

**Expression spezifischer microRNAs während der  
Implantation und Auswirkung eines maternalen  
Diabetes mellitus auf die microRNA-Prozessierung  
beim Kaninchen**

Dissertation

zur Erlangung des

Doktorgrades der Ernährungswissenschaften (Dr. troph.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät III  
Agrar- und Ernährungswissenschaften,  
Geowissenschaften und Informatik

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt

von Frau M.Sc. Sophia Mareike Pendzialek  
geboren am 15.04.1985 in Leipzig

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer  
Prof. Dr. Gabriele Stangl  
PD Dr. Jennifer Schön

Datum der Verteidigung: 08. Juli 2019

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	DIABETES MELLITUS .....	1
1.1.1	<i>Diabetes mellitus während der Schwangerschaft</i> .....	2
1.1.2	<i>Experimentell induzierter Typ 1 Diabetes mellitus beim Kaninchen</i> .....	3
1.2	PRÄIMPLANTATIONSENTWICKLUNG DES KANINCHENS .....	3
1.3	PLAZENTAENTWICKLUNG DES KANINCHENS .....	5
1.4	MICRORNAS .....	7
1.4.1	<i>Biogenese von microRNAs</i> .....	7
1.4.2	<i>Posttranskriptionale Regulation von mRNAs</i> .....	12
1.4.3	<i>Die Bedeutung von microRNAs während der Embryonal- und Fetalentwicklung</i> .....	13
1.4.4	<i>Plazentare microRNAs</i> .....	15
1.4.5	<i>microRNAs als Biomarker</i> .....	16
1.4.6	<i>Spezifische microRNAs und deren Zielgene</i> .....	17
1.5	ZIELSTELLUNG DER ARBEIT .....	21
<b>2</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>23</b>
2.1	VERSUCHSTIERE UND VERSUCHSTIERHALTUNG .....	23
2.2	EXPERIMENTELL INDUZIERTER DIABETES MELLITUS TYP 1 .....	23
2.3	VERPAARUNG.....	23
2.4	GEWINNUNG VON EMBRYONEN, BLASTOZYSTENHÖHLENFLÜSSIGKEIT, PLAZENTA, ENDOMETRIUM UND BLUTPLASMA.....	24
2.4.1	<i>Gewinnung von Präimplantationsembryonen</i> .....	24
2.4.2	<i>Gewinnung von Blastozystenhöhlenflüssigkeit</i> .....	25
2.4.3	<i>Gewinnung von implantierten Embryonen und Plazenten</i> .....	25
2.4.4	<i>Gewinnung von Endometrium</i> .....	25
2.4.5	<i>Gewinnung von Blutplasma</i> .....	26
2.5	IN VITRO-KULTUR MIT TAG 6 P.C. BLASTOZYSTEN .....	26
2.6	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	27
2.6.1	<i>RNA-Isolation</i> .....	27
2.6.2	<i>mRNA-Isolation aus Kaninchenblastozysten</i> .....	28
2.6.3	<i>microRNA-Isolation aus Kaninchenblastozysten, Blastozystenhöhlenflüssigkeit, Plazenta, Endometrium und Blutplasma</i> .....	29
2.6.4	<i>RNA- und DNA-Quantifizierung</i> .....	29
2.6.5	<i>Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA und DNA</i> .....	30
2.6.6	<i>DNase-Verdau</i> .....	30
2.6.7	<i>Reverse Transkriptase-Reaktion</i> .....	31
2.6.8	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i> .....	34
2.6.9	<i>Klonierung von PCR-Fragmenten</i> .....	37
2.7	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	40
2.7.1	<i>Proteinisolation aus Geweben und Kaninchenblastozysten</i> .....	40
2.7.2	<i>Proteinquantifizierung</i> .....	41
2.7.3	<i>Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgel-elektrophorese (SDS- PAGE)</i> .....	41
2.7.4	<i>Western Blot</i> .....	43
2.7.5	<i>Hybridisierung mit verschiedenen Antikörpern</i> .....	43
2.7.6	<i>Proteindetektion und Auswertung</i> .....	44
2.8	MICRORNA ZIELGEN-VORHERSAGE .....	45
2.9	MICRORNA-SEQUENZANALYSE .....	45
2.10	STATISTISCHE ANALYSEN .....	45

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>47</b>
3.1	SEQUENZANALYSE VON REIFEN MICRORNAs UND DEREN MUTMÄBLICHE SEKUNDÄRSTRUKTUR IN KANINCHENBLASTOZYSTEN .....	47
3.2	EXPRESSION SPEZIFISCHER MICRORNAs, MICRORNA-PROZESSIERENDER ENZYME UND VON MICRORNA-ZIELGENEN IM MÜTTERLICHEN GEWEBE DIABETISCHER KANINCHEN .....	47
3.2.1	<i>Expression spezifischer microRNAs im Blutplasma diabetischer Kaninchen .....</i>	<i>47</i>
3.2.2	<i>Expression spezifischer microRNAs im Endometrium diabetischer Kaninchen ..</i>	<i>49</i>
3.2.3	<i>Expression von Drosha und Dicer im Endometrium diabetischer Kaninchen .....</i>	<i>50</i>
3.2.4	<i>Expression von miR-222-Zielgenen im Endometrium diabetischer Kaninchen ..</i>	<i>50</i>
3.3	CHARAKTERISIERUNG DER EXPRESSION SPEZIFISCHER MICRORNAs, MICRORNA-PROZESSIERENDER PROTEINE UND VON ZIELGENEN IN BLASTOZYSTEN DIABETISCHER KANINCHEN .....	51
3.3.1	<i>Expression spezifischer microRNAs im Embryoblasten und Trophoblasten diabetischer Kaninchen.....</i>	<i>51</i>
3.3.2	<i>Nachweis und Quantifizierung spezifischer microRNAs in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit.....</i>	<i>53</i>
3.3.3	<i>Expression von Genen der microRNA-Biogenese in Kaninchenembryonen.....</i>	<i>54</i>
3.3.4	<i>Expression spezifischer microRNA-Zielgene im Embryoblasten und Trophoblasten diabetischer Kaninchen .....</i>	<i>56</i>
3.4	EXPRESSION SPEZIFISCHER MICRORNAs UND MICRORNA-PROZESSIERENDER PROTEINE IN DER PLAZENTA VON KANINCHEN .....	58
3.4.1	<i>Charakterisierung des microRNA-Expressionsprofils in Trophoblast-zellen und Plazenten gesunder Häsinnen am Tag 6 bis Tag 14 p.c.....</i>	<i>58</i>
3.4.2	<i>Expression spezifischer microRNAs in Plazenten diabetischer Kaninchen am Tag 12 p.c. ....</i>	<i>59</i>
3.4.3	<i>Expression von Genen der microRNA-Biogenese in Plazenten diabetischer Kaninchen am Tag 12 p.c.....</i>	<i>60</i>
3.5	UNTERSUCHUNG DER REGULATION SPEZIFISCHER MICRORNAs DURCH GLUKOSE UND HORMONE IN KANINCHENBLASTOZYSTEN .....	62
3.5.1	<i>Einfluss von Insulin auf die Expression spezifischer microRNAs in Blastozysten diabetischer Häsinnen.....</i>	<i>62</i>
3.5.2	<i>Einfluss von Glukose auf die Expression spezifischer microRNAs in Kaninchenblastozysten .....</i>	<i>63</i>
3.5.3	<i>Einfluss von IGF2 auf die Expression spezifischer microRNAs in Kaninchenblastozysten .....</i>	<i>64</i>
3.5.4	<i>Einfluss von LIF auf die Expression spezifischer microRNAs in Kaninchenblastozysten .....</i>	<i>65</i>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>67</b>
4.1	SEQUENZHOMOLOGIE VON MICRORNAs UNTERSCHIEDLICHER SPEZIES.....	67
4.2	MICRORNAs IM PLASMA UND IM ENDOMETRIUM – IHR POTENTIAL ALS BIOMARKER .....	69
4.2.1	<i>Einfluss der Gravidität und eines Diabetes mellitus auf die microRNA-Expression im Blutplasma .....</i>	<i>69</i>
4.2.2	<i>Einfluss eines experimentell erzeugten Diabetes mellitus Typ 1 auf die microRNA-Expression im Endometrium.....</i>	<i>72</i>
4.3	MICRORNA-EXPRESSION IN BLASTOZYSTEN – MÖGLICHE REGULATOREN DER METABOLISCHEN ADAPTATION?.....	74
4.3.1	<i>Einfluss eines experimentell erzeugten Diabetes mellitus Typ 1 auf die microRNA-Expression in Präimplantationsembryonen.....</i>	<i>75</i>
4.3.2	<i>MicroRNAs in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit – Vermittler zwischen Embryoblast und Trophoblast?.....</i>	<i>81</i>
4.4	EMBRYONALE MICRORNA-BIOGENESE IN DER DIABETISCHEN FRÜHSCHWANGERSCHAFT	82

4.5	DIE MEISTEN MICRORNA-ZIELGENE SIND TROTZ VERÄNDERTER MICRORNA-EXPRESSION TRANSKRPTIONAL UNVERÄNDERT – MICRORNAs ALS REGULATOREN DER TRANSLATION	86
4.6	EIN MATERNALER DIABETES MELLITUS TYP 1 BEEINFLUSST DIE EXPRESSION MICRORNA- PROZESSIERENDER ENZYME IN DER PLAZENTA .....	88
4.7	EINFLUSSFAKTOREN AUF DIE EMBRYONALE MICRORNA-EXPRESSION .....	89
4.8	AUSBlick .....	93
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>98</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>100</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>I</b>
8.1	MICRORNA-NOMENKLATUR.....	I
8.2	SEQUENZ, LOKALISATION UND HOMOLOGIE VON MICRORNAs.....	II
8.2.1	<i>Sekundärstrukturen der kaninchenspezifischen pre-microRNAs.....</i>	<i>III</i>
8.3	MATERIALIEN, GERÄTE, GEBRAUCHSWAREN UND SOFTWARE .....	V
8.3.1	<i>Chemikalien.....</i>	<i>V</i>
8.3.2	<i>Enzyme.....</i>	<i>VII</i>
8.3.3	<i>Vorgefertigte Systeme (Kits).....</i>	<i>VII</i>
8.3.4	<i>Oligonukleotide.....</i>	<i>VII</i>
8.3.5	<i>Antikörper.....</i>	<i>X</i>
8.3.6	<i>Bakterienstamm .....</i>	<i>XI</i>
8.3.7	<i>Geräte.....</i>	<i>XI</i>
8.3.8	<i>Gebrauchswaren.....</i>	<i>XII</i>
8.3.9	<i>Software.....</i>	<i>XII</i>
8.4	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	XIV
8.5	TABELLENVERZEICHNIS.....	XV
8.6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	XVII
	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>XXI</b>
	<b>PUBLIKATIONSVERZEICHNIS .....</b>	<b>XXIII</b>
	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG/ DECLARATION UNDER OATH....</b>	<b>XXVIII</b>
	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>XXIX</b>

# 1 Einleitung

Die Theorie der „Fetalen Programmierung von Erkrankungen im Erwachsenenalter“ (*Developmental Origins of Health and Disease* (DOHaD)) beschreibt den Zusammenhang zwischen pathophysiologischen Einflüssen während der Embryonal- und Fetalperiode und einem daraus resultierenden erhöhten Risiko für Erkrankungen im Erwachsenenalter. Diese Theorie wurde in den späten 1980er Jahren von David Barker und Kollegen begründet, die erstmalig den Zusammenhang zwischen einem geringen Geburtsgewicht und dem erhöhten Risiko für koronare Herzkrankheit und Typ 2-Diabetes im Erwachsenenalter beschrieben (Barker & Osmond 1986, Hales et al. 1991, Barker et al. 1993). Die normale Funktion der Plazenta ist entscheidend für das optimale Wachstum und die Ernährung des Embryos bzw. Fötus (Übersichtsartikel Barker & Thornburg 2013). Abweichungen in der Plazentamorphologie sind mit einer veränderten fetalen Nährstoffzufuhr verbunden, führen zur „fetalen (Fehl-) Programmierung“ und können eine Ursache für spätere Erkrankungen im Erwachsenenalter sein. Sowohl hohe als auch geringe Plazentagewichte sind mit Hypertonie und koronaren Herzerkrankungen bei den Nachkommen assoziiert. Auch die Größe und Form der Plazenta können mit Erkrankungen im späteren Leben der Nachkommen korreliert werden (Übersichtsartikel Barker & Thornburg 2013).

Ein veränderter maternaler Metabolismus wie er u.a. bei schwangeren diabetischen und adipösen Frauen zu beobachten ist, wirkt sich negativ auf die Plazentaentwicklung, -morphologie und -funktion aus (Übersichtsartikel Vambergue & Fajardy 2011, Myatt & Maloyan 2016). Die Adaptation der Plazenta an das vorherrschende intrauterine Milieu sichert das Überleben und das Wachstum des Fötus (Übersichtsartikel Vaughan et al. 2012), jedoch zu dem Preis das das Risiko für Erkrankungen im Erwachsenenalter erhöht ist.

## 1.1 Diabetes mellitus

Ein Diabetes mellitus stellt eine Stoffwechselstörung dar, die durch einen chronisch erhöhten Blutglukosespiegel infolge eines absoluten Insulinmangels (Typ 1 Diabetes mellitus, T1DM, aber auch T2DM), einer verminderten Insulinsensitivität (Typ 2 Diabetes mellitus, T2DM) oder einer gestörten Glukosetoleranz während der Schwangerschaft (Gestationsdiabetes, GDM) gekennzeichnet ist und mit Veränderungen im Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsel einhergeht (WHO 1999, Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes (DGD) 2018). Es wird geschätzt, dass sich die Zahl von Menschen (20-79 Jahre) mit Diabetes mellitus von derzeit 425 Millionen auf ca. 629 Millionen im Jahr 2045 erhöhen wird. Mit über 7,5 Millionen Diabetikern (9,5% der erwachsenen Bevölkerung) steht Deutschland im europäischen Vergleich auf Platz 2, weltweit auf Platz 9. Circa 95% der Betroffenen sind an einem T2DM erkrankt (IDF Diabetes Atlas 2017, DGD 2018).

### 1.1.1 Diabetes mellitus während der Schwangerschaft

Eine Steigerung der Diabetesprävalenz kann in allen Altersgruppen verzeichnet werden, so auch bei Frauen im gebärfähigen Alter. Im Jahr 2016 waren ca. 0,9% der Geburten von einem präkonzeptionellen Diabetes mellitus (T1DM und T2DM) und ca. 5,4% von einem Gestationsdiabetes betroffen – eine, im Vergleich zum Jahr 2002, 1,6- bzw. 3,7-fache Steigerung (DGD 2018). Neben erhöhten Glukosespiegeln und einem absoluten (T1DM) oder relativen Insulinmangel (T2DM und GDM) ist ein maternaler Diabetes u.a. mit einer Dysregulation des Triglyzerid-, Cholesterin- und Aminosäurestoffwechsels, von Wachstumshormonen (insulinähnliche Wachstumsfaktoren (IGFs)) und Adipokinen sowie mit einer Anhäufung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) verbunden (Yan-Jun et al. 1996, Nelson et al. 2008, Ahmed 2011, Huynh, Xiong, & Bentley-Lewis 2014). Ein präkonzeptioneller Diabetes beeinflusst alle Phasen der Embryonal-, Fetal- und Plazentaentwicklung. Die Schwere der Schwangerschaftskomplikationen hängt von der Einstellung des Blutglukosespiegels ab. Ein vor der Schwangerschaft bestehender Diabetes mellitus ist mit einem erhöhten Risiko für Fehl- und Frühgeburten, Präeklampsie, Sectio, Neugeborenensterblichkeit, Fehlbildungen, Makrosomie oder fetaler Wachstumsretardierung verbunden (Yu et al. 2017a). Weiterhin konnten epidemiologische Studien zeigen, dass ein maternaler Diabetes mit einem erhöhten Risiko für die Nachkommen einhergeht, im Kindes- und Erwachsenenalter Einschränkungen in der kognitiven Leistung oder Adipositas, T2DM oder ein metabolisches Syndrom zu entwickeln (Pettitt & Knowler 1998, Vohr, McGarvey & Tucker 1999, Bytoft et al. 2016, Damm et al. 2016). Um die Auswirkungen eines maternalen Diabetes auf die Entwicklung und Gesundheit der Nachkommen zu minimieren, ist eine frühzeitige Diagnose und enge Kontrolle des Blutglukosespiegels wichtig. Die steigende Zahl an diabetischen schwangeren Frauen macht zudem die Dringlichkeit deutlich, die physiologischen, zellulären und molekularen Mechanismen zu erforschen und besser zu verstehen, die mit den kurz- und langfristigen Schwangerschaftskomplikationen verbunden sind.

Die Präimplantationsphase stellt eine besonders kritische Phase während der Embryonalentwicklung dar, da der Embryo in dieser Phase noch nicht über das plazentare Stoffwechselangebot, sondern über die Eileiter- bzw. Uterussekrete versorgt wird (Übersichtsartikel Fleming, Velazquez & Eckert 2015). Außerdem werden in dieser Phase die Weichen für eine erfolgreiche Implantation gestellt. Die experimentelle Erforschung des Einflusses eines Diabetes mellitus auf die embryo-maternale Interaktion sowie auf embryonale Adaptationsmechanismen erfordert aus ethischen Gründen diabetische Tiermodelle (v.a. in Mäusen, Ratten, Kaninchen, Schafen, Rindern und Schweinen) und *in vitro*-Modelle mit Embryonen (Übersichtsartikel Fleming et al. 2004, Jawerbaum & White 2010, Fischer et al. 2012).

### 1.1.2 Experimentell induzierter Typ 1 Diabetes mellitus beim Kaninchen

Ein T1DM kann in Versuchstieren spontan (*Bio-Breeding-Ratte*, *Non-obese diabetic-Maus*), durch partielle Pankreatektomie und diabetogene Chemikalien (Streptozotocin, Alloxan) induziert werden (Übersichtsartikel Jawerbaum & White 2010). Die zytotoxischen Glukoseanaloga Streptozotocin und Alloxan zerstören selektiv die insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas (Übersichtsartikel Lenzen 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde in fertilen weiblichen Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) ein experimentell induzierter T1DM durch eine einmalige Injektion von Alloxan, einem Pyrimidinderivat, erzeugt. Alloxan wird aufgrund seiner Strukturähnlichkeit mit Glukose vom Glukosetransporter 2 (GLUT2) in die  $\beta$ -Zellen des Pankreas aufgenommen (Munday, Ludwig & Lenzen 1993). Es akkumuliert im Zytoplasma und wird durch Glutathion und Cystein zu Dialursäure reduziert. Durch spontane Autooxidation von Dialursäure mit molekularem Sauerstoff entstehen zytotoxische ROS (Winterbourn & Munday 1989, Lenzen & Munday 1991). Die intrazelluläre Akkumulation von ROS führt letztendlich zum nekrotischen Zelltod der  $\beta$ -Zelle (Jörns et al. 1997). Die Alloxan-vermittelte Zerstörung der pankreatischen  $\beta$ -Zellen erfolgt selektiv, da diese im Vergleich zu anderen GLUT2-exprimierenden Zellen wie Hepatozyten, Enterozyten und Nephrozyten über weniger antioxidative Enzyme verfügen (Lenzen, Drinkgern & Tiedge 1996).

Die irreversible Zerstörung der pankreatischen  $\beta$ -Zellen führt innerhalb von 48 Stunden zur Etablierung eines insulinpflichtigen Diabetes mellitus mit einer Hyperglykämie (15-33 mmol/l) und Hypoinsulinämie (Ramin et al. 2010). Um eine lebensbedrohliche Ketoazidose der Versuchstiere zu verhindern, erfolgt eine tägliche Blutzuckerkontrolle und Insulinsupplementation.

In früheren Studien konnte bereits die Eignung des Kaninchens als reproduktionsbiologisches und embryologisches Modell gezeigt werden, da es gegenüber anderen Tiermodellen einige Vorteile aufweist (siehe Kapitel 1.2). Um den Einfluss eines maternalen Diabetes in der Präimplantationsphase *in vivo* zu untersuchen, wurde das diabetische Kaninchenmodell etabliert und charakterisiert (Ramin et al. 2010, Thieme et al. 2012b).

## 1.2 Präimplantationsentwicklung des Kaninchens

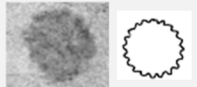
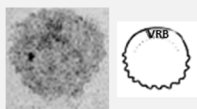
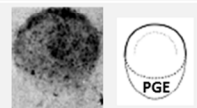
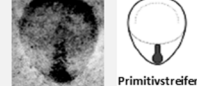
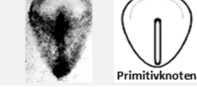
Die Präimplantationsphase bezeichnet die Entwicklung des Embryos von der Befruchtung der Eizelle (Konzeption) bis zur Einnistung (Nidation, Implantation) der Blastozyste in die Uterusschleimhaut am Tag 6,5 bis 6,8 nach der Begattung (*post coitum, p.c.*). Da weibliche Kaninchen keinem Zyklus unterliegen und spontan durch den Verpaarungsreiz ovulieren, kann das exakte Alter des Embryos bestimmt werden (Fischer et al. 2012). Nach Verschmelzung der Oozyte mit einem Spermium im Eileiter (ca. 10 Stunden *p.c.*) ist das 2-Zellstadium nach 14 Stunden *p.c.* sichtbar. Einer Reihe von Furchungsteilungen folgt im 8-16-Zellstadium die

Aktivierung des embryonalen Genoms (Brunet-Simon et al. 2001). Am Tag 2,5 *p.c.* entsteht die Morula, die aus über 32 annähernd gleichgroßen Zellen besteht. Die als Blastomeren bezeichneten Zellen verdichten sich bis zum Tag 3,5 *p.c.* zur kompaktierten Morula. Während der Furchungsreifungen gelangt die Morula vom Eileiter in den Uterus, wo sie sich zur frühen Blastozyste entwickelt. Durch erste Differenzierungsprozesse entstehen der Embryoblast (EB, Keimscheibe, *inner cell mass*) und Trophoblast (TB). Der Trophoblast proliferiert stark und es entsteht ein flüssigkeitsgefüllter Raum, die sogenannte Blastozystenöhle, die er umgibt. Aus den zentral liegenden Zellen des Embryoblasten entwickelt sich später der Embryo. Der Trophoblast bildet mit dem maternalen Endometrium die Plazenta.

Am Tag 6 *p.c.* setzt die Differenzierung des Embryoblasten in eine zweiblättrige Keimscheibe ein, die aus der äußeren Zellschicht, dem Epiblasten und der inneren Zellschicht, dem Hypoblasten besteht. Aus dem Epiblasten gehen die drei Keimblätter, das Entoderm, Ektoderm und Mesoderm, hervor. Während der Gastrulation wird die anteriore-posteriore Körperachse festgelegt. Anhand dieser charakteristischen morphologischen Veränderungen kann die Keimscheibe lichtmikroskopisch beurteilt und die Normalentwicklung verlässlich eingeteilt werden. Bis zur Implantation der Blastozyste ist die Einteilung in fünf Entwicklungsstadien möglich (Stadium 0, 1, 2, 3 und 4) (Viebahn, Mayer & Miething 1995; siehe Tab. 1).

**Tab. 1: Morphologische Charakterisierung der Keimscheibendifferenzierung und Einteilung der Gastrulationsstadien beim Kaninchenembryo während der Periimplantationsphase**

Dorsale Aufsichten Osmium-fixierter Keimscheiben (Embryoblast) und schematische Darstellung der Keimscheiben der Stadien 0 bis 4 (Tag 5,5 – 7,0 *p.c.*) (aus Viebahn, Mayer & Miething 1995); **VRB**-vorderer Randbogen, **PGE**-posteriore Gastrulationsextension

Stadium	Morphologie der Keimscheibe	
0	nach außen hin locker abgegrenzte Keimscheibe (Embryoblast), bestehend aus morphologisch gleichen Zellen	
1	beginnende axiale Differenzierung, erhöhte Zellproliferation am anterioren Pol, Bildung einer halbmondförmigen Zellverdichtung (vordere Randbogen (VRB)) entlang der Embryoblast-Trophoblast-Grenze	
2	lichtmikroskopisch hell erscheinende sichelförmige posteriore Gastrulationsextension (PGE) am posterioren Pol aufgrund geringerer Zelldichte	
3	Elongation der Keimscheibe und Ausbildung des Primitivstreifens von posterior nach anterior, Einsetzen der Implantation	
4	Vollendung des Primitivstreifens mit Bildung des Primitivknotens am vorderen Pol (Hensen 1876)	

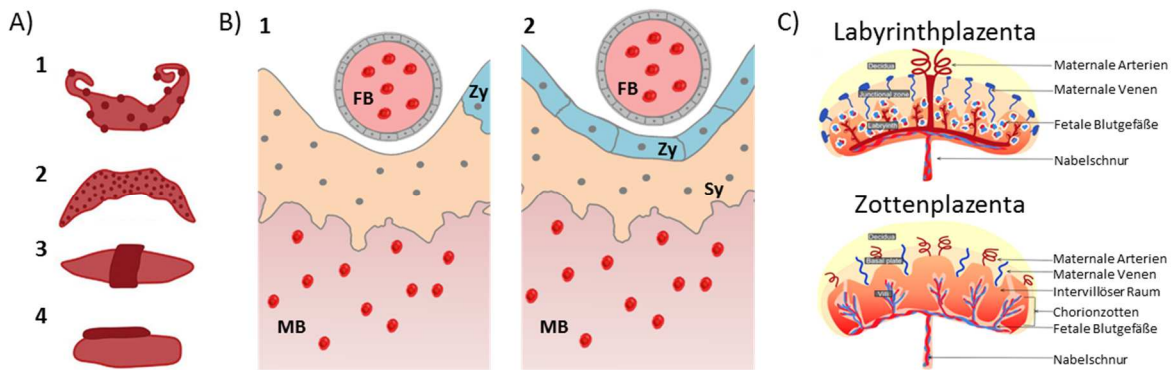
Als Versuchstiermodell bietet das Kaninchen aufgrund der exakten und zuverlässigen Bestimmung des Fertilisationszeitpunktes und des Gestationsalters einen großen Vorteil



gegenüber anderen Säugetiermodellen. Des Weiteren können Kaninchenblastozysten am Tag 6 *p.c.* einfach gewonnen und manipuliert werden, da sie im Vergleich zu anderen Spezies groß sind (ca. 3 mm) und erst am Tag 6,5 bis 6,8 *p.c.* implantieren, ein Zeitpunkt, an dem die Gastrulation bereits begonnen hat (Daniel 1964, Übersichtsartikel Denker 1977). Die Blastozystengröße ermöglicht eine mechanische Separation von Embryoblast- und Trophoblastzellen. Weiterhin können Blastozysten, die Blastozystenhöhlenflüssigkeit sowie die separierten Embryo- und Trophoblastzellen aufgrund der hohen Zellzahl (EB- Stadium 1: ca. 2000, Stadium 2: ca. 7000, TB am Tag 6 *p.c.*: ca. 80.300) individuell oder vereinigt analysiert werden (Daniel 1964, Fischer et al. 2012). Vergleichende Analysen zur humanen Embryonalentwicklung sind möglich, da große Gemeinsamkeiten während der Gastrulation und in der Art der Plazentation (hämochoriale *Placenta discoidalis*) bestehen. Des Weiteren weist das Kaninchen einen höheren phylogenetischen Verwandtschaftsgrad zum Menschen als zu Nagern auf (Graur, Duret & Gouy 1996).

### **1.3 Plazentaentwicklung des Kaninchens**

Der Aufbau der Plazenta von Menschen und Kaninchen ist sich ähnlich. Beide Spezies weisen im Unterschied zu Rind und Schwein eine invasive hämochoriale *Placenta discoidalis* auf. Es gibt speziespezifische Unterschiede. Die fetale und maternale Zirkulation erfolgt im Menschen durch eine (hämomonochorial) und im Kaninchen durch zwei (hämodichorial) Trophoblastschichten (Enders 1965). Beim Menschen ist die Struktur der feto-maternalen Verzahnung der Plazenta villös und beim Kaninchen labyrinthartig (Übersichtsartikel Furukawa, Kuroda & Sugiyama 2014, Abb. 1).



**Abb. 1: Einteilung der Plazentaformen nach der Verteilung der Chorionzotten (A), den fetomaternalen Schichten (B) und der Verzahnungsstruktur der Chorionoberfläche (C)**

(A) Anhand der Verteilung der Chorionzotten können vier Plazentaformen unterschieden werden: 1-*Placenta cotyledonaria* (z.B. Wiederkäuer), 2-*Placenta diffusa* (z.B. Pferd), 3-*Placenta zonaria* (z.B. Hund, Katze) und 4-*Placenta discoidalis*, die durch eine scheibenartige Verzahnung charakterisiert ist (z.B. Mensch, Nager, Kaninchen). (B) Anhand der Schichten, die zwischen fetalem und maternalem Blutkreislauf bestehen bleiben, können 3 Plazentaformen unterschieden werden: *Placenta epitheliochorialis*, *Placenta endotheliochorialis* und die *Placenta hämochorialis*. Bei der *Placenta hämochorialis* wird das Chorionepithel direkt von mütterlichem Blut umspült (z.B. Mensch, Nager, Kaninchen). Aufgrund der Schichtung des Chorionepithels kann diese Form in die *Placenta hämomonochorialis* (1), *hämodichorialis* (2) und *hämotrichorialis* (z.B. Ratte, Maus) unterteilt werden. Bei der *Placenta hämodichorialis* wird die äußere Schicht vom Synzytiotrophoblasten gebildet, der den im Synzytium gelegenen mütterlichen Blutgefäßen anliegt. Die innere Schicht wird vom Zytotrophoblasten ausgekleidet, der die darüber liegenden fetalen Blutgefäße vom Synzytiotrophoblasten abgrenzt. **FB**-fetales Blut, **MB**-mütterliches Blut, **Sy**-Synzytiotrophoblast, **Zy**-Zytotrophoblast (C) *Placentalia* weisen unterschiedliche Formen der feto-maternalen Verzahnung auf: Faltenplazenta (z.B. Schwein, Hund, Katze), Zottenplazenta (z.B. Wiederkäuer, Pferd, Mensch) und Labyrinthplazenta (Nager, Kaninchen) (Kaufmann 1990, Rai & Cross 2014, Eidem et al. 2017). Bei der Labyrinthplazenta werden Synzytiotrophoblasten von netzartig angeordneten Kanälen durchzogen, durch die die fetalen oder maternalen Blutgefäße führen (Kaufmann 1990).

Die Kaninchenblastozyste implantiert auf der antimesometrialen Seite des Uterus am Tag 6,5 bis 6,8 *p.c.* (Denker 1977), indem Trophoblastzellen in das oberflächliche Endometrium eindringen. Dabei kommt es zur Differenzierung der Trophoblastzellen in den Synzytiotrophoblasten, der direkt an das Uterusgewebe angrenzt und den Zytotrophoblasten, der einerseits dem Synzytiotrophoblasten und andererseits dem Embryo anliegt. Der Synzytiotrophoblast wächst unter Verlust seiner Zellgrenzen und mittels proteolytischer Enzyme in das Uterusgewebe hinein und bildet ein vielkerniges Synzytium mit unregelmäßig vernetzten Trabekeln und Zwischenräumen (Lakunen). Nachdem der Synzytiotrophoblast am Tag 9 *p.c.* (beim Menschen Tag 12 *p.c.*) die mütterlichen Gefäße erreicht hat (Hoffman, Winfrey & Hoos 1990), beginnt die Ausbildung des Plazenta-Labyrinthsystems, das mit steigendem Gestationsalter an Größe zulegt (Samuel, Jack & Nathanielsz 1975).

Die frühzeitige Diagnose von pathophysiologischen Veränderungen in der Plazentamorphologie und -funktion ist von klinischer Bedeutung. Bei Plazentastörungen sollte durch ärztliche Beratung und Behandlung und engmaschige Kontrollen der Risikopatientinnen gewährleistet werden, dass die Entwicklung und die Gesundheit des Embryos bzw. Fötus nicht

gefährdet ist. Für die pränatalen Untersuchungen wird nach geeigneten nicht-invasiven Markern gesucht. Im Fokus der wissenschaftlichen Forschung stehen u.a. plazentare microRNAs, die im Blut von Schwangeren nachgewiesen werden konnten (Chim et al. 2008).

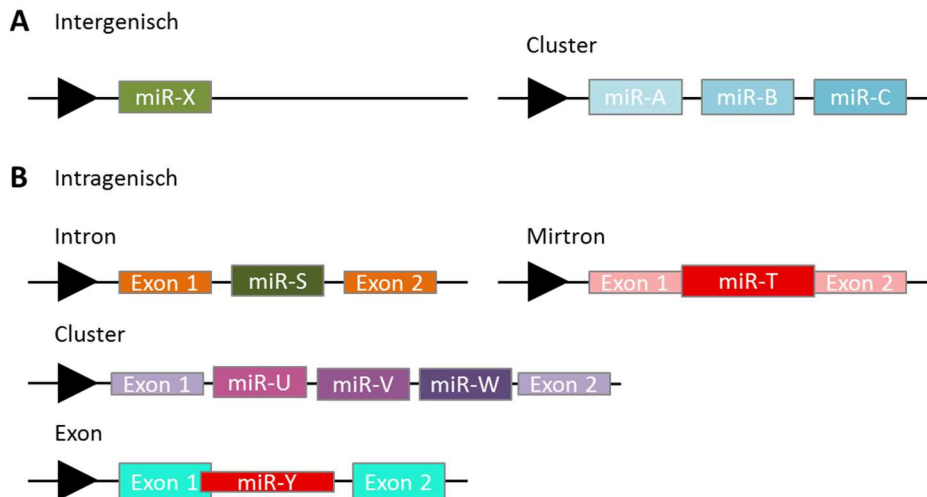
## 1.4 microRNAs

Circa 65% des humanen Genoms werden in RNA umgeschrieben (Djebali & Davis et al. 2012). Nur 1-2% der RNAs kodieren Proteine (Lander et al. 2001). Zu den nicht-kodierenden RNAs (ncRNA) zählen ribosomale RNAs (80-90%), Transfer-RNAs (10-15%), *long non-coding* RNAs (lncRNA), *small nucleolar* RNAs (snoRNA), *small nuclear* RNAs (snRNA), *Piwi-interacting* RNAs (piRNA) und microRNAs. Den regulatorischen ncRNAs und insbesondere den microRNAs gilt wachsendes wissenschaftliches Interesse (Palazzo & Lee 2015). MicroRNAs bilden eine Klasse kleiner, einzelsträngiger nicht-kodierender RNA-Moleküle, die im Mittel eine Länge von 22 Nukleotiden (17-25 Nukleotide) aufweisen, über Artengrenzen hinweg hoch konserviert sind und gewebespezifisch exprimiert werden (Übersichtsartikel Bartel 2004, Barad et al. 2004, Liang et al. 2007). Die erste microRNA, lin-4, und ihre regulatorische Funktion für die Entwicklung von *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) wurde 1993 identifiziert (Lee, Feinbaum & Ambros 1993, Wightman, Ha & Ruvkun 1993). Mit der Beschreibung von let-7 in *C. elegans* (Reinhart et al. 2000, Slack et al. 2000), *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*), im Menschen sowie in 11 weiteren bilateralen Tierarten (Pasquinelli et al. 2000) begann die Liste der microRNAs und damit das Verständnis für deren Biogenese und Funktionalität anzuwachsen. In der aktuellen Datenbank miRBase werden derzeit 2654 reife humane microRNAs gelistet (miRBase Version 22, März 2018).

### 1.4.1 Biogenese von microRNAs

#### 1.4.1.1 Transkriptionale Regulation

microRNAs sind im Genom einzeln oder in Clustern organisiert (Abb. 2). Zu einem Cluster werden eng beieinander liegende (<100 bp - 50 kb) microRNAs gezählt, die eine hohe Sequenz-Homologie insbesondere in der Seed-Sequenz aufweisen. MicroRNAs eines Clusters werden oft ko-transkribiert und regulieren z.T. die gleichen Zielgene und Signalwege (Yuan et al. 2009, Wang et al. 2016a). Sie können auch individuell transkribiert und reguliert werden. Im menschlichen Genom sind 18-25% aller microRNAs, insbesondere konservierte microRNAs, in Clustern organisiert (Wang et al. 2016a; miRBase V22, März 2018). Eine microRNA-Familie kann wiederum aus microRNAs unterschiedlicher Cluster bestehen, wie die miR-200-Familie, die 2 Cluster umfasst: das miR-200b/429- und miR-200c/141-Cluster (Megraw et al. 2006). Zu einer microRNA-Familie werden microRNAs gezählt, die innerhalb der microRNA-Seed-Sequenz identisch sind. Die Seed-Sequenz bezeichnet die am 5'-Ende gelegenen Positionen 2 bis 8, die für die Zielgenerkennung wichtig ist.



**Abb. 2: Genomische Lokalisation von microRNAs**

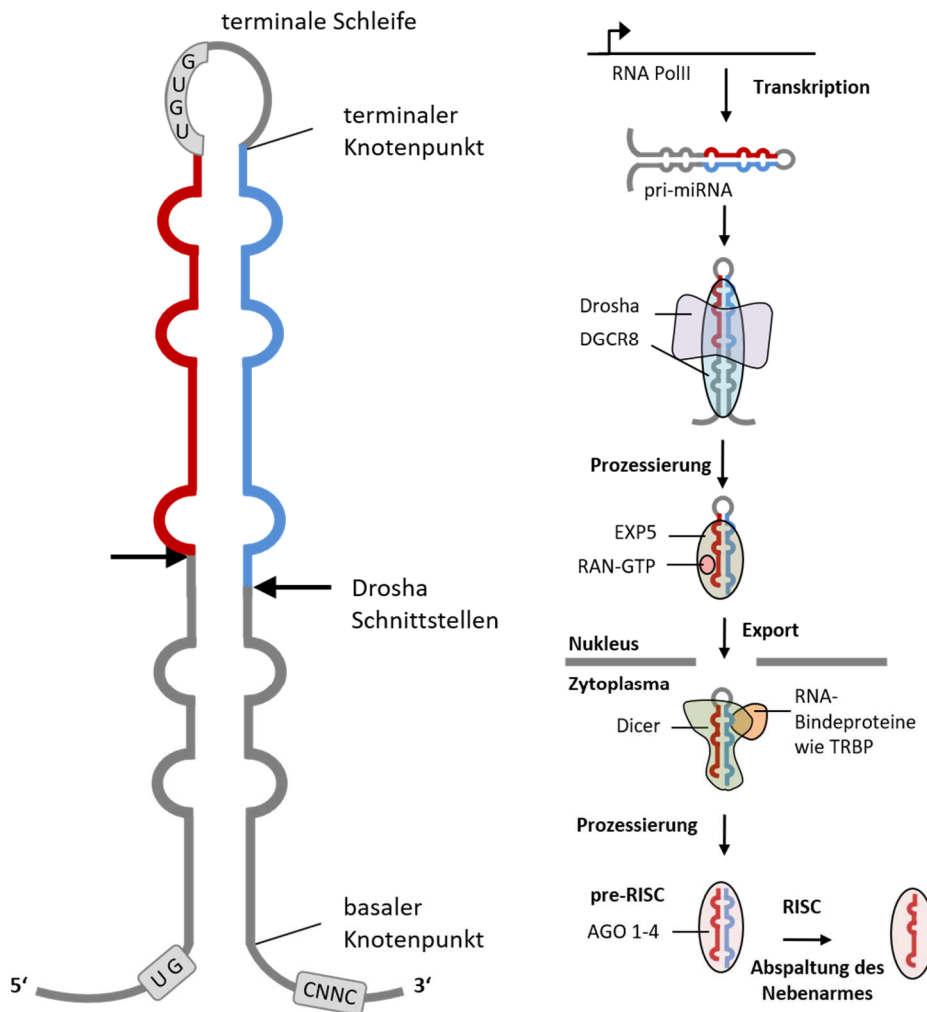
microRNAs sind im Genom einzeln oder als Cluster organisiert, deren Transkription über Promotoren (Pfeil) reguliert wird. In einem Cluster organisierte microRNAs teilen sich i.d.R. einen Promotor und werden als polycistronisches primäres Transkript synthetisiert. **(A)** Intergenisch gelegene microRNAs (ca. 24%) liegen außerhalb bekannter Transkriptionseinheiten. **(B)** Die Mehrheit der microRNAs sind in intragenischen Regionen in Introns kodierender und nicht-kodierender Transkripte (ca. 56%), wenige in Exon-Regionen (ca. 10%) lokalisiert. Sie werden i.d.R. über die Promotoren ihrer Wirts-Gene reguliert und aus deren Introns prozessiert. Im Falle der mirtrons entspricht die pre-miRNA-Sequenz einer Intron-Sequenz des Wirts-Gens und ist somit unabhängig vom Mikroprozessor-Komplex (Abbildung modifiziert nach Olena & Patton 2014, Lagos-Quintana et al. 2001, Lau et al. 2001, Altuvia et al. 2005, Ghorai & Ghosh 2014).

Die transkriptionale Regulation von microRNAs erfolgt über Transkriptions-Initiations-Regionen (Promoter), die mit dem Aufbau von Promotoren Protein-kodierender Gene vergleichbar sind. Diese stellen einen Angriffspunkt für Transkriptionsfaktoren, wie c-Myc, ESR1, p53 und NF- $\kappa$ B dar (Yang & Wang 2011). Mehr als 64% aller microRNA-Promotoren weisen CpG-Inseln auf und unterliegen somit epigenetischen Regulationen durch (De-)Methylierungsprozesse (Ozsolak et al. 2008). Histon-Modifikationen stellen eine weitere Möglichkeit dar, die microRNA-Expression transkriptional zu regulieren (Übersichtsartikel Morales, Monzo & Navarro 2017).

Die Mehrheit aller microRNAs wird über den kanonischen Biogeneseweg prozessiert, der nachfolgend beschrieben wird. Die verschiedenen nicht-kanonischen Wege können in zwei Kategorien eingeteilt werden: Drosha/DGCR8- und Dicer-unabhängig (Kim, Kim & Kim 2016).

#### 1.4.1.2 MicroRNA Transkription und Mikroprozessor-Prozessierung

MicroRNAs werden meist als über 1 kb lange primäre Transkripte (sog. pri-miRNAs) von der RNA-Polymerase II (RNA PolII), seltener von der RNA PolIII transkribiert (Abb. 3 A+B; Lee et al. 2004, Borchert, Lanier & Davidson 2006).



**Abb. 3: pri-miRNA-Struktur (A) und kanonischer microRNA-Biogeneseweg (B)**

(A) Die Haarnadelstruktur einer pri-miRNA besteht aus einer terminalen Schleife und einem ca. 35 bp großen Stamm, der über den basalen Knotenpunkt mit einzelsträngiger RNA (ssRNA) verbunden ist, den sog. basalen Segmenten (Han et al. 2006). Drosha schneidet die pri-miRNA 11 bp oberhalb des basalen Knotenpunktes. DGCR8 bindet am terminalen Knotenpunkt und erhöht die Effizienz und Genauigkeit der pri-miRNA-Prozessierung (Nguyen et al. 2015). Die pri-miRNA-Erkennung erfolgt durch bestimmte Sequenzabschnitte. Dazu zählen das UG-, UGUG- und CNNC-Motiv, die durch verschiedene Faktoren wie den Spleißfaktor *Serine and Arginine Rich Splicing Factor 3* (SRSF3) gebunden werden und so die pri-miRNA-Prozessierung erhöhen (Auyeung et al. 2013, Fang & Bartel 2015). (B) MicroRNAs werden von der RNA Pol III transkribiert. Die pri-miRNA wird vom Mikroprozessor-Komplex zu pre-miRNAs prozessiert. Über die Bindung an EXP5 gelangen die pre-miRNAs in das Zytoplasma, wo sie durch Dicer im Komplex mit verschiedenen Bindeproteinen zu einem kleinen RNA-Duplex gespalten werden. Die Bindung von AGO 1-4-Proteinen führt zur Bildung des pre-RISC, der durch Abspaltung des microRNA-Nebenarmes zum reifen RISC-Komplex umgebaut wird (Abbildung nach Ha & Kim 2014).

pri-miRNAs beinhalten eine oder mehrere Haarnadelstrukturen und können Vorläufer mehrerer reifer microRNAs sein. Sie weisen Strukturelemente von mRNAs auf. So enthalten sie eine 5'-Kappe und einen 3'-Poly(A)-Schwanz und unterliegen alternativem Spleißen (Cai, Hagedorn & Cullen 2004, Melamed et al. 2013). Der Mikroprozessor-Komplex besteht aus der Ribonuklease III Drosha und dem RNA-bindenden Protein *DiGeorge syndrome critical region*

8 (DGCR8). Dieser Enzymkomplex spaltet im Nukleus die Haarnadelstruktur der pri-miRNAs in sog. Stammschleifen- (*stem loops*) Vorläufer (pre-miRNA), die eine Größe von 65-80 Nukleotiden aufweisen (Abb. 3A+B) (Lee et al. 2003, Han et al. 2004).

#### Der Mikroprozessor-Komplex

Drosha ist ein 160 kDa großes Kernprotein, das zur Familie der Endoribonukleasen gehört und doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA) spaltet. Die aminoternale Domäne ist entscheidend für die Kernlokalisierung und für die microRNA-unabhängige Regulation der Genexpression, indem sie an die proximale Promoterregion vieler Gene bindet (Han et al. 2004, Tang et al. 2010, Gromak et al. 2013). Am C-Terminus befinden sich zwei RNasell-Domänen (RIIID), die intramolekular dimerisieren und das katalytische Zentrum bilden (Han et al. 2004). Durch die Drosha-Prozessierung entsteht eine pre-miRNA mit einem 3'-Überhang von 2 Nukleotiden, der von Dicer erkannt wird. Die dsRNA-Bindedomäne ist verantwortlich für die pri-miRNA-Bindung (Han et al. 2004). DGCR8 hat eine Größe von 90 kDa und verfügt über zwei dsRNA-Bindedomänen, die der pri-miRNA-Erkennung dienen (Yeom et al. 2006).

Der Mikroprozessor-Komplex wird durch den Drosha/DGCR8-Komplex selbst und weitere Faktoren reguliert. Die Autoregulation durch Drosha und DGCR8 dient der homöostatischen Kontrolle der Mikroprozessor-Aktivität und zellulären microRNA-Menge (Han et al. 2009). Erhöhte zelluläre Drosha- und DGCR8-Spiegel führen zur Drosha-vermittelten Spaltung und Destabilisierung der DGCR8-RNA. Da DGCR8 Drosha über Protein-Protein-Wechselwirkungen stabilisiert, führt dies zu einer verringerten Drosha-Proteinmenge und Aktivität des Mikroprozessor-Komplexes (Han et al. 2009). Des Weiteren steuern posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung und Acetylierung die Drosha-Kernlokalisierung (Tang et al. 2010, Tang et al. 2011) sowie die Drosha- und DGCR8-Stabilität (Herbert et al. 2013, Tang et al. 2013b). Weiterhin wird die Spezifität, Aktivität und Stabilität von Drosha über die Interaktion mit den RNA-Bindeproteinen p53, p68, p72 und SMAD gesteuert (Gregory et al. 2004, Davis et al. 2008, Suzuki et al. 2009). Das *TAR DNA-binding protein 43* (TDP43 oder TARDBP) ist ein weiterer Kofaktor des Mikroprozessor-Komplexes (Gregory et al. 2004), der die Drosha-Stabilität (Di Carlo et al. 2013) und die Prozessierung spezifischer microRNAs beeinflusst (Kawahara & Mieda-Sato 2012).

#### **1.4.1.3 Nukleärer Transport und zytoplasmatische Prozessierung**

Die prozessierte pre-miRNA wird von dem Karyopherin Exportin 5 (EXP5) und dessen an GTP-gebundenen Kofaktor Ran aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert (Abb. 3B) (Yi et al. 2003, Lund et al. 2004). Dabei wird GTP hydrolysiert, wodurch der pre-miRNA-EXP5-Ran-Komplex auseinanderfällt und die pre-miRNA ins Zytoplasma freigesetzt wird. EXP5 bindet kleine RNA-Moleküle, die wie microRNAs einen über 14 bp langen dsRNA-Stamm und einen kurzen 3'-Überhang aufweisen (Gwizdek et al. 2003).

Im Zytoplasma wird die pre-miRNA nahe der terminalen Schleife durch Dicer in einen ca. 22 bp langen RNA-Duplex gespalten (Hutvagner et al. 2001). Die Bindung des RNA-Duplexes durch Argonaut-Proteine (AGO) führt zur Bildung des *pre-RNA induced silencing complex* (pre-RISC), der durch die Abspaltung des microRNA-Nebenarmes (*passenger strand*) zum Effektor-Komplex RISC umgebaut wird (Mourelatos et al. 2002). Die thermodynamische Stabilität der beiden Enden entscheidet, welcher der beiden komplementären Stränge des RNA-Duplexes in den RISC eingebaut wird. Der Strang mit dem instabilen 5'-Ende wird als Leitstrang (*guide strand*) ausgewählt (Schwarz et al. 2003). Anschließend leiten microRNAs den Effektor-Komplex i.d.R. zu dem 3' untranslatierten Bereich (3'-UTR) ihrer Ziel-mRNA, an den sie innerhalb ihrer Seed-Sequenz binden.

### Dicer

Dicer ist ein 200 kDa großes Protein, das zur Familie der Endoribonukleasen gehört. Genau wie bei Drosha bilden zwei C-terminal gelegene RNaseIII-Domänen über intramolekulare Dimerisierung das katalytische Zentrum (Zhang et al. 2004). Am N-Terminus befindet sich die Helikase-Domäne und die Bindestelle für den Dicer-Kofaktor *Trans-Activation Responsive RNA-Binding Protein* (TRBP). Er dient über die Interaktion mit der terminalen Schleife der pre-miRNA-Erkennung (Tsutsumi et al. 2011). Dicer bindet bevorzugt an pre-miRNAs mit einem 2 Nukleotid-langen 3'-Überhang (Zhang et al. 2004). RNA-Bindeproteine wie TRBP, PACT und TARDBP regulieren die Dicer-Stabilität, Prozessierungseffizienz und -spezifität sowie die exakte Länge der reifen microRNAs, sind jedoch nicht essentiell für die microRNA-Reifung (Chendrimada et al. 2005, Paroo et al. 2009, Fukunaga et al. 2012, Kawahara & Mieda-Sato 2012, Fareh et al. 2016).

### AGO-Proteine

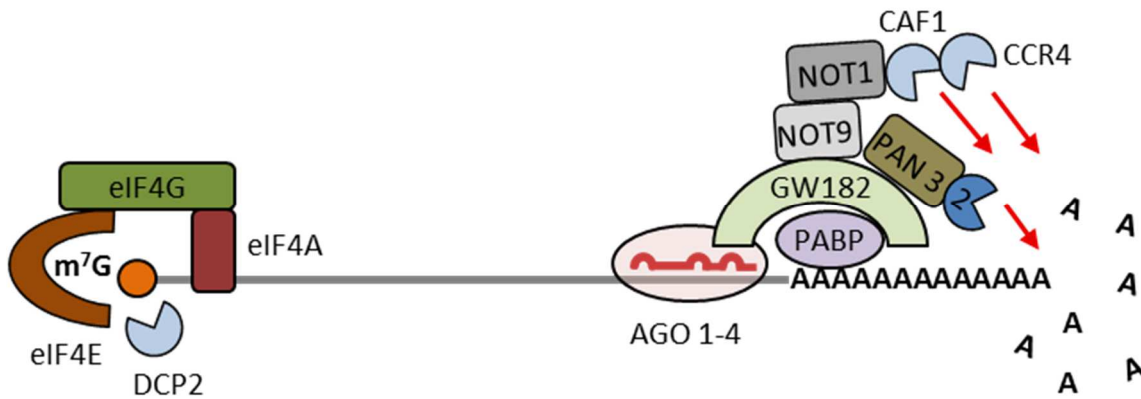
Im humanen Organismus sind zwei AGO-Proteinklassen beschrieben: AGOs, die ubiquitär exprimiert werden und mit siRNAs und microRNAs assoziieren und PIWIs, die nur in den Keimzellen vorkommen und dort piRNAs binden (Übersichtsartikel Ha & Kim 2014). AGOs weisen aufgrund ihrer engen Verwandtschaft überschneidende Funktionen bei der microRNA-Zielgen-Interaktion auf (Su et al. 2009). Im Gegensatz zu *D. melanogaster* und *C. elegans*, erfolgt die microRNA-Bindung durch humane AGO-Proteine (AGO1-4) sequenzunspezifisch (Dueck et al. 2012). Einige AGOs, wie humanes AGO2 sind endonukleolytisch aktiv und können nahezu perfekt gebundene Ziel-mRNAs spalten (Liu et al. 2004). Die meisten Zielgene werden jedoch durch translationale Inhibierung und mRNA-Destabilisierung reguliert (Übersichtsartikel Ha & Kim 2014). Neben der zytoplasmatischen Funktion, sind AGOs gemeinsam mit Dicer, TRBP und GW182 im Zellkern lokalisiert, wo sie einzeln oder als Multiproteinkomplex die Genexpression transkriptional und posttranskriptional beeinflussen (Gagnon et al. 2014).

Die AGO-Expression, -Lokalisation und -Bindung kleiner RNAs werden über verschiedene Modifikationen reguliert. So führt die Hydroxylierung, Phosphorylierung oder Ubiquitinierung zu einer erhöhten AGO2-Stabilität, zur Lokalisation in *processing bodies* (P-bodies), zum erhöhten proteasomalen Abbau oder zu einer verminderten Bindung von microRNAs (Übersichtsartikel Ha & Kim 2014). Des Weiteren werden AGOs durch microRNAs stabilisiert, wobei unbeladene instabile AGO-Proteine proteasomal bzw. autophagosomal abgebaut werden (Smibert et al. 2013, Martinez & Gregory 2013).

#### **1.4.2 Posttranskriptionale Regulation von mRNAs**

Über 60% der Protein-kodierenden Gene im Menschen besitzen mindestens eine konservierte Bindestelle für microRNAs (Friedman et al. 2009). Bei Berücksichtigung der vielen nicht-konservierten microRNA-Bindestellen (Übersichtsartikel Bartel 2009), kann davon ausgegangen werden, dass beinahe alle Protein-kodierenden Gene durch microRNAs reguliert werden. Dabei kann ein Zielgen durch verschiedene microRNAs reguliert werden und eine microRNA viele Zielgene regulieren. Bislang besteht kein wissenschaftlicher Konsens über den vorrangigen Regulationsmodus. Der Abbau der Ziel-mRNA ist insbesondere bei perfekter bzw. nahezu perfekter microRNA-mRNA-Bindung in Pflanzen beschrieben (Übersichtsartikel Jones-Rhoades, Bartel & Bartel 2006). In Tieren verläuft die microRNA-mRNA-Interaktion über die partielle Basenpaarung, insbesondere in der Seed-Sequenz (Übersichtsartikel Pasquinelli 2010), wodurch die endonukleolytische Aktivität des RISC unterbunden wird. Über die Rekrutierung zusätzlicher Effektorproteine induziert der RISC die translationale Inhibierung und den Abbau bzw. die Destabilisierung der Ziel-mRNA (Abb. 4) (Übersichtsartikel Iwakawa & Tomari 2015).





**Abb. 4: Die microRNA-vermittelte posttranskriptionale Regulation von mRNAs**

**(A)** Die microRNA-vermittelte Regulation der Translation findet zum Zeitpunkt der Initiation statt. Dafür werden drei potentielle Regulationsmechanismen beschrieben: (I) GW182 interagiert direkt mit dem Poly(A)-bindenden Protein (PABP) und führt zu dessen Dissoziation von dem Poly(A)-Schwanz der mRNA. Der Ringschluss der RNA, der durch die Interaktion des Poly(A)-Schwanzes mit eIF4E, eIF4G und PABP entsteht, wird dadurch aufgebrochen und die Translation unterdrückt (Zekri, Kuzuoğlu-Öztürk & Izaurralde 2013). (II) Der an GW182 gebundene Deadenylase-Komplex CCR4-NOT bindet Inhibitoren, die die Translation von Zielgenen mit und ohne Poly(A)-Schwanz unterbinden (Mathys et al. 2014). (III) Die Bindung von microRNAs führt zur Dissoziation von eIF4A, einer RNA-Helikase, die zum Kappenbindenden-Komplex gehört, wodurch die Ribosomenbindung unterbunden wird (Fukao et al. 2014). **(B)** Beim microRNA-vermittelten mRNA-Abbau erfolgt nach Bindung des RISCs an den 3'-UTR der mRNA die Rekrutierung des Effektorproteins GW182 an AGO. GW182 interagiert mit den Deadenylase-Komplexen CCR4-NOT und PAN2-PAN3 sowie mit PABP, wodurch der Abbau des Poly(A)-Schwanzes induziert wird. Anschließend wird die 5'-Kappenstruktur der mRNA durch das in einem Komplex agierende *mRNA-decapping enzyme 2* (DCP2) entfernt. Die Exonuklease XRN1 führt letztendlich zum Abbau der mRNA (Übersichtsartikel Fabian, Sonenberg & Filipowicz 2010; Abb. nach Iwakawa & Tomari 2015).

**AGO**-Argonaut-Proteine, **CAF1**-CCR4-Associated Factor 1, **CCR4**-Carbon catabolite repressor protein 4, **DCP2**-*mRNA-decapping enzyme 2*, **eIF4A/E/G**-eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 4A/E/G, **GW182**-*Glycine-Tryptophan Protein of 182 kDa*, **NOT1/9**-CCR4-Associated Factor 1/9, **PABP**-Poly(A)-bindendes Protein, **PAN2/3**-*Poly(A)-Nuclease Deadenylation Complex Subunit 2/3*

### 1.4.3 Die Bedeutung von microRNAs während der Embryonal- und Fetalentwicklung

Eine zygotische Inaktivierung von Dicer, Drosha oder DGCR8 führt in Mäusen zu einem embryonalen Arrest an Tag 6,5 bis 7,5 *p.c.* (Bernstein et al. 2003, Wang et al. 2007, Chong et al. 2010). Aber auch ein Ausschalten der Gene AGO2 (Morita et al. 2007, Lykke-Andersen et al. 2008), TARDBP (Wu et al. 2009, Sephton et al. 2010) und SRSF3 (Jumaa, Wie & Nielsen 1999) ist mit einem Stillstand in der frühen Embryonalentwicklung verbunden. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass AGO2 für die Degradierung mütterlicher Transkripte verantwortlich ist (Lykke-Andersen et al. 2008). Da im Fall einer zygotischen Inaktivierung die Entwicklung von der Befruchtung zum Blastozystenstadium uneingeschränkt verläuft, besteht die Notwendigkeit an microRNAs erst ab dem Zeitpunkt der Differenzierung des Embryoblasten und Trophoblasten (Suh et al. 2010). Diese Beobachtung korreliert mit einer

stetig zunehmenden Expressionsvielfalt an microRNAs von der reifen Oozyte bis zur Blastozyste (Tang et al. 2007, Yang et al. 2008, Ohnishi et al. 2010, Maraghechi et al. 2013). Die beschränkte microRNA-Expression und –Funktion könnte im Zusammenhang mit der Reprogrammierung während der Präimplantationsphase stehen, die einen Neustart der Genexpression gewährleistet (Übersichtsartikel Hemberger, Dean & Reik 2009). In den späteren Entwicklungsstadien werden microRNAs aufgrund ihrer regulatorischen Rolle für die Proliferation und Differenzierung unentbehrlich wie durch Dicer- oder DGCR8-Inaktivierungsstudien in embryonalen Stammzellen bewiesen wurde (Kanellopoulou et al. 2005, Murchison et al. 2005, Wang et al. 2007). Humane und murine embryonale Stammzellen weisen eine hohe microRNA-Expression auf. Viele microRNAs werden exklusiv während der Pluripotenzphase und während der Differenzierung exprimiert (Suh et al. 2004, Ren et al. 2009), um sowohl den Erhalt des Stammzellcharakters (Bernstein et al. 2003) als auch die Differenzierung der Stammzellen sicherzustellen (Kanellopoulou et al. 2005, Wang et al. 2007).

In extraembryonalen Geweben (Trophoblast und Hypoblast) haben microRNAs vermutlich die Funktion die Differenzierung zu unterbinden, um die Fähigkeit der Zellen zur Selbsterneuerung aufrechtzuerhalten (Spruce et al. 2010). Diese Eigenschaft ist von besonderer Bedeutung für die Plazentaentwicklung, da einige Zytotrophoblastzellen im undifferenzierten Zustand verweilen und der wachsenden Plazenta als Stammzell-Reservoir dienen (Spitalieri et al. 2009).

Neben Zytokinen, Chemokinen, und Wachstumshormonen, sind microRNAs an dem embryo-/feto-maternalen Dialog beteiligt, der die Implantation reguliert. So interagieren microRNAs mit den Rezeptoren für Östrogen und Progesteron – also den Hormonen, die für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft essentiell sind (Übersichtsartikel Yang & Wang 2011). Des Weiteren konnten microRNAs im Kulturmedium von *in vitro*-kultivierten humanen Blastozysten nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass sie spezifisch von Trophoblastzellen abgegeben werden, um den Implantationsprozess zu regulieren (Luo et al. 2009, Kropp, Salih & Khatib 2014, Rosenbluth et al. 2014, Capalbo et al. 2016). Embryonal- bzw. endometrial-sezernierte microRNAs können von uterinen Zellen bzw. Trophoblastzellen aufgenommen werden, wo sie die Genexpression und die Implantation regulieren (Cuman et al. 2015, Vilella et al. 2015, Burns, Brooks & Spencer 2016, Gross, Kropp & Khatib 2017a). Nach der Präimplantationsphase und Differenzierung der Plazenta koordiniert der Synzytiotrophoblast den feto-maternalen Austausch. Es wird angenommen, dass er exosomale microRNAs in die maternale Zirkulation abgibt und aufnimmt (Luo et al. 2009).

#### 1.4.4 Plazentare microRNAs

MicroRNAs weisen in der Plazenta ein hohes Expressionsniveau auf. Es gibt drei plazentaspezifische microRNA-Cluster: das C19MC, C14MC und miR-371-3-Cluster (Übersichtsartikel Morales-Prieto et al. 2013). Neben den plazentaspezifischen, sind schwangerschaftsassozierte microRNAs wie die miR-141, -149, -299-5p und -135b bekannt. Diese microRNAs sind durch eine Expressionszunahme mit fortschreitendem Gestationsalter und einem drastischem postpartalen Transkriptionsabfall charakterisiert (Chim et al. 2008).

Das C19MC gehört zu den größten humanen microRNA-Clustern und besteht aus 46 pre-miRNA-Genen, die 53 reife microRNAs generieren (Bortolin-Cavaillé et al. 2009). Es wird fast ausschließlich in der Plazenta, im Reproduktionstrakt und embryonalen Stammzellen von Menschen und Primaten exprimiert (Bentwich et al. 2005, Lin et al. 2010). Die C19MC-Mitglieder werden zu Beginn der Schwangerschaft nur gering transkribiert und erreichen während des dritten Trimenons ihr Expressionsmaximum (Luo et al. 2009, Donker et al. 2012, Morales-Prieto et al. 2012). Sie liegen, wie das C14MC, in einer *Imprinting*-Region und werden ausschließlich vom väterlichen Chromosom abgelesen (Noguer-Dance et al. 2010).

Zum C14MC werden 46 pre-miRNA-Gene gezählt, die nur vom mütterlichen Chromosom transkribiert werden (Seitz et al. 2004). Das C14MC wird exklusiv in *Placentalia* exprimiert, vor allem im Embryo, der Plazenta, in Epithelgeweben und im adulten Gehirn (Seitz et al. 2004, Liang et al. 2007). Im Gegensatz zum C19MC, zeigt das C14MC sein Expressionsmaximum während des ersten Trimenons und nimmt mit zunehmendem Gestationsalter ab (Morales-Prieto et al. 2012). Das C14MC befindet sich in einer für die Entwicklung wichtigen *Imprinting*-Region, der DLK1-DIO3-Region, die neben dem microRNA-Cluster, mütterlich und väterlich exprimierte Gene beinhaltet, die durch die differentiell methylierten Regionen (DMR) reguliert werden. Eine abnormale Expression elterlich geprägter Gene wirkt sich auf die pränatale, postnatale und plazentare Entwicklung und das Wachstum aus (Übersichtsartikel Peters 2014).

Das miR-371-3-Cluster besteht aus drei microRNAs, der miR-371,-372 und -373, die die gleiche Seed-Sequenz aufweisen und auf Chromosom 19 lokalisiert sind (Suh et al. 2004). Es wird vornehmlich in der Plazenta und in embryonalen Stammzellen von Säugetieren exprimiert (Suh et al. 2004, Bentwich et al. 2005). Es zeigt eine leicht gesteigerte Expression im Verlauf der Schwangerschaft (Morales-Prieto et al. 2012).

Die temporäre Aktivierung bzw. Inaktivierung stadienspezifischer microRNAs beeinflussen somit die Plazentaentwicklung. Plazentare microRNAs regulieren wichtige Prozesse wie die Apoptose, Migration, Invasion und Angiogenese (Übersichtsartikel Fu et al. 2013). Eine veränderte Stoffwechsellage der Mutter durch einen Diabetes mellitus, Über-, Unter- oder Fehlernährung, aber auch durch mütterlichen Tabak- und Alkoholabusus beeinflussen wiederum die plazentare microRNA-Expression und können somit zur Entstehung von

Erkrankungen und Schwangerschaftskomplikationen wie Präeklampsie, fetaler Wachstumsretardierung, Früh- und Fehlgeburten beitragen (Übersichtsartikel Fu et al. 2013, Kappil & Chen 2014, Li et al. 2015a, Carreras-Badosa et al. 2017, Baker et al. 2017). Dysregulationen von plazentaren microRNAs sind von daher mögliche Kandidaten für die fetale Programmierung.

#### 1.4.5 microRNAs als Biomarker

Neben der Regulation von verschiedenen Prozessen innerhalb der Zelle, können microRNAs in Vesikel (Mikrovesikel, Exosomen, Apoptosekörperchen) verpackt und sekretiert werden. Die Verpackung von zirkulierenden microRNAs bzw. ihre Bindung an Proteine verhindern ihren Abbau durch Endonukleasen (Übersichtsartikel Turchinovich et al. 2013). Extrazelluläre Vesikel (EVs) werden über Endozytose, Pinozytose, Oberflächenrezeptoren oder Membranfusion aufgenommen. MicroRNAs wirken über autokrine, parakrine und endokrine Sekretionsmechanismen und können über Transzytose, *gap junctions* und Synapsen aufgenommen werden (Übersichtsartikel Gross, Kropp & Khatib 2017b). Über die Funktion von extrazellulären microRNAs besteht derzeit kein wissenschaftlicher Konsens. Circa 90-99% der extrazellulären microRNAs sind an AGO-Proteine gebunden und vermutlich Nebenprodukte zellulärer Aktivität oder sterbender bzw. toter Zellen ohne Signalwirkung (Arroyo et al. 2011, Turchinovich et al. 2011, Turchinovich und Burwinkel 2012). Zahlreiche Studien konnten jedoch zeigen, dass vor allem die microRNAs, die in EVs verpackt werden, eine große Bedeutung für die Zell-Zell-Kommunikation haben (Übersichtsartikel Cortez et al. 2011, Chen et al. 2012, Turchinovich et al. 2013).

Mit ihrer Entdeckung im Plasma bzw. Serum (Chim et al. 2008, Mitchell et al. 2008, Lawrie et al. 2008) sowie in 11 weiteren Körperflüssigkeiten wie Muttermilch, Urin, Speichel, Zerebrospinal-, Peritoneal- und Tränenflüssigkeit (Weber et al. 2010) rückten microRNAs als potentielle Biomarker in den wissenschaftlichen Fokus. Da sie gewebespezifisch exprimiert werden, in Körperflüssigkeiten besonders stabil, einfach zu detektieren und zu amplifizieren sind und eine hohe phylogenetische Konservierung aufweisen, verfügen microRNAs über das Potential, minimal- bzw. nicht-invasive Biomarker für verschiedene Erkrankungen zu sein (Liang et al. 2007, Mitchell et al. 2008, Chen et al. 2008).

Für die pränatale Diagnostik sind nicht-invasive Marker im Blut von klinischer Bedeutung, da die Gewinnung von mütterlichem Blut leicht durchführbar ist und in für die Analytik ausreichender Menge erfolgen kann. Es wird angenommen, dass plazentare microRNAs, die in die mütterliche Zirkulation abgegeben werden den physiologischen Zustand der Schwangerschaft bzw. Plazenta widerspiegeln. Bisher konnte die veränderte Expression zahlreicher microRNAs mit schwangerschaftsassozierten Erkrankungen bzw. Komplikationen wie Präeklampsie (Pineles et al. 2007, Mayor-Lynn et al. 2011, Enquobahrie et al. 2011),

Gestationsdiabetes (Zhao et al. 2011, Zhu et al. 2015), Frühgeburten (Montenegro et al. 2009) und fetaler Wachstumsretardierung (Higashijima et al. 2013) assoziiert werden. Da die Diagnostik embryonaler Fehlbildungen vor der 12. Schwangerschaftswoche schwierig ist, könnten microRNAs gerade für diese Entwicklungsphase hilfreich sein (Blaas, Eik-Nes und Isaksen 2000, Sonek & Nicolaides 2010, Shiefa et al. 2013). MicroRNAs werden spezifisch von *in vitro*-kultivierten Blastozysten in das Kulturmedium abgegeben und könnten somit auch als prädiktive Marker für die Entwicklungsfähigkeit der Embryonen und den Erfolg der *In-vitro*-Fertilisation (IVF) dienen. Momentan wird die Qualität von Embryonen und deren Implantationspotential vor allem anhand ihrer Morphologie beurteilt. Morphologisch ähnliche Embryonen unterscheiden sich jedoch deutlich in ihrem Transkriptom und in ihrer microRNA-Zusammensetzung. Die Analyse des Kulturmediums zeigte, dass *in vitro*-kultivierte Embryonen in Abhängigkeit ihres Geschlechts (Gross, Kropp & Khatib 2017a), ihrer Chromosomensatz (Rosenbluth et al. 2014) und ihres Entwicklungspotentials (Kropp & Khatib 2015) spezifische microRNAs sekretieren.

#### 1.4.6 Spezifische microRNAs und deren Zielgene

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression bestimmter microRNAs untersucht, die aufgrund ihrer Bedeutung für die Trophoblastendifferenzierung und Plazentation in Präimplantationsembryonen, in der Plazenta, im Plasma der Mutter und im Endometrium ausgesucht worden waren. Diese microRNAs werden nachfolgend beschrieben. Deren genomische Lokalisation ist in Tab. 2 dargestellt. Außerdem wird auf die microRNA-Zielgene eingegangen, die für die Reproduktionsorgane und den Embryo von Bedeutung sind (Tab. 3).

**Tab. 2: Genomische Lokalisation und Organisation der miR-27b, -29b, -141, -191, -210, -222 und -433**

microRNA	Lokalisation
miR-27b	miR-23-27-24- Familie: miR-23a-27a-24-2-Cluster (Chr 19) und miR-23b-27b-24-1-Cluster (Chr 9)
miR-29b	miR-29-Familie: miR-29b-1/29a-Cluster (Chr 7) und miR-29b-2/29c-Cluster (Chr 1)
miR-141	miR-200-Familie: miR-200a/200b/429-Cluster (Chr 1) und miR-200c/141-Cluster (Chr 12)
miR-191	miR-191/425-Cluster (Chr 3)
miR-210	Chr 11
miR-222	221/222-Cluster (Chr X)
miR-433	miR-433/431/127/432/136-Cluster (Chr 14) als Subcluster zum C14MC gehörend

Die **miR-27b** reguliert viele Prozesse während der Embryonal- und Fetalentwicklung. Sie konnte in Oozyten (Suh et al. 2010, Song et al. 2016), in humanen Blastozysten (Rosenbluth et al. 2013) und in der menschlichen Plazenta (Luo et al. 2009) nachgewiesen werden. Des Weiteren ist die miR-27b ein wichtiger Regulator der Angiogenese (Kuehbacher et al. 2007,

Zhou et al. 2011, Biyashev et al. 2012) und Differenzierung (Karbiener et al. 2009, Vilches et al. 2014) und besitzt proliferative (Mitxelena et al. 2016) und anti-proliferative (Lee et al. 2012, Tao et al. 2015) Eigenschaften. In endometrialen Stromazellen wird die miR-27b stark exprimiert (Qian et al. 2009, Reed et al. 2018).

Die **miR-29**-Mitglieder sind innerhalb der Zelle unterschiedlich lokalisiert, wobei die miR-29a vorrangig im Zytoplasma und die miR-29b im Kern vorkommt (Hwang, Wentzel & Mendell 2007). Die miR-29b ist ein wichtiger Regulator der Präimplantationsentwicklung und embryonalen Differenzierung. Sowohl eine miR-29b-Überexpression als auch –Inhibierung führen zu einem embryonalen Arrest vor dem Blastozystenstadium (Zhang et al. 2015). Weiterhin beeinflusst die miR-29b den Pluripotenzstatus (Tu et al. 2015, Cui et al. 2016) und durch ihre Zielgene DNMT3a und DNMT3b die *de novo*-Methylierung (Takada et al. 2009). Eine miR-29b-Überexpression führt zu einer vermehrten Expression mesendodermaler und trophektodermaler Marker wie Brachyury (Tu et al. 2015) bzw. Cdx2 (Cui et al. 2016). Des Weiteren ist die miR-29b an der Dezidualisierung endometrialer Stromazellen beteiligt (Qian et al. 2009, Kuokkanen et al. 2010, Su et al. 2010). Während der Plazentaentwicklung reguliert die miR-29b die Apoptose und Invasion von Trophoblastzellen sowie die Angiogenese (Li et al. 2013a, Gu et al. 2016). Eine erhöhte miR-29b-Expression konnte in Plazenten von präeklampsischen Frauen gezeigt werden (Hu et al. 2009, Li et al. 2013a).

Die **miR-141** wird in embryonalen Stammzellen hoch exprimiert, wo sie die Pluripotenz und Differenzierung von murinen embryonalen, induzierten pluripotenten (iPS) und trophoblastären Stammzellen steuert (Lin et al. 2009, Gill et al. 2011, Wang et al. 2013a, Saha, Choudhury & Ain 2015). Eine gesteigerte miR-141-Expression ist mit einer erhöhten Expression an Pluripotenzmarkern assoziiert (Lin et al. 2009, Gill et al. 2011). Die miR-141 weist in der Promoterregion eine Bindungsstelle für Oct4 auf (Wang et al. 2013a). In humanen Blastozysten konnte die miR-141 ebenfalls nachgewiesen werden (Rosenbluth et al. 2013). Die miR-141 ist außerdem am Prozess der Proliferation von endometrialen Stromazellen und deren Differenzierung in Deziduaellen beteiligt. Veränderungen der miR-141-Expression sind mit verminderten Implantationsraten bei Mäusen korreliert (Liu et al. 2013).

Die miR-141 ist eine der ersten plazentaren microRNAs (Barad et al. 2004), die im mütterlichen Plasma nachgewiesen wurden. Ihre Plasmakonzentration und Expression in Trophoblastzellen steigt mit fortschreitendem Gestationsalter bzw. mit dem Plazentawachstum an und fällt unmittelbar nach der Geburt drastisch ab (Chim et al. 2008, Morales-Prieto et al. 2012). Im Gegensatz dazu, zeigt die miR-141 in der murinen Plazenta ihr Expressionsmaximum im ersten Trimenon und wird gegen Ende der Schwangerschaft gering exprimiert (Saha, Choudhury & Ain 2015). Während der Plazentaentwicklung ist die miR-141 an der Regulation der Trophoblasten-Proliferation (Morales-Prieto et al. 2011, Ospina-Prieto et al. 2016) und Angiogenese (Gutiérrez-Samudio et al. 2016) beteiligt. Die Bedeutung der

miR-141 für die Entwicklung und Funktion der Plazenta wird insbesondere durch ihre veränderte plazentare Expression in Schwangerschaftskomplikationen wie Präeklampsie (Ospina-Prieto et al. 2016), fetaler Wachstumsretardierung (Tang et al. 2013a) und fetaler Makrosomie (Guo et al. 2018) deutlich.

Der **miR-191** kommt neben der Funktion in der Neurogenese (Kim et al. 2004, Cho et al. 2011) und Adipogenese (Ji et al. 2014) eine Rolle während der frühen Embryonalentwicklung zu (Mahdipour et al. 2015). In murinen embryonalen Stammzellen ist die miR-191 an der Keimblattentwicklung beteiligt (Hadjimichael et al. 2016). Eine gesteigerte miR-191-Expression ist außerdem physiologisch in Plazenten des ersten Trimesters (Luo et al. 2009) sowie pathologisch in Plazenten von präeklampsischen Frauen (Choi et al. 2013) nachweisbar. Des Weiteren ist ihre veränderte Expression mit zahlreichen Erkrankungen wie der Alzheimer-Krankheit, neurodegenerativen Erkrankungen, Typ 2 Diabetes mellitus und Hypertonie assoziiert (Übersichtsartikel Nagpal & Kulshreshtha 2014).

Die **miR-210** gilt als eine der am häufigsten untersuchten microRNAs, da sie zahlreiche biologische und zelluläre Prozesse wie den Zellzyklus, die Differenzierung, Neurogenese, Adipogenese, Proliferation, Apoptose und Angiogenese reguliert. Sie ist somit an der Entstehung zahlreicher Erkrankungen beteiligt (Übersichtsartikel Chan et al. 2012 & Bavelloni et al. 2017). Die miR-210 wird in unreifen Oozyten, in Kumuluszellen und in Präimplantationsembryonen exprimiert (Dissertation Abd El Naby 2012, Gilchrist et al. 2016). In der Plazenta wird sie vermehrt während des ersten Trimesters gebildet (Gu et al. 2013) und ist eine in der Literatur am häufigsten mit Präeklampsie assoziierten microRNAs (Übersichtsartikel Fu et al. 2013, Sheikh et al. 2016). Eine veränderte miR-210-Expression in der Plazenta, im Amnion oder im mütterlichen Blut korreliert mit weiteren Schwangerschaftskomplikationen wie Frühgeburt (Mayor-Lynn et al. 2011, Enquobahrie et al. 2016) und fetaler Wachstumsretardierung (Lee et al. 2011, Whitehead et al. 2013).

Die **miR-222** wird in Oozyten, Kumuluszellen und Präimplantationsembryonen exprimiert (Dissertation Abd El Naby 2012, Mahdipour et al. 2015, Krawczynski et al. 2015a, Xin et al. 2015, Gilchrist et al. 2016). Mit fortschreitender Entwicklung nimmt die miR-222-Expression ab, wodurch die osteogene, myogene und adipogene Differenzierung sichergestellt wird (Cardinali et al. 2009, Xie, Lim & Lodish 2009, Ortega et al. 2010, Yan et al. 2016). Im Plasma adipöser Patienten und im Fettgewebe von Mäusen und Ratten ist die miR-222-Menge erhöht (Ortega et al. 2013, Prats-Puig et al. 2013). Außerdem konnte eine veränderte miR-222-Transkription in Plazenten präeklampsischer Frauen und in Trophoblastzellen entwicklungsretardierter Föten gemessen werden (Hu et al. 2009, Bidarimath et al. 2015). Ihre Rolle bei der Entstehung einer diabetischen Stoffwechsellage wird durch die veränderten miR-222-Mengen im Plasma bzw. Serum von Typ 2-Diabetikern und Frauen mit einem

Gestationsdiabetes (Karolina et al. 2011, Zhao et al. 2011, Ortega et al. 2014) und ihrem Einfluss auf die Insulinsensitivität deutlich (Ortega et al. 2014, Shi et al. 2014).

Die **miR-433** steuert die Myogenese (Snyder et al. 2013), Erythropoese (Lin et al. 2013), Osteoblasten-Differenzierung (Tang et al. 2017) und Angiogenese (Sun et al. 2016) und fördert die Proliferation pankreatischer  $\beta$ -Zellen (Wang 2017). Die miR-433 wird in Oozyten, Zygoten und Föten exprimiert. Sie ist an der Regulation des Pluripotenzstatus und der Differenzierung von Stammzellen beteiligt (Tesfaye et al. 2009, Liu et al. 2010b, Cheung et al. 2012, Guo et al. 2014, Ito et al. 2015, Gilchrist et al. 2016). Des Weiteren wird die miR-433 als C14MC-Mitglied in besonders hohem Maße im ersten Trimester in der Plazenta exprimiert (Morales-Prieto et al. 2013).

**Tab. 3: Funktionen der microRNA-Zielgene während der Implantation, Embryonal-, Fetal- und Plazentaentwicklung**

Die Zielgene wurden farblich den entsprechenden microRNAs zugeordnet: **miR-27b**, **-141**, **-191** und **-222**

Gene	Präimplantationsentwicklung, Implantation	Differenzierung	Embryonal- und Fetalentwicklung	TB-Entwicklung	Plazentation	Organentwicklung	Schwangerschaftskomplikationen
<b>CREB1</b>	x [1,2]				x [3]		
<b>E2F7</b>			x [4]		x [5]		
<b>Wee1</b>	x [6]	x [7]					
<b>ERBB2IP</b>			x [8,9]	x [10,11]	x [10,11]	x [9]	
<b>IFNAR1</b>	x [12]			x [12]			
<b>IGF2</b>	x [16]		x [13,14]	x [15]	x [15]		
<b>PAPPA</b>	x [19]			x [18]			x [17]
<b>PLAG1</b>			x [20]				x [21,22]
<b>PTEN</b>		x [23,24]	x [23,24]		x [24]		
<b>TGF<math>\beta</math>2</b>	x [25]					x [26]	
<b>ZEB1</b>		x [27]			x [28]		
<b>BDNF</b>	x [29]			x [30]	x [30]		x [31]
<b>CEBP<math>\beta</math></b>	x [32]			x [33]	x [33]		
<b>IL1<math>\alpha</math></b>	x [34]						
<b>SATB1</b>	x [35,36]	x [35,37]		x [38]	x [38]		
<b>CNR1</b>	x [39,40]			x [39,41]	x [39,41]		x [42,43]
<b>ErbB4</b>	x [44,45]		x [46]	x [47]			x [48]
<b>ESR1</b>	x [49]		x [50]		x [51]		
<b>TGF<math>\beta</math>R1</b>	x [52,53]		x [53,54]	x [53]	x [53]		x [53]

**Literaturverweise:** [1] Bleckmann et al. 2002, [2] Jin & O'Neill 2007, [3] Zhou et al. 2014, [4] Li et al. 2008, [5] Ouseph et al. 2012, [6] Tominaga et al. 2006, [7] Van Oudenhove et al. 2016, [8] Klonisch et al. 2001, [9] Lee et al. 1995, [10] Fock et al. 2015a, [11] Jokhi, King & Loke 1994, [12] Imakawa et al. 2002, [13] Übersichtsartikel Robertson 1995, [14] Kadakia & Josefson 2016, [15] Übersichtsartikel Forbes & Westwood 2008, [16] Übersichtsartikel Nayak & Giudice 2003, [17] Morris et al. 2017, [18] Wang et al. 2014a, [19] Yu et al. 2017b, [20] Übersichtsartikel Juma et al. 2016, [21] Hensen et al. 2005, [22] Tang et al. 2013a, [23] Di Cristofano et al. 1998,



[24] Suzuki et al. 1998, [25] Übersichtsartikel Jones et al. 2006, [26] Sanford et al. 2007, [27] Vandewalle, Van Roy & Berx 2009, [28] Bai et al. 2018, [29] Anderson et al. 2010, [30] Kawamura et al. 2009, [31] Mayeur et al. 2010, [32] Ramathal et al. 2011, [33] Bégay, Smink & Leutz 2004, [34] Übersichtsartikel Simón et al. 1996, [35] Goolam & Zernicka-Goetz 2017, [36] Kao et al. 2002, [37] Savarese et al. 2009, [38] Asanoma et al. 2012, [39] Übersichtsartikel Sun & Dey 2012, [40] Paria et al. 1998, [41] Sun et al. 2010, [42] Wang, Xie & Dey 2008, [43] Trabucco et al. 2009, [44] Lim & Dey 2009, [45] Chobotova et al. 2002, [46] Gassmann et al. 1995, [47] Fock et al. 2015b, [48] Armant et al. 2015, [49] Übersichtsartikel Bondesson et al. 2015, [50] Albrecht & Pepe 2010, [51] Roelen et al. 1998, [52] Chow et al. 2001, [53] Peng et al. 2015, [54] Larsson et al. 2001

## 1.5 Zielstellung der Arbeit

Veränderungen der plazentaren microRNA-Expression sind potentielle Marker der Plazentafunktion und können mit Schwangerschaftskomplikationen assoziiert werden (Übersichtsartikel Fu et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss eines maternalen Diabetes mellitus auf die microRNA-Expression in Präimplantationsembryonen experimentell untersucht werden. Da Störungen der Plazentafunktion bereits während der Implantation entstehen können (Übersichtsartikel Norwitz 2006), wurde die frühe Phase der Trophoblastendifferenzierung untersucht.

Am Reproduktionsmodell des Kaninchens wurden mittels molekularbiologischer und proteinbiochemischer Methoden folgende Fragestellungen bearbeitet:

I. In Kaninchenblastozysten am Tag 6 *p.c. in vivo*:

- Beeinflusst ein maternaler Typ 1 Diabetes mellitus die Expression spezifischer microRNAs (miR-27b, -29b, -141, -191, -210, -222 und 433) und deren Zielgene in Embryoblast- und Trophoblastzellen von Kaninchenblastozysten?
- Sind microRNAs in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit nachweisbar?
- Welchen Einfluss hat die diabetische Stoffwechsellage der Mutter auf die Expression von Genen der microRNA-Biogenese: AGO2, Dicer, DGCR8, Drosha, Exportin 5, SRSF3 und TARDBP?

II. Um zu überprüfen, ob die veränderte microRNA-Expression in Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen in der Plazentaentwicklung bestehen bleibt, wurde:

- die Expressionsanalyse spezifischer microRNAs (miR-27b, -29b, -141, -191, -210, -222 und -433) sowie
- die transkriptionale Untersuchung von Genen der microRNA-Biogenese: AGO2, Dicer, DGCR8, Drosha, Exportin 5, SRSF3 und TARDBP in Plazenten am Tag 12 *p.c.* von diabetischen Häsinnen

durchgeführt.

III. In der vorliegenden Arbeit wird die Hypothese aufgestellt, dass Störungen während der Trophoblastendifferenzierung mit Hilfe von microRNAs im mütterlichen Blut identifiziert werden können. Daher wurde am Tag 6 *p.c.*:

- die Expression spezifischer microRNAs (miR-27b, -29b, -141, -191, -210, -222 und 433) im Blutplasma von diabetischen Häsinnen untersucht.

Die verzögerte Embryonalentwicklung in Kaninchen mit einem experimentellen Typ 1 Diabetes mellitus (Ramin et al. 2010) gab Anlass,

- die Expression spezifischer microRNAs (miR-27b, -29b, -141, -191, -210, -222 und 433) im Endometrium diabetischer Tiere zu analysieren.

IV. Um potentielle Einflussfaktoren der microRNA-Expression zu identifizieren wurde in *in vitro*-Kulturversuchen mit Blastozysten von gesunden (und teils diabetischen) Tieren

- der Einfluss von Insulin, Glukose, IGF2 oder LIF auf die Expression der miR-27b, -141, -191 und -222 untersucht.

## 2 Methoden

### 2.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Für die Tierversuche wurden 18-20 Wochen alte, 3-4,5 kg schwere, weibliche, geschlechtsreife Kaninchen (Weiße Neuseeländer, ZiKa-Hybriden) von der Firma Dr. Zimmermann GbR aus Abtsgmünd-Untergröningen bezogen. Die Haltung der Kaninchen erfolgte in klimatisierten, fensterlosen Versuchsterräumen des Zentrums für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) in Einzelkäfigen in einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 16:8 Stunden. Den Kaninchen standen Trockenfutter (REIKA Krafftutter) und Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Nach einer Adaptationsphase von 18-21 Tagen, wurden die Tiere in 2 Versuchsgruppen eingeteilt.

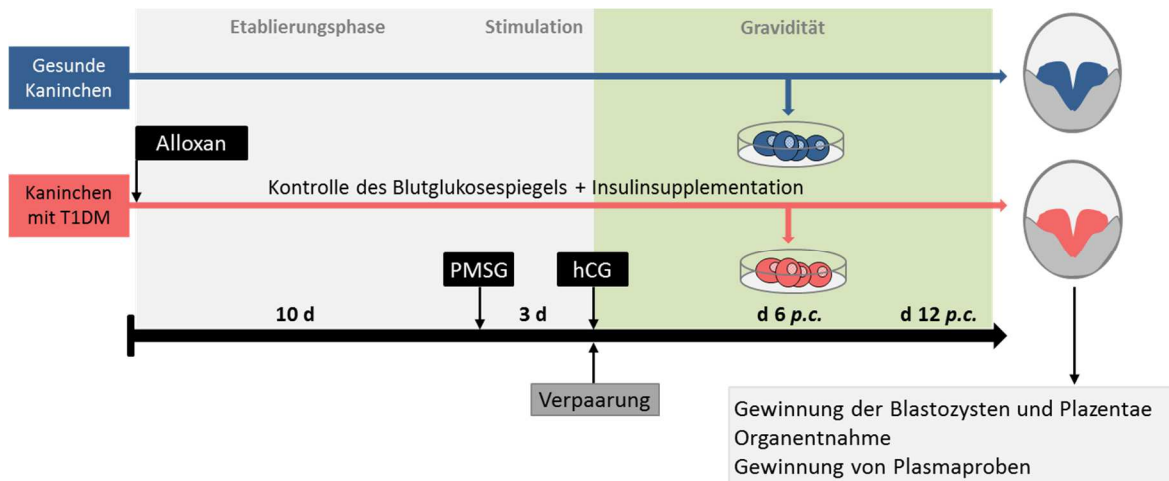
### 2.2 Experimentell induzierter Diabetes mellitus Typ 1

Die Induktion eines experimentell induzierten Diabetes mellitus Typ 1 erfolgte mit dem Glukoseanalogon Alloxan. Den Versuchstieren wurde 15 Stunden vor der Alloxangabe das Futter entzogen, um die Aufnahme der Chemikalie in den Pankreas zu erhöhen. Am Behandlungstag wurde den Kaninchen das Sedativum Domitor® (0,25 mg/kg Körpergewicht) sowie das Anästhetikum Ketanest® (15 mg/kg Körpergewicht) intramuskulär injiziert. Nach eingetretener sedierender und analgesierender Wirkung, erfolgte die intravenöse Applikation von Alloxan in die *Vena auricularis lateralis* (120 mg/kg Körpergewicht). Um lokale Gewebeschädigungen durch die reizende Chemikalie zu vermeiden, wurde die Vene anschließend mit 10 ml isotonischer Kochsalzlösung gespült. Zehn Minuten nach der Alloxangabe wurde den Kaninchen 50 ml einer 20%-igen Glukoselösung subkutan appliziert, um einer Hypoglykämie vorzubeugen. Die Kaninchen wurden im Anschluss 24 Stunden beobachtet, wobei den Tieren statt Trinkwasser eine 5%-ige Glukoselösung sowie trockenes Brot zur Verfügung standen. Eine stabile hyperglykämische Stoffwechsellage (Blutglukosekonzentration über 14 mmol/l) stellte sich nach 24 bis 48 Stunden ein. Der Blutglukosespiegel wurde zweimal am Tag mit dem *MediSense Precision Xceed Diabetes Management System* bestimmt und mit der entsprechenden Menge Insulin (Huminsulin Basal (NPH)) auf  $\geq 14$  mmol/l bis 33 mmol/l Glukose eingestellt. Die Kaninchen wurden für mindestens 8 Tage in einer hyperglykämischen Stoffwechsellage gehalten bis sie verpaart wurden (Abb. 5). Bei gesunden Kaninchen lag der Blutglukosespiegel bei 5 bis 6 mmol/l.

### 2.3 Verpaarung

Drei Tage vor der Verpaarung wurde den gesunden und diabetischen Kaninchen einmalig 110 IE *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG) subkutan in die Nackenfalte injiziert, um die Follikelreifung zu unterstützen (Abb. 5). Die Versuchstiere wurden mit zwei fertilen Böcken

verpaart. Anschließend erfolgte die intravenöse Injektion von 75 IE humanem Choriongonadotropin (hCG) in die *Vena auricularis lateralis*, um die Ovulation zu unterstützen. Am Tag (d) 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13 oder 14 *p.c.* wurden die Kaninchen mit einer Überdosis Pentobarbital (100 mg/kg Körpergewicht) getötet und durch Eröffnung der Karotiden entblutet. Der Bauchraum wurde eröffnet und die Organe Ovar und Uterus entnommen. Weiterhin wurden Gewebeproben gewonnen und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.



**Abb. 5: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs**

**T1DM**-Typ 1 Diabetes mellitus, **PMSG**-*Pregnant Mare Serum Gonadotropin*, **hCG**-humanes Choriongonadotropin, **d**-Tag

## 2.4 Gewinnung von Embryonen, Blastozystenhöhlenflüssigkeit, Plazenta, Endometrium und Blutplasma

Unter einer halbsterilen Werkbank wurden Eileiter und Uterus vom umgebenden Mesometrium freipräpariert. Anschließend wurden die Embryonen, Blastozystenhöhlenflüssigkeit, Plazenten und das Endometrium gewonnen und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.4.1 Gewinnung von Präimplantationsembryonen

Die Präimplantationsstadien (Morula (d3), frühe Blastozyste (d4), Blastozyste (d5) und expandierte Blastozyste (d6)) wurden aus den Eileitern bzw. Uteri mit  $37^{\circ}\text{C}$  warmen sterilfiltriertem Spülmedium (BSM II-Medium [Maurer 1978, Tab. 4]) ausgespült. Die Embryonen wurden durch Umsetzen in frisches Spülmedium zweimal gewaschen. Anschließend wurden sie unter dem Lichtmikroskop morphologisch beurteilt. Anhand des Aussehens der Keimscheibe konnten 6 Tage alte Blastozysten den Gastrulationsstadien 1, 2 oder 3 zugeordnet werden (nach Viebahn, Mayer und Miething 1995). Für *in vivo*-Untersuchungen wurden die Embryonen zweimal in kalten PBS-Puffer umgesetzt und anschließend in PBS-Puffer mit 0,05% Polyvinylalkohol (PVA) mit Hilfe von Pinzette und Nadel

von der embryonalen Hülle (*Zona pellucida*) befreit. Für die Analyse der microRNA-, mRNA- und Proteinexpression in separierten Embryoblast- und Trophoblastzellen wurde unter einem Lichtmikroskop der Embryoblast mit Pinzetten vom umgebenden Trophoblasten abgetrennt.

**Tab. 4: Zusammensetzung der verwendeten Medien für die Gewinnung und Kultivierung von Kaninchenblastozysten**

	Spülmedium	Kulturmedium pH 7,2-7,4
Basal synthetic medium II (BSM II)	7,64 g/l	7,64 g/l
NaHCO <sub>3</sub>	2,11 g/l	2,11 g/l
Penicillin	0,06 g/l	0,06 g/l
Streptomycin	0,15 g/l	0,15 g/l
Glukose (10 mM)	1,80 g/l	1,80 g/l
NaCl	1,00 g/l	1,00 g/l
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	100 µl/l	100 µl/l
Bovines Serumalbumin (BSA)	1,0 g/l	15 g/l
dest. H <sub>2</sub> O	<b>ad 1 l</b>	<b>ad 1 l</b>

#### 2.4.2 Gewinnung von Blastozystenhöhlenflüssigkeit

Die Uteri wurden mit Hilfe von Schere und Pinzette geöffnet und die Blastozysten (d6 *p.c.*) auf ein trockenes Uhrglasschälchen gebettet. Die Blastozyste wurde am zur Keimscheibe entgegengesetzt liegenden Pol mit einer Nadel angestochen, die austretende Blastozystenhöhlenflüssigkeit mit der Pipette aufgenommen und in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

#### 2.4.3 Gewinnung von implantierten Embryonen und Plazenten

Im Falle von implantierten Embryonalstadien und Plazenten wurden die Uteri an der anti-mesometrialen Seite eröffnet und die Blastozysten bzw. Föten und Plazenten aus den Uteri präpariert. Die Blastozysten und Plazenten wurden zweimal in PBS gewaschen.

#### 2.4.4 Gewinnung von Endometrium

Die Uteri wurden mit Schere und Pinzette geöffnet und das Endometrium mit einem scharfen Skalpell vom darunterliegenden Myometrium abgeschabt. Das Gewebe wurde in ein *Multi TwistTop™ Vial* überführt und mit 1 ml RNAlater® für 24 Stunden bei 4°C inkubiert, zentrifugiert und der RNAlater® abgenommen.

### 2.4.5 Gewinnung von Blutplasma

Zur Blutentnahme wurde die *Vena auricularis lateralis* punktiert und das Blut in EDTA-haltigen Monovetten aufgenommen. Die Blutproben wurden bei 1000 g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert, das überstehende Blutplasma abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.5 *In vitro*-Kultur mit Tag 6 *p.c.* Blastozysten

Für *in vitro*-Kulturversuche wurden 6 Tage alte Blastozysten des Gastrulationsstadiums 1 und 2 von mindestens vier Kaninchen pro unabhängigen Versuch verwendet. Nach dem Ausspülen aus den Uteri wurden die Blastozysten aus dem Spülmedium in das entsprechende Kulturmedium umgesetzt und kurzzeitig an das Kulturmedium adaptiert. Anschließend erfolgte eine zufällige Einteilung der Embryonen in die verschiedenen Versuchsgruppen. Jede Gruppe bestand aus vier Embryonen. Es wurden Blastozysten von gesunden und von diabetischen Tieren mit Insulin, Glukose, IGF2 oder LIF kultiviert (Tab. 5).

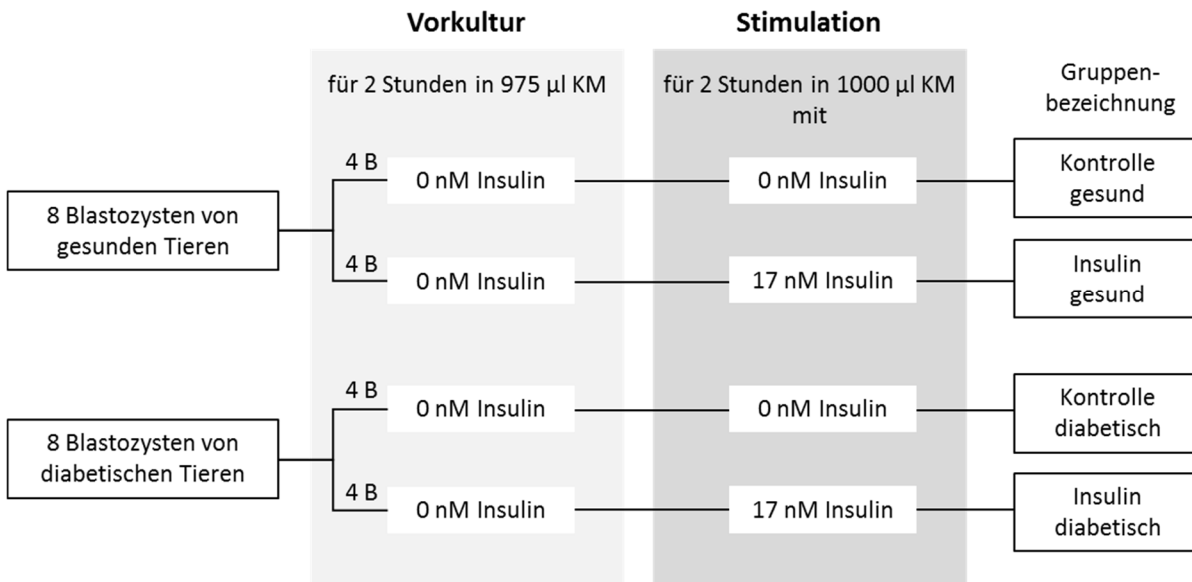
**Tab. 5: Tabellarische Übersicht der *in vitro*-Kulturversuche von 6 Tage alten Blastozysten**

N = Zahl der unabhängigen Versuche, n = Gesamt-Probenanzahl, wobei ein n eine gepoolte Probe aus jeweils 4 Embryoblasten bzw. 4 Trophoblasten oder ein Pool von 100 µl Blastozystenhöhlenflüssigkeit aus jeweils 4-7 Blastozysten darstellt

Stimulus	Blastozysten von:		Dauer (in Stunden)	Versuchs- und Proben- anzahl (N, n)
	Gesunden Kaninchen	Diabetischen Kaninchen		
Insulin (17 nM)	x	x	2	N≥2, n≥2
Glukose (0, 10 oder 25 mM)	x	-	5	N=3, n≥3
IGF2 (13 nM)	x	-	4	N=3, n≥4
LIF (10 ng/ml)	x	-	4	N=3, n≥3

Da im Uterussekret u.a. Wachstumsfaktoren und Hormone natürlicherweise vorkommen, erfolgte die *in vitro*-Kultur mit Insulin und IGF2 nach einer zweistündigen Vorkultur in BSM II-Medium (Zusammensetzung siehe Tab. 4). Der Ablauf der *in vitro*-Kultur ist exemplarisch am Beispiel der Kultur mit Blastozysten von gesunden und diabetischen Tieren mit Insulin in Abb. 6 dargestellt. Die Blastozysten wurden im Brutschrank bei 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 37°C kultiviert. Nach 2- bis 5-stündiger Kultur wurden die Embryonen zweimal in kaltem PBS gewaschen. Anschließend erfolgten die mechanische Entfernung der embryonalen Hülle, die Separierung von Embryoblast und Trophoblast sowie die Gewinnung der Blastozystenhöhlenflüssigkeit.

Um die microRNA-Ausbeute zu erhöhen, wurden jeweils vier Embryoblast- bzw. vier Trophoblastproben zusammengeführt bzw. die Blastozystenhöhlenflüssigkeit von individuellen Blastozysten zu einem Volumen von 100 µl vereinigt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.



**Abb. 6: Ablaufschema der *in vitro*-Kultur von 6 Tage alten Blastozysten mit Insulin**

Der Versuchsablauf wurde mindestens 3-mal wiederholt (N=3).  
 B-Blastozyste, KM-Kulturmedium

## 2.6 Molekularbiologische Methoden

### 2.6.1 RNA-Isolation

Um vorhandene RNasen zu deaktivieren, wurden Glasgefäße bei 180°C sterilisiert und alle Kunststoffprodukte autoklaviert. Wässrige Lösungen wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser hergestellt. Dazu wurde destilliertes Wasser mit 0,1% DEPC über Nacht inkubiert und anschließend zweimal autoklaviert.

#### 2.6.1.1 RNA-Isolation aus Endometrium und Plazenta

Die RNA-Isolation erfolgte nach der Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode (modifiziert nach Chomczynski und Sacchi 1987). Die Gewebeproben wurden in *Multi TwistTop™ Vials* mit je 7-10 Keramikkügelchen überführt und in 1 ml TRI Reagent® aufgenommen. Der Gewebeaufschluss erfolgte im Homogenisator Precellys<sup>24</sup> für 15 Sekunden. Anschließend wurden die Proben mit Chloroform versetzt und nach mehrmaligem Schütteln für 2 bis 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Eine 15-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C diente der gewünschten Phasentrennung von RNA, DNA und Protein. Die obere, wässrige, klare Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1:1 mit Isopropanol versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden bei 13.000 rpm

und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Präzipitat dreimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Jedem Waschschrift folgte eine Zentrifugation von 15 bzw. 10 Minuten bei 13000 rpm und 4°C. Abschließend wurde das Präzipitat für 5-10 Minuten im Rotations-Vakuum-Konzentrator getrocknet und in 300-500 µl DEPC-Wasser gelöst.

### 2.6.2 mRNA-Isolation aus Kaninchenblastozysten

Die Isolation von mRNA aus Blastozysten, Embryoblasten und Trophoblasten erfolgte mittels Dynabeads®Oligo(dT)<sub>25</sub>-Perlen. An die Oberfläche der paramagnetischen Kügelchen sind 25 Nukleotid-lange dT (Desoxythymidin)-Ketten kovalent gebunden, die die Bindung des mRNA-Poly-A-Schwanzes ermöglichen. Die Dynabeads®Oligo(dT)<sub>25</sub>-Perlen wurden durch zweimalige Zugabe von Bindepuffer im *Magnetic Particle Concentrator* (DynaL MPC®) aktiviert.

Die in PBS gelagerten Embryonenproben wurden zunächst für 10 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert, um das überschüssige PBS abzunehmen. Die Embryoblast- und Trophoblast-Proben wurden in je 110 µl Lysepuffer, die Gesamtembryo-Proben in 150 µl (d6) bzw. 180 µl (d8) Lysepuffer resuspendiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden je 10 µl der Dynabeads®Oligo(dT)<sub>25</sub>-Perlen zu den Embryoblast- bzw. Trophoblast-Proben und 13 µl zu den Gesamtembryo-Proben gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Im *Magnetic Particle Concentrator* erfolgte die Reinigung der Suspension durch zweimaliges Waschen mit je 100 µl Waschpuffer A und dreimaliges Waschen mit je 100 µl Waschpuffer B (Tab. 6). Der Überstand wurde abgenommen, 11 µl nukleasefreies Aqua dest. zugegeben und die Oligo(dT)<sub>25</sub> Reste durch Erhitzen auf 65°C für 3 Minuten von der mRNA entfernt. Um eine erneute Bindung der mRNA an die Dynabeads®Oligo(dT)<sub>25</sub>-Perlen zu verhindern, wurde der Überstand mit Hilfe des *Magnetic Particle Concentrator* abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

**Tab. 6: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für die mRNA-Isolation mittels Dynabeads®Oligo(dT)<sub>25</sub>-Perlen**

	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	ad 100 ml	ad 100 ml	ad 100 ml	ad 100 ml



### **2.6.3 microRNA-Isolation aus Kaninchenblastozysten, Blastozystenhöhlenflüssigkeit, Plazenta, Endometrium und Blutplasma**

Bei der Isolation von microRNAs wird i.d.R. Gesamt-RNA gewonnen. Aufgrund der geringen RNA-Menge von Embryoblast, Trophoblast, Blastozystenhöhlenflüssigkeit und Blutplasma wurden kommerzielle Kits verwendet, um die Ausbeute zu erhöhen. Für die microRNA-cDNA-Synthese aus Plazenta und Endometrium diente Gesamt-RNA, die mittels TRI Reagent® isoliert wurde (siehe 2.6.1.1).

#### **2.6.3.1 microRNA-Isolation aus Kaninchenblastozysten**

Für die microRNA-Isolation aus Kaninchenblastozysten wurde das miRNeasy Mini Kit verwendet. Das Kit kombiniert eine Phenol-/ Guanidin-basierte Zellyse und eine Aufreinigung der totalen RNA über eine Kieselgelmembran. Um die microRNA-Ausbeute zu erhöhen, wurden jeweils vier Embryoblast- bzw. vier Trophoblastproben zusammengeführt. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C wurde das überschüssige PBS abgenommen und die RNA entsprechend der Herstelleranweisungen isoliert. Die RNA wurde nach mehrmaligem Waschen mit 30 µl RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert.

#### **2.6.3.2 microRNA-Isolation aus Blastozystenhöhlenflüssigkeit und Blutplasma**

Die Isolation von microRNAs aus Blastozystenhöhlenflüssigkeit und Blutplasma erfolgte mit dem miRCURY™ *RNA Isolation Kit Biofluids* entsprechend der Anweisungen des Herstellers. Mit Hilfe einer säulenbasierten Anionenaustauschchromatographie werden RNA-Moleküle, die kleiner als 1000 Nukleotide sind, über eine Resin-Separationsmatrix isoliert und aufgereinigt. Um die Ausbeute an microRNAs zu erhöhen, wurde die Blastozystenhöhlenflüssigkeit von individuellen Blastozysten zu einem Volumen von 100 µl vereinigt. Für die Isolation von microRNAs aus Blutplasma wurden 200 µl individuelles Blutplasma eingesetzt. Anschließend wurden die Proben bei 3000 g für 5 Minuten und 4°C zentrifugiert, um vorhandenen Zelldebris zu entfernen. Die RNA wurde nach der Lyse, Präzipitation und einigen Waschschritten mit 30 µl (Blastozystenhöhlenflüssigkeit) bzw. 50 µl (Blutplasma) RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert.

### **2.6.4 RNA- und DNA-Quantifizierung**

#### **2.6.4.1 RNA- und DNA-Quantifizierung mittels UV-Spektroskopie**

Für die spektrophotometrische Messung im UV-Bereich wurde das NanoVue™-Spektrophotometer verwendet. Die Konzentration [µg/µl] der Nukleinsäurelösung errechnet sich aus der Absorption des UV-Lichts (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm sowie dem Extensionsfaktor, der für RNA 40 und für doppelsträngige DNA 50 beträgt. Zusätzlich wurde die Absorption bei 280 nm gemessen, da dies Aufschluss über die Verunreinigung der Probe

mit Proteinen gibt. Der Quotient aus 260/280 ermöglicht eine Beurteilung über den Reinheitsgrad der RNA bzw. DNA und sollte im Bereich von 1,8-2,0 liegen.

#### 2.6.4.2 Fluorometrische RNA-Quantifizierung

Die Fluoreszenz-basierte Quantifizierung von Nukleinsäuren stellt im Vergleich zur Absorptionsmessung eine sensitivere Methode für die Konzentrationsbestimmung dar und wurde daher für geringe RNA-Mengen eingesetzt. Die durchschnittliche Fluoreszenz-intensität der Proben wurde mit Hilfe des QuantiFluor® RNA-Systems, ein RNA-bindender Fluoreszenzfarbstoff, der bei einer Wellenlänge von 492 nm angeregt wird, fluorometrisch im Quantus™ Fluorometer bei einer Wellenlänge von 540 nm bestimmt. Mit Hilfe eines RNA-Standards konnte die zu bestimmende RNA-Menge [ng/μl] berechnet werden.

#### 2.6.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA und DNA

Für die Analyse und Präparation wurden RNA- und DNA-Fragmente in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Dafür wurden 1,2 bis 2,0 g Agarose in 10 ml 10x TAE-Puffer und 90 ml DEPC- (RNA) bzw. destilliertem Wasser (DNA) gelöst und in der Mikrowelle bis zur vollständigen Auflösung der Agarose aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf 60°C erfolgte die Zugabe von Ethidiumbromid (3 μl/100 ml) und das Gießen der Agarosegele in Gelkammern. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit 5x Ladepuffer versetzt. Die Größenauftrennung von Nukleinsäuren erfolgte im elektrischen Feld in einer horizontalen Gelkammer mit 1x TAE-Laufpuffer und bei einer Spannung von 50 V (RNA) bis 120 V (DNA). Für die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten wurde ein 100 Bp-DNA-Marker aufgetragen. Die Beurteilung von RNA erfolgte anhand der Fluoreszenzintensität der 28S und 18S rRNA-Banden.

Unter UV-Licht wurden die RNA- und DNA-Banden visualisiert und mithilfe einer Videokamera und der BioCaptMW Software dokumentiert.

##### 10x TAE-Puffer:

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

##### 6x Ladepuffer:

Glyzerin	3 ml
1x TAE-Puffer	7 ml
Xylencyanol	0,025 g

#### 2.6.6 DNase-Verdau

Im Anschluss an die RNA-Isolation wurden 8 μg RNA (Gewebe) mit dem Enzym rDNaseI inkubiert, um Kontaminationen durch genomische DNA auszuschließen.

Ansatz:

8 µg RNA	x µl RNA
DEPC- H <sub>2</sub> O	ad 25 µl
rDNaseI	2,0 µl
10x DnaseI-Puffer	2,5 µl
RNasin® RNAse-Inhibitor	0,5 µl

Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion mit 2,5 µl DNase-Inaktivierungsreagenz abgestoppt. Die Proben wurden für eine Minute bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Intaktheit der RNA wurde in einem 1,2%-igen Agarosegel überprüft. Eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf dem Referenzgen Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) diente der Überprüfung des Erfolgs des DNA-Verdaus.

Die mittels Säulen isolierte RNA von Embryoblast- und Trophoblastproben (siehe 2.6.3.1) wurde komplett verdaut. Anhand der geringen RNA-Konzentration wurde auf die Überprüfung der RNA-Intaktheit und auf eine PCR zur Kontrolle des DNA-Verdau-Erfolgs verzichtet.

RNA aus Blastozystenhöhlenflüssigkeit und Blutplasma (siehe 2.6.3.2) wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers auf der Säule verdaut. Dazu wurde die an der Säule gebundene RNA mit 50 µl rDNase für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die weitere Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

## 2.6.7 Reverse Transkriptase-Reaktion

Für nachfolgende Polymerase-Kettenreaktionen ist die Umschreibung von RNA in komplementäre DNA (cDNA) mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) erforderlich.

### 2.6.7.1 Reverse Transkriptase-Reaktion von RNA aus Endometrium

Für die RT-Reaktion wurden 3 µg RNA mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 11,5 µl aufgefüllt und mit 1 µl *Random* Primer versetzt. Im Thermocycler wurden die Proben für 5 Minuten bei 65°C inkubiert, um die Anlagerung des *Random* Primers und das Aufbrechen der RNA-Sekundärstruktur zu initiieren. Anschließend wurde 7,5 µl Reaktionsansatz zu den Proben gegeben.

**1-facher Ansatz bis 11,5 µl RNA (3 µg):**

- x µl RNA
- mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 11,5 µl auffüllen
- + 1 µl *Random Primer*
- + 7,5 µl Reaktionsansatz:

5x Reaktionspuffer	4 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	2 µl
Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1 µl
RNase-Inhibitor	0,5 µl

= 20 µl → nach erfolgter cDNA-Synthese mit 80 µl Aqua dest. auf 100 µl auffüllen

Bei einer geringen RNA-Konzentration wurde der Ansatz mit 1,5 bzw. 2 multipliziert und nach erfolgter cDNA-Synthese entsprechend mit 70 bzw. 60 µl destilliertem Wasser aufgefüllt.

Die cDNA-Synthese erfolgte im Thermocycler nach folgendem Protokoll:

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

Um die Effizienz der cDNA-Synthese zu überprüfen, wurde eine PCR auf dem Referenzgen GAPDH und eine anschließende gelelektrophoretischer Auftrennung des Produkts durchgeführt.

**2.6.7.2 Reverse Transkriptase-Reaktion von RNA aus Blastozysten**

Für die RT-Reaktion wurde die gesamte isolierte mRNA (aus Kapitel 2.6.2) der Blastozysten, der Embryoblasten und Trophoblasten eingesetzt und mit folgendem Reaktionsansatz inkubiert:

10x PCR-Puffer	2 µl
50 mM MgCl <sub>2</sub>	2 µl
10 mM dNTPs	2 µl
<i>Random Primer</i>	1 µl
Reverse Transkriptase (200 U/µl)	0,5 µl
RNase-Inhibitor	0,2 µl
dest. H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 9 µl

Die cDNA-Synthese erfolgte im Thermocycler nach folgendem Protokoll:

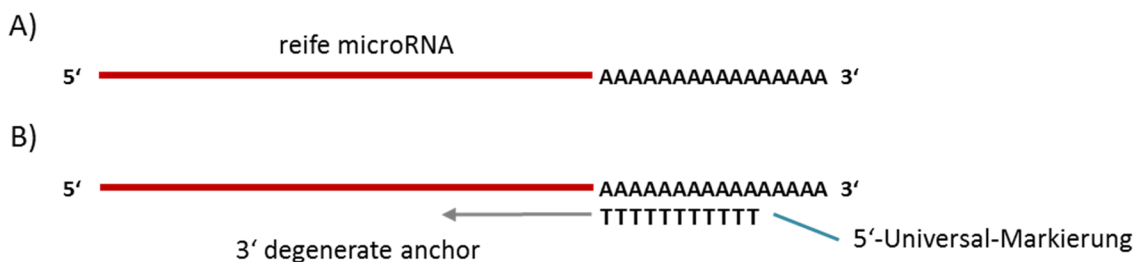
10 Minuten	25°C
60 Minuten	42°C
4 Minuten	99°C

Die synthetisierte cDNA wurde mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 µl (Blastozysten) bzw. 80 µl (Embryoblast und Trophoblast) aufgefüllt und bei -20°C gelagert.

Um die Effizienz der cDNA-Synthese zu überprüfen, wurde eine PCR auf dem Referenzgen GAPDH und eine anschließende gelelektrophoretischer Auftrennung des Produkts durchgeführt.

### 2.6.7.3 Reverse Transkriptase-Reaktion von microRNA

Da microRNA nur aus 20-25 Nukleotiden besteht und keinen Poly(A)-Schwanz besitzt, ist die herkömmliche RT-Reaktion mit *Random* Primern oder Oligo(dT)-Primern nicht möglich. Die cDNA-Synthese von microRNA aus Embryoblast, Trophoblast, Blastozystenhöhlen-flüssigkeit, Plasma, Endometrium und Plazenta erfolgte daher mit dem Universal cDNA Synthesis Kit II entsprechend den Herstelleranweisungen. Dabei wird die microRNA zunächst am 3'-Ende polyadenyliert (Abb. 7A), womit die Bindung des Oligo(dT)-Primers möglich wird. Der Oligo(dT)-Primer trägt am 3'-Ende eine zusätzliche Base Guanin, Cytosin oder Adenin (*degenerate anchor*), wodurch die Bindungsstelle genau festgelegt wird und eine Bindung des Primers nahe am 3'-Ende der microRNA erfolgt. Außerdem verfügt der Oligo(dT)-Primer am 5'-Ende eine Universal-Markierung (Abb. 7B), die dem *reverse* Primer während der quantitativen Echtzeit-RT-PCR (RT-qPCR) als Signalsequenz dient.



**Abb. 7: Schematische Darstellung der RT-Reaktion von microRNA mit dem Universal cDNA Synthesis Kit II** (Abb. nach Exiqon)

Für die cDNA-Synthese wurden 5-10 ng RNA mit dem Reaktionsansatz vermengt (Tab. 7). Die Inkubation der RT-Reaktion erfolgte im Thermocycler nach folgendem Protokoll:

60 Minuten	42°C
5 Minuten	95°C

Die synthetisierte cDNA wurde mit destilliertem Wasser 1:40 bzw. 1:20 verdünnt und bei -20°C gelagert.

**Tab. 7: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese von microRNA aus Blastozysten, Endometrium, Plasma und Plazenta**

(A) Embryoblast, Trophoblast, Plasma (B) Blastozystenhöhlenflüssigkeit	Endometrium, Plazenta
- (A) 10 ng bzw. (B) 5 ng RNA - mit nukleasefreiem Wasser auf 6,5 µl auffüllen + 3,5 µl Reaktionsansatz:	- 5 ng RNA-Lösung herstellen - 2 µl der 5ng RNA-Lösung + 8 µl Reaktionsansatz:
2 µl	<b>5x Reaktionspuffer</b> 2 µl
1 µl	<b>Enzymmix</b> 1 µl
0,5 µl	<b>Spike In-RNA U6</b> 0,5 µl
-	<b>Nukleasefreies Wasser</b> 4,5 µl

### 2.6.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde für die Analyse der ontogenetischen Expression von Genen der microRNA-Biogenese und für die Effizienzkontrolle des DNA-Verdau und der cDNA-Synthese mit Hilfe von GAPDH angewendet. Die für die RT-PCR und RT-qPCR verwendeten Primer sind dem Anhang beigefügt (Tab. 14, Tab. 15).

Für die Reaktion wurden 0,5 µl-1 µl cDNA eingesetzt und folgender Ansatz zugefügt:

5x PCR-Puffer	5 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	0,5 µl
Primer <i>forward</i> (10 µM)	0,5 µl
Primer <i>reverse</i> (10 µM)	0,5 µl
Taq DNA-Polymerase	0,125 µl
dest. H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 25 µl

Bei jeder RT-PCR wurde eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt. Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte im Thermocycler nach folgendem Protokoll:

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

Anschließend wurden die RT-PCR-Produkte in einem 1,8-2,0%-igen Agarosegel ihrer Fragmentlänge nach aufgetrennt.

### 2.6.8.1 Quantitative Echtzeit-RT-PCR (RT-qPCR)

Die auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion zugrunde liegende RT-qPCR ermöglicht mit Hilfe von Fluoreszenzmessung eine relative und absolute Quantifizierung der entstandenen DNA in Echtzeit.

Bei der RT-qPCR werden im Wesentlichen zwei Technologien eingesetzt: Fluoreszenzfarbstoffe oder Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-Sonden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Fluoreszenzfarbstoffe EvaGreen® (mRNA) und SYBR® Green (microRNA) verwendet, die nach dem Interkalieren in doppelsträngige DNA fluoreszieren. Die Fluoreszenzintensität steigt mit zunehmender Menge an DNA an und ermöglicht somit die Analyse der Fluoreszenzzunahme über die Reaktionszyklen. Dabei wird das Fluoreszenzsignal innerhalb der exponentiellen Phase quantifiziert, da es nur in dieser Phase zu einer Verdopplung der vorhandenen DNA kommt.

Jeder RT-qPCR-Reaktion folgte eine Schmelzkurvenanalyse, die die Spezifität der verwendeten Primer sicherstellt und sichtbar macht.

Die cDNA wurde in Doppelbestimmung analysiert. Eine Negativkontrolle wurde bei jeder RT-qPCR-Reaktion mitgeführt.

#### 2.6.8.1.1 RT-qPCR-Analyse von cDNA aus mRNA

In dem Endometrium und den Blastozysten von gesunden und diabetischen Kaninchen wurden folgende microRNA-Zielgene mittels RT-qPCR analysiert: BDNF, CEBP $\beta$ , CNR1, CREB1, E2F7, ERBB2IP, ErbB4, ESR1, IFNAR1, IGF2, Il1 $\alpha$ , PAPPA, PLAG1, PTEN, SATB1, TGF $\beta$ 2, TGF $\beta$ R1, Wee1 und ZEB1. Des Weiteren wurden in den Blastozysten und Plazenten folgende microRNA-prozessierenden Gene mittels RT-qPCR untersucht: AGO2, Dicer, DGCR8, Drosha, Exportin 5, SRSF3 und TARDBP. Für die Bestimmung der relativen mRNA-Menge wurde eine Verdünnungsreihe eines Plasmidstandards des zu untersuchenden Gens, im Bereich von  $10^9$  bis  $10^8$  Molekülen, als externe Referenz mitgeführt.

Für die RT-qPCR wurden 3  $\mu$ l cDNA eingesetzt und folgender Reaktionsansatz hinzugefügt:

5x HOT FIREPol® Eva Green® qPCR Mix Plus	4 $\mu$ l
Primer <i>forward</i>	0,5 $\mu$ l
Primer <i>reverse</i>	0,5 $\mu$ l
dest. H <sub>2</sub> O	ad 20 $\mu$ l

Die RT-qPCR wurde im *StepOnePlus™ Real Time PCR System* unter folgenden Standardbedingungen durchgeführt:

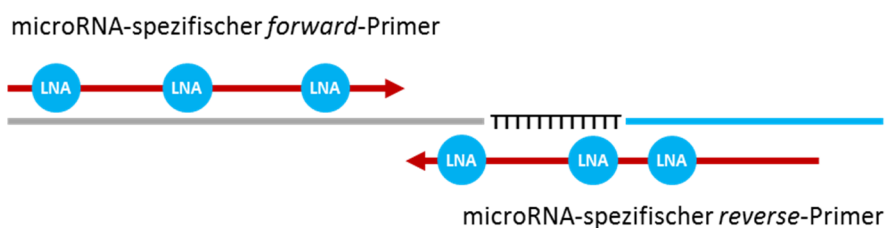
Aktivierung der Polymerase	15 Minuten	95°C	} 40 Zyklen
Denaturierung der cDNA	15 Sekunden	95°C	
Primerbindung	20 Sekunden	60°C	
Elongation	20 Sekunden	72°C	
Schmelzkurve	55°C-95°C in 0,8°C Intervallen		

Um die relative mRNA-Menge zu ermitteln, wurde zunächst für jede Probe die Zykluszahl bestimmt, bei der sich das Fluoreszenzsignal signifikant vom Hintergrund abhebt (*Cycle threshold* ( $C_T$ )-Wert). Der  $C_T$ -Wert wurde über die lineare Regressionsgerade des Plasmidstandards in die Molekülzahl der Probe umgerechnet. Die Berechnung der relativen Transkriptmengen eines Zielgens erfolgte in Bezug auf die Molekülzahl des Referenzgens GAPDH. GAPDH wird durch einen maternalen Diabetes mellitus nicht beeinflusst (Thieme et al. 2012b).

### 2.6.8.1.2 RT-qPCR-Analyse von cDNA aus microRNA

Für die Quantifizierung von microRNAs mittels RT-qPCR wurden LNA<sup>TM</sup>-angereicherte Oligonukleotide verwendet. *Locked nucleic acids* (LNA<sup>TM</sup>) sind RNA-Analoga, bei denen strukturelle Veränderungen den Ribose-Ring in einer idealen Konformation für Watson-Crick-Bindungen fixieren. Dadurch werden die thermische Stabilität, Sensitivität und Spezifität erhöht. Dies ist insbesondere für die Quantifizierung von kleinen und sehr ähnlichen RNA-Molekülen wie microRNAs von großer Bedeutung. Für jedes eingebaute LNA<sup>TM</sup>-Monomer erhöht sich die Schmelztemperatur des Duplexes um 2-8°C (Exiqon).

Die cDNA wird mittels microRNA-spezifischer *forward*- und *reverse*-Primer amplifiziert (Abb. 8).



**Abb. 8: Schematische Darstellung der RT-qPCR-Reaktion von microRNA mit dem LNA<sup>TM</sup> PCR primer set**

In dem Embryoblast, Trophoblast, der Blastozystenhöhlenflüssigkeit, dem Plasma, Endometrium und der Plazenta von gesunden und diabetischen Kaninchen wurden folgende microRNAs analysiert: miR-27b, -29b, -141, -191, -210, -222 und -433. Für jedes Gewebe wurde nach einer geeigneten internen Referenz gesucht. Dabei wurden die microRNAs als interne Referenz verwendet, die die höchste Stabilität unter Verwendung der Software NormFinder aufwiesen (Andersen, Ledet-Jensen & Ørntoft 2004). Dabei wurde die miR-92a für Embryoblast, Trophoblast und Plazenta, miR-103a für Plasma, U6 für Endometrium und der globale Mittelwert (Mestdagh et al. 2009, D'Haene et al. 2012) für die Blastozystenhöhlenflüssigkeit verwendet.

Für die RT-qPCR wurden 4 µl der 1:40 bzw. 1:20 verdünnten cDNA eingesetzt und folgender Reaktionsansatz hinzugefügt:



ExiLENT SYBR® Green PCR Master Mix	5 µl
microRNA LNA™ PCR primer sets	1 µl

Die RT-qPCR wurde im *StepOnePlus™ Real Time PCR System* unter folgenden Standardbedingungen durchgeführt:

Aktivierung der Polymerase	10 Minuten	95°C	} 45 Zyklen
Denaturierung der cDNA	10 Sekunden	95°C	
Primerbindung und Elongation	20 Sekunden	60°C	
Schmelzkurve	55°C-95°C in 1,6°C/s Intervallen		

Im Anschluss erfolgte die relative Auswertung der Transkripte mit Hilfe der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode (Livak & Schmittgen 2001). Dabei wurden die  $C_T$ -Werte jeder Probe unter Normalisierung auf die gewebespezifischen internen Referenzen (miR-103a, miR-92a, U6, globaler Mittelwert) miteinander verglichen. Unter Verwendung folgender Formeln können die microRNA-Expressionsunterschiede (Ratio) als n-fache Expression ausgedrückt werden:

$$\Delta C_T = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ Behandlung} - \Delta C_T \text{ Kontrolle}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Die Voraussetzungen für diese Berechnungsmethode stellen optimale Effizienzen der beteiligten RT-qPCR-Reaktionen und die Verdopplung der DNA-Menge in jedem Zyklus dar.

## 2.6.9 Klonierung von PCR-Fragmenten

Die Klonierung eines DNA-Fragments in einen Vektor dient der Amplifikation des Gen-spezifischen DNA-Produkts und der anschließenden Herstellung eines Plasmidstandards für die RT-qPCR.

### 2.6.9.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das genspezifische DNA-Fragment wurde in einer PCR amplifiziert und in einem 1,8-2,0%-igen Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die entsprechende DNA-Bande wurde unter UV-Licht ausgeschnitten und mit dem QIAquick® *Gel Extraction Kit* aufgereinigt.

### 2.6.9.2 Ligation der PCR-Fragmente

Da bei der cDNA-Synthese i.d.R. DNA-Fragmente mit Adenosin-Überhängen am 3'-Ende entstehen, wurde für die Ligation der pGEM®-T-Vektor verwendet, der über Thymidin-Überhänge am 3'-Ende verfügt.

Für die Ligation wurden 8 µl des DNA-Fragments für eine Stunde bei Raumtemperatur mit folgendem Reaktionsansatz inkubiert:

Reaktionsansatz:

2x <i>Rapid Ligation</i> Puffer (3 U/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l
T4 DNA-Ligase	1 $\mu$ l
pGEM®-T-Vektor (50 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

**2.6.9.3 Transformation in kompetente Bakterienzellen**

Für die Transformation wurde der Ligationsansatz mit 20  $\mu$ l kompetenten NEB 5-alpha *Escherichia coli*-Bakterien für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Aufnahme des Plasmids durch die Bakterien erfolgte nach einem Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42°C. Nach 5-minütiger Inkubation wurde der Transformationsansatz mit 380  $\mu$ l SOC-Medium (ohne Ampicillin) für eine Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden 50, 75 oder 100  $\mu$ l der Zellsuspension auf Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

*Super Optimal broth with Catabolite repression*(SOC)-Medium (pH 6,8-7,0):

Pepton	20 g
Hefeextrakt	5 g
Glukose	3,603 g
Magnesiumsulfat	2,4 g
Natriumchlorid	0,584 g
Kaliumchlorid	0,186 g
dest. H <sub>2</sub> O	ad 1 l

Das hergestellte SOC-Medium wurde sofort autoklaviert.

Selektionsplatten

Dem flüssigen SOC-Medium wurden vor dem Autoklavieren 3 g/l Agar-Agar zugegeben. Das SOC-Medium wurde vor dem Gebrauch bis zur vollständigen Auflösung der festen Bestandteile auf ca. 55°C erwärmt und mit Ampicillin (100  $\mu$ g/ml), X-Gal (40  $\mu$ g/ml) sowie IPTG (40  $\mu$ g/ml) versetzt.

**2.6.9.4 Selektion und Isolation von Plasmiden aus *E. coli***

Da der pGEM®-T-Vektor ein Ampicillinresistenzgen (*Amp<sup>r</sup>*) enthält, wachsen auf den ampicillinhaltigen Selektionsplatten nur *E. coli*-Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben. Des Weiteren ist mit Hilfe der Blau-Weiß-Selektion eine Beurteilung über den Erfolg der Ligation und somit die Selektion positiver Klone möglich.

Bei der Blau-Weiß-Selektionsmethode kommt es durch den Einbau eines DNA-Fragments in die *multiple cloning site* des Vektors zu einer Verschiebung des Leserasters des dort vorhandenen 5'-Abschnittes des *lacZ*-Gens. *LacZ* ist für die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase verantwortlich, die das Substrat X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid) hydrolytisch zu  $\beta$ -Galaktose und 5-Brom-4-Chlor-3-Hydroxyindol umsetzt. 5-Brom-4-Chlor-3-

Hydroxyindol oxidiert mit Luftsauerstoff und dimerisiert zu einem blauen Farbstoff (5,5'Dibrom-4,4'Dichlor-Indigo), wodurch die Kolonien bei intaktem lacZ-Gen blau erscheinen. Bakterienkolonien mit einer Unterbrechung im lacZ-Gen sind nach Inkubation mit X-Gal und IPTG weiß, da die Bildung einer funktionsfähigen  $\beta$ -Galaktosidase verhindert wird. IPTG dient als Induktor des lacZ-Promoters, da es das inhibierende lac-Repressorprotein bindet.

Die weißen Kolonien wurden gepickt und über Nacht bei 37°C in 5 ml SOC-Medium mit Ampicillin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) schüttelnd inkubiert. Zur Isolation der Plasmide wurden 2 ml der Bakterienkultur für 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert, um die Bakterien zu pelletieren. Der Überstand wurde verworfen. Die weitere Plasmidisolierung erfolgte nach dem Protokoll des QIAprep® Spin Miniprep Kits.

### 2.6.9.5 Restriktionsverdau von Plasmiden

Zur Kontrolle des Klonierungserfolgs wurden die rekombinanten Plasmide mit den zwei Endonukleasen Apal und SacI geschnitten. Für den Restriktionsverdau wurden 3  $\mu\text{l}$  des Plasmids für eine Stunde bei 37°C mit folgendem Reaktionsansatz inkubiert:

#### Restriktionsansatz:

Puffer B <sup>+</sup>	1 $\mu\text{l}$
Apal (10 U/ $\mu\text{l}$ )	0,5 $\mu\text{l}$
SacI (10 U/ $\mu\text{l}$ )	0,5 $\mu\text{l}$
dest. H <sub>2</sub> O	ad 10 $\mu\text{l}$

Anschließend wurde der Reaktionsansatz in einem 1,8%-igen Agarosegel aufgetrennt.

### 2.6.9.6 Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten

Um die Identität von DNA-Fragmenten zu überprüfen, wurden Plasmide und PCR-Produkte mit dem BigDye® Terminator v1.1 *Cycle Sequencing Kit* sequenziert.

#### Sequenzierungsansatz:

BigDye® Terminator v1.1 <i>Cycle Sequencing</i> RR 24	2 $\mu\text{l}$
BigDye® Terminator v1.1 v3.1 5x <i>Sequencing Buffer</i>	1,5 $\mu\text{l}$
T7 Primer (5 pmol/ $\mu\text{l}$ )	0,5 $\mu\text{l}$
Plasmid	2 $\mu\text{l}$
dest. H <sub>2</sub> O	ad 10 $\mu\text{l}$

Die Sequenzierreaktion erfolgte im Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

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

Für die anschließende Aufreinigung des Sequenzierprodukts wurde der Reaktionsansatz mit 1  $\mu\text{l}$  3 M Natriumazetat (pH 5,2) und 40  $\mu\text{l}$  96%-igem Ethanol versetzt und für 30 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die DNA wurde in zwei

weiteren Aufreinigungsschritten mit jeweils 200 µl bzw. 100 µl 70%-igem Ethanol gewaschen und anschließend für 20 bzw. 10 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand abgenommen und die DNA für mindestens 5 Minuten im Rotations-Vakuum-Konzentrator getrocknet. Die Separierung, Detektion und Analyse der fluoreszenzmarkierten DNA erfolgte im ABI PRISM® 3100 *Genetic Analyzer* durch den Sequenzierservice des ZMGs. Die anschließende Sequenzanalyse erfolgte mit Hilfe des *Nucleotide Basic Alignment Search Program* (BLASTN).

#### 2.6.9.7 Herstellung einer Glyzerinkultur

Für die Lagerung von rekombinanten Klonen wurden Glyzerinkulturen hergestellt. Dafür wurden 0,6 ml der Übernachtskultur sowie 0,4 ml Glycerin in ein Reaktionsgefäß gegeben und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

#### 2.6.9.8 Herstellung eines Plasmidstandards für die RT-qPCR

Anhand der Konzentration, der Plasmid- und Fragmentgröße konnte die Molekülzahl pro µl berechnet und eine Verdünnungsreihe von  $10^8$  bis  $10^3$  Molekülen pro 3 µl hergestellt werden. In einer nachfolgenden RT-qPCR wurden die Plasmidstandards nach dem Standardprotokoll getestet und ab einer Effizienz von >90% für darauffolgende RT-qPCRs verwendet. Eine Effizienz von 100% geht von einer Verdopplung der DNA in jedem Zyklus aus. Die Lagerung der Plasmidstandards erfolgte bei -20°C.

## 2.7 Proteinbiochemische Methoden

### 2.7.1 Proteinisolation aus Geweben und Kaninchenblastozysten

Die Endometrium- und Plazentaprobe wurden mit 300 µl RIPA-Puffer versetzt. Für die Proteinisolation aus Kaninchenblastozysten wurden 8-10 Embryoblasten (EB) bzw. Trophoblasten (TB) gepoolt und 40 µl (EB; 4 µl pro EB) bzw. 120 µl (TB; 12 µl pro TB) RIPA-Puffer zugegeben. Vor der Verwendung wurden dem RIPA-Puffer Phosphatase-Inhibitor (2 µl/100 µl) und Protease-Inhibitor (2 µl/100 µl) hinzugegeben.

#### RIPA (radio immunoprecipitation assay)-Puffer:

10x PBS-Puffer	10 ml
Nonidet P-40	1 ml
Natrium-Desoxycholat	0,5 g
SDS (10%)	100 µl
dest. H <sub>2</sub> O	ad 100 ml

Die Proben wurden für 15 Sekunden im Precellys<sup>24</sup> homogenisiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben bei 13.000 rpm und 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Der

Überstand, der v.a. zytoplasmatisches Protein enthält, wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt.

Die im Zellpellet enthaltenen Kernproteine wurden in 25 µl (EB) bzw. 90 µl (TB) RIPA-Puffer unter Zugabe von 5 µl (EB) bzw. 18 µl (TB) *Reducing Sample* (RS)-Puffer gelöst. Für das Aufbrechen der Kernmembran wurden die Proben 5-mal für je 7 Minuten abwechselnd für 30 Sekunden bei 103 W indirekt mit Ultraschall behandelt und zwischenzeitlich für 30 Sekunden auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Proben für 15 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Da der RS-Puffer SDS enthält, konnte die Konzentration der Kernproteine nicht mit dem Bradford-Test bestimmt werden.

RS -Puffer (pH 6,8):

TRIS-Puffer (1M, pH 6,8)	4 ml
Glyzerin	4 ml
1x TBS	4 ml
Mercaptoethanol	0,4 ml
SDS (10%)	4 ml
Bromphenolblau	Spatelspitze
dest. H <sub>2</sub> O	ad 20 ml

## 2.7.2 Proteinquantifizierung

Die Konzentration zytoplasmatischer Proteine wurde in Doppelbestimmung mittels Bradford-Test bestimmt. Dabei wurde 1 µl der Proteinprobe für mindestens 5 Minuten mit folgendem Reaktionsansatz inkubiert:

Reaktionsansatz:

Bradford-Reagenz	200 µl
dest. H <sub>2</sub> O	800 µl

Anschließend wurde im Spektrophotometer die Absorption des Leerwerts und der Proteinproben bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Anhand einer Eichkurve, die zuvor mit bekannten Konzentrationen an BSA in RIPA erstellt wurde, konnte die Proteinkonzentration der Proben ermittelt werden.

## 2.7.3 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgel-elektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülgröße erfolgte über eine SDS-Page nach Laemmli (1970). Dabei werden die Proteine zunächst durch SDS und Mercaptoethanol denaturiert und linearisiert. SDS überdeckt zudem über die Bindung an Proteine deren Eigenladung und ermöglicht die Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülgröße.

### 2.7.3.1 Herstellung eines Polyacrylamidgels

Für die Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels werden Sammelgel und Trenngel in einem Verhältnis von 1:4 in Gelkassetten gegossen. Die SDS-PAGE von zytoplasmatischen Proteinen wurde mit einem 10%-igen Trenngel durchgeführt. Für die SDS-PAGE von Kernproteinen unterschiedlicher Größe wurde ein Gradientengel (10%- auf 15%-iges Trenngel) verwendet, das durch die lineare Steigung der Polyacrylamid-Konzentration gekennzeichnet ist.

	<b>4% Sammelgel</b>	<b>10% Trenngel</b>	<b>15% Trenngel</b>
H <sub>2</sub> O	2,85 ml	4,0	2,3 ml
Acrylamid (30%)	520 µl	3,3	5,0 ml
TRIS-Puffer (1 M, pH 6,8)	1 ml	-	-
TRIS-Puffer (1,5 M, pH 8,8)	-	2,5 ml	2,5 ml
SDS (10%)	40 µl	100 µl	100 µl
APS (10%)	40 µl	100 µl	100 µl
TEMED	4 µl	4 µl	4 µl

Das polymerisierte Polyacrylamidgel wurde in die NOVEX-Elektrophoresekammer eingesetzt, der Taschenkamm entfernt und die Kammer mit 1x Laufpuffer gefüllt.

#### 10x Laufpuffer nach Laemmli:

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

### 2.7.3.2 Probenaufbereitung

25 µg Protein wurden mit 5 x Ladepuffer und dest. Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20-50 µl aufgefüllt.

#### 5x SDS-Ladepuffer:

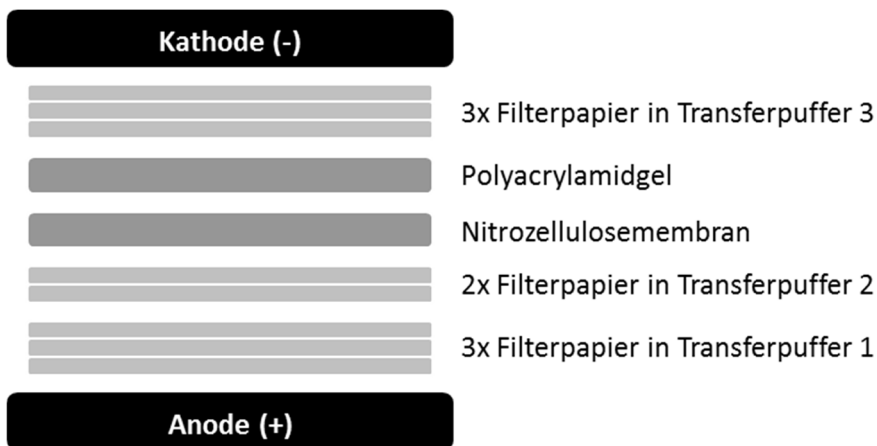
Glyzerin	25 ml
TRIS-Puffer (1 M, pH 6,8)	15,62 ml
β-Mercaptoethanol	5 ml
SDS	5 g
Bromphenolblau	2,5 g
dest. H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

Die Proteine wurden für 10 Minuten bei 70°C denaturiert und in die Ladetaschen des Sammelgels überführt. Die mitgeführten Proteinmarker *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* 10-170K und *SM Prestained Protein Ladder* dienen der Größenbestimmung. Nach der Konzentrierung der Proben im Sammelgel wurde die Spannung für die Größenauftrennung der Proteine im Trenngel von 100 V auf 160 V (zytoplasmatische Proteine) bzw. von 20 mA auf 40 mA (Kernproteine) erhöht.

### 2.7.4 Western Blot

Mit Hilfe des Semidry-Blotverfahrens wurden die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Um die Proteinbindungsstellen der Nitrozellulosemembran zu aktivieren, wurde diese kurzzeitig in methanolhaltigen (20%) Puffer gelagert. Für den Aufbau des Blots wurden acht Whatman™ Filterpapiere in den Maßen 8x7,5 cm verwendet, die zuvor in verschiedenen methanolhaltigen (20%) Transferpuffern getränkt wurden (Abb. 9).

	<b>Transferpuffer 1</b>	<b>Transferpuffer 2</b>	<b>Transferpuffer 3</b>
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	<i>ad</i> 1000 ml	<i>ad</i> 1000 ml	<i>ad</i> 1000 ml



**Abb. 9: Aufbau eines Semidry-Blots**

Bei dem Blot-Verfahren wird ein senkrecht zum Polyacrylamidgel gerichtetes elektrisches Feld von 150 mA für 2 Stunden angelegt. Aufgrund der negativen Ladung der Proteine wandern diese in Richtung Anode und werden von der Nitrozellulosemembran gebunden.

Nach erfolgtem Transfer werden die Proteine auf der Nitrozellulosemembran mit Ponceau S angefärbt, um die Transfereffizienz zu überprüfen.

### 2.7.5 Hybridisierung mit verschiedenen Antikörpern

Die Nitrozellulosemembran wurde für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT) mit einer Blocklösung inkubiert, um die unspezifische Bindung von Antikörpern an freie Proteinbindungsstellen der Membran zu verhindern. Dafür wurde eine 3%-ige bzw. eine 5%-ige BSA- bzw. Magermilchpulver-TBST-Lösung verwendet. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte über Nacht bei 4°C (Tab. 8). Um ungebundenen Primärantikörper zu entfernen, wurde die Membran am darauffolgenden Tag für 3x5 Minuten bzw. 6x5 Minuten

in TBST gewaschen und mit dem Sekundärantikörper für 2 Stunden inkubiert. Die Membran wurde zur Entfernung des Sekundärantikörpers erneut für 3x5 Minuten bzw. 6x5 Minuten in TBST sowie 2x5 Minuten in TBS gewaschen.

<u>TBS-Puffer:</u>		<u>TBST-Puffer:</u>	
TRIS (1,5 M pH 7,5)	10 ml	TRIS (1,5 M pH 7,5)	10 ml
NaCl	5,8 g	NaCl	5,8 g
		Tween 20	1 ml
dest. H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	dest. H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

**Tab. 8: Protokoll für die Hybridisierung mit den verwendeten Primär- und Sekundär-antikörpern**

Primär-antikörper	Blockierung	Spezies	Verdünnung	Sekundär-antikörper	Verdünnung
Anti-Dicer	3% Milch/ TBST, 2h RT	Kaninchen	1:250 in 3% Milch/TBST	Anti-Rabbit-IgG, HRP-konjugiert	1:5000 in 5% BSA/ TBST
Anti-Dicer	3% BSA/ TBST, 2h RT	Maus	1:1000 in 3% BSA/TBST	Anti-Maus-IgG, HRP-konjugiert	1:10000 in 3% BSA/TBST
Anti-Drosha	5% Milch/ TBST, 2h RT	Kaninchen	1:250 in 5% Milch/TBST	Anti-Rabbit-IgG, HRP-konjugiert	1:5000 in 3% BSA/ TBST
Anti-Drosha	5% Milch/ TBST, 2h RT	Maus	1:250 in 5% Milch/TBST	Anti-Maus-IgG, HRP-konjugiert	1:5000 in 3% BSA/TBST
Anti-β-Aktin	5% Milch/ TBST, 2h RT	Maus	1:20000 in 3% BSA/ TBST	Anti-Maus-IgG, HRP-konjugiert	1:45000 in 3% BSA/ TBST
Anti-Histon H3	5% Milch/ TBST, 2h RT	Maus	1:1000 in 5% Milch/TBST	Anti-Maus-IgG, HRP-konjugiert	1:5000 in 3% BSA/ TBST

### 2.7.6 Proteindetektion und Auswertung

Die verwendeten Sekundärantikörper sind mit dem Enzym Meerrettichperoxidase konjugiert, das die Oxidation von Luminol katalysiert und eine Chemolumineszenz-Reaktion induziert. Dafür wurde die Nitrozellulosemembran mit *Luminata™ Forte Western HRP substrate* inkubiert. Die Intensität des Chemolumineszenzsignals ist proportional der gebundenen Antikörpermenge und wurde mit Hilfe einer Kameraaufnahme am *ChemiDoc™ Touch Imaging System* detektiert. Durch den Bezug der Zielproteinbande auf die Ladekontrollproteine β-Aktin (Blot mit zytoplasmatischen Proteinen) bzw. Histon H3 (Blot mit Kernproteinen) wurden Mengenunterschiede bei der Proteinbeladung relativiert. Die normalisierte Zielproteinmenge von gesunden Tieren wurde 100% gesetzt.



## 2.8 MicroRNA Zielgen-Vorhersage

Für die Untersuchung von potentiellen microRNA-Zielgenen, wurden validierte sowie vorhergesagte Zielgene der miR-27b, miR-141, miR-191 und miR-222 untersucht, die im Zusammenhang mit Implantation und Reproduktion stehen. Die Suche nach experimentell validierten Zielgenen erfolgte mit Hilfe der Datenbank MiRTarbase (Chou et al. 2016).

Der Ermittlung von vorhergesagten, bislang nicht validierten Zielgenen dienen die Datenbanken TargetScan (Agarwal et al. 2015) und miRDB (Wong und Wang 2015), deren Schnittmenge anhand der Datenbankanwendung Microsoft Access ermittelt wurde. Für die bioinformatische Vorhersage von microRNA-Zielgen-Interaktionen wird unter Verwendung eines Datenbank-spezifischen Algorithmus die Sequenzkomplementarität konservierter 3'-UTRs und microRNA-Seed-Sequenzen untersucht.

## 2.9 MicroRNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse von microRNAs aus Kaninchenembryonen (d5,5, d6,5 und d14 *p.c.*) erfolgte mittels der Sequenzen, die von der Arbeitsgruppe Elen Gocza (Maraghechi et al. 2013) durch die Sequenzierung-durch-Ligations-Methode (*Sequencing by Oligo Ligation Detection*, SOLiD) ermittelt wurden.

Mit Hilfe der Sequenzabgleich-Programme BLAT und BLASTN (Ensembl database; Yates et al. 2016, release 86) wurden die SOLiD-Sequenzen im Genom des Kaninchens lokalisiert und auf ihre Sequenzähnlichkeit mit humanen, murinen und bovinen microRNAs untersucht. Die dafür benötigten humanen, murinen und bovinen microRNA-Sequenzen der miR-27b, miR-29b, miR-141, miR-210, miR-222, miR-433 und miR-92a wurden aus den Datenbanken miRBase (Kozomara & Griffiths-Jones 2014) und Ensembl (Yates et al. 2016, release 86) bezogen. Der Identifizierung der mutmaßlichen pre-microRNA-Sequenzen des Kaninchens diente der Abgleich mit humanen pre-microRNA-Sequenzen mittels BLASTN. Die Generierung der Sekundärstruktur der pre-microRNAs erfolgte mit dem Programm RNAfold (Gruber et al. 2008) und wurde als Sekundärstruktur mit minimal freier Energie (MFE) dargestellt.

## 2.10 Statistische Analysen

Mit Hilfe des Programms *QuickCalcs* wurde ein Ausreißertest nach Grubbs durchgeführt, um Ausreißer in den Messwerten zu identifizieren und zu eliminieren. Die statistische Auswertung der Messdaten erfolgte mit dem Programm SigmaPlot® 12.0. Im Falle einer Normalverteilung wurden die Daten mit Hilfe eines zweiseitigen t-Tests auf ihre Signifikanz überprüft. Ein U-Test (Wilcoxon *rank sum* Test) wurde durchgeführt, wenn keine Normalverteilung der Messdaten vorlag. Die zweifaktorielle Varianzanalyse (zweifaktorieller ANOVA) wurde genutzt, um zwei unabhängige Variablen miteinander zu vergleichen (Tab. 9). Für die Untersuchung einer

unabhängigen Variablen in unterschiedlichen Gruppen, wurde ein einfaktorieller ANOVA verwendet. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt gekennzeichnet: Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  kleiner 5% als  $*p < 0,05$ , kleiner 1% als  $**p < 0,01$  und kleiner 0,1% als  $***p < 0,001$ . Alle Werte wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (MW $\pm$ STF) angegeben. Die Zahl der unabhängigen Versuche wird mit N markiert und n bezeichnet die Gesamtprobenanzahl.

**Tab. 9: Übersicht über die angewandten statistischen Tests**

Probenmaterial	Analyse	Variablen	Statistischer Test
Plasma	microRNA	Diabetes & Gravidität	zweifaktorieller ANOVA
Endometrium	microRNA + mRNA	Diabetes	t-Test/ U-Test
Blastozysten <i>in vivo</i>	microRNA + mRNA	Diabetes & Zellart (EB/TB)	zweifaktorieller ANOVA
Blastozystenhöhlenflüssigkeit <i>in vivo</i> + <i>in vitro</i>	microRNA	Diabetes	t-Test/ U-Test
		Stimulus	
Embryoblast/ Trophoblast <i>in vitro</i>	microRNA	Stimulus	einfaktorieller ANOVA (Glukose)
			t-Test/ U-test (Insulin, IGF2, LIF)
Plazenta	microRNA + Protein	Diabetes	t-Test/ U-Test

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Sequenzanalyse von reifen microRNAs und deren mutmaßliche Sekundärstruktur in Kaninchenblastozysten**

Für die Sequenzen der miR-27b, -222 und -433 konnten beide microRNA-Stränge im SOLiD-Sequenz-Datensatz identifiziert werden. Sie weisen eine 100%-ige Sequenzhomologie zu ihren humanen, murinen und bovinen Orthologen auf (siehe Anhang Tab. 13). Hingegen konnte in Kaninchenembryonen für die miR-29b, -141, -210 bzw. -92a nur die Sequenz des 3p-Stranges identifiziert werden. Diese sind zu den humanen, murinen und bovinen microRNA-Sequenzen überwiegend identisch. Unter Verwendung der bekannten humanen, murinen und bovinen miR-29b-5p, -141-5p, -210-5p und -92a-1-5p-Sequenzen konnte mit Hilfe von BLASTN eine hohe Sequenzhomologie für diese microRNAs im Kaninchengenom festgestellt werden. Die ocu-miR-191 konnten Maraghechi et al. (2013) bereits für das Kaninchengenom annotieren (ocu-miR-191). Sie weist eine 100%-ige Sequenzhomologie zur humanen, murinen und bovinen miR-191 auf.

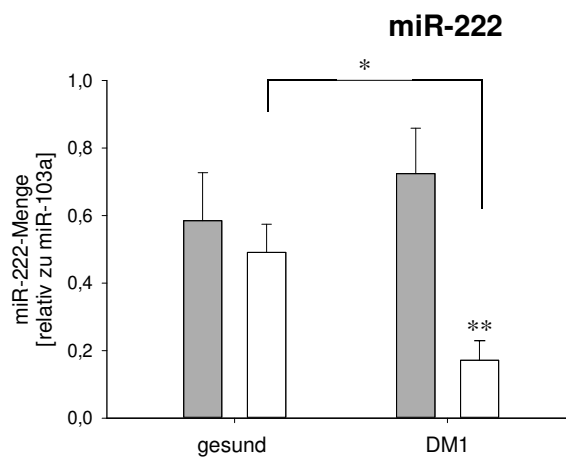
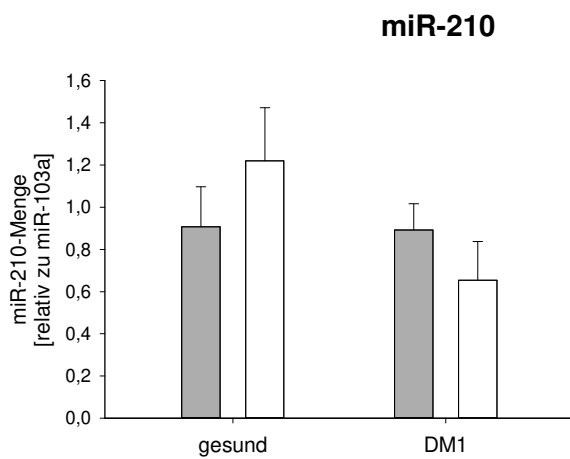
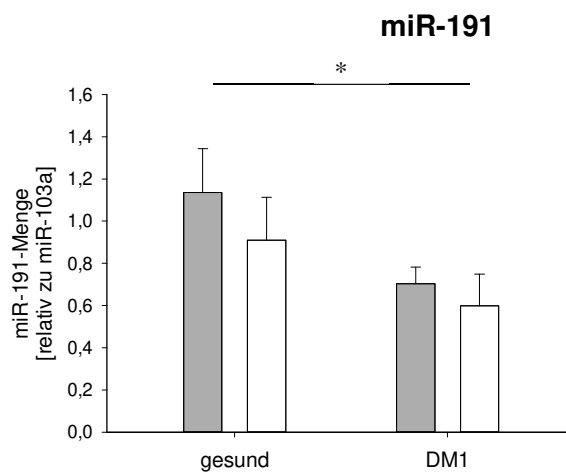
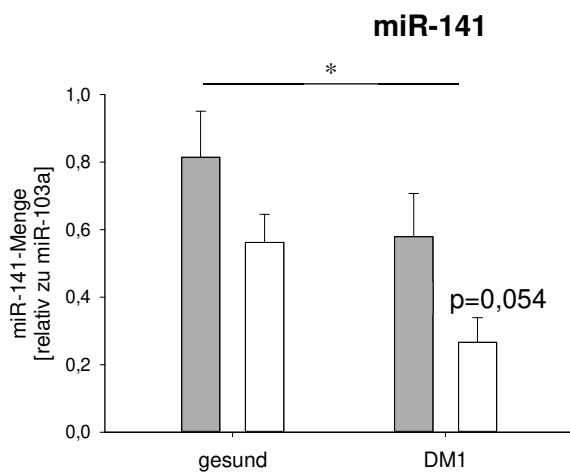
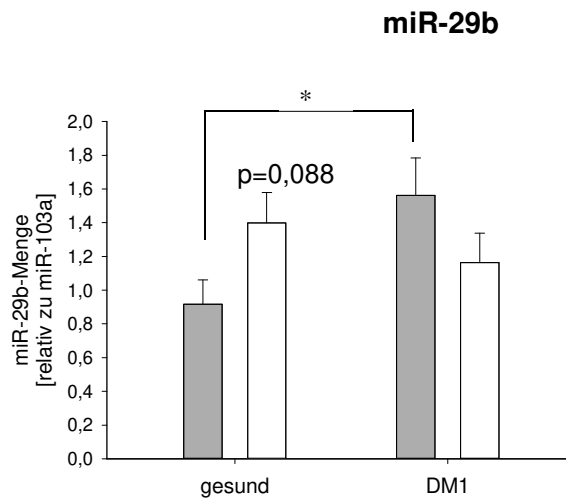
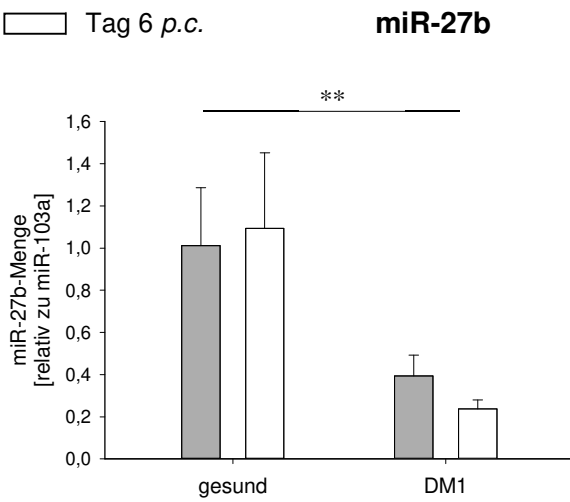
Der Abgleich der humanen pre-microRNA-Sequenzen mit dem Kaninchengenom führte zur Identifizierung der mutmaßlichen ocu-pre-miR-Sequenzen der pre-miR-27b, -29b, -141, -222, -433 und -92a und ihrer entsprechenden Sekundärstrukturen (siehe Anhang Abb. 30). Dabei war eine große Sequenzhomologie zu den humanen Orthologen festzustellen. Für die miR-210 konnte keine Übereinstimmung mit der humanen pre-microRNA-Sequenz im Kaninchengenom identifiziert werden.

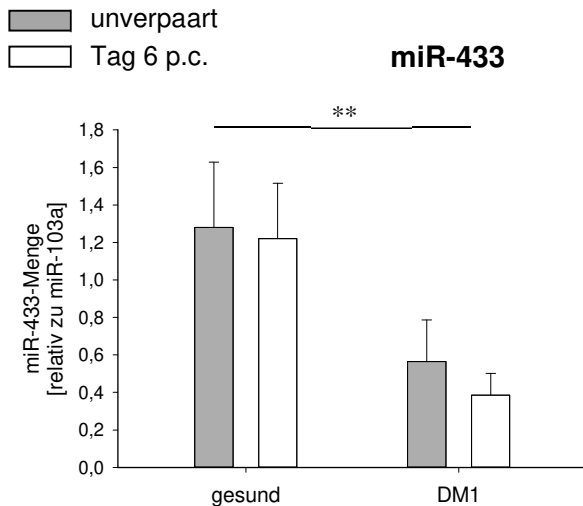
#### **3.2 Expression spezifischer microRNAs, microRNA-prozessierender Enzyme und von microRNA-Zielgenen im mütterlichen Gewebe diabetischer Kaninchen**

##### **3.2.1 Expression spezifischer microRNAs im Blutplasma diabetischer Kaninchen**

Die relativen microRNA-Mengen wurden im Blutplasma gesunder und diabetischer Kaninchen verglichen. Dabei konnten alle untersuchten microRNAs im Plasma quantifiziert werden. Im Plasma gravider und nicht-gravider diabetischer Kaninchen waren die microRNA-Mengen von miR-27b, -141, -191 und -433 verringert. Die miR-222 war nur im Plasma schwangerer diabetischer Kaninchen reduziert, wohingegen die miR-29b im Plasma nicht-gravider diabetischer Kaninchen erhöht war. Ein Einfluss der Gravität konnte für die miR-222 im Plasma diabetischer Kaninchen festgestellt werden (Abb. 10).

■ unverpaart  
 □ Tag 6 p.c.



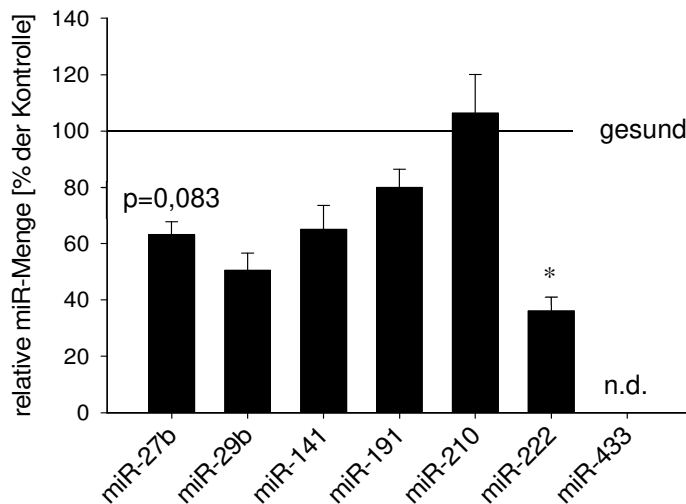


**Abb. 10: Relative microRNA-Mengen im Plasma gesunder und diabetischer (DM1) Kaninchen vor der Verpaarung und am 6. Tag der Gravidität**

Die Quantifizierung der miR-27b, -29b, -141, -191, -210, -222 und -433 erfolgte im Blutplasma von nicht-graviden und graviden Kaninchen mittels RT-qPCR. Anschließend wurden die relativen microRNA-Mengen nach der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode berechnet und auf die relative Menge an miR-103a normiert. Die Ergebnisse sind als  $MW \pm STF$  mit  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$  dargestellt.  $N=3$ ,  $n \geq 6$ .

### 3.2.2 Expression spezifischer microRNAs im Endometrium diabetischer Kaninchen

Im Endometrium von gesunden und diabetischen Kaninchen waren alle microRNAs, mit Ausnahme der miR-433, nachweisbar. Für die miR-222 konnte eine signifikante Abnahme der microRNA-Menge im Endometrium diabetischer Kaninchen gemessen werden (Abb. 11).

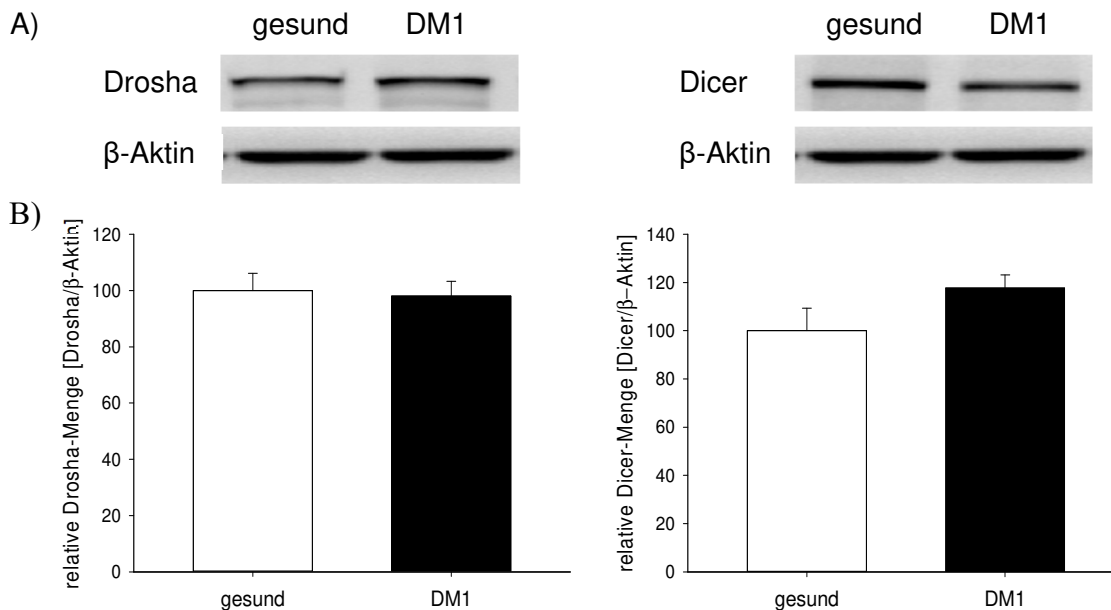


**Abb. 11: Relative microRNA-Mengen im Endometrium diabetischer Kaninchen**

Die Quantifizierung der miR-27b, -29b, -141, -191, -210, -222 und -433 erfolgte im Endometrium von gesunden und diabetischen Kaninchen mittels qPCR. Anschließend wurden die relativen microRNA-Mengen nach der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode berechnet, auf die relative Menge an U6 normiert und die microRNA-Menge gesunder Kaninchen 100% gesetzt. Die Ergebnisse sind als  $MW \pm STF$  mit  $*p < 0,01$  dargestellt.  $N=3$ ,  $n=8$ , n.d.=nicht detektierbar.

### 3.2.3 Expression von Drosha und Dicer im Endometrium diabetischer Kaninchen

Die Proteinexpression der microRNA-prozessierenden Enzyme Drosha und Dicer wurde im Endometrium gesunder und diabetischer Kaninchen mittels Western Blot bestimmt (Abb. 12). Die Proteinmenge beider Enzyme war im Endometrium diabetischer und gesunder Kaninchen annähernd gleich.

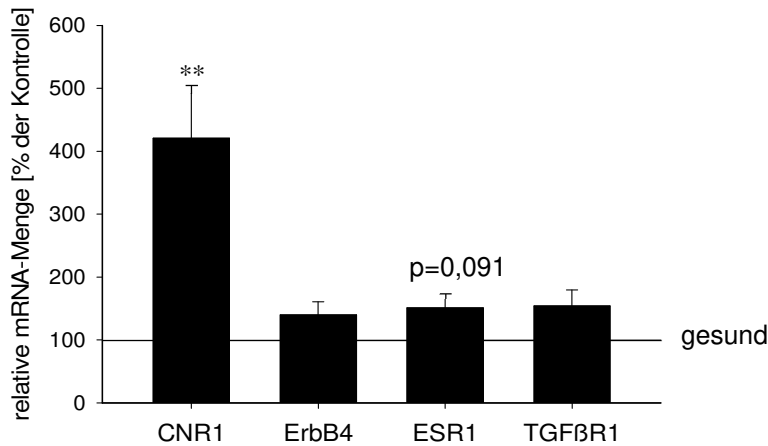


**Abb. 12: Relative Drosha- und Dicer-Proteinmengen im Endometrium diabetischer (DM1) Kaninchen**

Für die Quantifizierung der relativen Proteinmengen von Drosha und Dicer mittels SDS-PAGE und Western-Blot (A) wurden 25  $\mu$ g Gesamtprotein pro Probe aufgetragen und die Antikörperbindung densitometrisch ausgewertet (B). Die Drosha- und Dicer-Proteinmenge wurde auf die Proteinmenge von  $\beta$ -Aktin normiert. Die normalisierte Proteinmenge von gesunden Tieren wurde 100% gesetzt. Die Ergebnisse sind als  $MW \pm STF$  dargestellt.  $N=3$ ,  $n=8$ .

### 3.2.4 Expression von miR-222-Zielgenen im Endometrium diabetischer Kaninchen

Da die miR-222-Menge im Endometrium diabetischer Kaninchen verringert war, wurde die Expression der miR-222-Zielgene CNR1, ErbB4, ESR1 und TGF $\beta$ R1 im Endometrium mittels RT-qPCR quantifiziert. Für CNR1 konnte eine erhöhte mRNA-Expression im Endometrium diabetischer Tiere festgestellt werden (Abb. 13).



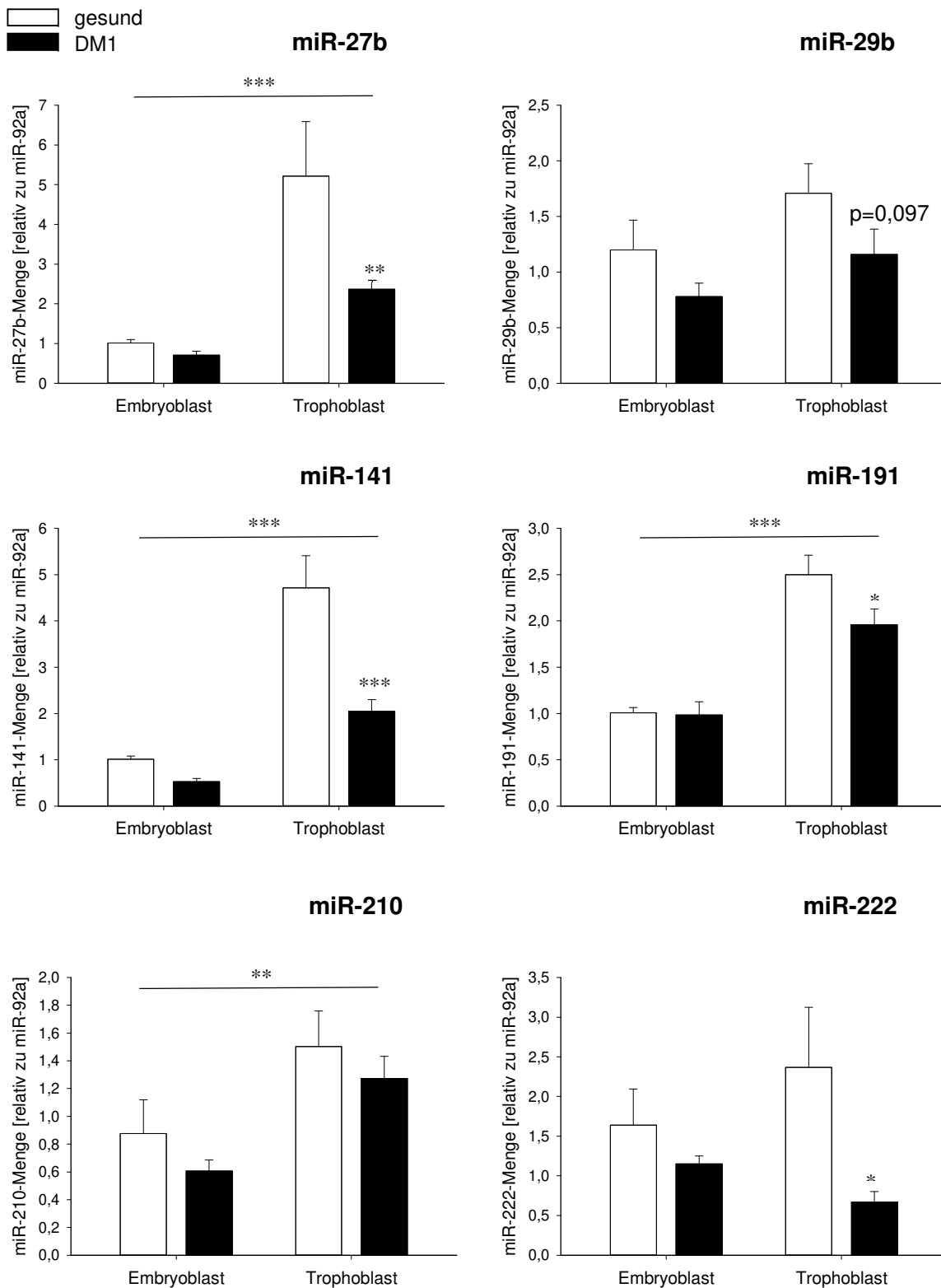
**Abb. 13: Relative mRNA-Mengen der miR-222-Zielgene CNR1, ErbB4, ESR1 und TGFβR1 im Endometrium diabetischer Kaninchen**

Die relative mRNA-Menge im Endometrium von gesunden und diabetischen Kaninchen wurde mittels RT-qPCR bestimmt. Für die Bestimmung der Molekülzahlen von CNR1, ErbB4, ESR1 und TGFβR1 wurde ein Plasmidstandard mitgeführt. Für jede Probe wurde die Molekülzahl der jeweiligen Zielgene auf die Anzahl der GAPDH-Moleküle normiert. Die mRNA-Mengen gesunder Kaninchen wurde 100% gesetzt. Die Ergebnisse sind als MW±STF mit \*\* $p < 0,01$  dargestellt. N=3, n≥6.

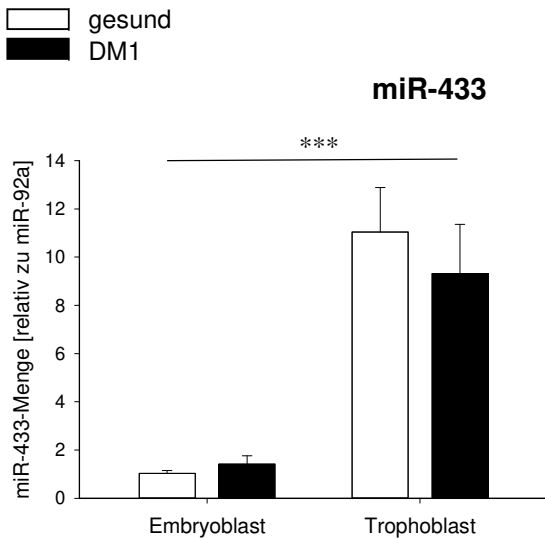
### 3.3 Charakterisierung der Expression spezifischer microRNAs, microRNA-prozessierender Proteine und von Zielgenen in Blastozysten diabetischer Kaninchen

#### 3.3.1 Expression spezifischer microRNAs im Embryoblasten und Trophoblasten diabetischer Kaninchen

Die relativen microRNA-Mengen im Embryoblasten und Trophoblasten gesunder und diabetischer Kaninchen wurden mittels RT-qPCR quantifiziert. Alle untersuchten microRNAs waren in beiden Zellarten nachweisbar. Für die miR-27b, -141, -191, -210 und -433 zeigte sich eine deutlich höhere microRNA-Expression im Trophoblasten im Vergleich zum Embryoblasten unabhängig vom Einflussfaktor Diabetes. Die microRNA-Mengen der miR-29b und miR-222 waren in beiden Zelllinien annähernd gleich. Ein mütterlicher Diabetes hatte keinen Einfluss auf die microRNA-Expression in Embryoblastzellen. Eine deutliche Verringerung der miR-27b-, -141-, -191-, -222-Expression konnte in Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen quantifiziert werden (Abb. 14). Die miR-29b, -210 und -433-Expression war in Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen unverändert.





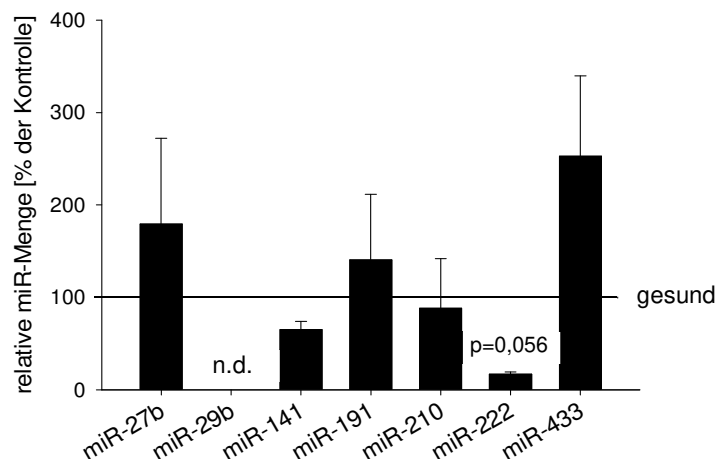


**Abb. 14: Relative microRNA-Mengen im Embryoblasten und Trophoblasten diabetischer Kaninchen**

Die Quantifizierung der miR-27b, -29b, -141, -191, -210, -222 und -433 erfolgte in Embryoblasten und Trophoblasten von Embryonen gesunder und diabetischer (DM1) Kaninchen mittels RT-qPCR. Anschließend wurden die relativen microRNA-Mengen nach der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode berechnet und auf die relative Menge an miR-92a normiert. Die Ergebnisse sind als MW $\pm$ STF mit \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  dargestellt. N=3, n $\geq$ 5 gepoolte Proben von jeweils 4 Embryoblasten bzw. 4 Trophoblasten.

### 3.3.2 Nachweis und Quantifizierung spezifischer microRNAs in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit

In der Blastozystenhöhlenflüssigkeit von Tag 6 *p.c.* Embryonen konnten nahezu alle microRNAs mittels RT-qPCR quantifiziert werden. Die miR-29b lag unterhalb der Nachweisgrenze. Die microRNA-Mengen an miR-27b, -141, -191-, 210- und -433 waren in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit von gesunden und diabetischen Tieren annähernd gleich (Abb. 15).



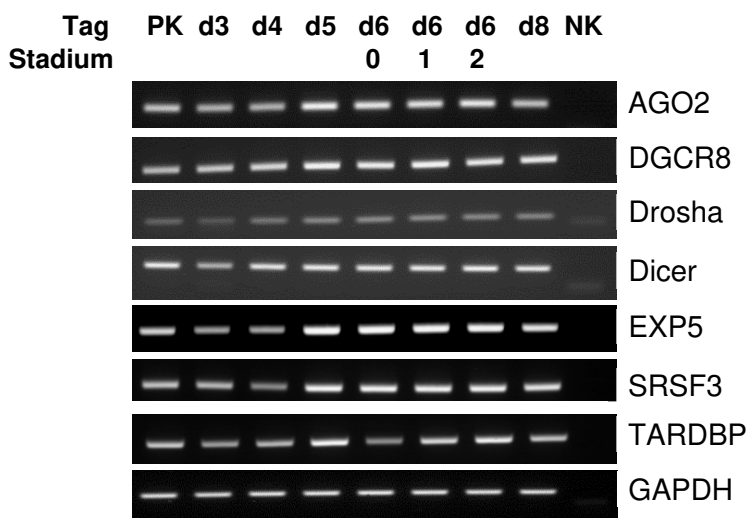
**Abb. 15: Relative microRNA-Mengen in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit diabetischer Kaninchen**

Die Quantifizierung der miR-27b, -29b, -141, -191, -210, -222 und -433 erfolgte in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit (BF) von Tag 6 *p.c.* Blastozysten gesunder und diabetischer Tiere mittels RT-qPCR. Anschließend wurden die relativen microRNA-Mengen nach der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode berechnet, auf den globalen Mittelwert normiert und die microRNA-Menge gesunder Kaninchen 100% gesetzt. Die Ergebnisse sind als MW $\pm$ STF dargestellt. N=3, n=3 gepoolte Proben BF à 100  $\mu$ l von jeweils 4-7 Blastozysten, n.d.= nicht detektierbar

### 3.3.3 Expression von Genen der microRNA-Biogenese in Kaninchenembryonen

#### 3.3.3.1 Ontogenetische Expression von Genen der microRNA-Biogenese in Blastozysten gesunder Kaninchen

Die AGO2-, DGCR8-, Dicer-, Drosha-, EXP5-, SRSF3- und TARDBP-Expression wurde während der frühen Embryonalentwicklung mittels RT-PCR untersucht (Abb. 16). Die Transkription von AGO2, DGCR8, Drosha, Dicer, EXP5, SRSF3 und TARDBP war ab Tag 3 *p.c.* in allen Embryonalstadien nachweisbar.

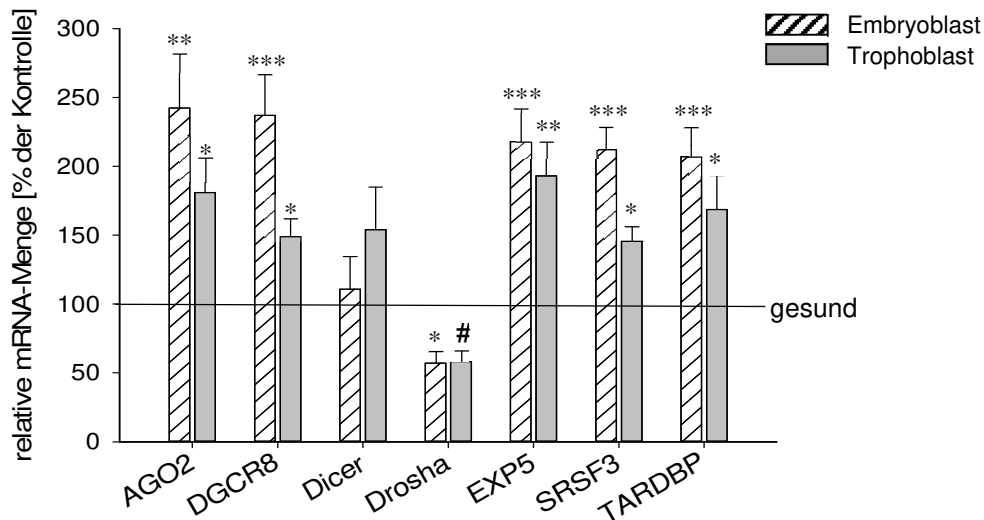


**Abb. 16: Ontogenetische Expression von Genen der microRNA-Biogenese in Präimplantationsembryonen des Kaninchens**

Die ontogenetische Expression von AGO2, DGCR8, Dicer, Drosha, EXP5, SRSF3 und TARDBP wurde in gepoolten Embryonen am Tag 3 (d3; n=27), 4 (d4, n=15) und 5 (d5, n=8) und in individuellen Blastozysten am Tag 6 (d6) der verschiedenen Gastrulationsstadien (Stadium 0, 1, 2) und Tag 8 *p.c.* (d8) mittels RT-PCR untersucht. Eine RT-PCR auf GAPDH diente als cDNA-Kontrollreaktion. Eine Probe ohne cDNA wurde als Negativkontrolle (NK), eine Probe mit cDNA aus Lebergewebe des Kaninchens als Positivkontrolle (PK) verwendet.

#### 3.3.3.2 Quantifizierung der mRNA- und Proteinmengen von Genen der microRNA-Biogenese im Embryoblasten und Trophoblasten 6 Tage alter Kaninchenblastozysten

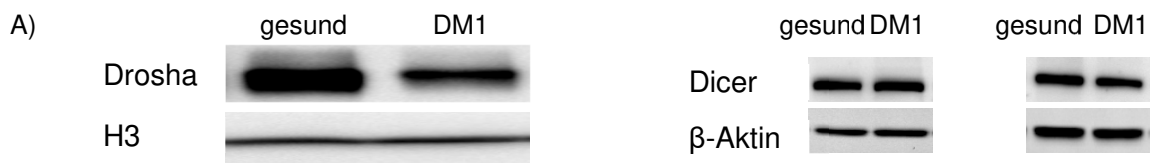
Die Analyse von microRNA-prozessierenden Genen in Embryoblast- und Trophoblastzellen (Stadium 1) gesunder und diabetischer Kaninchen erfolgte mittels RT-qPCR (Abb. 17) und für Drosha und Dicer zusätzlich mittels Western Blot (Abb. 18). Die AGO2-, DGCR8-, EXP5-, SRSF3- und TARDBP-mRNA-Expression war sowohl im Embryoblasten als auch im Trophoblasten diabetischer Kaninchen erhöht, wohingegen die Dicer-Menge in beiden embryonalen Geweben annähernd gleich war. Für Drosha konnte eine Abnahme der Transkriptmenge im Embryoblasten diabetischer Kaninchen gemessen werden (Abb. 17).

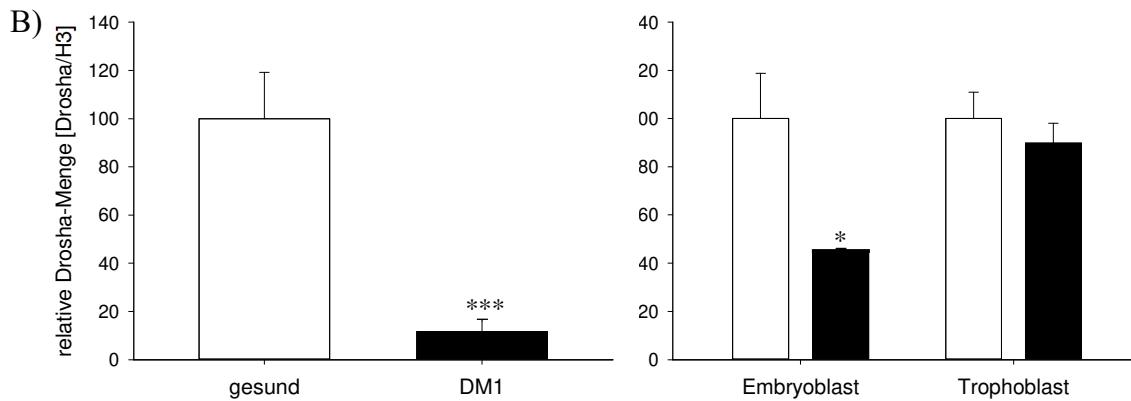


**Abb. 17: Relative mRNA-Mengen von microRNA-prozessierenden Proteinen im Embryoblasten und Trophoblasten diabetischer Kaninchen**

Die relativen mRNA-Mengen des Embryoblasten und Trophoblasten von Embryonen gesunder und diabetischer Kaninchen wurden mittels RT-qPCR bestimmt. Für die Quantifizierung der Molekülzahlen wurde ein Plasmidstandard mitgeführt. Die Molekülzahl der Zielgene wurde auf die Anzahl der GAPDH-Moleküle normiert und die mRNA-Menge von Embryonen gesunder Kaninchen 100% gesetzt. Die Ergebnisse sind als  $MW \pm STF$  mit \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; # $p = 0,094$  dargestellt.  $N=3$ ,  $n \geq 6$ .

Die Drosha-Proteinmenge war im Trophoblasten diabetischer Kaninchen deutlich verringert (Abb. 18). Die Quantifizierung von Drosha in Embryoblastzellen war aufgrund der zu geringen Kernproteinmengen nicht möglich. Für Dicer konnte im Embryoblasten diabetischer Tiere eine Verringerung in der Dicer-Proteinmenge gemessen werden. Die Dicer-Proteinexpression im Trophoblasten gesunder und diabetischer Tiere war annähernd gleich (Abb. 18).





**Abb. 18: Relative Drosha- und Dicer-Proteinmenge im Embryoblasten und Trophoblasten diabetischer (DM1) Kaninchen**

Die Analyse der Kernprotein- (Drosha) und zytoplasmatischen Proteinmengen (Dicer) des Embryoblasten und Trophoblasten von Embryonen gesunder und diabetischer (DM1) Kaninchen erfolgte mittels SDS-PAGE und Western-Blot (A). Die Antikörperbindung wurde densitometrisch ausgewertet (B). Die Drosha- und Dicer-Proteinmenge wurde auf die Proteinmenge von H3 oder  $\beta$ -Aktin normiert. Die normalisierte Proteinmenge von gesunden Tieren wurde 100% gesetzt. Die Ergebnisse sind als  $MW \pm STF$  mit  $*p < 0,05$ ;  $***p < 0,001$  dargestellt.  $N=3$ ,  $n=3$  gepoolte Proben von jeweils 8-10 Embryoblasten bzw. 8-10 Trophoblasten

### 3.3.4 Expression spezifischer microRNA-Zielgene im Embryoblasten und Trophoblasten diabetischer Kaninchen

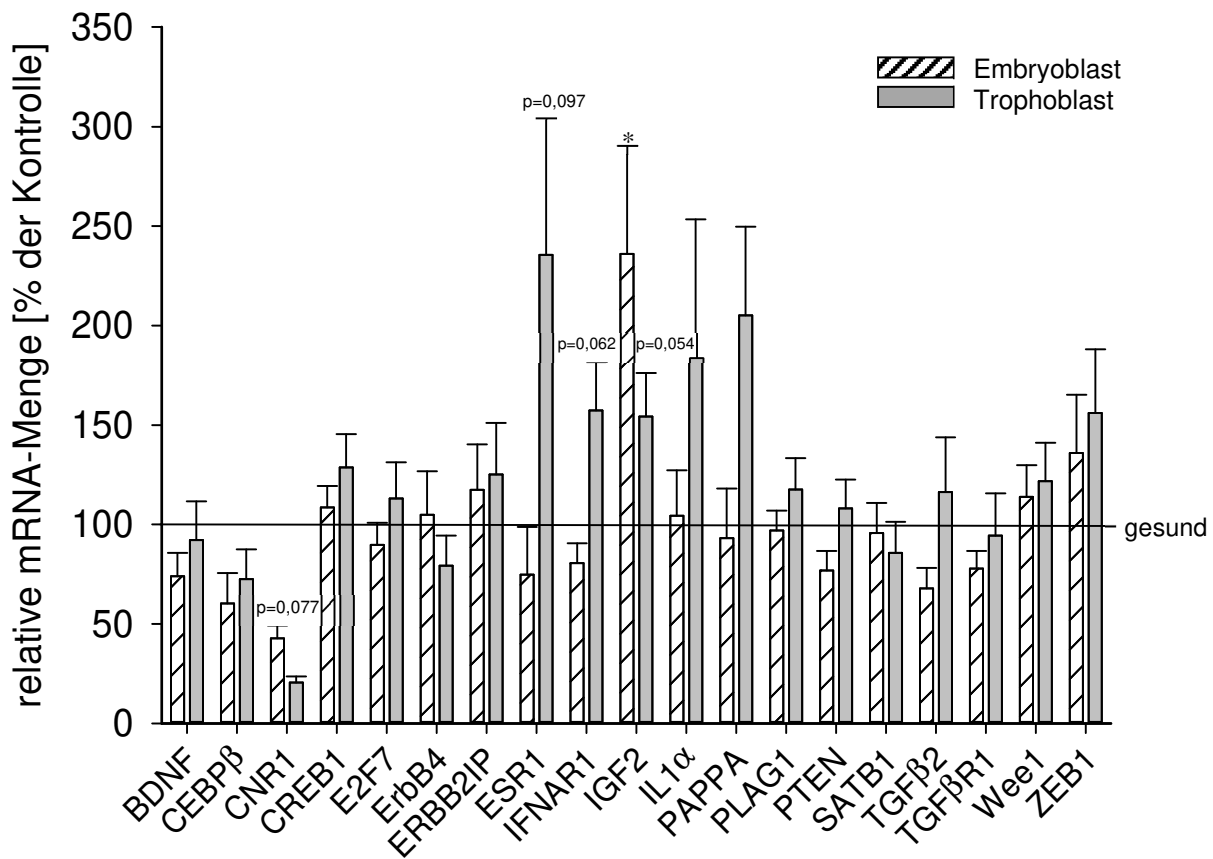
MicroRNAs regulieren ihre Zielgene auf posttranskriptionaler Ebene durch einen Abbau ihrer Ziel-mRNA oder Hemmung der Translation. Aufgrund einer deutlichen Reduktion der microRNA-Mengen der miR-27b, -141,- 191 und -222 in Trophoblastzellen von Embryonen diabetischer Kaninchen, wurden potentielle Zielgene der genannten microRNAs untersucht. Dabei wurden validierte sowie vorhergesagte Zielgene, die im Zusammenhang mit Implantation und Reproduktion stehen, mit Hilfe der bioinformatischen Datenbanken miRDB, MiRTarbase und TargetScan ermittelt (Tab. 10).

**Tab. 10: Liste von reproduktionsbiologisch relevanten Zielgenen der miR-27b, -141, -191 und -222**

miRNA	Validierte Zielgene (nach miRDB)	Vorhergesagte Zielgene (nach miRTarbase und TargetScan)
miR-27b	WEE1	CREB1 E2F7
miR-222	ESR1 PTEN	CNR1 ErbB4 TGFβR1
miR-141	PTEN TGFβ2 ERBB2IP ZEB1	IFNAR1 PAPPA IGF2 PLAG1
miR-191	IL1α SATB1 CEBPβ	BDNF

**BDNF**-Brain-Derived Neurotrophic Factor, **CEBPβ**-CCAAT/Enhancer Binding Protein β, **CNR1**-Cannabinoid-Rezeptor 1, **CREB1**-CAMP Responsive Element Binding Protein 1, **E2F7**-E2F Transcription Factor 7, **ErbB4**-Rezeptor Tyrosine-Protein Kinase 4, **ERBB2IP**-ErbB2 Interacting Protein, **ESR1**-Östrogenrezeptor α, **IFNAR1**-Interferon Alpha and Beta Receptor Subunit 1, **IGF2**-Insulin-like growth factor 2, **IL1α**-Interleukin 1 α, **PAPPA**-Pregnancy-Associated Plasma Protein A, **PLAG1**-Pleiomorphic Adenoma Gene 1, **PTEN**-Phosphatase and Tensin Homolog, **SATB1**-Special AT-Rich Sequence Binding Protein 1, **TGFβ2**-Transforming Growth Factor β 2, **TGFβR1**-Transforming growth factor (TGF) β-Rezeptor 1, **Wee1**-WEE1 G2 Checkpoint Kinase, **ZEB1**-Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1

Die Quantifizierung von microRNA-Zielgenen im Embryoblasten und Trophoblasten gesunder und diabetischer Kaninchen erfolgte mittels RT-qPCR (Abb. 19). Ein maternaler Diabetes führte zu einer Steigerung der IGF2-Transkription im Embryoblasten. In Trophoblastzellen von Embryonen diabetischer Kaninchen war die IGF2-Menge unverändert. Die BDNF-, CEBPβ-, CNR1-, CREB1-, E2F7-, ErbB4-, ERBB2IP-, ESR1-, IFNAR1-, IL1α-, PAPPA-, PLAG1-, PTEN-, SATB1-, TGFβ2-, TGFβR1-, Wee1- und ZEB1-Transkriptmengen waren sowohl in Embryoblast- als auch Trophoblastzellen gesunder und diabetischer Kaninchen annähernd gleich.



**Abb. 19: Relative mRNA-Mengen spezifischer microRNA-Zielgene im Embryoblasten und Trophoblasten diabetischer Kaninchen**

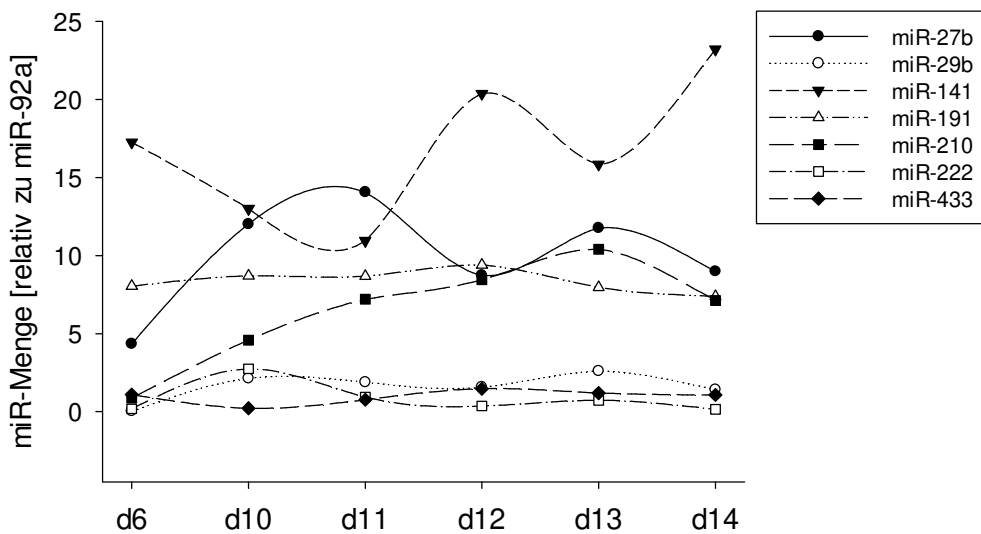
Die relativen mRNA-Mengen des Embryoblasten und Trophoblasten von gesunden und diabetischen Kaninchen wurde mittels RT-qPCR bestimmt. Für die Quantifizierung der Molekülzahlen mittels RT-qPCR wurde ein Plasmidstandard mitgeführt. Die Molekülzahl der Zielgene wurde auf die Anzahl der GAPDH-Moleküle normiert und die mRNA-Menge in den embryonalen Geweben gesunder Kaninchen 100% gesetzt. Die Ergebnisse sind als MW±STF mit \* $p < 0,05$  dargestellt. N=3, n≥6

### 3.4 Expression spezifischer microRNAs und microRNA-prozessierender Proteine in der Plazenta von Kaninchen

#### 3.4.1 Charakterisierung des microRNA-Expressionsprofils in Trophoblastzellen und Plazenten gesunder Häsinnen am Tag 6 bis Tag 14 *p.c.*

Das microRNA-Expressionsprofil in Trophoblastzellen und Plazenten am Tag 6 bis Tag 14 *p.c.* wurde mittels RT-qPCR untersucht (Abb. 20). Dabei konnten die miR-27b, -29b, -141, -191, -210, -222 und -433 zu allen Untersuchungszeitpunkten nachgewiesen werden. Die miR-29b, -191, -222 und -433 sind durch eine konstante Expression in den Plazenten mit steigendem Gestationsalter gekennzeichnet, während die miR-27b-Expression deutlichen Schwankungen

unterliegt. Eine tendenzielle Zunahme in der microRNA-Menge konnte für die miR-141 und -210 von Tag 6 bis Tag 14 *p.c.* in den Plazenten festgestellt werden.

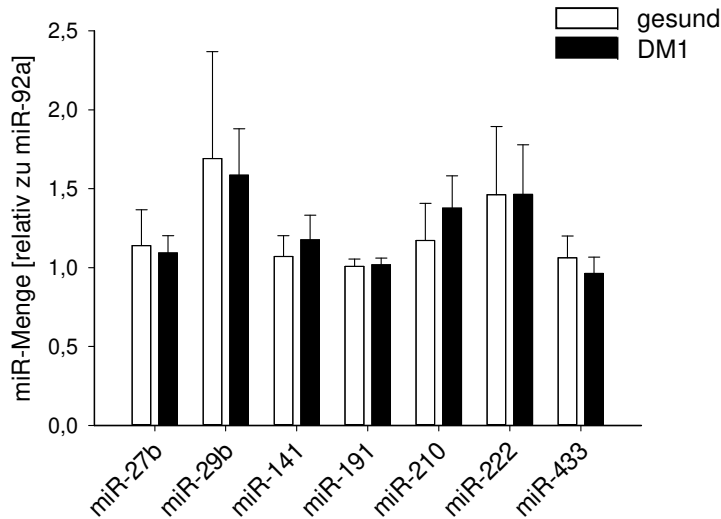


**Abb. 20: Relative microRNA-Mengen in Trophoblastzellen (d6) und Plazenten (d10-d14) am Tag 6 bis Tag 14 *p.c.***

Die Quantifizierung der miR-27b, -29b, -141, -191, -210, -222 und -433 erfolgte in Trophoblastzellen und Plazenten von Kaninchen mittels RT-qPCR. Anschließend wurden die relativen microRNA-Mengen nach der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode berechnet und auf die relative Menge an miR-92a normiert. Die Ergebnisse sind als MW dargestellt. Trophoblast d6: N=3, n=6 gepoolte Proben von jeweils 4 Trophoblasten; Plazenta: N=2, n=2

### 3.4.2 Expression spezifischer microRNAs in Plazenten diabetischer Kaninchen am Tag 12 *p.c.*

Die Analyse der relativen microRNA-Mengen in Plazenten gesunder und diabetischer Kaninchen am Tag 12 *p.c.* erfolgte mittels RT-qPCR. Ein mütterlicher Diabetes hatte keinen Einfluss auf die microRNA-Menge von miR-27b, -29b, -141, -191, -210, -222 und -433 in der Plazenta am Tag 12 *p.c.* (Abb. 21).

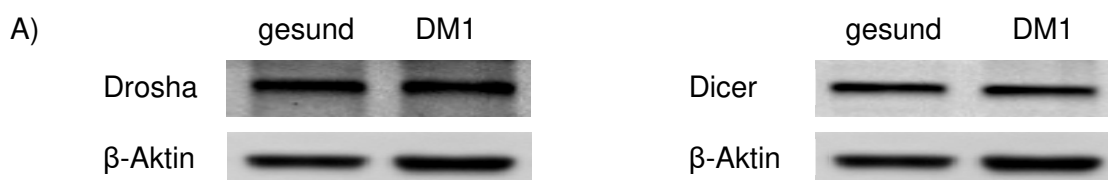


**Abb. 21: Relative microRNA-Mengen in Plazenten diabetischer (DM1) Häsinnen am Tag 12 p.c.**

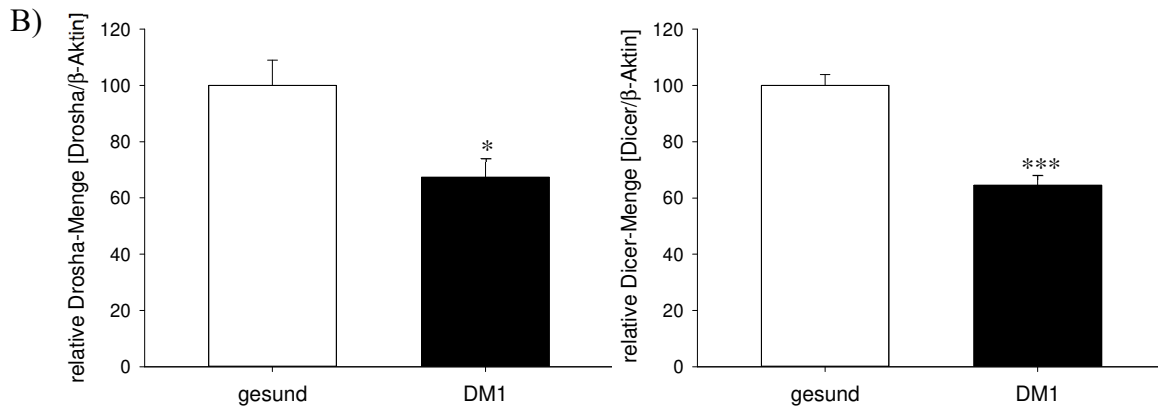
Die Quantifizierung der miR-27b, -29b, -141, -191, -210, -222 und -433 erfolgte in Plazenten von gesunden und diabetischen (DM1) Kaninchen mittels RT-qPCR. Anschließend wurden die relativen microRNA-Mengen nach der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode berechnet und auf die relative Menge an miR-92a normiert. Die Ergebnisse sind als  $MW \pm STF$  dargestellt.  $N=3$ ,  $n=9$ .

### 3.4.3 Expression von Genen der microRNA-Biogenese in Plazenten diabetischer Kaninchen am Tag 12 p.c.

Die Proteinexpression der microRNA-prozessierenden Enzyme Drosha und Dicer wurde mittels Western Blot (Abb. 22) bestimmt. In Plazenten diabetischer Kaninchen zeigte sich für Drosha und Dicer eine ca. 40%-ige Verringerung der Proteinmenge.



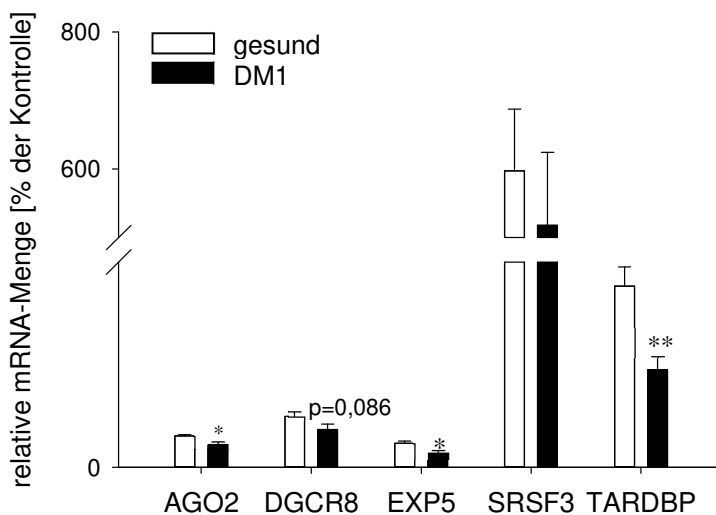




**Abb. 22: Relative Drosha- und Dicer-Proteinmenge in Plazenten diabetischer (DM1) Häsinnen am Tag 12 *p.c.***

Für die Analyse der Proteinmenge von Drosha und Dicer mittels SDS-PAGE und Western-Blot (A) wurden 25  $\mu$ g Gesamtprotein pro Probe verwendet und die Antikörperbindung densitometrisch ausgewertet (B). Die Drosha- und Dicer-Proteinmenge wurde auf die Proteinmenge von  $\beta$ -Aktin normiert. Die normalisierte Proteinmenge von gesunden Tieren wurde 100% gesetzt. Die Ergebnisse sind als  $MW \pm STF$  mit \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  dargestellt.  $N=3$ ,  $n \geq 4$ .

Die Quantifizierung weiterer Gene der microRNA-Biogenese erfolgte mittels RT-qPCR in Plazenten diabetischer (DM1) Häsinnen am Tag 12 *p.c.* (Abb. 23). Für AGO2, EXP5 und TARDBP konnte eine signifikante Abnahme der mRNA-Expression in Plazenten diabetischer Kaninchen gemessen werden. Die DGCR8- und SRSF3-Transkription war in beiden Zellarten annähernd gleich.



**Abb. 23: Relative mRNA-Mengen von microRNA-prozessierenden Proteinen in Plazenten diabetischer (DM1) Häsinnen am Tag 12 *p.c.***

Die relativen mRNA-Mengen in Plazenten von diabetischen Kaninchen wurden quantifiziert. Für die Bestimmung der Molekülzahlen mittels RT-qPCR wurde ein Plasmidstandard mitgeführt. Die Molekülzahl der Zielgene wurde auf die Anzahl der GAPDH-Moleküle normiert. Die Ergebnisse sind als  $MW \pm STF$  mit \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  dargestellt.  $N=3$ ,  $n \geq 6$ .

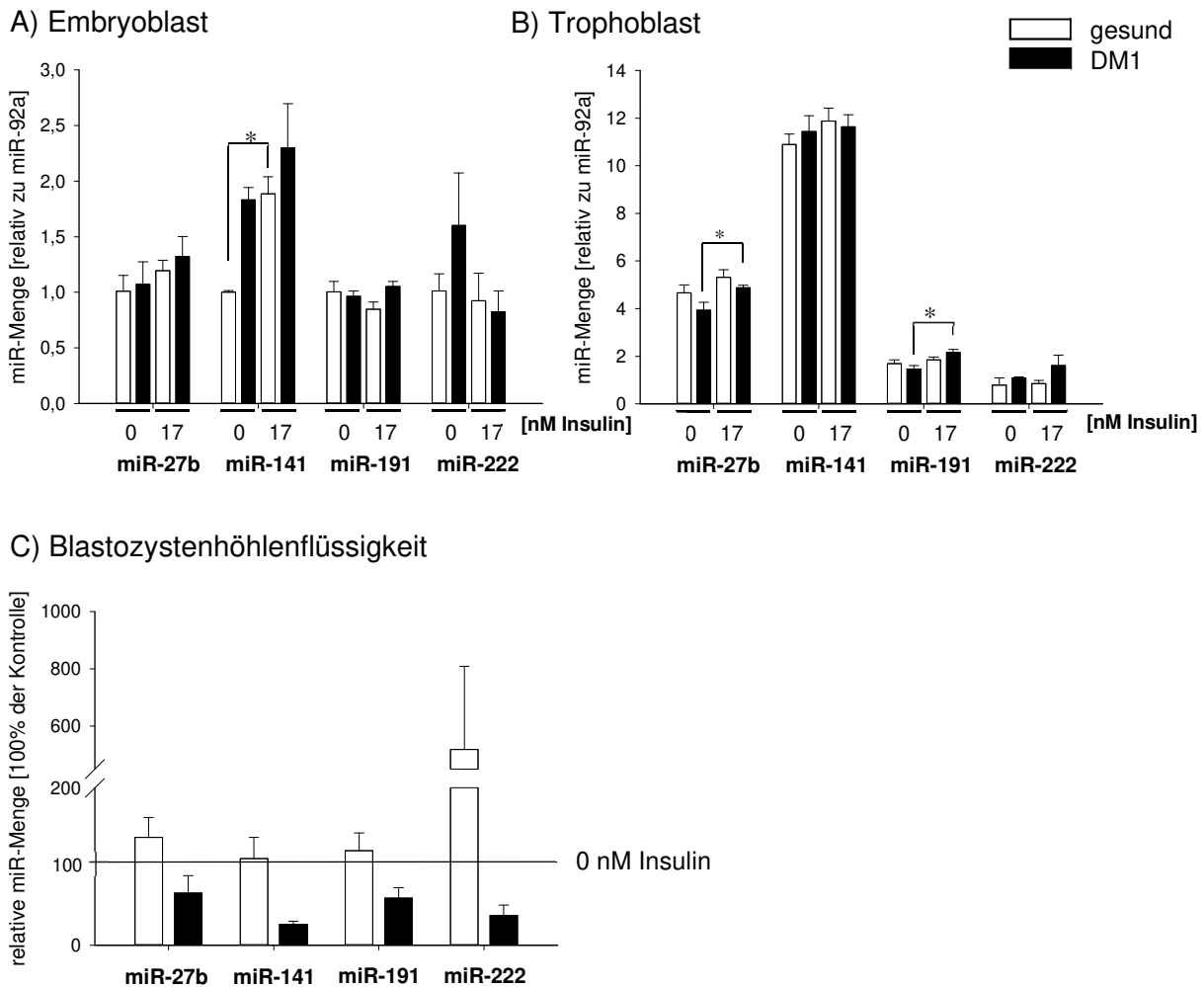
### **3.5 Untersuchung der Regulation spezifischer microRNAs durch Glukose und Hormone in Kaninchenblastozysten**

Für die Untersuchung des Einflusses spezifischer Faktoren auf die embryonale microRNA-Expression wurden Nährstoffe und Hormone gewählt, die im diabetischen Kaninchenmodell nachweislich verändert sind: Glukose (Ramin et al. 2010), Insulin (Ramin et al. 2010) und IGF2 (Thieme et al. 2012b). Des Weiteren wurde die Regulation der microRNA-Transkription in Tag 6 *p.c.* Blastozysten durch den *Leukemia inhibitory factor* (LIF) analysiert. Nachfolgend wurde der Einfluss von Glukose, Insulin, IGF2 oder LIF auf die Transkription der miR-27b, -141, -191 und -222 untersucht, da diese in Trophoblasten von Embryonen diabetischer Häsinnen verringert exprimiert waren.

#### **3.5.1 Einfluss von Insulin auf die Expression spezifischer microRNAs in Blastozysten diabetischer Häsinnen**

Wie in Kapitel 2.5 beschrieben, wurden Blastozysten (d6 St.2 *p.c.*) von gesunden und diabetischen Kaninchen mit 17 nM Insulin oder ohne Insulin-Zugabe (Kontrolle) für 2 Stunden *in vitro* kultiviert. Die Analyse der relativen microRNA-Mengen in Embryoblast, Trophoblast und in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit gesunder und diabetischer Kaninchen erfolgte mittels RT-qPCR (Abb. 24). Im Embryoblasten gesunder Tiere führte die Kultur mit 17 nM Insulin zu einer signifikanten Steigerung der miR-141-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (0 nM Insulin). Die microRNA-Mengen der miR-27b, -191 und -222 waren nach 2-stündiger Kultur mit 17 nM Insulin in den Embryoblastzellen gesunder und diabetischer Kaninchen annähernd gleich (Abb. 24A).

Im Trophoblasten gesunder Kaninchen konnte kein Einfluss von Insulin auf die microRNA-Expression beobachtet werden. Eine Kultur mit 17 nM Insulin führte jedoch zu einer deutlichen Steigerung der miR-27b- und -191-Menge in den Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen im Vergleich zur Kontrollgruppe (0 nM Insulin), wohingegen die miR-141- und -222-Expression unverändert war (Abb. 24B). Die microRNA-Menge in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit gesunder und diabetischer Tiere war durch die Kultur mit Insulin unverändert (Abb. 24C).



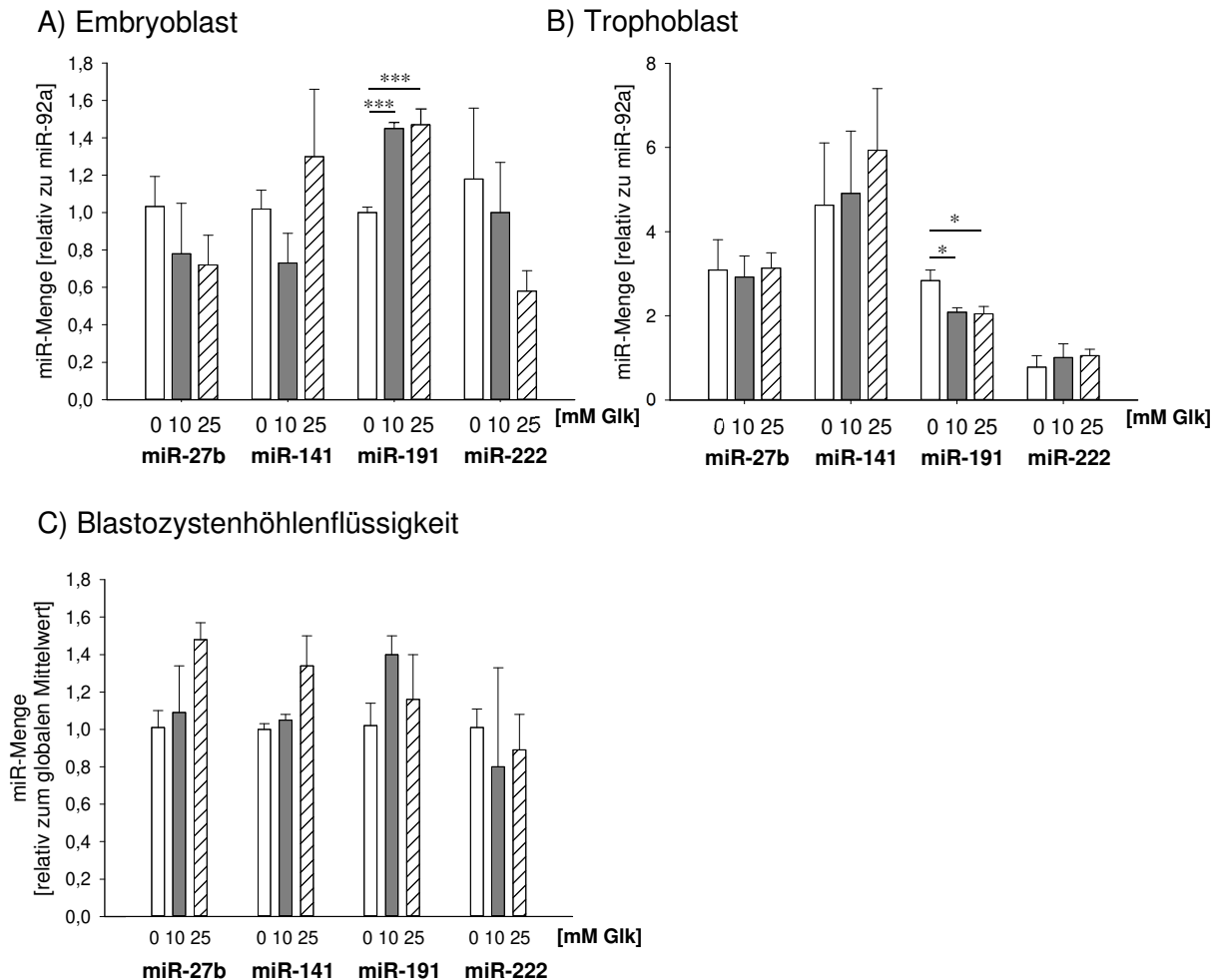
**Abb. 24: Relative microRNA-Mengen im Embryoblasten (A), Trophoblasten (B) und in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit (C) gesunder und diabetischer Kaninchen nach 2-stündiger *in vitro*-Kultur mit 17 nM Insulin**

Die Quantifizierung der miR-27b, -141, -191 und -222 erfolgte im Embryoblasten, Trophoblasten und in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit (BF) von Embryonen gesunder und diabetischer (DM1) Kaninchen mittels RT-qPCR. Anschließend wurden die relativen microRNA-Mengen nach der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode berechnet und auf die relative Menge an miR-92a (EB und TB) bzw. den globalen Mittelwert (BF) normiert. Für die Darstellung der microRNA-Expression in der BF wurden die microRNA-Mengen gesunder Kaninchen 100% gesetzt. Die Ergebnisse sind als  $MW \pm STF$  mit  $*p < 0,05$  dargestellt. EB/TB:  $N \geq 2$ ,  $n \geq 2$  gepoolte Proben von jeweils 4 Embryoblasten bzw. 4 Trophoblasten; BF:  $N \geq 2$ ,  $n \geq 3$  gepoolte Proben BF à 100  $\mu$ l von jeweils 4-7 Blastozysten.

### 3.5.2 Einfluss von Glukose auf die Expression spezifischer microRNAs in Kaninchenblastozysten

Blastozysten (d6 St.1) wurden wie in Kapitel 2.5 beschrieben mit 0, 10 oder 25 mM Glukose für 5 Stunden kultiviert. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der microRNA-Mengen im Embryoblasten, Trophoblasten und in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit mittels RT-qPCR (Abb. 25). Die veränderte Glukosekonzentration im Medium hatte keinen Einfluss auf die embryonale miR-27b, -141 und -222-Expression, wohingegen die miR-191-Transkription

glukoseabhängig war. Dabei konnte für die miR-191 eine zelltypspezifische Transkriptionsveränderung festgestellt werden. Im Embryoblasten stieg die miR-191-Menge bei hohen Glukosekonzentrationen an und verringerte sich im Trophoblasten. In der Blastozystenhöhlenflüssigkeit war die Menge von miR-27b, -141, -191 und -222 nach einer Kultur mit 0, 10 oder 25 mM Glukose annähernd gleich.



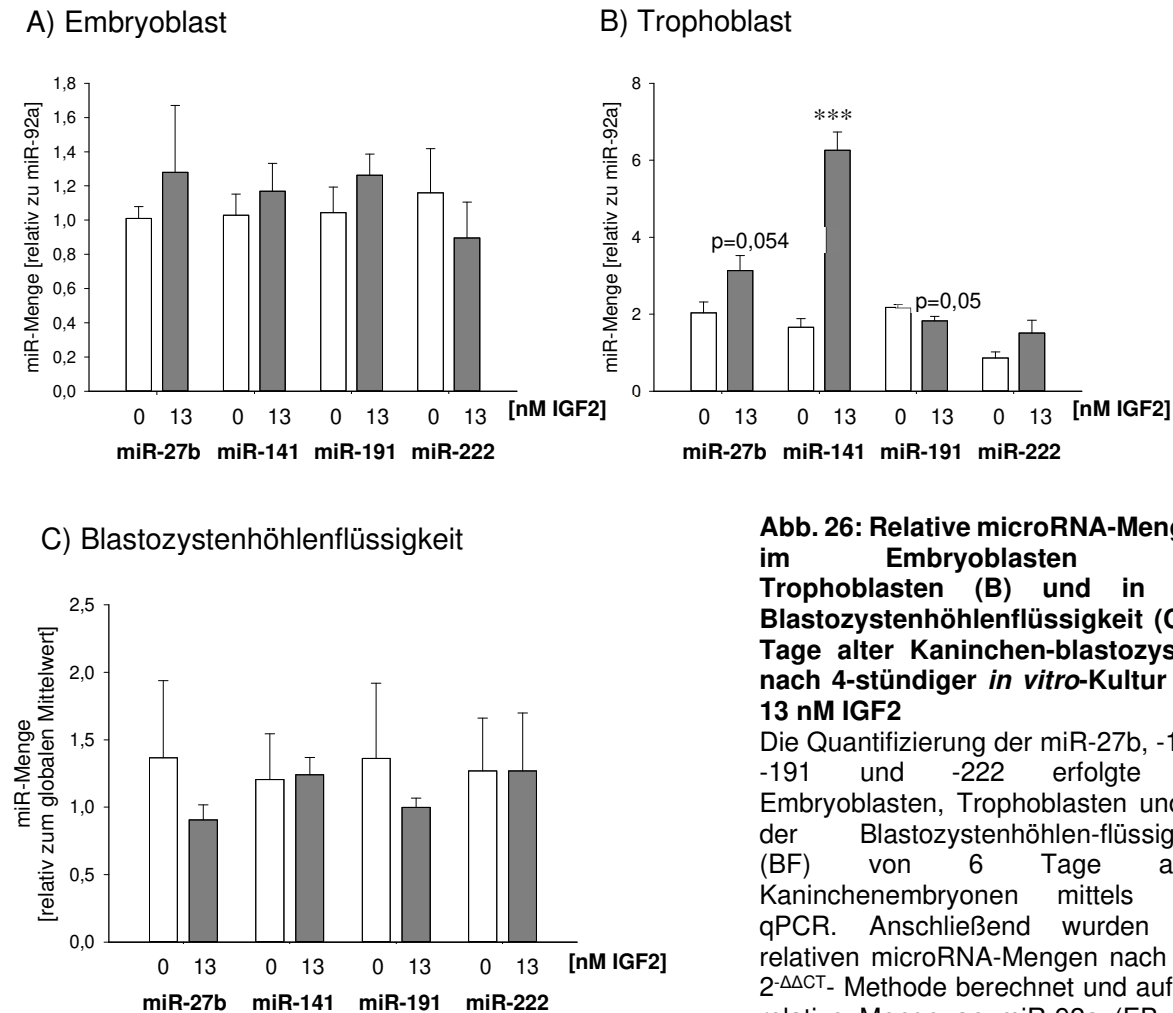
**Abb. 25: Relative microRNA-Mengen im Embryoblasten (A), Trophoblasten (B) und in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit (C) 6 Tage alter Kaninchenembryonen nach 5-stündiger *in vitro*-Kultur mit 0, 10 oder 25 mM Glukose (Glik)**

Die Quantifizierung der miR-27b, -141, -191 und -222 erfolgte im Embryoblasten, Trophoblasten und in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit (BF) von 6 Tage alten Kaninchenembryonen mittels RT-qPCR. Anschließend wurden die relativen microRNA-Mengen nach der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode berechnet und auf die relative Menge an miR-92a (EB und TB) bzw. den globalen Mittelwert (BF) normiert. Die Ergebnisse sind als MW $\pm$ STF mit \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  dargestellt. EB/TB: N=3, n $\geq$ 4 gepoolte Proben von jeweils 4 Embryoblasten bzw. 4 Trophoblasten; BF: N=3, n=3 gepoolte Proben BF à 100  $\mu$ l von jeweils 4-7 Blastozysten.

### 3.5.3 Einfluss von IGF2 auf die Expression spezifischer microRNAs in Kaninchenblastozysten

Sechs Tage alte Kaninchenblastozysten (St.1) wurden für 4 Stunden mit 13 nM IGF2 oder ohne den Zusatz von IGF2 (Kontrolle) kultiviert. Anschließend erfolgte die Quantifizierung

spezifischer microRNAs im Embryoblasten, Trophoblasten und in der Blastozysten-höhlenflüssigkeit mittels RT-qPCR (Abb. 26). Im Embryoblasten und in der Blastozysten-höhlenflüssigkeit war die microRNA-Expression der miR-27b, -141, -191 und -222 annähernd gleich. Eine Kultur mit 13 nM IGF2 führte im Trophoblasten zu einer signifikanten Erhöhung der miR-141-Menge im Vergleich zur Kontrolle ohne IGF2-Zusatz.



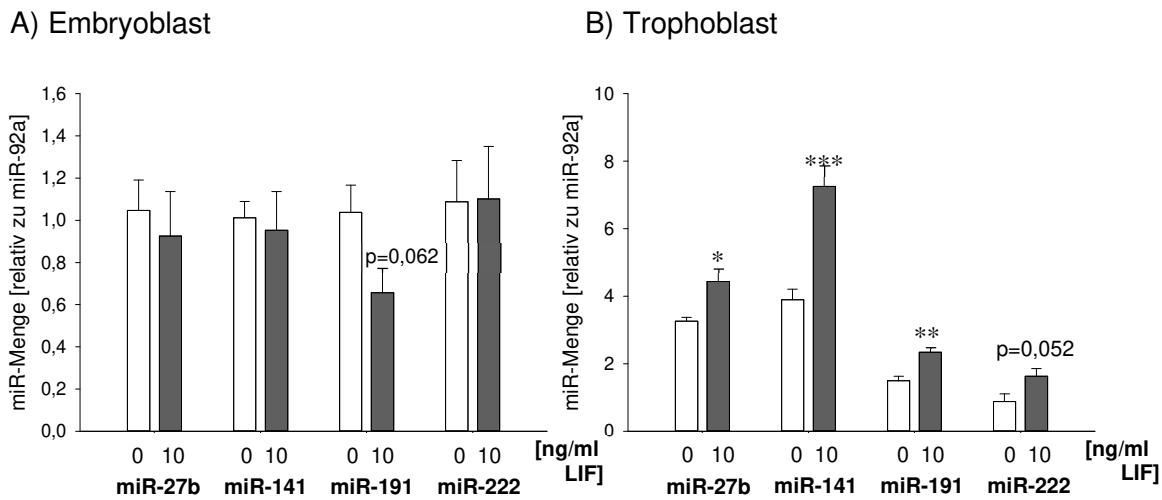
**Abb. 26: Relative microRNA-Mengen im Embryoblasten (A), Trophoblasten (B) und in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit (C) 6 Tage alter Kaninchen-blastozysten nach 4-stündiger *in vitro*-Kultur mit 13 nM IGF2**

Die Quantifizierung der miR-27b, -141, -191 und -222 erfolgte im Embryoblasten, Trophoblasten und in der Blastozystenhöhlen-flüssigkeit (BF) von 6 Tage alten Kaninchenembryonen mittels RT-qPCR. Anschließend wurden die relativen microRNA-Mengen nach der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode berechnet und auf die relative Menge an miR-92a (EB und

TB) bzw. den globalen Mittelwert (BF) normiert. Die Ergebnisse sind als MW $\pm$ STF mit \*\*\* $p < 0,001$  dargestellt. EB/TB: N=3, n $\geq$ 4 gepoolte Proben von jeweils 4 Embryoblasten bzw. 4 Trophoblasten; BF: N=3, n $\geq$ 4 gepoolte Proben BF à 100  $\mu$ l von jeweils 4-7 Blastozysten.

### 3.5.4 Einfluss von LIF auf die Expression spezifischer microRNAs in Kaninchenblastozysten

Für die *in vitro*-Kultur mit dem *Leukemia inhibitory factor* (LIF) wurden Blastozysten von gesunden Kaninchen für 4 Stunden mit 10 ng/ml LIF oder ohne Zusatz von LIF (Kontrolle) kultiviert. Im Anschluss erfolgte die Quantifizierung der microRNA-Expression mittels RT-qPCR (Abb. 27). Im Embryoblasten führte die Kultur mit LIF zu keiner Veränderung in der Menge spezifischer microRNAs. Die Expression der miR-27b, -141 und -191 war im Trophoblasten signifikant erhöht.



**Abb. 27: Relative microRNA-Mengen im Embryoblasten (A) und Trophoblasten (B) 6 Tage alter Kaninchenblastozysten nach 4-stündiger *in vitro*-Kultur mit 10 ng/ml LIF**

Die Quantifizierung der miR-27b, -141, -191 und -222 erfolgte im Embryoblasten und Trophoblasten von 6 Tage alten Kaninchenembryonen mittels RT-qPCR. Anschließend wurden die relativen microRNA-Mengen nach der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode berechnet und auf die relative Menge an miR-92a normiert. Die Ergebnisse sind als MW $\pm$ STF mit \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  dargestellt. N=3, n $\geq$ 3 gepoolte Proben von jeweils 4 Embryoblasten bzw. 4 Trophoblasten.

## 4 Diskussion

### 4.1 Sequenzhomologie von microRNAs unterschiedlicher Spezies

MicroRNAs sind hochkonservierte RNA-Moleküle in Metazoa und Pflanzen. Am höchsten konserviert ist die microRNA-Seed-Sequenz (Yang et al. 2011). Die Datenbank miRBase (Kozomara & Griffiths-Jones 2014) listet aktuell 48885 reife microRNA-Produkte aus 271 Spezies (Version 22, März 2018). Für das menschliche Genom sind die Sequenzen von 1917 pre-microRNAs und 2654 reifen microRNAs bekannt. Auch für die Maus (1234 pre-miRNAs, 1978 miRNAs) und die Ratte (496 pre-miRNAs, 764 miRNAs) konnten bereits zahlreiche microRNA-Sequenzen identifiziert werden. Zu Beginn der vorliegenden Studie waren erst wenige microRNAs für das Kaninchengenom annotiert. Mittlerweile sind 306 pre-microRNA- und 579 microRNA-Sequenzen bei der Datenbank miRBase gelistet (Liu et al. 2010a, Maraghechi et al. 2013, Tarver et al. 2016). Die Sequenzen für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten microRNAs miR-27b, -29b, -141, -222, -433 und -92a sind mit Ausnahme der miR-210 für das Kaninchen annotiert, jedoch nicht in embryonalen Geweben. Der Vergleich der ocu-microRNA-Sequenzen aus der Veröffentlichung von Tarver et al. (2016) und aus der vorliegenden Arbeit ergab eine beinahe 100%-ige Übereinstimmung. Maraghechi et al. (2013) konnten zeigen, dass in Kaninchenembryonen an Tag 6,5 *p.c.* die microRNA-Sequenzen eine Ähnlichkeit von 77% zu humanen und 64% zu murinen bzw. bovinen microRNAs aufweisen. Da die Expression von microRNAs in mütterlichen und embryonalen Geweben des Kaninchens mit spezifischen Oligonukleotiden untersucht werden sollte, erfolgte im Vorfeld eine Sequenzanalyse. Diese wurde mit dem SOLiD-Sequenz-Datensatz aus Kaninchenembryonen (Tag 5,5, Tag 6,5 und Tag 14 *p.c.*), der von der Arbeitsgruppe Elen Gocza (Maraghechi et al. 2013) zur Verfügung gestellt wurde, nach Abgleich mit bekannten humanen, murinen und bovinen microRNA-Sequenzen durchgeführt.

In den Kaninchenembryonen konnte für jede untersuchte microRNA mindestens ein Strang des microRNA-Doppelstrangs nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich eine deutliche Zunahme der microRNA-Expression im Verlauf der Ontogenese. In den Kaninchenembryonen konnten an Tag 5,5 *p.c.* nur 5 microRNAs (31,3%), an Tag 6,5 *p.c.* 7 microRNAs (43,8%) und an Tag 14 *p.c.* 11 microRNAs (68,8%) identifiziert werden (Tab. 11).

**Tab. 11: Sequenznachweise der miR-27b, -29b, -141, -191, -210, -222, -433 und -92a in 5,5, 6,5 und 14 Tage-alten (p.c.) Kaninchenembryonen**

Für die Identifizierung der kaninchenspezifischen microRNA-Sequenzen aus dem SOLiD-Sequenz-Datensatz wurden die bekannten humanen, murinen und bovinen Sequenzen der miR-27b, -29b, -141, -191, -210, -222, -433 und -92a mit Hilfe der Sequenzabgleich-Programme BLAT und BLASTN (Stand 03/2017) mit dem Kaninchengenom verglichen.

✓: Sequenznachweis positiv; -: Sequenz im Datensatz nicht vorhanden

miRNA	Sequenz (human)	d5,5	d6,5	d14
miR-27b-3p	TTCACAGTGGCTAAGTTCTGC	✓	✓	✓
miR-27b-5p	AGAGCTTAGCTGATTGGTGAAC	-	-	✓
miR-29b-3p	TAGCACCATTTGAAATCAGTGTT	-	-	✓
miR-29b-5p	GCTGGTTTCATATGGTGGTTTAGA	-	-	-
miR-141-3p	TAACACTGTCTGGTAAAGATGG	✓	✓	✓
miR-141-5p	CATCTTCCAGTACAGTGTTGGA	-	-	-
miR-191-3p	GCTGCGCTTGGATTTTCGTCCCC	-	-	-
miR-191-5p	CAACGGAATCCCAAAGCAGCTG	✓	✓	✓
miR-210-3p	CTGTGCGTGTGACAGCGGCTGA	-	✓	✓
miR-210-5p	AGCCCTGCCACCGCACACTG	-	-	-
miR-222-3p	AGCTACATCTGGCTACTGGGT	-	✓	✓
miR-222-5p	CTCAGTAGCCAGTGTAGATCCT	-	-	✓
miR-433-3p	ATCATGATGGGCTCCTCGGTGT	✓	-	✓
miR-433-5p	TACGGTGAGCCTGTCATTATTC	-	✓	✓
miR-92a-3p	TATTGCACTTGTCGGCCTGT	✓	✓	✓
miR-92a-1-5p	AGGTTGGGATCGGTTGCAATGCT	-	-	-

Es ist bekannt, dass die Expression kleiner ncRNAs, wie microRNAs, endogene siRNAs (endo-siRNAs) oder piRNAs, die eine wichtige Rolle während der Gametogenese und der Embryonalentwicklung spielen, während der Entwicklung stark variiert (Suh & Blelloch 2011). So werden endo-siRNAs und piRNAs vor allem in den Spermien und Oozyten exprimiert. Die microRNA-Expression steigt signifikant mit Aktivierung des embryonalen Genoms (Kaninchen: 8-16-Zellstadium) an und nimmt im Verlauf der Ontogenese weiterhin zu (Tang et al. 2007, Yang et al. 2008, Ohnishi et al. 2010, Maraghechi et al. 2013). Daher ist zu erwarten, dass mit fortschreitender Embryonal- und Fetalentwicklung die microRNA-Expression qualitativ und quantitativ ansteigt. Dies wird auch darin deutlich, dass nicht alle microRNA-Strang-Sequenzen in den Kaninchenembryonen ermittelt werden konnten. Auch in einer Studie von Landgraf et al. (2007) konnten die Sequenzen für die microRNA-5p-Stränge (miR-29b-5p, miR-141-5p, miR-210-5p, miR-92a-1-5p) in Embryonen der Maus (d11 und d12) nicht detektiert werden. Bei einem Abgleich der humanen, murinen und bovinen microRNA-Sequenzen mit dem Kaninchengenom (Kozomara & Griffiths-Jones 2014, Yates et al. 2016, release 86) konnten jedoch alle fehlenden microRNA-Sequenzen mit hoher Übereinstimmung identifiziert werden, was annehmen lässt, dass alle untersuchten microRNAs exprimiert



werden können. Für das Nicht-Auffinden einzelner microRNA-Stränge in der microRNA-Bibliothek ist ein methodischer Fehler nicht auszuschließen. Limitationen ergeben sich dadurch, dass für jedes Ontogenesestadium lediglich eine Probe sequenziert wurde, wodurch die biologische Reproduzierbarkeit nicht gegeben ist. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass bei der SOLiD-Sequenzierung nicht alle Sequenzen erfasst wurden (Linsen et al. 2009, Tian et al. 2010), da bei der Herstellung der cDNA-Bibliotheken einige RNA-Moleküle möglicherweise inert für die enzymatischen Modifikationen und daher nicht detektierbar sind.

## **4.2 MicroRNAs im Plasma und im Endometrium – ihr Potential als Biomarker**

Bereits 2008 wurden im mütterlichen Blut erstmalig plazentare microRNAs nachgewiesen (Chim et al. 2008), die vom Synzytiotrophoblasten in die mütterliche Zirkulation via Exosomen abgegeben werden (Luo et al. 2009). Es wird angenommen, dass trophoblastäre microRNAs den physiologischen Zustand der Schwangerschaft bzw. Plazenta widerspiegeln und somit in der Diagnostik von Plazentadysfunktionen Anwendung finden könnten. Bislang konnte die veränderte Expression zahlreicher microRNAs mit schwangerschaftsassozierten Erkrankungen bzw. Komplikationen wie Präeklampsie (Pineles et al. 2007, Mayor-Lynn et al. 2011, Enquobahrie et al. 2011), Gestationsdiabetes (Zhao et al. 2011, Zhu et al. 2015), Frühgeburten (Montenegro et al. 2009) und fetaler Wachstumsretardierung (Higashijima et al. 2013) assoziiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wird die Hypothese aufgestellt, dass sich Störungen in der Plazentafunktion bereits während der frühen Phase der Trophoblastendifferenzierung manifestieren (Übersichtsartikel Norwitz 2006) und mit Hilfe von microRNAs im mütterlichen Blut identifiziert werden können. Zur Validierung der Hypothese wurde in diabetischen Häsinen während der Frühschwangerschaft die Menge an microRNAs im Blutplasma gemessen. Da ein mütterlicher Diabetes zugleich zu einer verzögerten Embryonalentwicklung und einer verminderten Implantationsrate führt (Ramin et al. 2010), wurde auch die microRNA-Expression im Endometrium untersucht.

### **4.2.1 Einfluss der Gravität und eines Diabetes mellitus auf die microRNA-Expression im Blutplasma**

Die **miR-222-Menge** im Blutplasma diabetischer gravider Häsinen war geringer als in gesunden und nicht-trächtigen Tieren, was einen Zusammenhang zwischen miR-222 und diabetischen Schwangerschaftskomplikationen vermuten lässt. Die anti-angiogene miR-222 (Poliseno et al. 2006, Dentelli et al. 2010) wird in Plazenten und im Blutplasma präeklampsischer Frauen verstärkt exprimiert (Hu et al. 2009, Murphy et al. 2015).

Präeklampsie ist u.a. durch eine gestörte Blutgefäßbildung und damit einhergehenden Minderdurchblutung der Plazenta gekennzeichnet (Übersichtsartikel Lambert et al. 2014).

Bei Frauen mit einem Gestationsdiabetes konnte ebenfalls ein verändertes microRNA-Profil im Blutplasma nachgewiesen werden (Zhao et al. 2011, Zhu et al. 2015, Wander et al. 2017, Sebastiani et al. 2017). Dabei zeigte sich, dass die miR-222, neben weiteren microRNAs, im Plasma diabetischer schwangerer Frauen deutlich erniedrigt (Zhao et al. 2011) oder unverändert war (Wander et al. 2017). Im Gegensatz dazu wurde im Plasma von Typ 2-Diabetikern eine erhöhte miR-222-Menge gemessen (Karolina et al. 2011, Ortega et al. 2014). Diabetische Kaninchen entwickeln aufgrund der Alloxanbehandlung eine Hypoinsulinämie im Unterschied zum relativen Insulinmangel bei Typ 2-Diabetikern. Daher ist ein Einfluss von Insulin auf die miR-222-Expression nicht auszuschließen. So konnte gezeigt werden, dass die Gabe des Insulin-Sensitizers Metformin oder die Gabe von Insulin die erhöhte miR-222-Menge im Plasma von Patienten mit einem Typ 2 Diabetes mellitus verringerte (Ortega et al. 2014).

Für die **miR-29b**-Menge zeigte sich eine Zunahme im Plasma gesunder gravider Kaninchen (Abb. 10). Dieser Anstieg korreliert mit der Zunahme der miR-29b-Menge im Verlauf der Trophoblastendifferenzierung. Die miR-29b-Expression steigt in der Plazenta gegen Ende der Schwangerschaft an (Gu et al. 2013) und ist für die Regulation plazentarer Funktionen wie Invasion, Apoptose und Angiogenese mitverantwortlich (Li et al. 2013a).

Die **miR-141**, wie auch die **miR-433**, sind schwangerschaftsassozierte microRNAs, aufgrund ihrer vornehmlichen Expression in der Plazenta (Panwar, Omenn & Guan 2017). Da sie auch in großen Mengen im mütterlichen Plasma nachgewiesen werden können, eignen sich die miR-141 und -433 als potentielle Indikatoren für eine Schwangerschaft und für die Schwangerschaftsüberwachung (Chim et al. 2008, Miura et al. 2010, Morales-Prieto et al. 2012). Die miR-433, zum C14M-Cluster gehörend, wird vorwiegend im ersten Trimester (Morales-Prieto et al. 2012 & 2013), wohingegen die miR-141 vor allem im dritten Trimester (Chim et al. 2008, Miura et al. 2010) in der Plazenta exprimiert wird. Bei Häsinnen bis zum 6. Tag der Trächtigkeit konnte jedoch kein Einfluss der Graviddität auf die Expression der beiden microRNAs festgestellt werden. Die microRNA-Menge im Blutplasma von Kaninchen wurde zu einem frühen Zeitpunkt der Schwangerschaft bestimmt. Da die Plazenta an Tag 6 *p.c.* noch nicht entwickelt ist, ist anzunehmen, dass die schwangerschaftsassozierten microRNAs miR-141 und -433 noch nicht in ausreichendem Maße in die Zirkulation abgegeben werden. Die miR-141- und -433 können deshalb zu diesem frühen Zeitpunkt nicht als Schwangerschaftsindikatoren im Blutplasma dienen.

Die Abnahme der miR-141 im Plasma und in Trophoblastzellen von diabetischen trächtigen Häsinnen könnte aufgrund der funktionalen Rolle der miR-141 für die Trophoblasten-Proliferation (Morales-Prieto et al. 2011, Ospina-Prieto et al. 2016, Guo et al. 2018) und Angiogenese (Gutiérrez-Samudio et al. 2016) auf Veränderungen in der Plazentaentwicklung

hindeuten. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die miR-141-Expression in Plazenten bzw. im Plasma von Frauen mit einer Präeklampsie (Li et al. 2013b, Ospina-Prieto et al. 2016), fetalen Wachstumsretardierung (Mouillet et al. 2010, Tang et al. 2013a) oder fetalen Makrosomie (Guo et al. 2018) verändert war.

Des Weiteren sind im Blutplasma diabetischer gravider Kaninchen die Mengen an **miR-27b**, **-191** und **-433** signifikant verringert. Die miR-29b-Menge ist im Plasma diabetischer nichtschwangerer Häsinnen tendenziell erhöht (Abb. 10). Im Blut von Patientinnen und Patienten mit einem manifesten und latenten T2DM (Zampetaki et al. 2010, Karolina et al. 2011, Yang et al. 2014, Ortega et al. 2014, Wang et al. 2014b, Dangwal et al. 2015) und einem T1DM (Nielsen et al. 2012, Salas-Pérez et al. 2013) ist die Menge der genannten microRNAs ebenfalls verändert (Tab. 12).

**Tab. 12: Veränderte microRNA-Mengen im Plasma bzw. Serum von Kindern und Erwachsenen**

Die Studien von Nielsen et al. 2012<sup>[1]</sup>, Karolina et al. 2011<sup>[2]</sup>, Wang et al. 2014b<sup>[3]</sup>, Tao et al. 2016<sup>[4]</sup>, Zampetaki et al. 2010<sup>[5]</sup>, Yang et al. 2014<sup>[6]</sup>, Dangwal et al. 2015<sup>[7]</sup>, Ortega et al. 2014<sup>[8]</sup>, Zhao et al. 2011<sup>[9]</sup> und Wander et al. 2017<sup>[10]</sup> zeigen den Einfluss eines T1DM, T2DM oder eines Gestationsdiabetes (GDM) auf die miR-27b, -29b, -191, -210, -222 und -433-Menge im Plasma bzw. Serum. ↑ erhöht, ↓ erniedrigt, = unverändert

	T1DM	T2DM	GDM
miR-27b	↑ <sup>[1]</sup>		
miR-29b		↑ <sup>[2,3,4]</sup> ↓ <sup>[5]</sup>	
miR-191		↓ <sup>[5,6,7]</sup>	
miR-210	↑ <sup>[1]</sup>		
miR-222		↑ <sup>[2,8]</sup>	↓ <sup>[9]</sup> = <sup>[10]</sup>
miR-433		verändert <sup>[5]</sup>	

In der Studie von Nielsen et al. (2012) wurden Plasmaproben von Kindern mit einem neu aufgetretenen T1DM analysiert. Daher kann ein Einfluss von Komponenten des Immunsystems, infolge der stattfindenden Autoimmunreaktion, auf die microRNA-Expression nicht ausgeschlossen werden und könnte eine mögliche Erklärung für die abweichenden Expressionsergebnisse darstellen.

Generell ist festzustellen, dass das microRNA-Muster, das mit einem Diabetes mellitus korreliert wird, von Studie zu Studie sehr unterschiedlich ist. Dies könnte u.a. in der Verwendung unterschiedlichen Materials (Plasma, Serum, Gesamtblut) begründet liegen. Die Suche nach potenziell Diabetes-relevanten microRNAs erfolgte nach unterschiedlichen Methoden (Arrays, Sequenzierung und Literaturrecherche). Außerdem verwendeten alle genannten Studien, mit Ausnahme von Wang et al. (2014, microRNA LNA™ PCR primer sets) für die Validierung ihrer Daten RT-qPCR TaqMan-Assays (vorliegende Arbeit: microRNA

LNA™ PCR primer sets). Des Weiteren ist ein Vergleich zwischen den verschiedenen Studien-Gruppen (T1DM, T2DM, GDM, experimentell erzeugter Diabetes im Kaninchenmodell) aufgrund unterschiedlicher Einflussfaktoren schwierig. So spielt beim T2DM die Insulinresistenz eine große Rolle. Hingegen liegt beim T1DM ein Insulinmangel und i.d.R. eine Autoimmunreaktion vor. Bei einem Gestationsdiabetes kommt der Faktor der Graviddität als Einflussgröße hinzu. Ein experimentell erzeugter Diabetes ist ebenfalls durch einen Insulinmangel gekennzeichnet (Ramin et al. 2010), der chemisch induziert wurde. Allen gemein ist jedoch der erhöhte Blutglukosespiegel.

**Zusammenfassend lässt sich der Einfluss eines Diabetes mellitus auf die microRNA-Expression für folgende microRNAs in mindestens zwei Studien feststellen:** miR-27b (Nielsen et al. 2012, vorliegende Arbeit), miR-29b (Zampetaki et al. 2010, Karolina et al. 2011, Wang et al. 2014b, Tao et al. 2016), miR-191 (Zampetaki et al. 2010, Yang et al. 2014, Dangwal et al. 2015), miR-222 (Zhao et al. 2011, Karolina et al. 2011, Ortega et al. 2014) und miR-433 (Zampetaki et al. 2010, vorliegende Arbeit). In weiterführenden Studien muss nun geklärt werden, ob diese microRNAs sensitiv und spezifisch genug sind, um als mögliche diagnostische Biomarker für Diabetes mellitus eingesetzt werden zu können.

Alle genannten Studien, einschließlich der vorliegenden Arbeit, analysierten die microRNA-Menge im gesamten Plasma bzw. Serum und nicht, aufgrund der ohnehin geringen RNA-Konzentration im Blut, in extrazellulären Vesikeln. Zirkulierende microRNAs entfalten ihre hormonähnliche Wirkung allerdings nur, wenn sie in extrazelluläre Vesikel verpackt werden (Übersichtsartikel Cortez et al. 2011, Chen et al. 2012, Turchinovich et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch nach einem frühen Marker gesucht, der Veränderungen in der frühen Phase der Plazentaentwicklung - der Trophoblastendifferenzierung - mit Hilfe spezifischer microRNAs im mütterlichen Blut anzeigen kann. Die miR-27b-, -141-, -191- und -222-Menge war sowohl in den Trophoblastzellen als auch im Plasma gravidier diabetischer Kaninchen reduziert. Daher könnte dieses microRNA-Profil im Plasma diabetischer Kaninchen, auch wenn nicht alle untersuchten microRNAs plazentaspezifisch sind, einen sehr frühen Hinweis auf die Trophoblastenfunktion geben, zu einem Zeitpunkt, an dem andere diagnostische Möglichkeiten fehlen.

#### **4.2.2 Einfluss eines experimentell erzeugten Diabetes mellitus Typ 1 auf die microRNA-Expression im Endometrium**

Der Implantationsprozess ist eine zeitlich und räumlich subtil abgestimmte Interaktion zwischen dem Endometrium und dem Embryo. Die Differenzierung von endometrialen Stromazellen zu Deziduazellen verläuft im Menschen und im Kaninchen in ähnlicher Weise (Davies & Hoffman 1973). Dieser Prozess ist entscheidend für die Implantation der Blastozyste, die nachfolgende Invasion des Trophoblasten, die Plazentaentwicklung und damit

für die Ernährung des Embryos (Brosens, Pijnenborg & Brosens 2002). In Tierstudien konnte gezeigt werden, dass ein Diabetes mellitus mit einer verminderten endometrialen Rezeptivität in Folge einer gestörten Dezidualisierung und Vaskularisation assoziiert ist (Garris 1988, Favaro et al. 2013). Ein fehlgeleiteter Differenzierungsprozess ist mit Schwangerschaftskomplikationen wie Fehlgeburt, Infertilität und Präeklampsie assoziiert (Übersichtsartikel Lim & Wang 2010, Vinketova, Mourdjeva & Oreshkova 2016). Die Rolle von microRNAs für die Entwicklung des weiblichen Reproduktionstraktes wird in Dicer-Inaktivierungsstudien bei Mäusen deutlich. Diese zeigen, dass die microRNA-Prozessierung für die Entwicklung muriner Stromazellen im Eileiter und Uterus *in vivo* (Hong et al. 2008) und für die Dezidualisierung endometrialer Stromazellen *in vitro* (Estella et al. 2012) notwendig ist. Eine veränderte endometriale microRNA-Expression geht mit einer erhöhten Abortrate (Bidarimath et al. 2015) und mit Implantationsstörungen einher (Revel et al. 2011). Für die in dieser Arbeit untersuchten microRNAs miR-27b (Qian et al. 2009), miR-29b (Qian et al. 2009, Kuokkanen et al. 2010, Su et al. 2010), miR-141 (Estella et al. 2012, Liu et al. 2013), miR-191 (Wang et al. 2016b), miR-210 (Su et al. 2010, Kuokkanen et al. 2010) und miR-222 (Qian et al. 2009, Kuokkanen et al. 2010) konnte im Einzelnen gezeigt werden, dass diese während des Dezidualisierungsprozesses verändert exprimiert werden bzw. diese microRNAs eine entscheidende Rolle während dieses Prozesses spielen. Im Unterschied zum humanen Endometrium war die miR-433 beim Kaninchen nicht detektierbar (Sha et al. 2011).

Im Endometrium diabetischer Häsinnen sind die miR-27b und -222 verringert exprimiert (Abb. 11). Während des Dezidualisierungsprozesses werden die miR-27b und -222 in *in vitro* kultivierten endometrialen Stromazellen herunterreguliert (Qian et al. 2009). Für die miR-222 wird eine regulatorische Funktion für das Wachstum von endometrialen Stromazellen beschrieben (Qian et al. 2009). Bei IVF-Patientinnen, bei denen wiederholt die Implantation der übertragenen Embryonen fehlschlug, war im Endometrium im Vergleich zu fertilen Patientinnen u.a. die miR-27b-Expression erhöht (Revel et al. 2011). Die verringerte miR-27b- und -222-Expression im Endometrium diabetischer Kaninchen könnte eine Gegenregulation darstellen, um durch die Forcierung der Dezidualisierung die durch einen Diabetes mellitus verminderte endometriale Rezeptivität und den Implantationserfolg zu erhöhen.

Die microRNA-prozessierenden Enzyme Drosha und Dicer sind bei Mäusen an der Dezidualisierung von endometrialen Stromazellen beteiligt (Hong et al. 2008, Zhang et al. 2016). Im Endometrium von Mäusen und Schweinen wurde für Drosha und Dicer eine Zunahme der Expression zum Zeitpunkt der Implantation festgestellt (Krawczynski et al. 2015b, Zhang et al. 2016). Im Endometrium diabetischer Häsinnen war die Drosha- und Dicer-Expression unverändert (Abb. 12).

Die Transkription des miR-222-Zielgens CNR1 war im Endometrium diabetischer Häsinnen signifikant erhöht. CNR1 wird bei Säugetieren im Uterus verstärkt während der

Implantationsphase in endometrialen Stromazellen exprimiert (Das et al. 1995, Fonseca et al. 2009). Es beeinflusst zusammen mit dem CNR1-Liganden Anandamid die Rezeptivität des Endometriums und damit die Implantation der Blastozyste (Schmid et al. 1997, Paria et al. 2001). Im Gegensatz dazu resultierte in humanen endometrialen Stromazellen die Aktivierung des CNR1 über den CNR1-Agonist WIN 55,212-2 in einer Inhibierung der Dezidualisierung (Kessler et al. 2005). Da CNR1 während der Dezidualisierung physiologischen Schwankungen unterliegt, könnte eine erhöhte endometriale CNR1-Transkription zusammen mit der reduzierten miR-222-Expression in den diabetischen Kaninchen für eine adaptive Regulation stehen. Für die abschließende Klärung der Fragestellung wären histologische Untersuchungen des Endometriums und die Charakterisierung des Endocannabinoid-Systems im Endometrium notwendig.

Im Endometrium diabetischer Kaninchen konnte eine tendenziell erhöhte Menge des miR-222-Zielgens ESR1 gemessen werden. ESR1 spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Dezidualisierung. Er inhibiert wie die miR-222 das Wachstum endometrialer Stromazellen (Pawar et al. 2015, Kumar, Yadav & Pakrasi 2017). Die Rolle des ESR1 während der Dezidualisierung ist in der Literatur nicht einheitlich beschrieben. In früheren Inaktivierungsstudien wurde gezeigt, dass der ESR1 für den Dezidualisierungsprozess entbehrlich ist (Paria et al. 1999, Hewitt et al. 2002). Allerdings lassen spätere Untersuchungen vermuten, dass die verwendeten ESR1-knockout-Mäuse nach wie vor eine verkürzte Form des ESR1 exprimieren (Dupont et al. 2000, Hewitt et al. 2010). Die Kontrolle der uterinen ESR1-Konzentration ist bedeutend, da sowohl eine Inaktivierung (Hewitt et al. 2002, Kumar, Yadav & Pakrasi 2017) als auch eine Überexpression (Tomic et al. 2007, Lee et al. 2010) des ESR1 zu einer gestörten Implantation führen. Im Falle einer uterinen ESR1-Überexpression treten vermehrt apoptotische Zellen im endometrialen Epithel auf (Tomic et al. 2007). Die leichte Erhöhung des ESR1 im Endometrium diabetischer Kaninchen lässt annehmen, dass die Dezidualisierung ungestört abläuft.

Die verminderte miR-222- und die erhöhte CNR1-Transkription sprechen für eine Adaptation des Endometriums bei der die, durch den maternalen Diabetes mellitus verminderte, endometriale Rezeptivität wieder verbessert wird. Abweichungen in der ESR1-Expression beeinträchtigen die Dezidualisierung nicht, könnten sich jedoch negativ auf die Implantation des Embryos auswirken.

#### **4.3 MicroRNA-Expression in Blastozysten – mögliche Regulatoren der metabolischen Adaptation?**

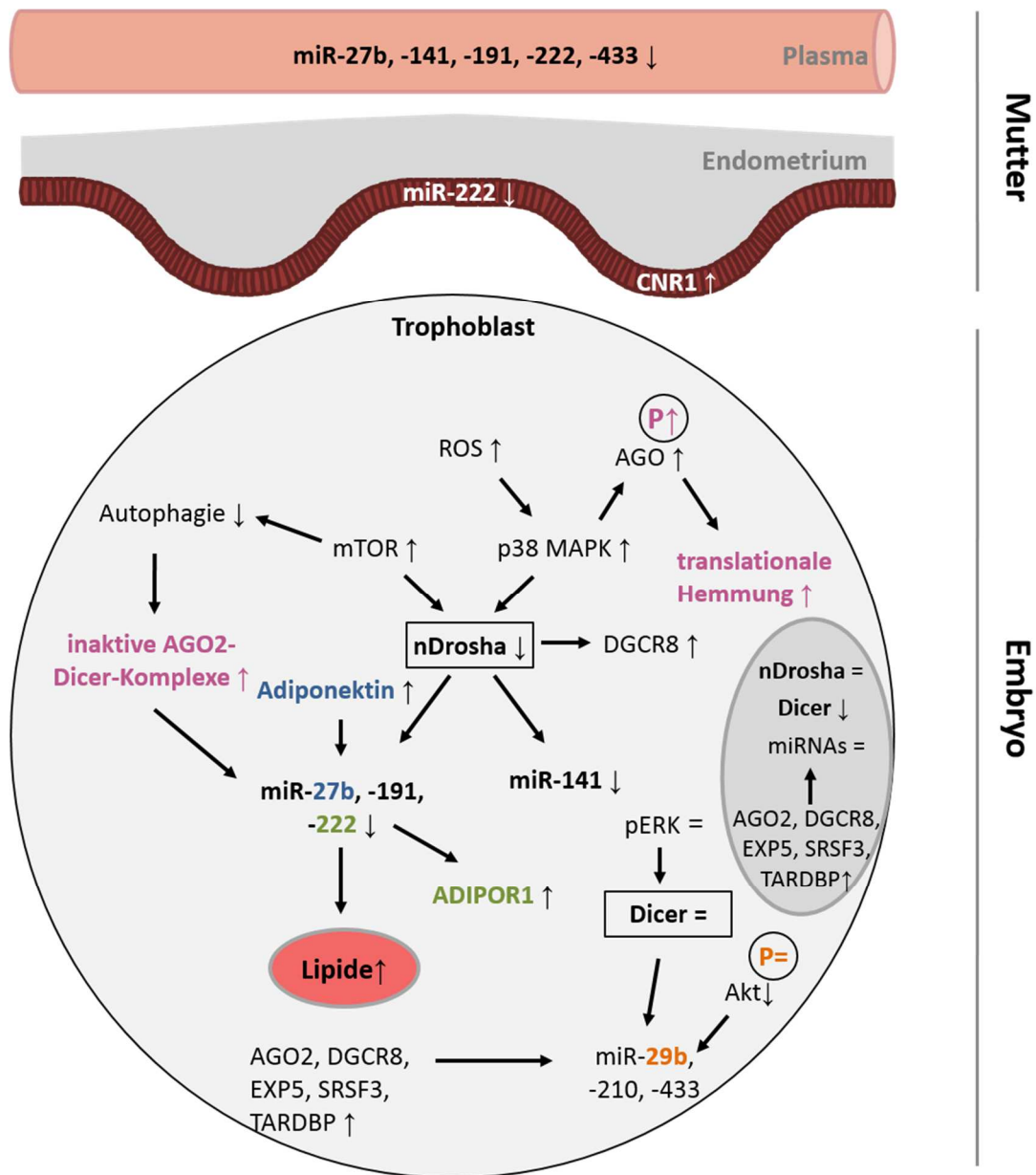
Hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Plazentaentwicklung und -funktion kann eine veränderte plazentare microRNA-Expression mit Schwangerschaftskomplikationen assoziiert werden (Übersichtsartikel Fu et al. 2013). Diese treten wiederum vermehrt in Schwangerschaften mit

einem präkonzeptionellen Diabetes mellitus auf (Hiilesmaa et al. 2000, De Valk et al. 2006, Abell et al. 2017). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss eines maternalen Diabetes mellitus auf die microRNA-Expression in Präimplantations-embryonen untersucht. Zum einen sollte geprüft werden, ob ein verändertes microRNA-Expressionsprofil einen Erklärungsansatz für den verminderten Implantationserfolg von Blastozysten diabetischer Kaninchen darstellt (Ramin et al. 2010). microRNAs sind mutmaßlich am embryo-maternalen Dialog während der Implantation beteiligt (Liu et al. 2016). Zum anderen wurde dieser Zeitpunkt gewählt, da sich Störungen in der Plazentafunktion, die mit Schwangerschaftskomplikationen einhergehen, bereits während der frühen Phase der Trophoblastendifferenzierung manifestieren (Übersichtsartikel Norwitz 2006).

#### **4.3.1 Einfluss eines experimentell erzeugten Diabetes mellitus Typ 1 auf die microRNA-Expression in Präimplantationsembryonen**

In Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen konnte eine verminderte miR-27b-, -141-, -191- und -222-Expression und eine tendenzielle Abnahme in der miR-29b-Menge beobachtet werden (Abb. 14, Abb. 28). Eine mögliche Erklärung dafür stellt die deutliche Verringerung in der Drosha-Proteinmenge in den Trophoblastzellen diabetischer Häsinnen dar. Die unveränderte Expression der miR-210 und -433 in den Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen deutet darauf hin, dass diese microRNAs ein schlechteres Drosha-Substrat darstellen (Feng et al. 2011) und posttranskriptionalen Veränderungen unterliegen (Siomi & Siomi 2010, Newman & Hammond 2010, siehe Kapitel 4.4).

Ein mütterlicher Diabetes mellitus hatte in Embryoblastzellen trotz veränderter Expression von Genen der microRNA-Biogenese (Abb. 17, Abb. 18) keinen Einfluss auf die Transkription der untersuchten microRNAs (Abb. 14). Möglicherweise wird der verringerten Dicer-Proteinmenge durch die gesteigerte Expression von AGO2, DGCR8, EXP5, SRSF3 und TARDBP entgegengewirkt, um die microRNA-Biogenese aufrechtzuerhalten (siehe Kapitel 4.4, Übersicht Abb. 28).



**Abb. 28: Auswirkungen eines maternalen Diabetes mellitus auf die microRNA-Prozessierung und –Expression in Präimplantationsembryonen diabetischer Kaninchen am Tag 6 p.c.**

Die wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in diesem Schema im Kontext von Daten zum Modell zusammenfassend dargestellt. Dabei konnten die Beobachtungen in Embryonen diabetischer Kaninchen in den Zusammenhang zur mTOR-Signaltransduktion (Gürke et al. 2015 & 2016), dem p38- und Adiponektin-Signalweg (Schindler et al. 2013, 2014, 2017), der Akt-Phosphorylierung (Thieme et al. 2012b) und ROS-Akkumulation (Haucke et al. 2014, Dissertation Haucke 2015) gestellt werden. In diesem Netzwerk könnte nDrosha eine zentrale Rolle bei der Regulation der Anpassungsprozesse insbesondere in Trophoblasten haben und stellt möglicherweise einen zentralen Faktor für diabetische Embryopathien dar. **nDrosha**- nukleäres Drosha; Expression: ↑ erhöht, ↓ verringert, = unverändert; **Annahmen**

### miR-27b

Ein maternaler Diabetes verringert die Expression der miR-27b in Trophoblastzellen während der Präimplantationsphase. Die miR-27b ist für die Plazentaentwicklung aufgrund ihrer regulatorischen Funktion in der Angiogenese bedeutend. Es wurde gezeigt, dass die miR-27b für die Sprossung und Verzweigung von Kapillaren und für die venöse Differenzierung



essentiell ist (Kuehbacher et al. 2007, Zhou et al. 2011). Aufgrund ihrer proliferativen (Mixelena et al. 2016) bzw. anti-proliferativen Eigenschaften (Lee et al. 2012, Tao et al. 2015) sowie ihrer Funktion während der Differenzierung (Karbiener et al. 2009, Vilches et al. 2014) ist von einem Einfluss der miR-27b auf die Trophoblasten-Proliferation und -Differenzierung auszugehen. Eine geringere miR-27b-Menge steht im Zusammenhang mit der Blastozysten-Qualität, da ihre Expression in aneuploiden Blastozysten verringert ist (Rosenbluth et al. 2013). Neben der veränderten Drosha- und Dicer-Expression (Abb. 17, Abb. 18) könnte die erhöhte Adiponektin-Expression (Schindler et al. 2013) an der Regulation der miR-27b-Transkription in Blastozysten diabetischer Kaninchen beteiligt sein. Adiponektin führt in humanen Chondrosarkoma-Zellen zu einer Inhibierung der miR-27b-Expression (Huang et al. 2016) und zu einer Erhöhung intrazellulärer Lipidvesikel in *in vitro*-kultivierten Kaninchenblastozysten (Schindler et al. 2017). Da die miR-27b-Menge in humanen Präadipozyten invers mit der Adipogenese und Triglyzerid-Akkumulation korreliert ist (Karbiener et al. 2009, Zhu et al. 2014), stellt die Regulation der miR-27b-Expression über Adiponektin einen potentiellen Zusammenhang für die gesteigerte Zahl an intrazellulären Lipidtropfen in Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen her (Schindler et al. 2014).

### miR-29b

Die miR-29b spielt eine große Rolle während der Mesendoderm- und Trophektoderm-Entwicklung bei Mäusen (Kapitel 1.4.6, Tu et al. 2015, Cui et al. 2016). Daher könnte die tendenziell verringerte miR-29b-Menge in Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen ein erster Hinweis auf eine gestörte trophektodermale Differenzierung sein. Die miR-29b reguliert die Apoptose und Invasion von Trophoblastzellen in der entwickelten und reifen Plazenta sowie die Angiogenese (Li et al. 2013a, Gu et al. 2016). In Plazenten von präeklampsischen Frauen ist die miR-29b-Menge erhöht (Hu et al. 2009, Li et al. 2013a).

In Embryoblastzellen diabetischer Kaninchen ist die miR-29b-Expression stabil und korreliert nicht mit Veränderungen der DNMT3a-, DNMT3b- (Dissertation Katarzyna Grybel, unveröffentlicht) und Brachyury-Transkription (Thieme et al. 2012a).

Es ist anzunehmen, dass die miR-29b an embryonalen Adaptationsmechanismen infolge hormoneller Veränderungen beteiligt ist. Unter Insulinmangel werden autokrine Wachstumsfaktoren wie IGF und Adiponektin beim Embryo aktiviert (Thieme et al. 2012b, Schindler et al. 2013). Das miR-29b-Zielgen IGF1 (Fenn et al. 2013, Gao et al. 2016) wird in Blastozysten diabetischer Häsinnen verstärkt exprimiert (Thieme et al. 2012b). Die miR-29b könnte in Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen an der Regulation und Adaptation des Insulin/IGF-Signalwegs beteiligt sein.

### miR-141

Ein maternaler Diabetes verringert die Expression der miR-141 in Trophoblastzellen während der Präimplantationsphase. In der humanen Choriokarzinoma-Zelllinie JEG3 führt eine miR-141-Inhibierung zu einer reduzierten Proliferation, Invasion und Zellviabilität (Morales-Prieto, Schleussner & Markert 2011, Ospina-Prieto et al. 2016, Guo et al. 2018). Die Signalkaskade der miR-141-Expression erfolgt über c-Myc (Lin et al. 2009) und den LIF-STAT-Signalweg. Eine 4-6-stündige Stimulation mit LIF reduziert die miR-141-Expression in JEG3-Zellen (Morales-Prieto, Schleussner & Markert 2011, Kapitel 4.7) und führt zu einer Erhöhung in Trophoblastzellen von in *in vitro*-kultivierten Kaninchenblastozysten (Abb. 27). LIF unterstützt die Entwicklung von Präimplantationsembryonen und reguliert die Differenzierung, Migration, Invasion und Proliferation von Trophoblast- und Embryoblastzellen (Fitzgerald et al. 2005, Takahashi et al. 2008, Liu et al. 2014). In den Blastozysten diabetischer Kaninchen ist die LIF-Rezeptor (LIFR)-Transkription erhöht (unveröffentlicht, Maria Schindler). Eine erhöhte LIFR-Expression in den Blastozysten diabetischer Kaninchen könnte im Zusammenhang mit der verringerten miR-141-Expression in den Trophoblastzellen stehen. Die Wirkung auf den LIFR wurde nicht gemessen.

Zusammengefasst lässt die Reduktion der miR-141 einen negativen Einfluss auf Proliferation, Differenzierung und Invasion von Trophoblastzellen in diabetischen Kaninchen vermuten. Eine erhöhte plazentare miR-141-Menge korreliert mit Komplikationen wie Präeklampsie (Ospina-Prieto et al. 2016), fetaler Wachstums-retardierung (Tang et al. 2013a) und fetaler Makrosomie (Guo et al. 2018). Rosenbluth et al. (2013) zeigte, dass in aneuploiden humanen Blastozysten die miR-141-Expression verringert war. Da Aneuploidie eine der Hauptursachen für einen gescheiterten Implantationsprozess darstellt, könnte eine verminderte miR-141-Expression in den Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen auf eine erschwerte Nidation hindeuten.

### miR-191

Ein maternaler Diabetes verringert die Expression der miR-191 in Trophoblastzellen während der Präimplantationsphase. Die miR-191 ist an der Regulation der Keimblattentwicklung beteiligt. Eine miR-191-Inhibierung in murinen embryonalen Stammzellen führt zu einer erhöhten Expression mesodermaler (Brachyury, Gsc, Bmp4, Lhx1), endodermaler (Gata4 und Gata6) und trophektodermaler (Cdx2) Marker (Hadjimichael et al. 2016). Die entwicklungsspezifischen Gene sind für die Gastrulation und Plazentaentwicklung essenziell. Das Kulturmedium von degenerierten bzw. aneuploiden Blastozysten weist eine erhöhte miR-191-Transkriptmenge auf (Rosenbluth et al. 2014, Kropp & Khatib 2015).

Die miR-191 reguliert die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen z.B. indem sie in 3T3-L1-Präadipozyten die Differenzierung inhibiert und die Lipidakkumulation hemmt (Ji et al. 2014). Die Reduktion der miR-191 und miR-27b könnte einen Mechanismus für die

Akkumulation von Lipidvesikeln in Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen darstellen (Schindler et al. 2014).

Während der Plazentaentwicklung kommt der miR-191 ebenfalls eine regulatorische Funktion zu. Sie wird in der Plazenta vor allem im ersten Trimester exprimiert (Luo et al. 2009), wo sie möglicherweise aufgrund ihrer proliferativen (Nagpal et al. 2013) bzw. anti-proliferativen (Polioudakis et al. 2015) und angiogenen (Suarez et al. 2008, Dangwal et al. 2015) bzw. anti-angiogenen (Gu et al. 2017) Eigenschaften an der Plazentaentwicklung beteiligt ist. Eine erhöhte miR-191-Expression konnte in Plazenten von schwangeren Frauen mit einer schweren Präeklampsie gemessen werden (Choi et al. 2013). Die verminderte miR-191-Menge in Trophoblastzellen diabetischer Häsinnen könnte einen negativen Einfluss auf die Trophoblastendifferenzierung und Plazentaentwicklung haben und Schwangerschaftskomplikationen wie Präeklampsie begünstigen.

#### miR-210

In Blastozysten diabetischer Kaninchen war die miR-210-Transkription unverändert. Daher kann angenommen werden, dass die miR-210 keinen Einfluss auf den veränderten embryonalen Stoffwechsel nimmt. Während der Plazentaentwicklung ist die miR-210 von enormer Bedeutung für die Regulation der Trophoblasten-Migration, -Invasion und -Proliferation (Zhang et al. 2012, Anton et al. 2013). Ihre veränderte Expression kann mit Schwangerschaftskomplikationen (Mayor-Lynn et al. 2011, Lee et al. 2011, Enquobahrie et al. 2016) korreliert werden.

#### miR-222

In Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen war die miR-222-Transkription vermindert. Dies kann Folgen für die Embryonal- und Fetalentwicklung haben, da die miR-222-Expression in Trophoblastzellen von entwicklungsretardierten Föten verringert ist (Bidarimath et al. 2015). Die miR-222 ist vermutlich an der Regulation der Gastrulation beteiligt (Xin et al. 2015). Im Verlauf der Embryonalentwicklung ist ihre Reduktion essenziell für die osteogene (yan et al. 2016), myogene (Cardinali et al. 2009) und adipogene Differenzierung (Xie, Lim & Lodish 2009, Ortega et al. 2010).

Die erhöhte ADIPOR1-Transkription des miR-222-Zielgens (Hwang et al. 2013) in Blastozysten diabetischer Kaninchen (Schindler et al. 2013) geht mit einer erhöhten Adiponektin-Expression (Schindler et al. 2013) einher. Adiponektin führt zu einer Erhöhung intrazellulärer Lipidvesikel in *in vitro*-kultivierten Kaninchenblastozysten (Schindler et al. 2017). Demnach kann die verringerte miR-222-Expression in Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen Konsequenzen für die Differenzierung und den Fettstoffwechsel der Embryonen haben, wie in Blastozysten diabetischer Kaninchen zu beobachten ist (Schindler et al. 2014). Eine erhöhte miR-222-Menge konnte im Fettgewebe von adipösen Mäusen (Xie, Lim & Lodish

2009, Chartoumpakis et al. 2012) und schwangeren adipösen (Nardelli et al. 2017) bzw. schwangeren diabetischen Patientinnen (Shi et al. 2014) gemessen werden.

Die Bedeutung der miR-222 für die Plazentaentwicklung ist bisher nicht belegt. Aufgrund ihrer anti-angiogenen (Poliseno et al. 2006, Dentelli et al. 2010) und proliferativen (Wang et al. 2013b, Sun et al. 2014) Eigenschaften ist sie vermutlich am Prozess der placentaren Gefäßneubildung bzw. -modellierung und Plazentaentwicklung beteiligt. Diese Vermutung wird gestützt durch eine Studie mit präeklampsischen Frauen, in deren Plazenten eine erhöhte miR-222-Menge gemessen wurde (Hu et al. 2009). Eine deregulierte miR-222-Transkription während einer diabetischen Schwangerschaft kann als Teil eines Adaptationsprozesses gesehen werden, der mit Konsequenzen für die Plazentaentwicklung und für die fetale und neonatale Gesundheit verbunden sein kann.

### miR-433

In Blastozysten diabetischer Kaninchen war die miR-433-Expression unverändert. Daher kann angenommen werden, dass die miR-433 keinen Einfluss auf den veränderten embryonalen Stoffwechsel nimmt. Die miR-433 reguliert den Pluripotenzstatus und die Differenzierung von Stammzellen (Liu et al. 2010b, Cheung et al. 2012, Guo et al. 2014). Ihre Zugehörigkeit zum C14M-Cluster (Morales-Prieto et al. 2013) und ihre angiogenen Eigenschaften (Sun et al. 2016) lassen vermuten, dass die miR-433 an der Plazentaentwicklung beteiligt ist.

Die meisten microRNAs waren im Plasma des Muttertieres ebenso verändert. Da in der Literatur bislang wenig über die genannten microRNAs und deren Rolle für die Embryonal- und Plazentaentwicklung beschrieben ist, sollte in weiterführenden Studien mittels funktionaler Ansätze in Trophoblastzelllinien und Embryonal- bzw. iPS-Zellen ihre Funktion dahingehend untersucht werden. Konkret wären *in vitro*-Versuche mit microRNA-Inhibitoren oder *mimics* denkbar. Über die Markierung von microRNAs könnte der Internalisierungs- und Sekretionsmechanismus näher untersucht werden. Des Weiteren ist in Folgeprojekten geplant, in 3D-Ko-Kulturmodellen (Trophoblast-Spheroide und endometriale Stromzellen) die Rolle von spezifischen microRNAs während der Implantation und Plazentation zu untersuchen. Somit könnten darüber hinaus die Eignung der miR-27b, -141, -191 und -222 als frühe potentielle Biomarker für Plazentadysfunktionen weiter aufgeklärt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden nur einige microRNAs untersucht. Die Auswahl erfolgte anhand von Literaturhinweisen. In nachfolgenden Studien wäre es sinnvoll mit Hilfe der *small RNA*-Sequenzierung weitere microRNAs zu identifizieren, die ein unterschiedliches Expressionsniveau in Blastozysten von diabetischen und gesunden Tieren aufweisen. Dieses microRNA-Muster könnte helfen die Adaptation der Blastozyste an das diabetische Milieu besser zu verstehen und mögliche Mechanismen zu identifizieren. In Bezug auf die Plazentaentwicklung sind vor allem microRNAs aus dem C14M- und miR-371-3-Cluster von

Bedeutung, da diese besonders während des ersten Trimenons exprimiert werden. Das C19M-Cluster wird hingegen nur in Primaten exprimiert und scheidet daher für die Analyse in Kaninchenblastozysten aus.

#### **4.3.2 MicroRNAs in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit – Vermittler zwischen Embryoblast und Trophoblast?**

Mit der Differenzierung von Embryoblast und Trophoblast entsteht die Blastozyste. Der Trophoblast bildet eine Hohlkugel und umrahmt die Blastozystenhöhle, zu der die innen liegenden Zellen des Embryoblasten direkten und indirekten Kontakt haben (Watson, Natale & Barcroft 2004, Fischer et al. 2012). Die Blastozystenhöhle ist flüssigkeitsgefüllt und es konnten bereits verschiedene Metabolite (D'Alessandro et al. 2012, Haucke et al. 2014), Proteine und Aminosäuren (Jensen et al. 2013, Gürke et al. 2015, Poli et al. 2015) sowie DNA (Palini et al. 2013, Tobler et al. 2015) nachgewiesen werden. Der Nachweis von microRNAs in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit wurde bisher nicht beschrieben. MicroRNAs kommen in zahlreichen Körperflüssigkeiten wie dem Seminalplasma, der Follikel- und Amnionflüssigkeit vor (Weber et al. 2010, Sang et al. 2013, Santonocito et al. 2014). Während die aus der Blastozystenhöhlenflüssigkeit gewonnene DNA hauptsächlich von apoptotischen Embryoblast- oder Trophoblastzellen stammen und deshalb zur Beurteilung von Chromosomenstörungen dienen könnte (Palini et al. 2013, Gianaroli et al. 2014), ist die Funktion von microRNAs in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit ungeklärt. Es ist anzunehmen, dass sie den Stoffwechsel der anliegenden Zellen regulieren können. Dies ist in ähnlich konfigurierten Strukturen wie dem Follikel bereits gezeigt worden. So sind exosomale microRNAs in der Follikelflüssigkeit über die Regulation von spezifischen Zielgenen an der Follikelentwicklung beteiligt (Sohel et al. 2013). Die microRNAs in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit stammen vermutlich von den umgebenden Embryoblast- und Trophoblastzellen, wobei die Sekretions- und Internalisierungsmechanismen noch ungeklärt sind. Für die Zell-Zell-Kommunikation beider Zelllinien ist der zielgerichtete Transport der microRNAs entlang aktinhaltiger Filopodien, die die Blastozystenhöhle durchspannen, denkbar (Salas-Vidal & Lomelí 2004, Übersichtsartikel Fairchild & Barna 2014). Ob in Kaninchenblastozysten die Signalweiterleitung entlang der Filopodien wie üblich vom Embryoblast zum Trophoblasten stattfindet (Salas-Vidal & Lomelí 2004, Übersichtsartikel Fairchild & Barna 2014), ist nicht bekannt. In Kaninchenblastozysten besteht nur für die miR-222 eine Korrelation zwischen der microRNA-Menge in Trophoblastzellen und in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit (Abb. 14, Abb. 15). Bei den anderen getesteten microRNAs ergaben die Messungen hohe Standardfehler, der auf eine hohe Variabilität der Proben hindeutet. Dieses Phänomen ist auch aus Proteom-Untersuchungen von Poli et al. (2015) in humanen Blastozysten bekannt.

#### 4.4 Embryonale microRNA-Biogenese in der diabetischen Frühschwangerschaft

Die Bedeutung der microRNA-prozessierenden Enzyme Dicer und Drosha für die Embryonalentwicklung konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden. So führt eine zygotische Inaktivierung von Dicer oder Drosha in Mäusen zu einem embryonalen Arrest an Tag 6,5 bis 7,5 *p.c.* (Bernstein et al. 2003, Chong et al. 2010). Aber auch ein Ausschalten der Gene AGO2 (Morita et al. 2007, Lykke-Andersen et al. 2008), DGCR8 (Wang et al. 2007), TARDBP (Wu et al. 2009, Sephton et al. 2010) und SRSF3 (Jumaa, Wie & Nielsen 1999) ist mit einem Stillstand in der frühen Embryonalentwicklung verbunden. In embryonalen Stammzellen steuern AGO2 (Shekar et al. 2011, Ngondo et al. 2018), Dicer (Kanellopoulou et al. 2005, Murchison et al. 2005), DGCR8 (Wang et al. 2007), Drosha (Qi et al. 2009, Oskowitz et al. 2011) und TARDBP (Chiang et al. 2010) wichtige Funktionen wie den Erhalt des Stammzellcharakters, die Differenzierung und die Proliferation. In Kaninchenembryonen werden die Gene der microRNA-Biogenese (AGO2, DGCR8, Dicer, Drosha, EXP5, SRSF3 und TARDBP) konstant exprimiert (Abb. 16). In Mäusen nimmt die mRNA-Transkriptmenge von AGO2, DGCR8, Dicer, Drosha und EXP5 mit dem Zygoten- bzw. Morulastadium deutlich ab. In Blastozysten werden sie nur gering exprimiert (García-López & del Mazo 2012). Hingegen konnte in Rinder-, Mäuse-, und Schweine-Morulae und -Blastozysten eine konstante Expression von AGO2 (Lykke-Andersen et al. 2008) und Dicer (Burrola-Barraza et al. 2011, Stowe et al. 2012) nachgewiesen werden. SRSF3 und TARDBP war in Mäusen sowohl in Oozyten als auch in Blastozysten von Mäusen nachweisbar (Jumaa, Wie & Nielsen 1999, Sephton et al. 2010). Speziespezifische Unterschiede sowie die Expressionsanalyse in *in vitro*-kultivierten Mäuseembryonen (García-López & del Mazo 2012) könnten mögliche Ursachen für die konträren Ergebnisse der Studien darstellen.

##### Regulation des Mikroprozessor-Komplexes Drosha-DGCR8

Die Adaptation der Kaninchenblastozyste an einen maternalen Diabetes geht mit Veränderungen des embryonalen Stoffwechsels und der Signaltransduktion einher. In Blastozysten diabetischer Kaninchen wurde in Trophoblastzellen eine erhöhte mTOR-Phosphorylierung und Aktivität des mTOR-Signalweges beschrieben (Gürke et al. 2015 & 2016). mTOR ist ein zentrales Molekül für zellphysiologische Prozesse. Auch Drosha wird über mTOR reguliert. mTOR aktiviert die E3-Ligase *Mouse double minute 2* (Mdm2) und fördert somit den Abbau von Drosha im Proteasom (Ye et al. 2015). Die Inhibierung von mTOR durch Rapamycin resultiert in einem veränderten microRNA-Expressionsprofil (Totary-Jain et al. 2013). Die verminderte microRNA-Expression in Trophoblastzellen diabetischer Häsinnen könnte demnach über die mTOR-Aktivierung und einem forcierten Abbau von Drosha erklärt werden. Die Abnahme von Drosha ist mit einer erhöhten Stress-Sensibilität und Zelltod

assoziiert (Yang et al. 2015). Blastozysten diabetischer Kaninchen sind einem erhöhten Stress ausgesetzt. Sie weisen mehr oxidierte Proteine und ROS (Haucke et al. 2014, Dissertation Haucke 2015), eine erhöhte Apoptoserate (Ramin et al. 2010) und eine erhöhte ATF4- und p38 MAPK-Expression auf (Schindler et al. 2014 & 2017). Unter Stressbedingungen wird Drosha über die p38 MAPK phosphoryliert, wodurch die Interaktion mit DGCR8 unterbunden wird. Drosha wird in das Zytoplasma exportiert und abgebaut (Yang et al. 2015). Ob die Regulation von Drosha über mTOR und p38 MAPK in unabhängigen Signalwegen verläuft, ist nicht geklärt. Aus Zelllinien ist bekannt, dass p38 in der Lage ist mTOR zu aktivieren (Cully et al. 2010, Hernández et al. 2011).

Drosha spielt neben der pri-miRNA-Prozessierung auch eine wichtige Rolle im RNA-Metabolismus, wie die posttranskriptionale Destabilisierung von mRNAs zeigt (Chong et al. 2010). Die gut beschriebene Auto- und Kreuzregulation zwischen Drosha und DGCR8 dient der homöostatischen Kontrolle der Mikroprozessor-Aktivität und zellulären microRNA-Menge (Han et al. 2009). Erhöhte Drosha- und DGCR8-Spiegel führen zur Drosha-vermittelten Spaltung und somit zur Destabilisierung der DGCR8-RNA. Dies führt zu einer Verringerung in der Drosha-Proteinmenge und einer herabgesetzten Aktivität des Mikroprozessor-Komplexes, da DGCR8 Drosha über Protein-Protein-Wechselwirkungen stabilisiert (Han et al. 2009). Drosha-defiziente Zellen weisen eine erhöhte DGCR8-Expression auf (Han et al. 2009). Dieser Zusammenhang zeigt sich auch in Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen, wo die deutliche Reduktion von Drosha mit der erhöhten DGCR8-Transkription korreliert. Des Weiteren reguliert TARDBP die Drosha-Stabilität, indem es an Drosha bindet und vor dem proteasomalen Abbau schützt (Di Carlo et al. 2013). Die gesteigerte DGCR8- und TARDBP-Transkription könnte demnach über eine Erhöhung der Drosha-Stabilität der Drosha-Destabilisierung entgegenwirken, um die Mikroprozessor-Aktivität aufrecht zu erhalten.

Ein mütterlicher Diabetes bewirkte in Trophoblastzellen nicht eine generell veränderte microRNA-Expression. Die erhöhte TARDBP- und SRSF3-Transkription könnten ein Hinweis darauf sein, dass bestimmte pri-miRNAs bevorzugt prozessiert werden (Kawahara & Mieda-Sato 2012, Auyeung et al. 2013, Kim et al. 2018). Des Weiteren ist bekannt, dass die pri-miRNA-Prozessierung durch Drosha unterschiedlich effizient verläuft und mit der endogenen microRNA-Expression und Sekundärstruktur korreliert (Feng et al. 2011, Sperber et al. 2014). In Drosha-defizienten Zellen wurden pri-miRNAs mit weniger Basenfehlpaarungen effizienter prozessiert (Sperber et al. 2014). Während der embryonalen und zellulären Entwicklung stellt dies eine physiologische Regulation der microRNA-Biogenese dar (Sperber et al. 2014). Hierbei zeigt sich, dass eine veränderte Drosha-Expression, wie im diabetischen Kaninchenmodell beobachtet werden konnte, vermutlich zu einer Verschiebung des embryonalen microRNA-Expressionsprofils führt. Da Drosha eine microRNA-abhängige als auch -unabhängige Rolle für den Zellzyklus und für die Proliferation humaner embryonaler

Stammzellen spielt (Kanellopoulou et al. 2005, Wang et al. 2007, Qi et al. 2009, Oskowitz et al. 2011), ist anzunehmen, dass in Trophoblastzellen eine Reduktion von Drosha, verbunden mit einer veränderten microRNA-Expression, zu einer Entwicklungsverzögerung und ferner zu einem Absterben des Embryos führen kann (Entwicklungsverzögerung bei Kaninchenembryonen diabetischer Mütter gezeigt von Ramin et al. 2010). Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Drosha-Veränderungen Teil einer Stressantwort sind, die zur Adaptation des Embryos führen. Die microRNA-Expression in der Plazenta am Tag 12 *p.c.* war in diabetischen Tieren unverändert.

### Regulation von Dicer

Die erhöhte embryonale AGO2- und EXP5-Transkription könnte dazu beitragen, die microRNA-Expression in Embryoblastzellen diabetischer Kaninchen aufrechtzuerhalten, da AGO2 (Liu et al. 2012) und EXP5 (Zeng & Cullen 2004) bei schwankenden Dicer-Spiegeln als vorübergehende pre-miRNA-Lagerstätten beschrieben werden. AGO2 kann unter bestimmten Bedingungen die pre-miRNA-Prozessierung übernehmen (Kim, Kim & Kim 2016). Außerdem kann eine vermehrte Expression von EXP5, die in Embryoblastzellen diabetischer Kaninchen gemessen wurde, zu einer erhöhten microRNA-Expression führen (Yi et al. 2005). Des Weiteren deutet die gesteigerte TARDBP-Expression in Blastozysten diabetischer Kaninchen darauf hin, dass Dicer bestimmte pre-miRNAs bevorzugt prozessiert (Kawahara & Mieda-Sato 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Auswahl an microRNAs untersucht. Daher ist zu vermuten, dass eine verringerte Dicer-Expression die Prozessierung bestimmter, für die Embryonalentwicklung wichtiger, pre-miRNAs herabsetzen kann.

Dicer ist essentiell für die Differenzierung und die Proliferation von embryonalen und mesenchymalen Stammzellen (Kanellopoulou et al. 2005, Zhao et al. 2015). Der Verlust an Dicer treibt differenzierende Zellen in die Seneszenz (Jauhari et al. 2017). Ein Dicer-knockout verzögert bei Mäuseembryonen die Gastrulation (Spruce et al. 2010). Die unter diabetischen Entwicklungsbedingungen gemessene Abnahme der embryonalen Dicer-Expression könnte eine Ursache für Subfertilität und die verzögerte Embryonalentwicklung bei diabetischen Kaninchen sein (Ramin et al. 2010). In Dicer-defizienten embryonalen Stammzellen (Qi et al. 2009, Spruce et al. 2010) wurde wie in Embryoblastzellen diabetischer Kaninchenblastozysten eine erhöhte Apoptoserate (Ramin et al. 2010) und Oct4-Expression (Dissertation Katarzyna Grybel, unveröffentlicht) gemessen. Embryonen von diabetischen Kaninchen akkumulieren ROS in Embryoblastzellen (Dissertation Haucke 2015), was wiederum Dicer beeinflussen könnte. In verschiedenen Zelllinien wurde der Zusammenhang von ROS und der Inhibition der Dicer-Expression bereits gezeigt (Wiesen & Tomasi 2009). Auch eine Feedback-Regulation von Dicer über verschiedene microRNAs wie miR-103/107 (Martello et al. 2010), miR-192 (Feinberg-Gorenshtein et al. 2013), miR-191 (Zhang et al. 2018) und Mitglieder der let-7 microRNA-Familie (Forman, Legesse-Miller & Coller 2008) ist beschrieben.



Es ist anzunehmen, dass in Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen die pre-miRNA-Menge aufgrund einer reduzierten Drosha-Expression verringert ist. Da die Dicer-mRNA mit pre-miRNAs um die Bindung an EXP5 konkurrieren (Bennasser et al. 2011), würde dies dafür sprechen, dass in Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen mehr Dicer-mRNA ins Zytoplasma transportiert wird. Die Dicer-mRNA- und -Proteinmenge war in Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen jedoch unverändert (Abb. 17, Abb. 18). Eine vermeintlich verminderte pre-miRNA-Menge bei gleichbleibender Dicer-Expression würde für ein vermehrtes Vorkommen inaktiver Dicer-AGO2-Komplexe sprechen. Dicer wird wie AGO2 über den Prozess der Autophagie reguliert (Gibbins et al. 2012), indem inaktive Dicer-AGO2-Komplexe autophagosomal abgebaut werden. Aufgrund einer erhöhten mTOR-Phosphorylierung, verbunden mit einer verminderten Autophagie (Gürke et al. 2015 & 2016), ist anzunehmen, dass in Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen vermehrt inaktive Dicer-AGO2-Komplexe vorliegen, die die microRNA-Prozessierung hemmen (Gibbins et al. 2012).

### Regulation von AGO2

In Embryoblast- und Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen konnte eine erhöhte AGO2-Transkription festgestellt werden (Abb. 17). AGO-Proteine binden reife microRNAs und schützen sie so vor dem Abbau durch Exoribonukleasen (Winter & Diederichs 2011). Die Expression der miR-27b-, -141-, -191- und -222 in Trophoblastzellen war indes verringert und in Embryoblastzellen unverändert.

Blastozysten diabetischer Kaninchen weisen eine geringere autophagosomale Aktivität und Anzahl lysosomaler Vesikel, insbesondere in Trophoblastzellen, auf (Gürke et al. 2016). Die verringerte Autophagie in Trophoblasten diabetischer Kaninchen könnte einen Adaptationsmechanismus darstellen, der zur Abnahme spezifischer microRNAs in Trophoblastzellen führt. Denn über den Prozess der Autophagie werden aktive Dicer-AGO2-Komplexe stabilisiert, indem inaktives AGO2 proteasomal (Smibert et al. 2013) und/ oder autophagosomal abgebaut wird (Gibbins et al. 2012). Autophagie-inhibierte Zellen zeigen eine verminderte Beladung von AGO mit microRNA-Duplexen und verringerte microRNA-Spiegel, da inaktive und aktive Dicer-AGO2-Komplexe vermutlich um Ko-Faktoren, Substrate und Zielgene konkurrieren (Gibbins et al. 2012).

Es ist bekannt, dass die AGO2-RNA-Menge nicht mit der AGO2-Proteinmenge korreliert (Martinez & Gregory 2013) und dass AGO2 posttranskriptional über die microRNA-Verfügbarkeit reguliert wird. So führt eine beeinträchtigte microRNA-Biogenese durch ein Ausschalten der Gene DGCR8 bzw. Dicer zu einem Verlust des AGO2-Proteins (Martinez & Gregory 2013; Smibert et al. 2013). Die Stabilität des AGO2-Proteins hängt stark vom Vorhandensein reifer microRNAs sowie eines reifen RISC ab. Bei einer verminderten microRNA-Menge, wie in den Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen, wäre eine Reduktion in der AGO2-Proteinexpression möglich mit Folgen für die weitere Plazentaentwicklung. In

Mäusen resultiert eine verminderte AGO2-Expression in Fehlbildungen der Plazenta (Cheloufi et al. 2010).

**Zusammenfassend lässt sich der Einfluss eines maternalen Diabetes mellitus auf die microRNA-Prozessierung in Trophoblastzellen wie folgt zusammenfassen (Abb. 28):** Die erhöhte mTOR-Phosphorylierung (Gürke et al. 2015) oder p38 MAPK-Expression (Schindler et al. 2017) in Blastozysten diabetischer Kaninchen sind vermutlich am proteasomalen Abbau von Drosha beteiligt (Ye et al. 2015, Yang et al. 2015). Um die Mikroprozessor-Aktivität aufrecht zu erhalten, erhöhen DGCR8 und TARDBP die Drosha-Stabilität. (Han et al. 2009, Di Carlo et al. 2013). Aufgrund der mutmaßlich verminderten pre-miRNA-Mengen in Kombination mit der unveränderten Dicer-Expression sowie einer verminderten autophagosomalen Aktivität (Gürke et al. 2016), ist die Menge inaktiver Dicer-AGO2-Komplexe vermutlich erhöht (Gibbins et al. 2012). Die microRNA-Prozessierung wird dadurch zusätzlich gehemmt. Des Weiteren wirkt sich eine verminderte Menge reifer microRNAs negativ auf die AGO2-Proteinmenge aus. Die dargestellten Zusammenhänge könnten eine mögliche Erklärung für die verminderte Expression spezifischer microRNAs darstellen. Die erhöhte TARDBP- und SRSF3-Expression deutet außerdem darauf hin, dass die Prozessierung von pri-miRNAs unterschiedlich effizient verläuft. Damit lässt sich erklären, warum sich eine drastische Reduktion der Drosha-Expression nicht auf die Transkription aller untersuchten microRNAs auswirkte.

In weiterführenden Studien sollten die Gene der microRNA-Biogenese im diabetischen Kaninchenmodell weiter charakterisiert werden. *In vitro*-Versuche mit funktionalen Ansätzen (Überexpression oder Inhibierungsversuche) könnten helfen mögliche Regulationsmechanismen, Signalwege und Zusammenhänge aufzuklären. Des Weiteren wäre für die Entwicklung eines Gesamtbildes die Expressionsanalyse spezifischer pre-miRNAs sowie weiterer microRNAs (mittels *small* RNA-Sequenzierung) wichtig.

#### **4.5 Die meisten microRNA-Zielgene sind trotz veränderter microRNA-Expression transkriptional unverändert – microRNAs als Regulatoren der Translation**

Da microRNAs die Genexpression auf posttranskriptionaler Ebene regulieren, wurde in dieser Arbeit die Expression von validierten und vorhergesagten microRNA-Zielgenen untersucht. Ein für die Embryogenese wichtiges Gen ist das miR-141-Zielgen IGF2. In Blastozysten diabetischer Kaninchen ist die Expression von IGF2 im Embryoblasten stark und im Trophoblasten moderat erhöht. Diese Erhöhung korreliert nur im Trophoblasten mit der Expression der miR-141. In humanen und murinen Plazenten konnte gezeigt werden, dass die miR-141- und IGF2-Expression invers korrelieren (Tang et al. 2013a, Saha, Choudhury & Ain 2015). Bei Mäusen verringert sich die miR-141-Expression während der Plazentaentwicklung,

wodurch die IGF2-Expression zunimmt (Saha, Choudhury & Ain 2015). IGF2 ist essentiell für die Plazentaentwicklung, indem es die Proliferation und Migration fördert (Übersichtsartikel Forbes & Westwood 2008). Ein IGF2-knockout in Mäusen (DeChiara, Efstratiadis & Robertsen 1990) sowie eine verringerte Expression von IGF2 in humanen Plazenten (Antonazzo et al. 2008) führen zur fetalen und plazentaren Wachstumsretardierung. Eine Beobachtung, die ebenso bei einer erhöhten miR-141-Expression gemacht wurde (Tang et al. 2013a). Es ist zu vermuten, dass die verminderte miR-141-Expression in Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen einen Adaptationsmechanismus darstellt, um die Entwicklung der Plazenta sicherzustellen.

Daten aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass das miR-27b-Zielgen ATF4 (Schindler et al. 2013) und die miR-222-Zielgene ADIPOR1 (Schindler et al. 2013), DBT (Gürke et al. 2015) und SOD2 (Schindler, unveröffentlicht) transkriptional erhöht sind, was mit der verminderten Expression dieser microRNAs korreliert. Die Transkriptmengen weiterer untersuchter microRNA-Zielgene waren jedoch unverändert. Dafür gibt es mehrere Erklärungsansätze. Es wird noch immer kontrovers diskutiert, ob microRNAs die Zielgen-Expression vornehmlich über mRNA-Degradation oder translationale Repression regulieren (Jonas & Izaurralde 2015, Iwakawa & Tomari 2015; Abb. 4). Es wird angenommen, dass die translationale Hemmung das initiale Ereignis bei der microRNA-vermittelten Genexpressionsregulation darstellt (Selbach et al. 2008, Djuranovic, Nahvi & Green 2012, Bazzini, Lee & Giraldez 2012). Dies würde erklären, warum bei dem miR-141- und miR-222-Zielgen PPAR $\alpha$  zwar eine erhöhte Proteinexpression, aber keine erhöhte mRNA-Menge messbar ist (Schindler et al. 2017).

Die beschriebene Aktivierung von p38 MAPK in Blastozysten diabetischer Tiere (Schindler et al. 2017) lässt ein Umschalten der microRNA-vermittelten posttranskriptionalen Regulation der Zielgene vermuten (Abb. 28). Unphosphoryliertes AGO2 weist eine hohe endonukleolytische Aktivität auf, wodurch insbesondere entwicklungsrelevante Gene und Onkogene reguliert werden, während phosphoryliertes AGO2 zu einer erhöhten translationalen Reprimierung der microRNA-Zielgene führt (Horman et al. 2013). Die Phosphorylierung von AGO2 an Serin-387 über den p38 MAPK-Signalweg (Zeng et al. 2008) oder Akt (Horman et al. 2013) forciert die Lokalisierung von AGO2 in P-bodies, deren Bildung unter Stressbedingungen deutlich erhöht ist. P-bodies sind zytoplasmatische RNA-Protein-Aggregate, die die translationale Repression und den Abbau von mRNAs regulieren (Übersichtsartikel Parker & Sheth 2007) sowie reprimierte mRNAs stabilisieren und lagern (Wang et al. 2018). Die p38 MAPK-Aktivierung in Blastozysten diabetischer Tiere (Schindler et al. 2017) deutet auf eine vermehrte Lokalisierung von AGO2 in P-bodies hin, mit der Konsequenz, dass der Abbau von mRNAs zum Teil verringert werden würde.

Eine weitere Erklärung stellt die Regulation von mRNAs durch mehrere microRNAs dar. So werden z.B. für das miR-27b-Zielgen Wee1 134 (miRDB, Stand 2018) bzw. 234 (miRWalk2.0,

Stand 2018) microRNAs vorausgesagt, die mit Wee1 interagieren. Diese komplexe Regulation wird durch die Messung einzelner microRNAs nicht erfasst. Außerdem ist die strukturbedingte Voraussagung von Zielgenen kein sicherer Beweis für die Interaktion und Regulation. In der vorliegenden Arbeit wurden validierte als auch vorhergesagte Zielgene untersucht. Die Vorhersage-Algorithmen haben eine Falsch-Positive-Rate von 20-50%, da sich die microRNA-mRNA-Interaktions-Programme auf die Vorhersage der *seed*-Region konzentrieren. Es gibt jedoch noch viele weitere microRNA-mRNA Bindungsstellen (Übersichtsartikel Bartel 2009, Cloonan 2015). Hinzu kommt, dass die *seed*-Region einer mRNA, selbst bei Überexpression der microRNA, nicht zwangsläufig von der microRNA gebunden wird (Didiano & Hobert 2006). Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass die microRNA-mRNA-Interaktion gewebespezifisch erfolgt (Amirkhah et al. 2017). Außerdem verläuft der mRNA-Abbau zwischen verschiedenen Zellarten unterschiedlich effizient (Übersichtsartikel Chen & Shyu 2011). In weiterführenden Studien sollte die Proteinexpression der microRNA-Zielgene untersucht werden und funktionale Ansätze Anwendung finden, um die Auswirkungen der microRNA-mRNA-Interaktion zu analysieren.

#### **4.6 Ein maternaler Diabetes mellitus Typ 1 beeinflusst die Expression microRNA-prozessierender Enzyme in der Plazenta**

In Plazenten von diabetischen Tieren wurde eine verminderte Expression des zytoplasmatischen Drosha- (c-Drosha) und Dicer-Proteins (Abb. 22) sowie eine Abnahme in der AGO2-, EXP5- und TARDBP-Transkription (Abb. 23) gemessen. Es ist anzunehmen, dass eine fehlregulierte microRNA-Prozessierung in Plazenten diabetischer Kaninchen Auswirkungen auf die Plazentaentwicklung hat.

Die Expression von spezifischen microRNAs war indes unverändert. Die Inhibition von EXP5 könnte eine Erklärung für die Reduktion von Dicer sein, da die Dicer-mRNA über die Bindung an EXP5 aus dem Nukleus in das Zytoplasma transportiert wird (Bennasser et al. 2011). In Plazenten makrosomer Neugeborener (Li et al. 2015b) und im Plasma schwangerer Frauen mit einem Gestationsdiabetes (Rahimi et al. 2015) konnten eine erhöhte Drosha- und Dicer-RNA-Menge gemessen werden. Eine verminderte Dicer-Expression treibt differenzierende Zellen in die Seneszenz (Jauhari et al. 2017) und ist mit einer erhöhten Apoptoserate verbunden (Spruce et al. 2010). Ein spezifisches Ausschalten von Dicer in Mäuseembryonen verdeutlicht die microRNA-vermittelte Strukturierung und Ernährung des Embryos durch extraembryonale Gewebe wie dem Trophoblasten (Spruce et al. 2010). Ferner sind die Hoch- sowie die Herunterregulation von Dicer und Drosha in verschiedenen Tumorarten und Krebszelllinien mit einer erhöhten Proliferation und Invasion assoziiert (Han et al. 2010, Papachristou et al. 2011, Jafari et al. 2013).

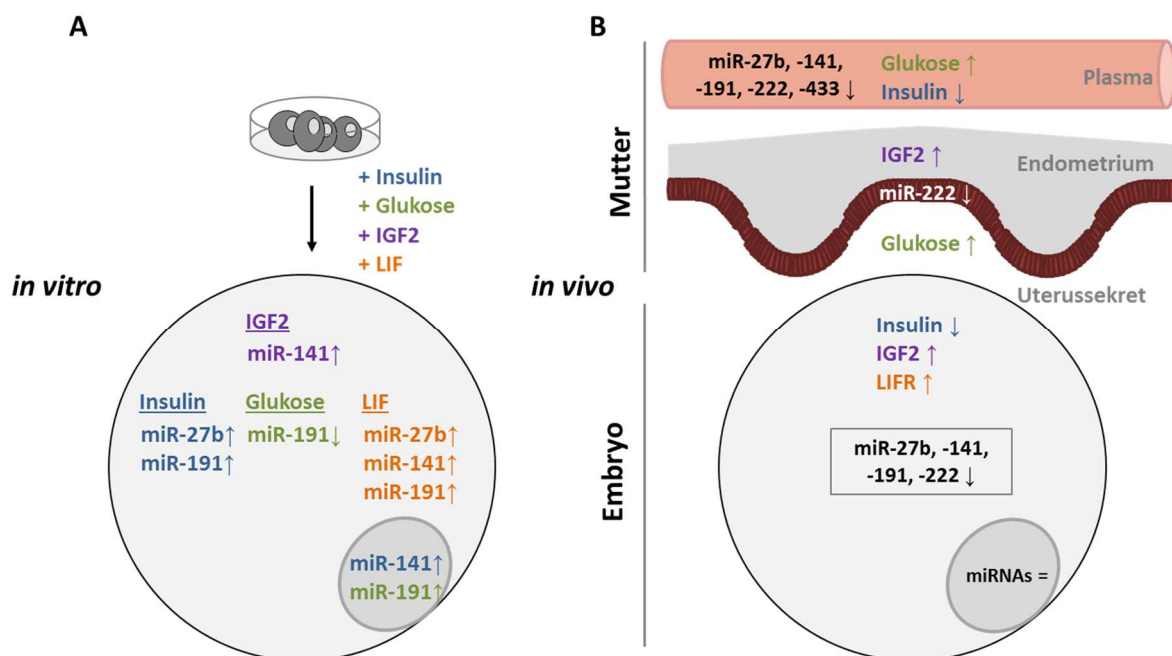
AGO2 wird posttranskriptional über die microRNA-Verfügbarkeit reguliert (Martinez & Gregory 2013, Smibert et al. 2013). Die spezifischen in dieser Arbeit untersuchten microRNAs waren in dem Plazentagewebe unverändert exprimiert und bieten somit keine Erklärung für die AGO2-Reduktion. Um eine generelle Aussage zur microRNA-Verfügbarkeit zu erhalten, sollten weitere plazentare schwangerschaftsassozierte microRNAs (C14M-Cluster, C19M-Cluster und miR-371-3 Cluster) untersucht werden. Ein Ausschalten von AGO2 in Mäuseembryonen ist mit Fehlbildungen in der Plazenta gekennzeichnet (Cheloufi et al. 2010). Interessanterweise war die Expression des zytoplasmatischen Drosha-Proteins (c-Drosha) in Plazenten von diabetischen Tieren vermindert (Abb. 22). Die Lokalisation im Kern wird über die Phosphorylierung von Drosha an Serin-300 oder Serin-302 reguliert (Tang et al. 2010). Seine Rolle im Zytoplasma ist noch nicht eindeutig geklärt. Da Drosha zellartspezifisch exprimiert wird und während der Tumorgenese ansteigt, ist zu vermuten, dass c-Drosha eine biologische Funktion hat. Die Prozessierung von pri-miRNAs scheint für c-Drosha weniger relevant zu sein (Dai et al. 2016, Link, Grund & Diederichs 2016). Einige Studien weisen darauf hin, dass Drosha neben seiner Rolle als Transkriptionsaktivator und Splicing-Regulator (Übersichtsartikel Lee & Shin 2018), für den Abbau bestimmter mRNAs verantwortlich ist (Han et al. 2009, Seong et al. 2014, Johanson et al. 2015). Demzufolge könnte eine verminderte c-Drosha-Expression in Plazenten diabetischer Kaninchen auch direkt Einfluss auf die Genexpression nehmen.

Trotz Veränderungen in der Expression von microRNA-prozessierenden Enzymen war die Expression spezifischer microRNAs unverändert. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch nur einige microRNAs untersucht. Es ist wahrscheinlich, dass Veränderungen in der microRNA-Prozessierung Auswirkungen auf die Expression anderer microRNAs haben. In weiterführenden Studien wäre es demnach sinnvoll eine *small* RNA-Sequenzierung durchzuführen, um microRNAs zu identifizieren, die durch eine diabetische Schwangerschaft in Trophoblastzellen der Plazenta verändert sind. Daran könnten sich *in vitro*-Kulturversuche mit verschiedenen Trophoblastzelllinien anschließen, um die Rolle von spezifischen microRNAs für die Plazentaentwicklung und -funktion zu untersuchen.

#### **4.7 Einflussfaktoren auf die embryonale microRNA-Expression**

Die Expression von microRNAs kann durch Hormone und Nährstoffe beeinflusst werden (Übersichtsartikel Arefhosseini, Ebrahimi-Mamaeghani & Mohammadi 2014, Gulyaeva & Kushlinskiy 2016). Um Faktoren für die veränderte microRNA-Expression in Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen zu ermitteln, wurde in Kulturversuchen der Einfluss von Insulin, Glukose oder IGF2 auf die embryonale microRNA-Expression untersucht. Aus vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe ist bekannt, dass aufgrund der maternalen Hypoinsulinämie kein Insulin die Blastozyste erreicht (Ramin et al. 2010). Des Weiteren konnten im Uterussektret

diabetischer Tiere eine 3-fach erhöhte Glukosekonzentration (gesunde Tiere: 0,5 mM vs. diabetische Tiere: 1,5 mM; Ramin et al. 2010) und in Blastozysten und im Endometrium diabetischer Tiere eine erhöhte IGF2-Konzentration gemessen werden (Thieme et al. 2012b). Als wichtiger Regulator für die Implantation (Stewart et al. 1992, Yang et al. 1995) und die Trophoblasten-Differenzierung, -Migration, -Invasion und -Proliferation (Fitzgerald et al. 2005, Takahashi et al. 2008, Liu et al. 2014) wurde LIF als weiterer Faktor für *in vitro*-Kulturversuche ausgewählt. Dabei zeigte sich, dass eine kurzzeitige Kultur von Blastozysten mit Insulin, Glukose, IGF2 oder LIF die microRNA-Expression in Embryoblast- aber vor allem in Trophoblastzellen beeinflussen konnte (Abb. 29). Bereits in früheren Studien wurden Insulin (Granjon et al. 2009, Bachelorarbeit Judith Scholze 2016), Glukose (Tang et al. 2009, Herrera et al. 2010, Bagge et al. 2012, Ocloń et al. 2016) und LIF (Morales-Prieto, Schleussner & Markert 2011) als potente Regulatoren der microRNA-Biogenese beschrieben.



**Abb. 29: Einfluss von Insulin, Glukose, IGF2 oder LIF auf die microRNA-Expression in *in vitro*-kultivierten Präimplantationsembryonen des Kaninchens am Tag 6 *p.c.* (A) im Vergleich mit der *in vivo*-Situation (B)**

In *in vitro*-Versuchen wurde der Einfluss von Insulin, Glukose, IGF2 oder LIF auf die embryonale microRNA-Expression betrachtet (A). In (B) sind die Ergebnisse der Untersuchungen *in vivo* im Vergleich dargestellt. Expression: ↑ erhöht, ↓ verringert, = unverändert

Eine 2-stündige Kultur mit 17 nM Insulin erhöhte die miR-27b- und -191-Spiegel in Blastozysten diabetischer Kaninchen, die unter *in vivo*-Bedingungen verringert waren. Daher ist zu vermuten, dass Insulin in Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen eine Angleichung der miR-27b- und -191-Expression auf „gesunde“ Verhältnisse bewirkt, da die miR-27b- und -191-Mengen in *in vitro*-kultivierten Blastozysten gesunder Kaninchen unverändert waren. Die Regulation der miR-27b-Expression durch Insulin konnte außerdem in der humanen

Trophoblastenzelllinie AC-1M88 (Bachelorarbeit Judith Scholze 2016) sowie in humanen Muskelzellen gezeigt werden (Granjon et al. 2009). Eine Inhibierung der miR-27b-Expression führte in murinen, insulinresistenten Adipozyten zu einer verbesserten Glukosetoleranz und Insulinsensitivität (Srivastava et al. 2018). Demnach könnte die *in vivo* gemessene verminderte miR-27b-Expression in Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen einen Mechanismus darstellen, um die reduzierte Insulin-/IGF-Sensitivität (Thieme et al. 2012b) zu erhöhen.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass ein externer Stimulus mit IGF2 in der Lage ist, die Expression der miR-141 und tendenziell der miR-27b und -191 zu regulieren. Für die miR-141 ist bekannt, dass deren Expression invers mit der endogenen IGF2-Expression korreliert (Saha, Choudhury & Ain 2015), was auch in den Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen bestätigt werden konnte. Die Zugabe von 13 nM IGF2 führte in der *in vitro*-Kultur von Kaninchenblastozysten zu einer gesteigerten trophoblastären miR-141-Expression. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die IGF2-miR-141-Interaktion über einen Feedback-Mechanismus verläuft, wobei IGF2 die Expression der miR-141 und umgekehrt reguliert. Über die Korrelation erhöhter miR-141-Spiegel mit fetaler Wachstumsretardierung wurde bereits in Kapitel 4.3.1 diskutiert.

Die *in vitro*-Kultur mit 10 und 25 mM Glukose veränderten die miR-191-Expression zellartspezifisch. Die Regulation der miR-191-Expression durch Hormone, Nährstoffe und Chemikalien wurde in verschiedenen Studien beschrieben (Elyakim et al. 2010, Nagpal et al. 2013). So führte die Kultur von Trophoblastzellen (Bachelorarbeit Judith Scholze 2016) und von der Brustkrebszelllinie MCF7 (Nagpal et al. 2013) in serumfreiem, d.h. nährstoffarmem, Medium zu einer erhöhten miR-191-Expression, einer verminderten Akt-Phosphorylierung und zellulären Glukoseaufnahme (Yang et al. 2017). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der verminderten miR-191-Expression in Trophoblastzellen mit steigenden Glukosekonzentrationen. Die Transkription der miR-191 in Embryoblastzellen scheint anderen Regulationsmechanismen zu unterliegen. Es ist zu vermuten, dass die 3-fache Erhöhung der uterinen Glukosekonzentration in diabetischen Kaninchen (Ramin et al. 2010) für die *in vivo*-Regulation der trophoblastären, jedoch nicht der embryoblastären, miR-191-Expression verantwortlich ist. Die verminderte miR-191-Expression könnte über die Regulation von IRS1 und Akt (Yang et al. 2017) zur Aufrechterhaltung der Glukoseaufnahme in Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen beitragen. Für die miR-222 zeigte sich in murinen Adipozyten ebenfalls eine glukoseabhängige Expression (Herrera et al. 2010), die vermutlich aufgrund gewebespezifischer Unterschiede in Kaninchenblastozysten nicht gezeigt werden konnte.

Diese Befunde dokumentieren eine deutlich unterschiedliche Abhängigkeit der Embryoblast- und Trophoblastzellentwicklung von extrazellulären Nähr- und Wirkstoffen mit zelllinienspezifischer intrazellulärer Umsetzung. Die Entschlüsselung dieser Interaktionen verspricht neben dem besseren Verständnis der Embryonalentwicklung in einer äußerst

sensiblen ontogenetischen Phase potentiell neue Ansätze in der weiteren Aufklärung der „fetalen Programmierung“.

Die Ergebnisse der *in vitro*-Kultur mit Insulin, IGF2 oder Glukose legen nahe, dass die microRNA-Expression über den Insulinrezeptor-Signalweg reguliert werden kann. Dafür spricht, dass die Regulation von skelettmuskelspezifischen microRNAs über IGF1/MAPK/ERK bereits gezeigt werden konnte (Meyer et al. 2015). Es wäre auch die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs möglich, wie die Regulation der miR-27b-Expression über PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B verdeutlicht (Jin et al. 2013). Die Beteiligung der mTOR-Signaltransduktion stellt einen weiteren potentiellen Mechanismus dar. In Lungentumorzellen führte die glukosefreie Kultur zu einer reduzierten mTOR-Aktivität, verbunden mit erhöhten Drosha- und pre-miRNA und microRNA-Spiegeln (Ye et al. 2015). In humanen Muskelzellen konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Insulin direkt Einfluss auf die Drosha-, Dicer- AGO2-, AGO3- und AGO4-Transkription nimmt (Granjon et al. 2009). Daher wäre in weiterführenden Studien zu klären über welchen Signalweg Insulin, IGF2 und Glukose die microRNA-Expression regulieren und ob diese Faktoren Einfluss auf die Expression microRNA-prozessierender Enzyme nehmen. Die *in vitro*-Kultur mit 10 ng/ml LIF erhöhte die miR-27b-, -141-, und -191-Menge in Embryonen. In der Chorionkarzinom-Zelllinie JEG3 führt eine 4-6-stündige Stimulation mit LIF zu einer Verringerung der miR-141-Expression (Morales-Prieto, Schleussner & Markert 2011) sowie zur Deregulation zahlreicher weiterer microRNAs (Morales-Prieto et al. 2014). Es ist anzunehmen, dass die durch den LIFR aktivierten Signalwege wie u.a. JAK/STAT3, PI3K/Akt, ERK1/2 und mTOR dabei eine zentrale Rolle spielen (Übersichtsartikel Yue, Wu & Hu 2015). LIF beeinflusst die microRNA-Expression zellartspezifisch (Morales-Prieto et al. 2014), wodurch die unterschiedlichen Ergebnisse zur miR-141-Expression in Trophoblastzellen und JEG3-Zellen erklärt werden können.

Über die transkriptionale Regulierung der miR-27b- und -191-Expression durch LIF ist in der Literatur zu embryonalen Zellen nichts bekannt. In humanen kolorektalen Karzinomzelllinien konnte jedoch gezeigt werden, dass Interleukin 6 (Il6) die miR-27b-Expression verringert (Patel et al. 2014). Il6 gehört wie LIF zur Il6-Familie, die für die Signalweiterleitung die Rezeptoruntereinheit gp130 teilen und die JAK/STAT3-, PI3K/Akt-, ERK1/2- und mTOR-Signalwege aktivieren (Übersichtsartikel Taga & Kishimoto 1997).

Die kurzzeitige Stimulation von Kaninchenblastozysten mit verschiedenen Faktoren veränderte die microRNA-Expression in Embryoblast- und in Trophoblastzellen. Dabei zeigte sich, dass vor allem Trophoblastzellen schnell an hormonelle und nutritive Veränderungen adaptieren. Das ein veränderter maternaler Metabolismus Auswirkungen auf die Plazentaentwicklung und -funktion haben kann, machen Studien an Plazenten von Frauen bzw. Mäusen mit einem präkonzeptionellen Diabetes und Gestationsdiabetes (Evers et al.



2003, Übersichtsartikel Vambergue & Fajardy 2011), mit Adipositas (Huang et al. 2014, Myatt & Maloyan 2016) und Unterernährung (Albion et al. 2007) deutlich.

#### 4.8 Ausblick

Abweichungen in der Plazentamorphologie und -funktion sind mit einer veränderten embryonalen/ fetalen Nährstoffzufuhr verbunden und können zur „fetalen Programmierung“ führen (Übersichtsartikel Barker & Thornburg 2013). Eine gestörte mütterliche Stoffwechsellage, wie sie bei einem Diabetes mellitus auftritt, ist mit Embryopathien und Plazentopathologien assoziiert (Evers et al. 2003, Übersichtsartikel Vambergue & Fajardy 2011, Huang et al. 2014, Myatt & Maloyan 2016). Die zugrunde liegenden Mechanismen dafür sind nicht geklärt. Aus dem diabetischen Tiermodell des Kaninchens war bekannt, dass ein maternaler Diabetes bereits an Tag 6 *p.c.* zu Veränderungen des uterinen Milieus und des embryonalen Stoffwechsels führt (Ramin et al. 2010, Thieme et al. 2012b, Schindler et al. 2014, Haucke et al. 2014, Gürke et al. 2015, Pendzialek et al. 2016). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die trophoblastäre microRNA-Expression in Blastozysten diabetischer Kaninchen verändert ist. Es ist davon auszugehen, dass die veränderte microRNA-Expression an der Dysregulation des embryonalen Metabolismus diabetischer Kaninchenembryonen regulativ beteiligt ist. Da die Expression zahlreicher microRNAs mit Schwangerschaftskomplikationen assoziiert werden kann und microRNAs im mütterlichen Blut nachweisbar sind, werden ihre Eignung als Biomarker für Schwangerschaftserkrankungen und -komplikationen intensiv untersucht (Übersichtsartikel Fu et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte eine verminderte Expression spezifischer trophoblastärer microRNAs im Plasma bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Schwangerschaft nachgewiesen werden. Es muss nun in weiterführenden Studien mit einem anderen Versuchsdesign geklärt werden, ob sich diese spezifischen Moleküle als frühe Marker für die Blastozystenqualität und für physiologische und pathologische Veränderungen der Plazenta eignen.

Die *in vivo*- und *in vitro*-Ergebnisse der vorliegenden Arbeit machen deutlich, dass insbesondere Trophoblastzellen sensitiv auf veränderte Nährstoffbedingungen reagieren. Da microRNAs nachweislich ein Bestandteil des für den Implantationsprozess essentiellen embryo-maternalen Dialogs sind, ist die dysregulierte embryonale microRNA-Expression und -Prozessierung eine potentielle Ursache für Subfertilität und embryonale Entwicklungsverzögerung in diabetischen Kaninchen (Ramin et al. 2010). Diese Erkenntnis unterstreicht die Notwendigkeit, Frauen mit Stoffwechselerkrankungen während der Schwangerschaft intensiv zu betreuen und ggf. so frühzeitig wie möglich zu behandeln. Eine engmaschige frauenärztliche Kontrolle kann Schwangerschaftsrisiken verringern und Auswirkungen auf die Gesundheit der Kinder reduzieren. Im Hinblick auf die nutritive und metabolische Sensitivität des Trophoblasten muss kritisch auf die eingesetzten Nährmedien

geschaut werden, die bei der IVF-Embryonenkultur verwendet werden. Diese entsprechen nicht dem intraoviduktalen oder intrauterinen Milieu und sind nur unzureichend definiert (Übersichtsartikel McEvoy 2003, Mantikou et al. 2013, Chronopoulou & Harper 2015, Kleijkers et al. 2016). Über die kurzfristigen Folgen und die langfristigen Auswirkungen auf die Kindgesundheit wird kontrovers diskutiert, da die Subfertilität und das meist höhere Alter der Eltern einen zusätzlichen Einflussfaktor darstellen (Sutcliffe & Ludwig 2007, Romundstad et al. 2008, Ceelen et al. 2008, Übersichtsartikel Basatemur & Sutcliffe 2008, Übersichtsartikel Chronopoulou & Harper 2015, Kleijkers et al. 2016). Das Risiko für Komplikationen ist für Nachkommen, die durch eine IVF-Behandlung gezeugt wurden, nachweisbar höher (Klemetti et al. 2005, El-Chaar et al. 2009, Übersichtsartikel Santos, Kuijk & Macklon 2010, Vialard et al. 2011). Daher muss intensiv an den optimalen Kulturbedingungen für die Embryonenkultur geforscht werden, um den embryonalen Metabolismus nicht zu stören und peri- und postnatale Gesundheitsrisiken zu minimieren.

## 5 Zusammenfassung

Die steigende Inzidenz von Diabetes mellitus (präkonzeptioneller Diabetes und Gestationsdiabetes; IDF Diabetes Atlas 2017, DGD 2018), Übergewicht und Adipositas (Obesity Update 2017) bei Frauen im gebärfähigen Alter ist besorgniserregend. In Deutschland sind derzeit ca. 7% aller Schwangerschaften von einem Diabetes mellitus betroffen. Der Anteil an Frauen mit einem präkonzeptionellen Diabetes mellitus (T1DM, T2DM) beträgt ca. 1% mit ansteigender Tendenz. Aus tierexperimentellen Studien ist bekannt, dass Embryonen diabetischer Mütter bereits während der Präimplantationsentwicklung Stoffwechsellafälligkeiten zeigen. Wichtige Regulatoren für die embryonale und plazentare Entwicklung sind microRNAs. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Einfluss eines experimentell erzeugten T1DM auf die microRNA-Expression und –Prozessierung während der frühen Phase der Präimplantation und Plazentation sowohl in embryonalen als auch maternalen Geweben untersucht. Die experimentellen Untersuchungen wurden am diabetischen Frühgraviditätsmodell des Kaninchens durchgeführt.

Die Analyse der SOLiD-Sequenz-Daten ergab, dass alle verwendeten microRNA-Sequenzen vom Kaninchen zu 100% mit den humanen Sequenzen übereinstimmen.

Die Ergebnisse aus den **maternalen Geweben** lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die Gravidität der Kaninchen hat keinen Einfluss auf die Menge der untersuchten microRNAs im mütterlichen Plasma. Lediglich die miR-222-Menge ist im Plasma von diabetischen graviden im Vergleich zu nicht-graviden Tieren verringert.
- Erfolgt die Gravidität jedoch in einem diabetischen Kaninchen dann ist die Menge an miR-27b, -141, -191, -222 und -433 im Plasma verringert und
- führt zu einer verminderten miR-222-Expression und gesteigerter Expression des miR-222-Zielgens CNR1 im Endometrium.
- Die Proteinexpression von Drosha und Dicer ist im Endometrium gravider diabetischer Kaninchen unverändert.

Im Vergleich zu einer normalen Gravidität kommt es bei einer diabetischen Gravidität zu einer deutlichen Veränderung des microRNA-Musters im maternalen Blut und im Endometrium.

Die Ergebnisse der Untersuchung von **Embryonen an Tag 6 p.c.** der Entwicklung lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- MicroRNAs werden vom Embryoblasten und Trophoblasten exprimiert und sind in der Blastozystenflüssigkeit nachweisbar.
- Die Expression von microRNA-prozessierenden Genen ist ab Tag 3 p.c. in allen Embryonalstadien vorhanden.

- Die mRNA-Mengen der Gene AGO2, DGCR8, EXP5, SRSF3 und TARDBP sind in Embryoblast- und Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen erhöht, während die Drosha- und Dicer-Expression deutlich verringert ist.

Diese Dysregulation hat Auswirkungen auf die embryonale microRNA-Expression:

- Ein maternaler Diabetes führt zu einer Verringerung der miR-27b-, -141-, -191-, -222-Expression im Trophoblasten, während deren Expression im Embryoblasten diabetischer Kaninchen unverändert ist.
- Die Erhöhung der IGF2-Expression korreliert mit der miR-141-Menge im Trophoblasten diabetischer Kaninchen. Die mRNA-Expression weiterer microRNA-Zielgene ist in Embryoblast- und Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen unverändert.

Blastozysten aus diabetischen Müttern zeigen eine zelllinienspezifisch veränderte Expression von microRNAs und eine veränderte microRNA-Prozessierung. Das microRNA-Muster ist vielschichtig und läßt derzeit keine einfachen Erklärungsansätze für den Einfluss auf die Embryonalentwicklung zu. In weiteren Untersuchungen mit anderen Versuchsansätzen muss geklärt werden wie sich ein dysreguliertes microRNA-Muster auf die Embryonalentwicklung und Implantation auswirkt.

Während der **Plazentaentwicklung**:

- steigt die miR-141 und -210-Menge an ohne Veränderungen durch einen maternalen Diabetes mellitus in den untersuchten microRNAs.
- Die microRNA-prozessierenden Moleküle in der Plazenta sind durch einen Diabetes verändert. Die AGO2-, EXP5- und TARDBP-Transkription und die Dicer- und Drosha-Proteinmenge sind in Placentae am Tag 12 *p.c.* verringert.

Trotz Veränderungen in der Expression microRNA-prozessierender Gene, war die Expression spezifischer microRNAs unverändert. Daher reichen die beobachteten Veränderungen derzeit nicht aus, um etwaige Plazentations- und Plazentastörungen in dem in der vorliegenden Arbeit genutzten Tiermodell aufzuzeigen. In weiteren Untersuchungen muss geklärt werden, ob andere microRNAs in ihrer Expression verändert sind und welche Bedeutung dies für die Plazentaentwicklung und –funktion hat.

Durch die ***in vitro*-Kultivierung** von Tag 6 *p.c.* Kaninchenblastozysten mit verschiedenen Supplementen wird messbar, wie Embryonen auf veränderte Konzentrationen an Glukose oder Wachstumsfaktoren in ihrer Umgebung reagieren:

- Eine steigende Glukosekonzentration führt zu einer Erhöhung der miR-191-Expression in Embryoblastzellen und zu einer Verringerung in Trophoblastzellen.
- Insulin steigert die miR-141-Menge in Embryoblastzellen gesunder Kaninchen und die miR-27b- und -191-Expression in Trophoblastzellen diabetischer Kaninchen.

- IGF2 erhöht die miR-141-Menge in Trophoblastzellen.
- LIF steigert die Expression der miR-27b, -141 und -191 im Trophoblasten.
- Die Menge an spezifischen microRNAs ist in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit durch die *in vitro*-Kultur unverändert.

Die *in vitro*-Kulturversuche verdeutlichen den zelllinienspezifischen Effekt durch ein verändertes Umgebungsmilieu. Insbesondere Trophoblastzellen reagieren sensitiv auf ein verändertes Nährstoff- und Hormonangebot mit einer veränderten microRNA-Expression *in vivo* und *in vitro*. Dieser Prozess der metabolischen Anpassung kann zu Abweichungen in der Plazentamorphologie und einer veränderten fetalen Nährstoffzufuhr bis hin zur „fetalen Programmierung“ führen. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass microRNAs eine zentrale Rolle im Adaptationsprozess des Embryos in der Frühschwangerschaft zukommt und eine dysregulierte embryonale microRNA-Expression und -Prozessierung eine potentielle Ursache für die embryonale Entwicklungsverzögerung in diabetischen Kaninchen ist.

## 6 Summary

The prevalence of Diabetes mellitus (pregestational and gestational diabetes), of overweight and obesity among women of reproductive age is increasing worldwide (IDF Diabetes Atlas 2017, Obesity Update 2017, DGD 2018). In Germany, about 7% of all pregnancies are affected by Diabetes mellitus. The prevalence of pregestational diabetes (T1DM, T2DM) amounts to approximately 1%, with increasing tendency. It is known that diabetes affects embryo development as soon as during the very first days after conception. Due to their fundamental role for embryogenesis and placentation, microRNA processing and expression were investigated during the preimplantation period and during placentation in embryonic and maternal tissues in an experimentally induced T1DM pregnancy in rabbits.

The analysis of the SOLiD-Sequencing data reveals 100% identity between used rabbit and human microRNA sequences.

The main results for **maternal tissues** can be summarised as follows:

- Pregnancy has no influence on the amounts of specific microRNAs in maternal plasma. Merely, miR-222 amount is reduced in plasma of diabetic pregnant compared to non-pregnant rabbits.
- A maternal Diabetes mellitus reduces miR-27b, -141, -191, -222 and -433 amounts in plasma
- and leads to a decreased miR-222 expression and an increased expression of the miR-222 target gene CNR1 in the endometrium.
- The endometrial Drosha and Dicer protein expression was unchanged in pregnant diabetic rabbits.

The main results for **day 6 p.c. rabbit blastocysts** can be summarised as follows:

- MicroRNAs are expressed in embryoblast, trophoblast and are present in blastocyst cavity fluid.
- microRNA processing genes are present from day 3 p.c. onwards.
- The mRNA amounts of AGO2, DGCR8, EXP5, SRSF3 und TARDBP are increased in embryoblast and trophoblast cells from diabetic rabbits, whereas the Drosha and Dicer expression is decreased.

The dysregulation has consequences for embryonic microRNA expression:

- Maternal diabetes leads to a reduction of miR-27b, -141, -191, -222 expression in trophoblast cells, whereas no changes are observed in embryoblast cells of diabetic rabbits.

- The increase of IGF2 expression correlates with miR-141 amount in trophoblast cells of diabetic rabbits. The expression of other microRNA target genes was unchanged in embryoblast and trophoblast from diabetic rabbits.

During **placental** development:

- miR-141 and -210 amount is increasing without changes in the expression of investigated microRNAs in placental tissue of diabetic rabbits.
- The microRNA processing genes are altered in placental tissues of diabetic rabbits. The AGO2, EXP5 and TARDBP transcription and the Dicer and Drosha protein expression is reduced in placentae at day 12 *p.c.*

The ***in vitro*** culture of day 6 *p.c.* rabbit blastocysts demonstrates how embryos react to altered glucose or growth factor concentrations in the surrounding milieu:

- miR-191 transcription is elevated with increasing glucose concentrations in embryoblast cells and is reduced in trophoblast cells.
- Insulin enhances the miR-141 amount in embryoblast cells of healthy rabbits and the miR-27b and -191 expression in trophoblast cells of diabetic rabbits.
- IGF2 increases the miR-141 amount in trophoblast cells.
- LIF leads to the enhanced expression of miR-27b, -141 and -191 in trophoblast cells.
- The amounts of specific microRNAs are unchanged in the blastocyst cavity fluid of *in vitro*-cultured embryos.

The present study demonstrates that an experimentally induced T1DM leads to alterations in the microRNA processing and expression in maternal and embryonic tissues. Particularly, trophoblast cells are highly sensitive to altered uterine conditions during the implantation period, indicated by clear changes in the microRNA expression. In contrast, embryoblast cells showed only moderate or no changes in miRNA expression. The observed changes may explain the observed embryonic developmental delay and subfertility of diabetic rabbits. The reduced Drosha and Dicer expression in embryoblast, trophoblast and placental tissue assumes that other microRNAs are differentially expressed. Their role as posttranscriptional regulators of various genes suggests that microRNAs participate in the adaptation of embryonic metabolism with consequences for implantation and placentation. The changes in microRNA expression in trophoblast cells were remarkably. Further studies have to elucidate the potential role of microRNAs as early biomarkers for embryonic and placental pathologies.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abd El Naby, W.S.H., 2012. Expression analysis of regulatory MicroRNA in bovine cumulus oocyte complex and preimplantation embryos. Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn, Bonn.
- Abell, S.K., Boyle, J.A., De Courten, B., Soldatos, G., Wallace, E.M., Zoungas, S., Teede, H.J., 2017. Impact of type 2 diabetes, obesity and glycaemic control on pregnancy outcomes. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 57, 308-314.
- Agarwal, V., Bell, G.W., Nam, J.-W., Bartel, David P., 2015. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife* 4, e05005.
- Ahmed, R.G., 2011. Evolutionary interactions between diabetes and development. *Diabetes Res Clin Pract* 92, 153–167.
- Alaiti, M.A., Ishikawa, M., Masuda, H., Simon, D.I., Jain, M.K., Asahara, T., Costa, M.A., 2012. Up-regulation of miR-210 by vascular endothelial growth factor in ex vivo expanded CD34+ cells enhances cell-mediated angiogenesis. *J Cell Mol Med* 16, 2413–2421.
- Albion, C., Dixon, S., Nygard, K., Reid, C., Han, V., 2007. Effects of maternal nutrient restriction on placental morphology and insulin-like growth factor system expressions. *Clin Invest Med* 30, 71.
- Albrecht, E.D., Pepe, G.J., 2010. Estrogen regulation of placental angiogenesis and fetal ovarian development during primate pregnancy. *Int J Dev Biol* 54, 397–408.
- Altuvia, Y., Landgraf, P., Lithwick, G., Elefant, N., Pfeffer, S., Aravin, A., Brownstein, M.J., Tuschl, T., Margalit, H., 2005. Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res.* 33, 2697–2706.
- Amirkhah, R., Meshkin, H.N., Farazmand, A., Rasko, J.E.J., Schmitz, U., 2017. Computational and Experimental Identification of Tissue-Specific MicroRNA Targets. *Methods Mol. Biol.* 1580, 127–147.
- Andersen, C.L., Jensen, J.L., Ørntoft, T.F., 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 64, 5245–5250.
- Andersen, J.N., Lundgren, E., Nyholm, R., Qvarford, M., 1992. Changes in the local surface geometry with conserved adsorbate coverage and long-range order caused by annealing. *Phys Rev, B Condens Matter* 46, 12784–12787.
- Anderson, R.A., Bayne, R.A.L., Gardner, J., De Sousa, P.A., 2010. Brain-derived neurotrophic factor is a regulator of human oocyte maturation and early embryo development. *Fertil Steril* 93, 1394–1406.
- Anton, L., Olarerin-George, A.O., Schwartz, N., Srinivas, S., Bastek, J., Hogenesch, J.B., Elovitz, M.A., 2013. miR-210 Inhibits Trophoblast Invasion and Is a Serum Biomarker for Preeclampsia. *Am J Pathol* 183, 1437–1445.
- Antonazzo, P., Alvino, G., Cozzi, V., Grati, F.R., Tabano, S., Sirchia, S., Miozzo, M., Cetin, I., 2008. Placental IGF2 expression in normal and intrauterine growth restricted (IUGR) pregnancies. *Placenta* 29, 99–101.
- Arefhosseini, S.R., Ebrahimi-Mamaeghani, M., Mohammadi, S., 2014. MicroRNAs Regulation by Nutrients, the New Ray of Hope in Obesity Related Glucose and Lipid Metabolic Disorders. *J. Metabolic Syndr.* 4, 158.
- Armant, D.R., Fritz, R., Kilburn, B.A., Kim, Y. M., Nien, J.K., Maihle, N.J., Romero, R., Leach, R.E., 2015. Reduced expression of the epidermal growth factor signaling system in preeclampsia. *Placenta* 36, 270–278.
- Arroyo, J.D., Chevillet, J.R., Kroh, E.M., Ruf, I.K., Pritchard, C.C., Gibson, D.F., Mitchell, P.S., Bennett, C. F., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Stirewalt, D.L., *et al.*, 2011. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 5003–5008.
- Asanoma, K., Kubota, K., Chakraborty, D., Renaud, S.J., Wake, N., Fukushima, K., Soares, M.J., Rumi, M.A.K., 2012. SATB homeobox proteins regulate trophoblast stem cell renewal and differentiation. *J Biol Chem* 287, 2257–2268.



- Auyeung, V.C., Ulitsky, I., McGeary, S.E., Bartel, David P., 2013. Beyond secondary structure: primary-sequence determinants license pri-miRNA hairpins for processing. *Cell* 152, 844–858.
- Bagge, A., Clausen, T.R., Larsen, S., Ladefoged, M., Rosenstjerne, M.W., Larsen, L., Vang, O., Nielsen, J.H., Dalgaard, L.T., 2012. MicroRNA-29a is up-regulated in beta-cells by glucose and decreases glucose-stimulated insulin secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 426, 266–272.
- Bai, R., Kusama, K., Nakamura, K., Sakurai, T., Kimura, K., Ideta, A., Aoyagi, Y., Imakawa, K., 2018. Down-regulation of transcription factor OVOL2 contributes to epithelial-mesenchymal transition in a noninvasive type of trophoblast implantation to the maternal endometrium. *FASEB J.* 32, 3371–3384.
- Baker, B.C., Mackie, F.L., Lean, S.C., Greenwood, S.L., Heazell, A.E.P., Forbes, K., Jones, R.L., 2017. Placental dysfunction is associated with altered microRNA expression in pregnant women with low folate status. *Mol Nutr Food Res* 61.
- Barad, O., Meiri, E., Avniel, A., Aharonov, R., Barzilai, A., Bentwich, I., Einav, U., Gilad, S., Hurban, P., Karov, Y., *et al.*, 2004. MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues. *Genome Res.* 14, 2486–2494.
- Barker, D.J.P., Thornburg, K.L., 2013. Placental programming of chronic diseases, cancer and lifespan: a review. *Placenta* 34, 841–845.
- Barker, D.J., Osmond, C., Simmonds, S.J., Wiold, G.A., 1993. The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life. *BMJ* 306, 422–426.
- Barker, D.J., Osmond, C., 1986. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1, 1077–1081.
- Bartel, David P., 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215–233.
- Bartel, David P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297.
- Basatemur, E., Sutcliffe, A., 2008. Follow-up of children born after ART. *Placenta* 29 Suppl B, 135–140.
- Bavelloni, A., Ramazzotti, G., Poli, A., Piazzzi, M., Focaccia, E., Blalock, W., Faenza, I., 2017. MiRNA-210: A Current Overview. *Anticancer Res* 37, 6511–6521.
- Bégay, V., Smink, J., Leutz, A., 2004. Essential requirement of CCAAT/enhancer binding proteins in embryogenesis. *Mol Cell Biol* 24, 9744–9751.
- Bennasser, Y., Chable-Bessia, C., Triboulet, R., Gibbings, D., Gwizdek, C., Dargemont, C., Kremer, E.J., Voinnet, O., Benkirane, M., 2011. Competition for XPO5 binding between Dicer mRNA, pre-miRNA and viral RNA regulates human Dicer levels. *Nat Struct Mol Biol* 18, 323–327.
- Bentwich, I., Avniel, A., Karov, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad, O., Barzilai, A., Einat, P., Einav, U., Meiri, E., *et al.*, 2005. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet* 37, 766–770.
- Bernstein, E., Kim, S.Y., Carmell, M.A., Murchison, E.P., Alcorn, H., Li, M.Z., Mills, A.A., Elledge, S.J., Anderson, K.V., Hannon, G.J., 2003. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 35, 215–217.
- Bidarimath, M., Edwards, A.K., Wessels, J.M., Khalaj, K., Kridli, R.T., Tayade, C., 2015. Distinct microRNA expression in endometrial lymphocytes, endometrium, and trophoblast during spontaneous porcine fetal loss. *J Reprod Immunol* 107, 64–79.
- Biyashev, D., Veliceasa, D., Topczewski, J., Topczewska, J.M., Mizgirev, I., Vinokour, E., Reddi, A.L., Licht, Jonathan D., Revskoy, S.Y., Volpert, O.V., 2012. miR-27b controls venous specification and tip cell fate. *Blood* 119, 2679–2687.
- Blaas, H.G., Eik-Nes, S.H., Isaksen, C.V., 2000. The detection of spina bifida before 10 gestational weeks using two- and three-dimensional ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol* 16, 25–29.
- Bleckmann, S.C., Blendy, J.A., Rudolph, D., Monaghan, A.P., Schmid, W., Schütz, G., 2002. Activating transcription factor 1 and CREB are important for cell survival during early mouse development. *Mol Cell Biol* 22, 1919–1925.
- Boehm, M., Slack, Frank J., 2006. MicroRNA control of lifespan and metabolism. *Cell Cycle* 5, 837–840.
- Bondesson, M., Hao, R., Lin, C.-Y., Williams, C., Gustafsson, J.-Å., 2015. Estrogen receptor signaling during vertebrate development. *Biochim Biophys Acta* 1849, 142–151.

- Borchert, G.M., Lanier, W., Davidson, B.L., 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13, 1097–1101.
- Bortolin-Cavaillé, M.-L., Dance, M., Weber, M., Cavaillé, J., 2009. C19MC microRNAs are processed from introns of large Pol-II, non-protein-coding transcripts. *Nucleic Acids Res* 37, 3464–3473.
- Brosens, J.J., Pijnenborg, R., Brosens, I.A., 2002. The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: a review of the literature. *Am J Obstet Gynecol* 187, 1416–1423.
- Brunet-Simon, A., Henrion, G., Renard, J.P., Duranthon, V., 2001. Onset of zygotic transcription and maternal transcript legacy in the rabbit embryo. *Mol Reprod Dev* 58, 127–136.
- Burns, G.W., Brooks, K.E., Spencer, T.E., 2016. Extracellular Vesicles Originate from the Conceptus and Uterus During Early Pregnancy in Sheep. *Biol Reprod* 94, 56.
- Burrola-Barraza, M.E., Hernández-Seáñez, R., Barceló-Fimbres, M., Rodríguez-Almeida, F.A., González-Rodríguez, E., García-Quiñónez, S., Grado-Ahuir, J.A., Moreno-Brito, V., 2011. Dicer gene expression during early bovine embryo development. *Mol Reprod Dev* 78, 622–622.
- Butler, J., Jayson, G.G., Swallow, A.J., 1975. The reaction between the superoxide anion radical and cytochrome c. *Biochim Biophys Acta* 408, 215–222.
- Bytoft, B., Knorr, S., Vlachova, Z., Jensen, R.B., Mathiesen, E.R., Beck-Nielsen, H., Gravholt, C.H., Jensen, D.M., Clausen, T.D., Mortensen, E.L., Damm, P., 2016. Long-term Cognitive Implications of Intrauterine Hyperglycemia in Adolescent Offspring of Women With Type 1 Diabetes (the EPICOM Study). *Diabetes Care* 39, 1356–1363.
- Cai, X., Hagedorn, C.H., Cullen, B.R., 2004. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10, 1957–1966.
- Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., *et al.*, 2002. Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes miR-15 and miR-16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 15524–15529.
- Capalbo, A., Ubaldi, F.M., Cimadomo, D., Noli, L., Khalaf, Y., Farcomeni, A., Ilic, D., Rienzi, L., 2016. MicroRNAs in spent blastocyst culture medium are derived from trophectoderm cells and can be explored for human embryo reproductive competence assessment. *Fertil Steril* 105, 225–235.e1–3.
- Cardinali, B., Castellani, L., Fasanaro, P., Basso, A., Alemà, S., Martelli, F., Falcone, G., 2009. MicroRNA-221 and microRNA-222 modulate differentiation and maturation of skeletal muscle cells. *PLoS ONE* 4, e7607.
- Carleton, M., Cleary, M.A., Linsley, P.S., 2007. MicroRNAs and cell cycle regulation. *Cell Cycle* 6, 2127–2132.
- Carreras-Badosa, G., Bonmatí, A., Ortega, F.-J., Mercader, J.-M., Guindo-Martínez, M., Torrents, D., Prats-Puig, A., Martínez-Calcerrada, J.-M., De Zegher, F., Ibáñez, L., *et al.*, 2017. Dysregulation of Placental miRNA in Maternal Obesity Is Associated With Pre- and Postnatal Growth. *J Clin Endocrinol Metab* 102, 2584–2594.
- Ceelen, M., Van Weissenbruch, M.M., Vermeiden, J.P.W., Van Leeuwen, F.E., Delemarre-van de Waal, H.A., 2008. Growth and development of children born after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 90, 1662–1673.
- Chakrabarty, A., Tranguch, S., Daikoku, T., Jensen, K., Furneaux, H., Dey, Sudhansu K., 2007. MicroRNA regulation of cyclooxygenase-2 during embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15144–15149.
- Chan, Y.C., Banerjee, J., Choi, S.Y., Sen, C.K., 2012. miR-210: the master hypoxamir. *Microcirculation* 19, 215–223.
- Chartoumpekis, D.V., Zaravinos, A., Ziros, P.G., Iskrenova, R.P., Psyrogiannis, A.I., Kyriazopoulou, V.E., Habeos, I.G., 2012. Differential Expression of MicroRNAs in Adipose Tissue after Long-Term High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice. *PLoS ONE* 7, e34872.
- Cheloufi, S., Dos Santos, C.O., Chong, M.M.W., Hannon, Gregory J., 2010. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* 465, 584–589. doi:10.1038/nature09092
- Chen, C., Yang, Q., Wang, D., Luo, F., Liu, X., Xue, J., Yang, P., Xu, H., Lu, J., Zhang, A., Liu, Q., 2018. MicroRNA-191, regulated by HIF-2 $\alpha$ , is involved in EMT and acquisition of a stem cell-like phenotype in arsenite-transformed human liver epithelial cells. *Toxicol In Vitro* 48, 128–136.

- Chen, K.-C., Liao, Y.-C., Wang, J.-Y., Lin, Y.-C., Chen, C.-H., Juo, S.-H.H., 2015. Oxidized low-density lipoprotein is a common risk factor for cardiovascular diseases and gastroenterological cancers via epigenomical regulation of microRNA-210. *Oncotarget* 6, 24105–24118.
- Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K., Zhang, C.-Y., 2012. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol* 22, 125–132.
- Chen, C.-Y.A., Shyu, A.-B., 2011. Mechanisms of deadenylation-dependent decay. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2, 167–183.
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., *et al.*, 2008. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research* 18, 997–1006.
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., Shiekhattar, R., 2005. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436, 740–744.
- Cheung, T.H., Quach, N.L., Charville, G.W., Liu, L., Park, L., Edalati, A., Yoo, B., Hoang, P., Rando, T.A., 2012. Maintenance of muscle stem-cell quiescence by microRNA-489. *Nature* 482, 524–528.
- Chiang, P.-M., Ling, J., Jeong, Y.H., Price, D.L., Aja, S.M., Wong, P.C., 2010. Deletion of TDP-43 down-regulates *Tbc1d1*, a gene linked to obesity, and alters body fat metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 16320–16324.
- Chim, S.S.C., Shing, T.K.F., Hung, E.C.W., Leung, T.Y., Lau, T.K., Chiu, R.W.K., Lo, D.Y.M., 2008. Detection and Characterization of Placental MicroRNAs in Maternal Plasma. *Clinical Chemistry* 54, 482–490.
- Cho, J.A., Park, H., Lim, E.H., Lee, K.W., 2011. MicroRNA expression profiling in neurogenesis of adipose tissue-derived stem cells. *J Genet* 90, 81–93.
- Chobotova, K., Spyropoulou, I., Carver, J., Manek, S., Heath, J.K., Gullick, W.J., Barlow, D.H., Sargent, I.L., Mardon, H.J., 2002. Heparin-binding epidermal growth factor and its receptor ErbB4 mediate implantation of the human blastocyst. *Mech Dev* 119, 137–144.
- Choi, S.-Y., Yun, J., Lee, O.-J., Han, H.-S., Yeo, M.-K., Lee, M.-A., Suh, K.-S., 2013. MicroRNA expression profiles in placenta with severe preeclampsia using a PNA-based microarray. *Placenta* 34, 799–804.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156–159.
- Chong, M.M.W., Zhang, G., Cheloufi, S., Neubert, T.A., Hannon, G.J., Littman, D.R., 2010. Canonical and alternate functions of the microRNA biogenesis machinery. *Genes Dev* 24, 1951–1960.
- Chou, C.-H., Chang, N.-W., Shrestha, S., Hsu, S.-D., Lin, Y.-L., Lee, W.-H., Yang, C.-D., Hong, H.-C., Wei, T.-Y., Tu, S.-J., *et al.*, 2016. miRTarBase 2016: updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. *Nucleic Acids Res* 44, D239–D247.
- Chow, J.F., Lee, K.F., Chan, S.T., Yeung, W.S., 2001. Quantification of transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) mRNA expression in mouse preimplantation embryos and determination of TGFbeta receptor (type I and type II) expression in mouse embryos and reproductive tract. *Mol Hum Reprod* 7, 1047–1056.
- Chronopoulou, E., Harper, J.C., 2015. IVF culture media: past, present and future. *Hum. Reprod. Update* 21, 39–55.
- Cloonan, N., 2015. Re-thinking miRNA-mRNA interactions: intertwining issues confound target discovery. *Bioessays* 37, 379–388.
- Cortez, M.A., Bueso-Ramos, C., Ferdin, J., Lopez-Berestein, G., Sood, A.K., Calin, George A., 2011. MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* 8, 467–477.
- Cui, Y., Li, T., Yang, D., Li, S., Le, W., 2016. miR-29 regulates Tet1 expression and contributes to early differentiation of mouse ESCs. *Oncotarget* 7, 64932–64941.
- Cully, M., Genevet, A., Warne, P., Treins, C., Liu, T., Bastien, J., Baum, B., Tapon, N., Leever, S.J., Downward, J., 2010. A role for p38 stress-activated protein kinase in regulation of cell growth via TORC1. *Mol Cell Biol* 30, 481–495.

- Cuman, C., Van Sinderen, M., Gantier, M.P., Rainczuk, K., Sorby, K., Rombauts, L., Osianlis, T., Dimitriadis, E., 2015. Human Blastocyst Secreted microRNA Regulate Endometrial Epithelial Cell Adhesion. *EBioMedicine* 2, 1528–1535.
- D'Alessandro, A., Federica, G., Palini, S., Bulletti, C., Zolla, L., 2012. A mass spectrometry-based targeted metabolomics strategy of human blastocoele fluid: a promising tool in fertility research. *Mol BioSyst* 8, 953–958.
- D'haene, B., Mestdagh, P., Hellemans, J., Vandesompele, J., 2012. miRNA Expression Profiling: From Reference Genes to Global Mean Normalization, in: Fan, J.-B. (Ed.), *Next-Generation MicroRNA Expression Profiling Technology*. Humana Press, Totowa, NJ, 261–272.
- Dai, L., Chen, K., Youngren, B., Kulina, J., Yang, A., Guo, Z., Li, J., Yu, P., Gu, S., 2016. Cytoplasmic Drosha activity generated by alternative splicing. *Nucleic Acids Res* 44, 10454–10466.
- Damm, P., Houshmand-Oeregaard, A., Kelstrup, L., Lauenborg, J., Mathiesen, E.R., Clausen, T.D., 2016. Gestational diabetes mellitus and long-term consequences for mother and offspring: a view from Denmark. *Diabetologia* 59, 1396–1399.
- Dangwal, S., Stratmann, B., Bang, C., Lorenzen, J.M., Kumarswamy, R., Fiedler, J., Falk, C.S., Scholz, C.J., Thum, T., Tschoepe, D., 2015. Impairment of Wound Healing in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus Influences Circulating MicroRNA Patterns via Inflammatory Cytokines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35, 1480–1488.
- Daniel, J.C., 1964. Early Growth of Rabbit Trophoblast. *Am Nat* 98, 85–98.
- Das, S. K., Paria, B. C., Chakraborty, I., Dey, S. K., 1995. Cannabinoid ligand-receptor signaling in the mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4332–4336.
- Davies, J., Hoffman, L.H., 1973. Studies on the progesterational endometrium of the rabbit. I. Light microscopy, day 0 to day 13 of gonadotrophin-induced pseudopregnancy. *Am J Anat* 137, 423–445.
- Davis, B.N., Hilyard, A.C., Lagna, G., Hata, A., 2008. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* 454, 56–61.
- Davis, E., Caiment, F., Tordoir, X., Cavallé, J., Ferguson-Smith, A., Cockett, N., Georges, M., Charlier, C., 2005. RNAi-mediated allelic trans-interaction at the imprinted *Rtl1/Peg11* locus. *Curr Biol* 15, 743–749.
- DDG, diabetesDE, 2017. *Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2018*. Verlag: Kirchheim + Co GmbH, Berlin.
- De Valk, H.W., Van Nieuwaal, N.H.G., Visser, Gerard H. A., 2006. Pregnancy outcome in type 2 diabetes mellitus: a retrospective analysis from the Netherlands. *Rev Diabet Stud* 3, 134–142.
- DeChiara, T.M., Efstratiadis, A., Robertson, E. J., 1990. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 345, 78–80.
- Denker, H.W., 1977. Implantation. The role of proteinases, and blockage of implantation by proteinase inhibitors. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 53, 3–123.
- Dentelli, P., Rosso, A., Orso, F., Olgasi, C., Taverna, D., Brizzi, M.F., 2010. microRNA-222 Controls Neovascularization by Regulating Signal Transducer and Activator of Transcription 5A Expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 1562–1568.
- Di Carlo, V., Grossi, E., Laneve, P., Morlando, M., Dini Modigliani, S., Ballarino, M., Bozzoni, I., Caffarelli, E., 2013. TDP-43 regulates the microprocessor complex activity during in vitro neuronal differentiation. *Mol Neurobiol* 48, 952–963.
- Di Cristofano, A., Pesce, B., Cordon-Cardo, C., Pandolfi, P.P., 1998. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet* 19, 348–355.
- Di Leva, G., Gasparini, P., Piovan, C., Ngankeu, A., Garofalo, M., Taccioli, C., Iorio, M.V., Li, M., Volinia, S., Alder, H., *et al.*, 2010. MicroRNA cluster 221-222 and estrogen receptor alpha interactions in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 102, 706–721.
- Didiano, D., Hobert, O., 2006. Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions. *Nat Struct Mol Biol* 13, 849–851.
- Ding, L., Ni, J., Yang, F., Huang, L., Deng, H., Wu, Y., Ding, X., Tang, J., 2017. Promising therapeutic role of miR-27b in tumor. *Tumour Biol* 39, 1010428317691657.

- Djebali, S., Davis, C.A., Merkel, A., Dobin, A., Lassmann, T., et al., 2012. Landscape of transcription in human cells. *Nature* 489, 101–108.
- Djuranovic, S., Nahvi, A., Green, R., 2012. miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science* 336, 237–240.
- Donker, R.B., Mouillet, J.F., Chu, T., Hubel, C.A., Stolz, D.B., Morelli, A.E., Sadovsky, Y., 2012. The expression profile of C19MC microRNAs in primary human trophoblast cells and exosomes. *Mol Hum Reprod* 18, 417–424.
- Dooley, J., Garcia-Perez, J.E., Sreenivasan, J., Schlenner, S.M., Vangoitsenhoven, R., Papadopoulou, A.S., Tian, L., Schonefeldt, S., Serneels, L., Deroose, C., et al., 2016. The microRNA-29 Family Dictates the Balance Between Homeostatic and Pathological Glucose Handling in Diabetes and Obesity. *Diabetes* 65, 53–61.
- Downing, S.E., Lee, J.C., 1976. Cardiac function and metabolism following hemorrhage in the newborn lamb. *Ann Surg* 184, 743–751.
- Dueck, A., Ziegler, C., Eichner, A., Berezikov, E., Meister, G., 2012. microRNAs associated with the different human Argonaute proteins. *Nucleic Acids Res* 40, 9850–9862.
- Dupont, S., Krust, A., Gansmuller, A., Dierich, A., Chambon, P., Mark, M., 2000. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 127, 4277–4291.
- Eidem, H.R., McGary, K.L., Capra, J.A., Abbot, P., Rokas, A., 2017. The transformative potential of an integrative approach to pregnancy. *Placenta* 57, 204–215.
- El-Chaar, D., Yang, Q., Gao, J., Bottomley, J., Leader, A., Wen, S.W., Walker, M., 2009. Risk of birth defects increased in pregnancies conceived by assisted human reproduction. *Fertil Steril* 92, 1557–1561.
- Elyakim, E., Sitbon, E., Faerman, A., Tabak, S., Montia, E., Belanis, L., Dov, A., Marcusson, E.G., Bennett, C. Frank, Chajut, A., Cohen, D., Yerushalmi, N., 2010. hsa-miR-191 is a candidate oncogene target for hepatocellular carcinoma therapy. *Cancer Res* 70, 8077–8087.
- Enders, A.C., 1965. A Comparative Study Of The Fine Structure Of The Trophoblast In Several Hemochorial Placentas. *Am J Anat* 116, 29–67.
- Enquobahrie, D.A., Hensley, M., Qiu, C., Abetew, D.F., Hevner, K., Tadesse, M.G., Williams, M.A., 2016. Candidate Gene and MicroRNA Expression in Fetal Membranes and Preterm Delivery Risk. *Reprod Sci* 23, 731–737.
- Enquobahrie, D.A., Abetew, D.F., Sorensen, T.K., Willoughby, D., Chidambaram, K., Williams, M.A., 2011. Placental microRNA expression in pregnancies complicated by preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 204, 178.e12–21.
- Esguerra, J.L.S., Bolmeson, C., Cilio, C.M., Eliasson, L., 2011. Differential glucose-regulation of microRNAs in pancreatic islets of non-obese type 2 diabetes model Goto-Kakizaki rat. *PLoS ONE* 6, e18613.
- Estella, C., Herrero, I., Moreno-Moya, J.M., Quiñonero, A., Martínez, S., Pellicer, A., Simón, C., 2012. miRNA Signature and Dicer Requirement during Human Endometrial Stromal Decidualization In Vitro. *PLoS ONE* 7, e41080.
- Evers, I. M., Nikkels, P.G.J., Sikkema, J.M., Visser, G. H. A., 2003. Placental pathology in women with type 1 diabetes and in a control group with normal and large-for-gestational-age infants. *Placenta* 24, 819–825.
- Fairchild, C.L., Barna, M., 2014. Specialized filopodia: at the “tip” of morphogen transport and vertebrate tissue patterning. *Curr Opin Genet Dev* 27, 67–73.
- Fabian, M.R., Sonenberg, N., Filipowicz, W., 2010. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem* 79, 351–379.
- Fang, W., Bartel, David P., 2015. The Menu of Features that Define Primary MicroRNAs and Enable De Novo Design of MicroRNA Genes. *Mol Cell* 60, 131–145.
- Fareh, M., Yeom, K.-H., Haagsma, A.C., Chauhan, S., Heo, I., Joo, C., 2016. TRBP ensures efficient Dicer processing of precursor microRNA in RNA-crowded environments. *Nat Commun* 7, 13694.

- Favaro, R.R., Salgado, R.M., Covarrubias, A.C., Bruni, F., Lima, C., Fortes, Z.B., Zorn, T.M., 2013. Long-term type 1 diabetes impairs decidualization and extracellular matrix remodeling during early embryonic development in mice. *Placenta* 34, 1128–1135.
- Feinberg-Gorenshtein, G., Guedj, A., Shichrur, K., Jeison, M., Luria, D., Kodman, Y., Ash, S., Feinmesser, M., Edry, L., Shomron, N., *et al.*, 2013. MiR-192 directly binds and regulates Dicer1 expression in neuroblastoma. *PLoS ONE* 8, e78713.
- Fenn, A.M., Smith, K.M., Lovett-Racke, A.E., Guerau-de-Arellano, M., Whitacre, C.C., Godbout, J.P., 2013. Increased micro-RNA 29b in the aged brain correlates with the reduction of insulin-like growth factor-1 and fractalkine ligand. *Neurobiol Aging* 34, 2748–2758.
- Fischer, B., Chavatte-Palmer, P., Viebahn, C., Navarrete Santos, A., Duranthon, V., 2012. Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction* 144, 1–10.
- Fitzgerald, J.S., Tsareva, S.A., Poehlmann, T.G., Berod, L., Meissner, A., Corvinus, F.M., Wiederanders, B., Pfitzner, E., Markert, U.R., Friedrich, K., 2005. Leukemia inhibitory factor triggers activation of signal transducer and activator of transcription 3, proliferation, invasiveness, and altered protease expression in choriocarcinoma cells. *Int J BiochemCell Biol* 37, 2284–2296.
- Fleming, T. P., Velazquez, M.A., Eckert, J. J., 2015. Embryos, DOHaD and David Barker. *J Dev Orig Health Dis* 6, 377–383.
- Fleming, T.P., Kwong, W.Y., Porter, R., Ursell, E., Fesenko, I., Wilkins, A., Miller, D.J., Watkins, A.J., Eckert, J.J., 2004. The embryo and its future. *Biol Reprod* 71, 1046–1054.
- Fock, V., Plessl, K., Draxler, P., Otti, G.R., Fiala, C., Knöfler, M., Pollheimer, J., 2015a. Neuregulin-1-mediated ErbB2-ErbB3 signalling protects human trophoblasts against apoptosis to preserve differentiation. *J Cell Sci* 128, 4306–4316.
- Fock, V., Plessl, K., Fuchs, R., Dekan, S., Milla, S.K., Haider, S., Fiala, C., Knöfler, M., Pollheimer, J., 2015b. Trophoblast subtype-specific EGFR/ERBB4 expression correlates with cell cycle progression and hyperplasia in complete hydatidiform moles. *Hum Reprod* 30, 789–799.
- Fonseca, B.M., Correia-da-Silva, G., Taylor, A.H., Konje, J.C., Bell, S.C., Teixeira, N.A., 2009. Spatio-temporal expression patterns of anandamide-binding receptors in rat implantation sites: evidence for a role of the endocannabinoid system during the period of placental development. *Reprod Biol Endocrinol* 7, 121.
- Forbes, K., Westwood, M., 2008. The IGF axis and placental function: a mini review. *Horm Res* 69, 129–137.
- Forman, J.J., Legesse-Miller, A., Coller, H.A., 2008. A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14879–14884.
- Fu, G., Brkić, J., Hayder, H., Peng, C., 2013. MicroRNAs in Human Placental Development and Pregnancy Complications. *Int J Mol Sci* 14, 5519–5544.
- Fukao, A., Mishima, Y., Takizawa, N., Oka, S., Imataka, H., Pelletier, J., Sonenberg, N., Thoma, C., Fujiwara, T., 2014. MicroRNAs trigger dissociation of eIF4A1 and eIF4A11 from target mRNAs in humans. *Mol Cell* 56, 79–89.
- Fukunaga, R., Han, B.W., Hung, J.H., Xu, J., Weng, Z., Zamore, P.D., 2012. Dicer partner proteins tune the length of mature miRNAs in flies and mammals. *Cell* 151, 533–546.
- Furukawa, S., Kuroda, Y., Sugiyama, A., 2014. A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. *J Toxicol Pathol* 27, 11–18.
- Gagnon, K.T., Li, L., Chu, Y., Janowski, B.A., Corey, D.R. 2014. RNAi factors are present and active in human cell nuclei. *Cell Rep* 6, 211–221.
- Galardi, S., Mercatelli, N., Farace, M.G., Ciafrè, S.A., 2011. NF- $\kappa$ B and c-Jun induce the expression of the oncogenic miR-221 and miR-222 in prostate carcinoma and glioblastoma cells. *Nucleic Acids Res* 39, 3892–3902.
- Gao, S., Cheng, C., Chen, H., Li, M., Liu, K., Wang, G., 2016. IGF1 3'UTR functions as a ceRNA in promoting angiogenesis by sponging miR-29 family in osteosarcoma. *J Mol Histol* 47, 135–143.
- García-López, J., Del Mazo, J., 2012. Expression dynamics of microRNA biogenesis during preimplantation mouse development. *Biochim Biophys Acta, Gene Regul Mech* 1819, 847–854.

- Garris, D.R., 1988. Effects of Diabetes on Uterine Condition, Decidualization, Vascularization, and Corpus Luteum Function in the Pseudopregnant Rat. *Endocrinology* 122, 665–672.
- Gassmann, M., Casagrande, F., Orioli, D., Simon, H., Lai, C., Klein, R., Lemke, G., 1995. Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* 378, 390–394.
- Gebeh, A.K., Willets, J.M., Marczylo, E.L., Taylor, A.H., Konje, Justin C., 2012. Ectopic Pregnancy Is Associated with High Anandamide Levels and Aberrant Expression of FAAH and CB1 in Fallopian Tubes. *J Clin Endocrinol Metab* 97, 2827–2835.
- Ghorai, A., Ghosh, U., 2014. miRNA gene counts in chromosomes vary widely in a species and biogenesis of miRNA largely depends on transcription or post-transcriptional processing of coding genes. *Front Genet* 5, 100.
- Gianaroli, L., Magli, M.C., Pomante, A., Crivello, A.M., Cafueri, G., Valerio, M., Ferraretti, A.P., 2014. Blastocentesis: a source of DNA for preimplantation genetic testing. Results from a pilot study. *Fertil Steril* 102, 1692–1699.e6.
- Gibbings, D., Mostowy, S., Jay, F., Schwab, Y., Cossart, P., Voinnet, O., 2012. Selective autophagy degrades DICER and AGO2 and regulates miRNA activity. *Nat Cell Biol* 14, 1314–1321.
- Gilchrist, G., Tscherner, A., Nalpathamkalam, T., Merico, D., LaMarre, J., 2016. MicroRNA Expression during Bovine Oocyte Maturation and Fertilization. *Int J Mol Sci* 17, 396.
- Gill, J.G., Langer, E.M., Lindsley, R.C., Cai, M., Murphy, T.L., Kyba, M., Murphy, K.M., 2011. Snail and the microRNA-200 Family Act in Opposition to Regulate Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Germ Layer Fate Restriction in Differentiating ESCs. *Stem Cells* 29, 764–776.
- Goolam, M., Zernicka-Goetz, Magdalena, 2017. The chromatin modifier Satb1 regulates cell fate through Fgf signalling in the early mouse embryo. *Development* 144, 1450–1461.
- Goossens, K., Mestdagh, P., Lefever, S., Van Poucke, M., Van Zeveren, A., Van Soom, A., Vandesomepele, J., Peelman, L., 2013. Regulatory microRNA Network Identification in Bovine Blastocyst Development. *Stem Cells Dev* 22, 1907–1920.
- Granjon, A., Gustin, M.-P., Rieusset, J., Lefai, E., Meugnier, E., Güller, I., Cerutti, C., Paultre, C., Disse, E., Rabasa-Lhoret, R., *et al.*, 2009. The microRNA signature in response to insulin reveals its implication in the transcriptional action of insulin in human skeletal muscle and the role of a sterol regulatory element-binding protein-1c/myocyte enhancer factor 2C pathway. *Diabetes* 58, 2555–2564.
- Graur, D., Duret, L., Gouy, M., 1996. Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies). *Nature* 379, 333–335.
- Gregory, R.I., Yan, K.-P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., Shiekhattar, R., 2004. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432, 235–240.
- Gromak, N., Dienstbier, M., Macias, S., Plass, M., Eyra, E., Cáceres, J.F., Proudfoot, N.J., 2013. Drosha Regulates Gene Expression Independently of RNA Cleavage Function. *Cell Rep* 5, 1499–1510.
- Gross, N., Kropp, J., Khatib, H., 2017a. Sexual Dimorphism of miRNAs Secreted by Bovine In vitro-produced Embryos. *Front Genet* 8, 39.
- Gross, N., Kropp, J., Khatib, H., 2017b. MicroRNA Signaling in Embryo Development. *Biology (Basel)* 6.
- Gruber, A.R., Lorenz, R., Bernhart, S.H., Neuböck, R., Hofacker, I.L., 2008. The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Res* 36, W70–74.
- Grybel, K.J., unveröffentlicht. Epigenetic changes in preimplantation embryos from a diabetic pregnancies. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät, Institut für Anatomie und Zellbiologie. Halle (Saale)
- Gu, Y., Ampofo, E., Menger, M.D., Laschke, M.W., 2017. miR-191 suppresses angiogenesis by activation of NF- $\kappa$ B signaling. *FASEB J* 31, 3321–3333.
- Gu, Y., Bian, Y., Xu, X., Wang, X., Zuo, C., Meng, J., Li, H., Zhao, S., Ning, Y., Cao, Y., *et al.*, 2016. Downregulation of miR-29a/b/c in placenta accreta inhibits apoptosis of implantation site intermediate trophoblast cells by targeting MCL1. *Placenta* 48, 13–19.
- Gu, Y., Sun, J., Groome, L.J., Wang, Y., 2013. Differential miRNA expression profiles between the first and third trimester human placentas. *AJP: Endocrinology and Metabolism* 304, E836–E843.

- Guay, C., Roggli, E., Nesca, V., Jacovetti, C., Regazzi, R., 2011. Diabetes mellitus, a microRNA-related disease? *Transl Res* 157, 253–264.
- Gulyaeva, L.F., Kushlinskiy, N.E., 2016. Regulatory mechanisms of microRNA expression. *J Transl Med* 14, 143.
- Guo, D., Jiang, H., Chen, Y., Yang, J., Fu, Z., Li, J., Han, X., Wu, X., Xia, Y., Wang, X., Chen, L., Tang, Q., Wu, W., 2018. Elevated microRNA-141-3p in placenta of non-diabetic macrosomia regulate trophoblast proliferation. *EBioMedicine*. 38,154-161.
- Guo, L., Zhou, Y., Wang, S., Wu, Y., 2014. Epigenetic changes of mesenchymal stem cells in three-dimensional (3D) spheroids. *J Cell Mol Med* 18, 2009–2019.
- Gürke, J., Schindler, M., Pendzialek, S.M., Thieme, R., Grybel, K.J., Heller, R., Spengler, K., Fleming, T.P., Fischer, B., Navarrete Santos, A., 2016. Maternal diabetes promotes mTORC1 downstream signalling in rabbit preimplantation embryos. *Reproduction* 151, 465–476.
- Gürke, J., Hirche, F., Thieme, R., Haucke, E., Schindler, M., Stangl, G.I., Fischer, B., Navarrete Santos, A., 2015. Maternal Diabetes Leads to Adaptation in Embryonic Amino Acid Metabolism during Early Pregnancy. *PLoS ONE* 10, e0127465.
- Gutiérrez-Samudio, R.N., Heimann, Y., Markert, U.R., Morales-Prieto, D.M., 2016. Role of miR-141 in angiogenesis and communication between trophoblast and endothelial cells via extracellular vesicles with emphasis on preeclampsia. *Placenta* 45, 73.
- Gwizdek, C., Ossareh-Nazari, B., Brownawell, A.M., Doglio, A., Bertrand, E., Macara, I.G., Dargemont, C., 2003. Exportin-5 mediates nuclear export of minihelix-containing RNAs. *J Biol Chem* 278, 5505–5508.
- Ha, M., Kim, V.N., 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 509–524.
- Hadjimichael, C., Nikolaou, C., Papamatheakis, J., Kretsovali, A., 2016. MicroRNAs for Fine-Tuning of Mouse Embryonic Stem Cell Fate Decision through Regulation of TGF- $\beta$  Signaling. *Stem Cell Rep* 6, 292–301.
- Hales, C.N., Barker, D.J., Clark, P.M., Cox, L.J., Fall, C., Osmond, C., Winter, P.D., 1991. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* 303, 1019–1022.
- Han, L., Zhang, A., Zhou, X., Xu, P., Wang, G.-X., Pu, P.-Y., Kang, C.-S., 2010. Downregulation of Dicer enhances tumor cell proliferation and invasion. *Int J Oncol* 37, 299–305.
- Han, J., Pedersen, J.S., Kwon, S.C., Belair, C.D., Kim, Y.-K., Yeom, Kyu-Hyeon, Yang, W.-Y., Hausler, D., Blleloch, Robert, Kim, V.N., 2009. Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8. *Cell* 136, 75–84.
- Han, L., Witmer, P.D., Casey, E., Valle, D., Sukumar, S., 2007. DNA methylation regulates MicroRNA expression. *Cancer Biol Ther* 6, 1284–1288.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Nam, J.-W., Heo, I., Rhee, J.-K., Sohn, S.Y., Cho, Y., Zhang, B.-T., Kim, V.N., 2006. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 125, 887–901.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Kim, Y.-K., Jin, H., Kim, V.N., 2004. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 18, 3016–3027.
- Haucke, E., 2015. Der Einfluss eines maternalen Diabetes mellitus Typ 1 auf das AGE/RAGE-System während der Präimplantation am Modell des Kaninchens. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät, Institut für Anatomie und Zellbiologie. Halle (Saale).
- Haucke, E., Navarrete Santos, A., Simm, A., Henning, C., Glomb, M.A., Gurke, J., Schindler, M., Fischer, B., Navarrete Santos, A., 2014. Accumulation of advanced glycation end products in the rabbit blastocyst under maternal diabetes. *Reproduction* 148, 169–178.
- He, Y., Cui, Y., Wang, W., Gu, J., Guo, S., Ma, K., Luo, X., 2011. Hypomethylation of the hsa-miR-191 locus causes high expression of hsa-mir-191 and promotes the epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Neoplasia* 13, 841–853.
- He, A., Zhu, L., Gupta, N., Chang, Y., Fang, F., 2007. Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 21, 2785–2794.
- Hemberger, M., Dean, W., Reik, W., 2009. Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 526–537.



- Hensen, K., Braem, C., Declercq, J., Van Dyck, F., Dewerchin, M., Fiette, L., Denef, C., Van de Ven, W.J.M., 2004. Targeted disruption of the murine Plag1 proto-oncogene causes growth retardation and reduced fertility. *Dev Growth Differ* 46, 459–470.
- Hensen, V., 1876. Beobachtungen über die Befruchtung und Entwicklung des Kaninchens und Meerschweinchens. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte* 1, 213–273, 353–432.
- Herbert, K.M., Pimienta, G., DeGregorio, S.J., Alexandrov, A., Steitz, J.A., 2013. Phosphorylation of DGCR8 increases its intracellular stability and induces a progrowth miRNA profile. *Cell Rep* 5, 1070–1081.
- Hernández, G., Lal, H., Fidalgo, M., Guerrero, A., Zalvide, J., Force, T., Pombo, C.M., 2011. A novel cardioprotective p38-MAPK/mTOR pathway. *Exp Cell Res* 317, 2938–2949.
- Herrera, B.M., Lockstone, H.E., Taylor, J.M., Ria, M., Barrett, A., Collins, S., Kaisaki, P., Argoud, K., Fernandez, C., Travers, M.E., *et al.*, 2010. Global microRNA expression profiles in insulin target tissues in a spontaneous rat model of type 2 diabetes. *Diabetologia* 53, 1099–1109.
- Hewitt, S.C., Kissling, G.E., Fieselman, K.E., Jayes, F.L., Gerrish, K.E., Korach, K. S., 2010. Biological and biochemical consequences of global deletion of exon 3 from the ER gene. *FASEB J* 24, 4660–4667.
- Hewitt, S.C., Goulding, E.H., Eddy, E.M., Korach, K.S., 2002. Studies using the estrogen receptor alpha knockout uterus demonstrate that implantation but not decidualization-associated signaling is estrogen dependent. *Biol Reprod* 67, 1268–1277.
- Higashijima, A., Miura, K., Mishima, H., Kinoshita, A., Jo, O., Abe, S., Hasegawa, Y., Miura, S., Yamasaki, K., Yoshida, A., *et al.*, 2013. Characterization of placenta-specific microRNAs in fetal growth restriction pregnancy. *Prenat Diagn* 33, 214–222.
- Hiilesmaa, V., Suhonen, L., Teramo, K., 2000. Glycaemic control is associated with pre-eclampsia but not with pregnancy-induced hypertension in women with type I diabetes mellitus. *Diabetologia* 43, 1534–1539.
- Hoffman, L.H., Winfrey, V.P., Hoos, P.C., 1990. Sites of endometrial vascular leakage during implantation in the rabbit. *Anat Rec* 227, 47–61.
- Hong, X., Luense, L.J., McGinnis, L.K., Nothnick, W.B., Christenson, L.K., 2008. Dicer1 Is Essential for Female Fertility and Normal Development of the Female Reproductive System. *Endocrinology* 149, 6207–6212.
- Horman, S.R., Janas, M.M., Litterst, C., Wang, B., MacRae, I.J., Sever, M.J., Morrissey, D.V., Graves, P., Luo, B., Umesalma, S., *et al.*, 2013. Akt-mediated phosphorylation of argonaute 2 downregulates cleavage and upregulates translational repression of MicroRNA targets. *Mol Cell* 50, 356–367.
- Hsu, S.-D., Chu, C.-H., Tsou, A.-P., Chen, S.-J., Chen, H.-C., Hsu, P.W.-C., Wong, Y.-H., Chen, Y.-H., Chen, G.-H., Huang, H.-D., 2008. miRNAMap 2.0: genomic maps of microRNAs in metazoan genomes. *Nucleic Acids Res* 36, D165–169.
- Hu, Y., Li, P., Hao, S., Liu, L., Zhao, J., Hou, Y., 2009. Differential expression of microRNAs in the placentae of Chinese patients with severe pre-eclampsia. *Clin Chem Lab Med* 47, 923–929.
- Huang, C.-Y., Chang, A.-C., Chen, H.-T., Wang, S.-W., Lo, Y.-S., Tang, C.-H., 2016. Adiponectin promotes VEGF-C-dependent lymphangiogenesis by inhibiting miR-27b through a CaMKII/AMPK/p38 signaling pathway in human chondrosarcoma cells. *Clinical Science* 130, 1523–1533.
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A. E., Bálint, E., Tuschl, T., Zamore, P.D., 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293, 834–838.
- Huynh, J., Xiong, G., Bentley-Lewis, R., 2014. A systematic review of metabolite profiling in gestational diabetes mellitus. *Diabetologia* 57, 2453–2464.
- Hwang, M.S., Yu, N., Stinson, S.Y., Yue, P., Newman, R.J., Allan, B.B., Dornan, D., 2013. miR-221/222 Targets Adiponectin Receptor 1 to Promote the Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Breast Cancer. *PLoS ONE* 8, e66502.
- Hwang, H.-Way, Wentzel, E.A., Mendell, Joshua T., 2007. A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science* 315, 97–100.
- Hwang, H-W, Mendell, J T, 2006. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer* 94, 776–780.

- Imakawa, K., Tamura, K., Lee, R.S.F., Ji, Y., Kogo, H., Sakai, S., Christenson, R.K., 2002. Temporal expression of type I interferon receptor in the peri-implantation ovine extra-embryonic membranes: demonstration that human IFN $\alpha$  can bind to this receptor. *Endocr J* 49, 195–205.
- International Diabetes Federation, n.d. *IDF Diabetes Atlas*, 8th edn. Brüssel.
- Ito, M., Sferruzzi-Perri, A.N., Edwards, C.A., Adalsteinsson, B.T., Allen, S.E., Loo, T.-H., Kitazawa, M., Kaneko-Ishino, T., Ishino, F., Stewart, C. L., Ferguson-Smith, A. C., 2015. A trans-homologue interaction between reciprocally imprinted miR-127 and Rtl1 regulates placenta development. *Development* 142, 2425–2430.
- Ivey, K.N., Srivastava, D., 2010. MicroRNAs as Regulators of Differentiation and Cell Fate Decisions. *Cell Stem Cell* 7, 36–41.
- Iwakawa, H.-O., Tomari, Y., 2015. The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends Cell Biol* 25, 651–665.
- Jafari, N., Dogahneh, H.P., Bohlooli, S., Oyong, G.G., Shirzad, Z., Alibeiki, F., Asl, S.H., Zargar, S.J., 2013. Expression levels of microRNA machinery components Drosha, Dicer and DGCR8 in human (AGS, HepG2, and KEYSE-30) cancer cell lines. *Int J Clin Exp Med* 6, 269–274.
- Jauhari, A., Singh, T., Pandey, A., Singh, P., Singh, N., Srivastava, A.K., Pant, A.B., Parmar, D., Yadav, S., 2017. Differentiation Induces Dramatic Changes in miRNA Profile, Where Loss of Dicer Diverts Differentiating SH-SY5Y Cells Toward Senescence. *Mol Neurobiol* 54, 4986–4995.
- Jawerbaum, A., White, V., 2010. Animal models in diabetes and pregnancy. *Endocr Rev* 31, 680–701.
- Jensen, P.L., Beck, H.C., Petersen, J., Hreinsson, J., Wånggren, K., Laursen, S.B., Sørensen, P.D., Christensen, S.T., Andersen, C.Y., 2013. Proteomic Analysis of Human Blastocoel Fluid and Blastocyst Cells. *Stem Cells Dev* 22, 1126–1135.
- Ji, S., Li, W., Bao, L., Han, P., Yang, W., Ma, L., Meng, F., Cao, B., 2014. PU.1 promotes miR-191 to inhibit adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 451, 329–333.
- Jin, L., Wessely, O., Marcusson, E.G., Ivan, C., Calin, G.A., Alahari, S.K., 2013. Prooncogenic factors miR-23b and miR-27b are regulated by Her2/Neu, EGF, and TNF- $\alpha$  in breast cancer. *Cancer Res* 73, 2884–2896.
- Jin, X.L., O'Neill, C., 2007. cAMP-responsive element-binding protein expression and regulation in the mouse preimplantation embryo. *Reproduction* 134, 667–675.
- Johanson, T.M., Keown, A.A., Cmero, M., Yeo, J.H.C., Kumar, A., Lew, A.M., Zhan, Y., Chong, M.M.W., 2015. Drosha controls dendritic cell development by cleaving messenger RNAs encoding inhibitors of myelopoiesis. *Nat Immunol* 16, 1134–1141.
- Jokhi, P.P., King, A., Loke, Y.W., 1994. Reciprocal expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R) and c-erbB2 by non-invasive and invasive human trophoblast populations. *Cytokine* 6, 433–442.
- Jonas, S., Izaurralde, E., 2015. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet* 16, 421–433.
- Jones, R.L., Stoikos, C., Findlay, J.K., Salamonsen, L.A., 2006. TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction* 132, 217–232.
- Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., Bartel, B., 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol* 57, 19–53.
- Jörns, A., Munday, R., Tiedge, M., Lenzen, S., 1997. Comparative toxicity of alloxan, N-alkylalloxans and ninhydrin to isolated pancreatic islets in vitro. *J Endocrinol* 155, 283–293.
- Jouneau, A., Ciaudo, C., Sismeiro, O., Brochard, V., Jouneau, L., Vandormael-Pournin, S., Coppee, J.-Y., Zhou, Q., Heard, E., Antoniewski, C., Cohen-Tannoudji, M., 2012. Naive and primed murine pluripotent stem cells have distinct miRNA expression profiles. *RNA* 18, 253–264.
- Juma, A.R., Damdimopoulou, P.E., Grommen, S.V.H., Van de Ven, W.J.M., De Groef, B., 2016. Emerging role of PLAG1 as a regulator of growth and reproduction. *J Endocrinol* 228, R45–56.
- Jumaa, H., Wei, G., Nielsen, P.J., 1999. Blastocyst formation is blocked in mouse embryos lacking the splicing factor SRp20. *Curr Biol* 9, 899–902.

- Kadakia, R., Josefson, J., 2016. The Relationship of Insulin-Like Growth Factor 2 to Fetal Growth and Adiposity. *Horm Res Paediatr* 85, 75–82.
- Kahn, T., Bosch, J., Levitt, M.F., Goldstein, M.H., 1975. Effect of sodium nitrate loading on electrolyte transport by the renal tubule. *Am J Physiol* 229, 746–753.
- Kane, N.M., Meloni, M., Spencer, H.L., Craig, M.A., Strehl, R., Milligan, G., Houslay, M.D., Mountford, J.C., Emanuelli, C., Baker, A.H., 2010. Derivation of endothelial cells from human embryonic stem cells by directed differentiation: analysis of microRNA and angiogenesis in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 1389–1397.
- Kanellopoulou, C., Muljo, S.A., Kung, A.L., Ganesan, S., Drapkin, R., Jenuwein, T., Livingston, D.M., Rajewsky, K., 2005. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev* 19, 489–501.
- Kao, L.C., Tulac, S., Lobo, S., Imani, B., Yang, J.P., Germeyer, A., Osteen, K., Taylor, R. N., Lessey, B.A., Giudice, L.C., 2002. Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology* 143, 2119–2138.
- Karbiener, M., Fischer, C., Nowitsch, S., Opriessnig, P., Papak, C., Ailhaud, G., Dani, C., Amri, E.-Z., Scheideler, M., 2009. microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPAR $\gamma$ . *Biochem Biophys Res Commun* 390, 247–251.
- Karolina, D.S., Armugam, A., Tavintharan, S., Wong, M.T.K., Lim, S.C., Sum, C.F., Jeyaseelan, K., 2011. MicroRNA 144 Impairs Insulin Signaling by Inhibiting the Expression of Insulin Receptor Substrate 1 in Type 2 Diabetes Mellitus. *PLoS ONE* 6, e22839.
- Kaufmann, P., 1990. Placentation und Placenta, in: Hinrichsen, K.V. (Ed.), *Humanembryologie: Lehrbuch Und Atlas Der Vorgeburtlichen Entwicklung Des Menschen*. Springer Berlin Heidelberg, 159–204.
- Kawahara, Y., Mieda-Sato, A., 2012. TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 3347–3352.
- Kawamura, K., Kawamura, N., Sato, W., Fukuda, J., Kumagai, J., Tanaka, T., 2009. Brain-derived neurotrophic factor promotes implantation and subsequent placental development by stimulating trophoblast cell growth and survival. *Endocrinology* 150, 3774–3782.
- Kessler, C.A., Moghadam, K.K., Schroeder, J.K., Buckley, A.R., Brar, A.K., Handwerger, S., 2005. Cannabinoid receptor I activation markedly inhibits human decidualization. *Mol Cell Endocrinol* 229, 65–74.
- Kiezun, A., Artzi, S., Modai, S., Volk, N., Isakov, O., Shomron, N., 2012. miRviewer: a multispecies microRNA homologous viewer. *BMC Res Notes* 5, 92.
- Kim, K., Nguyen, T.D., Li, S., Nguyen, T.A., 2018. SRSF3 recruits DROSHA to the basal junction of primary microRNAs. *RNA* 24, 892–898.
- Kim, Y.-K., Kim, B., Kim, V.N., 2016. Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin, and DICER in microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E1881–E1889.
- Kim, J., Krichevsky, A., Grad, Y., Hayes, G.D., Kosik, K.S., Church, G.M., Ruvkun, G., 2004. Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 360–365.
- Kleijkers, S.H.M., Mantikou, E., Slappendel, E., Consten, D., Van Echten-Arends, J., Wetzels, A.M., Van Wely, M., Smits, L.J.M., Van Montfoort, A.P.A., Repping, S., *et al.*, 2016. Influence of embryo culture medium (G5 and HTF) on pregnancy and perinatal outcome after IVF: a multicenter RCT. *Hum Reprod* 31, 2219–2230.
- Klemetti, R., Gissler, M., Sevón, T., Koivurova, S., Ritvanen, A., Hemminki, E., 2005. Children born after assisted fertilization have an increased rate of major congenital anomalies. *Fertil Steril* 84, 1300–1307.
- Klonisch, T., Wolf, P., Hombach-Klonisch, S., Vogt, S., Kuechenhoff, A., Tetens, F., Fischer, B., 2001. Epidermal growth factor-like ligands and erbB genes in the peri-implantation rabbit uterus and blastocyst. *Biol Reprod* 64, 1835–1844.
- Kozomara, A., Griffiths-Jones, S., 2014. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 42, D68–D73.

- Krawczynski, K., Najmula, J., Bauersachs, S., Kaczmarek, M. M., 2015a. MicroRNAome of Porcine Conceptuses and Trophoblasts: Expression Profile of microRNAs and Their Potential to Regulate Genes Crucial for Establishment of Pregnancy. *Biol Reprod* 92, 21–21.
- Krawczynski, K., Bauersachs, S., Reliszko, Z.P., Graf, A., Kaczmarek, M.M., 2015b. Expression of microRNAs and isomiRs in the porcine endometrium: implications for gene regulation at the maternal-conceptus interface. *BMC Genomics* 16.
- Kriegel, A.J., Liu, Y., Fang, Y., Ding, X., Liang, M., 2012. The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. *Physiol Genomics* 44, 237–244.
- Kropp, J., Khatib, H., 2015. Characterization of microRNA in bovine in vitro culture media associated with embryo quality and development. *J Dairy Sci* 98, 6552–6563.
- Kropp, J., Salih, S.M., Khatib, H., 2014. Expression of microRNAs in bovine and human pre-implantation embryo culture media. *Front Genet* 5, 91.
- Kuehbacher, A., Urbich, C., Zeiher, A.M., Dimmeler, S., 2007. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res* 101, 59–68.
- Kumar, R., Yadav, A., Pakrasi, P.L., 2017. Expression of ER- $\alpha$  and ER- $\beta$  during peri-implantation period in uterus is essential for implantation and decidualization in golden hamster. *Life Sciences* 170, 115–122.
- Kuokkanen, S., Chen, B., Ojalvo, L., Benard, L., Santoro, N., Pollard, J.W., 2010. Genomic Profiling of MicroRNAs and Messenger RNAs Reveals Hormonal Regulation in MicroRNA Expression in Human Endometrium. *Biol Reprod* 82, 791–801.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853–858.
- Laguë, M.-N., Detmar, J., Paquet, M., Boyer, A., Richards, J.S., Adamson, S.L., Boerboom, D., 2010. Decidual PTEN expression is required for trophoblast invasion in the mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299, E936–946.
- Lambert, G., Brichant, J.F., Hartstein, G., Bonhomme, V., Dewandre, P.Y., 2014. Preeclampsia: an update. *Acta Anaesthesiol Belg* 65, 137–149.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., et al., 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921.
- Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., et al., 2007. A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing. *Cell* 129, 1401–1414.
- Larsson, J., Goumans, M.J., Sjöstrand, L.J., Van Rooijen, M.A., Ward, D., Levéen, P., Xu, X., Ten Dijke, P., Mummery, C.L., Karlsson, S., 2001. Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF- $\beta$  type I receptor-deficient mice. *EMBO J* 20, 1663–1673.
- Lau, N.C., Lim, L. P., Weinstein, E.G., Bartel, D. P., 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858–862.
- Lawrie, C.H., Gal, S., Dunlop, H.M., Pushkaran, B., Liggins, A.P., Pulford, K., Banham, A.H., Pezzella, F., Boulwood, J., Wainscoat, J.S., et al., 2008. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 141, 672–675.
- Lee, D., Shin, C., 2018. Emerging roles of DROSHA beyond primary microRNA processing. *RNA Biol* 15, 186–193.
- Lee, H.Y., Zhou, K., Smith, A.M., Noland, C.L., Doudna, J.A., 2013. Differential roles of human Dicer-binding proteins TRBP and PACT in small RNA processing. *Nucleic Acids Res* 41, 6568–6576.
- Lee, J.-J., Drakaki, A., Iliopoulos, D., Struhl, K., 2012. MiR-27b targets PPAR $\gamma$  to inhibit growth, tumor progression and the inflammatory response in neuroblastoma cells. *Oncogene* 31, 3818–3825.
- Lee, D.-C., Romero, R., Kim, J.-S., Tarca, A.L., Montenegro, D., Pineles, B.L., Kim, E., Lee, J.H., Kim, S. Young, D., et al., 2011. miR-210 Targets Iron-Sulfur Cluster Scaffold Homologue in Human Trophoblast Cell Lines. *Am J Pathol* 179, 590–602.

- Lee, D.-K., Kurihara, I., Jeong, J.-W., Lydon, J.P., DeMayo, F.J., Tsai, M.-J., Tsai, S.Y., 2010. Suppression of ER $\alpha$  Activity by COUP-TFII Is Essential for Successful Implantation and Decidualization. *Mol Endocrinol* 24, 930–940.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., Kim, V.N., 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23, 4051–4060.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., Kim, V.N., 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415–419.
- Lee, K.F., Simon, H., Chen, H., Bates, B., Hung, M.C., Hauser, C., 1995. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 378, 394–398.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.
- Lenzen, S., 2008. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51, 216–226.
- Lenzen, S., Drinkgern, J., Tiedge, M., 1996. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med* 20, 463–466.
- Lenzen, S., Munday, R., 1991. Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. *Biochem Pharmacol* 42, 1385–1391.
- Li, J., Song, L., Zhou, L., Wu, J., Sheng, C., Chen, H., Liu, Y., Gao, S., Huang, W., 2015a. A MicroRNA Signature in Gestational Diabetes Mellitus Associated with Risk of Macrosomia. *Cell Physiol Biochem* 37, 243–252.
- Li, J., Chen, L., Tang, Q., Wu, W., Gu, H., Liu, L., Wu, J., Jiang, H., Ding, H., Xia, Y., *et al.*, 2015b. The role, mechanism and potentially novel biomarker of microRNA-17-92 cluster in macrosomia. *Sci Rep* 5, 17212.
- Li, P., Guo, W., Du, L., Zhao, J., Wang, Y., Liu, L., Hu, Y., Hou, Y., 2013a. microRNA-29b contributes to pre-eclampsia through its effects on apoptosis, invasion and angiogenesis of trophoblast cells. *Clin Sc* 124, 27–40.
- Li, H., Ge, Q., Guo, L., Lu, Z., 2013b. Maternal Plasma miRNAs Expression in Preeclamptic Pregnancies. *Biomed Res Int* 2013, 1–9.
- Li, J., Ran, C., Li, E., Gordon, F., Comstock, G., Siddiqui, H., Cleghorn, W., Chen, H.-Z., Kornacker, K., Liu, C.-G., Pandit, S.K., Khanizadeh, M., Weinstein, M., Leone, G., De Bruin, A., 2008. Synergistic function of E2F7 and E2F8 is essential for cell survival and embryonic development. *Dev Cell* 14, 62–75.
- Liang, W.-C., Wang, Y., Wan, D.C.-C., Yeung, V.S.-Y., Wayne, M.M.-Y., 2013. Characterization of miR-210 in 3T3-L1 adipogenesis: miR-210 Regulates 3T3-L1 Adipogenesis. *J Cell Biochem* 114, 2699–2707.
- Liang, Y., Ridzon, D., Wong, L., Chen, C., 2007. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics* 8, 166.
- Lim, H.J., Wang, H., 2010. Uterine disorders and pregnancy complications: insights from mouse models. *J Clin Invest* 120, 1004–1015.
- Lim, H.J., Dey, S. K., 2009. HB-EGF: a unique mediator of embryo-uterine interactions during implantation. *Exp Cell Res* 315, 619–626.
- Lin, C.-H., Jackson, A.L., Guo, J., Linsley, P.S., Eisenman, R.N., 2009. Myc-regulated microRNAs attenuate embryonic stem cell differentiation. *EMBO J* 28, 3157–3170.
- Lin, S., Cheung, W.K.C., Chen, S., Lu, G., Wang, Z., Xie, D., Li, K., Lin, M.C.M., Kung, H.-F., 2010. Computational identification and characterization of primate-specific microRNAs in human genome. *Comput Biol Chem* 34, 232–241.
- Lin, X., Rice, K.L., Buzzai, M., Hexner, E., Costa, F.F., Kilpivaara, O., Mullally, A., Soares, M.B., Ebert, B.L., Levine, R., Licht, J D, 2013. miR-433 is aberrantly expressed in myeloproliferative neoplasms and suppresses hematopoietic cell growth and differentiation. *Leukemia* 27, 344–352.
- Link, S., Grund, S.E., Diederichs, S., 2016. Alternative splicing affects the subcellular localization of Drosha. *Nucleic Acids Res* 44, 5330–5343.

- Linsen, S.E.V., De Wit, E., Janssens, G., Heater, S., Chapman, L., Parkin, R.K., Fritz, B., Wyman, S.K., De Bruijn, E., Voest, E.E., *et al.*, 2009. Limitations and possibilities of small RNA digital gene expression profiling. *Nat Methods* 6, 474–476.
- Liu, W., Niu, Z., Li, Qian, P., R.T.K., Chiu, P.C.N., Yeung, W.S.-B., 2016. MicroRNA and Embryo Implantation. *Am J Reprod Immunol* 75, 263–271.
- Liu, J., Ye, C., Liu, W., Zhao, W., Zhang, Y., Zhang, H., Ying, H., 2015. AICAR enhances insulin signaling via downregulation of miR-29. *Can J Physiol Pharmacol* 1–7.
- Liu, S, Wang, J, Qin, H-M, Yan, X.-M., Yang, X.-S., Liu, C, Yan, Q, 2014. LIF upregulates poFUT1 expression and promotes trophoblast cell migration and invasion at the fetal–maternal interface. *Cell Death Dis* 5, e1396.
- Liu, X., Gao, R., Chen, X., Zhang, H., Zheng, A., Yang, D., Ding, Y., Wang, Y., He, J., 2013. Possible Roles of mmu-miR-141 in the Endometrium of Mice in Early Pregnancy Following Embryo Implantation. *PLoS ONE* 8, e67382.
- Liu, X., Jin, D.-Y., McManus, M.T., Mourelatos, Z., 2012. Precursor microRNA-programmed silencing complex assembly pathways in mammals. *Mol Cell* 46, 507–517.
- Liu, G., Fang, Y., Zhang, H., Li, Y., Li, X., Yu, J., Wang, X., 2010a. Computational identification and microarray-based validation of microRNAs in *Oryctolagus cuniculus*. *Mol Biol Rep* 37, 3575–3581.
- Liu, L., Luo, G.-Z., Yang, W., Zhao, X., Zheng, Q., Lv, Z., Li, W., Wu, H.-J., Wang, L., Wang, X.-J., Zhou, Q., 2010b. Activation of the imprinted *Dlk1-Dio3* region correlates with pluripotency levels of mouse stem cells. *J Biol Chem* 285, 19483–19490.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., Hannon, G.J., 2004. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 1437–41.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods* 25, 402–408.
- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., Kutay, U., 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303, 95–98.
- Luo, S.-S., Ishibashi, O., Ishikawa, G., Ishikawa, T., Katayama, A., Mishima, T., Takizawa, T., Shigihara, T., Goto, T., Izumi, A., *et al.*, 2009. Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes. *Biol Reprod* 81, 717–729.
- Lykke-Andersen, K., Gilchrist, M.J., Grabarek, J.B., Das, P., Miska, E., Zernicka-Goetz, M., 2008. Maternal Argonaute 2 Is Essential for Early Mouse Development at the Maternal-Zygotic Transition. *Mol Biol Cell* 19, 4383–4392.
- Lynam-Lennon, N., Maher, S.G., Reynolds, J.V., 2009. The roles of microRNA in cancer and apoptosis. *Biol Rev* 84, 55–71.
- Maatouk, D., Harfe, B., 2006. MicroRNAs in development. *ScientificWorldJournal* 6, 1828–1840.
- Mahdipour, M., Van Tol, H.T.A., Stout, T.A.E., Roelen, B.A.J., 2015. Validating reference microRNAs for normalizing qRT-PCR data in bovine oocytes and preimplantation embryos. *BMC Dev Biol* 15, 25.
- Mantikou, E., Youssef, M. a. F.M., Van Wely, M., Van der Veen, F., Al-Inany, H.G., Repping, S., Mastenbroek, S., 2013. Embryo culture media and IVF/ICSI success rates: a systematic review. *Hum Reprod Update* 19, 210–220.
- Maraghechi, P., Hiripi, L., Toth, G., Bontovics, B., Bosze, Z., Gocza, E., 2013. Discovery of pluripotency-associated microRNAs in rabbit preimplantation embryos and embryonic stem-like cells. *Reproduction* 145, 421–437.
- Maraghechi, Pouneh, 2013. Investigation of stem cell-specific microRNA expression as potential stem cell regulators, in rabbit embryos and embryonic stem cells. Eötvös Loránd University, Faculty of Science, Department of Genetics, Agricultural Biotechnology Center, Gödöllő, Hungary.
- Mardente, S., Mari, E., Consorti, F., Di Gioia, C., Negri, R., Etna, M., Zicari, A., Antonaci, A., 2012. HMGB1 induces the overexpression of miR-222 and miR-221 and increases growth and motility in papillary thyroid cancer cells. *Oncol Rep* 28, 2285–2289.
- Martello, G., Rosato, A., Ferrari, F., Manfrin, A., Cordenonsi, M., Dupont, S., Enzo, E., Guzzardo, V., Rondina, M., Spruce, T., *et al.*, 2010. A MicroRNA targeting dicer for metastasis control. *Cell* 141, 1195–1207.

- Martinez, N.J., Gregory, R.I., 2013. Argonaute2 expression is post-transcriptionally coupled to microRNA abundance. *RNA* 19, 605–612.
- Mathys, H., Basquin, J., Ozgur, S., Czarnocki-Cieciura, M., Bonneau, F., Aartse, A., Dziembowski, A., Nowotny, M., Conti, E., Filipowicz, W., 2014. Structural and biochemical insights to the role of the CCR4-NOT complex and DDX6 ATPase in microRNA repression. *Mol Cell* 54, 751–765.
- Maurer, R.R., 1978. *Advances in Rabbit Embryo Culture*, in: *Methods in Mammalian Reproduction*. Elsevier, 259–272.
- Mayeur, S., Silhol, M., Moitrot, E., Barbaux, S., Breton, C., Gabory, A., Vaiman, D., Dutriez-Casteloot, I., Fajardy, I., Vambergue, A., *et al.*, 2010. Placental BDNF/TrkB signaling system is modulated by fetal growth disturbances in rat and human. *Placenta* 31, 785–791.
- Mayor-Lynn, K., Toloubeydokhti, T., Cruz, A.C., Chegini, N., 2011. Expression profile of microRNAs and mRNAs in human placentas from pregnancies complicated by preeclampsia and preterm labor. *Reprod Sci* 18, 46–56.
- McCallie, B., Schoolcraft, W.B., Katz-Jaffe, M.G., 2010. Aberration of blastocyst microRNA expression is associated with human infertility. *Fertil Steril* 93, 2374–2382.
- McEvoy, J., Ulyanov, A., Brennan, R., Wu, G., Pounds, S., Zhang, J., Dyer, M.A., 2012. Analysis of MDM2 and MDM4 single nucleotide polymorphisms, mRNA splicing and protein expression in retinoblastoma. *PLoS ONE* 7, e42739.
- McEvoy, T.G., 2003. Manipulation of domestic animal embryos and implications for development. *Reprod Domest Anim* 38, 268–275.
- Megraw, M., Sethupathy, P., Corda, B., Hatzigeorgiou, A.G., 2007. miRGen: a database for the study of animal microRNA genomic organization and function. *Nucleic Acids Res* 35, D149–155.
- Melamed, Z., Levy, A., Ashwal-Fluss, R., Lev-Maor, G., Mekahel, K., Atias, N., Gilad, S., Sharan, R., Levy, C., Kadener, S., Ast, G., 2013. Alternative splicing regulates biogenesis of miRNAs located across exon-intron junctions. *Mol Cell* 50, 869–881.
- Mestdagh, P., Van Vlierberghe, P., De Weer, A., Muth, D., Westermann, F., Speleman, F., Vandesompele, J., 2009. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol* 10, R64.
- Meyer, S.U., Thirion, C., Polesskaya, A., Bauersachs, S., Kaiser, S., Krause, S., Pfaffl, M.W., 2015. TNF- $\alpha$  and IGF1 modify the microRNA signature in skeletal muscle cell differentiation. *Cell Commun Signal* 13, 4.
- Mitchell, P.S., Parkin, R. K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K.C., Allen, A., *et al.*, 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 10513–10518.
- Mitxelena, J., Apraiz, A., Vallejo-Rodríguez, J., Malumbres, M., Zubiaga, A.M., 2016. E2F7 regulates transcription and maturation of multiple microRNAs to restrain cell proliferation. *Nucleic Acids Res* 44, 5557–5570.
- Miura, K., Miura, S., Yamasaki, K., Higashijima, A., Kinoshita, A., Yoshiura, K., Masuzaki, H., 2010. Identification of pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem* 56, 1767–1771.
- Montenegro, D., Romero, R., Kim, S.S., Tarca, A. L., Draghici, S., Kusanovic, J. P., Kim, J.S., Lee, D.C., Erez, O., Gotsch, F., *et al.*, 2009. Expression patterns of microRNAs in the chorioamniotic membranes: a role for microRNAs in human pregnancy and parturition. *J Pathol* 217, 113–121.
- Morales, S., Monzo, M., Navarro, A., 2017. Epigenetic regulation mechanisms of microRNA expression. *Biomol Concepts* 8, 203–212.
- Morales-Prieto, D.M., Ospina-Prieto, S., Chaiwangyen, W., Markert, U.R., 2014. MiRNA expression analysis in JEG-3 and HTR-8 cells after LIF. *Placenta* 35, A105.
- Morales-Prieto, D.M., Ospina-Prieto, S., Chaiwangyen, W., Schoenleben, M., Markert, U.R., 2013. Pregnancy-associated miRNA-clusters. *J Reprod Immunol* 97, 51–61.
- Morales-Prieto, D.M., Chaiwangyen, W., Ospina-Prieto, S., Schneider, U., Herrmann, J., Gruhn, B., Markert, U.R., 2012. MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells. *Placenta* 33, 725–734.

- Morales-Prieto, D.M., Schleussner, E., Markert, U.R., 2011. Reduction in miR-141 is induced by leukemia inhibitory factor and inhibits proliferation in choriocarcinoma cell line JEG-3. *Am J Reprod Immunol* 66 Suppl 1, 57–62.
- Morita, S., Horii, T., Kimura, M., Goto, Y., Ochiya, T., Hatada, I., 2007. One Argonaute family member, Eif2c2 (Ago2), is essential for development and appears not to be involved in DNA methylation. *Genomics* 89, 687–696.
- Morris, R.K., Bilagi, A., Devani, P., Kilby, M.D. 2017. Association of serum PAPP-A levels in first trimester with small for gestational age and adverse pregnancy outcomes: systematic review and meta-analysis. *Prenat Diagn* 37, 253-265.
- Mouillet, J.-F., Chu, T., Hubel, C.A., Nelson, D.M., Parks, W.T., Sadovsky, Y., 2010. The levels of hypoxia-regulated microRNAs in plasma of pregnant women with fetal growth restriction. *Placenta* 31, 781–784.
- Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., Dreyfuss, G., 2002. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev* 16, 720-728.
- Munday, R., Ludwig, K., Lenzen, S., 1993. The relationship between the physicochemical properties and the biological effects of alloxan and several N-alkyl substituted alloxan derivatives. *J Endocrinol* 139, 153–163.
- Murchison, E.P., Partridge, J.F., Tam, O.H., Cheloufi, S., Hannon, G.J., 2005. Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12135–12140.
- Murphy, M.S.-Q., Casselman, R.C., Tayade, C., Smith, G.N., 2015. Differential expression of plasma microRNA in preeclamptic patients at delivery and 1 year postpartum. *Am J Obstet Gynecol* 213, 367.e1–367.e9.
- Myatt, L., Maloyan, A., 2016. Obesity and Placental Function. *Semin Reprod Med* 34, 42–49.
- Nagpal, N., Kulshreshtha, R., 2014. miR-191: an emerging player in disease biology. *Front Genet* 5, 99.
- Nagpal, N., Ahmad, H. M., Molparia, B., Kulshreshtha, R., 2013. MicroRNA-191, an estrogen-responsive microRNA, functions as an oncogenic regulator in human breast cancer. *Carcinogenesis* 34, 1889–1899.
- Nardelli, C., Granata, I., Iaffaldano, L., D'Argenio, V., Del Monaco, V., Maruotti, G.M., Omodei, D., Del Vecchio, L., Martinelli, P., Salvatore, F., *et al.*, 2017. miR-138/miR-222 Overexpression Characterizes the miRNome of Amniotic Mesenchymal Stem Cells in Obesity. *Stem Cells Dev* 26, 4–14.
- Nayak, N.R., Giudice, L.C., 2003. Comparative biology of the IGF system in endometrium, decidua, and placenta, and clinical implications for foetal growth and implantation disorders. *Placenta* 24, 281–296.
- Nelson, S.M., Freeman, D.J., Sattar, N., Lindsay, R.S., 2008. Role of adiponectin in matching of fetal and placental weight in mothers with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 31, 1123–1125.
- Newman, M.A., Hammond, S.M., 2010. Emerging paradigms of regulated microRNA processing. *Genes Dev* 24, 1086–1092.
- Ngondo, R.P., Cirera-Salinas, D., Yu, J., Wischnewski, H., Bodak, M., Vandormael-Pournin, S., Geiselman, A., Wettstein, R., Luitz, J., Cohen-Tannoudji, M., Ciaudo, C., 2018. Argonaute 2 Is Required for Extra-embryonic Endoderm Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Rep* 10, 461–476.
- Nguyen, T.A., Jo, M.H., Choi, Y.-G., Park, J., Kwon, S.C., Hohng, S., Kim, V.N., Woo, J.-S., 2015. Functional Anatomy of the Human Microprocessor. *Cell* 161, 1374–1387.
- Ni, N., Li, Qinglei, 2017. TGFβ superfamily signaling and uterine decidualization. *Reprod Biol Endocrinol* 15, 84.
- Nielsen, L.B., Wang, C., Sørensen, K., Bang-Berthelsen, C.H., Hansen, L., Andersen, M.-L.M., Hougaard, P., Juul, A., Zhang, C.-Y., Pociot, F., Mortensen, H.B., 2012. Circulating Levels of MicroRNA from Children with Newly Diagnosed Type 1 Diabetes and Healthy Controls: Evidence That miR-25 Associates to Residual Beta-Cell Function and Glycaemic Control during Disease Progression. *J Diabetes Res* 2012, 1–7.
- Noguer-Dance, M., Abu-Amero, S., Al-Khtib, M., Lefèvre, A., Coullin, P., Moore, G.E., Cavallé, J., 2010. The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta. *Hum Mol Genet* 19, 3566–3582.



- Norwitz, E.R., 2006. Defective implantation and placentation: laying the blueprint for pregnancy complications. *Reprod Biomed Online* 13, 591–599.
- Ocloń, E., Latacz, A., Zubeł-Łojek, J., Pierzchała-Koziec, K., 2016. Hyperglycemia-induced changes in miRNA expression patterns in epicardial adipose tissue of piglets. *J Endocrinol* 229, 259–266.
- Ohnishi, Y., Totoki, Y., Toyoda, A., Watanabe, T., Yamamoto, Y., Tokunaga, K., Sakaki, Y., Sasaki, H., Hohjoh, H., 2010. Small RNA class transition from siRNA/piRNA to miRNA during pre-implantation mouse development. *Nucleic Acids Res* 38, 5141–5151.
- Ortega, F. J., Mercader, J. M., Moreno-Navarrete, J.M., Rovira, O., Guerra, E., Esteve, E., Xifra, G., Martínez, C., Ricart, W., Rieusset, J. *et al.*, 2014. Profiling of Circulating MicroRNAs Reveals Common MicroRNAs Linked to Type 2 Diabetes That Change With Insulin Sensitization. *Diabetes Care* 37, 1375–1383.
- Ortega, F.J., Mercader, J.M., Catalán, V., Moreno-Navarrete, J.M., Pueyo, N., Sabater, M., Gómez-Ambrosi, J., Anglada, R., Fernández-Formoso, J.A., Ricart, W., *et al.*, 2013. Targeting the circulating microRNA signature of obesity. *Clin Chem* 59, 781–792.
- Ortega, F. J., Moreno-Navarrete, J. M., Pardo, G., Sabater, M., Hummel, M., Ferrer, A., Rodríguez-Hermosa, J.I., Ruiz, B., Ricart, W., Peral, B., Fernández-Real, J. M., 2010. MiRNA Expression Profile of Human Subcutaneous Adipose and during Adipocyte Differentiation. *PLoS ONE* 5, e9022.
- Oskowitz, A.Z., Penfornis, P., Tucker, A., Prockop, D.J., Pochampally, R., 2011. Drosha regulates hMSCs cell cycle progression through a miRNA independent mechanism. *Int J Biochem Cell Biol* 43, 1563–1572.
- Ospina-Prieto, S., Chaiwangyen, W., Herrmann, J., Groten, T., Schleussner, E., Markert, U.R., Morales-Prieto, D.M., 2016. MicroRNA-141 is upregulated in preeclamptic placentae and regulates trophoblast invasion and intercellular communication. *Transl Res* 172, 61–72.
- Ouseph, M.M., Li, J., Chen, H.-Z., Pécot, T., Wenzel, P., Thompson, J.C., Comstock, G., Chokshi, V., Byrne, M., Forde, B., *et al.*, 2012. Atypical E2F repressors and activators coordinate placental development. *Dev Cell* 22, 849–862.
- Ozsolak, F., Poling, L.L., Wang, Z., Liu, H., Liu, X.S., Roeder, R.G., Zhang, X., Song, J.S., Fisher, D.E., 2008. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev* 22, 3172–3183.
- Palazzo, A.F., Lee, E.S., 2015. Non-coding RNA: what is functional and what is junk? *Front Genet* 6, 2.
- Palini, S., Galluzzi, L., De Stefani, S., Bianchi, M., Wells, D., Magnani, M., Bulletti, C., 2013. Genomic DNA in human blastocoele fluid. *Reprod Biomed Online* 26, 603–610.
- Panwar, B., Omenn, G.S., Guan, Y., 2017. miRmine: a database of human miRNA expression profiles. *Bioinformatics* 33, 1554–1560.
- Papachristou, D.J., Korpetinou, A., Giannopoulou, E., Antonacopoulou, A.G., Papadaki, H., Grivas, P., Scopa, C.D., Kalofonos, H.P., 2011. Expression of the ribonucleases Drosha, Dicer, and Ago2 in colorectal carcinomas. *Virchows Arch* 459, 431–440.
- Paria, B. C., Song, H., Wang, X., Schmid, P.C., Krebsbach, R.J., Schmid, H.H.O., Bonner, T.I., Zimmer, A., Dey, S. K., 2001. Dysregulated Cannabinoid Signaling Disrupts Uterine Receptivity for Embryo Implantation. *J Biol Chem* 276, 20523–20528.
- Paria, B.C., Tan, J., Lubahn, D.B., Dey, S.K., Das, S.K., 1999. Uterine Decidual Response Occurs in Estrogen Receptor- $\alpha$ -Deficient Mice. *Endocrinology* 140, 2704–2710.
- Paria, B. C., Ma, W., Andrenyak, D.M., Schmid, P.C., Schmid, H.H., Moody, D.E., Deng, H., Makriyannis, A., Dey, S. K., 1998. Effects of cannabinoids on preimplantation mouse embryo development and implantation are mediated by brain-type cannabinoid receptors. *Biol Reprod* 58, 1490–1495.
- Parker, R., Sheth, U., 2007. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* 25, 635–646.
- Paroo, Z., Ye, X., Chen, S., Liu, Q., 2009. Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling. *Cell* 139, 112–122.
- Pasquinelli, A.E., 2010. Paring MiRNAs Through Pairing. *Science* 328, 1494–1495.
- Pasquinelli, A. E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degnan, B., Müller, P., *et al.*, 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408, 86–89.

- Patel, S. a. A., Bhambra, U., Charalambous, M.P., David, R.M., Edwards, R.J., Lightfoot, T., Boobis, A.R., Gooderham, N.J., 2014. Interleukin-6 mediated upregulation of CYP1B1 and CYP2E1 in colorectal cancer involves DNA methylation, miR27b and STAT3. *Br J Cancer* 111, 2287–2296.
- Pawar, S., Laws, M.J., Bagchi, I. C., Bagchi, M. K., 2015. Uterine Epithelial Estrogen Receptor- $\alpha$  Controls Decidualization via a Paracrine Mechanism. *Mol. Endocrinol.* 29, 1362–1374.
- Pendzialek, S.M., Schindler, M., Plösch, T., Gürke, J., Haucke, E., Hecht, S., Fischer, Bernd, Navarrete Santos, A., 2017. Cholesterol metabolism in rabbit blastocysts under maternal diabetes. *Reprod Fertil Dev* 29, 1921–1931.
- Peng, J., Monsivais, D., You, R., Zhong, H., Pangas, S.A., Matzuk, M.M., 2015. Uterine activin receptor-like kinase 5 is crucial for blastocyst implantation and placental development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E5098–5107.
- Peters, J., 2014. The role of genomic imprinting in biology and disease: an expanding view. *Nat Rev Genet* 15, 517–530.
- Pettitt, D.J., Knowler, W.C., 1998. Long-term effects of the intrauterine environment, birth weight, and breast-feeding in Pima Indians. *Diabetes Care* 21 Suppl 2, B138–141.
- Pineles, B.L., Romero, R., Montenegro, D., Tarca, A.L., Han, Y.M., Kim, Y.M., Draghici, S., Espinoza, J., Kusanovic, J.P., Mittal, P., *et al.*, 2007. Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 196, 261.e1–6.
- Pitt, J.A., Carney, E.W., 1999. Development of a morphologically-based scoring system for postimplantation New Zealand White rabbit embryos. *Teratology* 59, 88–101.
- Poli, M., Ori, A., Child, T., Jaroudi, S., Spath, K., Beck, M., Wells, D., 2015. Characterization and quantification of proteins secreted by single human embryos prior to implantation. *EMBO Mol Med* 7, 1465–1479.
- Polioudakis, D., Abell, N.S., Iyer, V.R., 2015. MiR-191 Regulates Primary Human Fibroblast Proliferation and Directly Targets Multiple Oncogenes. *PLoS ONE* 10, e0126535.
- Poliseno, L., Tuccoli, A., Mariani, L., Evangelista, M., Citti, L., Woods, K., Mercatanti, A., Hammond, S., Rainaldi, G., 2006. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood* 108, 3068–3071.
- Prats-Puig, A., Carreras-Badosa, G., Bassols, J., Cavelier, P., Magret, A., Sabench, C., De Zegher, F., Ibáñez, L., Feil, R., López-Bermejo, A., 2017. The placental imprinted DLK1-DIO3 domain: a new link to prenatal and postnatal growth in humans. *Am J Obstet Gynecol* 217, 350.e1–350.e13.
- Qi, J., Yu, J.-Y., Shcherbata, H.R., Mathieu, J., Wang, A.J., Seal, S., Zhou, W., Stadler, B.M., Bourgin, D., Wang, L., *et al.*, 2009. microRNAs regulate human embryonic stem cell division. *Cell Cycle* 8, 3729–3741.
- Qian, K., Hu, L., Chen, H., Li, H., Liu, N., Li, Y., Ai, J., Zhu, G., Tang, Z., Zhang, H., 2009. Hsa-miR-222 Is Involved in Differentiation of Endometrial Stromal Cells in Vitro. *Endocrinology* 150, 4734–4743.
- Rai, A., Cross, J.C., 2014. Development of the hemochorial maternal vascular spaces in the placenta through endothelial and vasculogenic mimicry. *Dev Biol* 387, 131–141.
- Ramathal, C., Wang, W., Hunt, E., Bagchi, I.C., Bagchi, M.K., 2011. Transcription factor CCAAT enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta) regulates the formation of a unique extracellular matrix that controls uterine stromal differentiation and embryo implantation. *J Biol Chem* 286, 19860–19871.
- Ramin, N., Thieme, R., Fischer, S., Schindler, M., Schmidt, T., Fischer, B., Navarrete Santos, A., 2010. Maternal diabetes impairs gastrulation and insulin and IGF-I receptor expression in rabbit blastocysts. *Endocrinology* 151, 4158–4167.
- Reed, B.G., Babayev, S.N., Chen, L.X., Carr, B.R., Word, R.A., Jimenez, P.T., 2018. Estrogen-regulated miRNA-27b is altered by bisphenol A in endometrial stromal cells. *Reproduction pii: REP-18-0041*.
- Reinhart, B.J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., Ruvkun, G., 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901–906.
- Ren, J., Jin, P., Wang, E., Marincola, F.M., Stroncek, D.F., 2009. MicroRNA and gene expression patterns in the differentiation of human embryonic stem cells. *J Transl Med* 7, 20.
- Revel, A., Achache, H., Stevens, J., Smith, Y., Reich, R., 2011. MicroRNAs are associated with human embryo implantation defects. *Hum Reprod* 26, 2830–2840.

- Robertson, E.J., 1995. Insulin-like growth factors, imprinting and embryonic growth control. *Semin Dev Biol* 6, 293–299.
- Roelen, B.A., Goumans, M.J., Zwijsen, A., Mummery, C.L., 1998. Identification of two distinct functions for TGF-beta in early mouse development. *Differentiation* 64, 19–31.
- Roggli, E., Gattesco, S., Caille, D., Briet, C., Boitard, C., Meda, P., Regazzi, R., 2012. Changes in microRNA expression contribute to pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction in prediabetic NOD mice. *Diabetes* 61, 1742–1751.
- Romundstad, L.B., Romundstad, P.R., Sunde, A., Von Düring, V., Skjaerven, R., Gunnell, D., Vatten, L.J., 2008. Effects of technology or maternal factors on perinatal outcome after assisted fertilisation: a population-based cohort study. *Lancet* 372, 737–743.
- Rosenbluth, E.M., Shelton, D.N., Wells, L.M., Sparks, A.E.T., Van Voorhis, B.J., 2014. Human embryos secrete microRNAs into culture media—a potential biomarker for implantation. *Fertil Steril* 101, 1493–1500.
- Rosenbluth, E.M., Shelton, D.N., Sparks, A.E.T., Devor, E., Christenson, L., Van Voorhis, B.J., 2013. MicroRNA expression in the human blastocyst. *Fertil Steril* 99, 855–861.e3.
- Saha, S., Choudhury, J., Ain, R., 2015. MicroRNA-141-3p and miR-200a-3p regulate insulin-like growth factor 2 during mouse placental development. *Mol Cell Endocrinol* 414, 186–193.
- Salas-Pérez, F., Codner, E., Valencia, E., Pizarro, C., Carrasco, E., Pérez-Bravo, F., 2013. MicroRNAs miR-21a and miR-93 are down regulated in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with type 1 diabetes. *Immunobiology* 218, 733–737.
- Salas-Vidal, E., Lomelí, H., 2004. Imaging filopodia dynamics in the mouse blastocyst. *Dev Biol* 265, 75–89.
- Samuel, C.A., Jack, P.M., Nathanielsz, P.W., 1975. Ultrastructural studies of the rabbit placenta in the last third of gestation. *J Reprod Fertil* 45, 9–14.
- Sanford, L.P., Ormsby, I., Gittenberger-de Groot, A.C., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G.P., Cardell, E.L., Doetschman, T., 1997. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* 124, 2659–2670.
- Sang, Q., Yao, Z., Wang, H., Feng, R., Wang, H., Zhao, X., Xing, Q., Jin, L., He, L., Wu, L., *et al.*, 2013. Identification of MicroRNAs in Human Follicular Fluid: Characterization of MicroRNAs That Govern Steroidogenesis in Vitro and Are Associated With Polycystic Ovary Syndrome in Vivo. *J Clin Endocr Metab* 98, 3068–3079.
- Santonocito, M., Vento, M., Guglielmino, M.R., Battaglia, R., Wahlgren, J., Ragusa, M., Barbagallo, D., Borzì, P., Rizzari, S., Maugeri, M., *et al.*, 2014. Molecular characterization of exosomes and their microRNA cargo in human follicular fluid: bioinformatic analysis reveals that exosomal microRNAs control pathways involved in follicular maturation. *Fertil Steril* 102, 1751–1761.e1.
- Santos, M.A., Kuijk, E.W., Macklon, N.S., 2010. The impact of ovarian stimulation for IVF on the developing embryo. *Reproduction* 139, 23–34.
- Savarese, F., Dávila, A., Nechanitzky, R., De La Rosa-Velazquez, I., Pereira, C.F., Engelke, R., Takahashi, K., Jenuwein, T., Kohwi-Shigematsu, T., Fisher, A.G., Grosschedl, R., 2009. *Satb1* and *Satb2* regulate embryonic stem cell differentiation and *Nanog* expression. *Genes Dev* 23, 2625–2638.
- Schindler, M., Pendzialek, M., Grybel, K.J., Seeling, T., Gürke, J., Fischer, B., Navarrete Santos, Anne, 2017. Adiponectin stimulates lipid metabolism via AMPK in rabbit blastocysts. *Hum Reprod* 32, 1382–1392.
- Schindler, M., Pendzialek, M., Navarrete Santos, A., Plösch, T., Seyring, S., Gürke, J., Haucke, E., Knelangen, J.M., Fischer, B., Navarrete Santos, A., 2014. Maternal diabetes leads to unphysiological high lipid accumulation in rabbit preimplantation embryos. *Endocrinology* 155, 1498–1509.
- Schindler, M., Fischer, S., Thieme, R., Fischer, B., Navarrete Santos, A., 2013. cAMP-Responsive Element Binding Protein: A Vital Link in Embryonic Hormonal Adaptation. *Endocrinology* 154, 2208–2221.
- Schmid, P.C., Paria, B. C., Krebsbach, R.J., Schmid, H.H., Dey, S. K., 1997. Changes in anandamide levels in mouse uterus are associated with uterine receptivity for embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4188–4192.

- Scholze, J., 2016. Einfluss von Insulin auf die Expression von miR-27b und miR-191 in der humanen Trophoblastenzelllinie AC-1M88.
- Sebastiani, G., Guarino, E., Grieco, G.E., Formichi, C., Delli Poggi, C., Ceccarelli, E., Dotta, F., 2017. Circulating microRNA (miRNA) Expression Profiling in Plasma of Patients with Gestational Diabetes Mellitus Reveals Upregulation of miRNA miR-330-3p. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8, 345.
- Seitz, H., Royo, H., Bortolin, M.-L., Lin, S.-P., Ferguson-Smith, A.C., Cavallé, J., 2004. A large imprinted microRNA gene cluster at the mouse *Dlk1-Gtl2* domain. *Genome Res* 14, 1741–1748.
- Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., Rajewsky, N., 2008. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455, 58–63.
- Seong, Y., Lim, D.-H., Kim, A., Seo, J.H., Lee, Y.S., Song, H., Kwon, Y.-S., 2014. Global identification of target recognition and cleavage by the Microprocessor in human ES cells. *Nucleic Acids Res* 42, 12806–12821.
- Sephton, C.F., Good, S.K., Atkin, S., Dewey, C.M., Mayer, P., Herz, J., Yu, G., 2010. TDP-43 Is a Developmentally Regulated Protein Essential for Early Embryonic Development. *J Biol Chem* 285, 6826–6834.
- Sha, A.-G., Liu, J.-L., Jiang, X.-M., Ren, J.-Z., Ma, C.-H., Lei, W., Su, R.-W., Yang, Z.-M., 2011. Genome-wide identification of micro-ribonucleic acids associated with human endometrial receptivity in natural and stimulated cycles by deep sequencing. *Fertil Steril* 96, 150–155.e5.
- Shapiro, J.S., Langlois, R.A., Pham, A.M., Tenover, B.R., 2012. Evidence for a cytoplasmic microprocessor of pri-miRNAs. *RNA* 18, 1338–1346.
- Sheikh, A.M., Small, H.Y., Currie, G., Delles, C., 2016. Systematic Review of MicroRNA Expression in Pre-Eclampsia Identifies a Number of Common Pathways Associated with the Disease. *PLoS ONE* 11, e0160808.
- Shekar, P.C., Naim, A., Sarathi, D.P., Kumar, S., 2011. Argonaute-2-null embryonic stem cells are retarded in self-renewal and differentiation. *J Biosciences* 36, 649–657.
- Shi, C., Shen, H., Fan, L.-J., Guan, J., Zheng, X.-B., Chen, X., Liang, R., Zhang, X.-W., Cui, Q.-H., Sun, K.-K., *et al.*, 2017. Endometrial MicroRNA Signature during the Window of Implantation Changed in Patients with Repeated Implantation Failure. *Chin Med J* 130, 566–573.
- Shi, Z., Zhao, C., Guo, X., Ding, H., Cui, Y., Shen, R., Liu, J., 2014. Differential Expression of MicroRNAs in Omental Adipose Tissue From Gestational Diabetes Mellitus Subjects Reveals miR-222 as a Regulator of ER $\alpha$  Expression in Estrogen-Induced Insulin Resistance. *Endocrinology* 155, 1982–1990.
- Shiefa, S., Amargandhi, M., Bhupendra, J., Moulali, S., Kristine, T., 2013. First Trimester Maternal Serum Screening Using Biochemical Markers PAPP-A and Free  $\beta$ -hCG for Down Syndrome, Patau Syndrome and Edward Syndrome. *Indian J Clin Biochem* 28, 3–12.
- Silen, W., Machen, T.E., Forte, J.G., 1975. Acid-base balance in amphibian gastric mucosa. *Am J Physiol* 229, 721–730.
- Simón, C., Gimeno, M.J., Mercader, A., Francés, A., Garcia Velasco, J., Remohí, J., Polan, M.L., Pellicer, A., 1996. Cytokines-adhesion molecules-invasive proteinases. The missing paracrine/autocrine link in embryonic implantation? *Mol Hum Reprod* 2, 405–424.
- Siomi, H., Siomi, M.C., 2010. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Mol Cell* 38, 323–332.
- Slack, F. J., Basson, M., Liu, Z., Ambros, V., Horvitz, H.R., Ruvkun, G., 2000. The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the *LIN-29* transcription factor. *Mol Cell* 5, 659–669.
- Smibert, P., Yang, Jr-Shiuan, Azzam, G., Liu, J.-L., Lai, E.C., 2013. Homeostatic control of Argonaute stability by microRNA availability. *Nat Struct Mol Biol* 20, 789–795.
- Snyder, C.M., Rice, A.L., Estrella, N.L., Held, A., Kandarian, S.C., Naya, F.J., 2013. MEF2A regulates the *Gtl2-Dio3* microRNA mega-cluster to modulate WNT signaling in skeletal muscle regeneration. *Development* 140, 31–42.

- Sohel, M.M.H., Hoelker, M., Noferesti, S.S., Salilew-Wondim, D., Tholen, E., Looft, C., Rings, F., Uddin, M.J., Spencer, T.E., Schellander, K., Tesfaye, D., 2013. Exosomal and Non-Exosomal Transport of Extra-Cellular microRNAs in Follicular Fluid: Implications for Bovine Oocyte Developmental Competence. *PLoS ONE* 8, e78505.
- Sonek, J., Nicolaidis, K., 2010. Additional first-trimester ultrasound markers. *Clin Lab Med* 30, 573–592.
- Song, C., Yao, J., Cao, C., Liang, X., Huang, J., Han, Z., Zhang, Y., Qin, G., Tao, C., Li, C., *et al.*, 2016. PPAR $\gamma$  is regulated by miR-27b-3p negatively and plays an important role in porcine oocyte maturation. *Biochem Biophys Res Commun* 479, 224–230.
- Song, G., Wang, L., 2009. A conserved gene structure and expression regulation of miR-433 and miR-127 in mammals. *PLoS ONE* 4, e7829.
- Song, G., Wang, L., 2008. Transcriptional mechanism for the paired miR-433 and miR-127 genes by nuclear receptors SHP and ERR $\gamma$ . *Nucleic Acids Res* 36, 5727–5735.
- Sperber, H., Beem, A., Shannon, S., Jones, R., Banik, P., Chen, Y., Ku, S., Varani, G., Yao, S., Ruohola-Baker, H., 2014. miRNA sensitivity to Drosha levels correlates with pre-miRNA secondary structure. *RNA* 20, 621–631.
- Spitalieri, P., Cortese, G., Pietropolli, A., Filareto, A., Dolci, S., Klinger, F.G., Giardina, E., Di Cesare, S., Bernardini, L., Lauro, D., *et al.*, 2009. Identification of Multipotent Cytotrophoblast Cells from Human First Trimester Chorionic Villi. *Cloning Stem Cells* 11, 535–556.
- Spruce, T., Pernaute, B., Di-Gregorio, A., Cobb, B.S., Merkenschlager, M., Manzanares, M., Rodriguez, T.A., 2010. An early developmental role for miRNAs in the maintenance of extraembryonic stem cells in the mouse embryo. *Dev Cell* 19, 207–219.
- Stein, J.M., 1975. The effect of adrenaline and of alpha- and beta-adrenergic blocking agents on ATP concentration and on incorporation of  $^{32}\text{P}$  into ATP in rat fat cells. *Biochem Pharmacol* 24, 1659–1662.
- Stewart, C.L., Kaspar, P., Brunet, L.J., Bhatt, H., Gadi, I., Köntgen, F., Abbondanzo, S.J., 1992. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 359, 76–79.
- Stowe, H.M., Curry, E., Calcaterra, S.M., Krisher, R.L., Paczkowski, M., Pratt, S.L., 2012. Cloning and expression of porcine Dicer and the impact of developmental stage and culture conditions on MicroRNA expression in porcine embryos. *Gene* 501, 198–205.
- Su, R.-W., Lei, W., Liu, J.-L., Zhang, Z.-R., Jia, B., Feng, X.-H., Ren, G., Hu, S.-J., Yang, Z.-M., 2010. The Integrative Analysis of microRNA and mRNA Expression in Mouse Uterus under Delayed Implantation and Activation. *PLoS ONE* 5, e15513.
- Su, H., Trombly, M.I., Chen, J., Wang, X., 2009. Essential and overlapping functions for mammalian Argonautes in microRNA silencing. *Genes Dev* 23, 304–317.
- Suarez, Y., Fernandez-Hernando, C., Yu, J., Gerber, S.A., Harrison, K.D., Pober, J.S., Iruela-Arispe, M.L., Merkenschlager, M., Sessa, W.C., 2008. Dicer-dependent endothelial microRNAs are necessary for postnatal angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14082–14087.
- Suh, N., Blelloch, R., 2011. Small RNAs in early mammalian development: from gametes to gastrulation. *Development* 138, 1653–1661.
- Suh, N., Baehner, L., Moltzahn, F., Melton, C., Shenoy, A., Chen, J., Blelloch, R., 2010. MicroRNA Function Is Globally Suppressed in Mouse Oocytes and Early Embryos. *Curr Biol* 20, 271–277.
- Suh, M.-R., Lee, Y., Kim, J.Y., Kim, S.-K., Moon, S.-H., Lee, J.Y., Cha, K.-Y., Chung, H.M., Yoon, H.S., Moon, S.Y., *et al.*, 2004. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol* 270, 488–498.
- Sun, J., Chen, J., Cao, J., Li, T., Zhuang, S., Jiang, X., 2016. IL-1 $\beta$ -stimulated  $\beta$ -catenin up-regulation promotes angiogenesis in human lung-derived mesenchymal stromal cells through a NF- $\kappa$ B-dependent microRNA-433 induction. *Oncotarget* 7, 59429–59440.
- Sun, Yi, Zhang, B., Cheng, J., Wu, Yi, Xing, F., Wang, Yingyi, Wang, Qingying, Qiu, J., 2014. MicroRNA-222 promotes the proliferation and migration of cervical cancer cells. *Clin Invest Med* 37, E131.
- Sun, X., Dey, S.K., 2012. Endocannabinoid signaling in female reproduction. *ACS Chem Neurosci* 3, 349–355.

- Sun, X., Xie, H., Yang, J., Wang, H., Bradshaw, H.B., Dey, S.K., 2010. Endocannabinoid signaling directs differentiation of trophoblast cell lineages and placentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 16887–16892.
- Sutcliffe, A.G., Ludwig, M., 2007. Outcome of assisted reproduction. *Lancet* 370, 351–359.
- Suzuki, A., De la Pompa, J.L., Stambolic, V., Elia, A.J., Sasaki, T., Del Barco Barrantes, I., Ho, A., Wakeham, A., Itie, A., Khoo, W., *et al.*, 1998. High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Curr Biol* 8, 1169–1178.
- Suzuki, H.I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., Miyazono, K., 2009. Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* 460, 529–533.
- Taga, T., Kishimoto, T., 1997. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 15, 797–819.
- Takada, S., Berezikov, E., Choi, Y.L., Yamashita, Y., Mano, H., 2009. Potential role of miR-29b in modulation of Dnmt3a and Dnmt3b expression in primordial germ cells of female mouse embryos. *RNA* 15, 1507–1514.
- Takahashi, Y., Takahashi, M., Carpino, N., Jou, S.-T., Chao, J.-R., Tanaka, S., Shigeyoshi, Y., Parganas, E., Ihle, J.N., 2008. Leukemia Inhibitory Factor Regulates Trophoblast Giant Cell Differentiation via Janus Kinase 1-Signal Transducer and Activator of Transcription 3-Suppressor of Cytokine Signaling 3 Pathway. *Mol Endocrinol* 22, 1673–1681.
- Tang, X., Lin, J., Wang, G., Lu, J., 2017. MicroRNA-433-3p promotes osteoblast differentiation through targeting DKK1 expression. *PLoS ONE* 12, e0179860.
- Tang, Q., Wu, W., Xu, X., Huang, L., Gao, Q., Chen, H., Sun, H., Xia, Y., Sha, J., Wang, X., *et al.*, 2013a. miR-141 contributes to fetal growth restriction by regulating PLAG1 expression. *PLoS ONE* 8, e58737.
- Tang, X., Wen, S., Zheng, D., Tucker, L., Cao, L., Pantazatos, D., Moss, S.F., Ramratnam, B., 2013b. Acetylation of drosha on the N-terminus inhibits its degradation by ubiquitination. *PLoS ONE* 8, e72503.
- Tang, X., Li, M., Tucker, L., Ramratnam, B., 2011. Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 $\beta$ ) phosphorylates the RNAase III enzyme Drosha at S300 and S302. *PLoS ONE* 6, e20391.
- Tang, X., Zhang, Y., Tucker, L., Ramratnam, B., 2010. Phosphorylation of the RNase III enzyme Drosha at Serine300 or Serine302 is required for its nuclear localization. *Nucleic Acids Res* 38, 6610–6619.
- Tang, X., Muniappan, L., Tang, G., Ozcan, S., 2009. Identification of glucose-regulated miRNAs from pancreatic  $\beta$  cells reveals a role for miR-30d in insulin transcription. *RNA* 15, 287–293.
- Tang, F., Kaneda, M., O'Carroll, D., Hajkova, P., Barton, S.C., Sun, Y.A., Lee, C., Tarakhovskiy, A., Lao, K., Surani, M.A., 2007. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. *Genes Dev* 21, 644–648.
- Tao, W., Dong, X., Kong, G., Fang, P., Huang, X., Bo, P., 2016. Elevated Circulating hsa-miR-106b, hsa-miR-26a, and hsa-miR-29b in Type 2 Diabetes Mellitus with Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome. *Gastroent Res Pract* 2016, 1–9.
- Tao, J., Zhi, X., Zhang, X., Fu, M., Huang, H., Fan, Y., Guan, W., Zou, C., 2015. miR-27b-3p suppresses cell proliferation through targeting receptor tyrosine kinase like orphan receptor 1 in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 34.
- Tarentino, A.L., Maley, F., 1975. A comparison of the substrate specificities of endo-beta-N-acetylglucosaminidases from *Streptomyces griseus* and *Diplococcus Pneumoniae*. *Biochem Biophys Res Commun* 67, 455–462.
- Tarver, J.E., Dos Reis, M., Mirarab, S., Moran, R.J., Parker, S., O'Reilly, J.E., King, B.L., O'Connell, M.J., Asher, R.J., Warnow, T., *et al.*, 2016. The Interrelationships of Placental Mammals and the Limits of Phylogenetic Inference. *Genome Biol Evol* 8, 330–344.
- Taylor, A.H., Finney, M., Lam, P.M., Konje, J.C., 2011. Modulation of the endocannabinoid system in viable and non-viable first trimester pregnancies by pregnancy-related hormones. *Reprod Biol Endocrinol* 9, 152.
- Tesfaye, D., Worku, D., Rings, F., Phatsara, C., Tholen, E., Schellander, K., Hoelker, M., 2009. Identification and expression profiling of microRNAs during bovine oocyte maturation using heterologous approach. *Mol Reprod Dev* 76, 665–677.

- Thieme, R., Ramin, N., Fischer, S., Püschel, B., Fischer, B., Navarrete Santos, A., 2012a. Gastrulation in rabbit blastocysts depends on insulin and insulin-like-growth-factor 1. *Mol Cell Endocrinol* 348, 112–119.
- Thieme, R., Schindler, M., Ramin, N., Fischer, S., Mühleck, B., Fischer, B., Navarrete Santos, A., 2012b. Insulin growth factor adjustment in preimplantation rabbit blastocysts and uterine tissues in response to maternal type 1 diabetes. *Mol Cell Endocrinol* 358, 96–103.
- Thum, T., Catalucci, D., Bauersachs, J., 2008. MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. *Cardiovasc Res* 79, 562–570.
- Tian, G., Yin, X., Luo, H., Xu, X.H., Bolund, L., Zhang, X.Q., 2010. Sequencing bias: comparison of different protocols of MicroRNA library construction. *BMC Biotechnol* 10, 64.
- Tobler, K.J., Zhao, Y., Ross, R., Benner, A.T., Xu, X., Du, L., Broman, K., Thrift, K., Brezina, P.R., Kearns, W.G., 2015. Blastocoel fluid from differentiated blastocysts harbors embryonic genomic material capable of a whole-genome deoxyribonucleic acid amplification and comprehensive chromosome microarray analysis. *Fertil Steril* 104, 418–425.
- Tomic, D., Frech, M., Babus, J., Symonds, D., Furth, P., Koos, R., Flaws, J., 2007. Effects of ER $\alpha$  overexpression on female reproduction in mice. *Reprod Toxicol* 23, 317–325.
- Tominaga, Y., Li, Cuiling, Wang, R.-H., Deng, C.-X., 2006. Murine Wee1 plays a critical role in cell cycle regulation and pre-implantation stages of embryonic development. *Int J Biol Sci* 2, 161–170.
- Totary-Jain, H., Sanoudou, D., Ben-Dov, I.Z., Dautriche, C.N., Guarnieri, P., Marx, S.O., Tuschl, T., Marks, A.R., 2013. Reprogramming of the microRNA transcriptome mediates resistance to rapamycin. *J Biol Chem* 288, 6034–6044.
- Trabucco, E., Acone, G., Marenga, A., Pierantoni, R., Cacciola, G., Chioccarelli, T., Mackie, K., Fasano, S., Colacurci, N., Meccariello, R., *et al.*, 2009. Endocannabinoid system in first trimester placenta: low FAAH and high CB1 expression characterize spontaneous miscarriage. *Placenta* 30, 516–522.
- Tsutsumi, A., Kawamata, T., Izumi, N., Seitz, H., Tomari, Y., 2011. Recognition of the pre-miRNA structure by *Drosophila* Dicer-1. *Nat Struct Mol Biol* 18, 1153–1158.
- Tu, J., Ng, S.H., Shui Luk, A.C., Liao, J., Jiang, X., Feng, B., Lun Mak, K.K., Rennert, O.M., Chan, W.-Y., Lee, T.-L., 2015. MicroRNA-29b/Tet1 regulatory axis epigenetically modulates mesendoderm differentiation in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 43, 7805–7822.
- Turchinovich, A., Samatov, T.R., Tonevitsky, A.G., Burwinkel, B., 2013. Circulating miRNAs: cell–cell communication function? *Front Genet* 4.
- Turchinovich, Andrey, Burwinkel, Barbara, 2012. Distinct AGO1 and AGO2 associated miRNA profiles in human cells and blood plasma. *RNA Biol* 9, 1066–1075.
- Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., Burwinkel, B., 2011. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res* 39, 7223–7233.
- Vambergue, A., Fajardy, I., 2011. Consequences of gestational and pregestational diabetes on placental function and birth weight. *World J Diabetes* 2, 196–203.
- Van Oudenhove, J.J., Grandy, R.A., Ghule, P.N., Del Rio, R., Lian, J.B., Stein, J.L., Zaidi, S.K., Stein, G.S., 2016. Lineage-Specific Early Differentiation of Human Embryonic Stem Cells Requires a G2 Cell Cycle Pause. *Stem Cells* 34, 1765–1775.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, RESEARCH0034.
- Vandewalle, C., Van Roy, F., Berx, G., 2009. The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease. *Cell Mol Life Sci* 66, 773–787.
- Vaughan, O.R., Sferruzzi-Perri, A.N., Coan, P.M., Fowden, A.L., 2011. Environmental regulation of placental phenotype: implications for fetal growth. *Reprod. Fertil. Dev.* 24, 80–96.
- Vialard, F., Boitrelle, F., Molina-Gomes, D., Selva, J., 2011. Predisposition to aneuploidy in the oocyte. *Cytogenet Genome Res* 133, 127–135.
- Viebahn, C., Mayer, B., Miething, A., 1995. Morphology of incipient mesoderm formation in the rabbit embryo: a light- and retrospective electron-microscopic study. *Acta Anat (Basel)* 154, 99–110.

- Vilches, J., Pulido, A., Hernández-Torres, F., Franco, D., Aránega, A., 2014. miR-27b and miR-23b Modulate Cardiomyocyte Differentiation from Mouse Embryonic Stem Cells. *J Cardiovasc Dev Dis* 1, 41–51.
- Vilella, F., Moreno-Moya, J. M., Balaguer, N., Grasso, A., Herrero, M., Martinez, S., Marcilla, A., Simon, C., 2015. Hsa-miR-30d, secreted by the human endometrium, is taken up by the pre-implantation embryo and might modify its transcriptome. *Development* 142, 3210–3221.
- Vinketova, K., Mourdjeva, M., Oreshkova, T., 2016. Human Decidual Stromal Cells as a Component of the Implantation Niche and a Modulator of Maternal Immunity. *J Pregnancy* 2016, 1–17.
- Vohr, B.R., McGarvey, S.T., Tucker, R., 1999. Effects of maternal gestational diabetes on offspring adiposity at 4-7 years of age. *Diabetes Care* 22, 1284–1291.
- Voloboueva, L.A., Sun, X., Xu, L., Ouyang, Y.-B., Giffard, R.G., 2017. Distinct effects of miR-210 reduction on neurogenesis: increased neuronal survival of inflammation but reduced proliferation associated with mitochondrial enhancement. *J Neurosci* 1777–16.
- Vrba, L., Jensen, T.J., Garbe, J.C., Heimark, R.L., Cress, A.E., Dickinson, S., Stampfer, M.R., Futscher, B.W., 2010. Role for DNA methylation in the regulation of miR-200c and miR-141 expression in normal and cancer cells. *PLoS ONE* 5, e8697.
- Wander, P.L., Boyko, E.J., Hevner, K., Parikh, V.J., Tadesse, M.G., Sorensen, T.K., Williams, M.A., Enquobahrie, D.A., 2017. Circulating early- and mid-pregnancy microRNAs and risk of gestational diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 132, 1–9.
- Wang, C., Schmich, F., Srivatsa, S., Weidner, J., Beerenwinkel, N., Spang, A., 2018. Context-dependent deposition and regulation of mRNAs in P-bodies. *elife* 7.
- Wang, M., 2017. miR-433 protects pancreatic  $\beta$  cell growth in high-glucose conditions. *Mol Med Rep* 16, 2604–2610.
- Wang, Y., Luo, J., Zhang, H., Lu, J., 2016a. microRNAs in the Same Clusters Evolve to Coordinately Regulate Functionally Related Genes. *Mol Biol Evol* 33, 2232–2247.
- Wang, Y., Lv, Y., Gao, S., Zhang, Y., Sun, J., Gong, C., Chen, X., Li, G., 2016b. MicroRNA Profiles in Spontaneous Decidualized Menstrual Endometrium and Early Pregnancy Decidua with Successfully Implanted Embryos. *PLoS ONE* 11, e0143116.
- Wang, J., Liu, S., Qin, H.-M., Zhao, Y., Wang, X.-Q., Yan, Q., 2014a. Pregnancy-associated plasma protein A up-regulated by progesterone promotes adhesion and proliferation of trophoblastic cells. *Int J Clin Exp Pathol* 7, 1427–1437.
- Wang, X., Sundquist, J., Zöller, B., Memon, A.A., Palmér, K., Sundquist, K., Bennet, L., 2014b. Determination of 14 Circulating microRNAs in Swedes and Iraqis with and without Diabetes Mellitus Type 2. *PLoS ONE* 9, e86792.
- Wang, G., Guo, X., Hong, W., Liu, Q., Wei, T., Lu, C., Gao, L., Ye, D., Zhou, Y., Chen, J., *et al.*, 2013a. Critical regulation of miR-200/ZEB2 pathway in Oct4/Sox2-induced mesenchymal-to-epithelial transition and induced pluripotent stem cell generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 2858–2863.
- Wang, Y., Dai, W., Chu, X., Yang, B., Zhao, M., Sun, Y., 2013b. Metformin inhibits lung cancer cells proliferation through repressing microRNA-222. *Biotechnol Lett* 35, 2013–2019.
- Wang, H., Xie, H., Dey, S.K., 2008. Loss of cannabinoid receptor CB1 induces preterm birth. *PLoS ONE* 3, e3320.
- Wang, Y., Medvid, R., Melton, C., Jaenisch, R., Blelloch, R., 2007. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nature Genet* 39, 380–385.
- Watson, A., Natale, D., Barcroft, L., 2004. Molecular regulation of blastocyst formation. *Anim Reprod Sci* 82-83, 583–592.
- Weber, J.A., Baxter, D.H., Zhang, S., Huang, D.Y., How Huang, K., Jen Lee, M., Galas, D.J., Wang, K., 2010. The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clin Chem* 56, 1733–1741.
- Wheeler, B.M., Heimberg, A.M., Moy, V.N., Sperling, E.A., Holstein, T.W., Heber, S., Peterson, K.J., 2009. The deep evolution of metazoan microRNAs. *Evol Dev* 11, 50–68.
- Whitehead, C.L., Teh, W.T., Walker, S.P., Leung, C., Larmour, L., Tong, S., 2013. Circulating MicroRNAs in Maternal Blood as Potential Biomarkers for Fetal Hypoxia In-Utero. *PLoS ONE* 8, e78487.



- Wightman, B., Ha, I., Ruvkun, G., 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855–862.
- Winter, J., Diederichs, S., 2011. Argonaute proteins regulate microRNA stability: Increased microRNA abundance by Argonaute proteins is due to microRNA stabilization. *RNA Biol* 8, 1149–1157.
- Winterbourn, C.C., Munday, R., 1989. Glutathione-mediated redox cycling of alloxan. Mechanisms of superoxide dismutase inhibition and of metal-catalyzed OH $\cdot$  formation. *Biochem Pharmacol* 38, 271–277.
- Wong, N., Wang, X., 2015. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res* 43, D146–152.
- World Health Organization, 1999. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications : report of a WHO consultation. Part 1, Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva.
- Wu, L.-S., Cheng, W.-C., Hou, S.-C., Yan, Y.-T., Jiang, S.-T., Shen, C.-K.J., 2009. TDP-43, a neuro-pathosignature factor, is essential for early mouse embryogenesis. *Genesis* 48, 56-62.
- Xie, H., Lim, B., Lodish, H.F., 2009. MicroRNAs Induced During Adipogenesis that Accelerate Fat Cell Development Are Downregulated in Obesity. *Diabetes* 58, 1050–1057.
- Xin, Z., Yi, H., Kai-Zhuo, W., Ping, W., Tan, Y., Dun-Xue, C., Jun-Zhi, Z., Tao, Chen, 2015. The Expressional Characterization Of Mir-222 In Mandarin Fish (*Siniperca Chuatsi*). *Acta Hydrobiol Sin* 315–320.
- Yan, J., Guo, D., Yang, S., Sun, H., Wu, B., Zhou, D., 2016. Inhibition of miR-222-3p activity promoted osteogenic differentiation of hBMSCs by regulating Smad5-RUNX2 signal axis. *Biochem Biophys Res Commun* 470, 498–503.
- Yang, Q., Cui, Y., Luo, F., Liu, X., Wang, Q., Bai, J., Dong, F., Sun, Q., Lu, L., Xu, H., *et al.*, 2018. MicroRNA-191, acting via the IRS-1/Akt signaling pathway, is involved in the hepatic insulin resistance induced by cigarette smoke extract. *Environ Sci Pollut Res Int* 25, 22400–22407.
- Yang, Y., Pan, Q., Sun, B., Yang, R., Fang, X., Liu, X., Yu, X., Zhao, Z., 2016. MiR-29b Targets LPL and TDG Genes and Regulates Apoptosis and Triglyceride Production in MECs. *DNA Cell Biol* 35, 758–765.
- Yang, Q., Li, W., She, H., Dou, J., Duong, D.M., Du, Y., Yang, S.-H., Seyfried, N.T., Fu, H., Gao, G., Mao, Z., 2015. Stress induces p38 MAPK-mediated phosphorylation and inhibition of Drosha-dependent cell survival. *Mol Cell* 57, 721–734.
- Yang, Z., Chen, H., Si, H., Li, X., Ding, X., Sheng, Q., Chen, P., Zhang, H., 2014. Serum miR-23a, a potential biomarker for diagnosis of pre-diabetes and type 2 diabetes. *Acta Diabetol* 51, 823–831.
- Yang, J.-S., Phillips, M.D., Betel, D., Mu, P., Ventura, A., Siepel, A.C., Chen, K.C., Lai, E. C., 2011. Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA\* species. *RNA* 17, 312–326.
- Yang, Z., Wang, L., 2011. Regulation of microRNA expression and function by nuclear receptor signaling. *Cell Biosci* 1, 31.
- Yang, Y., Bai, W., Zhang, L., Yin, G., Wang, X., Wang, J., Zhao, H., Han, Y., Yao, Y.-Q., 2008. Determination of microRNAs in mouse preimplantation embryos by microarray. *Dev Dyn* 237, 2315–2327.
- Yang, Z.-M., Le, S.-P., Chen, D.-B., Yasukawa, K., Harper, M.J.K., 1995. Expression patterns of leukaemia inhibitory factor receptor (LIFR) and the gp130 receptor component in rabbit uterus during early pregnancy. *Reproduction* 103, 249–255.
- Yan-Jun, L., Tsushima, T., Minei, S., Sanaka, M., Nagashima, T., Yanagisawa, K., Omori, Y., 1996. Insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins (IGFBP-1, -2 and -3) in diabetic pregnancy: relationship to macrosomia. *Endocr J* 43, 221–231.
- Yates, A., Akanni, W., Amode, M.R., Barrell, D., Billis, K., Carvalho-Silva, D., Cummins, C., Clapham, P., Fitzgerald, S., Gil, L., *et al.*, 2016. Ensembl 2016. *Nucleic Acids Res* 44, D710–716.
- Ye, P., Liu, Y., Chen, C., Tang, F., Wu, Q., Wang, X., Liu, C.-G., Liu, X., Liu, R., Liu, Y., Zheng, P., 2015. An mTORC1-Mdm2-Drosha axis for miRNA biogenesis in response to glucose- and amino acid-deprivation. *Mol Cell* 57, 708–720.
- Yeom, K.-H., Lee, Y., Han, J., Suh, M.R., Kim, V.N., 2006. Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Res* 34, 4622–4629.

- Yi, R., Doehle, B.P., Qin, Y., Macara, I.G., Cullen, B.R., 2005. Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs. *RNA* 11, 220–226.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., Cullen, B.R., 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17, 3011–3016. doi:10.1101/gad.1158803
- Yu, L., Zeng, X.-L., Cheng, M.-L., Yang, G.-Z., Wang, B., Xiao, Z.-W., Luo, X., Zhang, B.-F., Xiao, D.-W., Zhang, S., *et al.*, 2017a. Quantitative assessment of the effect of pre-gestational diabetes and risk of adverse maternal, perinatal and neonatal outcomes. *Oncotarget* 8, 61048–61056.
- Yu, M., Wang, J., Liu, S., Wang, X., Yan, Q., 2017b. Novel function of pregnancy-associated plasma protein A: promotes endometrium receptivity by up-regulating N-fucosylation. *Sci Rep* 7, 5315.
- Yu, J., Kong, X., Liu, J., Lv, Y., Sheng, Y., Lv, S., Di, W., Wang, C., Zhang, F., Ding, G., 2014. Expression profiling of PPAR $\gamma$ -regulated microRNAs in human subcutaneous and visceral adipogenesis in both genders. *Endocrinology* 155, 2155–2165.
- Yuan, H., Christina, V.R., Guo, C., Chu, Y., Liu, R., Yan, Z., 2016. Involvement of MicroRNA-210 Demethylation in Steroid-associated Osteonecrosis of the Femoral Head. *Sci Rep* 6, 20046.
- Yuan, X., Liu, C., Yang, P., He, S., Liao, Q., Kang, S., Zhao, Y., 2009. Clustered microRNAs' coordination in regulating protein-protein interaction network. *BMC Syst Biol* 3, 65.
- Yue, X., Wu, L., Hu, W., 2015. The regulation of leukemia inhibitory factor. *Cancer Cell Microenviron* 2.
- Zampetaki, A., Kiechl, S., Drozdov, I., Willeit, P., Mayr, U., Prokopi, M., Mayr, A., Weger, S., Oberhollenzer, F., Bonora, E., *et al.*, 2010. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res* 107, 810–817.
- Zekri, L., Kuzuoğlu-Öztürk, D., Izaurralde, E., 2013. GW182 proteins cause PABP dissociation from silenced miRNA targets in the absence of deadenylation. *EMBO J* 32, 1052-1065.
- Zeng, L., He, X., Wang, Y., Tang, Y., Zheng, C., Cai, H., Liu, J., Wang, Y., Fu, Y., Yang, G.-Y., 2014. MicroRNA-210 overexpression induces angiogenesis and neurogenesis in the normal adult mouse brain. *Gene Ther* 21, 37–43.
- Zeng, Y., Sankala, H., Zhang, X., Graves, P.R., 2008. Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies. *Biochem J* 413, 429–436.
- Zeng, Y., Cullen, B.R., 2004. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res* 32, 4776–4785.
- Zhang, X., Wu, M., Chong, Q.-Y., Zhang, W., Qian, P., Yan, H., Qian, W., Zhang, M., Lobie, P.E., Zhu, T., 2018. Amplification of hsa-miR-191/425 locus promotes breast cancer proliferation and metastasis by targeting DICER1. *Carcinogenesis* 39, 1506–1516.
- Zhang, C., Long, X., Ding, Y., Chen, X., He, J., Liu, S., Geng, Y., Wang, Y., Liu, X., 2016. Expression of DROSHA in the Uterus of Mice in Early Pregnancy and Its Potential Significance During Embryo Implantation. *Reprod Sci* 23, 154–162.
- Zhang, J., Wang, Y., Liu, X., Jiang, S., Zhao, C., Shen, R., Guo, X., Ling, X., Liu, C., 2015. Expression and Potential Role of microRNA-29b in Mouse Early Embryo Development. *Cell Physiol Biochem* 35, 1178–1187.
- Zhang, Y., Fei, M., Xue, G., Zhou, Q., Jia, Y., Li, L., Xin, H., Sun, S., 2012. Elevated levels of hypoxia-inducible microRNA-210 in pre-eclampsia: new insights into molecular mechanisms for the disease. *J Cell Mol Med* 16, 249–259.
- Zhang, H., Kolb, F.A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., Filipowicz, W., 2004. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 118, 57–68.
- Zhao, C., Dong, J., Jiang, T., Shi, Z., Yu, B., Zhu, Y., Chen, D., Xu, J., Huo, R., Dai, J., *et al.*, 2011. Early second-trimester serum miRNA profiling predicts gestational diabetes mellitus. *PLoS ONE* 6, e23925.
- Zheng, G., Tao, Y., Yu, W., Schwartz, R.J., 2013. Brief report: SRF-dependent MiR-210 silences the sonic hedgehog signaling during cardiopoiesis: miR210 Blocks SHH Signaling. *Stem Cells* 31, 2279–2285.
- Zhou, Z., Wang, R., Yang, X., Lu, X.-Y., Zhang, Q., Wang, Y.-L., Wang, H., Zhu, C., Lin, H.-Y., Wang, H., 2014. The cAMP-responsive element binding protein (CREB) transcription factor regulates furin expression during human trophoblast syncytialization. *Placenta* 35, 907–918.

- Zhou, Q., Gallagher, R., Ufret-Vincenty, R., Li, X., Olson, E.N., Wang, S., 2011. Regulation of angiogenesis and choroidal neovascularization by members of microRNA-23 27 24 clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 8287–8292.
- Zhu, Y., Tian, F., Li, H., Zhou, Y., Lu, J., Ge, Q., 2015. Profiling maternal plasma microRNA expression in early pregnancy to predict gestational diabetes mellitus. *Int J Gynaecol Obstet* 130, 49–53.
- Zhu, Y., Zhang, X., Ding, X., Wang, H., Chen, X., Zhao, H., Jia, Y., Liu, S., Liu, Y., 2014. miR-27 inhibits adipocyte differentiation via suppressing CREB expression. *Acta Biochim Biophys Sin* 46, 590–596.

## 8 Anhang

### 8.1 microRNA-Nomenklatur

Die Namensgebung der microRNAs erfolgt anhand der zeitlichen Reihenfolge ihrer Sequenzierung bzw. Beschreibung. Dabei stehen die ersten drei Buchstaben vor jeder microRNA für den Organismus, aus dem sie isoliert wurde. Die hsa-miR-181 kann dementsprechend der Spezies *Homo sapiens*, die ocu-miR-141 der Spezies *Oryctolagus cuniculus* zugeordnet werden. Innerhalb einer Art werden identische microRNAs mit unterschiedlichen Genloci oder Vorläufer-Sequenzen mit einer zusätzlichen Nummer versehen, z.B. miR-142-1 und miR-142-2, während bei eng verwandten Sequenzen ein Buchstabe angehängt wird, z.B. miR-27a und miR-27b. Bei microRNA-Sequenzen, die von einem gemeinsamen Vorläufermolekül (pri- und pre-miRNA) abstammen, wird der vorherrschend exprimierte microRNA-Strang mit miR-56 und der geringer vorkommende microRNA-Strang mit miR-56\* bezeichnet. Wenn das Expressionsniveau unbekannt ist, erfolgt die Bezeichnung anhand des pre-miRNA-Armes, von dem sie abstammen, z.B. miR-142-5p (5'-Arm) und miR-142-3p (3'-Arm) (Ambros et al. 2003).

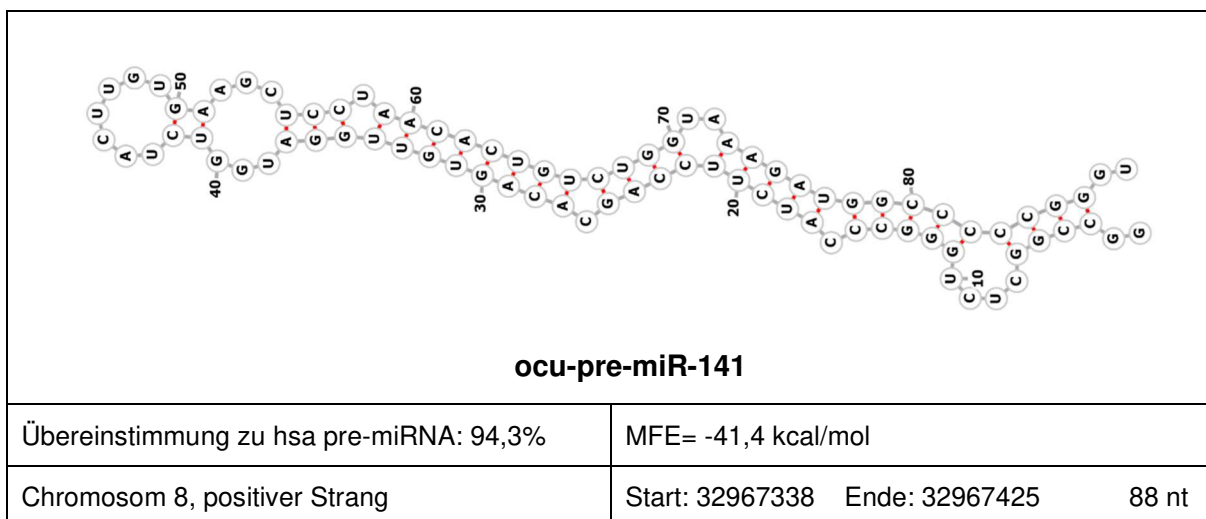
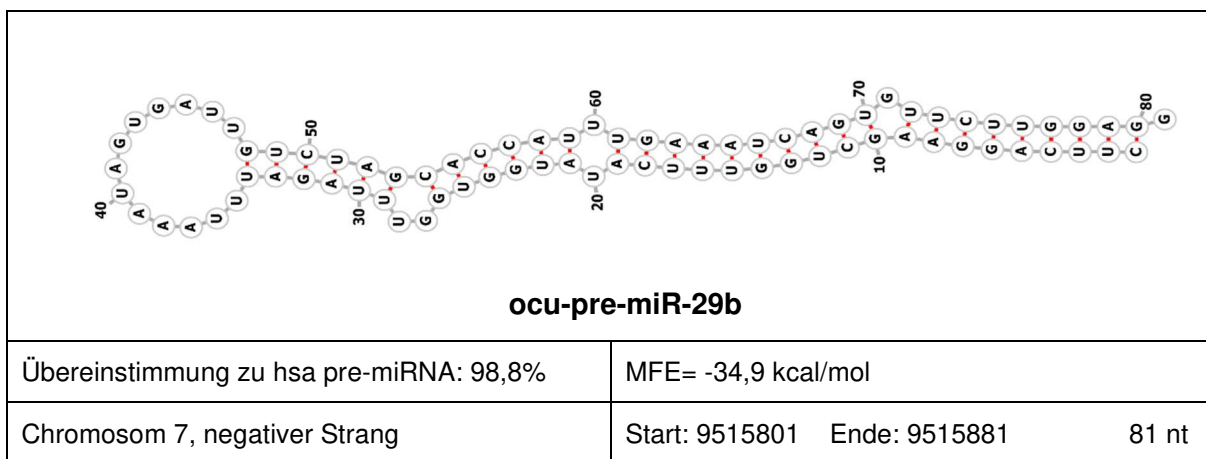
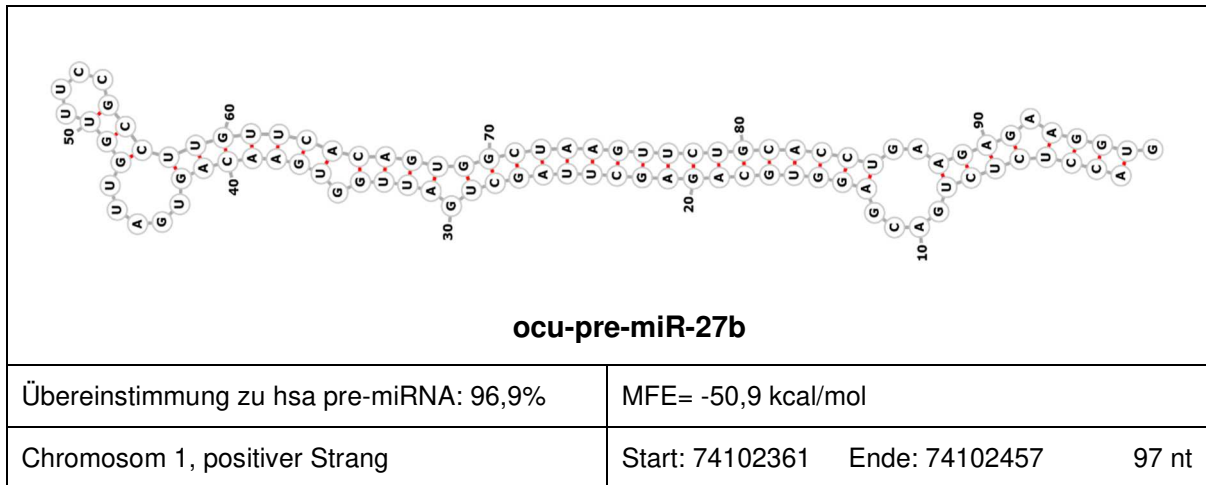
## 8.2 Sequenz, Lokalisation und Homologie von microRNAs

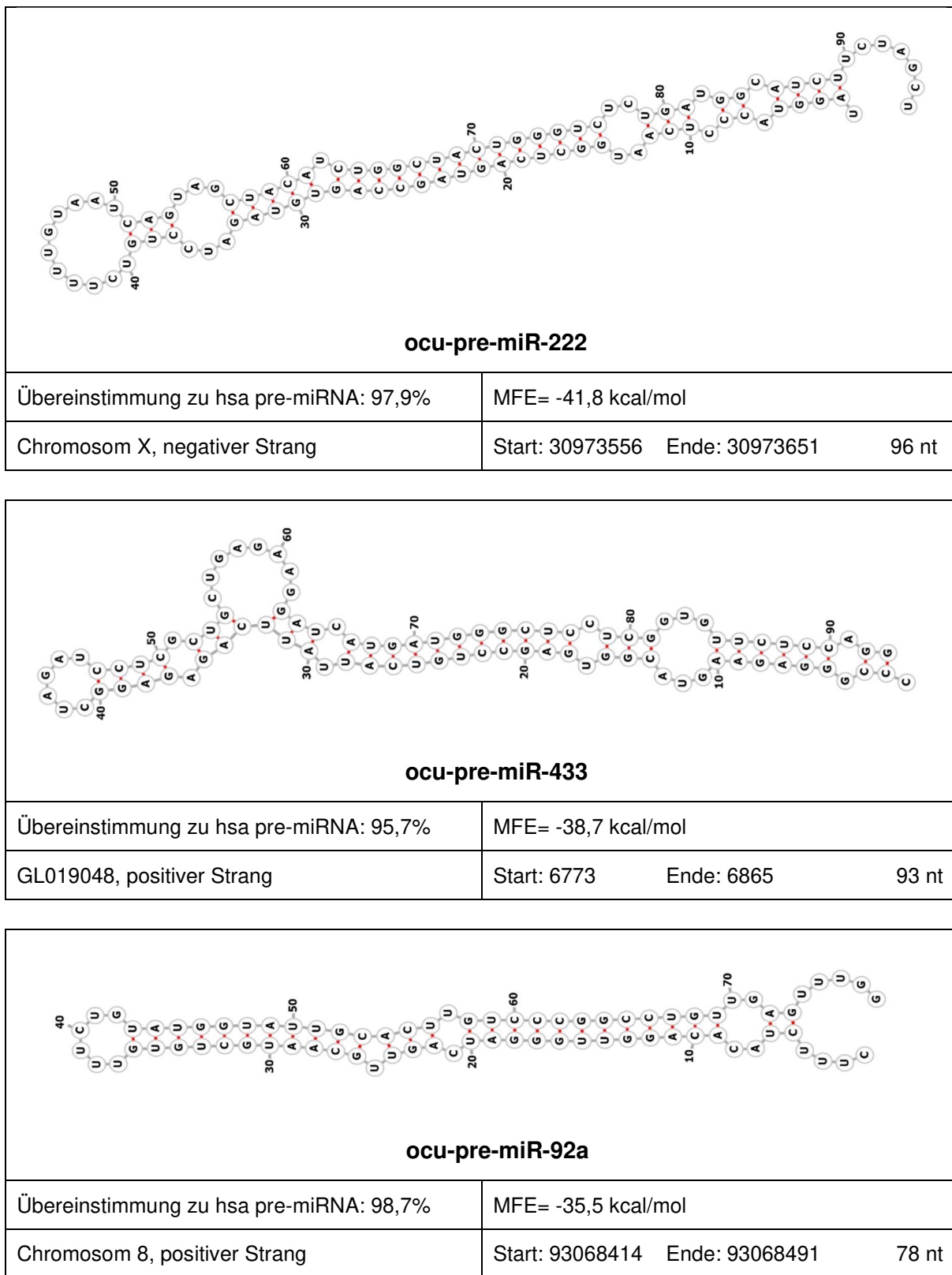
**Tab. 13: Lokalisation und prozentuale Übereinstimmung der Kaninchen-microRNAs (ocu-miRs) miR-27b, -29b, -141, -210, -222, -433 und -92a zu humanen (hsa), murinen (mmu) und bovinen (bta) reifen microRNAs**

/: Sequenz im Datensatz nicht vorhanden

miRNA	Größe	Reife Sequenz 5' nach 3'	Chr.	Strang	Start	Ende	% Übereinstimmung zu		
							hsa-miRNA	mmu-miRNA	bta-miRNA
ocu-miR-27b-3p	21	TTCACAGTGGCTAAGTTCTGC	1	+	74102421	74102441	100	100	100
ocu-miR-27b-5p	22	AGAGCTTAGCTGATTGGTGAAC	1	+	74102379	74102400	100	100	100
ocu-miR-29b-3p	22	TAGCACCATTGAAATCAGTGT	7	-	9515809	9515831	100	100	100
ocu-miR-29b-5p	-	/(vermutliche Sequenz: GCTGGTTTCATATGGTGGTTAG)	7	-	9515849	9515872	100	100	100
ocu-miR-141-3p	22	TAACACTGTCTGTTAAAGATGG	8	+	32967395	32967416	100	100	100
ocu-miR-141-5p	-	/(vermutliche Sequenz: CATCTTCCAGCACAGTTGG)	8	+	32967353	32967374	95,5	91	100
ocu-miR-210-3p	22	CTGTGGTGTGACAGCGGCTGA	GL018 755	+	166948	166968	100	100	100
ocu-miR-210-5p	-	/(vermutliche Sequenz: GCCCTTGCCCA CCGCTCACTG)	GL018 845	+	57860	57880	95,2	94	94
ocu-miR-222-3p	21	AGCTACATCTGGCTACTGGGT	X	-	30973577	30973597	100	100	100
ocu-miR-222-5p	22	CTCAGTAGCCAGTGTAGATCCC	X	-	30973614	30973635	100	100	100
ocu-miR-433-3p	22	ATCATGATGGGCTCCTCGGTGT	GL019 048	+	6836	6857	100	100	100
ocu-miR-433-5p	22	TACGGTGAGCCTGTCATTATTC	GL019 048	+	6784	6805	100	100	100
ocu-miR-92a-3p	22	TATTGCACTTGTCCCGGCCTGT	8	+	93068461	93068482	100	95,7	100
ocu-miR-92a-1-5p	-	/(vermutliche Sequenz: AGTTGGGATCAGTTGCAATGCT)	8	+	93068424	93068446	95,7	87	95,7

## 8.2.1 Sekundärstrukturen der kaninchenspezifischen pre-microRNAs





**Abb. 30: Vorhergesagte Haarnadelstruktur der kaninchenspezifischen pre-microRNAs**

Für die Vorhersage der mutmaßlichen Sekundärstrukturen der ocu-pre-miR-27b, -29b, -141, -222, -433 und -92a wurden die bekannten pre-microRNA-Sequenzen vom Menschen und der Maus mit Hilfe des Sequenzabgleich-Programms BLASTN abgeglichen. Die Generierung der Sekundärstruktur der pre-microRNAs erfolgte mit dem Programm RNAfold (Gruber et al. 2008) und wurde als Sekundärstruktur mit minimal freier Energie (MFE) dargestellt.

## 8.3 Materialien, Geräte, Gebrauchswaren und Software

### 8.3.1 Chemikalien

5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal)	Carl-Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Acrylamid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Agar-Agar	Carl-Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Oldendorf
Alloxan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
$\alpha$ -D-Glucose	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ampicillin	Carl-Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
$\beta$ -Mercaptoethanol	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Benzylpenicillin-Natrium	Infectopharm Arzneimittel und Consilium GmbH, Heppenheim
BSM II	Biochrom AG, Berlin
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bradford-Reagenz	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bromphenolblau	Fluka, Buchs
Chloroform	Carl-Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT)	Carl-Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
DNA-Leiter 100bp <i>Gene Ruler</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Fermentas, St. Leon-Rot
Domitor® SPC	Janssen Animal Health, Neuss
$\epsilon$ -Aminocarbonsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethylendiamintetraazetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Eisessig	Carl-Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Carl-Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Glukose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glyzerin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Glycin	Carl-Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl-Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Hexan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Humanes Choriongonadotropin (hCG)	Intervet, Unterschleißheim
Huminsulin Basal (NPH)	Lilly Deutschland GmbH, Bad Homburg



Insulin (bovin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
<i>Insulin like growth factor</i> (IGF2)	Calbiochem, Merck Millipore, Darmstadt
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Carl-Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Carl-Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Ketanest®	Pfizer, Karlsruhe
Kochsalzlösung (isotonisch)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Kupfersulfat	Biochrom AG, Berlin
L-Leucin	AppliChem GmbH, Darmstadt
ESGRO® <i>Leukemia Inhibitory Factor</i> (LIF)	Merck Millipore, Darmstadt
Luminata™ <i>Forte Western HRP substrate</i>	Merck Millipore, Darmstadt
Sucofin Magermilchpulver	TSI GmbH & Co.KG, Zeven
Magnesiumsulfat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Methanol	Carl-Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
MicroRNA LNA™ PCR primer set	Exiqon, Vedbaek (Dänemark)
Natriumazetat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumchlorid	Carl-Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Life Technologies GmbH, Darmstadt
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Nonidet (NP40)	ICN Biomedicals, Inc., Ohio
Oligonukleotide	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PageRuler™ <i>Prestained Protein Ladder</i> 10-170K	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford (USA)
Pentobarbital	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pepton	Carl-Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
<i>Phosphate buffer solution</i> (PBS) Dulbecco	Biochrom AG, Berlin
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polyvinylalkohol (PVA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Pregnant Mare Serum Gonadotropin</i> (PMSG)	Intervet, Unterschleißheim
<i>Random Primer</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
Rapamycin	Calbiochem, Merck Millipore, Darmstadt
Reika Kraftfutter	Reinsdorf Kraftfutterwerk, Reinsdorf
RNAlater®	Applied Biosystems, Darmstadt
Salzsäure (36%)	Carl-Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
SM <i>Prestained Protein ladder</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris[hydroxymethyl]-aminomethan (TRIS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
TRI Reagent®	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Tween® 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
5fach Reaktionspuffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford (USA)
5fach PCR-Puffer	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
2fach <i>Rapid Ligation Buffer</i>	Promega GmbH, Mannheim

### 8.3.2 Enzyme

Apa I (10 U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot
Crimson <i>Taq</i> ™ DNA-Polymerase (5 U/ml)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
ExiLENT SYBR® Green Master Mix	Exiqon, Vedbaek (Dänemark)
5x HOT FIREPol® Eva Green® qPCR Mix Plus (ROX)	Solis BioDyne, Tartu (Estland)
Protease-Inhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
Phosphatase-Inhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
rRNasin® Rnase-Inhibitor (40 U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot
RevertAid™ H Minus Reverse Transkriptase (200 U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot
SacI (10 U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot
Takyon ROX SYBR MasterMix blue dTTP	Eurogentec, Seraing (Belgien)
T4 DNA-Ligase (3 U/μl)	Promega GmbH, Mannheim

### 8.3.3 Vorgefertigte Systeme (Kits)

BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
DNA-free™ ( <i>DNase-Treatment &amp; Removal</i> )	Ambion INC, Austin
Dynabeads® mRNA Direct™ Kit	Invitrogen, Karlsruhe
miRNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
pGEM®-T Vektor Kit	Promega GmbH, Mannheim
QIAquick® <i>Gel Extraction Kit</i> (250)	Qiagen, Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QuantiFluor® RNA System	Promega GmbH, Mannheim
Universal cDNA synthesis kit II	Exiqon, Vedbaek (Dänemark)

### 8.3.4 Oligonukleotide

Die LNA™-angereicherten microRNA-spezifischen Oligonukleotide wurden von der Firma Exiqon bezogen (Tab. 14).

**Tab. 14: microRNA-spezifische Oligonukleotide für die RT-qPCR**

Für die Quantifizierung von microRNA mittels RT-qPCR wurden LNA™ PCR primer sets der Firma Exiqon verwendet.

Name	Primersequenz 5' → 3'	Identifikationsnummer
hsa-miR-27b-3p	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC	MIMAT0000419
hsa-miR-29b-3p	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	MIMAT0000100
hsa-miR-92a	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU	MIMAT0000092
hsa-miR-103a	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	MIMAT0000101
hsa-miR-141-3p	UAACACUGUCUGGUAAGAUGG	MIMAT0000432
hsa-miR-191-5p	CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG	MIMAT0000440
hsa-miR-210-3p	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA	MIMAT0000267
hsa-miR-222-3p	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	MIMAT0000279
hsa-miR-433-3p	AUCAUGAUGGGCUCCUCGGUGU	MIMAT0001627
U6	geschützte Information (Exiqon)	NR_004394

Die Synthese der Oligonukleotide für die Quantifizierung von cDNA aus mRNA erfolgte durch die Firma Sigma-Aldrich (Tab. 15.)

**Tab. 15: Oligonukleotide für RT-PCR, RT-qPCR und Sequenzierung**

Die Annealing-Temperatur aller Oligonukleotide lag für die RT-PCR und RT-qPCR bei 60°C.  
Strangspezifität: forward (fw) und reverse (rev); Bp- Basenpaare

Name	Primersequenz 5' → 3'	Produkt (Bp)	Identifikationsnummer
AGO2	fw: GATATGCCTTCAAGCCTCCG rev: TATCTCCCTGTTCACTCTCCTGG	164	NM_001082710.1
BDNF	fw: GCCCAAGACAGGTTCAAGAG rev: TGTTTGCAGCATCCAGGTAA	221	XM_008269140.1
CEBP $\beta$	fw: GGTC AAGAGCAAGGCCAAGA rev: ACAGCTGCTCCACCTTCTTC	188	XM_002723927.1
CNR1	fw: TGCTCAGACATTTTCCGCT rev: GGTCTTGGCCAGCCTAATGT	243	XM_008263198.2
CREB1	fw: GTATGCACAGACCACGGATG rev: TGCAGGCTGTGTAGGAAGTG	169	NM_004379.3
DGCR8	fw: GAGAGACAGAGCGGACGAAG rev: GCCACGACTTTTGAGCACTG	211	XM_008250577.2
Dicer	fw: GAAGCGGCCTCTATGAACGA rev: GGTCCCAGAACTACCAGCAC	157	XM_008251493.1
Drosha	fw: ACCTGAGAACA CTTCGATGCT rev: TGACACCTACTGCCTTGCAT	209	XM_008262091.1
E2F7	fw: CTCTTTCCCTTGTCGTGCCT rev: TCTTCCGCAGGCTTTTCAGT	220	XM_008256836.1
ErbB4	fw: GACACCGATTGCTTTGCCTG rev: TTGACACAGAACGCGCCATA	146	XM_017343080.1
ERBB2IP	fw: GACATTCTGAGGACACGCCA rev: TCCCACTGGACCACTTCTCT	125	XM_008262287.1
ESR1	fw: GAAAGGTGGTATACGGAAGACC rev: GGTCAGTAGGCCATCATCG	289	XM_002714947.3
EXP5	fw: CTA CT CAGGAGTCAAAGGCTCA rev: ATCAAGGGCTTCCGGTCTTC	232	XM_017345148.1
GAPDH	fw: GCCGCTTCTTCTCGTG CAG rev: ATGGATCATTGATGGCGACAACAT	144	L23961
IFNAR1	fw: CGTGTTCTTTCCATCCCCGA rev: GCCGGTTCCTTAGCTTCTT	166	XM_008274931.1
IGF2	fw: TGGAAGAACTTGCCACGGAG rev: GCTGCATTGCTGCTTACCGC	286	JN825734.1
IL1 $\alpha$	fw: GCTCTGCCATTGACCATCTT rev: TCAGAATCTTCCC ACTGGCTG	180	NM_001101684.1

Name	Primersequenz 5' → 3'	Produkt (Bp)	Identifikationsnummer
PAPPA	fw: AACCCAGCTCCCAAACACAA rev: AGTGCATTCTGGCGACTTGA	160	XM_008273386.1
PLAG1	fw: ATCACCTCCACACACACGAC rev: GGCGATCACAATGCTCACAC	252	XM_002710501.2
PTEN	fw: TCGCGGCATTTCCCTAGATA rev: ATGCCTTTCAGCACATAGATTG	289	XM_008270132.1
SATB1	fw: GCAACCAAAAAGCCAGGGATG rev: CCCGGTAAGAAAACGCCTCT	275	XM_008266050.1
SRSF3	fw: GATGGAAGAACGCTGTGTGG rev: ATCGGGACGGCTTGTGATTT	250	XM_008262842.2
T7	AATACGACTCACTATAGG		
TARDBP	fw: CCTTGGTCTACGTCGTCAACT rev: ATCTATCATGTGCCGCTGGG	298	XM_008253938.2
TGFβ2	fw: GCCTGCGTCCACTCTACATT rev: GGGACACACAGCAAGGAGAA	195	NM_001082660.1
TGFβR1	fw: GCCATTTGTATGTGCACCCTC rev: GCCAGGTGACTGCTTTACTG	127	XM_008262084.1
Wee1	fw: TATGTGCTGCTGGTGCTGAA rev: TCGCAACTGTTCTGCACTCT	221	XM_002708805.3
ZEB1	fw: TTGAGAAGATGCAGGCTGGG rev: TGAGGAGAGGTTGAGAGGGG	251	XM_008268014.1

### 8.3.5 Antikörper

Goat-anti-mouse-IgG, HRP-konjugiert,  
Goat-anti-rabbit-IgG, HRP-konjugiert, P0448  
Mouse-anti-human β-Aktin, monoclonal, A-5441  
Mouse-anti-human Histone H3, monoclonal,  
ab-10799

Rabbit-anti-human Dicer, polyclonal, sc-30226

Mouse-anti-human Dicer, monoclonal, sc-136981

Rabbit-anti-human Drosha, monoclonal, #3364

Mouse-anti-human Drosha, monoclonal,  
sc-393591

Dianova, Hamburg  
Dako, Hamburg  
Sigma-Aldrich, Taufkirchen  
Abcam, Cambridge (Großbritannien)

Santa Cruz Biotechnologie, Inc.,  
Santa Cruz (USA)

Santa Cruz Biotechnologie, Inc.,  
Santa Cruz (USA)

Cell Signaling, Davers (USA)

Santa Cruz Biotechnologie, Inc.,  
Santa Cruz (USA)

### 8.3.6 Bakterienstamm

In der vorliegenden Arbeit wurde der Bakterienstamm der Spezies *Escherichia coli* (*E.coli*) verwendet.

Zellstamm	Genotyp	Referenz
NEB 5-alpha	fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main

### 8.3.7 Geräte

ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt
Becherresonator BR 30	Bandelin, Berlin
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Brutschrank HERACell 150i (Stimulation)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bonn
ChemiDoc™ <i>Touch Imaging System</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH
<i>Electrophoresis Power Supply EV 202</i>	Consort, Turnhout (Belgien)
Gel-Dokumentationsgerät	LTF Labortechnik
Gelelektrophoresekammer	Agagel Mini und Maxi Biometra, Göttingen
LaminAir® HP72 (halbsterile Werkbank)	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge, Biofuge fresco 17	Heraeus, Hanau
Dynal MPC® Magnetic Particle Concentrator	Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norwegen
Magnetrührer mit Heizung MR 2002	Heidolph, Schwabach
Mikrowelle	AEG
Mikroskop Olympus IX-70	Olympus, Hamburg
Multitron	Infors AG, Bottmingen (Schweiz)
Novex Elektrophoresekammer	Invitrogen, Karlsruhe
pH-Meter pH 525	WTW, Weilheim
Pipettus	Hirschmann® Laborgeräte, Eberstadt
Quantus™ Fluorometer	Promega GmbH, Mannheim
Precellys <sup>24</sup> <i>lysis &amp; homogenization</i> (Homogenisator)	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Reaktionscuphalter EH 3	Bandelin, Berlin
Rollenmischgerät RM 5	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG „Assistent“, Sondheim
Rotations-Vakuum-Konzentrator RVC 2-18	Christ, Osterode
Schüttler GFL 3006	GFL, Burgwedel
Semi-Dry-Blot	Biometra, Göttingen
Sicherheitswerkbank HERAsafe®	Heraeus, Hanau
SONOPULS HD 3200	Bandelin, Berlin
Spektrophotometer	Amersham Biosciences, Freiburg
Spektrophotometer <i>Nano Vue™</i>	GE Healthcare, München
Sprout™ Minizentrifuge	Biozym, Oldendorf
StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems	Applied Biosystems, Darmstadt
Stereomikroskop Stemi 2000	Carl Zeiss, Jena
Stereomikroskop Stemi SV 11	Carl Zeiss, Jena
Stereomikroskop SZH 10	Olympus, Hamburg
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen

Trockenschrank T6060  
 Vortex-Genie 2 (G560E)  
 Waage BP 210 S & BP 3100 S  
 Wasserbad  
 Zentrifuge Biofuge 13

Heraeus, Hanau  
 Scientific Industries, Inc., New York  
 Sartorius, Göttingen  
 GFL, Burgwedel  
 Hereaus, Hanau

### 8.3.8 Gebrauchswaren

Amersham Hyperfilm™ ECL  
 BD Microlance™ 3

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

Dieffenbach-Klemme  
 Einmal-Küvetten  
 Falkonröhrchen (15ml, 50ml)

Geuder AG, Heidelberg  
 Brand GmbH & Co.KG, Wertheim  
 Greiner Bio-One GmbH,  
 Frickenhausen

Gelkassetten 1,5mm  
 Glaspipetten

Invitrogen, Karlsruhe  
 Greiner Bio-One GmbH,  
 Frickenhausen

Keratoplastik-Sieb spatel  
 Micro Amp™ Fast Reaction Tubes  
 Micro Amp™ Fast Optical 8-Cap Strip  
 Multi-Adapter für S-Monovette®  
 Multi TwistTop™ Vials 2,0ml

Geuder AG, Heidelberg  
 Applied Biosystems, Darmstadt  
 Applied Biosystems, Darmstadt  
 Sarstedt, Nümbrecht  
 PeqLab Biotechnologie GmbH,  
 Erlangen

Nitrozellulosemembran  
 Omnifix® U-40 Insulin  
 Petrischalen  
 Petrischalen 30x10

GE Healthcare, München  
 B.Braun, Melsungen  
 Gosselin, Borre (Frankreich)  
 Greiner Bio-One GmbH,  
 Frickenhausen

Parafilm® M 4 In x 125 Ft.  
 Pasteurpipetten 150 mm

Brand GmbH & Co.KG, Wertheim  
 Carl-Roth GmbH & Co.KG,  
 Karlsruhe

Precellys-Keramik-Kügelchen 1,4mm

PeqLab Biotechnologie GmbH,  
 Erlangen

Pinzette

Fine Science Tools GmbH,  
 Heidelberg

Pinzette Student Dumont

Fine Science Tools GmbH,  
 Heidelberg

Pipetten  
 Reaktionsgefäße (safe lock tubes)  
 Reagenzgläser  
 Safety Multifly-Kanüle  
 S-Monovette®  
 Vannas Federschere

Eppendorf AG, Hamburg  
 Eppendorf AG, Hamburg  
 Schott AG, Mainz  
 Sarstedt, Nümbrecht  
 Sarstedt, Nümbrecht  
 Fine Science Tools GmbH,  
 Heidelberg

Whatman™ Filterpapier  
 Nunc™ 4-Well-Schalen

GE Healthcare, München  
 Thermo Fisher Scientific GmbH,  
 Bonn

### 8.3.9 Software

*Basic Alignment Search Tool* (BLAST)

National Centre for Biotechnology  
 Information (NCBI)

BioCaptMW  
 Bio1D

Vilber Lourmat, Eberhardzell  
 Scientific Software Group, Utah

---

Generunner	(USA) Hastings Software, Inc., New York
Image Lab™ Software 5.2.1	(USA) Bio-Rad Laboratories GmbH
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporation, Redmond
miRBase	(USA) University of Manchester, Manchester (Großbritannien)
miRDB	<a href="http://www.mirdb.org/miRDB/index.html">http://www.mirdb.org/miRDB/index.html</a>
miRmine	University of Michigan
NormFinder	Department of Molecular Medicine (MOMA), Aarhus (Dänemark)
Primer3Plus	Free Software Foundation, Inc., Boston (USA)
QuickCalcs	GraphPad Software, Inc, La Jolla (USA)
SigmaPlot® 12.0	Systat Software GmbH, Erkrath
TargetScan	Bioinformatics and Research Computing, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge (USA)
Zotero 3.0.8	Center for History and New Media, Fairfax (USA)



## 8.4 Abbildungsverzeichnis

ABB. 1: EINTEILUNG DER PLAZENTAFORMEN NACH DER VERTEILUNG DER CHORIONZOTTEN (A), DEN FETO-MATERNALEN SCHICHTEN (B) UND DER VERZÄHNUNGSSTRUKTUR DER CHORIONOBERFLÄCHE (C) ...	6
ABB. 2: GENOMISCHE LOKALISATION VON MICRORNAs .....	8
ABB. 3: PRI-MIRNA-STRUKTUR (A) UND KANONISCHER MICRORNA-BIOGENESEWEG (B) .....	9
ABB. 4: DIE MICRORNA-VERMITTELTE POSTTRANSKRIPTIONALE REGULATION VON MRNAs.....	13
ABB. 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES VERSUCHSABLAUFS .....	24
ABB. 6: ABLAUFSCHHEMA DER <i>IN VITRO</i> -KULTUR VON 6 TAGE ALTEN BLASTOZYSTEN MIT INSULIN.....	27
ABB. 7: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER RT-REAKTION VON MICRORNA MIT DEM UNIVERSAL cDNA SYNTHESIS KIT II (ABB. NACH EXIQON).....	33
ABB. 8: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER RT-QPCR-REAKTION VON MICRORNA MIT DEM LNA™ PCR PRIMER SET.....	36
ABB. 9: AUFBAU EINES SEMIDRY-BLOTS.....	43
ABB. 10: RELATIVE MICRORNA-MENGEN IM PLASMA GESUNDER UND DIABETISCHER (DM1) KANINCHEN VOR DER VERPAARUNG UND AM 6. TAG DER GRAVIDITÄT.....	49
ABB. 11: RELATIVE MICRORNA-MENGEN IM ENDOMETRIUM DIABETISCHER KANINCHEN .....	49
ABB. 12: RELATIVE DROSHA- UND DICER-PROTEINMENGEN IM ENDOMETRIUM DIABETISCHER (DM1) KANINCHEN.....	50
ABB. 13: RELATIVE mRNA-MENGEN DER miR-222-ZIELGENE CNR1, ERBB4, ESR1 UND TGFBR1 IM ENDOMETRIUM DIABETISCHER KANINCHEN .....	51
ABB. 14: RELATIVE MICRORNA-MENGEN IM EMBRYOBLASTEN UND TROPHOBLASTEN DIABETISCHER KANINCHEN.....	53
ABB. 15: RELATIVE MICRORNA-MENGEN IN DER BLASTOZYSTENHÖHLENFLÜSSIGKEIT DIABETISCHER KANINCHEN.....	53
ABB. 16: ONTOGENETISCHE EXPRESSION VON GENEN DER MICRORNA-BIOGENESE IN PRÄIMPLANTATIONSEMBRYONEN DES KANINCHENS.....	54
ABB. 17: RELATIVE mRNA-MENGEN VON MICRORNA-PROZESSIERENDEN PROTEINEN IM EMBRYOBLASTEN UND TROPHOBLASTEN DIABETISCHER KANINCHEN.....	55
ABB. 18: RELATIVE DROSHA- UND DICER-PROTEINMENGE IM EMBRYOBLASTEN UND TROPHOBLASTEN DIABETISCHER (DM1) KANINCHEN.....	56
ABB. 19: RELATIVE mRNA-MENGEN SPEZIFISCHER MICRORNA-ZIELGENE IM EMBRYOBLASTEN UND TROPHOBLASTEN DIABETISCHER KANINCHEN.....	58
ABB. 20: RELATIVE MICRORNA-MENGEN IN TROPHOBLASTZELLEN (D6) UND PLAZENTEN (D10-D14) AM TAG 6 BIS TAG 14 <i>P.C.</i> .....	59
ABB. 21: RELATIVE MICRORNA-MENGEN IN PLAZENTEN DIABETISCHER (DM1) HÄSINNEN AM TAG 12 <i>P.C.</i>	60
ABB. 22: RELATIVE DROSHA- UND DICER-PROTEINMENGE IN PLAZENTEN DIABETISCHER (DM1) HÄSINNEN AM TAG 12 <i>P.C.</i> .....	61
ABB. 23: RELATIVE mRNA-MENGEN VON MICRORNA-PROZESSIERENDEN PROTEINEN IN PLAZENTEN DIABETISCHER (DM1) HÄSINNEN AM TAG 12 <i>P.C.</i> .....	61

ABB. 24: RELATIVE MICRORNA-MENGEN IM EMBRYOBLASTEN (A), TROPHOBLASTEN (B) UND IN DER BLASTOZYSTENHÖHLENFLÜSSIGKEIT (C) GESUNDER UND DIABETISCHER KANINCHEN NACH 2-STÜNDIGER <i>IN VITRO</i> -KULTUR MIT 17 nM INSULIN .....	63
ABB. 25: RELATIVE MICRORNA-MENGEN IM EMBRYOBLASTEN (A), TROPHOBLASTEN (B) UND IN DER BLASTOZYSTENHÖHLENFLÜSSIGKEIT (C) 6 TAGE ALTER KANINCHENEMBRYONEN NACH 5-STÜNDIGER <i>IN VITRO</i> -KULTUR MIT 0, 10 ODER 25 mM GLUKOSE (GLK) .....	64
ABB. 26: RELATIVE MICRORNA-MENGEN IM EMBRYOBLASTEN (A), TROPHOBLASTEN (B) UND IN DER BLASTOZYSTENHÖHLENFLÜSSIGKEIT (C) 6 TAGE ALTER KANINCHEN-BLASTOZYSTEN NACH 4-STÜNDIGER <i>IN VITRO</i> -KULTUR MIT 13 nM IGF2 .....	65
ABB. 27: RELATIVE MICRORNA-MENGEN IM EMBRYOBLASTEN (A) UND TROPHOBLASTEN (B) 6 TAGE ALTER KANINCHENBLASTOZYSTEN NACH 4-STÜNDIGER <i>IN VITRO</i> -KULTUR MIT 10 ng/ml LIF .....	66
ABB. 28: AUSWIRKUNGEN EINES MATERNALEN DIABETES MELLITUS AUF DIE MICRORNA-PROZESSIERUNG UND -EXPRESSION IN PRÄIMPLANTATIONSEMBRYONEN DIABETISCHER KANINCHEN AM TAG 6 <i>P.C.</i> .....	76
ABB. 29: EINFLUSS VON INSULIN, GLUKOSE, IGF2 ODER LIF AUF DIE MICRORNA-EXPRESSION IN <i>IN VITRO</i> -KULTIVierten PRÄIMPLANTATIONSEMBRYONEN DES KANINCHENS AM TAG 6 <i>P.C.</i> (A) IM VERGLEICH MIT DER <i>IN VIVO</i> -SITUATION (B) .....	90
ABB. 30: VORHERGESAGTE HAARNADELSTRUKTUR DER KANINCHENSPEZIFISCHEN PRE-MICRORNAs .....	IV

## 8.5 Tabellenverzeichnis

TAB. 1: MORPHOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER KEIMSCHLEIBENDIFFERENZIERUNG UND EINGETILGUNG DER GASTRULATIONSTADIEN BEIM KANINCHENEMBRYO WÄHREND DER PERIIMPLANTATIONSPHASE .....	4
TAB. 2: GENOMISCHE LOKALISATION UND ORGANISATION DER miR-27b, -29b, -141, -191, -210, -222 UND -433 .....	17
TAB. 3: FUNKTIONEN DER MICRORNA-ZIELGENE WÄHREND DER IMPLANTATION, EMBRYONAL-, FETAL- UND PLAZENTAENTWICKLUNG .....	20
TAB. 4: ZUSAMMENSETZUNG DER VERWENDETEN MEDIEN FÜR DIE GEWINNUNG UND KULTIVIERUNG VON KANINCHENBLASTOZYSTEN .....	25
TAB. 5: TABELLARISCHE ÜBERSICHT DER <i>IN VITRO</i> -KULTURVERSUCHE VON 6 TAGE ALTEN BLASTOZYSTEN .....	26
TAB. 6: ZUSAMMENSETZUNG DER VERWENDETEN PUFFER FÜR DIE mRNA-ISOLATION MITTELS DYNABEADS@OLIGO(dT) <sub>25</sub> -PERLEN .....	28
TAB. 7: REAKTIONSANSATZ FÜR DIE cDNA-SYNTHESE VON MICRORNA AUS BLASTOZYSTEN, ENDOMETRIUM, PLASMA UND PLAZENTA .....	34
TAB. 8: PROTOKOLL FÜR DIE HYBRIDISIERUNG MIT DEN VERWENDETEN PRIMÄR- UND SEKUNDÄR-ANTIKÖRPERN .....	44
TAB. 9: ÜBERSICHT ÜBER DIE ANGEWANDTEN STATISTISCHEN TESTS .....	46
TAB. 10: LISTE VON REPRODUKTIONS BIOLOGISCH RELEVANTEN ZIELGENEN DER miR-27b, -141, -191 UND -222 .....	57
TAB. 11: SEQUENZNACHWEISE DER miR-27b, -29b, -141, -191, -210, -222, -433 UND -92a IN 5,5, 6,5 UND 14 TAGE-ALTEN ( <i>P.C.</i> ) KANINCHENEMBRYONEN .....	68
TAB. 12: VERÄNDERTE MICRORNA-MENGEN IM PLASMA BZW. SERUM VON KINDERN UND ERWACHSENEN .....	71

TAB. 13: LOKALISATION UND PROZENTUALE ÜBEREINSTIMMUNG DER KANINCHEN-MICRORNAs (OCU-MIRs)  
MIR-27B, -29B, -141, -210, -222, -433 UND -92A ZU HUMANEN (HSA), MURINEN (MMU) UND BOVINEN  
(BTA) REIFEN MICRORNAs..... II

TAB. 14: MICRORNA-SPEZIFISCHE OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE RT-QPCR..... VIII

TAB. 15: OLIGONUKLEOTIDE FÜR RT-PCR, RT-QPCR UND SEQUENZIERUNG .....IX

## 8.6 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ADIPOR1	Adiponektin-Rezeptor 1
AGO	Argonaut-Proteine
Akt	Proteinkinase B
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
B	Blastozyste
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
BF	Blastozystenhöhlenflüssigkeit
BLASTN	<i>Nucleotide Basic Alignment Search Program</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BSM	Basales synthetisches Medium
bta	<i>Bos taurus</i> (Rind)
bzw.	beziehungsweise
C/ Chr	Chromosom
ca.	circa
CAF1	<i>CCR4-Associated Factor 1</i>
CCR4	Carbon catabolite repressor protein 4
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEBP $\beta$	<i>CCAAT/Enhancer Binding Protein <math>\beta</math></i>
CNR1	Cannabinoid-Rezeptor 1
CREB1	<i>CAMP responsive element binding protein 1</i>
C <sub>T</sub>	<i>Cycle treshold</i>
d	Tag
da	Dalton
DCP2	<i>mRNA-decapping enzyme 2</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region 8</i>
DGD	Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes
DM1	diabetisch
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
dT	Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
E2F7	<i>E2F Transcription Factor 7</i>
EB	Embryoblast
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
endo-siRNA	endogene siRNAs

ErbB4	Rezeptor Tyrosine-Protein Kinase 4
ERBB2IP	<i>ErbB2 Interacting Protein</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ESR1	Östrogenrezeptor $\alpha$
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat.: und andere)
EV	extrazelluläre Vesikel
EXP5	Exportin 5
fw	<i>forward</i>
g	Erdbeschleunigung/ Zentrifugalbeschleunigung
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDM	Gestationsdiabetes
ggf.	gegebenenfalls
Glk	Glukose
GLUT	Glukosetransporter
GTP	Guanosintriphosphat
GW182	<i>Glycine-Tryptophan Protein of 182 kDa</i>
H3	Histon 3
hCG	humanes Choriongonadotropin
HRP	Meerrettichperoxidase
hsa	<i>Homo sapiens</i>
i.d.R.	in der Regel
IE	internationale Einheiten
IFNAR1	<i>Interferon Alpha and Beta Receptor Subunit 1</i>
IgG	Immunglobulin G
Il1 $\alpha$	Interleukin 1 $\alpha$
IL6	Interleukin 6
IGF2	<i>Insulin-like growth factor 2</i>
iPS	induzierte pluripotente Stammzellen
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IVF	<i>In vitro</i> -Fertilisation
k (als Präfix)	kilo
kB	Kilobasen
KM	Kulturmedium
l	Liter
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
LIFR	<i>Leukemia inhibitory factor</i> -Rezeptor
LNA	<i>Locked nucleic acids</i>
lncRNA	<i>long non-coding RNA</i>
M	Molar
m (als Präfix)	milli
MC	microRNA-Cluster
Mdm2	<i>Mouse double minute 2</i>
MFE	minimal freie Energie
miRNA	microRNA
mmu	<i>Mus musculus</i> (Maus)
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure

mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
Mw	Mittelwert
n	Gesamt-Probenzahl
N	Anzahl der unabhängigen Versuche
ncRNA	nicht-kodierende RNA
n.d.	nicht detektierbar
nm	Nanometer
NOT	<i>CCR4-Associated Factor</i>
ocu	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
OD	optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p38 MAPK	p38 mitogenaktivierte Proteinkinase
PABP	Poly(A)-bindendes Protein
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Pan 2/3	<i>Poly(A)-Nuclease Deadenylation Complex Subunit 2/3</i>
PAPPA	<i>Pregnancy-Associated Plasma Protein A</i>
PBS	<i>Phosphate buffer solution</i>
P-bodies	<i>processing bodies</i>
p.c.	<i>post coitum</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGE	posteriore Gastrulationsextension
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
piRNA	<i>Piwi-interacting RNA</i>
PLAG1	<i>Pleiomorphic Adenoma Gene 1</i>
PMSG	<i>Pregnant Mare Serum Gonadotropin</i>
Pol	Polymerase
PPAR $\alpha$	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
pre-miRNA	<i>precursor miRNA</i>
pri-miRNA	primäre microRNA
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
PVA	Polyvinylalkohol
RIIID	RNaselll-Domäne
rev	<i>reverse</i>
RIPA	<i>radio immunoprecipitation assay</i>
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNA PolII	RNA-Polymerase II
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RS	<i>Reducing Sample</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RT-qPCR	quantitative Echtzeit-Reverse-Transkriptase-PCR
SATB1	<i>Special AT-Rich Sequence Binding Protein 1</i>

---

SDS	Natriumlaurylsulfat
snoRNA	<i>small nuclear RNA</i>
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
sog.	sogenannt
SOLiD	<i>Sequencing by Oligo Ligation Detection</i>
SRSF3	<i>Serine and Arginine Rich Splicing Factor 3</i>
STF	Standardfehler
T1DM	Typ 1 Diabetes mellitus
T2DM	Typ 2 Diabetes mellitus
Tab.	Tabelle
TARDBP	<i>TAR DNA-binding protein 43</i>
TB	Trophoblast
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF $\beta$ 2	<i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math> 2</i>
TGF $\beta$ R1	<i>Transforming growth factor (TGF) <math>\beta</math>-Rezeptor 1</i>
TRBP	<i>Trans-Activation Responsive RNA-Binding Protein</i>
TRIS	Tris[hydroxymethyl]-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Enzymeinheit
u.a.	unter anderem
UTR	untranslatierter Bereich
UV	ultraviolett
VRB	vorderer Randbogen
Wee1	<i>WEE1 G2 Checkpoint Kinase</i>
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid
z.B.	zum Beispiel
ZEB1	<i>Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1</i>
ZMG	Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
z.T.	zum Teil
$\alpha$	alpha
$\beta$	beta
$\mu$	mikro
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius

## Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN

Name: Pendzialek  
Vorname: Sophia Mareike  
Akademischer Grad: M. Sc.  
Geburtsdatum und -ort: 15.04.1985 in Leipzig  
Familienstand: ledig; 1 Sohn (2 Jahre)

### BERUFLICHER WERDEGANG

seit 02/2019 Labormanagerin am Institut für Bakteriologie und Mykologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

06/2013 – 01/2019 wissenschaftliche Mitarbeiterin/ Promotion am Institut für Anatomie und Zellbiologie, Medizinische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

01/2017 – 03/2018 Mutterschutz/ Elternzeit

10/2010 – 10/2012 Masterstudium Ernährungswissenschaften an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Masterarbeit: „Expressionsanalyse von Genen des Lipidstoffwechsels in Präimplantationsembryonen diabetischer Kaninchen“ am Institut für Anatomie und Zellbiologie, Medizinische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

10/2007 – 09/2010 Bachelorstudium Ernährungswissenschaften an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Bachelorarbeit: „Biofunktionelle Eigenschaften des Lupinenproteins“ am Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

03/2004 – 03/2007 Ausbildung zur staatlich geprüften Ergotherapeutin an der Bernd-Blindow-Schule Leipzig

10/2003 – 02/2007 Lehramtsstudium Deutsch und Geschichte an der Universität Leipzig



06/2003                      Abitur an der Max-Klinger-Schule Leipzig

### **BEGLEITENDE NEBENTÄTIGKEITEN**

02/2013 – 05/2013              wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Anatomie und Zellbiologie, Medizinische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

10/2014 – 02/2016              Tutorin im Praktikum „Anatomie und Mikroskopische Anatomie“ für Studierende der Ernährungs- und Naturwissenschaften und der Medizinischen Physik

### **WEITERBILDUNG IM IN- UND AUSLAND**

10/2016                      *Short Term Scientific Mission* am National Agricultural Research and Innovation Centre in Gödöllő, Ungarn

- Transfektion von Kaninchenembryonen, *in vitro* Kultur von rabbit iPS-Zellen, Analyse von RNA-Sequenzierdaten

07/2015                      *Practical Course* der *European Molecular Biology Organization* (EMBO): „Analysis of Small Non-coding RNAs: per aspera ad astra“ in Brno, Tschechische Republik

03/2014                      Sachkundenachweis nach § 4 des Tierschutzgesetzes  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

### **WISSENSCHAFTLICHE AUSZEICHNUNGEN**

02/2019                      Auszeichnung mit dem 3. Preis der DGRM  
52. Jahrestagung Physiologie & Pathologie der Fortpflanzung und gleichzeitig 44. Veterinär-Human-medizinische Gemeinschaftstagung in Göttingen

10/2014                      Auszeichnung mit dem 3. Posterpreis  
Forschungstag 2014 Universitätsmedizin Halle (Saale) Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

## Publikationsverzeichnis

### publizierte Beiträge

#### **Zeitschriftenartikel**

Jacqueline Gürke, Karen Uhde, Asis Mousa, Elisa Haucke, Katarzyna J. Grybel, S. Mareike Pendzialek, Maria Schindler, Tom Seeling, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos „Maternal diabetes leads to an altered FoxO1 signalling dependent on mTORC1 and BCAA availability in rabbit preimplantation embryos“ in Bearbeitung

Tom Seeling, Elisa Haucke, Alexander Navarrete Santos, Katarzyna J. Grybel, Jacqueline Gürke, S. Mareike Pendzialek, Maria Schindler, Andreas Simm und Anne Navarrete Santos „Glyoxalase 1 expression is downregulated in preimplantation blastocysts of diabetic rabbits“ eingereicht bei *Reproduction in Domestic Animals* (Februar 2019)

S. Mareike Pendzialek, Julia M. Knelangen, Maria Schindler, Jacqueline Gürke, Katarzyna J. Grybel, Elen Gocza, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos „Trophoblastic microRNAs are downregulated in a diabetic pregnancy through an inhibition of Drosha“ *Molecular and Cellular Endocrinology* (Januar 2019) Doi: 10.1016/j.mce.2018.11.002

Tom Seeling, Štefan Čikoš, Katarzyna J. Grybel, Žofia Janštová, S. Mareike Pendzialek, Maria Schindler, Alexandra Špírková, Anne Navarrete Santos „A Diabetic Pregnancy Alters the Expression of Stress-Related Receptors in Gastrulating Rabbit Blastocyst and in the Reproductive Tract“ *Reproductive Sciences* (Februar 2018) Doi: 10.1177/1933719117707055

S. Mareike Pendzialek, Maria Schindler, Torsten Plösch, Jacqueline Gürke, Elisa Haucke, Stefanie Hecht, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos „Cholesterol metabolism in rabbit blastocysts under maternal diabetes“ *Reproduction, Fertility and Development* (September 2017) Doi: 10.1071/RD15542

Bernd Fischer, Maria Schindler, S. Mareike Pendzialek, Jacqueline Gürke, Elisa Haucke, Katarzyna J. Grybel, René Thieme und Anne Navarrete Santos „The Long-Term Effect of the Periconception Period on the Embryo's Epigenetic Profile and Phenotype: The Role of Maternal Disease Such as Diabetes and How the Effect Is Mediated (Example from a Rabbit Model)“ In: *Fazeli A., Holt W. (eds) Periconception in Physiology and Medicine. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1014. Pp 107-115, Springer, Cham (September 2017) Doi: 10.1007/978-3-319-62414-3\_6

Maria Schindler, S. Mareike Pendzialek, Katarzyna J. Grybel, Tom Seeling, Jacqueline Gürke, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos „Adiponectin stimulates lipid metabolism via AMPK in rabbit blastocysts“ *Human Reproduction* (Juli 2017) Doi: 10.1093/humrep/dex087

Jacqueline Gürke, Maria Schindler, S. Mareike Pendzialek, René Thieme, Katarzyna J Grybel, Regine Heller, Katrin Spengler, Tom P Fleming, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos „Maternal diabetes promotes mTORC1 downstream signalling in rabbit preimplantation embryos“ *Reproduction* (Mai 2016) DOI: 10.1530/REP-15-0523

Maria Schindler, Mareike Pendzialek, Alexander Navarrete-Santos, Torsten Plösch, Stefanie Seyring, Jacqueline Gürke, Elisa Haucke, Julia Miriam Knelangen, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos “Maternal diabetes leads to unphysiological high lipid accumulation in rabbit preimplantation embryos.“ *Endocrinology* (April 2014) DOI: 10.1210/en.2013-1760

**Publizierte Abstracts****Vorträge**

S. Mareike Pendzialek, Katarzyna Grybel, Maria Schindler, Tom Seeling, Elen Gocza, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos „The expression of microRNA processing enzymes Drosha and Dicer is altered in preimplantation embryos and placentae of diabetic rabbits.” 52. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung und gleichzeitig 44. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, 20.-22. Februar 2019, Göttingen, Deutschland, Doi: 10.1111/rda.13387

Anne Navarrete Santos, Maria Schindler, Tom Seeling, Elisa Haucke, Alexander Navarrete Santos, Katarzyna J. Grybel, S. Mareike Pendzialek, Jacqueline Gürke, Regine Heller, Andreas Simm und Bernd Fischer “Does the maternal metabolism during early pregnancy determine the offspring’s health and ageing?” Gerontologie und Geriatrie Jahreskongress 2016: Leben und Altern – Funktionalität und Qualität, 7. bis 10. September 2016, Stuttgart, Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie Suppl. 1 , 2016, S75

Maria Schindler, S. Mareike Pendzialek, Katarzyna Grybel, Jacqueline Guerke, Tom Seeling, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos “Different mechanism of lipid accumulation in embryoblast and trophoblast cells trigger by lipid excess.” Society for Reproduction and Fertility Annual Conference 2016, August 2016, Reproduction Abstracts, Doi:10.1530/repabs.3.O030

S. Mareike Pendzialek, Katarzyna Grybel, Jacqueline Gürke, Maria Schindler, Tom Seeling, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos “LIF and IGF2 are potent regulators of microRNA expression in trophoblast cells of rabbit blastocysts.” 13th Congress of the International Society for Immunology of Reproduction and the European Society for Reproductive Immunology, 22.-25. Juni 2016, Erfurt, Deutschland, *Journal of Reproductive Immunology*, Doi: 10.1016/j.jri.2016.04.162

Maria Schindler, S. Mareike Pendzialek, Katarzyna J. Grybel, Jacqueline Gürke, Tom Seeling, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos “How does an altered adiponectin level during early diabetic pregnancy influences embryonic lipid metabolism.” Diabeteskongress, in Diabetologie und Stoffwechsel, April 2016, Doi: 10.1055/s-0036-1580928

S. Mareike Pendzialek, Julia M. Knelangen, Katarzyna J. Grybel, Jacqueline Gürke, Maria Schindler, Tom Seeling, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos “Distinct changes in maternal and embryonic microRNA expression in diabetic rabbits during early pregnancy.” 49. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung und gleichzeitig 41. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, 10.-12. Februar 2016, Leipzig, Deutschland, ISSN/ISBN: 9783863453046/3863453042

Katarzyna J. Grybel, Eugenie Canon, S. Mareike Pendzialek, Maria Schindler, Jacqueline Gürke, Tom Seeling, Thierry Blachère, Murielle Godet, Bernd Fischer, Veronique Duranthon und Anne Navarrete Santos “Gestational diabetes changes the DNA methylation patterns at Oct4 promoter region in rabbit preimplantation embryos.” 49. Jahrestagung Physiologie & Pathologie der Fortpflanzung und gleichzeitig 41. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, 10.-12. Februar 2016, Leipzig, Deutschland, ISSN/ISBN: 9783863453046/3863453042

**Poster**

Tom Seeling, Katarzyna J. Grybel, S. Mareike Pendzialek, Axel Imhof, Ignasi Forné, Alexander Navarrete Santos, Andreas Simm und Anne Navarrete Santos “Impact of glucose metabolites on histone modifications and glyoxalase activity in trophoblast cells”, 21st IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics, 23.-27. September 2017 San Francisco, USA, Doi:10.1093/geroni/igx004.4376

Maria Schindler, S. Mareike Pendzialek, Katarzyna Grybel, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos “Embryonic lipid accumulation in response to lipid excess – the difference between embryoblast and trophoblast)” 111. Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft, 22.-23. September 2017 Göttingen, Deutschland, Doi:10.3337/anatges.2015.0026

Tom Seeling, Štefan Číkoš, Soňa Czikková, Žofia Janštová, Katarzyna J. Grybel, S. Mareike Pendzialek, Maria Schindler, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos “Expression of adrenergic receptor transcripts in rabbit reproductive tissues and preimplantation embryos – impact of a maternal insulin-dependent diabetes mellitus.” 49. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung und gleichzeitig 41. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, 10.-12. Februar 2016, Leipzig, Deutschland, ISSN/ISBN: 9783863453046/3863453042

Maria Schindler, S. Mareike Pendzialek, Katarzyna Grybel, Jacqueline Gürke, Bernd Fischer and Anne Navarrete Santos “Adiponectin regulates embryonic lipid metabolism in rabbit blastocysts.” 110. Annual Meeting of the Anatomische Gesellschaft, 23.-25. September 2015, Würzburg, Deutschland, DOI: 10.337/anatges.2015.00224

Maria Schindler, S. Mareike Penzialek, Jacqueline Gürke, Bernd Fischer and Anne Navarrete Santos “Adiponectin regulates PPAR expression in rabbit blastocysts.” 48. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung und gleichzeitig 40. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, 11.-13. Februar 2015, Zürich, Schweiz, *Reproduction in Domestic Animals* DOI: 10.1111/rda.12498

Maria Schindler, S. Mareike Pendzialek, Torsten Plösch, Jaqueline Gürke, Elisa Haucke, Julia Miriam Knelangen, Bernd Fischer and Anne Navarrete Santos. “Influence of a maternal diabetes mellitus type 1 on lipid and cholesterol metabolism in rabbit preimplantation embryos.” *Reproduction, Fertility and Development* Hannover, Deutschland, 19.-21. Januar 2015 DOI: 10.1071/RDv25n1Ab4

S. Mareike Pendzialek, Maria Schindler, Jacqueline Gürke, Elisa Haucke, Torsten Plösch, Bernd Fischer and Anne Navarrete Santos “Influence of experimental diabetes mellitus type 1 on the expression of cholesterol metabolism genes in rabbit embryos and maternal tissues.” 30. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, 25.-27.09.2013, Würzburg, Deutschland, DOI: 10.3337/anatges.2013.0018

Maria Schindler, S. Mareike Penzialek, Torsten Plösch, Alexander Navarrete Santos, Bernd Fischer and Anne Navarrete Santos “Maternal diabetes mellitus influences fatty acid metabolism in rabbit preimplantation embryos.” 108. Annual Meeting of the Anatomische Gesellschaft, 22.-25. März 2013, Magdeburg, Deutschland *Reproduction, Fertility and Development* 25(1) 149-149 DOI:org/10.1071/RDv25n1Ab4

## Nicht publizierte Beiträge

### Vorträge

S. Mareike Pendzialek, Katarzyna J. Grybel, Maria Schindler, Tom Seeling, Elen Gocza, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos "Aberrant expression of microRNAs and microRNA processing genes in preimplantation embryos and placentae of diabetic rabbits" DGZ 2018 - International Meeting of the German Society for Cell Biology, 17.-19. September 2018, Leipzig, Deutschland

S. Mareike Pendzialek, Katarzyna J. Grybel, Jacqueline Gürke, Maria Schindler, Tom Seeling, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos „Impaired microRNA processing in rabbit trophoblast cells during early diabetic pregnancy” 16. Treffen des Arbeitskreises Molekularbiologie der DGGEF und DGRM, 25.-26. November 2016, Düsseldorf, Deutschland

S. Mareike Pendzialek, Katarzyna J. Grybel, Jacqueline Gürke, Maria Schindler, Tom Seeling, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos „Maternal diabetes mellitus type 1 downregulates the embryonic microRNA biogenesis in trophoblast cells“ EpiConcept COST Action FA1201 Epigenetics and Periconception Environment Conference 2016, 26.-29. September 2016, Giardini Naxos, Italien

S. Mareike Pendzialek, Julia Miriam Knelangen, Katarzyna Grybel, Jacqueline Gürke, Maria Schindler, Bernd Fischer and Anne Navarrete Santos „Maternal insulin-dependent diabetes mellitus leads to an altered microRNA expression in maternal plasma and preimplantation embryos during early pregnancy.” 3. Kongress für Doktorandinnen und Doktoranden, 20. November 2015, Halle (Saale), Deutschland

### Poster

S. Mareike Pendzialek, Katarzyna Grybel, Jacqueline Gürke, Maria Schindler, Tom Seeling, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos "Effects of maternal insulin-dependent diabetes and hormonal stimuli on embryonic microRNA expression" 11th Microsymposium on Small RNAs, 2.-4. Mai 2016, Wien, Österreich

S. Mareike Pendzialek, Julia Miriam Knelangen, Katarzyna Grybel, Jacqueline Gürke, Maria Schindler, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos "Altered maternal and embryonic microRNA expression during early diabetic pregnancy." EpiConcept COST Action FA1201 Epigenetics and Periconception Environment, Conference 2015, 6.-7. Oktober 2015, Hersonissos, Kreta, Griechenland

S. Mareike Pendzialek, Julia Miriam Knelangen, Katarzyna Grybel, Jacqueline Gürke, Maria Schindler, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos "Maternal insulin-dependent diabetes mellitus affects embryonic microRNA expression during the preimplantation period: Insights from a rabbit model ." Treatment of Elderly Patients: The Challenge of the Future - ageing meeting in Halle, 25.-27. September 2015, Halle (Saale), Deutschland

S. Mareike Pendzialek, Julia Miriam Knelangen, Katarzyna Grybel, Jacqueline Gürke, Maria Schindler, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos "Aberrant microRNA expression in maternal plasma and preimplantation embryos of diabetic rabbits- a promising biomarker for trophoblast function in early pregnancy." CNAPS IX meeting, 10.-12. September 2015, Berlin, Deutschland

S. Mareike Pendzialek, Julia Miriam Knelangen, Katarzyna Grybel, Jacqueline Gürke, Maria Schindler, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos „Differentially expressed microRNAs in maternal plasma and preimplantation embryos of diabetic rabbits.“ 16th World Congress on human reproduction, 18.-21. März 2015, Berlin, Deutschland

S. Mareike Pendzialek, Julia Miriam Knelangen, Jacqueline Gürke, Katarzyna Grybel, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos “Expression of microRNAs in maternal serum, placenta and rabbit preimplantation embryos.” 3. Forschungstag der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität, 10. Oktober 2014, Halle (Saale), Deutschland

S. Mareike Pendzialek, Julia Miriam Knelangen, Jacqueline Gürke, Katarzyna Grybel, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos “Determination of pregnancy-associated microRNAs in maternal serum, placenta and rabbit preimplantation embryos.” EpiConcept COST Action FA1201 Epigenetics and Periconception Environment Conference 2014, 01.-03. Oktober 2014, Vilamoura, Portugal

S. Mareike Pendzialek, Maria Schindler, Jacqueline Gürke, Elisa Haucke, Torsten Plösch, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos “Embryonic cholesterol metabolism under the influence of maternal insulin-dependent diabetes mellitus: Insights from the rabbit model.” The power of programming 2014, 13.-15. März 2014, München, Deutschland

S. Mareike Pendzialek, Maria Schindler, Jacqueline Gürke, Elisa Haucke, Torsten Plösch, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos “Experimental insulin-dependent diabetes affects maternal lipid metabolism with consequences for embryonic lipid metabolism.” XVIII Lipid Meeting, 5.-7. Dezember 2013, Leipzig, Deutschland

S. Mareike Pendzialek, Maria Schindler, Jacqueline Gürke, Elisa Haucke, Torsten Plösch, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos “Effects of an insulin-dependent diabetes mellitus on maternal and embryonic cholesterol metabolism during the preimplantation period: Insights from the rabbit model.” EpiConcept COST Action FA1201 Epigenetics and Periconception Environment, Workshop 2013, 13.-16. Oktober 2013, Sant Feliu de Guíxols, Spanien

## **Eidesstattliche Erklärung/ *Declaration under Oath***

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 ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

*I hereby declare that the thesis has not been handed in at any other university for reasons of graduation. I declare under penalty of perjury that this thesis is my own work entirely and has been written without any help from other people. I used only the sources mentioned and included all the citations correctly both in word or content.*

.....

Datum / *Date*

.....

Name des Antragstellers/  
*signature of applicant*

## Danksagung

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

Zunächst bedanke ich mich bei **Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer** für die Möglichkeit meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe am Institut für Anatomie und Zellbiologie anfertigen zu können und für die Bereitstellung des interessanten Themas. Seine Diskussionsbereitschaft und Kritik haben meine Dissertation stets vorangebracht. Im Besonderen danke ich ihm für die Ermöglichung zur Teilnahme an zahlreichen nationalen und internationalen Kongressen sowie der Realisierung eines Auslandsaufenthaltes, die eine große Bereicherung für mich waren und mich in meiner wissenschaftlichen Arbeit bestärkt haben. Er war und ist im wahrsten Sinne ein Doktorvater, der stets Interesse an fachlichen und privaten Gegebenheiten zeigte und immer wieder die Gelegenheit fand, um über sportliche Ereignisse zu fachsimpeln.

Mein ganz besonderer Dank gilt **apl. Prof. Dr. Anne Navarrete Santos**, die an der Entwicklung dieses Themas maßgeblich beteiligt war. Durch ihre stetige Diskussionsbereitschaft und Kritik hat sie mich zur selbstständigen und kritischen wissenschaftlichen Arbeit angeregt und mich gelehrt Dinge zu hinterfragen. Ihre immerwährende Unterstützung bei allen Problemen und Fragestellungen und ihr anhaltender Glaube an meine Fähigkeiten haben maßgeblich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen. Ihre Tür stand jederzeit offen für fachliche und private Freuden und Sorgen.

Ein großer Dank gilt **Sabine Schrötter** und **Michaela Kirstein** für die technische Unterstützung, die stete Hilfsbereitschaft und die allzeit offenen Ohren für Fragen aller Art. Danke für eure Ausdauer und die heitere und lockere Arbeitsatmosphäre, zu der ihr beigetragen habt.

Weiterhin möchte ich mich bei **Julia Knelangen, Jacqueline Gürke, Maria Schindler, Katarzyna Grybel, Elisa Haucke, Juliane-Susanne Jung, Tom Seeling, Kristina Schädlich** und **Matthias Jung** für die freundschaftliche und kollegiale Zusammenarbeit, die vielen konstruktiven Diskussionen und das stete Interesse an meiner Arbeit bedanken. Danke für die tolle Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und Unterstützung. Ihr habt an mich geglaubt und mich angespornt.

Ich möchte Frau **PD Dr. Elen Gocza** aus Gödöllő, Ungarn, danken, die mir während meiner Dissertation mit Rat und Tat zur Seite stand und die es mir ermöglichte im Rahmen eines kurzen wissenschaftlichen Aufenthaltes in ihren Laboren, die Sequenzanalyse von Kaninchenblastozysten, die Kultivierung von Kaninchen-iPS-Zellen sowie die Mikroinjektion von Kaninchenblastozysten zu erlernen.



Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich während meiner Dissertation begleitet und motiviert haben und immer an mich geglaubt haben. Danke **Mama**, dass du mir all das ermöglicht hast. Ohne deine Selbstlosigkeit stände ich nicht da, wo ich jetzt bin.

Lieber **Martin** und lieber kleiner **Ferdinand**, Ihr habt mir Kraft geschenkt, mich motiviert und mir großen Rückhalt gegeben. Danke für eure Ausdauer, Geduld und Verständnis. Mit euch ist die Welt bunt, hell und aufregend. Ihr seid mein größtes Glück.