

**„Metabolismus und Signalkaskade der  
verzweigt-kettigen, aliphatischen Aminosäuren  
bei Stoffwechselstörungen in der  
Frühgravidität beim Kaninchen“**

Dissertation

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Dipl.-Biol. Jacqueline Gürke

geb. am 23.08.1986 in Ludwigsfelde

Gutachter: Prof. Dr. Gary Sawers

Prof. Dr. Bernd Fischer

apl. Prof. Dr. Judith Eckert

Datum der Verteidigung: 06.04.2018

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>- 1 -</b>
1.1	Diabetes mellitus	- 1 -
1.2	Experimentell induzierter Typ 1 Diabetes mellitus im Tiermodell	- 3 -
1.2.1	Präimplantationsentwicklung von <i>Oryctolagus cuniculus</i>	- 3 -
1.3	Der Einfluss von Aminosäuren auf die Embryogenese	- 5 -
1.4	Die verzweigtkettigen, aliphatischen Aminosäuren	- 6 -
1.4.1	Die Funktion von BCAA	- 7 -
1.4.2	Der Metabolismus von BCAA	- 7 -
1.4.3	Die Transportsysteme der BCAAs: System L	- 9 -
1.5	Der mTOR-Signalweg	- 10 -
1.6	Die Aktivierung von mTORC1	- 10 -
1.6.1	mTORC1-regulierte zelluläre Prozesse	- 11 -
1.6.2	Bedeutung von mTORC1 bei der Entwicklung von Krankheiten	- 13 -
1.6.3	Bedeutung von mTORC1 während der Embryogenese	- 14 -
1.7	Zielstellung	- 15 -
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>- 17 -</b>
2.1	Chemikalien, Enzyme, vorgefertigte Systeme, Oligonukleotide und Antikörper	- 17 -
2.1.1	Chemikalien	- 17 -
2.1.2	Enzyme	- 19 -
2.1.3	Vorgefertigte Systeme (Kits)	- 19 -
2.1.4	Oligonukleotide	- 20 -
2.1.5	Antikörper	- 20 -
2.2	Geräte und Gebrauchswaren	- 21 -
2.2.1	Geräte	- 21 -
2.2.2	Gebrauchswaren	- 22 -
2.3	Software	- 23 -
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>- 24 -</b>
3.1	Versuchstiere und Versuchstierhaltung	- 24 -
3.1.1	Alloxanbehandlung	- 24 -
3.1.2	Gewinnung von maternalen Blutproben	- 25 -
3.1.3	Gewinnung der Kaninchenblastozysten	- 25 -
3.1.4	Separation von Embryoblast und Trophoblast	- 26 -
3.1.5	Gewinnung von RNA-Proben	- 26 -
3.1.6	Gewinnung von Proteinproben	- 26 -
3.1.7	Gewinnung von Blastozystenhöhlenflüssigkeit, Uterussekret und Endometrium	- 27 -
3.1.8	Kultivierung von 6 Tage alten Kaninchenblastozysten	- 27 -
3.1.8.1	Stimulation mit Insulin	- 28 -
3.1.8.2	Stimulation mit Glukose für 6 Stunden	- 28 -
3.1.8.3	Stimulation mit Glukose und Rapamycin	- 28 -
3.1.8.4	Stimulation mit L-Leucin	- 29 -
3.1.8.5	Stimulation mit L-Leucin und Rapamycin	- 29 -
3.1.8.6	Stimulation mit Rapamycin für eine Stunde	- 30 -
3.1.8.7	Stimulation mit Rapamycin und Ly-294,002	- 31 -
3.1.8.8	Langzeitkultur mit nachgestellten BCAA-Konzentrationen <i>in vitro</i> von Blastozysten nicht-diabetischer und diabetischer Kaninchen	- 31 -
3.1.8.9	Langzeitkultur ohne BCAA <i>in vitro</i> für 6 Stunden	- 32 -
3.2	Molekularbiologische Methoden	- 33 -
3.2.1	Qualitative und quantitative Bestimmung freier Aminosäuren	- 33 -
3.2.1.1	Vorbereitung der Plasmaproben	- 33 -
3.2.1.2	Vorbereitung der Uterussekretproben	- 33 -
3.2.1.3	Vorbereitung der Blastozystenhöhlenflüssigkeit	- 33 -

3.2.2	RNA-Isolation	- 34 -
3.2.2.1	RNA-Isolation aus Geweben	- 34 -
3.2.2.2	mRNA-Isolation aus Kaninchenblastozysten	- 35 -
3.2.3	RNA-Quantifizierung mittels UV-Spektroskopie	- 35 -
3.2.4	DNase-Verdau	- 36 -
3.2.5	Reverse-Transkriptase Reaktion	- 36 -
3.2.5.1	Reverse-Transkriptase Reaktion von RNA aus Gewebe	- 36 -
3.2.5.2	Reverse-Transkriptase Reaktion von RNA aus Blastozysten	- 37 -
3.2.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	- 37 -
3.2.6.1	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RTq-PCR)	- 37 -
3.2.7	Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA und DNA	- 38 -
3.2.8	Eluierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	- 39 -
3.2.9	Klonierung von DNA-Fragmenten	- 39 -
3.2.9.1	Ligation von PCR-Fragmenten	- 39 -
3.2.9.2	Transformation in kompetente Bakterienzellen	- 40 -
3.2.9.3	Selektion und Isolation von Plasmiden aus <i>E. coli</i>	- 40 -
3.2.9.4	Restriktionsverdau von Plasmiden	- 41 -
3.2.9.5	Sequenzierung der rekombinanten Plasmide	- 41 -
3.2.9.6	Primer für die PCR	- 42 -
3.2.9.7	Herstellung von Plasmidstandards für die RTq-PCR	- 42 -
3.2.10	Proteinisolation	- 42 -
3.2.10.1	Proteinisolation aus Kaninchengewebe	- 42 -
3.2.10.2	Proteinisolation aus Blastozysten	- 43 -
3.2.11	Proteinquantifizierung	- 43 -
3.2.12	Auftrennung von Proteinen mittels SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	- 44 -
3.2.13	Western-Blot	- 45 -
3.2.14	Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern	- 45 -
3.2.15	Detektion und Auswertung	- 46 -
3.2.16	Abwaschen der Nitrozellulosemembran	- 47 -
<b>3.3</b>	<b>Bestimmung der zellulären Proteinsyntheseaktivität in Blastozysten</b>	<b>- 47 -</b>
3.3.1	Bestimmung der zellulären Proteinsyntheseaktivität in <i>in vitro</i> kultivierten Blastozysten mit und ohne BCAA	- 48 -
3.3.2	Mikroskopische Auswertung und Quantifizierung	- 48 -
<b>3.4</b>	<b>Fluoreszenzfärbung von Lysosomen in Blastozysten</b>	<b>- 49 -</b>
3.4.1	Bestimmung der Fluoreszenzfärbung von Lysosomen in <i>in vitro</i> kultivierten Blastozysten mit und ohne BCAA	- 49 -
3.4.2	Mikroskopische Auswertung und Quantifizierung	- 50 -
<b>3.5</b>	<b>Statistische Analyse</b>	<b>- 50 -</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>- 51 -</b>
<b>4.1</b>	<b>Vergleich der Futteraufnahme diabetischer Kaninchen in der Präimplantationsphase</b>	<b>- 51 -</b>
<b>4.2</b>	<b>Bestimmung der freien Aminosäuren im Blutplasma, Uterussekret und Blastozystenhöhlenflüssigkeit</b>	<b>- 51 -</b>
4.2.1	Aminosäuregehalt des Blutplasmas bei Kaninchen am Tag 6 <i>p.c.</i>	- 51 -
4.2.2	Aminosäuregehalt im Uterussekret bei Kaninchen am Tag 6 <i>p.c.</i>	- 52 -
4.2.3	Aminosäuregehalt in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit am Tag 6 <i>p.c.</i>	- 53 -
4.2.3.1	Vergleich der Aminosäurenkonzentrationen in Blastozysten des Gastrulationsstadiums 1 und 2	- 53 -
4.2.3.2	Vergleich der Aminosäurenkonzentrationen in Blastozysten gesunder und diabetischer Kaninchen	- 53 -
<b>4.3</b>	<b>Genexpression der BCAA-Abbauenzyme und -Transporter in Geweben des Kaninchens</b>	<b>- 55 -</b>
4.3.1	Genexpression der BCAA-Abbauenzyme im Gewebe diabetischer Kaninchen	- 55 -

4.3.2	Proteinmenge von BCAT2 im Fettgewebe diabetischer Kaninchen _____	- 56 -
<b>4.4</b>	<b>Genexpression der BCAA-Transporter im Endometrium diabetischer Kaninchen</b> _____	<b>- 56 -</b>
<b>4.5</b>	<b>Genexpression der BCAA-Abbauenzyme und -Transporter in Blastozysten des Kaninchens</b> _____	<b>- 57 -</b>
4.5.1	Ontogenetische Expression von <i>SLC7A5</i> _____	- 57 -
4.5.2	Genexpression der BCAA-Abbauenzyme und -Transporter in Kaninchenblastozysten _____	- 57 -
4.5.3	Genexpression der BCAA-Abbauenzyme in Blastozysten diabetischer Kaninchen _____	- 57 -
4.5.4	Proteinmenge von BCAT2 in Blastozysten diabetischer Kaninchen _____	- 58 -
4.5.5	Untersuchung der transkriptionellen Regulation von <i>Bcat2</i> _____	- 59 -
4.5.5.1	Regulation der <i>Bcat2</i> -Transkription durch Insulin _____	- 59 -
4.5.5.2	Regulation der <i>Bcat2</i> -Transkription durch Glukose _____	- 60 -
4.5.6	Genexpression der BCAA-Transporter in Blastozysten diabetischer Kaninchen _____	- 60 -
<b>4.6</b>	<b>mTOR und dessen Signalweg</b> _____	<b>- 61 -</b>
4.6.1	Ontogenetische Expression von mTOR _____	- 61 -
4.6.2	mTOR, S6K1 und 4E-BP1 in Embryoblast- und Trophoblastzellen _____	- 62 -
4.6.3	Aktivierung von mTOR und S6 Kinase 1 in Blastozysten _____	- 62 -
4.6.3.1	Aktivierung von mTOR und S6 Kinase 1 in Blastozysten durch Glukose _____	- 62 -
4.6.3.2	Aktivierung von mTOR und S6 Kinase 1 in Blastozysten durch L-Leucin _____	- 63 -
4.6.3.3	Expressionsanalyse von mTORC1-Zielgenen in L-Leucin-stimulierten Blastozysten _____	- 64 -
4.6.4	mTOR, S6K1 und 4E-BP1 in Embryoblast- und Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen _____	- 65 -
4.6.5	mTOR, S6K1 und 4E-BP1 in Blastozysten diabetischer Kaninchen _____	- 66 -
4.6.6	Quantifizierung von <i>CCND1</i> , <i>eIF4E</i> , <i>PCNA</i> , <i>ODC1</i> und <i>SLC7A8</i> in Blastozysten diabetischer Kaninchen _____	- 67 -
4.6.7	Bestimmung der Proteinsynthese in Blastozysten diabetischer Kaninchen _____	- 68 -
4.6.8	Expression der Autophagiemarker <i>Beclin 1</i> , <i>LC3</i> und p62 in Blastozysten diabetischer Kaninchen _____	- 69 -
4.6.9	Bestimmung der Anzahl von Lysosomen in Blastozysten diabetischer Kaninchen _____	- 70 -
<b>4.7</b>	<b>Expression von FoxO1 in Kaninchenblastozysten</b> _____	<b>- 71 -</b>
4.7.1	FoxO1 in Embryoblast- und Trophoblastzellen _____	- 71 -
4.7.2	Phosphorylierung von FoxO1 in Blastozysten durch Glukose _____	- 72 -
4.7.3	Phosphorylierung von FoxO1 in Blastozysten durch L-Leucin _____	- 72 -
4.7.4	Phosphorylierung von FoxO1 in Blastozysten durch Rapamycin _____	- 73 -
4.7.5	Identifikation von mTOR- oder Akt-abhängigen Phosphorylierung von FoxO1 in Blastozysten _____	- 74 -
4.7.6	FoxO1 in Embryoblast- und Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen _____	- 74 -
4.7.7	FoxO1 in Blastozysten diabetischer Kaninchen _____	- 75 -
4.7.7.1	FoxO1-Nachweis in der Kernfraktion von Trophoblastzellen nicht- diabetischer und diabetischer Kaninchen _____	- 76 -
4.7.8	Quantifizierung der FoxO1-Zielgene <i>LC3</i> , <i>PEPCK</i> und <i>HK2</i> in Blastozysten diabetischer Kaninchen _____	- 76 -
<b>4.8</b>	<b>Langzeit-<i>in-vitro</i>-Kultur mit nicht-diabetischen und diabetischen Konzentrationen an BCAA</b> _____	<b>- 77 -</b>
4.8.1	Bestimmung des Wachstums von <i>in vitro</i> kultivierten Blastozysten mit nicht-diabetischen und diabetischen BCAA-Konzentrationen _____	- 77 -
4.8.2	Interferenz des mTOR-Signalweges und FoxO1 in <i>in vitro</i> kultivierten Blastozysten mit nicht-diabetischen und diabetischen BCAA- Konzentrationen _____	- 77 -
4.8.3	Expressionsanalysen von <i>CCND1</i> , <i>eIF4E</i> und <i>SLC7A8</i> nach der <i>in vitro</i> Kultur mit nicht-diabetischen und diabetischen BCAA-Konzentrationen _____	- 78 -
<b>4.9</b>	<b>Langzeit-<i>in-vitro</i>-Kultur ohne BCAA</b> _____	<b>- 79 -</b>
4.9.1	Aminosäurenmessung in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit nach der Kultur ohne BCAA _____	- 79 -



4.9.2	Bestimmung des Wachstums und der Entwicklungskapazität von Blastozysten kultiviert ohne BCAA _____	- 79 -
4.9.3	Interferenz des mTOR-Signalweges und FoxO1 in Blastozysten kultiviert ohne BCAA _____	- 81 -
4.9.4	Expressionsanalyse von <i>Beclin</i> , <i>CCND1</i> , <i>eIF4E</i> , <i>HK2</i> , <i>LC3</i> , <i>ODC1</i> , <i>SLC7A8</i> und <i>SLC7A5</i> nach der Kultur ohne BCAA _____	- 82 -
4.9.5	Bestimmung der Proteinsynthese in Blastozysten kultiviert ohne BCAA _____	- 82 -
4.9.6	Bestimmung der Anzahl von Lysosomen in Blastozysten kultiviert ohne BCAA _____	- 83 -
4.9.7	Proteinmenge des Autophagiemarkers p62 in Blastozysten kultiviert ohne BCAA _____	- 84 -
<b>5</b>	<b>Diskussion _____</b>	<b>- 85 -</b>
<b>5.1</b>	<b>Ein Typ 1 Diabetes mellitus verändert das Aminosäureprofil der Mutter und des Embryos _____</b>	<b>- 85 -</b>
5.1.1	In einer diabetischen Schwangerschaft ist die Akkumulation der BCAA in maternalen Geweben und in Blastozysten die Folge eines veränderten BCAA-Metabolismus _____	- 87 -
5.1.1.1	Auswirkung eines Insulinmangels auf die BCAA-Verfügbarkeit in Geweben und Embryonen _____	- 89 -
5.1.1.2	Eine höhere BCAA-Verfügbarkeit steigert die Expression des BCAA- Transporters <i>SLC7A8</i> im Embryo _____	- 89 -
<b>5.2</b>	<b>Der mTORC1-Signalweg ist in 6 Tage alten Blastozysten des Kaninchens aktiv und über Glukose und L-Leucin regulierbar _____</b>	<b>- 90 -</b>
<b>5.3</b>	<b>Die veränderte Stoffwechselsituation der Mutter während eines Typ 1 Diabetes mellitus führt zur Aktivierung der embryonalen mTORC1-Signalkaskade _____</b>	<b>- 92 -</b>
5.3.1	BCAA regulieren die mTORC1-Signalkaskade in Blastozysten _____	- 94 -
5.3.2	Die metabolische Adaptation hat Konsequenzen für den Embryo _____	- 94 -
5.3.2.1	Die Proteinsynthese und Autophagie werden in Embryonen diabetischer Kaninchen über den mTORC1-Signalweg in Abhängigkeit von der BCAA- Verfügbarkeit reguliert_ _____	- 95 -
<b>5.4</b>	<b>FoxO1 ist in 6 Tage alten Blastozysten des Kaninchens nachweisbar und über Glukose und L-Leucin regulierbar _____</b>	<b>- 97 -</b>
<b>5.5</b>	<b>FoxO1 wird in Embryonen diabetischer Kaninchen über den mTORC1-Signalweg in Abhängigkeit von der BCAA-Verfügbarkeit reguliert _____</b>	<b>- 98 -</b>
5.5.1	Die Inaktivierung von FoxO1 hat Folgen für den Embryo _____	- 99 -
<b>5.6</b>	<b>Ausblick _____</b>	<b>- 100 -</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung _____</b>	<b>- 102 -</b>
<b>7</b>	<b>Summary _____</b>	<b>- 104 -</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis _____</b>	<b>- 106 -</b>
<b>9</b>	<b>Anhang _____</b>	<b>V</b>
9.1	Berechnung der Molekülzahl zur Herstellung eines Plasmidstandards _____	V
9.2	Berechnung von metabolischer Lebendmasse (LM) und Futtermittelverwertung (Fuve) _____	VI
9.3	Chromatogramm der Aminosäurenbestimmung im Plasma _____	VII
9.4	Abbildungsverzeichnis _____	VIII
9.5	Tabellenverzeichnis _____	X
9.6	Abkürzungsverzeichnis _____	XII
<b>10</b>	<b>Lebenslauf _____</b>	<b>XVI</b>
<b>11</b>	<b>Publikationsverzeichnis _____</b>	<b>XVIII</b>
<b>12</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung _____</b>	<b>XX</b>
<b>13</b>	<b>Erklärung über Vorstrafen _____</b>	<b>XXI</b>
<b>14</b>	<b>Danksagung _____</b>	<b>XXII</b>

## 1 Einleitung

Die Hypothese des fetalen Ursprungs von im Erwachsenenalter auftretenden Erkrankungen wurde erstmalig 1986 von dem britischen Wissenschaftler Prof. David J.P. Barker postuliert (Barker und Osmond 1986; Barker 1990; Barker 1994; Barker 2001; Hales und Barker 2001). Diese Hypothese beschreibt, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Geburtsgewicht und dem Risiko für bestimmte Erkrankungen im Erwachsenenalter gibt (Barker 2001; Ozanne und Hales 2002; Hales und Barker 2013). Dabei korreliert ein geringes Geburtsgewicht mit einem erhöhten Risiko, als Erwachsener an Krankheiten des Metabolischen Syndroms zu leiden. Mit dem Bekanntwerden der Barker-Hypothese wurde der Untersuchung von maternalen-fetalen Wechselwirkungen stärkere Beachtung geschenkt. Aus den Beobachtungen von Barker und anderen Wissenschaftlern heraus entwickelte sich die Theorie „der fetalen Programmierung von Erkrankungen im Erwachsenenalter“. Während das Phänomen bereits bei Tieren und Menschen wiederholt gezeigt werden konnte, sind die Mechanismen dieser fetalen Programmierung noch nicht geklärt. Die Weichenstellung für die fetale Programmierung kann an verschiedenen Zeitpunkten der Embryogenese erfolgen. David Barker ging in seiner Hypothese von der Prägung des fetalen Pankreas in der Organogenese aus (Barker 1998). Es kommt jedoch bereits viel früher, in der Präimplantationsphase, zur Prägung des Embryos (Kwong *et al.* 2000).

Die Präimplantationsphase stellt insoweit ein kritisches Zeitfenster dar, da der noch nicht im Uterus implantierte Embryo sowohl von der Nährstoffverfügbarkeit, aber auch von endokrinen und parakrinen Regulationsmechanismen des maternalen intrauterinen Milieus abhängig ist (Watkins *et al.* 2008, Watkins und Fleming 2009). Der sich entwickelnde Embryo ist gegenüber Änderungen im Nährstoffangebot sensitiv, kann sich aber kurzzeitig an metabolische Veränderungen anpassen. Diese Anpassungsreaktionen können durch bisher noch nicht geklärte molekulare Mechanismen gespeichert werden und dadurch zu einer nachhaltigen metabolischen Prägung embryonaler Zellen (metabolische Programmierung) führen. Es werden also durch die Stoffwechselsituation der Mutter nicht nur unmittelbar ablaufende Prozesse der Blastozystenmorphogenese beeinflusst, sondern auch die spätere Gesundheit der Nachkommen.

### 1.1 Diabetes mellitus

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO 1980) beschreibt einen Diabetes mellitus als einen Zustand der chronischen Hyperglykämie, der durch einen Insulinmangel oder dem Überschuss an Insulin-antagonisierenden Faktoren gekennzeichnet ist. Das so entstehende metabolische Ungleichgewicht führt zu Stoffwechselstörungen von Kohlenhydraten, Proteinen und Fetten. Weltweit sind derzeit 415 Millionen erwachsene Menschen an einem Diabetes mellitus erkrankt, d.h. einer von elf Erwachsenen (IDF Diabetes Atlas 7th Edition 2015). Diese Zahl an Erkrankten soll im Jahr 2040 bis auf 642 Millionen, also einer von zehn

Erwachsenen, steigen. In Deutschland leiden bereits 7 bis 8 % der Bevölkerung an einem Diabetes mellitus. Darunter sind ca. 90 % Erkrankte mit einem Typ 2 Diabetes mellitus (Insulinsensitivitätsverlust) und 5 % mit einem Typ 1 Diabetes mellitus (absoluter Insulinmangel) (Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2016). Der Typ 2 Diabetes mellitus tritt dabei meist erst im Alter ab 40 Jahren auf. Im Gegensatz dazu manifestiert sich der Typ 1 Diabetes mellitus vorrangig bei Jugendlichen und Erwachsenen unter 35 Jahren.

Durch die ansteigenden Zahlen an Erkrankten steigt auch die Anzahl der Schwangerschaften bei diabetischen Frauen. Mittlerweile sind 0,8 % der Schwangeren von einem Typ 1 oder Typ 2 Diabetes mellitus und ca. 5 % von einem Gestationsdiabetes betroffen. Der maternale Diabetes mellitus führt dabei zu Veränderungen des intrauterinen Milieus. Da das Nährstoffangebot der Mutter für die Entwicklung des Embryos immens wichtig ist, kommt es bei Schwangerschaften mit einem Diabetes mellitus zu einem erhöhten Risiko an Entwicklungsstörungen des Embryos und zu einer erhöhten Abortrate (Miodovnik *et al.* 1985). Weitere Komplikationen wie ein erhöhtes Risiko für Präeklampsie oder Eklampsie der Mutter und eine frühe Wachstumsverzögerung, Fehlbildungen und metabolische Anpassungsstörungen für den Fetus sind möglich (Garner *et al.* 1990; Rosenn *et al.* 1994; Schaefer *et al.* 1997). Die Nachkommen diabetischer Mütter sind häufig makrosom (*large for gestational age*, LGA; Übersichtsartikel: Walkinshaw 2001; Evers *et al.* 2004), können aber auch eine Wachstumsretardierung aufweisen (*small for gestational age*, SGA; Kwong *et al.* 2000). Für diese Kinder steigt das Risiko, in der ersten bzw. zweiten Lebensdekade adipös zu werden, einen erhöhten Blutdruck, eine gestörte Glukosetoleranz, einen manifestierten Diabetes mellitus oder ein metabolisches Syndrom zu entwickeln (Silverman *et al.* 1991, 1995, 1998; Cho *et al.* 2000; Boney *et al.* 2005; Clausen *et al.* 2008; Tam *et al.* 2008). Jedoch treten diese Langzeitfolgen für die Gesundheit der Kinder nicht nur allein durch die intrauterine Exposition mit erhöhten Glukosewerten auf. Neben der klassischen Hyperglykämie sind auch Wachstumshormone, der Lipidmetabolismus und das Aminosäureprofil bei diabetischen Patienten verändert (Felig 1970; Bloomgarden 2002; Teppala und Shankar 2010). Deshalb ist eine strenge Überwachung des Blutglukosespiegels und die Insulingabe unabdinglich, um die negativen Auswirkungen eines Diabetes mellitus auf die Schwangerschaft und den Fetus zu vermindern (Bernasko 2007).

Aus ethischen Gründen wurden tierexperimentelle Versuche etabliert und forciert, um die molekularbiologischen Mechanismen der Interaktion zwischen Mutter und Embryo in der frühen Schwangerschaft untersuchen zu können. Dafür gibt es verschiedene diabetische Tiermodelle und *in vitro* Kulturen von Embryonen, die den Einfluss von veränderten Nährstoffangeboten analysieren.

## 1.2 Experimentell induzierter Typ 1 Diabetes mellitus im Tiermodell

Die Induktion eines Typ 1 Diabetes mellitus kann in Versuchstieren spontan (*BioBreeding-Maus*, *Non-Obese-Diabetic-Maus*), über hochkalorisches Futter oder durch diabetogene Chemikalien (Streptozotocin, Alloxan) erfolgen. Die beiden zytotoxischen Chemikalien zerstören über unterschiedliche Mechanismen selektiv die insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas (Gorus *et al.* 1982; Lenzen und Munday 1991).

Alloxan, ein Pyrimidinderivat, kann aufgrund seiner zu Glukose ähnlichen sterischen Eigenschaft über den Glukosetransporter Typ 2 (GLUT 2) transportiert werden. Dieser ist u.a. in der Zellmembran pankreatischer  $\beta$ -Zellen lokalisiert. In der  $\beta$ -Zelle akkumuliert Alloxan im Zytoplasma (Munday *et al.* 1993; Malaisse *et al.* 2001). Die Zerstörung der insulinproduzierenden Zellen des Pankreas ist das Ergebnis der Alloxanwirkung, da reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS= *reactive oxygen species*) gebildet werden. Das Tripeptid Glutathion (GSH) reduziert Alloxan in der  $\beta$ -Zelle und induziert folgend die Dialursäurebildung. Diese kann spontan autooxidiert werden und induziert die Bildung von zytotoxischen ROS (Munday 1988; Winterbourn *et al.* 1989). Mit steigender ROS-Konzentration in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen unterliegen diese einem nekrotischen Zelltod (Jörns *et al.* 1997). Alloxan zerstört selektiv die  $\beta$ -Zellen des Pankreas, da diese im Vergleich zu anderen GLUT 2-tragenden Zellen (Hepatozyten, Enterozyten) mit weniger protektiven Enzymen (Katalasen) ausgestattet sind (Grankvist *et al.* 1979; Tiedge *et al.* 1997).

Die irreversible Zerstörung der  $\beta$ -Zellen führt zu einer Änderung des Blutglukosespiegels in Abhängigkeit zum Plasmainsulinspiegel (Tasaka *et al.* 1988; Lenzen 2008). Nach etwa 48 Stunden etabliert sich infolge des Insulinmangels eine permanente Hyperglykämie (Ramin *et al.* 2010). Um eine lebensbedrohliche Ketoazidose zu verhindern, müssen die Versuchstiere täglich kontrolliert und Insulin supplementiert werden.

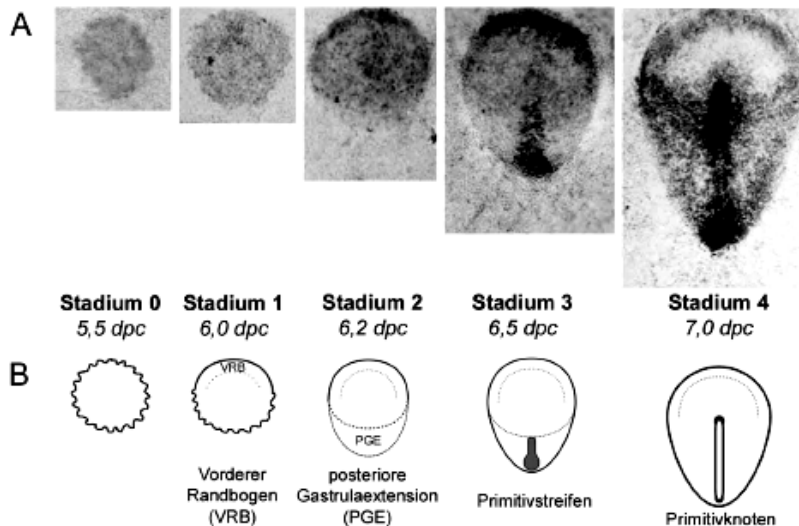
Als Schwangerschaftsmodell mit metabolischer Komplikation wurde das diabetische Kaninchen bereits vor einigen Jahren etabliert (Ramin *et al.* 2010; Thieme *et al.* 2012). Das Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) eignet sich wegen mehrerer reproduktionsbiologischer Vorzüge für solche Studien (Fischer *et al.* 2012). Kaninchen mit einem experimentell induzierten Typ 1 Diabetes mellitus sind subfertil und weisen weniger gut entwickelte Blastozysten auf (Ramin *et al.* 2010).

### 1.2.1 Präimplantationsentwicklung von *Oryctolagus cuniculus*

Das Kaninchen ist ein etabliertes Modell für die frühe Entwicklung von Säugetierembryonen (Fischer *et al.* 2012). Die Präimplantationsphase umfasst die embryonale Entwicklung von der Befruchtung bis zur Nidation der Blastozyste in das Uterusgewebe am Tag 6,5 bis 6,8 nach der Begattung (*post coitum*, *p.c.*). Weibliche Kaninchen unterliegen keinem Ovulationszyklus und ovulieren spontan (induzierte Ovulation).

Da der Verpaarungszeitpunkt überwacht und dokumentiert wird, kann das Embryonalalter bestimmt und die Präimplantationsentwicklung exakt datiert werden (Fischer *et al.* 2012). Nach der Verschmelzung der sekundären Oozyte mit einem Spermium im Eileiter (ca. 10-14 Stunden *p.c.*) bildet sich die Zygote, gefolgt von Furchungsteilungen (holoblastische (vollständige) Furchung). Im Verlauf der Zellteilungen wird lediglich die Zellzahl vermehrt. Im 8- bis 16-Zell-Stadium (36-44 Stunden *p.c.*) erfolgt die Aktivierung des embryonalen Genoms (Brunet-Simon *et al.* 2001) und am Tag 2,5 *p.c.* entsteht eine Morula ("Maulbeerkeim"). Die Morula beinhaltet 32 bis 64 annähernd gleichgroße Blastomeren (Zellen, die durch Furchung entstanden sind) und wird bis zum Tag 3,5 *p.c.* verdichtet (kompaktierte Morula). Während der Furchungsteilungen gelangt die Morula aus dem Eileiter in den Uterus. Es entsteht durch erste Differenzierungsprozesse die frühe Blastozyste mit Embryoblast- (EB) und Trophoblastzellen (TB). Im weiteren Verlauf der Embryogenese entwickelt sich aus dem Embryoblasten, eine Gruppe zentralliegender Zellen (auch *inner cell mass*= ICM genannt), der Embryo und aus dem Trophoblasten zusammen mit dem maternalen Endometrium die Plazenta.

Am 6. Tag *p.c.* beginnen im Embryoblasten die frühen Gastrulationsereignisse beim Kaninchen. Dabei wird die pluripotente Blastozyste mit den drei Keimblättern Mesoderm, Entoderm, Ektoderm in eine Keimanlage umgewandelt. Im Verlauf der Gastrulation wird eine Embryopolarisierung vorgenommen. Es werden vorläufige Achsenorgane gebildet, die der Körperachsenfestlegung dienen. Bis zur Nidation lassen sich 5 Stadien (Stadium 0, 1, 2, 3, 4) der sich differenzierenden Keimscheibe lichtmikroskopisch beurteilen und einteilen (Abb. 1) (Viebahn *et al.* 1995a/b). Im Stadium 0 ist die Keimscheibe (Embryoblast) nach außen hin locker abgegrenzt. Sie besteht aus homogenen und morphologisch gleichen Zellen. Im Stadium 1 zeigt sich erstmals eine axiale Determinierung. Die Zellen verdichten sich am anterioren Pol entlang der Embryoblast-Trophoblast-Grenze aufgrund hoher Zellproliferation. Diese Verdichtung wird morphologisch als Vorderer Randbogen (VRB) bezeichnet und ist das erste Differenzierungsmerkmal einer posterior-anterioren Orientierung. Im Stadium 2 bildet sich die posteriore Gastrulationsextension (PGE) aus. Diese erscheint lichtmikroskopisch heller, da im posterioren Bereich eine verringerte Zelldichte herrscht. Der VRB und die PGE bilden die Grenze zur anterior-posterioren Ausdehnung der Keimscheibe. Dies ist der Beginn der Körperachsenfestlegung. Das Stadium 3 ist durch eine elongierte Keimscheibe mit einem Primitivstreifen charakterisiert. Der Primitivstreifen bildet sich von posterior nach anterior aus. Die Blastozyste beginnt in diesem Stadium die Implantation. Die Vollendung des Primitivstreifens erfolgt im Stadium 4. Der Primitivknoten wird an dessen vorderem Pol gebildet (Hensen 1876).



**Abb. 1: Morphologische Einteilung der Keimscheibendifferenzierung des Kaninchens (aus Viebahn *et al.* 1995b).** (A) Dorsale Aufsicht Osmium-fixierter Keimscheiben der Stadien 0 bis 4; (B) Schematische Darstellung der Stadien 0 bis 4. Das Stadium 1 ist durch den Vorderen Randbogen (VRB), Stadium 2 durch die posteriore Gastrulationsextension (PGE), Stadium 3 durch den Primitivstreifen und Stadium 4 durch den Primitivknoten gekennzeichnet. Das durchschnittliche Entwicklungsalter ist unter den Stadien in Tagen nach der Begattung (*days post coitum, dpc*) angegeben.

Das Kaninchen hat einen höheren phylogenetischen Verwandtschaftsgrad zum Menschen als Maus, Ratte oder embryologische Modelle wie Rind und Schwein (Graur *et al.* 1996). Da die Kaninchenblastozyste am Tag 6 *p.c.* ca. 3 mm groß ist und relativ spät am Tag 6,5 bis 6,8 *p.c.* implantiert (Daniel 1964), ist ihre Gewinnung und Manipulation einfacher durchzuführen als bei der Maus. Die Gastrulation von Kaninchenblastozysten und humanen Embryonen ist vergleichbar und beide weisen eine plane Morphologie der Keimscheibe auf (Viebahn 1999). Weiterhin haben der Mensch und das Kaninchen Gemeinsamkeiten in der Plazentation (*hämochoriale Placenta discoidalis*) und der damit verbundenen Nährstoffversorgung des Embryos. Die Analysen von individuellen Blastozysten und die Separation in Embryoblast- und Trophoblastzellen wird durch die hohe Zellzahl von Kaninchenblastozysten ermöglicht.

### 1.3 Der Einfluss von Aminosäuren auf die Embryogenese

Aminosäuren haben eine Vielzahl von physiologischen Aufgaben während der Präimplantationsentwicklung. Sie können als Quelle für Energie dienen (Lane und Gardner 1998), für die Synthese von Proteinen und Nukleotiden (Alexiou und Leese 1992), als Schutz vor oxidativem Stress (Nasr-Esfahani *et al.* 1992) und für die Osmoregulation (Van Winkle und Campione 1996; Dumoulin *et al.* 1997) genutzt werden und den pH-Wert regulieren (Edwards *et al.* 1998). Als Vorläufer für die fetale Proteinsynthese werden Aminosäuren und Peptide aus dem Metabolismus des maternalen Gewebes aktiv zum Fetus transportiert. Eine Interaktion zwischen maternalem und fetalem Gewebe ist für eine erfolgreiche Implantation

und zeitgerechte Entwicklung des Feten erforderlich. Die Verfügbarkeit und Konzentration von Aminosäuren bestimmen die Proliferation und Differenzierung des Trophektoderms und die Implantation des Embryos (Martin *et al.* 2003; Martin und Sutherland 2001).

Eine Nahrungsrestriktion von Proteinen auf nur 9 % des Nahrungsanteils in schwangeren Ratten verändert spezifisch Aminosäurekonzentrationen im Plasma (Rees *et al.* 1999). Dabei steigt die Konzentration an Glutamat und die Konzentration an verzweigtkettigen, aliphatischen Aminosäuren (BCAA) sinken am Tag 10 der Schwangerschaft (Parimi *et al.* 2004). Diese Proteinrestriktion führt zu einer intrauterinen Wachstumsrestriktion (IUGR) und resultiert in geringeren Plazentagewichten und fetalen Lebergewichten. Eine Supplementation von BCAA kehrt den Einfluss dieser intrauterinen Wachstumsrestriktion jedoch um (Zheng *et al.* 2009; Teodoro *et al.* 2012). Eine Proteindefizienz während der frühen Schwangerschaft minimiert das plazentale und fetale Wachstum (Pond 1973). Dabei ist das fetale Wachstum während der Implantations- und Plazentationsphase besonders sensitiv gegenüber einer maternalen Proteinrestriktion.

Insbesondere die BCAA sind für das fetale Wachstum von großer Bedeutung, da sie bevorzugt zum Fetus transportiert werden (Jozwik *et al.* 2001) und die Plazenta schnell überqueren können (Chung *et al.* 1998). Schon 1966 wurde beschrieben, dass das Fehlen von L-Leucin und L-Arginin im Kulturmedium das Trophoblastenwachstum inhibiert (Gwatkin 1966). Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass in kultivierten Zellsystemen über L-Leucin die intrazelluläre Signalkaskade von *mammalian target of rapamycin* (mTOR) aktiviert wird, die die Proteintranslation und Zellzyklusprogression reguliert (Brooks 1977; Brunn *et al.* 1997; Lawrence & Abraham 1997). Diese Studien implizieren eine essentielle Rolle der BCAA für die Embryonalentwicklung. Besonders hervorzuheben ist die Tatsache, dass eine Erhöhung der BCAA-Konzentrationen im Serum von Kindern und Jugendlichen als ein Prädiktor für Insulinresistenz identifiziert wurde (McCormack *et al.* 2013).

### **1.4 Die verzweigtkettigen, aliphatischen Aminosäuren**

Die verzweigtkettigen, aliphatischen Aminosäuren (*branched-chain amino acids*, BCAA) L-Leucin, L-Isoleucin und L-Valin sind essentielle Aminosäuren und müssen dem Körper über die Nahrung zugeführt werden. Die meisten Nahrungsproteine beinhalten ca. 20 % an BCAA. Die BCAA besitzen apolare und hydrophobische Kohlenwasserstoffseitenketten. Sie ähneln sich in ihrer Struktur, unterscheiden sich jedoch in der Größe und Hydrophobizität ihrer Seitenketten. BCAA besitzen wichtige Aufgaben in Proteinen, z.B. die Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur wasserlöslicher Proteine und die Unterstützung von Faltungsprozessen (Dill 1990; Brosnan und Brosnan 2006).

## **1.4.1 Die Funktion von BCAA**

Die BCAA sind die am stärksten hydrophobisch wirkenden Aminosäuren (Creighton 1997). Deshalb sind ihnen wichtige strukturelle Rollen in globulären Proteinen und Membranproteinen zugewiesen. In den Muskelproteinen Aktin, Myosin und Troponin sind sie essentielle Bestandteile (Reglin 2003). Weiterhin regulieren die BCAA effizient die Proteinsynthese (Louard *et al.* 1990), inhibieren die Proteindegradation (Mordier *et al.* 2000) und stimulieren die Insulinausschüttung aus den pankreatischen  $\beta$ -Zellen (Lynch *et al.* 2002). L-Leucin kann den anabolen Effekt auf den Proteinmetabolismus im Skelettmuskel regulieren (Fulks *et al.* 1975; Li und Jefferson 1978; Buse und Reid 1975). Die Aktivierung der Proteinbiosynthese erfolgt dabei über das Signalmolekül mTOR. L-Leucin ist einer der potentesten Aktivatoren von mTOR (Hara *et al.* 1998). Weiterhin stellen die BCAA die Vorläufer für Glutamin und Alanin dar (Darmaun und Dechelotte 1991). Im Skelettmuskel, Fett, Herz und in der Plazenta wird aus BCAA und  $\alpha$ -Ketoglutarat das zirkulierende Glutamin synthetisiert (Curthoys und Watford 1995; Self *et al.* 2004). Glutamin ist ein exzitatorischer Neurotransmitter im zentralen Nervensystem und wird von den BCAA auf einem annähernd konstanten Niveau gehalten (Yudkoff 1997; Hutson *et al.* 2001). Neurologische Dysfunktionen können aus einem Übermaß an BCAA resultieren, wie zum Beispiel bei der Ahornsirupkrankheit (*Maple syrup urine disease*, MSUD) (Chuang *et al.* 1995). MSUD ist eine autosomal rezessive Stoffwechselstörung, bei der eine Defizienz des verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-(BCKDH)-Komplexes vorliegt. Mutationen im E1  $\alpha$ -Gen führen zum Funktionsverlust des Komplexes, mit der Folge, dass die BCAA nicht vollständig abgebaut werden können und akkumulieren (Harris *et al.* 1990; Chuang *et al.* 1995). Die positiven Effekte der BCAA sind selbstlimitierend, da sie ihren eigenen Abbau fördern; ein Übermaß an BCAA kann toxisch wirken.

## **1.4.2 Der Metabolismus von BCAA**

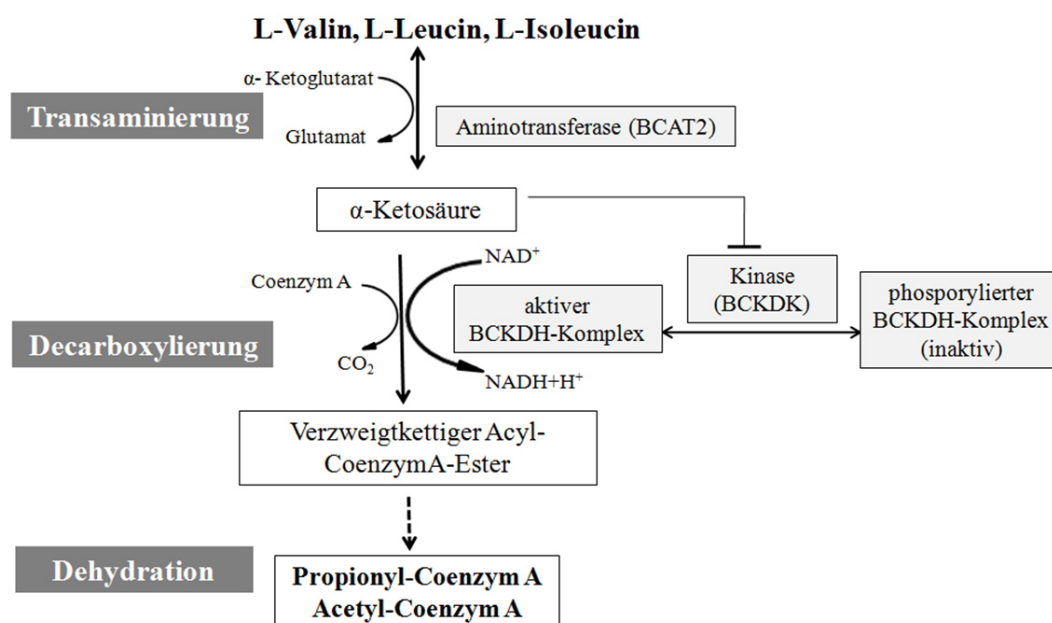
Die BCAA passieren nach einer proteinreichen Mahlzeit das hepatische Gewebe und gelangen in die systemische Zirkulation. Mehr als 60 % von ihnen werden im Skelettmuskel metabolisiert (Gelfand *et al.* 1986). Der Skelettmuskel und das Fettgewebe haben die höchste Kapazität für den Abbau der BCAA (Brosnan und Brosnan 2006). Der extrahepatische Abbau beinhaltet drei Schritte: die Transaminierung, die oxidative Decarboxylierung und die Dehydration (Abb. 2). Die verzweigt-kettige L-Aminosäuren-Aminotransferase (BCAT) transaminiert die BCAA zu der korrespondierenden verzweigt-kettigen  $\alpha$ -Ketosäure (BCKAs) (Harper *et al.* 1984; Harris *et al.* 2005). Bei diesem reversiblen Prozess wird Glutamat gebildet.

Kommt es durch die erhöhte Oxidation der BCAA zu einer vermehrten Bildung der  $\alpha$ -Ketosäure, so können diese durch das Einschleusen in den Zitratzyklus zur Energiegewinnung beitragen (Wagenmakers und Soeters 1995). Der nachfolgende



irreversible Decarboxylierungsschritt wird durch den verzweigtkettigen 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex (BCKDHK) katalysiert. Die Decarboxylierung der Carboxylgruppe der BCKAs führt zur Generierung der korrespondierenden verzweigtkettigen Acyl-CoA-Ester. Diese werden in Analogie zur  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren weiter abgebaut und letztlich über Acetyl-CoA und Propionyl-CoA in den Zitratzyklus eingeschleust.

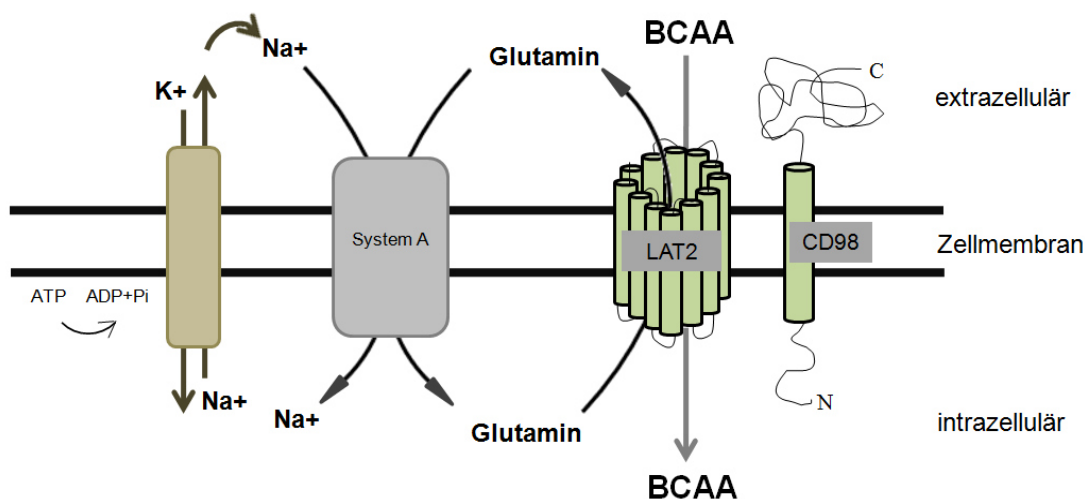
Die mitochondriale, verzweigtkettige L-Aminosäuren-Aminotransferase (*Branched-chain aminotransferase*, BCATm oder BCAT2), die für die Initiation des BCAA-Abbaus nötig ist, ist ubiquitär vorhanden. Im Gegensatz dazu ist die Genexpression des zytosolischen Isoenzym (BCATc) auf Gehirn, Ovar und Plazenta beschränkt (Kadowaki und Knox 1982). Der verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex (BCKDHK) ist ein Multienzymkomplex bestehend aus drei katalytischen Komponenten: einer verzweigtkettigen 2-Oxosäuren-Dehydrogenase (BCKDH; E1, ein Heterotetramer  $\alpha_2\beta_2$ ), einer Dihydrolipoyl-Transacylase (DBT; E2) und einer Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (DLD; E3). Die E1-Untereinheit katalysiert den Decarboxylierungsschritt der  $\alpha$ -Ketosäuren und die nachfolgende Reduktion des kovalent an die E2-Untereinheit gebundenen Lipoylanteils (Abb. 2). Von dem reduzierten Lipoyl-Anteil wird die Acylgruppe durch die E1-Untereinheit auf Koenzym A übertragen. Die Komplexaktivierung wird durch die Phosphorylierung zweier Serin-Reste der E1- $\alpha$ -Untereinheit (BCKDHA) mittels der mitochondrialen Proteinkinase (verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenasekinase= BCKDK) reguliert. Der Abbau der BCAA kann über BCKDK reguliert werden, indem sie den BCKDH-Komplex durch ATP-abhängige Phosphorylierung inhibieren kann. Die Kinase selbst wird allosterisch über alpha-Ketoisocaproat ( $\alpha$ -KIC) inhibiert.



**Abb. 2: Abbauweg der verzweigtkettigen, aliphatischen Aminosäuren.** BCAT2= verzweigtkettige L-Aminosäuren-Aminotransferase; BCKDK= verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Kinase; BCKDH-Komplex= verzweigtkettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex

**1.4.3 Die Transportsysteme der BCAAs: System L**

Aminosäuretransporter sind Membranproteine, die hauptsächlich zur Familie der löslichen Membranproteine (SLC= *solute carrier family*) gehören. Es sind 48 Untergruppen bekannt. Die SLC7-Familie beinhaltet die Glykoprotein-assoziierten Aminosäuretransporter (SLC7A5-11), zu denen auch das heterodimere Transportsystem L gehört. Das natriumunabhängige System L ist in der Lage, verzweigt-kettige, neutrale Aminosäuren zu transportieren (Christensen 1990). Es wurde in den meisten Säugetierzellen nachgewiesen und speziell in der Mikrovillusmembran (Johnson und Smith 1988) und Basalmembran des Synzytiotrophoblasten (Kudo und Boud 1990). Das System L bildet ein Heterodimer, das aus einer katalytischen Untereinheit und dem Glykoprotein 4F2hc/CD98 aufgebaut ist. Es gibt zwei Isoformen der katalytischen Untereinheit, LAT-1 (Gen: SLC7A5= *Solute Carrier Family 7 Member 5*; Kanai *et al.* 1998) und LAT-2 (Gen: SLC7A8= *Solute Carrier Family 7 Member 8*; Pineda *et al.* 1999; Segawa *et al.* 1999). LAT-2 ist ein nichtglykosyliertes Membranprotein (Abb. 3) mit hoher Affinität ( $K_m=30-50\mu M$ ) zu L-Isoleucin, L-Leucin und L-Valin (Segawa *et al.* 1999). Die SLC7A8-Genexpression wurde in der Niere, Plazenta, Gehirn, Leber, Skelettmuskel, Ovar und Darm nachgewiesen (Pineda 1999; Bassi *et al.* 1999). Für eine funktionelle Genexpression von LAT-2 ist die Assoziation mit dem Glykoprotein 4F2hc/CD98 unerlässlich (Abb. 3), da die Koexpression beider Faktoren zu einer hohen Leucinaufnahme führt (Pineda *et al.* 1999; Segawa *et al.* 1999). 2002 wurde bereits bewiesen, dass L-Leucin durch das LAT-2-System transportiert wird (Meier *et al.* 2002). Weiterhin ist die Aktivität des L-Systems in der humane Plazenta über mTOR reguliert (Roos *et al.* 2007).



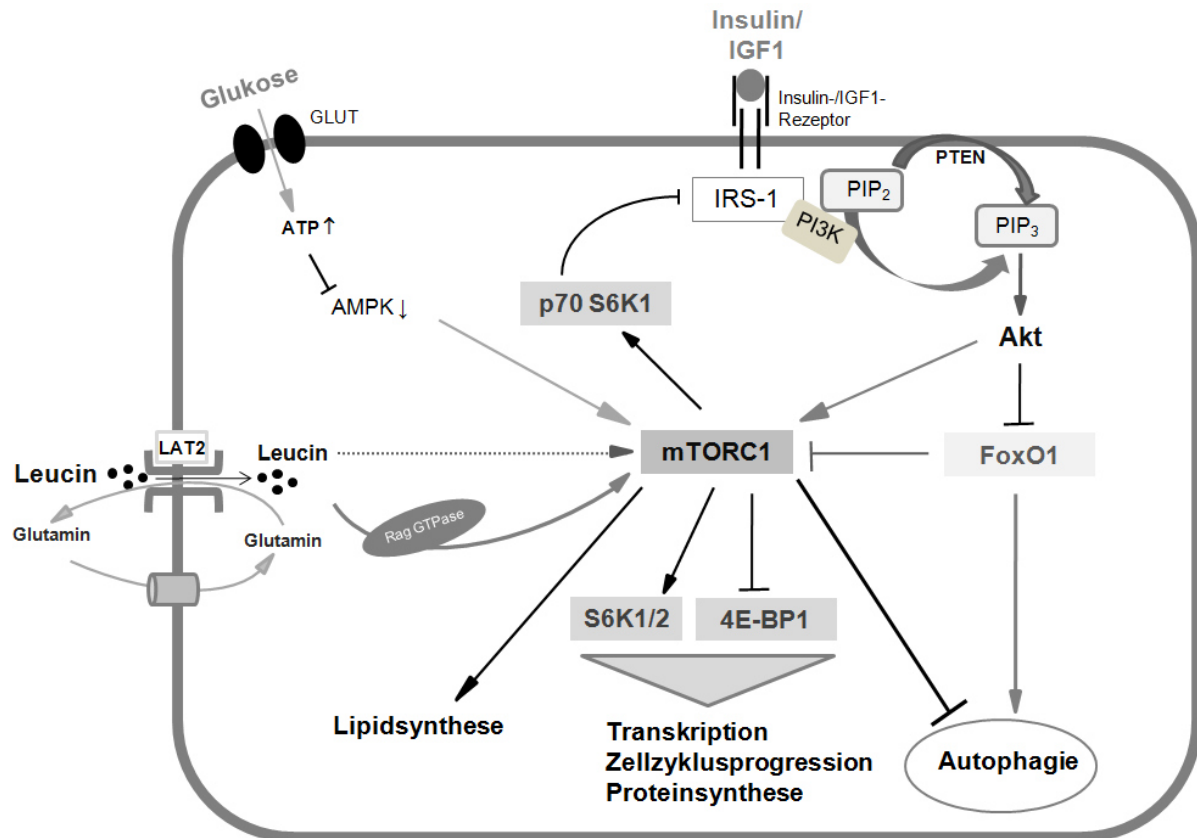
**Abb. 3: Schema des BCAA-Transports über LAT2.** Die BCAA werden über das System L (LAT2 kolokalisiert mit CD98) in die Zelle transportiert. Um diesen aktiven Transport über den Austauscher LAT2 durchführen zu können, wird Glutamin aus der Zelle transportiert. Glutamin wird wiederum für diesen Austausch in die Zelle über den natriumabhängigen System A-Transporter zurück transportiert. Das hierfür nötige Natrium wird über eine Natrium-Kalium-Pumpe bereitgestellt.

## 1.5 Der mTOR-Signalweg

Die Serin-/Threonin-Kinase *target of rapamycin* (TOR) (290 kDa) gehört zur Superfamilie der Phosphatidylinositol-3-kinase-ähnliche Kinase (PIKK). TOR wurde zuerst in *Saccharomyces cerevisiae*-Mutanten identifiziert, ist evolutionär konserviert und reguliert das Zellwachstum und die Zellproliferation (Shamji *et al.* 2003). Diese Regulation wird durch die Fähigkeit von TOR, auf Signale von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren zu reagieren, vermittelt. Am Carboxy-Terminus findet sich eine Kinasedomäne (Keith und Schreiber 1995). An die FKBP-*rapamycin-binding*-Domäne des Amino-Terminus kann der inhibitorische Komplex aus dem makrozyklischem Lacton Rapamycin (Immunsuppressivum aus *Streptomyces hygroscopicus*) und FKBP12 binden, um die mTOR-Aktivität zu unterdrücken. mTOR kann in zwei Komplexen vorliegen, mTORC1 und mTORC2 (Wullschleger *et al.* 2006). Der Komplex mTORC2 besteht aus mTOR, dem G-Protein-beta-Untereinheit-ähnliches Protein (mLST8) und dem Rapamycin-insensitiven Begleiter von mTOR (riCTOR). mTORC1 ist von größerer Bedeutung, da dieser für die Regulation des zellulären Metabolismus und des Wachstums verantwortlich ist. Sein Aufbau unterscheidet sich von mTORC2 lediglich in dem Begleitmolekül, dem regulatorisch-assoziierten Protein von TOR (raptor). mTORC1 ist im Gegensatz zu mTORC2 Rapamycin-sensitiv.

## 1.6 Die Aktivierung von mTORC1

Die Funktion der Nährstoffsensitivität von TOR ist evolutionär konserviert (Übersichtsartikel: Rohde *et al.* 2001). Dabei nimmt mTORC1 eine zentrale Position in den Nährstoffsignalwegen der Zelle ein und kann durch verschiedene Signalmoleküle über Phosphorylierung aktiviert werden (Abb. 4). In Anwesenheit von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren ist mTORC1 konstitutiv aktiviert. Aber auch Veränderungen des zellulären Energiestatus und von Aminosäuren sind in der Lage, mTORC1 zu aktivieren (Übersichtsartikel: Yang *et al.* 2008). Als Kinase aktiviert bzw. inhibiert mTORC1 wichtige intrazelluläre Prozesse (Abb. 4).



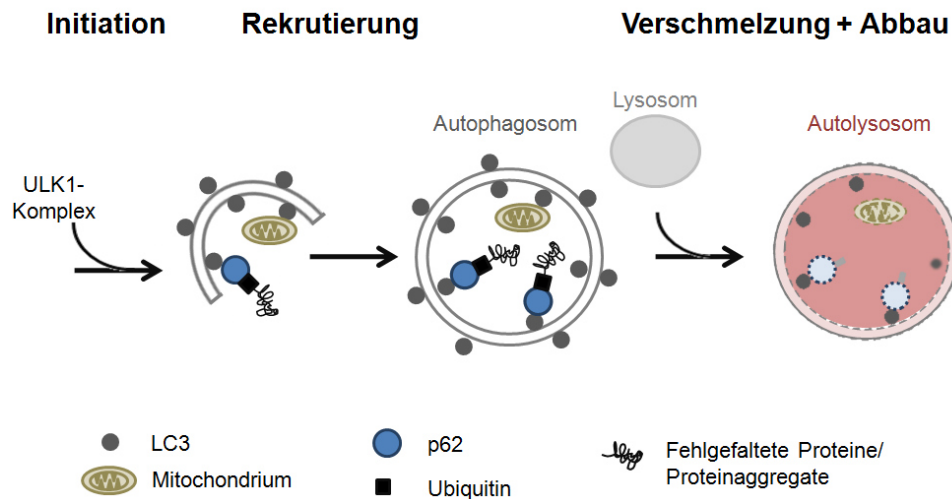
**Abb. 4: Schema der Aktivierung des mTORC1-Signalweges.** Insulin/ *Insulin-like growth factor 1* (IGF-1), Glukose und Leucin aktivieren mTORC1 synergistisch. Insulin und IGF1 aktivieren die Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K). Diese Aktivierung wird intrazellulär über das Insulinrezeptorsubstrat 1 (IRS-1) vermittelt. PI3K katalysiert die Umwandlung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) über die Phosphatase PTEN (Phosphatase- und Tensinhomolog). Über mehrere Phosphorylierungsereignisse wird dann die Proteinkinase B (Akt) aktiviert. Akt wiederum führt zur Aktivierung von mTORC1 und zur Inhibition des Forkhead-Box-Protein O 1 (FoxO1). Akt reguliert über diese Signalmoleküle die Balance zwischen Proteinsynthese und -degradation in der Zelle. Unter Stressbedingungen kann FoxO1 die anabole Wirkung von mTORC1 inhibieren. Eine hohe Glukoseaufnahme über den Glukosetransporter (GLUT) hat über die Hemmung der AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) ebenfalls einen positiven Einfluss auf mTORC1. Die Aktivierung von mTORC1 kann aber auch über Leucin (direkt oder indirekt über Rag GTPase) erfolgen. Aktives mTORC1 kann die Lipidsynthese über verschiedene Transkriptionsfaktoren fördern. Es phosphoryliert ebenfalls die ribosomalen Proteinkinasen 1 und 2 (S6K1/2) und das Elongationsfaktorbindeprotein 1 (4EBP1). Daraus resultiert eine Aktivierung der S6K1, dessen Untereinheit p70 S6K1 eine negative Rückkopplung auf IRS-1 überträgt. Phosphoryliertes 4E-BP1 ist inaktiv. Es erfolgt dadurch die Förderung der Transkription verschiedener Gene, der Zellzyklusprogression und der Proteinsynthese.

### 1.6.1 mTORC1-regulierte zelluläre Prozesse

mTORC1 reguliert die für das Zellwachstum nötige Lipidsynthese (Abb. 4), da mTORC1 in der Lage ist die Transkriptionsfaktoren *Sterol regulatory element-binding transcription factor 1* (SREBP1) und *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR $\gamma$ ) zu aktivieren (Porstmann *et al.* 2008; Kim und Chen 2004). Diese Transkriptionsfaktoren kontrollieren die Expressionen von Genen, deren Proteinfunktionen in der Lipid- und Cholesterolumhomöostase liegen.

An die Aktivierung von mTORC1 schließen sich zunächst Phosphorylierungen weiterer Kinasen und nachfolgend die Induktion der Transkriptionsinitiation von Zielgenen, wie z.B. der Ornithindecaboxylase (*ODC1*), die die Geschwindigkeit der Polyaminsynthese bestimmt, und von Cyclin D1 (*CCND1*) an. Cyclin D1 agiert als Schlüsselsensor und Integrator extrazellulärer Signale in der frühen bis mittleren G1-Phase des Zellzyklus. In Säugetieren ist die mTORC1-abhängige Phosphorylierung der S6K1 und 4E-BP1 über Konzentrationsänderungen der Aminosäuren und von Glukose induzierbar (Hara *et al.* 1998; Inoki *et al.* 2003). Die ribosomale Serin/Threonin-Kinase S6K hat einen regulatorischen Carboxyterminus (Banerjee *et al.* 1990) und kommt in Säugerzellen in zwei Isoenzymen (S6K1 und S6K2) vor, die durch zwei verschiedene Gene kodiert werden (Shima *et al.* 1998). Ihre Phosphorylierungsdomänen sind konserviert. Die Isoformen der S6K1 sind zytosolisch (p70-S6K1) und nukleär (p85-S6K1) lokalisiert (Martin *et al.* 2001). Ihre Funktion liegt in der Kontrolle des Zellwachstums (Montagne *et al.* 1999; Radimerski *et al.* 2002). Die aktivierte S6K1 fördert die Translation von 5'TOP (*terminal oligopyrimidine tract*) mRNAs. Diese mRNAs beinhalten kurze Polypyrimidinstücke (4-14 Nukleotide) mit einem angrenzendem 5'CAP (Meyuhas und Hornstein 2000) und kodieren speziell für Komponenten der Translationsmaschinerie wie ribosomale Proteine und Elongationsfaktoren. Zeitgleich führt eine mTORC1-abhängige Phosphorylierung von 4E-BP1, einem Repressor des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 4E (eIF4E), zu dessen Inaktivierung. eIF4E kann dann die CAP-abhängige Translation initiieren (Übersichtsartikel: Richter und Sonenberg 2005).

Weiterhin reguliert mTORC1 den zellulären „Selbstverdauungsprozess“, die Autophagie (Abb. 4). Dieser Prozess ist für das Recycling falsch gefalteter Proteine oder defekter Organellen nötig (Hara *et al.* 2008; He *et al.* 2009; Stipanuk 2009; Wang *et al.* 2010). Autophagosomen umschließen mit einer Doppelmembran Organellen, Ribosomen und polyubiquitinierte Proteinaggregate (Übersichtsartikel: Aburto *et al.* 2012). Für die Bildung dieser Proteinaggregate ist eine Interaktion von *Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3* (LC3) und Nucleoporin p62 (p62) von großer Bedeutung (Tanida *et al.* 2008; Bjørkøy *et al.* 2009). Die Autophagosomen fusionieren mit Lysosomen, um ihren Inhalt mithilfe von aziden Hydrolasen abbauen zu können (Abb. 5). Die dabei entstehenden Makromoleküle können durch Permeasen recycelt werden. Ein Aminosäuremangel führt zur Aktivierung der Autophagie mit gleichzeitiger Inhibierung von mTORC1 über den PI3K-Signalweg. Andererseits können Insulin bzw. Wachstumsfaktoren und/oder ein erhöhtes Nährstoffangebot mTORC1 aktivieren, was eine Inhibierung der Autophagie zur Folge hat (Übersichtsartikel: Jung *et al.* 2010; Kim und Guan 2015). Der Schlüsselregulator der Autophagieinitiation, die Proteinkinase *Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1* (ULK1), wird dabei phosphoryliert und blockiert (Hosokawa *et al.* 2009; Nazio *et al.* 2013).



**Abb. 5: Schematischer Ablauf der Autophagie.** ULK1= *Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1*; LC3= *Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*; p62= Nucleoporin p62

Eine regulierende Rolle in der Balance zwischen Proteindegradation und -synthese wird dem Forkhead-Box-Protein O 1 (FoxO1) zugesprochen. Die Wechselwirkung von FoxO1 und mTORC1 wurde bereits in *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila* gezeigt und bewiesen, dass das jeweilige FoxO1-Ortholog eine inhibierende Funktion auf TORC1 ausübt (Jia *et al.* 2004; Puig *et al.* 2003). FoxO1 kann mTORC1 über eine erhöhte Sestrin-Expression in Säugerzellen blockieren (Chen *et al.* 2010) und reguliert dabei die Homöostase von Akt und mTORC1, von Proteinsynthese und Autophagie. Als Transkriptionsfaktor ist FoxO1 in weitere zelluläre Prozesse, wie Apoptose, Glukosemetabolismus und Stress-Resistenz involviert (Calnan und Brunet 2008; Kousteni 2011). Die Deaktivierung von FoxO1 über Phosphorylierung durch aktiviertes Akt ist die am Besten erforschte Regulation von FoxO1 (Calnan und Brunet 2008). Wird FoxO1 als Antwort auf Wachstumssignale phosphoryliert, so wird es aus dem Zellkern transportiert, im Zytoplasma ubiquitiniert und durch das Proteasom abgebaut (Calnan und Brunet 2008). Stress hingegen wirkt als Importsignal für FoxO1 in den Zellkern (Vogt *et al.* 2005). In der Embryogenese führt ein Fehlen von FoxO1 nicht nur zu einer Wachstumsverzögerung am Tag 9,5 in der Maus, sondern auch zur Letalität der Embryonen am Tag 10,5 (Hosaka *et al.* 2004).

### 1.6.2 Bedeutung von mTORC1 bei der Entwicklung von Krankheiten

Eine Fehlregulation von mTORC1 ist mit einer Vielzahl von Erkrankungen assoziiert (Tab. 1). Da der mTORC1-Signalweg das Wachstum der pankreatischen  $\beta$ -Zelle, die Insulinsynthese und -sekretion reguliert (McDaniel *et al.* 2002; Kwon *et al.* 2004; Yang *et al.* 2010; Blandino-Rosano *et al.* 2012; Bartolome *et al.* 2014), rückt die Rolle von mTORC1 bei Typ 2 Diabetes mellitus und Adipositas in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses (Übersichtsartikel: Dann *et al.* 2007; Proud *et al.* 2011; Zoncu *et al.* 2011; Dazert und Hall 2011; Cornu *et al.* 2013). Das Fehlen von S6K1 wirkt protektiv gegen eine diätinduzierte Adipositas, da die Insulinsensitivität gesteigert wird (Um *et al.* 2004). Die S6K1-vermittelte

Phosphorylierung des Insulin-Rezeptor-Substrats führt zu der Blockierung der Insulin/IGF1-Signalkaskade, was mit der Induktion einer Insulinresistenz assoziiert ist (Zick 2005; Carlson *et al.* 2004; Newgard *et al.* 2009).

**Tab. 1: Die Fehlregulation des mTORC1-Signalweges in Geweben/Organen ist mit Erkrankungen assoziiert.**

Regulation	Erkrankung	Referenz
Überaktivierung von mTORC1 und S6K1 in Leber und Skelettmuskel	Adipositas bei Ratten	Khamzina <i>et al.</i> 2005
Erhöhte Phosphorylierung der S6K1 in Herzzellen	Diabetes bei Ratten	Sharma <i>et al.</i> 2007
Überaktivierung von mTORC1 in früher bzw. später Corticogenese	Mikrozephalie bzw. tuberöse Sklerose bei Mäusen	Kassai <i>et al.</i> 2014
Überaktivierung von mTORC1 und S6K1 in T-Zellen	Systemischer Lupus erythematodes	Fernandez und Perl 2009
Reduzierte mTORC1-Aktivität in Herzzellen	diabetische Patienten	Nandi <i>et al.</i> 2015
Reduzierte mTORC1-Aktivität in atherosklerotische Plaque der Aorta	Diabetes bei Mäusen	Zhang <i>et al.</i> 2014
Überaktivierung von mTORC1 und S6K1 in Krebszellen	Brust- und Prostatakrebs, maligne Lymphome und Melanome	Guertin und Sabatini 2005; Kremer <i>et al.</i> 2006; Rojo <i>et al.</i> 2007; Übersichtsartikel: Populo <i>et al.</i> 2012

### 1.6.3 Bedeutung von mTORC1 während der Embryogenese

Der Nährstoffsensoren mTORC1 besitzt große Bedeutung für die frühe Embryonalentwicklung und Implantation. Exogene Aminosäuren schalten den mTORC1-Signalweg an und führen zur Translation von Proteinen, die für die Trophoblastendifferenzierung und die Implantationsinitiation notwendig sind (Martin und Sutherland 2001). In der Maus hat ein Defekt des mTOR-Gens die Letalität des Embryos am Tag 5,5 der Schwangerschaft zur Folge (Gangloff *et al.* 2004). Eine maternale Proteinrestriktion während der Präimplantationsphase beeinflusst die Aminosäurezusammensetzung im Plasma und im Embryo (Eckert *et al.* 2012). Dabei stehen erniedrigte Konzentrationen von BCAA in Korrelation mit einer reduzierten mTORC1-Aktivität. Während der Schwangerschaftskomplikation IUGR konnte ebenfalls eine verringerte Aktivität des mTORC1-Signalweges in der humanen Plazenta festgestellt werden (Roos *et al.* 2007). Dieser Befund ist eng mit den bereits beschriebenen Veränderungen der plazentären Leucinverfügbarkeit assoziiert (Parimi *et al.* 2004). Weiterhin sind mTORC1-regulierende Signalgeber wie Insulin und IGF-1, aber auch die Mengen an Glukose und Aminosäuren in der Plazenta einer IUGR verändert. Der trophoblastäre mTORC1-Signalweg beeinflusst indirekt das fetale Wachstum und den Metabolismus über die Regulation der Aminosäuretransporteraktivität des Trophoblasten (Roos *et al.* 2007; Roos *et al.* 2009). Zusammengefasst gibt es zahlreiche Hinweise, die darauf hindeuten, dass mTORC1 ein bedeutendes Bindeglied zwischen der maternalen Nährstoffverfügbarkeit und dem fetalen Wachstum darstellt, wobei die langfristige Gesundheit des Feten beeinflusst werden kann (Übersichtsartikel: Jansson *et al.* 2012).

## 1.7 Zielstellung

Die Wechselwirkungen zwischen Mutter und Embryo in der frühen Schwangerschaft stehen im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses, da veränderte Stoffwechselsituationen der Mutter auf das intrauterine Milieu übertragen werden und somit direkt die Entwicklungsbedingungen des Embryos beeinflussen. Der embryonale Metabolismus kann sich an Schwankungen in der Nährstoffverfügbarkeit adaptieren.

Im diabetischen Versuchstiermodell des Kaninchens (Ramin *et al.* 2010) sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Ist die Aminosäurezusammensetzung im maternalen Blutplasma und Uterussekret durch einen Typ 1 Diabetes mellitus verändert?
- Wie wirkt sich die diabetische Stoffwechselsituation der Mutter auf den Aminosäurehaushalt des Embryos aus?

Für die experimentellen Untersuchungen wurden die maternale und embryonale Aminosäurezusammensetzung am 6. Tag der Schwangerschaft von gesunden und diabetischen Kaninchen verglichen.

Aufgrund der pathologischen BCAA-Konzentrationen stellten sich folgende Fragen, die experimentell bearbeitet wurden.

- Führt ein gestörter BCAA-Abbau in maternalen Geweben zu der Akkumulation der BCAA im Plasma?
- Welchen Einfluss hat ein maternaler Typ 1 Diabetes mellitus auf den embryonalen BCAA-Metabolismus?

Zur Klärung dieser Fragen wurden die Expressionen der BCAA-Abbauenzyme und -Transportsysteme in maternalem Gewebe und in Blastozysten gesunder und diabetischer Kaninchen analysiert.

Als zentraler Punkt der Nährstoffsensitivität wurde der mTORC1-Signalweg in Hinblick auf folgende Fragestellungen untersucht:

- Wird die Aktivierung von mTORC1 und seinen Zielproteinen von exogenen Nährstoffveränderungen in Embryonen des Kaninchens reguliert?
- Welchen Veränderungen unterliegt der embryonale mTORC1-Signalweg während eines maternalen Typ 1 Diabetes mellitus und sind mTORC1-abhängige zelluläre Prozesse betroffen?

Ein weiteres Ziel war es, die Wechselwirkung von mTORC1 und dem Transkriptionsfaktor FoxO1 zu untersuchen. Dabei stellten sich folgende Fragestellungen:

- Wird die Aktivität von FoxO1 über exogene Nährstoffveränderungen in Embryonen des Kaninchens reguliert?



- Kann die FoxO1-Aktivität durch mTORC1 blockiert werden?
- Welchen Einfluss hat ein maternaler Typ 1 Diabetes mellitus auf FoxO1 und seine Zielgene?

Hierfür wurden 6 Tage alte Blastozysten gesunder Kaninchen *in vitro* mit Glukose und L-Leucin stimuliert. Weiterhin wurden umfassende Analysen der mTORC1-FoxO1-Signalkaskade in Blastozysten gesunder und diabetischer Kaninchen durchgeführt.

Welche Rolle die BCAA bei der Regulation molekularbiologischen Mechanismen spielt wurde unter folgenden Fragestellungen untersucht:

- Sind die BCAA für die Regulation des mTORC1-FoxO1-Signalwegs *in vivo* verantwortlich?
- Welchen Einfluss hat ein Fehlen der BCAA für die embryonale mTORC1-FoxO1-Signalkaskade und deren Zielgene bzw. -prozesse?

6 Tage alte Blastozysten wurden *in vitro* mit den embryonalen *in vivo* BCAA-Konzentrationen oder ohne BCAA im Kulturmedium kultiviert.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien, Enzyme, vorgefertigte Systeme, Oligonukleotide und Antikörper

#### 2.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Agar-Agar	Carl-Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Oldendorf
Alloxan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
$\alpha$ -D-Glukose	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ampicillin	Carl-Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
$\beta$ -Mercaptoethanol	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
BSM II (nach Maurer 1978)	Biochrom AG (Millipore), Berlin
Bovines Serum Albumin (BSA)	Fluka, Buchs
Bradford-Reagenz	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bromphenolblau	Fluka, Buchs
Chloroform	Carl-Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Chloralhydrat	Fuka Chemie AG, Steinheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT)	Carl-Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
DNA-Leiter 100 Bp <i>Gene Ruler</i>	Thermo Fisher Scientific
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Thermo Fisher Scientific
Domitor <sup>®</sup> SPC	Janssen Animal Health, Neuss
$\epsilon$ -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 Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Hefeextrakt	Carl-Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe

Hoechst 33342, trihydrochlorid	Invitrogen, Karlsruhe
Humanes Choriongonadotropin (hCG)	Intervet, Unterschleißheim
Huminsulin® Basal (NPH) 100 I.E./ml	Lilly Deutschland GmbH, Gießen
Immobilon™ Western Detection Reagents	Millipore, Schwalbach
<i>Insulin solution from bovine pancreas</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Carl-Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Lithiumchlorid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
L-Leucin	Applichem GmbH, Darmstadt
L-Glutamin (200mM)	PAA GmbH, Cölbe
L-Isoleucin	Applichem GmbH, Darmstadt
L-Valin	Applichem GmbH, Darmstadt
Ly-294,002 hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kalialaun	Merck, Darmstadt
Kalium-Aluminium-Sulfat	Merck-Darmstadt
Ketanest®	Pfizer, Karlsruhe
Kochsalzlösung (isotonisch)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Magermilchpulver	TSI GmbH & Co. KG, Zeven
Magnesiumchlorid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Methanol	Carl-Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Mowiol® 4-88 Reagent	Calbiochem, Darmstadt
Natriumazetat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumchlorid	Carl-Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Natriumdesoxycholat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumjodat	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Nonidet (NP40)	ICN Biomedicals, Inc., Ohio
Oligonukleotide	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin	PAA GmbH, Cölbe
Pentobarbital	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pepton	Carl-Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Phenol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Phosphate buffer solution (PBS) Dulbecco</i>	Biochrom AG, Berlin
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polyvinylalkohol (PVA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG)</i>	Intervet, Unterschleißheim
<i>Random Primer</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
Rapamycin	Calbiochem, Darmstadt

Salzsäure (36%)	Carl-Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
SM 0671 <i>Prestained Protein ladder</i>	Thermo Fisher Scientific
SM 1851 Spectra™ <i>Multicolor High Range Protein ladder</i>	Thermo Fisher Scientific
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tris [hydroxymethyl]-aminomethan (TRIS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid	Merck (Millipore), Darmstadt
X-Gal	Carl-Roth gmbH und Co. KG, Karlsruhe
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
Ziegenserum	Dianova, Hamburg
Zitronensäure	Merck, Darmstadt
5-fach Reaktionspuffer	Thermo Fisher Scientific
10-fach PCR-Puffer	Thermo Fisher Scientific
2-fach <i>Rapid Ligation Buffer</i>	Promega GmbH, Mannheim
<b>2.1.2 <u>Enzyme</u></b>	
Apal (10 U/μL)	Thermo Fisher Scientific
Crimson Taq™ DNA-Polymerase (5 U/mL)	NEB, Frankfurt
Protease-Inhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
Phosphatase-Inhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
rRNasin® RNase Inhibitor (40 U/μL)	Thermo Fisher Scientific
RevertAid™ H Minus Reverse Transkriptase (200 U/μL)	Thermo Fisher Scientific
SacI (10 U/μL)	Thermo Fisher Scientific
T4 DNA-Ligase (3 U/μL)	Promega GmbH, Mannheim
<b>2.1.3 <u>Vorgefertigte Systeme (Kits)</u></b>	
BigDye® Terminator v1.1 <i>Cycle Sequencing Kit</i>	Applied Biosystems, Darmstadt
Click-iT® HPG Alexa Fluor®488 <i>Protein synthesis assay kit</i> (C10428)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
DNA-free™ (DNase-Treatment & Removal)	Ambion INC (Life Technologies), Austin
Dynabeads® mRNA Direct™ Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Lysotracker® Deep Red (L12492)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
MESA Blue qPCR® Mastermix Plus for SYBR® Assay	Eurogentec, Köln
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
pGEM-T Vektor Kit	Promega GmbH, Mannheim
Takyon™ Rox Sybr® Master Mix blue dTTP	Eurogentec, Seraig, Belgien

QiAquick® Gel Extraction Kit (250)

Qiagen, Hilden

### 2.1.4 Oligonukleotide

**Tab. 2: Oligonukleotide für PCR, RTq-PCR und Sequenzierung.** Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Sigma-Aldrich. Strangspezifität: forward (fw) und reverse (rev);  $T_m$  = Annealingtemperatur; Bp = Basenpaare

Name	Primersequenz 5' - 3'	Produkt [Bp]	$T_m$ [°C]	Acc. No.
<i>rabbit Bcat2</i>	fw: ACTACTCCCTGCAGCTCTTTG rev: GAACCCAGTCCTTGCCACTC	191	60	XM_002723704.2
<i>rabbit Bckdha</i>	fw: AGACAAGCTCGAGTTCATCCA rev: AGAACTTCAGCACCTTCTCCT	130	60	XM_002722294.1
<i>rabbit Beclin 1</i>	fw: GCTGGATCAGGAGGAAGCTC rev: TGTGCCAAACTGTCCACTGT	190	60	XM_002719409.1
<i>rabbit CCND1</i>	fw: GTGGCCTCCAAGATGAAAGA rev: TTGGAGAGGAAGTGCTCGAT	176	60	DQ845180
<i>rabbit Dbt</i>	fw: GATATTGCCACCTGAAGTAGC rev: GAGAAGCGTGACCATTGAAGCA	155	60	XM_002715835.1
<i>rabbit Did</i>	fw: GTGATAGGTTCTGGTCTGGA rev: CAATTCCTTAGATGCAAAT	198	60	XR_085085.2
<i>rabbit eIF4E</i>	fw: CTTGGCAAGCAAACCTTCGG rev: GGTCACCTCGTCTCTGCTGT	213	60	NM_001101710.1
<i>human FoxO1</i>	fw: CATCACCAAGGCCATCGAG rev: CGAATGAACTTGCTGTGTAGGG	298	60	NM_002015.3
<i>rabbit GAPDH</i>	fw: GCCGCTTCTTCTCGTGCAG rev: ATGGATCATTGATGGCGACAACAT	144	60	L23961
<i>rabbit HK2</i>	fw: ACAGCAACCACATCCAGGTCAAAC rev: TTCTCCTCAAGTGGACGAAAGGCT	118	60	FJ848380
<i>human LC3</i>	fw: GTCCCGGACCATGTCAACAT rev: GTTTCCTGGGAGGCGTAGAC	194	60	NM_032514.3
<i>human mTOR</i>	fw: AGTGGACCAGTGGAAACAGG rev: CAGTTCAGACCAGCAGGACA	249	60	NM_004958.3
<i>rabbit ODC1</i>	fw: AGTTGGTTTTGCGGATTGCC rev: CGAAGGTCTCAGGATCGGTA	179	60	XM_002722389.1
<i>rabbit PCNA</i>	fw: GGACACCTTGGCGCTAGTAT rev: GGTCTCGGCATATACGTGCA	164	60	XM_008256277.1
<i>rabbit PEPCK</i>	fw: TGCGGCCTCCAAAGATGATG rev: CCCTGGAAACCTGGTGACAAGG	143	60	EF616471
<i>rabbit SLC7A5</i>	fw: CTCTTCTCATCGCCGTCTC rev: TTTTCCACCACACCCCGAA	110	60	NM_001082120.1
<i>rabbit SLC7A8</i>	fw: GTCCTTGCATCTGCTAAGACT rev: TCCAAAAGTAAGGCATCCACT	234	60	NM_001082682.1
<b>T7</b>	AATACGACTCACTATAGG		60	

### 2.1.5 Antikörper

<i>Goat-anti-mouse, labelled Polymer</i> , HRP-konjugiert	Dako, Hamburg
<i>Goat-anti-mouse -IgG</i> , HRP-konjugiert	Dianova, Hamburg
<i>Goat-anti-rabbit, labelled Polymer</i> , HRP-konjugiert	Dako, Hamburg
<i>Mouse-anti-human RPS6KB1</i> , monoklonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Mouse-anti-human Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389)</i>	NEB, Frankfurt
<i>Mouse-anti-human <math>\beta</math>-Aktin</i> , monoclonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Mouse-anti-human BCAT2</i> , polyclonal	Abcam, Cambridge, UK
<i>Rabbit-anti-human Phospho-mTOR (Ser2448)</i> , polyclonal	NEB, Frankfurt
<i>Rabbit-anti-human mTOR</i> , polyclonal	NEB, Frankfurt
<i>Rabbit-anti-human Phospho-FoxO1 (Ser256)</i> , polyclonal	Cell signaling Technology

<i>Rabbit-anti-human</i> FoxO1, monoclonal	Cell signaling Technology
<i>Rabbit-anti-human</i> Phospho-4E-BP1 (Thr37/46), polyclonal	Cell signaling Technology
<i>Rabbit-anti-human</i> 4E-BP1, polyclonal	Cell signaling Technology
<i>Rabbit-anti-human</i> SQSTM1/p62, monoclonal	Cell signaling Technology
<i>Rabbit-anti-human</i> Histon H3, monoclonal	Abcam, Cambridge, UK

## 2.2 Geräte und Gebrauchswaren

### 2.2.1 Geräte

Brutschrank	Hereaus, Hanau
Brutschrank HERACell 150i	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bonn
Biozero 8100E	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg
Chemi Doc Imaging System	UVP, Inc., Upland (USA)
Gel-Dokumentationsgerät	LTF Labortechnik, Wasserburg
Gelelektrophoresekammer	Agagel Mini und Maxi Biometra, Göttingen
Electrophoresis Power Supply EV 202	Consort, Turnhout (Belgien)
LaminAir <sup>®</sup> HP72 (halbsterile Werkbank)	Hereaus, Hanau
Kühlzentrifuge, Biofuge fresco 17	Hereaus, Hanau
Magnetrührer mit Heizung MR 2002	Heidolph, Schwabach
Mikroskop Nikon Eclipse TS 100	Nikon, Japan
Mikroskop Olympus IX70	Olympus, Hamburg
Novex Elektrophoresekammer	Invitrogen, Karlsruhe
Precision <sup>®</sup> Xceed <sup>™</sup> (Blutzuckermessgerät)	Abott, Wiesbaden
Precellys <sup>24</sup> lysis & homogenization (Homogenisator)	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Rotations-Vakuum-Konzentrator RVC 2-18	Christ, Osterode
Schüttler GFL 3006	GFL, Burgwedel
Semi-Dry-Blot	Biometra, Göttingen
Sicherheitswerkbank HERAsafe <sup>®</sup>	Hereaus, Hanau
Spektrophotometer Nano Vue <sup>™</sup>	GE Healthcare, München
StepOnePlus <sup>™</sup> Real-Time PCR Systems	Applied Biosystems, Darmstadt
Sterile Werkbank HERA safe	Hereaus, Hanau
Stereomikroskop Stemi 2000	Carl Zeiss, Jena
Stereomikroskop Stemi SV 11	Carl Zeiss, Jena
Stereomikroskop SZH 10	Olympus, Jena
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen
TCS SP5 LSM-Mikroskop, konfokal	Leica, Biberach, Deutschland
Ultra-Turrax <sup>®</sup> T25	IKA <sup>®</sup> -Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Vortexer G-560E	Scientific Industries, Inc. (USA)
Waage BP 210 S & BP 3100 S	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel

Wärmeschrank, Hybridisierungssofen  
Zentrifuge Biofuge 13  
Ultraschallgerät Sonoplus mini20

Biometra, Göttingen  
Hereaus, Hanau  
BANDELIN electronic GmbH &  
Co. KG

### 2.2.2 Gebrauchswaren

Amersham Hyperfilm™ ECL  
BD Microlance™3

GE Healthcare, München  
Becton Dickinson S.a.,  
Fraga (Spanien)

Deckgläser 18x18mm

Engelbrecht Medizin- und  
Labortechnik GmbH,  
Edermünde

Einmal-Küvetten

Brand GmbH und Co. KG,  
Wertheim

Einmal-Skalpell steril  
Falkonröhrchen (15 mL, 50 mL)

B.Braun, Melsungen  
Greiner Bio-One GmbH,  
Frickenhausen

Gelkassette 1,5 mm  
Glaspipetten (5 mL, 10 mL)

Invitrogen, Karlsruhe  
Greiner Bio-One GmbH,  
Frickenhausen

Kryoröhrchen

Greiner Bio-One GmbH,  
Frickenhausen

Micro Amp™ Fast Reaction Tubes  
Micro Amp™ Fast Optical 8-Cap Strip  
Nitrozellulosemembran  
Objektträger 76x26 mm StarFrost®

Applied Biosystems, Darmstadt  
Thermo Fisher Scientific  
GE Healthcare, München  
Knittel Glasbearbeitungs  
GmbH, Braunschweig

Omnifix®U-40 Insulin  
Petrischalen

B.Braun, Melsungen  
Carl-Roth GmbH und Co. KG,  
Karlsruhe

Petrischalen 30x10

Greiner Bio-One GmbH,  
Frickenhausen

Petrischalen 60x15

Greiner Bio-One GmbH,  
Frickenhausen

Precellys-Keramik-Kügelchen 1,4 mm

PeqLab Biotechnologie  
GmbH, Erlangen

Pipetten  
Pipettus

Eppendorf AG, Hamburg  
Hirschmann® Laborgeräte,  
Eberstadt

Reaktionsgefäße  
S-Monovetten  
Whatman™ Filterpapier  
Wolframdraht

Eppendorf AG, Hamburg  
Sarstedt, Deutschland  
GE Healthcare, München  
Goodfellow GmbH, Bad  
Nauheim

4-Well Platten

Nunc GmbH und Co. KG,  
Langenselbold

---

## 2.3 Software

<i>Basic Alignment Search Tool (BLAST)</i>	National Centre for Biotechnology Information (NCBI)
BioCaptMW Bio1D	Vilber Lourmat, Eberhardzell Scientific Software Group, Utah (USA)
<i>BZ image analysis application</i>	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg
<i>BZ 8100 observation application</i>	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg
Generunner	Hastings Software, Inc, N.Y. (USA)
<i>LabWorks™ Image Acquisition and Analysis</i> Microsoft Office 2007	UVP, Cambridge (UK) Microsoft® Corporation, Redmond (USA)
Primer3Plus	Free Software Foundation, Inc., Boston (USA)
SigmaPlot® 12	Systat Software GmbH, Erkrath
Volocity 3D	Perkin Elmer



### 3 Methoden

#### 3.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Für die tierexperimentellen Versuche wurden ZiKa-Hybride *New Zealand White* Kaninchen genutzt. Diese wurden von der Firma R. Krieg (Niederwünsch, Sachsen-Anhalt) und später von Dr. Zimmermann GbR (Abtsgmünd-Untergröningen, Baden-Württemberg) bezogen. Das Alter der Kaninchen betrug zum Lieferzeitpunkt 12 bis 16 Wochen und sie hatten ein Gewicht von ca. 3,5 kg. Die Kaninchen wurden in den Versuchsterräumen des Zentrums für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) in Einzelkäfigen bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12:12 Stunden gehalten. Handelsübliches Trockenfutter (REIKA Krafffutter, Reinsdorf) und Wasser stand den Versuchstieren *ad libitum* zur Verfügung. Alle Tiere unterliefen bis zum Versuchsbeginn einer Eingewöhnungsphase von 18 bis 21 Tage. Drei Tage vor der Verpaarung wurden die Häsinnen mit 110 I.E. *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG) durch subkutane Gabe in die Nackenfalte stimuliert, um einen reproduktionssteigernden Einfluss zu erhalten. Die Verpaarung erfolgte mit zwei fertilen Böcken durch Natursprung. Zur Ovulationsunterstützung wurden 75 U humanes Choriongonadotropin (hCG) in die *Vena auricularis lateralis* appliziert.

Entsprechend der geplanten Embryonalstadien wurden die Tiere am 3., 4. und 6. Tag *post coitum* (*p.c.*) mit einer Überdosis Pentobarbital (120 mg/kg Körpergewicht, in 5 ml warmen 10%-igem Ethanol gelöst) getötet. Die Versuchstiere wurden durch die Eröffnung der Karotiden entblutet. Der Bauchraum wurde halbsteril geöffnet, um Eileiter und Uteri zu entnehmen. Die Embryonen wurden aus dem Uterus bzw. Eileiter ausgespült. Zusätzlich wurden Blut- und Gewebeproben gewonnen.

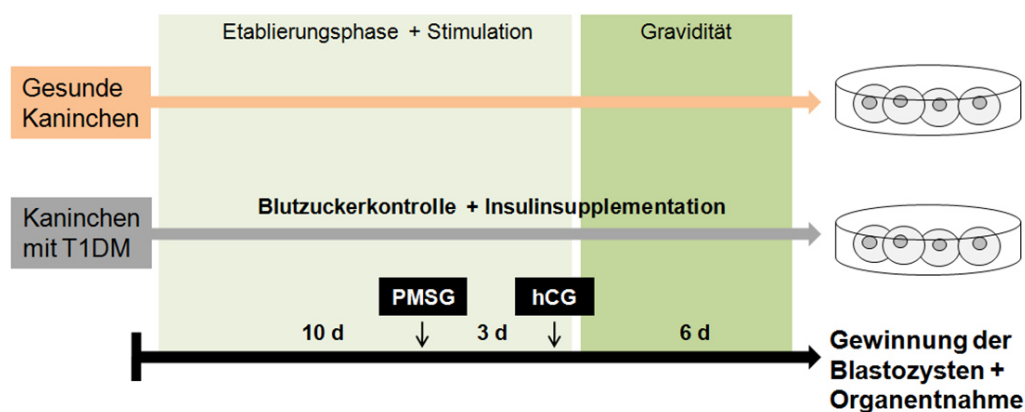
##### 3.1.1 Alloxanbehandlung

Die diabetogene Chemikalie Alloxan führt zur Induktion eines Typ 1 Diabetes mellitus. Diese wird von den  $\beta$ -Zellen des Pankreas als Glukoseanalogon aufgenommen und führt zu dessen Zerstörung.

In der Nacht vor der Alloxanbehandlung wurde den Versuchstieren das Futter entzogen. Die Kaninchen wurden am Behandlungstag zunächst mit Dormitor<sup>®</sup> (0,25 mg/kg Körpergewicht i.m.) beruhigt und anschließend mit Ketanest<sup>®</sup> (15 mg/kg Körpergewicht i.m.) betäubt. Die Injektion von Alloxan (120 mg/kg Körpergewicht in 10 mL *Phosphate buffer solution* (PBS) gelöst) über die *Vena auricularis lateralis* erfolgte am beruhigten und schmerzbetäubten Tier. Die *Vena auricularis lateralis* wurde nach der Alloxaneinleitung mit 10 mL isotonischer Kochsalzlösung (0,9 %) gespült, um lokale Gefäßschädigungen der reizenden Chemikalie zu vermeiden. 10 Minuten nach der Alloxaneinleitung wurden zwei subkutane Glukosepolster (je 25 mL) 27,5 % w/v in die Bauchfalte appliziert.

Die Aufwachphase wurde kontrolliert und der Blutzuckerspiegel überwacht. In den ersten 24 Stunden nach Alloxanbehandlung wurde eine stündliche Kontrolle durchgeführt. Den Tieren wurde eine 5 %-ige Glukoselösung als Trinkwasser und Brot gegeben, um eine lebensbedrohliche Hypoglykämie zu vermeiden. Die Etablierung einer Hyperglykämie ( $> 14$  mmol/L) erfolgte nach 36 bis 48 Stunden. Danach wurden das glukosehaltige Trinkwasser und das Brot entfernt.

Der Blutglukosespiegel wurde in der ersten Woche zweimal täglich geprüft (AccuCheck Performa-Messgerät), ab der zweiten Woche nur noch einmal täglich. An den Blutglukosewert wurde die zu verabreichende Insulindosis (0,5 - 3 I.E.) angepasst. Insgesamt wurde den Versuchstieren 3 Mal pro Tag Insulin in die Nackenfalte injiziert. Dies diente zur Einstellung der Blutzuckerkonzentration auf einen Wert von 14 bis 30 mmol/L. Desweiteren wurden die Körpergewichte und die aufgenommene Futtermenge der Versuchstiere täglich dokumentiert und dienten zur Analyse der metabolischen Lebendmasse und Futtermittelnutzung (Anhang VI).



**Abb. 6: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung im diabetischen Graviditätsmodell.** Typ 1 Diabetes mellitus (T1DM); *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG); humanes Choriongonadotropin (hCG); Tag (d)

### 3.1.2 Gewinnung von maternalen Blutproben

Nach dem Eröffnen der Karotiden wurde das Blut direkt in S-Monovetten, die EDTA enthalten, aufgefangen und durchmischt. Die Blutproben wurden bis zum Versuchsende des jeweiligen Tages im Kühlschrank bei  $+4^{\circ}\text{C}$  gelagert. Anschließend wurden die Blutproben bei 4400 *rpm* für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bildete eine Plasmaprobe, die bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde.

### 3.1.3 Gewinnung der Kaninchenblastozysten

Die Ovarien, Eileiter und Uteri wurden unter einer halbsterilen Werkbank von Fett und angrenzendem Gewebe freipräpariert. Die Uteri wurden mit 10 mL warmen Spülmedium ausgespült. Die Blastozysten wurden mit einem Blastozystenlöffel zweimal in frisches

Spülmedium umgesetzt und so maternale Gewebereste entfernt. Die Blastozysten wurden unter dem Stereomikroskop morphologisch beurteilt und nach ihrem Gastrulationsstadium (Viebahn *et al.* 1995a/b) eingeteilt. In Versuchsgruppen wurde eine gemischte Gruppe von Blastozysten aus mindestens 3 Tieren eingesetzt. Die Blastozysten wurden entweder direkt nach dem Ausspülen, Waschen und Sortieren als *in vivo*-Probe analysiert oder *in vitro* kultiviert. Für *in vitro* Kulturen (Kapitel 3.1.8) wurden die Blastozysten aus dem Spülmedium in Kulturmedium überführt.

### Spülmedium (pH 7,2-7,4):

<i>Basal synthetic medium II</i> (BSM II; Maurer 1978)	7,64 g/L
NaHCO <sub>3</sub>	2,11 g/L
Penicillin	0,06 g/L
Streptomycin	0,15 g/L
Glukose	1,80 g/L
NaCl	1,00 g/L
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	100 µL/L
<i>Bovine serum albumine</i> (BSA)	1,00 g/L

Die Herstellung des PBS-Puffers erfolgte durch Lösen von 9,55g PBS Dulbecco in einem Liter destilliertem Wasser.

### **3.1.4 Separation von Embryoblast und Trophoblast**

Die gespülten Blastozysten wurden zweimal in kaltem PBS-Puffer gewaschen. Die *Zona pellucida* wurde von den Blastozysten mit Mikroscheren und Nadeln in 0,05 % Polyvinylalkohol (PVA) in PBS-Puffer mechanisch entfernt. Für die Separierung von Embryoblast und Trophoblast wurde der Trophoblast mit einer Pinzette mechanisch vom Embryoblasten entfernt.

### **3.1.5 Gewinnung von RNA-Proben**

Nachdem die gespülten Blastozysten zweimal in kaltem PBS-Puffer gewaschen und die *Zona pellucida* mechanisch entfernt wurde, wurden die Proben für RNA-Analyse in PBS-Puffer in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur weiteren Aufarbeitung (Kapitel 3.2.2.2) erfolgte die Lagerung bei -80°C.

### **3.1.6 Gewinnung von Proteinproben**

Die gespülten Blastozysten wurden zweimal in kaltem PBS-Puffer gewaschen und anschließend die *Zona pellucida* mit Mikroscheren und Nadeln in 0,05 % PVA in PBS-Puffer mit Protease- und Phosphatase-Inhibitor mechanisch entfernt. Die Proben der Proteinanalyse wurden in RIPA-Puffer (100 µL auf 10 Embryonen), welcher Protease- und Phosphatase-Inhibitor (je 2 µL je 100 µL RIPA-Puffer) enthielt, aufgenommen und

schockgefroren. Bis zur Proteinisolierung (Kapitel 3.2.10.2) wurden die Proben bei -80°C gelagert.

### **3.1.7 Gewinnung von Blastozystenhöhlenflüssigkeit, Uterussekret und Endometrium**

Zur Gewinnung der Blastozystenhöhlenflüssigkeit wurden die Uteri nicht gespült, sondern vorsichtig aufgezipft bis eine Blastozyste zu sehen war. Diese wurde mit einem Blastozystenlöffel aufgenommen und kurz in kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde das Gastrulationsstadium bestimmt und die Blastozyste auf ein Uhrglasschälchen gebettet. Die Blastozyste wurde mit einem fusselfreien Tuch trocken getupft. Der Embryo wurde mit einer Kanüle angestochen und die *Zona pellucida* entfernt. Die Blastozystenhöhlenflüssigkeit wurde mit einer Pipette aufgenommen. Die Proben wurden sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Blastozystenhöhlenflüssigkeiten bei -80°C gelagert.

Die aufgezipften Uteri dienten zur Gewinnung von Uterussekret- und Endometriumsproben. Das Uterussekret wurde mit einem saugfähigen Filterpapierblättchen aufgenommen. Die sekretbeladenen Filterpapiere wurden gewogen und in einem 0,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß bei -80°C gelagert.

Das Endometrium wurde mit einem Skalpell vorsichtig abgeschabt und in einem 1,5 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäß bei -80°C gelagert.

### **3.1.8 Kultivierung von 6 Tage alten Kaninchenblastozysten**

Um die transkriptionelle Regulation und Signaltransduktion in Präimplantationsembryonen gezielt untersuchen zu können, wurden 6 Tage alte Kaninchenblastozysten des Gastrulationsstadiums 1 *in vitro* für 30 Minuten bis zu 6 Stunden kultiviert und mit L-Leucin, BCAA, Glukose oder Insulin stimuliert.

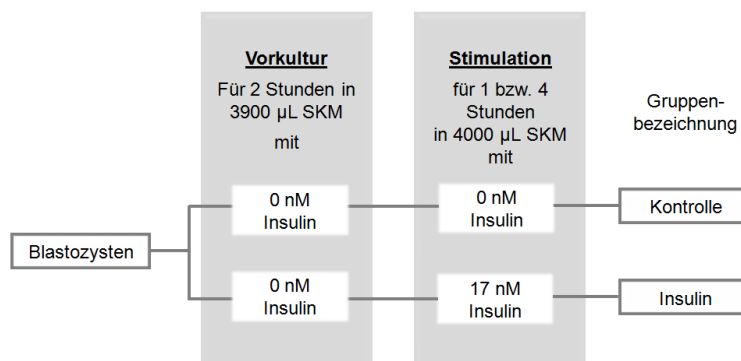
Nach mehrmaligem Waschen in Spülmedium wurden die Blastozysten durch das Umsetzen in neue Schalen mit Standardkulturmedium (SKM) adaptiert. Nach einer kurzen Adaptation (ca. 2 min) wurden die Blastozysten zufällig in die jeweiligen Versuchsgruppen in neue Kulturschalen eingeteilt. Die Kultur der Blastozysten erfolgte bei 37°C, 5 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank.

Standardkulturmedium (pH7,2-7,4):

<i>Basal synthetic medium II</i> (BSM II)	7,65 g/L
Penicillin	0,06 g/L
Glukose	1,80 g/L
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	100 µL/L
<i>Bovine serum albumin</i> (BSA)	15,00 g/L
NaHCO <sub>3</sub>	2,11 g/L
Streptomycin	0,15 g/L
NaCl	1,99 g/L

**3.1.8.1 Stimulation mit Insulin**

Blastozysten des Gastrulationsstadiums 1 wurden nach einer zweistündigen Vorkultur in Standardkulturmedium (SKM) mit 17 nM oder ohne Insulin für eine Stunde und 4 Stunden kultiviert (Abb. 7). Anschließend wurden die Blastozysten als RNA-Proben gelagert (Kapitel 3.1.5).



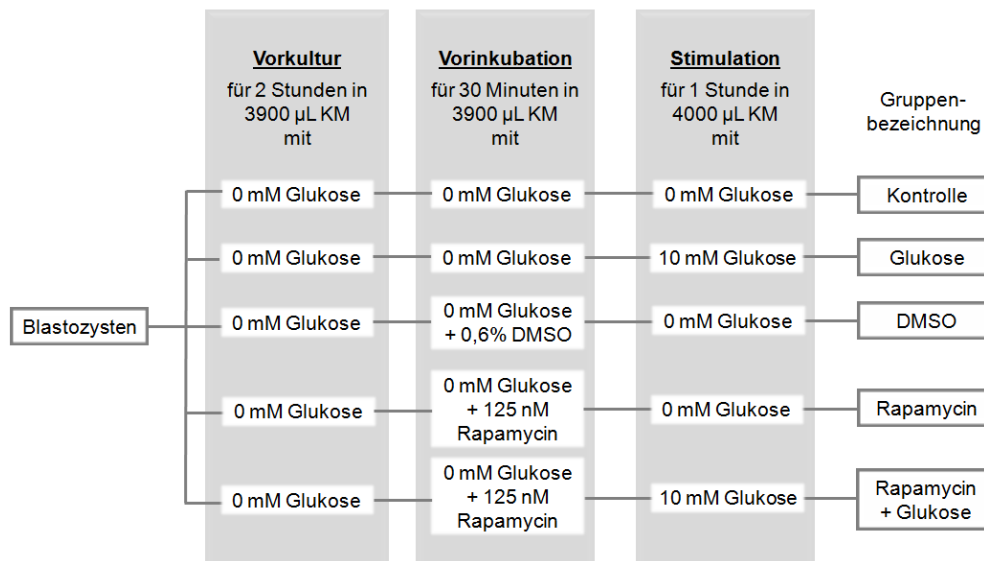
**Abb. 7: Schema der Stimulation von 6 Tage alten Kaninchenblastozysten *in vitro* mit Insulin.**  
SKM: Standardkulturmedium

**3.1.8.2 Stimulation mit Glukose für 6 Stunden**

Blastozysten gesunder Kaninchen wurden mit 0, 10 oder 25 mM Glukose für 6 Stunden kultiviert. Anschließend wurden die Blastozysten in kaltem PBS-Puffer gewaschen, die *Zona pellucida* entfernt und die Einzelembryonen für RNA-Analysen bei -80°C gelagert.

**3.1.8.3 Stimulation mit Glukose und Rapamycin**

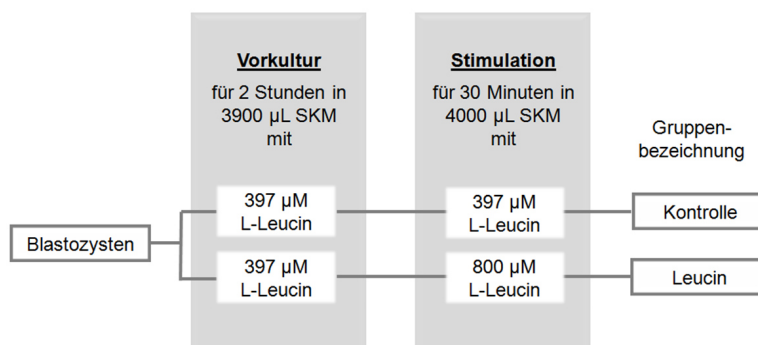
Zur Analyse der mTOR-abhängigen Glukoseaktivierung wurden Blastozysten in Gruppen von 10 nach dem Kulturschema Abb. 8 kultiviert. Die selektive Inhibierung von mTOR erfolgte durch eine 30-minütige Vorinkubation mit Rapamycin. Als Lösungsmittelkontrolle wurde eine Gruppe, die 0,6 % DMSO erhielt, mitgeführt. Nach der Vorinkubationszeit wurden zu dem Kulturmedium (KM mit 0 mM Glukose) der jeweiligen Stimulationsgruppen 10 mM Glukose zugesetzt und für eine Stunde weiter kultiviert. Die anderen Gruppen erhielten Kulturmedium ohne Glukose. Nach der Kultur wurden die Blastozysten als Proteinproben gelagert (Kapitel 3.1.6).



**Abb. 8: Schema der Stimulation von 6 Tage alten Kaninchenblastozysten *in vitro* mit Glukose und Rapamycin.** KM: Kulturmedium

### 3.1.8.4 Stimulation mit L-Leucin

Gruppen von 10 Blastozysten wurden nach dem Kulturschema in Abb. 9 kultiviert. Nach einer zweistündigen Vorkulturzeit in Kulturmedium, was bereits 397 µM L-Leucin enthielt, erfolgte die additive Zugabe von L-Leucin, um eine Endkonzentration von 800 µM zu erhalten. Die Kontrollgruppe bekam Standardkulturmedium (397 µM L-Leucin). Nach der 30-Minütigen Kultur wurden die Blastozysten als Proteinproben gelagert (Kapitel 3.1.6).

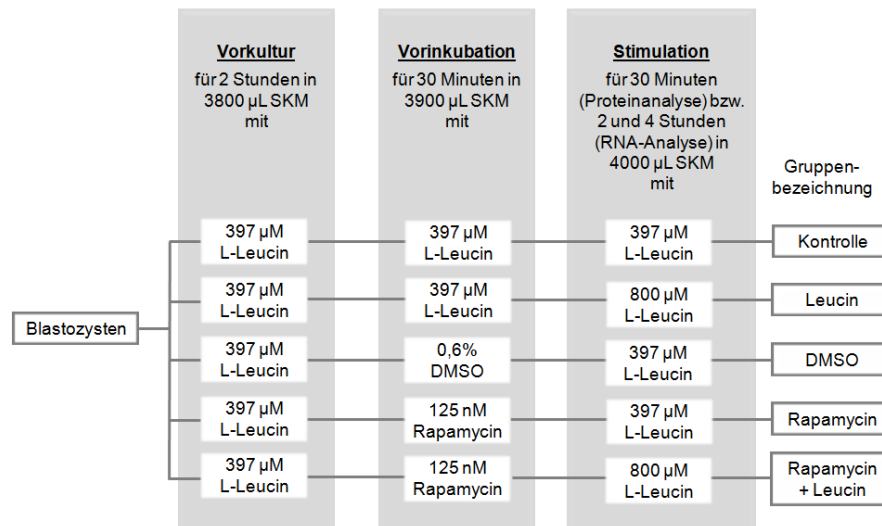


**Abb. 9: Schema der Stimulation von 6 Tage alten Kaninchenblastozysten *in vitro* mit L-Leucin.** SKM: Standardkulturmedium

### 3.1.8.5 Stimulation mit L-Leucin und Rapamycin

Es wurden für die Stimulation je 5 bis 10 Blastozysten des Gastrulationsstadiums 1 gesunder Kaninchen eingesetzt und in 3,9 mL Kulturmedium nach dem Kulturschema in Abb. 10 kultiviert. Die selektive Inhibierung von mTOR erfolgte durch eine 30-minütige Vorinkubation mit Rapamycin. Als Lösungsmittelkontrolle wurde eine Gruppe, die 0,6 % DMSO erhielt, mitgeführt. Nach der Vorinkubationszeit wurden zu dem

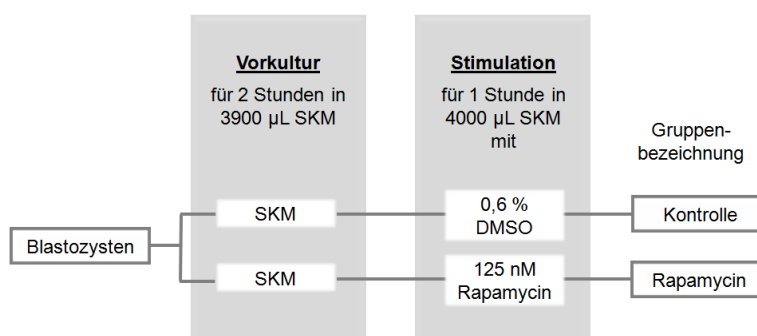
Standardkulturmedium (SKM mit 397  $\mu\text{M}$  L-Leucin) additiv 800  $\mu\text{M}$  L-Leucin zugesetzt und nochmals für 30 Minuten kultiviert. Die anderen Gruppen erhielten Standardkulturmedium. Nach der Kultur wurden die Blastozysten als Proteinproben aufgearbeitet (Kapitel 3.1.6). Zur Untersuchung von potentiellen mTOR-Zielgenen wurden die Blastozysten wie bereits beschrieben mit L-Leucin kultiviert (Abb. 10). Die Kulturdauer betrug 2 und 4 Stunden. Nach der Beendigung der Kultur wurden RNA-Proben generieren (Kapitel 3.1.5).



**Abb. 10: Schema der Stimulation von 6 Tage alten Kaninchenblastozysten *in vitro* mit L-Leucin und Rapamycin.** SKM: Standardkulturmedium

### 3.1.8.6 Stimulation mit Rapamycin für eine Stunde

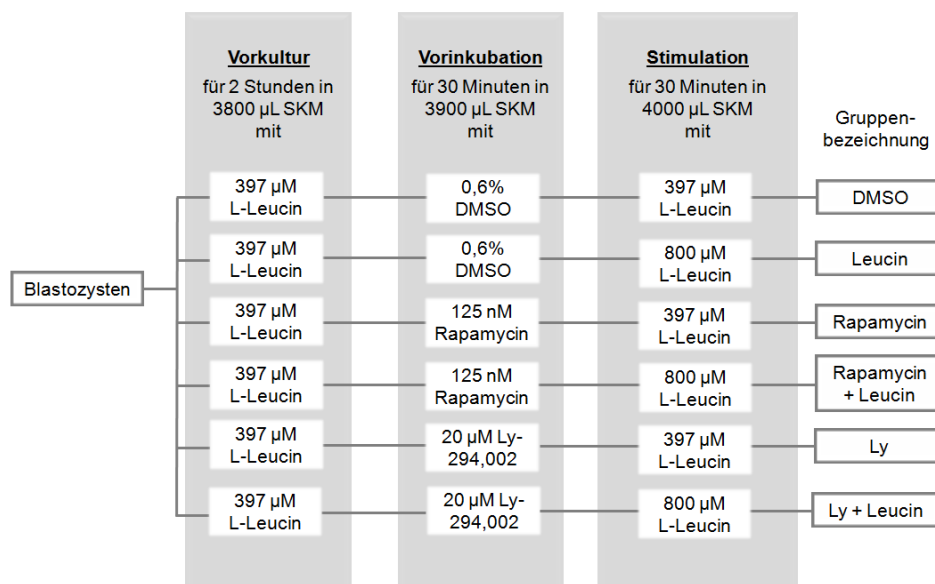
Nach einer zweistündigen Vorkultur wurden 10 Blastozysten mit 125 nM Rapamycin für eine Stunde kultiviert (Abb. 11). Die zugehörige Kontrollgruppe erhielt als Lösungsmittelkontrolle 0,6 % DMSO in Standardkulturmedium. Nach der Kultur wurden die Blastozysten als aufgearbeitet (Kapitel 3.1.6).



**Abb. 11: Schema der Stimulation von 6 Tage alten Kaninchenblastozysten *in vitro* mit Rapamycin.** SKM: Standardkulturmedium

### 3.1.8.7 Stimulation mit Rapamycin und Ly-294,002

Es wurden je 3 Blastozysten pro Behandlungsgruppe für die Kultur laut Schema in Abb. 12 eingesetzt. Es erfolgte die selektive Inhibierung von mTOR durch den Einsatz von 125 nM Rapamycin oder von Akt durch 20 µM Ly-294,002 (Abb. 12). Als Lösungsmittelkontrolle wurde eine Gruppe, die 0,6 % DMSO erhielt, mitgeführt. Nach der Vorinkubationszeit wurden zu dem Standardkulturmedium (SKM mit 397 µM L-Leucin) der jeweiligen Behandlungsgruppe additiv 800 µM L-Leucin zugesetzt und nochmals für 30 Minuten kultiviert. Die anderen Gruppen erhielten Standardkulturmedium. Nach der Kultur wurden die Blastozysten als Proteinprobe gelagert (Kapitel 3.1.6).



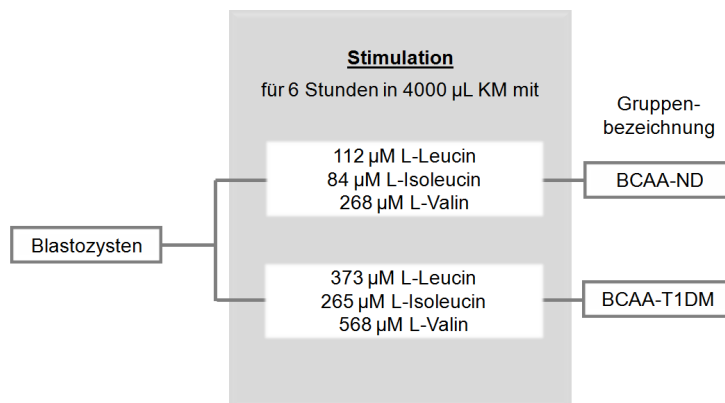
**Abb. 12: Schema der Stimulation von 6 Tage alten Kaninchenblastozysten *in vitro* mit Rapamycin und Ly-294,002.** SKM: Standardkulturmedium

### 3.1.8.8 Langzeitkultur mit nachgestellten BCAA-Konzentrationen *in vitro* von Blastozysten nicht-diabetischer und diabetischer Kaninchen

Da ein Unterschied in den Konzentrationen von verzweigt-kettige, aliphatischen Aminosäuren (BCAA) in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit von Präimplantationsembryonen nicht-diabetischer und diabetischer Kaninchen gefunden wurde, wurden die *in vivo* Konzentrationen der BCAA *in vitro* nachgestellt. Hierfür wurde Kulturmedium verwendet, was keine BCAA enthielt. Vor der Kultur wurden die in Abb. 13 aufgezeigten BCAA-Konzentrationen der jeweiligen Gruppen eingestellt. Blastozysten des Gastrulationsstadiums 1 gesunder Kaninchen wurden in Gruppen von 3 Blastozysten in Kulturmedium mit nicht-diabetischen BCAA (BCAA-ND) oder diabetischen BCAA (BCAA-T1DM) für 6 Stunden kultiviert. Der Blastozystendurchmesser wurde vor und nach der Kultur dokumentiert. Nach der Kultur wurden die Blastozysten in kaltem PBS gewaschen



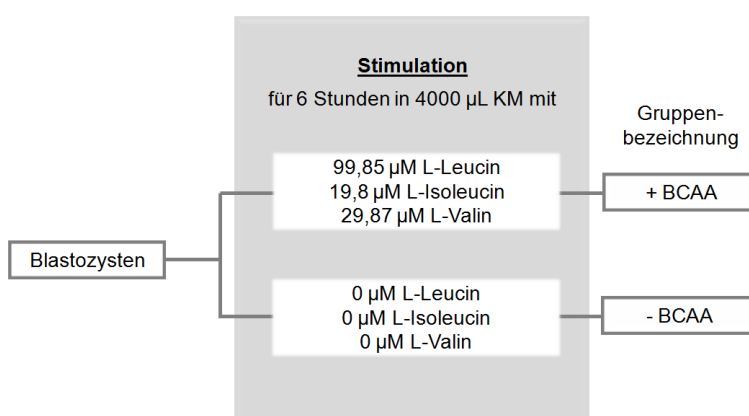
und RNA- sowie Proteinproben generiert (Kapitel 3.1.5 und 3.1.6) und bis zur weiteren Aufbereitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.



**Abb. 13:** Schema der Stimulation von 6 Tage alten Kaninchenblastozysten *in vitro* mit nicht-diabetischen (BCAA-ND) und diabetischen BCAA-Konzentrationen (BCAA-T1DM). KM: Kulturmedium

### 3.1.8.9 Langzeitkultur ohne BCAA *in vitro* für 6 Stunden

Um den Einfluss einer fehlenden Verfügbarkeit von BCAA zu untersuchen, wurden Blastozysten ohne die essentiellen Aminosäuren L-Leucin, L-Isoleucin und L-Valin für 6 Stunden kultiviert (Abb. 14). Die Kontrollgruppe wurde mit Kulturmedium, was BCAA enthielt, behandelt. Es wurden jeweils mindestens 3 Blastozysten pro Gruppe eingesetzt. Vor und nach der Kultur wurden der Blastozystendurchmesser dokumentiert. Nach der Kultur wurden Blastozystenhöhlenflüssigkeit (Kapitel 3.1.7), RNA- und Proteinproben gewonnen (Kapitel 3.1.5 und 3.1.6).



**Abb. 14:** Schema der Stimulation von 6 Tage alten Kaninchenblastozysten *in vitro* mit (+ BCAA) und ohne BCAA (- BCAA). KM: Kulturmedium

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Qualitative und quantitative Bestimmung freier Aminosäuren

Die Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen im Plasma, Uterussekret und in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit wurde mittels Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) im Labor von Prof. Dr. Stangl und Dr. Hirche (Ernährungswissenschaften, MLU Halle-Wittenberg) durchgeführt.

#### 3.2.1.1 Vorbereitung der Plasmaproben

Die Plasmaproben wurden aufgetaut und gut durchmischt. Es wurden jeweils 20 µL Plasmaprobe eingesetzt und gleichzeitig mit 5 µL 10 %-iger Sulfosalicylsäure und 1 mM des internen Standards Nor-Valin für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 13000rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde danach 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt.

#### 3.2.1.2 Vorbereitung der Uterussekretproben

Da das Uterussekret bei der Probengewinnung mit Filterpapieren aufgenommen wurde, wurden diese mit einem Teil 1 mM Nor-Valin und zwei Teilen destilliertem Wasser ihres Gewichtes versetzt. Das Reaktionsgefäß wurde anschließend in einem 4°C kaltem Ultraschallbad inkubiert. Die Probe wurde anschließend in ein angestochenes Reaktionsgefäß übertragen und für 5 Minuten bei 7500 rpm und 4°C in ein übergestülptes Reaktionsgefäß zentrifugiert. Es wurden dann 20 µL Uterussekretprobe mit 5 µL 10 %-iger Sulfosalicylsäure für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 13000 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde danach 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt.

#### 3.2.1.3 Vorbereitung der Blastozystenhöhlenflüssigkeit

Es wurden jeweils 5 µL einer Blastozystenhöhlenflüssigkeitsprobe (BF) entstanden aus einer einzelnen Blastozyste eingesetzt und gleichzeitig mit 1,25 µL 10 %-iger Sulfosalicylsäure und mit 1 mM des internen Standards Nor-Valin für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 13000rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde danach 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt.

Jeweils 10 µL der verdünnten Probenüberstände (Plasma, Uterussekret oder BF) wurden in ein Fläschchen (*Vial*) mit spitzem *Insert* überführt. Die Konzentrationen an freien Aminosäuren in maternalem Plasma, Uterussekret und der Blastozystenhöhlenflüssigkeit wurden als Isonidolderivate mittels HPLC gemessen (Schuster 1988). Diese Messung wurde von Dr. Hirche durchgeführt und überwacht. Die Vorsäulenderivatisierung erfolgte mit o-Phthaldialdehyde und Mercaptopropionsäure (Terlink *et al.* 1994). Die Fluoreszenzsignale wurden bei den Wellenlängen 337 nm und 454 nm detektiert. Die

erhaltenen Chromatogramme einer Probe wurden ausgewertet und gaben die Konzentrationen an freien Aminosäuren in nmol/g an.

Insgesamt konnten 18 Aminosäuren für die Quantifizierung der Plasma- und Blastozystenhöhlenflüssigkeitsproben nachgewiesen werden. Darunter befanden sich 9 essentielle Aminosäuren. Im Uterussekretpoben konnten 16 Aminosäuren (Threonin, Methionin, Tryptophan, Phenylalanin, Lysin, Valin, Isoleucin, Leucin, Serin, Glutamin, Glycin, Arginin, Alanin, Taurin, Tyrosin, Ornithin) quantifiziert werden, lediglich die Konzentrationen für Histidin und Asparagin waren aufgrund eines nicht eindeutigen Signals bzw. Doppelspitzen im Chromatogramm nicht bewertbar.

Die Konzentrationen von Asparaginsäure und Glutaminsäure konnten in allen Proben aufgrund von Doppelspitzen im Chromatogramm oder das Erreichen der Konzentrationsnachweisgrenze nicht eindeutig bestimmt werden und wurden deshalb aus der Quantifizierung ausgeschlossen.

### **3.2.2 RNA-Isolation**

Da RNA-abbauende Enzyme (RNasen) universell vorkommen, müssen benötigten Materialien frei von RNasen sein. Destilliertes Wasser wurde mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt. Diese Substanz führt über die kovalente Bindung von Histidin im aktiven Zentrum der RNasen zu ihrer Aktivitätsinhibierung. Alle wässrigen Lösungen mit 0,1 % DEPC-Wasser (1 mL DEPC auf 1 L dest. Wasser) hergestellt, alle Glasgefäße bei 180°C sterilisiert und Kunststoffreaktionsgefäße autoklaviert.

#### **3.2.2.1 RNA-Isolation aus Geweben**

Tiefgefrorene Gewebeproben (Fett, Skelettmuskel, Leber) wurden portioniert und in einer Porzellan-Mörser-Schale, gefüllt mit flüssigem Stickstoff, gemörsert. Anschließend wurden ca. 300 mg Gewebematerial in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überspachtelt und mit 1 mL Trizol überschichtet. Mithilfe eines Ultra-Turrax wurden die Proben eine Minute lang auf höchster Stufe homogenisiert und dadurch das Gewebematerial aufgeschlossen.

Das Endometrium wurde mit dem Precylles-Verfahren aufgearbeitet. Dafür wurde das Gewebe auf Eis aufgetaut und mit 1 mL Trizol überschichtet. Es wurden 10 Keramikkügelchen zugegeben und die Zellen für 15 Sekunden im Precylles aufgebrochen. Anschließend wurden 200 µL Chloroform in die Reaktionsgefäße zugegeben, kräftig gemischt und für 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Phasentrennung zu verstärken, wurden die Proben für 15 Minuten bei 13000 *rpm* und 4°C zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 500 µL Isopropanol wurde die RNA für 10 Minuten bei Raumtemperatur gefällt. Es folgte die Zentrifugation der Proben für 10 Minuten bei 13000 *rpm* und 4°C. Der Überstand wurde abgenommen und das RNA-Pellet zweimal mit 1 mL 70 %-igem Ethanol gewaschen. Die

RNA wurde für 5 Minuten in einem Rotations-Vakuum-Konzentrator getrocknet und in ca. 100  $\mu$ L DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst.

### 3.2.2.2 mRNA-Isolation aus Kaninchenblastozysten

Die mRNA wurde mittels Dynabeads<sup>®</sup>Oligo(dT)<sub>25</sub> von Einzelblastozysten oder separiertem Embryoblast bzw. Trophoblast isoliert. Die auf der Oberfläche dieser magnetischen Polyesterol-Kügelchen kovalent gebundenen Oligo(dT)<sub>25</sub>-Reste binden die mRNA an ihrem Poly-A-Schwanz.

Die Proben wurden auf Eis aufgetaut, für 10 Minuten bei 13000 *rpm* zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Blastozysten wurden in Lysepuffer (110  $\mu$ L je Embryoblast bzw. Trophoblast, 150  $\mu$ L je Gesamtembryo) resuspendiert und bei Raumtemperatur für 10 Minuten schüttelnd inkubiert. Gleichzeitig wurden die Dynabeads<sup>®</sup>Oligo(dT)<sub>25</sub> mittels eines *Magnetic Particle Concentrator* (DynaL MPC<sup>®</sup>) zweimal mit 100  $\mu$ L Bindepuffer aktiviert und je 10  $\mu$ L zu Embryo- bzw. Trophoblast und 13  $\mu$ L zu Gesamtembryonen gegeben und anschließend bei Raumtemperatur für 10 Minuten schütteln inkubiert. Es wurde zweimal mit 100 $\mu$ L Waschpuffer A und dreimal mit 100  $\mu$ L Waschpuffer B im *Magnetic Particle Concentrator* gewaschen. Die mRNA wurde in 11  $\mu$ L DEPC-Wasser durch Erhitzen auf 65°C für 3 Minuten aufgenommen. Um eine erneute Bindung zu verhindern, wurden die Proben in den vorgekühlten *Magnetic Particle Concentrator* auf Eis gebracht und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß übertragen.

	Lysepuffer	Bindepuffer	Waschpuffer A	Waschpuffer B
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	-
DTT (0,1 M)	0,5 mL	-	-	-
dest. H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 100 mL	<i>ad</i> 100 mL	<i>ad</i> 100 mL	<i>ad</i> 100 mL

### 3.2.3 RNA-Quantifizierung mittels UV-Spektroskopie

Um die Konzentration und den Reinheitsgrad der isolierten RNA bestimmen zu können, wurde die Absorption bei den Wellenlängen  $\lambda = 260$  nm und  $\lambda = 280$  nm gemessen. Dies erfolgte mittels NanoVue<sup>™</sup>-Spektrophotometer. Dabei wurden jeweils unverdünnte Probenlösungen auf die vorgesehene Messstelle aufgetragen und die optische Dichte (OD) bei 260 nm und 280 nm photometrisch gemessen. Hierbei entspricht eine Absorption von OD = 1 bei 260 nm (A<sub>260</sub>) einer RNA-Konzentration von 40  $\mu$ g/ mL. Über die Absorptionsmessung bei  $\lambda = 260$  nm wurde dann die RNA-Konzentration in  $\mu$ g/ $\mu$ L angegeben. Der Quotient beider gemessenen Wellenlängen gibt eine Aussage über den Reinheitsgrad der RNA an. Dieser Wert sollte im Bereich von 1,8 bis 2,0 liegen. Um die RNA-Qualität zu prüfen, wurde 1  $\mu$ g RNA auf einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt.

### 3.2.4 DNase-Verdau

Um Kontaminationen durch genomische DNA auszuschließen, mussten die RNA-Proben mit rDNaseI für 30 Minuten bei 37°C behandelt werden. Anschließend wurden 2,5 µL DNase-Inaktivierungsreagenz zu dem Ansatz hinzugegeben, kurz gemischt und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden für 1 Minute bei 13000 *rpm* zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die verdaute RNA-Probe wurde dann auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen. Desweiteren wurde eine Kontroll-PCR durchgeführt, um genomische DNA ausschließen zu können. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80°C.

#### Ansatz pro 10µg RNA:

10 µg RNA	x µL
DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 25 µL
rDNaseI	2 µL
10-fach DNaseI Puffer	2,5 µL
<u>RNasin®RNase-Inhibitor</u>	<u>0,5 µL</u>
Gesamtvolumen	30 µL

### 3.2.5 Reverse-Transkriptase Reaktion

Mit der RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) ist es möglich, RNA in die komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben. Die so gewonnene cDNA kann als Matrize für eine folgende Polymerase-Kettenreaktion (PCR) genutzt werden.

#### 3.2.5.1 **Reverse-Transkriptase Reaktion von RNA aus Gewebe**

Es wurden 3 µg RNA mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 11,5 µL aufgefüllt und mit 1 µL *random* Primer (1 µmol) versetzt. Das Aufbrechen der RNA-Sekundärstruktur und die Anlagerung des Primers wurden durch eine Inkubation bei 65°C für 5 Minuten im Thermozykler erreicht. Die Proben wurden anschließend bei 4°C gekühlt.

Folgender Reaktionsansatz wurde hinzugegeben:

5-fach Reaktionspuffer	4 µL
dNTP-Mix (je 10 mM)	2 µL
Reverse Transkriptase (200 U/µL)	1 µL
<u>RNase-Inhibitor</u>	<u>0,5 µL</u>
dest. H <sub>2</sub> O	ad 20 µL

#### Protokoll im Thermozykler:

10 Minuten	25°C
60 Minuten	42°C
10 Minuten	70°C

Nach der Beendigung der Reaktion wurde der Probenansatz mit 80 µL destilliertem Wasser aufgefüllt und bei -20°C gelagert.

### 3.2.5.2 Reverse-Transkriptase Reaktion von RNA aus Blastozysten

Nach der Isolation der mRNA aus Blastozysten (Kapitel 3.2.2.2) wurde zu jeder Probe folgender Ansatz für die cDNA-Synthese hinzugegeben:

10-fach PCR-Puffer	2 $\mu$ L
50 mM MgCl <sub>2</sub>	2 $\mu$ L
10 mM dNTPs	2 $\mu$ L
<i>random</i> Primer	1 $\mu$ L
Reverse Transkriptase (200 U/ $\mu$ L)	0,5 $\mu$ L
<u>RNase-Inhibitor</u>	<u>0,2 <math>\mu</math>L</u>
dest. H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 9 $\mu$ L

Es wurde nach der Zugabe gut gemischt und folgendes Programm gestartet:

10 Minuten	25°C
60 Minuten	42°C
4 Minuten	99°C

Die erhaltene cDNA wurde auf ein Gesamtvolumen von 50  $\mu$ L für Proben separierter Embryo- und Trophoblasten bzw. 100  $\mu$ L für Gesamtblastozysten mit destilliertem Wasser aufgefüllt und bei -20°C gelagert.

### 3.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde zur Effizienzkontrolle der cDNA-Synthese genutzt. Dies wurde mithilfe des Referenzgens Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) durchgeführt.

#### Reaktionsansatz:

10-fach PCR-Puffer	5 $\mu$ L
dNTP-Mix (je 10 mM)	0,5 $\mu$ L
Primer <i>forward</i> (10 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ L
Primer <i>reverse</i> (10 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ L
Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ L)	0,125 $\mu$ L
<u>cDNA</u>	<u>1 <math>\mu</math>L</u>
dest. H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 25 $\mu$ L

Folgendes Standardprogramm wurde im Thermozykler genutzt:

Initiale Denaturierung	3 Minuten	94°C	
Denaturierung der cDNA	45 Sekunden	94°C	} 40 Zyklen
Primerbindung	45 Sekunden	60°C	
Kettenverlängerung	1 Minute	72°C	
Finale Kettenverlängerung	10 Minuten	72°C	
Kühlung	Pause	4°C	

#### 3.2.6.1 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RTq-PCR)

Die RTq-PCR ermöglicht die relative und absolute Quantifizierung von entstehenden DNA-Mengen. Die quantitative Echtzeitanalyse der amplifizierten DNA-Fragmente wird über die

Messung von Fluoreszenzsignalen ermöglicht. *SYBR<sup>®</sup> Green* ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in doppelsträngige DNA-Moleküle interkaliert und dessen Fluoreszenzintensität mit der DNA-Mengen Zunahme korreliert. Es wird also die Fluoreszenzzunahme über die Zyklen der Reaktion analysiert. Mithilfe der RTq-PCR wurde die Expression von Genen (verwendete Primer siehe Tab. 1) untersucht. *GAPDH* diente dabei als Referenzgen. Die Analyse der cDNA-Proben wurde in Doppelbestimmung durchgeführt. Eine Negativkontrolle und eine Verdünnungsreihe eines Plasmidstandards ( $10^4$  bis  $10^8$  Moleküle) des zu untersuchenden Gens wurden mitgeführt. Der Plasmidstandard (Kapitel 3.2.9.7) als Referenz.

Folgender Reaktionsansatz wurde in der RTq-PCR eingesetzt:

Mastermix Plus for SYBR <sup>®</sup> Assay	10 µL
Primer <i>forward</i>	0,5 µL
Primer <i>reverse</i>	0,5 µL
cDNA	3 µL
dest. H <sub>2</sub> O	ad 20 µL

Die RTq-PCR wurde im *StepOnePlus<sup>™</sup> Real Time PCR System* unter folgenden Standardbedingungen durchgeführt:

Aktivierung der Polymerase	5 Minuten	95°C	
Denaturierung der cDNA	10 Sekunden	95°C	} 40 Zyklen
Primerbindung	15 Sekunden	60°C	
Kettenverlängerung	20 Sekunden	72°C	

Im Anschluss an diese PCR-Reaktion wurde eine Schmelzpunktanalyse (Bereich von 55°C bis 95°C in 0,5°C Intervallen) erstellt. Diese sichert, dass es innerhalb einer Probe auch nur ein Produkt gab.

Das Quantifizierungsprinzip nutzt die Kinetik der PCR-Reaktion. Die exponentielle Vermehrung von cDNA-Molekülen findet in den früheren Zyklen statt. In den späteren Zyklen wird die Vermehrung immer linearer aufgrund steigender Störgrößen. Der Kurvenverlauf des Fluoreszenzsignals wird deshalb als sigmoidal bezeichnet. Ist die Vermehrung zu dem Zeitpunkt, an dem sich das Fluoreszenzsignal signifikant vom Hintergrund hebt, noch exponentiell, so wird ein Zykluswert  $C_T$ -Wert (*Cycle threshold*) bestimmt. Dieser Wert wurde für alle eingesetzten Proben ermittelt und über die durch den Plasmidstandard erhaltene Regressionsgerade in Molekülzahlen umgerechnet. Die Berechnung der relativen Transkriptmengen eines Zielgens erfolgte in Bezug auf das Referenzgen *GAPDH*.

### **3.2.7 Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA und DNA**

Zur analytischen und präparativen Trennung von RNA- und DNA-Fragmenten wurden großporige Agarosegele genutzt. Die Fragmente wandern in Abhängigkeit mit einer unterschiedlichen Geschwindigkeit durch ein Spannungsfeld.

Es wurden Agarosegele mit 1,2 bis 2,0 % Agarose mit TAE-Puffer in DEPC- (RNA) bzw. destilliertem Wasser (DNA) und hergestellt. Die Agarose wurde in 1-fach TAE aufgekocht und nach dem Abkühlen auf ca. 60°C mit Ethidiumbromid versetzt und in Gelschlitten gegossen. Zu Bestimmung der RNA- bzw. DNA-Fragmentgröße wurde eine DNA-Leiter aufgetragen. Die Proben wurden vor der gelelektrophoretischen Auftrennung in einer horizontalen Gelkammer mit 6-fach Ladepuffer versetzt. Nach der Auftrennung wurden die RNA bzw. DNA unter dem UV-Licht sichtbar gemacht und mittels Videokamera und der BioCaptMW Software dokumentiert.

#### Agarosegel:

Agarose	1,0 bzw. 1,8 g
1-fach TAE-Puffer	100 mL
Ethidiumbromid	3 µL

#### 6-fach Ladepuffer:

Glycerin	3 mL
1-fach TAE-Puffer	7 mL
Xylencyanol	0,025 g

#### 10-fach TAE-Puffer (TRIS-Azetat-EDTA-Puffer):

TRIS	48,4 g
Eisessig	11,4 mL
<u>EDTA (0,5 M)</u>	<u>20 mL</u>
dest. H <sub>2</sub> O	ad 1000 mL

### **3.2.8 Eluierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten konnte anhand einer mitgeführten DNA-Leiter bestimmt werden. Das PCR-Fragment wurde aus dem Agarosegel unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten, um eine spätere Klonierung oder Sequenzierung des Produkts zu ermöglichen. Die nachfolgende Aufreinigung erfolgte mit dem *QIAquick® Gel Extraction Kit*.

### **3.2.9 Klonierung von DNA-Fragmenten**

Die Klonierung wurde eingesetzt, um ein DNA-Fragment in einen Vektor zu integrieren und es so zu vervielfältigen.

#### **3.2.9.1 Ligation von PCR-Fragmenten**

Die bei der cDNA-Synthese entstandenen 3'-A-Überhänge der cDNA wurden zur Ligation in einen pGEM-T-Vektor mit 5'-T-Überhängen genutzt.

Der folgende Ligationsansatz wurde über Nacht im Wasserbad bei 12°C inkubiert.

#### Ligationsansatz:

cDNA	8 µL
2-fach <i>Rapid Ligation Buffer</i>	10 µL
T4 DNA-Ligase (3 U/µL)	1 µL
pGEM-T-Vektor (50 ng/µL)	1 µL



### 3.2.9.2 Transformation in kompetente Bakterienzellen

Für die Transformation wurden 100 µL kompetente *Escherichia coli* XL-1*blue* Bakterien verwendet und auf Eis aufgetaut. Es wurden 20 µL Ligationsansatz hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation von 20 Minuten auf Eis wurden die Zellen einem Hitzeschock von 45 Sekunden bei 42°C unterzogen und anschließend 2 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte die Zugabe von 400 µL LB-Medium (*lysogeny broth*; autoklaviert). Die Zellsuspension wurde für 30 Minuten bei 37°C schüttelnd inkubiert und je 50-100 µL auf eine Agarplatte, die Ampicillin für die Selektion der Bakterien enthielt, ausplattiert. Die Bakterien wuchsen über Nacht bei 37°C im Brutschrank an.

Für die Herstellung von Agarplatten wurde flüssigem LB-Medium wurde vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar-Agar hinzugefügt. Vor dem Gebrauch wurde dieses erwärmt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Zu 200 mL Medium wurden 4 mL Ampicillin, 800 µL X-Gal und 80 µL IPTG hinzugefügt. Petrischalen wurden gefüllt und die ausgehärteten Agarplatten im Kühlschrank gelagert.

#### LB-Medium (pH 6,4-7,5):

Pepton	10 g
Natriumchlorid	10 g
Hefeextrakt	5 g
dest. H <sub>2</sub> O	ad 1000 mL

#### Stammlösungen:

Ampicillin	10 mg/mL
X-Gal (in Dimethylformamid)	20 mg/mL
IPTG	200 mg/mL

### 3.2.9.3 Selektion und Isolation von Plasmiden aus *E. coli*

Positive Klone wurden anhand der Blau-Weiß-Selektion erkannt. Bakterien die den pGEM-T-Vektor enthalten sind ampicillinresistent und besitzen eine funktionsfähige β-Galaktosidase, die Wirtstamm XL-1*blue* entfernt wurde. pGEM-T-rekombinante *E.coli* setzen daher in Gegenwart des Induktors IPTG das Substrat X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid) hydrolytisch zu Galaktose und 5-Brom-4-Chlor-3-Hydroxyindol um. Letzteres hat die Fähigkeit mit Luftsauerstoff zu oxidieren und zu einem blauen Farbstoff (5,5'Dibrom-4,4'Dichlor-Indigo) zu dimerisieren, wodurch die Bakterienkolonien blau erscheinen. Wird das gewünschte DNA-Fragment in die *multiple cloning site* des Vektors eingebaut, zerstört dies das Leseraster des des *lacZ*-Gens, wodurch keine funktionsfähige β-Galaktosidase gebildet werden kann und die Bakterienkolonien farblos (weiß) bleiben. Weiße Kolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte gepickt und in 5 mL LB-Medium mit 0,1 mg/mL Ampicillin gegeben. Die Bakterien wuchsen über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator an. Die Isolation der Plasmide erfolgte mithilfe des peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I nach Firmenprotokoll.

### 3.2.9.4 Restriktionsverdau von Plasmiden

Zur Kontrolle des Klonierungserfolges und der integrierten Fragmentgröße wurden die rekombinanten Plasmide durch eine doppelte Restriktion mit den Endonukleasen Apal und SacI geschnitten, da es für diese eine spezifische Schnittstelle innerhalb der *multiple cloning site* des pGEMT-Vektors gibt.

#### Restriktionsansatz:

Puffer B	1 µL
Apal (10 U/µL)	0,5 µL
SacI (10 U/µL)	0,5 µL
Plasmid	3 µL
dest.H <sub>2</sub> O	ad 10 µL

Der Plasmidverdau erfolgte für eine Stunde bei 37°C im Wasserbad. Nach der Restriktion wurde der gesamte Ansatz auf ein 1,8 %-iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 3.2.7). Da bei dem Verdau auch ein Teil der *multiple cloning site* des Vektors ausgeschnitten wurde, sind die erhaltenen Fragmente 80 Basenpaare länger als das ligierte DNA-Fragment.

### 3.2.9.5 Sequenzierung der rekombinanten Plasmide

Die Bestimmung der Nukleotidabfolge des gewünschten DNA-Fragments wurde mithilfe des BigDye® Terminator v1.1 *Cycle Sequencing Kits* durchgeführt.

#### Ansatz:

BigDye® Terminator v1.1 <i>Cycle Sequencing</i> RR24	2 µL
BigDye® Terminator v1.1 v3.5x <i>Sequencing Buffer</i>	1,5 µL
T7 Primer (5 pmol/µL)	0,5 µL
Plasmid	2 µL
dest. H <sub>2</sub> O	ad 10 µL

Im Thermozykler wurden folgende Standardbedingungen durchgeführt:

Denaturierung	1 Minuten	96°C	
Denaturierung	10 Sekunden	96°C	} 25 Zyklen
Primerbindung	15 Sekunden	55°C	
Kettenverlängerung	4 Minute	60°C	

Im Anschluss wurde das Produkt der Sequenzreaktion aufgereinigt. 1 µL Natriumazetat (3 M, pH 5,2) und 40 µL 96 %-iger Ethanol wurden zu dem Reaktionsansatz hinzugegeben und gut gemischt, 30 Minuten bei 13000 *rpm* und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet zweimal mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und jeweils für 20 Minuten bei 4°C und 13000 *rpm* zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem Rotations-Vakuum-Konzentration getrocknet. Die automatische Auftrennung am ABI 3100 *Genetic Analyzer C* wurde durch den Sequenzierservice des Zentrums für Medizinische

Grundlagenforschung (ZMG) vorgenommen. Zur Analyse der Sequenzabfolge wurde das *Nucleotide Basic Alignment Search* Programm (BLASTN) verwendet.

### **3.2.9.6 Primer für die PCR**

Um die PCR-basierten Nachweise der transkriptionellen Aktivität Mikrotubulin-assoziiertes Protein 1 Leichte Kette 3 alpha (*LC3*) und mammalian target of rapamycin (*mTOR*) beim Kaninchen durchführen zu können, wurden deren DNA-Sequenzen ermittelt und die Identität überprüft.

Für *LC3* und *mTOR* wurde keine Kaninchensequenz in der *NCBI*-Datenbank gefunden, deshalb diente eine Referenzsequenz (*LC3*: NM\_032514.3; *mTOR*: NM\_004958.3) aus dem humanen Genom als Grundlage. Mittels der spezifischen humanen Primer für das *LC3*- und *mTOR*-Gen wurde die aus Blastozysten des Kaninchens gewonnene cDNA in einer PCR amplifiziert, anschließend kloniert und die erhaltene Plasmid-DNA sequenziert (Kapitel 3.2.9.5). Die Sequenzdaten wurden mit der Datenbank *BLASTN* auf ihre Sequenzidentität zum Kaninchen und Menschen geprüft. Die klonierte Sequenz und die in der Datenbank als putative Mikrotubulin-assoziiertes Protein 1 Leichte Kette 3 alpha-Sequenz geführte DNA (*NCBI*-Eintrag: XM\_008256085.1) waren zu 98 % identisch. Die klonierte Sequenz für *mTOR* und die in der Datenbank als *mechanistic target of rapamycin* geführte DNA (*NCBI*-Eintrag: 100356164) waren zu 99 % identisch. Deshalb wurden die klonierten Fragmente für *LC3* und *mTOR* zur Herstellung eines Plasmidstandards genutzt und in die RTq-PCR eingesetzt.

### **3.2.9.7 Herstellung von Plasmidstandards für die RTq-PCR**

Die rekombinanten Plasmide wurden als DNA-Standard für die quantitative PCR genutzt. Zuerst wurden die Plasmidkonzentration und die Molekülzahl pro 1  $\mu\text{L}$  bestimmt. Aus der Plasmidstammlösung wurde eine Verdünnungsreihe von  $10^8$  bis  $10^4$  Moleküle pro 3  $\mu\text{L}$  hergestellt. Die erstellten Plasmidstandards wurden über das Standardprotokoll der RTq-PCR getestet und ab einer PCR-Effizienz von 90 % für weitere Analysen eingesetzt. Theoretisch kommt es bei jedem Zyklus der PCR zu einer Verdopplung des PCR-Produktes, d.h. die Effizienz der PCR müsste bei 100 % liegen. Durch Einflussfaktoren wie die Matrizenlänge oder die PCR-Bedingungen kann diese Effizienz nicht exakt 100 % betragen. Die Lagerung des Plasmidstandards erfolgte bei  $-20^\circ\text{C}$ . Ein Berechnungsbeispiel ist im Anhang V zu finden.

### **3.2.10 Proteinisolation**

#### **3.2.10.1 Proteinisolation aus Kaninchengewebe**

Fettgewebeproben wurden mit einem Hammer zerkleinert, in 800  $\mu\text{L}$  kaltem RIPA-Puffer aufgenommen und mit 10 Keramikkügelchen versetzt. Die Zellen wurden im *Precylles* für

15 Sekunden aufgeschlossen, 30 Minuten auf Eis inkubiert und 20 Minuten bei 13000 *rpm* und 4°C zentrifugiert. Der Überstand bildeten die Probe zellulärer Proteine.

### 3.2.10.2 Proteinisolation aus Blastozysten

Die wie in Kapitel 3.1.6 generierten Proteinproben wurden auf Eis aufgetaut und mit 10 Keramik-Kügelchen versetzt. Anschließend wurden die Zellen im Precylles 15 Sekunden lang aufgeschlossen, 30 Minuten auf Eis inkubiert und 20 Minuten bei 13000 *rpm* und 4°C zentrifugiert. Der Überstand bildeten die Probe zellulärer Proteine.

#### RIPA-Puffer:

10-fach PBS-Puffer	10 mL
Nonidet P-40	1 mL
Natrium-Deoxycholat	0,5 g
<u>Sodiumdodecylsulfat (SDS 10 %)</u>	<u>100 µL</u>
dest. H <sub>2</sub> O	ad 100 mL

Zu dem RIPA-Puffer wurden vor dem Gebrauch Phosphatase- (2 µL/100 µL) und Protease-Inhibitor (2 µL/100 µL) gegeben.

#### 3.2.10.2.1 Proteinisolation der Kernfraktion von Blastozysten

Das durch die Isolation der zellulären Proteine entstandene Pellet wurde genutzt, um Kernproteine zu gewinnen. Zu dem Pellet wurden 25 µL RIPA-Puffer und 5 µL RS-Puffer (RSB= *Reducing Sample Buffer*) gegeben. Die Proben wurden in einem 5 x 7 Minuten-Programm sonifiziert. Dabei wurde im Wechsel 30 Sekunden sonifiziert und 30 Sekunden auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 15 Minuten bei 13000 *rpm* und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und ohne Bestimmung der Proteinkonzentrationen direkt für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese genutzt.

#### RS-Puffer:

Glycerin	4 mL
SDS (10 %)	4 mL
Mercaptoethanol	0,4 mL
1x TBS	4 mL
<u>Tris-Puffer (1 M, pH 6,8)</u>	<u>4 mL</u>
dest. H <sub>2</sub> O	ad 20 mL

Zu dem RS-Puffer wurde eine Spatelspitze Bromphenolblau hinzugegeben und ein pH-Wert von pH 6,8 eingestellt.

### 3.2.11 Proteinquantifizierung

Die Proteinkonzentration jeder Probe wurde mittels Bradford-Reagenz in Doppelbestimmung gemessen.

Ansatz:

Proteinlösung	1 µL
Bradford-Reagenz	200 µL
dest. H <sub>2</sub> O	800 µL

Der Ansatz wurde gut durchgemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm am Spektrophotometer gemessen. Eine Ansatzprobe ohne Protein diente als Referenz. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer BSA-Eichkurve ermittelt.

**3.2.12 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE trennet Proteine nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch auf. Die Proteinprobe (25 µg) wurde mit SDS-Ladepuffer versetzt und im Wasserbad hitzedenaturiert. Das in dem Ladepuffer enthaltene Sodiumdodecylsulfat (SDS) bindet Proteine zu negativ geladenen Komplexen. Es wurde das diskontinuierliche Lämmli-System mit TRIS-Glycin-Puffer verwendet. Die Proteine durchlaufen zunächst das Sammelgel, indem sie auf eine Lauffront gebracht werden. In dem folgenden Trenngel erfolgt die Auftrennung der Proteine.

	4 % Sammelgel (5 mL)	10 % Trenngel (10 mL)	15 % Trenngel (10 mL)
H <sub>2</sub> O	3,4 mL	4,0 mL	2,3 mL
Acrylamid (30 %)	0,83 mL	3,3 mL	5,0 mL
TRIS-Puffer (1 M, pH 6,8)	0,63 mL	-	-
TRIS-Puffer (1,5 M, pH 8,8)	-	2,5 mL	2,5 mL
SDS (10 %)	0,05 mL	0,1 mL	0,1 mL
APS (10 %)	0,05 mL	0,1 mL	0,1 mL
TEMED	0,005 mL	0,004 mL	0,004 mL

Die Substanzen für das Trenngel (10 % bzw. 15 % für Kernproteine) wurden gemischt und in die Gelkassette auf eine dreiviertel Höhe gefüllt. Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) sind Katalysatoren der Polymerisationsreaktion. Das Trenngel wurde mit Wasser überschichtet und nach einer Aushärtungszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Sammelgel bis zum oberen Rand der Gelkassette gegossen. Ein Taschenkamm wurde eingesetzt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde die Gelkassette in die NOVEX Elektrophoresekammer gestellt, der Taschenkamm gezogen und die Taschen gründlich mit 1-fach Laufpuffer gespült. Zu den Proteinproben (25 µg) wurden 5 µL 5-fach SDS-Ladepuffer zugegeben. Danach wurden die Proben für 10 Minuten bei 70°C denaturiert und in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Die angelegte Spannung betrug 120 V für

30 Minuten. Hatten sich die Proben in einer Lauffront gesammelt, wurde die Spannung auf 180 V erhöht. Zur Größenbestimmung der Proteine wurden zwei Proteinmarker (SM0671 und SM1851) mitgeführt.

10-fach Lauffpuffer nach Laemmli:

TRIS	30,25 g
Glycin	144,25 g
SDS	10 g
dest. H <sub>2</sub> O	ad 1000 mL

5-fach SDS-Ladepuffer:

Glycerin	25 mL
TRIS-Puffer (1 M, pH 6,8)	15,62 mL
β-Mercaptoethanol	5 mL
SDS	5 g

Bromphenolblau 2,5g

dest. H <sub>2</sub> O	ad 1000 mL
------------------------	------------

### 3.2.13 Western-Blot

Die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran mittels Semidry-Blotverfahren übertragen. In den verschiedenen konzentrierten Transferpuffern war 20 % Methanol enthalten, was als Aktivator der Proteinbindungsstellen auf der Membran dient. Das Blot-Verfahren beruht auf einem senkrecht auf das Polyacrylamidgel gerichteten elektrischen Feld. Die Proteinbindung auf der Membranoberfläche erfolgte durch hydrophobische Wechselwirkungen. Der Aufbau des Blots entstand aus 8 auf eine Größe von 8 x 7,5 cm gebrachten Whatman™ Filterpapieren. Diese wurden zuvor in die verschiedenen Transferpuffer getränkt. Die einzelnen Komponenten wurden frei von Luftblasen aufeinander gelegt.

Die Blot-Apparatur wurde gekühlt und der Transfer erfolgte bei einer Spannung von 150 mA für zwei Stunden. Im Anschluss wurde die Nitrozellulosemembran mit Ponceau S gefärbt, um die Proteine auf der Membran sichtbar zu machen und diente als Kontrolle der Transfereffizienz. Das Bandenmuster der Proteine wurde durch eine Aufnahme oder Kopie dokumentiert. Anschließend wurde die Membran mehrfach mit destilliertem Wasser gewaschen bis sie vollständig entfärbt war.

	Transferpuffer 1	Transferpuffer 2	Transferpuffer 3
TRIS	36,3 g (300 mM)	3 g (25 mM)	3 g (25 mM)
Methanol (100 %)	200 mL	200 mL	200 mL
ε-Aminocarbonsäure	-	-	5,2 g (40 mM)
dest. H <sub>2</sub> O	ad 1000 mL	ad 1000 mL	ad 1000 mL

### 3.2.14 Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern

Die Nitrozellulosemembran wurde zur Verhinderung von unspezifischen Proteinbindungsstellen mit einer Magermilchpulver-TBST-Lösung oder mit zusätzlich BSA für 2h bei Raumtemperatur abgesättigt (Tab. 3). Die Membran wurde mit dem jeweilig verdünnten Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurde dreimal für 10 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen und der jeweilige Sekundärantikörper für zwei Stunden auf die Membran gegeben. Es folgten wiederholende Waschschrte von 3 x 10

Minuten in TBST-Puffer und 2 x 5 Minuten mit TBS-Puffer, um ungebundene Antikörper zu entfernen. TBS-Puffer wurde für die letzten Waschschrte verwendet, um eine erfolgreiche Detektionsreaktion zu ermöglichen.

TBS-Puffer:

TRIS-Puffer (1,5 M, pH 7,5) 10 mL  
 NaCl 5,8 g  
 dest. H<sub>2</sub>O ad 1000 mL

Der TBS-Puffer wurde zu Herstellung von TBST-Puffer noch 1 mL/L Tween® 20 beigemischt.

Eine Abweichung des Standardprotokolls zur Hybridisierung ergab sich bei dem Antikörper Maus-anti-p-p70-S6K. Die Blockierung der Membran erfolgte über Nacht (ü.N.) bei 4°C in einer 5 % Magermilchlösung. Der Primärantikörper wurde anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, es folgte Waschen und die Inkubation des Sekundärantikörpers für zwei Stunden bei Raumtemperatur.

**Tab. 3: Verwendete Primärantikörper und zugehörige Sekundärantikörper im Western-Blot.**

Blockierung	Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Sekundär-antikörper	Verdünnung
5 % Milch ü. N. 4°C	anti-p-p70-S6K	Maus	1:5000 in 5 % Milch/TBST	Anti-Maus-IgG, HRP-konjugiert	1:45000 in 3 % BSA/TBST
5 % Milch 2 h RT	anti-RPS6KB1	Maus	1:1000 in 5 % Milch/TBST	Anti-Maus-IgG, HRP-konjugiert	1:20000 in 3 % BSA/TBST
2 % Milch 2h RT	anti-p-mTOR	Kaninchen	1:750 in 5 % BSA/TBS	Anti-Kaninchen, HRP-konjugiert	1:6000 in 3 % BSA/TBST
2 % Milch 2h RT	anti-mTOR	Kaninchen	1:500 in 5 % BSA/TBS	Anti-Kaninchen, HRP-konjugiert	1:12000 in 3 % BSA/TBST
5 % BSA und 1 % Milch 2h RT	anti-BCAT2	Maus	1:500 in 3 % BSA/TBS	Anti-Maus-IgG, HRP-konjugiert	1:10000 in 3 % Milch
5 % Milch 2h RT	anti-p-FoxO1	Kaninchen	1:250 in 5 % Milch	Anti-Kaninchen, HRP-konjugiert	1:6000 in 3 % BSA/TBST
5 % Milch 2h RT	anti-FoxO1	Kaninchen	1:250 in 5 % Milch	Anti-Kaninchen, HRP-konjugiert	1:6000 in 3 % BSA/TBST
5 % Milch 2h RT	anti-p62	Kaninchen	1:500 in 5 % BSA	Anti-Kaninchen, HRP-konjugiert	1:6000 in 3 % BSA/TBST
3 % Milch 2h RT	anti-p4E-BP1	Kaninchen	1:1000 in 3 % BSA	Anti-Kaninchen, HRP-konjugiert	1:6000 in 3 % BSA/TBST
3 % Milch 2h RT	anti-4E-BP1	Kaninchen	1:1000 in 3 % BSA	Anti-Kaninchen, HRP-konjugiert	1:6000 in 3 % BSA/TBST
3 % Milch 2h RT	anti-β-Aktin	Maus	1:40000 in 3 % BSA/TBST	Anti-Maus-IgG, HRP-konjugiert	1:45000 in 3 % BSA/TBST
5 % Milch 2 h RT	anti-H3	Kaninchen	1:5000 in 5 % Milch/TBST	Anti-Maus-IgG, HRP-konjugiert	1:12000 in 3 % BSA/TBST

### 3.2.15 Detektion und Auswertung

Die immunologisch markierten Proteine wurden über eine Chemilumineszenzreaktion sichtbar gemacht. Diese wurde von der an dem Sekundärantikörper gekoppelten

Meerrettichperoxidase (HRP) katalysiert. Dafür wurde das Immobilon™ *Western Detection Reagent* (Millipore, Schwalbach) nach Herstellerangaben auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Die Detektion dieser Reaktion erfolgte über das *Chemi DocIt Imaging System*. Die densitometrische Analyse erfolgte über die *LabWorks™ Image Acquisition and Analysis Software*. Über die Schwärzung der einzelnen Proteinbanden konnte die Menge in optische Einheiten und daraus die relative Proteinmenge abgeleitet werden. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin oder H3 (für Kernproteine). Die Intensität der zu untersuchenden Proteine wurde in Bezug zu den Aktinmengen gesetzt. Da die Phosphorylierungsstatus von mTOR, der S6 Kinase 1, dem 4E-Bindeprotein 1 und FoxO1 untersucht werden sollten, wurde die Intensität des nicht-phosphorylierten Proteins in das relative Verhältnis zu der Intensität des phosphorylierten Proteins gesetzt.

### 3.2.16 Abwaschen der Nitrozellulosemembran

Um eine Membran für weitere Western-Blots nutzen zu können wurden die gebundenen Antikörper abgewaschen (*stripping*). Hierfür wurde die Membran in *stripping*-Puffer für 10 Minuten bei 70°C im Hybridisierungsöfen schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Membran kurz mit TBST-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran erneut abgesättigt und mit einem neuen Primärantikörper hybridisiert.

#### stripping-Puffer:

SDS (10 %)	10 mL
TRIS-Puffer (1 M, pH 6,8)	6,25 mL
<u><math>\beta</math>-Mercaptoethanol</u>	<u>0,35 mL</u>
dest. H <sub>2</sub> O	ad 50 mL

### 3.3 **Bestimmung der zellulären Proteinsyntheseaktivität in Blastozysten**

Für die Bestimmung von neu entstandenen Proteinen auf zellulärer Ebene wurde die sensitive, nichttoxische und nichtradioaktive Methode des *Click-iT® HPG Alexa Fluor® 488 Protein Synthesis Assay Kits* verwendet. *Click-iT® L*-Homopropargylglycin (*Click-iT® HPG*) ist ein Aminosäureanalogon von Methionin, was eine funktionelle Alkingruppe trägt. *Click-iT® HPG* wird zu der jeweiligen Zellkultur hinzugegeben, um in Proteine während einer aktiven Proteinsynthese eingebaut zu werden. Die Detektion der Aminosäureinkorporation geschieht über eine chemoselektive Ligation, die *Click*-Reaktion zwischen Alkin- und Azidgruppe. Alkinmodifizierte Proteine können so über die Verwendung eines Alexa Fluor® 488-Azids detektiert und über Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden.

Die ausgespülten Blastozysten wurden morphologisch beurteilt und jeweils 3 Blastozysten des Gastrulationsstadiums 2 von nicht-diabetischen und diabetischen Kaninchen in Standardkulturmedium ohne Methionin adaptiert. Anschließend wurden die Blastozysten in 1 mL methioninfreies Standardkulturmedium mit 1:1000 Komponente A (*Click-iT® HPG*)



aus dem Proteinsynthesekit überführt und für eine Stunde kultiviert. Als Kontrolle wurden jeweils 2 Blastozysten pro Gruppe ohne *Click-iT*<sup>®</sup> HPG kultiviert.

Nach der Kultur wurden die Blastozysten in kaltem 0,05 % PVA/PBS gewaschen und für 15 Minuten in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Anschließend wurden die Blastozysten gewaschen, die *Zona pellucida* entfernt und Proben von Trophoblastzellen mit einer Mikroschere unter einer Stereolupe ausgeschnitten. Die Trophoblastproben wurden in 1 % BSA gelöst in PBS/PVA mit 0,1 % Triton X-100 für 30 Minuten blockiert. Nach mehrmaligem Waschen in 0,05 % PVA/PBS wurden die Trophoblastproben mit dem im Firmenprotokoll beschriebenen Reaktionsgemisch für 45 Minuten im Dunkeln schüttelnd inkubiert. Die Einzelkomponenten des Reaktionsgemisch waren im *Kit* enthalten und mussten wie folgt gemischt werden.

Reaktionsgemisch:

Reaktionspuffer	2,15 mL
CuSO <sub>4</sub>	100 µL
Alexa-Fluorazid	6,25 µL
additiver Puffer	250 µL

Nach der Inkubation wurden die Trophoblasten gewaschen und die Zellkerne mit dem im *Kit* enthaltenen *Nuclear Mask*<sup>™</sup> *Blue Stain* (1:2000 in 0,05 % PVA/PBS) für 30 Minuten gegengefärbt. Zum Schluss wurden die Trophoblasten auf einen Objektträger mittels Mowiol<sup>®</sup> 4-88 gebettet, mit einem Wolframdraht eben gelegt und mit einem Deckglas bedeckt. Die Objektträger wurden über Nacht getrocknet und die Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei +4°C.

### **3.3.1 Bestimmung der zellulären Proteinsyntheseaktivität in *in vitro* kultivierten Blastozysten mit und ohne BCAA**

Die Proteinsyntheseaktivität wurde in *in vitro* kultivierten Blastozysten mit und ohne BCAA untersucht. Dabei wurde das Kulturschema aus Kapitel 3.1.8.9 für die Kultur mit oder ohne BCAA wie folgt verändert. Die gespülten und gewaschenen Blastozysten wurden zunächst für zwei Stunden in methioninfreiem Kulturmedium mit oder ohne BCAA kultiviert. Anschließend wurden die Blastozysten mit 1:1000 Komponente A (*Click-iT*<sup>®</sup> HPG) aus dem Proteinsynthesekit für weitere vier Stunden in methioninfreiem Kulturmedium mit oder ohne BCAA kultiviert. Als Kontrolle wurden jeweils 2 Blastozysten pro Gruppe ohne *Click-iT*<sup>®</sup> HPG kultiviert. Das Abstoppen der Kultur und die weitere Behandlung der Proben erfolgte wie unter Kapitel 3.3 beschrieben.

### **3.3.2 Mikroskopische Auswertung und Quantifizierung**

Die mikroskopischen Aufnahmen der Trophoblastenproben wurden mit dem invertierten Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop BZ-8000 durchgeführt. In dem Messspektrum bei den Wellenlängen 488/519 nm [Anregung/Emission] konnte das Fluoreszenzsignal des

grün-fluoreszierenden Produkts der *Click*-Reaktion bestimmt werden. Von jeder Trophoblastprobe wurden zwei verschiedene Positionen im *Z-stack*-Modus aufgenommen. Es wurden 12 bis 15 Aufnahmen einer Position dokumentiert und konnten später übereinander gelagert werden. Alle mikroskopischen Schritte wurden für die Negativkontrollen und Behandlungsgruppen gleich durchgeführt. Es wurden dieselben mikroskopischen Einstellungen genutzt.

Die Intensität der Grünfluoreszenz wurde anschließend mit der Analysesoftware Velocity 3D untersucht. Dafür wurden die Einzelbilder des *Z-stacks* übereinander gelagert. Für alle untersuchten Trophoblastbereiche wurde eine definierte Flächengröße bestimmt, um die Fluoreszenzintensität über den Softwarealgorithmus zu quantifizieren.

### **3.4 Fluoreszenzfärbung von Lysosomen in Blastozysten**

In den Zellen der Blastozysten wurden die Lysosomen durch *LysoTracker<sup>R</sup> Deep Red* markiert und visualisiert. Der Einsatz der Methode erfolgte nach Herstellerangaben mit der Anpassung an die Embryonenkultur. Dafür wurden Blastozysten des Gastrulationsstadiums 2 nicht-diabetischer und diabetischer Kaninchen mit 100 nM *LysoTracker<sup>R</sup> Deep Red* in Standardkulturmedium für zwei Stunden kultiviert. Es wurden jeweils 3 Blastozysten pro Gruppe kultiviert. Als Negativkontrolle wurden zwei Blastozysten in jeder Versuchsgruppe ohne *LysoTracker<sup>R</sup> Deep Red* inkubiert. Nach der Kultur wurden die Blastozysten in 0,05 % PVA/PBS gewaschen und für 15 Minuten in 4 % PFA fixiert. Unter eine Stereolupe wurde die *Zona pellucida* entfernt und der Trophoblast mit einer Mikroschere ausgeschnitten. Die Häutchenpräparate wurden mit Hoechst (1:200 in 0.05 % PVA/PBS) für 30 Minuten im Dunkeln gegengefärbt. Die Objekte wurden auf einen Objektträger mit Mowiol® 4-88 gebettet, mit einem Wolframdraht eben gelegt, mit einem Deckglas bedeckt und über Nacht getrocknet. Die Lagerung der Objekte erfolgte im Kühlschrank bei +4°C bis zur mikroskopischen Analyse.

#### **3.4.1 Bestimmung der Fluoreszenzfärbung von Lysosomen in *in vitro* kultivierten Blastozysten mit und ohne BCAA**

Die Fluoreszenzfärbung von Lysosomen wurde in *in vitro* kultivierten Blastozysten mit und ohne BCAA untersucht. Dabei wurde das Kulturschema aus Kapitel 3.1.8.9 für die Kultur mit oder ohne BCAA wie folgt verändert. Die gespülten und gewaschenen Blastozysten wurden zunächst für vier Stunden in Kulturmedium mit oder ohne BCAA kultiviert. Anschließend wurden die Blastozysten mit 100 nM *LysoTracker<sup>R</sup> Deep Red* für weitere zwei Stunden in Kulturmedium mit oder ohne BCAA kultiviert. Als Kontrolle wurden jeweils 2 Blastozysten pro Gruppe ohne *LysoTracker<sup>R</sup> Deep Red* kultiviert. Das Abstoppen der Kultur und die weitere Behandlung der Proben erfolgte wie unter Kapitel 3.4 beschrieben.

### **3.4.2 Mikroskopische Auswertung und Quantifizierung**

Die mikroskopischen Aufnahmen der Trophoblasten wurden mit einem konfokalen TCS SP5 LSM-Mikroskop der *Core Facility Imaging (CFI)* der Martin-Luther-Universität durchgeführt. In dem Messspektrum bei den Wellenlängen 573/592 nm [Anregung/Emission] konnte das Fluoreszenzsignal des rot-fluoreszierenden Produkts der Lysosomenfärbung mithilfe des Diodenlasers 561 nm bestimmt werden. Für die Aufnahmen wurde ein Objektiv mit einer Vergrößerung von 63x mit Öl verwendet. Von jeder Trophoblastenprobe wurden drei verschiedene Positionen als Z-Serie mit 12 bis 15 Aufnahmen einer Position aufgenommen. Alle mikroskopischen Schritte wurden für die Negativkontrollen und Behandlungsgruppen gleich durchgeführt. Es wurden dieselben mikroskopischen Einstellungen genutzt.

Die Anzahl der gefärbten Lysosomen und die Intensität der Rotfluoreszenz wurde anschließend mit der Analysesoftware Volocity 3D untersucht. Dafür wurden die Einzelbilder des Z-stacks übereinander gelagert. Für alle untersuchten Trophoblastbereiche wurden mithilfe der Software einzelne Zellen ausgeschnitten und die lysosomalen Vesikel, die rot gefärbt waren, in einem Größenbereich von 0,01 bis 8  $\mu\text{m}^3$  gezählt. So konnte pro Trophoblastzelle die Lysosomenanzahl direkt bestimmt werden.

Die Intensität der Rotfluoreszenz wurde in den ausgewählten lysosomalen Vesikeln als totales Vesikelvolumen pro Zelle über den Softwarealgorithmus bestimmt.

### **3.5 Statistische Analyse**

Für alle statistischen Auswertungen wurde das Programm SigmaPlot® 11 verwendet. Handelte es sich bei den Daten um eine Normalverteilung wurden diese mithilfe des zweiseitigen t-Tests auf Signifikanz analysiert. Herrschte keine Normalverteilung vor, so wurden die Daten mittels eines U-Tests, (*Wilcoxon rank sum* Test) auf signifikante Ereignisse untersucht. Weiterhin wurde die zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) zur Auswertung der Stimulationsversuche mit mehreren Blastozystengruppen genutzt. Die zweifaktorielle Varianzanalyse bezieht zur Analyse der Zielvariablen zwei Faktoren mit ein. Dabei wurden die Zeit und der verwendete Stimulus als Einflussfaktoren berücksichtigt.

Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt gekennzeichnet: Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  kleiner als 5 % (\*- $p < 0,05$ );  $p$  kleiner als 1 % (\*\*- $p < 0,01$ );  $p$  kleiner als 0,1 % (\*\*\*- $p < 0,001$ ). Alle Werte wurden als Mittelwerte und Standardfehler angegeben ( $Mw \pm SEM$ ). Die Anzahl der unabhängigen Versuche wird mit  $N$  markiert, wobei  $n$  die Probenanzahl kennzeichnet. Alle analysierten Werte wurden relativ auf den Kontrollwert  $n1 = 100\%$  bezogen, wobei  $n1$  je ein Probenwert der jeweiligen Kontrollgruppe darstellte. Durch diese Bezugsweise konnte die Variabilität in der Kontrollgruppe einbezogen und dargestellt werden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Vergleich der Futtermittelaufnahme diabetischer Kaninchen in der Präimplantationsphase

Um den Einfluss eines Typ 1 Diabetes mellitus auf das Körpergewicht und die Futtermittelaufnahme der Versuchstiere untersuchen zu können, wurden das Gewicht der Kaninchen und der Futtermittelverzehr täglich ermittelt. Körpergewicht, Futtermittelaufnahme, metabolische Lebendmasse und Futtermittelverwertung der Versuchstiere wurden für den Zeitraum von der Verpaarung bis 6 Tage *p.c.* erfasst bzw. errechnet (Tab. 4, Rechnung Anhang VI).

Es ergab sich kein Unterschied im Körpergewicht und der täglichen Futtermittelaufnahme von diabetischen und gesunden Kaninchen. Auch bei der Analyse der metabolischen Lebendmasse (LM) und der Futtermittelverwertung (Fuve) konnte keine Veränderung durch einen Typ 1 Diabetes mellitus festgestellt werden.

**Tab. 4: Körpergewicht, Futtermittelaufnahme, metabolische Lebendmasse (LM) und Futtermittelverwertung (Fuve) von nicht-diabetischen (ND) und diabetischen (T1DM) Kaninchen.** Die Ergebnisse sind als Mittelwerte in Gramm dargestellt. (Mw  $\pm$  SEM; N=3; n<sub>ND</sub>=15; n<sub>T1DM</sub>=22)

	ND	T1DM
Körpergewicht	4332,19 $\pm$ 115,79	4121,45 $\pm$ 62,55
Futtermittelaufnahme/Tag	251,27 $\pm$ 9,44	250,43 $\pm$ 4,87
metabol. LM g	3280 $\pm$ 90	3100 $\pm$ 50
g Fuve/kg LM	57,66 $\pm$ 1,85	60,92 $\pm$ 1,12
g Fuve/kg LM 0,75	76,88 $\pm$ 2,46	81,23 $\pm$ 1,89

### 4.2 Bestimmung der freien Aminosäuren im Blutplasma, Uterussekret und Blastozystenhöhlenflüssigkeit

Der Gehalt von freien Aminosäuren wurde im maternalen Plasma und Uterussekret, sowie in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit des Kaninchens am Tag 6 der Gravidität mittels HPLC bestimmt. Es wurden Proben von gesunden und diabetischen Tieren analysiert und verglichen. Die Konzentrationen von Asparaginsäure und Glutaminsäure wurden nicht in die Auswertung einbezogen, da das Chromatogramm für diese Aminosäuren Peaks mit doppelter Spitze zeigten bzw. die Nachweisgrenze für die Konzentration bei vielen Proben erreicht war. Ein Chromatogramm für eine Plasmaprobe ist im Anhang VII hinterlegt.

#### 4.2.1 Aminosäuregehalt des Blutplasmas bei Kaninchen am Tag 6 *p.c.*

Im Blutplasma gravider Kaninchen konnten die Konzentrationen von 9 essentiellen und 9 nicht-essentiellen Aminosäuren quantifiziert werden (Tab. 5). Insgesamt waren 12 Aminosäuren in ihrer Konzentration durch einen Typ 1 Diabetes mellitus verändert (Tab. 5). Die Konzentrationen von Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin und Phenylalanin waren im

Plasma diabetischer Kaninchen höher, während die Konzentrationen der Aminosäuren Serin, Glutamin, Glycin, Arginin, Tyrosin, Tryptophan und Lysin niedriger als bei gesunden Tieren waren. Fünf essentielle Aminosäuren waren durch einen Typ 1 Diabetes mellitus verändert. Dabei zeigten die verzweigtkettigen, aliphatischen Aminosäuren (BCAA) Valin, Isoleucin und Leucin die stärkste Abweichung. Ihre Konzentrationen waren um das 3-fache erhöht.

**Tab. 5: Konzentrationen (C) freier Aminosäuren im Plasma nicht-diabetischer (ND) und diabetischer (T1DM) Kaninchen am 6. Tag p.c..** Bei signifikanten Abweichungen der Werte zwischen beiden Gruppen sind der p-Wert und die relative Abweichung (*fold change*) angegeben. (Mw  $\pm$  SEM; N=3; n=11)

	ND	T1DM		
Aminosäure	C in [mM]	C in [mM]	p-Wert	fold change
<b>essentiell</b>				
Histidin	0,118 $\pm$ 0,003	0,116 $\pm$ 0,003		
Threonin	0,201 $\pm$ 0,011	0,248 $\pm$ 0,012		
Methionin	0,081 $\pm$ 0,004	0,089 $\pm$ 0,006		
Tryptophan	0,062 $\pm$ 0,002	0,055 $\pm$ 0,002	0,024	0,87
Phenylalanin	0,054 $\pm$ 0,001	0,061 $\pm$ 0,002	0,032	1,13
Lysin	0,203 $\pm$ 0,011	0,169 $\pm$ 0,007	0,02	0,83
Valin	0,241 $\pm$ 0,014	0,674 $\pm$ 0,095	0,001	2,8
Isoleucin	0,080 $\pm$ 0,005	0,231 $\pm$ 0,040	0,001	2,89
Leucin	0,108 $\pm$ 0,007	0,323 $\pm$ 0,057	0,001	2,99
<b>nicht-essentiell</b>				
Asparagin	0,106 $\pm$ 0,005	0,091 $\pm$ 0,008		
Serin	0,247 $\pm$ 0,006	0,209 $\pm$ 0,012	0,014	0,85
Glutamin	0,836 $\pm$ 0,023	0,527 $\pm$ 0,017	0,001	0,63
Glycin	0,903 $\pm$ 0,041	0,500 $\pm$ 0,042	0,001	0,55
Arginin	0,211 $\pm$ 0,016	0,112 $\pm$ 0,014	0,001	0,53
Alanin	0,355 $\pm$ 0,028	0,624 $\pm$ 0,065	0,01	1,75
Taurin	0,128 $\pm$ 0,023	0,092 $\pm$ 0,009		
Tyrosin	0,079 $\pm$ 0,002	0,053 $\pm$ 0,002	0,001	0,68
Ornithin	0,063 $\pm$ 0,003	0,085 $\pm$ 0,013		

#### 4.2.2 Aminosäuregehalt im Uterussektret bei Kaninchen am Tag 6 p.c.

Die Konzentrationen der freien Aminosäuren wurden im Uterussektret von 8 nicht-diabetischen, gesunden und 7 diabetischen Kaninchen am Tag 6 p.c. gemessen (Tab. 6). Die Konzentrationen von Asparagin und Histidin konnten nicht bestimmt werden, da für diese *Peaks* mit doppelter Spitze bzw. ein nicht eindeutiges Signal im Chromatogramm auftraten.

Die Konzentrationen von Threonin, Valin, Isoleucin, Leucin, Glutamin, Arginin, Alanin und Taurin waren im Uterussektret diabetischer Kaninchen höher als bei nicht-diabetischen Kaninchen.

**Tab. 6: Konzentrationen (C) freier Aminosäuren im Uterussektret nicht-diabetischer (ND) und diabetischer (T1DM) Kaninchen am 6. Tag p.c..** Bei signifikanten Abweichungen der Werte zwischen beiden Gruppen sind der p-Wert und die relative Abweichung (*fold change*) angegeben. (Mw  $\pm$  SEM; N=4; n<sub>ND</sub>=8; n<sub>T1DM</sub>=7)

	ND	T1DM		
Aminosäure	C in [mM]	C in [mM]	p-Wert	fold change
<b>essentiell</b>				
Threonin	0,651 $\pm$ 0,050	0,803 $\pm$ 0,043	0,043	1,23
Methionin	0,205 $\pm$ 0,026	0,213 $\pm$ 0,018		
Tryptophan	0,048 $\pm$ 0,003	0,050 $\pm$ 0,005		
Phenylalanin	0,151 $\pm$ 0,020	0,164 $\pm$ 0,015		
Lysin	0,355 $\pm$ 0,034	0,342 $\pm$ 0,029		
Valin	0,350 $\pm$ 0,033	0,573 $\pm$ 0,062	0,002	1,63
Isoleucin	0,157 $\pm$ 0,019	0,238 $\pm$ 0,029	0,032	1,51
Leucin	0,269 $\pm$ 0,023	0,454 $\pm$ 0,055	0,017	1,69
<b>nicht-essentiell</b>				
Serin	1,994 $\pm$ 0,148	2,032 $\pm$ 0,141		
Glutamin	0,046 $\pm$ 0,008	0,100 $\pm$ 0,022	0,04	2,15
Glycin	34,964 $\pm$ 3,136	41,073 $\pm$ 1,660		
Arginin	0,181 $\pm$ 0,025	0,262 $\pm$ 0,027	0,021	1,44
Alanin	4,307 $\pm$ 0,413	6,884 $\pm$ 0,267	0,001	1,60
Taurin	0,733 $\pm$ 0,066	1,008 $\pm$ 0,098	0,033	1,37
Tyrosin	0,176 $\pm$ 0,018	0,148 $\pm$ 0,015		
Ornithin	0,076 $\pm$ 0,016	0,054 $\pm$ 0,005		

#### 4.2.3 Aminosäuregehalt in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit am Tag 6 p.c.

Die Analyse der freien Aminosäuren wurde in 5  $\mu$ l Blastozystenhöhlenflüssigkeit von einzelnen Blastozysten durchgeführt. Die Blastozysten wurden nach ihrem Gastrulationsstadium (Stadium 1 und 2) und nach ihrer Herkunft aus nicht-diabetischen bzw. diabetischen Kaninchen gruppiert (Tab. 7).

##### 4.2.3.1 Vergleich der Aminosäurekonzentrationen in Blastozysten des Gastrulationsstadiums 1 und 2

In Blastozysten gesunder Kaninchen stieg die Konzentration von Ornithin vom Gastrulationsstadium 1 zu 2 um das 2-fache an (Tab. 7). Es ergaben sich keine weiteren entwicklungspezifischen Unterschiede der freien Aminosäuren in Blastozysten gesunder Kaninchen.

In Blastozysten von diabetischer Kaninchen waren die Konzentrationen von insgesamt 6 Aminosäuren (Asparagin, Serin, Histidin, Threonin, Tyrosin und Ornithin) im Gastrulationsstadium 2 verglichen mit Gastrulationsstadium 1 erhöht (Tab. 7).

##### 4.2.3.2 Vergleich der Aminosäurekonzentrationen in Blastozysten gesunder und diabetischer Kaninchen

Im Gastrulationsstadium 1 ergab der Vergleich von Blastozysten nicht-diabetischer (gesunder) und diabetischer Kaninchen Veränderungen von 8 Aminosäuren (davon 3 essentielle und 5 nicht-essentielle). Blastozysten diabetischer Kaninchen zeigten eine

signifikante Reduktion der Tyrosinkonzentration im Vergleich zu Blastozysten gesunder Kaninchen. Gleichzeitig waren die Konzentrationen von Glutamin, Glycin, Alanin, Taurin, Valin, Isoleucin und Leucin in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit von Blastozysten diabetischer Kaninchen erhöht (Tab. 7). Die BCAA zeigten in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit, im maternalen Plasma und im Uterussektret die höchsten Konzentrationsunterschiede verursacht durch den maternalen Diabetes mellitus. Die embryonalen BCAA-Konzentrationen waren um das 2- bis 3-fache erhöht, wobei andere essentielle Aminosäuren unbeeinflusst blieben.

Im Gastrulationsstadium 2 waren die Konzentrationen von insgesamt 10 Aminosäuren (davon 4 essentielle und 6 nicht-essentielle) in Blastozysten diabetischer Kaninchen verändert (Tab. 7). Die Tyrosinkonzentration war in Blastozysten diabetischer Kaninchen signifikant verringert. Die nicht-essentiellen Aminosäuren Glutamin, Glycin, Arginin, Alanin und Taurin sowie die essentiellen Aminosäuren Lysin und die BCAA zeigten signifikante Konzentrationserhöhungen, wobei die BCAA wiederum die stärkste Konzentrationszunahme aufwiesen.

**Tab. 7: Konzentrationen freier Aminosäuren in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit (BF) von Blastozysten des Gastrulationsstadium 1 und 2 nicht-diabetischer (ND) und diabetischer (T1DM) Kaninchen.** (Mw  $\pm$  SEM; N=3; n=11; **a** – signifikanter Unterschied zwischen nicht-diabetisch und diabetisch ( $p < 0.05$ ); **b** – signifikanter Unterschied zwischen den Gastrulationsstadien 1 und 2 ( $p < 0.05$ ))

Aminosäure	Aminosäurenkonzentration C in [mM]			
	BF Gastrulationsstadium 1		BF Gastrulationsstadium 2	
	ND	T1DM	ND	T1DM
<b>essentiell</b>				
Histidin	0,094 $\pm$ 0,013	0,080 $\pm$ 0,007	0,094 $\pm$ 0,007	0,112 $\pm$ 0,009 <b>b</b>
Threonin	0,337 $\pm$ 0,025	0,302 $\pm$ 0,028	0,387 $\pm$ 0,022	0,453 $\pm$ 0,021 <b>b</b>
Methionin	0,113 $\pm$ 0,020	0,114 $\pm$ 0,023	0,143 $\pm$ 0,023	0,116 $\pm$ 0,015
Tryptophan	0,050 $\pm$ 0,004	0,040 $\pm$ 0,03	0,055 $\pm$ 0,005	0,048 $\pm$ 0,006
Phenylalanin	0,066 $\pm$ 0,005	0,054 $\pm$ 0,003	0,073 $\pm$ 0,006	0,067 $\pm$ 0,005
Lysin	0,438 $\pm$ 0,044	0,483 $\pm$ 0,027	0,411 $\pm$ 0,050	0,582 $\pm$ 0,061 <b>a</b>
Valin	0,268 $\pm$ 0,030	0,586 $\pm$ 0,054 <b>a</b>	0,271 $\pm$ 0,026	0,595 $\pm$ 0,052 <b>a</b>
Isoleucin	0,084 $\pm$ 0,010	0,265 $\pm$ 0,029 <b>a</b>	0,099 $\pm$ 0,011	0,240 $\pm$ 0,024 <b>a</b>
Leucine	0,112 $\pm$ 0,011	0,373 $\pm$ 0,043 <b>a</b>	0,133 $\pm$ 0,013	0,330 $\pm$ 0,033 <b>a</b>
<b>nicht-essentiell</b>				
Asparagin	0,341 $\pm$ 0,033	0,250 $\pm$ 0,019	0,286 $\pm$ 0,024	0,367 $\pm$ 0,029 <b>b</b>
Serin	0,892 $\pm$ 0,108	0,720 $\pm$ 0,039	0,992 $\pm$ 0,076	1,098 $\pm$ 0,069 <b>b</b>
Glutamin	0,491 $\pm$ 0,065	0,798 $\pm$ 0,084 <b>a</b>	0,522 $\pm$ 0,042	0,754 $\pm$ 0,062 <b>a</b>
Glycin	5,414 $\pm$ 0,352	7,688 $\pm$ 0,767 <b>a</b>	6,451 $\pm$ 0,408	7,770 $\pm$ 0,029 <b>a</b>
Arginin	0,318 $\pm$ 0,050	0,316 $\pm$ 0,018	0,248 $\pm$ 0,016	0,380 $\pm$ 0,038 <b>a</b>
Alanin	2,333 $\pm$ 0,311	3,949 $\pm$ 0,508 <b>a</b>	2,063 $\pm$ 0,234	3,851 $\pm$ 0,406 <b>a</b>
Taurin	0,093 $\pm$ 0,007	0,161 $\pm$ 0,015 <b>a</b>	0,086 $\pm$ 0,005	0,141 $\pm$ 0,025 <b>a</b>
Tyrosin	0,090 $\pm$ 0,007	0,047 $\pm$ 0,003 <b>a</b>	0,092 $\pm$ 0,007	0,061 $\pm$ 0,004 <b>ab</b>
Ornithin	0,089 $\pm$ 0,019	0,093 $\pm$ 0,007	0,193 $\pm$ 0,027 <b>b</b>	0,154 $\pm$ 0,015 <b>b</b>

### 4.3 Genexpression der BCAA-Abbauenzyme und -Transporter in Geweben des Kaninchens

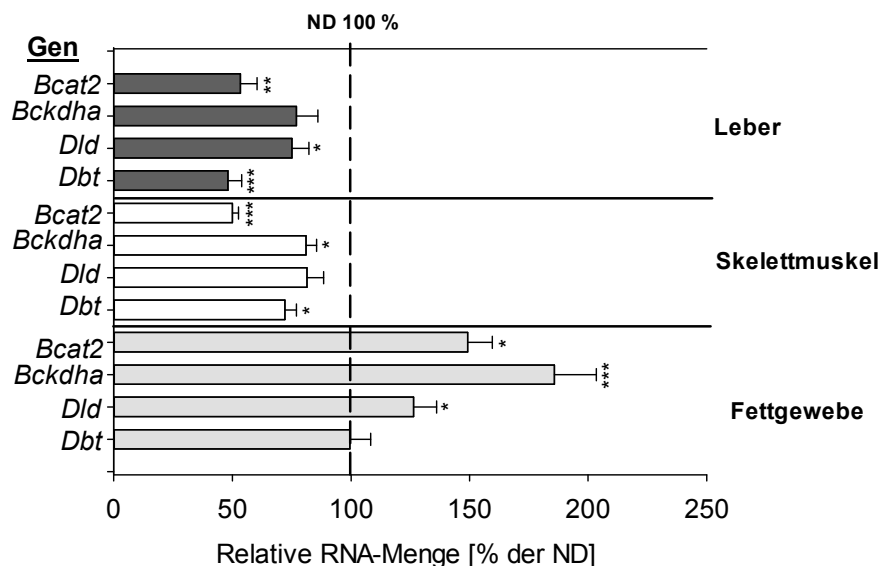
Die Genexpression der BCAA-Abbauenzyme war Teil meiner Diplomarbeit und wurde von mir bereits beschrieben (Jacqueline Gürke, Diplomarbeit 2011, unveröffentlichte Daten). Für diese Erstanalysen wurden die Kaninchen in einem Regime mit zwei Fütterungsintervallen gehalten. Für die vorliegende Arbeit wurde dieses Futterregime aufgelöst, sodass den Versuchstieren *ad libitum* Futter zur Verfügung stand. Die Genexpression der BCAA-Abbauenzyme wurde in dem geänderten Versuchsmodell der vorliegenden Arbeit neu validiert (Abb. 15).

Da die Futteraufnahme gesunder und diabetischer Kaninchen vergleichbar hoch war, wurde die potentielle Ursache für die gesteigerten Konzentrationen von verzweigtkettigen, aliphatischen Aminosäuren in ihrem Abbau und Transport in den metabolisch-relevanten Geweben der graviden Kaninchen untersucht.

#### 4.3.1 Genexpression der BCAA-Abbauenzyme im Gewebe diabetischer Kaninchen

Die Transkription von *Bcat2*, *Bckdha*, *Dld* und *Dbt* wurde in Leber-, Skelettmuskel- und Fettproben nicht-diabetischer und diabetischer Kaninchen verglichen (Abb. 15).

Die RNA-Expression der meisten BCAA-Abbauenzyme diabetischer Kaninchen waren in der Leber und im Skelettmuskel verringert (Abb. 15), wohingegen im Fettgewebe diabetischer Kaninchen *Bcat2*, *Bckdha* und *Dld* erhöht waren. Diese Ergebnisse weisen auf eine gewebespezifische Regulation der BCAA-Abbauenzyme hin.

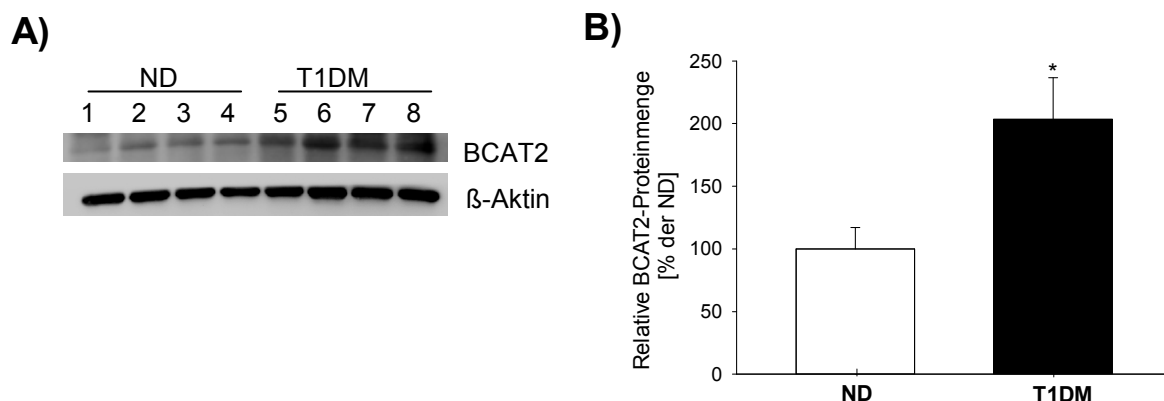


**Abb. 15: Relative Transkriptmengen der BCAA-Abbauenzyme in Leber-, Skelettmuskel- und Fettgewebe diabetischer Kaninchen am Tag 6 p.c..** Die Transkriptmengen der Gene *Bcat2*, *Bckdha*, *Dld* und *Dbt* wurden in Gewebeprobe diabetischer und gesunder Kaninchen quantifiziert. Die Molekülzahl der Zielgene wurde auf die Anzahl der *GAPDH*-Moleküle der entsprechenden Probe normiert. Alle Transkriptmengen wurden relativ auf den Kontrollwert n1= 100% der ND-Gruppe bezogen. (Mw  $\pm$  SEM; N=3; n=9; \*-p<0,05, \*\*-p<0,01, \*\*\*-p< 0,001)



#### 4.3.2 Proteinmenge von BCAT2 im Fettgewebe diabetischer Kaninchen

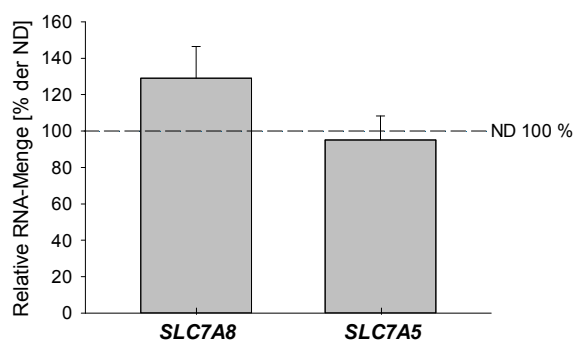
Die Proteinmenge der verzweigtkettigen L-Aminosäuren-Aminotransferase (BCAT2) wurde im Fettgewebe nicht-diabetischer und diabetischer Kaninchen mittels Western Blot bestimmt. Es konnte eine 2-fache Zunahme der BCAT2-Proteinmenge im Fettgewebe diabetischer Kaninchen nachgewiesen werden (Abb. 16).



**Abb. 16: Relative Proteinmenge von BCAT2 im Fettgewebe gravidier Kaninchen am Tag 6 p.c..** (A) Western Blot-Nachweis von BCAT2 im Fettgewebe gesunder (ND mit 1-4) und diabetischer (T1DM mit 5-8) Kaninchen am Tag 6 p.c. und (B) densitometrische Quantifizierung der relativen BCAT2-Proteinmenge. Die BCAT2-Proteinmenge wurde auf die Proteinmenge von  $\beta$ -Aktin normiert. Alle BCAT2-Proteinmengen wurden relativ auf den Kontrollwert  $n_1 = 100\%$  der ND-Gruppe bezogen. (Mw  $\pm$  SEM; N=3;  $n \geq 6$ ; \* $-p < 0,05$ )

#### 4.4 Genexpression der BCAA-Transporter im Endometrium diabetischer Kaninchen

Die Expression der BCAA-Transporter wurde im Endometrium gravidier Kaninchen am Tag 6 p.c. mittels quantitativer Echtzeit-PCR quantifiziert. Sowohl für *SLC7A8* als auch für *SLC7A5* ergab sich kein Einfluss eines Typ 1 Diabetes mellitus auf die endometriale Transkriptmenge (Abb. 17).



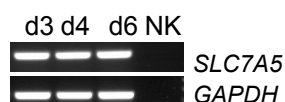
**Abb. 17: Relative Transkriptmengen von *SLC7A8* und *SLC7A5* im Endometrium diabetischer Kaninchen am Tag 6 p.c..** Die Molekülzahl der Zielgene wurde auf die Anzahl der *GAPDH*-Moleküle der entsprechenden Probe normiert. Alle Transkriptmengen wurden relativ auf den Kontrollwert  $n_1 = 100\%$  der ND-Gruppe bezogen. (Mw  $\pm$  SEM; N=3;  $n \geq 9$ )

#### 4.5 Genexpression der BCAA-Abbauenzyme und -Transporter in Blastozysten des Kaninchens

Die ontogenetische Expression von *Bcat2*, *Bckdha*, *Dbt*, *Did* und *SLC7A8* wurde bereits in meiner Diplomarbeit beschrieben (Jacqueline Gürke, Diplomarbeit 2011).

##### 4.5.1 Ontogenetische Expression von SLC7A5

Für *SLC7A5* konnte eine Transkription ab dem 3. Tag der frühen Ontogenese nachgewiesen werden (Abb. 18).



**Abb. 18: Gelelektrophoretische Auftrennung des RT-PCR-Produkts von SLC7A5.** Die Expression des BCAA-Transporters *SLC7A5* wurde während der frühen Entwicklung beginnend mit dem Morulastadium am Tag 3 (d3), in frühen Blastozysten am Tag 4 (d4) sowie in expandierten Blastozysten am Tag 6 (d6) *p.c.* mittels RT-PCR untersucht. NK= Negativkontrolle der PCR-Reaktion ohne cDNA; *GAPDH*= cDNA-Kontrollreaktion für *GAPDH*

##### 4.5.2 Genexpression der BCAA-Abbauenzyme und -Transporter in Kaninchenblastozysten

Die Transkriptmengen der BCAA-Abbauenzyme wurden in 6 Tage alten Blastozysten des Gastrulationsstadiums 1 und 2 auf entwicklungspezifische Unterschiede mittels quantitativer Echtzeit-PCR untersucht. Bei Kaninchenblastozysten verringerte sich in der Entwicklung vom Gastrulationsstadium 1 zum Gastrulationsstadium 2 die Transkriptmenge von *Bcat 2*, während sich die *Dbt*-Transkripte erhöhten (Tab. 8). Die RNA-Expression von *Bckdha* und *Did* zeigte keine entwicklungsbedingten Unterschiede (Tab. 8). Weiterhin konnte für die mRNA-Expression der BCAA-Transporter *SLC7A8* und *SLC7A5* kein Unterschied zwischen dem Gastrulationsstadium 1 und 2 gezeigt werden (Tab. 8).

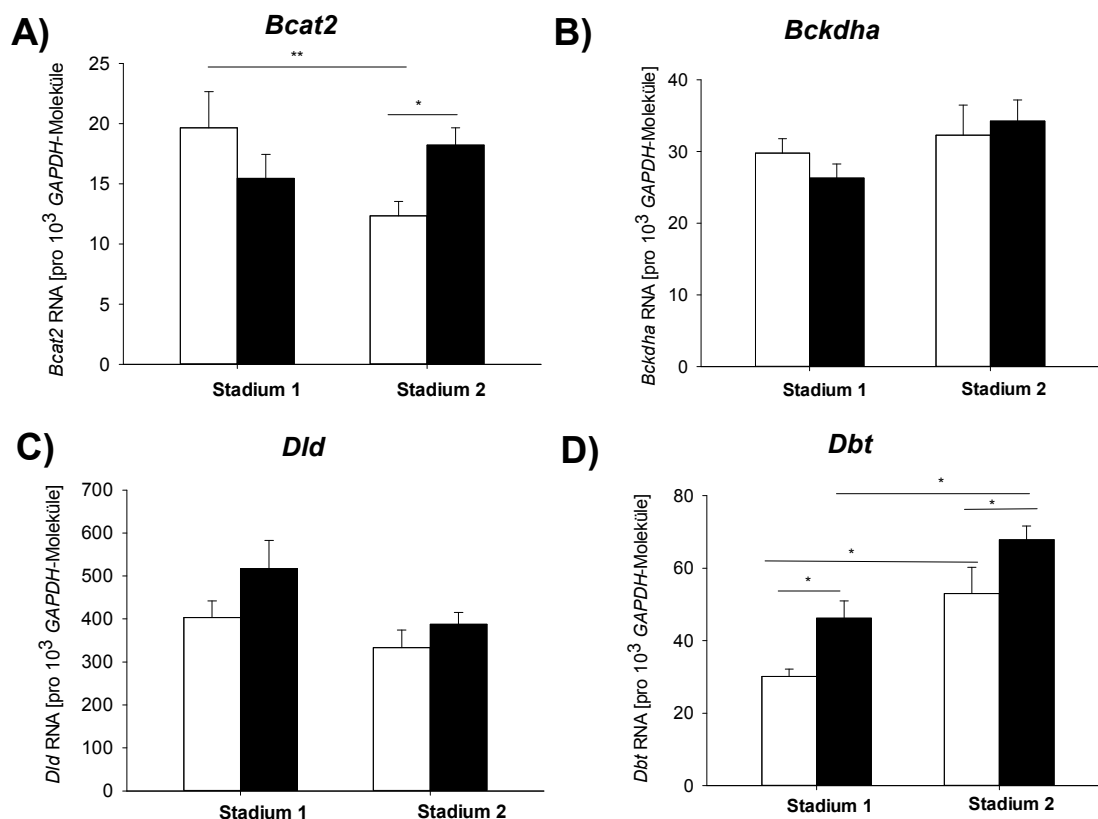
**Tab. 8: Transkriptmengen von *Bcat2*, *Bckdha*, *Did*, *Dbt*, *SLC7A8* und *SLC7A5* in Kaninchenblastozysten.** (Mw  $\pm$  SEM; N=4; n=40; \*- $p < 0,05$ ; \*\*- $p < 0,01$ )

Gen	Transkriptmenge pro 10 <sup>5</sup> GAPDH-Moleküle	
	Gastrulationstadium 1	Gastrulationstadium 2
<i>Bcat2</i>	19,66 $\pm$ 3,01	12,32 $\pm$ 1,19**
<i>Bckdha</i>	29,78 $\pm$ 2,02	26,29 $\pm$ 1,97
<i>Did</i>	402,95 $\pm$ 39,31	333,51 $\pm$ 40,66
<i>Dbt</i>	30,14 $\pm$ 20,04	53,02 $\pm$ 7,18*
<i>SLC7A8</i>	78,36 $\pm$ 13,33	67,58 $\pm$ 7,42
<i>SLC7A5</i>	72,89 $\pm$ 9,96	59,91 $\pm$ 4,06

##### 4.5.3 Genexpression der BCAA-Abbauenzyme in Blastozysten diabetischer Kaninchen

Die Transkriptmengen der BCAA-Abbauenzyme wurden in 6 Tage alten Blastozysten des Gastrulationsstadiums 1 und 2 nicht-diabetischer und diabetischer Kaninchen mittels quantitativer Echtzeit RT-PCR analysiert (Abb. 19).

Es konnte wie in Blastozysten gesunder Tiere eine entwicklungspezifische Erhöhung der *Dbt*-Transkripte in Blastozysten diabetischer Kaninchen vom Gastrulationsstadium 1 zu 2 nachgewiesen werden. Die Transkriptmengen von *Bcat2*, *Bckdha* und *Did* zeigten keine entwicklungspezifischen Änderungen. Die Transkriptmenge von *Dbt* war in Blastozysten diabetischer Kaninchen sowohl im Gastrulationsstadium 1 als auch im Gastrulationsstadium 2 gesteigert, wohingegen die Transkriptmengen von *Bckdha* und *Did* durch einen maternalen Diabetes mellitus unverändert waren. Im Gastrulationsstadium 2 zeigten Blastozysten diabetischer Kaninchen eine signifikante Erhöhung der *Bcat2*-Transkriptmengen.

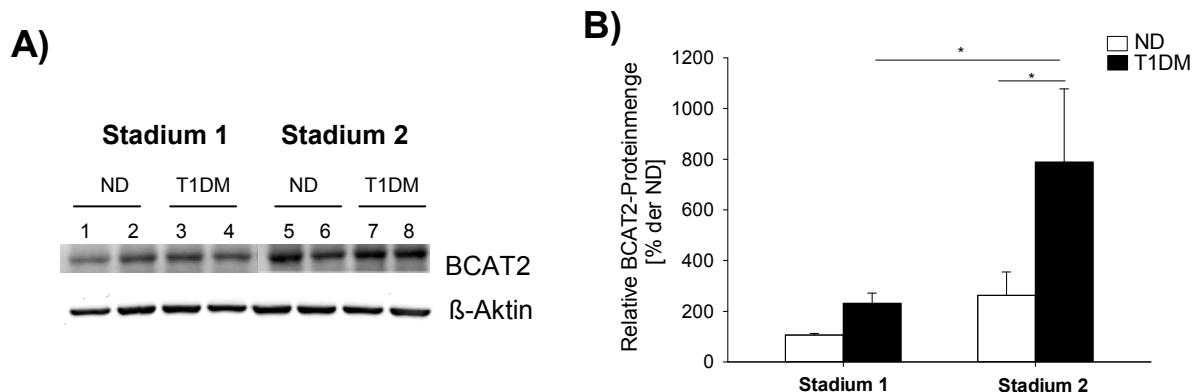


**Abb. 19: Transkriptmengen von *Bcat2* (A), *Bckdha* (B), *Did* (C) und *Dbt* (D) in Blastozysten diabetischer Kaninchen.** Die Genexpressionen von Blastozysten nicht-diabetischer (weiße Balken) und diabetischer (schwarze Balken) Kaninchen wurden miteinander verglichen. Die Anzahl der Transkripte bezieht sich auf die Anzahl der zugehörigen *GAPDH*-Transkripte der gleichen Probe (Mw  $\pm$  SEM; N=4; n=40; zweifaktorieller ANOVA \*-p $\leq$  0,05; Bonferroni \*\*-p $\leq$ 0,01)

#### 4.5.4 Proteinmenge von BCAT2 in Blastozysten diabetischer Kaninchen

Die Proteinmenge von BCAT2 wurde in Blastozysten des Gastrulationsstadiums 1 und 2 mittels Western Blot quantifiziert (Abb. 20A). In der Entwicklung vom Gastrulationsstadium 1 zu 2 ergab sich kein Unterschied in der BCAT2-Proteinmenge von Blastozysten gesunder, nicht-diabetischer Tiere. Blastozysten aus diabetischen Kaninchen hingegen zeigten einen signifikanten, entwicklungspezifischen Anstieg der BCAT2-Proteinmenge (Abb. 20B).

Die BCAT2-Proteinmenge war im Gastrulationsstadium 1 durch einen maternalen Diabetes mellitus unverändert, wohingegen die Proteinmenge von BCAT2 in Blastozysten des Gastrulationsstadiums 2 diabetischer Kaninchen höher als in Blastozysten nicht-diabetischer Kaninchen war.

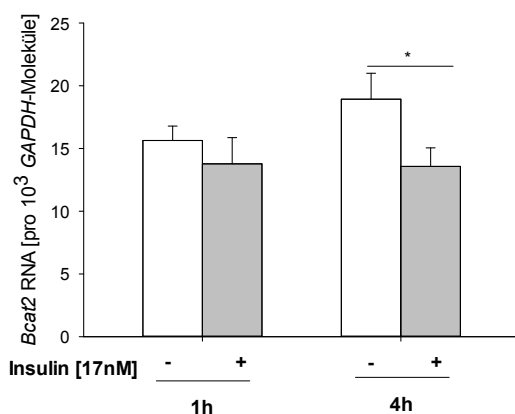


**Abb. 20: Relative Proteinmengen von BCAT2 in Blastozysten diabetischer Kaninchen.** (A) Western Blot-Nachweis von BCAT2 in Blastozysten des Gastrulationsstadiums 1 und 2 gesunder (ND 1,2,5,6) und diabetischer (T1DM 3,4,7,8) Kaninchen am Tag 6 *p.c.* und (B) densitometrische Quantifizierung der relativen BCAT2-Proteinmenge. Die BCAT2-Proteinmenge wurde auf die Proteinmenge von  $\beta$ -Aktin normiert. Alle BCAT2-Proteinmengen wurden relativ auf den Kontrollwert  $n=100\%$  der ND-Gruppe des Gastrulationsstadiums 1 bezogen. (Mw  $\pm$  SEM; N=4; n=40; \*- $p < 0,05$ )

#### 4.5.5 Untersuchung der transkriptionellen Regulation von *Bcat2*

##### 4.5.5.1 Regulation der *Bcat2*-Transkription durch Insulin

Da der maternale Typ 1 Diabetes mellitus zu einem Insulinmangel beim Embryo führt (Ramin *et al.* 2010), wurde der Einfluss von Insulin auf die transkriptionelle Regulation von *Bcat2* untersucht. Kaninchenblastozysten des Gastrulationsstadiums 1 wurden für eine und vier Stunden ohne bzw. mit 17 nM Insulin kultiviert (Kapitel 3.1.8.1).



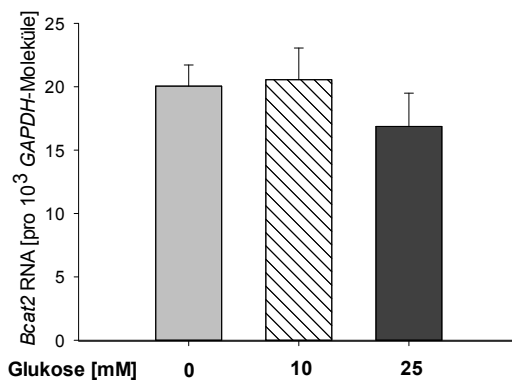
**Abb. 21: Quantifizierung der *Bcat2*-Transkriptmenge in Blastozysten kultiviert ohne oder mit Insulin.** Die Transkriptmengen von *Bcat2* wurden in Blastozysten nach der Kultur ohne Insulin (weiße Balken) oder mit Insulin (graue Balken) mittels RTq-PCR quantifiziert. Die Anzahl der Transkripte wurden auf die Anzahl der zugehörigen *GAPDH*-Transkripte der gleichen Probe normiert. (Mw  $\pm$  SEM; N= 3; n $\geq$ 11; \*- $p \leq 0,05$ )

Nach einer einstündigen Kultur ergab sich kein Unterschied in der *Bcat2*-Transkriptmenge, wohingegen nach einer vierstündigen Kultur die *Bcat2*-Transkriptmenge in Blastozysten, die ohne Insulin kultiviert wurden, signifikant anstieg (Abb. 21). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass das Fehlen von Insulin bei Blastozysten diabetischer Kaninchen zu einer transkriptionellen Hochregulation von *Bcat2* führen könnte.

#### 4.5.5.2 Regulation der *Bcat2*-Transkription durch Glukose

Um eine transkriptionelle Regulation von *Bcat2* im Zusammenhang zu einem maternalen Diabetes mellitus zu untersuchen, wurden Kaninchenblastozysten des Gastrulationsstadiums 1 für sechs Stunden mit 0, 10 oder 25 mM Glukose kultiviert (Kapitel 3.1.8.2).

Die erhöhten Glukosekonzentrationen *in vitro* führten zu keiner Veränderung der *Bcat2*-Transkriptmenge (Abb. 22).

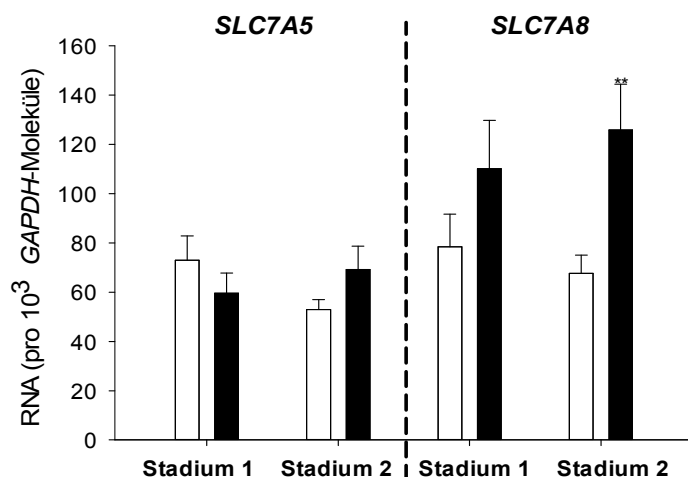


**Abb. 22: Quantifizierung der *Bcat2*-Transkriptmenge in Blastozysten nach der Kultur mit 0, 10 und 25 mM Glukose für 6h.** Die Transkriptmengen von *Bcat2* wurden in kultivierten Blastozysten mittels RTq-PCR quantifiziert. Die Anzahl der Transkripte bezieht sich auf die Anzahl der zugehörigen *GAPDH*-Transkripte der gleichen Probe. (Mw ± SEM; N= 3; n≥11)

#### 4.5.6 Genexpression der BCAA-Transporter in Blastozysten diabetischer Kaninchen

Die Transkriptmengen von *SLC7A5* und *SLC7A8* wurden in Blastozysten des Gastrulationsstadiums 1 und 2 mittels quantitativer Echtzeit RT-PCR analysiert.

Zwischen Blastozysten des Gastrulationsstadiums 1 und 2 diabetischer und nicht-diabetischer Kaninchen konnte kein Unterschied in der *SLC7A5*-Transkriptmenge nachgewiesen werden (Abb. 23). Die *SLC7A8*-Transkriptmengen waren in Blastozysten des Gastrulationsstadium 1 diabetischer Kaninchen im Vergleich zu nicht-diabetischen Kaninchen ebenfalls unverändert, wohingegen die *SLC7A8*-Transkriptmengen in Blastozysten des Gastrulationsstadium 2 diabetischer Kaninchen signifikant höher waren (Abb. 23).



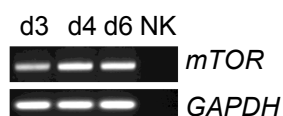
**Abb. 23: Transkriptmengen von *SLC7A5* und *SLC7A8* in Blastozysten diabetischer Kaninchen.** Die Transkriptmengen der BCAA-Transporter wurden in Blastozysten des Gastrulationsstadiums 1 und 2 aus nicht-diabetischen (weiße Balken) und diabetischen (schwarze Balken) Kaninchen mittels RTq-PCR quantifiziert. Die Anzahl der Transkripte bezieht sich auf die Anzahl der zugehörigen *GAPDH*-Transkripte der gleichen Probe. (Mw  $\pm$  SEM; N=3; n $\geq$ 9; zweifaktorieller ANOVA \*\*-p < 0,01)

#### 4.6 mTOR und dessen Signalweg

mTOR ist der zentrale Nährstoffsensor innerhalb der Zelle. Er forciert die Proteinsynthese und blockiert die Autophagie (Übersichtsartikel: Richter und Sonenberg 2005; Jung *et al.* 2010) und ist deshalb für eine normale Entwicklung von Embryonen unabdinglich. Da die Frage entstand, inwiefern die metabolischen Veränderungen im maternalen Aminosäurenmetabolismus die Nährstoffsignalwege des Embryos verändern, wurde die Aktivierbarkeit des mTOR-Signalweges in Blastozysten gesunder Kaninchen durch Glukose und L-Leucin *in vitro*, sowie die Aktivität der mTOR-Kaskade in Blastozysten diabetischer Kaninchen *in vivo* untersucht. Dabei wurde die Phosphorylierung von mTOR und seiner Zielproteine analysiert.

##### 4.6.1 Ontogenetische Expression von mTOR

Für mTOR konnte eine Transkription ab dem 3. Tag der Ontogenese nachgewiesen werden (Abb. 24).

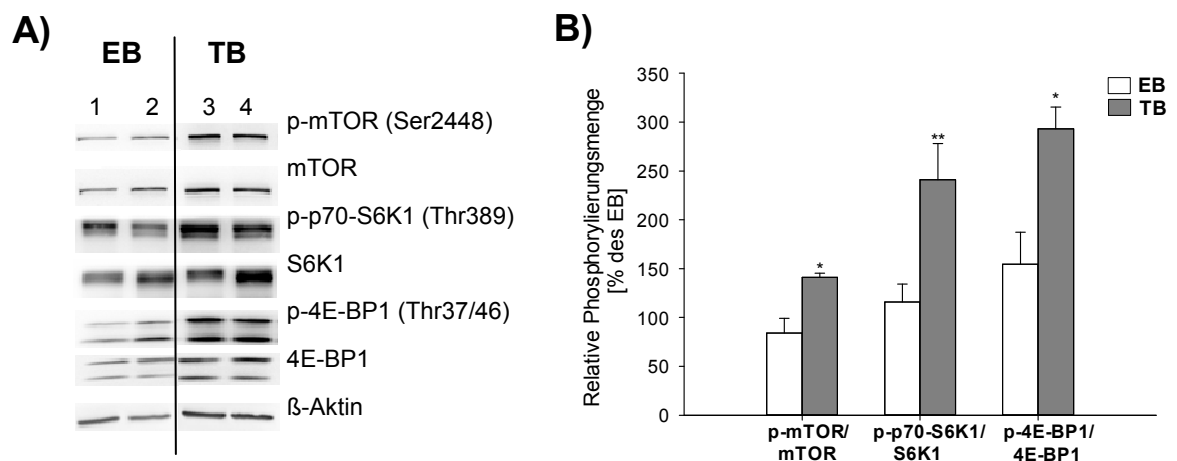


**Abb. 24: Gelelektrophoretische Auftrennung des RT-PCR-Produkts von *mTOR*.** Die Expression von *mTOR* wurde während der frühen Entwicklung beginnend mit dem Morulastadium am Tag 3 (d3), in frühen Blastozysten am Tag 4 (d4) sowie in expandierten Blastozysten am Tag 6 (d6) *p.c* mittels RT-PCR untersucht. NK= Negativkontrolle der PCR-Reaktion ohne cDNA; *GAPDH*= cDNA-Kontrollreaktion für *GAPDH*

#### 4.6.2 mTOR, S6K1 und 4E-BP1 in Embryoblast- und Trophoblastzellen

Die Proteinmenge und Phosphorylierung von mTOR und seinen Zielproteinen ribosomale S6 Kinase 1 und 4E-Bindeprotein 1 wurden in Embryoblast- (EB) und Trophoblastzellen (TB) von Blastozysten des Gastrulationsstadiums 2 gesunder Kaninchen mittels Western Blot untersucht (Abb. 25A). Die Proteinmengen von mTOR (EB: 98,0 %  $\pm$  3,9 %; TB: 120,0 %  $\pm$  8,0 %) und S6K1 (EB: 98,0 %  $\pm$  3,9 %; TB: 120,0 %  $\pm$  8,0 %) waren in Embryoblast- und Trophoblastzellen vergleichbar hoch, während die 4E-BP1-Proteinmenge in Trophoblastzellen (87,7 %  $\pm$  6,2 %) im Vergleich zu Embryoblastzellen (59,0 %  $\pm$  1,7 %) um die Hälfte reduziert ( $p=0,004$ ) war.

Die relative Phosphorylierungsmenge von mTOR, S6K1 und 4E-BP1 war in Trophoblastzellen signifikant höher als in Embryoblastzellen (Abb. 25B). Dies deutet auf eine höhere Aktivität des mTOR-Signalweges in Zellen des Trophoblasten hin.



**Abb. 25: Relative Phosphorylierungsmengen von mTOR, S6K1 und 4E-BP1 Embryoblast- (EB) und Trophoblastzellen (TB).** (A) Western Blot-Nachweis von mTOR, S6K1, 4E-BP1 und deren Phosphorylierung und  $\beta$ -Aktin in zwei gepoolten Proteinproben von Kaninchenblastozysten des Gastrulationsstadiums 2 im Embryoblast (EB 1, 2) und Trophoblast (TB 3, 4) am Tag 6 *p.c.* und (B) densitometrische Quantifizierung der relativen Phosphorylierungsmenge. Die Menge des phosphorylierten Proteins wurde auf die Proteinmenge des entsprechenden unphosphorylierten Proteins normiert. Alle Phosphorylierungsmengen wurden relativ auf den Kontrollwert  $n=100\%$  der EB-Gruppe bezogen. (Mw  $\pm$  SEM; N=3;  $n \geq 15$ ; \*- $p < 0,05$ ; \*\*- $p < 0,01$ )

#### 4.6.3 Aktivierung von mTOR und S6 Kinase 1 in Blastozysten

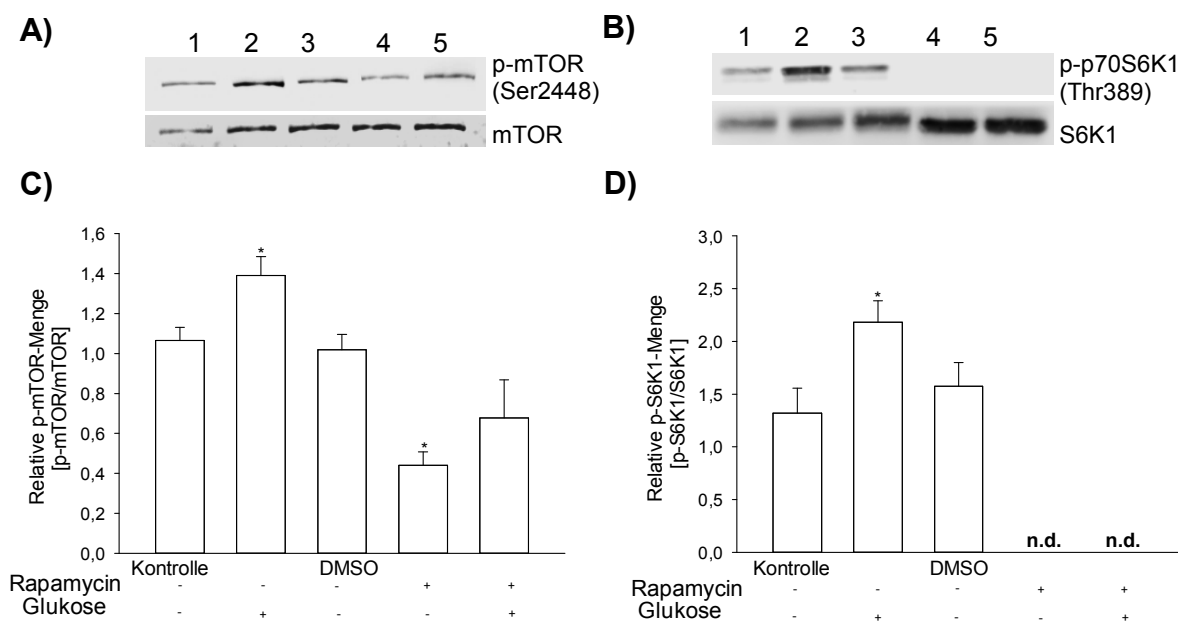
Um den Einfluss von spezifischen Nährstoffangeboten auf den mTOR-Signalweg zu prüfen, wurden Kaninchenblastozysten mit verschiedenen Glukose- oder L-Leucinkonzentrationen und dem mTORC1-spezifischen Inhibitor Rapamycin kultiviert.

##### 4.6.3.1 Aktivierung von mTOR und S6 Kinase 1 in Blastozysten durch Glukose

Da in der Uterusflüssigkeit diabetischer Kaninchen eine erhöhte Glukosekonzentration gemessen wurde (Ramin *et al.* 2010), wurden Kaninchenblastozysten mit 10 mM Glukose und/oder Rapamycin kultiviert (Kapitel 3.1.8.3). Die Aktivierung von mTOR und S6K1 wurde über deren Phosphorylierungsstatus mittels Western Blot analysiert (Abb. 26A+B).

Nach einer Stunde Kultur mit Glukose stieg die Phosphorylierungsmenge von mTOR und S6K1 an (Abb. 26C+D). Rapamycin reduzierte die Phosphorylierung von mTOR und der S6K1 und inhibierte die Phosphorylierungssteigerung durch Glukose.

Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass Veränderungen in der Glukoseverfügbarkeit über den mTORC1-Signalweg in Präimplantationsembryonen des Kaninchens übertragen werden.



**Abb. 26: Relative Phosphorylierungsmengen von mTOR und S6K1 nach der Kultur mit 10 mM Glukose.** Western Blot-Nachweis von mTOR (A) und S6K1 (B) und derer Phosphorylierung in einer gepoolten Proteinproben (n=10 Blastozysten pro Probe). (C+D) Densitometrische Quantifizierung der relativen Phosphorylierungsmenge in Blastozysten kultiviert mit Glukose und/ oder Rapamycin für eine Stunde. Alle Phosphorylierungsmengen wurden relativ auf den Kontrollwert n1= 1 der Kontrollgruppe bezogen. (Mw ± SEM; 1- Kontrolle ohne Glukose; 2- 10 mM Glukose; 3- DMSO-Kontrolle; 4- 125 nM Rapamycin; 5- 10 mM Glukose und 125 nM Rapamycin; N=3; n=30; \*-p< 0,05)

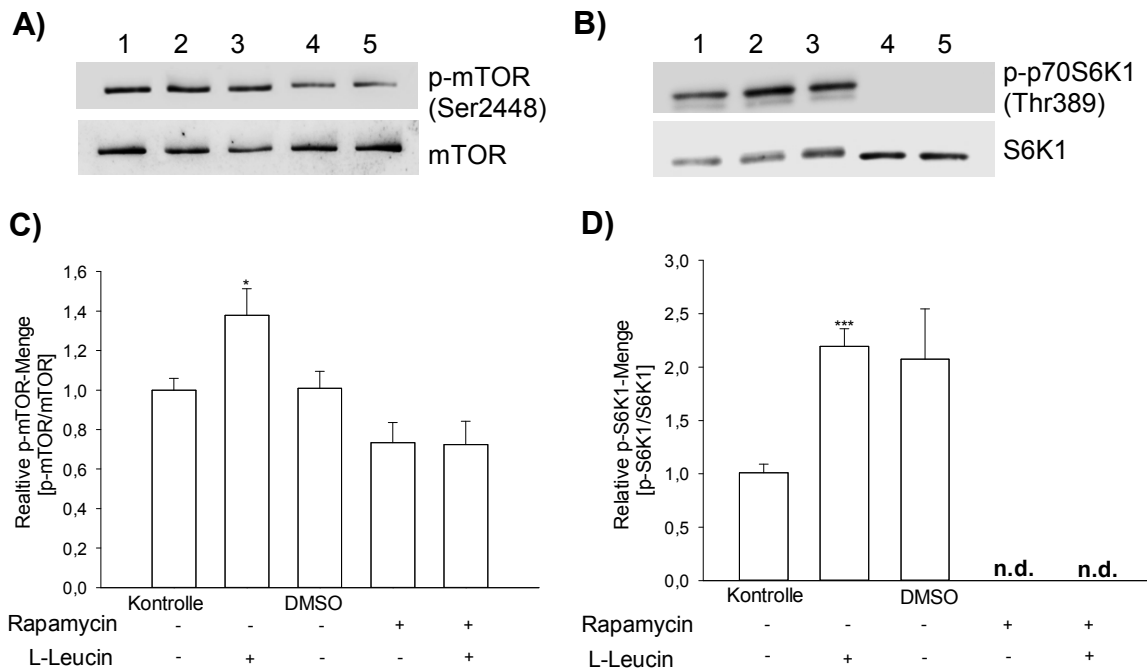
#### 4.6.3.2 Aktivierung von mTOR und S6 Kinase 1 in Blastozysten durch L-Leucin

L-Leucin ist ein potenter Aktivator des mTOR-Signalweges ist. Die Konzentration von L-Leucin war in Blastozysten diabetischer Kaninchen um das 2,5-fache erhöht. Um die mTOR-Aktivität nach einer L-Leucinerhöhung zu untersuchen, wurden Blastozysten gesunder Kaninchen mit 800 µM L-Leucin und/oder Rapamycin für 30 Minuten kultiviert (Kapitel 3.1.8.5). Die Aktivierung von mTOR und S6K1 wurde über ihre Phosphorylierung mittels Western Blot analysiert (Abb. 27A+B).

Nach 30-Minütiger Kultur mit der 2-fach erhöhten L-Leucinkonzentration war die Phosphorylierungsmenge von mTOR und S6K1 signifikant gesteigert (Abb. 27C+D). Dieser Effekt wurde durch den Einsatz von Rapamycin blockiert. Eine Phosphorylierung der S6K1 konnte nach der Rapamycin-Stimulation nicht mehr detektiert werden. Diese Ergebnisse



zeigen, dass Präimplantationsembryonen des Kaninchens Änderungen in der L-Leucinkonzentration direkt über mTORC1 übertragen.



**Abb. 27: Relative Phosphorylierungsmengen von mTOR und S6K1 nach der Kultur mit 800  $\mu\text{M}$  L-Leucin.** Western Blot-Nachweis von mTOR (A) und S6K1 (B) und derer Phosphorylierung in einer gepoolten Proteinproben ( $n=10$  Blastozysten pro Probe). (C+D) Densitometrische Quantifizierung der relativen Phosphorylierungsmenge in Blastozysten kultiviert mit L-Leucin und/oder Rapamycin. Alle Phosphorylierungsmengen wurden relativ auf den Kontrollwert  $n_1=1$  der Kontrollgruppe bezogen. (Mw  $\pm$  SEM; 1- Kontrolle 397  $\mu\text{M}$  L-Leucin; 2- 800  $\mu\text{M}$  L-Leucin; 3- 397  $\mu\text{M}$  L-Leucin und DMSO; 4- 397  $\mu\text{M}$  L-Leucin und 125 nM Rapamycin; 5- 800  $\mu\text{M}$  L-Leucin und 125 nM Rapamycin;  $N=3$ ;  $n=30$ ; \*- $p < 0,05$ ; \*\*\*- $p < 0,001$ )

#### 4.6.3.3 Expressionsanalyse von mTORC1-Zielgenen in L-Leucin-stimulierten Blastozysten

Blastozysten des Gastrulationsstadiums 1 gesunder Kaninchen wurden mit 800  $\mu\text{M}$  L-Leucin additiv zum Medium für 2 Stunden und 4 Stunden kultiviert (Kapitel 3.1.8.5). Um eine mTORC1-abhängige Transkription potentieller Zielgene untersuchen zu können, wurden die Blastozysten mit Rapamycin vorinkubiert. Nach der Stimulation wurden die erhaltenen RNA-Proben wie in Kapitel 3.2.2.2 beschrieben aufgearbeitet. Die Expressionsuntersuchungen potentieller mTOR-Zielgene wurden mittels quantitativer Echtzeit-PCR durchgeführt.

Nach 2-stündiger Kultur mit 800  $\mu\text{M}$  L-Leucin waren die Transkriptmengen von Cyclin D1 (*CCND1*), dem eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 4E (*eIF4E*) und dem Aminosäuretransporter LAT2 (*SLC7A8*) im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (Tab. 9). Dieser Anstieg der Transkriptmengen blieb nach Inkubation mit Rapamycin aus. Eine gleichzeitige Kultur von Rapamycin und L-Leucin führte zu unveränderten

Transkriptmengen. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass eine Aktivierung von mTOR durch L-Leucin einen direkten Einfluss auf die Transkriptmengen von *CCND1*, *eIF4E* und *SLC7A8* hat.

Nach einer 4-stündigen Kultur mit L-Leucin 800  $\mu$ M L-Leucin zeigte lediglich *SLC7A8* eine signifikante Transkriptmengenzunahme. Die Transkriptmengen von *CCND1*, *eIF4E* und *ODC* waren unverändert, wohingegen die Transkriptmengen von *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA)* nach L-Leucin-Stimulus verringert waren. Rapamycin inhibierte diese Regulation, wodurch *CCND1*, *eIF4E*, *SLC7A8* und *PCNA* als mTORC1-Zielgene in Präimplantationsembryonen des Kaninchens identifiziert werden konnten.

**Tab. 9: Relative Transkriptmengen von *CCND1*, *eIF4E*, *ODC1*, *PCNA* und *SLC7A8* in L-Leucin-stimulierten Blastozysten für 2 bzw. 4 Stunden.** Alle Transkriptmengen wurden relativ auf den Kontrollwert  $n1= 100\%$  der Kontrollgruppe bezogen. (Mw  $\pm$  SEM; N=3;  $n \geq 9$ ; \*- signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und L-Leucin mit Angabe des p-Werts)

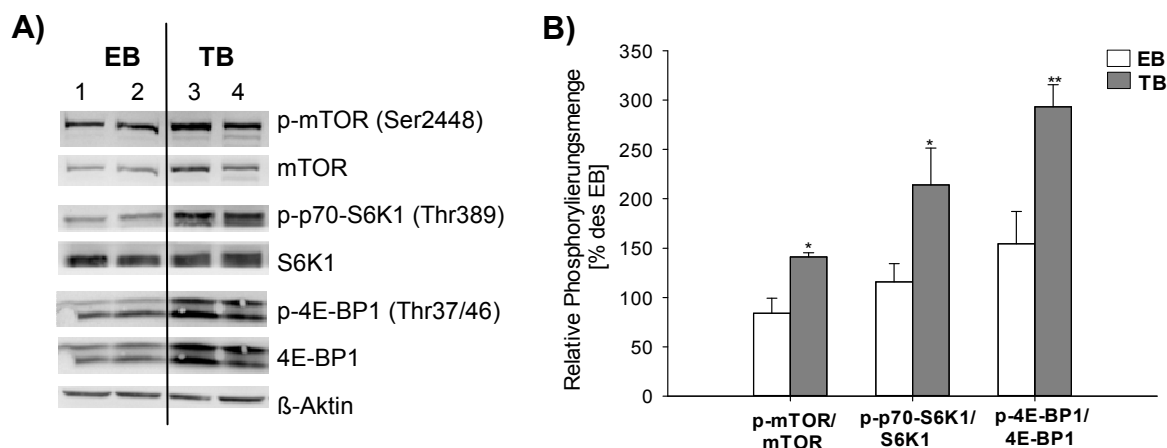
Gen	Zeit [h]	Relative Transkriptmenge in [% der Kontrolle]					p-Wert
		Kontrolle	L-Leucin	DMSO	Rapamycin	Rapamycin + L-Leucin	
<i>CCND1</i>	2	125,9 $\pm$ 26,2	553,1 $\pm$ 151,4*	109,3 $\pm$ 12,4	121,6 $\pm$ 14,5	125,4 $\pm$ 11,9	0,014
	4	149,2 $\pm$ 42,5	169,11 $\pm$ 29,6	118,7 $\pm$ 21,1	142,8 $\pm$ 28,7	102,8 $\pm$ 18,2	-
<i>eIF4E</i>	2	80,6 $\pm$ 13,0	127,1 $\pm$ 7,8*	96,0 $\pm$ 7,1	98,0 $\pm$ 4,3	94,3 $\pm$ 5,8	0,008
	4	95,4 $\pm$ 5,5	95,7 $\pm$ 5,6	97,3 $\pm$ 9,5	87,9 $\pm$ 4,4	81,5 $\pm$ 3,4	-
<i>ODC1</i>	2	120,9 $\pm$ 11,3	123,3 $\pm$ 11,8	119,8 $\pm$ 11,7	106,4 $\pm$ 12,1	102,7 $\pm$ 8,0	-
	4	98,9 $\pm$ 6,8	104,4 $\pm$ 12,6	121,8 $\pm$ 8,9	120,6 $\pm$ 10,2	102,2 $\pm$ 12,2	-
<i>PCNA</i>	2	85,6 $\pm$ 11,8	110,9 $\pm$ 5,0	109,8 $\pm$ 8,6	118,2 $\pm$ 12,3	102,6 $\pm$ 9,0	-
	4	106,1 $\pm$ 5,9	75,7 $\pm$ 11,1*	120,2 $\pm$ 6,2	110,4 $\pm$ 14,7	96,3 $\pm$ 9,4	0,02
<i>SLC7A8</i>	2	102,0 $\pm$ 17,4	150,8 $\pm$ 11,5*	91,8 $\pm$ 10,7	86,9 $\pm$ 8,1	104,8 $\pm$ 14,7	0,046
	4	125,1 $\pm$ 8,7	213,9 $\pm$ 21,3*	86,8 $\pm$ 8,2	71,4 $\pm$ 6,7	60,9 $\pm$ 3,4	0,005

#### 4.6.4 mTOR, S6K1 und 4E-BP1 in Embryoblast- und Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen

Die Proteinmenge und Phosphorylierung von mTOR und seinen Zielproteinen ribosomale S6 Kinase 1 und 4E-Bindeprotein 1 wurden in separierten Embryoblast- (EB) und Trophoblastzellen (TB) von Blastozysten des Gastrulationsstadiums 2 diabetischer Kaninchen mittels Western Blot untersucht (Abb. 28A).

Die Proteinmengen von S6K1 war in Trophoblastzellen (TB: 190,0 %  $\pm$  32,2 %) höher als in Embryoblastzellen (EB: 85,2 %  $\pm$  12,4 %;  $p= 0,039$ ) und für mTOR (EB: 72,6 %  $\pm$  25,1 %; TB: 493,5 %  $\pm$  122,1 %;  $p=0,049$ ) und 4E-BP1 (EB: 83,6 %  $\pm$  10,4 %; TB: 412,1 %  $\pm$  126,0 %;  $p=0,030$ ) sogar um das 4-fache höher. Auch die relativen Phosphorylierungsmengen von mTOR, S6K1 und 4E-BP1 waren in Trophoblastzellen signifikant höher als in Embryoblastzellen (Abb. 28B). Dieses Ergebnis deutet auf eine

höhere Aktivität des mTOR-Signalweges in Zellen des Trophoblasten diabetischer Kaninchen hin.



**Abb. 28: Relative Phosphorylierung von mTOR, S6K1 und 4E-BP1 in Embryoblast- (EB) und Trophoblastzellen (TB) diabetischer Kaninchen.** (A) Western Blot-Nachweis von mTOR, S6K1, 4E-BP1, deren Phosphorylierung und  $\beta$ -Aktin in zwei gepoolten Proteinproben ( $n \geq 5$  Blastozysten pro Probe) von Embryoblasten (EB 1, 2) und Trophoblasten (TB 3, 4) des Gastrulationsstadiums 2 diabetischer Kaninchen und (B) densitometrische Quantifizierung der relativen Phosphorylierungsmenge. Die Menge des phosphorylierten Proteins wurde auf die Proteinmenge des entsprechenden unphosphorylierten Proteins normiert. Alle Phosphorylierungsmengen wurden relativ auf den Kontrollwert  $n_1 = 100\%$  der EB-Gruppe bezogen. (Mw  $\pm$  SEM; N=3;  $n \geq 15$ ; \*- $p < 0,05$ ; \*\*- $p < 0,041$ )

#### 4.6.5 mTOR, S6K1 und 4E-BP1 in Blastozysten diabetischer Kaninchen

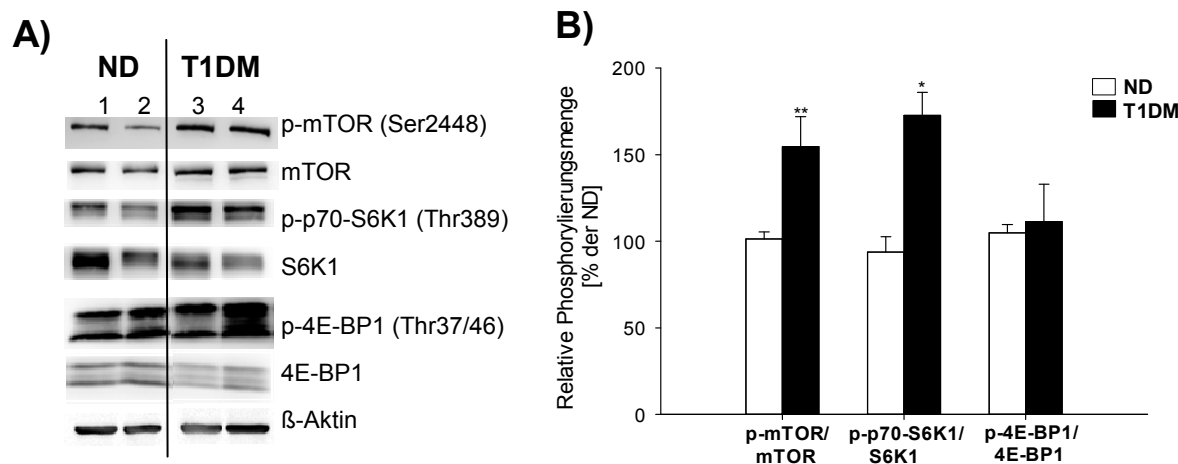
Der Einfluss eines maternalen Typ 1 Diabetes mellitus wurde mittels Western Blot auf den mTOR-Signalweg in Blastozysten des Gastrulationsstadiums 2 analysiert.

Die Proteinmenge von mTOR, S6K1 und 4E-BP1 waren in Blastozysten nicht-diabetischer (ND) und diabetischer (T1DM) Kaninchen gleich (Tab. 10).

**Tab. 10: Relative Proteinmengen von mTOR, S6K1 und 4E-BP1 in Blastozysten diabetischer Kaninchen.** Die Proteinmengen wurden auf  $\beta$ -Aktin normiert. Alle Proteinmengen wurden relativ auf den Kontrollwert  $n_1 = 100\%$  der ND-Gruppe bezogen. (ND= nicht-diabetisch; T1DM= Typ 1 Diabetes mellitus; Mw  $\pm$  SEM; N=4; n=30)

Protein	Relative Proteinmenge in [% der ND]	
	ND	T1DM
mTOR	96,1 $\pm$ 3,1	83,6 $\pm$ 3,7
S6K1	99,4 $\pm$ 1,7	104,9 $\pm$ 11,5
4E-BP1	91,7 $\pm$ 16,8	110,3 $\pm$ 7,1

Auch der Anteil von phospho-4E-BP1 blieb durch einen maternalen Typ 1 Diabetes mellitus unverändert, wohingegen die mTOR- und der S6K1-Phosphorylierung in Blastozysten diabetischer Kaninchen um das 1,5-fache anstieg (Abb. 29A+B).



**Abb. 29: Relative Phosphorylierung von mTOR, S6K1 und 4E-BP1 in Blastozysten diabetischer Kaninchen.** (A) Western Blot-Nachweis von mTOR, S6K1 und 4E-BP1, deren Phosphorylierung und  $\beta$ -Aktin in zwei gepoolten Proteinproben (n=10 Blastozysten pro Probe) von Blastozysten des Gastrulationsstadiums 2 nicht-diabetischer (ND 1, 2) und diabetischer (T1DM 3, 4) Kaninchen am Tag 6 *p.c.* und (B) densitometrische Quantifizierung der relativen Phosphorylierungsmenge. Die Menge des phosphorylierten Proteins wurde auf die Proteinmenge des entsprechenden unphosphorylierten Proteins normiert. Alle Phosphorylierungsmengen wurden relativ auf den Kontrollwert n1= 100% der ND-Gruppe bezogen. (Mw  $\pm$  SEM; N=4; n=30; \*-p < 0,05; \*\*-p < 0,01)

#### 4.6.6 Quantifizierung von CCND1, eIF4E, PCNA, ODC1 und SLC7A8 in Blastozysten diabetischer Kaninchen

In der *in vitro* Kultur mit L-Leucin (Kapitel 4.6.3.3) wurde die Expression von *CCND1*, *eIF4E*, *PCNA*, *ODC1* und *SLC7A8* in Kaninchenblastozysten als mTORC1-abhängig identifiziert. Um zu klären, ob die erhöhte mTOR-Aktivität in Blastozysten diabetischer Kaninchen zu einer veränderten Genexpression führt, wurde die Expression der mTORC1-Zielgene in Blastozysten des Gastrulationsstadiums 2 diabetischer Kaninchen mittels quantitativer Echtzeit-PCR untersucht.

Blastozysten diabetischer Kaninchen wiesen im Vergleich zu Blastozysten gesunder Kaninchen signifikant höhere Transkriptmengen an *CCND1*, *eIF4E* und *SLC7A8* auf (Tab. 11). Die Transkriptmengen von *PCNA* waren in Blastozysten diabetischer Kaninchen verringert.

**Tab. 11: Relative Transkriptmengen von CCND1, eIF4E, PCNA, ODC1 und SLC7A8 in Blastozysten diabetischer Kaninchen.** Alle Transkriptmengen wurden relativ auf den Kontrollwert n1= 100% der ND-Gruppe bezogen. (ND= nicht-diabetisch; T1DM= Typ 1 Diabetes mellitus; Mw  $\pm$  SEM; N= 3; n=10)

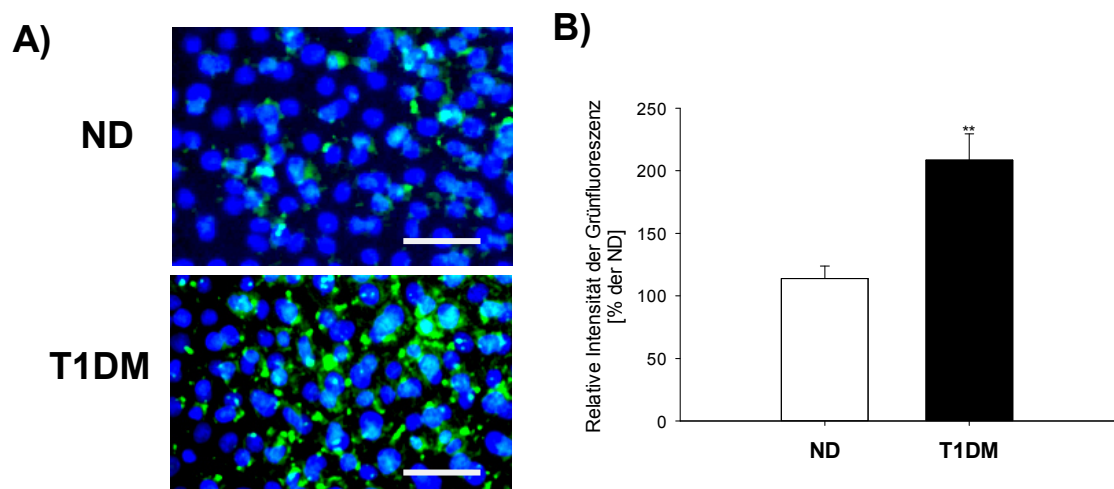
Gen	Relative Transkriptmenge in [% der ND]		P-Wert
	ND	T1DM	
<i>CCND1</i>	92,5 $\pm$ 8,6	129,8 $\pm$ 13,2	0,036
<i>eIF4E</i>	89,9 $\pm$ 11,4	125,7 $\pm$ 11,6	0,047
<i>PCNA</i>	97,3 $\pm$ 6,8	71,2 $\pm$ 6,4	0,002
<i>ODC1</i>	127,7 $\pm$ 14,0	104,3 $\pm$ 14,1	-
<i>SL7A8</i>	116,0 $\pm$ 12,7	215,8 $\pm$ 32,0	0,018

#### 4.6.7 Bestimmung der Proteinsynthese in Blastozysten diabetischer Kaninchen

Eine erhöhte mTORC1-Aktivität fördert die Proteinsynthese in der Zelle (Übersichtsartikel: Richter und Sonenberg 2005). Um die Verhältnisse im Embryo zu klären, wurde die Proteinsyntheseaktivität bestimmt. Dafür wurde die Aufnahme und der Einbau des Methioninanalogs L-Homopropargylglycin (HPG; Kapitel 3.3) mittels Immunfluoreszenz in Blastozysten des Gastrulationsstadiums 2 nicht-diabetischer und diabetischer Kaninchen detektiert.

Da HPG nicht in die Zellen des Embryoblasten aufgenommen wurde, konnte nur in Trophoblastzellen die Grünfluoreszenz bestimmt werden. Die Grünfluoreszenz der Trophoblastzellen wurde mittels konfokaler Mikroskopie dokumentiert (Abb. 30A). Die Fluoreszenzintensität wurde über den Algorithmus der Software Volocity 3D als Volumen bestimmt und als relative Intensität in Prozent dargestellt (Abb. 30B).

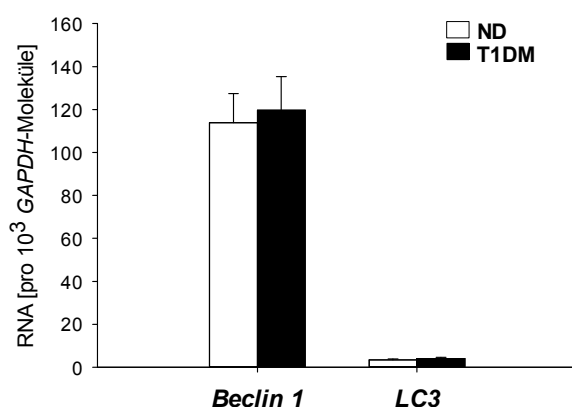
Das Signal der Grünfluoreszenz war im Zytoplasma von Trophoblastzellen nicht-diabetischer und diabetischer Kaninchen nachweisbar. Die Zellkerne wiesen keine Grünfluoreszenz auf. Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen zeigten eine 2-fach höhere Grünfluoreszenz im Zytoplasma auf als Trophoblasten gesunder Kaninchen (Abb. 38A+B).



**Abb. 30: Immunfluoreszenz (A) und densitometrische Analyse (B) von HPG-Alexa Fluor 488 in Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen.** (A) Die Proteinsynthese wurde in Trophoblastzellen von Blastozysten nicht-diabetischer (ND) und diabetischer (T1DM) Kaninchen durch den Einbau von HPG mittels Alexa Fluor 488 visualisiert (grün). Die Zellkerne sind mit *Nuclear Mask™ Blue Stain* (blau) gefärbt. (B) Die Grünfluoreszenzsignalintensität wurde ermittelt und der Mittelwert der Messungen bestimmt. Alle Werte wurden relativ auf den Kontrollwert  $n_1 = 100\%$  der ND-Gruppe bezogen. (Mw  $\pm$  SEM; Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu$ m; ND= 100 %; N=3; n=6; \*\*- $p < 0,01$ )

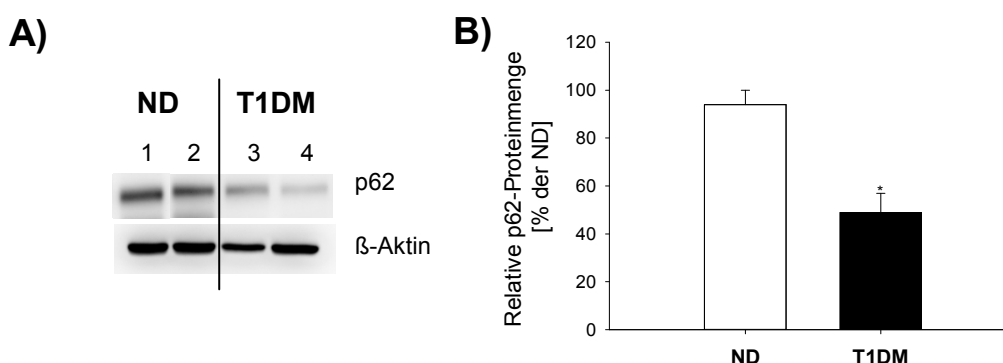
#### 4.6.8 Expression der Autophagiemarker *Beclin 1*, *LC3* und *p62* in Blastozysten diabetischer Kaninchen

Die Aktivierung von mTORC1 führt zur Inhibierung der zellulären Autophagie (Übersichtsartikel: Jung *et al.* 2010). Als Marker für die Autophagie wurden das für die Initiation des Autophagosoms wichtige *Beclin 1* und das *Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3* (*LC3*) in Blastozysten des Gastrulationsstadiums 2 diabetischer Kaninchen mittels quantitativer Echtzeit-PCR untersucht. Es ergab sich kein Unterschied der *Beclin 1*- und *LC3*-Transkriptmengen von Blastozysten nicht-diabetischer und diabetischer Kaninchen (Abb. 31).



**Abb. 31: Transkriptmengen von *Beclin 1* und *LC3* in Blastozysten diabetischer Kaninchen.** Die Transkriptmengen wurden mittels RTq-PCR in nicht-diabetischen und diabetischen Kaninchenblastozysten quantifiziert. Die Anzahl der Transkripte beziehen sich auf die Anzahl der zugehörigen *GAPDH*-Transkripte der gleichen Probe. (Mw  $\pm$  SEM; N=3; n=9)

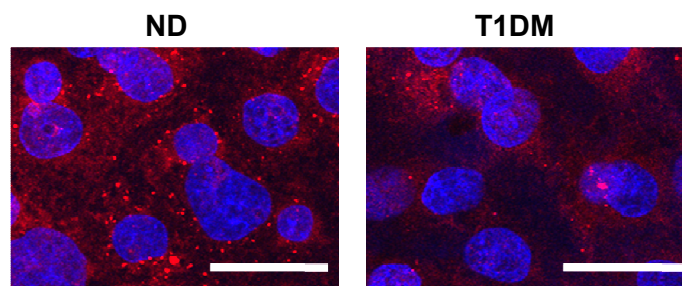
Nucleoporin *p62* wurde als weiterer Autophagiemarker in Blastozysten des Gastrulationsstadiums 2 nicht-diabetischer und diabetischer Kaninchen mittels Western Blot analysiert (Abb. 32A). Blastozysten diabetischer Kaninchen wiesen eine signifikant niedrigere *p62*-Proteinmenge auf (Abb. 32B).



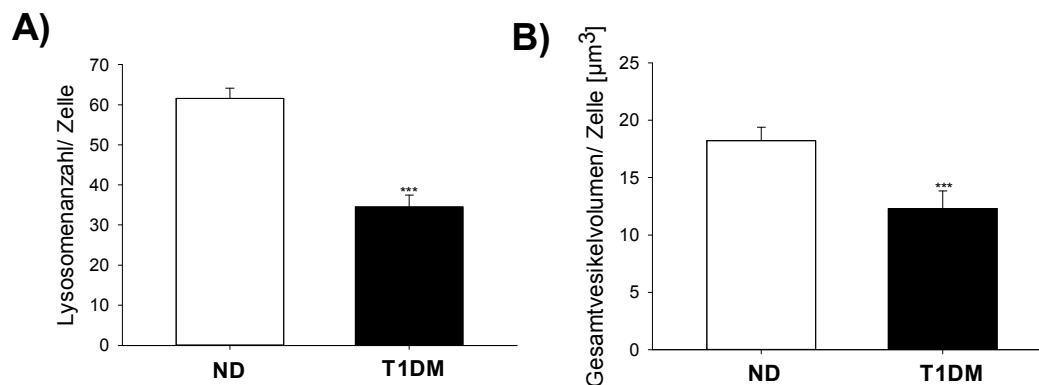
**Abb. 32: Relative Proteinmenge von *p62* in Blastozysten diabetischer Kaninchen.** (A) Western Blot-Nachweis von *p62* in zwei gepoolten Proteinproben (n=10 Blastozysten pro Probe) von Blastozysten des Gastrulationsstadiums 2 nicht-diabetischer (ND 1, 2) und diabetischer (T1DM 3, 4) Kaninchen am Tag 6 *p.c.* und (B) densitometrische Quantifizierung der relativen *p62*-Proteinmenge. Die *p62*-Proteinmenge wurde auf die Proteinmenge von  $\beta$ -Aktin normiert. Alle *p62*-Proteinmengen wurden relativ auf den Kontrollwert n1= 100% der ND-Gruppe bezogen. (Mw  $\pm$  SEM; N=4; n=30; \* $p$  < 0,05)

#### 4.6.9 Bestimmung der Anzahl von Lysosomen in Blastozysten diabetischer Kaninchen

In Trophoblastzellen des Gastrulationsstadiums 2 nicht-diabetischer und diabetischer Kaninchen wurden die Lysosomen mittels Immunfluoreszenz detektiert (Kapitel 3.4; Abb. 33). In Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen war die Lysosomenanzahl um die Hälfte verringert (Abb. 34A). Insgesamt war die Lysosomenmenge in Trophoblastzellen ( $34 \pm 3$  Lysosomen pro Trophoblastzelle) gering. Nach Meyers weisen Säugerzellen ca. 50 bis 1000 Lysosomen pro Zelle auf (Meyers 2004). Der Wert von Lysosomen pro Zelle für Blastozysten gesunder Kaninchen ( $61 \pm 2$  Lysosomen pro Trophoblastzelle) lag im unteren Normalbereich. Das Gesamtvesikelvolumen aller azider Vesikel in den Trophoblastzellen war in diabetischer Kaninchen geringer (Abb. 34B).



**Abb. 33: Immunfluoreszenz der Lysosomenfärbung in Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen.** Lysosomen und azide Vesikel (beides in rot) wurden in Trophoblastzellen von Blastozysten nicht-diabetischer (ND) und diabetischer (T1DM) mittels LysoTracker<sup>R</sup> Deep Red markiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst (blau) gegengefärbt. (Maßstabsbalken entspricht 31  $\mu\text{m}$ )



**Abb. 34: Lysosomenanzahl (A) und Vesikelvolumen (B) von Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen.** Die aziden Vesikel wurden mit LysoTracker<sup>R</sup> Deep Red gefärbt. Die Lysosomenanzahl (A) und das Gesamtvesikelvolumen (B) wurden in Trophoblastzellen von Blastozysten nicht-diabetischer (ND) und diabetischer (T1DM) Kaninchen analysiert. In (A) wurden die rotgefärbten Vesikel des Größenbereichs  $0,01$  bis  $8 \mu\text{m}^3$  gezählt und in (B) das Fluoreszenzsignal aller Vesikel über den Volocity 3D Software-Algorithmus als Volumen bestimmt. (Mw  $\pm$  SEM; N= 3; n=10; \*\*\*- $p < 0,001$ )

#### 4.7 Expression von FoxO1 in Kaninchenblastozysten

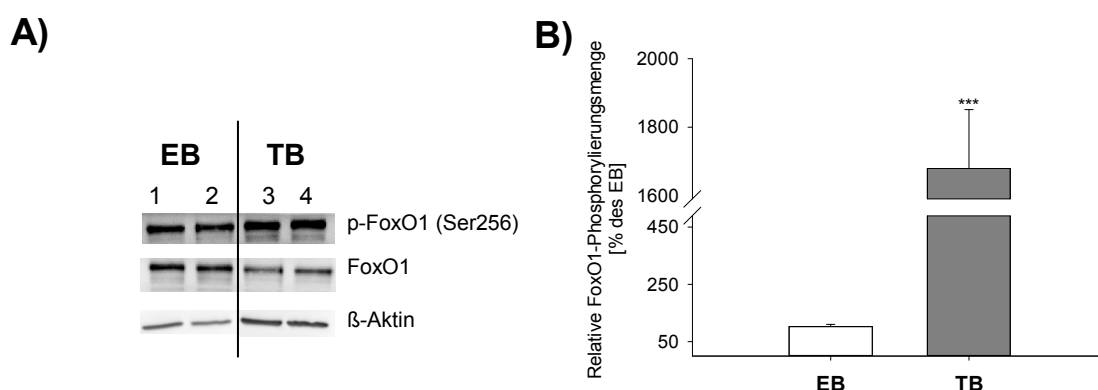
Der Nachweis von aktiven FoxO-Genen in Embryonen des Kaninchens wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von Asis Mousa und der Masterarbeit von Karen Uhde durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde der Phosphorylierungsstatus von FoxO1 in Präimplantationsembryonen des Kaninchens, der Einfluss von Glukose und L-Leucin und eines maternalen Typ 1 Diabetes mellitus auf FoxO1 in Blastozysten untersucht. Ausgehend davon wurde die Frage nach einer möglichen Quervernetzung von FoxO1 und der mTOR-Signalkaskade experimentell untersucht.

FoxO1 ist ein Transkriptionsfaktor, der durch die Phosphorylierung am Serinrest 256 deaktiviert wird, indem er aus dem Kern transloziert und im Zytoplasma abgebaut wird. Eine stärkere FoxO1-Phosphorylierung deutet also auf eine Inaktivierung hin. Der verwendete FoxO1-Antikörper bringt in Abhängigkeit vom Phosphorylierungsstatus von FoxO1 teilweise Doppelbanden im Western-Blot hervor. Ist FoxO1 noch an weiteren Phosphorylierungsstellen phosphoryliert, dann können durch die SDS-PAGE-Auftrennung Unterschiede in der Proteinlauffront und somit Doppelbanden entstehen.

##### 4.7.1 FoxO1 in Embryoblast- und Trophoblastzellen

Die Proteinmenge und der Anteil der Phosphorylierung von FoxO1 wurden im Embryoblasten und Trophoblasten von Kaninchenblastozysten des Gastrulationsstadiums 2 mittels Western Blot untersucht (Abb. 35A).

Die Proteinmenge von FoxO1 war in Trophoblastzellen (TB:  $17,98 \pm 2,0$  %) um das ungefähr 6-fache im Vergleich zu Embryoblastzellen (EB:  $105,9 \pm 10,9$  %) verringert ( $p < 0,001$ ). Die relative Phosphorylierungsmenge von FoxO1 war in Trophoblastzellen signifikant höher als in Embryoblastzellen (Abb. 35B).



**Abb. 35: Relative Phosphorylierung von FoxO1 in Embryoblast- (EB) und Trophoblastzellen (TB).** (A) Western Blot-Nachweis von FoxO1, seiner Phosphorylierung und  $\beta$ -Aktin in zwei gepoolten Proteinproben ( $n \geq 5$  Blastozysten pro Probe) von Blastozysten des Gastrulationsstadiums 2 gesunder Kaninchen separiert in Embryoblast (EB 1, 2) und Trophoblast (TB 3, 4) am Tag 6 *p.c.* und (B) densitometrische Quantifizierung der relativen Phosphorylierungsmenge. Die Menge des phosphorylierten FoxO1 wurde auf die Proteinmenge von FoxO1 normiert. Alle Phosphorylierungsmengen wurden relativ auf den Kontrollwert  $n_1 = 100\%$  der EB-Gruppe bezogen. (Mw  $\pm$  SEM; N=3;  $n \geq 15$ ; \*\*\*- $p < 0,001$ )

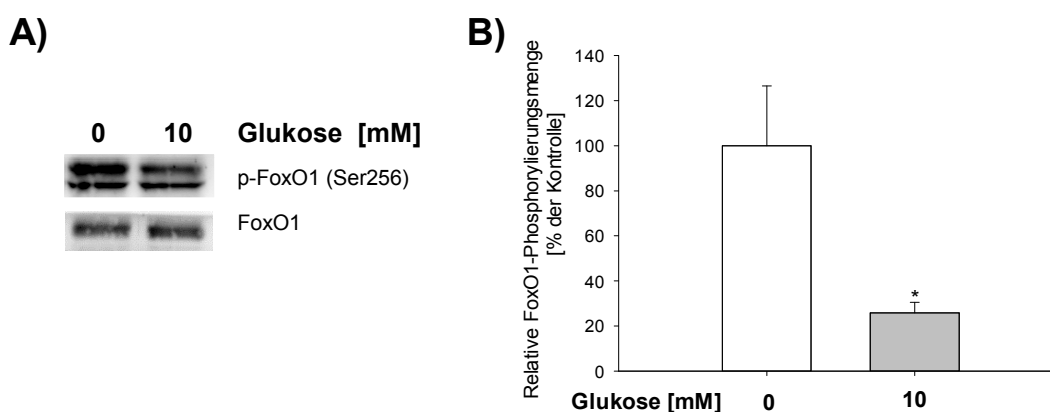


Diese Ergebnisse deuten auf eine verringerte Aktivität von FoxO1 in Zellen des Trophoblasten hin, denn eine erhöhte FoxO1-Phosphorylierung weist auf eine forcierte Translokation von FoxO1 aus dem Zellkern mit folgendem zytoplasmatischem Abbau hin, was durch die geringere FoxO1-Proteinmenge in Trophoblastzellen nachgewiesen wurde.

#### 4.7.2 Phosphorylierung von FoxO1 in Blastozysten durch Glukose

Eine verringerte FoxO1-Phosphorylierung mit folgender, verstärkter Bindung von FoxO1 an die DNA wurde nach erhöhten Glukosekonzentrationen bereits beschrieben (Behl *et al.* 2009). Um dies nachzustellen, wurden Blastozysten gesunder Kaninchen mit 0 und 10 mM Glukose *in vitro* kultiviert (Kapitel 3.1.8.3) und die FoxO1-Phosphorylierung mittels Western Blot analysiert (Abb 36A).

Nach 60-minütiger Kultur mit Glukose reduzierte sich die Phosphorylierungsmenge von FoxO1 verglichen mit Blastozysten, die ohne Glukose kultiviert wurden (Abb. 36B). Ist FoxO1 weniger phosphoryliert, so kann es als Transkriptionsfaktor an die DNA binden, was einer Aktivierung von FoxO1 durch Glukose entspricht.

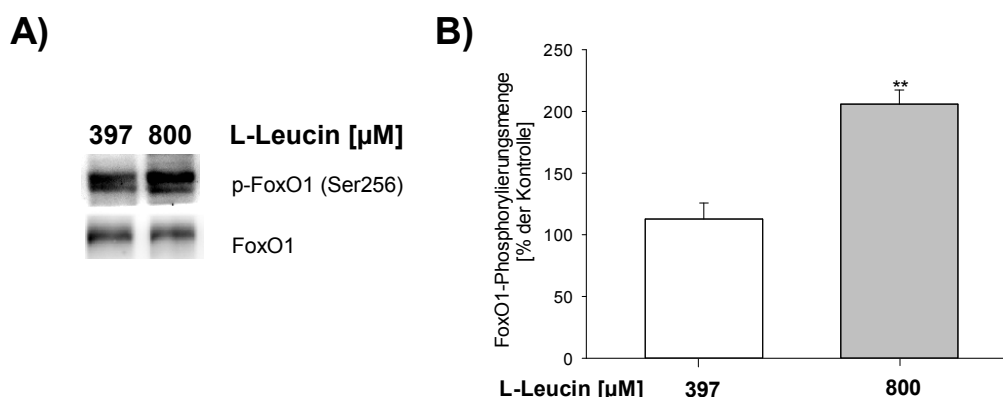


**Abb. 36: Relative Phosphorylierung von FoxO1 nach der Kultur mit 0 mM und 10 mM Glukose.** (A) Western Blot-Nachweis von FoxO1 und seiner Phosphorylierung in einer gepoolten Proteinproben (n=8 Blastozysten pro Probe) und (B) densitometrische Quantifizierung der relativen Phosphorylierungsmenge in Blastozysten kultiviert mit 0 mM oder 10 mM Glukose für 60 Minuten. Die Menge des phosphorylierten FoxO1 wurde auf die Proteinmenge von FoxO1 normiert. Alle Phosphorylierungsmengen wurden relativ auf den Kontrollwert n1= 100% der Kontrollgruppe (0 mM Glukose) bezogen. (Mw  $\pm$  SEM; N=3; n=24; \*-p< 0,05)

#### 4.7.3 Phosphorylierung von FoxO1 in Blastozysten durch L-Leucin

Die L-Leucinkonzentration war in Blastozysten diabetischer Kaninchen um das 3-fache erhöht (Kapitel 4.2.3.2). Deshalb wurde analysiert, ob Änderungen der Verfügbarkeit von L-Leucin Einfluss auf die Aktivität von FoxO1 haben. Kaninchenblastozysten des Gastrulationsstadiums 1 wurden mit einer hohen L-Leucinkonzentration (800  $\mu$ M) für eine Stunde *in vitro* kultiviert (Kapitel 3.1.8.4). Die FoxO1-Phosphorylierung wurde mittels Western Blot detektiert (Abb. 37A).

Die Phosphorylierungsmenge von FoxO1 war nach der Kultur mit 800  $\mu\text{M}$  L-Leucin signifikant erhöht (Abb. 37B), was auf eine Inaktivierung von Foxo1 hinweist.

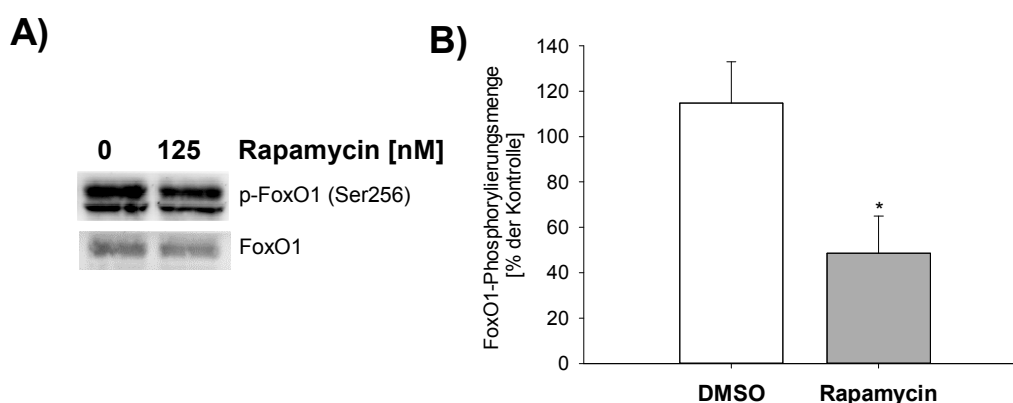


**Abb. 37: Relative Phosphorylierung von FoxO1 nach der Kultur mit 800  $\mu\text{M}$  L-Leucin.** (A) Western Blot-Nachweis von FoxO1 und seiner Phosphorylierung in einer gepoolten Proteinproben (n=10 Blastozysten pro Probe) und (B) densitometrische Quantifizierung der relativen Phosphorylierungsmenge in Blastozysten kultiviert mit 397 oder 800  $\mu\text{M}$  L-Leucin für 30 Minuten. Die Menge des phosphorylierten FoxO1 wurde auf die Proteinmenge von FoxO1 normiert. Alle Phosphorylierungsmengen wurden relativ auf den Kontrollwert n1= 100% der Kontrollgruppe (397  $\mu\text{M}$  L-Leucin) bezogen. (Mw  $\pm$  SEM; N=3; n=30; \*\*-p< 0,01)

#### 4.7.4 Phosphorylierung von FoxO1 in Blastozysten durch Rapamycin

Um die Abhängigkeit der FoxO1-Phosphorylierung von mTORC1 in Embryonen zu untersuchen, wurden Kaninchenblastozysten des Gastrulationsstadium 1 mit dem mTORC1-Inhibitor Rapamycin für eine Stunde *in vitro* kultiviert (Kapitel 3.1.8.6). Die FoxO1-Phosphorylierungsmenge wurde mittels Western Blot analysiert (Abb. 38A).

Nach der Kultur mit Rapamycin war die Phosphorylierungsmenge von FoxO1 signifikant reduziert (Abb. 38B). Dieses Ergebnis bestätigt eine mTORC1-abhängige Regulation von FoxO1.

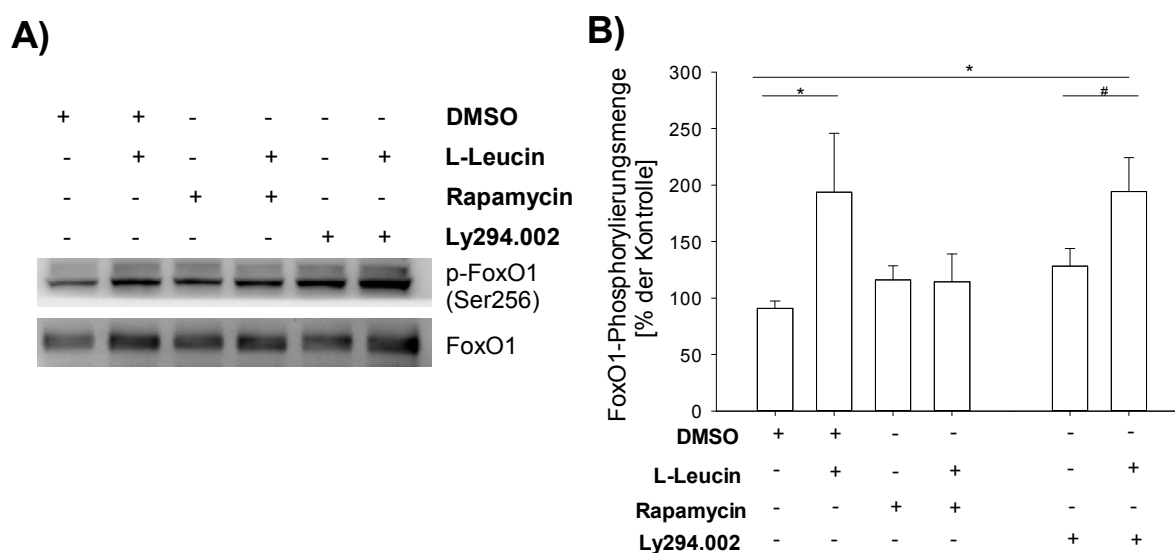


**Abb. 38: Relative Phosphorylierung von FoxO1 nach der Kultur mit 125 nM Rapamycin.** (A) Western Blot-Nachweis von FoxO1 und seiner Phosphorylierung in einer gepoolten Proteinproben (n=8 Blastozysten pro Probe) und (B) densitometrische Quantifizierung der relativen Phosphorylierungsmenge in Blastozysten kultiviert mit 125 nM oder ohne Rapamycin (Vehikelkontrolle DMSO) für 60 Minuten. Die Menge des phosphorylierten FoxO1 wurde auf die Proteinmenge von FoxO1 normiert. Alle Phosphorylierungsmengen wurden relativ auf den Kontrollwert n1= 100% der Kontrollgruppe (DMSO; ohne Rapamycin) bezogen. (Mw  $\pm$  SEM; N=3; n=24; \*-p< 0,05)

#### 4.7.5 Identifikation von mTOR- oder Akt-abhängigen Phosphorylierung von FoxO1 in Blastozysten

Wie *in vitro* gezeigt werden konnte steigerte eine Erhöhung der L-Leucinkonzentration die Phosphorylierung von FoxO1 in kultivierten Kaninchenblastozysten (Kapitel 4.7.3). Um zu prüfen, ob dieser Effekt über den Nährstoffsensor mTOR oder über die Proteinkinase B (Akt) vermittelt wird, wurden Kaninchenblastozysten mit dem mTORC1-Inhibitor Rapamycin oder dem Akt-Inhibitor Ly294.002 und mit 800  $\mu$ M L-Leucin für 30 Minuten *in vitro* kultiviert (Kapitel 3.1.8.7). Die FoxO1-Phosphorylierungsmenge wurde mittels Western Blot detektiert (Abb. 39A).

Die Zugabe von Rapamycin inhibierte die L-Leucin induzierte Steigerung der FoxO1-Phosphorylierung (Abb. 39B). Ly294.002 dagegen hatte keinen Einfluss auf die Phosphorylierungsinduktion durch L-Leucin (Abb. 39B). Dieses Ergebnis bestätigt, dass die L-Leucin-abhängige Regulation der FoxO1-Phosphorylierung in *in vitro* kultivierten Kaninchenblastozysten über mTORC1 vermittelt wird und unabhängig von Akt ist.



**Abb. 39: Relative Phosphorylierung von FoxO1 nach der Kultur mit L-Leucin und Rapamycin oder Ly294.002.** (A) Western Blot-Nachweis von FoxO1 und ihrer Phosphorylierung Blot in einer gepoolten Proteinproben (n= 3 Blastozysten pro Probe) und (B) densitometrische Quantifizierung der relativen Phosphorylierungsmenge in Blastozysten kultiviert mit L-Leucin und Rapamycin oder Ly294.002. Die Menge des phosphorylierten FoxO1 wurde auf die Proteinmenge von FoxO1 normiert. Alle Phosphorylierungsmengen wurden relativ auf den Kontrollwert n1= 100% der Kontrollgruppe (DMSO) bezogen (Mw  $\pm$  SEM; N= 3; n= 9; \* $p$ < 0.05; # $p$ =0.057)

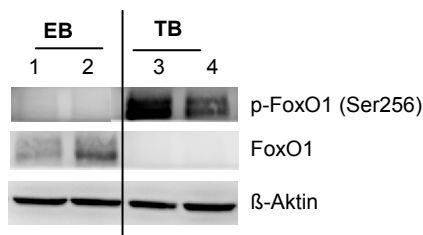
#### 4.7.6 FoxO1 in Embryoblast- und Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen

Die FoxO1-Proteinmenge und -Phosphorylierung wurden in separierten Embryoblast- und Trophoblastzellen 6 Tage alter Blastozysten von diabetischen Kaninchen mittels Western Blot analysiert (Abb. 40).

Im Embryoblasten diabetischer Kaninchen konnte kein phospho-FoxO1 detektiert werden (Abb. 40). FoxO1-Protein konnte in Embryoblastzellen nachgewiesen werden. In

Trophoblastzellen war im Western Blot ausschließlich ein Signal für phospho-FoxO1 nachweisbar, wohingegen im Blot mit FoxO1-Antikörper keine Bande sichtbar war. Ein Grund für den negativen Blot könnte in der geringen FoxO1-Proteinmenge und der Sensitivitätsgrenzen der FoxO1-Antikörper liegen.

Bemerkenswert ist, dass FoxO1 in Embryoblastzellen am Serin 256 nicht phosphoryliert war, was auf eine Aktivität von FoxO1 hinweist, und in Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen stark phosphoryliert war, was eine Inaktivierung in Trophoblastzellen andeutet (Abb. 40).

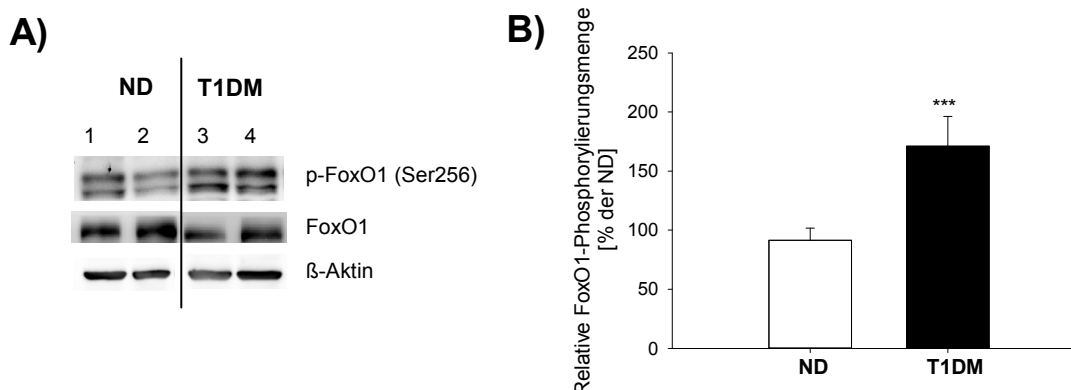


**Abb. 40: Nachweis von FoxO1-Protein und -Phosphorylierung in Embryoblast- (EB) und Trophoblastzellen (TB) diabetischer Kaninchen.** Western Blot-Nachweis von FoxO1, seiner Phosphorylierung und  $\beta$ -Aktin in zwei gepoolten Proteinproben ( $n \geq 5$  Blastozysten pro Probe) von separierten Embryoblast (EB 1, 2) und Trophoblastzellen (TB 3, 4) aus Blastozysten diabetischer Kaninchen. ( $N=3$ ;  $n \geq 15$ )

#### 4.7.7 FoxO1 in Blastozysten diabetischer Kaninchen

Die Protein- und Phosphorylierungsmenge von FoxO1 wurden in Blastozysten des Gastrulationsstadium 2 diabetischer Kaninchen mittels Western Blot untersucht.

Die relative Proteinmenge von FoxO1 in Blastozysten diabetischer ( $49,8 \pm 6,5$  %) war verglichen mit Blastozysten gesunder Kaninchen ( $109,8 \pm 14,3$  %;  $p=0,022$ ) um die Hälfte reduziert (Abb. 41A). Die FoxO1-Phosphorylierungsmenge in Blastozysten diabetischer Kaninchen signifikant erhöht (Abb. 41B), was auf eine Inaktivierung von FoxO1 in diesen Blastozysten hindeutet.

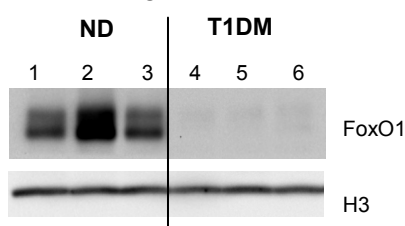


**Abb. 41: Relative Phosphorylierung von FoxO1 in Blastozysten diabetischer Kaninchen.** (A) Western Blot-Nachweis von FoxO1, seiner Phosphorylierung und  $\beta$ -Aktin in zwei gepoolten Proteinproben ( $n=10$  Blastozysten pro Probe) von Blastozysten gesunder (ND 1, 2) und diabetischer (T1DM 3, 4) am Tag 6 *p.c.* und (B) densitometrische Quantifizierung der relativen Phosphorylierungsmenge. Die Menge des phosphorylierten FoxO1 wurde auf die Proteinmenge von FoxO1 normiert. Alle Phosphorylierungsmengen wurden relativ auf den Kontrollwert  $n1= 100\%$  der ND-Gruppe bezogen. ( $Mw \pm SEM$ ;  $N=4$ ;  $n=40$ ; \*\*\*- $p < 0,001$ )

#### 4.7.7.1 FoxO1-Nachweis in der Kernfraktion von Trophoblastzellen nicht-diabetischer und diabetischer Kaninchen

Weiterhin wurde die FoxO1-Proteinmenge in der Kernproteinfraktion von Trophoblastzellen nicht-diabetischer und diabetischer Kaninchen mittels Western-Blot untersucht (Kapitel 3.2.10.2.1). Für das FoxO1-Protein wurde in der Kernfraktion von Trophoblastzellen nicht-diabetischer Kaninchen ein starkes Signal detektiert, wohingegen in der Kernfraktion von Trophoblastzellen nicht-diabetischer Kaninchen FoxO1-Protein nicht oder nur in sehr geringen Mengen nachweisbar war (Abb. 42).

Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass FoxO1 in Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen im Vergleich zu nicht-diabetischen Kaninchen weniger bzw. nicht aktiv ist.



**Abb. 42: Nachweis von FoxO1-Protein in der Kernproteinfraktion von Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen.** Western Blot-Nachweis von FoxO1 und H3 in drei gepoolten Proteinproben ( $n \geq 5$  Blastozysten pro Probe) von separierten Trophoblastzellen von Blastozysten gesunder (ND 1, 2, 3) und diabetischer (T1DM 4, 5, 6) Kaninchen am Tag 6 *p.c.* (N=3;  $n \geq 15$ )

#### 4.7.8 Quantifizierung der FoxO1-Zielgene *LC3*, *PEPCK* und *HK2* in Blastozysten diabetischer Kaninchen

Die Expression der potentiellen Zielgene von FoxO1 wurden in separierten Embryoblast- und Trophoblastzellen des Gastrulationsstadiums 2 nicht-diabetischer und diabetischer Kaninchen mittels quantitativer Echtzeit-PCR quantifiziert.

Die Transkriptmengen waren von *PEPCK* in Trophoblastzellen höher und *LC3* und *HK2* niedriger als im Embryoblasten (Tab. 12).

Bei Blastozysten diabetischer Kaninchen waren die Transkriptmengen von *LC3*, *PEPCK* und *HK2* sowohl im Embryoblasten als auch im Trophoblasten reduziert, wobei der deutlichste Unterschied für *PEPCK* gemessen wurde.

**Tab. 12: Relative Transkriptmengen von *LC3*, *PEPCK* und *HK2* in Blastozysten diabetischer Kaninchen.** Alle Transkriptmengen wurden relativ auf den Kontrollwert  $n1 = 100\%$  der EB-Gruppe nicht-diabetischer Kaninchen bezogen. (EB= Embryoblast;  $Mw \pm SEM$ ; N= 3;  $n \geq 7$ ; zweifaktorieller ANOVA; a - signifikanter Unterschied zwischen nicht-diabetisch (ND) und diabetisch (T1DM); b - signifikanter Unterschied zwischen Embryoblast und Trophoblast; \*- $p < 0,05$ ; \*\*- $p < 0,01$ ; \*\*\*- $p < 0,001$ )

Gen	Relative Transkriptmenge in [% des EB von ND]			
	ND		T1DM	
	Embryoblast	Trophoblast	Embryoblast	Trophoblast
<i>LC3</i>	108,8 ± 11,6	48,0 ± 11,6 <b>b**</b>	62,8 ± 12,7 <b>a*</b>	20,6 ± 14,2 <b>b*</b>
<i>PEPCK</i>	96,2 ± 15,9	199,6 ± 36,3 <b>b**</b>	50,1 ± 10,7 <b>a*</b>	54,7 ± 16,8 <b>a***</b>
<i>HK2</i>	118,4 ± 16,83	45,6 ± 9,6 <b>b***</b>	78,1 ± 7,3 <b>a*</b>	33,6 ± 5,0 <b>b**</b>

#### 4.8 Langzeit-*in-vitro*-Kultur mit nicht-diabetischen und diabetischen Konzentrationen an BCAA

Um den direkten Einfluss von diabetischen BCAA-Konzentrationen auf die Aktivierung des mTOR-Signalweges und von FoxO1 in Embryonen zu untersuchen, wurden Kaninchenblastozysten *in vitro* für 6 Stunden mit den *in vivo* BCAA-Konzentrationen von Blastozysten nicht-diabetischer (112  $\mu$ M L-Leucin; 84  $\mu$ M L-Isoleucin; 268  $\mu$ M L-Valin) und diabetischer (373  $\mu$ M L-Leucin; 265  $\mu$ M L-Isoleucin; 568  $\mu$ M L-Valin) Kaninchen kultiviert (Kapitel 3.1.8.8).

##### 4.8.1 Bestimmung des Wachstums von *in vitro* kultivierten Blastozysten mit nicht-diabetischen und diabetischen BCAA-Konzentrationen

Der Durchmesser der *in vitro* kultivierten Blastozysten wurde vor Kulturbeginn und nach der Kultur durch eine Messung mittels Stereolupe bestimmt. Für die Analyse der Durchmesserzunahme wurden pro Gruppe 22 Blastozysten aus 4 verschiedenen Experimenten verwendet (N=4; n=22).

Die durchschnittliche Zunahme der Blastozystengröße betrug bei Blastozysten kultiviert mit nicht-diabetischen BCAA-Konzentration (BCAA-ND)  $2,1 \pm 0,2$  mm und bei Blastozysten kultiviert mit diabetischen BCAA-Konzentrationen (BCAA-T1DM)  $3,0 \pm 0,2$  mm. Es ergab sich hierbei ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen ( $p=0,003$ ).

##### 4.8.2 Interferenz des mTOR-Signalweges und FoxO1 in *in vitro* kultivierten Blastozysten mit nicht-diabetischen und diabetischen BCAA-Konzentrationen

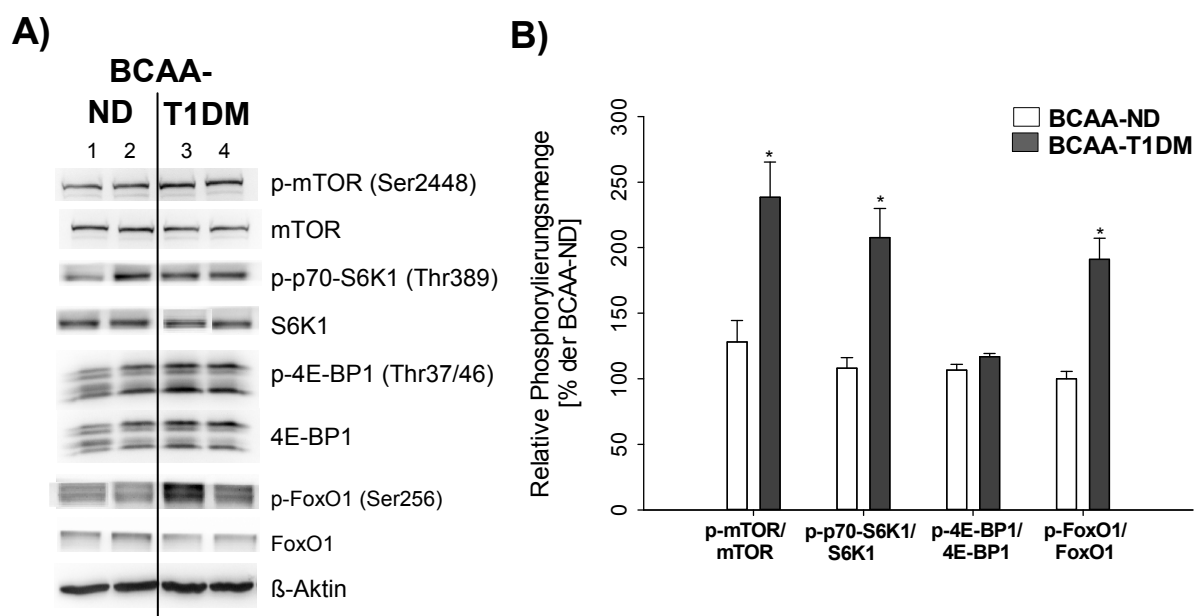
Mittels Western-Blot wurden die Protein- und Phosphorylierungsmengen von mTOR, S6K1, 4E-BP1 und FoxO1 in beiden Versuchsgruppen analysiert.

**Tab. 13: Relative Proteinmengen von mTOR, S6K1, 4E-BP1 und FoxO1 in Blastozysten kultiviert mit nicht-diabetischen (BCAA-ND) oder diabetischen (BCAA-T1DM) BCAA-Konzentration für 6h *in vitro*.** Die Proteinmengen von mTOR, S6K1, 4E-BP1 und FoxO1 wurden auf  $\beta$ -Aktin normiert. Alle Proteinmengen wurden relativ auf den Kontrollwert  $n1= 100\%$  der Kontrollgruppe (BCAA-ND) bezogen. (Mw  $\pm$  SEM; N=4; n=12)

Protein	Relative Proteinmenge [% der BCAA-ND]		p-Wert
	BCAA-ND	BCAA-T1DM	
mTOR	99,3 $\pm$ 1,4	93,6 $\pm$ 10,3	-
S6K1	104,8 $\pm$ 4,8	84,9 $\pm$ 6,0	-
4E-BP1	108,4 $\pm$ 4,9	121,6 $\pm$ 13,6	-
FoxO1	95,4 $\pm$ 4,6	54,6 $\pm$ 7,0	0,006

Die Proteinmengen von mTOR, S6K1 und 4E-BP1 blieben nach der Kultur mit diabetischen BCAA-Konzentrationen unverändert (Tab. 13), wobei die mTOR- und S6K1-Phosphorylierungsmengen signifikant erhöht waren (Abb. 43B). Die Phosphorylierungsmenge von 4E-BP1 blieb unverändert.

Nach der Kultur mit diabetischen BCAA-Konzentrationen war die FoxO1-Proteinmenge hingegen signifikant verringert (Tab. 13). Der Anteil von phospho-FoxO1 war signifikant erhöht (Abb. 43B).



**Abb. 43: Relative Phosphorylierung von mTOR, S6K1, 4E-BP1 und FoxO1 in Blastozysten kultiviert mit nicht-diabetischen und diabetischen BCAA für 6h *in vitro*.** (A) Western Blot-Nachweis von mTOR, S6K1, 4E-BP1 und FoxO1, ihrer Phosphorylierung und  $\beta$ -Aktin in zwei gepoolten Proteinproben (n=3 Blastozysten pro Probe) von Blastozysten, die mit nicht-diabetischen (BCAA-ND 1, 2) und diabetischen (BCAA-T1DM 3, 4) BCAA-Konzentrationen für 6 Stunden kultiviert wurden und (B) densitometrische Quantifizierung der relativen Phosphorylierungsmenge. Die Menge des phosphorylierten Proteins wurde auf die unphosphorylierte Proteinmenge normiert. Alle Phosphorylierungsmengen wurden relativ auf den Kontrollwert n1= 100% der Kontrollgruppe (BCAA-ND) bezogen. (Mw  $\pm$  SEM; N=4; n=12; \*-p< 0,05)

#### 4.8.3 Expressionsanalysen von *CCND1*, *eIF4E* und *SLC7A8* nach der *in vitro* Kultur mit nicht-diabetischen und diabetischen BCAA-Konzentrationen

In Korrelation zu der erhöhten Phosphorylierung von mTOR und S6K1 waren die Transkriptmengen von *CCND1*, *eIF4E* und *SLC7A8* nach der Kultur mit diabetischen BCAA-Konzentrationen signifikant erhöht (Tab. 14).

Dieses Ergebnis zeigt eine transkriptionelle Regulation von *CCND1*, *eIF4E*, und *SLC7A8* über die BCAA-Verfügbarkeit.

**Tab. 14: Relative Transkriptmenge von *CCND1*, *eIF4E* und *SLC7A8* in Blastozysten kultiviert mit nicht-diabetischen und diabetischen BCAA-Konzentration für 6h *in vitro*.** Alle Transkriptmengen wurden relativ auf den Kontrollwert n1= 100% der Kontrollgruppe (BCAA-ND) bezogen. (Mw  $\pm$  SEM; N=4; n=10)

Gen	Relative Transkriptmenge [% der BCAA-ND]		p-Wert
	BCAA-ND	BCAA-T1DM	
<b><i>CCND1</i></b>	108,2 $\pm$ 18,9	254,5 $\pm$ 56,7	0,039
<b><i>eIF4E</i></b>	98,4 $\pm$ 8,1	159,6 $\pm$ 13,6	0,001
<b><i>SLC7A8</i></b>	110,3 $\pm$ 26,3	255,1 $\pm$ 50,2	0,02

#### 4.9 Langzeit-*in-vitro*-Kultur ohne BCAA

Um den Einfluss der BCAA auf die Entwicklung, den mTOR-Signalweg und FoxO1 zu prüfen, wurden Blastozysten des Gastrulationstadiums 1 gesunder Kaninchen für 6 Stunden mit oder ohne BCAA kultiviert (Kapitel 3.1.8.9).

##### 4.9.1 Aminosäurenmessung in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit nach der Kultur ohne BCAA

Die Blastozystenhöhlenflüssigkeit der *in vitro* kultivierten Blastozysten wurde gewonnen und in Hinblick auf ihre Aminosäurezusammensetzung mittels HPLC untersucht.

Blastozysten, kultiviert ohne BCAA, zeigten geringere Konzentrationen von Valin, Isoleucin, Leucin und Serin in ihrer Blastozystenhöhlenflüssigkeit als Blastozysten, die mit BCAA-Standardkonzentrationen kultiviert wurden, wohingegen die Glutamatkonzentration erhöht war (Tab. 15).

**Tab. 15: Vergleich der Aminosäurenkonzentration in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit von Blastozysten kultiviert mit (+) oder ohne (-) BCAA für 6h *in vitro*.** Bei signifikanten Abweichungen der Werte zwischen beiden Gruppen sind der p-Wert und die relative Abweichung (*fold change*) angegeben. (Mw  $\pm$  SEM; N=3; n $\geq$ 8)

	+BCAA	- BCAA		
Aminosäure	C in [mM]	C in [mM]	P-Wert	<i>fold change</i>
<b>essentielle</b>				
Histidin	0,273 $\pm$ 0,0055	0,298 $\pm$ 0,014		
Threonin	0,196 $\pm$ 0,007	0,189 $\pm$ 0,028		
Methionin	0,269 $\pm$ 0,014	0,241 $\pm$ 0,018		
Tryptophan	0,005 $\pm$ 0,0003	0,005 $\pm$ 0,0003		
Phenylalanin	0,112 $\pm$ 0,003	0,122 $\pm$ 0,006		
Lysin	0,361 $\pm$ 0,015	0,323 $\pm$ 0,022		
Valin	0,210 $\pm$ 0,026	0,092 $\pm$ 0,009	0,005	0,44
Isoleucin	0,086 $\pm$ 0,013	0,012 $\pm$ 0,004	0,001	0,13
Leucin	0,468 $\pm$ 0,024	0,039 $\pm$ 0,004	0,001	0,08
<b>nicht-essentiell</b>				
Asparagin	0,148 $\pm$ 0,009	0,145 $\pm$ 0,011		
Serin	0,582 $\pm$ 0,033	0,449 $\pm$ 0,057	0,049	0,77
Glutamin	2,425 $\pm$ 0,083	2,348 $\pm$ 0,159		
Glutamat	0,342 $\pm$ 0,033	0,516 $\pm$ 0,035	0,002	1,51
Glycin	5,946 $\pm$ 0,148	5,299 $\pm$ 0,493		
Arginin	6,141 $\pm$ 2,187	7,311 $\pm$ 1,975		
Alanin	1,884 $\pm$ 0,201	1,474 $\pm$ 0,215		
Taurin	0,040 $\pm$ 0,005	0,051 $\pm$ 0,006		
Tyrosin	0,056 $\pm$ 0,002	0,056 $\pm$ 0,003		
Ornithin	0,093 $\pm$ 0,006	0,085 $\pm$ 0,006		

##### 4.9.2 Bestimmung des Wachstums und der Entwicklungskapazität von Blastozysten kultiviert ohne BCAA

Der Durchmesser der *in vitro* kultivierten Blastozysten wurde vor und nach der Kultur mittels einer Messung mit Stereolupe bestimmt. Für die Analyse der Durchmesserzunahme wurden pro Gruppe mindestens 25 Blastozysten aus 5 verschiedenen Experimenten verwendet (N=5; n $\geq$ 25). Die durchschnittliche Zunahme der Blastozystengröße betrug bei



Blastozysten kultiviert mit BCAA (+ BCAA)  $2,8 \pm 0,3\text{mm}$  und bei Blastozysten kultiviert ohne BCAA (- BCAA)  $1,9 \pm 0,3\text{mm}$ . Es ergab sich hierbei ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen ( $p=0,027$ ).

Um zu prüfen, ob ein Mangel an BCAA ebenfalls einen Einfluss auf die Entwicklungskapazität von Blastozysten hat, wurde zusätzlich vor und nach der *in vitro* Kultur das Gastrulationsstadium der einzelnen Blastozysten bestimmt und dokumentiert (Tab. 16). Von 34 Blastozysten, die mit BCAA kultiviert wurden, entwickelten sich 17 Blastozysten vom Gastrulationsstadium 1 zu 2 weiter. Dies entspricht einer Entwicklungskapazität von 50 %. Lediglich 20,6 % (7 Blastozysten von 34) der Blastozysten, die keine BCAA im Kulturmedium zur Verfügung hatten, entwickelten sich zum Gastrulationsstadium 2 weiter.

**Tab. 16: Vergleich der Gastrulationsstadien vor (VK) und nach (NK) der Kultur von Blastozysten mit (+) oder ohne (-) BCAA für 6h *in vitro*. (N=5; n=34)**

Versuch	+ BCAA Gastrulationsstadium		- BCAA Gastrulationsstadium	
	VK	NK	VK	NK
N1	1	2	1	1
	1	1	1	1
	1	2	1	1
	1	1	1	2
	1	2	1	1
	-	-	1	1
N2	1	1	1	2
	1	2	1	1
	1	2	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	2	1	1
	1	2	1	2
N3	1	1	-	-
	1	1	1	1
	1	2	1	1
	1	2	1	1
	1	2	1	1
	1	1	1	2
	1	1	1	1
	1	1	1	1
N4	1	2	1	2
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	1	2	1	1
	1	2	1	1
N5	1	2	1	1
	1	1	1	1
	1	1	1	2
	1	1	1	1
	1	2	1	1
Gesamt:		34		34

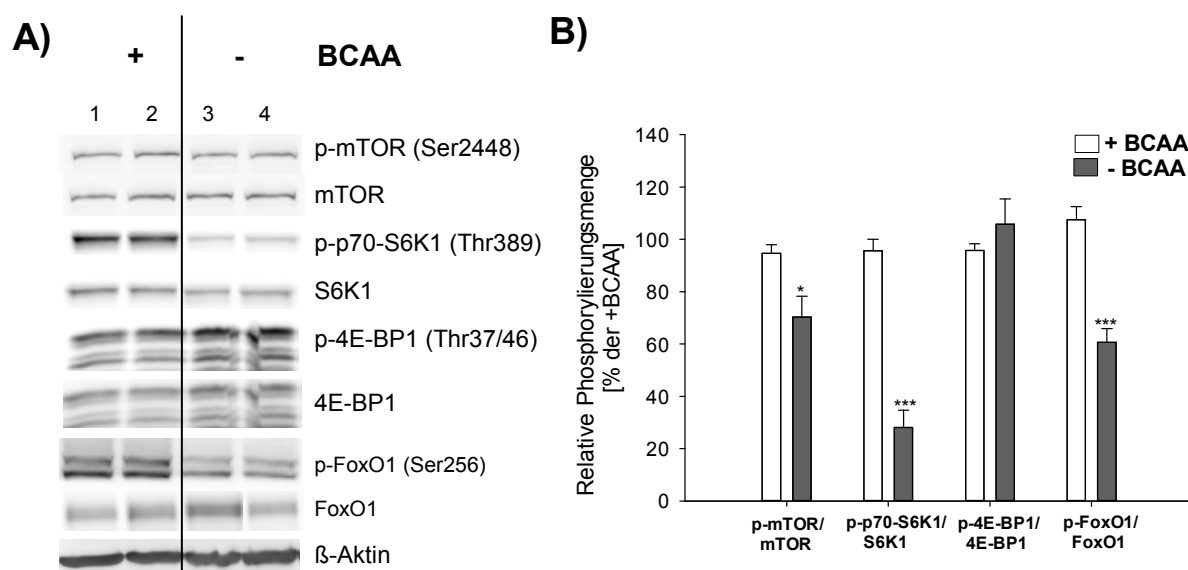
#### 4.9.3 Interferenz des mTOR-Signalweges und FoxO1 in Blastozysten kultiviert ohne BCAA

Die Protein- und Phosphorylierungsmenge von mTOR, S6K1, 4E-BP1 und FoxO1 wurde in Blastozysten, die ohne BCAA kultiviert wurden, mittels Western Blot analysiert.

Die Proteinmengen von mTOR, S6K1, 4E-BP1 und FoxO1 waren durch die Kultur ohne BCAA unverändert (Tab. 17; Abb. 44A), wohingegen die Phosphorylierungsmengen von mTOR, S6K1 und FoxO1 signifikant verringert waren (Abb. 44B). Die 4E-BP1-Phosphorylierung blieb unverändert.

**Tab. 17: Relative Proteinmengen von mTOR, S6K1, 4E-BP1 und FoxO1 in Blastozysten kultiviert mit (+) oder ohne (-) BCAA für 6h *in vitro*.** Die Proteinmengen von mTOR, S6K1, 4E-BP1 und FoxO1 wurden auf  $\beta$ -Aktin normiert. Alle Proteinmengen wurden relativ auf den Kontrollwert  $n=100\%$  der Kontrollgruppe (+ BCAA) bezogen. (Mw  $\pm$  SEM; N=4; n=12)

Protein	Relative Proteinmenge [% der + BCAA]	
	+ BCAA	+ BCAA
mTOR	119,3 $\pm$ 11,2	115,5 $\pm$ 9,2
S6K1	112,2 $\pm$ 7,7	96,4 $\pm$ 20,3
4E-BP1	102,3 $\pm$ 3,8	83,1 $\pm$ 11,1
FoxO1	95,3 $\pm$ 4,1	97,9 $\pm$ 4,3



**Abb. 44: Relative Phosphorylierung von mTOR, S6K1, 4E-BP1 und FoxO1 in Blastozysten kultiviert mit (+) oder ohne (-) BCAA für 6h *in vitro*.** (A) Western Blot-Nachweis von mTOR, S6K1, 4E-BP1 und FoxO1, ihrer Phosphorylierung und  $\beta$ -Aktin in zwei gepoolten Proteinproben ( $n=3$  Blastozysten pro Probe) von Blastozysten, die mit (+ BCAA 1,2) und ohne (- BCAA 3,4) BCAA kultiviert wurden und (B) densitometrische Quantifizierung der relativen Phosphorylierungsmenge. Die Menge des phosphorylierten Proteins wurde auf die unphosphorylierte Proteinmenge normiert. Alle Phosphorylierungsmengen wurden relativ auf den Kontrollwert  $n=100\%$  der Kontrollgruppe (+ BCAA) bezogen. (Mw  $\pm$  SEM; N=4; n=12; \*- $p < 0,05$ ; \*\*\*- $p < 0,001$ )

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Fehlen der BCAA im Kulturmedium in Blastozysten zu einer Inhibierung des mTOR-Signalweges mit gleichzeitiger Aktivierung von FoxO1 führen kann.

#### 4.9.4 Expressionsanalyse von *Beclin*, *CCND1*, *eIF4E*, *HK2*, *LC3*, *ODC1*, *SLC7A8* und *SLC7A5* nach der Kultur ohne BCAA

Die Expressionsanalyse mittels quantitativer Echtzeit-PCR ergab keine Veränderungen der Transkriptmengen von den mTORC1-Zielgenen *CCND1* und *eIF4E* nach der Kultur ohne BCAA (Tab. 18). Die Transkriptmengen von den FoxO1-Zielgenen *HK2* und *LC3* stiegen nach der Kultur ohne BCAA signifikant an (Tab. 18), was die erhöhte Aktivität von FoxO1 als Transkriptionsfaktor bestätigt.

Der BCAA-Transporter *SLC7A8* nimmt eine Sonderstellung ein; er kann transkriptionell sowohl über mTOR als auch über FoxO1 reguliert werden. Eine Kultur ohne BCAA bewirkte einen transkriptionellen Anstieg von *SLC7A8*.

**Tab. 18: Relative Transkriptmenge von *Beclin*, *CCND1*, *eIF4E*, *HK2*, *LC3*, *ODC1*, *SLC7A8* und *SLC7A5* in Blastozysten kultiviert mit (+) oder ohne (-) BCAA für 6h *in vitro*. Alle Transkriptmengen wurden relativ auf den Kontrollwert n1= 100% der Kontrollgruppe (+ BCAA) bezogen. (Mw ± SEM; N=5; n≥15)**

Gen	Relative Transkriptmenge [% der + BCAA]		P-Wert
	+ BCAA	- BCAA	
<i>Beclin</i>	91,2 ± 9,1	99,8 ± 10,8	-
<i>CCND1</i>	98,8 ± 13,2	114,7 ± 16,5	-
<i>eIF4E</i>	109,8 ± 9,9	128,9 ± 9,8	-
<i>HK2</i>	99,6 ± 8,2	186,1 ± 16,4	0,001
<i>LC3</i>	101,1 ± 9,8	192,9 ± 26,9	0,006
<i>ODC1</i>	88,6 ± 8,7	108,9 ± 9,3	-
<i>SLC7A8</i>	105,2 ± 11,7	288,1 ± 35,1	0,002
<i>SLC7A5</i>	95,6 ± 9,1	100,1 ± 13,4	-

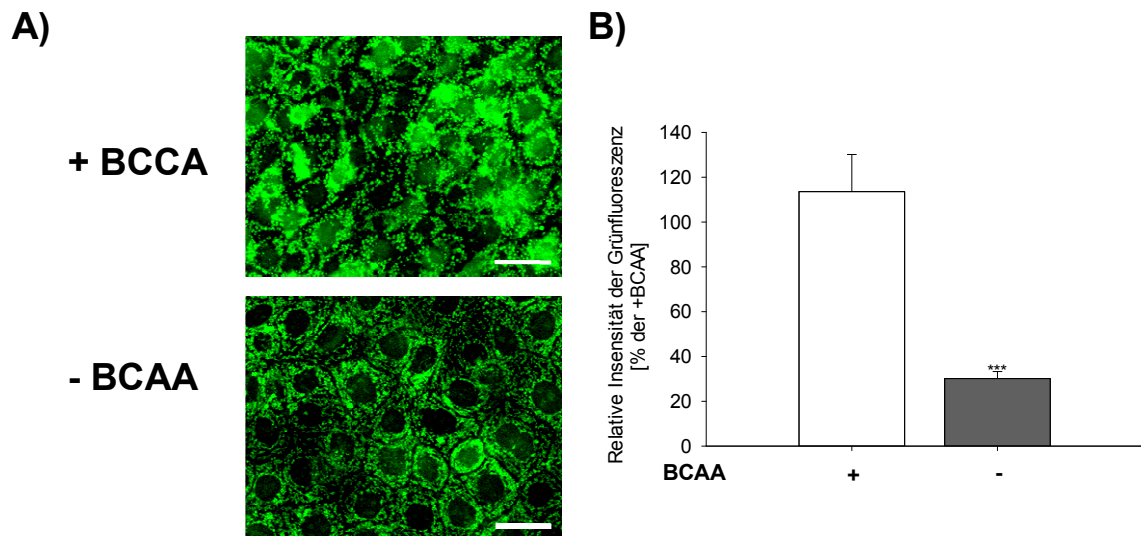
#### 4.9.5 Bestimmung der Proteinsynthese in Blastozysten kultiviert ohne BCAA

In Trophoblastzellen von Blastozysten kultiviert mit oder ohne BCAA wurde die Aufnahme und der Einbau von L-Homopropargylglycin (HPG; Kapitel 3.3.1) mittels Immunfluoreszenz detektiert.

Blastozysten kultiviert mit oder ohne BCAA wiesen ein Signal der Grünfluoreszenz im Zytoplasma ihrer Trophoblastzellen auf, wobei für Blastozysten, die mit BCAA kultiviert wurden, zusätzlich Grünfluoreszenz im Zellkern nachgewiesen werden konnte (Abb. 45A).

Blastozysten, die ohne BCAA kultiviert wurden, zeigten ein signifikant reduziertes Signal der Grünfluoreszenz ihrer Trophoblastzellen (Abb. 45A+B). Dieses Ergebnis korreliert mit

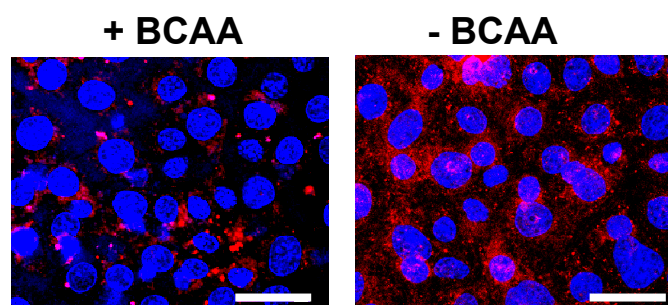
den dokumentierten verringerten mTOR- und S6K1-Phosphorylierungsmengen in Blastozysten, die ohne BCAA kultiviert wurden.



**Abb. 45: Immunfluoreszenz (A) und densitometrische Analyse (B) der Proteinsynthese in Trophoblastzellen von Blastozysten kultiviert mit (+) oder ohne (-) BCAA für 6h *in vitro*.** (A) Die Proteinsynthese wurde in Trophoblastzellen mittels Click-iT<sup>®</sup>HPG Alexa Fluor<sup>®</sup> Protein Synthese-Assay visualisiert. (B) Die Grünfluoreszenzsignalintensität wurde ermittelt und der Mittelwert der Messungen bestimmt. Alle Werte wurden relativ auf den Kontrollwert n1= 100% der Gruppe +BCAA bezogen. (Mw ± SEM; Maßstabsbalken entspricht 31 µm; N=3; n=9; \*\*-p< 0,001)

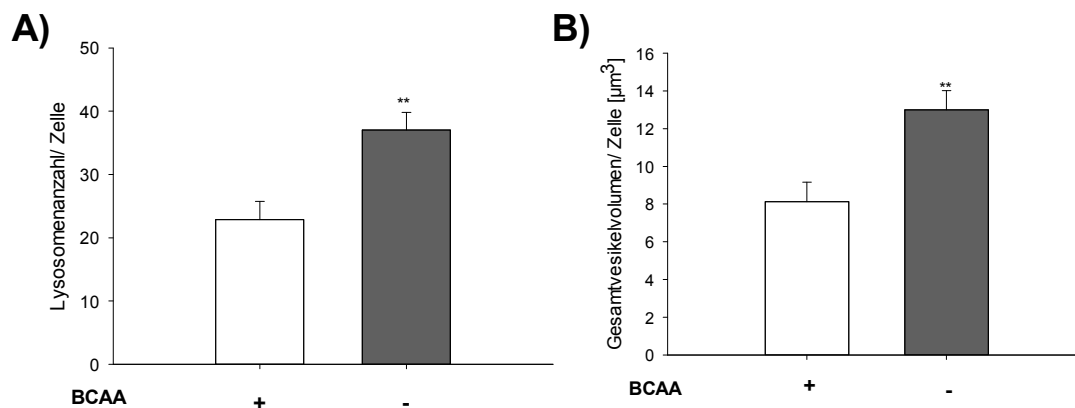
#### 4.9.6 Bestimmung der Anzahl von Lysosomen in Blastozysten kultiviert ohne BCAA

In Trophoblastzellen von Blastozysten kultiviert mit und ohne BCAA wurden die Lysosomen mittels Immunfluoreszenz markiert und detektiert (Kapitel 3.4.1; Abb. 46).



**Abb. 46: Immunfluoreszenz der Lysosomenfärbung in Trophoblastzellen von Blastozysten kultiviert mit (+) oder ohne (-) BCAA für 6h *in vitro*.** Lysosomen und azide Vesikel (beides in rot) wurden in Trophoblastzellen mittels LysoTracker<sup>R</sup> Deep Red markiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst (blau) gegengefärbt. (Maßstabsbalken entspricht 31 µm)

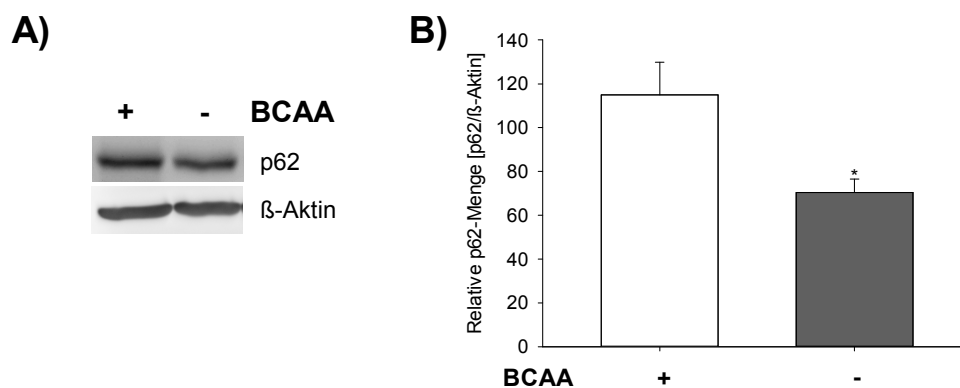
Blastozysten, die ohne BCAA kultiviert wurden, hatten mehr Lysosomen pro Trophoblastzelle als Blastozysten, die mit BCAA kultiviert wurden (Abb. 47A). Das Gesamtvesikelvolumen aller azider Vesikel war in Blastozysten kultiviert ohne BCAA ebenfalls erhöht (Abb. 47B).



**Abb. 47: Lysosomenanzahl (A) und Vesikelvolumen (B) in Trophoblastzellen von Blastozysten kultiviert mit (+) oder ohne (-) BCAA für 6h *in vitro*.** Die Lysosomen wurden mit LysoTracker<sup>R</sup> Deep Red gefärbt. Die Lysosomenanzahl (A) und das Gesamtes Vesikelvolumen (B) wurden in Trophoblastzellen analysiert. Dabei wurden die rotgefärbten Vesikel in einem Größenbereich von 0,01 bis 8  $\mu\text{m}^3$  gezählt und das Fluoreszenzsignal aller Vesikel über den Volocity 3D Software-Algorithmus als Volumen bestimmt. (Mw  $\pm$  SEM; N= 3; n=9; \*\*-p<0,01)

#### 4.9.7 Proteinmenge des Autophagiemarkers p62 in Blastozysten kultiviert ohne BCAA

Um einen weiteren Autophagiemarker zu untersuchen, wurde die Proteinmenge von p62 in kultivierten Blastozysten mittels Western Blot analysiert (Abb. 48A). Nach der Kultur ohne BCAA zeigten die Blastozysten eine verringerte p62-Proteinmenge im Vergleich zu Blastozysten kultiviert mit BCAA (Abb. 48B).



**Abb. 48: Relative Proteinmenge von p62 in Trophoblastzellen von Blastozysten kultiviert mit (+) oder ohne (-) BCAA für 6h *in vitro*.** (A) Western Blot-Nachweis von p62 in einer gepoolten Proteinproben (n=3 Blastozysten pro Probe) von Blastozysten, die mit (+ BCAA) und ohne (- BCAA) BCAA kultiviert wurden und (B) und densitometrische Quantifizierung der relativen p62-Proteinmenge (B). Die p62-Proteinmenge wurde auf die Proteinmenge von  $\beta$ -Aktin normiert. Alle p62-Proteinmenge wurden relativ auf den Kontrollwert n1= 100% der Kontrollgruppe (+ BCAA) bezogen. (Mw  $\pm$  SEM; N=4; n=12; \*-p< 0,05)

## 5 Diskussion

Während der Schwangerschaft ist die Präimplantationsphase ein kritisches Zeitfenster in der Embryogenese, da der sich entwickelnde Embryo nicht nur sensitiv auf Veränderungen der Entwicklungsbedingungen im Uterus ist, sondern auch von der maternalen Nährstoffverfügbarkeit abhängig ist. Der Präimplantationsembryo ist über Fehlregulationen im maternalen Metabolismus durch externe Stimuli angreifbar. Aufgrund seiner hohen metabolischen Plastizität ist der Embryo in der Lage, sich kurzzeitig an veränderte Wachstumsbedingungen zu adaptieren. Diese gute Anpassungsfähigkeit des embryonalen Metabolismus ist im bestimmten Maße physiologisch und von Vorteil, aber sie birgt auch ein potentiell Risiko für negative Folgen in der weiteren Entwicklung. Veränderte Entwicklungsbedingungen können über einen noch nicht verstandenen molekularen Mechanismus gespeichert werden und zu einer nachhaltigen metabolischen Prägung des Embryos führen. Abweichungen vom ursprünglichen Entwicklungsprogramm können in der weiteren Differenzierungsabfolge dazu führen, dass der Phänotyp der Nachkommen langfristig beeinflusst wird.

Im Folgenden wird diskutiert, welche Rolle Aminosäuren, speziell die BCAA, der mTORC1-Signalweg und FoxO1, bei der Anpassung des Embryos an veränderte Umgebungsbedingungen während eines maternalen Typ 1 Diabetes mellitus einnehmen.

### 5.1 Ein Typ 1 Diabetes mellitus verändert das Aminosäurenprofil der Mutter und des Embryos

Es ist bekannt, dass Patienten mit einem unzureichend überwachten und eingestellten Typ 1 Diabetes mellitus veränderte Aminosäurenprofile im Plasma aufweisen (Felig *et al.* 1970). Bei einer diabetischen Ketoazidose sind die Plasmakonzentrationen der BCAA erhöht und die Serin- und Glycinkonzentration verringert. Vergleichbare Veränderungen der Aminosäurenkonzentrationen wurden auch in Patienten mit einem Insulin-abhängigen Diabetes mellitus beschrieben (Wahren 1972).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Konzentrationen der Aminosäuren im Plasma von gesunden und diabetischen Kaninchen bestimmt. Die ermittelten Konzentrationsbereiche der BCAA sind mit humanen Plasmaproben vergleichbar. Die Normalkonzentrationen betragen im humanen Plasma für L-Leucin  $0,14 \pm 0,03$  mM, L-Isoleucin  $0,07 \pm 0,01$  mM und L-Valin  $0,25 \pm 0,002$  mM (Berger *et al.* 1978). Durch eine diabetische Ketose steigen die Konzentrationen der BCAA um das 2-fache ( $0,27$ - $0,28$  mM L-Leucin,  $0,14$ - $0,15$  mM L-Isoleucin und  $0,40$ - $0,46$  mM L-Valin; Berger *et al.* 1978; Felig *et al.* 1970). Eine 2-fache Erhöhung der BCAA wurde auch in diabetischen Versuchstiermodellen von Ratten als Konsequenz eines Diabetes mellitus gemessen (Styrud *et al.* 1995; Wijekoon *et al.* 2004). Da diabetische Kaninchen die gleichen Veränderungen der Aminosäurenkonzentrationen

im Plasma wie diabetische Patienten aufweisen, ist das Kaninchen ein geeignetes Modell zur Untersuchung des Einflusses eines maternalen Diabetes mellitus auf die Frühschwangerschaft.

Die Veränderungen des maternalen Metabolismus können den frühen Embryo auf verschiedene Weise beeinflussen. Das uterine Epithel nimmt als Grenzzellschicht zwischen Embryo und Mutter eine wichtige Rolle ein. Im Uterussektret von Mäusen sind alle Aminosäuren nachweisbar, zum Teil sogar in einer höheren Konzentration als im Plasma (Gardner und Leese 1990; Harris *et al.* 2005). Auch bei Frauen wurden hohe BCAA-Konzentrationen im Uterussektret nach der Fertilisation beschrieben (Leese *et al.* 2008), was vermuten lässt, dass es in der Frühschwangerschaft eine Anreicherung von BCAA zur besseren Versorgung des Embryos gibt.

Im Uterussektret diabetischer Kaninchen sind neben Threonin, Glutamin, Arginin, Alanin und Taurin insbesondere die BCAA, die den stärksten Effekt zeigen, erhöht. Dieses Ergebnis reflektiert neueste Befunde in der Uterusflüssigkeit vor dem Embryonentransfer bei Patientinnen, die sich ungesund (proteinarm und kohlenhydratreich) ernährten (Kermack *et al.* 2015). In der Uterusflüssigkeit dieser Patientinnen sind ebenfalls die Konzentrationen der BCAA und Glutamin erhöht. Eine proteinarme Diät bei Mäusen hingegen führt zu einer Konzentrationsverringerng der BCAA in der Uterusflüssigkeit (Eckert *et al.* 2012).

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Nährstoffausstattung des Uterussekrete sowohl in Tiermodellen als auch beim Menschen sensitiv gegenüber veränderten Stoffwechselsituationen wie Diäten oder eines Typ 1 Diabetes mellitus ist. Das intrauterine Milieu reflektiert in hohem Maße den metabolischen Status der Mutter.

Da bisher wenig über den Aminosäurenmetabolismus von Säugerembryonen in der Präimplantationsphase bekannt ist, wurden das Uterusmilieu und frühe Embryonen im Reproduktionsmodell des Kaninchens untersucht. Die Aminosäurezusammensetzung bleibt während der Gastrulation der Blastozysten annähernd gleich, was die Stabilität des embryonalen Aminosäurenmetabolismus zu diesem Zeitpunkt zeigt. Lediglich die Ornithinkonzentration ist gastrulationsabhängig und steigt im Gastrulationsstadium 2 um das 2-fache an. Ornithin wird für die Polyaminsynthese benötigt, die für das embryonale Wachstum essentiell ist (Van Winkle und Campione 1983).

Im Vergleich zum mütterlichen Plasma sind die Konzentrationen der gluconeogenen Aminosäuren Alanin und Glycin in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit um das 6- bis 8-fache erhöht. In der Blastozystenhöhlenflüssigkeit von Rindern wurden für Alanin, Glycin, Asparagin und Glutaminsäure die höchsten Konzentrationen nachgewiesen (Gopichandran und Leese 2003). Für frühe Embryonen sind insbesondere hohe Konzentrationen von

Alanin und Glycin kennzeichnend. Daher vermutet man, dass diese beiden Aminosäuren als Protonenshuttle wichtig für die intrazelluläre pH-Regulation des Embryos sind (Hamster: Bavister und Liebermann 1983; Bavister und McKiernan 1993). Da die Kaninchenblastozyste mit ca. 3 mm Durchmesser am Tag 6 *p.c.* einer der größten Säugerembryonen ist, wäre die hohe Alanin- und Glycinkonzentration durch die Notwendigkeit für Wachstum und Expansion der Blastozyste zu erklären.

Durch die Untersuchungen am Kaninchen wurde zum ersten Mal der Einfluss eines maternalen Typ 1 Diabetes mellitus auf den embryonalen Aminosäurenmetabolismus noch vor der Implantation bewiesen. Im Vergleich zu Embryonen aus normalen Entwicklungsbedingungen sind in Blastozysten diabetischer Versuchstiere hohe Konzentrationen der BCAA, von Arginin, Alanin, Glutamin, Glycin und Taurin in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit vorhanden. Die BCAA-Konzentrationen weisen dabei den stärksten Anstieg um das 2- bis 3-fache auf, was den Anstieg der BCAA im Plasma und im Uterussekret diabetischer Kaninchen reflektiert.

Dass Blastozysten bereits vor der Implantation an die maternale Verfügbarkeit von Aminosäuren adaptieren können, wurde 2012 in Mausembryonen gezeigt (Eckert *et al.* 2012). In Mäusen, die eine proteinarme Diät gefüttert bekamen, waren die BCAA-Konzentrationen reduziert. Durch die maternale Proteinrestriktion verringern sich die Konzentrationen der BCAA im Plasma und es kommt zu einer intrauterinen Wachstumsretardierung (IUGR), die die metabolische Gesundheit der Nachkommen beeinflusst (Fleming *et al.* 2012). Eine Supplementierung der BCAA kehrt die IUGR-Wirkung während der Schwangerschaft wieder um (Zheng *et al.* 2009; Teodoro 2012).

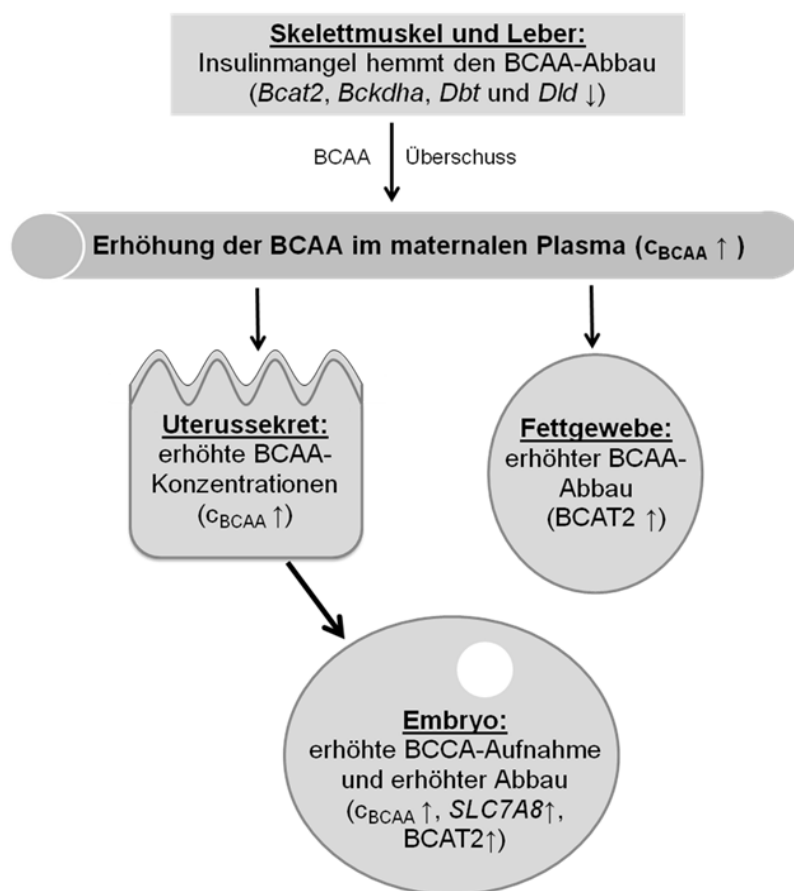
Diese Ergebnisse unterstreichen die Wichtigkeit der BCAA für eine zeitgerechte Embryogenese, mit dem Schluss, dass veränderte BCAA-Mengen die Entwicklung von Embryonen bereits vor der Implantation beeinflussen könnten.

### **5.1.1 In einer diabetischen Schwangerschaft ist die Akkumulation der BCAA in maternalen Geweben und in Blastozysten die Folge eines veränderten BCAA-Metabolismus**

Die BCAA werden im Körper in verschiedenen Organen abgebaut. Leber und Skelettmuskel, aber auch das Fettgewebe verfügen über entsprechende Enzymkaskaden. Die Regulation der Abbauprozesse ist organabhängig und wird in einer hyperglykämischen und hypoinsulinämischen Stoffwechselsituation in divergenter Weise moduliert. Durch die Bestimmung der Expression von Schlüsselenzymen in Leber-, Skelettmuskel- und Fettgewebe kann der Beitrag der Gewebe zur BCAA-Konzentrationserhöhung abgeleitet werden.



Da die erhöhten BCAA-Konzentrationen nicht durch eine erhöhte Futtermittelaufnahme der Versuchstiere erklärt werden kann, könnte ein gestörter BCAA-Metabolismus in Skelettmuskel und Leber für die Akkumulation der BCAA im Plasma verantwortlich sein. Ein Schema für den BCAA-Metabolismus als Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse ist in Abbildung 49 zu sehen. In der Leber und dem Skelettmuskel diabetischer Versuchstiere sind die Transkriptmengen aller untersuchten BCAA-Abbauenzyme (*Bcat2*, *Bckdha*, *Dbt* und *Dld*) reduziert. Dieser verringerte BCAA-Abbau im Skelettmuskel, welcher bezogen auf den Gesamtabbau 60 % BCAA-Kapazität besitzt (Gelfand *et al.* 1986), könnte zu der Akkumulation von BCAA im Plasma während eines Typ 1 Diabetes mellitus führen (Abb. 49).



**Abb. 49: Schema des BCAA-Metabolismus in maternalen Geweben und in Präimplantationsembryonen während einer diabetischen Schwangerschaft.** BCAA= *branched-chain amino acids*; BCAT2= verzweigtkettige L-Aminosäuren-Aminotransferase 2; *SLC7A8*= *Solute carrier family 7 member 8 (LAT2)*; ↑= Hochregulation; ↓= Herunterregulation

Im Gegensatz dazu sind die Transkript- und Proteinmengen von BCAT2, welches den ersten Abbauschritt der BCAA katalysiert, im Fettgewebe diabetischer Versuchstiere erhöht. Das zeigt wiederum, dass das Fettgewebe von den hohen BCAA-Konzentrationen „profitiert“. Der Anstieg der BCAA-Abbauenzyme ermöglicht es dem Fettgewebe, ein Übermaß an BCAA in Form von Lipiden zu speichern (Felig *et al.* 1969).

Kaninchenblastozysten weisen wie das maternale Fettgewebe erhöhte BCAT2-Transkripte und -Proteinmengen auf, was auf eine gesteigerte embryonale Transaminierung der BCAA zu ihrer korrespondierenden Ketosäure in der Stoffwechselsituation eines maternalen Typ 1 Diabetes mellitus hindeutet (Abb. 49). Es ist möglich, dass die beobachtete, erhöhte intrazelluläre Lipidakkumulation in Blastozysten diabetischer Kaninchen (Schindler *et al.* 2014) als Folge des erhöhten embryonalen BCAA-Katabolismus entsteht.

### **5.1.1.1 Auswirkung eines Insulinmangels auf die BCAA-Verfügbarkeit in Geweben und Embryonen**

Es ist bereits bekannt, dass die BCAA-Konzentrationen mit der Insulinmenge im Serum korrelieren (Felig *et al.* 1969). Ein hoher Insulinspiegel reduziert die BCAA-Plasmakonzentrationen über einen nicht bekannten Mechanismus. In diabetischen oder adipösen postoperativen Patienten führt eine Insulinsupplementation zur Einstellung der BCAA-Konzentrationen im Plasma auf ein normales Niveau (Pozefsky *et al.* 1969; Hanna *et al.* 1980; Forlani *et al.* 1984). Die eingesetzte Insulindosis im diabetischen Kaninchenmodell ist minimal, um die Kaninchen diabetisch zu halten. Dies spiegelt sich in den typischen Plasmakonzentrationssteigerungen der BCAA wieder. Normale oder hohe Insulinwerte in adipösen Mäusen und beim Menschen korrelieren indirekt mit der *Bcat2*-Expression, was verdeutlicht, dass die Regulation von *Bcat2* durch Insulin ein entscheidendes Stellglied für den BCAA-Abbau sein könnte (Pietiläinen *et al.* 2008; Herman *et al.* 2010).

Experimente mit *in vitro* kultivierten Kaninchenembryonen zeigen, dass Insulin die *Bcat2*-Transkription reguliert. Im Gegensatz dazu zeigen veränderte Glukosekonzentrationen *in vitro* keinen Effekt. Eine Insulinzugabe *in vitro* verringert die *Bcat2*-Transkription, während eine Hypoinsulinämie die *Bcat2*-Transkription in Blastozysten diabetischer Kaninchen erhöht. Die Insulindefizienz *in vivo* stellt damit einen potentiellen Grund für die verstärkte embryonale *Bcat2*-Transkription dar.

Die erhöhten *Bcat2*-Transkript- und -Proteinmengen im Fettgewebe korrelieren mit dem Anstieg der BCAA-Konzentrationen im Plasma diabetischer Kaninchen. Eine gewebespezifische Regulation von BCAT2 scheint neben der Wirkung von Insulin ebenfalls möglich, da die *Bcat2*-Transkripte im Skelettmuskel und in der Leber diabetischer Kaninchen reduziert sind.

### **5.1.1.2 Eine höhere BCAA-Verfügbarkeit steigert die Expression des BCAA-Transporters SLC7A8 im Embryo**

Neben dem gestörten Abbau der BCAA könnte ebenfalls ein erhöhter zellulärer Transport der BCAA vom Uterus zum Embryo vermutet werden. Dem widerspricht jedoch, dass die

Transkriptmengen der BCAA-Transporter *SLC7A5* und *SLC7A8* im Endometrium diabetischer Kaninchen unverändert sind. In Blastozysten hingegen sind die Transkriptmengen von *SLC7A8* erhöht, was wiederum auf eine verstärkte embryonale Aufnahme der BCAA hindeutet und die gemessenen erhöhten BCAA-Konzentrationen im Embryo selbst stützt.

Diese Zusammenhänge verdeutlichen, dass sich die metabolischen Eigenschaften der Mutter schon während der Präimplantationsphase auf den Embryo übertragen. Veränderte Muster der BCAA-Konzentrationen als Folge von metabolischen Störungen können das embryonale Entwicklungsprogramm beeinflussen. Die Akkumulation von Leucin und seiner Metabolite z.B. in MSUD ist neurotoxisch und könnte langfristig zu neurologischen Dysfunktionen führen (Gaul *et al.* 1975; Saudubray *et al.* 1984). Ein verminderter Aminosäureumsatz ist für die humane Blastozystenbildung *in vitro* von großer Bedeutung (Houghton *et al.* 2002). Leese postulierte 2002, dass die Vitalität von Säugerembryonen während ihrer frühen Entwicklung eher mit einem „ruhigen“ als „überaktiven“ Metabolismus assoziiert ist, denn der metabolisch ruhende Embryo ist unter einer geringeren Beanspruchung des Genoms, Transkriptoms und Proteoms vitaler (Leese 2002). Ein Präimplantationsembryo ist nach Leese lebensfähiger, wenn er eine geringe Glykolyserate, einen Metabolismus auf niedrigem Niveau und einen geringen Aminosäureumsatz hat (Leese 2002).

Diabetische Veränderungen des embryonalen BCAA-Metabolismus, wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, stören die „Ruhe“ des Embryos. Eine mögliche Folge dieser „Ruhestörung“ des Embryos könnte die verminderte Entwicklungskompetenz diabetischer Embryonen und eine potentielle (negative) „metabolische Prägung“ sein.

### **5.2 Der mTORC1-Signalweg ist in 6 Tage alten Blastozysten des Kaninchens aktiv und über Glukose und L-Leucin regulierbar**

Als metabolischer Sensor der Zelle ist mTOR eine essentielle Voraussetzung für die frühe Embryonalentwicklung und eine erfolgreiche Implantation (Gangloff *et al.* 2004; Übersichtsartikel: Pollheimer und Knöfler 2005; Guertin *et al.* 2006). Seine Aktivierung durch Aminosäuren ist ein wichtiges Stellglied für die Blastozystenentwicklung und die embryo-maternale Kommunikation (Martin und Sutherland 2001; Martin *et al.* 2003; Gonzalez *et al.* 2012).

Die Expression von mTOR ist im Kaninchen ab dem Morulastadium (Tag 3 *p.c.*) nachweisbar. In 6 Tage alten Kaninchenblastozysten weisen Trophoblastzellen eine höhere Phosphorylierung von mTORC1, S6K1 und 4E-BP1 gegenüber dem Embryoblasten auf.

Bereits frühe Experimente zeigten, dass Mausblastozysten L-Leucin und L-Arginin für ihr Wachstum benötigen (Gwatkin 1966; Naeslund 1979; Martin und Sutherland 2001). Auch die nichtinvasive Messung des Aminosäureumsatzes bei humanen Embryonen, die für *in vitro* Fertilisation (IVF) verwendet wurden, ergab, dass L-Leucin für die Entwicklung zum Blastozystenstadium wichtig ist (Houghton *et al.* 2002). Weiterhin ist der Umsatz von L-Asparagin, L-Glycin und L-Leucin in humanen Embryonen mit einer erfolgreichen Schwangerschaft und Lebendgeburt assoziiert (Brison *et al.* 2004).

Die Konvergenz multipler Wachstumsfaktor-initiiertes Signalwege (IGF, Insulin) und der Nährstoffsensitivität (L-Leucin, Glukose) über mTORC1 bestärkt dessen Rolle an vielen entwicklungsspezifischen und physiologischen Prozessen. Die mTORC1-Aktivität und die Phosphorylierung seines Zielproteins, der ribosomalen S6K1, sind sensitiv gegenüber Änderungen der Aminosäure- und Glukosekonzentrationen in Säugerzellen (Hara *et al.* 1998). L-Leucin zeigt die stärkste Stimulationswirkung aller Aminosäuren auf die Aktivierung des mTORC1-Signalwegs (Übersichtsartikel: Lynch 2001). Bereits 1998 wurde publiziert, dass 1 mM L-Leucin in der *in vitro* Kultur von isolierten Adipozyten der Ratte zu einer verstärkten Phosphorylierung des mTORC1-Zielproteins 4E-BP1 führt (Fox *et al.* 1998). Eine dosisabhängige Induktion der mTORC1-Signalgebung durch Glukose wurde 2003 in HEK293-Zellen bewiesen, wobei eine Konzentrationsreihe von 0 mM, 1,4 mM, 2,8 mM, 8,3 mM und 25 mM Glukose verwendet wurde. Die S6K1-Phosphorylierung verstärkte sich in Korrelation zu den erhöhten Glukosekonzentrationen (Inoki *et al.* 2003), wobei der Einsatz von 25 mM Glukose den stärksten Phosphorylierungseffekt für S6K1 hervorbrachte (Inoki *et al.* 2003).

In Kaninchenembryonen führt eine hohe Glukosekonzentration (10 mM) im Kulturmedium zu einer Rapamycin-sensitiven Aktivierung von mTORC1 und S6K1. Dieser Befund ist vergleichbar mit der erhöhten Phosphorylierung der S6K1 nach einer Stimulation mit 8,3 mM Glukose in HEK293-Zellen (Inoki *et al.* 2003).

Neben Glukose und Aminosäuren ist auch Insulin in der Lage, über eine Reihe von Phosphorylierungsereignisse den mTORC1-Signalweg anzuschalten (Übersichtsartikel: Hay und Sonenberg 2004). Auch eine mTORC1-Aktivierung nur über Aminosäuren ist möglich (Kwon *et al.* 2004). So wurde gezeigt, dass in Rattengewebe L-Leucin allein in der Lage ist, die mTORC1-Phosphorylierung zu steigern (Lynch *et al.* 2002). In der Kultur von Schafembryonen mit verschiedenen Nährstoffen brachte L-Leucin neben Asparagin und Glukose einen verstärkenden Phosphorylierungseffekt auf mTORC1 und sein Zielprotein S6K1 hervor (Kim *et al.* 2011).

In der *in vitro* Kultur von Kaninchenembryonen führt die Erhöhung der L-Leucinverfügbarkeit zu einer Rapamycin-sensitiven Aktivierung von mTORC1 und S6K1

und der Transkriptionsregulation von mTORC1-Zielgenen, die in den Zellzyklus (*CCND1*), den BCAA-Transport (*SLC7A8*) und die Translationsinitiation (*eIF4E*) involviert sind. Die 2-fache Erhöhung der L-Leucinverfügbarkeit verstärkt die embryonale Transkription dieser Gene und verringert die Expression des Proliferationsmarkers *PCNA* über mTORC1.

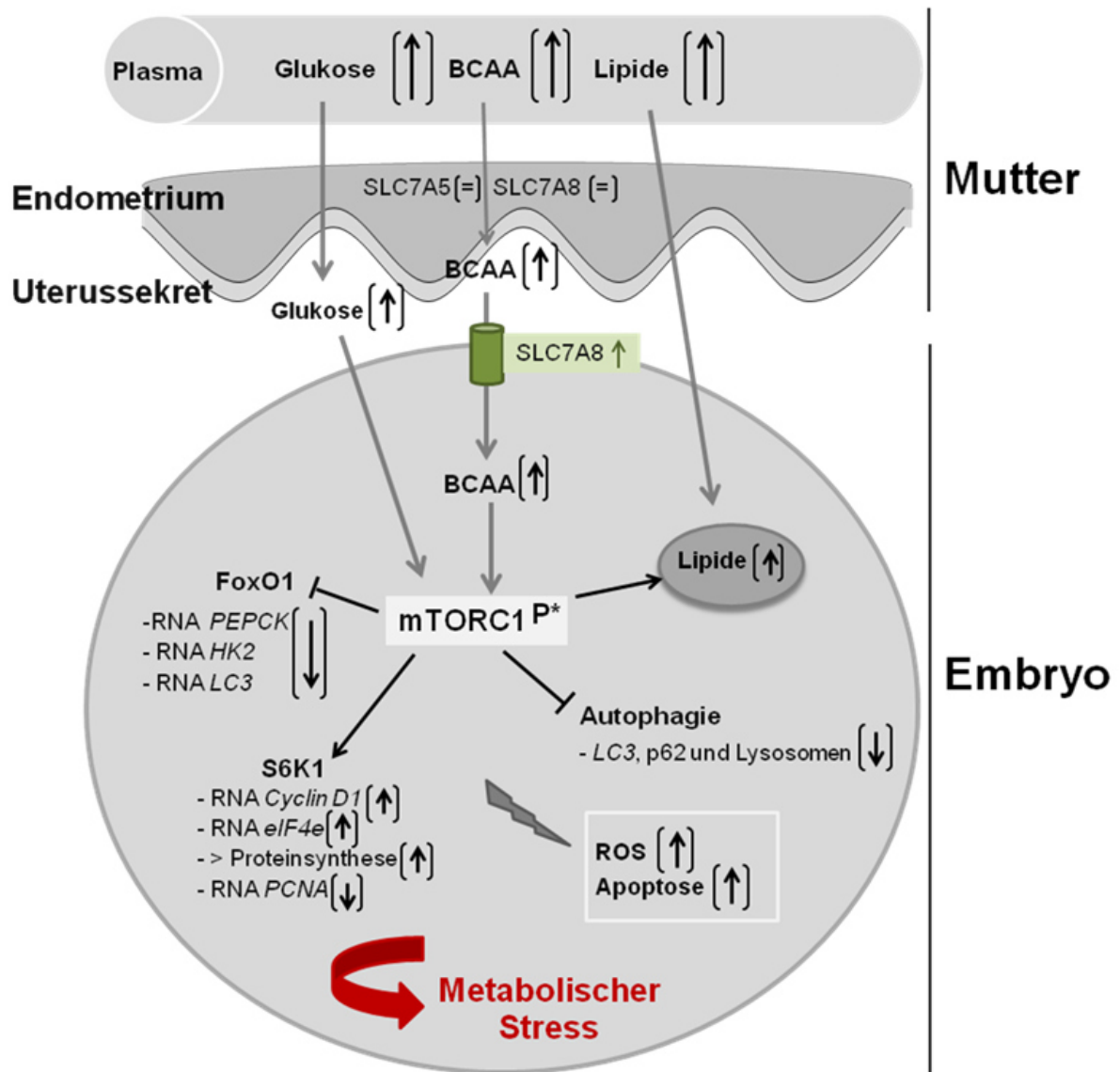
Es ist bereits bekannt, dass *eIF4E* und *SLC7A8* über mTORC1 reguliert werden können (Übersichtsartikel: Hay und Sonenberg 2004; Kurayama *et al.* 2011). Eine Rapamycin-abhängige Expression von *PCNA* und *CCND1* wurde in Hepatozyten von Mäusen gezeigt (Fouraschen *et al.* 2013). Die vorliegende Arbeit beweist erstmalig eine mTORC1-abhängige Expression von *CCND1*, *eIF4E*, *SLC7A8* und *PCNA* über die L-Leucinverfügbarkeit in Präimplantationsembryonen.

### **5.3 Die veränderte Stoffwechselsituation der Mutter während eines Typ 1 Diabetes mellitus führt zur Aktivierung der embryonalen mTORC1-Signalkaskade**

Blastozysten im vorliegenden Typ1-entsprechenden Diabetes-Modell erleiden einen absoluten Insulinmangel (Ramin *et al.* 2010). Unter den hypoinsulinämischen und hyperglykämischen Bedingungen reagiert die mTORC1-Signalgebung sensitiv auf die metabolischen Veränderungen und den Anstieg der BCAA. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Glukose und L-Leucin jeweils allein in der Lage sind, mTORC1 zu aktivieren. Im *in vivo* Modell einer diabetischen Schwangerschaft sind die Konzentrationen von Glukose und L-Leucin im Uterusmilieu erhöht, was direkt mit der gesteigerten Aktivierung der mTORC1-Signalgebung und der Expression von mTORC1-Zielgenen einhergeht. In Korrelation zu den 2-fach erhöhten BCAA-Konzentrationen in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit von Embryonen diabetischer Kaninchen ist ebenfalls die Phosphorylierung von embryonalen mTORC1 und S6K1 gesteigert (Abb. 50). Passend dazu führt eine proteinarme Diät während der Schwangerschaft bei Mäusen zu einer verringerten embryonalen mTOR-Signalgebung, die die verringerten BCAA-Konzentrationen gut widerspiegelt (Eckert *et al.* 2012).

Die Expression des Proliferationsmarkers *PCNA* in Blastozysten diabetischer Kaninchen *in vivo* ist genau wie in mit L-Leucin kultivierten Kaninchenblastozysten *in vitro* verringert. Dieser Befund fügt sich in die beschriebene Verzögerung der Blastozystenentwicklung diabetischer Kaninchen ein (Ramin *et al.* 2010). Weiterhin sind die Transkriptmengen von *CCND1* und *eIF4E* in Blastozysten diabetischer Kaninchen erhöht, was ein Hinweis auf eine erhöhte Zellzyklusprogression und verstärkte Translation sein könnte. Dass eine Überexpression von *eIF4E* zu zellulären Veränderungen wie raschem Wachstum (De Benedetti und Rhoads 1990) führen kann, wurde bereits beschrieben.

Die Korrelation der erhöhten BCAA-Konzentrationen und mTORC1-Signalgebung koinzidiert mit den veränderten Expressionen der mTORC1-abhängigen Gene in Blastozysten diabetischer Tiere. In Abbildung 50 sind diese Ergebnisse in einem Flussdiagramm zusammengestellt.



**Abb. 50:** Schematische Darstellung der mTORC1-FoxO1-Regulation in Präimplantationsembryonen diabetischer Kaninchen am Tag 6 p.c.. BCAA= Branched-chain amino acids; mTORC1= mammalian target of rapamycin complex 1; FoxO1= Forkhead-Box-Protein O 1; SLC7A8= Solute carrier family 7 member 8 (LAT2); SLC7A5= Solute carrier family 7 member 5 (LAT1); S6K1= ribosomale S6 Kinase 1; eIF4E= eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 4E; PCNA= Proliferating cell nuclear antigen; PEPCK= Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase; HK2 = Hexokinase 2; LC3= Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3; p62= Nucleoporin p62; ROS= reaktive Sauerstoffspezies; [↑] = erhöht; [↓] = verringert; [=] = unverändert gegenüber gesunden Tieren.

### **5.3.1 BCAA regulieren die mTORC1-Signalkaskade in Blastozysten**

Die Daten der *in vitro* Kultur mit „gesunden“ und „diabetischen“ BCAA-Konzentrationen sind ein weiteres Indiz dafür, dass die BCAA-Verfügbarkeit allein den embryonalen mTORC1-Signalweg regulieren kann. Blastozysten, die mit diabetischen BCAA-Konzentrationen kultiviert wurden, weisen eine erhöhte mTORC1- und S6K1-Phosphorylierung und gesteigerte Transkriptmengen von *CCND1*, *eIF4E* und *SLC7A8* auf. Diese Daten stimmen mit denen von Embryonen diabetischer Kaninchen *in vivo* überein.

Weiterhin wurden Blastozysten gesunder Kaninchen ohne BCAA im Kulturmedium kultiviert, um zu zeigen, dass ein Fehlen der BCAA zu einer Gegenregulation des mTORC1-Signalweges führt. Die Phosphorylierung von mTORC1 und S6K1 war in Blastozysten, die keinen Zugang zu BCAA hatten, geringer. Die reduzierte Aktivität von mTORC1 aufgrund der veränderter BCAA-Verfügbarkeit hat sowohl *in vitro* (vorliegende Arbeit) als auch *in vivo* (Eckert *et al.* 2012) eine verzögerte Entwicklung von Embryonen zur Folge. Die Gastrulation und das Wachstum der Blastozysten waren durch einen BCAA-Mangel stark verzögert (Kapitel 4.9).

In der humanen Embryonenkultur werden für die IVF kommerzielle Kulturmedien verwendet, die drastische Unterschiede in der Zusammensetzung und unterschiedliche Effekte auf die Entwicklung von Mausembryonen zeigen (Morbeck *et al.* 2014). In sieben Kulturmedien von unterschiedlichen Firmen finden sich BCAA-Konzentrationen von 0  $\mu\text{M}$  über ca. 250  $\mu\text{M}$  bis hin zu ca. 400  $\mu\text{M}$ . Da nicht abschätzbar ist, welchen Einfluss diese Konzentrationsunterschiede auf die Entwicklung und Qualität humaner Embryonen *in vitro* ausüben, müssen standardisierte und optimierte Kulturbedingungen für die assistierte Reproduktionsmedizin festgelegt werden.

### **5.3.2 Die metabolische Adaptation hat Konsequenzen für den Embryo**

Die Ergebnisse der *in vitro* Kulturen und der analysierten Embryonen *in vivo* zeigen, dass in einer diabetischen Schwangerschaft die erhöhten BCAA-Konzentrationen zu einer Forcierung der mTORC1-Signalgebung und embryonalen Proteinsynthese führen. Diese metabolische Adaptation an einen BCAA-Überschuss vermittelt durch mTORC1 könnte längerfristige Konsequenzen für den Embryo haben. Eine erhöhte mTORC1-Aktivität wird im Zusammenhang mit einem verstärkten Wachstum des Fetus und der Plazenta gesehen (Gaccioli *et al.* 2013). mTORC1 ist ein essentieller Faktor für die Initiation der Proteinsynthese in verschiedenen Spezies und Geweben (Übersichtsartikel: Jacinto und Hall 2003; Proud 2013; Goodman 2014). Wie in Abbildung 50 zusammengefasst ist, ist bei Embryonen diabetischer Kaninchen die Proteinsynthese und in Korrelation dazu die Transkription von *eIF4E* und *CCND1* erhöht und das, obwohl beide Versuchstiergruppen gleiche Futtermengen zu sich nehmen. Die Erklärung für die gesteigerte Proteinsynthese

liegt in der erhöhten BCAA-Verfügbarkeit und der dadurch hochregulierten mTORC1-Aktivität bei Embryonen diabetischer Kaninchen. Passend dazu führt eine proteinarme Diät während der Schwangerschaft bei Mäusen zur Reduktion der BCAA-Verfügbarkeit und mTORC1-Aktivität in Korrelation zu einer reduzierten embryonalen Proteinsynthese. Die Fütterung mit einer proteinreichen Diät resultiert entsprechend in einer forcierten embryonalen Proteinsynthese (Dr. Judith Eckert, Universität Southampton, unveröffentlichte Daten).

Es ist deshalb anzunehmen, dass die "metabolische Ruhe", die für eine optimale Entwicklung vom Embryo von Vorteil ist (Leese 2002), durch einen veränderten BCAA-Katabolismus und eine gesteigerte Proteinsynthese gestört ist. Deutlich wird dies auch daran, dass Embryonen diabetischer Kaninchen vermehrte Stresszeichen aufweisen. Diese Embryonen haben eine höhere oxidative Stressbelastung (ROS) und metabolisch-bedingte Proteinmodifikationen (Haucke *et al.* 2014). Durch eine Inhibierung der Autophagie verstärkt sich möglicherweise dieser negative Effekt, da die modifizierten Proteine nicht oder nur langsam abgebaut werden. So resultiert aus der scheinbar vorteilhaften Überversorgung des Embryos eine unphysiologisch hohe Belastung, was erklären würde, dass sich Embryonen diabetischer Mütter langsamer entwickeln (Ramin *et al.* 2010) und langfristig ein höheres Risiko für Stoffwechselstörungen haben.

### **5.3.2.1 Die Proteinsynthese und Autophagie werden in Embryonen diabetischer Kaninchen über den mTORC1-Signalweg in Abhängigkeit von der BCAA-Verfügbarkeit reguliert**

Die zelluläre Proteinsynthese und Autophagie sind Prozesse, die in der Zelle koordiniert ablaufen. In Mausembryonen koinzidiert eine erhöhte lysosomale Aktivität in Präimplantationsembryonen mit einer verringerten BCAA-Verfügbarkeit und mTORC1-Signalgebung (Eckert *et al.* 2012; Sun *et al.* 2014). Der Anstieg in der Autophagie embryonaler Zellen während einer proteinarmen Diät der Mütter wurde als kompensatorischer Mechanismus interpretiert, um das Überleben der Blastozysten trotz verringerter BCAA-Verfügbarkeit zu sichern (Sun *et al.* 2014).

Passend dazu weisen Blastozysten diabetischer Kaninchen, die im Uterusmilieu mehr BCAA zur Verfügung hatten, eine überaktivierte mTORC1-Signalgebung und eine verringerte Autophagie auf.

Der Zusammenhang zwischen BCAA-Verfügbarkeit und mTOR-Signalkaskade kann auch in *in vitro* kultivierten Embryonen beobachtet werden. Die Stilllegung des mTORC1-Signalweges in kultivierten Embryonen durch den Mangel an BCAA resultiert in einer reduzierten Proteinsynthese in Trophoblastzellen und in erhöhten Lysosomenzahlen. Bereits 2014 wurde in der *in vitro* Kultur von Mausembryonen gezeigt, dass das Fehlen von BCAA zu einem Anstieg der Lysosomenanzahl führt (Sun *et al.* 2014).



Die vorliegende Arbeit beweist, dass die embryonale Proteinsynthese und Autophagie während einer diabetischen Schwangerschaft direkt von der mTORC1-Aktivität abhängig sind und über die BCAA-Verfügbarkeit reguliert werden.

Autophagie ist für die intrazelluläre Qualitätskontrolle nötig. *In vitro* und *in vivo* Studien an Mausembryonen haben gezeigt, dass Zellen auf eine hyperglykämische Umgebung mit einer verstärkten Autophagie reagieren (Adastra *et al.* 2011). Eine metabolische Umgebungsveränderung kann zu einer Fehlregulation des Autophagiesystems führen und im Zelltod enden. Andererseits schützt die Autophagie auch über die Degradation von intrazellulären Komponenten vor dem Verhungern der Zelle und damit vor dem frühzeitigen Zelltod (Levine und Yuan 2005). Zusammen mit der verringerten *PCNA*-Expression koinzidiert die Dysregulation der Autophagie mit der Entwicklungsverzögerung der Blastozysten und der höheren Anzahl von apoptotischen Zellen am Tag 6 *p.c.* während einer diabetischen Schwangerschaft (Ramin *et al.* 2010).

Die Regulation von p62 ist bezogen auf das experimentelle System differenziert zu betrachten. Im Falle der *in vitro* kultivierten Embryonen führt ein 6-stündiger Mangel an BCAA zu einer geringeren Proteinmenge des Autophagiemarkers p62. Dieser Befund deutet auf eine verstärkte Autophagie in diesen kultivierten Embryonen hin, da p62 bekanntlich während einer verstärkten Autophagie abgebaut wird (Bjørkøy *et al.* 2009). Embryonen diabetischer Kaninchen weisen eine geringere Proteinmenge von p62 am Tag 6 *p.c.* und eine verminderte Lysosomenanzahl im Vergleich zu Blastozysten gesunder Kaninchen auf. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen stimmen beide Beobachtungen zu p62 mit der Hypothese überein, dass die Autophagie in Abhängigkeit von mTORC1 reguliert wird.

Neben seiner Bedeutung für das Autophagosom ist für p62 bekannt, dass es in der Lage ist, der Differenzierung von Adipozyten entgegen zu wirken (Rodriguez *et al.* 2006), da ein Mangel an p62 in einer verstärkten Adipogenese *in vitro* und Adipositas *in vivo* resultiert (Rodriguez *et al.* 2006; Lee *et al.* 2010).

Embryonen aus diabetischen Kaninchen weisen eine hohe Anzahl an intrazellulären Fettvesikeln auf (Schindler *et al.* 2014). Diese massive Lipidakkumulation mit gleichzeitig gesteigertem Kern-Zytoplasma-Verhältnis des *Sterol regulatory element binding protein 1* (SREBP1) könnte durch die erhöhte Aktivierung der mTORC1-Signalgebung und die Inhibierung von p62 hervorgerufen worden sein. Aktiviertes mTORC1 reguliert die Lipidsynthese positiv über die Aktivierung von SREBP1 und *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR $\gamma$ ) (Porstmann *et al.* 2008; Kim und Chen 2004). In 3T3-L1 Adipozyten hat eine Überaktivierung von mTORC1 eine Suppression der Lipolyse mit zeitgleicher Stimulation der *de novo* Lipogenese und Erhöhung der Akkumulation von

Triglyceriden zur Folge (Chakrabarti *et al.* 2010). Die Inhibierung von mTORC1 im Fettgewebe von Mäusen hingegen führt zu einem schlanken Phänotyp und einer Resistenz gegenüber einer Diät-induzierten Adipositas (Polak *et al.* 2008). Desweiteren verlieren Patienten nach einer Nierentransplantation durch die Gabe des mTORC1-Inhibitors Rapamycin an Körpergewicht im Vergleich zu anderen Immunsuppressiva (Rovira *et al.* 2008). Ein Mangel an S6K1 bringt ebenfalls einen Adipositas-resistenten Phänotyp hervor (Um *et al.* 2004). Zusammenfassend lässt sich einschätzen, dass p62 und mTORC1/S6K1 antagonistische Funktionen auf die Adipogenese und Adipositas haben und in ihrer Regulation verknüpft sind.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine veränderte Stoffwechselsituation der Mutter die embryonale mTORC1-Aktivität beeinflusst. Die verstärkte Aktivierung von mTORC1 im Embryo ist mit einer forcierten Proteinsynthese und gleichzeitiger Reduktion der Autophagie in einer diabetischen Schwangerschaft assoziiert (Abb. 50). Es ist möglich, dass dadurch fehlgefaltete und defekte Proteine bzw. Organellen intrazellulär akkumulieren, was eine Schädigung der Zellen zur Folge haben könnte. Diese Vermutung steht im engen Zusammenhang mit der bereits bekannten erhöhten Apoptose embryonaler Zellen während einer diabetischen Schwangerschaft (Ramin *et al.* 2010). Die Fehlregulation wichtiger zellulärer Prozesse ruft einen metabolischen Stress im Embryo hervor. Ein regulierender Transkriptionsfaktor könnte das *Forkhead-Box*-Protein O 1 FoxO1 sein.

#### **5.4 FoxO1 ist in 6 Tage alten Blastozysten des Kaninchens nachweisbar und über Glukose und L-Leucin regulierbar**

Der Transkriptionsfaktor FoxO1 spielt eine wichtige Rolle in der Embryogenese, denn ein Fehlen von FoxO1 bei Mausembryonen führt zu Störungen der Angiogenese und zum Absterben der Embryonen am Tag 10,5 der Entwicklung (Hosaka *et al.* 2004). In humanen embryonalen Stammzellen stellt FoxO1 einen essentiellen Faktor für die Differenzierung dar, da FoxO1 auch für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz verantwortlich ist (Zhang *et al.* 2011). FoxO1 erhält durch die Koordination der zellulären Energieverfügbarkeit die Energiehomöostase.

In 6 Tage alten Kaninchenblastozysten ist FoxO1 sowohl auf Transkriptebene (Bachelorarbeit Asis Mousa, unveröffentlichte Daten) als auch auf Proteinebene (Masterarbeit Karen Uhde, unveröffentlichte Daten) nachweisbar. FoxO1 ist in Trophoblastzellen stärker phosphoryliert als in Embryoblastzellen. Es ist anzunehmen, dass das phosphorylierte FoxO1 im Trophoblasten schneller abgebaut wird, da auch die Gesamtproteinmenge gering ist. Beides, die höhere Phosphorylierung und die geringe FoxO1-Proteinmenge weisen auf eine verringerte Aktivität im Trophoblasten hin.

Die Aktivität von FoxO1 als Transkriptionsfaktor ist durch seine DNA-Bindung der nicht-phosphorylierten FoxO1-Form an DNA-Bindemotive reguliert (Übersichtsartikel: Obsil und Obsilova 2008). Ein Glukoseüberschuss führt zu einer Reduktion der FoxO1-Phosphorylierung und somit zu einer verstärkten Bindung von FoxO1 an die DNA, um seine Aktivität als Transkriptionsfaktor zu forcieren (Behl *et al.* 2009). In *in vitro* kultivierten Blastozysten wird die FoxO1-Phosphorylierung durch 10 mM Glukose verringert, was wiederum die Bindung von FoxO1 an die DNA verstärkt. In Übereinstimmung mit den Erkenntnissen aus der Zellkultur (Behl *et al.* 2009) wird die FoxO1-Phosphorylierung in Kaninchenembryonen durch Glukose *in vitro* reguliert.

Da in einer diabetischen Frühschwangerschaft die Glukosekonzentration im Uterus 3-fach erhöht ist (Ramin *et al.* 2010), kann FoxO1 in dieser Umgebung aktiviert werden. Außerdem ist bekannt, dass FoxO1 indirekt die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) aktivieren kann und es so zu einer Inhibierung der TORC1-Aktivität kommt (Lee *et al.* 2010; Chen *et al.* 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde die komplexe Interaktion von FoxO1 und mTORC1 in Kaninchenblastozysten näher analysiert. Eine erhöhte embryonale L-Leucinverfügbarkeit sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ist mit einer forcierten mTORC1-Signalgebung assoziiert. Embryonales FoxO1 wird durch erhöhte L-Leucinkonzentrationen *in vitro* stärker phosphoryliert, was eine Inaktivierung bedeutet.

### **5.5 FoxO1 wird in Embryonen diabetischer Kaninchen über den mTORC1-Signalweg in Abhängigkeit von der BCAA-Verfügbarkeit reguliert**

In Blastozysten diabetischer Kaninchen ist die FoxO1-Phosphorylierung bei gleichzeitiger Verringerung seiner Gesamtproteinmenge erhöht. In der Zellkernfraktion von Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen ist kein FoxO1-Protein nachweisbar. Diese Ergebnisse bestätigen die Inaktivierung und eine Degradation von FoxO1 im Embryo unter den Bedingungen einer diabetischen Schwangerschaft. Die Regulation von FoxO1 ist von mehreren Faktoren abhängig. Es können sowohl Insulin direkt über die Insulinrezeptor-Signalkaskade und Akt als auch Glukose und BCAA indirekt über mTORC1 FoxO1 regulieren.

Die Inhibierung von FoxO1 erfolgt über Phosphorylierung durch Akt, was einen Kernexport von FoxO1 zur Folge hat (Übersichtsartikel: Calnan und Brunet 2008; Greer und Brunet 2008; Hay 2011). Für Akt konnte kein Unterschied in der relativen Phosphorylierungsmenge in Blastozysten diabetischer Kaninchen nachgewiesen werden (Thieme *et al.* 2012), wohl aber eine Verringerung der Akt-Proteinmenge. Weiterhin führte die Behandlung von Kaninchenembryonen *in vitro* mit dem Akt-spezifischen Inhibitor Ly294.002 zu keiner Änderung in der FoxO1-Phosphorylierung.

Die Stimulationsversuche *in vitro* weisen darauf hin, dass die Inaktivierung von FoxO1 in Blastozysten diabetischer Kaninchen eine Folge der erhöhten BCAA-Verfügbarkeit und mTORC1-Aktivität ist. Blastozysten, die mit diabetischen BCAA-Konzentrationen kultiviert wurden, zeigen eine Erhöhung der FoxO1-Phosphorylierung und eine Abnahme des FoxO1-Proteins. Auch *in vivo* korrelieren hohe BCAA-Konzentrationen mit erhöhten Phosphorylierungsmengen von FoxO1 und mTORC1. Der Einsatz des mTORC1-spezifischen Inhibitors Rapamycin bestätigte die Vermutung, dass FoxO1 in Kaninchenembryonen über mTORC1 reguliert wird, denn die Rapamycingabe verringert die embryonale FoxO1-Phosphorylierung *in vitro*. Weiterhin bleibt der Anstieg der Phosphorylierung von FoxO1 nach L-Leucinstimulus unter Verwendung von Rapamycin aus.

Die vorliegende Arbeit beweist erstmalig eine Regulation von FoxO1 im Präimplantationsembryo über die L-Leucinverfügbarkeit in einer mTORC1-abhängigen und Akt-unabhängigen Weise.

Embryonales mTORC1 und FoxO1 sind über die BCAA koreguliert. *In vitro* ist FoxO1 während eines BCAA-Entzugs aktiv mit zeitgleicher Inaktivierung von mTORC1. Darauf weisen nicht nur die verringerten Phosphorylierungsmengen von FoxO1 hin, sondern auch die erhöhte Transkription von FoxO1-Zielgenen (*HK2* und *LC3*) und die verstärkte Autophagie, um überlebenswichtige Nährstoffe und Energie zu sichern.

Die Aktivierung der mTORC1-Signalkaskade und der FoxO1-Inhibierung *in vivo* kann als Folge der BCAA-Erhöhung angesehen werden, wobei die Aktivität von FoxO1 simultan über BCAA in Abhängigkeit von mTORC1 reguliert wird.

### **5.5.1 Die Inaktivierung von FoxO1 hat Folgen für den Embryo**

Die Inaktivierung von FoxO1 in Embryonen diabetischer Kaninchen wird zusätzlich über die verringerte Transkription seiner Zielgene Hexokinase (*HK2*) und Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (*PEPCK*) in Trophoblastzellen bestätigt. Ramin und Kollegen zeigten bereits 2010, dass die *PEPCK*-Transkriptmengen in Gesamtembryonen abhängig von Glukose ist (Ramin *et al.* 2010) und schlugen u.a. FoxO1 als möglichen Regulator vor. FoxO1 ist in der Lage, mit den Insulin-*response*-Sequenzen im Promotor der *PEPCK* zu interagieren (Yeagley *et al.* 2001; Wolfrum *et al.* 2004). Eine Regulation der Hexokinase-Expression in Abhängigkeit von FoxO1 wurde in einer *Foxo1*-defizienten  $\beta$ -Zelllinie beschrieben (Miyazaki *et al.* 2012).

Es ist bekannt, dass die FoxOs eine wichtige Rolle in der Regulation der Autophagie einnehmen. Eine gesteigerte FoxO3-Aktivität führt im Skelettmuskel zu einer Induktion von Genen der Autophagie-Signalgebung, wie z.B. *LC3* (Zhao *et al.* 2007; Mammucari *et al.* 2007). Weiterhin forciert FoxO1 in kultivierten neonatalen Kardiomyozyten von Ratten die

Bildung von Autophagosomen über die Expressionsinduktion des Autophagie-assoziierten Gens *LC3* (Sengupta *et al.* 2009). Eine neue Studie von Liu und Kollegen zeigte, dass FoxO1 die Autophagie auch in kultivierten Adipozyten und explantiertem weißen Fettgewebe reguliert (Liu *et al.* 2016). Passend dazu sind in Korrelation zu der FoxO1-Inaktivität in Blastozysten diabetischer Kaninchen die Transkription des Autophagiemarkers *LC3* und die Lysosomenzahlen verringert.

Da aktives FoxO1 ROS-Stress entgegen wirkt (Ponugoti *et al.* 2012), kann die Inaktivierung von FoxO1 zu einer geringeren zellulären Stressresistenz im Embryo führen. Als Folge einer gestörten Stressabwehr wurden in Blastozysten diabetischer Kaninchen bereits mehr oxidierte Proteine und reaktive Sauerstoffspezies (Haucke *et al.* 2014) nachgewiesen, was auf die Inaktivität von FoxO1 zurückzuführen sein könnte.

Diese Ergebnisse verdeutlichen einen komplexen Signalweg, in dem aktiviertes mTORC1 mit inhibierten FoxO1 während einer diabetischen Schwangerschaft assoziiert ist (Abb. 50). Im Embryo ist die mTORC1-abhängige FoxO1-Aktivität über die BCAA-Verfügbarkeit reguliert. Zusammenfassend muss an dieser Stelle verdeutlicht werden, dass der Embryo nicht nur an die metabolische Situation der Mutter adaptiert, sondern sich dadurch im Embryo selbst zelluläre Prozesse verändern. Die verstärkte Proteinsynthese und verringerte Autophagie in Embryonen diabetischer Kaninchen ist vermutlich Folge der veränderten mTORC1-FoxO1-Signalgebung. Diese zellulären Veränderungen im Embryo könnten ein kompensatorischer Mechanismus sein, um das Überleben des Embryos zu sichern und ihn aber auch langfristig metabolisch zu programmieren.

### **5.6 Ausblick**

Bei Tier und Mensch wurden postnatale Programmierungseffekte auf das Körpergewicht über den Ernährungsstatus beschrieben (McCance und Widdowson 1960; Lamb *et al.* 2010). Ein hohes Geburtsgewicht und eine verstärkte Gewichtszunahme in den ersten zwei Lebensjahren sind mit einem erhöhten Risiko für Adipositas im späteren Leben assoziiert (Übersichtsartikel: Baird *et al.* 2005; Monteiro und Victora 2005; Ong und Loos 2006; Koletzko *et al.* 2009). Jedoch können bereits funktionelle Veränderungen des pränatalen Metabolismus die Entwicklung von Adipositas fördern (Ashwell *et al.* 1987; Dulloo und Girardier 1993). Die intrauterine L-Leucinverfügbarkeit wird während maternalen Stoffwechselstörungen als ein Schlüsselfaktor für die veränderte Prädisposition, im Erwachsenenalter an Krankheiten zu leiden, angesehen (Langley *et al.* 1994; Langley-Evans *et al.* 1996; Heywood *et al.* 2004; Eckert *et al.* 2012).

Mit der Erkenntnis über die Empfindlichkeit und Anpassungsfähigkeit des Embryos in der Präimplantationsphase wächst die klinische Notwendigkeit, Frauen mit Stoffwechselstörungen in der Schwangerschaft metabolisch zu kontrollieren und

gegebenenfalls besser zu betreuen und zu behandeln. Auch in der Reproduktionsmedizin werden die Kulturbedingungen der Embryonen genauer untersucht, denn die verwendeten Nährmedien entsprechen häufig nicht annähernd dem intrauterinen Milieu *in vivo* (Bavister 1995; Young *et al.* 1998; Sinclair *et al.* 2000; McEvoy 2003; Hoelker *et al.* 2010). Die Embryonenkultur und die perikonzeptionelle Behandlungen in Tiermodellen der assistierten Reproduktionstechnik (ART) haben eine veränderte Wachstumsrate und metabolische Dysfunktionen zur Folge (Ecker *et al.* 2004; Fernandez-Gonzalez *et al.* 2004; Watkins *et al.* 2007; Banrezes *et al.* 2011; Übersichtsartikel: Bloise *et al.* 2014). Außerdem verändert die Verwendung von kommerziellen Kulturmedien in humaner ART das Geburtsgewicht (Dumoulin *et al.* 2010).

Über die Langzeitfolgen für die postnatale Entwicklung kann bisher nur spekuliert werden. Einige Studien weisen darauf hin, dass mTOR in der Anpassung des fetalen Wachstums an den maternalen Ernährungsstatus über die Regulation des Nährstofftransports in der Plazenta eine Rolle spielt (Roos *et al.* 2007; Roos *et al.* 2009; Rosario *et al.* 2011; Jansson *et al.* 2012; Jansson *et al.* 2013). Es wurde gezeigt, dass während einer IUGR der reduzierte plazentare Aminosäuretransport (Dicke und Henderson 1988; Mahendran *et al.* 1993; Glazier *et al.* 1997; Norberg *et al.* 1998) als Folge der verringerten mTORC1-Aktivität angesehen werden kann (Roos *et al.* 2007; Yung *et al.* 2008). Im Vergleich dazu war der plazentare L-Leucintransport während eines Gestationsdiabetes mit makrosomen Nachkommen erhöht (Jansson *et al.* 2002). Eine aktivierte mTORC1-Signalgebung in der humanen Plazenta steht in Verbindung mit einem hohem BMI der Mütter und gesteigerten fetalen Wachstum (Jansson *et al.* 2013).

Die vorliegende Arbeit gibt wichtige Hinweise auf molekularbiologische Signalwege, die bereits vor der Implantation durch einen maternalen Typ 1 Diabetes mellitus im Embryo verändert werden. In Kohärenz mit anderen wissenschaftlichen Arbeiten wird der embryonale mTORC1-Signalweg in Abhängigkeit von der BCAA-Verfügbarkeit in Schwangerschaftskomplikationen als Mediator der Adaptation und der pränatalen Prägung des embryonalen Metabolismus angesehen und bestätigt (Eckert *et al.* 2012; Sun *et al.* 2013).

Um gesundheitliche Folgen für das Kind durch reproduktionsmedizinische Behandlungen und/oder metabolische Erkrankungen der Mutter auszuschließen, ist es erforderlich, veränderte zelluläre Prozesse im Embryo intensiv in Korrelation zu gesundheitlichen Langzeitfolgen zu untersuchen. Optimale Kulturbedingungen für ART müssen identifiziert und Frauen mit Stoffwechselerkrankungen vor und während der Schwangerschaft konsequenter behandelt werden, um langfristige Gesundheitsschädigungen bei ihren Kindern zu vermeiden.

## 6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen einer Stoffwechselstörung (Typ 1 Diabetes mellitus) in der Präimplantationsphase (Tag 6 *p.c.*) der Gravidität beim Kaninchen auf den maternalen und embryonalen Aminosäurenmetabolismus, den mTORC1-Signalweg und dem Transkriptionsfaktor FoxO1 untersucht.

Im diabetischen Schwangerschaftsmodell wurde gezeigt, dass sich der Präimplantationsembryo an den veränderten Aminosäurenmetabolismus der Mutter anpasst.

Es wurden folgende Erkenntnisse gewonnen\*<sup>1</sup>:

- Ein Typ 1 Diabetes mellitus führt zu Erhöhungen der BCAA-Konzentrationen im Plasma, Uterusekret und in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit.
- In einer diabetischen Schwangerschaft ist die Akkumulation der BCAA in maternalen Geweben und Blastozysten die Folge eines verringerten BCAA-Katabolismus.
- Eine höhere BCAA-Verfügbarkeit steigert die Expression des BCAA-Transporters *SLC7A8* im Embryo.

Der mTORC1-Signalweg ist in 6 Tage alten Blastozysten des Kaninchens aktiv und über die Glukose- und L-Leucinverfügbarkeit beeinflussbar\*<sup>2</sup>.

Die veränderte Stoffwechselsituation der Mutter während eines Typ 1 Diabetes mellitus führt zur Aktivierung der embryonalen mTORC1-Signalkaskade. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen\*<sup>2</sup>:

- Präimplantationsembryonen diabetischer Kaninchen weisen eine erhöhte mTORC1- und S6K1-Phosphorylierung und verstärkte Transkription von den mTORC1-Zielgenen *CCND1*, *eIF4E* und *SLC7A8* auf.

Diese metabolische Adaptation hat Konsequenzen für den Embryo\*<sup>2</sup>:

- Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen weisen eine erhöhte Proteinsynthese und verringerter Autophagie auf.

Der Transkriptionsfaktor FoxO1 ist in 6 Tage alten Blastozysten des Kaninchens nachweisbar und über die Glukose- und L-Leucinverfügbarkeit regulierbar.

- FoxO1 wird in einer mTORC1-abhängigen Weise über L-Leucin *in vitro* inhibiert.

FoxO1 wird in Embryonen diabetischer Kaninchen über den mTORC1-Signalweg in Abhängigkeit von der BCAA-Verfügbarkeit inhibiert.

- Ein maternaler Typ 1 Diabetes mellitus führt zur verstärkten Phosphorylierung von embryonalen FoxO1 und zu einer veränderten Transkription von FoxO1-Zielgenen (*LC3*, *HK2* und *PEPCK*).

Die BCAA-Verfügbarkeit reguliert die Wechselwirkung von mTORC1 und FoxO1 in Präimplantationsembryonen des Kaninchens wie folgt:

- Erhöhte BCAA-Konzentration wie bei einem Typ 1 Diabetes mellitus führen zu einer erhöhten Aktivierung des mTORC1-Signalweges und zur Inhibierung von FoxO1 in 6 Tage alten Blastozysten *in vitro*.
- Ein Fehlen der BCAA *in vitro* hat zur Folge, dass die Phosphorylierung von mTORC1, S6K1 und FoxO1 verringert wird. Die reduzierte mTORC1-Aktivität resultiert in einer verringerten Proteinsynthese in Trophoblastzellen. Aktives FoxO1 hingegen kann die Transkription von den Genen *LC3* und *HK2* und die Autophagie fördern.

Die vorliegende Arbeit zeigt mittels molekularbiologischer Methoden, wie der embryonale mTORC1-FoxO1-Signalweg durch veränderte Nährstoffbedingungen im Falle eines maternalen Typ 1 Diabetes mellitus reguliert wird. Die Anpassungsfähigkeit des embryonalen Metabolismus sichert dem Embryo durch die Modulation des mTORC1-Signalweges das Überleben. Sie birgt aber auch das Risiko einer Weichenstellung für einen „überaktiven“ Zellmetabolismus in der Präimplantationsphase. In Kohärenz mit anderen wissenschaftlichen Arbeiten beweist die vorliegende Arbeit, dass den BCAA und dem mTORC1-FoxO1-Signalweg eine zentrale Rolle in der metabolischen Anpassung des Embryos in der Frühschwangerschaft zukommt.

\*<sup>1</sup> Daten veröffentlicht in: Gürke *et al.* 2015 „Maternal Diabetes Leads to Adaptation in Embryonic Amino Acid Metabolism during Early Pregnancy.“ PLoS One. 10(5):e0127465.

\*<sup>2</sup> Daten veröffentlicht in: Gürke *et al.* 2016 „Maternal diabetes promotes mTORC1 downstream signalling in rabbit preimplantation embryos“. Reproduction. 151(5):465-76.



## 7 Summary

The objective of the current study was to investigate the effects of a maternal type 1 diabetes mellitus on maternal and embryonic amino acid metabolism, mTORC1 signalling and the transcription factor FoxO1 during the preimplantation period of pregnancy in the rabbit.

Rabbit preimplantation embryos adapt to changes in maternal amino acid metabolism in diabetic pregnancy model. Following results were obtained\*<sup>1</sup>:

- A maternal diabetes mellitus leads to an increase of BCAA in plasma, uterine fluid and blastocyst cavity fluid.
- The BCAA accumulation in maternal tissue and blastocysts during a diabetic pregnancy is a result of a reduced BCAA degradation.
- Higher BCAA availability enhanced the transcript amounts of BCAA transporter *SLC7A8* in blastocysts.

The mTORC1 signalling pathway is active and is regulated by exogenous glucose and L-leucine in 6 days old blastocysts\*<sup>2</sup>.

The changed metabolic situation of the mother during type 1 diabetes mellitus leads to the activation of embryonic mTORC1 signalling. The main results can be summarised as follows\*<sup>2</sup>:

- Preimplantation embryos from diabetic rabbits show enhanced phosphorylation of mTORC1 and S6K1 and a higher transcription of mTORC1 target genes such as *CCND1*, *eIF4E* and *SLC7A8*.

This metabolic adaptation has consequences for the embryo\*<sup>2</sup>:

- Trophoblast cells have a higher protein synthesis and simultaneously a reduced autophagy during a diabetic pregnancy.

The transcription factor FoxO1 is detectable in 6 days old blastocysts and is regulated by exogenous glucose and L-leucine.

- The inhibition of FoxO1 is dependent on mTORC1 through the availability of L-leucine.

FoxO1 is inhibited by mTORC1 depending on BCAA availability in blastocysts from diabetic rabbits.

- Maternal diabetes leads to higher phosphorylation of embryonic FoxO1 and an altered expression of FoxO1 target genes (*LC3*, *HK2* and *PEPCK*).

The availability of BCAA regulates the interaction of mTORC1 signalling and FoxO1 in preimplantation rabbit embryos as follows:

- Higher availability of BCAA *in vitro* leads to an increased activation of mTORC1 signalling and inhibition of FoxO1 in preimplantation embryos like *in vivo* mirroring clearly development in a diabetic rabbit.
- A lack of BCAA leads to a reduced phosphorylation of mTORC1, S6K1 and FoxO1. The decreased mTORC1 signalling coincides with a reduced protein synthesis in trophoblast cells. In contrast, active FoxO1 enhances gene expression of *LC3* and *HK2* and promotes autophagy.

The current study clearly shows the adaptation of embryonic mTORC1 and FoxO1 signalling on changes in the nutritional supply in a maternal type 1 diabetes mellitus pregnancy. The adaptability of the embryonic metabolism ensures development and survival by modulation of mTORC1 signalling in the preimplantation period. The results from current study propose that BCAA and mTORC1/FoxO1 signalling have crucial importance for embryonic metabolic adaptation in the preimplantation period, but may lead to long-term metabolic misprogramming.

\*<sup>1</sup> data published in: Gürke *et al.* 2015 „Maternal Diabetes Leads to Adaptation in Embryonic Amino Acid Metabolism during Early Pregnancy.” PLoS One. 10(5):e0127465.

\*<sup>2</sup> data published in: Gürke *et al.* 2016 „Maternal diabetes promotes mTORC1 downstream signalling in rabbit preimplantation embryos”. Reproduction. 151(5):465-76.

---

## 8 Literaturverzeichnis

- Aburto**, M. R., Hurlé, J. M., Varela-Nieto, I., und Magariños, M. (2012). Autophagy During Vertebrate Development. *Cells*, 1(4), 428–448.
- Adastra**, K. L., Chi, M. M., Riley, J. K., und Moley, K. H. (2011). A differential autophagic response to hyperglycemia in the developing murine embryo. *Reproduction (Cambridge, England)*, 141(5), 607–615.
- Alexiou**, M., und Leese, H. J. (1992). Purine utilisation, de novo synthesis and degradation in mouse preimplantation embryos. *Development (Cambridge, England)*, 114(1), 185–192.
- Ashwell**, M., Purkins, L., Cowen, T., und Day, K. C. (1987). Pre- and postnatal development of adipose tissue at four sites in the guinea pig: effect of maternal diet restriction during the second half of pregnancy. *Annals of Nutrition und Metabolism*, 31(4), 197–210.
- Baird**, J., Fisher, D., Lucas, P., Kleijnen, J., Roberts, H., und Law, C. (2005). Being big or growing fast: systematic review of size and growth in infancy and later obesity. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 331(7522), 929.
- Banerjee**, P., Ahmad, M. F., Grove, J. R., Kozlosky, C., Price, D. J., und Avruch, J. (1990). Molecular structure of a major insulin/mitogen-activated 70-kDa S6 protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(21), 8550–8554.
- Banrezes**, B., Sainte-Beuve, T., Canon, E., Schultz, R. M., Cancela, J., und Ozil, J.-P. (2011). Adult Body Weight Is Programmed by a Redox-Regulated and Energy-Dependent Process during the Pronuclear Stage in Mouse. *PLoS ONE*, 6(12), e29388.
- Barker**, D. J., und Osmond, C. (1986). Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*, 1(8489):1077-81.
- Barker**, D. J. (1994). Outcome of low birthweight. *Hormone Research*, 42(4-5), 223–230.
- Barker**, D. J. (1998). In utero programming of chronic disease. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 95(2), 115–128.
- Barker**, D. J. (2001). The malnourished baby and infant. *British Medical Bulletin*, 60, 69–88.
- Bartolomé**, A., Kimura-Koyanagi, M., Asahara, S.-I., Guillén, C., Inoue, H., Teruyama, K., et al. (2014). Pancreatic  $\beta$ -cell failure mediated by mTORC1 hyperactivity and autophagic impairment. *Diabetes*, 63(9), 2996–3008.
- Bassi**, M. T., Sperandeo, M. P., Incerti, B., Bulfone, A., Pepe, A., Surace, E. M., et al. (1999). SLC7A8, a gene mapping within the lysinuric protein intolerance critical region, encodes a new member of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *Genomics*, 62(2), 297–303.
- Bavister**, B. D., Leibfried, M. L., und Lieberman, G. (1983). Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biology of Reproduction*, 28(1), 235–247.
- Bavister**, B. D., und McKiernan, S. H. (1993). Regulation of Hamster Embryo Development In Vitro by Amino Acids. In B. D. Bavister (Hrsg.), *Preimplantation Embryo Development* (S. 57–72). New York, NY: Springer New York.

- Bavister**, B. D. (1995). Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Human Reproduction Update*, 1(2), 91–148.
- Behl**, Y., Krothapalli, P., Desta, T., Roy, S., und Graves, D. T. (2009). FOXO1 Plays an Important Role in Enhanced Microvascular Cell Apoptosis and Microvascular Cell Loss in Type 1 and Type 2 Diabetic Rats. *Diabetes*, 58(4), 917–925.
- Berger**, M., Zimmermann-Telschow, H., Berchtold, P., Drost, H., Müller, W. A., Gries, F. A., und Zimmermann, H. (1978). Blood amine acid levels in patients with insulin excess (functioning insulinoma) and insulin deficiency (diabetic ketosis). *Metabolism: Clinical and Experimental*, 27(7), 793–799.
- Bernasko**, J. (2007). Intensive insulin therapy in pregnancy: strategies for successful implementation in pregestational diabetes mellitus. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 20(2), 125–132.
- Bjørkøy**, G., Lamark, T., Pankiv, S., Øvervatn, A., Brech, A., und Johansen, T. (2009). Chapter 12 Monitoring Autophagic Degradation of p62/SQSTM1. In *Methods in Enzymology* (Bd. 452, S. 181–197). Elsevier.
- Blandino-Rosano**, M., Chen, A. Y., Scheys, J. O., Alejandro, E. U., Gould, A. P., Taranukha, T., et al. (2012). mTORC1 signaling and regulation of pancreatic  $\beta$ -cell mass. *Cell Cycle*, 11(10), 1892–1902.
- Blaise**, E., Feuer, S. K., und Rinaudo, P. F. (2014). Comparative intrauterine development and placental function of ART concepti: implications for human reproductive medicine and animal breeding. *Human Reproduction Update*, 20(6), 822–839.
- Bloomgarden**, Z. T. (2002). Adiposity and Diabetes. *Diabetes Care*, 25(12), 2342–2349.
- Boney**, C. M., Verma, A., Tucker, R., und Vohr, B. R. (2005). Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics*, 115(3), e290–296.
- Bose**, K. S., und Sarma, R. H. (1975). Delineation of the intimate details of the backbone conformation of pyridine nucleotide coenzymes in aqueous solution. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 66(4), 1173–1179.
- Brison**, D. R., Houghton, F. D., Falconer, D., Roberts, S. A., Hawkhead, J., Humpherson, P. G., et al. (2004). Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 19(10), 2319–2324.
- Brooks**, R. F. (1977). Continuous protein synthesis is required to maintain the probability of entry into S phase. *Cell*, 12(1), 311–317.
- Brosnan**, J. T., und Brosnan, M. E. (2006). Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation. *The Journal of Nutrition*, 136(1 Suppl), 207S–11S.
- Brunet-Simon**, A., Henrion, G., Renard, J. P., und Duranthon, V. (2001). Onset of zygotic transcription and maternal transcript legacy in the rabbit embryo. *Molecular Reproduction and Development*, 58(2), 127–136.
- Brunn**, G. J., Hudson, C. C., Sekulić, A., Williams, J. M., Hosoi, H., Houghton, P. J., et al. (1997). Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5322), 99–101.

- Buse**, M. G., und Reid, S. S. (1975). Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle. *Journal of Clinical Investigation*, 56(5), 1250–1261.
- Calnan**, D. R., und Brunet, A. (2008). The FoxO code. *Oncogene*, 27(16), 2276–2288.
- Carlson**, C. J., White, M. F., und Rondinone, C. M. (2004). Mammalian target of rapamycin regulates IRS-1 serine 307 phosphorylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316(2), 533–539.
- Chakrabarti**, P., English, T., Shi, J., Smas, C. M., und Kandror, K. V. (2010). Mammalian target of rapamycin complex 1 suppresses lipolysis, stimulates lipogenesis, and promotes fat storage. *Diabetes*, 59(4), 775–781.
- Chen**, C.-C., Jeon, S.-M., Bhaskar, P. T., Nogueira, V., Sundararajan, D., Tonic, I., *et al.* (2010). FoxOs inhibit mTORC1 and activate Akt by inducing the expression of Sestrin3 and Rictor. *Developmental Cell*, 18(4), 592–604.
- Cho**, N. H., Silverman, B. L., Rizzo, T. A., und Metzger, B. E. (2000). Correlations between the intrauterine metabolic environment and blood pressure in adolescent offspring of diabetic mothers. *The Journal of Pediatrics*, 136(5), 587–592.
- Christensen**, H. N. (1990). Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiological Reviews*, 70(1), 43–77.
- Chuang**, D. T., Davie, J. R., Wynn, R. M., Chuang, J. L., Koyata, H., und Cox, R. P. (1995). Molecular basis of maple syrup urine disease and stable correction by retroviral gene transfer. *The Journal of Nutrition*, 125(6 Suppl), 1766S–1772S.
- Clausen**, T. D., Mathiesen, E. R., Hansen, T., Pedersen, O., Jensen, D. M., Lauenborg, J., und Damm, P. (2008). 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*, 31(2), 340–346.
- Cornu**, M., Albert, V., und Hall, M. N. (2013). mTOR in aging, metabolism, and cancer. *Current Opinion in Genetics and Development*, 23(1), 53–62.
- Creighton**, T. E. (1997). *Proteins: structures and molecular properties* (2. ed., 5. printing). New York: Freeman.
- Curthoys**, N. P., und Watford, M. (1995). Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 15, 133–159.
- Daniel**, J. (1964). Early Growth of Rabbit Trophoblast. *The American Naturalist*, 98(899), 85–98.
- Dann**, S. G., Selvaraj, A., und Thomas, G. (2007). mTOR Complex1-S6K1 signaling: at the crossroads of obesity, diabetes and cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 13(6), 252–259.
- Darmaun**, D., und Déchelotte, P. (1991). Role of leucine as a precursor of glutamine alpha-amino nitrogen in vivo in humans. *The American Journal of Physiology*, 260(2 Pt 1), E326–329.
- Dazert**, E., und Hall, M. N. (2011). mTOR signaling in disease. *Current Opinion in Cell Biology*, 23(6), 744–755.
- De Benedetti**, A., und Rhoads, R. E. (1990). Overexpression of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E in HeLa cells results in aberrant growth and morphology.

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(21), 8212–8216.

**diabetesDE** – Deutsche Diabetes-Hilfe und, und Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG). (2016). Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2016. Kirchheim + Co GmbH Mainz.

**Dicke**, J. M., und Henderson, G. I. (1988). Placental amino acid uptake in normal and complicated pregnancies. *The American Journal of the Medical Sciences*, 295(3), 223–227.

**Dill**, K. A. (1990). Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*, 29(31), 7133–7155.3

**Dulloo**, A. G., und Girardier, L. (1993). Adaptive role of energy expenditure in modulating body fat and protein deposition during catch-up growth after early undernutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 58(5), 614–621.

**Dumoulin**, J. C., van Wissen, L. C., Menheere, P. P., Michiels, A. H., Geraedts, J. P., und Evers, J. L. (1997). Taurine acts as an osmolyte in human and mouse oocytes and embryos. *Biology of Reproduction*, 56(3), 739–744.

**Dumoulin**, J. C., Land, J. A., Van Montfoort, A. P., Nelissen, E. C., Coonen, E., Derhaag, J. G., *et al.* (2010). Effect of in vitro culture of human embryos on birthweight of newborns. *Human Reproduction*, 25(3), 605–612.

**Ecker**, D. J., Stein, P., Xu, Z., Williams, C. J., Kopf, G. S., Bilker, W. B., *et al.* (2004). Long-term effects of culture of preimplantation mouse embryos on behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(6), 1595–1600.

**Eckert**, J. J., Porter, R., Watkins, A. J., Burt, E., Brooks, S., Leese, H. J., *et al.* (2012). Metabolic Induction and Early Responses of Mouse Blastocyst Developmental Programming following Maternal Low Protein Diet Affecting Life-Long Health. *PLoS ONE*, 7(12), e52791.

**Edwards**, L. J., Williams, D. A., und Gardner, D. K. (1998). Intracellular pH of the preimplantation mouse embryo: effects of extracellular pH and weak acids. *Molecular Reproduction and Development*, 50(4), 434–442.

**Evers**, I. M., de Valk, H. W., und Visser, G. H. A. (2004). Risk of complications of pregnancy in women with type 1 diabetes: nationwide prospective study in the Netherlands. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 328(7445), 915.

**Fee**, J. A., und Phillips, W. D. (1975). The behavior of holo- and apo-forms of bovine superoxide dismutase at low pH. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 412(1), 26–38.

**Felig**, P., Marliss, E., und Cahill, G. F. (1969). Plasma Amino Acid Levels and Insulin Secretion in Obesity. *New England Journal of Medicine*, 281(15), 811–816.

**Felig**, P., Marliss, E., Ohman, J. L., und Cahill, C. F. (1970). Plasma amino acid levels in diabetic ketoacidosis. *Diabetes*, 19(10), 727–728.

**Fernandez**, D., und Perl, A. (2009). Metabolic control of T cell activation and death in SLE. *Autoimmunity Reviews*, 8(3), 184–189.

**Fernández-Gonzalez**, R., Moreira, P., Bilbao, A., Jiménez, A., Pérez-Crespo, M., Ramírez, M. A., *et al.* (2004). Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16), 5880–5885.

- Fischer**, B., Chavatte-Palmer, P., Viebahn, C., Navarrete Santos, A., und Duranthon, V. (2012). Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction (Cambridge, England)*, 144(1), 1–10.
- Fleming**, T. P., Velazquez, M. A., Eckert, J. J., Lucas, E. S., und Watkins, A. J. (2012). Nutrition of females during the peri-conceptual period and effects on foetal programming and health of offspring. *Animal Reproduction Science*, 130(3-4), 193–197.
- Forlani**, G., Vannini, P., Marchesini, G., Zoli, M., Ciavarella, A., und Pisi, E. (1984). Insulin-dependent metabolism of branched-chain amino acids in obesity. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 33(2), 147–150.
- Fouraschen**, S. M., de Ruiter, P. E., Kwekkeboom, J., de Bruin, R. W., Kazemier, G., Metselaar, H. J., *et al.* (2013). mTOR signaling in liver regeneration: Rapamycin combined with growth factor treatment. *World Journal of Transplantation*, 3(3), 36–47.
- Fox**, H. L., Pham, P. T., Kimball, S. R., Jefferson, L. S., und Lynch, C. J. (1998). Amino acid effects on translational repressor 4E-BP1 are mediated primarily by L-leucine in isolated adipocytes. *The American Journal of Physiology*, 275(5 Pt 1), C1232–1238.
- Fulks**, R. M., Li, J. B., und Goldberg, A. L. (1975). Effects of insulin, glucose, and amino acids on protein turnover in rat diaphragm. *The Journal of Biological Chemistry*, 250(1), 290–298.
- Gaccioli**, F., White, V., Capobianco, E., Powell, T. L., Jawerbaum, A., und Jansson, T. (2013). Maternal overweight induced by a diet with high content of saturated fat activates placental mTOR and eIF2alpha signaling and increases fetal growth in rats. *Biology of Reproduction*, 89(4), 96.
- Gangloff**, Y.-G., Mueller, M., Dann, S. G., Svoboda, P., Sticker, M., Spetz, J.-F., *et al.* (2004). Disruption of the mouse mTOR gene leads to early postimplantation lethality and prohibits embryonic stem cell development. *Molecular and Cellular Biology*, 24(21), 9508–9516.
- Gardner**, D. K., und Leese, H. J. (1990). Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 88(1), 361–368.
- Garner**, P. R., D'Alton, M. E., Dudley, D. K., Huard, P., und Hardie, M. (1990). Preeclampsia in diabetic pregnancies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 163(2), 505–508.
- Gaull**, G., Tallan, H., Lajtha, A., und Rassin, D. (1975). Pathogenesis of brain dysfunction in inborn errors of amino acid metabolism. In *ed. Biology of Brain Dysfunction* (S. 47–143). New York: Plenum Press.
- Gelfand**, R. A., Glickman, M. G., Jacob, R., Sherwin, R. S., und DeFronzo, R. A. (1986). Removal of infused amino acids by splanchnic and leg tissues in humans. *The American Journal of Physiology*, 250(4 Pt 1), E407–413.
- Glazier**, J. D., Cetin, I., Perugino, G., Ronzoni, S., Grey, A. M., Mahendran, D., *et al.* (1997). Association between the activity of the system A amino acid transporter in the microvillous plasma membrane of the human placenta and severity of fetal compromise in intrauterine growth restriction. *Pediatric Research*, 42(4), 514–519.

- González**, I. M., Martin, P. M., Burdsal, C., Sloan, J. L., Mager, S., Harris, T., und Sutherland, A. E. (2012). Leucine and arginine regulate trophoblast motility through mTOR-dependent and independent pathways in the preimplantation mouse embryo. *Developmental Biology*, 361(2), 286–300.
- Goodman**, C. A. (2014). The role of mTORC1 in regulating protein synthesis and skeletal muscle mass in response to various mechanical stimuli. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 166, 43–95.
- Gopichandran**, N., und Leese, H. J. (2003). Metabolic characterization of the bovine blastocyst, inner cell mass, trophectoderm and blastocoel fluid. *Reproduction (Cambridge, England)*, 126(3), 299–308.
- Gorus**, F. K., Malaisse, W. J., und Pipeleers, D. G. (1982). Selective uptake of alloxan by pancreatic B-cells. *The Biochemical Journal*, 208(2), 513–515.
- Grankvist**, K., Marklund, S., Sehlin, J., und Täljedal, I. B. (1979). Superoxide dismutase, catalase and scavengers of hydroxyl radical protect against the toxic action of alloxan on pancreatic islet cells in vitro. *The Biochemical Journal*, 182(1), 17–25.
- Graur**, D., Duret, L., und Gouy, M. (1996). Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies). *Nature*, 379(6563), 333–335.
- Greer**, E. L., und Brunet, A. (2008). FOXO transcription factors in ageing and cancer. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 192(1), 19–28.
- Guertin**, D. A., und Sabatini, D. M. (2005). An expanding role for mTOR in cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 11(8), 353–361.
- Guertin**, D. A., Stevens, D. M., Thoreen, C. C., Burds, A. A., Kalaany, N. Y., Moffat, J., et al. (2006). Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC $\alpha$ , but not S6K1. *Developmental Cell*, 11(6), 859–871.
- Gwatkin**, R. B. (1966). Defined media and development of mammalian eggs in vitro. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 139(1), 79–90.
- Hales**, C. N., und Barker, D. J. (2001). The thrifty phenotype hypothesis. *British Medical Bulletin*, 60, 5–20.
- Hales**, C. N., und Barker, D. J. P. (2013). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. 1992. *International Journal of Epidemiology*, 42(5), 1215–1222.
- Hanna**, A. K., Zinman, B., Nakhooda, A. F., Minuk, H. L., Stokes, E. F., Albisser, A. M., et al. (1980). Insulin, glucagon, and amino acids during glycemic control by the artificial pancreas in diabetic man. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 29(4), 321–332.
- Hara**, K., Yonezawa, K., Weng, Q. P., Kozlowski, M. T., Belham, C., und Avruch, J. (1998). Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(23), 14484–14494.
- Harper**, A. E., Miller, R. H., und Block, K. P. (1984). Branched-chain amino acid metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 4, 409–454.
- Harris**, R. A., Zhang, B., Goodwin, G. W., Kuntz, M. J., Shimomura, Y., Rougraff, P., et al. (1990). Regulation of the branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase and elucidation of



a molecular basis for maple syrup urine disease. *Advances in Enzyme Regulation*, 30, 245–263.

**Harris**, R. A., Joshi, M., Jeoung, N. H., und Obayashi, M. (2005). Overview of the molecular and biochemical basis of branched-chain amino acid catabolism. *The Journal of Nutrition*, 135(6 Suppl), 1527S–30S.

**Haucke**, E., Navarrete Santos, A., Simm, A., Henning, C., Glomb, M. A., Gürke, J., *et al.* (2014). Accumulation of advanced glycation end products in the rabbit blastocyst under maternal diabetes. *Reproduction*, 148(2), 169–178.

**Hay**, N., und Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes and Development*, 18(16), 1926–1945.

**Hay**, N. (2005). The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer Cell*, 8(3), 179–183.

**Hay**, N. (2011). Interplay between FOXO, TOR, and Akt. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(11), 1965–1970.

**He**, C., Bartholomew, C. R., Zhou, W., und Klionsky, D. J. (2009). Assaying autophagic activity in transgenic GFP-Lc3 and GFP-Gabarap zebrafish embryos. *Autophagy*, 5(4), 520–526.

**Hensen**, V. (1876). Beobachtungen über die Befruchtung und Entwicklung des Kaninchens und Meerschweinchens. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, (1), 213–273, 353–432.

**Herman**, M. A., She, P., Peroni, O. D., Lynch, C. J., und Kahn, B. B. (2010). Adipose tissue branched chain amino acid (BCAA) metabolism modulates circulating BCAA levels. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(15), 11348–11356.

**Heywood**, W. E., Mian, N., Milla, P. J., und Lindley, K. J. (2004). Programming of defective rat pancreatic beta-cell function in offspring from mothers fed a low-protein diet during gestation and the suckling periods. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 107(1), 37–45.

**Hoelker**, M., Rings, F., Lund, Q., Phatsara, C., Schellander, K., und Tesfaye, D. (2010). Effect of embryo density on in vitro developmental characteristics of bovine preimplantative embryos with respect to micro and macroenvironments. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 45(5), e138–145.

**Hosaka**, T., Biggs, W. H., Tieu, D., Boyer, A. D., Varki, N. M., Cavenee, W. K., und Arden, K. C. (2004). Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), 2975–2980.

**Hosokawa**, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., *et al.* (2009). Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1-Atg13-FIP200 Complex Required for Autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, 20(7), 1981–1991.

**Houghton**, F. D., Hawkhead, J. A., Humpherson, P. G., Hogg, J. E., Balen, A. H., Rutherford, A. J., und Leese, H. J. (2002). Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 17(4), 999–1005.

- Hutson**, S. M., Lieth, E., und LaNoue, K. F. (2001). Function of leucine in excitatory neurotransmitter metabolism in the central nervous system. *The Journal of Nutrition*, 131(3), 846S–850S.
- Inoki**, K., Zhu, T., und Guan, K.-L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, 115(5), 577–590.
- International Diabetes Federation**. (2015). *IDF diabetes atlas*. Brussels: International Diabetes Federation.
- Jacinto**, E., und Hall, M. N. (2003). Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(2), 117–126.
- Jansson**, T., Ekstrand, Y., Björn, C., Wennergren, M., und Powell, T. L. (2002). Alterations in the activity of placental amino acid transporters in pregnancies complicated by diabetes. *Diabetes*, 51(7), 2214–2219.
- Jansson**, T., Aye, I. L. M. H., und Goberdhan, D. C. I. (2012). The emerging role of mTORC1 signaling in placental nutrient-sensing. *Placenta*, 33, e23–e29.
- Jansson**, N., Rosario, F. J., Gaccioli, F., Lager, S., Jones, H. N., Roos, S., *et al.* (2013). Activation of placental mTOR signaling and amino acid transporters in obese women giving birth to large babies. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(1), 105–113.
- Jia**, K., Chen, D., und Riddle, D. L. (2004). The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span. *Development (Cambridge, England)*, 131(16), 3897–3906.
- Johnson**, L. W., und Smith, C. H. (1988). Neutral amino acid transport systems of microvillous membrane of human placenta. *The American Journal of Physiology*, 254(6 Pt 1), C773–780.
- Józwik**, M., Teng, C., Wilkening, R. B., Meschia, G., Tooze, J., Chung, M., und Battaglia, F. C. (2001). Effects of branched-chain amino acids on placental amino acid transfer and insulin and glucagon release in the ovine fetus. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 185(2), 487–495.
- Jung**, C. H., Ro, S.-H., Cao, J., Otto, N. M., und Kim, D.-H. (2010). mTOR regulation of autophagy. *FEBS Letters*, 584(7), 1287–1295.
- Kadowaki**, H., und Knox, W. E. (1982). Cytosolic and mitochondrial isoenzymes of branched-chain amino acid aminotransferase during development of the rat. *Biochemical Journal*, 202(3), 777–783.
- Kanai**, Y., Segawa, H., Miyamoto, K. i, Uchino, H., Takeda, E., und Endou, H. (1998). Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *The Journal of Biological Chemistry*, 273(37), 23629–23632.
- Kassai**, H., Sugaya, Y., Noda, S., Nakao, K., Maeda, T., Kano, M., und Aiba, A. (2014). Selective Activation of mTORC1 Signaling Recapitulates Microcephaly, Tuberous Sclerosis, and Neurodegenerative Diseases. *Cell Reports*, 7(5), 1626–1639.
- Keith**, C. T., und Schreiber, S. L. (1995). PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints. *Science (New York, N.Y.)*, 270(5233), 50–51.

- Kermack**, A. J., Finn-Sell, S., Cheong, Y. C., Brook, N., Eckert, J. J., Macklon, N. S., und Houghton, F. D. (2015). Amino acid composition of human uterine fluid: association with age, lifestyle and gynaecological pathology. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 30(4), 917–924.
- Khamzina**, L., Veilleux, A., Bergeron, S., und Marette, A. (2005). Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology*, 146(3), 1473–1481.
- Kim**, J. E., und Chen, J. (2004). regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. *Diabetes*, 53(11), 2748–2756.
- Kim**, J.-Y., Burghardt, R. C., Wu, G., Johnson, G. A., Spencer, T. E., und Bazer, F. W. (2011). Select Nutrients in the Ovine Uterine Lumen. VII. Effects of Arginine, Leucine, Glutamine, and Glucose on Trophectoderm Cell Signaling, Proliferation, and Migration. *Biology of Reproduction*, 84(1), 62–69.
- Kim**, Y. C., und Guan, K.-L. (2015). mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *Journal of Clinical Investigation*, 125(1), 25–32.
- Koletzko**, B., von Kries, R., Closa, R., Escribano, J., Scaglioni, S., Giovannini, M., *et al.* (2009). Lower protein in infant formula is associated with lower weight up to age 2 y: a randomized clinical trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89(6), 1836–1845.
- Kousteni**, S. (2011). FoxO1: A molecule for all seasons. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(5), 912–917.
- Kremer**, C. L., Klein, R. R., Mendelson, J., Browne, W., Samadzedeh, L. K., Vanpatten, K., *et al.* (2006). Expression of mTOR signaling pathway markers in prostate cancer progression. *The Prostate*, 66(11), 1203–1212.
- Kudo**, Y., und Boyd, C. A. (1990). Characterization of amino acid transport systems in human placental basal membrane vesicles. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1021(2), 169–174.
- Kurayama**, R., Ito, N., Nishibori, Y., Fukuhara, D., Akimoto, Y., Higashihara, E., *et al.* (2011). Role of amino acid transporter LAT2 in the activation of mTORC1 pathway and the pathogenesis of crescentic glomerulonephritis. *Laboratory Investigation*, 91(7), 992–1006.
- Kwon**, G., Marshall, C. A., Pappan, K. L., Remedi, M. S., und McDaniel, M. L. (2004). Signaling elements involved in the metabolic regulation of mTOR by nutrients, incretins, and growth factors in islets. *Diabetes*, 53 Suppl 3, S225–232.
- Kwong**, W. Y., Wild, A. E., Roberts, P., Willis, A. C., und Fleming, T. P. (2000). Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development (Cambridge, England)*, 127(19), 4195–4202.
- Lane**, M., und Gardner, D. K. (1998). Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 13(4), 991–997.
- Langley-Evans**, S. C., Welham, S. J., Sherman, R. C., und Jackson, A. A. (1996). Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation

- exhibit differing severity of hypertension. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 91(5), 607–615.
- Langley**, S. C., Browne, R. F., und Jackson, A. A. (1994). Altered glucose tolerance in rats exposed to maternal low protein diets in utero. *Comparative Biochemistry and Physiology. Physiology*, 109(2), 223–229.
- Lawrence**, J. C., und Abraham, R. T. (1997). PHAS/4E-BPs as regulators of mRNA translation and cell proliferation. *Trends in Biochemical Sciences*, 22(9), 345–349.
- Leese**, H. J. (2002). Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 24(9), 845–849.
- Leese**, H. J., Hugentobler, S. A., Gray, S. M., Morris, D. G., Sturmey, R. G., Whitear, S.-L., und Sreenan, J. M. (2008). Female reproductive tract fluids: composition, mechanism of formation and potential role in the developmental origins of health and disease. *Reproduction, Fertility, and Development*, 20(1), 1–8.
- Lee**, S. J., Pfluger, P. T., Kim, J. Y., Nogueiras, R., Duran, A., Pagès, G., *et al.* (2010). A functional role for the p62–ERK1 axis in the control of energy homeostasis and adipogenesis. *EMBO reports*, 11(3), 226–232.
- Lenzen**, S., und Munday, R. (1991). Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. *Biochemical Pharmacology*, 42(7), 1385–1391.
- Lenzen**, S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51(2), 216–226.
- Levine**, B., und Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict? *The Journal of Clinical Investigation*, 115(10), 2679–2688.
- Li**, J. B., und Jefferson, L. S. (1978). Influence of amino acid availability on protein turnover in perfused skeletal muscle. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 544(2), 351–359.
- Liu**, L., Zheng, L. D., Zou, P., Brooke, J., Smith, C., Long, Y. C., *et al.* (2016). FoxO1 antagonist suppresses autophagy and lipid droplet growth in adipocytes. *Cell Cycle*, 15(15), 2033–2041.
- Louard**, R. J., Barrett, E. J., und Gelfand, R. A. (1990). Effect of infused branched-chain amino acids on muscle and whole-body amino acid metabolism in man. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 79(5), 457–466.
- Lynch**, C. J. (2001). Role of leucine in the regulation of mTOR by amino acids: revelations from structure-activity studies. *The Journal of Nutrition*, 131(3), 861S–865S.
- Lynch**, C. J., Patson, B. J., Anthony, J., Vaval, A., Jefferson, L. S., und Vary, T. C. (2002). Leucine is a direct-acting nutrient signal that regulates protein synthesis in adipose tissue. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 283(3), E503–513.
- Mahendran**, D., Donnai, P., Glazier, J. D., D'Souza, S. W., Boyd, R. D., und Sibley, C. P. (1993). Amino acid (system A) transporter activity in microvillous membrane vesicles from the placentas of appropriate and small for gestational age babies. *Pediatric Research*, 34(5), 661–665.
- Malaisse**, W. J., Doherty, M., Ladrière, L., und Malaisse-Lagae, F. (2001). Pancreatic uptake of [2-(14)C]alloxan. *International Journal of Molecular Medicine*, 7(3), 311–315.

- Mammucari, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P., et al.** (2007). FoxO3 Controls Autophagy in Skeletal Muscle In Vivo. *Cell Metabolism*, 6(6), 458–471.
- Martin, K. A., Schalm, S. S., Romanelli, A., Keon, K. L., und Blenis, J.** (2001). Ribosomal S6 kinase 2 inhibition by a potent C-terminal repressor domain is relieved by mitogen-activated protein-extracellular signal-regulated kinase kinase-regulated phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(11), 7892–7898.
- Martin, P. M., und Sutherland, A. E.** (2001). Exogenous amino acids regulate trophoblast differentiation in the mouse blastocyst through an mTOR-dependent pathway. *Developmental Biology*, 240(1), 182–193.
- Martin, P. M., Sutherland, A. E. und Van Winkle, L.J.** (2003). Amino Acid Transport Regulates Blastocyst Implantation. *Biology of Reproduction*, 69(4), 1101–1108.
- Maurer, R.** (1978). Advances in rabbit embryo culture. In ed. *Methods of mammalian reproduction* (S. 259–272). New York: J Academic Press.
- McCance, R., und Widdowson, E.** (1960). *The composition of Foods 3rd edition*. London: Spec. Rep. Ser. Med. Res. Coun. Lond.
- McCormack, S. E., Shaham, O., McCarthy, M. A., Deik, A. A., Wang, T. J., Gerszten, R. E., et al.** (2013). Circulating branched-chain amino acid concentrations are associated with obesity and future insulin resistance in children and adolescents. *Pediatric Obesity*, 8(1), 52–61.
- McDaniel, M. L., Marshall, C. A., Pappan, K. L., und Kwon, G.** (2002). Metabolic and autocrine regulation of the mammalian target of rapamycin by pancreatic beta-cells. *Diabetes*, 51(10), 2877–2885.
- McEvoy, T. G.** (2003). Manipulation of domestic animal embryos and implications for development. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 38(4), 268–275.
- Meier, C., Ristic, Z., Klauser, S., und Verrey, F.** (2002). Activation of system L heterodimeric amino acid exchangers by intracellular substrates. *The EMBO Journal*, 21(4), 580–589.
- Meyers, R. A. (Hrsg.).** (2004). *Encyclopedia of molecular cell biology and molecular medicine* (2nd ed). Weinheim: Wiley-VCH Verlag.
- Meyuhas, O., und Hornstein, E.** (2000). Translational control of TOP mRNAs. In *Translational Control of Gene Expression* (S. 671–693). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Miodovnik, M., Skillman, C., Holroyde, J. C., Butler, J. B., Wendel, J. S., und Siddiqi, T. A.** (1985). Elevated maternal glycohemoglobin in early pregnancy and spontaneous abortion among insulin-dependent diabetic women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 153(4), 439–442.
- Miyazaki, S., Minamida, R., Furuyama, T., Tashiro, F., Yamato, E., Inagaki, S., und Miyazaki, J.** (2012). Analysis of *Foxo1*-regulated genes using *Foxo1*-deficient pancreatic  $\beta$  cells. *Genes to Cells*, 17(9), 758–767.
- Montagne, J., Stewart, M. J., Stocker, H., Hafen, E., Kozma, S. C., und Thomas, G.** (1999). Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5436), 2126–2129.

- Monteiro**, P. O. A., und Victora, C. G. (2005). Rapid growth in infancy and childhood and obesity in later life--a systematic review. *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 6(2), 143–154.
- Morbeck**, D.E., Krisher, R.L., Herrick, J.R., Baumann, N.A., Matern, D., und Moyer, T. (2014). Composition of commercial media used for human embryo culture. *Journal of Fertility and Sterility*, 102(3), 759-766.
- Mordier**, S., Deval, C., Bechet, D., Tassa, A., und Ferrara, M. (2000). Leucine Limitation Induces Autophagy and Activation of Lysosome-dependent Proteolysis in C2C12 Myotubes through a Mammalian Target of Rapamycin-independent Signaling Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 275(38), 29900–29906.
- Munday**, R. (1988). Dialuric acid autoxidation. Effects of transition metals on the reaction rate and on the generation of „active oxygen“ species. *Biochemical Pharmacology*, 37(3), 409–413.
- Munday**, R., Ludwig, K., und Lenzen, S. (1993). The relationship between the physicochemical properties and the biological effects of alloxan and several N-alkyl substituted alloxan derivatives. *The Journal of Endocrinology*, 139(1), 153–163.
- Naeslund**, G. (1979). The Effect of Glucose-, Arginine- and Leucine-deprivation on Mouse Blastocyst Outgrowth *In Vitro*. *Uppsala Journal of Medical Sciences*, 84(1), 9–20.
- Nandi**, S. S., Duryee, M. J., Shahshahan, H. R., Thiele, G. M., Anderson, D. R., und Mishra, P. K. (2015). Induction of autophagy markers is associated with attenuation of miR-133a in diabetic heart failure patients undergoing mechanical unloading. *American Journal of Translational Research*, 7(4), 683–696.
- Nasr-Esfahani**, M. H., Winston, N. J., und Johnson, M. H. (1992). Effects of glucose, glutamine, ethylenediaminetetraacetic acid and oxygen tension on the concentration of reactive oxygen species and on development of the mouse preimplantation embryo in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 96(1), 219–231.
- Nazio**, F., Strappazon, F., Antonioli, M., Bielli, P., Cianfanelli, V., Bordi, M., *et al.* (2013). mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nature Cell Biology*, 15(4), 406–416.
- Newgard**, C. B., An, J., Bain, J. R., Muehlbauer, M. J., Stevens, R. D., Lien, L. F., *et al.* (2009). A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metabolism*, 9(4), 311–326.
- Norberg**, S., Powell, T. L., und Jansson, T. (1998). Intrauterine growth restriction is associated with a reduced activity of placental taurine transporters. *Pediatric Research*, 44(2), 233–238.
- Obsil**, T., und Obsilova, V. (2008). Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors. *Oncogene*, 27(16), 2263–2275.
- Ong**, K. K., und Loos, R. J. F. (2006). Rapid infancy weight gain and subsequent obesity: systematic reviews and hopeful suggestions. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*, 95(8), 904–908.
- Ozanne**, S. E., und Hales, C. N. (2002). Early programming of glucose-insulin metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 13(9), 368–373.

- Parimi**, P. S., Cripe-Mamie, C., und Kalhan, S. C. (2004). Metabolic Responses to Protein Restriction During Pregnancy in Rat and Translation Initiation Factors in the Mother and Fetus. *Pediatric Research*, 56(3), 423–431.
- Pietiläinen**, K. H., Naukkarinen, J., Rissanen, A., Saharinen, J., Ellonen, P., Keränen, H., *et al.* (2008). Global transcript profiles of fat in monozygotische twins discordant for BMI: pathways behind acquired obesity. *PLoS Medicine*, 5(3), e51.
- Pineda**, M., Fernández, E., Torrents, D., Estévez, R., López, C., Camps, M., *et al.* (1999). Identification of a membrane protein, LAT-2, that Co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(28), 19738–19744.
- Polak**, P., Cybulski, N., Feige, J. N., Auwerx, J., Rüegg, M. A., und Hall, M. N. (2008). Adipose-specific knockout of raptor results in lean mice with enhanced mitochondrial respiration. *Cell Metabolism*, 8(5), 399–410.
- Pollheimer**, J., und Knöfler, M. (2005). Signalling pathways regulating the invasive differentiation of human trophoblasts: a review. *Placenta*, 26 Suppl A, S21–30.
- Pond**, W. G. (1973). Influence of maternal protein and energy nutrition during gestation on progeny performance in swine. *Journal of Animal Science*, 36(1), 175–182.
- Ponugoti**, B., Dong, G., und Graves, D. T. (2012). Role of Forkhead Transcription Factors in Diabetes-Induced Oxidative Stress. *Experimental Diabetes Research*, 2012, 1–7.
- Pópulo**, H., Lopes, J. M., und Soares, P. (2012). The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), 1886–1918.
- Porstmann**, T., Santos, C. R., Griffiths, B., Cully, M., Wu, M., Leever, S., *et al.* (2008). SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metabolism*, 8(3), 224–236.
- Pozefsky**, T., Felig, P., Tobin, J. D., Soeldner, J. S., und Cahill, G. F. (1969). Amino acid balance across tissues of the forearm in postabsorptive man. Effects of insulin at two dose levels. *Journal of Clinical Investigation*, 48(12), 2273–2282.
- Proud**, C. G. (2011). mTOR Signalling in Health and Disease. *Biochemical Society Transactions*, 39(2), 431–436.
- Proud**, C. G. (2013). mTORC1 regulates the efficiency and cellular capacity for protein synthesis. *Biochemical Society Transactions*, 41(4), 923–926.
- Puig**, O. (2003). Control of cell number by Drosophila FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. *Genes und Development*, 17(16), 2006–2020.
- Radimerski**, T., Montagne, J., Rintelen, F., Stocker, H., van der Kaay, J., Downes, C. P., *et al.* (2002). dS6K-regulated cell growth is dPKB/dPI(3)K-independent, but requires dPDK1. *Nature Cell Biology*, 4(3), 251–255.
- Ramin**, N., Thieme, R., Fischer, S., Schindler, M., Schmidt, T., Fischer, B., und Navarrete Santos, A. (2010). Maternal diabetes impairs gastrulation and insulin and IGF-I receptor expression in rabbit blastocysts. *Endocrinology*, 151(9), 4158–4167.
- Rees**, W. D., Hay, S. M., Buchan, V., Antipatis, C., und Palmer, R. M. (1999). The effects of maternal protein restriction on the growth of the rat fetus and its amino acid supply. *The British Journal of Nutrition*, 81(3), 243–250.

- Reglin, F.** (2003). *Bausteine des Lebens Aminosäuren in der orthomolekularen Medizin; mit 25 Tabellen*. Köln: Reglin.
- Richter, J. D., und Sonenberg, N.** (2005). Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature*, 433(7025), 477–480.
- Rodriguez, A., Durán, A., Selloum, M., Champy, M.-F., Diez-Guerra, F. J., Flores, J. M., et al.** (2006). Mature-onset obesity and insulin resistance in mice deficient in the signaling adapter p62. *Cell Metabolism*, 3(3), 211–222.
- Rohde, J., Heitman, J., und Cardenas, M. E.** (2001). The TOR kinases link nutrient sensing to cell growth. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(13), 9583–9586.
- Rojo, F., Najera, L., Lirola, J., Jiménez, J., Guzmán, M., Sabadell, M. D., et al.** (2007). 4E-binding protein 1, a cell signaling hallmark in breast cancer that correlates with pathologic grade and prognosis. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(1), 81–89.
- Roos, S., Jansson, N., Palmberg, I., Säljö, K., Powell, T. L., und Jansson, T.** (2007). Mammalian target of rapamycin in the human placenta regulates leucine transport and is down-regulated in restricted fetal growth. *The Journal of Physiology*, 582(Pt 1), 449–459.
- Roos, S., Powell, T. L., und Jansson, T.** (2009). Placental mTOR links maternal nutrient availability to fetal growth. *Biochemical Society Transactions*, 37(Pt 1), 295–298.
- Rosario, F. J., Jansson, N., Kanai, Y., Prasad, P. D., Powell, T. L., und Jansson, T.** (2011). Maternal protein restriction in the rat inhibits placental insulin, mTOR, and STAT3 signaling and down-regulates placental amino acid transporters. *Endocrinology*, 152(3), 1119–1129.
- Rosenn, B., Miodovnik, M., Combs, C. A., Khoury, J., und Siddiqi, T. A.** (1994). Glycemic thresholds for spontaneous abortion and congenital malformations in insulin-dependent diabetes mellitus. *Obstetrics and Gynecology*, 84(4), 515–520.
- Rovira, J., Marcelo Arellano, E., Burke, J. T., Brault, Y., Moya-Rull, D., Bañón-Maneus, E., et al.** (2008). Effect of mTOR inhibitor on body weight: from an experimental rat model to human transplant patients. *Transplant International*, 21(10), 992–998.
- Saudubray, J. M., Ogier, H., Charpentier, C., Depondt, E., Coudé, F. X., Munnich, A., et al.** (1984). Hudson memorial lecture. Neonatal management of organic acidurias. Clinical update. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 7 Suppl 1, 2–9.
- Schaefer, U. M., Songster, G., Xiang, A., Berkowitz, K., Buchanan, T. A., und Kjos, S. L.** (1997). Congenital malformations in offspring of women with hyperglycemia first detected during pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 177(5), 1165–1171.
- Schindler, M., Pendzialek, M., Navarrete Santos, A., Plösch, T., Seyring, S., Gürke, J., et al.** (2014). Maternal diabetes leads to unphysiological high lipid accumulation in rabbit preimplantation embryos. *Endocrinology*, 155(4), 1498–1509.
- Schuster, R.** (1988). Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 431(2), 271–284.
- Segawa, H., Fukasawa, Y., Miyamoto, K., Takeda, E., Endou, H., und Kanai, Y.** (1999). Identification and functional characterization of a Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(28), 19745–19751.



- Self**, J. T., Spencer, T. E., Johnson, G. A., Hu, J., Bazer, F. W., und Wu, G. (2004). Glutamine synthesis in the developing porcine placenta. *Biology of Reproduction*, *70*(5), 1444–1451.
- Sengupta**, A., Molkenin, J. D., und Yutzey, K. E. (2009). FoxO Transcription Factors Promote Autophagy in Cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(41), 28319–28331.
- Shamji**, A. F., Nghiem, P., und Schreiber, S. L. (2003). Integration of growth factor and nutrient signaling: implications for cancer biology. *Molecular Cell*, *12*(2), 271–280.
- Sharma**, S., Guthrie, P., Chan, S., Haq, S., und Taegtmeyer, H. (2007). Glucose phosphorylation is required for insulin-dependent mTOR signalling in the heart. *Cardiovascular Research*, *76*(1), 71–80.
- Shima**, H., Pende, M., Chen, Y., Fumagalli, S., Thomas, G., und Kozma, S. C. (1998). Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *The EMBO Journal*, *17*(22), 6649–6659.
- Silverman**, B. L., Rizzo, T., Green, O. C., Cho, N. H., Winter, R. J., Ogata, E. S., *et al.* (1991). Long-term prospective evaluation of offspring of diabetic mothers. *Diabetes*, *40 Suppl 2*, 121–125.
- Silverman**, B. L., Metzger, B. E., Cho, N. H., und Loeb, C. A. (1995). Impaired glucose tolerance in adolescent offspring of diabetic mothers. Relationship to fetal hyperinsulinism. *Diabetes Care*, *18*(5), 611–617.
- Silverman**, B. L., Rizzo, T. A., Cho, N. H., und Metzger, B. E. (1998). Long-term effects of the intrauterine environment. The Northwestern University Diabetes in Pregnancy Center. *Diabetes Care*, *21 Suppl 2*, B142–149.
- Sinclair**, K. D., Young, L. E., Wilmut, I., und McEvoy, T. G. (2000). In-utero overgrowth in ruminants following embryo culture: lessons from mice and a warning to men. *Human Reproduction*, *15*(suppl 5), 68–86.
- Stipanuk**, M. H. (2009). Macroautophagy and its role in nutrient homeostasis. *Nutrition Reviews*, *67*(12), 677–689.
- Styrod**, J., Thunberg, L., Nybacka, O., und Eriksson, U. J. (1995). Correlations between maternal metabolism and deranged development in the offspring of normal and diabetic rats. *Pediatric Research*, *37*(3), 343–353.
- Sun**, C., Denisenko, O., Sheth, B., Cox, A., Lucas, E. S., Smyth, N. R., und Fleming, T. P. (2014). Epigenetic regulation of histone modifications and Gata6 gene expression induced by maternal diet in mouse embryoid bodies in a model of developmental programming. *BMC Developmental Biology*, *15*(1), 3.
- Tam**, W. H., Ma, R. C. W., Yang, X., Ko, G. T. C., Tong, P. C. Y., Cockram, C. S., *et al.* (2008). Glucose intolerance and cardiometabolic risk in children exposed to maternal gestational diabetes mellitus in utero. *Pediatrics*, *122*(6), 1229–1234.
- Tanida**, I., Ueno, T., und Kominami, E. (2008). LC3 and Autophagy. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *445*, 77–88.
- Tasaka**, Y., Inoue, Y., Matsumoto, H., und Hirata, Y. (1988). Changes in plasma glucagon, pancreatic polypeptide and insulin during development of alloxan diabetes mellitus in dog. *Endocrinologia Japonica*, *35*(3), 399–404.

- Teodoro**, G. F. R., Vianna, D., Torres-Leal, F. L., Pantaleao, L. C., Matos-Neto, E. M., Donato, J., und Tirapegui, J. (2012). Leucine Is Essential for Attenuating Fetal Growth Restriction Caused by a Protein-Restricted Diet in Rats. *Journal of Nutrition*, 142(5), 924–930.
- Teppala**, S., und Shankar, A. (2010). Association Between Serum IGF-1 and Diabetes Among U.S. Adults. *Diabetes Care*, 33(10), 2257–2259.
- Terrlink**, T., van Leeuwen, P. A., und Houdijk, A. (1994). Plasma amino acids determined by liquid chromatography within 17 minutes. *Clinical Chemistry*, 40(2), 245–249.
- Thieme**, R., Schindler, M., Ramin, N., Fischer, S., Mühleck, B., Fischer, B., und Navarrete Santos, A. (2012). Insulin growth factor adjustment in preimplantation rabbit blastocysts and uterine tissues in response to maternal type 1 diabetes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 358(1), 96–103.
- Tiedge**, M., Lortz, S., Drinkgern, J., und Lenzen, S. (1997). Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes*, 46(11), 1733–1742.
- Um**, S. H., Frigerio, F., Watanabe, M., Picard, F., Joaquin, M., Sticker, M., *et al.* (2004). Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature*, 431(7005), 200–205.
- Van Winkle**, L. J., und Campione, A. L. (1983). Effect of inhibitors of polyamine synthesis on activation of diapausing mouse blastocysts in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 68(2), 437–444.
- Van Winkle**, L. J., und Campione, A. L. (1996). Amino acid transport regulation in preimplantation mouse embryos: Effects on amino acid content and pre- and peri-implantation development. *Theriogenology*, 45(1), 69–80.
- Viebahn**, C., Mayer, B., und Miething, A. (1995a). Morphology of incipient mesoderm formation in the rabbit embryo: a light- and retrospective electron-microscopic study. *Acta Anatomica*, 154(2), 99–110.
- Viebahn**, C., Mayer, B., und Hrabé de Angelis, M. (1995b). Signs of the principle body axes prior to primitive streak formation in the rabbit embryo. *Anatomy and Embryology*, 192(2), 159–169.
- Viebahn**, C. (1999). The anterior margin of the mammalian gastrula: comparative and phylogenetic aspects of its role in axis formation and head induction. *Current Topics in Developmental Biology*, 46, 63–103.
- Vogt**, P.K., Jiang, H., und Aoki, M. (2005). Triple Layer Control: Phosphorylation, Acetylation and Ubiquitination of FOXO Proteins. *Cell Cycle* 4, 908-913.
- Wagenmakers**, A., und Soeters, P. (1995). Metabolism of branched-chain amino acids. In *Amino Acid Metabolism and Therapy in Health and Nutritional Disease* (S. 67–83). ed. New York: CRC press, Inc.
- Wahren**, J., Felig, P., Cerasi, E., und Luft, R. (1972). Splanchnic and peripheral glucose and amino acid metabolism in diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Investigation*, 51(7), 1870–1878.
- Walkinshaw**, S. A. (2001). Type 1 diabetes and pregnancy. *Current Obstetrics and Gynaecology*, 11(6), 321–328.

- Wang**, Z. V., Rothermel, B. A., und Hill, J. A. (2010). Autophagy in hypertensive heart disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(12), 8509–8514.
- Watkins**, A. J., Platt, D., Papenbrock, T., Wilkins, A., Eckert, J. J., Kwong, W. Y., *et al.* (2007). Mouse embryo culture induces changes in postnatal phenotype including raised systolic blood pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(13), 5449–5454.
- Watkins**, A. J., Ursell, E., Panton, R., Papenbrock, T., Hollis, L., Cunningham, C., *et al.* (2008). Adaptive responses by mouse early embryos to maternal diet protect fetal growth but predispose to adult onset disease. *Biology of Reproduction*, 78(2), 299–306.
- Watkins**, A. J., und Fleming, T. P. (2009). Blastocyst environment and its influence on offspring cardiovascular health: the heart of the matter. *Journal of Anatomy*, 215(1), 52–59.
- WHO** Expert Committee on Diabetes Mellitus: second report. (1980). *World Health Organization Technical Report Series*, 646, 1–80.
- Wijekoon**, E. P., Skinner, C., Brosnan, M. E., und Brosnan, J. T. (2004). Amino acid metabolism in the Zucker diabetic fatty rat: effects of insulin resistance and of type 2 diabetes. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 82(7), 506–514.
- Winterbourn**, C. C., Cowden, W. B., und Sutton, H. C. (1989). Auto-oxidation of dialuric acid, divicine and isouramil. Superoxide dependent and independent mechanisms. *Biochemical Pharmacology*, 38(4), 611–618.
- Wolfrum**, C., Asilmaz, E., Luca, E., Friedman, J. M., und Stoffel, M. (2004). Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. *Nature*, 432(7020), 1027–1032.
- Wullschlegel**, S., Loewith, R., und Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124(3), 471–484.
- Yang**, X., Yang, C., Farberman, A., Rideout, T. C., de Lange, C. F. M., France, J., und Fan, M. Z. (2008). The mammalian target of rapamycin-signaling pathway in regulating metabolism and growth. *Journal of Animal Science*, 86(14 Suppl), E36–50.
- Yeagley**, D., Guo, S., Unterman, T., und Quinn, P. G. (2001). Gene- and Activation-specific Mechanisms for Insulin Inhibition of Basal and Glucocorticoid-induced Insulin-like Growth Factor Binding Protein-1 and Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Transcription: ROLES OF FORKHEAD AND INSULIN RESPONSE SEQUENCES. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), 33705–33710.
- Young**, L. E., Sinclair, K. D., und Wilmut, I. (1998). Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Reviews of Reproduction*, 3(3), 155–163.
- Yudkoff**, M. (1997). Brain metabolism of branched-chain amino acids. *Glia*, 21(1), 92–98.
- Yung**, H., Calabrese, S., Hynx, D., Hemmings, B. A., Cetin, I., Charnock-Jones, D. S., und Burton, G. J. (2008). Evidence of Placental Translation Inhibition and Endoplasmic Reticulum Stress in the Etiology of Human Intrauterine Growth Restriction. *The American Journal of Pathology*, 173(2), 451–462.
- Zhang**, X., Yalcin, S., Lee, D.-F., Yeh, T.-Y. J., Lee, S.-M., Su, J., *et al.* (2011). FOXO1 is an essential regulator of pluripotency in human embryonic stem cells. *Nature Cell Biology*, 13(9), 1092–1099.

**Zhang**, Y., Wang, Q., Yang, D., Li, D., Tang, B., Yang, Y., und Ma, S. (2014). Expression of mammalian target of rapamycin in atherosclerotic plaques is decreased under diabetic conditions: A mechanism for rapamycin resistance. *Molecular Medicine Reports*.

**Zhao**, J., Brault, J. J., Schild, A., Cao, P., Sandri, M., Schiaffino, S., *et al.* (2007). FoxO3 Coordinately Activates Protein Degradation by the Autophagic/Lysosomal and Proteasomal Pathways in Atrophiying Muscle Cells. *Cell Metabolism*, 6(6), 472–483.

**Zheng**, C., Huang, C., Cao, Y., Wang, J., und Dong, B. (2009). Branched-chain Amino Acids Reverse the Growth of Intrauterine Growth Retardation Rats in a Malnutrition Model. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 22(11), 1495–1503.

**Zick**, Y. (2005). Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance. *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*, 2005(268), pe4.

**Zoncu**, R., Efeyan, A., und Sabatini, D. M. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 12(1), 21–35.

## 9 Anhang

### 9.1 Berechnung der Molekülzahl zur Herstellung eines Plasmidstandards

**Beispiel:** Berechnung für den Plasmidstandard von *SLC7A8*

Plasmidgröße	3000 Basen
Insertgröße <i>SLC7A8</i>	234 Basen
Gesamtgröße	3234 Basen

Da es sich um einen Doppelstrang handelt, ergeben sich 6468 Basen für das gesamte Plasmid.

Das durchschnittliche Molekulargewicht der vier DNA-Basen beträgt 308,95 g/mol.

Somit ergibt sich ein Molekulargewicht des Plasmids:

$$\text{MW(Plasmid)} = 6468\text{bp} \cdot 308,95 \text{ g/mol} = 1998288,6 \text{ g/mol}$$

Mittels UV-Spektrometrie konnte die DNA-Konzentration der isolierten Plasmidklone identifiziert werden.

Im Beispiel betrug die DNA-Konzentration 0,236 µg/µL.

$$\text{Da } n = \frac{m}{M} \text{ und } c = \frac{m}{V} \text{ gilt: } n = \frac{c \cdot V}{M}$$

$$\text{Daraus folgt pro Mikroliter Plasmid: } n(\text{Plasmid}) = \frac{0,236 \frac{\text{µg}}{\text{µL}} \cdot 1 \text{ µL}}{1998288,6 \cdot 10^6 \frac{\text{µg}}{\text{mol}}} = 1,18101 \cdot 10^{-13} \text{ mol}$$

Aus der Stoffmenge und der Avogadro-Zahl  $N_A$  ergibt sich die Molekülmenge pro Mikroliter:

$$\begin{aligned} N(\text{Plasmid}) &= N_A \cdot n(\text{Plasmid}) = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1} \cdot 1,18101 \cdot 10^{-13} \text{ mol} \\ &= 7,1122 \cdot 10^{10} \text{ Moleküle pro Mikroliter Lösung} \end{aligned}$$

Es wurde eine Verdünnungsreihe von  $10^8$  bis  $10^4$  Moleküle je Mikroliter Lösung hergestellt. Dafür wurde die Stammlösung 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und anschließend 10 µL dieser Verdünnung mit so viel Wasser verdünnt, so dass durchschnittlich  $10^8$  Moleküle pro µL vorhanden waren.

$$100 \text{ µL Plasmid-Stammlösung} + 900 \text{ µL H}_2\text{O} \rightarrow 7,1122 \cdot 10^9 \text{ Moleküle pro µL}$$

$$10 \text{ µL } 7,1122 \cdot 10^9 + 701 \text{ µL H}_2\text{O} \rightarrow 10^8 \text{ Moleküle pro µL}$$

Die fortgesetzte Verdünnungsreihe wurde anschließend so verdünnt, dass je  $1/3 \cdot 10^8$  bis  $1/3 \cdot 10^4$  Moleküle pro µL enthalten waren, da für die RTq-PCR 3 µL Standardlösung eingesetzt wurde.

## 9.2 Berechnung von metabolischer Lebendmasse (LM) und Futtermittelnutzung (Fuve)

Die Körpergewichte und die Futtermittelnutzung in [g] wurde täglich dokumentiert. Für die Analyse der Körpergewichte wurden die Daten ab dem Tag der Verpaarung bis zum 6. Tag der Schwangerschaft einbezogen und ergaben einen Mittelwert. Aus diesen konnten dann die metabolische Lebendmasse und die Futtermittelnutzung berechnet werden.

$$\text{metabol LM [kg]} = (\text{MW Körpergewicht in [g]} * 0,75) / 1000$$

-> Das Körpergewicht wurde mit 0,75 multipliziert, da ca. 75 % der Nahrung verdaulich sind. Der Rest wird unverdaut wieder ausgeschieden.

$$\text{g Fuve/ kg LM} = \text{MW Futtermittelnutzung in [g]} / \text{MW Körpergewicht in [g]} * 1000$$

$$\text{g Fuve/ kg LM 0,75} = \text{MW Futtermittelnutzung in [g]} / \text{metabol. LM kg}$$

### Beispiel Tier 719:

Tab. 19: Dokumentation der Körpergewichte und Futtermittelnutzung des Tiers 719 ab dem Tag der Verpaarung bis zum 6. Tag der Schwangerschaft.

	Tag 1 Verpaarung	Tag 2 <i>p.c.</i>	Tag 3 <i>p.c.</i>	Tag 4 <i>p.c.</i>	Tag 5 <i>p.c.</i>	Tag 6 <i>p.c.</i>	MW in [g]	SEM in [g]
Körpergewicht in [g]	3670	3785	3830	3870	3860	3880	3815,83	32,36
Futtermittelnutzung in [g]	235	255	250	240	240	250	245	3,16

$$\text{metabol LM [kg]} = (3815,83 \text{ g} * 0,75) / 1000 = \underline{2,861875 \text{ kg}}$$

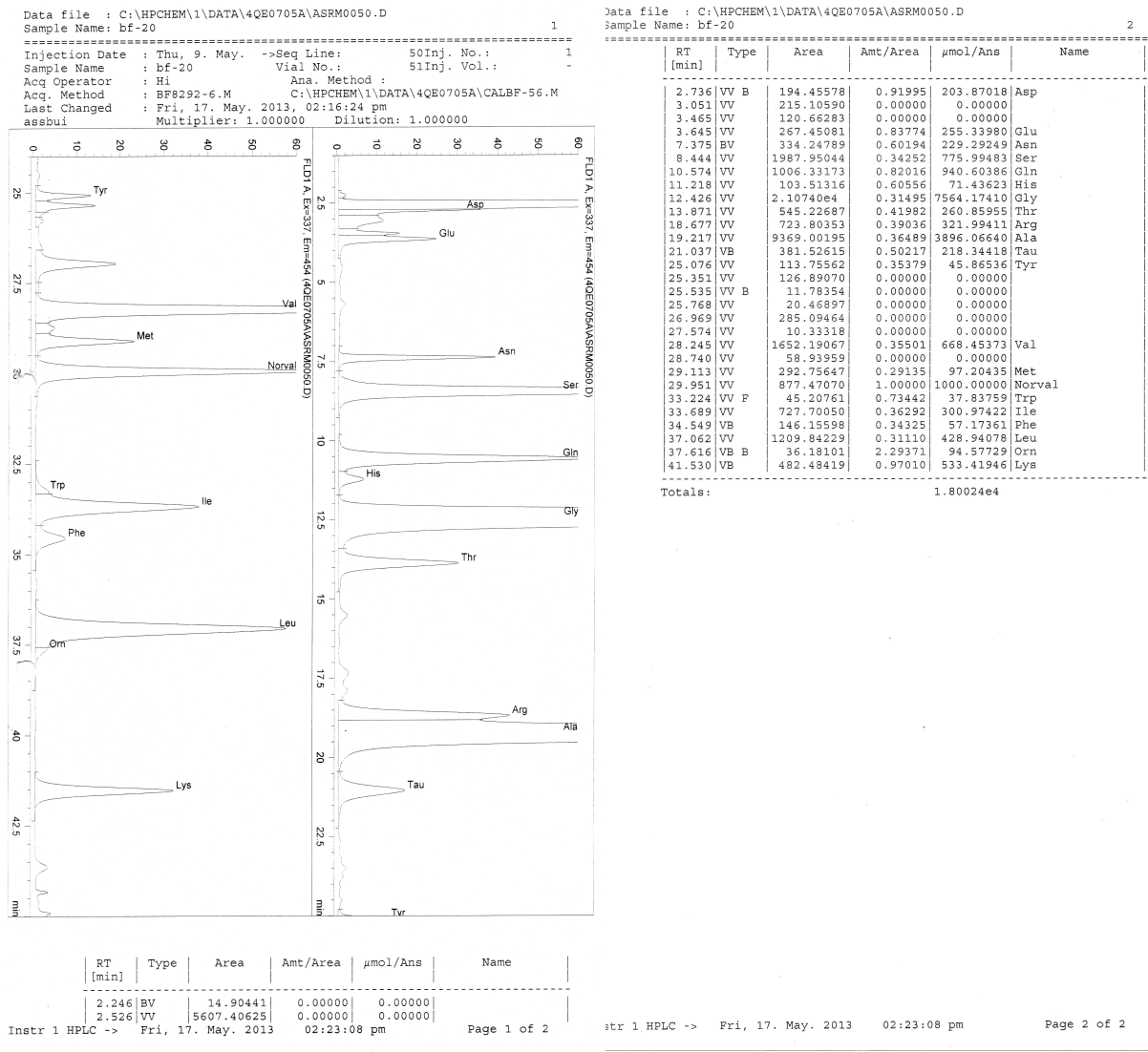
$$\text{g Fuve/ kg LM} = 245 \text{ g} / 3815,83 \text{ g} * 1000 = \underline{64,20615855 \text{ g Fuve/ kg LM}}$$

$$\text{g Fuve/ kg LM 0,75} = 245 \text{ g} / 2861,875 \text{ g} = \underline{85,6082114 \text{ g Fuve/ kg LM 0,75}}$$

Diese Rechnung wurde für insgesamt 15 nicht-diabetische und 22 diabetische Kaninchen durchgeführt. Anschließend wurde ein Mittelwert mit Standardfehler pro Gruppe ermittelt und in Tabelle 4 dargestellt.

### 9.3 Chromatogramm der Aminosäurenbestimmung im Plasma

Die Aminosäurezusammensetzung wurde im Plasma, Uterussektret und in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit nicht-diabetischer und diabetischer Kaninchen mittels HPLC gemessen. Abbildung 49 zeigt ein exemplarisches Chromatogramm der detektierten Aminosäuren im Plasma eines diabetischen Kaninchens und die Konzentrationsausgabe des Computers in  $\mu\text{mol/L}$ .



**Abb. 51: Chromatogramm der Aminosäurezusammensetzung im Plasma eines diabetischen Versuchstieres.** Links: Chromatogramm der Aminosäuren im Plasma; rechts: Konzentrationen der Aminosäuren in  $\mu\text{mol/Ans}$  entspricht  $\mu\text{mol/L}$

## 9.4 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Morphologische Einteilung der Keimscheibendifferenzierung des Kaninchens (aus Viebahn <i>et al.</i> 1995b).	5
Abb. 2:	Abbauweg der verzweigtkettigen, aliphatischen Aminosäuren.	8
Abb. 3:	Schema des BCAA-Transports über LAT2.	9
Abb. 4:	Schema der Aktivierung des mTORC1-Signalweges.	11
Abb. 5:	Schematischer Ablauf der Autophagie.	13
Abb. 6:	Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung im diabetischen Graviditätsmodell.	25
Abb. 7:	Schema der Stimulation von 6 Tage alten Kaninchenblastozysten <i>in vitro</i> mit Insulin.	28
Abb. 8:	Schema der Stimulation von 6 Tage alten Kaninchenblastozysten <i>in vitro</i> mit Glukose und Rapamycin.	29
Abb. 9:	Schema der Stimulation von 6 Tage alten Kaninchenblastozysten <i>in vitro</i> mit L-Leucin.	29
Abb. 10:	Schema der Stimulation von 6 Tage alten Kaninchenblastozysten <i>in vitro</i> mit L-Leucin und Rapamycin.	30
Abb. 11:	Schema der Stimulation von 6 Tage alten Kaninchenblastozysten <i>in vitro</i> mit Rapamycin.	30
Abb. 12:	Schema der Stimulation von 6 Tage alten Kaninchenblastozysten <i>in vitro</i> mit Rapamycin und Ly-294,002.	31
Abb. 13:	Schema der Stimulation von 6 Tage alten Kaninchenblastozysten <i>in vitro</i> mit nicht- diabetischen (BCAA-ND) und diabetischen BCAA-Konzentrationen (BCAA-T1DM).	32
Abb. 14:	Schema der Stimulation von 6 Tage alten Kaninchenblastozysten <i>in vitro</i> mit (+ BCAA) und ohne BCAA (- BCAA).	32
Abb. 15:	Relative Transkriptmengen der BCAA-Abbauenzyme in Leber-, Skelettmuskel- und Fettgewebe diabetischer Kaninchen am Tag 6 <i>p.c.</i>	55
Abb. 16:	Relative Proteinmenge von BCAT2 im Fettgewebe gravider Kaninchen am Tag 6 <i>p.c.</i>	56
Abb. 17:	Relative Transkriptmengen von <i>SLC7A8</i> und <i>SLC7A5</i> im Endometrium diabetischer Kaninchen am Tag 6 <i>p.c.</i>	56
Abb. 18:	Gelelektrophoretische Auftrennung des RT-PCR-Produkts von <i>SLC7A5</i> .	57
Abb. 19:	Transkriptmengen von <i>Bcat2</i> (A), <i>Bckdha</i> (B), <i>Did</i> (C) und <i>Dbt</i> (D) in Blastozysten diabetischer Kaninchen.	58
Abb. 20:	Relative Proteinmengen von BCAT2 in Blastozysten diabetischer Kaninchen.	59



---

Abb. 21:	Quantifizierung der <i>Bcat2</i> -Transkriptmenge in Blastozysten kultiviert ohne oder mit Insulin.	59
Abb. 22:	Quantifizierung der <i>Bcat2</i> -Transkriptmenge in Blastozysten nach der Kultur mit 0, 10 und 25 mM Glukose für 6h.	60
Abb. 23:	Transkriptmengen von <i>SLC7A5</i> und <i>SLC7A8</i> in Blastozysten diabetischer Kaninchen.	61
Abb. 24:	Gelelektrophoretische Auftrennung des RT-PCR-Produkts von <i>mTOR</i> .	61
Abb. 25:	Relative Phosphorylierungsmengen von mTOR, S6K1 und 4E-BP1 Embryoblast- (EB) und Trophoblastzellen (TB).	62
Abb. 26:	Relative Phosphorylierungsmengen von mTOR und S6K1 nach der Kultur mit 10 mM Glukose.	63
Abb. 27:	Relative Phosphorylierungsmengen von mTOR und S6K1 nach der Kultur mit 800 $\mu$ M L-Leucin.	64
Abb. 28:	Relative Phosphorylierung von mTOR, S6K1 und 4E-BP1 in Embryoblast- (EB) und Trophoblastzellen (TB) diabetischer Kaninchen.	66
Abb. 29:	Relative Phosphorylierung von mTOR, S6K1 und 4E-BP1 in Blastozysten diabetischer Kaninchen.	67
Abb. 30:	Immunfluoreszenz (A) und densitometrische Analyse (B) der Proteinsynthese in Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen.	68
Abb. 31:	Transkriptmengen von <i>Beclin 1</i> und <i>LC3</i> in Blastozysten diabetischer Kaninchen.	69
Abb. 32:	Relative Proteinmenge von p62 in Blastozysten diabetischer Kaninchen.	69
Abb. 33:	Immunfluoreszenz der Lysosomenfärbung in Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen.	70
Abb. 34:	Lysosomenanzahl (A) und Vesikelvolumen (B) von Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen.	70
Abb. 35:	Relative Phosphorylierung von FoxO1 in Embryoblast- (EB) und Trophoblastzellen (TB).	71
Abb. 36:	Relative Phosphorylierung von FoxO1 nach der Kultur mit 0 mM und 10 mM Glukose.	72
Abb. 37:	Relative Phosphorylierung von FoxO1 nach der Kultur mit 800 $\mu$ M L-Leucin.	73
Abb. 38:	Relative Phosphorylierung von FoxO1 nach der Kultur mit 125 nM Rapamycin.	73
Abb. 39:	Relative Phosphorylierung von FoxO1 nach der Kultur mit L-Leucin und Rapamycin oder Ly294.002.	74
Abb. 40:	Nachweis von FoxO1-Protein und -Phosphorylierung in Embryoblast- (EB) und Trophoblastzellen (TB) diabetischer Kaninchen.	75
Abb. 41:	Relative Phosphorylierung von FoxO1 in Blastozysten diabetischer Kaninchen.	75

Abb. 42:	Nachweis von FoxO1-Protein in der Kernproteinfraktion von Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen	76
Abb. 43:	Relative Phosphorylierung von mTOR, S6K1, 4E-BP1 und FoxO1 in Blastozysten kultiviert mit nicht-diabetischen und diabetischen BCAA für 6h <i>in vitro</i> .	78
Abb. 44:	Relative Phosphorylierung von mTOR, S6K1, 4E-BP1 und FoxO1 in Blastozysten kultiviert mit (+) oder ohne (-) BCAA für 6h <i>in vitro</i> .	81
Abb. 45:	Immunfluoreszenz (A) und densitometrische Analyse (B) der Proteinsynthese in Trophoblastzellen von Blastozysten kultiviert mit (+) oder ohne (-) BCAA für 6h <i>in vitro</i> .	83
Abb. 46:	Immunfluoreszenz der Lysosomenfärbung in Trophoblastzellen von Blastozysten kultiviert mit (+) oder ohne (-) BCAA für 6h <i>in vitro</i> .	83
Abb. 47:	Lysosomenanzahl (A) und Vesikelvolumen (B) in Trophoblastzellen von Blastozysten kultiviert mit (+) oder ohne (-) BCAA für 6h <i>in vitro</i> .	84
Abb. 48:	Relative Proteinmenge von p62 in Trophoblastzellen von Blastozysten kultiviert mit (+) oder ohne (-) BCAA für 6h <i>in vitro</i> .	84
Abb. 49:	Schema des BCAA-Metabolismus in maternalen Geweben und in Präimplantationsembryonen während einer diabetischen Schwangerschaft.	88
Abb. 50:	Schematische Darstellung des mTORC1-FoxO1-Signalweges in Präimplantationsembryonen diabetischer Kaninchen am Tag 6 <i>p.c.</i>	93
Abb. 51:	Chromatogramm der Aminosäurezusammensetzung im Plasma eines diabetischen Versuchstieres.	VII

## 9.5 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Die Fehlregulation des mTORC1-Signalweges in Geweben/Organen ist mit Erkrankungen assoziiert.	14
Tab. 2:	Oligonukleotide für PCR, RTq-PCR und Sequenzierung.	20
Tab. 3:	Verwendete Primärantikörper mit zugehörigen Sekundärantikörpern zur Western-Blot-Analyse.	46
Tab. 4:	Körpergewicht, Futteraufnahme, metabolische Lebendmasse (LM) und Futtermittelverwertung (Fuve) von nicht-diabetischen (ND) und diabetischen (T1DM) Kaninchen.	51
Tab. 5:	Konzentrationen freier Aminosäuren im Plasma nicht-diabetischer (ND) und diabetischer (T1DM) Kaninchen am 6. Tag <i>p.c.</i>	52
Tab. 6:	Konzentrationen freier Aminosäuren im Uterussekret nicht-diabetischer (ND) und diabetischer (T1DM) Kaninchen am Tag 6 <i>p.c.</i>	53
Tab. 7:	Konzentrationen freier Aminosäuren in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit (BF) von Blastozysten des Gastrulationsstadium 1 und 2 nicht-diabetischen (ND) und diabetischen (T1DM) Kaninchen.	54
Tab. 8:	Transkriptmengen von <i>Bcat2</i> , <i>Bckdha</i> , <i>Did</i> , <i>Dbt</i> , <i>SLC7A8</i> und <i>SLC7A5</i> in Blastozysten des Kaninchens.	57

---

Tab. 9:	Relative Transkriptmengen von <i>CCND1</i> , <i>eIF4E</i> , <i>ODC1</i> , <i>PCNA</i> und <i>SLC7A8</i> in L-Leucin-stimulierten Blastozysten für 2 bzw. 4 Stunden.	65
Tab. 10:	Relative Proteinmengen von mTOR, S6K1 und 4E-BP1 in Blastozysten diabetischer Kaninchen.	66
Tab. 11:	Relative Transkriptmengen von <i>CCND1</i> , <i>eIF4E</i> , <i>PCNA</i> , <i>ODC1</i> und <i>SLC7A8</i> in Blastozysten diabetischer Kaninchen.	67
Tab. 12:	Relative Transkriptmengen von <i>LC3</i> , <i>PEPCK</i> und <i>HK2</i> in Blastozysten diabetischer Kaninchen.	76
Tab. 13:	Relative Proteinmengen von mTOR, S6K1, 4E-BP1 und FoxO1 in Blastozysten kultiviert mit nicht-diabetischen (BCAA-ND) oder diabetischen (BCAA-T1DM) Konzentration an BCAA für 6h <i>in vitro</i> .	77
Tab. 14:	Relative Transkriptmenge von <i>CCND1</i> , <i>eIF4E</i> und <i>SLC7A8</i> in Blastozysten kultiviert mit nicht-diabetischen und diabetischen Konzentration an BCAA für 6h <i>in vitro</i> .	78
Tab. 15:	Vergleich der Aminosäurenkonzentration in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit von Blastozysten kultiviert mit (+) oder ohne (-) BCAA für 6h <i>in vitro</i> .	79
Tab. 16:	Vergleich der Gastrulationsstadien vor (VK) und nach (NK) der Kultur von Blastozysten mit (+) oder ohne (-) BCAA für 6h <i>in vitro</i> .	80
Tab. 17:	Relative Proteinmengen von mTOR, S6K1, 4E-BP1 und FoxO1 in Blastozysten kultiviert mit (+) oder ohne (-) BCAA für 6h <i>in vitro</i> .	81
Tab. 18:	Relative Transkriptmenge von <i>Beclin</i> , <i>CCND1</i> , <i>eIF4E</i> , <i>HK2</i> , <i>LC3</i> , <i>ODC1</i> , <i>SLC7A8</i> und <i>SLC7A5</i> in Blastozysten kultiviert mit (+) oder ohne (-) BCAA für 6h <i>in vitro</i> .	82
Tab. 19:	Dokumentation der Körpergewichte und Futteraufnahme des Tiers 719 ab dem Tag der Verpaarung bis zum 6. Tag der Schwangerschaft.	VI

## 9.6 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
<i>ad libitum</i>	lat.: nach Belieben
Ak	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APS	Ammoniumpersulfat
ART	assistierte Reproduktionstechnik
ATP	Adenosintriphosphat
BCAA	<i>Branched-chain amino acid</i>
BCAA-ND	BCAA-Konzentrationen von nicht-diabetischen Tieren
BCAA-T1DM	BCAA-Konzentrationen von diabetischen Tieren
BCAT2	verzweigt-kettige L-Aminosäuren-Aminotransferase
BCKDHK	verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplex
<i>Bckdk</i>	verzweigt-kettige 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Kinase
BF	Blastozystenhöhlenflüssigkeit
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BSM II	Basales synthetisches Medium II
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
C	Cytosin
ca.	circa
<i>CCND1</i>	Cyclin D1
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFI	<i>Core Facility Imaging</i>
C <sub>T</sub>	<i>Cycle threshold</i>
d	Tag
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidintetrahydrochlorid
<i>Dbt</i>	Dihydrolipoyl-Transacylase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
<i>Dld</i>	Dihydrolipoyl-Dehydrogenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>dpc</i>	<i>days post coitum</i>
DTT	Dithiothreitol
EB	Embryoblast
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>eIF4E</i>	eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 4E
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat.: und andere)

FKS	fötales Kälberserum
FoxO1	Forkhead-Box-Protein O 1
Fuve	Futtermittelverwertung
<i>fw</i>	<i>forward</i>
G	Guanin
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT	Glukosetransporter
GSH	Glutathion
GTC	Guanidiniumthiocyanat
h	Stunde
hCG	humanes Choriongonadotropin
HCl	Salzsäure
hCG	Humanes Choriongonadotropin
HPG	Homopropargylglycin
<i>HK2</i>	Hexokinase 2
HPLC	Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigchromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase
i.d.R.	in der Regel
I.E.	Insulineinheiten
IF	Immunfluoreszenz
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IgG	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
i.m.	intramuskulär
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IRS-1	Insulinrezeptorsubstrat 1
IUGR	intrauterine Wachstumsretardierung
i.v.	intravenös
IVF	<i>in vitro</i> Fertilisation
k (als PÄfix)	kilo
KM	Kulturmedium
L	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
LC3	<i>Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3</i>
LGA	<i>large for gestational age</i>
LM	Lebendmasse
M	Molar
m (als Präfix)	milli
MEM	<i>Minimal Eagle Medium</i>
min	Minute
mLST8	G-Protein-beta-Untereinheit-ähnliches Protein
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MSUD	<i>Maple syrup urine disease</i>
mTORC1	<i>mammalian target of rapamycin complex 1</i>
Mw	Mittelwert
n	Anzahl der Versuchsgruppen
N	Anzahl der unabhängigen Versuche

n.d.	nicht detektierbar
ND	nicht-diabetisch
nm	Nanometer
NK	nach der Kultur
OD	Optische Dichte
<i>ODC1</i>	Ornithindecaboxylase 1
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffer solution</i> = Phosphat-gepufferte Salzlösung
<i>p.c.</i>	<i>post coitum</i> (lat.: nach Begattung)
<i>PCNA</i>	<i>Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>PEPCK</i>	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PFA	Paraformaldehyd
PIKK	Phosphatidylinositol-3-kinase-ähnliche Kinase
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PGE	posteriore Gastrulaextension
PMSG	<i>Pregnant Mare Serum Gonadotropin</i>
PPAR <sub>γ</sub>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PVA	Polyvinylalkohol
p62	Nucleoporin p62
rab	Kaninchen ( <i>rabbit</i> )
<i>rev</i>	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffverbindungen
<i>rpm</i>	Umdrehungen pro Minute
RSB	<i>Reducing Sample Buffer</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RTq-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
s.c.	subkutan
<i>SLC7A5</i>	<i>Solute Carrier Family 7 Member 5</i>
<i>SLC7A8</i>	<i>Solute Carrier Family 7 Member 8</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat
SEM	Standardfehler
Ser	Serin
SKM	Standardkulturmedium
S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklus
SREBP1	<i>Sterol regulatory element-binding transcription factor 1</i>
S6K1	ribosomale S6 Kinase 1
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Azetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TB	Trophoblast
TBS	TRIS-gepufferte Kochsalzlösung

---

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Thr	Threonin
T <sub>m</sub>	Annealingtemperatur
TOR	<i>target of rapamycin</i>
TRIS	Tris[hydroxymethyl]-aminomethan
T1DM	Typ 1 Diabetes mellitus
U	Enzymeinheit
u.a.	unter anderem
ULK	<i>Unc-51 Like autophagy Activating Kinase</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
VK	Vorkultur
VRB	vorderer Randbogen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid
z.B.	zum Beispiel
ZMG	Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung
ü.N.	über Nacht
α	Alpha
α-KIC	alpha-Ketoisocaproat
β	Beta
μ	Mikro
°C	Grad Celsius

---

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Gürke

Akademischer Grad: Diplom-Biologin

Vorname: Jacqueline

Geburtsdatum: 23.08.1986

Geburtsort: Ludwigsfelde

Geschlecht: weiblich

Adresse: Burgstraße 14

06114 Halle (Saale)

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

---

### beruflicher Werdegang

seit Juli 2017	Mutterschutz
April 2016 - Juni 2017	Lehrkraft an WBS Training Schulen gGmbH Halle (Saale) im Fach Ökologie und Gesundheit für Erzieher
Sept 2014 - Juni 2015	Mutterschutz / Elternzeit
Dez 2011 - Mär 2016	wissenschaftliche Mitarbeiterin/ Promotion am Institut für Anatomie und Zellbiologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2006 - 2011	Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg - Abschluss Diplom-Biologin
2008 - 2009	Sachkundenachweis nach § 4 des Tierschutzgesetzes
1999 - 2006	Abitur am Martin-Luther-Gymnasium Lutherstadt Eisleben

### begleitende Nebentätigkeiten

Nov 2013 - Febr 2014	wissenschaftliche Hilfskraft im Mikroskopierkurs für Ernährungswissenschaftler und Naturwissenschaftler
Nov 2012 - Febr 2013	wissenschaftliche Hilfskraft im Mikroskopierkurs für Ernährungswissenschaftler und Naturwissenschaftler



---

**Weiterbildungen im Ausland**

- Mai 2014 "Short term scientific mission" vom 05. bis 23. Mai 2014 in Southampton, United Kingdom  
- Analyse der Proteinsynthese in Kaninchenembryonen mittels konfokaler Mikroskopie und Quantifizierung mit der Software Volocity-3D
- Okt 2012 "Training school on Rabbit and Pig genome analysis" vom 22. bis 26. Oktober 2012 in Norwich, United Kingdom  
- Analyse von Daten aus Transkriptomuntersuchungen und Next Generation Sequencing (NGS)

**Engagement**

Teilnehmerin des Promotionskollegs Medizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Halle (Salle), den

.....  
Jacqueline Gürke

---

## 11 Publikationsverzeichnis

### Veröffentlichungen:

Schindler M, Pendzialek SM, Grybel K, Seeling T, **Gürke** J, Fischer B and Navarrete Santos A (2017) Adiponectin stimulates lipid metabolism via AMPK in rabbit blastocysts. Human Reproduction. doi: 10.1093/humrep/dex087.

Pendzialek SM, Schindler M, Plösch T, **Gürke** J, Haucke E, Hecht S, Fischer B, Navarrete Santos A. (2016) Cholesterol metabolism in rabbit blastocysts under maternal diabetes. Reproduction, Fertility and Development. doi: 10.1071/RD15542.

**Gürke** J, Schindler M, Pendzialek SM, Thieme R, Grybel KJ, Heller R, Spengler K, Fleming TP, Fischer B, Navarrete Santos A (2016) Maternal diabetes promotes mTORC1 downstream signalling in rabbit preimplantation embryos. Reproduction. 151(5):465-76. doi: 10.1530/REP-15-0523.

**Gürke** J, Hirche F, Thieme R, Haucke E, Schindler M, Stangl GI, Fischer B, Navarrete Santos A (2015) Maternal Diabetes Leads to Adaptation in Embryonic Amino Acid Metabolism during Early Pregnancy. PLoS One. doi: 10(5):e0127465.

Schindler M, Pendzialek M, Navarrete Santos AI, Plösch T, Seyring S, **Gürke** J, Haucke E, Knelangen JM, Fischer B and Navarrete Santos A (2014) Maternal diabetes leads to unphysiological high lipid accumulation in rabbit preimplantation embryos. Endocrinology. 155:1498-1509.

Haucke E, Navarrete Santos AI, Simm A, Henning C, Glomb M, **Guerke** J, Schindler M, Fischer B, Navarrete Santos An (2014) Accumulation of advanced glycation end products in the rabbit blastocyst under maternal diabetes. Reproduction. 148:169-178.

### Vorträge:

**Gürke** J, Hirche F, Thieme R, Haucke E, Schindler M, Fischer B, Navarrete Santos A (2013) Anpassung des Aminosäurestoffwechsels in der diabetischen Frühschwangerschaft. 13. Treffen des Arbeitskreises Molekularbiologie der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin (DGGEF) und der Deutschen Gesellschaft für Reproduktionsmedizin (DGRM) 15. - 16. November 2013, Düsseldorf

**Gürke** J, Thieme R, Schindler M, Fischer S, Hirche F, Fischer B, Navarrete Santos (2012) Altered amino acid metabolism in preimplantation embryos from diabetic rabbits. 45. Jahrestagung Physiologie u. Pathologie der Fortpflanzung, gleichzeitig 37. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, 29.02. - 02.03 2012, Berlin, DOI: 10.1111/j.1439-0531

### Posterpräsentationen:

**Gürke** J, Hirche F, Pendzialek SM, Schindler M, Grybel K, Fischer B and Navarrete Santos A (2015) Embryonic amino acid metabolism and signalling adapt to a diabetic environment. 3. Kongress für Doktorandinnen und Doktoranden am 20./21.November 2015, Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)

**Gürke** J, Hirche F, Haucke E, Schindler M, Fischer B, Navarrete Santos A (2014) The embryonic amino acid metabolism adapts to a diabetic environment. Power of Programming 2014 - Developmental Origins of Adiposity and Long-term Health 13. - 15. März 2014, München

**Gürke** J, Hirche F, Haucke E, Schindler M, Fischer B, Navarrete Santos A (2013) Adaptation of embryonic amino acid metabolism to a diabetic environment. Stress and Ageing: from Molecular Biology to Clinical Perspectives - 10 years ageing meeting in Halle 06. - 08. September 2013, Halle (Saale)

**Gürke** J, Haucke E, Schindler M, Fischer B, Navarrete Santos A (2013) mTOR signalling is altered by maternal diabetes in rabbit preimplantation embryos. SRF Annual Conference 11. - 13. Juli 2013 Fitzwilliam College, Cambridge

**Gürke**, J, E. Haucke, M. Schindler, B. Fischer, and A. Navarrete Santos (2013) Altered mTOR signalling pathway in preimplantation embryos from diabetic rabbits. COST Action FA1201 EPICONCEPT: 1st General Conference "Epigenetics and Periconception Environment" 24. - 25. April 2013, Antalya, Türkei

**Gürke** J, Haucke E, Thieme R, Hirche F, Schindler M, Fischer B, Navarrete Santos (2013) Altered protein and amino acid metabolism in preimplantation embryos from diabetic rabbits. 39th Annual Conference of the IETS 19. - 22. Januar 2013, Hannover, doi: 10.1071/RDv25n1Ab95

**Gürke** J, Thieme R, Schindler M, Fischer S, Hirche F, Fischer B, Navarrete Santos (2012) Ein maternaler Diabetes mellitus in der Präimplantationsphase beeinflusst den Aminosäurestoffwechsel des Embryos. 47<sup>th</sup> Annual meeting of the German Diabetes Society (DDG), 16. - 19. Mai 2012, Stuttgart, Germany, DOI: 10.1055/s-0032-1314532

---

## **12 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe und die Arbeit weder in gleicher noch ähnlicher Form einer anderen Prüfungskommission zur Begutachtung vorgelegt habe. Diese wissenschaftliche Arbeit habe ich selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst. Alle wörtlich und inhaltlich entnommenen Angaben wurden als solche kenntlich gemacht.

Halle (Saale), den

.....  
Jacqueline Gürke

---

## 13 Erklärung über Vorstrafen

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Naturwissenschaftliche Fakultät I - Biowissenschaften -

### Erklärung über bestehende Vorstrafen und anhängige Ermittlungsverfahren

Hiermit bestätige ich	Jacqueline Gürke
geboren am	23.08.1986
Geburtsort	Ludwigsfelde
Staatsangehörigkeit	deutsch
Anschrift	Burgstraße 14 06114 Halle (Saale)

dass gegen meine Person keine bestehenden Vorstrafen und anhängige Ermittlungsverfahren laufen.

Unterschrift: .....

Datum: .....

---

## 14 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die beim Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Ich bedanke mich herzlichst bei Herrn **Professor Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer** für die Möglichkeit meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe im Institut für Anatomie und Zellbiologie anfertigen zu können und für die Bereitstellung des interessanten Themas. Durch produktive Kritik hat er mich zur selbstständigen Arbeit und zum Hinterfragen verschiedenster Dinge angeregt. Für die stetige Unterstützung bei der Realisierung von Kongressteilnahmen und einem Aufenthalt im Ausland danke ich besonders.

Herrn **Professor Dr. R. Gary Sawers** danke ich für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit außerhalb des biologischen Fachbereichs anfertigen zu können. Durch die Übernahme des 1. Gutachtens ermöglichte er mir überhaupt erst die Dissertation im Institut für Anatomie und Zellbiologie.

Einen besonderen Dank möchte ich Frau **PD Dr. rer. nat. Anne Navarrete Santos** aussprechen. Sie begleitete mich mit immerwährender Diskussionsfreunde und wertvollen Anregungen durch diese Arbeit. Mit kompetenter Betreuung stand sie mir stets hilfsbereit zur Seite, Ihre Tür stand für Fragen jederzeit offen.

Weiterhin möchte ich mich bei der gesamten **Arbeitsgruppe Fischer** für die Freundlichkeit, Hilfsbereitschaft und familiäre Arbeitsatmosphäre bedanken. Ein besonderer Dank gilt dem gesamten Kaninchenteam für viele hilfreiche Tipps und das stete Interesse an meiner Arbeit. Ein großer Dank gilt dabei **Sabine Schrötter** und **Michaela Kirstein**, die mich in Laborarbeiten unterstützt haben und mit denen ich lustige Stunden im Labor verbrachte.

Danken möchte ich ebenfalls meiner Familie und meinen Freunden, die mich während meiner Doktorarbeit begleitet und mit motivierenden Worten unterstützt haben.

Ein ganz besonderen Dank gilt meinem Mann **Mathias** und unserer Tochter **Johanna Matilda**, die mir sehr viel Kraft und Durchhaltevermögen geschenkt haben. Danke!

Die vorliegende Arbeit wurde durch das **EU-Projekt Epihealth** ermöglicht und finanzielle unterstützt.