

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

**Einfluss eines experimentell induzierten Typ-1-Diabetes mellitus auf
endometriale Faktoren während der Frühschwangerschaft am Modell des
Kaninchens**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von **Johannes Gabel**

geboren am 23.03.1989 in Schlema

Gutachter/Gutachterin:

1. Prof. Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer
2. Prof. Dr. rer. nat. Irmgard Classen-Linke (Aachen)
3. Prof. Dr. med. Gerhard Behre

03.11.2015

24.10.2016

Referat

Frauen mit Typ-1-Diabetes mellitus sind subfertil und haben ein erhöhtes Frühabortrisiko (Casson et al., 1997; Lorenzen et al., 1999; Tennant et al., 2014). Eine Ursache dafür ist die fehlende Insulinwirkung, welche zu einer fehlerhaften embryo-maternalen Kommunikation während der Frühschwangerschaft führt. In der Präimplantationsphase hat das Endometrium direkten Kontakt zum Embryo und beeinflusst dessen Wachstum, Differenzierung und Implantation durch die Sezernierung von Wachstumsfaktoren, wobei Insulin und den Insulin-artigen Wachstumsfaktoren (IGFs) eine besondere Bedeutung zukommt.

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss eines maternalen Insulinmangel-Diabetes auf Faktoren des Insulin-IGF-Systems und des IGF-bindenden Proteins 1 (IGFBP1) im Endometrium während der Frühschwangerschaft zu untersuchen. Um weitere durch einen Diabetes mellitus veränderte Faktoren zu detektieren, wurde im 2. Teil der Arbeit das endometriale Transkriptom durch *Next Generation Sequencing* (RNA-Seq) analysiert. Neben dem Diabetes mellitus wurde durch den Vergleich von graviden und pseudogriden Tieren der Schwangerschaftseffekt untersucht, um neue, für die embryo-maternale Interaktion relevante Gene zu identifizieren. Eines dieser Gene ist Protocadherin 15 (PCDH15), ein bis dato im Endometrium unbeschriebenes Mitglied der Cadherin-Familie, welches im 3. Teil dieser Arbeit im Endometrium sowohl des Kaninchens als auch des Menschen untersucht wurde.

Als diabetisches Schwangerschaftsmodell diente das Kaninchen. Der Diabetes mellitus Typ-1 wurde experimentell durch Alloxan induziert. Die hyperglykämischen Tiere wurden hormonell stimuliert, die Ovulation ausgelöst, verpaart, am 6. Tag *post coitum* (p. c.) getötet und das Endometrium isoliert. Mit den pseudogriden Tieren wurde mit Ausnahme der Verpaarung identisch verfahren. Methodisch wurden neben dem *Next Generation Sequencing* qRT-PCR, Western Blot und Immunhistochemie angewandt.

Ein Diabetes mellitus hatte im Endometrium graviden Kaninchen keinen Einfluss auf die Transkription der IGFs, deren Rezeptoren und von LIF. Eine vorbeschriebene Hochregulation der IGFs im Endometrium konnte lediglich bei den pseudogriden Tieren beobachtet werden. Allerdings kam es zu einer Abnahme der Transkription des IGFBP1, welches die Bioverfügbarkeit der IGFs steuert. Dadurch erhöht sich die Verfügbarkeit der IGFs im embryo-maternalen Raum, was als kompensatorischer Mechanismus zur fehlenden Insulinwirkung interpretiert werden kann.

Die RNA-Seq-Analyse ergab 206 durch Gravidität differenziell exprimierte Gene. Diese waren assoziiert mit Zelladhäsion, Glykosylierung, dem TGF- β - und Östrogen-Signalweg.

Durch einen Diabetes mellitus waren 360 Gene verändert. Diese waren assoziiert mit Zellstress, Apoptose, Wachstum, Immunregulation, Zelladhäsion, dem p53-, TGF- β - und EGF-Signalweg.

Die immunhistochemische Untersuchung von Protocadherin 15 ergab eine perinukleäre Lokalisation in den Epithelzellen basal gelegener Uterusdrüsen. Ein Diabetes mellitus Typ-1 hatte keinen Einfluss auf PCDH15. In humanen Uterusschnitten zeigte sich eine Zyklusabhängigkeit der Expression mit einem Maximum in der Sekretionsphase (Tag 16-18). Die Funktion des PCDH15 ist ungeklärt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ein maternaler Typ-1-Diabetes mellitus bereits in der Präimplantationsphase endometriale Faktoren und damit die embryo-maternale Interaktion beeinflusst.

Gabel, Johannes: „Einfluss eines experimentell induzierten Typ-1-Diabetes mellitus auf endometriale Faktoren während der Frühschwangerschaft am Modell des Kaninchens“, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 79 Seiten, 2016

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Diabetes mellitus und Schwangerschaft.....	1
1.2. Das Endometrium	2
1.2.1. Das Endometrium im Verlauf des ovariellen Zyklus	2
1.2.2. Das Endometrium und der Embryo in der Präimplantationsphase.....	2
1.3. Das Kaninchen als diabetisches Reproduktionsmodell	4
1.3.1. Die Präimplantationsphase des Kaninchens	4
1.3.2. Induktion eines experimentellen Diabetes mellitus	5
1.4. Das Insulin-IGF-System	5
1.4.1. Insulin, IGF1 und IGF2	5
1.4.2. IR, IGF1R und IGF2R	6
1.4.3. IGFBP1.....	7
1.5. LIF und LIFR	9
1.6. Protocadherin 15 (PCDH15).....	9
1.7. Next Generation Sequencing (RNA-Seq).....	10
1.8. Zielstellung der Arbeit.....	12
2. Material und Methoden	13
2.1. Chemikalien, Enzyme, Kits, Oligonukleotide, Antikörper und Software.....	13
2.1.1. Chemikalien.....	13
2.1.2. Enzyme und Kits	14
2.1.3. Oligonukleotide	14
2.1.4. Antikörper	15
2.1.5. Software.....	15
2.2. Versuchstiere.....	15
2.2.1. Versuchstierhaltung.....	15
2.2.2. Versuchsgruppen	16
2.2.3. Alloxanbehandlung.....	16
2.2.4. Einstellung eines hyperglykämischen Blutzuckerspiegels	17

2.2.5.	Verpaarung	17
2.3.	Gewinnung von Blastozysten und Endometrium.....	17
2.4.	Molekularbiologische Methoden	18
2.4.1.	RNA-Isolierung aus Endometrium.....	18
2.4.2.	RNA-Isolierung aus Kaninchenblastozysten.....	18
2.4.3.	Konzentrationsmessung von RNA und DNA.....	19
2.4.4.	DNA-Verdau	19
2.4.5.	cDNA-Synthese aus endometrialer RNA	19
2.4.6.	cDNA-Synthese aus RNA von Blastozysten.....	20
2.4.7.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	20
2.4.8.	Quantitative <i>Real Time</i> PCR (qRT-PCR).....	21
2.4.9.	Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA und DNA.....	21
2.5.	Klonierung von PCR-Fragmenten	22
2.5.1.	Isolierung von PCR-Fragmenten aus dem Agarosegel.....	22
2.5.2.	Ligation des PCR-Produktes	22
2.5.3.	Transformation des Ligationsansatzes in kompetente Bakterienzellen	22
2.5.4.	Selektion rekombinanter Bakterien und Plasmidisolierung.....	23
2.5.5.	Plasmidverdau	23
2.5.6.	Sequenzierung	23
2.5.7.	Herstellung eines Plasmidstandards	24
2.6.	Proteinchemie.....	24
2.6.1.	Proteinextraktion aus Endometrium	24
2.6.2.	Proteinquantifizierung	25
2.6.3.	Proteintrennung durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	25
2.6.4.	Western Blot.....	26
2.6.5.	Hybridisierung von Proteinen mit Antikörpern.....	26
2.6.6.	Proteindetektion.....	27
2.7.	Immunhistochemische Methoden.....	27
2.7.1.	Anfertigung von Gewebsschnitten	27
2.7.2.	Humane Uterusschnitte	28
2.7.3.	Immunhistochemische Detektion	28
2.7.4.	Immunhistochemische Quantifizierung.....	29
2.8.	Statistische Auswertung	29
2.9.	<i>Next-Generation-Sequencing (NGS)</i>	30
2.9.1.	Probengenerierung.....	30

2.9.2.	Sequenzierung	30
2.9.3.	Datenauswertung	30
3.	Ergebnisse	31
3.1.	Transkriptmengen von IGF1 und IGF2 im Kaninchenendometrium	31
3.1.1.	Quantifizierung von IGF1 mittels qRT- PCR.....	31
3.1.2.	Quantifizierung von IGF2 mittels qRT- PCR.....	31
3.2.	Transkriptmengen von IR, IGF1R und IGF2R im Kaninchenendometrium	32
3.2.1.	Quantifizierung des IR mittels qRT-PCR.....	32
3.2.2.	Quantifizierung von IGF1R mittels qRT-PCR.....	32
3.2.3.	Quantifizierung des IGF2R mittels qRT-PCR.....	33
3.3.	Quantifizierung von IGFBP1 in Endometrium und Blastozysten des Kaninchens ...	33
3.3.1.	Quantifizierung von IGFBP1 im Kaninchenendometrium mittels qRT- PCR	33
3.3.2.	Quantifizierung von IGFBP1 im Endometrium mittels <i>Western Blot</i>	33
3.3.3.	Quantifizierung von IGFBP1 in Kaninchenblastozysten mittels qRT-PCR.....	34
3.4.	Die Transkriptmengen von LIF und LIFR im Kaninchenendometrium.....	34
3.4.1.	Quantifizierung von LIF mittels qRT- PCR	34
3.4.2.	Quantifizierung von LIFR mittels qRT- PCR	34
3.5.	Transkriptomanalyse des Kaninchenendometriums durch RNA-Seq.....	35
3.5.1.	Erfassung des endometrialen Transkriptomts durch RNA-Seq	35
3.5.2.	Zuordnung durch Gravidität veränderter Gene zu funktionellen Begriffen	36
3.5.3.	Einfluss der Gravidität auf Signaltransduktionswege.....	36
3.5.4.	Zuordnung durch Diabetes mellitus veränderter Gene zu funktionellen Begriffen...	37
3.5.5.	Einfluss eines Diabetes mellitus auf Signaltransduktionswege	38
3.5.6.	Einfluss eines Diabetes mellitus auf Proteine mit EGF-ähnlichen Domänen.....	38
3.6.	Quantifizierung des Protocadherin 15 (PCDH15) im Kaninchenendometrium	39
3.6.1.	Quantifizierung von PCDH15 mittels Western Blot	39
3.7.	Lokalisierung von PCDH15 im Kaninchenendometrium durch IHC.....	39
3.7.1.	Immunhistochemische Detektion von PCDH15 in Abhängigkeit von Diabetes mellitus und Gravidität.....	39
3.7.2.	Immunhistochemische Detektion von PCDH15 im Verlauf der Schwangerschaft des Kaninchens.....	40
3.8.	Lokalisierung von PCDH15 im humanen Endometrium durch IHC	42

3.8.1. Quantifizierung von PCDH15 im humanen Endometrium durch IHC im Verlauf des weiblichen Zyklus	42
4. Diskussion.....	45
4.1. Die Faktoren des Insulin-IGF-Systems	45
4.1.1. IGF1 und IGF2	46
4.1.2. IGF1R und Insulinrezeptor	47
4.1.3. IGF2R	47
4.1.4. IGFBP1	48
4.2. LIF und LIFR	49
4.3. RNA-Seq des Endometriums	50
4.3.1. RNA-Seq des Endometriums – Graviditätseffekt.....	51
4.3.2. Durch Gravidität veränderte Genexpression	52
4.3.3. Durch Gravidität beeinflusste Signalwege	53
4.3.4. RNA-Seq des Endometriums – Diabeteseffekt	55
4.3.5. Durch Diabetes mellitus hochregulierte Gene	56
4.3.6. Durch Diabetes mellitus herunterregulierte Gene	56
4.3.7. Durch Diabetes mellitus beeinflusste Signalwege.....	59
4.3.8. Durch Diabetes mellitus veränderte, EGF-ähnliche Domänen tragende Proteine.....	60
4.4. Protocadherin 15 im Endometrium	61
5. Zusammenfassung	62
6. Literaturverzeichnis	64
7. Thesen	79

Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bHLH	basische Helix-Loop-Helix
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BSM II	Basales synthetisches Medium II
cAMP	<i>cyclic</i> AMP
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CSF	<i>Colony stimulating factor</i>
d	<i>day</i> , Tag
DAB	Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	Destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FC	<i>fold change</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FOXO	<i>Forkhead-Box-Protein O</i>
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
ggf.	gegebenenfalls
GLUT	Glukosetransporter
GO	<i>Gene Ontology</i>
h	Stunde
HbA _{1c}	Hämoglobin A _{1c}
hCG	humanes Choriongonadotropin
HCl	Salzsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
i.m.	intramuskulär
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IGF1-R	<i>Insulin-like growth factor 1 receptor</i>
IGF2-R	<i>Insulin-like growth factor 2 receptor</i>
IGFBP	<i>Insulin-like growth factor binding protein</i>
IHC	Immunhistochemie
inkl.	inklusive
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IR	Insulinrezeptor
kg	Kilogramm
LH	Luteinisierendes Hormon

LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
LIFR	<i>Leukemia inhibitory factor receptor</i>
M	Molar
min	Minuten
mM	Millimolar
mL	Milliliter
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
N	Anzahl der Versuchswiederholungen
n	Anzahl von Versuchstieren in einer Gruppe
p. c.	<i>post coitum</i> (lat.: nach Begattung)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBST	<i>phosphate buffered saline</i> mit Tween
PCDH	Protocadherin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
PMSG	<i>Pregnant mare serum gonadotropin</i>
POPC	<i>Percentage of positive cells</i>
PVA	Polyvinylalkohol
rab	Kaninchen (<i>rabbit</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
<i>rpm</i>	Umdrehungen pro Minute
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
s. c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SEM	Standardfehler
SI	<i>staining intensity</i>
<i>Str.</i>	<i>Stratum</i>
TAE	Tris-Azetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TRIS	Tris[hydroxymethyl]-aminomethan
U	Enzymeinheit
v. a.	vor allem
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Diabetes mellitus und Schwangerschaft

Über sieben Millionen Menschen leiden in Deutschland an der Volkskrankheit Diabetes mellitus. Davon sind über 90 % von einem Typ-2-Diabetes betroffen, welcher als "Wohlstandskrankheit" v. a. im höheren Lebensalter auftritt. Pathogenetisch kommt es zu einer zunehmenden Insulinresistenz und einem relativen Insulinmangel, welcher in späteren Krankheitsstadien in einen absoluten Insulinmangel übergehen kann. Davon unterscheidet sich der in 5-10 % der Fälle auftretende Typ-1-Diabetes mellitus, welcher sich v. a. im jungen Lebensalter manifestiert. Ursächlich dafür ist meist eine Autoimmunreaktion mit Zerstörung der pankreatischen β -Zellen und einem daraus resultierenden absoluten Insulinmangel. Als Risikofaktoren gelten eine genetische Prädisposition zusammen mit bestimmten Umwelteinflüssen, z.B. viralen Infektionen (Coppeters et al., 2012).

In Deutschland gehen 0,76 % der Schwangerschaften mit einem vorbestehenden Diabetes mellitus der Mutter einher. Dabei handelt es sich in 10-20 % der Fälle um einen Typ-2-Diabetes – Tendenz steigend (S3-Leitlinie „Diabetes und Schwangerschaft“, AWMF, 2014). Davon abzugrenzen ist der Gestationsdiabetes, welcher sich erst im Laufe der 2. Schwangerschaftshälfte durch eine zunehmende Insulinresistenz der Mutter entwickelt (Kautzky-Willer et al., 1997). Die Prävalenzzahlen für den Gestationsdiabetes schwanken zwischen 0,6 % und 22 %, abhängig von der Studienpopulation, der diagnostischen Methode und der zu Grunde gelegten Grenzwerte (King, 1998; Murgia et al., 2006). Laut Institut für angewandte Qualitätsförderung und Forschung im Gesundheitswesen (AQUA) wurde in Deutschland im Jahr 2010 bei 3,7 % der Schwangerschaften ein Gestationsdiabetes diagnostiziert.

Frauen mit einem vorbestehenden Diabetes mellitus sind subfertil. In Tiermodellen konnte bei diabetischen Müttern eine verminderte Blastozystenanzahl und eine Entwicklungsverzögerung der Embryonen nachgewiesen werden (Vercheval et al., 1990; Beebe u. Kaye, 1991; Ramin et al., 2010). Bei pseudograviden Tieren führte ein Diabetes mellitus zu einem erniedrigten Uterusgewicht, zu vermindertem uterinen Blutfluss, mangelnder Dezidualisierung und Ausbildung von Spiralarterien und verringertem Progesteron- und Östrogen-Serumspiegel (Norambuena et al., 1984; Garris, 1988; Zakaria et al., 2000). Beim Menschen ist das Frühabortrisiko dreifach erhöht, die Fehlbildungsrate vierfach erhöht, wobei Herzfehler, Neuralrohrdefekte, Skelettanomalien und Fehlbildungen der ableitenden Harnwege besonders häufig vorkommen (S3 Leitlinie „Diabetes und Schwangerschaft“ AWMF 2014; Casson et al., 1997; Lorenzen et al., 1999; Nielsen et al., 2005; Wender-Ozegowska et al., 2005; Yang et al., 2006). Da die Organogenese während der ersten 8 Schwangerschaftswochen erfolgt, ist diese Periode besonders vulnerabel gegenüber diabetischen Stoffwechselstörungen (Temple et al., 2002). Diabetische Frauen sollten deshalb einen Kinderwunsch genau planen und bereits 3 Monate präkonzeptionell eine Stoffwechsoptimierung vornehmen. (Ray et al., 2001). Dabei ist ein HbA_{1c}-Zielwert von unter 6,5 % anzustreben (S3-Leitlinie „Diabetes und Schwangerschaft“, AWMF, 2014).

Perinatal treten bei 45 % der Neugeborenen metabolische Anpassungsstörungen auf. Die Kinder sind häufig makrosom und leiden postnatal an Hypoglykämie, Polyglobulie, Hypocalciämie und Hyperbilirubinämie (Cordero et al., 1998). Dadurch erhöht sich die perinatale Mortalität um das 3-Fache (Yang et al., 2006). Eine gesteigerte Frühgeburtsrate in Verbindung mit einer gestörten Surfactantbildung führen zu einem hohen Risiko, ein Atemnotsyndrom zu entwickeln (Robert et al., 1976). Auch langfristig ergeben sich Risiken für Kinder diabetischer Mütter. Es steigt die Wahrscheinlichkeit, selbst einen Diabetes mellitus oder ein Metabolisches Syndrom zu entwickeln (Clausen et al., 2008).

Um die Risiken für Mutter und Neugeborenes zu minimieren, ist eine strikte Diabetesbehandlung anhand definierter Zielparameter vor und während der Schwangerschaft unumgänglich. Bei einem vorbestehenden Diabetes mellitus ist die Insulinsubstitution die Therapie der Wahl, während bei einem Gestationsdiabetes diätische Maßnahmen meist ausreichen.

1.2. Das Endometrium

1.2.1. Das Endometrium im Verlauf des ovariellen Zyklus

Das Uteruslumen wird von der Gebärmutter Schleimhaut (Endometrium) ausgekleidet. Diese besteht aus einschichtigem Zylinderepithel und Stroma. Es wird zwischen dem *Stratum basale* (Basalis) und *Stratum functionale* (Funktionalis) unterschieden. Während das *Str. basale* über den Zyklus hinweg ein homogenes Erscheinungsbild zeigt, ändert sich die Funktionalis hormonabhängig. Während der Proliferationsphase führt die FSH (Follikelstimulierendes Hormon)-gesteuerte Östrogenproduktion des heranreifenden Follikels zum Aufbau des *Str. functionale*. Am Tag 14 löst ein LH (Luteinisierendes Hormon)-Gipfel die Ovulation aus und in der darauf folgenden Sekretionsphase kommt es progesterongesteuert zu sekretorischen Transformation und Dezidualisierung des Endometriums. Die Funktionalis lässt sich in das luminale *Str. compactum* und das basale *Str. spongiosum* unterteilen. Zum potenziellen Implantationszeitpunkt des Embryos um den 21. Zyklustag kommt es zu einem Maximum der Östrogen- und Progesteronkonzentration. Bei fehlender Implantation sinkt gegen Ende der Sekretionsphase der Progesteronspiegel ab und das Endometrium wird abgestoßen (Desquamation). Im Falle einer Befruchtung sichert das vom Embryo gebildete humane Choriongonadotropin (hCG) die Progesteronproduktion und erhält damit die Schwangerschaft aufrecht.

1.2.2. Das Endometrium und der Embryo in der Präimplantationsphase

Die Präimplantationsphase bezeichnet den Zeitraum von der Befruchtung der Eizelle bis zum Beginn der Implantation des Embryos. Beim Menschen erreicht der Embryo ca. am 4. Tag der Schwangerschaft das *Cavum uteri* und am 6. Tag beginnt die Implantation. In dieser Zeit hat der Embryo direkten Kontakt zum mütterlichen Endometrium.

Für Wachstum und Differenzierung des Embryos ist die Wirkung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen notwendig. Dazu gehören Faktoren des Insulin-IGF-Systems, der EGF (*Epidermal*

growth factor)-Familie, der TGF-beta (*Transforming growth factor beta*)-Familie, LIF (*Leukemia inhibitory factor*), FGF (*Fibroblast growth factor*), PDGF (*Platelet-derived growth factor*), CSFs (*Colony-stimulating factors*) und andere (Brigstock et al., 1989; Schultz u. Heyner, 1993; Kaye u. Harvey, 1995). Diese Faktoren werden vom Embryo zum großen Teil selbst gebildet und wirken autokrin auf den Embryo selbst und parakrin auf das Endometriumepithel. Früher ging man davon aus, dass die embryonale Entwicklung weitestgehend autonom verlaufe, da die Reifung bis zum Blastozystenstadium in einem Kulturmedium auch in vitro möglich ist (Whitten u. Biggers, 1968). Allerdings verläuft die embryonale Entwicklung in vitro entwicklungsverzögert und die Embryonen sind wachstumsretardiert (Bowman u. McLaren, 1970; Harlow u. Quinn, 1982). Dies verdeutlicht die Notwendigkeit des uterinen Milieus bei der embryonalen Entwicklung.

Das Endometrium sezerniert parakrine Faktoren in das Uterussekret, stellt endokrine Faktoren aus dem mütterlichen Blut zur Verfügung (s. Abb. 1; Kane et al., 1997; Hardy u. Spanos, 2002) und steuert dadurch Wachstum, Differenzierung und Implantation des Embryos (Fazleabas et al., 2004; Guzeloglu-Kagisli et al., 2009). Umgekehrt beeinflussen auch vom Embryo sezernierte Faktoren endometriale Prozesse (Fazleabas et al., 2004).

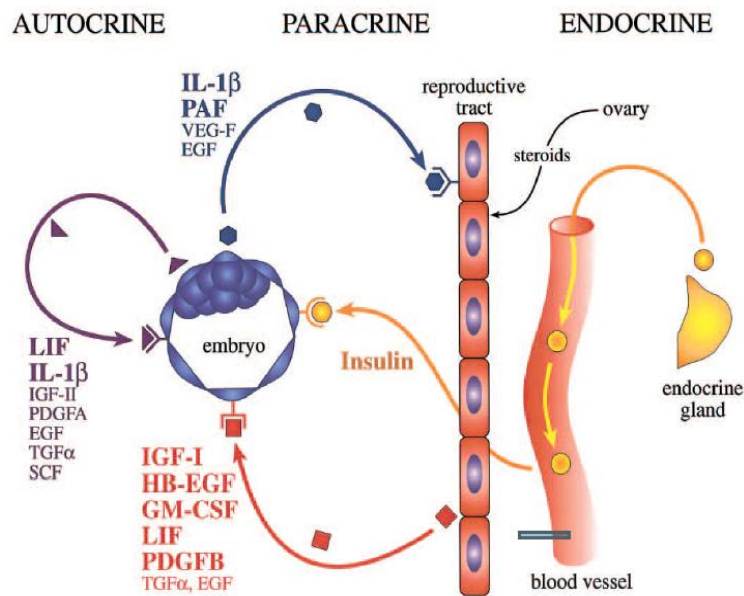


Abb. 1: Endometriale und embryonale Faktoren in der Präimplantationsphase (Hardy u. Spanos, 2002)

Dezidualisierung des Endometriums:

In Vorbereitung auf die Nidation erfolgt postovulatorisch und progesterongesteuert ein Umbau des Endometriums, der in seiner Gesamtheit als Dezidualisierung bezeichnet wird. Dabei kommt es zur sekretorischen Transformation der uterinen Drüsen, zur Einwanderung von uterinen natürlichen Killerzellen und zu einem vaskulären *Remodeling* (Gellersen et al., 2007; Lash et al., 2010).

Die Dezidua produziert Wachstumsfaktoren und Zytokine, die die embryonale Entwicklung beeinflussen. Sie spielt eine Rolle bei der Immuntoleranz gegenüber dem genotypisch fremden

Embryo und steuert die Trophoblasteninvasion (Kliman, 2000). Störungen der Dezidualisierung führen zu Fehlgeburten (Salker et al., 2010).

Morphologisch kommt es zu einer epitheloiden Transformation von endometrialen Stromazellen in polyploide, sekretorische Dezidua-Zellen (Gellersen et al., 2007). Es wird vermehrt Glykogen und Fett eingelagert, es kommt zu einer Volumenzunahme und Verdichtung der Zellen mit vermehrtem Auftreten von Lysosomen und rauem endoplasmatischem Retikulum (Cornillie et al., 1985). Die interzelluläre Kopplung nimmt durch die Bildung von Zell-Zell-Kontakten zu und es entwickeln sich Spiralarterien.

Während der Dezidualisierung ändert sich das Genexpressionsmuster umfassend. Bei Ratten konnte eine Expressionsänderung von 322 Genen nachgewiesen werden (Vallejo et al., 2010). Als Hauptsekretionsprodukte des dezidualisierten Endometriums und somit als Markerproteine gelten IGFBP1 und Prolaktin (Irwin et al., 1993). Die Gewebsveränderungen der Dezidualisierung werden nicht allein durch Progesteron gesteuert. Es sind weitere Faktoren wie Relaxin, hCG (humanes Choriongonadotropin), LH (Luteinisierendes Hormon) und Prostaglandin E2 notwendig, welche zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führen (Bartsch et al. 2001).

1.3. Das Kaninchen als diabetisches Reproduktionsmodell

Das Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) ist als Modell für Reproduktionsprozesse und die frühe Embryonalentwicklung sehr gut geeignet, da Gastrulation und Plazentation bei Kaninchen und Mensch weitestgehend vergleichbar sind (Fischer et al., 2012). Die relative Größe der Kaninchenembryonen von 2-3 mm im Blastozystenstadium erleichtert das experimentelle Arbeiten. Weiterhin weist das Kaninchen im Vergleich zu Nagern einen höheren phylogenetischen Verwandtschaftsgrad zum Menschen auf (Graur et al., 1996).

1.3.1. Die Präimplantationsphase des Kaninchens

Kaninchen haben zwei getrennte Uteri und Cervices (*Uterus duplex*). Im Gegensatz zum Menschen unterliegen sie keinem ovariellen Zyklus. Die Ovulation wird durch die Verpaarung ausgelöst (sog. induzierte Ovulation). Nach Verschmelzung von Ei- und Samenzelle im Eileiter entsteht die Zygote. Bis zum 8-Zell-Stadium sind die Blastomeren totipotent. Am Tag 2,5 *p. c.* (*post coitum*) entsteht die Morula bestehend aus 32-64 Blastomeren. Um den Tag 3,5 *p. c.* entsteht die kompaktierte Morula. Bis zu diesem Stadium bleibt das Volumen im Vergleich zur Zygote konstant. Danach erreicht der Embryo das *Cavum uteri* und es entsteht die Blastozyste mit Embryoblast und Trophoblast. Bereits vor der Implantation während des 7. Entwicklungstages beginnt mit der Gastrulation die Ausbildung der 3 Keimblätter. Dieser Vorgang wurde von Viebahn in 5 Stadien eingeteilt (Viebahn et al., 1995). Die Implantation des Embryos in das Endometrium beginnt am Tag 6,5-6,8 *p. c.* (Daniel 1964).

Durch das Fehlen eines ovariellen Zyklus unterliegt das Kaninchenendometrium keinen zyklischen Schwankungen mit einer Desquamation. Allerdings kommt es im Rahmen einer Schwangerschaft und den damit verbundenen hormonellen Veränderungen bereits vor der Implantation zu

Veränderungen des Endometriums (Beier u. Beier-Hellwig 1973). Neben der hormonellen Situation der Mutter hat auch der Embryo selbst, durch Sezernierung parakriner Faktoren oder durch direkten mechanischen Kontakt, Einfluss auf das Endometrium (Beier u. Kühnel, 1973; Parandoosh et al., 1995). Um den hormonellen vom embryonalen Einfluss unterscheiden zu können, ist es sinnvoll, neben der Versuchstiergruppe der graviden eine weitere Gruppe mit sog. pseudograviden Tieren einzuführen. Mit beiden Gruppen wird experimentell identisch verfahren (hormonelle Stimulation mit PMSG und Auslösung der Ovulation mit hCG), allerdings unterbleibt bei den pseudograviden Tieren die Verpaarung. Beide Versuchstiergruppen unterscheiden sich demnach ausschließlich in dem Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein von Embryonen und sind gute Modelle für die Lutealphase der Frau mit einer bzw. ohne eine Konzeption (Fischer et al., 1985; Busch et al., 1986).

1.3.2. Induktion eines experimentellen Diabetes mellitus

Ein experimenteller Diabetes mellitus kann beim Kaninchen mit den Chemikalien Alloxan oder Streptozotocin induziert werden (Lenzen, 2008). Alloxan wird aufgrund seiner Strukturähnlichkeit zu Glukose über den GLUT-2 (Glukosetransporter 2) insulinunabhängig in die pankreatischen β -Zellen aufgenommen (Gorus et al., 1982). Als starkes Oxidationsmittel kommt es hier zur Bildung von Sauerstoffradikalen (*reactive oxygen species* (ROS)) und damit zur Zerstörung der β -Zellen (Munday et al., 1993). Obwohl GLUT-2 auch in Leber, Niere und Darm vorkommt, zerstört Alloxan in den verwendeten Konzentrationen aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit (ca. 1,5 Minuten) und der großen Vulnerabilität der β -Zellen gegenüber ROS nur diese selektiv (Tiedge et al., 1997). Der daraufhin veränderte Blutglukosespiegel lässt sich charakteristischerweise in 4 Phasen einteilen (Tasaka et al., 1988). Etwa 12 Stunden nach Alloxangabe stellt sich eine permanente Hyperglykämie ein. Nur durch Insulinsubstitution kann eine ketoazidotische Stoffwechsellage, die unbehandelt zum Tod des Versuchstieres führen würde, verhindert werden.

1.4. Das Insulin-IGF-System

Das Insulin-IGF-System umfasst die Hormone Insulin, die insulinähnlichen Wachstumsfaktoren IGF1 und IGF2, deren Rezeptoren sowie die IGF-bindenden Proteine IGFBP1 bis IGFBP6. Zu den Rezeptoren zählen der Insulinrezeptor, der IGF1-Rezeptor (IGF1R) und der IGF2-Rezeptor (IGF2R). Über das Insulin-IGF-System werden sowohl Stoffwechselprozesse, als auch Proliferation, Differenzierung und Apoptose gesteuert (Annunziata et al., 2010).

1.4.1. Insulin, IGF1 und IGF2

Das Peptidhormon Insulin wird ausschließlich in den β -Zellen des Pankreas gebildet. Es besteht aus einer A-Kette mit 21 Aminosäuren und einer B-Kette mit 30 Aminosäuren. Insulin wird bei hohen Blutglukosespiegeln ausgeschüttet. Glukose wird über GLUT-2 (Glukosetransporter 2) in die pankreatischen β -Zellen aufgenommen und unter ATP-Bildung vollständig abgebaut. Äquivalent zur Menge an gebildetem ATP wird Insulin ins Blut freigesetzt.

Insulin ist das wichtigste anabole Hormon. Es senkt den Blutglukosespiegel, aktiviert die Glykolyse, die Fettsäuresynthese, die Glykogensynthese und die Proteinbiosynthese. Außerdem hemmt es die Glykogenolyse und Glukoneogenese. Neben seiner Funktion bei Stoffwechselprozessen ist Insulin mitogen aktiv und reguliert Wachstum und Differenzierung, was während der embryonalen Entwicklung von besonderer Bedeutung ist. Da der Embryo in der Präimplantationsphase nicht zur Insulinproduktion befähigt ist, wird Insulin über das Uterussekret aus dem systemischen Kreislauf der Mutter bereitgestellt.

Die insulinähnlichen Wachstumsfaktoren IGF1 und IGF2 sind zu Insulin ca. 50 % sequenzhomolog. Hauptsyntheseort der endogenen IGFs ist die Leber, wobei für IGF1 die Regulation über das Wachstumshormon (GH) erfolgt. Aber auch zahlreiche andere Gewebe produzieren parakrin und autokrin wirksame IGFs, darunter das Endometrium und die Blastozyste (Murphy et al., 1987; Thieme et al., 2012).

Während in adulten Geweben die IGF1-Expression überwiegt, dominiert IGF2 in fötalen Geweben und Serum (Han et al., 1988). Damit gilt es als einer der wichtigsten embryonalen Wachstumsfaktoren. IGF2-defiziente Mäuse kommen wachstumsretardiert zur Welt, während die postnatale Entwicklung regelrecht verläuft (DeChiara et al., 1990). Eine Überexpression von IGF2 dagegen führt zu fetalem Überwuchs mit einer Symptomatik ähnlich der des Beckwith-Wiedemann-Syndroms (Sun et al., 1997). In adulten Geweben kommt IGF2 nur noch schwach exprimiert vor mit einem Maximum im Gehirn (Lund et al., 1986).

IGF1 erreicht den Embryo über den endokrinen, parakrinen und autokrinen Weg. In der Blastozyste erhöht IGF1 die Zellzahl und hat anti-apoptotische Effekte (Valezquez et al., 2009). Mutationen im IGF1-Gen führen zu Wachstumsverzögerung und mentaler Retardierung (Denley et al., 2005). IGF1-*knock-out*-Mäuse sterben meist nach der Geburt. Die lebensfähigen Tiere sind infertil (Butler u. LeRoith, 2001). Das Geburtsgewicht von IGF1-mutierten Mäusen ist um mehr als 60 % verringert (Powell-Braxton, 1993).

Im Endometrium werden die IGFs in den Stromazellen, nicht jedoch in den Epithelzellen gebildet (Zhou et al., 1994). IGF1 hat sein Expressionsmaximum in der späten Proliferations- und frühen Sekretionsphase. Es wird über Östrogen gesteuert (Norstedt et al., 1989; Umayahara et al., 1994). Dagegen wird IGF2 v. a. mittel- bis spätsekretorisch und in der Schwangerschaft gebildet. Damit spielt es eine Rolle bei der Dezidualisierung und Implantation (Giudice et al. 1993; Han et al., 1996; Irwin u. Giudice, 1998).

1.4.2. IR, IGF1R und IGF2R

IR und IGF1R

Der Insulinrezeptor (IR) und der IGF1-Rezeptor (IGF1R) gehören zur Familie der Tyrosinkinase und ähneln sich stark in ihrer Struktur. Als Tetramere bestehen sie aus zwei extrazellulär gelegenen α - und zwei transmembranären β -Untereinheiten. Durch Bindung der Liganden kommt es zur Autophosphorylierung der β -Untereinheiten und zur Phosphorylierung von Tyrosinresten, welche als Andockstelle für weitere Signalmoleküle dienen.

Der Insulinrezeptor kommt in zwei Splicevarianten als IR-A und IR-B vor (Ullrich et al., 1985). Während über den IR-B die klassischen metabolischen Funktionen des Insulin gesteuert werden, hat der hauptsächlich in embryonalen Geweben vorkommende IR-A vor allem mitogene Aktivität (Denley et al., 2005). Weiterhin gibt es Hybridrezeptoren: den IR-A/IGF1R und den IR-B/IGF1R (Baillyes et al., 1997).

Die Liganden des Insulin-IGF-Systems binden mit unterschiedlicher Affinität an den Insulinrezeptor und IGF1R (Chao u. D'Amore, 2008, Übersichtsartikel). An die Insulinrezeptoren bindet Insulin mit hoher Affinität, an den IR-A auch IGF2 (Louvi et al., 1997). An den IGF1R binden IGF1 und IGF2 mit hoher Affinität, Insulin erst bei hohen Konzentrationen (Baudry et al., 2001).

Zum zentralen Vermittler der IR/IGF1R-Wirkung gehört der Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt (PI3-Kinase/Akt)-Signalweg. Die typischen Stoffwechselwirkungen des Insulins und antiapoptotische Prozesse werden hauptsächlich über diesen Signalweg gesteuert (Kulik et al., 1997; Saltiel u. Kahn, 2001).

Die mitogene Aktivität von Insulin und IGF wird über den MAPK/Erk-Signalweg vermittelt, wodurch Proliferation, Differenzierung und Mitose der Zelle beeinflusst werden (Baserga et al., 1994; Resnicoff et al., 1995; Surmacz et al., 1995). Vor allem der IGF1R und IR-A vermitteln darüber ihre Wirkung.

Sowohl das Endometrium als auch die Blastozyste exprimieren den IR und IGF1R (Rutanen 1998; Ramin et al., 2010). IGF1R und IGF2R werden im Endometrium über den Zyklus hinweg stetig exprimiert mit einem Anstieg während der Dezidualisierung (Ganeff et al., 2009). Sie kommen v. a. in den Epithelzellen, weniger im Stroma vor (Zhou et al., 1994).

IR- und IGF1R-*knock-out*-Mäuse kommen wachstumsretardiert zur Welt und sterben unmittelbar postnatal (Liu et al., 1993; Accili et al., 1996).

IGF2-R:

Der IGF2-Rezeptor (IGF2R) ist aus einer langen, extrazellulären und einer kurzen, transmembranären Domäne aufgebaut. Er gehört zur Gruppe der Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren, welche gebundene Liganden dem lysosomalen Abbau zuführen (Oka et al., 1985). Neben IGF2 gibt es weitere Liganden, z.B. LIF (Blanchard et al., 1999), deren Bioverfügbarkeit über den IGF2R gesteuert wird. Dementsprechend bezeichnet man den IGF2R auch als „*Clearance-Receptor*“. Die Bedeutung dieser Funktion zeigt sich bei mutiertem IGF2R: Es kommt zu fetalem Überwuchs und perinatalem Tod (Lau et al., 1994). Daneben scheint der IGF2R in verschiedene G-Proteingekoppelte Signalwege einzugreifen und somit z.B. die Zellmigration zu aktivieren (Murayana et al., 1990; McKinnon et al., 2001).

1.4.3. IGFBP1

Anders als Insulin werden die IGFs durch Bindeproteine stabilisiert. Davon sind sechs verschiedene Isoformen beim Säuger bekannt (Clemmons et al., 1995). Das im Blut vorherrschende Bindeprotein ist das IGFBP3 (Baxter, 1994). Es bindet als ternärer Komplex zusammen mit einer säurelabilen

Untereinheit (ALS) 90 bis 96 % des IGF1 im Serum. Dadurch erhöht sich dessen Halbwertszeit von ca. 20 Minuten als freie Form auf 15 Stunden (Guler et al., 1987).

Die IGFs haben eine deutlich höhere Affinität zu den IGFBP als zum IGF1R. Über die Komplexbildung der IGFs mit ihren Bindeproteinen wird die Bioverfügbarkeit der IGFs gesteuert, denn erst nach proteolytischer Abspaltung des IGFBP kann freies IGF an seine Rezeptoren binden (Hwa et al., 1999).

Im Endometrium wurden alle sechs IGFBP nachgewiesen (Zhou et al., 1994), wobei für die parakrine Verfügbarkeit von IGF das IGFBP1 die größte Rolle spielt. IGFBP1 kommt ausschließlich im stromalen Endometrium vor (Julkunen et al., 1988). Während in der Proliferationsphase kein IGFBP1 exprimiert wird, kommt es in der Sekretionsphase im Rahmen der Dezidualisierung zu einem starken Anstieg der Expression mit einem Maximum in der späten Sekretionsphase und während der Schwangerschaft. Das IGFBP1 gilt dadurch als Hauptsekretionsprodukt und als Markerprotein des dezidualisierten Endometriums (Irwin et al., 1993; Zhou et al., 1994; Han et al., 1996).

IGFBP1 bindet sowohl IGF1 als auch IGF2. Es steuert deren Verfügbarkeit im embryo-maternalen Raum und beeinflusst damit sowohl die embryonale Entwicklung als auch Differenzierung und Dezidualisierung des Endometriums (Ganefff et al., 2009). IGFBP1 enthält eine sog. RGD-Sequenz, mit der es an das Integrin 5 beta 1 (Fibrinrezeptor) bindet und somit die Zellmigration stimuliert. (Jones et al., 1993). Im Endometrium spielt diese Interaktion bei der Migration des Trophoblasten eine Rolle (Gleeson et al., 2001). IGF-unabhängige Wirkungen wurden durch Bindung an die Extrazellulärmatrix bzw. an Zelloberflächenrezeptoren beobachtet (Firth u. Baxter, 2002).

Die transkriptionelle Regulation des IGFBP1 erfolgt durch Progesteron (Bell et al., 1991; Gao et al., 1999) und Insulin. Insulin hemmt die IGFBP1-Transkription über Phosphorylierung von FOXO1 und FOXO3 (*Forkhead-Box-Protein O*) durch die Proteinkinase B (Guo et al., 1999; Hall et al., 2000; Kim u. Fazleabas, 2004). Beide Transkriptionsfaktoren binden dephosphoryliert am IRE (*Insulin Responsive Element*) des IGFBP1-Promotors und aktivieren die Transkription. Nach Phosphorylierung durch Insulin verlassen FOXO1 und FOXO3 den Kern und die IGFBP1-Transkription stoppt. Weiterhin wurde eine Regulation über die IGFs beschrieben. Geringe IGF-Konzentrationen stimulieren, während hohe IGF-Konzentrationen die IGFBP1-Expression hemmen (Irwin et al., 1993; Poretsky et al., 1996).

Auch über posttranslationale Modifizierung wird die Bioverfügbarkeit des IGFBP1 reguliert. Dazu gehören Polymerisation (Sakai et al. 2001) und Proteolyse (Coppock et al., 2004). Einen weiteren regulatorischen Einfluss hat der Phosphorylierungsstatus des IGFBP1. Dieses kann an drei Serinen phosphoryliert werden, wodurch 5 Phosphoisofomere existieren. Die vollständig phosphorylierte Form hat eine sechsfach höhere Affinität zu IGF1 als die dephosphorylierte Form (Jones et al., 1991; Miell et al., 1997; Westwood et al., 1997). Somit senkt phosphoryliertes IGFBP1 die Bioverfügbarkeit für IGF1, während durch dephosphoryliertes IGFBP1 sogar eine Erhöhung der Aktivität von IGF1 möglich ist (Elgin et al., 1987; Jones et al., 1991). Während im

Erwachsenenkreislauf v. a. das phosphorylierte IGFBP1 vorkommt, dominieren im Kreislauf von Schwangeren, im Endometrium und in der Amnionflüssigkeit wenig- bzw. nichtphosphorylierte Formen (Westwood et al., 1994; Jones et al., 1991). Auf die Affinität zu IGF2 hat der Phosphorylierungsstatus von IGFBP1 keinen Einfluss (Westwood et al., 1997).

1.5. LIF und LIFR

Leukemia Inhibitory Factor (LIF) ist ein Glykoprotein, welches eine Schlüsselrolle bei der Initiierung und Erhaltung der Frühschwangerschaft spielt. LIF hat pleiotrope Effekte in vielen Zellsystemen und steuert Proliferation und Differenzierung (Metcalf, 1992). Vermittelt wird seine Wirkung über den LIF-Rezeptor (LIFR), ein Transmembranprotein, welches ein Heterodimer mit Glycoprotein 130 (Gp130) bildet. Die LIFR-Signaltransduktion wird über verschiedene Signalwege wie den JAK/STAT-, den MAPK- oder den PI3-Kinase-Weg vermittelt (Duval et al., 2000).

LIF und LIFR werden im Endometrium während des gesamten Zyklus stetig exprimiert. In der mittleren bis späten Sekretionsphase, zum Zeitpunkt der Implantation, steigt die Expression stark an. Das hohe Expressionsniveau bleibt während der Frühschwangerschaft erhalten (Charnock-Jones et al., 1994; Arici et al., 1995). Die Regulation von LIF im Kaninchen und beim Menschen erfolgt hauptsächlich über Progesteron (Yang et al., 1996). Bei LIF-defizienten Mäusen bleibt die Dezidualisierung des Endometriums aus und es kommt zu keiner Implantation. Bei einem Transfer von LIF-*knock-out*-Blastozysten in Wildtyp-Mäuse findet eine regelrechte Implantation und Entwicklung statt (Stewart et al., 1992).

Auch in der Blastozyste werden LIF und LIFR exprimiert (Conquet and Brulet, 1990; Charnock-Jones et al., 1994; Lavranos et al., 2005). In Mäuseblastozysten mit mutiertem LIFR erfolgt die Implantation zwar regelhaft, es kommt aber zu einer Entwicklungsverzögerung und zum perinatalem Tod (Ware et al. 1995).

LIF spielt also nicht nur eine wichtige Rolle bei der Implantation, sondern auch bei der embryonalen Entwicklung danach. Damit ist LIF ein entscheidender Faktor bei der Pathogenese von In- und Subfertilität. Im Uterus von Frauen mit idiopathischer Infertilität ist LIF verringert (Mikołajczyk et al. 2003; Wu et al., 2013).

1.6. Protocadherin 15 (PCDH15)

Die Superfamilie der Cadherine sind calciumabhängige Zelladhäsionsproteine. Sie spielen eine Rolle bei der Zell-Zell-Erkennung, der Signaltransduktion, der Embryogenese und bei der neuronalen Entwicklung (Takeichi, 1988; Yagi und Takeichi, 2000). Die phylogenetisch ältesten Cadherine sind die Protocadherine, die sich durch ihren Bau von anderen Mitgliedern der Cadherin-Familie unterscheiden. Mehr als 80 Protocadherine sind derzeit bekannt (Weiner u. Jontes, 2013). Sie kommen in zahlreichen Geweben vor, mit der stärksten Expression im ZNS (Murcia u. Woychik, 2001; Sano et al., 1993).

Klassische Protocadherine bestehen aus 6 bis 7 extrazellulären Cadherin-Domänen, einer transmembranären Domäne und einer hochkonservierten, spezifischen, zytoplasmatischen Domäne, welche mit dem Zytoskelett interagiert (Suzuki, 1996; Morishita u. Yagi, 2007).

Sie spielen eine essentielle Rolle bei der neuronalen Entwicklung, der Formation des Neuralrohres, dem Axonwachstum und der Synapsenfunktion (Redies et al., 2012). In Protocadherin 12-defizienten Mäusen kommt es zu einer Verringerung der Embryonengröße und zu einer Abnahme von Zelldichte, Vaskularisation und Größe der Plazenta (Rampon et al., 2008). Beim Krallenfrosch (*Xenopus*) konnte der Einfluss von NF-Protocadherin auf die Formation des Ektoderms während der Gastrulation und von P APC (*paraxial Protocadherin*) auf die Somitogenese nachgewiesen werden (Bradley et al., 1998; Kim et al., 2000). Auch beim Zebrafisch wird eine Rolle von Protocadherinen bei Zellmigrationsvorgängen während der Gastrulation angenommen (Yamamoto et al., 1998).

Protocadherin 15 wurde bisher in ZNS, Niere, Lunge, Herz und Milz nachgewiesen (Rouget-Quermalet et al., 2006). Im Endometrium wurde Protocadherin 15 bisher nicht beschrieben.

Im Gegensatz zu anderen Protocadherinen trägt PCDH15 11 extrazelluläre Domänen und wird daher auch als *Protocadherin-like-molecule* bezeichnet (Nakajima et al., 2001; Alagramam et al., 2001). Drei Isoformen sind bekannt, welche durch alternatives *Splicing* entstehen (Ahmed et al., 2003; Rouget-Quermalet et al., 2006).

Bisher wurde PCDH15 intensiv ausschließlich im Innenohr untersucht. Hier ist es Bestandteil der *Tip-Links*, die die Stereozilien der inneren Haarzellen miteinander koppeln. Auch in der *Retina* wird Protocadherin 15 exprimiert. Eine Mutation führt zum Usher-Syndrom 1F, welches durch angeborene Taubheit und eine sich im Verlauf des Lebens entwickelnde *Retinitis pigmentosa* mit terminaler Blindheit gekennzeichnet ist.

1.7. Next Generation Sequencing (RNA-Seq)

Die Methode der Hochdurchsatzsequenzierung (*Next Generation Sequencing* (NGS) oder RNA-Seq) bietet die Möglichkeit, neue, für die embryo-maternale Interaktion relevante Gene zu identifizieren. Mithilfe von RNA-Seq im diabetischen Tiermodell des Kaninchens können durch einen Diabetes mellitus veränderte Faktoren detektiert werden. Das Potential von RNA-Seq besteht darin, nicht nur die veränderten Faktoren aufzulisten, sondern diese in einen biologischen Zusammenhang zu bringen und beeinflusste Signalwege und biologische Prozesse aufzuzeigen.

Das *Next Generation Sequencing* beruht auf der Sequenzierung des kompletten Transkriptom, also des kompletten Pools an mRNA (*messenger Ribonukleinsäure*) eines Gewebes. Damit erlaubt es eine Aussage über Quantität und Gensequenz aller exprimierten Gene (Wang et al., 2009). Pionier dieser Technik war die Firma Roche mit dem *Genome Sequencer* (GS) im Jahr 2004. Seitdem entwickelte sich die Technologie stark weiter mit derzeit 4 Anbietern für NGS-Systeme.

Im Vergleich mit den hybridisierungsbasierten Methoden der DNA-Mikroarray-Technologie weist RNA-Seq eine Reihe von Vorteilen auf:

1. Die hohe Sensitivität ermöglicht die Detektion von schwach exprimierten Genen (1 Kopie pro Zelle).
2. Der hohe dynamische Bereich erlaubt die gleichzeitige Analyse von sehr häufigen und sehr seltenen Transkripten (Costa et al., 2010).
3. Durch eine hohe Spezifität lassen sich auch strukturell ähnliche Sequenzen unterscheiden, was die Detektion von SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) oder posttranskriptionellen Modifikationen wie alternativem *Splicing* ermöglicht.

Die Nachteile von hybridisierungsbasierten Methoden wie Kreuzhybridisierung, ein hohes Hintergrundsignal und die Anwendbarkeit nur bei Spezies, deren Genomsequenz bereits bekannt ist, treten bei RNA-Seq nicht auf (Wang et al., 2009).

Das Prinzip der Detektion aller aktivierten Gene beruht auf der Analyse der gesamten mRNA eines Gewebes. Vor der eigentlichen Sequenzierung wird für jedes zu untersuchende Individuum eine cDNA-Bibliothek aus dem jeweiligen Gewebe erstellt. Dafür wird mit Hilfe von Oligo-dT-*coated magnetic beads* die mRNA mit ihrem Poly-A-Schwanz isoliert, fragmentiert, in cDNA umgeschrieben und anschließend mit einer probenspezifischen Adaptersequenz ligiert. Über diese Adaptoren binden die cDNA-Fragmente an die *Flowcell*-Oberfläche und werden amplifiziert, sodass *Cluster* von Sequenzen der gleichen Ausgangssequenz entstehen. Bei Verwendung der Illumina-Technologie entstehen somit pro cDNA-Bibliothek 12,5 Mio. je 76 Bp lange DNA-Sequenzen. Diese werden als Gemisch sequenziert, wobei später die Zuordnung zu den einzelnen Individuen anhand von kurzen Kodierungssequenzen innerhalb der Adaptersequenzen möglich ist.

Die Sequenzierung erfolgt ähnlich dem Prinzip der Sanger-Kettenabbruchmethode. Jedes Nukleotid ist mit einem von 4 spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Bei Einbau eines Nukleotides stoppt die Polymerase und der abgespaltene Fluoreszenzfarbstoff wird von einem Laser detektiert.

Zur bioinformatischen Auswertung der Daten werden die erhaltenen Sequenzen mit den genomischen Sequenzen der jeweiligen Spezies aligniert und den entsprechenden Genen zugeordnet. Die Transkriptmengen verschiedener Versuchsgruppen können miteinander verglichen und differenziell exprimierte Gene biologischen Prozessen bzw. Signalwegen zugeordnet werden.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden am Kaninchen durchgeführt. Das Genom des Kaninchens ist seit 2005 entschlüsselt (Broad Institute of MIT and Harvard, "Rabbit Genome Project").

1.8. Zielstellung der Arbeit

Im Rahmen eines Diabetes mellitus Typ-1 kommt es durch das Fehlen von Insulin zu einer Störung der embryo-maternalen Kommunikation bereits in der Präimplantationsphase. Damit einher geht eine verringerte Fertilität der Frau. Im Tiermodell konnte eine Verringerung der Embryonenzahl um 40 % sowie eine Entwicklungsverzögerung der Blastozysten nachgewiesen werden (Vercheval et al., 1990; Beebe u. Kaye, 1991; Ramin et al., 2010).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss eines maternalen Diabetes mellitus Typ-1 auf Markermoleküle im Endometrium zu untersuchen. Für die In-vivo-Untersuchung wurde das diabetische Schwangerschaftsmodell des Kaninchens genutzt. Folgende Ziele wurden verfolgt:

1.) Quantifizierung der Transkriptmenge von Faktoren des Insulin-IGF-Systems (**IGF1**, **IGF2**, Insulinrezeptor (**IR**), IGF1-Rezeptor (**IGF1-R**), IGF2-Rezeptor (**IGF2-R**)) und von **LIF** bzw. LIF-Rezeptor (**LIFR**) im Kaninchenendometrium.

2.) Quantifizierung von **IGFBP1** in Endometrium und Blastozysten des Kaninchens.

Genannte Faktoren wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht, da sie eine Schlüsselrolle in der frühen Embryonalentwicklung spielen. Für einige Faktoren des Insulin-IGF-Systems existieren bereits Untersuchungsbefunde aus Vorversuchen (Thieme et al., 2012). LIF wurde in die Studie eingeschlossen, da es als Implantationsfaktor unverzichtbar für die Initiierung und den Erhalt der Frühschwangerschaft ist.

3.) Transkriptomanalyse des Kaninchenendometriums durch *Next Generation Sequencing* – Einfluss von Gravidität und Diabetes mellitus auf endometriale Faktoren.

Next Generation Sequencing ist eine geeignete Methode, um neue, für die embryo-maternale Interaktion relevante und durch einen Diabetes mellitus veränderte Gene zu identifizieren und in einen funktionellen Zusammenhang zu bringen.

4.) Charakterisierung von Protocadherin 15 (**PCDH15**) im Endometrium des Kaninchens und des Menschen.

Protocadherin 15 wurde in der RNA-Seq-Analyse als ein durch Gravidität stark herunterreguliertes Gen identifiziert und daher tiefergehend untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien, Enzyme, Kits, Oligonukleotide, Antikörper und Software

2.1.1. Chemikalien

Acrylamid	Serva GmbH, Heidelberg
Agar-Agar	Carl-Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Oldendorf
Alloxan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
APES (Aminopropyltriethoxysilan)	Merck, Darmstadt
α -D-Glucose	Serva GmbH, Heidelberg
Aminocapronsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampicillin	Carl-Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β -Mercaptoethanol	Serva GmbH, Heidelberg
BSM II	Biochrom AG, Berlin
Bovines Serum Albumin (BSA)	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Bradford-Reagenz	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bromphenolblau	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Chloroform	Carl-Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)	WAK-Chemie GmbH, Steinbach/Ts.
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT)	Carl-Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
DNA-Leiter 100 Bp Gene Ruler	Fermentas, St. Leon-Rot
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Fermentas, St. Leon-Rot
Domitor® SPC	Janssen Animal Health, Neuss
ϵ -Aminocarbonsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Eisessig	Carl-Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Carl-Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin
Glycerin	Serva GmbH, Heidelberg
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Carl-Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
Histoclear	Biozym, Oldendorf
Histomount	Biozym, Oldendorf
Humanes Choriongonadotropin (hCG)	Intervet, Unterschleißheim
Insulin Insuman®	Sanofi Aventis, München
Immobilon™ Western Detection Reagents	Millipore, Schwalbach
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Carl-Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
Lantus®	Sanofi Aventis, Frankfurt am Main
Kalium-Aluminium-Sulfat	Merck, Darmstadt
Ketanest®	Pfizer, Karlsruhe
Kochsalzlösung (isotonisch)	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
Magermilchpulver	FSI GmbH & Co.KG, Zeven
Methanol	Carl-Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
Natriumacetat	Serva GmbH, Heidelberg
Natriumchlorid	Carl-Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
Nitrozellulosemembran	Amersham Biosciences, Freiburg
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva GmbH, Heidelberg
Oligonukleotide	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraffin	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Pentobarbital	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Penicillin	Gibco, Karlsruhe
Pepton	Carl-Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
Phosphate buffer solution (PBS) Dulbecco	Biochrom AG, Berlin
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polyvinylalkohol (PVA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG)	Intervet, Unterschleißheim
Random Primer	Roche Diagnostics, Mannheim
Reika Kraftfutter	Reinsdorf Kraftfutterwerk,
RNAlater®	Applied Biosystems, Darmstadt
Salzsäure (36 %)	Carl-Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
SM 0671 Prestained Protein ladder	Fermentas, St. Leon-Roth
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tris[hydroxymethyl]-aminomethan (TRIS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
TRIzol Reagent®	Invitrogen, Karlsruhe
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
X-Gal	Carl-Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
Ziegenserum	Dianova, Hamburg
Zitronensäure	Merck, Darmstadt
5× Reaktionspuffer	Fermentas, St. Leon-Rot
10× PCR-Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
2× Rapid Ligation Buffer	Promega GmbH

2.1.2. Enzyme und Kits

ApaI (10 U/μL)	Fermentas, St.Leon-Rot
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Crimson <i>Taq</i> ™ DNA-Polymerase (5 U/mL)	NEB, Frankfurt
DNA-free™ (DNase-Treatment & Removal)	Ambion INC, Austin
Dynabeads® mRNA Direct™ Kit	Invitrogen, Karlsruhe
pGEM-T Vektor Kit	Promega GmbH, Mannheim
Protease-Inhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
Phosphatase-Inhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
rRNasin® RNase Inhibitor (40 U/μL)	Fermentas, St. Leon-Rot
MESA Blue qPCR® Mastermix Plus for SYBR® Assay	Eurogentec, Köln
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
QiAquick® Gel Extraction Kit (250)	Qiagen, Hilden
Reverse Transkriptase RevertAid™ H Minus (200 U/μL)	Fermentas, St. Leon-Rot
SacI (10 U/μL)	Fermentas, St. Leon-Rot
SYBR® Green	Biorad, München
T4 DNA-Ligase (3 U/μL)	Promega GmbH, Mannheim

2.1.3. Oligonukleotide

Tab. 1: Real Time PCR- und PCR-Primer

Die *Annealing*-Temperatur für alle verwendeten Primer liegt bei 60 °C.

Primer	Strang-spezifität	Basen-anzahl	Sequenz 5'→3'	Produkt-länge [Bp]	qRT-PCR-System
rab LIF	<i>forward</i> <i>reverse</i>	22 18	TTCTCTATTACACAGCCCAAGG GTGGCGTTGAGTTTGCTG	104	StepOne
rab LIFR	<i>forward</i> <i>reverse</i>	20 20	TCGGAAGCGAGAATGGATTA CACTGCTTCCTCACAGACA	229	StepOne
rab IGF1	<i>forward</i> <i>reverse</i>	24 24	TGGTGGATGCTCTTCAGTTCGTGT GCTGATACTTCTGAGTCTTGG GCA	237	StepOne

rab IGF2	<i>forward</i> <i>reverse</i>	21 20	TGGAAGAACTTGCCCCACGGAG GCTGCATTGCTGCTTACCGC	286	StepOne
rab IGF1-R	<i>forward</i> <i>reverse</i>	21 20	CCCAAGCTCACGGTCATCACTG ATGGGCTTCTCTCCAAGGTCC	347	StepOne
rab IR	<i>forward</i> <i>reverse</i>	20 20	ACCGACTACCTGCTGCTGTT TGACCAGCGCATAGTTGAAG	112	StepOne
rab IGF2-R	<i>forward</i> <i>reverse</i>	22 22	CGGCATGGCAACCTGTATGACC TGTCGATGGTCGGGCAGATGTC	127	StepOne
rab IGFBP1	<i>forward</i> <i>reverse</i>	20 20	TTCCACTTGATGGCCTCTTC ACGTCTCACACTGCTTGCTG	247	iQ5
rab GAPDH	<i>forward</i> <i>reverse</i>	19 24	GCCGCTTCTTCTCGTGCAG ATGGATCATTGATGGCGACAACAT	144	StepOne iQ5

2.1.4. Antikörper

<i>Goat-anti-mouse, labelled Polymer, HRP-konjugiert</i>	Dako, Hamburg
<i>Goat-anti-mouse-IgG, HRP-konjugiert</i>	Dianova, Hamburg
<i>Mouse-anti-human β-Aktin, monoclonal</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Mouse-anti-human IGF1, WH0003484M1</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Mouse-anti-human IGF1, sc-25257</i>	Santa Cruz, Heidelberg
<i>Mouse-anti-human PCDH15, sc-377235</i>	Santa Cruz, Heidelberg

2.1.5. Software

BioCaptMW	Vilber Lourmat, Eberhardzell
<i>BZ image analysis application</i>	Keyence GmbH, Neu-Isenburg
<i>BZ 8100 observation application</i>	Keyence GmbH, Neu-Isenburg
<i>DAVID Bioinformatics Resources 6.7</i>	National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda (USA)
Fusion-CAPT-Steuerungs- und Analyse-Software	Peqlab, Erlangen
Generunner	Hastings Software, Inc, N.Y. (USA)
SigmaPlot® 11	Systat Software GmbH, Erkrath
StepOne™ Software	Applied Biosystems, Darmstadt
Zotero 3.0.8	Center for History and new Media, Fairfax (USA)

2.2. Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um geschlechtsreife New Zealand ZiKa Hybrid-Kaninchen mit einem Körpergewicht von 3,5 bis 4,5 kg. Die Tiere wurden von dem Züchter R. Krieg aus Niederwünsch (Sachsen-Anhalt) bezogen.

2.2.1. Versuchstierhaltung

Die Tiere wurden in Einzelkäfigen in den Räumen des ZMG (Zentrum für medizinische Grundlagenforschung) bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 h gehalten. Wasser stand *ad libitum* zur Verfügung, als Futter diente handelsübliches Trockenfutter (Reika Kraftfutter). Nach einer Eingewöhnungsphase von drei Wochen wurden die Tiere in vier Gruppen eingeteilt und gemäß dem Schema in Abb. 2 behandelt.

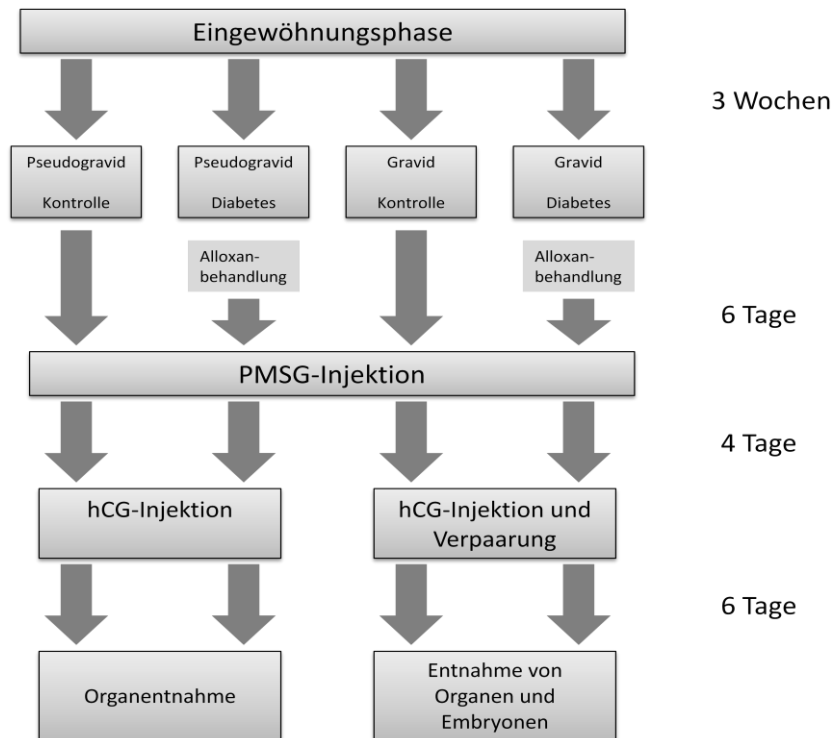


Abb. 2: Ablauf Kaninchenversuch

(PMSG= *Pregnant Mare Serum Gonadotropin*, hCG= humanes Choriongonadotropin)

2.2.2. Versuchsgruppen

1. Pseudogravide Tiere ohne Diabetes mellitus (Pseudogavid Kontrolle)
2. Pseudogravide Tiere mit Diabetes mellitus (Pseudogavid Diabetes)
3. Gravide Tiere ohne Diabetes mellitus (Gravid Kontrolle)
4. Gravide Tiere mit Diabetes mellitus (Gravid Diabetes)

2.2.3. Alloxanbehandlung

Ein experimentell induzierter Diabetes mellitus wurde durch die Injektion der Chemikalie Alloxan hervorgerufen. Nach einem Futterentzug über 16 Stunden wurden die Tiere mit Dormitor® i.m. (0,25 mg/kg Körpergewicht; Wirkstoff: Medetomidine) und Ketanest® i.m. (15 mg/kg Körpergewicht; Wirkstoff: Ketamin) sediert und analgesiert. Nach 10 Minuten wurde die Alloxanlösung (120 mg/kg Körpergewicht in mindestens 10 ml PBS gelöst) über die *Vena auricularis lateralis* als Bolus verabreicht und anschließend mit 10 ml physiologischer Kochsalzlösung nachgespült. Zur Vorbeugung von Hypoglykämien wurde den Tieren nach weiteren 10 Minuten 50 mL 27,5 %ige Glukoselösung in die Bauchfalte appliziert. In den folgenden 24 Stunden erfolgte eine intensive Überwachung der Tiere mit regelmäßigen Blutzuckerkontrollen. Es standen trockenes Brot und 5 %ige Glukoselösung *ad libitum* zur Verfügung. Kam es während dieser Zeit trotzdem zu Hypoglykämien $\leq 2,8$ mmol/l, so wurden zusätzlich weitere 20 mL 27,5 %ige Glukoselösung (s.c.) oder 10 mL 5 %ige Glukoselösung (i. v.) verabreicht. Nach ca. 24-48 Stunden stellte sich eine stabile hyperglykämische Stoffwechsellage ein.

2.2.4. Einstellung eines hyperglykämischen Blutzuckerspiegels

Alle Kaninchen wurden täglich in 2 Intervallen von je 3 Stunden gefüttert. Den diabetischen Tieren wurde zusätzlich viermal am Tag Insulin gespritzt und zweimal täglich der Blutzucker gemessen (siehe Abb. 3). Ziel war die Einstellung auf einen Blutzuckerwert zwischen 14 und 25 mmol/l. Vor jeder Futterperiode wurde den Tieren orientierend an den Blutzuckerwerten der vorherigen Tage kurzwirksames Humaninsulin (Insuman Rapid®) in die Nackenfalte verabreicht. Nach jeder Futterperiode wurde mit Blut aus der *Vena auricularis lateralis* der Blutzucker bestimmt und davon ausgehend Insulin (Insuman Rapid®) gespritzt. Zusätzlich wurde über Nacht das langwirksame Insulinanalogon Lantus® s.c. verabreicht. Die Kontrolltiere unterlagen dem gleichen Futterregime wie die diabetischen Tiere. Bei allen Kaninchen wurde täglich das Gewicht und die gefressene Futtermenge dokumentiert.

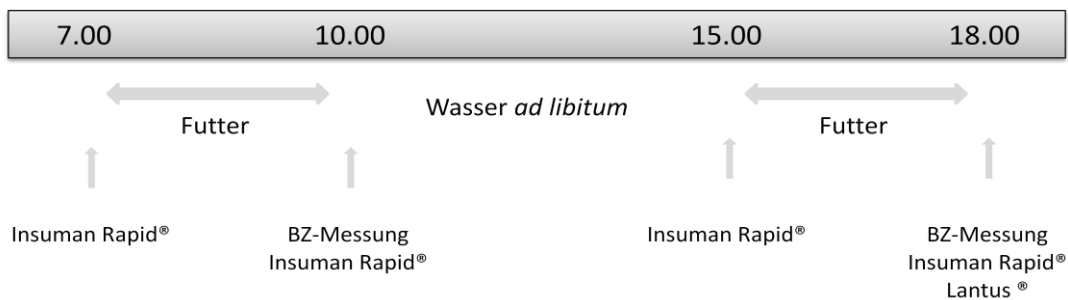


Abb. 3: Tägliches Behandlungsschema der diabetischen Kaninchen (BZ=Blutzucker)

2.2.5. Verpaarung

Zur Unterstützung der Follikelreifung wurden den Tieren vier Tage vor der Verpaarung 110 Units (U) PMSG (*Pregnant mare serum gonadotropin*) s.c. verabreicht. Die Verpaarung erfolgte mit zwei fertilen Böcken. Anschließend wurden zur Auslösung der Ovulation 75 U hCG in die *Vena auricularis lateralis* appliziert. Mit den pseudograviden Tieren wurde, bis auf das Unterlassen der Verpaarung, ebenso verfahren. Am Tag 6 *post coitum* (*p. c.*) wurden die Kaninchen durch die Injektion einer Überdosis Pentobarbital (100 mg/kg Körpergewicht gelöst in warmem PBS) getötet und durch die Eröffnung der Karotiden entblutet.

2.3. Gewinnung von Blastozysten und Endometrium

Auf einer semisterilen Arbeitsbank wurden nach Entfernung des Mesometriums die Embryonen mit sterilfiltriertem Spülmedium aus dem Uterus ausgespült und zweimal in frischem Spülmedium gewaschen. Die Keimscheiben der 6 Tage alten Blastozysten wurden anschließend mikroskopisch beurteilt und dem entsprechenden Gastrulationsstadium zugeordnet (Viebahn et al., 1995; Fischer et al., 2012). Nach zweimaligem Waschen in PBS-Puffer wurden die embryonalen Hüllen (*Gliolemma* und *Neozona*) in 0,05 % Polyvinylalkohol (PVA in PBS) mechanisch entfernt und die Blastozysten in PBS bei -80 °C gelagert (Fischer et al., 1991).

Spülmedium (pH 7,2-7,4):

<i>Basal synthetic medium II</i> (BSM II)	7,64 g/l
NaHCO ₃	2,11 g/l
Penicillin	0,06 g/l
Streptomycin	0,15 g/l
Glucose	1,80 g/l
NaCl	1,00 g/l
CuSO ₄ x 5H ₂ O	100 µl/l
<i>Bovine serum albumine</i> (BSA)	1,00 g/l

PBS-Puffer: 9,55 g PBS Dulbecco in 1 L *Aqua dest.*

Die Uteri wurden antimesometrial eröffnet und das Endometrium mit einem scharfen Skalpell vom Myometrium abgeschabt. Von jedem Organ wurden sowohl Protein- als auch RNA-Proben gesammelt. Die Proteinproben wurden sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, wohingegen die RNA-Proben, nach RNase-Inaktivierung durch 1ml RNAlater® (Applied Biosystems), zunächst für 24 h im Kühlschrank und im Anschluss bei -80 °C lagerten.

2.4. Molekularbiologische Methoden

2.4.1. RNA-Isolierung aus Endometrium

Die RNA-Extraktion aus dem Endometrium erfolgte mit TRIzol Reagent® (Invitrogen). Sie entspricht im Wesentlichen der *Single step*-Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987). Nach Zugabe von 1 ml TRIzol Reagent® wurde das Gewebe mittels Ultraturax homogenisiert und 0,2 ml Chloroform hinzugefügt. Durch Zentrifugation über 15 Minuten bei 13000 *rpm* und 4 °C erfolgte die 3-phasige Auftrennung des Gemisches. In der unteren und mittleren Phase sammelten sich Proteine und DNA, in der oberen, wässrigen Phase RNA. Diese wurde in ein neues *Tube* überführt und die enthaltene RNA mit einem Volumenanteil Isopropanol gefällt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und Zentrifugation bei 13000 *rpm* über 15 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit je 1 mL 70 %igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet vakuumgetrocknet und in 50 bis 150 µL DEPC *Aqua dest.* gelöst.

DEPC *Aqua dest.*:

0,1 % Diethylpyrocarbonat wird in *Aqua dest.* über Nacht unter Rühren inkubiert und anschließend zweimalig autoklaviert. DEPC *Aqua dest.* inaktiviert RNasen.

2.4.2. RNA-Isolierung aus Kaninchenblastozysten

Die Isolation der mRNA aus Blastozysten erfolgte mit dem Dynabeads® mRNA Direct™ Kit (Invitrogen). Dynabeads sind magnetische Polyesterperlen und verfügen über kovalent an die Oberfläche gebundene Oligo(dT)-Reste, die an den Poly-A-Schwanz der mRNA binden. Die in PBS bei -80 °C gelagerten Blastozysten wurden für 10 Minuten bei 13000 *rpm* zentrifugiert und das überschüssige PBS abgenommen. Die Embryonen wurden in 150 µL Lysis-Puffer resuspendiert und bei Raumtemperatur auf einem Schüttler für 10 Minuten inkubiert. In dieser Zeit wurden die Dynabeads mit Hilfe des *Magnetic Particle Concentrator* (DynaL MPC®) zweimal mit Bindepuffer gewaschen. Pro Embryo wurden 13 µL Dynabeadssuspension dazugegeben. Die Suspension wurde

jeweils zweimal mit 100 µL Puffer A und dreimal mit 100 µL Puffer B im *Magnetic Particle Concentrator* gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen und 11 µL nukleasefreies *Aqua dest.* zugegeben. Durch Erhitzen auf 65 °C für 3 Minuten wurden die Oligo(dT)₂₅-Reste der Dynabeads von der mRNA entfernt. Um ein erneutes Binden der mRNA an die Dynabeads zu verhindern, wurde der Überstand mit Hilfe des *Magnetic Particle Concentrator* in ein neues 0,5 mL Reaktionsgefäß überführt.

	<u>Lysepuffer</u>	<u>Bindepuffer</u>	<u>Waschpuffer A</u>	<u>Waschpuffer B</u>
LiCl (8 M)	6,25 mL	12,5 mL	1,88 mL	1,88 mL
EDTA (0,5 M)	2 mL	0,4 mL	0,2 mL	0,2 mL
TRIS (1 mM, pH 7,5)	10 mL	2 mL	1 mL	1 mL
SDS (10 %)	10 mL	-	1 mL	-
<u>DTT (0,1 M)</u>	<u>0,5 mL</u>	-	-	-
<i>Aqua dest.</i>	<i>ad 100 mL</i>	<i>ad 100 mL</i>	<i>ad 100 mL</i>	<i>ad 100 mL</i>

2.4.3. Konzentrationsmessung von RNA und DNA

Die Konzentrationsmessung von Polynukleotiden erfolgte am Spektrophotometer (NanoVue™, General Electric) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Konzentration [µg/mL] errechnet sich aus der Absorption des UV-Lichtes, multipliziert mit dem Extensionsfaktor 40 für RNA und 50 für dsDNA. Zusätzlich wurde der Absorptionsquotient der optischen Dichte für $\lambda=260$ durch $\lambda=280$ gebildet. Dieser Wert gibt Aufschluss über den Proteingehalt und sollte bei reiner RNA bzw. DNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Zur Qualitätskontrolle der isolierten RNA wurden 0,5 µg derselben auf ein 1,2 %iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

2.4.4. DNA-Verdau

Um nach der RNA-Isolation verbliebene genomische DNA zu beseitigen, wurde die DNA enzymatisch verdaut:

RNA	10 µg
10-fach DNase I Puffer	2,5 µL
rDNase I	2 µL
RNasin® RNase-Inhibitor	0,5 µL
DEPC <i>Aqua dest.</i>	ad 30 µL

Nach Inkubation über 30 Minuten bei 37 °C wurde dem Ansatz 2,5 µL DNase-Inhibitor hinzugefügt. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm für 1,5 Minuten wurde der nun DNA-freie Überstand in ein neues Tube überführt. Zur Qualitätskontrolle wurden 0,5 µg der RNA auf ein 1,2 %iges Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Weiterhin wurde der Erfolg des DNA-Verdaus durch eine PCR auf das Referenzgen GAPDH überprüft.

2.4.5. cDNA-Synthese aus endometrialer RNA

Zu 3 µg der isolierten RNA wurde 1 µL *Random Primer* zugemischt und dieser Ansatz mit DEPC *Aqua dest.* auf 12,5 µL aufgefüllt. Nach Inkubation bei 65 °C über 5 Minuten wurde folgender Ansatz hinzupipettiert:

5x Puffer	4 µL
RNase-Inhibitor	0,5 µL
10 mM dNTP	2 µL
Reverse Transkriptase (200 U/µL)	1 µL

Daraufhin durchliefen die Proben folgendes Programm im Thermocycler:

10 min	25 °C
60 min	42 °C
10 min	70 °C

Die entstandene cDNA-Lösung wurde mit *Aqua dest.* auf 100 µL Gesamtvolumen verdünnt. Bei erfolgreicher cDNA-Synthese zeigte sich nach einer PCR auf GAPDH und gelelektrophoretischer Auftrennung eine Bande bei 150 Bp.

2.4.6. cDNA-Synthese aus RNA von Blastozysten

Es wurde die gesamte isolierte mRNA der Blastozysten eingesetzt.

10x PCR-Puffer (Mg ²⁺ -frei)	2 µL
MgCl ₂ (50 mM)	2 µL
dNTP-Mix (10 mM)	2 µL
Random Primer (50 pM)	1 µL
Superscript II (200 U/µL)	0,5 µL
RNase-Inhibitor (400 U/µL)	0,2 µL
DEPC <i>Aqua dest.</i>	1,3 µL

Die Reverse Transkriptase-Reaktion erfolgt im Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

I.)	10 min 25 °C
II.)	60 min 42 °C
II.)	4 min 99 °C

Der Ansatz wurde mit 80 µL DEPC *Aqua dest.* auf 100 µL aufgefüllt.

2.4.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt einzelne DNA-Abschnitte.

25 µL-Ansatz: (1 µL DNA + 24 µL Mastermix)

DNA	1 µL
<i>Aqua dest.</i> nucleasefrei	17,375 µL
10x PCR-Puffer	5 µL
dNTP-Mix (10 mM)	0,5 µL
Primer <i>forward</i> (10 µM)	0,5 µL
Primer <i>reverse</i> (10 µM)	0,5 µL
Crimson Taq TM DNA-Polymerase (5 U/mL)	0,125 µL

Je nach Ergebnis der PCR wurden die Primer- und DNA-Menge variiert. Der Ansatz durchlief im Thermocycler abhängig von der Produktlänge folgendes Programm:

PCR-Produkt < 250 Bp

3 min	I.)	Denaturierung/Initialisierung 94 °C
15 s	II.)	Denaturierung 94 °C
15 s	III.)	Primer- <i>Annealing</i> 60 °C
15 s	IV.)	Elongation 72 °C

PCR-Produkt > 250 Bp

3 min
60 s
60 s
60 s

39-fache Wiederholung ab Schritt II.)

10 min	V.)	terminale Elongation 72 °C	10 min
	VI.)	Pause 4 °C	

2.4.8. Quantitative *Real Time* PCR (qRT-PCR)

Während mit der PCR qualitative, bestenfalls semiquantitative Aussagen möglich sind, erlaubt die *Real Time* PCR absolut- und relativ-quantitative Aussagen. Dies wird durch DNA-interkalierende Farbstoffe wie SYBR® Green ermöglicht. Nach jedem Zyklus wird die Fluoreszenz des SYBR® Green gemessen, welche linear mit der Menge an Doppelstrang-DNA ansteigt. Der C_T -Wert (*threshold cycle*) beschreibt den Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmalig über einen bestimmten Schwellenwert steigt. Er liegt im exponentiellen Bereich der Amplifikationskurve. Um absolut-quantitative Aussagen treffen zu können, wurde als Referenz eine Verdünnungsreihe mit einem Plasmidstandard (siehe Kap. 2.5.7.) eingesetzt, welcher die Ziel-DNA in definierter Menge enthielt (10^7 - 10^3 Moleküle in 10er Potenzschritten). Um Konzentrationsunterschiede einzelner Proben auszugleichen, wurde als interner Standard das *housekeeping* Gen GAPDH mitbestimmt. Für jeden Ansatz erfolgte eine Schmelzpunktanalyse. Die Messungen erfolgten in Doppelbestimmung und es wurden nur Differenzen des C_T -Wertes kleiner 0,5 akzeptiert. Pro Reaktion wurden 3 μ L cDNA und 17 μ L *Real Time*-Mastermix eingesetzt.

Real Time-Mastermix:

1.) Mastermix Plus für SYBR® Assay	10 μ L
2.) Aqua dest.	6 μ L
3.) Primer <i>forward</i>	0,5 μ L
4.) Primer <i>reverse</i>	0,5 μ L

Die qRT-PCR-Messungen erfolgten an verschiedenen Geräten:

1.) <u>iQ5 Real Time Detection System</u>		2.) <u>StepOnePlus™ Real-Time System</u>	
5 min	I.) 95 °C Denaturierung/Initialisierung	5 min	
20 sec	II.) 95 °C Denaturierung	10 sec	
30 sec	III.) 60 °C Primer- <i>Annealing</i>	15 sec	
40 sec	IV.) 72 °C Elongation	20 sec	

39fache Wiederholung ab Schritt II.)

VI.) Erstellen einer Schmelzkurve von 55 bis 90 °C in 0,5 K Intervallen

Die Auswertung der Messdaten erfolgte nach der vergleichenden C_T -Methode ($\Delta\Delta C_T$ -Methode) oder nach der Molekülwertmethode. Bei der $\Delta\Delta C_T$ -Methode werden die C_T -Werte nach Subtraktion von den entsprechenden GAPDH- C_T -Werten direkt miteinander verglichen. Sie ermöglicht relative Aussagen zur Genexpression. Bei der Molekülwertmethode kann durch die Standardkurve auf die absoluten Molekülzahlen rückgeschlossen werden. Die Molekülzahl des Zielgens wird zur GAPDH-Molekülmenge ins Verhältnis gesetzt.

2.4.9. Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA und DNA

Bei der Größentrennung von Polynukleotiden in Agarosegelen ist die Laufstrecke im elektrischen Feld proportional zum Logarithmus der Fragmentlänge. Nukleinsäuren > 1000 Bp wurden in 1-1,2%igen Agarosegelen, Fragmente < 1000 Bp in 1,8-2,0 %igen Gelen aufgetrennt. Die Agarose wurde mit 1×TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht, Ethidiumbromid (50 μ g/mL) hinzugefügt (3 μ L/100 mL) und in Gelschlitten gegossen. Durch einen Kamm wurden die Geltaschen geformt. Nach dem Auftragen der DNA bzw. RNA mit 5 μ L 6×Ladepuffer erfolgte die Auftrennung mit

1xTAE-Laufpuffer unter einer Spannung von 50-120 V. Als Referenz wurde ein 100 Bp-DNA-Marker mitgeführt. Die Fluoreszenz des Nukleinsäure-interkalierenden Ethidiumbromids wurde unter UV-Licht von einer Videokamera und der BioCaptMW Software dokumentiert.

6x Ladepuffer (100 mL):

Glycerin	30 mL
Bromphenolblau	0,25 g
1xTAE-Puffer	70 mL

Agarosegel:

Agarose	1,2-2,0 g
1xTAE-Puffer	100 mL
Ethidiumbromid (50 µg/ml)	3 µL

10x TAE-Puffer:

Tris	48,4 g
Eisessig	11,4 g
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	20,0 mL

2.5. Klonierung von PCR-Fragmenten

Zur Herstellung eines DNA-Standards für die qRT-PCR wurde das Gen-spezifische DNA-Fragment in ein Plasmid kloniert, amplifiziert, isoliert und anschließend quantifiziert. Ausgehend von einer definierten Anzahl spezifischer DNA-Moleküle wurde eine Verdünnungsreihe erstellt.

2.5.1. Isolierung von PCR-Fragmenten aus dem Agarosegel

Das zu klonierende DNA-Fragment wurde in einer PCR mit doppeltem Ansatz (50 µL) amplifiziert und anschließend auf einem 1,8 bis 2,0 %igen Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Unter UV-Licht wurde die entsprechende Bande mit dem Skalpell ausgeschnitten und mithilfe des QIAquick *Gel Extraction Kit* (Qiagen) die enthaltene DNA isoliert.

2.5.2. Ligation des PCR-Produktes

Das PCR-Produkt wurde in den pGEMT-Vektor (Promega) ligiert.

Ligationsansatz:

DNA-Fragment	8 µL
pGEMT-Vektor (50 ng/µL)	1 µL
T4 DNA-Ligase (1 U)	1 µL
2x <i>Rapid Ligation</i> Puffer	10 µL

Inkubation des Ansatzes 1 Stunde bei Raumtemperatur.

2.5.3. Transformation des Ligationsansatzes in kompetente Bakterienzellen

Für die Transformation wurden 100 µL kompetente *Escherichia coli* XL-1 *blue* Bakterien zum Ligationsansatz hinzugefügt. Nach 20 Minuten auf Eis erfolgte die Transformation im Wasserbad bei 42 °C über 45 Sekunden. Anschließend wurde 400 µL LB-Medium hinzugefügt und 30 Minuten im Schüttler inkubiert. Daraufhin wurden verschiedene Mengen (50 µL, 100 µL) kompetenter Zellen auf Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

Herstellung der Agarplatten:

400 mL LB-Medium wurden vor dem Autoklavieren 15 g Agar zugesetzt. Nach Erhitzen in der Mikrowelle wurde zu 400 mL LB-Medium folgendes hinzugefügt:

- | | |
|--|-------------|
| 1.) Ampicillin (50 mg/mL) | 4 mL |
| 2.) IPTG (Isopropylthio- β -D-Galactosid): 200 mg/mL in Aqua dest. | 80 μ L |
| 3.) X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactosid): 20 mg/mL in DMF | 800 μ L |

<u>LB-Medium:</u>	Pepton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
	Aqua dest.	ad 1 L

pH-Werteinstellung mit 4 M NaOH auf pH 7,5

2.5.4. Selektion rekombinanter Bakterien und Plasmidisolierung

Da der pGEMT-Vektor Ampicillinresistenzgene enthält, überleben nach Zugabe von Ampicillin zum Agar-Nährboden nur Bakterien mit erfolgreicher Transformation. Während Bakterien ohne Insertion in die Polylinkerregion des Plasmids blau erscheinen, kommt es bei erfolgreicher Rekombination zur Verschiebung des Leserasters im lacZ-Gen der *multiple cloning site* des Vektors. Daraufhin wird das Enzym β -Galaktosidase nicht mehr komplementiert und die Spaltung von X-Gal in Galaktose und den blauen Farbstoff 5-Bromo-4-Chloro-3-Indol unterbleibt, woraufhin die Zellen weiß erscheinen. Weiße Kolonien wurden in 5 mL LB-Medium mit Ampicillin (0,1 mg/mL) über Nacht bei 37 °C kultiviert. Davon wurden 2 mL in ein neues Tube überführt und 10 Minuten bei Raumtemperatur und 13000 rpm zentrifugiert. Die weitere Plasmidisolierung erfolgte mit dem Protokoll von peqGOLD Plasmid Miniprep Kit (Peqlab) nach dem Prinzip der alkalischen Lyse.

2.5.5. Plasmidverdau

Zur Kontrolle der Klonierung wurde das Plasmid mit den Restriktionsenzymen ApaI und SacI verdaut. Das entstehende DNA-Fragment enthält die klonierte DNA-Sequenz und Anteile des Polylinkers. Nach Inkubation des Verdau über 1 h bei 37 °C wurde das Plasmid auf einem 1,8 %igen Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht detektiert.

Plasmidverdau-Ansatz:

ApaI (10 U/ μ L)	0,5 μ L
SacI (10 U/ μ L)	0,5 μ L
Puffer B+	1,0 μ L
Aqua dest.	5,0 μ L
Plasmid-DNA	3,0 μ L

2.5.6. Sequenzierung

Um den Klonierungserfolg und die Spezifität des DNA-Standards zu überprüfen, wurde das Plasmid mit dem BigDye® Terminator v1.1 *Cycle Sequencing* Kit sequenziert:

Sequenzierungsansatz:

BigDye® Terminator v1.1 <i>Cycle Sequencing</i>	2,0 μ L
BigDye® Terminator v1.1 v3.1 5x <i>Sequencing buffer</i>	1,5 μ L
T 7.2. Primer (5 pM)	0,5 μ L
Aqua dest.	4,0 μ L
Plasmid	2,0 μ L

Die Sequenzierung erfolgte im Thermocycler mit folgendem Programm:

I.)	1 min	96 °C Denaturierung/Initialisierung
II.)	10 sec	96 °C Denaturierung
III.)	15 sec	55 °C Primer- <i>Annealing</i>
IV.)	4 min	60 °C Elongation

25-fache Wiederholung ab Schritt II

V.)	Pause	4 °C
-----	-------	------

Das enthaltene Sequenzierungsprodukt wurde aufgereinigt: Nach Zugabe von 1 µL 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 40 µL 96 %igem Ethanol wurde 30 min bei 13000 *rpm* und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die weitere Aufreinigung erfolgte zweimal mit 150 µL 70 %igem Ethanol und zwanzig- bzw. zehnminütiger Zentrifugation bei 13000 *rpm* und 4 °C. Nach Trocknung des Pellets in einem Rotations-Vakuum-Konzentrator erfolgte die automatisierte Auftrennung im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Medizinischen Fakultät am Gerät ABI 3100 *Genetic Analyzer C* (Applied Biosystems). Die erhaltene Sequenz wurde über das Programm BLASTN (*Basic Local Alignment Search Tool*) mit der Ausgangssequenz verglichen.

2.5.7. Herstellung eines Plasmidstandards

Zur Erstellung einer Standardkurve für die qRT-PCR wurde eine Plasmid-Verdünnungsreihe hergestellt. Dazu wurde die Konzentration des Plasmids (Messung der DNA-Konzentration) im Spektrophotometer ermittelt. Anhand dieser Konzentration, der Molarität des Plasmids inkl. Insert und der Avogadro-Konstante wurde die Anzahl der Plasmide pro µL Stammlösung errechnet und daraufhin eine Verdünnungsreihe von 10^7 bis 10^3 Molekülen in 10er Potenzschritten pro 3 µL *Aqua dest.* erstellt. Nur bei einer Effizienz (=Amplifikationsrate im exponentiellen Bereich) des Plasmidstandards von >85 % in der qRT-PCR wurde er für weitere Analysen genutzt.

2.6. Proteinchemie

2.6.1. Proteinextraktion aus Endometrium

Zu dem in 1ml RNAlater® aufgenommenem Endometrium wurde Folgendes zugegeben:

1.) RIPA Puffer	757 µL
2.) Phosphatase-Inhibitor (2 µL/100 µL)	100 µL
3.) Protease-Inhibitor (2 µL/100 µL)	143 µL

RIPA-Puffer:

10x PBS	20 mL
Nonidet (NP40)	1 mL
Na-Desoxycholat	0,5 g
<i>Aqua dest.</i>	<i>ad 1 L</i>

Die Homogenisierung erfolgte nach Zugabe von 10 Keramikkugeln mit Precylles über 15 Sekunden. Danach inkubierten die Proben 30 min auf Eis, um anschließend 20 min bei 13000 *rpm* und 4 °C zentrifugiert zu werden. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und die Proteinkonzentration wurde gemessen.

2.6.2. Proteinquantifizierung

Bei der Proteinquantifizierung nach Bradford bindet der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 (CBBG) an Proteine und ändert dabei sein Absorptionsmaximum.

<u>Ansatz:</u>	1.) <i>Aqua dest.</i>	800 µL
	2.) Proteinlösung	1 µL
	3.) Bio-Rad Protein Assay	200 µL

Nach Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm im Spektrophotometer gemessen. Eine Ansatzprobe ohne Protein diente als Referenz. Nach Mittelwertbildung der Doppelbestimmungen wurde die Proteinkonzentration anhand einer Standardkurve errechnet, welche vorher mit bekannten Konzentrationen von BSA in RIPA erstellt wurde.

2.6.3. Proteintrennung durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch Bindung an SDS tragen Proteine negative Ladungen proportional zu ihrer Molekülgröße. Weiterhin denaturiert SDS die Proteine nach Reduktion durch Mercaptoethanol. Durch Abstoßungskräfte der negativen Ladungen werden die Proteine in ihrer Primärstruktur gehalten, was eine Auftrennung nach der Molekülmasse ermöglicht. Das SDS-Polyacrylamidgel besteht aus einem Sammel- und einem Trenngel, welche im Verhältnis 1:4 in vorgefertigte Kassetten (Invitrogen) gegossen werden. Durch einen Kamm werden die Geltaschen geformt. Die Polymerisation des Acrylamid wird durch TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) und 10 % APS katalysiert.

Herstellung eines Polyacrylamidgels:

<u>Sammelgel 4 %</u>		<u>Trenngel 12 %</u>
2,5 mL	<i>Aqua dest.</i>	3,3 mL
1,0 mL	30 % Acrylamid	4,0 mL
1,0 mL	1 M Tris pH 6,8	0 mL
0 mL	1,5 M Tris pH 8,8	2,5 mL
40 µL	10 % SDS	100 µL
40 µL	10 % APS	100 µL
4 µL	TEMED	4 µL

Das Polyacrylamidgel wurde in eine Xcell SureLock Gelelektrophoresekammer (Invitrogen) eingesetzt, der Kamm wurde entfernt und sowohl die Kammern als auch die Geltaschen mit 1× Laemmli-Puffer gefüllt.

Elektrophoresepuffer (10× Laemmli):

Tris/HCl (250 mM)	30,25 g
Glycin (2,5 M)	144,25 g
SDS (10 %)	10,00 g
<i>Aqua dest.</i>	<i>ad 1 L</i>

Vorbereitung der Proteinproben:

In der Regel wurden 25 µg Protein aufgetrennt. Dazu wurde *Aqua dest.* und 5× Ladebuffer auf ein Gesamtvolumen von 20-40 µL hinzugefügt und die Proteine bei 70 °C für 10 min denaturiert. Außerdem wurde ein Größenmarker (SM0671, Fermentas) aufgetragen. Während das Sammelgel ca. 30 min unter einer Spannung von 120 V lief, wurde beim Trenngel die Spannung für ca. 90 min auf 170 V erhöht.

5× SDS-Ladepuffer:

Glycerin	25 mL
TRIS-Puffer (1 M, pH 6,8)	15,62 mL
β-Mercaptoethanol	5 mL
SDS	5 g
Bromphenolblau	2,5 g
<i>Aqua dest.</i>	<i>ad 1000 mL</i>

2.6.4. Western Blot

Im Western Blot werden die Proteine des Polyacrylamidgels durch elektrische Spannung auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Dazu wird eine gekühlte Kammer aufgebaut (Abb. 4). Die durch SDS negativ geladenen Proteine wandern in Richtung Anode und bleiben auf dem Weg dorthin aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen an der Nitrozellulosemembran hängen. Das in den Transferpuffern enthaltene Methanol dient als Aktivator der Proteinbindungsstellen auf der Membran. Der Blot dauerte bei 150 mA 2 h. Danach wurden die Proteinbanden auf der Nitrozellulosemembran durch Ponceaurot S angefärbt, um den Erfolg des Blottings zu überprüfen.

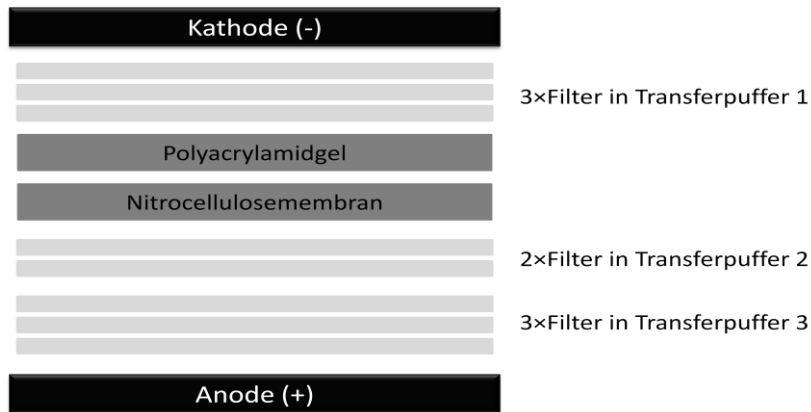


Abb. 4: Schema einer Western Blot-Kammer

Tab. 2: Zusammensetzung der Western Blot-Transferpuffer

	Transferpuffer 1	Transferpuffer 3	Transferpuffer 3
Tris	36,6 g (0,3 M)	3 g (23 mM)	3 g (23 mM)
Methanol (100%)	200 mL	200 mL	200 mL
Aminocaprinsäure	-	-	5,2 g (40 mM)
<i>Aqua dest.</i>	<i>ad 1L</i>	<i>ad 1 L</i>	<i>ad 1 L</i>

2.6.5. Hybridisierung von Proteinen mit Antikörpern

Zum Abblocken unspezifischer Proteinbindungsstellen dienten entfettetes Milchpulver, Bovines Serumalbumin (BSA) oder Fetales Kälberserum (FKS). Nach dem Blocken für eine Stunde bei Raumtemperatur wurde über Nacht mit dem Primärantikörper im Kühlschrank inkubiert und daraufhin 3×10 min mit TBST gewaschen. Der mit einer *horseradish* Peroxidase konjugierte

Sekundärantikörper inkubierte 1 h bei Raumtemperatur, danach wurde 3×10 min mit TBST und anschließend 2×5 min mit TBS gewaschen.

TBS-Puffer:

Tris (1,5 M pH 7,5) 10 mL
 NaCl 5,8 g
 Aqua dest. ad 1 L

TBST (Tween20/TBS):

Tris (1,5 M pH 7,5) 10 mL
 NaCl 5,8 g
 Tween 20 1 mL
 Aqua dest. ad 1 L

Tab. 3: Verwendete Antikörper

Primär-antikörper	Spezies	Blockierung	Verdünnung	Hersteller	Sekundär-antikörper	Verdünnung
Anti-human IGFBP1	Maus	3 % FKS/TBST	1:3000 in 3 % FKS/TBST	Sigma Aldrich	Anti-Maus-IgG (Dianova)	1:20000 in 3 % Milchpulver/ TBST
Anti-human IGFBP1	Maus	5 % Milchpulver/ TBST	1:1000 in 5 % Milchpulver/ TBST	Santa Cruz	Anti-Maus-IgG (Dianova)	1:20000 in 3 % Milchpulver/ TBST
Anti-human β-Aktin	Maus	5 % Milchpulver/ TBST	1:20000 in 3 % BSA/TBST	Sigma Aldrich	Anti-Maus-IgG (Dianova)	1:45000 in 3 % Milchpulver/ TBST
Anti-human PCDH15	Maus	5 % Milchpulver/ TBST	1:1000 in 5 % Milchpulver/ TBST	Santa Cruz	Anti-Maus-IgG (Dianova)	1:20000 in 3 % Milchpulver/ TBST

2.6.6. Proteindetektion

Die an den Sekundärantikörper konjugierte HRP (*horseradish peroxidase*) oxidiert den Farbstoff Luminol. Die Intensität der entstehenden Chemielumineszenz ist proportional zur Proteinmenge. Die Bildentwicklung erfolgte nach Herstellerprotokoll mit dem Immobilon™ Western Detection Reagent (Millipore). Die Detektion der Chemielumineszenz erfolgte am Fusion FX7™ Multi-Imagingsystem (PqLab). Je nach Bandenstärke wurde die Belichtungszeit automatisch eingestellt bzw. manuell nachkorrigiert. Die quantitative Auswertung erfolgte mit der Fusion-Software (PqLab). Über die Stärke des emittierten Lichtes wurde die relative Proteinmenge abgeleitet und diese wiederum zur β-Aktin-Menge ins Verhältnis gesetzt.

2.7. Immunhistochemische Methoden

Um die Expression von Protocadherin 15 im Endometrium zu lokalisieren, wurden immunhistochemische Untersuchungen an Uteri des Kaninchens und Menschen durchgeführt.

2.7.1. Anfertigung von Gewebsschnitten

Die isolierten Uteri wurden für 24 h in Bouin-Lösung fixiert und anschließend in 70 %igem Alkohol gelagert. Nach folgendem Protokoll wurden die Gewebe automatisiert in Paraffin eingebettet: aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 %, 96 %), 2x Isopropanol und 2x Xylol für jeweils eine

Stunde. Anschließend wurden am Mikrotom 5 µm dicke Gewebsschnitte angefertigt und auf Objektträger platziert.

2.7.2. Humane Uterusschnitte

Die humanen Uterusschnitte sind im Rahmen der Promotion von Dr. med. Gregor Seliger am Institut für Anatomie und Zellbiologie der MLU Halle-Wittenberg angefertigt worden und standen für diese Arbeit zur Verfügung. Das Patientengut stammte aus der Klinik für Gynäkologie und aus der Klinik für Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin des Universitätsklinikums Halle aus den Jahren 1994-1998. Nach Berücksichtigung der klinischen Einschlusskriterien konnten 86 Uteri gewonnen werden. Dazu zählten das Alter der Frauen zwischen 20 und 45 Jahren, der Ausschluss von Blutungsanomalien in den letzten 3 Monaten und von Hormongaben im letzten Jahr. Weiterhin durften keine klinischen Diagnosen vorliegen, welche einen Einfluss auf die Physiologie des Endometriums haben könnten.

Die Gewebe wurden durch Hysterektomie (91 %) oder Abrasio (9 %) gewonnen. Die häufigsten Indikationen für den Eingriff waren: Uterus myomatosus (54 %), Descensus uteri (23 %), Endometriose (5 %) und Zervixkarzinom (5 %). Der Zyklustag wurde anhand histologischer Kriterien von 2 Untersuchern einfach verblindet ermittelt. Es wurden nur Präparate einbezogen, in denen der histologisch ermittelte und der aus klinischen Angaben berechnete Zyklustag nicht mehr als einen Tag voneinander abwichen (Dissertation Gregor Seliger, 2001; Küchenhoff et al., 1999).

2.7.3. Immunhistochemische Detektion

Nach Inkubation der Gewebeschnitte über Nacht bei 60 °C erfolgte die Entparaffinierung mit HistoClear und die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (Isopropanol, 90 %, 80 %, 70 %, 50 %, 30 %, destilliertes Wasser, PBST). Zum Abblocken endogener Peroxidasen wurde mit 3 % H₂O₂/Methanol in Dunkelheit inkubiert und anschließend 3x5 Minuten in PBST gewaschen. Die Blockierung freier Epitope erfolgte mit 10 % Ziegen Serum für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Der Primärantikörper (*mouse anti-PCDH15*) inkubierte in einer Konzentration von 1:250 in 1 % PBS/BSA über Nacht bei 4 °C. Die Negativkontrollen wurden stattdessen nur mit 1 % PBS/BSA behandelt. Nach dem Waschen (3x5 Minuten) wurde der Sekundärantikörper (*anti mouse labelled Polymere horseradish Peroxidase (DAKO)*) in einer Verdünnung 1:2 mit PBS für 1 h bei Raumtemperatur hinzugegeben. Nach nochmaligem Waschen (3x5 Minuten) erfolgte die Detektion mit Diaminobenzidin (DAB), welches nach Oxidation durch die Peroxidase ein braunes Präzipitat bildet. Nach Ausbildung eines kräftigen Präzipitates unter Sichtkontrolle am Mikroskop wurde die Reaktion in Leitungswasser abgestoppt und ggf. die Kerne mit Hämalaun nach Mayer für 5 Minuten gegengefärbt. In einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Gewebeschnitte dehydriert und anschließend mit Histomount eingedeckt.

Die Immunreaktion wurde lichtmikroskopisch mit dem Biozero Fluoreszenzmikroskop BZ 8100 dokumentiert und die Bilder mit der Software BZ *image analysis* und BZ 8100 *observation application* aufgenommen, bearbeitet und ausgewertet.

PBST-Puffer:

PBS Dulbecco 9,55 g
Tween 20 1 mL
dest. H₂O ad 1000 mL

PBS-Puffer:

PBS Dulbecco 9,55 g
dest. H₂O ad 1000 mL

Hämalaun nach Mayer:

Hämatoxylin 1 g
Ethanol (absolut) 10 mL
dest. H₂O ad 1000 mL
Natriumiodat 0,17 g
Kalium-Aluminium-Sulfat 50 g

2.7.4. Immunhistochemische Quantifizierung

Die PCDH15-Expression wurde in den humanen Unterschnitten für verschiedene Zyklustage am Lichtmikroskop quantifiziert. Dazu wurde die Stärke der Präzipitation (SI: *staining intensity* – 0=kein Signal, 1=schwaches Signal, 2=mittleres Signal, 3=starkes Signal) getrennt für *Str. basale* und *Str. functionale* (in der 2. Zyklushälfte unterteilt in *Str. spongiosum* und *Str. compactum*) und Stroma beurteilt. Aus dem Produkt der SI-Mittelwerte und der Anzahl der positiven Zellen (POPC: *Percentage Of Positive Cells* - 0=0 %, 1=1-10 %, 2=11-50 %, 3>50 %) wurde ein absoluter, die PCDH15-Expression repräsentierender Wert ermittelt.

2.8. Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse der Daten dienten die Programme Microsoft Excel sowie SigmaPlot®11 (Systat Software). Die zweifaktorielle Varianzanalyse (zweifaktorielle ANOVA) war bei allen Untersuchungen mit zwei unabhängigen Variablen – Diabetes mellitus und Gravidität – der statistische Test der Wahl. Sie vergleicht die Varianz der Messwerte zwischen den Gruppen mit der Varianz innerhalb der Gruppen und ermittelt somit, ob sich die Gruppen signifikant unterscheiden. Dahingegen wurde der t-Test, welcher auf dem Vergleich von Mittelwerten zweier Stichproben beruht, bei Analysen mit nur einer unabhängigen Variable angewendet. Das Signifikanzniveau wurde als Irrtumswahrscheinlichkeit p angegeben mit p kleiner 5 % (*= $p < 0,05$), p kleiner 1 % (**= $p < 0,01$) und p kleiner 0,1 % (***= $p < 0,001$). Die Mittelwerte der Messung wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (MW \pm SEM) angegeben. Als Symbole wurden außerdem verwendet: n =Zahl der Versuchsgruppen, N =Zahl der unabhängigen Versuche.

2.9. Next-Generation-Sequencing (NGS)

2.9.1. Probengenerierung

Die RNA-Isolierung aus den Kaninchenendometrien erfolgte ebenfalls mit TRIzol ((Invitrogen) (siehe Kap. 2.4.1). Um Verunreinigungen der RNA auszuschließen, wurden folgende Grenzwerte bei der UV-Messung festgelegt: für das 260 nm:230 nm-Verhältnis $> 2,1$; für das 260 nm:280 nm-Verhältnis $< 2,0$. Zur Qualitätskontrolle der RNA wurde eine Analyse durch den Agilent Bioanalyzer 2100 (Type G2939A) an der Klinik für Herz-Thorax-Chirurgie des Universitätsklinikums Halle durchgeführt. Die *RNA integrity numbers* (RIN) der Proben schwankte zwischen 9,1 und 10.

Die anschließende RNA-Fällung erfolgte mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat pH 5,2 und 1 Volumen Isopropanol für 30 Minuten bei -20°C . Nach Zentrifugation (30 Minuten, 4°C , 13000 Umdrehungen) wurde zweimalig mit 70 % Alkohol gewaschen und zwischenzeitlich zentrifugiert (30 Min., 4°C , 13000 Umdrehungen). Das RNA-Pellet wurde nach Zugabe von 1 mL 70 % Alkohol auf Trockeneis gelagert.

2.9.2. Sequenzierung

Im Laboratory for Functional Genome Analysis (LAFUGA) der Ludwig-Maximilian-Universität-München unter Leitung von Dr. rer. nat., Dr. vet. med. habil. Stefan Bauersachs erfolgte nach der cDNA-Synthese die Sequenzierung mit dem Illumina Genome Analyzer Iix. Dazu wurden 16 *Multiplex-RNA-Seq-Libraries* auf 7 Lanes verteilt und als Gemisch sequenziert.

2.9.3. Datenauswertung

Ebenfalls LAFUGA erfolgte die Alignierung der Sequenzen mit dem Kaninchengenom. Datensätze mit quantitativen Aussagen zu allen im Endometrium exprimierten Sequenzen wurden in Form von Excel-Tabellen zur Verfügung gestellt. Zur weiteren Analyse der Daten wurden die Kaninchen-*Gen-IDs* in humane *Gen-IDs* umgeschrieben. Dazu wurde ein Algorithmus genutzt, welcher auf einem BLAST-Vergleich zwischen den *Reference Sequence* (RefSeq)-Transkripten von Kaninchen und Menschen beruht.

Eine Sortierung der Gene nach Signifikanzniveau und *fold change* (FC) erfolgte über Microsoft Excel. Zur Zuordnung von Genen zu funktionellen Begriffen und zu deren Clusterbildung diente das freie Web-Programm DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery). Dabei wurden nur Gene mit einem p-Wert kleiner 0.1 und einem *fold change* größer 1.5 bzw. kleiner 0.67 berücksichtigt. Als Referenz (*background*) diente die Gesamtheit der in der RNA-Seq sequenzierten Transkripte des Kaninchens, welche in humane *Gen-IDs* umgeschrieben werden konnten (8703 Gene).

3. Ergebnisse

Um den Einfluss eines Diabetes mellitus und einer Schwangerschaft auf das Kaninchenendometrium zu überprüfen, wurde am Tag 6 p.c. gewonnenes Endometrium von vier verschiedenen Versuchstiergruppen miteinander verglichen:

1. gravid	-	Kontrolle
2. gravid	-	Diabetes mellitus
3. pseudogravid	-	Kontrolle
4. pseudogravid	-	Diabetes mellitus

3.1. Transkriptmengen von IGF1 und IGF2 im Kaninchenendometrium

3.1.1. Quantifizierung von IGF1 mittels qRT-PCR

Die IGF1-Transkriptmenge war bei den pseudograviden, diabetischen Kaninchen ca. 3fach höher als bei den graviden Tieren und entsprechenden Kontrollen (Abb. 5).

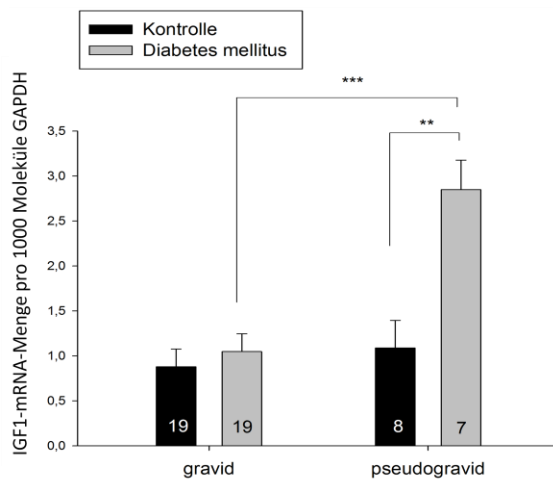


Abb. 5

IGF1-Transkriptmenge im Endometrium des Kaninchens am Tag 6 p.c. in Abhängigkeit von Diabetes mellitus und Gravidität.

Die mRNA-Menge wurde mittels qRT-PCR ermittelt. Die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe wurde in die Diagrammsäulen eingetragen. Die Ergebnisse sind als MW±SEM mit * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ dargestellt.

3.1.2. Quantifizierung von IGF2 mittels qRT-PCR

Unter dem Einfluss von Diabetes mellitus kam es bei den graviden Tieren zu keiner signifikanten Änderung der IGF2-Transkriptmenge. Bei den pseudograviden Tieren zeigte sich ein fast vierfacher Anstieg der Transkription. Bei den Kontrolltieren exprimierten gravide Tiere IGF2-mRNA ca. dreifach so stark wie pseudogravide (Abb. 6).

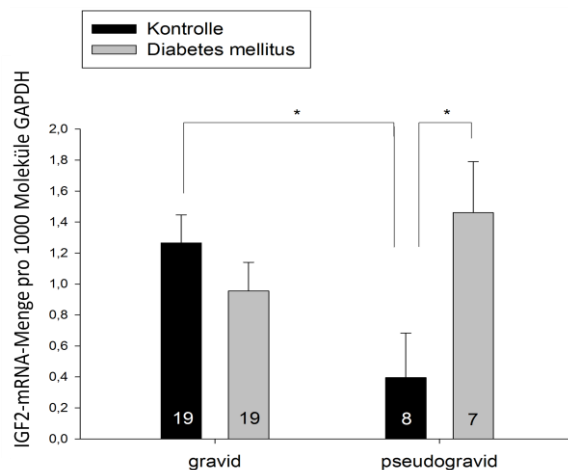


Abb. 6

IGF2-Transkriptmenge im Endometrium des Kaninchens am Tag 6 p.c. in Abhängigkeit von Diabetes mellitus und Gravidität.

Die mRNA-Menge wurde mittels qRT-PCR ermittelt. Die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe wurde in die Diagrammsäulen eingetragen. Die Ergebnisse sind als MW±SEM mit * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ dargestellt.

3.2. Transkriptmengen von IR, IGF1R und IGF2R im Kaninchenendometrium

3.2.1. Quantifizierung des IR mittels qRT-PCR

Bei den graviden und pseudogriden Kaninchen hatte die Induktion eines Diabetes mellitus keinen signifikanten Einfluss auf die IR-Transkriptmenge. Pseudogravide Tiere exprimierten den IR stärker als gravide Tiere (Abb. 7).

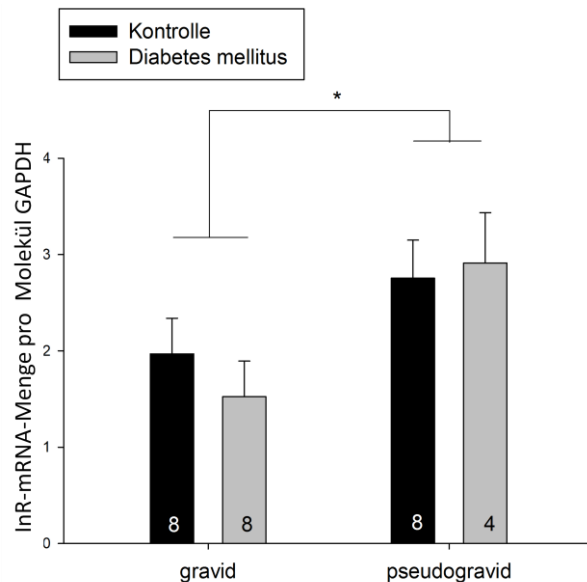


Abb. 7

IR-Transkriptmenge im Endometrium des Kaninchens am Tag 6 p. c. in Abhängigkeit von Diabetes mellitus und Gravidität.

Die mRNA-Menge wurde mittels qRT-PCR ermittelt. Die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe wurde in die Diagrammsäulen eingetragen. Die Ergebnisse sind als MW±SEM mit *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 dargestellt.

3.2.2. Quantifizierung von IGF1R mittels qRT-PCR

Im Endometrium des Kaninchens hatten Diabetes mellitus und Gravidität keinen signifikanten Einfluss auf die IGF1R-Transkriptmenge (Abb. 8).

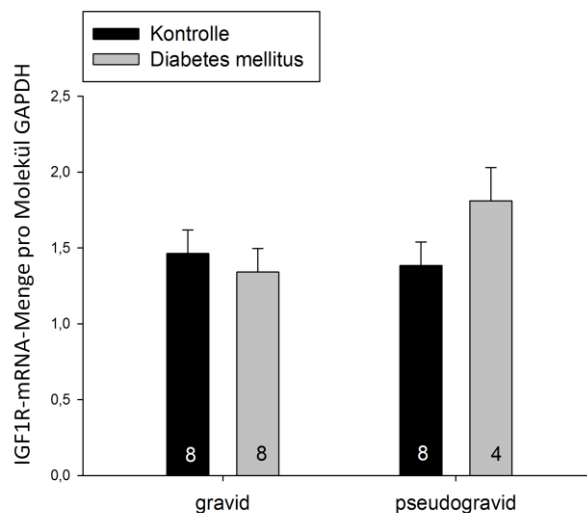


Abb. 8

IGF1R-Transkriptmenge im Endometrium des Kaninchens am Tag 6 p. c. in Abhängigkeit von Diabetes mellitus und Gravidität.

Die mRNA-Menge wurde mittels qRT-PCR ermittelt. Die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe wurde in die Diagrammsäulen eingetragen. Die Ergebnisse sind als MW±SEM mit *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 dargestellt.

3.2.3. Quantifizierung des IGF2R mittels qRT-PCR

Ein Diabetes mellitus hatte bei den graviden und pseudogriden Tieren keinen signifikanten Einfluss auf die IGF2R-Transkriptmenge. Pseudogravide Tiere exprimierten mehr IGF2R als gravide Tiere (Abb. 9).

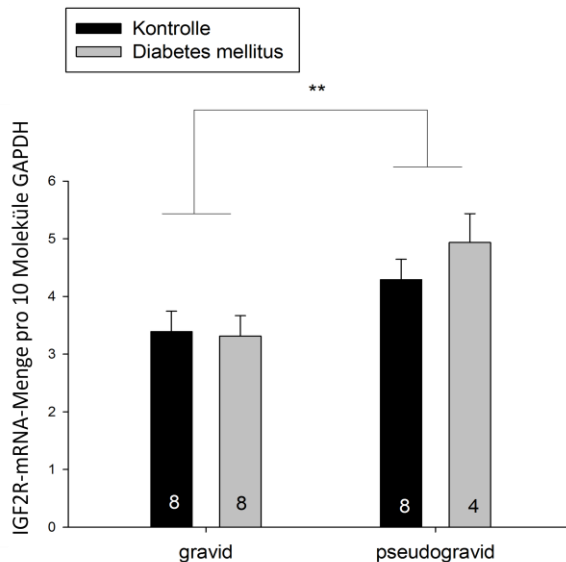


Abb. 7
IGF2R-Transkriptmenge im Endometrium des Kaninchens am Tag 6 p. c. in Abhängigkeit von Diabetes mellitus und Gravidität.

Die mRNA-Menge wurde mittels qRT-PCR ermittelt. Die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe wurde in die Diagrammsäulen eingetragen. Die Ergebnisse sind als $MW \pm SEM$ mit * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ dargestellt.

3.3. Quantifizierung von IGFBP1 in Endometrium und Blastozysten des Kaninchens

3.3.1. Quantifizierung von IGFBP1 im Kaninchenendometrium mittels qRT-PCR

Bei den graviden Tieren verringerte sich die IGFBP1-Transkriptmenge durch einen Diabetes mellitus auf ca. die Hälfte. Ähnliches zeigte sich auch bei den pseudogriden Tieren ohne signifikant zu sein. Gravidität hatte keinen Einfluss auf die IGFBP1-Transkription (Abb. 10).

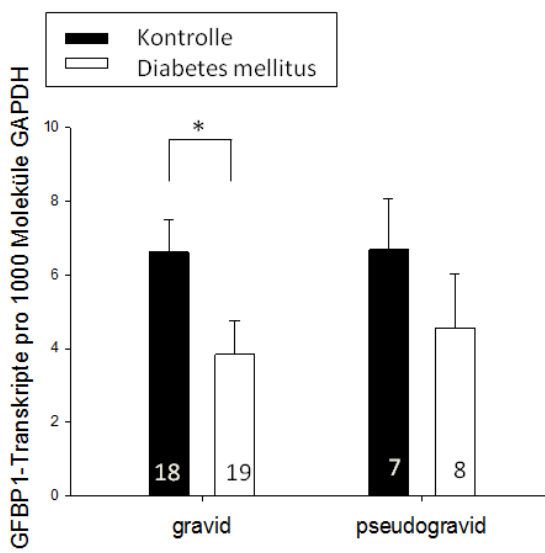


Abb. 8
IGFBP1-Transkriptmenge im Endometrium des Kaninchens am Tag 6 p. c. in Abhängigkeit von Diabetes mellitus und Gravidität.

Die mRNA-Menge wurde mittels qRT-PCR ermittelt. Die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe wurde in die Diagrammsäulen eingetragen. Die Ergebnisse sind als $MW \pm SEM$ mit * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ dargestellt.

3.3.2. Quantifizierung von IGFBP1 im Endometrium mittels Western Blot

Die Quantifizierung des IGFBP1 auf Proteinebene war nicht möglich. Zwei gegen humane Epitope gerichtete Antikörper wurden intensiv getestet ohne eine spezifische Bande für IGFBP1 detektieren zu können.

3.3.3. Quantifizierung von IGFBP1 in Kaninchenblastozysten mittels qRT-PCR

In den Kaninchenblastozysten zeigte sich stadienübergreifend kein Einfluss eines Diabetes mellitus auf die IGFBP1-Expression (Abb. 11).

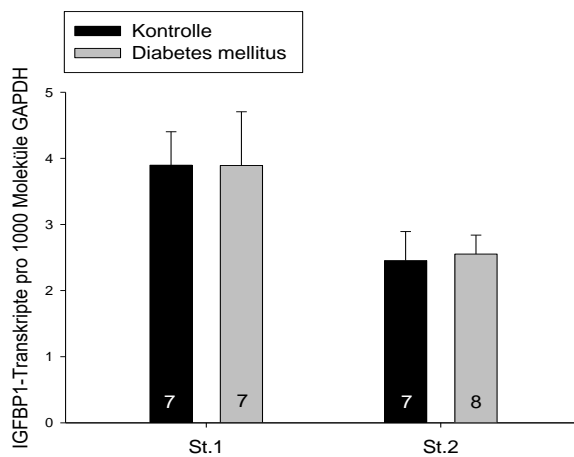


Abb. 9

IGFBP1-Transkriptmenge von Kaninchenblastozysten der Gastrulationsstadien 1 und 2 in Abhängigkeit von Diabetes mellitus.

Die mRNA-Menge (MW ± SEM) wurde mittels qRT-PCR ermittelt. Die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe wurde in die Diagrammsäulen eingetragen

3.4. Die Transkriptmengen von LIF und LIFR im Kaninchenendometrium

3.4.1. Quantifizierung von LIF mittels qRT-PCR

Im Endometrium des Kaninchens hatten ein maternaler Diabetes mellitus und die Gravidität keinen signifikanten Einfluss auf die LIF-Transkriptmenge (Abb. 12).

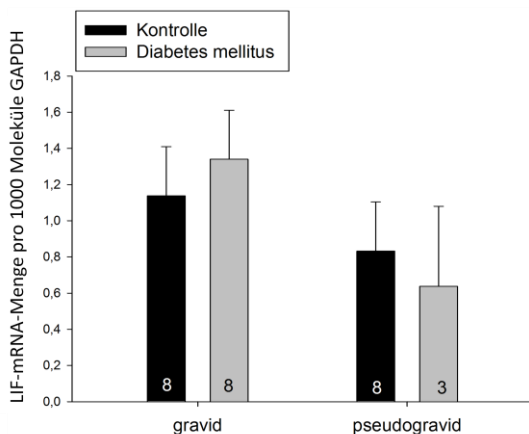


Abb. 10

LIF-Transkriptmenge im Endometrium des Kaninchens am Tag 6 p.c. in Abhängigkeit von Diabetes mellitus und Gravidität.

Die mRNA-Menge wurde mittels qRT-PCR ermittelt. Die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe wurde in die Diagrammsäulen eingetragen. Die Ergebnisse sind als MW±SEM mit *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 dargestellt.

3.4.2. Quantifizierung von LIFR mittels qRT-PCR

Im Endometrium des Kaninchens hatten ein maternaler Diabetes mellitus und Gravidität keinen Einfluss auf die LIFR-Transkription (Abb. 13).

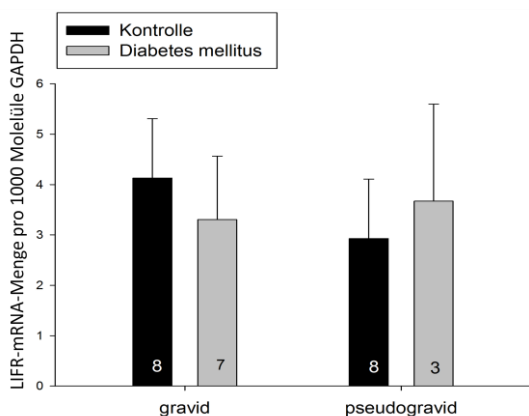


Abb. 11

LIFR-Transkriptmenge im Endometrium des Kaninchens am Tag 6 p.c. in Abhängigkeit von Diabetes mellitus und Gravidität.

Die mRNA-Menge wurde mittels qRT-PCR ermittelt. Die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe wurde in die Diagrammsäulen eingetragen. Die Ergebnisse sind als MW±SEM mit p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 dargestellt.

3.5. Transkriptomanalyse des Kaninchenendometriums durch RNA-Seq

In die Transkriptomanalyse des Endometriums mittels RNA-Seq wurden 16 Individuen, aufgeteilt auf 4 Gruppen, eingeschlossen. Allerdings war die RNA-Qualität nicht in allen Fällen ausreichend, sodass die Gruppe der diabetischen, graviden Tiere vollständig entfiel, während die Anzahl der Versuchstiere in anderen Gruppen dezimiert wurde (Abb. 14). Aufgrund dessen war ein Diabeteseffekt ausschließlich bei den pseudograviden Kaninchen und ein Graviditätseffekt ausschließlich bei den Kontrolltieren auswertbar.

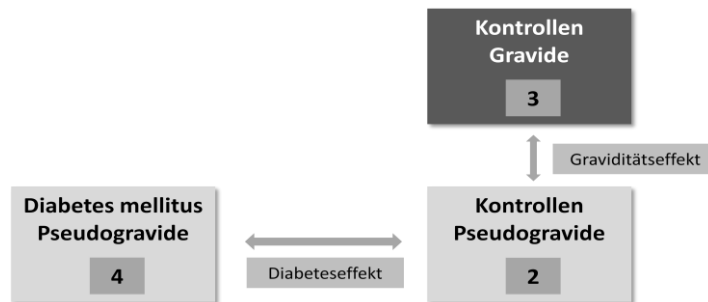


Abb. 12: Anzahl der durch RNA-Seq auswertbaren Tiere pro Versuchsgruppe

3.5.1. Erfassung des endometrialen Transkriptoms durch RNA-Seq

Durch die Sequenzierung wurden 34926 verschiedene Transkripte erfasst. Bei ca. einem Drittel der Sequenzen war es möglich, sie einem annotierten Gen des Kaninchengenoms zuzuordnen. Die Auswertung der RNA-Seq-Daten basierte auf der Zuordnung differenziell exprimierter Gene zu funktionellen Begriffen (z. B. *GO-Terms*). Biologisch zusammenhängende funktionelle Begriffe wurden zu Clustern (*annoation cluster*) zusammengefasst. Die Analyse erfolgte durch das *Webtool* DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery). Zur Prozessierung der Daten war es notwendig, die *Gen-IDs* des Kaninchens in humane *Gen-IDs* umzuschreiben und einen Vergleichsparameter (*background*) zu definieren. Tabelle 4 fasst die Vorgehensweise und die resultierenden bewertbaren Sequenzen der RNA-Seq-Analyse zusammen. Letztendlich gingen 22,4 % aller RNA-Seq-Transkripte in die Auswertung durch DAVID ein. Als hoch- bzw. herunterreguliert wurden Gene mit einem p -Wert < 0.1 und einem *fold change* größer 1,5 bzw. kleiner 0,76 festgelegt.

Tab. 4: Anzahl der durch RNA-Seq erfassten Gene im Kaninchenendometrium

	Anzahl der Gene (% zur Gesamtmenge)	
Durch RNA-Seq erfasste Sequenzen	34926	
... davon im Kaninchengenom annotierte Gene	11467 (33 %)	
... und in humane Gen-ID umschreibbar	8703 (24,9 %)	
... davon durch DAVID erkannte Gene (<i>background</i>)	7824 (22,4 %)	
	<u>Diabetes mellitus</u>	<u>Gravidität</u>
... davon hochregulierte Gene	166 (2,1 %)	102 (1,3 %)
... und herunterregulierte Gene	194 (2,5 %)	104 (1,3 %)

DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery)

3.5.2. Zuordnung durch Gravidität veränderter Gene zu funktionellen Begriffen

Durch den Einfluss des Embryos waren im Endometrium 206 Gene differenziell exprimiert, wobei die Menge der hoch- und herunterregulierten Gene annähernd gleich war (siehe Tab. 4).

Durch DAVID konnten veränderte Gene funktionellen Begriffen verschiedener Klassifikationssysteme wie z. B. *Gene Ontology* (GO) zugeordnet werden. Zur Auswahl der zu berücksichtigenden Klassifikationssysteme wurden die DAVID-internen Voreinstellungen genutzt (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/list.jsp>). Daraus ergaben sich 72 funktionelle Begriffe für durch Gravidität hochregulierte Gene und 69 funktionelle Begriffe für herunterregulierte Gene. Berücksichtigt wurden funktionelle Begriffe mit mindestens 2 veränderten Genen mit $p < 0.1$. Biologisch nahestehende funktionelle Begriffe wurden in Clustern (*Annotation cluster*) zusammengefasst und diese und nach ihrem Signifikanzniveau (*enrichment score* (ES)) geordnet. Tabelle 5 zeigt die Cluster funktioneller Begriffe, welche durch eine Gravidität verändert waren.

Tab. 5: Ausgewählte *Annotation cluster* für durch eine Gravidität beeinflusste Gene des Kaninchenendometriums

Cluster hochregulierter Gene mit Darstellung ausgewählter funktioneller Begriffe	ES
1.) <i>disulfide bond</i> (16, 2.6); <i>glycoprotein</i> (22, 1.7)	2,41
2.) <i>membran</i> (39, 1.4); <i>transmembran</i> (28, 1.4)	1,53
3.) <i>glycoprotein metabolic process</i> (6, 4.5); <i>glycoprotein biosynthetic process</i> (5, 4.7); <i>glycosylation</i> (4, 4.6)	1,50
4.) <i>cell adhesion</i> (6, 2.6); <i>basolateral plasma membrane</i> (7, 4.4), <i>extracellular region part</i> (7, 6.0)	1,46
Cluster herunterregulierter Gene mit Darstellung funktioneller Begriffe	
1.) <i>glycoprotein</i> (29, 2.2); <i>signal</i> (20, 2.2); <i>secreted</i> (11, 3.1); <i>extracellular region</i> (13, 2.5)	3,15
2.) <i>glycoprotein</i> (29, 2.2); <i>intrinsic to membrane</i> (34, 1.4)	3,14
3.) <i>calcium ion binding</i> (10, 2.8); <i>calcium</i> (7, 2.4)	1,41

ES (*enrichment score*): Mittelwert der p-Werte der *functional terms* eines Clusters (-log₁₀-Skala). Es wurden nur *annotation cluster* mit ES-Werten > 1,3 berücksichtigt. Die Werte in Klammern der *functional terms* geben die Anzahl der Gene und den *fold change an*. Der *fold change* vergleicht die Anzahl der veränderten Gene eines funktionellen Begriffs mit der der Referenzgruppe (*background*). *Classification stringency*: medium; p-Wert der *functional terms* < 0.1

3.5.3. Einfluss der Gravidität auf Signaltransduktionswege

Die Gravidität hat Einfluss auf 3 Signaltransduktionswege bei der Analyse aller durch Schwangerschaft veränderten Gene in der Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)-Database.

Tab. 6: Durch Gravidität beeinflusste Signaltransduktionswege

Signalweg	Gen	FC G/P	p-Wert
<i>TGF-beta signaling pathway</i>	1. S-phase kinase-associated protein 1	0,53	0,0055
	2. bone morphogenetic protein 6	0,57	
	3. cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)	0,37	
	4. inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	0,34	
	5. inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-	6,47	

	helix protein		
	6. latent transforming growth factor beta binding protein 1	1,67	
	1. calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (MAGUK family)	1,79	
tight junction	2. claudin 1	0,13	0,031
	3. erythrocyte membrane protein band 4.1-like	1,96	
	4. myosin, heavy chain 9, non-muscle	3,37	
	5. protein kinase C, epsilon	2,23	
	6. symplekin	1,91	
CARM1 and Regulation of Estrogen Receptor	1. coactivator-associated arginin methyltransferase 1	0,17	0,089
	2. glutamate receptor interacting protein 1	0,62	
	3. nuclear receptor interacting protein 1	1,61	

FC (fold change), G (Gravid), P (Pseudogravid)

3.5.4. Zuordnung durch Diabetes mellitus veränderter Gene zu funktionellen Begriffen

Durch den Einfluss des Diabetes mellitus waren im Endometrium 360 Gene differenziell exprimiert, davon 166 Gene hoch- und 194 Gene herunterreguliert.

Durch DAVID konnten veränderte Gene funktionellen Begriffen verschiedener Klassifikationssysteme wie z. B. *Gene Ontology* (GO) zugeordnet werden. Zur Auswahl der zu berücksichtigenden Klassifikationssysteme wurden die DAVID-internen Voreinstellungen genutzt (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/list.jsp>). Daraus ergaben sich 32 funktionelle Begriffe für durch Diabetes mellitus hochregulierte Gene und 197 funktionelle Begriffe für herunterregulierte Gene. Berücksichtigt wurden funktionelle Begriffe mit mindestens 2 veränderten Genen mit $p < 0.1$. Biologisch nahestehende funktionelle Begriffe wurden in Clustern (*Annotation cluster*) zusammengefasst und diese und nach ihrem Signifikanzniveau (*enrichment score* (ES)) geordnet. Tabelle 6 zeigt die Cluster funktioneller Begriffe, welche durch Diabetes mellitus verändert waren.

Tab. 7: Ausgewählte *Annotation cluster* für durch Diabetes mellitus beeinflusste Gene des Kaninchenendometriums

Cluster hochregulierter Gene mit Darstellung ausgewählter funktioneller Begriffe	ES
1.) <i>stress response</i> (4, 6.3); <i>response to unfolded protein</i> (5, 5.5)	1,87
2.) <i>ion transport</i> (12, 2.3); <i>calcium channel activity</i> (3, 7.8)	1,54
Cluster herunterregulierter Gene mit Darstellung ausgewählter funktioneller Begriffe	
1.) <i>signal</i> (39, 2.3); <i>receptor</i> (18, 2.5); <i>glycoprotein</i> (49, 2.0); <i>membrane</i> (62, 1.2); <i>extracellular space</i> (12, 3.5)	3,88
2.) <i>immunoglobulin domain</i> (8, 4.1); <i>cell adhesion</i> (9, 3.2);	1,96
3.) <i>positive regulation of apoptosis</i> (13, 2.3); <i>regulation of cell death</i> (18, 1.8)	1,79
4.) <i>intrinsic to plasma membrane</i> (17, 2.0); <i>plasma membrane part</i> (28, 1.4)	1,75
5.) <i>response to vitamin A</i> (4, 13); <i>response to nutrient</i> (5, 3.2)	1,66
6.) <i>positive regulation of secretion</i> (4, 5.4); <i>positive regulation of transport</i> (6, 3.0)	1,56
7.) <i>regulation of growth</i> (9, 2.5); <i>cell growth</i> (4, 4.5)	1,55
8.) <i>growth factor activity</i> (4, 5.5); <i>positive regulation of cell differentiation</i> (6, 2.8)	1,54
9.) <i>ribosome</i> (8, 2.2); <i>translational elongation</i> (5, 3.2)	1,45

10.) <i>cell migration</i> (8, 2.9); <i>localization of cell</i> (8, 2.7); <i>pattern binding</i> (4, 4.0)	1,43
11.) <i>regulation of immune effector process</i> (4, 5.4); <i>regulation of leukocyte mediated immunity</i> (3, 8.2)	1,35
12.) <i>positive regulation of biosynthetic process</i> (15, 1.9); <i>positive regulation of gene expression</i> (13, 1.8); <i>positive regulation of transcription</i> (12, 1.7)	1,35

ES (*enrichment score*): Mittelwert der p-Werte der *functional terms* eines Clusters (-log₁₀-Skala). Es wurden nur *annotation cluster* mit ES-Werten >1,3 berücksichtigt. Die Werte in Klammern der *functional terms* geben die Anzahl der Gene und den *fold change an*. Der *fold change* vergleicht die Anzahl der veränderten Gene eines funktionellen Begriffs mit der der Referenzgruppe (*background*). *classification stringency*: medium; p-Wert der *functional terms* < 0.1

3.5.5. Einfluss eines Diabetes mellitus auf Signaltransduktionswege

Ein Diabetes mellitus hat Einfluss auf 2 Signaltransduktionswege bei der Analyse aller durch Diabetes mellitus veränderten Gene in der Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG).

Tab. 8: Durch einen Diabetes mellitus beeinflusste Signaltransduktionswege

Signalweg	Gen	FC D/K	p-Wert
<i>p53 signaling pathway</i>	1. checkpoint kinase 1	0,63	1,5E-2
	2. MDM2 oncogene, E3 ubiquitin protein ligase	0,61	
	3. cytochrome c, somatic	0,40	
	4. etoposide induced 2.4	0,66	
	5. thrombospondin 1	0,31	
<i>TGF-beta signaling pathway</i>	1. bone morphogenetic protein 6	0,64	7,8E-2
	2. inhibitor of DNA binding 1, dominant helix-loop-protein	7,48	
	3. thrombospondin 1	0,31	
	4. thrombospondin 3	0,38	
	5. transforming growth factor, beta III	0,42	
	6. zinc finger, FYVE domain containing 16	0,60	

FC (*fold change*), G (Gravid), P (Pseudogravid), FE (*fold enrichment*)

3.5.6. Einfluss eines Diabetes mellitus auf Proteine mit EGF-ähnlichen Domänen

Unter den durch einen Diabetes mellitus veränderten Genen war eine erhöhte Anzahl von EGF-ähnlichen Domänen tragenden Proteinen herunterreguliert.

Tab. 9: Durch Diabetes mellitus beeinflusste, EGF-ähnliche Domänen tragende Proteine

	p-Wert	FC D/K
betacellulin	4,70E-3	0,16
fibrillin 1	3,37E-5	0,38
heparin-binding EGF-like growth factor	2,51E-6	0,14
low density lipoprotein-related protein 2	2,70E-7	0,31
thrombospondin 1	6,39E-2	0,31
thrombospondin 3	5,50E-3	0,38
versican	1,03E-3	0,56

FC (*fold change*); D (Diabetische Tiere); K (Kontrolltiere)

3.6. Quantifizierung des Protocadherin 15 (PCDH15) im Kaninchenendometrium

Bei Auswertung der RNA-Seq-Daten fiel das Protocadherin 15 mit einer 5,8-fachen Herunterregulation der Transkriptmenge durch Gravidität auf und wurde aufgrund dessen zur weitergehenden Analyse ausgewählt. Die Verifikation der RNA-Seq-Daten durch qRT-PCR zeigte ebenfalls eine abnehmende Transkriptmenge durch Gravidität sowie eine zunehmende Expression durch Diabetes mellitus (Teller, 2013).

3.6.1. Quantifizierung von PCDH15 mittels Western Blot

Ein Diabetes mellitus und Gravidität hatten keinen signifikanten Einfluss auf die PCDH15-Proteinmenge (Abb. 15).

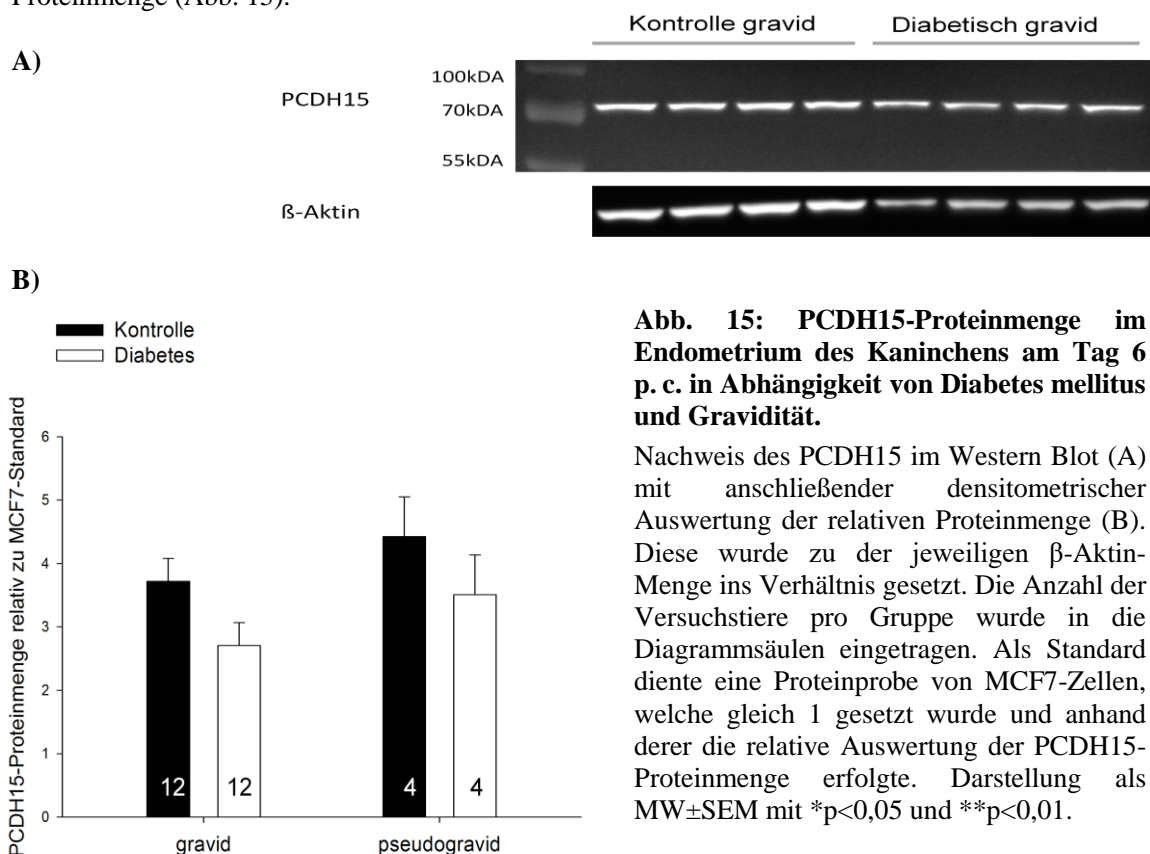


Abb. 15: PCDH15-Proteinmenge im Endometrium des Kaninchens am Tag 6 p. c. in Abhängigkeit von Diabetes mellitus und Gravidität.

Nachweis des PCDH15 im Western Blot (A) mit anschließender densitometrischer Auswertung der relativen Proteinmenge (B). Diese wurde zu der jeweiligen β -Aktin-Menge ins Verhältnis gesetzt. Die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe wurde in die Diagrammsäulen eingetragen. Als Standard diente eine Proteinprobe von MCF7-Zellen, welche gleich 1 gesetzt wurde und anhand derer die relative Auswertung der PCDH15-Proteinmenge erfolgte. Darstellung als $MW \pm SEM$ mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$.

3.7. Lokalisierung von PCDH15 im Kaninchenendometrium durch IHC

Protocadherin 15 wurde auf Uterusquerschnitten des Kaninchens immunhistochemisch dargestellt. Es zeigte sich eine ausschließlich epitheliale Expression mit einer intensiven Markierung basal gelegener Drüsenzellen und einer Abnahme der Färbungsintensität nach luminal. PCDH15 war im Zytoplasma streng perinukleär lokalisiert. Die Zellmembran zeigte keine Färbung.

3.7.1. Immunhistochemische Detektion von PCDH15 in Abhängigkeit von Diabetes mellitus und Gravidität

Am Tag 6 der Schwangerschaft zeigte sich im Kaninchenendometrium durch eine visuelle mikroskopische Bewertung kein signifikanter Einfluss von Diabetes mellitus und Gravidität auf Lage und Verteilung des PCDH15 (Abb. 16).

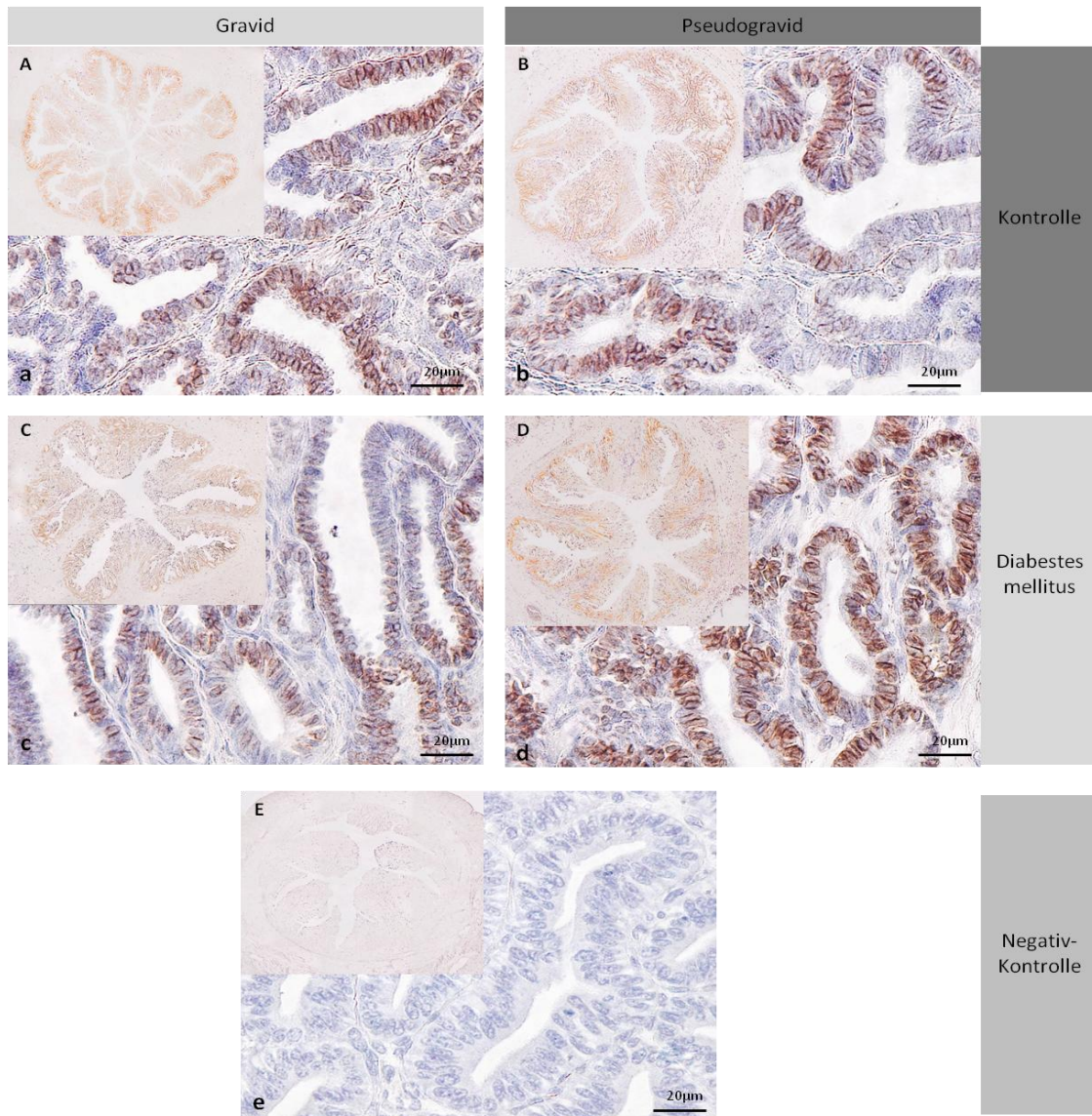


Abb. 13: Immunhistochemische Detektion von PCDH15 im Endometrium des Kaninchens am 6. Tag p. c. in Abhängigkeit von Diabetes mellitus und Gravidität.

A, B, C, D, E: Uterusquerschnitt als Übersichtsaufnahme; a, b, c, d, e: 40fache Vergrößerung mit Hämalaun gegengefärbt; Die Detektion von PCDH15 erfolgte mit DAB (braune Färbung). Für jede der Gruppen wurden Endometrien von mind. 6 verschiedenen Tieren beurteilt und repräsentative Ausschnitte dokumentiert.

3.7.2. Immunhistochemische Detektion von PCDH15 im Verlauf der Schwangerschaft des Kaninchens

Um die Dynamik der PCDH15-Expression im Verlauf der Schwangerschaft beurteilen zu können, wurden immunhistochemische Schnitte der Schwangerschaftstage 3 bis 8 p. c. angefertigt. Während der Präimplantationsphase der Tage 3 bis 6 kam es zu einer Zunahme der Höhe des Endometriums. PCDH15 zeigte in diesem Zeitraum ein konstantes Expressionsmuster mit einem maximalen Signal in den Epithelzellen der basal gelegenen endometrialen Drüsen und einer Abnahme nach luminal. Während der Implantationsphase kam es an den Tagen 7 und 8 im Rahmen der Dezidualisierung zu einem vollständigen Verschwinden des PCDH15 aus den dezidualisierten Epithelzellen. Die basal gelegenen, nicht dezidualisierten Drüsen waren weiterhin PCDH15-positiv.

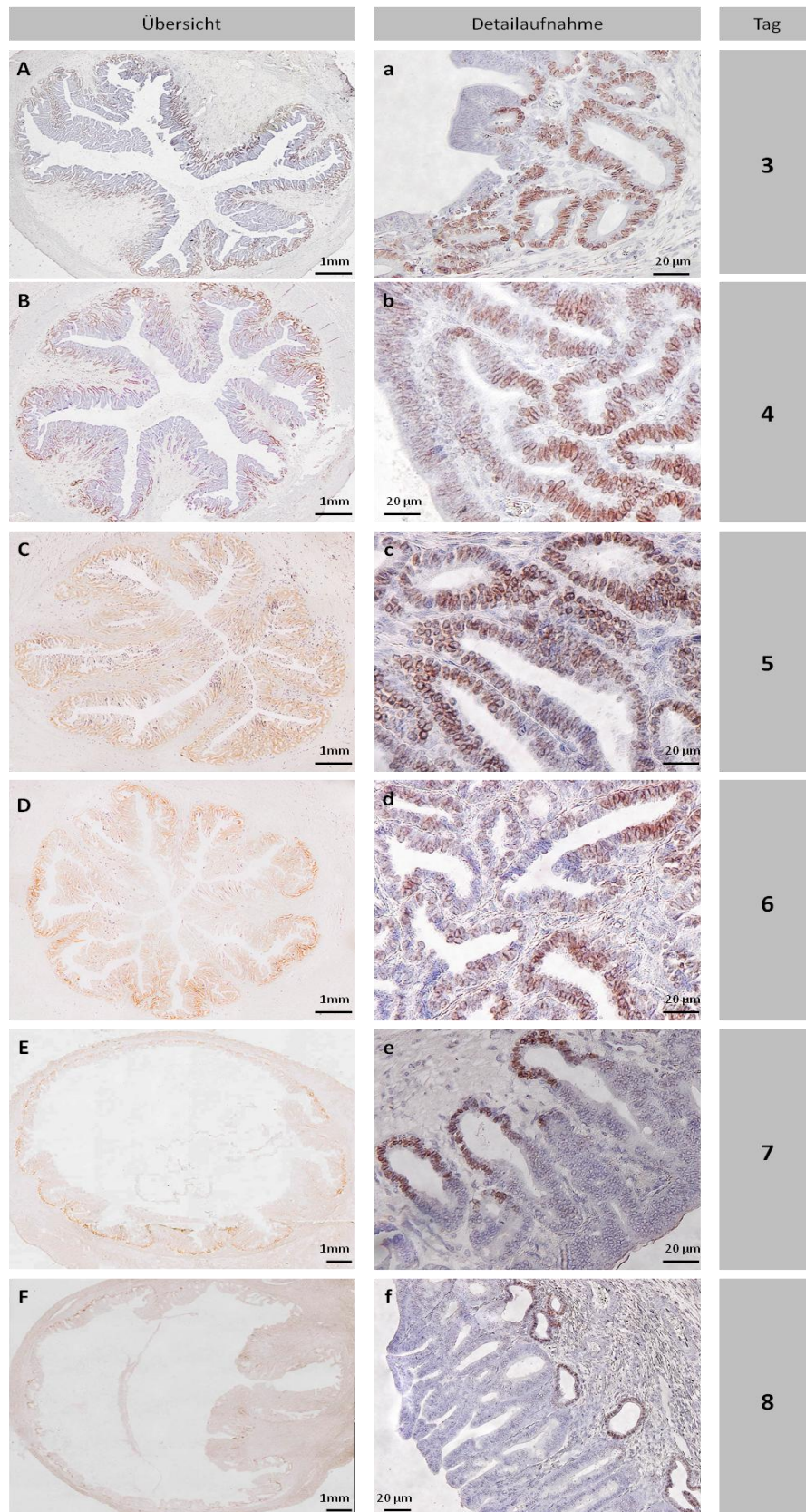


Abb. 14: Immunhistochemische Darstellung von PCDH15 im Kaninchenendometrium der Tage 3 bis 8 der Schwangerschaft.

Es sind ausschließlich Gewebsschnitte nicht-diabetischer Tiere dargestellt. Die Detektion von PCDH15 erfolgte mit DAB (braune Färbung). Bei den Bildern A, a, B, b, c, d, e, f sind die Kerne mit Hämalaun (blaue Färbung) gegengefärbt. Für jede der Gruppen wurden Endometrien von mind. 2 verschiedenen Tieren beurteilt und repräsentative Ausschnitte dokumentiert.

3.8. Lokalisierung von PCDH15 im humanen Endometrium durch IHC

Im humanen Endometrium konnte die Proteinexpression von PCDH15 nachgewiesen werden. PCDH15 war in allen Schichten des epithelialen Endometriums und vereinzelt in stromalen Zellen detektierbar. Wie im Kaninchen war auch im humanen Model PCDH15 perinukleär lokalisiert.

3.8.1. Quantifizierung von PCDH15 im humanen Endometrium durch IHC im Verlauf des weiblichen Zyklus

Um die Dynamik der endometrialen PCDH15-Expression im Verlauf des weiblichen Zyklus zu untersuchen, wurde PCDH15 auf humanen Uterusschnitten verschiedener Zyklustage immunhistochemisch dargestellt und lichtmikroskopisch quantifiziert (siehe Abb. 18, Tbl. 10). Es zeigte sich ein zyklusabhängiger Verlauf der PCDH15-Expression mit einem Maximum an den Tagen 16 bis 18. In der frühen Proliferations- (Tag 6) bzw. späten Sekretionsphase (Tag 26) wurde kein PCDH15 exprimiert (siehe Abb. 19).

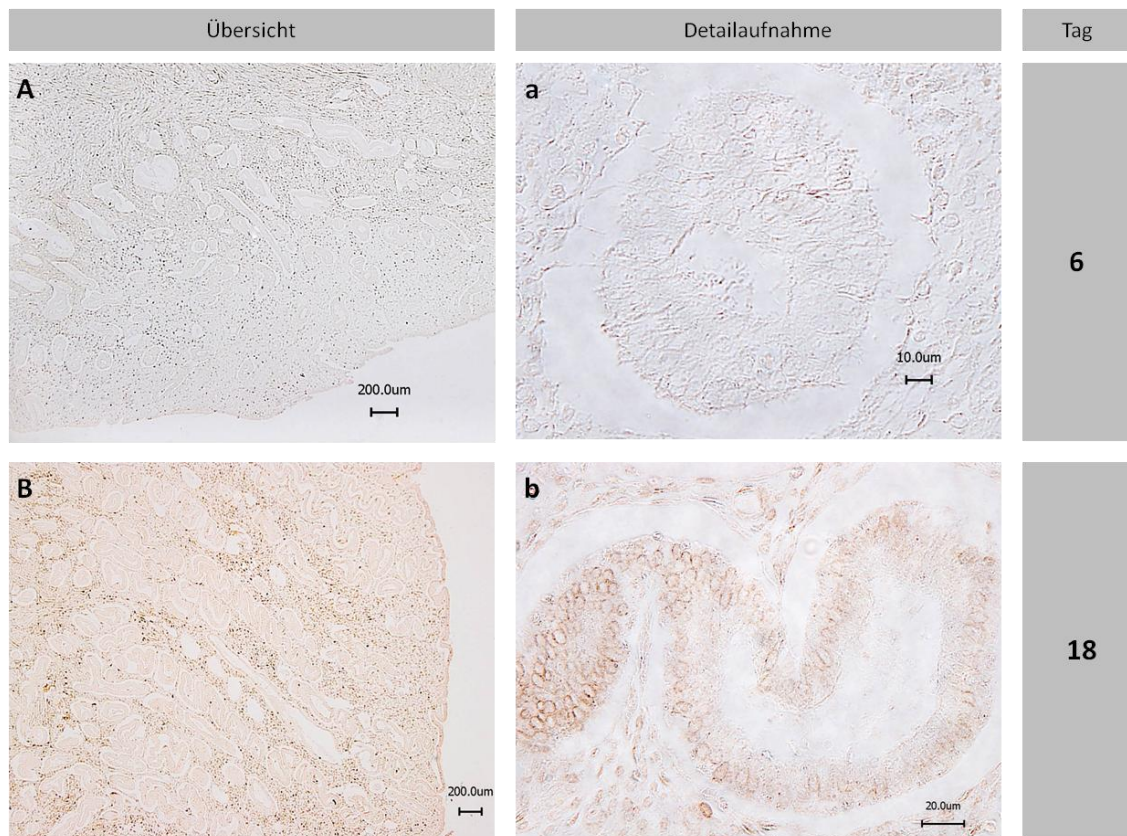


Abb. 15: Immunhistochemische Detektion von PCDH15 im humanen Endometrium in Abhängigkeit vom Zyklustag der Frau.

Dargestellt ist exemplarisch Tag 6 (A, a), an dem kein PCDH15 exprimiert wurde, und Tag 18 als Tag mit der maximalen PCDH15-Expression. A, B: Übersichtsaufnahmen in 2-facher Vergrößerung; a, b: Ausschnitt in 40-facher Vergrößerung; Die Detektion von PCDH15 erfolgte mit DAB (braune Färbung).

Tab. 10: Relative PCDH15-Proteinmenge im humanen Endometrium in Abhängigkeit vom Zyklustag und der Lokalisation im Gewebe

Die Signalstärke (SI: *staining intensity*) wurde am Lichtmikroskop visuell beurteilt. Eine relative Mengenbewertung erfolgte durch die Einteilung der Färbungsintensitäten in 0=kein Signal, 1=schwaches Signal, 2=mittleres Signal, 3=starkes Signal. Der Anteil positiver Zellen (POPC=*percentage of positive cells*) wurde eingeteilt in: 0=0 %, 1=1-10 %, 2=11-50 %, 3>50 %. Aus den SI-Werten von Basalis, Funktionalis und Stroma wurde der Mittelwert gebildet und dieser mit dem POPC-Wert multipliziert.

Zt.	Nr.	SI	SI		SI Stroma	Ø SI	POPC	Ø SI	Ø
		Str. basale	Str. functionale Str. sp.	Str. comp.				x POPC	
6	8182	0	0		0	0	0	0	0
	3591	0	0		0	0	0	0	
9	6591	0	0		0	0	0	0	0,45
	H64	1	1		0	0,67	1	0,67	
	4832	0	1		1	0,67	1	0,67	
10	8532	1	1		1	1	1	1	0,56
	3582	0	0		0	0	0	0	
	3801	0	1		1	0,67	1	0,67	
12	6101	1	1		0	0,67	1	0,67	2,01
	2431	2	2		1	1,67	2	3,34	
13	2022	1	1		1	1	1	1	1
	2481	0	0		0	0	0	0	
	2901	1	1		1	1	2	2	
14	2641	1	1		1	1	1	1	1
16	3202	2	3	2	2	2,25	3	6,75	4,12
	7562	1	1	1	1	1	2	2	
	0462	2	1	2	1	1,5	3	4,5	
17	3421	3	2	3	2	2,5	3	7,5	5
	7292	1	2	2	1	1,5	3	4,5	
	3632	1	1	1	1	1	3	3	
18	3741	2	2	3	1	2	3	6	5,75
	F110	1	1	1	1	1	3	3	
	3912	2	3	3	3	2,75	3	8,25	
19	6152	1	1	1	1	1	2	2	2,33
	3782	1	1	1	1	1	2	2	
	2042	1	1	2	2	1,5	2	3	
20	2322	0	1	1	1	0,75	1	0,75	2,125
	9292	0	1	1	0	0,5	1	0,5	
	2071	1	1	1	1	1	2	2	
	6021	2	1	2	2	1,75	3	5,25	
21	3372	0	0	1	0	0,25	1	0,25	1,08
	4732	2	1	1	0	1	2	2	
	6842	1	1	1	1	1	1	1	
22	5672	0	0	1	0	0,25	1	0,25	0,42
	9282	0	0	0	0	0	0	0	
	2962	1	1	1	1	1	1	1	
25	8632	0	0	0	0	0	0	0	0,92
	4171	1	1	1	1	1	2	2	
	2962	1	0	1	1	0,75	1	0,75	
26	6123	0	0	0	0	0	0	0	0

Zt.: Zyklustag, Nr.: Nummer, Str.: Stratum, sp.: spongiosum, comp.: compactum

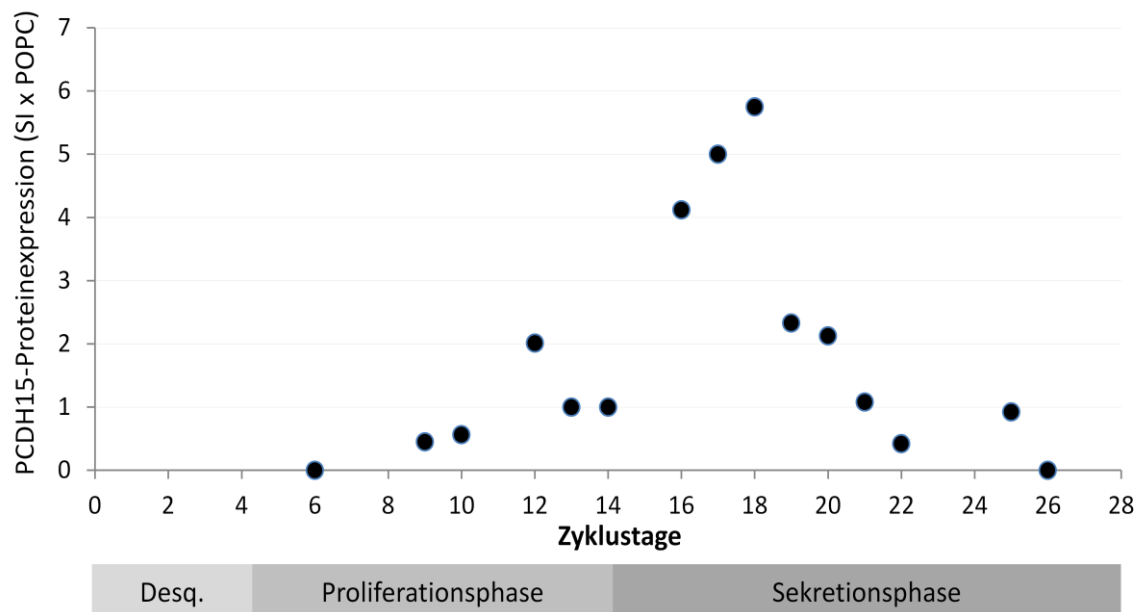


Abb. 16: Immunhistochemische Quantifizierung der PCDH15-Proteinexpression im humanen Endometrium in Abhängigkeit vom Zyklustag der Frau

Die PCDH15-Proteinexpression als quantitativer Wert ergibt sich aus der Signalstärke (SI: *staining intensity*) und der Anzahl der positiven Zellen (POPC: *percentage of positive cells*). Die Einzelwerte wurden in Tab. 10 erfasst. Desq.: Desquamationsphase

4. Diskussion

Für die erfolgreiche Entwicklung des Embryos während der Präimplantationsphase und zur Koordinierung der Implantation bedarf es der engen Kommunikation zwischen Embryo und Endometrium. Diese erfolgt über endokrin, parakrin und autokrin wirksame Faktoren (Brigstock et al., 1989; Kaye u. Harvey, 1995; Kane et al., 1997; Hardy u. Spanos, 2002).

Durch einen Diabetes mellitus kommt es zu einer mütterlichen Subfertilität, welche sich bereits in der Präimplantationsphase durch eine embryonale Entwicklungsverzögerung und eine verminderte Blastozystenanzahl äußert (Vercheval et al., 1990; Beebe u. Kaye, 1991; Ramin et al., 2010). Ursache dafür ist eine gestörte embryo-maternale Kommunikation, bedingt durch die diabetische Stoffwechsellaage und die fehlende Wirkung des Wachstumsfaktors Insulin.

4.1. Die Faktoren des Insulin-IGF-Systems

Insulin stimuliert als Wachstumsfaktor die Proliferation, Entwicklung und Proteinsynthese des Embryos (Harvey u. Kaye, 1988; Rao et al., 1990). Allerdings kann Insulin vom Präimplantationsembryo nicht selbst gebildet werden (Ramin et al., 2010), weshalb es über das Endometrium aus dem mütterlichen Kreislauf bereitgestellt werden muss. Im Rahmen eines experimentell induzierten Diabetes mellitus kommt es im Kaninchen zu einer Abnahme der Insulin-Serumkonzentration um 85 %. In der Blastozyste ist kein Insulin mehr nachweisbar, es kommt zum vollständigen Erliegen der Insulinwirkung im Embryo (Ramin et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob ein Diabetes mellitus weitere endometriale Faktoren des Insulin-IGF-Systems in Bezug auf die embryo-maternale Kommunikation verändert. Durch die Expression von IGF1 und IGF2 in endometrialen Stromazellen werden einerseits endometriale Prozesse, durch die Sezernierung in den embryo-maternalen Raum gleichzeitig auch embryonale Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose gesteuert. (Kaye u. Harvey, 1995; Heyner, 1997; Watson et al., 1999).

Tab. 11: Vergleich erhobener Expressionsdaten (Transkriptmengen) von Faktoren des Insulin-IGF-Systems im Endometrium diabetischer Kaninchen.

	J. Gabel, Dissertation (vorliegende Arbeit)		M. Schindler, Diplomarbeit 2009	Thieme et al., 2012
	Gravid	Pseudogravid		
IGF1	=	↑	=	↑↑
IGF2	=	↑	=	↑↑
IR	=	=	=	
IGF1R	=	=	↓	
IGF2R	=	=	=	

= gleich, ↓ geringer, ↑ höher, ↑↑ stark erhöht im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren

4.1.1. IGF1 und IGF2

IGF1 wirkt als Östrogen-Mediator auf mitogene und anti-apoptotische Prozesse im Endometriums während der Proliferationsphase (Giudice et al., 1993). Dagegen steuert IGF2 mit seinem Expressionsmaximum während der Sekretionsphase endometriale Prozesse im Rahmen der 2. Zyklushälfte (Giudice et al., 1993; Ganefff et al., 2009).

In der Blastozyste erhöht IGF1 die Zellzahl und wirkt anti-apoptotisch (Velazquez et al., 2009; Ramin et al., 2010). Sowohl eine IGF1- als auch eine IGF2-Nullmutation sind im Mausmodell mit dem Leben vereinbar, allerdings führen sie zu intrauteriner Wachstumsretardierung und einer hohen perinatalen Mortalität (DeChiara et al., 1990; Liu et al., 1993; Powell-Braxton et al., 1993).

Im Rahmen eines mütterlichen Diabetes mellitus sinkt die Serumkonzentration des IGF1 durch verminderte Bildung in der Leber (Bhaumick et al., 1986; Thieme et al., 2012). Gleichzeitig kommt es in Präimplantationsembryonen diabetischer Kaninchen kompensatorisch zu einer deutlichen Steigerung sowohl der IGF1- als auch der IGF2-Expression (Thieme et al., 2012). Dazu passend konnten im Nabelschnurblut von Kindern diabetischer Mütter erhöhte IGF1-Konzentrationen gemessen werden, was potentiell für die Makrosomie von Neugeborenen diabetischer Mütter verantwortlich gemacht wird (Roth et al., 1996; Sun et al., 1997). Die lokale Überexpression der IGFs in embryonalen Geweben bei einer systemischen Herunterregulation wird als kompensatorischer Mechanismus zur fehlenden Insulinwirkung angesehen (Thieme et al., 2012).

Auch im Endometrium diabetischer Kaninchen wurde von Thieme und Koautoren eine Erhöhung der Transkriptmenge von IGF1 und IGF2 um das 11- bzw. 13-fache beschrieben (Thieme et al., 2012), und dies als kompensatorischer Mechanismus zur fehlenden Insulinwirkung interpretiert. In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Effekt ausschließlich bei den pseudograviden Tieren bestätigt werden. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der graviden Tiere und die Beobachtungen von Schindler (2009), bei denen kein Effekt eines Diabetes mellitus auf die IGFs festgestellt wurde. Der Kontakt des Embryos zum Endometrium scheint demnach einen Einfluss auf die endometriale IGF-Expression zu haben und sich durch einen hemmenden Effekt auszuwirken.

Zum Einfluss eines Diabetes mellitus auf die IGF-Expression im Endometrium wurden in der Literatur unterschiedliche Effekte beschrieben:

- Im Endometrium nicht-gravider Nager zeigte sich kein Einfluss eines Diabetes mellitus auf IGF1 (Murphy, 1988; Manabe et al., 2013).
- Bei pseudograviden Mäusen kam es durch einen Diabetes mellitus sogar zu einer Abnahme der IGF-Transkriptmengen, während die Proteinmengen konstant blieben. (Zakaria et al., 2007, 2009).

Die Abweichungen der IGF-Transkriptionsdaten erklären sich möglicherweise aus der Generierung des Untersuchungsmaterials. Die Messungen im Endometrium wurden an verschiedenen Versuchstieren unterschiedlicher Tierversuchswiederholungen vorgenommen. Es bedarf weiterer Untersuchungen, um eine abschließende Aussage zu den IGFs im Endometrium treffen zu können.

Zum direkten Nachweis auf Proteinebene schlage ich deshalb einen ELISA auf IGF1 und IGF2 im Uterussekret als Untersuchungsmethode vor.

4.1.2. IGF1R und Insulinrezeptor

Der IGF1R und der IR vermitteln mitogene, proliferative und anti-apoptotische Signale. Durch einen Diabetes mellitus kommt es in Blastozysten diabetischer Mütter zu einer Abnahme der Transkript- und Proteinmengen von IGF1R und IR (Ramin et al., 2010). Als Ursache dafür wird die Erhöhung des IGF1 in der Blastozyste angesehen, welches den IGF1R und IR negativ reguliert (Thieme et al., 2012). Die durch einen Diabetes mellitus kompensatorisch erhöhten IGFs in der Blastozyste können ihre volle Wirkung aufgrund mangelnder Rezeptoren demnach nicht entfalten.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Herunterregulation des IGF1R durch hohe IGF1-Spiegel zur Apoptoseinduktion in den Blastozysten führt (Chi et al., 2000; Ramin et al., 2010). Von der Blastozyste gebildete IGFs, welche parakrin in den embryo-maternalen Raum sezerniert werden, sind möglicherweise für die niedrigeren IR-Transkriptmengen im Endometrium gravider im Vergleich zu pseudograviden Kaninchen verantwortlich.

Im Endometrium werden IGF1R und IR hauptsächlich in den Epithelzellen exprimiert. Im Rahmen der Dezidualisierung kommt es progesterongesteuert zu einer Zunahme der Expression (Ganef et al., 2009). Vom Embryo wird IGF2 in hohen Konzentrationen an der Oberfläche exprimiert. IGF2 interagiert mit dem epithelialen IGF1R und IR-A und könnte damit die Implantation beeinflussen (Han et al., 1996; Irwin et al., 1999).

Ein maternaler Diabetes mellitus hat, anders als in der Blastozyste, keinen Effekt auf den IGF1R und den IR im Endometrium. Dazu im Widerspruch stehen Daten von Schindler, in denen eine Abnahme der IGF1R-Transkriptmenge auf ca. die Hälfte beschrieben wird, ohne den Effekt auf Proteinebene belegen zu können (Schindler, 2009).

4.1.3. IGF2R

Der IGF2R steuert die Bioverfügbarkeit von IGF2. Mutationen führen zu einer überschießenden IGF2-Wirkung, was mit fetalem Überwuchs und perinatalem Tod einhergeht (Lau et al., 1994).

In der Blastozyste diabetischer Kaninchen kommt es zu einer Zunahme der IGF2R-Expression (Schindler, 2009) und damit zu einer abnehmenden IGF2-Wirkung. Dies könnte ursächlich für die Entwicklungsverzögerung diabetischer Embryonen sein (Ramin et al., 2010).

Im Endometrium dagegen hat ein Diabetes mellitus keinen Effekt auf den IGF2R. Allerdings kommt es zu einer Abnahme der IGF2R-Expression bei graviden im Vergleich zu pseudograviden Tieren. Die Präsenz des Embryos hemmt also die IGF2R-Expression im Endometrium, wodurch die Bioverfügbarkeit von IGF2 im embryo-maternalen Raum ansteigt.

4.1.4. IGFBP1

IGFBP1 ist das Hauptsekretionsprodukt des dezidualisierten Endometriums mit einem Expressionsmaximum in der späten Sekretionsphase und der Schwangerschaft (Irwin et al., 1993; Zhou et al., 1994)

FOXO ist der Hauptregulator der IGFBP1-Transkription (Guo et al., 1999; Hall et al., 2000; Kim u. Fazleabas, 2004). Durch Phosphorylierung von FOXO1 und FOXO3 verlassen diese das IRE (*Insulin Responsive Element*) des IGFBP1-Promotors und die Transkription stoppt. Insulin hemmt die IGFBP1-Expression über Phosphorylierung von FOXO1 und FOXO3. Ein Insulinmangel führt demnach zu einer Erhöhung des IGFBP1 im Serum von Typ 1-Diabetikern (Fowelin et al., 1994; Frystyk et al., 1999).

Im Endometrium des Kaninchens dagegen zeigen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine Abnahme der IGFBP1-Transkriptmenge unter Insulinmangel. Gibt es im Endometrium also andere Mechanismen, die die Expression von IGFBP1 regulieren? Nicht nur Insulin, auch die verzweigt-kettige Aminosäure L-Leucin steuert FOXO1. Bei In-vitro-Stimulationsversuchen mit L-Leucin kommt es zu einem Anstieg des phosphorylierten FOXO1 (p-FOXO1), (Gürke, unveröffentlicht). Gleichzeitig konnten im Kaninchen unter diabetischen Bedingungen erhöhte L-Leucin-Spiegel im Serum der Mutter, im Uterussekret und in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit nachgewiesen werden (Gürke et al., 2015). Eine durch L-Leucin vermittelte Zunahme von p-FOXO1 stellt einen Erklärungsansatz für die unter diabetischen Bedingungen herunterregulierte IGFBP1-Transkription im Endometrium dar.

Eine Abnahme der IGFBP1-Transkriptmenge im Endometrium führt zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit der IGFs im Endometrium und im embryo-maternalen Raum. Dies führt, v. a. durch eine Erhöhung der IGF2-Verfügbarkeit, zu einer Beeinflussung der Differenzierung und Dezidualisierung des Endometriums (Giudice et al., 1993; Rutanen et al., 1998; Fowler et al., 2000). Ein Anstieg freier IGFs im embryo-maternalen Raum verstärkt Wachstum, Proliferation und anti-apoptotische Prozesse des Embryos (Herrler et al., 1998; Spanos et al., 2000). Eine Herunterregulation der IGFBP1-Transkription durch einen Diabetes mellitus kann als kompensatorischer Mechanismus zur fehlenden Insulinwirkung angesehen werden.

Weiterhin scheint das endometriale IGFBP1 eine wichtige Rolle bei der Implantation des Embryos zu spielen. Dieser exprimiert an seiner Oberfläche hohe Konzentrationen von IGF2, welches über die Interaktion mit endometrialen Rezeptoren die Invasion des Trophoblasten reguliert. IGFBP1 drosselt die IGF2-Verfügbarkeit und hemmt damit den Implantationsvorgang (Han et al., 1996; Irwin u. Giudice, 1998; Irwin et al., 1999). Andererseits bindet IGFBP1 mit seiner RGD-Sequenz an das $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin (Fibrinrezeptor) und stimuliert damit die Migration des Trophoblasten (Jones et al., 1993; Gleeson et al., 2001). IGFBP1 greift also in den Implantationsprozess mit aktivierenden und hemmenden Signalen ein. Störungen der Trophoblasteninvasion scheinen in der Pathogenese der Präeklampsie eine Rolle zu spielen. Im Serum betroffener Frauen wurden deutlich erhöhte IGFBP1-

Konzentrationen gemessen (Irwin et al., 1999; Giudice et al., 1997). Ob ein maternaler Diabetes mellitus den Implantationsvorgang beeinflusst, ist bisher kaum untersucht worden.

IGFBP1 ist als „Wächter der IGFs“ entscheidend für die embryonale und fetale Entwicklung. Zwischen der maternalen Serumkonzentration des IGFBP1 und dem Geburtsgewicht besteht eine negative Korrelation (Fowler et al., 1999). Erhöhte IGFBP1-Spiegel sind mit intrauteriner Wachstumsretardierung und Plazentainsuffizienz assoziiert (Giudice et al. 1997, Watson et al. 2006). Anhand der Expressionsdaten des IGFBP1 ist anzunehmen, dass ein maternaler Diabetes mellitus über das endometriale IGF-IGFBP1-System Einfluss auf die embryonale Entwicklung hat. Um die Rolle des IGFBP1 abschließend bewerten zu können, sind Proteinuntersuchungen notwendig. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 2 gegen humane IGFBP1-Epitope gerichtete Antikörper im Western Blot für Untersuchungen am Kaninchenmodell getestet. Allerdings waren die humanen Antikörper für Kaninchengewebe nicht geeignet.

Weiterhin muss bei der Betrachtung der Rolle des IGFBP1 dessen Phosphorylierungsstatus beachtet werden. Phosphorylierte Formen haben eine höhere Affinität zu IGF1 als dephosphorylierte Formen (Jones et al., 1991; Miell et al., 1997). Das Verhältnis zwischen phosphoryliertem zu dephosphoryliertem IGFBP1 ist ein guter Prädiktor für das fetale Outcome (Iwashita et al., 1998; Gibson et al., 1999). Bei wachstumsverzögerten Feten ist das Verhältnis entsprechend hoch. Durch einen Diabetes mellitus steigen sowohl die nichtphosphorylierte als auch die phosphorylierte Form des IGFBP1 im Serum gleich stark an (Gibson et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit gelang der Nachweis der IGFBP1-Transkription in Kaninchenblastozysten. In den Blastozysten anderer Spezies wurde das IGFBP1 bisher nicht detektiert (Rutanen et al., 1998; Watson et a., 1999). Dagegen konnten in Präimplantationsembryonen des Rindes beispielsweise die IGF-bindenden Proteine 2-5 nachgewiesen werden. (Winger et al., 1997; Watson et al., 1999). Ein Diabetes mellitus beim Kaninchen hatte keinen Einfluss auf die IGFBP1-Expression im Gesamtembryo. Eine getrennte Untersuchung für Embryoblast und Trophoblast steht noch aus.

4.2. LIF und LIFR

Im Kaninchenendometrium hat ein mütterlicher Diabetes mellitus keinen Einfluss auf die Expression von LIF bzw. LIFR. Als wichtiger Implantationsfaktor wird LIF über Progesteron gesteuert mit einem Maximum der Expression um den Implantationstermin herum (Arici et al., 1995; Yang et al., 1996). Durch einen Diabetes werden die Progesteron-Serumspiegel der Mutter nicht oder nur marginal verändert (Botta et al., 1984; Stewart et al., 1989). Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass die Subfertilität diabetischer Frauen nicht über das endometriale LIF-System vermittelt wird.

Zwischen graviden und pseudogriden Tieren gibt es keinen Unterschied der LIF- und LIFR-Expression. Der unmittelbare Kontakt zwischen Blastozyste und Endometrium wirkt demnach nicht regulatorisch auf LIF.

Auch in der Blastozyste werden LIF und LIFR exprimiert und haben hier proliferative Effekte (Conquet and Brulet 1990; Lavranos et al., 1995). In LIFR-defizienten Mäuseblastozysten kommt es zu einer Entwicklungsverzögerung und zum perinatalen Tod (Ware et al. 1995). Ein Diabetes mellitus hat in der Blastozyste des Kaninchens keinen Einfluss auf die LIF-Expression. Für den LIFR konnte lediglich in Stadium 2-Blastozysten ein Anstieg der Transkription durch Diabetes mellitus nachgewiesen werden. (Schindler M., Pendzialek M.; unveröffentlicht). Anhand der Transkriptionsdaten scheint auch in der Blastozyste das LIF-System nicht Mediator der durch Diabetes mellitus bedingten Wachstumsretardierung zu sein.

Als Mannose-6-Phosphat-Rezeptor führt der IGF2R neben IGF2 auch LIF dem lysosomalen Abbau zu (Blanchard et al., 1999). Da der IGF2R unter diabetischen Bedingungen in der Blastozyste erhöht ist (Schindler, 2009), wäre eine erniedrigte LIF-Proteinmenge in der Blastozyste zu erwarten. Allerdings ist die physiologische Relevanz des LIF-Abbaus über den IGF2R noch weitestgehend unklar.

4.3. RNA-Seq des Endometriums

Die Entwicklung von Hochdurchsatzverfahren zur RNA-Sequenzierung hat die Analyse von Transkriptionsdaten revolutioniert und ermöglicht die ganzheitliche Erfassung von Expressionsänderungen (Wang et al., 2009; Costa et al., 2010). Die Herausforderung der Technik besteht in der Analyse der resultierenden Datenmenge und der Erfassung der biologischen Relevanz der Ergebnisse.

Neben den zahlreichen Vorteilen der Methode (siehe Kap. 1.7.) gibt es eine Reihe von Limitationen, auf die im Folgenden eingegangen werden soll: Das Endometrium ist ein Mischgewebe, bestehend aus zahlreichen Zelltypen wie luminalen und glandulären Epithelzellen, Stromazellen, Endothelzellen, Immunzellen etc.. Die Genexpression in den einzelnen Zelltypen unterscheidet sich, wodurch von Transkriptionsänderungen im Mischgewebe nicht auf Veränderungen in den einzelnen Zelltypen geschlossen werden kann.

Weitere Limitationen ergeben sich aus der Gewebegewinnung: Das Abkratzen des Endometriums erfolgte interindividuell an verschiedenen Stellen des Uterus. Weiterhin zeigten sich regelhaft geringe Blutbeimengungen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass vereinzelt auch myometriale Zellen gewonnen wurden. Außerdem enthielten die Uteri eine unterschiedliche Anzahl an Blastozysten, was einen Einfluss auf endometriale Faktoren hat, die durch den direkten Kontakt zur Blastozyste gesteuert werden.

Die RNA-Qualität einzelner Proben war mangelhaft, was zum Wegfall der Gruppe der gravid-diabetischen Tiere und zur Dezimierung anderer Versuchsgruppen führte. Deshalb war ein Diabeteseffekt nur unter den pseudograviden, ein Graviditätseffekt nur unter den Kontrolltieren untersuchbar. Aus den geringen Gruppenstärken (2, 3 bzw. 4 Tiere pro Gruppe) ergaben sich niedrige Signifikanzen für veränderte Gene, wodurch das Signifikanzniveau auf $p < 0,1$ angehoben werden musste, um eine repräsentative Anzahl veränderter Gene zu erhalten. Dies führt zu einem

vermehrten Einschluss von falsch-positiven Genen. Ferner gab es Gene mit recht hoher Streuung der Ergebnisse, welche das Signifikanzniveau nicht erreichen und damit als falsch-negative Gene aus der Analyse herausfielen.

Problematisch ist weiterhin, dass nur ca. ein Drittel der Sequenzen einem Gennamen des Kaninchens zuzuordnen waren. Davon gingen weitere 25 % durch Umschreiben in humane *Gene-IDs* verloren und weitere 10 % der Gene wurden durch das zur Auswertung benutzte Programm DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) nicht erkannt. All das führte dazu, dass nur 22,4 % der durch RNA-Seq erfassten Sequenzen in die Auswertung gingen.

Die RNA-Seq-Daten wurden mittels qRT-PCR verifiziert (Teller, 2013), wobei 5 Gene mit je 3 zu vergleichenden Versuchsgruppen getestet wurden und bei 3 Genen die Ergebnisse von RNA-Seq und qRT-PCR übereinstimmten.

Der Vergleich der RNA-Seq-Daten mit den Transkriptionsdaten aus dem ersten Teil der Arbeit zeigte folgendes:

- Die Gensequenzen für IGF1, IGF2, LIF und LIFR des Kaninchens waren zum Untersuchungszeitpunkt noch unbekannt, weshalb dafür keine RNA-Seq-Daten vorliegen.
- Für die Gene IGF1R, IGF2R und IR stimmten die RNA-Seq-Daten mit den qRT-PCR-Daten aus dem ersten Teil der Arbeit überein.
- Die Herunterregulation von IGFBP1 durch Diabetes mellitus konnte in der RNA-Seq nicht bestätigt werden.

4.3.1. RNA-Seq des Endometriums – Graviditätseffekt

Durch den Vergleich gravider Tiere mit pseudograviden Tieren lässt sich der direkte Einfluss des Embryos auf die Genexpression im Endometrium untersuchen. Da gravide und pseudogravide Tiere die gleiche hormonelle Vorbehandlung erhielten, unterscheiden sich beide Gruppen ausschließlich durch den direkten embryo-endometrialen Kontakt und die Sezernierung von parakrinen Faktoren durch den Embryo.

Der embryonale Einfluss bedingt im Kaninchenendometrium die differenzielle Expression von 206 Genen (2,4 % aller Gene; Einschlusskriterien: $p < 0.1$, *fold change* > 1.5 bzw. < 0.67), wobei sich hoch- und herunterregulierte Gene weitestgehend die Waage halten (102 vs. 104 Gene).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine *Next-Generation-Sequencing*-Analyse zum embryonalen Einfluss auf die Genexpression im Endometrium zum ersten Mal im Kaninchen durchgeführt. In zahlreichen anderen Spezies erfolgten vergleichbare Untersuchungen bereits (Bauersachs et al., 2006; Klein et al., 2006; Hess et al., 2007; Samborsky et al., 2013). Darin sind durch Gravidität hochregulierte Gene mit proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und angiogenetischen Faktoren assoziiert (Hess et al., 2007). Neben Immunregulation werden Prozesse wie Zelladhäsion, Zellmotilität, Zellproliferation, Mitose, Apoptose, Signaltransduktion und Proteolyse beeinflusst. Herunterregulierte Gene sind in ihrer Funktion deutlich divergenter und lassen sich weniger

biologischen Prozessen zuordnen. Häufig sind sie mit Extrazellulärmatrix und Zytoskelett assoziiert (Bauersachs et al., 2006; Klein et al., 2006; Samborski et al., 2013).

Tabelle 12 zeigt eine Liste von Genen, die sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in vergleichbaren Studien an anderen Spezies durch Gravidität verändert sind. Für 2 Gene fand sich eine Übereinstimmung der Expressionsänderung mit 2 weiteren Studien: Es handelt sich um die 2 durch Gravidität hochregulierten Tumorsuppressorgene SAMD9 (*sterile alpha motif domain containing 9*), ($FC=2,7$), (Ma et al., 2014) und ST7 (*suppression of tumorigenicity 7*), ($FC=2,0$), (Zenklusen et al., 2001).

Tab. 12: Vergleich verschiedener Studien zum embryonalen Einfluss auf das Endometrium mit Ergebnissen der vorliegenden Arbeit

Dargestellt sind Gene, welche sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in einer bzw. zwei weiteren Studien differentiell exprimiert sind. Die Gene sind mit Gennamen des HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee) dargestellt.

Hochregulierte Gene		Herunterregulierte Gene			
Übereinstimmung mit einer Studie		Übereinstimmung mit zwei Studien	Übereinstimmung mit einer Studie		Übereinstimmung mit zwei Studien
SPATA13 ³	HSPA4L ⁴	SAMD9 ^{2,4}	CDCA7L ¹	SNCA ³	-
MT1L ³	NEBL ⁴	ST7 ^{3,4}	DNAH11 ¹	SOX6 ³	
MMD ³	PDE4D ⁴		ARHGAP24 ³	C17orf62 ⁴	
FEN1 ³	RAB27B ⁴		ATP6V1H ³	CPVL ⁴ , ID1 ⁴	
DUSP4 ⁴	RNF152 ⁴		CYCS ³ , ELAC1 ³	FRAS1 ⁴	
FERMT1 ⁴	TSPAN12 ⁴		PTGER2 ³	METRNL ⁴	
			SMARCA2 ³	MAMO1 ⁴	

¹= Bauersachs et al., 2006 (Rind); ²= Klein et al., 2006 (Rind); ³= Hess et al., 2007 (Human); ⁴= Samborski et al., 2013 (Schwein)

Bei Bauersachs u. Wolf (2012) wurden 29 Gene gefunden, welche sowohl in Rind, Schwein, als auch Pferd durch eine Gravidität hochreguliert sind. Davon finden sich 2 Gene in der vorliegenden Studie wieder:

- RASEF (*RAS and EF-hand domain containing*), ($FC=1,8$), ein Protoonkogen, welches am Membrantransport der Zelle beteiligt ist (Oshita et al., 2013).
- NR4A3 (*nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3*), ($FC=8,5$), ein Mitglied der Steroidhormonrezeptor-Familie.

Die geringe Trefferquote der Übereinstimmung veränderter Gene mit anderen Spezies ist entweder durch eine hohe Spezifität der Genexpression des Kaninchens und/oder durch die reduzierte Probenanzahl der Versuchsgruppen (siehe Kap. 3.5) bedingt.

4.3.2. Durch Gravidität veränderte Genexpression

Durch Gravidität hochregulierte Gene codieren überdurchschnittlich häufig für Membranproteine, darunter Zelladhäsionsmoleküle, Glykoproteine und an Glykosylierungsprozessen beteiligte Faktoren. Herunterregulierte Gene sind in ihrer Funktion divergenter und codieren

überdurchschnittlich häufig für Glykoproteine, für extrazellulär sezernierte Proteine und für calciumbindende Proteine.

Glykosylierung:

Unter den hochregulierten Genen sind 4 an Glykosylierungsprozessen beteiligte Transkripte zu finden. In den nachfolgenden Ausführungen werden der Gennamen nach HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee) und der *fold change (FC)* angegeben: ST6GALNAC3 ($FC=2.5$), STT3B ($FC=1.6$), ALG12 ($FC=2.6$) und LDLR ($FC=3.7$).

Das endometriale Epithel trägt abhängig vom Differenzierungsstadium an seiner Oberfläche eine Glykokalyx. Ihr wird eine Rolle bei der Erkennung und Implantation des Embryos zugeschrieben (Aplin, 1991; Jones u. Aplin, 2009). Eine veränderte Glykosylierung wurde in Fällen von idiopathischer Infertilität und häufigen Fehlgeburten beobachtet (Graham et al., 1990; Serle et al., 1994; Hey et al., 1995).

Zelladhäsion:

Endometriale Zelladhäsionsmoleküle vermitteln die Anheftung des Embryos an das luminale Epithel und steuern den Implantationsvorgang (Aplin 1997; Kimber u. Spanswick et al., 2000).

Durch Gravidität waren unter dem GO-Term „*cell adhesion*“ 6 Gene hochreguliert: COL7A1 ($FC=6,1$), LAMA3 ($FC=3,7$), NID2 ($FC=1,6$), NEDD9 ($FC=2,6$), SYMPK ($FC=1,9$), FERMT1 ($FC=2,6$). Bei den ersten drei Faktoren handelt es sich um Basalmembranbestandteile. LAMA3 kodiert für die alpha-3-Untereinheit des Laminin 5. Dieses beeinflusst Adhäsion, Migration und Organisation von Zellen während der embryonalen Entwicklung (Hamill et al., 2010; Kariya u. Miyazaki, 2004). NID2 spielt eine Rolle bei der späteren Organentwicklung. Nidogen 1- und 2-defiziente Mäuse sterben perinatal durch pulmonale und kardiale Insuffizienz (Bader et al., 2005). Das Zelladhäsionsmolekül NEDD9 beeinflusst verschiedene Signalwege und ist in die Steuerung von Migration, Invasion, Zellzyklus und Apoptose involviert (Kong et al., 2011; Zhong et al., 2012). SYMPK beeinflusst Bau und Funktion von *tight junctions* (Chang et al., 2012) und FERMT1 bindet an Integrine und steuert damit Zellproliferation und Migration (Kiryama et al., 2013).

4.3.3. Durch Gravidität beeinflusste Signalwege

Durch den Graviditätseffekt werden 3 Signaltransduktionswege beeinflusst (siehe Kap. 4.3.3.):

- Der *tight junction*-Signalweg, wobei die starke Herunterregulation von Claudin 1 ($FC=0,13$) besondere Erwähnung verdient.
- Der TGF- β - Signalweg mit agonistischen als auch antagonistischen Effekten.
- Der Östrogen-Signalweg mit hemmenden Effekten.

Tight junction-Signalweg:

Tight junctions kontrollieren den parazellulären Transport von Wasser, Ionen und Molekülen. Sie beeinflussen die Zusammensetzung des Uterussekretes und den Implantationsvorgang. Außerdem induziert der semiallogene Embryo zum Schutz vor dem mütterlichen Immunsystem die Expression

von *tight junctions* in Deziduazellen. (Wang et al., 2004).

Im Kaninchen sind 6 Bestandteile bzw. regulatorisch wirkende Proteine des *tight junction*-Signalweges verändert (siehe Liste der Gene: Tab. 6 (Kap. 3.5.3.)), davon ist CLDN1 (Claudin 1) das einzig herunterregulierte Gen ($FC=0,13$). Als membrandurchspannendes Protein vermittelt es direkt die Zell-Zell-Adhäsion der *tight junctions*. Eine Herunterregulation durch den Embryo in der Periimplantationsphase könnte zu einer veränderten Zusammensetzung des Uterussekretes mit darin enthaltenen Wachstumsfaktoren führen oder in Vorbereitung auf die folgende Implantation interpretiert werden.

Die Bedeutung der 5 hochregulierten Gene ist noch weitestgehend unklar. Für Symplekin, *protein kinase C epsilon* und *erythrocyte membrane protein band 4.1-like 2* wurde eine Interaktion mit ZO-Proteinen (*Zonula occludens*-Protein) beschrieben, welche als Bindeglieder zwischen den membranären Claudinen/Occludin und dem Zytoskelett stehen und gleichzeitig Signaltransduktion vermitteln (Mattagajasingh et al., 2000; Chang et al., 2012; Mitic u. Anderson, 1998). Die *protein kinase C, epsilon* phosphoryliert ZO-2 und hemmt dieses damit (Avila-Flores et al., 2001).

TGF- β -Signalweg:

Die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie haben pleiotrope Effekte auf die frühe Entwicklung des Embryos, auf die Rezeptivität/Dezidualisierung des Endometriums und die embryonale Implantation (Hogan, 1996; Godkin u. Dore, 1998; Jones et al., 2006, Guzeloglu-Ksyisli et al., 2009). TGF- β wirkt antiproliferativ und zellteilungshemmend. Es induziert Differenzierung und Apoptose. Im Kaninchenendometrium sind 6 Faktoren des TGF- β -Signalweges differenziell exprimiert (siehe Liste der Gene: Tab. 6 (Kap. 3.5.3.)), wobei sich sowohl TGF- β -agonistische als auch - antagonistische Effekte ergeben.

BMP6 (*bone morphogenetic protein 6*) gehört zu den Liganden der TGF- β -Superfamilie und ist durch den Embryo herunterreguliert ($FC=0,57$). Neben ihren Effekten auf die Osteogenese spielen die BMPs eine wesentliche Rolle in frühen embryonalen Entwicklungsprozessen wie Gastrulation, Achsenformation und Mesodermentwicklung (Hogan et al., 1996; Faure et al., 2000) und steuern die Dezidualisierung des Endometriums (Stoikos et al., 2008; Kodama et al., 2010).

Zu den Effektormolekülen des TGF- β -Signalweges gehören die TGF- β -antagonistisch wirkenden IDs (*inhibitor of DNA binding*). Diese unterdrücken Differenzierungsprozesse und wirken proliferativ durch Inaktivierung des zellzyklushemmenden Retinoblastom-Proteins (Benezra et al., 1990). Durch den Embryo kommt es im Endometrium des Kaninchens zum Abfall der ID1-Transkripte ($FC=0,34$) und zum Anstieg des ID2 ($FC=6,47$). In der Maus dagegen kommt es im luminalen Epithel an der Implantationsstelle zu einer Hochregulation von ID1 (Hong et al., 2010), was eine Rolle bei der Implantation vermuten lässt.

Weiterhin ist CDKN2B (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2B*), auch bekannt als p15, herunterreguliert ($FC=0,37$). Dieses bildet Komplexe mit CDK4 (*cyclin dependent kinase*) und CDK6 und versetzt die Zelle in den G1-Zellzyklusarrest. Eine Herunterregulation wirkt demnach proliferationsfördernd auf Endometrium und Embryo.

Das Protein SKP1 (*(S-phase kinase-associated protein 1)*, $FC=0.53$) ist an der Ubiquitylierung von Proteinen beteiligt und markiert sie so für den Abbau im Proteasom. Neben zellzyklussteuernden Proteinen wird auch der Abbau von Faktoren des TGF- β -Signalweges (z. B. SMAD-Proteine) reguliert (Bai et al., 1996; Izzi u. Attisano, 2004).

LTBP1 (*latent transforming growth factor beta binding protein 1*) bildet ternäre Komplexe mit TGF- β und steuert damit dessen Faltung, Sekretion sowie die Bindung an die Extrazellulärmatrix (Dabovic et al., 2002; Rifkin, 2005). Durch eine Hochregulation im Endometrium ($FC=1,67$) wird die TGF- β -Bioverfügbarkeit beeinflusst.

Östrogen-Signalweg:

Durch den Embryo sind 3 Kofaktoren bzw. regulatorische Proteine des Östrogen-Signalweges differenziell exprimiert, die zu einer Abschwächung des Östrogen-Signals führen: GRIP1, CARM1 und NRIP1 (siehe Tab. 6 Kap. 3.5.3.).

Das herunterregulierte GRIP1 (*glutamate receptor interacting protein 1*), ($FC=0,62$), auch SRC-2 genannt, ist ein Coaktivator am Steroidrezeptor, welcher mit nukleären Rezeptoren interagiert und durch Acetylierung/Methylierung bestimmter Promotorregionen transkriptionell aktiv wird (Xu u. Li, 2003). GRIP1 beeinflusst neben dem Östrogen- auch den Progesteron- und BMP-Signalweg. Eine GRIP1-Defizienz führt zu gestörter Dezidualisierung und Implantation (Mukherjee et al., 2006; Fernandez-Valdivia et al., 2007).

Das ebenfalls herunterregulierte CARM1 (*coactivator-associated arginine methyltransferase 1*), ($FC=0,17$) nimmt über die Methylierung von Koaktivatoren und Histonen Einfluss auf die Östrogen-Rezeptor-abhängige Transkription, hemmt Zellproliferation und induziert Differenzierung (Torres-Padilla et al., 2007; Frieze et al., 2008; Wu et al., 2009).

Das hochregulierte NRIP1 (*nuclear receptor interacting protein 1*), ($FC=1,61$) reguliert als Korepressor vieler nukleärer Rezeptoren deren transkriptionelle Aktivität herunter (L'Horset et al., 1996; Treuter et al., 1998). Bei NRIP1-defizienten Mäusen bleibt die Ovulation aus und es zeigen sich Fettstoffwechselstörungen und Untergewicht (White et al., 2000; Leonardsson et al., 2004).

Die Veränderungen aller 3 Faktoren des Östrogen-Signalweges führen funktionell zu einer Senkung der Östrogen-Wirkung. Beim Affen und der Maus konnte gezeigt werden, dass Östrogen für die Dezidualisierung des Endometriums und Implantation des Embryos nicht notwendig ist (Ghosh et al., 1994; Paria et al., 1999). Beim Nager können Öltropfen die Dezidualisierung des Endometriums induzieren, was mit der Herunterregulation endometrialer Östrogenrezeptoren einhergeht (Parandoosh et al., 1995). Möglicherweise spielt im Kaninchen ein ähnlicher Mechanismus eine Rolle.

4.3.4. RNA-Seq des Endometriums – Diabeteseffekt

Durch einen Diabetes mellitus sind 360 Gene (4 % aller Gene) differenziell exprimiert (Einschlusskriterien: $p < 0.1$, *fold change* > 1.5 bzw. < 0.67). Mitursächlich für die höhere Anzahl differenziell exprimierter Gene im Vergleich zum Graviditätseffekt (206 Gene) ist eine größere

Gruppenstärke der diabetischen Tiere und damit verbunden höhere Signifikanzniveaus (Vergleich von 2 versus 4 Tieren beim Diabeteseffekt, Vergleich von 2 versus 3 Tieren beim Graviditätseffekt). Durch einen Diabetes mellitus sind 166 Gene hoch- und 194 Gene herunterreguliert. Für die herunterregulierten Gene konnten wesentlich mehr funktionelle Begriffe (197) und *annotation cluster* (12) gefunden werden als für die hochregulierten Gene (32 bzw. 2). Ein Diabetes mellitus wirkt sich demnach eher hemmend auf die Genexpression im Endometrium aus.

4.3.5. Durch Diabetes mellitus hochregulierte Gene

Unter dem GO-Term „*stress response*“ befanden sich 4 Hitzeschockproteine (HSP): HSPH1 (*heat shock 105kDa/110kDa protein 1*, $FC=1,75$); HSPB1 (*heat shock 27kDa protein 1*, $FC=1,84$); HSPA1A (*heat shock 70kDa protein 1A*, $FC=2,77$); HSPA4L (*heat shock 70kDa protein 4-like*, $FC=1,52$).

Hitzeschockproteine werden unter Stresssituationen wie Temperatur, oxidativem Stress, viralen Infektionen etc. ausgeschüttet und fungieren als Chaperone, welche die Faltung von neu translatierten bzw. fehlgefalteten Proteinen steuern. Weiterhin hemmen sie Proteinaggregation, greifen in das Ubiquitinylierungssystem ein und steuern Apoptose sowohl mit hemmenden als auch aktivierenden Signalen (Sreedhar u. Csermely, 2004).

Eine Zunahme der HSPs im Endometrium ist Ausdruck einer durch den Diabetes mellitus bedingten Stresssituation. Die diabetische Hyperglykämie als Stresssignal führt zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und zur Zunahme von HSPs (Hall und Martinus, 2013). Hitzeschockproteine werden auch in Verbindung mit Insulinresistenz gebracht, wobei erhöhte HSP-Spiegel zu einer Verbesserung des Insulin-*signalings* führen (Chung e al., 2008; Simar et al., 2012). Eine Zunahme der HSPs im Endometrium könnte damit einen Kompensationsmechanismus zum diabetischen Insulinmangel darstellen. Allerdings sind hohe HSP-Level in der Schwangerschaft diabetischer Mütter mit fetalen Malformationen und geringem Geburtsgewicht assoziiert (Saito et al., 2013).

HSPs werden auch nach extrazellulär sezerniert, wo sie eine Rolle bei der interzellulären Kommunikation spielen (De Maio u. Vazquez, 2013). Dementsprechend könnten die endometrialen HSPs Einfluss auf die embryonale Entwicklung nehmen.

4.3.6. Durch Diabetes mellitus herunterregulierte Gene

Die herunterregulierten Gene codieren für Zelladhäsionsmoleküle, proapoptische Faktoren, Vitamin-A-Stoffwechsel, Wachstum und Immunregulation (siehe unten). Weiterhin sind 45 Transmembranproteine (23 %) herunterreguliert, davon überdurchschnittlich viele Rezeptorproteine (18, $FC=2,5$). Auch Glykoproteine (49, $FC=2,0$) und Signalpeptide (39, $FC=2,3$) sind überdurchschnittlich stark repräsentiert. Weitere GO-Terms sind assoziiert mit der Herunterregulation von Genen für Proteinsynthese, Transkription, Zellmigration und Sekretionsvorgänge.

Zelladhäsionsmoleküle:

Zelladhäsionsmoleküle in der Periimplantationsphase vermitteln die Anheftung des Embryos an das uterine Epithel. Sie garantieren auf der einen Seite die Integrität der epithelialen Barriere und steuern auf der anderen Seite die Invasion des Embryos (Aplin, 1997; Kimber u. Spanswick, 2000). Die Implantation ist ein kritischer Vorgang im Laufe einer Schwangerschaft, bei dem 30-70 % der Embryonen verloren gehen (Kennedy, 1997). Eine gestörte Implantation durch veränderte Zelladhäsionsmoleküle kann zur Subfertilität diabetischer Frauen beitragen.

Unter dem GO-Term „*cell adhesion*“ befanden sich 9 herunterregulierte Faktoren: THBS1 ($FC=0,31$), THBS3 ($FC=0,38$), CD44 ($FC=0,56$), COL4A3 ($FC=0,52$), DPP4 ($FC=0,53$), CTNND2 ($FC=0,35$), CADM1 ($FC=0,59$), PVR ($FC=0,48$), PVRL3 ($FC=0,49$).

Thrombospondine (THBS) sind Oberflächenproteine, welche Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen vermitteln. Für THBS1 sind antiangiogenetische Effekte, die Aktivierung von Apoptose und die Hemmung von Proliferation und Migration beschrieben worden (Rastinejad et al., 1989; Guo et al., 1997).

CD44 wird im Kaninchen um den Implantationszeitpunkt herum auf dem epithelialen Endometrium und an der Blastozystenoberfläche exprimiert (Hohn et al., 1995; Campbell et al., 1995). Durch fehlende CD44-Wirkung kommt es zu einer Störung der Implantation (Illera et al., 2004).

DPP4 (*dipeptidyl-peptidase 4*) ist eine Exopeptidase, welche neben ihrer Funktion als Zelladhäsionsmolekül bestimmte Proteine spaltet und somit inaktiviert. DPP4-Inhibitoren vermindern den Abbau von GLP-1 (*Glucagon-like Peptid 1*) und werden als neue orale Antidiabetika eingesetzt. Die starke endometriale Expression von DPP4 periimplantär lässt auf eine Rolle bei der Implantation schließen (Shimomura et al., 2006). In der Maus führen DPP4-Hemmer zum Abort (Hildebrandt et al., 2001).

Apoptose:

In zahlreichen Geweben wurde eine Zunahme apoptotischer Prozesse im Rahmen eines Diabetes mellitus beschrieben. Mitverantwortlich dafür sind proinflammatorische Zytokine und die Bildung von AGEs (*advanced glycation endproducts*), (Graves et al., 2006; van den Oever et al., 2010). Im Endometrium diabetischer Kaninchen lassen sich anhand der RNA-Seq-Daten jedoch keine proapoptotischen Prozesse ableiten. Unter dem GO-Term „*positive regulation of apoptosis*“ waren 13 differenziell exprimierte Gene zu finden: CEBPB ($FC=0,61$), CD44 ($FC=0,56$), TIAM1 ($FC=0,64$), APBB1 ($FC=0,50$), CADM1 ($FC=0,59$), COL4A3 ($FC=0,52$), DUSP1 ($FC=0,29$), EI24 ($FC=0,66$), FOXO3 ($FC=0,58$), NUPR1 ($FC=0,25$), RPS3A ($FC=0,63$), TGFB3 ($FC=0,42$), UBC ($FC=0,59$). Da diese als proapoptotisch eingestuft sind, wäre ein antiapoptotischer Effekt zu vermuten. Hyperglykämische Stoffwechselsituationen werden in der Literatur sowohl für pro- als auch für antiapoptotische Prozesse verantwortlich gemacht (Moley et al., 1998; Ramakrishnan et al., 2011).

Vitamin A-Stoffwechsel:

Unter dem GO-Term „*response to vitamin A*“ befanden sich 4 differenziell exprimierte Gene: RBP4 ($FC=0,64$), CD44 ($FC=0,56$), DUSP1 ($FC=0,29$), LRP2 ($FC=0,31$).

Vitamin A ist in der frühen Embryonalentwicklung essentiell bei der Gastrulation, bei Ausbildung der Körperachse und des Neuralrohres (Ribes et al., 2009). Ein Vitamin A-Mangel führt zu zahlreichen Organfehlbildungen (Wilson et al., 1953). Dem Embryo wird das lipophile Vitamin A hauptsächlich über das Transportprotein RBP4 (*retinol binding protein 4*) zur Verfügung gestellt (Quadro et al., 2005). Bei Typ 1-Diabetikerinnen ist der Plasma-RBP4-Spiegel erniedrigt, bei Typ 2-Diabetikerinnen erhöht (Lu et al., 2000; Wolf, 2007), was eine Regulation über Insulin nahelegt. Durch einen maternalen Diabetes mellitus kommt es im Kaninchenendometrium zur Senkung der RBP4-Transkripte und damit zu einer geringeren Verfügbarkeit von Vitamin A im embryomaternalen Raum. Dies könnte mitursächlich sein für die verzögerte Gastrulation diabetischer Blastozysten (Ramin et al., 2010).

Wachstum:

Ein maternaler Diabetes hat Einfluss auf Wachstumsprozesse des Uterus. So konnten bei pseudograviden Tieren durch Diabetes mellitus ein erniedrigtes Uterusgewicht, ein geringerer uteriner Blutfluss, mangelnde Dezidualisierung und eine verminderte Ausbildung von Spiralarterien nachgewiesen werden (Norambuena et al., 1984; Garris, 1988; Zakaria et al., 2000).

Unter dem GO-Term „*regulation of growth*“ fanden sich 9 das Wachstum beeinflussende Faktoren, darunter 6 wachstumshemmende (NDN ($FC=0,34$), APBB1 ($FC=0,50$), DCBLD2 ($FC=0,61$), EI24 ($FC=0,66$), GPC3 ($FC=0,25$), NPR1 ($FC=0,51$)) und 3 wachstumsfördernde Proteine (HBEGF ($FC=0,14$), CD44 ($FC=0,56$), RBP4 ($FC=0,64$)). Ein maternaler Diabetes mellitus beeinflusst Wachstumsprozesse im Kaninchenendometrium sowohl mit aktivierenden als auch hemmenden Signalen.

Immunregulation:

30 bis 40 % der Zellen des dezidualisierten Stromas im Endometrium sind Leukozyten, davon der größte Teil uterine Natural Killer (NK)-Zellen. Diese spielen eine wichtige Rolle bei Initiierung und Erhalt der Schwangerschaft, indem sie Angiogenese und Trophoblasteninvasion steuern und zu einer Toleranz des maternalen Immunsystems gegenüber dem semiallogenen Embryo führen (Hanna et al., 2006; Lash et al., 2010).

Unter dem GO-Term „*regulation of immune effector process*“ fanden sich 4 durch einen Diabetes mellitus herunterregulierte Transkripte: RBP4 ($FC=0,64$), CADM1 ($FC=0,59$), PVR ($FC=0,48$) und DPP4 ($FC=0,53$).

RBP4 aus dem Vitamin A-Stoffwechsel (siehe Erklärung oben) greift in zahlreiche immunregulatorische Prozesse ein. Ein Mangel führt zu einer verminderten NK-Zell-Aktivität und zu Immundefizienz (Stephensen, 2001; Jiang et al., 2007).

CADM1 (*cell adhesion molecule 1*) und DPP4 (*dipeptidyl-peptidase 4*) sind an der Regulation von T-Zellen beteiligt (Giangreco et al., 2012; Ohnuma et al., 2008). PVR (*poliovirus receptor*) ist ein

Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie. Es bindet an verschiedene NK-Zell-Rezeptoren und vermittelt sowohl aktivierende als auch hemmende Signale (Stanietsky u. Mandelboim, 2010).

Eine durch einen Diabetes mellitus verursachte, immunologische Fehlregulation kann zu Störungen der Implantation, der nutritiven Versorgung des Embryos und der Immuntoleranz führen.

4.3.7. Durch Diabetes mellitus beeinflusste Signalwege

Durch einen Diabetes mellitus werden der p53- und der TGF- β -Signalweg beeinflusst.

p53-Signalweg:

p53 als wichtigster Tumorsuppressor führt bei Stresssignalen und daraus resultierenden DNA-Schäden die Zelle in den Zellzyklus-Arrest bzw. die Apoptose. Im Kaninchenendometrium wirkt sich ein Diabetes mellitus auf den p53-Signalweg mit aktivierenden und hemmenden Signalen aus. Es sind fünf Faktoren des p53-Signalweges durch einen Diabetes mellitus herunterreguliert (siehe Liste der Gene: Tab. 8 (Kap. 3.5.5.)):

Der wichtigste Inhibitor des p53 ist MDM2. p53 wird konstitutiv von der Zelle gebildet und bei Abwesenheit von Stresssignalen durch MDM2 ubiquitinyliert und abgebaut. Eine Senkung des MDM2 ($FC=0,61$) führt damit zu einer erhöhten Verfügbarkeit von p53.

Die Herunterregulation der anderen 4 Faktoren wirkt sich hemmend auf den p53-Signalweg aus. Die *checkpoint kinase 1* (CHEK1) ist ein zentrales Kontrollprotein, welches die Zelle in den Zellzyklus-Arrest führt. Als Serin/Threonin-Kinase phosphoryliert es zahlreiche Effektorproteine, darunter auch p53, was zu dessen Aktivierung führt (Ranuncolo et al., 2008). Über Aktivierung der Caspase 9 wirken das p53-Effektorprotein EI24 und das Atmungskettenprotein Cytochrom c proapoptotisch (Lehar et al., 1996; Jiang et al., 2013). Thrombospondin 1 wirkt als Zelladhäsionsmolekül aktivierend auf Apoptose und hemmend auf Proliferation und Zellmigration (Rastinejad et al., 1989; Lawler u. Lawler, 2012).

Während sich im Kaninchenendometrium ein Diabetes mellitus mit aktivierenden und hemmenden Signalen auf den p53-Signalweg auswirkt, wird in anderen Geweben vor allem eine Aktivierung beschrieben (Kane u. Greenhalgh, 2000; Rosso et al., 2006). Neben der Apoptoseregulation hat p53 während der Reproduktion weitere Funktionen: Es aktiviert die Expression des Schwangerschaftshormons hCG und des Implantationsfaktors LIF. p53-defiziente Mäuse sind demzufolge subfertil (Hu et al., 2007; Sohr u. Engeland, 2011).

TGF- β -Signalweg:

Der TGF- β -Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Dezidualisierung des Endometriums, bei der Implantation und bei der frühen Embryonalentwicklung (Godkin u. Dore, 1998; Jones et al., 2006, Guzeloglu-Ksyisli et al., 2009). TGF- β wirkt antiproliferativ und zellteilungshemmend, es induziert Differenzierung und Apoptose.

Durch einen Diabetes mellitus sind 6 Faktoren im Kaninchenendometrium differenziell exprimiert (siehe Liste der Gene: Tab. 8 (Kap. 3.5.5.)), was sich in allen Fällen hemmend auf den TGF- β -Signalweg auswirkt. Darunter befinden sich 2 Liganden der TGF-Superfamilie: BMP6 und TGF- β 3

(zu BMP6 siehe Kap. 4.3.3.). TGF- β wird von endometrialen Drüsen ins Uterussekret abgegeben (Omwantho et al., 2010). TGF- β 3 dient als Wachstumsfaktor in der frühen Embryonalentwicklung (Lim et al., 1993; Nowak et al., 1999). TGF- β 3-defiziente Mäuse entwickeln Fehlbildungen (Koo et al., 2001; Dünker u. Kriegelstein, 2002).

Die IDs (*inhibitor of DNA binding*) haben eine TGF- β -antagonistische Wirkung (siehe Kap. 4.3.3.). Durch einen Diabetes mellitus ist ID1 stark hochreguliert ($FC=7,48$). Dagegen haben das herunterregulierte Thrombospondin 1 und 3 einen aktivierenden Effekt auf TGF- β (Ribeiro et al., 1999; Murphy-Ullrich u. Poczatek, 2000). Das Zinkfinger-Protein *FYVE domain containing 16* (Endofin) wirkt über die Phosphorylierung bestimmter Smad-Proteine aktivierend sowohl auf den TGF- β - als auch den BMP-Signalweg (Chen et al., 2007; Shi et al., 2007).

Eine Störung des TGF- β -Signalweges kann mitursächlich für diabetische Schwangerschaftskomplikationen wie mangelnde Dezidualisierung, Implantationsstörungen und embryonale Fehlbildungen sein.

4.3.8. Durch Diabetes mellitus veränderte, EGF-ähnliche Domänen tragende Proteine

Durch einen Diabetes mellitus sind 7 EGF-ähnliche Domänen tragende Faktoren herunterreguliert (Liste der Gene siehe Tab. 9 Kap. 3.5.6.). Zur EGF-Familie selbst gehören nur 2 der Faktoren (HBEGF und BTC). Diese binden an den EGF-Rezeptor (EGFR), welcher als Tyrosinkinase Proliferation, Differenzierung und Zellwachstum reguliert.

HBEGF (*heparin-binding EGF-like growth factor*) ist durch einen Diabetes mellitus stark herunterreguliert ($FC=0,14$). Es wird maximal um den Implantationszeitpunkt herum im luminalen Epithel des Endometriums und im Bereich der Anheftungsstelle der Blastozyste exprimiert (Das et al., 1994; Yoo et al., 1997). Daraus ergeben sich wichtige Funktionen des HBEGF bei der Dezidualisierung (Chobotova et al., 2005), der Implantation und der frühen Embryonalentwicklung. Neben dem EGFR bindet HBEGF Heparansulfat-Proteoglykan, welches auf der Oberfläche der Blastozyste exprimiert wird (Raab et al., 1996). Außerdem stimuliert HBEGF in endometrialen Epithelzellen die Expression der Implantationsfaktoren LIF, HOXA-10 und β 3-Integrin (Lessey et al., 2002). Beide Mechanismen verdeutlichen die Funktion des HBEGF bei der Anheftung und Implantation des Embryos. HBEGF kommt neben der transmembranären auch als sezernierte Form vor. Es dient als wichtiger Wachstumsfaktor in der frühen Embryogenese (Martin et al., 1998).

Auch der EGFR-Ligand Betacellulin (BTC) ist stark herunterreguliert ($FC=0,16$). Sein Expressionsprofil ähnelt dem des HBEGF, weshalb auch BTC eine Rolle bei der Steuerung der endometrialen Rezeptivität zugeschrieben wird (S K Das et al., 1997).

Alle weiteren EGF-ähnliche Domänen tragenden Proteine sind nicht in der Lage, den EGFR direkt zu aktivieren, allerdings wurden für Versican und Thrombospondin 1 eine indirekte Aktivierung des EGFR-Signalweges beschrieben (Du et al., 2010; Liu et al., 2009).

Im Rahmen einen maternalen Diabetes mellitus kommt es zu einer Störung des endometrialen EGF-Systems. Dies kann mitursächlich sein für eine mangelnde endometriale Rezeptivität, für Störungen der Implantation und frühen Embryonalentwicklung.

4.4. Protocadherin 15 im Endometrium

Die Untersuchungen an Protocadherin 15 (PCDH15) ergaben sich aus den Ergebnissen der RNA-Seq-Daten des Endometriums, in denen sich eine 5,8-fache Herunterregulation der Transkriptmenge durch Gravidität zeigte. Um die differenzielle Expression und biologische Funktion im Endometrium aufzuklären, wurde PCDH15 im Kaninchenmodell und in humanen Uterusschnitten untersucht.

In der vorliegenden Arbeit gelang erstmals der Nachweis von PCDH15 im Endometrium sowohl auf Transkriptions- als auch auf Proteinebene. Während die Cadherine im Endometrium und ihre Rolle bei der Rezeptivität und Implantation bereits gut untersucht sind (Horne et al., 2002; Singh u. Aplin, 2009), waren Protocadherine bisher kaum im Fokus der Forschung. Lediglich Protocadherin 12 und 17 wurden im Endometrium bereits beschrieben (Rampon et al., 2005; Sherwin et al., 2008).

Im Kaninchenendometrium zeigte sich weder im Western Blot noch in der Immunhistochemie ein Einfluss von Gravidität bzw. Diabetes mellitus auf die PCDH15 Expression. Die Ergebnisse stehen somit im Widerspruch zu den Transkriptionsdaten der RNA-Seq und verdeutlichen die Relevanz der Bestätigung der RNA-Seq-Daten auf Proteinebene.

Immunhistochemisch zeigte sich sowohl im humanen als auch im Kaninchenmodell eine Lokalisation des PCDH15 streng perinukleär. Dies verwundert, da die Mitglieder der Cadherin-Familie typischerweise in der Zellmembran lokalisiert sind. Allerdings wurden auch in HeLa-Zellen (Datenblatt sc-377235, Santa Cruz) sowie in den inneren Haarzellen eine perinukleäre Lage des PCDH15 beschrieben (Senften et al., 2006; Xiong et al., 2012).

Im Kaninchenendometrium konnte im Rahmen der Implantation des Embryos an Tag 7 und 8 p. c. und der damit einhergehenden Dezidualisierung ein vollständiges Verschwinden des PCDH15 aus den Drüsenzellen des *Str. functionale* nachgewiesen werden. Lediglich die nicht dezidualisierten Epithelzellen des *Str. basale* blieben positiv für PCDH15.

In humanen Uterusschnitten zeigte sich eine Zyklusabhängigkeit der PCDH15-Expression mit einem Maximum in der Sekretionsphase am Tag 16-18 des weiblichen Zyklus.

Über die biologische Bedeutung des PCDH15 im Endometrium lässt sich derzeit nur spekulieren: Aufgrund der perinukleären Lage scheint PCDH15 keine Zell-Zell-Adhäsion zu vermitteln. Dagegen wurde für Protocadherine die Steuerung verschiedener Signaltransduktionswege beschrieben (Heggen u. Bradley, 2003; Haas et al., 2005; Redies et al., 2005). Die Dynamik der PCDH15-Expression während des weiblichen Zyklus und der Implantation des Embryos lassen eine Rolle des PCDH15 bei der Dezidualisierung des Endometriums und der embryonalen Implantation vermuten. Weiterhin kommt PCDH15 als sekretorische Form vor (Rouget-Quermalet et al., 2006) und könnte damit im Uterussekret direkt Einfluss auf den Embryo nehmen. Während der Embryonalentwicklung ist für einige Protocadherine bekannt, dass sie Zellmigration und Gewebemorphogenese beeinflussen (Yamamoto et al., 1998; Bradley et al., 1998; Kim et al., 2000).

Mutationen im PCDH15-Gen führen zum seltenen Usher-Syndrom 1F, einem Krankheitsbild, welches mit Taubheit und Blindheit der Patienten einhergeht. Auswirkungen auf die weibliche Fertilität wurden bisher nicht beschrieben.

5. Zusammenfassung

Für die embryonale Entwicklung in der Präimplantationsphase und eine erfolgreiche Implantation ist eine komplexe embryo-maternale Kommunikation notwendig. Das Endometrium stellt Nährstoffe und Hormone aus dem mütterlichen Kreislauf zur Verfügung und steuert über die Sezernierung parakriner Faktoren die embryonale Frühentwicklung. Ein maternaler Typ-I-Diabetes mellitus führt durch die fehlende Insulinwirkung zu einer Störung dieser embryo-maternalen Kommunikation. Dies korreliert mit einer Subfertilität diabetischer Frauen (Casson et al., 1997; Tennant et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Einfluss eines experimentell induzierten Typ-1-Diabetes mellitus auf endometriale Faktoren am Modell des Kaninchens untersucht. Zusätzlich wurde der embryonale Einfluss auf das Endometrium durch den Vergleich von graviden und pseudograviden Tieren analysiert.

1. Einfluss von Diabetes mellitus und Gravidität auf Faktoren des **Insulin-IGF- und LIF-Systems im Endometrium:**

- Bei graviden Tieren hatte ein Diabetes mellitus keinen Einfluss auf die **IGF1-** und **IGF2-** Transkription. Bei pseudograviden Tieren kam es durch einen Diabetes mellitus zu einem ca. 3- bzw. 4-fachen Anstieg der Expression.
- Ein Diabetes mellitus hatte keinen Einfluss auf die Expression des **IGF1R**, **IGF2R** und **IR**. Pseudogravide Kaninchen exprimierten den **IR** und **IGF2R** stärker als gravide Tiere.
- Durch einen Diabetes mellitus kam es zu einer Herunterregulation der **IGFBP1**-Expression im Endometrium. Daraus lässt sich eine erhöhte Bioverfügbarkeit der IGFs im embryo-maternalen ableiten. Auch in den Kaninchenembryonen wurde **IGFBP1** exprimiert.
- Auf die Transkription von **LIF** und **LIFR** im Endometrium hatten die Faktoren Diabetes mellitus und Gravidität keinen Einfluss.

Im **2. Teil** der Arbeit wurde das Transkriptom des Kaninchenendometriums mittels **Next Generation Sequencing** untersucht. Durch den Vergleich graviden, pseudograviden und diabetischer Tiere wurden neue, für die embryo-maternale Interaktion relevante Gene und durch einen Diabetes mellitus beeinflusste Faktoren identifiziert.

- Durch die RNA-Seq-Analyse wurden ca. 35 000 verschiedene Transkripte quantitativ erfasst. Davon gingen ca. 7 800 Sequenzen (22,4 %) in die Analyse durch DAVID ein.
- Der Vergleich der RNA-Seq-Daten mit den Transkriptionsdaten aus dem ersten Teil der Arbeit zeigte folgendes: Für **IGF1R**, **IGF2R** und **IR** stimmten die RNA-Seq-Daten mit den qRT-PCR-Daten überein. Für **IGF1**, **IGF2**, **LIF** und **LIFR** lagen keine RNA-Seq-Daten vor. Die Herunterregulation von **IGFBP1** durch Diabetes mellitus konnte in der RNA-Seq nicht bestätigt werden.

Einfluss der **Gravidität**

- Durch den Einfluss des Embryos waren 206 Gene differenziell exprimiert, davon waren etwa gleich viele Gene hoch- bzw. herunterreguliert. **Hochregulierte** Gene kodierten überdurchschnittlich häufig für Membranproteine, darunter Zelladhäsionsmoleküle,

Glykoproteine und an Glykosylierungsprozessen beteiligte Faktoren. **Herunterregulierte** Gene waren in ihrer Funktion divergenter und kodierten überdurchschnittlich häufig für Glykoproteine, für nach extrazellulär sezernierte und Calcium-bindende Proteine. Der Vergleich mit Studien ähnlichen Designs zeigte eine geringe Trefferquote der Übereinstimmung veränderter Gene mit anderen Spezies.

- Durch den Embryo wurden hauptsächlich 3 **Signaltransduktionswege** beeinflusst: Verändert waren je 6 Faktoren des **tight junction-Signalweges**, mit starker Herunterregulation von Claudin 1 ($FC=0,13$), und des **TGF- β -Signalweges**, wobei sich für diesen sowohl agonistische als auch antagonistische Effekte ergaben. Ebenso verändert waren 3 Faktoren des **Östrogen-Signalweges** mit jeweils hemmendem Einfluss.

Einfluss eines maternalen **Diabetes mellitus**

- Durch einen Diabetes mellitus waren 360 Gene differenziell exprimiert, davon 166 hoch- und 194 herunterreguliert. **Hochregulierte** Gene ließen sich der Kategorie "*stress response*", **herunterregulierte** Gene den Kategorien Zelladhäsion, proapoptotische Faktoren, Vitamin-A-Stoffwechsel, Wachstum und Immunregulation zuordnen.
- Durch einen Diabetes mellitus wurden folgende **Signaltransduktionswege** beeinflusst: Der **p53-Signalweg** wird sowohl gehemmt als auch aktiviert, bekanntester Vertreter ist MDM2 ($FC=0,61$). Der **TGF- β -Signalweg** wird durch die Regulation von TGF- β 3 ($FC=0,42$) und BMP6 ($FC=0,64$) inhibiert. Der **EGF-Signalweg** wird gehemmt durch HBEGF ($FC=0,14$) und Betacellulin ($FC=0,16$).

3. Die Auswertung der RNA-Seq-Daten ergab für **Protocadherin 15** (PCDH15) eine Herunterregulation um das 5,8-Fache durch Gravidität, weshalb für dieses Gen funktionelle Untersuchungen im Tiermodell und beim Menschen durchgeführt wurden:

- PCDH15 wurde auf Transkriptions- und Proteinebene erstmalig im Endometrium nachgewiesen. Das Protein ist in den Drüsenepithelien **perinukleär lokalisiert**.
- Im Kaninchenendometrium konnte im Rahmen der Implantation des Embryos an Tag 7 und 8 p. c. immunhistochemisch ein vollständiges Verschwinden des PCDH15 aus den Drüsenzellen des *Str. functionale* nachgewiesen werden. Lediglich die nicht-dezidualisierten Epithelzellen des *Str. basale* blieben positiv.
- In humanen Uterusschnitten zeigte sich immunhistochemisch eine **Zyklusabhängigkeit** der PCDH15-Expression mit einem Maximum des Signals in der Sekretionsphase am Tag 16-18.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die RNA-Seq-Technologie für quantitative Genexpressionsanalysen in der Reproduktionsmedizin eine aussagekräftige Methode ist. Das Ziel, neue Gene und funktionelle Zusammenhänge zu finden, wurde teilweise erreicht. Einschränkungen ergeben sich durch die limitierte Anzahl der Versuchsgruppen und methodische Ausfälle.

Aus der Gruppe der differentiell exprimierten Gene wurde Protocadherin 15 detailliert analysiert und funktionell untersucht. Mit PCDH15 konnte ein neuer endometrialer Graviditätsfaktor gefunden und für die Frau verifiziert werden.

6. Literaturverzeichnis

- Accili D**, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, u. a. Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet.* Januar 1996;12(1):106–9.
- Ahmed ZM**, Riazuddin S, Ahmad J, Bernstein SL, Guo Y, Sabar MF, u. a. PCDH15 is expressed in the neurosensory epithelium of the eye and ear and mutant alleles are responsible for both USH1F and DFNB23. *Hum Mol Genet.* 15. Dezember 2003;12(24):3215–23.
- Alagramam KN**, Murcia CL, Kwon HY, Pawlowski KS, Wright CG, Woychik RP. The mouse Ames waltzer hearing-loss mutant is caused by mutation of Pcdh15, a novel protocadherin gene. *Nat Genet.* Januar 2001;27(1):99–102.
- Angst BD**, Marcozzi C, Magee AI. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci.* 15. Februar 2001;114(4):629–41.
- Annunziata**, Marta, Riccarda Granata, und Ezio Ghigo. „The IGF System“. *Acta Diabetologica* 48, Nr. 1 (2. November 2010): 1–9. doi:10.1007/s00592-010-0227-z.
- Aplin JD**. Glycans as biochemical markers of human endometrial secretory differentiation. *J Reprod Fertil.* Juli 1991;92(2):525–41.
- Aplin JD**. Adhesion molecules in implantation. *Rev Reprod.* Mai 1997;2(2):84–93.
- Arici A**, Engin O, Attar E, Olive DL. Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab.* Juni 1995;80(6):1908–15.
- Avila-Flores A**, Rendón-Huerta E, Moreno J, Islas S, Betanzos A, Robles-Flores M, u. a. Tight-junction protein zonula occludens 2 is a target of phosphorylation by protein kinase C. *Biochem J.* 1. Dezember 2001;360(Pt 2):295–304.
- AWMF** (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften), S3-Leitlinie Diabetes und Schwangerschaft der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG). In: AWMF online (Stand 2014)
- AWMF** (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften), S3-Leitlinie Gestationsdiabetes mellitus (GDM), Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG). In: AWMF online (Stand 2011)
- Bader BL**, Smyth N, Nedbal S, Miosge N, Baranowsky A, Mokkaapati S, u. a. Compound genetic ablation of nidogen 1 and 2 causes basement membrane defects and perinatal lethality in mice. *Mol Cell Biol.* August 2005;25(15):6846–56.
- Bai C**, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebel M, Harper JW, u. a. SKP1 Connects Cell Cycle Regulators to the Ubiquitin Proteolysis Machinery through a Novel Motif, the F-Box. *Cell.* 26. Juli 1996;86(2):263–74.
- Bailyes EM**, Navé BT, Soos MA, Orr SR, Hayward AC, Siddle K. Insulin receptor/IGF-I receptor hybrids are widely distributed in mammalian tissues: quantification of individual receptor species by selective immunoprecipitation and immunoblotting. *Biochem J.* 1. Oktober 1997;327 (Pt 1):209–15.
- Bartsch O**, Bartlick B, Ivell R. Relaxin signalling links tyrosine phosphorylation to phosphodiesterase and adenylyl cyclase activity. *Mol Hum Reprod.* September 2001;7(9):799.
- Baserga R**, Sell C, Porcu P, Rubini M. The role of the IGF-I receptor in the growth and transformation of mammalian cells. *Cell Prolif.* Februar 1994;27(2):63–71.
- Baudry A**, Lamothe B, Bucchini D, Jami J, Montarras D, Pinset C, u. a. IGF-1 receptor as an alternative receptor for metabolic signaling in insulin receptor-deficient muscle cells. *FEBS Lett.* 19. Januar 2001;488(3):174–8.
- Bauersachs S**, Ulbrich SE, Gross K, Schmidt SEM, Meyer HHD, Wenigerkind H, u. a. Embryo-induced transcriptome changes in bovine endometrium reveal species-specific and common molecular markers of uterine receptivity. *Reproduction.* August 2006;132(2):319–31.
- Bauersachs S**, Wolf E. Transcriptome analyses of bovine, porcine and equine endometrium during the pre-implantation phase. *Anim Reprod Sci.* September 2012;134(1-2):84–94.
- Beebe LF, Kaye PL. Maternal diabetes and retarded preimplantation development of mice. *Diabetes.* April 1991;40(4):457–61.

- Baxter**, Robert C. „Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins in the Human Circulation: A Review“. *Hormone Research* 42, Nr. 4–5 (1994): 140–44. doi:10.1159/000184186.
- Beebe**, L F, und P L Kaye. „Maternal Diabetes and Retarded Preimplantation Development of Mice“. *Diabetes* 40, Nr. 4 (April 1991): 457–61.
- Beier** HM, Beier-Hellwig K. SPECIFIC SECRETORY PROTEIN OF THE FEMALE GENITAL TRACT. *European Journal of Endocrinology*. 1. Dezember 1973;74(Suppl):S404.
- Beier** HM, Kühnel W. Pseudopregnancy in the Rabbit after Stimulation by Human Chorionic Gonadotropin. *Hormone Research*. 1973;4(1):1–27.
- Bell** SC, Jackson JA, Ashmore J, Zhu HH, Tseng L. Regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 synthesis and secretion by progesterin and relaxin in long term cultures of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*. Mai 1991;72(5):1014–24.
- Benezra** R, Davis RL, Lassar A, Tapscott S, Thayer M, Lockshon D, u. a. Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. Control of terminal myogenic differentiation. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;599:1–11.
- Bhaumick** B, Danilkewich AD, Bala RM. Insulin-like growth factors (IGF) I and II in diabetic pregnancy: suppression of normal pregnancy-induced rise of IGF-I. *Diabetologia*. November 1986;29(11):792–7.
- Blanchard** F, Duplomb L, Raheer S, Vusio P, Hoflack B, Jacques Y, u. a. Mannose 6-Phosphate/Insulin-like growth factor II receptor mediates internalization and degradation of leukemia inhibitory factor but not signal transduction. *J Biol Chem*. 27. August 1999;274(35):24685–93.
- Botta** RM, Donatelli M, Bucalo mL, Bellomonte mL, Bompiani GD. Placental lactogen, progesterone, total estriol and prolactin plasma levels in pregnant women with insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. März 1984;16(6):393–401.
- Bowman** P, McLaren A. Cleavage rate of mouse embryos in vivo and in vitro. *J Embryol Exp Morphol*. August 1970;24(1):203–7.
- Bradley** RS, Espeseth A, Kintner C. NF-protocadherin, a novel member of the cadherin superfamily, is required for *Xenopus* ectodermal differentiation. *Curr Biol*. 12. März 1998;8(6):325–34.
- Brigstock** DR, Heap RB, Brown KD. Polypeptide growth factors in uterine tissues and secretions. *J Reprod Fertil*. März 1989;85(2):747–58.
- Busch**, L.C., Winterhager, E., Fischer, B. (1986) Regeneration of the uterine epithelium in later stages of pseudopregnancy in the rabbit. An ultrastructural study. *Anat.Embryol*. 174, 97-104
- Butler** AA, LeRoith D. Minireview: tissue-specific versus generalized gene targeting of the *igf1* and *igf1r* genes and their roles in insulin-like growth factor physiology. *Endocrinology*. Mai 2001;142(5):1685–8.
- Campbell** S, Swann HR, Aplin JD, Seif MW, Kimber SJ, Elstein M. CD44 is expressed throughout pre-implantation human embryo development. *Hum Reprod*. Februar 1995;10(2):425–30.
- Casson** IF, Clarke CA, Howard CV, McKendrick O, Pennycook S, Pharoah PO, u. a. Outcomes of pregnancy in insulin dependent diabetic women: results of a five year population cohort study. *BMJ*. 2. August 1997;315(7103):275–8.
- Chang** H, Zhang C, Cao Y. Expression and distribution of symplekin regulates the assembly and function of the epithelial tight junction. *Histochem Cell Biol*. März 2012;137(3):319–27.
- Chao** W, D’Amore PA. IGF2: epigenetic regulation and role in development and disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. April 2008;19(2):111–20.
- Charnock-Jones** DS, Sharkey AM, Fenwick P, Smith SK. Leukaemia inhibitory factor mRNA concentration peaks in human endometrium at the time of implantation and the blastocyst contains mRNA for the receptor at this time. *J Reprod Fertil*. Juli 1994;101(2):421–6.
- Chen** X, Gumbiner BM. Paraxial protocadherin mediates cell sorting and tissue morphogenesis by regulating C-cadherin adhesion activity. *J Cell Biol*. 17. Juli 2006;174(2):301–13.
- Chen** Y-G, Wang Z, Ma J, Zhang L, Lu Z. Endofin, a FYVE domain protein, interacts with Smad4 and facilitates transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem*. 30. März 2007;282(13):9688–95.

- Cheng H-C, Abdel-Ghany M, Elble RC, Pauli BU.** Lung Endothelial Dipeptidyl Peptidase IV Promotes Adhesion and Metastasis of Rat Breast Cancer Cells via Tumor Cell Surface-associated Fibronectin. *J Biol Chem.* 9. November 1998;273(37):24207–15.
- Chi MM, Schlein AL, Moley KH.** 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.* Dezember 2000;141(12):4784–92.
- Chobotova K, Karpovich N, Carver J, Manek S, Gullick WJ, Barlow DH, u. a.** Heparin-binding epidermal growth factor and its receptors mediate decidualization and potentiate survival of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* Februar 2005;90(2):913–9.
- Chomczynski P, Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* April 1987;162(1):156–9.
- Chung J, Nguyen A-K, Henstridge DC, Holmes AG, Chan MHS, Mesa JL, u. a.** HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 5. Februar 2008;105(5):1739.
- Clausen TD, Mathiesen ER, Hansen T, Pedersen O, Jensen DM, Lauenborg J, u. a.** High prevalence of type 2 diabetes and pre-diabetes in adult offspring of women with gestational diabetes mellitus or type 1 diabetes: the role of intrauterine hyperglycemia. *Diabetes Care.* Februar 2008;31(2):340–6.
- Clemmons, D. R., W. H. Busby, T. Arai, T. J. Nam, J. B. Clarke, J. I. Jones, und D. K. Ankrapp.** „Role of Insulin-like Growth Factor Binding Proteins in the Control of IGF Actions“. *Progress in Growth Factor Research* 6, Nr. 2–4 (1995):357–66.
- Conquet F, Brûlet P.** Developmental expression of myeloid leukemia inhibitory factor gene in preimplantation blastocysts and in extraembryonic tissue of mouse embryos. *Mol Cell Biol.* Juli 1990;10(7):3801–5.
- Coppieters KT, Wiberg A, Tracy SM, von Herrath MG.** Immunology in the clinic review series: focus on type 1 diabetes and viruses: the role of viruses in type 1 diabetes: a difficult dilemma. *Clin Exp Immunol.* April 2012;168(1):5–11.
- Coppock HA, White A, Aplin JD, Westwood M.** Matrix metalloprotease-3 and -9 proteolyze insulin-like growth factor-binding protein-1. *Biol Reprod.* August 2004;71(2):438–43.
- Cordero L, Treuer SH, Landon MB, Gabbe SG.** Management of infants of diabetic mothers. *Arch Pediatr Adolesc Med.* März 1998;152(3):249–54.
- Cornillie FJ, Lauweryns JM, Brosens IA.** Normal human endometrium. An ultrastructural survey. *Gynecol Obstet Invest.* 1985;20(3):113–29.
- Costa V, Angelini C, De Feis I, Ciccodicola A.** Uncovering the Complexity of Transcriptomes with RNA-Seq. *BioMed Research International* [Internet]. 27. Juni 2010 [zitiert 18. Oktober 2013];2010. Verfügbar unter: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2010/853916/abs/>
- Dabovic B, Chen Y, Colarossi C, Obata H, Zambuto L, Perle MA, u. a.** Bone abnormalities in latent TGF- β binding protein (Ltbp)-3-null mice indicate a role for Ltbp-3 in modulating TGF- β bioavailability. *J Cell Biol.* 21. Januar 2002;156(2):227–32.
- Daniel JC Jr.** Early Growth of Rabbit Trophoblast. *The American Naturalist.* 1. März 1964;98(899):85–98.
- Das SK, Wang XN, Paria BC, Damm D, Abraham JA, Klagsbrun M, u. a.** Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development.* Mai 1994;120(5):1071–83.
- De Maio A, Vazquez D.** Extracellular heat shock proteins: a new location, a new function. *Shock.* Oktober 2013;40(4):239–46.
- DeChiara TM, Efstratiadis A, Robertson EJ.** A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature.* 3. Mai 1990;345(6270):78–80.
- Denley A, Wang CC, McNeil KA, Walenkamp MJE, van Duyvenvoorde H, Wit JM, u. a.** Structural and functional characteristics of the Val44Met insulin-like growth factor I missense mutation: correlation with effects on growth and development. *Mol Endocrinol.* März 2005;19(3):711–21.

- Du WW**, Yang BB, Shatseva TA, Yang BL, Deng Z, Shan SW, u. a. Versican G3 promotes mouse mammary tumor cell growth, migration, and metastasis by influencing EGF receptor signaling. *PLoS ONE*. 2010;5(11):e13828.
- Dünker N**, Krieglstein K. Tgfbeta2 *-/-* Tgfbeta3 *-/-* double knockout mice display severe midline fusion defects and early embryonic lethality. *Anat Embryol*. Dezember 2002;206(1-2):73–83.
- Duval D**, Reinhardt B, Keding C, Boeuf H. Role of suppressors of cytokine signaling (Socs) in leukemia inhibitory factor (LIF) -dependent embryonic stem cell survival. *FASEB J*. August 2000;14(11):1577–84.
- Elgin RG**, Busby WH Jr, Clemmons DR. An insulin-like growth factor (IGF) binding protein enhances the biologic response to IGF-I. *Proc Natl Acad Sci USA*. Mai 1987;84(10):3254–8.
- Faure S**, Lee MA, Keller T, ten Dijke P, Whitman M. Endogenous patterns of TGFbeta superfamily signaling during early *Xenopus* development. *Development*. Juli 2000;127(13):2917–31.
- Fazleabas AT**, Kim JJ, Strakova Z. Implantation: Embryonic Signals and the Modulation of the Uterine Environment—A Review. *Placenta*. April 2004;25, Supplement:S26–S31.
- Fernandez-Valdivia R**, Mukherjee A, Amato P, Allred DC, Nguyen J, DeMayo FJ, u. a. Progesterone-action in the murine uterus and mammary gland requires steroid receptor coactivator 2: relevance to the human. *Front Biosci*. 2007;12:3640–7.
- Firth**, Sue M, und Robert C Baxter. „Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins“. *Endocrine Reviews* 23, Nr. 6 (Dezember 2002):824–54.
- Fischer, B.**, Winterhager, E., Busch, L.C., Beier, H.M. (1985) Die Pseudogravidität des Kaninchens als reproduktionsbiologisches Modell. *Fertilität* 1, 101-109
- Fischer, B.**, U. Mootz, H. W. Denker, M. Lambertz, und H. M. Beier. „The Dynamic Structure of Rabbit Blastocyst Coverings. III. Transformation of Coverings under Non-Physiological Developmental Conditions“. *Anatomy and Embryology* 183, Nr. 1 (1991): 17–27.
- Fischer, Bernd**, Pascale Chavatte-Palmer, Christoph Viebahn, Anne Navarrete Santos, und Veronique Duranthon. „Rabbit as a Reproductive Model for Human Health“. *Reproduction (Cambridge, England)* 144, Nr. 1 (Juli 2012): 1–10. doi:10.1530/REP-12-0091.
- Fowelin, J.**, S. Attvall, H. von Schenck, U. Smith, I. Lager, und K. Hall. „Regulation of Insulin-like Growth Factor Binding Protein-1 (IGFBP-1) in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus“. *Acta Diabetologica* 31, Nr. 4 (1. Dezember 1994): 183–86. doi:10.1007/BF00571948.
- Fowler D**, Albaiges G, Lees C, Jones J, Nicolaides K, Miell J. The role of insulin-like growth factor binding protein-1 phosphoisoforms in pregnancies with impaired placental function identified by Doppler ultrasound. *Human Reproduction*. 1. November 1999;14(11):2881–2885.
- Fowler DJ**, Nicolaides KH, Miell JP. Insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1): a multifunctional role in the human female reproductive tract. *Hum Reprod Update*. 9. Januar 2000;6(5):495–504.
- Frietze S**, Lupien M, Silver PA, Brown M. CARM1 regulates estrogen-stimulated breast cancer growth through up-regulation of E2F1. *Cancer Res*. 1. Januar 2008;68(1):301–6.
- Frystyk, J.**, C. Skjærbaek, E. Vestbo, S. Fisker, und H. Ørskov. „Circulating Levels of Free Insulin-like Growth Factors in Obese Subjects: The Impact of Type 2 Diabetes“. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 15, Nr. 5 (1. September 1999): 314–22. doi:10.1002/(SICI)1520-7560(199909/10)15:5<314::AID-DMRR56>3.0.CO;2-E.
- Ganef C**, Chatel G, Munaut C, Frankenne F, Foidart J-M, Winkler R. The IGF system in in-vitro human decidualization. *Mol Hum Reprod*. Januar 2009;15(1):27–38.
- Gao, J**, J Mazella, A Suwanichkul, D R Powell, und L Tseng. „Activation of the insulin-like growth factor binding protein-1 promoter by progesterone receptor in decidualized human endometrial stromal cells“. *Molecular and Cellular Endocrinology* 153, Nr. 1–2 (20. Juli 1999):11–17.
- Garris DR**. Effects of diabetes on uterine condition, decidualization, vascularization, and corpus luteum function in the pseudopregnant rat. *Endocrinology*. Februar 1988;122(2):665–72.
- Gellersen B**, Brosens IA, Brosens JJ. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Semin Reprod Med*. November 2007;25(6):445–53.

- Ghosh D, De P, Sengupta J.** Luteal phase ovarian oestrogen is not essential for implantation and maintenance of pregnancy from surrogate embryo transfer in the rhesus monkey. *Hum Reprod.* 4. Januar 1994;9(4):629–37.
- Giangreco A, Hoste E, Takai Y, Rosewell I, Watt FM.** Epidermal *Cadml* expression promotes autoimmune alopecia via enhanced T cell adhesion and cytotoxicity. *J Immunol.* 1. Februar 2012;188(3):1514–22.
- Gibson JM, Westwood M, Lauszus FF, Klebe JG, Flyvbjerg A, White A.** Phosphorylated insulin-like growth factor binding protein 1 is increased in pregnant diabetic subjects. *Diabetes.* Februar 1999;48(2):321–6.
- Giudice LC, Dsupin BA, Jin IH, Vu TH, Hoffman AR.** Differential expression of messenger ribonucleic acids encoding insulin-like growth factors and their receptors in human uterine endometrium and decidua. *J Clin Endocrinol Metab.* Mai 1993;76(5):1115–22.
- Giudice LC, Martina NA, Crystal RA, Tazuke S, Druzin M.** Insulin-like growth factor binding protein-1 at the maternal-fetal interface and insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-II, and insulin-like growth factor binding protein-1 in the circulation of women with severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* April 1997;176(4):751–757; discussion 757–758.
- Gleeson LM, Chakraborty C, McKinnon T, Lala PK.** Insulin-like growth factor-binding protein 1 stimulates human trophoblast migration by signaling through alpha 5 beta 1 integrin via mitogen-activated protein Kinase pathway. *J Clin Endocrinol Metab.* Juni 2001;86(6):2484–93.
- Godkin J.** Transforming growth factor beta and the endometrium. *Reviews of Reproduction.* 1. Januar 1998;3(1):1–6.
- Gorus FK, Malaisse WJ, Pipeleers DG.** Selective uptake of alloxan by pancreatic B-cells. *Biochem J.* 15. November 1982;208(2):513–5.
- Graham RA, Seif MW, Aplin JD, Li TC, Cooke ID, Rogers AW, u. a.** An endometrial factor in unexplained infertility. *British Medical Journal.* 6. Februar 1990;300(6737):1428–31.
- Graur D, Duret L, Gouy M.** Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies). *Nature.* 25. Januar 1996;379(6563):333–5.
- Graves DT, Liu R, Alikhani M, Al-Mashat H, Trackman PC.** Diabetes-enhanced Inflammation and Apoptosis—Impact on Periodontal Pathology. *J DENT RES.* 1. Januar 2006;85(1):15–21.
- Guler, H P, J Zapf, und E R Froesch.** „Short-term metabolic effects of recombinant human insulin-like growth factor I in healthy adults“. *The New England Journal of Medicine* 317, Nr. 3 (16. Juli 1987): 137–40. doi:10.1056/NEJM198707163170303.
- Guo N, Krutzsch HC, Inman JK, Roberts DD.** Thrombospondin 1 and type I repeat peptides of thrombospondin 1 specifically induce apoptosis of endothelial cells. *Cancer Res.* 1. Mai 1997;57(9):1735–42.
- Guo, S., G. Rena, S. Cichy, X. He, P. Cohen, und T. Unterman.** „Phosphorylation of Serine 256 by Protein Kinase B Disrupts Transactivation by FKHR and Mediates Effects of Insulin on Insulin-like Growth Factor-Binding Protein-1 Promoter Activity through a Conserved Insulin Response Sequence“. *The Journal of Biological Chemistry* 274, Nr. 24 (11. Juni 1999): 17184–92.
- Gürke J, Hirche F, Thieme R, Haucke E, Schindler M, Stangl G, Fischer B, Navarrete Santos A.** (2015) Maternal diabetes leads to adaptation in embryonic amino acid metabolism during early pregnancy. *PLOS ONE.*
- Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA, Taylor HS.** The role of growth factors and cytokines during implantation: endocrine and paracrine interactions. *Semin Reprod Med.* Januar 2009;27(1):62.
- Haas IG, Frank M, Véron N, Kemler R.** Presenilin-dependent processing and nuclear function of gamma-protocadherins. *J Biol Chem.* 11. März 2005;280(10):9313–9.
- Hall, R. K., T. Yamasaki, T. Kucera, M. Waltner-Law, R. O’Brien, und D. K. Granner.** „Regulation of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase and Insulin-like Growth Factor-Binding Protein-1 Gene Expression by Insulin. The Role of Winged Helix/forkhead Proteins“. *The Journal of Biological Chemistry* 275, Nr. 39 (29. September 2000): 30169–75. doi:10.1074/jbc.M004898200.
- Hall L, Martinus RD.** Hyperglycaemia and oxidative stress upregulate HSP60 & HSP70 expression in HeLa cells. *Springerplus.* 2013;2:431.

- Hamill** KJ, Paller AS, Jones JCR. Adhesion and Migration, the Diverse Functions of the Laminin $\alpha 3$ Subunit. *Dermatol Clin.* Januar 2010;28(1):79.
- Han** VK, Bassett N, Walton J, Challis JR. The expression of insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein (IGFBP) genes in the human placenta and membranes: evidence for IGF-IGFBP interactions at the fetomaternal interface. *J Clin Endocrinol Metab.* Juli 1996;81(7):2680.
- Han** VK, Lund PK, Lee DC, D'Ercole AJ. Expression of somatomedin/insulin-like growth factor messenger ribonucleic acids in the human fetus: identification, characterization, and tissue distribution. *J Clin Endocrinol Metab.* Februar 1988;66(2):422–9.
- Hanna** J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, u. a. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med.* September 2006;12(9):1065–74.
- Hardy** K, Spanos S. Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. *J Endocrinol.* Februar 2002;172(2):221–36.
- Harlow** GM, Quinn P. Development of preimplantation mouse embryos in vivo and in vitro. *Aust J Biol Sci.* 1982;35(2):187–93.
- Harvey** MB, Kaye PL. Insulin stimulates protein synthesis in compacted mouse embryos. *Endocrinology.* März 1988;122(3):1182–4.
- Heggem** MA, Bradley RS. The cytoplasmic domain of *Xenopus* NF-protocadherin interacts with TAF1/set. *Dev Cell.* März 2003;4(3):419–29.
- Herrler**, A., C. A. Krusche, und H. M. Beier. „Insulin and Insulin-like Growth Factor-I Promote Rabbit Blastocyst Development and Prevent Apoptosis“. *Biology of Reproduction* 59, Nr. 6 (Dezember 1998): 1302–10.
- Hess** AP, Hamilton AE, Talbi S, Dosiou C, Nyegaard M, Nayak N, u. a. Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: amplification of immune and angiogenic modulators. *Biol Reprod.* Januar 2007;76(1):102–17.
- Hey** N, Li TC, Devine PL, Graham RA, Saravelos H, Aplin JD. MUC1 in secretory phase endometrium: expression in precisely dated biopsies and flushings from normal and recurrent miscarriage patients. *Hum Reprod.* 10. Januar 1995;10(10):2655–62.
- Heyner** S. Growth factors in preimplantation development: role of insulin and insulin-like growth factors. *Early Pregnancy.* September 1997;3(3):153–63.
- Hildebrandt** M, Arck PC, Kruber S, Demuth HU, Reutter W, Klapp BF. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) activity abrogates stress-induced, cytokine-mediated murine abortions. *Scand J Immunol.* Mai 2001;53(5):449–54.
- Hogan** BL. Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev.* August 1996;6(4):432–8.
- Hohn** HP, Huch G, Tlolka U, Denker HW. Differential expression of CD44 in rabbit uterine epithelium during early pregnancy. *Acta Anat (Basel).* 1995;152(3):185–94.
- Hollnagel** A, Oehlmann V, Heymer J, Rütter U, Nordheim A. Id Genes Are Direct Targets of Bone Morphogenetic Protein Induction in Embryonic Stem Cells. *J Biol Chem.* 7. September 1999;274(28):19838–45.
- Hong** S-H, Nah H-Y, Kim C-H. Estrogen-regulated expression and distribution of Id-1 in the mouse uterus. *Placenta.* März 2010;31(3):240–4.
- Horne** AW, White JO, Lalani E-N. Adhesion molecules and the normal endometrium. *BJOG.* Juni 2002;109(6):610–7.
- Hu** W, Feng Z, Teresky AK, Levine AJ. p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature.* 29. November 2007;450(7170):721–4.
- Hwa** V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev.* Dezember 1999;20(6):761–87.
- Illera** MJ, Bermejo P, Hernandez J, Gonzalez A, Illera JC. 137 THE EFFECT OF ANTI-CD44 ON EMBRYO IMPLANTATION IN RABBITS. *Reprod Fertil Dev.* 2004;16(2):190–1.

- Irwin** JC, de las Fuentes L, Dsupin BA, Giudice LC. Insulin-like growth factor regulation of human endometrial stromal cell function: coordinate effects on insulin-like growth factor binding protein-1, cell proliferation and prolactin secretion. *Regul Pept.* 20. Oktober 1993;48(1-2):165–77.
- Irwin** JC, Giudice LC. Insulin-like growth factor binding protein-1 binds to placental cytotrophoblast alpha5beta1 integrin and inhibits cytotrophoblast invasion into decidualized endometrial stromal cultures. *Growth Horm IGF Res.* Februar 1998;8(1):21–31.
- Irwin** JC, Suen LF, Martina NA, Mark SP, Giudice LC. Role of the IGF system in trophoblast invasion and pre-eclampsia. *Hum Reprod.* Dezember 1999;14 Suppl 2:90–6.
- Iwashita** M, Sakai K, Kudo Y, Takeda Y. Phosphoisoforms of insulin-like growth factor binding protein-1 in appropriate-for-gestational-age and small-for-gestational-age fetuses. *Growth Horm IGF Res.* Dezember 1998;8(6):487–93.
- Izzi** L, Attisano L. Regulation of the TGFbeta signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation. *Oncogene.* 15. März 2004;23(11):2071–8.
- Jiang** Y, Obuseh F, Ellis W, Piyathilake C, Jolly P. Association of vitamin A deficiency with decrease in TNF- α expressing CD3-CD56+ NK cells in Ghanaians. *Nutr Res.* Juli 2007;27(7):400–7.
- Jiang** L, Luo M, Liu D, Chen B, Zhang W, Mai L, u. a. BAD overexpression inhibits cell growth and induces apoptosis via mitochondrial-dependent pathway in non-small cell lung cancer. *Cancer Cell Int.* 1. Juni 2013;13:53.
- Jones** JI, D’Ercole AJ, Camacho-Hubner C, Clemmons DR. Phosphorylation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 1 in cell culture and in vivo: effects on affinity for IGF-I. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1. September 1991;88(17):7481–5.
- Jones** JI, Gockerman A, Busby WH, Wright G, Clemmons DR. Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and binds to the alpha 5 beta 1 integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 15. November 1993;90(22):10553
- Jones** RL, Stoikos C, Findlay JK, Salamonsen LA. TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction.* August 2006;132(2):217–32.
- Jones** CJP, Aplin JD. Glycosylation at the fetomaternal interface: does the glycode play a critical role in implantation? *Glycoconj J.* April 2009;26(3):359–66.
- Julkunen** M, Koistinen R, Aalto-Setälä K, Seppälä M, Jänne OA, Kontula K. Primary structure of human insulin-like growth factor-binding protein/placental protein 12 and tissue-specific expression of its mRNA. *FEBS Lett.* 29. August 1988;236(2):295–302.
- Kane** MT, Morgan PM, Coonan C. Peptide growth factors and preimplantation development. *Hum Reprod Update.* April 1997;3(2):137–57.
- Kane** CD, Greenhalgh DG. Expression and localization of p53 and bcl-2 in healing wounds in diabetic and nondiabetic mice. *Wound Repair Regen.* Februar 2000;8(1):45–58.
- Kang** Y, Chen C-R, Massagué J. A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell.* April 2003;11(4):915–26.
- Kariya** Y, Miyazaki K. The basement membrane protein laminin-5 acts as a soluble cell motility factor. *Exp Cell Res.* 15. Juli 2004;297(2):508–20.
- Kautzky-Willer** A, Prager R, Waldhausl W, Pacini G, Thomaseth K, Wagner OF, u. a. Pronounced insulin resistance and inadequate beta-cell secretion characterize lean gestational diabetes during and after pregnancy. *Diabetes Care.* November 1997;20(11):1717–23.
- Kaye** PL, Harvey MB. The role of growth factors in preimplantation development. *Prog Growth Factor Res.* 1995;6(1):1–24.
- Kennedy**, T.G. Physiology of implantation. 10th World Congress on in vitro fertilization and assisted reproduction. Vancouver, Canada, 24–28 May 1997.
- Kim** SH, Jen WC, De Robertis EM, Kintner C. The protocadherin P APC establishes segmental boundaries during somitogenesis in xenopus embryos. *Curr Biol.* 13. Juli 2000;10(14):821–30.
- Kim**, J. J., und Asgerally T. Fazleabas. „Uterine Receptivity and Implantation: The Regulation and Action of Insulin-like Growth Factor Binding Protein-1 (IGFBP-1), HOXA10 and Forkhead

- Transcription Factor-1 (FOXO-1) in the Baboon Endometrium“. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E* 2 (16. Juni 2004): 34. doi:10.1186/1477-7827-2-34.
- Kimber SJ**, Spanswick C. Blastocyst implantation: the adhesion cascade. *Semin Cell Dev Biol.* April 2000;11(2):77–92.
- King H.** Epidemiology of glucose intolerance and gestational diabetes in women of childbearing age. *Diabetes Care.* August 1998;21 Suppl 2:B9–13.
- Kiriyama K**, Hirohashi Y, Torigoe T, Kubo T, Tamura Y, Kanaseki T, u. a. Expression and function of FERMT genes in colon carcinoma cells. *Anticancer Res.* Januar 2013;33(1):167–73.
- Klein C**, Bauersachs S, Ulbrich SE, Einspanier R, Meyer HHD, Schmidt SEM, u. a. Monozygotic Twin Model Reveals Novel Embryo-Induced Transcriptome Changes of Bovine Endometrium in the Preattachment Period. *Biol Reprod.* 2. Januar 2006;74(2):253–64.
- Kliman**, Harvey Jon. „Uteroplacental Blood Flow“. *The American Journal of Pathology* 157, Nr. 6 (Dezember 2000): 1759–68.
- Kodama A**, Yoshino O, Osuga Y, Harada M, Hasegawa A, Hamasaki K, u. a. Progesterone decreases bone morphogenetic protein (BMP) 7 expression and BMP7 inhibits decidualization and proliferation in endometrial stromal cells. *Hum Reprod.* März 2010;25(3):751–6.
- Kong C**, Wang C, Wang L, Ma M, Niu C, Sun X, u. a. NEDD9 is a positive regulator of epithelial-mesenchymal transition and promotes invasion in aggressive breast cancer. *PLoS ONE.* 2011;6(7):e22666.
- Koo**, S H, M C Cunningham, B Arabshahi, J S Gruss, und J H Grant 3rd. „The Transforming Growth Factor-Beta 3 Knock-out Mouse: An Animal Model for Cleft Palate“. *Plastic and Reconstructive Surgery* 108, Nr. 4 (15. September 2001): 938–48; discussion 949–51.
- Kowanetz M**, Valcourt U, Bergström R, Heldin C-H, Moustakas A. Id2 and Id3 define the potency of cell proliferation and differentiation responses to transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein. *Mol Cell Biol.* Mai 2004;24(10):4241–54.
- Küchenhoff A**, Seliger G, Klonisch T, Tscheudschilsuren G, Kaltwasser P, Seliger E, u. a. Arylhydrocarbon receptor expression in the human endometrium. *Fertil Steril.* Februar 1999;71(2):354–60.
- Kulik**, G., A. Klippel, und M. J. Weber. „Antiapoptotic Signalling by the Insulin-like Growth Factor I Receptor, Phosphatidylinositol 3-Kinase, and Akt.“ *Molecular and Cellular Biology* 17, Nr. 3 (3. Januar 1997): 1595–1606.
- Lash GE**, Robson SC, Bulmer JN. Review: Functional role of uterine natural killer (uNK) cells in human early pregnancy decidua. *Placenta.* März 2010;31 Suppl:S87–92.
- Lau MM**, Stewart CE, Liu Z, Bhatt H, Rotwein P, Stewart CL. Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. *Genes Dev.* 15. Dezember 1994;8(24):2953–63.
- Lavranos TC**, Rathjen PD, Seamark RF. Trophic effects of myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF) on mouse embryos. *J Reprod Fertil.* November 1995;105(2):331–8.
- Lawler PR**, Lawler J. Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin-1 and -2. *Cold Spring Harb Perspect Med.* Mai 2012;2(5):a006627.
- Lehar SM**, Nacht M, Jacks T, Vater CA, Chittenden T, Guild BC. Identification and cloning of EI24, a gene induced by p53 in etoposide-treated cells. *Oncogene.* 21. März 1996;12(6):1181–7.
- Lenzen**, S. „The Mechanisms of Alloxan- and Streptozotocin-Induced Diabetes“. *Diabetologia* 51, Nr. 2 (Februar 2008): 216–26. doi:10.1007/s00125-007-0886-7.
- Leonardsson G**, Steel JH, Christian M, Pocock V, Milligan S, Bell J, u. a. Nuclear receptor corepressor RIP140 regulates fat accumulation. *PNAS.* 6. Januar 2004;101(22):8437–42.
- Lessey BA**, Gui Y, Apparao KBC, Young SL, Mulholland J. Regulated expression of heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) in the human endometrium: a potential paracrine role during implantation. *Mol Reprod Dev.* August 2002;62(4):446–55.
- L’Horset F**, Dauvois S, Heery DM, Cavailles V, Parker MG. RIP-140 interacts with multiple nuclear receptors by means of two distinct sites. *Mol Cell Biol.* 11. Januar 1996;16(11):6029

- Lim J**, Bongso A, Ratnam S. Mitogenic and cytogenetic evaluation of transforming growth factor-beta on murine preimplantation embryonic development in vitro. *Mol Reprod Dev.* Dezember 1993;36(4):482–7.
- Liu JP**, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell.* 8. Oktober 1993;75(1):59–72.
- Liu A**, Garg P, Yang S, Gong P, Pallero MA, Annis DS, u. a. Epidermal growth factor-like repeats of thrombospondins activate phospholipase Cgamma and increase epithelial cell migration through indirect epidermal growth factor receptor activation. *J Biol Chem.* 6. März 2009;284(10):6389–402.
- Lorenzen**, T, F Pociot, J Johannesen, O P Kristiansen, und J Nerup. „A Population-Based Survey of Frequencies of Self-Reported Spontaneous and Induced Abortions in Danish Women with Type 1 Diabetes Mellitus. Danish IDDM Epidemiology and Genetics Group“. *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association* 16, Nr. 6 (Juni 1999): 472–76.
- Louvi A**, Accili D, Efstratiadis A. Growth-promoting interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development. *Dev Biol.* 1. September 1997;189(1):33–48.
- Lu J**, Dixon WT, Tsin AT, Basu TK. The metabolic availability of vitamin A is decreased at the onset of diabetes in BB rats. *J Nutr.* August 2000;130(8):1958–62.
- Lund PK**, Moats-Staats BM, Hynes MA, Simmons JG, Jansen M, D’Ercole AJ, u. a. Somatomedin-C/insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II mRNAs in rat fetal and adult tissues. *J Biol Chem.* 5. November 1986;261(31):14539–44.
- Ma**, Qing, Tao Yu, Yao-Yao Ren, Ting Gong, und Dian-Sheng Zhong. „Overexpression of SAMD9 Suppresses Tumorigenesis and Progression during Non Small Cell Lung Cancer“. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 454, Nr. 1 (7. November 2014): 157–61. doi:10.1016/j.bbrc.2014.10.054.
- Manabe Y**, Tochigi M, Moriwaki A, Takeuchi S, Takahashi S. Insulin-like growth factor 1 mRNA expression in the uterus of streptozotocin-treated diabetic mice. *J Reprod Dev.* 2013;59(4):398–404.
- Martin KL**, Barlow DH, Sargent IL. Heparin-binding epidermal growth factor significantly improves human blastocyst development and hatching in serum-free medium. *Hum Reprod.* Juni 1998;13(6):1645–52.
- Mattagajasingh SN**, Huang SC, Hartenstein JS, Benz EJ Jr. Characterization of the interaction between protein 4.1R and ZO-2. A possible link between the tight junction and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* 29. September 2000;275(39):30573–85.
- McKinnon T**, Chakraborty C, Gleeson LM, Chidiac P, Lala PK. Stimulation of human extravillous trophoblast migration by IGF-II is mediated by IGF type 2 receptor involving inhibitory G protein(s) and phosphorylation of MAPK. *J Clin Endocrinol Metab.* August 2001;86(8):3665–74.
- Metcalf D**. Leukemia inhibitory factor--a puzzling polyfunctional regulator. *Growth Factors.* 1992;7(3):169–73.
- Miell JP**, Jauniaux E, Langford KS, Westwood M, White A, Jones JS. Insulin-like growth factor binding protein concentration and post-translational modification in embryological fluid. *Molecular Human Reproduction.* 1. April 1997;3(4):343–349.
- Mikolajczyk M**, Skrzypczak J, Szymanowski K, Wirstlein P. The assessment of LIF in uterine flushing--a possible new diagnostic tool in states of impaired fertility. *Reprod Biol.* November 2003;3(3):259–70.
- Mitic LL**, Anderson JM. Molecular architecture of tight junctions. *Annu Rev Physiol.* 1998;60:121
- Moley**, K. H., M. M.-Y. Chi, C. M. Knudson, S. J. Korsmeyer, und M. M. Mueckler. „Hyperglycemia Induces Apoptosis in Pre-Implantation Embryos through Cell Death Effector Pathways“. *Nature Medicine* 4, Nr. 12 (Dezember 1998): 1421–24. doi:10.1038/4013.
- Morishita H**, Yagi T. Protocadherin family: diversity, structure, and function. *Current Opinion in Cell Biology.* Oktober 2007;19(5):584–92.
- Mukherjee A**, Amato P, Allred DC, Fernandez-Valdivia R, Nguyen J, O’Malley BW, u. a. Steroid receptor coactivator 2 is essential for progesterone-dependent uterine function and mammary

morphogenesis: insights from the mouse--implications for the human. *J Steroid Biochem Mol Biol.* Dezember 2006;102(1-5):22–31.

Munday R, Ludwig K, Lenzen S. The relationship between the physicochemical properties and the biological effects of alloxan and several N-alkyl substituted alloxan derivatives. *J Endocrinol.* Oktober 1993;139(1):153–63.

Murayama Y, Okamoto T, Ogata E, Asano T, Iiri T, Katada T, u. a. Distinctive regulation of the functional linkage between the human cation-independent mannose 6-phosphate receptor and GTP-binding proteins by insulin-like growth factor II and mannose 6-phosphate. *J Biol Chem.* 15. Oktober 1990;265(29):17456–62.

Murcia CL, Woychik RP. Expression of Pcdh15 in the inner ear, nervous system and various epithelia of the developing embryo. *Mechanisms of Development.* Juli 2001;105(1–2):163–6.

Murgia C, Berria R, Minerba L, Mallocci B, Daniele C, Zedda P, u. a. Gestational diabetes mellitus in Sardinia: results from an early, universal screening procedure. *Diabetes Care.* Juli 2006;29(7):1713–4.

Murphy LJ, Bell GI, Friesen HG. Tissue distribution of insulin-like growth factor I and II messenger ribonucleic acid in the adult rat. *Endocrinology.* April 1987;120(4):1279–82.

Murphy LJ. Impaired estrogen-induced uterine insulin-like growth factor-I gene expression in the streptozotocin diabetic rat. *Diabetologia.* November 1988;31(11):842–7.

Murphy-Ullrich JE, Poczatek M. Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* Juni 2000;11(1-2):59–69.

Nakajima D, Nakayama M, Kikuno R, Hirosawa M, Nagase T, Ohara O. Identification of three novel non-classical cadherin genes through comprehensive analysis of large cDNAs. *Brain Res Mol Brain Res.* 19. Oktober 2001;94(1-2):85–95.

Nielsen GL, Nørgard B, Puho E, Rothman KJ, Sørensen HT, Czeizel AE. Risk of specific congenital abnormalities in offspring of women with diabetes. *Diabet Med.* Juni 2005;22(6):693–6.

Norambuena J, Pijnenborg R, Brosens I. Decidual changes in the endometrium and morphological adaptation of the associated supplying arteries in the normal and diabetic pseudopregnant rat. *Placenta.* Juni 1984;5(3):249–60.

Norstedt G, Levinovitz A, Eriksson H. Regulation of uterine insulin-like growth factor I mRNA and insulin-like growth factor II mRNA by estrogen in the rat. *Acta Endocrinol.* April 1989;120(4):466

Nowak RA, Haimovici F, Biggers JD, Erbach GT. Transforming growth factor-beta stimulates mouse blastocyst outgrowth through a mechanism involving parathyroid hormone-related protein. *Biol Reprod.* Januar 1999;60(1):85–93.

Ohnuma K, Dang NH, Morimoto C. Revisiting an old acquaintance: CD26 and its molecular mechanisms in T cell function. *Trends Immunol.* Juni 2008;29(6):295–301.

Oka Y, Rozek LM, Czech MP. Direct demonstration of rapid insulin-like growth factor II Receptor internalization and recycling in rat adipocytes. Insulin stimulates 125I-insulin-like growth factor II degradation by modulating the IGF-II receptor recycling process. *J Biol Chem.* 5. August 1985;260(16):9435–42.

Omwandho COA, Konrad L, Halis G, Oehmke F, Tinneberg H-R. Role of TGF-betas in normal human endometrium and endometriosis. *Hum Reprod.* Januar 2010;25(1):101–9.

Oshita H, Nishino R, Takano A, Fujitomo T, Aragaki M, Kato T, u. a. RASEF is a novel diagnostic biomarker and a therapeutic target for lung cancer. *Mol Cancer Res.* August 2013;11(8):937–51.

Parandoosh Z, Crombie DL, Tetzke TA, Hayes JS, Heap RB, Wang MW. Progesterone and oestrogen receptors in the decidualized mouse uterus and effects of different types of anti-progesterone treatment. *J Reprod Fertil.* November 1995;105(2):215–20.

Paria BC, Zhao X, Das SK, Dey SK, Yoshinaga K. Zonula occludens-1 and E-cadherin are coordinately expressed in the mouse uterus with the initiation of implantation and decidualization. *Dev Biol.* 15. April 1999;208(2):488–501.

Patrizio P, Broomfield D. The genetic basis of male infertility. In: Glover TD, Barratt CLR, editors. *Male fertility and infertility.* Cambridge: Cambridge University; 1999, p 163- 76

- Poretsky L**, Chun B, Liu HC, Rosenwaks Z. Insulin-like growth factor II (IGF-II) inhibits insulin-like growth factor binding protein I (IGFBP-1) production in luteinized human granulosa cells with a potency similar to insulin-like growth factor I (IGF-I) and higher than insulin. *J Clin Endocrinol Metab.* September 1996;81(9):3412–4.
- Powell-Braxton L**, Hollingshead P, Warburton C, Dowd M, Pitts-Meek S, Dalton D, u. a. IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes Dev.* Dezember 1993;7(12B):2609–17.
- Quadro L**, Hamberger L, Gottesman ME, Wang F, Colantuoni V, Blaner WS, u. a. Pathways of Vitamin A Delivery to the Embryo: Insights from a New Tunable Model of Embryonic Vitamin A Deficiency. *Endocrinology.* Oktober 2005;146(10):4479–90.
- Raab G**, Kover K, Paria BC, Dey SK, Ezzell RM, Klagsbrun M. Mouse preimplantation blastocysts adhere to cells expressing the transmembrane form of heparin-binding EGF-like growth factor. *Development.* Februar 1996;122(2):637–45.
- Ramakrishnan P**, Kahn DA, Baltimore D. Anti-apoptotic effect of hyperglycemia can allow survival of potentially autoreactive T cells. *Cell Death Differ.* April 2011;18(4):690–9.
- Ramin N**, Thieme R, Fischer S, Schindler M, Schmidt T, Fischer B, u. a. Maternal diabetes impairs gastrulation and insulin and IGF-I receptor expression in rabbit blastocysts. *Endocrinology.* September 2010;151(9):4158–67.
- Rampon C**, Prandini M-H, Bouillot S, Pointu H, Tillet E, Frank R, u. a. Protocadherin 12 (VE-cadherin 2) is expressed in endothelial, trophoblast, and mesangial cells. *Exp Cell Res.* 1. Januar 2005;302(1):48–60.
- Rampon**, Christine, Stéphanie Bouillot, Adriana Climescu-Haulica, Marie-Hélène Prandini, Francine Cand, Yves Vandembrouck, und Philippe Huber. „Protocadherin 12 Deficiency Alters Morphogenesis and Transcriptional Profile of the Placenta“. *Physiological Genomics* 34, Nr. 2 (15. Juli 2008): 193–204. doi:10.1152/physiolgenomics.00220.2007.
- Ranuncolo SM**, Polo JM, Melnick A. BCL6 represses CHEK1 and suppresses DNA damage pathways in normal and malignant B-cells. *Blood Cells Mol Dis.* August 2008;41(1):95–9.
- Rao LV**, Wikarczuk ML, Heyner S. Functional roles of insulin and insulinlike growth factors in preimplantation mouse embryo development. *In Vitro Cell Dev Biol.* November 1990;26(11):1043.
- Rastinejad F**, Polverini PJ, Bouck NP. Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell.* 10. Februar 1989;56(3):345–55.
- Ray JG**, O'Brien TE, Chan WS. Preconception care and the risk of congenital anomalies in the offspring of women with diabetes mellitus: a meta-analysis. *QJM.* August 2001;94(8):435–44.
- Redies C**, Vanhalst K, Roy F van. delta-Protocadherins: unique structures and functions. *Cell Mol Life Sci.* Dezember 2005;62(23):2840–52.
- Redies C**, Hertel N, Hübner CA. Cadherins and neuropsychiatric disorders. *Brain Res.* 27. August 2012;1470:130–44.
- Resnicoff M**, Abraham D, Yutanawiboonchai W, Rotman HL, Kajstura J, Rubin R, u. a. The insulin-like growth factor I receptor protects tumor cells from apoptosis in vivo. *Cancer Res.* 1. Juni 1995;55(11):2463–9.
- Ribeiro SM**, Poczatek M, Schultz-Cherry S, Villain M, Murphy-Ullrich JE. The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency-associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor-beta. *J Biol Chem.* 7. Mai 1999;274(19): 86–93.
- Ribes V**, Le Roux I, Rhinn M, Schuhbauer B, Dollé P. Early mouse caudal development relies on crosstalk between retinoic acid, Shh and Fgf signalling pathways. *Development.* Februar 2009;136(4):665–76.
- Rifkin DB**. Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: rchestrators of TGF-beta availability. *J Biol Chem.* 4. März 2005;280(9):7409–12.
- Robert MF**, Neff RK, Hubbell JP, Tausch HW, Avery ME. Association between maternal diabetes and the respiratory-distress syndrome in the newborn. *N Engl J Med.* 12. Februar 1976;294(7):357.
- Rosso A**, Balsamo A, Gambino R, Dentelli P, Falcioni R, Cassader M, u. a. p53 Mediates the accelerated onset of senescence of endothelial progenitor cells in diabetes. *J Biol Chem.* 17. Februar 2006;281(7):4339–47.

- Roth S**, Abernathy MP, Lee WH, Pratt L, Denne S, Golichowski A, u. a. Insulin-like growth factors I and II peptide and messenger RNA levels in macrosomic infants of diabetic pregnancies. *J Soc Gynecol Investig*. April 1996;3(2):78–84.
- Rouget-Quermalet V**, Giustiniani J, Marie-Cardine A, Beaud G, Besnard F, Loyaux D, u. a. Protocadherin 15 (PCDH15): a new secreted isoform and a potential marker for NK/T cell lymphomas. *Oncogene*. 4. Mai 2006;25(19):2807–11.
- Rutanen EM**. Insulin-like growth factors in endometrial function. *Gynecol Endocrinol*. Dezember 1998;12(6):399–406.
- Saltiel**, Alan R., und C. Ronald Kahn. „Insulin Signalling and the Regulation of Glucose and Lipid Metabolism“. *Nature* 414, Nr. 6865 (13. Dezember 2001): 799–806. doi:10.1038/414799a.
- S K Das ND**. Expression of betacellulin and epiregulin genes in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition is coincident with the "window" of implantation. *Developmental biology*. 1997;190(2):178–90.
- Saito FH**, Damasceno DC, Dallaqua B, Linhares IM, Rudge MVC, De Mattos Paranhos Calderon I, u. a. Heat shock protein production and immunity and altered fetal development in diabetic pregnant rats. *Cell Stress Chaperones*. Januar 2013;18(1):25–33.
- Sakai K**, Busby WH, Clarke JB, Clemmons DR. Tissue Transglutaminase Facilitates the Polymerization of Insulin-like Growth Factor-binding Protein-1 (IGFBP-1) and Leads to Loss of IGFBP-1's Ability to Inhibit Insulin-like Growth Factor-I-stimulated Protein Synthesis. *Journal of Biological Chemistry*. 23. März 2001;276(12):8740 –8745.
- Salker M**, Teklenburg G, Molokhia M, Lavery S, Trew G, Aojanepong T, u. a. Natural selection of human embryos: impaired decidualization of endometrium disables embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss. *PLoS ONE*. 2010;5(4):e10287.
- Samborski A**, Graf A, Krebs S, Kessler B, Reichenbach M, Reichenbach H-D, u. a. Transcriptome changes in the porcine endometrium during the preattachment phase. *Biol Reprod*. 2013;89(6):134.
- Sano K**, Tanihara H, Heimark RL, Obata S, Davidson M, St John T, u. a. Protocadherins: a large family of cadherin-related molecules in central nervous system. *EMBO J*. Juni 1993;12(6):2249–56.
- Schindler M**, Diplomarbeit „Die Expression des Insulin-/IGF-Rezeptor-Systems im Uterusgewebe diabetischer Kaninchen“, MLU Halle-Wittenberg, 2009.
- Schultz GA**, Heyner S. Growth factors in preimplantation mammalian embryos. *Oxf Rev Reprod Biol*. 1993;15:43–81.
- Seliger Gregor**, Arylhydrocarbon-Rezeptor im humanen Endometrium.“, Halle, Univ., Diss., 2001
- Senften M**, Schwander M, Kazmierczak P, Lillo C, Shin J-B, Hasson T, u. a. Physical and Functional Interaction between Protocadherin 15 and Myosin VIIa in Mechanosensory Hair Cells. *J Neurosci*. 15. Februar 2006;26(7):2060–71.
- Serle E**, Aplin JD, Li TC, Warren MA, Graham RA, Seif MW, u. a. Endometrial differentiation in the peri-implantation phase of women with recurrent miscarriage: a morphological and immunohistochemical study. *Fertil Steril*. November 1994;62(5):989–96.
- Sherwin JRA**, Sharkey AM, Mihalyi A, Simsa P, Catalano RD, D'Hooghe TM. Global gene analysis of late secretory phase, eutopic endometrium does not provide the basis for a minimally invasive test of endometriosis. *Hum Reprod*. Mai 2008;23(5):1063–8.
- Shi W**, Chang C, Nie S, Xie S, Wan M, Cao X. Endofin acts as a Smad anchor for receptor activation in BMP signaling. *J Cell Sci*. 1. April 2007;120(Pt 7):1216–24.
- Shimomura Y**, Ando H, Furugori K, Kajiyama H, Suzuki M, Iwase A, u. a. Possible involvement of crosstalk cell-adhesion mechanism by endometrial CD26/dipeptidyl peptidase IV and embryonal fibronectin in human blastocyst implantation. *Mol Hum Reprod*. August 2006;12(8):491–5.
- Simar D**, Jacques A, Caillaud C. Heat shock proteins induction reduces stress kinases activation, potentially improving insulin signalling in monocytes from obese subjects. *Cell Stress Chaperones*. September 2012;17(5):615–21.
- Singh H**, Aplin JD. Adhesion molecules in endometrial epithelium: tissue integrity and embryo implantation. *J Anat*. Juli 2009;215(1):3–13.

- Sohr S**, England K. The tumor suppressor p53 induces expression of the pregnancy-supporting human chorionic gonadotropin (hCG) CGB7 gene. *Cell Cycle*. 1. November 2011;1(21):58–67.
- Solloway MJ**, Dudley AT, Bikoff EK, Lyons KM, Hogan BL, Robertson EJ. Mice lacking Bmp6 function. *Dev Genet*. 1998;22(4):321–39.
- Spanos S**, D. L. Becker, R. M. Winston, und K. Hardy. „Anti-Apoptotic Action of Insulin-like Growth Factor-I during Human Preimplantation Embryo Development“. *Biology of Reproduction* 63, Nr. 5 (November 2000): 1413–20.
- Sreedhar AS**, Csermely P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. *Pharmacol Ther*. März 2004;101(3):227–57.
- Stanietsky N**, Mandelboim O. Paired NK cell receptors controlling NK cytotoxicity. *FEBS Letters*. 15. Dezember 2010;584(24):4895–900.
- Stephensen CB**. Vitamin A, infection, and immune function. *Annu Rev Nutr*. 2001;21:167–92.
- Stewart MO**, Whittaker PG, Persson B, Hanson U, Lind T. A longitudinal study of circulating progesterone, oestradiol, hCG and hPL during pregnancy in type 1 diabetic mothers. *Br J Obstet Gynaecol*. April 1989;96(4):415–23.
- Stewart C. L.**, P. Kaspar, L. J. Brunet, H. Bhatt, I. Gadi, F. Köntgen, und S. J. Abbondanzo. „Blastocyst Implantation Depends on Maternal Expression of Leukaemia Inhibitory Factor“. *Nature* 359, Nr. 6390 (3. September 1992): 76–79. doi:10.1038/359076a0.
- Stoikos CJ**, Harrison CA, Salamonsen LA, Dimitriadis E. A distinct cohort of the TGF β superfamily members expressed in human endometrium regulate decidualization. *Hum Reprod*. 6. Januar 2008;23(6):1447–56.
- Sun FL**, Dean WL, Kelsey G, Allen ND, Reik W. Transactivation of Igf2 in a mouse model of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature*. 23. Oktober 1997;389(6653):809–15.
- Surmacz E**, Sell C, Swantek J, Kato H, Roberts CT Jr, LeRoith D, u. a. Dissociation of mitogenesis and transforming activity by C-terminal truncation of the insulin-like growth factor-I receptor. *Exp Cell Res*. Mai 1995;218(1):370–80.
- Suzuki ST**. Protocadherins and diversity of the cadherin superfamily. *J Cell Sci*. 11. Januar 1996;109(11):2609–11.
- Takeichi M**. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development*. April 1988;102(4):639–55.
- Taniguchi CM**, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Februar 2006;7(2):85–96.
- Tasaka Y**, Inoue Y, Matsumoto H, Hirata Y. Changes in plasma glucagon, pancreatic polypeptide and insulin during development of alloxan diabetes mellitus in dog. *Endocrinol Jpn*. Juni 1988;35(3):399–404.
- Teller Janine**, Praktikumsbericht, Institut für Anatomie und Zellbiologie der MLU Halle-Wittenberg, 2013.
- Temple R**, Aldridge V, Greenwood R, Heyburn P, Sampson M, Stanley K. Association between outcome of pregnancy and glycaemic control in early pregnancy in type 1 diabetes: population based study. *BMJ*. 30. November 2002;325(7375):1275–6.
- Tennant**, Peter W. G., Svetlana V. Glinianaia, Rudy W. Bilous, Judith Rankin, und Ruth Bell. „Pre-Existing Diabetes, Maternal Glycated Haemoglobin, and the Risks of Fetal and Infant Death: A Population-Based Study“. *Diabetologia* 57, Nr. 2 (Februar 2014): 285–94. doi:10.1007/s00125-013-3108-5.
- Thieme R**, Schindler M, Ramin N, Fischer S, Mühleck B, Fischer B, u. a. Insulin growth factor adjustment in preimplantation rabbit blastocysts and uterine tissues in response to maternal type 1 diabetes. *Mol Cell Endocrinol*. 6. Juli 2012;358(1):96–103.
- Tiedge M**, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes*. November 1997;46(11):1733
- Torres-Padilla M-E**, Parfitt D-E, Kouzarides T, Zernicka-Goetz M. Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. *Nature*. 11. Januar 2007;445(7124):214–8.

- Treuter E**, Albrektsen T, Johansson L, Leers J, Gustafsson JA. A regulatory role for RIP140 in nuclear receptor activation. *Mol Endocrinol*. Juni 1998;12(6):864–81.
- Ullrich A**, Bell JR, Chen EY, Herrera R, Petruzzelli LM, Dull TJ, u. a. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature*. 28. März 1985;313(6005):756
- Umayahara Y**, Kawamori R, Watada H, Imano E, Iwama N, Morishima T, u. a. Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer. *J Biol Chem*. 10. Juni 1994;269(23):16433–42.
- Vallejo G**, Maschi D, Mestre-Citrinovitz AC, Aiba K, Maronna R, Yohai V, u. a. Changes in global gene expression during in vitro decidualization of rat endometrial stromal cells. *J Cell Physiol*. Januar 2010;222(1):127–37.
- Van den Oever**, Inge A. M., Hennie G, Raterman, Mike T, Nurmohamed, und Suat Simsek. „Endothelial Dysfunction, Inflammation, and Apoptosis in Diabetes Mellitus“. *Mediators of Inflammation* 2010 (2010): 792393. doi:10.1155/2010/792393.
- Velazquez MA**, Zaraza J, Oropeza A, Webb R, Niemann H. The role of IGF1 in the in vivo production of bovine embryos from superovulated donors. *Reproduction*. Februar 2009;137(2):161
- Vercheval M**, De Hertogh R, Pampfer S, Vanderheyden I, Michiels B, De Bernardi P, u. a. Experimental diabetes impairs rat embryo development during the preimplantation period. *Diabetologia*. April 1990;33(4):187–91.
- Viebahn C**, Mayer B, Miething A. Morphology of incipient mesoderm formation in the rabbit embryo: a light- and retrospective electron-microscopic study. *Acta Anat (Basel)*. 1995;154(2):99
- Wang X**, Matsumoto H, Zhao X, Das SK, Paria BC. Embryonic signals direct the formation of tight junctional permeability barrier in the decidualizing stroma during embryo implantation. *J Cell Sci*. 1. Januar 2004;117(Pt 1):53–62.
- Wang Z**, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*. Januar 2009;10(1):57–63.
- Ware CB**, Horowitz MC, Renshaw BR, Hunt JS, Liggitt D, Koblar SA, u. a. Targeted disruption of the low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neural and metabolic defects and results in perinatal death. *Development*. Mai 1995;121(5):1283–99.
- Watson AJ**, Westhusin ME, Winger QA. IGF paracrine and autocrine interactions between conceptus and oviduct. *J Reprod Fertil Suppl*. 1999;54:303–15.
- Watson CS**, Bialek P, Anzo M, Khosravi J, Yee S-P, Han VKM. Elevated circulating insulin-like growth factor binding protein-1 is sufficient to cause fetal growth restriction. *Endocrinology*. März 2006;147(3):1175–86.
- Weiner JA**, Jontes JD. Protocadherins, not prototypical: a complex tale of their interactions, expression, and functions. *Front Mol Neurosci* [Internet]. 19. März 2013 [zitiert 18. September 2013];6. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3601302/>
- Wender-Ozegowska E**, Wróblewska K, Zawiejska A, Pietryga M, Szczapa J, Biczysko R. Threshold values of maternal blood glucose in early diabetic pregnancy--prediction of fetal malformations. *Acta Obstet Gynecol Scand*. Januar 2005;84(1):17–25.
- Westwood M**, Gibson JM, Davies AJ, Young RJ, White A. The phosphorylation pattern of insulin-like growth factor-binding protein-1 in normal plasma is different from that in amniotic fluid and changes during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. Dezember 1994;79(6):1735–41.
- Westwood M**, Gibson JM, White A. Purification and Characterization of the Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-1 Phosphoform Found in Normal Plasma. *Endocrinology*. 1. März 1997;138(3):1130–1136.
- White R**, Leonardsson G, Rosewell I, Ann Jacobs M, Milligan S, Parker M. The nuclear receptor co-repressor nrip1 (RIP140) is essential for female fertility. *Nat Med*. Dezember 2000;6(12):1368
- White CA**, Zhang J-G, Salamonsen LA, Baca M, Fairlie WD, Metcalf D, u. a. Blocking LIF action in the uterus by using a PEGylated antagonist prevents implantation: a nonhormonal contraceptive strategy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 4. Dezember 2007;104(49):19357–62.
- Whitten WK**, Biggers JD. Complete development in vitro of the pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. *J Reprod Fertil*. November 1968;17(2):399–401.

- WILSON JG, ROTH CB, WARKANY J.** An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *Am J Anat.* März 1953;92(2):189–217.
- Winger QA, de los Rios P, Han VK, Armstrong DT, Hill DJ, Watson AJ.** Bovine oviductal and embryonic insulin-like growth factor binding proteins: possible regulators of „embryotrophic“ insulin-like growth factor circuits. *Biol Reprod.* Juni 1997;56(6):1415–23.
- Wolf G.** Serum retinol-binding protein: a link between obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Nutr Rev.* Mai 2007;65(5):251–6.
- Wu Q, Bruce AW, Jedrusik A, Ellis PD, Andrews RM, Langford CF, u. a.** CARM1 is required in embryonic stem cells to maintain pluripotency and resist differentiation. *Stem Cells.* November 2009;27(11):2637–45.
- Wu M, Yin Y, Zhao M, Hu L, Chen Q.** The low expression of leukemia inhibitory factor in endometrium: possible relevant to unexplained infertility with multiple implantation failures. *Cytokine.* Mai 2013;62(2):334–9.
- Xiong W, Grillet N, Elledge HM, Wagner TFJ, Zhao B, Johnson KR, u. a.** TMHS is an integral component of the mechanotransduction machinery of cochlear hair cells. *Cell.* 7. Dezember 2012;151(6):1283–95.
- Xu J, Li Q.** Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Mol Endocrinol.* September 2003;17(9):1681–92.
- Yagi T, Takeichi M.** Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev.* 15. Mai 2000;14(10):1169–80.
- Yamamoto A, Amacher SL, Kim S-H, Geissert D, Kimmel CB, De Robertis EM.** Zebrafish paraxial protocadherin is a downstream target of spadetail involved in morphogenesis of gastrula mesoderm. *Development.* September 1998;125(17):3389–97.
- Yang ZM, Chen DB, Le SP, Harper MJ.** Differential hormonal regulation of leukemia inhibitory factor (LIF) in rabbit and mouse uterus. *Mol Reprod Dev.* April 1996;43(4):470–6.
- Yang J, Cummings EA, O'connell C, Jangaard K.** Fetal and neonatal outcomes of diabetic pregnancies. *Obstet Gynecol.* September 2006;108(3 Pt 1):644–50.
- Yoo HJ, Barlow DH, Mardon HJ.** Temporal and spatial regulation of expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the human endometrium: a possible role in blastocyst implantation. *Dev Genet.* 1997;21(1):102–8.
- Zakaria R, Ismail Z, Chatterjee A.** Cyproterone acetate and reversal of the impaired endometrial decidualization in streptozotocin-diabetic pseudopregnant rats. *Pharmacol Res.* August 2000;42(2):183–6.
- Zakaria R, Rajikin MH, Yaacob NS, Nor NM.** Diabetes alters the mRNA expression of insulin-like growth factors and their receptors in the mouse fallopian tube and uterus during the preimplantation stages. *Reprod Biol.* März 2007;7(1):41–53.
- Zakaria R, Rajikin MH, Yaacob NS, Nor NM.** Immunolocalization of insulin-like growth factors and their receptors in the diabetic mouse oviduct and uterine tissues during the preimplantation period. *Acta Histochem.* 2009;111(1):52–60.
- Zenklusen, J. C., C. J. Conti, und E. D. Green.** „Mutational and Functional Analyses Reveal That ST7 Is a Highly Conserved Tumor-Suppressor Gene on Human Chromosome 7q31“. *Nature Genetics* 27, Nr. 4 (April 2001): 392–98. doi:10.1038/86891.
- Zhong J, Baquiran JB, Bonakdar N, Lees J, Ching YW, Pugacheva E, u. a.** NEDD9 stabilizes focal adhesions, increases binding to the extra-cellular matrix and differentially effects 2D versus 3D cell migration. *PLoS ONE.* 2012;7(4):e35058.
- Zhou J, Dsupin BA, Giudice LC, Bondy CA.** Insulin-like growth factor system gene expression in human endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* Dezember 1994;79(6):1723–34.

7. Thesen

1. Ein maternaler Typ-1-Diabetes mellitus führt zu einer veränderten endometrialen Genexpression. Daraus resultiert eine gestörte embryo-maternale Kommunikation, welche eine der Gründe für die bei diabetischen Müttern bekannte Subfertilität sein kann.
2. Anders als in der Blastozyste, hat ein maternaler Diabetes mellitus im Endometrium gravider Kaninchen auf die Faktoren des Insulin-IGF-Systems (IGF1, IGF2) und deren Rezeptoren (IR, IGF1-R und IGF2-R) keinen Einfluss.
3. Als kompensatorischer Mechanismus zur fehlenden Insulinwirkung ist die IGFBP1-Transkription im Endometrium diabetischer Kaninchen herunterreguliert. Dies erhöht die Bioverfügbarkeit der IGFs im embryo-maternalen Raum.
4. Auch die Blastozyste des Kaninchens exprimiert IGFBP1. Im Unterschied zum Endometrium hat ein Diabetes mellitus in der Blastozyste keinen Einfluss auf die IGFBP1-Transkription.
5. Ein maternaler Diabetes mellitus führt nicht zu Veränderungen des Implantationsfaktors LIF und dessen Rezeptors LIFR im Endometrium.
6. Die Analyse des Transkriptom durch *Next Generation Sequencing* ist eine geeignete Methode, um quantitative Aussagen zu den Transkriptionsmengen aller in einem Gewebe exprimierten Gene treffen zu können. Die Aussagekraft der vorliegenden Untersuchung wird durch den niedrigen Prozentsatz von in die Auswertung eingegangenen Transkripten (22,4 %) und durch den geringen Umfang der Vergleichsgruppen eingeschränkt.
7. Bereits die Anwesenheit des Embryos führt in der Präimplantationsphase des Kaninchens zu Veränderungen der endometrialen Genexpression. Der Vergleich von graviden und pseudograviden Tieren ergab 206 differenziell exprimierte Gene. Davon betroffen sind Glykosylierungsprozesse, Zelladhäsionsmoleküle und Faktoren des TGF- β - und Östrogen-Signalweges.
8. *Next Generation Sequencing* ist eine geeignete Methode, um neue, durch einen Diabetes mellitus beeinflusste Gene im Endometrium zu detektieren: Es wurden 360 Gene durch einen Diabetes mellitus differenziell exprimiert. Die überwiegend herunterregulierten Gene waren assoziiert mit Zelladhäsion, Apoptose, Wachstum und Signalwegen wie p53, TGF- β und EGF.
9. Erstmals gelang der Nachweis von Protocadherin 15, einem Mitglied der Cadherin-Familie, im humanen und im Kaninchenendometrium. PCDH15 ist in den basal liegenden Uterusdrüsen streng perinukleär lokalisiert. Beim Menschen erfolgt die Expression zyklusabhängig mit einem Maximum der Expression in der Sekretionsphase (Zyklustag 16-18). Beim Kaninchen kommt es im Rahmen der Implantation zu einem vollständigen Verschwinden des PCDH15 aus dem *Str. functionale*. Die Ergebnisse lassen eine Funktion des PCDH15 bei der Dezidualisierung des Endometriums und der embryonalen Implantation vermuten. Als sezernierte Form in das Uterussekret erscheint außerdem eine Rolle bei der Präimplantationsentwicklung des Embryos möglich.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

.....	
Name	Johannes Gabel
Geburtsdatum	23.03.1989
Geburtsort	Schlema/Sa.
Adresse	Martha-Brautzsch-Str.1, 06108 Halle/Saale
Familienstand	ledig

Schulbildung

.....	
1995 - 1999	Grundschule Aue-Zelle
1999 - 2007	Clemens-Winkler-Gymnasium Aue

Studium

.....	
10/2008-12/2015	Studium der Humanmedizin an der MLU Halle-Wittenberg
August 2010	1. Staatsexamen der Humanmedizin (Note: 1,0)
November 2015	2. Staatsexamen der Humanmedizin (Note: 1,0)
11/2014-10/2015	Praktisches Jahr in den Fächern Inneren Medizin, Chirurgie und Anästhesie

Praktika

.....	
02/2010-03/2013	Famulaturen in den Bereichen: Notaufnahme, Neurologie, Radiologie, Innere Medizin, Gynäkologie und Geburtshilfe, Orthopädie und Anästhesie/Intensivmedizin
März 2013	Teilnahme am „Lehrgang Tropenmedizin“ am Universitätsklinikum Jena
02-06/2014	Aufenthalt in Kamerun und Arbeit bei der Entwicklungshilfeorganisation „Ascovime“

Sonstiges

.....	
07/2007-05/2008	Auslandsaufenthalt in Australien: „work and travel“
seit 04/2011	Doktorand am Institut für Anatomie und Zellbiologie der MLU Halle/Wittenberg unter Leitung von Prof. Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer
10/2011-09/2014	Stipendiat des Deutschlandstipendiums

Selbstständigkeitserklärung

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

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

Halle/Saale, den

Erklärung über frühere Promotionsversuche

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

Halle/Saale, den

Danksagung

Die 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 zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer danke ich für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen. Herzlichen Dank auch für seine Unterstützung bei der Bewerbung um das Deutschlandstipendium.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. rer. nat. Anne Navarrete-Santos. Ein Laborpraktikum bei ihr machte mich neugierig auf das wissenschaftliche Arbeiten und veranlasste mich dazu, meine Promotion in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen. Danke für die Hilfe bei der Auswahl des Themas, das immer offene Ohr bei Problemen und Fragen, die vielen konstruktiven Gespräche und die sehr gute Betreuung die ganze Arbeit hindurch.

Ebenso danke ich Dr. rer. nat. Stefan Bauersachs des „Laboratory For Functional Gene Analysis“ der Ludwig-Maximilian-Universität München für die fruchtbare Kooperation und die Bereitstellung der *Next-Generation-Sequencing*-Daten.

Danken möchte ich auch für die unerschöpfliche Unterstützung im Labor. Vor allem Sabine Schrötter und Michaela Kirstein haben mir durch ihre Geduld die Grundlagen der Laborforschung beigebracht. Ihr kritisches Auge verhalf mir zur nötigen Sorgfalt bei meiner Arbeit.

Danke auch an den Rest der Arbeitsgruppe – Dr. Maria Schindler, Jacqueline Gürke, Mareike Pendzialek, Dr. Sünje Fischer, Dr. Elisa Hauke und Janine Teller – für die Unterstützung im Labor und die zahlreichen Verbesserungsvorschläge.

Vielen Dank auch an meine Eltern, die mich das gesamte Studium hindurch finanziell und mental unterstützten, und an meine Freunde, die meine Studienzeit unvergesslich werden ließen.