März 2012, Berlin, Deutschland, Reproduction in Domestic Animals: Volume 47 Issue s2; DOI 10.1111/j.1439-0531.2012.01989.x

Thieme, R., Fischer, S., Schindler, M., Fischer, B., Navarrete Santos, A. (2012) An experimental insulin dependent diabetes model to investigate diabetic dysfunctions in early pregnancy. Joint International Congress of ASRI and ESRI, 31. Mai – 02. Juni 2012, Hamburg, Deutschland, American Journal of Reproductive Immunology 67(s2):3-4

Nichtpublizierte Abstracts – Vorträge

Thieme, R., Schindler, M., Ramin, N., Fischer, S., Fischer, B., Navarrete Santos A. (2009) Die Auswirkungen eines Diabetes Typ 1 auf den Metabolismus und die Genexpression von Präimplantationsembryonen des Kaninchens. 9. Treffen des Arbeitskreises Molekularbiologie der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin (DGGEF), 28. – 29. August 2009, Düsseldorf, Deutschland

Thieme, R., Fischer, S., Schindler, M., Fischer, B., Navarrete Santos, A. (2011) Disturbed glucose supply, transport and intracellular metabolism in preimplantation embryos from diabetic rabbits. Society for Reproduction and Fertility Conference 2011, 11. – 13. Juli 2011, Brighton, UK

Publizierte Posterbeiträge

Thieme, R., Ramin, N., Viebahn, C., Plitzner, J., Fischer, B., Navarrete Santos, A. (2007) Gastrulation depends on insulin in the rabbit blastocyst. 24. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, 26. – 28. September 2007, Würzburg, Deutschland; DOI: 10.3337 /anatges.2007.0004

Thieme, R., Schindler, M., Ramin, N., Fischer, S., Hirche, F., Fischer, B., Navarrete Santos, A. (2009) Effects of diabetes type 1 on the preimplantation uterine milieu in rabbits. Second General Conference of Maternal Interaction With Gametes and Embryo - GEMINI - COST Action FA0702, 1. – 3. Oktober 2009, Alghero, Italien; ISBN: 978-0-9563694-0-6, Seite 117

Nichtpublizierte Posterbeiträge

Thieme, R., Ramin, N., Fischer, S., Fischer, B., Navarrete Santos, A. (2008) Insulin and IGF1 promote mesoderm differentiation in rabbit blastocysts. First General Conference of Maternal Interaction

With Gametes and Embryo - GEMINI - COST Action FA0702, 9. – 11. Oktober 2008, Volos, Griechenland

Thieme, R., Ramin, N., Fischer, S., Fischer, B., Navarrete Santos, A. (2009) Influence of insulin and IGF1 on early gastrulation in rabbit blastocysts. Mini symposium - IUGR and Metabolic programming, 23. März 2009, Beauvais, Frankreich

Thieme, R., Schindler, M., Fischer, S., Ramin, N., Hirche, F., Fischer, B., Navarrete Santos, A. (2009) Diabetes type 1 changes the nutritional environment and metabolism of preimplantation embryos in rabbits. 5th International Conference on the Female Reproductive Tract, 15. – 18. Mai 2009, Frauenchiemsee, Deutschland

Thieme, R., Schindler, M., Ramin, N., Fischer, S., Fischer, B., Navarrete Santos, A. (2010) Adaptation of rabbit preimplantation blastocysts to maternal type 1 diabetes. The Power of Programming, 6. – 8. Mai 2010, München, Deutschland

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: René Thieme
Geburtstag und -ort: 22. September 1983 in Torgau
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig, 1 Kind – Charlotta Dorothea Thieme
Adresse: Herderstraße 10
06114 Halle (Saale)

Ausbildung und beruflicher Werdegang

seit Nov. 2011 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Frau Professor Petra C. Arck „Experimentelle Feto-Maternale Medizin“ am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Okt. 2007 – Okt. 2011 Doktorand in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Bernd Fischer am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Thema: Der Einfluss eines maternalen Diabetes mellitus Typ 1 auf die Entwicklungskompetenz und Stoffwechseladaptation in der Kaninchenblastozyste

Okt. 2002 – Sept. 2007 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Abschluss: Diplom-Biochemiker
Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Bernd Fischer am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Thema: Wirkung von Wachstumsfaktoren der IGF-Familie auf die Expression entwicklungsspezifischer Gene bei der Blastozystendifferenzierung des Kaninchens

Sept. 1994 – Juni 2002 Joe-Polowsky-Gymnasium Torgau
Abschluss mit allgemeiner Hochschulreife

Sept. 1990 – Aug. 1994 Grundschule Torgau

Forschungsaufenthalte

Mai und Oktober 2011 LAFUGA, Ludwig-Maximilian-Universität München,
Februar 2012 Dr. Georg J. Arnold und Dr. Thomas Fröhlich, München, Deutschland

Januar – März 2011 Liggins Institut, Dr. Michael Steiner, Auckland University, Auckland,
Neuseeland

März – April 2009 Functional Genome Plasticity Group and Integrative Physiology
Group, Dr. Veronique Duranthon und Dr. Pascale Chavatte-Palmer,
UMR 1198 INRA-ENVA Biologie du Développement et Reproduction
(BDR), Jouy-en-Josas, Frankreich

Februar 2009 Anatomie und Embryologie, Professor Christoph Viebahn und Dr.
Bernd Püschel, Zentrum für Anatomie, Georg-August-Universität,
Göttingen, Deutschland

Auszeichnungen

Reisestipendium der GlaxoSmithKline Foundation zur
Kongressteilnahme: The Power of Programming, 6. – 8. Mai 2010,
München, Deutschland; 200€

Unterstützung durch die Society for Reproduction and Fertility zur
Konferenzteilnahme: Society for Reproduction and Fertility Annual
Conference 2011, 11. – 13. Juli 2011, Brighton; UK, 400£

Reisestipendium von Cayman Chemicals zur Kongressteilnahme: 7th
World Congress on Developmental Origin of Health and Disease, 18. –
21. September 2011, Portland, Oregon, USA; 250US\$

Junior Faculty Travel Stipend Award zur Kongressteilnahme: 7th World
Congress on Developmental Origin of Health and Disease, 18. – 21.

September 2011, Portland, Oregon, USA, verliehen durch: Congress Scientific Committee; 750US\$

Eingeworbene Drittmittel

Deutsche Diabetes Stiftung (DDS): “Diabetogenous embryopathies: A proteome analysis for identification of embryonic dysfunctions” (275-08-10); 10.000€

Wilhelm-Roux-Programm: “Diabetogenous embryopathies: A proteome analysis for identification of embryonic dysfunctions” (FKZ 24/04; Kofinanzierung); 2.000€

Reisestipendium zur Kongressteilnahme: 7th World Congress on Developmental Origin of Health and Disease, 18. – 21. September 2011, Portland, Oregon, USA, durch den DAAD; 1.407€

Halle (Saale), den 22. August 2013

Dipl.-Biochem. René Thieme

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle (Saale), den 22. August 2013

Dipl.-Biochem. René Thieme

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg angefertigt. Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich während der Zeit der Durchführung und Anfertigung dieser Dissertationsschrift unterstützt haben.

Bei Herrn **Professor Dr. Dr. Bernd Fischer** möchte ich mich bedanken, dass er mir die Möglichkeit gab diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Ich möchte mich bei ihm für die stetige Diskussionsbereitschaft und sein Interesse an den in dieser Arbeit behandelten Themen bedanken. Meine Teilnahme und die Präsentation meiner Ergebnisse auf nationalen und internationalen Kongressen war ihm immer ein großes Anliegen. Die durch seine Hilfestellung ermöglichten Auslandsaufenthalte in Frankreich und Neuseeland waren eine große Bereicherung während meiner Doktorandenzeit. Hierfür gilt ihm mein besonderer Dank.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau **PD Dr. Anne Navarrete Santos**, der ich das interessante und vielseitige Thema mit zu verdanken habe, die mich immer und stets bei allen Problemen und Fragestellungen unterstützt hat und immer zu einer sehr ausführlichen und inspirierenden Diskussion bereit war. Durch sie wurde ich zum selbständigen und eigenverantwortlichen wissenschaftlichen Arbeiten angeleitet und angeregt.

Weiterhin möchte ich mich bei **Michaela Kirstein, Franziska Knöfel und Sabine Schrötter** für die stets sehr kompetente und immerwährende Unterstützung im Labor bedanken.

Herrn **Professor Dr. G.-J. Krauß** danke ich für die Bereitschaft diese Arbeit mit zu betreuen und zu begutachten.

Mein Dank gilt **Ronald Biemann, Sünje Fischer, Matthias Jung, Julia Knelangen, Kristina Schädlich, Juliane-Susanne Schmidt und Maria Schindler**, sowie den zahlreichen Kooperationspartnern im In- und Ausland, die mich seit der Zeit meiner Diplomarbeit begleitet, unterstützt und angespornt haben. Es war ein großes Glück in dieser offenen und entspannten Atmosphäre zu arbeiten und zu forschen.

Meinen Eltern **Petra** und **Edgar Thieme** danke ich, dass sie mir ein Studium ermöglichten, mich während der Dissertation immer begleitet haben und diese mit Interesse verfolgt haben.

Bei **Sandy** möchte ich mich für die Unterstützung und die viele Geduld während der letzten Jahre bedanken. Unsere Tochter **Charlotta** ist ein großes Glück und eine Bereicherung unseres gemeinsamen Lebens.

Die vorliegende Arbeit wurde maßgeblich durch die **Deutsche Forschungsgemeinschaft** (NA-418/4-2), die **Deutschen Diabetes Stiftung** (275-08-10), das **Wilhelm-Roux-Programm** der Medizinischen Fakultät der Martin Luther Universität Halle-Wittenberg (FKZ 24/04) und durch den **Deutschen akademischen Austauschdienst (DAAD)** finanziell gefördert und gestützt.