

**" Expression, Signaltransduktion und Funktion von Adiponektin
und Adiponektinrezeptoren in Präimplantationsembryonen
des Kaninchens "**

Dissertation

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

angefertigt am

Institut für Anatomie und Zellbiologie

vorgelegt

von Frau Dipl.-Biol. Sünje Fischer

geb. am 22. April 1981 in Heide (Dithmarschen)

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer
Prof. Dr. Gerald Moritz
Prof. Dr. Anette-Gabriele Ziegler
Prof. Dr. Dr. Hans-Georg Joost

Datum der Verteidigung: 29. Juli 2013

1. EINLEITUNG	1
1.1 ZIELSTELLUNG DER ARBEIT	1
1.2 ADIPOKINE	2
1.2.1 ADIPONEKTIN	2
1.2.2 ADIPONEKTINREZEPTOREN	4
1.3 ADIPONEKTIN UND DER ZELLMETABOLISMUS	5
1.3.1 ZELLULÄRE SIGNALWEGE DER ADIPONEKTINREZEPTOREN	5
1.3.2 DIE REGULATION DES GLUKOSEMETABOLISMUS DURCH ADIPONEKTIN	7
1.4 ADIPONEKTIN IN DER SCHWANGERSCHAFT	8
1.5 DIE BEDEUTUNG DER GLUKOSE FÜR DIE BLASTOZYSTENENTWICKLUNG	10
1.6 EINFLUSS EINES DIABETES MELLITUS TYP 1 AUF DIE EMBRYONALENTWICKLUNG	11
1.7 CHARAKTERISIERUNG DER KEIMSCHIBE IM KANINCHEN	13
2. MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 VERSUCHSTIERE	16
2.1.1 VERSUCHSTIERHALTUNG	16
2.1.2 VERSUCHSGRUPPEN	17
2.1.3 EXPERIMENTELL INDUZIERTER DIABETES MELLITUS TYP 1 IM KANINCHEN	18
2.1.4 GEWINNUNG DER PRÄIMPLANTATIONSEMBRYONEN	18
2.1.5 GEWINNUNG DER BLUTPROBEN	19
2.1.6 ENTNAHME DER UTERI UND SEPARATION DES ENDOMETRIUMS	19
2.1.7 EMBRYONENKULTUR	19
2.1.8 MIKROSEKTION VON BLASTOZYSTEN	20
2.2 ZELLKULTUR	20
2.2.1 KULTIVIERUNG DER HEK-HUACRP30-ZELLINIE	20
2.2.2 GEWINNUNG UND ISOLIERUNG DES ÜBEREXPRIMIERTEN HUMANEN ADIPONEKTINS	21
2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	21
2.3.1 RNA-ISOLIERUNG	21
2.3.1.1 RNA-ISOLIERUNG AUS GEWEBEN	21
2.3.1.2 RNA-ISOLIERUNG AUS ZELLEN	22
2.3.1.3 MRNA-ISOLIERUNG AUS EMBRYONEN	22
2.3.2 RNA-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG	23
2.3.3 DNASE-VERDAU	23
2.3.4 CDNA-SYNTHESE	23
2.3.4.1 CDNA-SYNTHESE AUS RNA VON GEWEBE	24
2.3.4.2 CDNA-SYNTHESE AUS RNA VON BLASTOZYSTEN	24
2.3.4.3 POLYMERASE KETTENREAKTION (PCR)	24
2.3.4.4 <i>REAL TIME</i> PCR	25
2.3.5 RNA- UND DNA-GELELEKTROPHORESE	26
2.3.6 ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN	27
2.3.7 KLONIERUNG VON PCR-FRAGMENTEN	28
2.3.7.1 LIGATION DER PCR-FRAGMENTE	28

2.3.7.2 HERSTELLUNG DER KOMPETENTEN BAKTERIENZELLEN	28
2.3.7.3 TRANSFORMATION	28
2.3.7.4 PLASMIDISOLATION AUS <i>E. COLI</i>	29
2.3.7.5 RESTRIKTION	30
2.3.7.6 GLYCERINKULTUR	30
2.3.7.7 SEQUENZIERUNG	31
2.3.7.8 HERSTELLUNG DES DNA-PLASMID-STANDARDS	31
2.4 IMMUNHISTOCHEMISCHE METHODEN (IHC)	31
2.4.1 ANFERTIGUNG DER SCHNITTE	32
2.4.2 IMMUNHISTOCHEMIE AN PARAFFINSCHNITTEN	32
2.4.3 <i>WHOLE MOUNT</i> -IMMUNHISTOCHEMIE	33
2.4.3.1 <i>WHOLE MOUNT</i> -IMMUNHISTOCHEMIE MIT DAB-DETEKTION	33
2.4.3.2 <i>WHOLE MOUNT</i> -IMMUNHISTOCHEMIE MIT FLUORESZIERENDEM SEKUNDÄRANTIKÖRPER	34
2.4.4 IMMUNHISTOCHEMIE AN SEPARIERTEN EMBRYOBLASTEN (KEIMSCHEIBEN)	34
2.4.5 HÄMALAUNFÄRBUNG	35
2.5 PROTEINBIOCHEMIE	35
2.5.1. PROTEINISOLATION UND -QUANTIFIZIERUNG	35
2.5.2 SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	36
2.5.3 NATIVE GELELEKTROPHORESE	37
2.5.4 WESTERN-BLOT	38
2.5.5 HYBRIDISIERUNG MIT SPEZIFISCHEN ANTIKÖRPERN	39
2.5.6 DETEKTION UND AUSWERTUNG	39
2.5.7 ABWASCHEN DER NITROZELLULOSEMEMBRAN	40
2.5.8 ADIPONEKTIN-ELISA	40
2.6 GLUKOSEAUFNAHME VON KANINCHENBLASTOZYSTEN	41
2.7 STATISTISCHE ANALYSEN	42
3. ERGEBNISSE	43
3.1 EXPRESSION VON ADIPONEKTIN UND SEINEN REZEPTOREN IN PRÄIMPLANTATIONS- EMBRYONEN DES KANINCHENS	43
3.2 EXPRESSION VON MITGLIEDERN DER ADIPONEKTIN-SIGNALKASKADE IN PRÄIMPLANTATIONS-EMBRYONEN DES KANINCHENS	45
3.3 EXPRESSIONSPROFIL VON ADIPONEKTIN UND SEINEN REZEPTOREN <i>IN VIVO</i> UNTER DEM EINFLUSS EINES EXPERIMENTELL INDUZIERTEN MATERNALEN DIABETES MELLITUS TYP 1	46
3.3.1 ADIPONEKTIN UND SEINE REZEPTOREN AUF EMBRYONALER SEITE	46
3.3.1.1 ADIPONEKTIN	46
3.3.1.2 ADIPONEKTINREZEPTOREN	48
3.3.2 ADIPONEKTIN UND SEINE REZEPTOREN AUF MATERNALER SEITE	50
3.3.2.1 ADIPONEKTIN IM PLASMA	50
3.3.2.2 ADIPONEKTIN IM ENDOMETRIUM	51
3.3.2.3 ADIPONEKTINREZEPTOREN IM ENDOMETRIUM	51
3.4 AKTIVIERUNG DES ADIPONEKTIN-SIGNALWEGES IN PRÄIMPLANTATIONSEMBRYONEN DES KANINCHENS DURCH ADIPONEKTIN IN DER <i>IN-VITRO</i> -KULTUR	52

3.4.1 AKTIVIERUNG DES SCHLÜSSELENZYMS AMPK	52
3.4.2 AKTIVIERUNG DES PI3-KINASE- / AKT-SIGNALWEGES DURCH ADIPONEKTIN IN KANINCHENBLASTOZysten	53
3.4.3 WIRKUNG VON ADIPONEKTIN AUF SEINE REZEPTOREN	54
3.4.3.1 ADIPOR1	54
3.4.3.2 ADIPOR2	55
3.4.4 WIRKUNG VON ADIPONEKTIN AUF DEN GLUKOSESTOFFWECHSEL VON KANINCHENBLASTOZysten	57
3.4.4.1 GLUKONEOGENESE	57
3.4.4.2 EXPRESSION DER GLUKOSETRANSPORTER 1 UND 4	58
3.4.4.3 GLUT4-TRANSLOKATION	60
3.4.4.4 GLUKOSEAUFNAHME	62
4. DISKUSSION	63
4.1 EXPRESSION VON ADIPONEKTIN UND SEINEN REZEPTOREN IN PRÄIMPLANTATIONS-EMBRYONEN	63
4.2 EXPRESSION VON MITGLIEDERN DER ADIPONEKTIN-SIGNALKASKADE IN PRÄIMPLANTATIONS-EMBRYONEN	63
4.3 HORMONELLE INTERAKTIONEN ZWISCHEN ADIPONEKTIN UND INSULIN	65
4.4 ANPASSUNG DES EMBRYONALEN ADIPONEKTIN-ADIPOR-SYSTEMS AN EINEN MÜTTERLICHEN DIABETES	67
4.4.1 DER EINFLUSS EINES EXPERIMENTELL INDUZIERTEN DIABETES MELLITUS TYP 1 <i>IN VIVO</i> AUF ADIPONEKTIN UND SEINE REZEPTOREN	68
4.4.1.1 AUSWIRKUNGEN EINES EXPERIMENTELL INDUZIERTEN DIABETES MELLITUS TYP 1 <i>IN VIVO</i> AUF DEN MÜTTERLICHEN ORGANISMUS	68
4.4.1.2 ANPASSUNGEN DER EMBRYONALEN ADIPONEKTIN-ADIPOR-EXPRESSION AN EINEN MÜTTERLICHEN DIABETES	71
4.4.1.3 AUSWIRKUNGEN EINES EXPERIMENTELL INDUZIERTEN DIABETES MELLITUS TYP 1 <i>IN VIVO</i> AUF DEN EMBRYO	72
4.4.1.4 ZUSAMMENFASSUNG DER VERÄNDERUNGEN EINES EXPERIMENTELL INDUZIERTEN DIABETES MELLITUS TYP 1 AUF DAS ADIPONEKTINSYSTEM	75
4.4.2 BEEINFLUSSUNG DES GLUKOSESTOFFWECHSELS DER KANINCHENBLASTOZyste DURCH ADIPONEKTIN	75
4.4.2.1 GLUKOSEAUFNAHME	75
4.4.2.2 GLUKONEOGENESE	77
4.4.2.3 ZUSAMMENFASSUNG DER REGULATION DES GLUKOSEMETABOLISMUS DURCH ADIPONEKTIN IM PRÄIMPLANTATIONSEMBRYO DES KANINCHENS	80
5. ZUSAMMENFASSUNG	82
6. LITERATURVERZEICHNIS	85
7. ANHANG	I

7.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	I
7.2	TABELLENVERZEICHNIS	II
7.3	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	II
7.4	GERÄTE- UND SOFTWAREVERZEICHNIS	V
7.4.1	GERÄTE	V
7.4.2	SOFTWARE	VI
7.5	CHEMIKALIEN- UND VERBRAUCHSMATERIALIENVERZEICHNIS	VI
7.6	ANTIKÖRPERVERZEICHNIS	X
7.7	BEISPIEL FÜR DIE AUSWERTUNG EINER <i>REAL TIME</i> PCR	XI
7.8	AMPK-PHOSPHORYLIERUNG IN RK13-ZELLEN	XIII
8.	LEBENS LAUF	XIV
9.	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	XVI
10.	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	XXII
11.	DANKSAGUNG	XXIII

1. Einleitung

1.1 Zielstellung der Arbeit

Erkrankungen aus dem Kreis des Metabolischen Syndroms (z.B. Adipositas, Diabetes mellitus, Lipidstoffwechselstörungen, Herz-Kreislauf-Erkrankungen) nehmen weltweit rasant zu. Mittlerweile ist in Europa fast jede dritte Frau im gebärfähigen Alter übergewichtig. Eine maternale Adipositas und / oder ein maternaler Diabetes mellitus erhöht das Risiko der Nachkommen, im Erwachsenenalter am Metabolischen Syndrom zu erkranken [1–20].

Der britische Wissenschaftler Professor David J. P. Barker hat aufgrund epidemiologischer Untersuchungen zu Beginn der 1990er Jahre die nach ihm benannte Hypothese formuliert, der zufolge es einen Zusammenhang zwischen dem Geburtsgewicht und dem Risiko für bestimmte Erkrankungen im Erwachsenenalter gibt (Barker-Hypothese, auch DOHaD (Developmental Origin of Health and Disease) genannt) [21]. Je niedriger das Geburtsgewicht ist, desto höher ist die Anfälligkeit für Krankheiten des Metabolischen Syndroms. Die Barker-Hypothese wurde inzwischen in Tiermodellen experimentell untermauert [22–25] und konnte auch in Studien an Patienten bestätigt werden [21,26–42]. Der Einfluss des mütterlichen Stoffwechselgeschehens auf die Entwicklung der Nachkommen betrifft bereits die ersten Tage der Schwangerschaft, die Präimplantationsphase, und erstreckt sich nach neueren Untersuchungen schon auf die Oozytenentwicklung vor der Befruchtung [43–45].

Im Zentrum des wissenschaftlichen Interesses stehen die Fragen nach den Wechselwirkungen zwischen Mutter und Embryo, die bei der Weitergabe von Stoffwechselstörungen von der Mutter auf ihre Nachkommen zum Tragen kommen. Fettgewebshormone wie die Adipokine spielen in der Ätiologie des Metabolischen Syndroms eine wichtige Rolle. Es ist von wissenschaftlichem und klinischem Interesse zu klären, welche Funktionen Adipokine in der Präimplantationsphase haben und ob sie an einer pränatalen Dysregulierung und metabolischen Programmierung beteiligt sind.

In der vorliegenden Arbeit soll am Versuchstiermodell des Kaninchens geklärt werden, wie das Hormon Adiponektin den embryonalen Metabolismus in der Präimplantationsphase beeinflusst. Desweiteren soll untersucht werden, ob und wie Adiponektin an der embryo-maternalen Interaktion in dieser Phase beteiligt ist. Dazu wurde das Adiponektin-Adiponektinrezeptorsystem in Blastozysten und im graviden Uterus charakterisiert. Die Wirkungen von Adiponektin auf die beiden Zelllinien in der Blastozyste, den Embryoblasten und Trophoblasten, wurde durch *in vitro* Stimulations- und Inhibitionsversuche analysiert. Hierbei standen die Signaltransduktion und Funktion für die Glukoseaufnahme im Fokus.

Zudem wurde der Einfluss eines maternalen, experimentell induzierten Diabetes mellitus Typ 1 auf das Adiponektin-Adiponektinrezeptorsystem in Blastozysten und im graviden Uterus untersucht. Es wurde analysiert, ob ein experimentell induzierter Diabetes mellitus Typ 1 zu einer veränderten Adiponektin-Signaltransduktion und Wirkung in Blastozysten führt.

1.2 Adipokine

Adipokine sind Hormone, die – laut der ursprünglichen Definition – vom Fettgewebe sezerniert werden. Seit der Entdeckung der Adipokine gilt das Fettgewebe nicht mehr nur als inaktiver Fettspeicher. Das Fettgewebe ist ein endokrines Organ, das eine Vielzahl biologisch aktiver Polypeptide sezerniert, die den Metabolismus und die Energiehomeostase regulieren [46–48]. Zu diesen Hormonen gehören unter anderem Adiponektin, Leptin, Resistin, Visfatin, Chemerin und Apelin.

1.2.1 Adiponektin

Adiponektin ist ein 26-kDa großes Polypeptid, das vorwiegend, aber nicht ausschließlich durch adulte Fettzellen synthetisiert und sezerniert wird. Strukturell wird es der Komplement 1q-Familie (siehe Abb. 2) zugeordnet [49–52]. Das humane Adiponektin konnte auf dem Chromosom 3 Locus q27 lokalisiert werden. Dieser wird mit einer Prädisposition für Diabetes mellitus Typ 2 und für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert [53]. Die Genstruktur weist drei Exons und zwei Introns auf und zeigt eine hohe Übereinstimmung mit dem Leptin, dem Anti-Adipositasgen *par excellence* [54]. Im Adiponektinlokus konnten verschiedene Einzelbasenaustausche (SNPs) lokalisiert werden. Diese SNPs werden mit Diabetes mellitus Typ 2 [55,56], einem ansteigenden *Body Mass Index* (BMI) [57], erhöhtem Bauchumfang [58,59], Dyslipidämie [60], Bluthochdruck und aortokoronaren Erkrankungen [55,56] korreliert.

Adiponektin kommt als *full-length* Protein (fl-Adiponektin) oder als kleineres, globuläres Fragment (g-Adiponektin) im Plasma vor (siehe Abb. 2) [61]. Das g-Adiponektin entsteht durch proteolytische Spaltung, die z.B. durch eine Leukozyten-Elastase, aus aktivierten Monozyten und Neutrophilen katalysiert wird [62]. Die pathophysiologische Bedeutung dieser Spaltung *in vivo* ist noch nicht geklärt.

Adiponektin ist in der Lage, charakteristische Homomultimere zu formen (siehe Abb. 1) [52], die durch Disulfidbrückenbindungen am Cys-39 entstehen [63]. Durch eine native Polyacrylamidgelelektrophorese kann eine Separierung der verschiedenen Adiponektin-Multimere (siehe Abb. 1a) erreicht werden [64]. Humanes und murines Serum weisen eine Vielzahl dieser Multimere auf. Die Bandbreite geht von Trimeren und Hexameren über hochmolekulargewichtige (HMW) Multimere [64] wie z.B. Dodekamere [52,65,66].

Adiponektin zirkuliert unter physiologischen Bedingungen in Konzentrationen von 0,5 – 30 µg/ml im Plasma und kann bis zu 0,01% der gesamten Plasmaproteine ausmachen [67]. Die Aktivierbarkeit der intrazellulären Signalwege ist von der jeweiligen Adiponektinisoform und der Rezeptorausstattung abhängig [68].

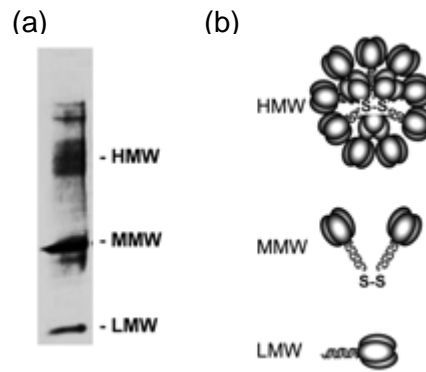


Abb. 1: Adiponektinisoformen

- (a) Western Blot-Analyse von Adiponektin
- (b) Schematische Darstellung der Adiponektinmultimere

HMW = *High molecular weight* Adiponektin;
 MMW = *Middle molecular weight* Adiponektin;
 LMW = *Low molecular weight* Adiponektin

(aus Kadowaki und Yamauchi, 2005 [69])

Adiponektin übt mannigfaltige Funktionen im Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel aus. Seit seiner Entdeckung 1996 durch vier unabhängige Forschergruppen [43,70–72] implizieren viele Publikationen eine Rolle von Adiponektin in pathologischen Prozessen, wie z.B. Adipositas oder Diabetes mellitus Typ 2. Paradoxaerweise, obwohl es unter anderem vom Fettgewebe sezerniert wird, ist die Adiponektinkonzentration mit Adipositas und Adipositas-assoziierten Erkrankungen, wie z.B. Diabetes mellitus Typ 2, kardiovaskuläre Erkrankungen oder hepatische Dysfunktionen, invers korreliert [44,73–77]. Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 1 hingegen weisen eine erhöhte Adiponektinkonzentration auf [78–80].

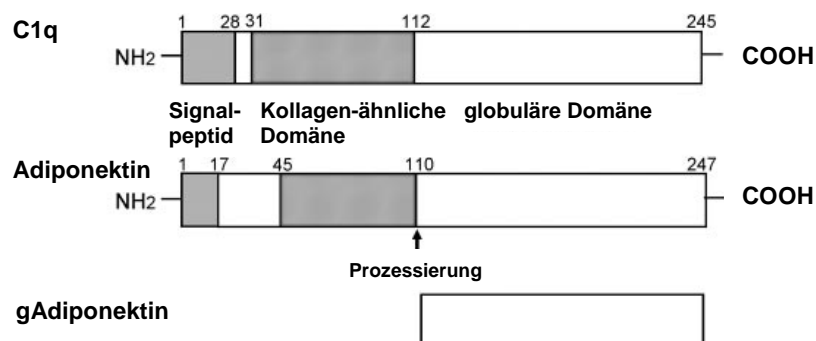


Abb. 2: Schematische Darstellung von Adiponektin und Komplement 1q.

Adiponektin besteht aus einer N-terminalen Kollagen-ähnlichen Sequenz und einer C-terminalen globulären Region.

C1q – Komplement 1q ; gAdiponektin – globuläres Adiponektin
 (modifiziert nach Kadowaki und Yamauchi, 2005 [69])

1.2.2 Adiponektinrezeptoren

Die biologische Wirkung von Adiponektin wird über die Bindung an spezifische membranständige Rezeptoren, den Adiponektinrezeptoren 1 und 2 (AdipoR1/2), vermittelt [81]. Eine bemerkenswerte Eigenschaft dieser beiden Rezeptoren ist die große Anzahl an Geweben, in denen sie exprimiert werden. Sie wurden in nahezu allen humanen und murinen Geweben nachgewiesen [82,83].

AdipoR1/2 sind integrale Membranproteine, die in ihrer Aminosäuresequenz zu ca. 67% identisch sind [82] (siehe Abb. 3). Diese beiden Rezeptoren sind in der Lage, sowohl Homo- als auch Heteromultimere zu bilden [84,85]. Diese Multimere dissoziieren vermutlich nach der Ligandenbindung wieder auseinander [84].

Die Tertiärstruktur beider Rezeptorisoformen ist bisher noch nicht aufgeklärt. Es wird angenommen, dass es sich um heptahelikale Rezeptoren handelt [82], die in ihrer Topologie den G-Protein gekoppelten Rezeptoren ähneln [86–88]. Ein Unterschied besteht in der Lage des N-Terminus, welcher intrazellulär lokalisiert ist, und des C-terminalen Endes, welches extrazellulär orientiert ist [82,89]. Dies entspräche einer entgegengesetzten Topologie aller bisher bekannten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Aufgrund dieser strukturellen Besonderheiten wurden die Adiponektinrezeptoren in eine neue Superfamilie eingeordnet. Zusammen mit den Progesterinrezeptoren gehören sie der Progesterin- und Adiponektinrezeptor-Superfamilie (PAQR) an [90], die bisher elf Mitglieder umfasst. Zu diesen zählen die beiden AdipoRs und drei Progesterinrezeptoren (Progesteronrezeptor- α , - β , - γ). Die restlichen Familienmitglieder sind strukturähnliche Rezeptoren mit unbekannter Funktion. Die Klassifizierung in diese Familie erfolgt ausschließlich anhand der Anwesenheit der sieben Transmembranhelices, die durch drei kurze Aminosäuresequenzen flankiert werden. Welcher molekulare Mechanismus die Grundlage bildet und welcher physiologische Vorteil sich durch die Orientierung der Rezeptoren ergibt, ist noch nicht geklärt.

AdipoRs sind hochkonserviert. Das Homologon in der Hefe, YOL002c, reguliert unter anderem den Lipidmetabolismus wie in anderen Säugern [91].

Obwohl bisher noch keine exakte Bindungsstelle des Adiponektins an die beiden Rezeptoren bekannt ist, weisen die Rezeptoren unterschiedliche Bindungsaffinitäten für fl- und g-Adiponektin auf [81,82]. AdipoR1 bindet globuläres Adiponektin mit hoher Affinität, während fl-Adiponektin eine geringere Affinität zeigt. Dagegen weist AdipoR2 eine intermediäre Affinität für beide Adiponektinisoformen auf. Ob diese unterschiedliche Bindungsart physiologisch relevant ist, ist nicht geklärt, da überwiegend fl-Adiponektin im Plasma vorliegt [69], während g-Adiponektin nur in geringen Konzentrationen im Blut präsent ist [61,64].

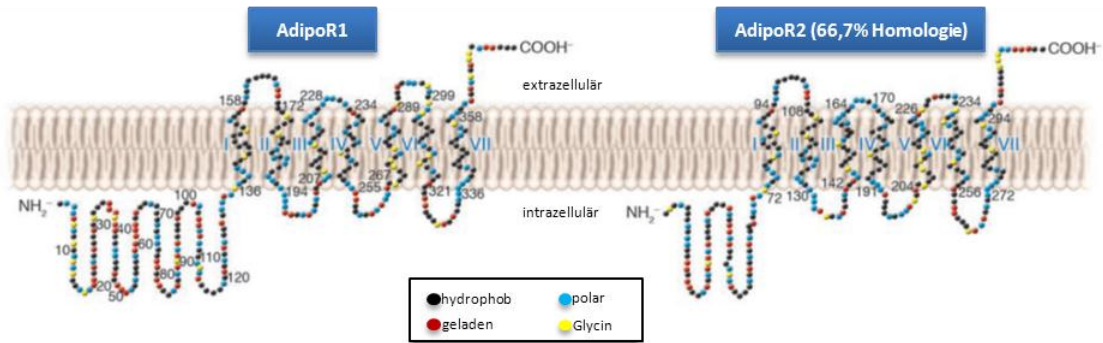


Abb. 3: Struktur der Adiponektinrezeptoren.

AdipoR1 und R2 weisen 7 Transmembrandomänen, einen extrazellulären C- und einen intrazellulären N-Terminus auf. AdipoR2 ist in 66,7% der Aminosäuren mit AdipoR1 identisch.

(modifiziert nach Kadowaki *et al.*, 2006 [68])

1.3 Adiponektin und der Zellmetabolismus

1.3.1 Zelluläre Signalwege der Adiponektinrezeptoren

Die beiden Adiponektinrezeptoren werden in Geweben unterschiedlich exprimiert. AdipoR1 kommt vorwiegend im Skelettmuskel und AdipoR2 hauptsächlich in der Leber vor [82]. Hinzu kommt, dass die beiden Rezeptoren, wie bereits im Kapitel 1.2.2 beschrieben, unterschiedliche Affinitäten für die verschiedenen Isoformen von Adiponektin aufweisen.

Die metabolische Wirkung von Adiponektin vermittelt die AMP-Kinase alpha 1/2 (AMPK) (siehe Abb. 4). Diese reguliert sowohl den Glukosemetabolismus als auch den Lipidmetabolismus [92]. Dabei induziert die Phosphorylierung der AMPK katabolische Stoffwechselwege wie z.B. Fettsäureoxidation und Glykolyse, während anabole Wege (z.B. Lipogenese und Glukoneogenese) abgeschaltet werden. Bekannte Ziele der AMPK sind die Acetyl-Coenzym A Carboxylase (ACC), die den Lipidmetabolismus reguliert, die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase 2 (PEPCK), das Schlüsselenzym der Glukoneogenese und der Glukosetransporter 4 (GLUT4), der Insulin-sensitiv die Aufnahme von Glukose in die Zelle reguliert [93–96].

Die Charakterisierung dieser Signalwege im Einzelnen steht erst am Anfang. Am Beispiel des Skelettmuskels und der Leber soll dies verdeutlicht werden (siehe Abb. 4). Allgemein lässt sich sagen, dass alle Isoformen im Skelettmuskel aktiv sind, während in der Leber nur fl- und HMW-Adiponektin eine biologische Antwort induzieren können [64,92,97].

Adiponektin-Signalkaskade in Skelettmuskelzellen

Im Skelettmuskel sind alle Adiponektinvarianten aktiv [98]. Durch die Bindung von Adiponektin an AdipoR1 interagiert der N-Terminus des Rezeptors mit dem intrazellulären Bindungspartner APPL1 (*adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 1*) [99]. Dieser stimuliert die Phosphorylierung von AMPK und p38MAPK und steigert so die β -Oxidation und die Glukoseaufnahme [99]. Letzteres wird bedingt durch die Interaktion von

Rab5 mit APPL1, wodurch die Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran induziert wird [99]. Die Aktivierung der AMPK beruht auf einer direkten Interaktion von APPL1 mit LKB1, der wichtigsten AMPK-Kinase [100]. Die so aktivierte AMPK ist ihrerseits in der Lage, die ACC zu phosphorylieren und folglich zu inhibieren [101]. Die ACC stellt das Schlüsselenzym der Fettsäuresynthese dar. Durch ihre Inhibierung kommt es zu einer Reduzierung der Malonyl-CoA-Konzentration im Zytoplasma und daher zu einem gesteigerten Import von freien Fettsäuren in die Mitochondrien durch die Carnitin-Palmitoyltransferase 1 (CPT1) [102,103]. In den Mitochondrien werden diese Fettsäuren oxidiert.

Desweiteren wird die p38MAPK durch die AMPK phosphoryliert, so dass diese PPAR α aktivieren kann [86,104]. PPAR α ist ein Transkriptionsfaktor, der die Promotoraktivität vieler Gene des Fettsäuremetabolismus kontrolliert. Hierzu zählen unter anderem *Cluster of Differentiation* (CD36), *Acetyl CoA Oxidase* (ACO), *Uncoupling Protein 2* (UCP2) und das *Sterol regulatory element-binding protein 1c* (SREBP1c). Adiponektin erhöht die Expression von CD36, ACO und UCP2, während SREBP1c herunterreguliert wird. Diese vier Proteine sind Schlüsselenzyme, die Fettsäuretransport, -synthese oder -abbau regulieren [105,106].

Adiponektin beeinflusst in der Skelettmuskulatur den Glukose- und Fettsäuremetabolismus hauptsächlich über AdipoR1, indem die Oxidation freier Fettsäuren und die Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran gesteigert werden [69,81,99,102].

Adiponektin-Signalkaskade in Leberzellen

Die Leberzelle reagiert ausschließlich auf fl- oder HMW-Adiponektin, obwohl AdipoR2 alle Isoformen in gleichem Maße binden kann [82,98]. In der Leber reguliert Adiponektin ebenfalls den Glukose- und Fettsäuremetabolismus, jedoch anders als in der Skelettmuskulatur.

Eine Gemeinsamkeit zwischen der Muskel- und der Leberzelle ist die Interaktion zwischen AdipoR1 und APPL1 mit nachgeschalteter Aktivierung der AMPK und Inhibierung der ACC. Die aktivierte AMPK führt in der Leber zu einer Reduzierung der Schlüsselenzyme der hepatischen Glukoneogenese (Glukose-6-Phosphatase (G6P) und Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK)) [81,92,99,107].

Die PEPCK katalysiert die Umkehrreaktion der Glykolyse vom Oxalacetat zum Phosphoenolpyruvat. In adulten Leberzellen wird die PEPCK durch cAMP aktiviert und durch Insulin gehemmt [108]. Die Regulation durch Insulin erfolgt über den Transkriptionsfaktor FOXO, dessen Phosphorylierung über den PI3-K/Akt-Weg zur Abnahme der PEPCK-Transkriptmenge führt [109].

Desweiteren wird PPAR α hier nicht über die AMPK aktiviert, sondern, über AdipoR2 [81]. Es werden aber dennoch die gleichen Gene (CD36, ACO, UCP2 und SREBP1c) wie in der Skelettmuskulatur reguliert.

Adiponektin zeigt eine andere Wirkung auf die Leber- als auf die Skelettmuskelzelle. Es inhibiert die Glukoneogenese und aktiviert die β -Oxidation [81,92,99].

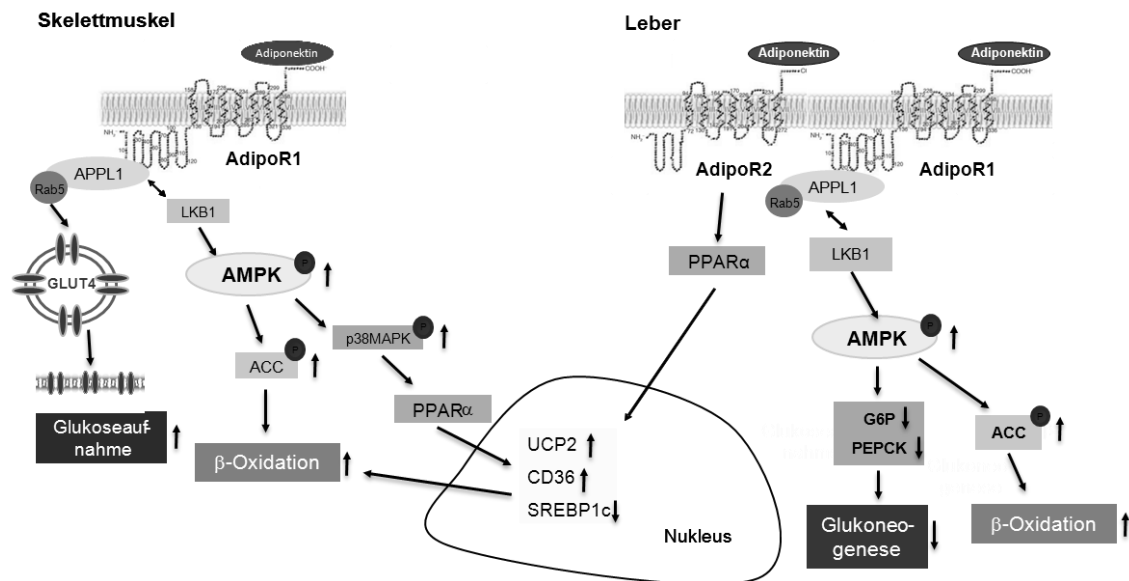


Abb. 4: Adiponektin-Signalkaskade in der Skelettmuskulatur und der Leberzelle

ACC – Acetyl-CoA Carboxylase; ACO – Acetyl-CoA Oxidase; AdipoR1/2 – Adiponektinrezeptor 1/2; AMPK – AMP-aktivierte Proteinkinase; APPL1 – *Adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 1*; CD36 – *Cluster of Differentiation 36*; G6P – Glukose-6-Phosphatase; GLUT4 – Glukosetransporter 4; LKB1 – Serin/Threoninkinase 11; p38MAPK – p38-mitogenaktivierte Proteinkinase; PEPCK – Phosphoenolpyruvatcarboxykinase; PPAR α – Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor alpha; Rab5 – *RAS-related protein 5*; UCP2 – *Mitochondrial uncoupling protein 2*; SREBP1c – *sterol regulatory element-binding protein*, • – Phosphorylierung

1.3.2 Die Regulation des Glukosemetabolismus durch Adiponektin

Adiponektin kann wie gerade beschrieben den Glukosemetabolismus in der Leber und im Skelettmuskel regulieren. Dazu gehört eine gesteigerte Glukoseaufnahme im Skelettmuskel, die durch eine verstärkte GLUT4-Translokation zur Plasmamembran ausgelöst wird [82,110]. Außerdem wird die Expression der Glukose-6-Phosphatase (G6P) und der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK), die Schlüsselenzyme der hepatischen Glukoneogenese sind, reduziert [81,92,99]. Diese Effekte werden alle durch den AdipoR1, der nach Bindung von Adiponektin die Phosphorylierung der AMPK initiiert, vermittelt [81].

Wie genau die durch Adiponektin induzierte Signaltransduktion abläuft, ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Im Jahr 2006 konnte das erste AdipoR-Adaptorprotein identifiziert werden – APPL1 [99]. Dieses interagiert mit dem N-Terminus beider AdipoRs. Die Bindung von APPL1 an AdipoR1 aktiviert die AMPK und steigert die Glukoseaufnahme [99]. Die AMPK wird phosphoryliert indem APPL1 direkt mit der Serin-/Threoninkinase 11 (LKB1 oder STK11) interagiert, eine der wichtigsten AMPK-Kinasen [100]. Daraufhin kommt es zur Phosphorylierung von *CREB (cAMP responsive element-binding protein) regulated transcriptional coactivator 2* (CRTC2) [111]. Dies ist ein CREB-Coaktivator, der die hepatische Glukoneogenese transkriptionell reguliert [112]. Es kommt zur Reduktion der G6P und PEPCK. Außerdem kann die AMPK den *orphan nuclear receptor small heterodimer partner* (SHP) aktivieren. Dieser Transkriptionsrepressor verhindert die Transkription des PEPCK-Gens [113].

Neben der Aktivierung der AMPK kann Akt durch Adiponektin phosphoryliert werden. Dies kann zusätzlich die Transkription der PEPCK inhibieren, wie es unter dem Einfluss von Insulin der Fall ist [114].

Die Glukoseaufnahme wird über die Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran gesteigert. Sowohl g-Adiponektin als auch fl-Adiponektin können den Einbau von GLUT4 in die Membran AdipoR1-vermittelt induzieren. Die Aktivierung von AdipoR1 führt zur Bindung von APPL1 [99,115] und der GTPase Rab5 (*Ras-related protein Rab-5*) [99]. Dies resultiert in der Translokation des GLUT4-Proteins [99]. Desweiteren ist es möglich, dass die AMPK selber und die p38MAPK (p38-mitogenaktivierte Proteinkinase) zur GLUT4-Translokation beitragen [99]. Die weitere Abfolge innerhalb der Adiponektin-induzierten GLUT4-Translokation ist noch nicht bekannt.

1.4 Adiponektin in der Schwangerschaft

Der physiologische Adiponektin-Serumspiegel ist abhängig vom Schwangerschaftsstadium:

Hohe Adiponektinkonzentrationen in der frühen Schwangerschaft verbessern die maternale Speicherung von Nährstoffen. Abnehmende Werte in der späteren Schwangerschaft begünstigen die Bereitstellung von Energiespeichern. Im Verlauf der Schwangerschaft adipöser Frauen gibt es dagegen keine Konzentrationsunterschiede von Adiponektin [116].

Auch aus Untersuchungen bei Mäusen ist bekannt, dass zum Ende der Gravidität die Adiponektinkonzentration im maternalen Serum abnimmt [117]. Deshalb wird vermutet, dass Adiponektin bei der Entwicklung der Insulinresistenz in der späten Schwangerschaft eine Rolle spielt. Diese Insulinresistenz ist eines der Kennzeichen einer humanen Schwangerschaft [118–122]. Interessanterweise weist eine Änderung der Adiponektinkonzentration im maternalen Serum auf eine Veränderung der maternalen Insulinsensitivität hin [123–126].

Die Schwangerschaft erfordert eine große Energieaufnahme und –aktivierung durch die Mutter [127]. Um eine normale fetale Entwicklung zu gewährleisten, wird die erste Hälfte der Schwangerschaft dazu genutzt, auf maternaler Seite Fettreserven anzulegen. In der zweiten Hälfte bildet sich eine Insulinresistenz bei der Mutter aus. Diese verhindert einen Anstieg der hepatischen Glukoneogenese und eine Abnahme der maternalen Glukoseaufnahme in den eigenen Skelettmuskel und das eigene Fettgewebe und steigert gleichzeitig die Lipolyse im Fettgewebe, um Glukose und Lipide dem Fötus zur Verfügung zu stellen [128,129].

In Übereinstimmung mit den Stoffwechselprozessen ist die Adiponektinkonzentration der Mutter im Serum in der ersten Hälfte der Schwangerschaft erhöht [130,131]. In der zweiten Hälfte der Schwangerschaft fällt der Adiponektinspiegel im maternalen Serum [121] proportional zum Anstieg des mütterlichen BMI und der sich entwickelnden Insulinresistenz wieder ab [121,131,132].

Frauen mit Gestationsdiabetes weisen eine geringere Adiponektinkonzentrationen im Serum auf [126,133]. Ein Gestationsdiabetes zeichnet sich durch eine Insulinresistenz und Glukoseintoleranz aus. Desweiteren sind niedrige Adiponektinkonzentrationen typischerweise mit einem gesteigerten Risiko verbunden, Babys mit einem erhöhten Geburtsgewicht (*large for*

gestational age) oder makrosome Babys zu bekommen [134]. Geringe Adiponektinkonzentrationen im ersten Trimester sind ein Indiz für einen späteren Gestationsdiabetes [135,136]. Wenn die Adiponektinkonzentration einer Schwangeren unterhalb von 6,4 µg/ml im Serum liegt, ist das Risiko für einen Gestationsdiabetes um das 2,4-fache erhöht. Kommt zu diesem niedrigen Wert auch noch eine Adipositas hinzu, dann erhöht sich das Risiko um den Faktor 11 [136]. Ein Gestationsdiabetes tritt bei insgesamt 2 bis 8% aller Schwangerschaften auf [137,138].

Die Adiponektinkonzentration im Nabelschnurblut des Fetus nimmt ab der 24. Woche der Schwangerschaft deutlich zu. Um den Entbindungstermin herum erreichen diese Werte ein Plateau und die Konzentration ist gegenüber der 24. Woche um das 20-fache gestiegen [139]. Diese Konzentrationen liegen deutlich über denen im Serum eines Erwachsenen (Faktor 2 bis 3) [139–147].

Im dritten Trimester der Schwangerschaft steigert sich das Fettgewebe im Fötus deutlich. Parallel zu dieser Zunahme nimmt auch die Adiponektinkonzentration im Nabelschnurblut zu [139], d.h. im Fötus liegt eine positive Korrelation der Adiponektinkonzentration mit dem BMI vor [139], während in Erwachsenen und Kindern ein negativer Zusammenhang existiert. Vermutlich ist dieses Phänomen auf das braune Fettgewebe des Fötus zurückzuführen. Dieses macht ca. 5 % des Gesamtgewichtes des Fötus aus [148]. Im braunen Fettgewebe wird die Expression von Adiponektin anders reguliert als im weißen. Insulin wirkt in weißen Adipozyten inhibitorisch auf die Synthese von Adiponektin [149], während es in braunen Adipozyten stimulierend wirkt [150].

Adiponektin in der Prä- und Periimplantationsphase der Schwangerschaft

Adiponektin und seine beiden Rezeptoren sind während der Prä- und Periimplantationsphase in verschiedenen Säugern präsent. Dies weist daraufhin, dass Adiponektin schon zu diesem Zeitpunkt wichtig für den Embryo ist.

Bisher konnten Adiponektin und seine beiden Rezeptoren während der Präimplantationsphase in Maus- [151–153], Rind- [154] und Kaninchenembryonen [151,155] nachgewiesen werden (siehe Tabelle 1). Die genaue Datenlage in einzelnen Spezies während der Präimplantationsphase ist in Tabelle 1 zusammengestellt.

Auf maternaler Seite konnte Adiponektin im Uterus während der Periimplantationsphase von Maus und Kaninchen [151,152] und die beiden Adiponektinrezeptoren (AdipoR1 / R2) im humanen [156] und Schweineuterus [157] nachgewiesen werden. Eine relevante Rolle von Adiponektin während der Implantation wird dadurch unterstrichen, dass Adiponektin und seine beiden Rezeptoren in den Implantationsbereichen im Uterus der Maus hochreguliert werden [152]. Adiponektin *Knock out*-Mäuse sind fertil. Offensichtlich können die Aufgaben von Adiponektin durch *complement-C1q TNF-related proteins* (CTRPs) oder bisher noch unbekannte Vertreter kompensiert werden [158].

Ein Fehlen von Adiponektin beeinflusst die Fertilität von Mäusen nicht [158]. Dennoch sind zu niedrige mütterliche Adiponektinkonzentrationen ein Indiz für eine veränderte

Stoffwechsellage der Mutter, die die Wahrscheinlichkeit von Schwangerschaftskomplikationen, wie beispielsweise einem Gestationsdiabetes, erhöhen [135,136].

Tabelle 1: Adiponektin und seine beiden Rezeptoren in der Präimplantationsphase verschiedener Säuger (n.b. – nicht bekannt)

	Kaninchen [151,155]	Maus [151–153]	Schwein [159]	Rind [154]
Adiponektin	▪ Blastozyste	▪ Oozyte ▪ 1- bis 16- Zellstadium ▪ Blastozyste	n.b.	▪ Oozyte ▪ Blastozyste
AdipoR1	▪ Blastozyste	▪ Oozyte ▪ 1- bis 16- Zellstadium ▪ Blastozyste	▪ Oozyte ▪ 2-Zellstadium ▪ Blastozyste	▪ Oozyte ▪ Blastozyste
AdipoR2	▪ Blastozyste	▪ Oozyte ▪ 1-, 2-, 4-, 8- und 16- Zellstadium ▪ Blastozyste	▪ Oozyte ▪ 2-Zellstadium ▪ Blastozyste	▪ Oozyte ▪ Blastozyste

1.5 Die Bedeutung der Glukose für die Blastozystenentwicklung

Die Energiegewinnung in Säugetierembryonen wird durch verschiedene Stoffwechselwege gesichert und ist abhängig von der Spezies und vom Entwicklungsstadium des Embryos. Vor der Kompaktierung der Furchungsstadien werden als Substrate hauptsächlich Laktat und Pyruvat verbraucht. Glukose wird erst ab der Blastozystenbildung metabolisiert [Mensch [160,161], Maus [162–164], Ratte [165], Kaninchen [166], Rind [167,168], Schaf [169], Schwein [170]]. In Schweine- und Rinderembryonen steigt der Glukoseverbrauch zwischen dem 1-/ 2-Zellstadium und dem Blastozystenstadium um das ca. 150- bis 300-fache an [168,170]. Glukose, Laktat und Pyruvat dienen zur Energiegewinnung durch die Glykolyse, über den Zitratzyklus und durch oxidative Phosphorylierung. Pentosen für die Nukleinsäuresynthese werden über den Pentosephosphatweg gebildet. Der Wechsel von Pyruvat zu Glukose ist begleitet von einem Wechsel vom aeroben zum anaeroben Stoffwechsel, vermutlich bedingt durch die sauerstoffarme Umgebung, in der sich der Embryo vor und während der Implantation im Uterus entwickelt [171,172]. Sind diese Stoffwechselwege im Embryo gestört, kann es zu Implantationsstörungen und Aborten kommen. Aber auch Entwicklungsverzögerungen mit langfristigen Nachwirkungen wie prä- bzw. postnataler Mortalität können daraus resultieren [173].

Glukose ist ein polares Molekül, welches über Transportproteine in die Zelle aufgenommen wird. Diese sind entweder aktive Natrium-Glukose-Cotransporter (SGLT) oder

energieunabhängige passive Glukosetransporter (GLUT). Der Präimplantationsembryo ist mit mindestens drei GLUTs ausgestattet, die entwicklungspezifisch exprimiert werden [174–176]. Die Rate der Glukoseaufnahme durch den Embryo liegt dabei im pM-Bereich [177–180].

1.6 Einfluss eines Diabetes mellitus Typ 1 auf die Embryonalentwicklung

Für einen erfolgreichen Implantationsprozess und die zeitgerechte Entwicklung des Embryos ist eine enge Interaktion zwischen Mutter und Embryo erforderlich. Exogene Faktoren, wie chronische oder akute Veränderung der Nahrungsaufnahme, haben einen Effekt auf die Fertilität von Säugetieren. Infolge von maternalen Diäten mit einer modifizierten Kalorienzahl oder einer veränderten Aufnahme bestimmter Nährstoffe kann die Embryonal- und Fetalentwicklung beeinflusst werden.

Der maternale Stoffwechsel kann auch durch pathologische Erkrankungen wie einen maternalen Diabetes mellitus Typ 1 und 2 oder Adipositas fehlreguliert werden. Das Krankheitsbild eines Typ 1 Diabetes wird durch einen absoluten Mangel an Insulin hervorgerufen.

Dieser Insulinmangel ist beim Menschen auf eine durch Infektionen und Autoimmunreaktionen ausgelöste Zerstörung der pankreatischen β -Zellen zurückzuführen [181,182]. Infolge des Insulinmangels ergeben sich eine Reihe von Konsequenzen für den Organismus. Der Glukosetransport in die Zellen und die anschließende Oxidation oder Speicherung der Glukose sind gestört, katabole Stoffwechselwege, wie die Lipolyse und Proteolyse, sind aktiviert.

Insulin spielt eine wichtige Rolle im embryonalen Energiestoffwechsel. Das mütterliche Nährstoffangebot geht eng mit der Entwicklung des Embryos einher. Es ist von daher nicht verwunderlich, dass es bei Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus zu Störungen in der Entwicklung des Embryos und zu einer erhöhten Fehlbildungs- oder Abortrate kommt [183]. Es wird angenommen, dass der Hauptgrund für diabetogene Fehlbildungen und Fehlgeburten die glukosevermittelte Apoptose ist [184]. Diabetes mellitus während der Schwangerschaft birgt zudem ein erhöhtes Risiko für Präeklampsie und Eklampsie [185].

Ein Insulinmangel wie beim Typ 1 Diabetes kann zu einem verringerten Geburtsgewicht führen (*small for gestational age* (SGA)) [22]. Diese SGA-Kinder weisen ein erhöhtes Risiko auf, im Erwachsenenalter an Diabetes mellitus Typ II oder dem Metabolischen Syndrom zu erkranken (Barker-Hypothese) [186–189]. Insulingabe und die strenge Überwachung der Blutglukosekonzentration kann die negativen Auswirkungen des Diabetes mellitus auf die Schwangerschaft reduzieren [190].

Experimenteller Diabetes mellitus Typ 1 im Tiermodell

Es werden verschiedene Tierversuchsmodelle genutzt, um die Pathophysiologie des Diabetes mellitus Typ 1 aufzuklären. Es gibt Versuchstiere, die spontan (BB-Ratte, NOD-Maus), über die Ernährung (hochkalorisches Futter) oder chemisch induziert (Streptozotolin, Alloxan) einen Diabetes mellitus Typ 1 entwickeln.

Im diabetischen Tiermodell der Maus mit erhöhten Glukosekonzentrationen im Blut [191] kommt es zu einer Verringerung der Glukoseaufnahme des Präimplantationsembryos, einer gesteigerten Apoptoserate und einer erhöhten Anzahl an fetalen Resorptionen und Fehlbildungen [192,193]. Embryonen von diabetischen Ratten haben eine schlechtere Entwicklungspotenz [165,194,195]. Aber auch der Entzug von Glukose führt zu einer verringerten Blastozystenbildung und, je nach Ausmaß des Glukosemangels, zum Entwicklungsarrest [196,197].

Im diabetischen Kaninchenmodell führt ein experimentell induzierter Diabetes mellitus Typ 1 zu Subfertilität. Die Anzahl der Blastozysten am Tag 6 *p.c.* verringert sich um 40% [198]. Zudem kommt es zu einer Entwicklungsverzögerung und zu einer verspäteten Gastrulation [198]. Die Expression des Insulinrezeptors und des IGF1-Rezeptors wird in der Kaninchenblastozyste herunterreguliert, ebenso wie ihre metabolischen Zielgene (z.B. PEPCK) [198]. Die verringerte Expression der Rezeptoren führt zu einer verminderten Insulin- und IGF1-Sensitivität, die ursächlich an der verzögerten Entwicklung der Kaninchenblastozyste beteiligt sein könnte.

Das Versuchstiermodell Kaninchen

Das Versuchstiermodell Kaninchen besitzt aus entwicklungsbiologischer Sicht eine hohe Relevanz, da die Kaninchenblastozyste aufgrund ihrer Größe und der Morphologie ihrer Keimscheibe gegenüber anderen Tiermodellen Vorteile bei experimentellen Arbeiten bietet. Des Weiteren besitzt das Kaninchen einen höheren phylogenetischen Verwandtschaftsgrad zum Menschen als die häufig genutzten Versuchstiere Maus und Ratte [199].

Ein Diabetes mellitus Typ 1 kann beim Kaninchen durch diabetogene Chemikalien, wie Alloxan und Streptozotocin, experimentell induziert werden. Bei beiden handelt es sich um zytotoxische Glukoseanaloga, die mit unterschiedlichen Mechanismen selektiv nur die insulinproduzierenden pankreatischen β -Zellen zerstören und keinen Effekt auf die anderen Inselzellen ausüben [200,201].

Alloxan (2,4,5,6-Tetraoxypyrimidin) wird aufgrund seiner Strukturähnlichkeit zur Glukose von dem u.a. in der β -Zellmembran lokalisierten insulinunabhängigen Glukosetransporter 2 (GLUT 2) in das Zytosol der pankreatischen β -Zellen transportiert, akkumuliert dort [200,202,203] und löst verschiedene pathophysiologische Effekte aus.

Der entscheidende zytotoxische Effekt von Alloxan zur Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen ist die Generierung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS - *reactive oxygen species*), verursacht durch einen komplexen Reaktionszyklus des Reduktionsproduktes Dialursäure. Das Tripeptid Glutathion (GSH) reduziert das vorhandene Alloxan in der β -Zelle und induziert somit die Bildung von Dialursäure. Diese wird spontan autooxidiert und induziert dadurch die zytotoxische ROS-Bildung [204,205]. Alloxan ist in seiner oxidierten Form, also in Abwesenheit von GSH und somit im Extrazellulärraum, nicht zytotoxisch [206]. Zum Schutz vor ROS verfügen die Zellen über verschiedene antioxidative Enzyme wie z.B. die Superoxid-Dismutase, die Superoxid-Anionen in Wasserstoffperoxid umwandelt, und die Katalase, die das entstandene Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff katalysiert. Die Katalase weist

einen signifikant besseren Schutz gegen die toxischen Effekte des Alloxan auf. Dennoch reicht die Menge in den β -Zellen nicht aus, um die ablaufenden Redoxreaktionen zu verhindern. Infolge der steigenden ROS-Konzentration unterliegen die β -Zellen dem nekrotischen Zelltod [207]. Die β -Zell-Selektivität des Alloxans beruht darauf, dass β -Zellen im Vergleich zu anderen GLUT2-exprimierenden Zielzellen, wie z.B. Hepato- und Enterozyten, unzureichend mit Katalasen ausgestattet sind [208,209].

Nach der Injektion des Alloxans verändert sich der Blutglukosespiegel des Versuchstieres in Abhängigkeit zur Plasmainsulinkonzentration. Man unterscheidet hierbei vier Phasen, die der Abbildung 8 entnommen werden können [210,211].

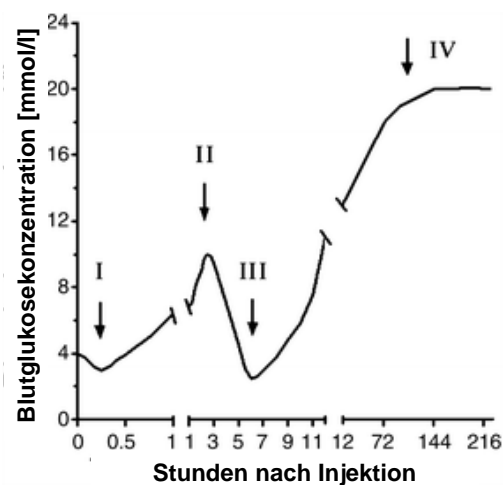


Abb. 5: Schema des Zeitverlaufs der Blutglukosekonzentration bei Versuchstieren nach Alloxaninjektion

Die Blutglukosekonzentration ändert sich nach einer Alloxaninjektion zeitabhängig. Bis zur Einstellung einer endgültigen Hyperglykämie (IV) unterscheidet man vier Phasen:

I – kurzfristige Hypoglykämie durch eine erhöhte Insulinsekretion der β -Zellen

II – gleichzeitiger Abfall der Plasmainsulinkonzentration und Anstieg des Blutglukosespiegels (Dauer: 2-4 h)

III – Nekrose der β -Zellen und die dadurch bedingte Freisetzung des Insulins führen zur Hyperinsulinämie (ca. 4-8 h nach Alloxangabe)

IV – absoluter Insulinmangel und klassische, permanente Hyperglykämie

(aus Lenzen 2008 [211])

1.7 Charakterisierung der Keimscheibe im Kaninchen

Das Kaninchen ist zur Untersuchung der frühen Phasen der Embryonalentwicklung besonders geeignet [212,213]. Die vergleichsweise späte Implantation am Tag 6 und 18 Stunden und die durchschnittliche Größe der Embryonen von 2,8 mm (6d p.c.) (siehe Abb. 6) [214] vereinfacht deren Gewinnung und Manipulation. Neben der planen Morphologie der Keimscheibe während der Gastrulation [215] verläuft auch die Entwicklung der embryonalen und

extraembryonalen Gewebe in Embryonen des Menschen und des Kaninchens ähnlich. Eine weitere Gemeinsamkeit findet sich in der Art der Plazentation und der damit verbundenen Versorgung des Embryos mit Nährstoffen.

Die frühen Gastrulationsereignisse beim Kaninchen erfolgen vor der Implantation am 6. Entwicklungstag und ermöglichen daher eine morphologische Beurteilung der Keimscheibe unter der Stereolupe und eine Einteilung in definierte Entwicklungsstadien (Stadien 0-7), die von Viebahn und Co-Autoren beschrieben wurden [213]. Bei der Entwicklung der undifferenzierten Keimscheibe bis zum Zeitpunkt der Implantation können 5 Entwicklungsphasen (Stadium 0 - 4) unterschieden werden [213,216] (siehe Abb. 7).

Dem Stadium 0 wird eine nach außen hin locker abgegrenzte Keimscheibe (Embryoblast) aus homogenen und morphologisch gleichen Zellen zugeteilt.

Im Stadium 1 kommt es am anterioren Pol entlang der Embryoblast-Trophoblast-Grenze zu einer lichtmikroskopischen Verdichtung der Zellen. Diese wird morphologisch als vorderer Randbogen (VRB) charakterisiert und stellt das erste Differenzierungsmerkmal einer posterior-anterioren Orientierung dar. Er liegt dem sich später entwickelnden Primitivstreifen gegenüber. Die Deutlichkeit des VRB nimmt in den nachfolgenden Stadien weiter zu.

Mit dem Stadium 2 bildet sich ein weiteres morphologisches Merkmal, die posteriore Gastrulaextension (PGE). Sie erscheint aufgrund einer verringerten Zelldichte im posterioren Bereich heller. Die anterior-posteriore Ausdehnung der Keimscheibe wird durch den VRB und die PGE begrenzt und legt noch vor der Ausbildung des Primitivstreifens die Körperachsen fest. Kennzeichnend für das Stadium 3 ist die elongierte Keimscheibe mit dem erkennbaren Primitivstreifen, der sich von posterior nach anterior ausbildet. Dieser bildet sich im posterioren Teil der Keimscheibe durch die Einwanderung von Mesodermzellen zwischen Epiblast und Hypoblast [217]. Die Bildung der migrierenden Epiblastzellen erfolgt im anterioren Teil des Embryoblasten (VRB). In diesem Stadium beginnt der Embryo mit der Anlagerung an die Uteruswand.

Das Stadium 4 ist durch die Vollendung der Primitivstreifenausbildung und der Anlage des Primitivknoten (Hensen-Knoten) am posterioren Pol charakterisiert [218].

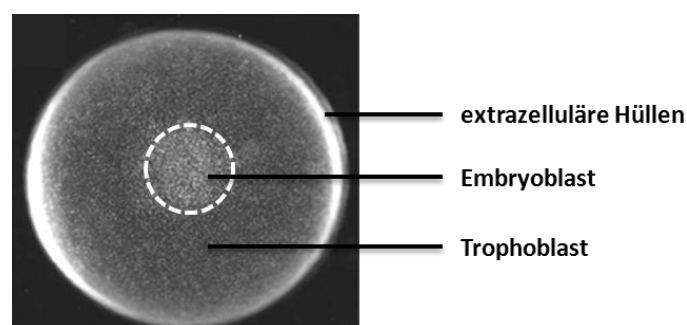


Abb. 6: Kaninchenblastozyste am Tag 6 p.c.
(modifiziert nach Idkowiak *et al.* 2004 [219])

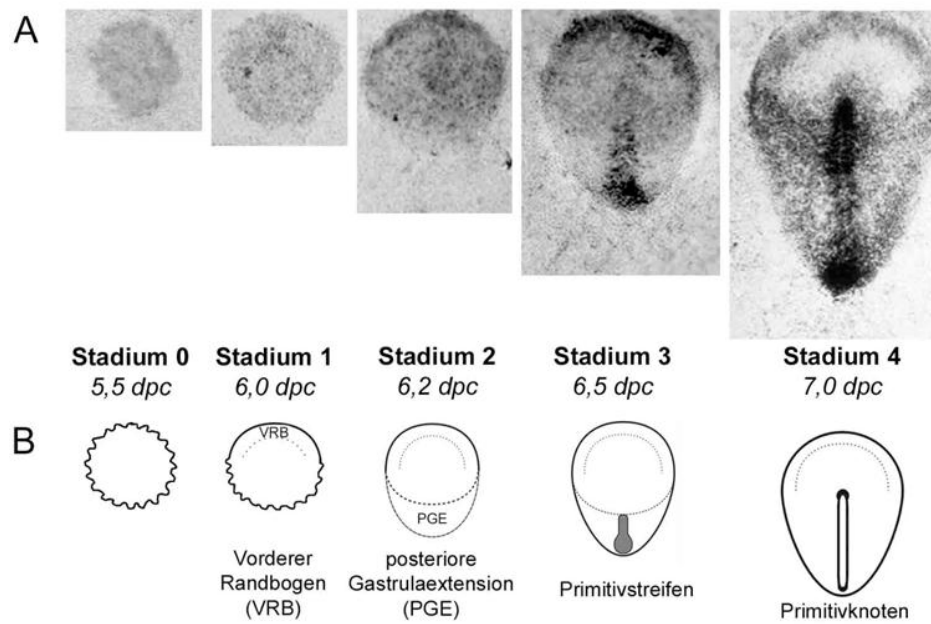


Abb. 7: Morphologische Einteilung der frühen Keimscheibendifferenzierung beim Kaninchen

(A) Dorsale Aufsichten Osmium (OsO_4)-fixierter Keimscheiben (Embryoblast) der Stadien 0 bis 4 und **(B)** schematische Darstellung der entsprechenden Stadien. Stadium 1 ist durch den Vorderen Randbogen (VRB), Stadium 2 durch die posteriore Gastrulaextension (PGE), Stadium 3 durch den Primitivstreifen und Stadium 4 durch den Primitivknoten charakterisiert. Unter den Stadien ist das durchschnittliche Entwicklungsalter in Tagen nach der Verpaarung angegeben (*days post coitum, dpc*).

(aus Viebahn *et al.* 1995 [213])

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die geschlechtsreifen *New Zealand* ZiKa Hybridkaninchen wurden von der Firma R. Krieg aus Niederwünsch (Sachsen-Anhalt) bezogen.

2.1.1 Versuchstierhaltung

Die für die Untersuchungen vorgesehenen Kaninchen (Körpergewicht von 3,5 bis 4,5 kg) wurden in fakultätseigenen Versuchsterräumen in Einzelkäfigen und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12:12 Stunden gehalten. Gefüttert wurden die Tiere mit handelsüblichem Trockenfutter (REIKA Kraftfutter); Wasser stand *ad libitum* zur Verfügung. Zwischen dem Eintreffen der Versuchstiere aus dem Zuchtbetrieb und dem Beginn der Versuche lagen drei Wochen zur Eingewöhnung. Die weiblichen Kaninchen wurden in zwei Versuchsgruppen (siehe Kapitel 2.1.2.) eingeteilt und nach dem Ablaufplan in Abb. 8 weiterbehandelt.

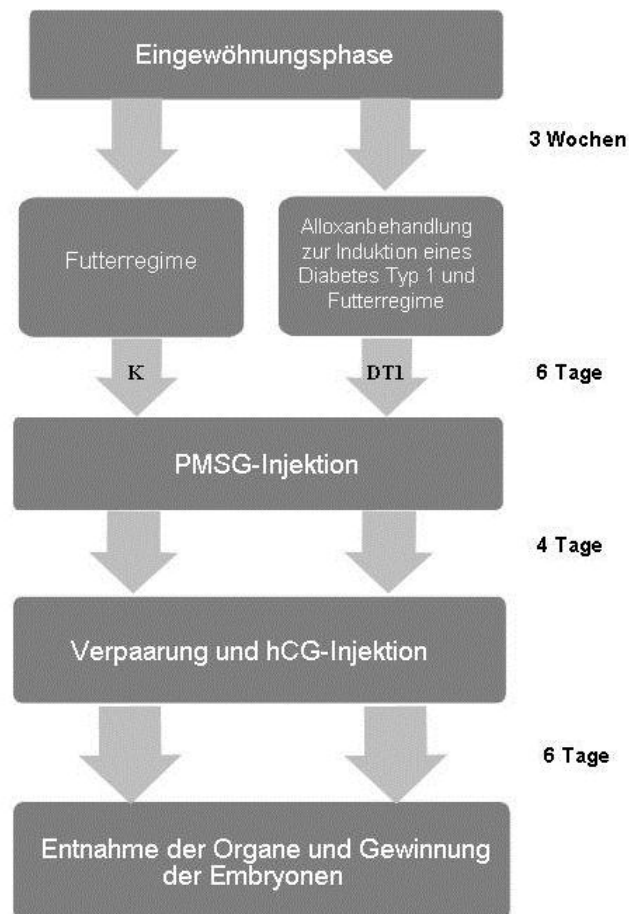


Abb. 8: Schema des Versuchsablaufes

PMSG – *Pregnant Mare Serum Gonadotropin*; hCG – humanes Choriongonadotropin; K – Kontrolle ; DT1 – experimentell induzierter Diabetes mellitus Typ 1

2.1.2 Versuchsgruppen

Im Rahmen der Untersuchung wurden zwei Versuchsgruppen verglichen:

1. Kontrolltiere mit Fütterungsregime (**gesund, normoglykämisch**)
2. Kaninchen mit einem experimentell induziertem Diabetes mellitus Typ 1 und Fütterungsregime (**DT1, diabetisch**)

Die diabetischen Kaninchen wurden während der Versuchsphase in den Futterzeiten eingeschränkt (siehe Abb. 9). Dieses Futterregime dient der Kontrolle und Begrenzung des Blutglukosespiegels im Bereich von ≥ 14 mmol/l und ≤ 18 -25 mmol/l. Zusätzlich wurde mit Beginn der Fütterung und bei einem erhöhten Blutglukosewert (≥ 18 mmol/l) nach Fütterung Insulin (s.c.) appliziert. Abends wurden zusätzlich 3 I.U. Lantus, ein Langzeitinsulin, injiziert. Die Kontrolltiere wurden wie die diabetischen Tiere in gleichen Intervallen morgens und am Nachmittag jeweils für drei Stunden gefüttert (siehe Abb. 9). Zur Kontrolle wurde täglich das Körpergewicht sowie die Menge des gefressenen Futters bei den Versuchstieren erfasst und dokumentiert. Zusätzlich wurde der Blutglukosewert und die verabreichte Insulinmenge bei den diabetischen Kaninchen gemessen.

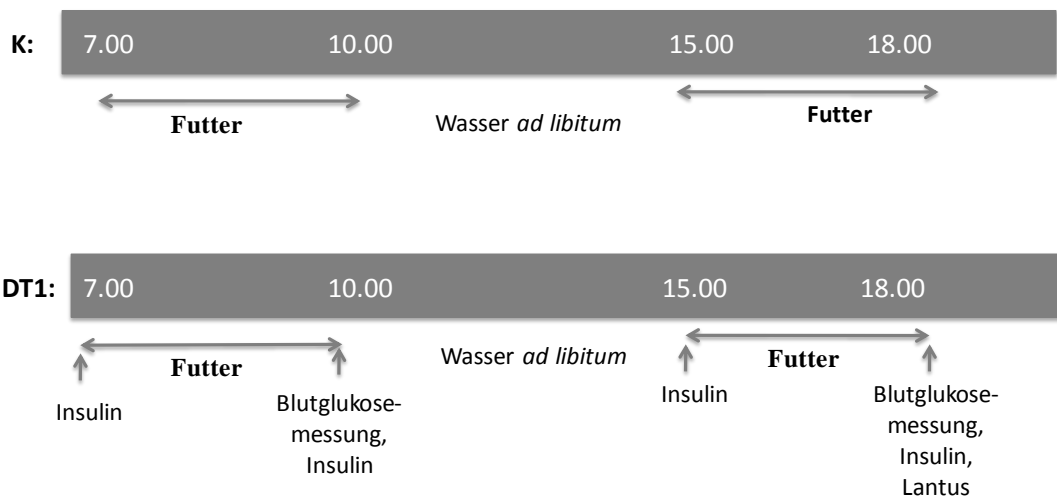


Abb. 9: Tägliches Behandlungsschema der zwei Versuchstiergruppen

- DT1: weibliche Kaninchen mit experimentell induziertem Diabetes mellitus Typ 1 mit Fütterungsregime
 K: gesunde weibliche Kaninchen mit Fütterungsregime

2.1.3 Experimentell induzierter Diabetes mellitus Typ 1 im Kaninchen

Der Diabetes mellitus Typ 1 wurde bei den Kaninchen durch die diabetogene Chemikalie Alloxan induziert, die als Glukoseanalogon von den β -Zellen des Pankreas aufgenommen wird und diese zerstört (siehe Kapitel 1.5.1). Begünstigend wirkt sich eine geringe Blutglukosekonzentration bei der Alloxangabe aus, weshalb den Kaninchen 16 Stunden vor der Alloxangabe das Futter entzogen wurde. Die Injektion von Alloxan erfolgte am beruhigten und schmerzbetäubten Tier. Dafür wurden die Kaninchen mit Dormitor[®] i.m. (0,25 mg/kg Körpergewicht) und Ketanest[®] S i.m. (15 mg/kg Körpergewicht) betäubt.

Nach 10 min wurde die Alloxanlösung (120 mg/kg Körpergewicht in 10 ml PBS gelöst) in die *Vena auricularis lateralis* injiziert. Um eine lokale Gefäßschädigung zu vermeiden, wurde unmittelbar nach der Alloxaninjektion das Gefäß mit 10 ml physiologischer Kochsalzlösung gespült. Nach weiteren 10 min wurde in die Bauchfalte 50 ml 27,5 %-ige Glukoselösung (s.c.) appliziert. Anschließend wurden die Tiere in ihre Käfige zurückgelegt und in den nächsten 24 Stunden stündlich kontrolliert. Um eine lebensbedrohliche Hypoglykämie zu verhindern, standen den Tieren in den ersten 24 h zusätzlich trockenes Brot und 5%-iges Glukosetrinkwasser zur Verfügung. Bei einem Abfall des Blutzuckerspiegels $\leq 2,8$ mmol/l wurde den Tieren zusätzlich 20 ml 27,5%-ige Glukoselösung (s.c.) oder 10 ml 5%-ige Glukoselösung (i.v.) verabreicht. Die Stabilisierung der Tiere und Einstellung eines hyperglykämischen Blutglukosespiegel dauerte 24 bis 48 Stunden. Der Blutglukosespiegel der Versuchstiere wurde zweimal am Tag kontrolliert und mit Hilfe des Insulin Insuman[®] Rapid (40 I.E./ml) auf ≥ 14 mmol/l bis ≤ 18 -25 mmol/l eingestellt. Um den Blutzuckerspiegel kontrollieren zu können, wurden die Tiere in zwei Intervallen von je drei Stunden gefüttert (siehe Abb. 9).

2.1.4 Gewinnung der Präimplantationsembryonen

Zur Steigerung der Embryonenzahl wurden die Spenderkaninchen mit 150 I.U. subkutan injiziertem PMSG (*Pregnant Mare Serum Gonadotropin*) stimuliert und drei Tage nach der Stimulation mit zwei fertilen Böcken gepaart. Um die Auslösung der Ovulation zu unterstützen wurden nach den Verpaarungen 75 I.U. humanes Choriongonadotropin (hCG) in die *Vena auricularis lateralis* injiziert. 3, 4 und 6 Tage (3d, 4d, 6d) nach der Paarung (*post coitum, p.c.*) wurden die Spenderkaninchen durch Injektion einer Überdosis Pentobarbital getötet und nach Eröffnung der Karotiden entblutet. Die Eileiter und die Uteri wurden anschließend entnommen und die Embryonen mit sterilfiltriertem Spülmedium (basales synthetisches Medium (BSM II) mit 0,1% BSA) unter einer halbsterilen Werkbank aus dem Eileiter (3d, 4d *p.c.*) bzw. dem Uterus (4 – 6d *p.c.*) ausgespült [220].

Um die Embryonen von anhängenden Gewebe- und Sekretresten zu befreien, wurden sie mindestens zweimal in frischem Spülmedium gewaschen. Die Embryonen von drei Spendertieren wurden gesammelt und zufällig auf die Versuchsgruppen verteilt. Dadurch wurde eine randomisierte Zuteilung der Embryonen der einzelnen Spendertiere auf die Versuchsgruppen gewährleistet. Die Keimscheiben der 6 Tage alten Blastozysten wurden anschließend morphologisch beurteilt und dem entsprechenden Entwicklungsstadium zugeordnet (siehe Abb. 7).

Die Bildung des Vorderen Randbogens (VRB) in Stadium 1 ist nur schwach erkennbar und kann zu Verwechslungen von Stadium 0 und 1 führen. Um diesen systematischen Fehler auszuschließen wurden Blastozysten im Stadium 0 und 1 einer Versuchsgruppe zugeteilt (Stadium 0/1), während Stadium 2 und 3 zweifelsfrei unter der Stereolupe zugeordnet werden konnten und eigenständige Versuchsgruppen bilden. Die Embryonen wurden entweder zur *in vivo* Analyse oder für die *in vitro* Kultur (siehe Kapitel 2.1.6) verwendet. Die Blastozysten wurden als Gesamtembryo oder separiert in Embryoblast und Trophoblast untersucht. Die embryonalen Hüllen wurden mechanisch entfernt. Für die RNA-Isolierung und die Proteingewinnung wurden die *in vivo* Blastozysten in PBS-Puffer bzw. 100 µl RIPA-Puffer aufgenommen und bei -80°C gelagert oder für die Immunhistochemie in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert und zur Lagerung in 100% Methanol überführt (aufsteigende Methanolreihe) und anschließend bei -20°C aufbewahrt.

BSM II (1 l)

BSM	7,64 g
NaHCO ₃	2,1 g
Glukose	1,8 g
Penicillin	0,061 g
Streptomycin	0,15 g

2.1.5 Gewinnung der Blutproben

Direkt nach der Eröffnung der Karotiden wurde das Blut in S-Monovetten (Citrat oder EDTA-K) aufgefangen und gründlich durchmischt. Danach wurden die S-Monovetten im Kühlschrank bei +4°C gelagert. Noch am selben Tag wurden die Proben bei 1 000 g und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Die obere Phase (Plasma) wurde abgenommen und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.1.6 Entnahme der Uteri und Separation des Endometriums

Die Uteri (*Uterus duplex*) wurden entnommen und an einer semisterilen Arbeitsbank präpariert. Das Uterusgewebe wurde entweder als gesamtes Organ oder nach Separation des Endometriums für RNA- und Proteinanalysen in flüssigen Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert. Zur Separation wurde das Endometrium mit einem Skalpell scharf vom Myometrium abgeschabt.

2.1.7 Embryonenkultur

Die nach ihrem Entwicklungsstadium vorsortierten Blastozysten wurden kurzzeitig (ca. 5 Minuten) an das Kulturmedium (BSM II mit 1,5% BSA) adaptiert [221] und anschließend zufällig auf die Versuchsgruppen mit minimal 4 bis maximal 10 Embryonen in Kulturgefäße mit 3,9 ml Kulturmedium aufgeteilt. Die *in vitro* Kultur erfolgte in einem Inkubator mit 5% O₂, 5% CO₂ und 90% N₂ bei 37°C. Nach einer zweistündigen Vorkultur in serumfreiem Medium wurde

Adiponektin (1 µg/ml oder 10 µg/ml), gelöst in 100 µl BSM II-Medium, direkt in die Kulturschalen mit den Blastozysten dem Medium zugefügt.

Den korrespondierenden Kontrollen wurde nur das Mediumvolumen zugefügt. Die Zugabe des Inhibitors Compound C (10 µM) erfolgte 60 min vor der Stimulation mit Adiponektin. Im Anschluss an die *in vitro* Kultur wurden die Embryonen zweimal in kaltem, sterilen PBS-Puffer gewaschen und wie unter Kapitel 2.1.4 beschrieben für die verschiedenen Versuche aufgearbeitet.

2.1.8 Mikrosektion von Blastozysten

Die Separation der beiden Zelllinien der Blastozyste wurde mechanisch mit Hilfe von Pinzette und Schere in kaltem PBS, 0,1% PVA, durchgeführt. Unter der Stereolupe wurden die Blastozystenhüllen unter Zuhilfenahme eines Wolframdrahtes und der Pinzetten vorsichtig entfernt. Anschließend wurde die Keimscheibe aus dem Trophoblastzellverband herauspräpariert. Bei dieser Technik ist das Anhaften von Trophoblastzellen am Embryoblasten wahrscheinlich, weil weiträumig geschnitten wird und/oder die über dem Embryoblasten liegenden Trophoblastzellen (Rauber'sche Trophoblastschicht) erst ab dem Tag 6 *p.c.* degenerieren. Demnach ist ein geringer Anteil von Trophoblastzellen in den Embryoblastproben wahrscheinlich.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Kultivierung der HEK-huACRP30-Zelllinie

Die HEK-huACRP30 Zellen sind stabil mit humanen Adiponektin-HA (human influenza hemagglutinin) transfiziert worden. Daher überexprimieren sie humanes, rekombinantes Adiponektin-HA, das sie in das Kulturmedium sezernieren.

HEK-Zellen sind eine seit Ende der 1970er Jahre bestehende humane Zelllinie, die als Transformationsprodukt aus einer menschlichen embryonalen Nierenzellen (Human Embryonic Kidney) mit DNA-Teilen des menschlichen Adenovirus 5 geschaffen wurde. Spezifisch wurden 4,5 kb des viralen Genoms in das Erbgut der Nierenzelle eingebaut. Die HEK-Zellen sind hypotriploide Epithelzellen, welche adhärent wachsen. Die HEK-Zelllinie wird oft bei der Entwicklung von Virenimpfstoffen, Chemotherapeutika sowie zur Produktion von rekombinanten Proteinen verwendet. Sie kann gut in serumfreien Medien kultiviert werden.

Die Zelllinie wurde bei einer Temperatur von 37°C, 20% O₂ und 5% CO₂ in dem unten genannten Medium kultiviert.

Kulturmedium für HEK-huACRP30

DMEM (Dulbecco's Modified <i>Eagle</i> Medium)	500 ml
FKS	50 ml
Na-Pyruvat	5 ml
L-Glutamin	3 ml
Penicillin/Streptomycin	6 ml
Geneticin	12 ml

2.2.2 Gewinnung und Isolierung des überexprimierten humanen Adiponektins

Zur Gewinnung des humanen Adiponektin-HA wurden die Zellen in serumfreien DMEM, mit 1 mM Natrium-Pyruvat supplementiert, kultiviert. Nach zwei Tagen wird zum ersten Mal der Kulturüberstand gewonnen und bei 3 000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Daran anschließend wurde der Überstand filtriert (Porengröße; 45 µM) und bei -20°C bis zur Isolation des humanen Adiponektin-HA gelagert. Diese „Ernte“ wurde wie zuvor beschrieben an den Tagen 4, 6 und 8 wiederholt.

Serum-freies Kulturmedium für HEK-huACRP30

DMEM (Dulbecco's Modified <i>Eagle</i> Medium)	500 ml
Natrium-Pyruvat	5 ml
L-Glutamin	2,5 ml
Penicillin/Streptomycin	6 ml
Geneticin	10 ml

Nachdem die Kulturüberstände vorsichtig auf Eis aufgetaut wurden, wurden die Proteine mit einer Ammoniumsulfatlösung (40% wt/vol) präzipitiert. Durch Zentrifugation (1 h, 3 000 g, 4°C) wurden die Proteine pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml eines Salzpuffers (20 mM Hepes (pH 8) und 50 mM NaCl) resuspendiert.

Die Isolierung von Adiponektin wurde mithilfe des *µMACS Epitope Tag Protein Isolation Kits* (*µMACS Anti-HA MicroBeads*; Miltenyi Biotec) durchgeführt. Hierbei wurden die Angaben des Herstellers genau befolgt.

Nach der Isolierung des Adiponektins mittels des *µMACS-Separator*s wurde das Eluat mit einem weiteren Salzpuffer (20 mM Hepes (pH 8) and 125 mM NaCl) über Nacht bei 4°C dialysiert, um die Adiponektin-Konzentration zu erhöhen. Die Salzlösung wurde einmal ausgetauscht.

Anschließend wurde die Proteinkonzentration spektroskopisch gemessen und sowohl ein nativer als auch ein denaturierender Western-Blot (siehe Kapitel 2.5.3 – 2.5.7) mit einem Antikörper gegen Adiponektin durchgeführt (siehe Tabelle 4).

Die Proteinlösung wurde aliquotiert und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 RNA-Isolierung

2.3.1.1 RNA-Isolierung aus Geweben

Die Kaninchengewebe wurden sofort nach dem Töten der Spendertiere entnommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Das Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff zermörsert, in 800 µl GTC-Puffer aufgenommen und mit einem Ultraturax homogenisiert. Anschließend wurden 80 µl 2 M Natriumacetat (pH 4,0), 800 µl Phenol und 200 µl Chloroform zu jeder homogenisierten Gewebeprobe gegeben, kräftig geschüttelt und bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Danach wurden die Proben 25 min bei 13 000 rpm und 10°C zentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein neues 1,5 ml

Reaktionsgefäß überführt. Die RNA-Fällung erfolgte durch Zugabe von 1 Volumen kaltem Isopropanol, 30-minütiger Inkubation bei -20°C und darauf folgender 30-minütiger Zentrifugation bei 13 000 *rpm* und 4°C . Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene RNA-Pellet wurde zwei- bis dreimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 μl DEPC-*Aqua dest.* aufgenommen.

GTC-Puffer

Guanidiniumthiocyanathydrochlorid	4 M
Natriumcitrat	25 mM
Natriumlaurosylosarcosinat	17 mM
β -Mercaptoethanol	100 mM

Vor dem Einsatz wurde β -Mercaptoethanol frisch hinzugegeben.

DEPC *Aqua dest.*

1 ml Diethylpyrocarbonat (0,1% DEPC) wurde in einen Liter *Aqua dest.* gegeben und für 4 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Lösung zweimal autoklaviert. Alle wässrigen Lösungen für die RNA-Isolierung wurden mit DEPC-*Aqua dest.* hergestellt.

2.3.1.2 RNA-Isolierung aus Zellen

Für die Isolierung von RNA wurden ca. 70% - 80% konfluente Zellen genutzt. Die Zellen wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS-Puffer von Mediumresten befreit und dann in 800 μl GTC-Puffer aufgenommen. Das Zelllysat wurde mit einer Spritze (0,45 x 12 mm, 26G) durch mehrmaliges Aufziehen und Ausstoßen homogenisiert. Um zu kontrollieren, ob die RNA nach der Isolierung intakt war, wurde 1 μg RNA der entsprechenden Probe auf ein 1,2%-iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Anschließend wurde die RNA-Isolierung wie unter Kapitel 2.3.1.1 beschrieben weitergeführt.

2.3.1.3 mRNA-Isolierung aus Embryonen

Aus den vollständigen Blastozysten bzw. den separierten Embryoblasten und Trophoblasten wurde mRNA mittels des *Dynabeads[®] mRNA Direct™ Kit* gewonnen (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). *Dynabeads[®]* sind magnetische Polyesterol-Perlen und verfügen über kovalent an die Oberfläche gebundene Oligo(dT)25 Reste, an die die mRNA mit ihrem Poly-A-Schwanz bindet. Die bei -80°C in PBS gelagerten Embryonen wurden aufgetaut, bei 13 000 *rpm* für 10 min zentrifugiert und der überschüssige PBS-Puffer abgenommen. Die Embryonen wurden dann in 100 μl Lysis-Puffer resuspendiert und bei Raumtemperatur für 15 min auf einem Schüttler inkubiert. Parallel dazu wurden die *Dynabeads[®]* mit Hilfe eines *Magnetic Particle Concentrator* (DynaL MPC[®]) in Lysispuffer gewaschen. Pro Embryo wurden 10 μl gewaschene *Dynabeads[®]* zum Lysat gegeben. Das Lysat wurde zweimal mit Waschpuffer A und dreimal mit Waschpuffer B (je 30 μl) im *Magnetic Particle Concentrator* gewaschen. Die mRNA wurde in 11 μl DEPC-*Aqua dest.* durch Erhitzen auf 65°C in einem Thermocycler von den Oligo(dT)25 Resten der *Dynabeads[®]* gelöst. Um ein erneutes Verbinden der mRNA mit den *Dynabeads[®]* zu

verhindern, wurde die Probe umgehend in den *Magnetic Particle Concentrator* auf Eis gestellt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Lysispuffer (50 ml):

LiCl	(8 M)	3,125 ml
EDTA	(0,5 M)	186,1 mg
Tris	(1 mM, pH 7,5)	605,7 mg
SDS	(10%)	500 mg
DTT	(0,1M)	38,56 mg

Bindepuffer (50 ml):

LiCl	(8 M)	3,125ml
EDTA	(0,5 M)	186,1mg
Tris	(1 mM, Ph 7,5)	605,7mg

Waschpuffer A (100 ml):

LiCl	(8 M)	1,875 ml
EDTA	(0,5 M)	37,22 mg
Tris	(1 mM, pH 7,5)	121,14 mg
SDS	(10%)	100 mg

Waschpuffer B (100 ml):

LiCl	(8 M)	1,875 ml
EDTA	(0,5 M)	37,22 mg
Tris	(1 mM, pH 7,5)	121,14 mg

2.3.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte mittels Absorptionsmessung bei $\lambda=260$ nm am Photospektrometer. Dafür wurde die RNA 1:50 mit DEPC-*Aqua dest.* verdünnt. Eine Absorption von 1,0 bei 260 nm entspricht dabei einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA. Eine eventuell auftretende Proteinverunreinigung wurde durch gleichzeitige Messung bei $\lambda=280$ nm festgestellt. Der Quotient aus gemessener optischer Dichte bei 260 nm und 280 nm sollte zwischen 1,7-2,0 liegen. Zur Kontrolle der intakten RNA wurde anschließend 1 μg RNA auf ein 1,2%-iges Agarosegel aufgetragen.

2.3.3 DNase-Verdau

Um Anteile genomischer DNA in der RNA auszuschließen, wurde ein enzymatischer Verdau der Proben mit DNase durchgeführt.

Ansatz pro 20 μg Probe:

10x Puffer mit MgCl_2	5 μl
RNase Inhibitor	0,5 μl
DNase	0,5 μl
DEPC <i>Aqua dest.</i>	ad 50 μl

Die Reaktion erfolgte bei 37°C und wurde nach 30 min durch Zugabe von 2 μl EDTA und Erhitzen für 10 min auf 65°C abgestoppt.

2.3.4 cDNA-Synthese

Die isolierte RNA wurde mittels Reverser Transkriptase (RT) in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, welche als Matrize für eine anschließende Polymerase Kettenreaktion (PCR) diene.

2.3.4.1 cDNA-Synthese aus RNA von Gewebe

In die cDNA-Synthese aus RNA von Geweben wurden 3 µg RNA eingesetzt. Zur RNA wurden 1 µl *Random Primer* zugegeben, der Reaktionsansatz mit DEPC *Aqua dest.* auf 12 µl aufgefüllt und für 10 min bei 70°C im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurden auf Eis hinzu pipettiert:

5x RT-Puffer	4 µl
DTT (0,1 M)	2 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
<i>Superscript II</i> (200 U/µl)	0,5 µl
RNase-Inhibitor (400 U/µl)	0,2 µl
DEPC <i>Aqua dest.</i>	0,3 µl

Die weitere RT-Reaktion erfolgte im Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

- I.) 10 min 22°C
- II.) 50 min 42°C
- III.) 15 min 70°C

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

2.3.4.2 cDNA-Synthese aus RNA von Blastozysten

Für die cDNA-Synthese von Blastozysten wurde die gesamte isolierte mRNA eingesetzt.

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

Die RT-Reaktion erfolgte im Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

- I.) 20min 25°C
- II.) 60min 42°C
- II.) 5 min 99°C

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

2.3.4.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Effizienz der durchgeführten RT-Reaktion wurde durch eine PCR überprüft. Dafür wurde eine Kontroll-PCR für das *housekeeping* Gen GAPDH mit den entsprechenden Primern (siehe Tabelle 2) durchgeführt. Für die PCR wurden 1 µl cDNA und 49 µl Mastermix eingesetzt.

10x <i>Dream Taq Green</i> Puffer	5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl
dNTP Mix (10 mM)	1 µl
<i>Primer forward</i> (10 µM)	1 µl
<i>Primer reverse</i> (10 µM)	1 µl
<i>Dream Taq DNA Polymerase</i> (1,25 I.U./µl)	0,25 µl
<i>Aqua dest.</i> Nuclease frei	41 µl

Die PCR wurde in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- I.) 3 min 94°C Denaturierung/Initialisierung
- II.) 45 s 94°C Denaturierung
- III.) 45 s 60°C *Primer-Annealing*
- IV.) 1 min 72°C Elongation
- V.) 39-fache Wiederholung ab Schritt II.)
- VI.) 10 min 72°C terminale Elongation
- VII.) Pause 4°C

2.3.4.4 Real Time PCR

Die *Real Time* PCR ist eine effiziente und sensitive Methode zur absoluten und relativen Quantifizierung von RNA und DNA. Die Quantifizierung der amplifizierten DNA-Fragmente ist über die Messung von Fluoreszenzsignalen möglich. Der fluoreszierende Farbstoff *SYBR[®] Green* interkaliert mit doppelsträngiger DNA. Die Zunahme der Ziel-DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenzintensität bei steigender Zykluszahl. Die Vorteile der *Real Time* PCR liegen im hohen Probendurchsatz und der Quantifizierung von Proben mit wenig Ausgangsmaterial. Mit Hilfe der *Real Time* PCR wurden die Expression der Zielgene Adiponektin, AdipoR1 und R2, GLUT1 und 4 und PEPCK ermittelt (verwendete Primerpaare siehe Tabelle 2). Als interne Referenz der eingesetzten cDNA wurde das *housekeeping* Gen GAPDH verwendet. Es wurden immer Doppelbestimmungen durchgeführt. Pro Reaktion wurden 3 µl cDNA und 17 µl *Real Time* Mastermix eingesetzt. Um eine Verunreinigung des Ansatzes auszuschließen, wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Eine Schmelzpunktanalyse wurde immer durchgeführt um sicherzustellen, dass es nur ein PCR-Produkt gibt. Als Referenz wurde eine Plasmid-DNA (Standard), die das entsprechende PCR-Produkt enthält, in einer Verdünnungsreihe von 10⁷-10³ Molekülen (Herstellung eines Plasmidstandards, siehe Kapitel 2.3.7.8) eingesetzt. Der Standard wurde mit den genspezifischen Primern zeitgleich mit den Proben in der *Real Time* PCR amplifiziert.

Real Time-Mastermix:

<i>Mastermix Plus for SYBR[®] Assay</i>	10 µl
cDNA / Plasmid-DNA	3 µl
<i>Primer forward</i> (10 µM)	1 µl
<i>Primer reverse</i> (10 µM)	1 µl
<i>Aqua dest.</i> Nuclease frei	5 µl
<u>Gesamtvolumen</u>	<u>20 µl</u>

Die PCR wurde mit Hilfe des iQ5 *Real Time Detection Systems* (Biorad, München) mit folgendem Programm durchgeführt:

- I.) 5 min 95°C Denaturierung/Initialisierung
- II.) 20 s 95°C Denaturierung
- III.) 30 s 60°C Primer-*Annealing*
- IV.) 40 s 72°C Elongation
- V.) Plattendetektion
- VI.) 39-fache Wiederholung ab Schritt II.)
- VII.) Erstellen einer Schmelzkurve von 60 bis 90°C in 0,5°C Intervallen

Zur Quantifizierung wurde der C_T -Wert der Proben ermittelt. Mit dem C_T -Wert wird die Zyklenzahl bezeichnet, bei welcher die Fluoreszenzintensität einen vorher festgelegten Schwellenwert überschreitet. Dazu wurde die Regressionsgerade der *Real Time* PCR-Amplifikation für jedes zu quantifizierende Gen ermittelt und der C_T -Bereich, in dem die Amplifikation annähernd linear verläuft. Die Auswertung der Messdaten erfolgte nach der Molekülwertmethode. Ein Berechnungsbeispiel dem Anhang (siehe Kapitel 7.7.1) entnommen werden.

2.3.5 RNA- und DNA-Gelelektrophorese

RNA-, DNA- und Plasmid-Fragmente wurden nach Zugabe von 0,15 Volumen Ladebuffer auf 1,2% bis 2,2%-igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die RNA bzw. DNA wurde durch Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und mittels Videokamera und Computer-unterstützter Bildbearbeitung (BioCaptMW, LTF Labortechnik, Wasserburg) dokumentiert.

6x Ladebuffer (100 ml):

Glycerin	30 ml
Bromphenolblau	0,25 g
1x TAE-Puffer	70 ml

10x TAE-Puffer:

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

Agarosegel:

Agarose	1,0-2,0 g
1x TAE-Puffer	100 ml
Ethidiumbromid (50 µg/ml)	3 µl

Die Agarose wurde in 1x TAE Puffer aufgekocht und nach dem Abkühlen auf ca. 60°C wurde Ethidiumbromid hinzugegeben.

Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide für die *Real Time* PCR, PCR und Sequenzierung

(T_m = *Annealing*-Temperatur der *Primer* in der PCR-Reaktion, FG=Länge des amplifizierten DNA-Fragmentes in Basenpaaren (bp))

Primername	Strang-spezifität	Anzahl der Basen	DNA-Sequenz 5'→3'	T_m [°C]	FG [bp]
rab ACC	<i>forward</i>	20	AGG AGG GAA GGG AAT CAG AA	60	123
	<i>reverse</i>	20	TGA CGA GAC TGT TTG GCA AG		
rab Adiponektin	<i>forward</i>	20	CCT GGT GAG AAG GGT GAA AA	60	158
	<i>reverse</i>	20	GCT GAG CGG TAG ACA TAG GC		
rab AdipoR1	<i>forward</i>	20	ACT GGA CTA TTC AGG GAT TG	54	238
	<i>reverse</i>	20	CGA TAG TAA AGT GCA TGG TG		
rab AdipoR2	<i>forward</i>	24	GTG TCC AAA TGT TGC CTG TCT CTG	60	210
	<i>reverse</i>	24	CCT ACA AGC CCA TCA TGC TAT GGA		
rab AMPK	<i>forward</i>	20	ACG ATC TGG AGG TGA ACG AC	60	204
	<i>reverse</i>	20	ACT GCC CAT CCA CAA AGA AC		
rab APPL1	<i>forward</i>	20	AGT GAG GGG CAG TTT GTT GT	60	113
	<i>reverse</i>	20	CCC ATC AAA AAG CAA GGG TA		
rab CaMKK1	<i>forward</i>	20	GAC ATC AAG CCA TCC AAC CT	60	231
	<i>reverse</i>	21	GCA CTT CCC ATA GAC AAA GCA		
rab GAPDH	<i>forward</i>	19	GCC GCT TCT TCT CGT GCA G	60	144
	<i>reverse</i>	24	ATG GAT CAT TGA TGG CGA CAA CAT		
rab GLUT1	<i>forward</i>	21	TGC CCT GGA TGT CCT ATC TGA	60	168
	<i>reverse</i>	21	TGA AAT TCG AGG TCC AGT TGG		
rab GLUT4	<i>forward</i>	18	GGC GGC ATG ATT TCC TCC	60	396
	<i>reverse</i>	20	GAA GGG CAG CAG GAT CAG CT		
rab LKB1	<i>forward</i>	20	GAG CTG ATG TCG GTG GGT AT	60	161
	<i>reverse</i>	20	GAG TCC AGC ACC TCC TTC AC		
rab PEPCK	<i>forward</i>	21	CTG CGG CCT CCA AAG ATG ATG	60	143
	<i>reverse</i>	22	CCC TGG AAA CCT GGT GAC AAG G		
rab PPAR α	<i>forward</i>	20	TTG TGG CTG CTA TCA TCT GC	60	146
	<i>reverse</i>	20	GAG TTT GGG GAA GAG GAA GG		
T7		18	AAT ACG ACT CAC TAT AGG	60	

2.3.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Fragmentgröße wurde anhand eines mitgeführten Größenmarkers bestimmt. Um PCR Produkte zu sequenzieren bzw. klonieren zu können, wurde das DNA-Fragment unter UV Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des *QuiaQuick Gel Extraction Kit* (Quiagen, Hilden).

2.3.7 Klonierung von PCR-Fragmenten

2.3.7.1 Ligation der PCR-Fragmente

Für die Ligation wurde der pGEMT-Vektor der Firma Promega (Mannheim) genutzt. Pro Reaktion wurden 8 µl gereinigtes PCR-Produkt (siehe Kapitel 2.3.6) eingesetzt. Die Klonierung mittels pGEMT-Vektor ist für PCR-Produkte optimiert, die einen 3'-A-Überhang besitzen, wie es nach der RT-PCR mit der *Taq*-DNA-Polymerase der Fall ist. Der Vektor verfügt über einen komplementären 3'-T-Überhang, dies macht die Ligation effizienter.

Ansatz:

Vektor	1 µl
2x Rapid Ligation Buffer	10 µl
T4 DNA-Ligase (1 I.U.)	1 µl
PCR-Produkt	8 µl

Die Reaktion wurde über Nacht bei 10°C durchgeführt und direkt am nächsten Tag zur Transformation eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

2.3.7.2 Herstellung der kompetenten Bakterienzellen

Eine Bakterienkultur wurde in 2 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. 100 µl dieser Kultur wurden in 10 ml LB-Medium überimpft und nochmals bis zu einer OD550 von 0,3 inkubiert. Dann wurden wiederum 5 ml in eine 100 ml Kultur überimpft und bei einer OD550 von 0,5 in 4 vorgekühlte 30 ml Corex-Röhrchen aufgeteilt. Es wurde für 5 min bei 4 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 7,5 ml kaltem *transformation buffer I* (TFBI) durch vorsichtiges Schwenken resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (5 min, 4000 rpm, 4°C) wurde das Pellet in 1 ml kaltem TFBII gelöst. Die Suspension wurde in kalte 1,5 ml Eppendorf-Tubes à 100 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

<u>TFBI</u>		<u>TFBII</u>	
Manganchlorid	50 mM	MOPS pH 7,0	10 mM
Rubidiumchlorid	100 mM	Calciumchlorid	75 mM
Calciumchlorid	10 mM	Rubidiumchlorid	10 mM
Glycerin	15%	Glycerin	15%
Kaliumacetat	30 mM		

Die Lösungen wurden bei -20°C gelagert.

2.3.7.3 Transformation

Die rekombinanten Plasmide wurden in kompetente *E.coli* X1 *blue* transformiert und auf Agarplatten mit LB-Medium ausgestrichen. Für die Herstellung von Agarplatten wurden vor dem Autoklavieren noch 15 g/l Agar hinzugefügt. Das feste LB-Medium wurde erwärmt bis es flüssig war und langsam wieder abgekühlt. Kurz vor dem Ausgießen wurde zu 200 ml LB-Agar folgendes hinzugegeben: 2 ml Ampicillin, 400 µl X-Gal und 40 µl IPTG.

Die kompetenten Zellen wurden 20 min auf Eis aufgetaut, der gesamte Ligationsansatz hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Es erfolgte eine weitere Inkubation für 20 min auf Eis. Im Wasserbad wurden die Zellen für 45 s bei 42°C erhitzt und 2 min auf Eis abgekühlt. Nun wurden sie mit 400 µl LB-Medium (ohne Ampicillin) für 1 Stunde bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden sie in 50, 100 oder 200 µl auf Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht im Inkubator bei 37°C kultiviert.

LB-Medium (Luria-Bertani, pH 6,4-7,5)

Pepton	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
Natriumchlorid	10 g
<i>Aqua dest.</i>	ad 1 l

Stocklösungen:

Ampicillin: 50 mg / ml

X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactosid): 20 mg / ml in Dimethylformamid (DMF)

IPTG (Isopropylthio-β-D-Galactosid): 200 mg / ml in *Aqua dest.*

Selektion der positiven Klone (Blau-Weiß-Selektion):

Transformierte Bakterien, welche den pGEMT-Vektor enthalten, sind ampicillinresistent und besitzen überdies eine funktionsfähige β-Galaktosidase, die im Wirtstamm *E.coli* XL1 *blue* deletiert wurde. pGEMT-rekombinante Bakterien setzen X-Gal enzymatisch um und bilden Galaktose und den blauen Farbstoff 5-Bromo-4-Chloro-3-Indol, durch den die Kolonien blau erscheinen. Der Einbau des DNA-Fragmentes in die *multiple cloning site* (liegt innerhalb eines 5'-Abschnitts des lacZ-Gens) zerstört das Leseraster des lacZ-Gens. Dadurch kann keine funktionsfähige β-Galaktosidase mehr gebildet werden, so dass die betreffenden, positiven Bakterienkolonien in Gegenwart von X-Gal farblos (weiß) bleiben. IPTG dient als Induktor für die β-Galaktosidase. Es kann durch die β-Galaktosidase nicht umgesetzt werden, wird somit nicht verstoffwechselt und liegt dauerhaft als Induktor vor.

2.3.7.4 Plasmidisolierung aus *E.coli*

Die weißen Kolonien wurden von den Selektionsplatten mit einer sterilen 200 µl Pipettenspitze abgenommen und in 3 ml LB-Medium mit Ampicillin (0,1 mg/ml) über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Plasmidisolierung wurde mit dem *GFX Micro Plasmid Prep Kit* (GE Healthcare, München) nach dem Prinzip der alkalischen Lyse durchgeführt. 2 ml einer Übernachtskultur wurden in einem 2 ml Reaktionsgefäß für 1 min bei 13 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die DNA nach dem Herstellerprotokoll eluiert.

2.3.7.5 Restriktion

Um den Klonierungserfolg und die Größe des Inserts zu kontrollieren, wurden die rekombinanten Plasmide durch Restriktion mit zwei Endonukleasen (ApaI und SacI) geschnitten.

Ansatz:

ApaI (5 I.U.)	0,5 µl
SacI (5 I.U.)	0,5 µl
PufferB+	1 µl
Plasmid bzw. PCR-Produkt	5 µl
<i>Aqua dest.</i>	ad. 10 µl

Es wurden die Enzyme ApaI und SacI eingesetzt, für die es je eine spezifische Schnittstelle in der *multiple cloning site* des pGEMT-Vektors (siehe Abb. 10) gibt. Der Restriktionsverdau der Plasmide erfolgte 60 min bei 37°C in einem vom Hersteller definierten Puffer. Der gesamte Ansatz wurde auf ein 1,8 %-iges Agarosegel aufgetragen (siehe Kapitel 2.3.5) und ausgewertet. Die erhaltenen Fragmente sind ca. 80 bp länger als das eigentliche PCR-Produkt, da mit dem Restriktionsverdau auch ein Teil des Vektors mit ausgeschnitten wird.

2.3.7.6 Glycerinkultur

Rekombinante Klone können für unbestimmte Zeit als Glycerinkultur gelagert werden. Man gibt in ein 2 ml Reaktionsgefäß 0,6 ml der Übernachtskultur und fügt 0,4 ml Glycerin hinzu. Dieses wird gut gemischt, für 15 min auf Eis inkubiert und dann bei -80°C eingefroren.

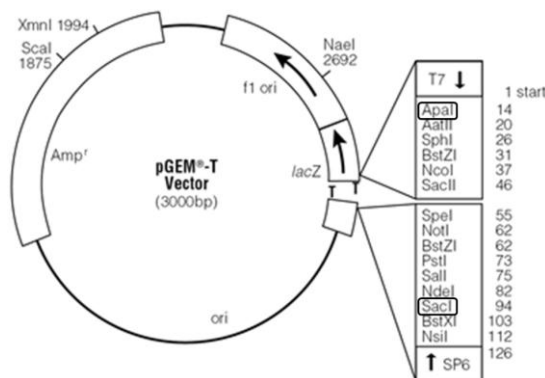


Abb. 10: Vektorkarte des pGEM[®]-T Vektors (Promega, Mannheim)

2.3.7.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten erfolgte mit dem *BigDye® Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Forster City, USA).

Ansatz:

<i>BigDye® Terminator v 1.1 CycleSequencing</i>	2,0 µl
<i>BigDye® Terminator v 1.1 v 3.1 5x Sequencing Buffer</i>	1,5 µl
T7.2 Primer (5 pM)	0,5 µl
Plasmid	1,5 µl
<i>Aqua dest.</i>	4,5 µl

Die Reaktion erfolgte im Thermocycler mit folgendem Standardprogramm:

- I.) 1 min 96°C Denaturierung / Initialisierung
- II.) 10 s 96°C Denaturierung
- III.) 15 s 55°C *Primer-Annealing*
- IV.) 4 min 60°C Elongation
- V.) 25-fache Wiederholung ab Schritt III.)
- VI.) Pause 4°C

Bei der direkten Sequenzierung von PCR-Produkten musste gegebenenfalls die *Annealing*-Temperatur angepasst werden. Nach der Sequenzierungsreaktion wurde das Produkt aufgereinigt. Dafür wird 1 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 40 µl 96%-iges Ethanol zum Reaktionsansatz gegeben und 30 min bei 13 000 *rpm* und 4°C zentrifugiert. Im Anschluss wurde zweimal mit 70%-igen Ethanol gewaschen (400 µl bzw. 100 µl) und für 20 bzw. 10 min bei 13 000 *rpm* und 4°C zentrifugiert. Die Proben wurden 5 min vakuumgetrocknet (SpeedVac). Die automatische Auftrennung am ABI 3100 *Genetic Analyzer C* der Firma Applied Biosystems wurde durch den Sequenzierservice des Zentrums für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Medizinischen Fakultät vorgenommen. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit der Software GeneRunner® v. 3.05. Die Sequenzanalyse erfolgte über das *Nucleotid Basic Local Alignment Search Programm* (BLASTn).

2.3.7.8 Herstellung des DNA-Plasmid-Standards

Die PCR-Produkte der Zielgene wurden kloniert und sequenziert. Die Konzentration der Plasmide wurde in Doppelbestimmungen spektrophotometrisch ermittelt. Für jedes Plasmid wurde eine Verdünnungsreihe in 10er Schritten von $\frac{1}{3} 10^8$ – $\frac{1}{3} 10^2$ Molekülen in H₂O als DNA-Standard für die *Real Time* PCR hergestellt, aliquotiert und bei -20° C gelagert.

2.4 Immunhistochemische Methoden (IHC)

Die Lokalisation von Adiponektin, seinen beiden Rezeptorisformen und GLUT4 wurde durch immunhistochemische Untersuchungen an Gewebeschnitten und Embryonen untersucht. Die Embryonen wurden dafür im Ganzen (*Whole Mount*) oder als ausgeschnittene Keimscheiben untersucht (Mikrosektion siehe Kapitel 2.1.8).

2.4.1 Anfertigung der Schnitte

Silanisierung der Objektträger:

Damit die Präparate auf dem Objektträger besser haften, wurden diese zuvor beschichtet. Dazu wurden die sauberen Objektträger 2 min in 2 % APES (Aminopropyltriethoxysilan) in Aceton getaucht, in Wasser gespült und danach bei Raumtemperatur getrocknet.

Fixierung und Einbettung:

Die Gewebe wurden für 68 Stunden in Bouin-Lösung fixiert. Anschließend wurden die fixierten Gewebe in Paraffin eingebettet. Die Einbettung erfolgte am automatischen Einbeter nach folgendem Protokoll:

Ethanol 70% → Ethanol 80% → Ethanol 90% → Ethanol 96% → 2x Isopropanol → 2x Xylol;
je 1 Stunde pro Lösungsmittel.

Bouin-Lösung:

Pikrinsäure (gesättigt)	75 ml
Formaldehyd	25 ml
Essigsäure (konzentriert)	5 ml (erst kurz vor Gebrauch dazugegeben)

Anfertigen von Paraffinschnitten:

Die Gewebe wurden mit einem Mikrotom in 5 µm dünne Schnitte geschnitten und auf Objektträger plaziert. Die Schnitte auf den Objektträgern wurden mindestens 2 Stunden bei 40°C getrocknet.

2.4.2 Immunhistochemie an Paraffinschnitten

Paraffinschnitte von Geweben des Kaninchens wurden vor dem Einsatz in die IHC für 2 - 24 Stunden bei 60°C entparaffiniert und anschließend zweimal in Xylol und einer absteigenden Ethanolreihe von 95 % → 80 % → 75 % → 50 % → 25 % → *Aqua dest.* (je 5 min) rehydriert. Die Objektträger wurden 3x mit PBST gewaschen. Die endogenen Peroxidasen wurden durch Inkubation in 3% Wasserstoffperoxid/Methanol blockiert. Danach wurde erneut in PBST gewaschen. Unspezifische Antikörper-Wechselwirkungen wurden durch Inkubation mit 10%-igem Ziegen- oder Eselserum in PBST für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur unterdrückt. Die Bindung des Primärantikörpers (siehe Tabelle 3) erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Danach wurden die Objektträger 2x 5 min und 3x 30 min in PBST gewaschen. Die Bindung des *horseradish* Peroxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörpers (siehe Tabelle 3) erfolgte für 2 h. Danach wurden die Objektträger 2x 5 min und 4x 30 min mit PBST gewaschen. Zur Detektion wurde das Substrat Diaminobenzidin (DAB) zugegeben, dass nach Umsatz ein braunes, unlösliches Präzipitat bildet. Die Reaktion wurde lichtmikroskopisch verfolgt und bei sichtbarem Niederschlag abgestoppt. Als Kontrollen wurden Gewebeschnitte ohne Primärantikörper mit 1% BSA/PBST inkubiert, aber ansonsten gleich behandelt. Die Zellkerne wurden teilweise mit Hämalaun gegengefärbt (siehe Kapitel 2.4.5). Nach Entwässern

der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe folgte die Einbettung mit DPX. Die IHC-Reaktion wurde am Lichtmikroskop (Zeiss, Software Axiovision 2.05) ausgewertet und dokumentiert.

PBS und PBST Puffer (pH 7,4)

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O	1,8 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
<i>Aqua dest.</i>	ad 1L

Zur Herstellung von PBST wurde auf 1 l PBS 1 ml Tween 20 zugegeben.

2.4.3 Whole Mount-Immunhistochemie

Für die *Whole Mount* Immunhistochemie (IHC) wurden 6 Tage alte Kaninchenblastozysten verwendet. *In vivo* und kultivierte Embryonen / Keimscheiben wurden zweimal in kaltem PBS gewaschen und 2 – 24 h in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Anschließend wurden sie direkt in die IHC eingesetzt oder nach Dehydrierung über eine Methanolreihe (50 %, 70 %, 100 %, je 5 min) in 100 % Methanol bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die Lagerung hatte keinen Einfluss auf die Qualität der Immunhistochemie.

Vor dem Einsatz in der IHC wurden die Embryonen je 5min über eine absteigende Methanolreihe von 75 % → 50 % → 25 % rehydriert. Anschließend wurden sie in PBS mit PVA (0,05 %) überführt. Nach mechanischem Entfernen der extrazellulären Blastozystenhüllen mittels Mikroschere und Pinzette wurden die Embryonen in die IHC eingesetzt.

PBS mit PVA (pH 7,4)

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O	1,8 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
PVA	0,5 g
<i>Aqua dest.</i>	ad 1L

2.4.3.1 Whole Mount-Immunhistochemie mit DAB-Detektion

Die wie zuvor beschrieben behandelten Embryonen (siehe Kapitel 2.4.3) wurden zur Blockierung endogener Peroxidasen für 15 min bei Raumtemperatur in 3% Wasserstoffperoxid/Methanol inkubiert und anschließend dreimal je 5 min bei Raumtemperatur in PBST gewaschen. Vor der Reaktion mit dem Primärantikörper wurden unspezifische Ladungen mit 10% Ziegen- oder Eseserum für 1 h bei Raumtemperatur abgeblockt. Folgend wurden die Embryonen mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert (siehe Tabelle 3).

Als Kontrolle dienten Embryonen, die ohne den Primärantikörper, aber ansonsten gleich behandelt wurden. Am nächsten Tag wurden die Blastozysten zweimal für 5min und dreimal

für 30 min mit 0,05 % PVA/PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Danach wurden die Embryonen für 1 h bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert (siehe Tabelle 3). Im anschließenden Waschschrift von zweimal 5 min und dreimal 30 min mit 0,05 % PVA/PBS (Raumtemperatur) wurde der überschüssige Sekundärantikörper entfernt. Die Detektion der positiven Immunreaktion erfolgte mit dem Substrat DAB unter Sichtkontrolle am Lichtmikroskop. Die Farbreaktion wurde bei sichtbarem Niederschlag nach ca. 10 min durch Umsetzen der Embryonen in *Aqua dest.* gestoppt. Anschließend erfolgte eine Kernfärbung mit Hämalaun (siehe Kapitel 2.4.5). Nach der Überführung der Blastozysten in *Aqua dest.* wurden sie auf silanisierten Objektträgern mit Moviol eingebettet. Die Farbreaktionen wurden am Lichtmikroskop ausgewertet und dokumentiert.

Pepsinlösung (pH 2,0)

HCl conc. (31%)	291,67 µl
Pepsin (0,2mg/ml)	25 µl
<i>Aqua dest.</i>	10 ml

Moviol

Glycerol	6 g
Moviol® 4-88 Reagent	2,4 g
Tris/HCL 0,2M pH 8,5	12 ml
<i>Aqua dest.</i>	6 ml

In einem 50 ml Polypropylenröhrchen wurde das Glycerol eingewogen, mit dem Moviol versetzt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde der Tris-Puffer zugegeben und das Gemisch auf 53°C erwärmt, bis sich das Moviol gelöst hat. Nach Zentrifugation bei 4 000 - 5 000 *rpm* für 20 min wurde die Moviol-Lösung in Aliquots bei -20°C gelagert.

2.4.3.2 Whole Mount-Immunhistochemie mit fluoreszierendem Sekundärantikörper

Die Blockierung unspezifischer Ladungen und die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgen wie unter Kapitel 2.4.3.1 beschrieben. Als zweiter Antikörper wurde ein Fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper verwendet (siehe Tabelle 3). Die Kernfärbung erfolgte zeitgleich mit dem Farbstoff 7-AAD in einer Verdünnung von 1:50. Nach einer Inkubationszeit von 90-120 min wurden die Embryonen mit 0,05% PVA/PBS gründlich gewaschen und anschließend in Moviol auf einem Objektträger eingedeckt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland).

2.4.4 Immunhistochemie an separierten Embryoblasten (Keimscheiben)

Nach dem Ausspülen der Blastozysten aus dem Uterus des Kaninchens und zweimaligem Waschen wurden sie in 4 % PFA für mindestens 2 Stunden fixiert und danach mit PBS-Puffer gewaschen. Unter einer Stereolupe und mit Hilfe einer feinen Pinzette und Schere wurde anschließend die Keimscheibe mit dem daran angrenzenden Trophoblasten ausgeschnitten. Diese wurden sofort für die IHC genutzt oder nach Dehydrierung über eine aufsteigende Methanolreihe in 100 % Methanol bei -20°C gelagert. Die IHC erfolgte mit HRP-gekoppeltem

oder Fluoreszenz-markiertem Sekundärantikörper wie im Kapitel 2.4.3.1 und 2.4.3.2 beschrieben.

2.4.5 Hämalaunfärbung

Die Zellkerne der Embryonen und Gewebe wurden nach IHC mittels DAB-Detektion mit Hämalaun gegengefärbt. Dafür wurden die Schnitte für 5 min bzw. Embryonen für ca. 1 min in Hämalaun (nach Mayer) inkubiert, anschließend wurden die Schnitte 20 min mit Leitungswasser fließend gewässert und 1 min in *Aqua dest.* gespült. Die Embryonen oder Keimscheiben wurden dreimal mit Leitungswasser gewaschen und dann in *Aqua dest.* überführt.

Hämalaun nach Mayer (saurer Hämalaun)

1g Hämatoxylin wurde in 10 ml absolutem Ethanol gelöst und auf 1l mit *Aqua dest.* aufgefüllt. Anschließend wurden 0,17 g Natriumiodat und 50 g Kalium-Aluminium-Sulfat zugegeben und sorgfältig gemischt. Nach vollständiger Lösung wurden 50 g Chloralhydrat und 0,1 g Zitronensäure zugefügt. Die Lösung ist mehrere Monate haltbar.

Tabelle 3: Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie

Primär-antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma (Katalog-Nr. #)	Sekundär-antikörper	Verdünnung	Firma
Adiponektin	mouse	1:250 in 3% BSA / PBS	abcam (# ab22554)	Goat Anti Mouse, HRP-konjugiert	1:2 in PBS	DAKO
AdipoR1	goat	1:500 in 3% BSA / PBS	abcam (# ab53398)	Donkey Anti Goat, HRP-konjugiert	1:250 in 3% BSA / PBS	abcam
AdipoR2	goat	1:500 in 3% BSA / PBS	abcam (# ab53399)	Donkey Anti Goat, HRP-konjugiert	1:250 in 3% BSA / PBS	abcam
GLUT4	mouse	1:2 000 in 3% BSA / PBs	abcam (# ab48547)	Goat Anti Mouse Alexa fluor® 488	1:300 in PBS	Molecular Probes

2.5 Proteinbiochemie

2.5.1. Proteinisolation und -quantifizierung

Die Gewebe wurden mit einem Mörser in flüssigem Stickstoff homogenisiert und in 800 µl kaltem RIPA-Puffer aufgenommen, gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit 800 µl kaltem RIPA-Puffer versetzt und von ihren Zellkulturflaschen mit Hilfe eines Schabers gelöst. Die gewonnenen Embryonen (in 100 µl RIPA) wurden auf Eis aufgetaut und ebenso wie die Zellen mit einer Spritze (0,45 x 12 mm, 26G) (Omnifix, Braun Meisungen AG, Karlsruhe) homogenisiert. Die Gewebe wurden mittels Ultraturrax homogenisiert. Nach sorgfältigem Mischen wurden die Suspensionen für weitere 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 20 min bei 14 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte in Doppelbestimmung mittels Bradford-Assay.

Ansatz:

Bradford- Reagenz	200 µl
<i>Aqua dest.</i>	800 µl
Proteinprobe	1 µl

Dafür wurde der Ansatz gemischt und die Absorption am Spektrophotometer bei 595 nm nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur gemessen. Als Leerwert wurde ein Ansatz aus 800 µl *Aqua dest.* und 200 µl Bradford-Reagenz verwendet. Die Proteinmenge wurde anhand einer Eichkurve ermittelt, welche mit bekannten Konzentrationen von BSA in RIPA erstellt war.

RIPA-Puffer:

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

Der RIPA-Puffer wurde bei 4°C gelagert. Vor der Verwendung wurde Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (2 µl / 100 µl) und Protease-Inhibitor-Cocktail (2 µl / 100 µl) frisch hinzugegeben.

2.5.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülgröße. Im Sammelgel, einem 4%-igen Polyacrylamidgel, werden die Proben auf eine möglichst kleine Bande konzentriert. Die Auftrennung der Proteingemische findet durch das Trenngel statt.

Für die Herstellung wurden die Komponenten für das jeweilige Gel zusammenpipettiert und nach Zugabe von 10%-igen APS (Ammoniumpersulfat) und TEMED (Tetramethylethylendiamin) wurde die Polymerisation ausgelöst. Das Trenngel wurde bis auf $\frac{3}{4}$ der Höhe in vorgefertigte Gelkassetten der Firma Invitrogen gegossen und mit 70%-igem Ethanol überschichtet. Nach der Auspolymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel bis zum oberen Rand gegossen. Für die Ausbildung der Ladetaschen wurde ein Kamm eingesetzt. Das auspolymerisierte Polyacrylamidgel wurde in eine NOVEX Elektrophoresekammer eingesetzt und mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Der Kamm wurde entnommen und die Ladetaschen mit Elektrophoresepuffer ausgespült.

Elektrophoresepuffer (10x Laemmli)

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

Vor der Verwendung wurde der 10x Laemmli mit *Aqua dest.* 1:10 verdünnt.

Herstellung eines Polyacrylamidgels:

<u>Trenngel:</u>	<u>8% Gel</u>	<u>10% Gel</u>	<u>12% Gel</u>
H ₂ O	4,3 ml	4,0 ml	3,3 ml
30% Acrylamid	3,0 ml	3,3 ml	4,0 ml
1,5M Tris (pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
10% APS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	6 µl	4 µl	4 µl

Sammelgel:

H ₂ O	2,7 ml
30% Acrylamid	0,67 ml
1,0M Tris (pH 6,8)	0,5 ml
10% SDS	40 µl
10% APS	40 µl
TEMED	4 µl

Probenaufbereitung

Zu den Proben wurden je nach aufzutragender Proteinmenge 5xSDS-Ladepuffer gegeben, so dass eine Einfachkonzentrierung des SDS-Ladepuffers resultierte. Anschließend wurden die Proben in einem Wasserbad für 10 min bei 75°C denaturiert und in die Ladetasche des Sammelgels aufgetragen. Zum Größenvergleich wurde der Proteinmarker SM0671 (Fermentas) aufgetragen. Während des Laufs im Sammelgel wurde eine Spannung von 120 V angelegt. Nach Durchlaufen durch die Trennschicht wurde die Spannung auf 180 V erhöht. Die Auftrennung wurde nach der Migration des SDS-Ladepuffers durch das Trenngel beendet.

5x Laemmli Ladepuffer:

Tris/HCl pH 6,8 (1 M)	30,25 g
SDS	5 g
Glycerol	25 ml
β-Mercaptoethanol	5 ml
Bromphenolblau	2,5 g
<i>Aqua dest.</i>	ad 50 ml

2.5.3 Native Gelelektrophorese

Bei einer Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen werden die Proteine abhängig von ihrer Größe, Struktur und Ladung aufgetrennt. Native Gele enthalten kein SDS, somit richtet sich die Ladung der Proteine im Gel nach ihrem isoelektrischen Punkt und dem pH-Wert des verwendeten Puffers. Es findet folglich keine Auftrennung nach dem Molekulargewicht statt. Dieses Verfahren dient allein der Überprüfung der Reinheit und Homogenität von Proteinen.

Das native Gel wird genauso gegossen wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben, ebenso wird die Gelelektrophoresekammer in gleicherweise vorbereitet. Es muss nur bedacht werden, dass sowohl die Gele als auch die zu verwendenden Puffer kein SDS, DTT oder β-Mercaptoethanol enthalten dürfen.

Herstellung eines nativen Polyacrylamidgels:

<u>Trenngel:</u>	<u>8% Gel</u>	<u>Sammelgel:</u>	
H ₂ O	4,3 ml	H ₂ O	2,7 ml
30% Acrylamid	3,0 ml	30% Acrylamid	0,67 ml
1,5M Tris (pH 8,8)	2,5 ml	1,0M Tris (pH 6,8)	0,5 ml
10% APS	0,1 ml	10% APS	40 µl
TEMED	6 µl	TEMED	4 µl

10x Elektrophoresepuffer (natives Polyacrylamidgel):

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

Vor der Verwendung wurde der 10x Elektrophoresepuffer mit *Aqua dest.* 1:10 verdünnt.

Probenaufbereitung

Zu den Proben wurden je nach aufzutragender Proteinmenge 5x-Ladepuffer ohne SDS gegeben, so dass eine Einfachkonzentrierung des Ladepuffers resultierte. Das daran anschließende auftragen der Proben und der Gellauf erfolgten wie bereits in Kapitel 2.5.3 beschrieben.

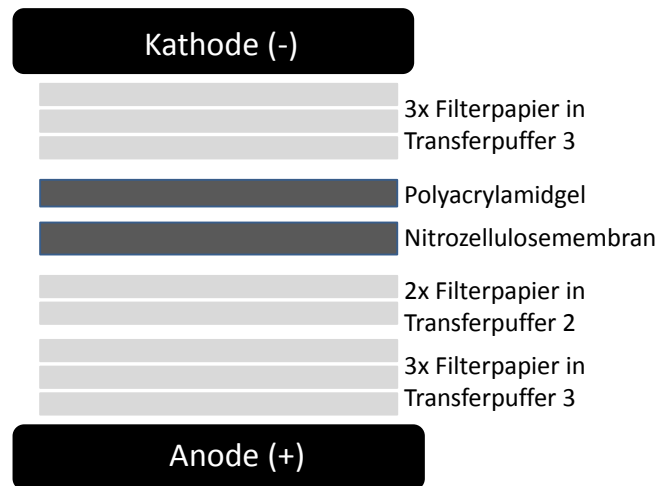
5x Ladepuffer:

Tris/HCl pH 6,8 (1 M)	30,25 g
Glycerol	25 ml
Bromphenolblau	2,5 g
<i>Aqua dest.</i>	ad 50 ml

2.5.4 Western-Blot

Für den Western-Blot wurden die Proteine des SDS-Gels bzw. des nativen Gels elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Bindung der Proteine an die Membran erfolgte über hydrophobe Wechselwirkungen. Um die Proteinbindungsstellen der Nitrozellulosemembran zu aktivieren, wurde dem Blotpuffer 20%-iges Methanol zugesetzt. Das Blotten erfolgte unter Kühlung in einer Blot-Kammer und bei einer Spannung von 150 mA für 120 min. Der Aufbau des Western-Blots kann der Abbildung 12 entnommen werden. Der Transfer wurde durch eine Ponceaurot S Färbung überprüft und eine Kopie der Membran angefertigt. Die Färbung wurde durch Waschen mit TBST 3 x 2 min entfernt.

	<u>Western-Blot- Transferpuffer 1:</u>	<u>Western-Blot- Transferpuffer 2:</u>	<u>Western-Blot- Transferpuffer 3:</u>
Tris	36,3g (0,3M)	3g (25mM)	3g (25mM)
Methanol (100%)	200ml (20%)	200ml (20%)	200ml (20%)
Aminocaprinsäure	-	-	5,2g (40mM)
<i>Aqua dest.</i>	ad 1l	ad 1l	ad 1l

Aufbau der Blot-Kammer:**Abb. 11:** Schema des Aufbaus einer Western-Blot-Kammer**2.5.5 Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern**

Um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen, erfolgte eine Blockierung in 5%-igen Magermilchpulver in TBST. Danach wurde die Membran mit dem entsprechenden Primärantikörper (siehe Tabelle 4) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am zweiten Tag wurde die Nitrozellulosemembran für 3x5 min mit TBST gewaschen und anschließend wurde der HRP-konjugierte Sekundärantikörper für 60-90 min bei Raumtemperatur zugegeben. Durch Waschen mit TBST für 3x5 min wurde der überschüssige ungebundene Sekundärantikörper entfernt. Vor der Detektionsreaktion wurde die Membran noch zweimal mit TBS gewaschen.

TBS-Puffer:

Tris (1,5M pH7,5)	10ml
NaCl	5,8g
Aqua dest.	ad 1l

TBST-Puffer

Tris (1,5M pH7,5)	10ml
NaCl	5,8g
Tween 20	1ml
Aqua dest.	ad 1l

2.5.6 Detektion und Auswertung

Die Detektion des Sekundärantikörpers erfolgte über eine Chemilumineszenzreaktion. Die an den Sekundärkörper konjugierte *horseradish* Peroxidase (HRP) katalysiert die Oxidation von Luminol und löst damit eine Chemilumineszenz aus. Dazu wurde die Nitrozellulosemembran mit dem *Immobilon Western Detection Reagent* (Millipore) nach Herstellerangaben entwickelt. Die Detektion der Chemilumineszenzreaktion erfolgte entweder über einen Röntgenfilm oder über eine Kameraaufnahme am *ChemiDoc-It Imaging System* (UVP, Cambridge, UK), mit dem eine Quantifizierung der Lichtemission direkt möglich war. Die Röntgenfilme wurden eingescannt und mit der Labworks-Software (UVP, Cambridge, UK) ausgewertet. Dabei wurde über die Schwärzung des Films oder die Menge des emittierten Lichtes über die Fläche der

entsprechenden Proteinbanden eine relative Proteinmenge abgeleitet. Die Mengenunterschiede bei der Proteinbeladung der Proben wurden durch den Bezug auf endogenes β -Actin verrechnet.

2.5.7 Abwaschen der Nitrozellulosemembran

Um die Membran für eine erneute Antikörperreaktion zu nutzen, mussten die hybridisierten Antikörper von der Membran entfernt werden. Dafür wurde die Membran bei 70°C für 30 min in *Stripping*-Puffer inkubiert, 4x5 min mit TBST gewaschen und wieder in 5%-igen Magermilchpulver/TBST blockiert. Eine so gereinigte Membran konnte wiederholt für die Hybridisierung mit einem neuen Primärantikörper verwendet werden.

Stripping-Puffer:

SDS (10%)	10ml
β -Mercaptoethanol	0,7ml
Tris-HCL (pH 6,8)	6,25ml
<i>Aqua dest.</i>	ad 50ml

Tabelle 4: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Primär-antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma (Katalog-Nr. #)	Sekundär-antikörper	Verdünnung	Firma
Adiponektin	<i>mouse</i>	1:1 000 in 3% BSA / TBST	Abcam (# ab22554)	<i>Goat Anti Mouse</i> , HRP-konjugiert	1:45 000 in 3% BSA / TBST	Dianova
AdipoR1	<i>mouse</i>	1:750 in 3% BSA / TBST	Abcam (# ab50675)	<i>Goat Anti Mouse</i> , HRP-konjugiert	1:10 000 in 5% Milch / TBST	Dianova
pAMPK	<i>rabbit</i>	1:1 000 in 5% BSA / TBST	Cell Signaling (# 2531)	<i>Goat Anti Rabbit</i> , HRP-konjugiert	1:12 000 in 3% BSA / TBST	DAKO
AMPK	<i>rabbit</i>	1:1 000 in 5% BSA / TBST	Cell Signaling (# 2532)	<i>Goat Anti Rabbit</i> , HRP-konjugiert	1:12 000 in 3% BSA / TBST	DAKO
pACC	<i>rabbit</i>	1:1 000 in 5% BSA / TBST	Cell Signaling (# 3661)	<i>Goat Anti Rabbit</i> , HRP-konjugiert	1:12 000 in 3% BSA / TBST	DAKO
pAkt	<i>rabbit</i>	1:1 000 in 5% BSA / TBST	Cell Signaling (# 9271)	<i>Goat Anti Rabbit</i> , HRP-konjugiert	1:12 000 in 3% BSA / TBST	DAKO
Akt	<i>rabbit</i>	1:1 000 in 5% BSA / TBST	Cell Signaling (# 9272)	<i>Goat Anti Rabbit</i> , HRP-konjugiert	1:12 000 in 3% BSA / TBST	DAKO
β-Actin	<i>mouse</i>	1:40 000 in 3% BSA / TBST	Sigma (# A5441)	<i>Goat Anti Mouse</i> , HRP-konjugiert	1:45 000 in 3% BSA / TBST	Dianova

2.5.8 Adiponektin-ELISA

Dieser ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*, AdipoGen) ist für die quantitative Determinierung von Adiponektin im Serum, Plasma, Urin, verschiedenen Geweben und Zellkulturüberständen geeignet. Es wurden Plasmaproben (siehe Kapitel 2.1.5) und Proteinproben (siehe Kapitel 2.5.1) einzelner, separierter Präimplantationsembryonen (6 dpc) aus dem Kaninchen untersucht.

Der ELISA wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Ein kurzes Ablaufschema ist in der Abb. 12 dargestellt.

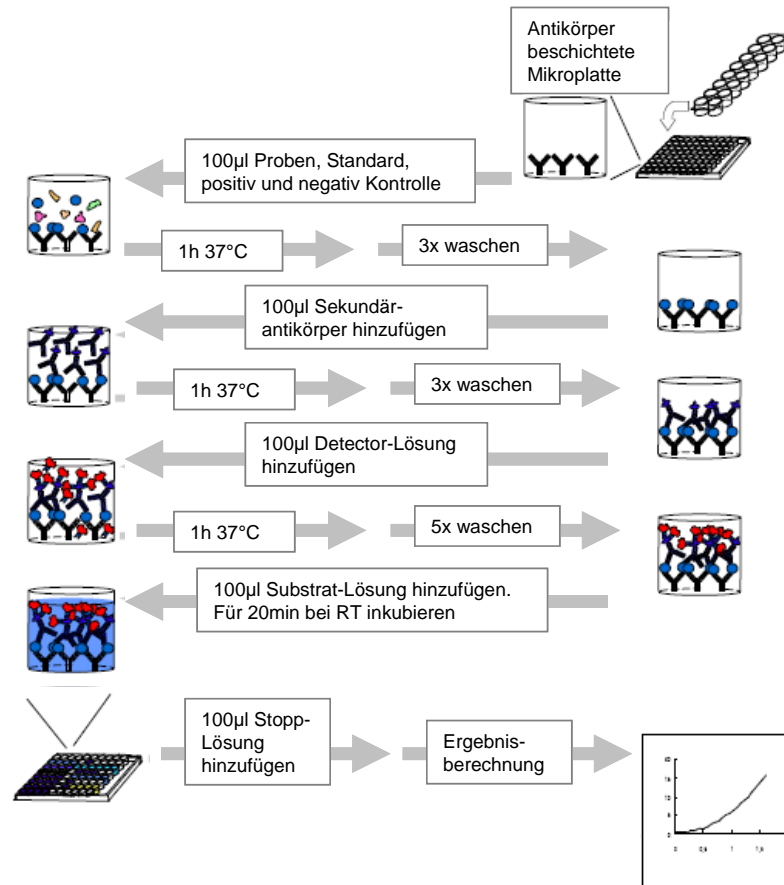


Abb. 12: Ablaufschema des Adiponektin-ELISAs

2.6 Glukoseaufnahme von Kaninchenblastozysten

Die Glukoseaufnahme der Präimplantationsembryonen wurde durch Messung der Inkorporation von Tritium [^3H]-markierter 3-O-Methyl-D-Glukose in einem Szintillationsmessgerät [Beckmann Coulter] bestimmt.

Nach einer einstündigen Adiponektin-Exposition (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (siehe Kapitel 2.1.7) wurden die Blastozysten drei Mal mit Glukose-freiem BSM II Medium gewaschen und im Anschluss in 600 μl Glukose-freies BSM II Medium, mit 0,3 mM 3-O-methyl- D -[^3H]Glukose (3-OMG; 37 GBq/l; Amersham) und 25 mM OMG (Sigma-Aldrich) supplementiert, überführt. Dort wurden sie für genau 3 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion abgestoppt, indem die Blastozysten in eiskaltes, Glukose-freies BSM II Medium und anschließend einzeln in Szintillations-gefäße mit 200 μl *aqua dest.* überführt wurden. Der Durchmesser der Blastozysten wurde zuvor mittels eines kalibrierten Okulareinsatzes unter der Stereolupe bestimmt. Als Hintergrundkontrolle wurden 3-mal 2 μl Medium-Proben aus dem letzten Waschschrift entnommen. Als Messkontrollgröße der Radioaktivität wurden 3-mal jeweils 10 μl des heißen Tropfens in 5 ml *aqua dest.* gemischt und daraus 200 μl in ein Szintillationsgefäß überführt. Für den Messvorgang wurden zu jeder Probe 5 ml Szintillationscocktail zugegeben, gemischt und im Counter die ^3H -Radioaktivität in cpm vermessen. Die Glukoseaufnahme wird

in Nanomol pro Minute pro Oberfläche (cm^2) dargestellt. Die Oberfläche der sphärischen Blastozyste ergibt sich aus folgender Formel: $4\pi r^2$ (r = Radius der Blastozyste).

2.7 Statistische Analysen

Für die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse wurde das Programm SigmaPlot® verwendet. Die Daten wurden zunächst auf ihre Normalverteilung untersucht und dann mithilfe der Varianzanalyse (ANOVA) unter Berücksichtigung der Bonferroni Korrektur auf ihre Signifikanz hin analysiert. Die verschiedenen Signifikanzniveaus werden wie folgt gekennzeichnet: Irrtumswahrscheinlichkeit p kleiner 5% als $p < 0,05$, p kleiner 1% als $p < 0,01$ und kleiner 0,1% als $p < 0,001$. Die Mittelwerte der Messungen wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (Mw \pm SEM) angegeben. Es wurden folgende Symbole verwendet: Mw - Mittelwert, SEM - Standardfehler des Mittelwertes, n - Zahl der Proben, N - Zahl der unabhängigen Versuche. Alle Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Expression von Adiponektin und seinen Rezeptoren in Präimplantations-embryonen des Kaninchens

Die Expression von Adiponektin und seinen beiden Rezeptoren (AdipoR1/2) während der Embryonalentwicklung wurde in Morulae (3 *dpc*), frühen Blastozysten am Tag 4 (4 *dpc*), Blastozysten am Tag 5 (5 *dpc*) und expandierten Blastozysten am Tag 6 (6 *dpc*) mittels *RT-PCR* untersucht. Die Blastozysten am Tag 6 wurden zusätzlich in die Gastrulationsstadien 0 bis 3 (siehe Abb. 7) unterteilt. Die zelllinienspezifische Verteilung der Gene in Embryoblast- und Trophoblastzellen (Em und Tr) wurde an 6 Tage alten Blastozysten analysiert.

AdipoR1 und R2 waren ab dem Morulastadium nachweisbar und die Expression nahm bis zur Blastozyste am Tag 6 kontinuierlich zu (siehe Abb. 13). Im Gegensatz dazu konnte Adiponektin erst ab dem 5. Tag detektiert werden (siehe Abb. 13). Die mRNA war sowohl im Embryoblasten als auch im Trophoblasten nachweisbar (siehe Abb. 13).

Die Proteinexpression von Adiponektin konnte in Kaninchenblastozysten des Stadiums 0/1 nachgewiesen werden. Auch hier war eine deutliche Expression in beiden Zelllinien erkennbar (siehe Abb. 14). Dies gilt auch für die Adiponektinrezeptoren (AdipoR1/R2), die ebenso in Embryoblast- und Trophoblastzellen immunhistochemisch nachgewiesen werden konnten (siehe Abb. 15).

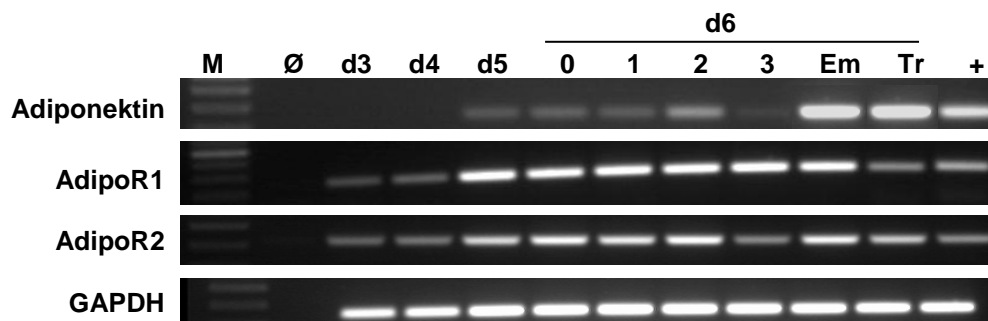


Abb. 13: Expression von Adiponektin, AdipoR1 und AdipoR2 in Präimplantationsembryonen des Kaninchens

Auftrennung der *RT-PCR*-Produkte für Adiponektin, AdipoR1 und R2 im Agarosegel von Morulae (d3), Blastozysten (d4 und d5) und expandierten Blastozysten (d6) der Gastrulationsstadien 0 bis 3 und für separierte Embryoblasten (Em) und Trophoblasten (Tr) des Stadium 1

Ø - PCR-Kontrollreaktion ohne cDNA (Negativkontrolle)

+ - PCR-Kontrollreaktion an Gewebe (Positivkontrolle)

(Adiponektin (158 bp): Herz; AdipoR1 (238 bp): Skelettmuskel; AdipoR2 (210 bp): Leber)

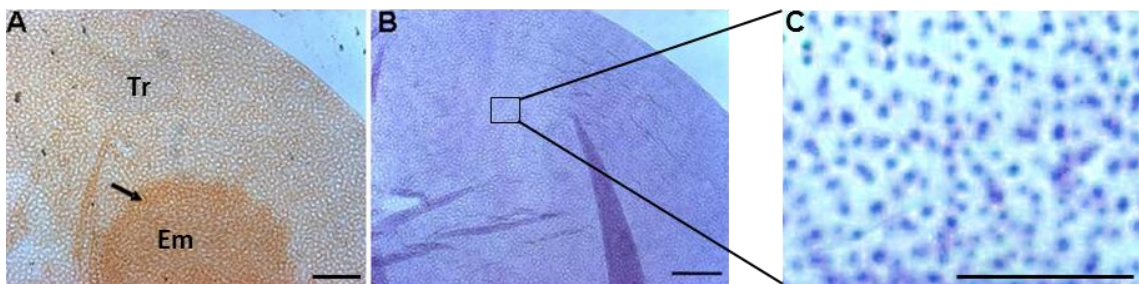


Abb. 14: Lokalisation von Adiponektin in der Kaninchenblastozyste

Whole Mount IHC an 6 Tage alten *in vivo* Kaninchenblastozysten. Die IHC zeigt eine positive Färbung für Adiponektin (**A**) und die IHC-Kontrollreaktion ohne 1. Antikörper, in der die Kerne durch Hämalaun (blau) gegengefärbt wurden (**B,C**). Der Pfeil zeigt auf die Grenze zwischen Embryoblasten (Em) und Trophoblasten (Tr). Die dargestellte IHC an einer Blastozyste steht repräsentativ für 8 untersuchte Blastozysten ($n = 8$).

Maßstab = 200 μm

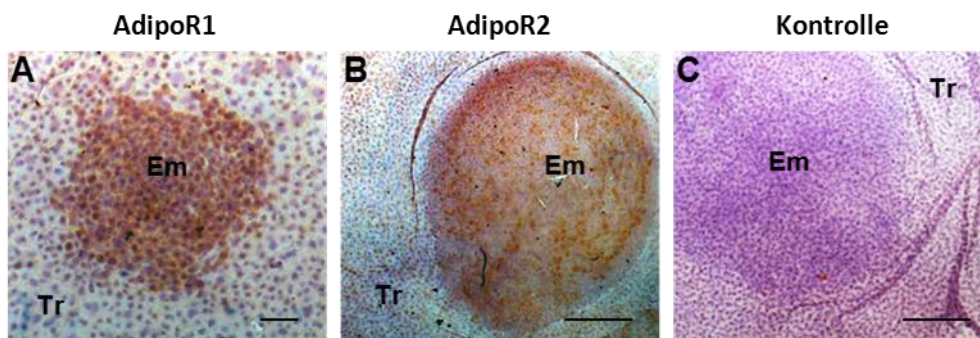


Abb. 15: Lokalisation von AdipoR1 und AdipoR2 in der Kaninchenblastozyste

Whole Mount IHC an 6 Tage alten *in vivo* Kaninchenblastozysten. Die IHC zeigt eine positive Färbung für AdipoR1 (**A**) und AdipoR2 (**B**) im Embryoblasten (Em) und Trophoblasten (Tr). Die IHC-Kontrollreaktion von A und B ist in (**C**) gezeigt. Die Kerne wurden mit Hämalaun (blau) gegengefärbt. Die dargestellte IHC an einer Blastozyste steht repräsentativ für 8 untersuchte Blastozysten ($n = 8$) verschiedener Gastrulationsstadien.

Maßstab = 100 μm (A); 200 μm (B, C)

3.2 Expression von Mitgliedern der Adiponektin-Signalkaskade in Präimplantations-embryonen des Kaninchens

Die Expression der wichtigsten Mitglieder der Adiponektin-Signalkaskade wurde an Blastozysten am Tag 6 im Stadium 0/1 mittels *RT-PCR* untersucht. Zudem wurde die Verteilung in Embryoblast- und Trophoblastzellen analysiert.

Die Transkripte für Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC), AMP-abhängige Kinase (AMPK), *Adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 1* (APPL1), *Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase kinase 2* (CaMKK), Serin/Threoninkinase 11 (LKB1) und Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor alpha (PPAR α) waren in der Blastozyste am Tag 6 nachweisbar (siehe Abb. 16). Für APPL1 und PPAR α konnte ein deutliches *PCR*-Produkt in beiden Zelllinien gezeigt werden (siehe Abb. 16). Für AMPK und CaMKK ergab sich im Trophoblasten nur eine schwache Bande, während im Embryoblasten eine stärkere Expression nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 16). Ein *PCR*-Produkt für ACC und LKB1 wurde ausschließlich im Embryoblasten nachgewiesen (siehe Abb. 16).

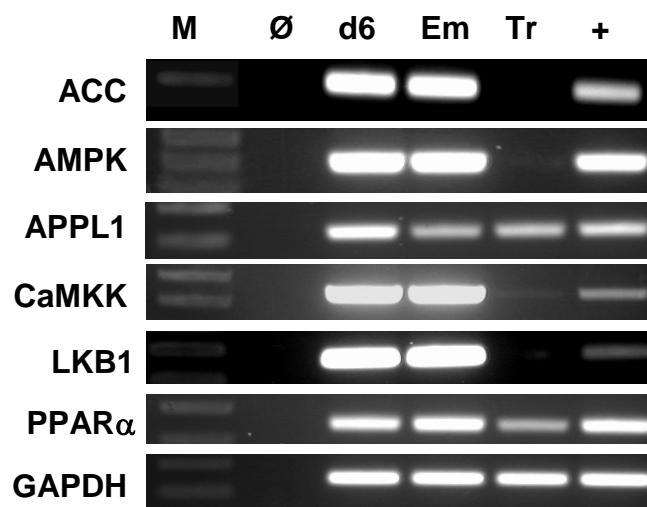


Abb. 16: Expression von Mitgliedern der Adiponektin-Signalkaskade in Präimplantationsembryonen des Kaninchens

Auftrennung der *RT-PCR*-Produkte der Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC), AMP-abhängige Kinase (AMPK), *Adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 1* (APPL1), *Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase kinase 2* (CaMKK), Serin/Threoninkinase 11 (LKB1) und Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor alpha (PPAR α) im Agarosegel von expandierten Blastozysten (d6) und für separierte Embryoblasten (Em) und Trophoblasten (Tr) des Stadium 1 (N=3; n=3)

Ø - *PCR*-Kontrollreaktion ohne cDNA (Negativkontrolle)

+ - *PCR*-Kontrollreaktion an der Leber (Positivkontrolle)

3.3 Expressionsprofil von Adiponektin und seinen Rezeptoren *in vivo* unter dem Einfluss eines experimentell induzierten maternalen Diabetes mellitus Typ 1

3.3.1 Adiponektin und seine Rezeptoren auf embryonaler Seite

3.3.1.1 Adiponektin

Mittels *Real time PCR* wurde ein Einfluss des DT1 auf die Kaninchenblastozyste (6 *dpc*) der Stadien 1 und 2 analysiert. Die Adiponektin-Transkriptmenge war in den diabetischen Blastozysten beider Stadien erhöht, mit einem p-Wert von 0,0507 (Stadium 1) und 0,0504 (Stadium 2) (siehe Abb. 17 A).

Die Verifizierung der Transkriptionsregulation wurde durch einen Adiponektin-ELISA vorgenommen, wobei zum Einen die Adiponektinmenge der gesamten Blastozyste gemessen wurde. Hierbei wiesen Blastozysten des Stadium 1 aus diabetischen Tieren eine Erhöhung der Adiponektinmenge um ungefähr 50 % auf. Im Stadium 2 war dieser Anstieg nur noch marginal und nicht signifikant (siehe Abb. 17 B).

Desweiteren wurden separierte Embryoblasten und Trophoblasten aus den beiden Versuchsgruppen mittels ELISA verglichen. Während in Blastozysten aus gesunden Tieren die Adiponektinkonzentration im Embryoblasten und Trophoblasten annähernd den gleichen Wert erreichte (ca. 0,1 ng/ml), war die Menge bei Blastozysten aus diabetischen Tieren deutlich unterschiedlich. Die Adiponektinkonzentration stieg im Trophoblasten um ca. das Vierfache auf 0,4 ng/ml, während im Embryoblasten kein Adiponektin mehr messbar war (siehe Abb. 18). Damit konnte geklärt werden, dass der Anstieg der Adiponektinkonzentration in der diabetischen Blastozyste auf der Hochregulierung von Adiponektin im Trophoblasten basiert (siehe Abb. 18). Im Embryoblasten war Adiponektin in den diabetischen Blastozysten nicht mehr nachweisbar. Immunhistochemisch konnte dieses veränderte Expressionsmuster untermauert werden. In den Kontrollblastozysten war Adiponektin im Embryoblasten und Trophoblasten nachweisbar (siehe Abb. 19 A, B, C) in den DT1-Blastozysten ausschließlich im Trophoblasten (siehe Abb. 19 D, E, F).

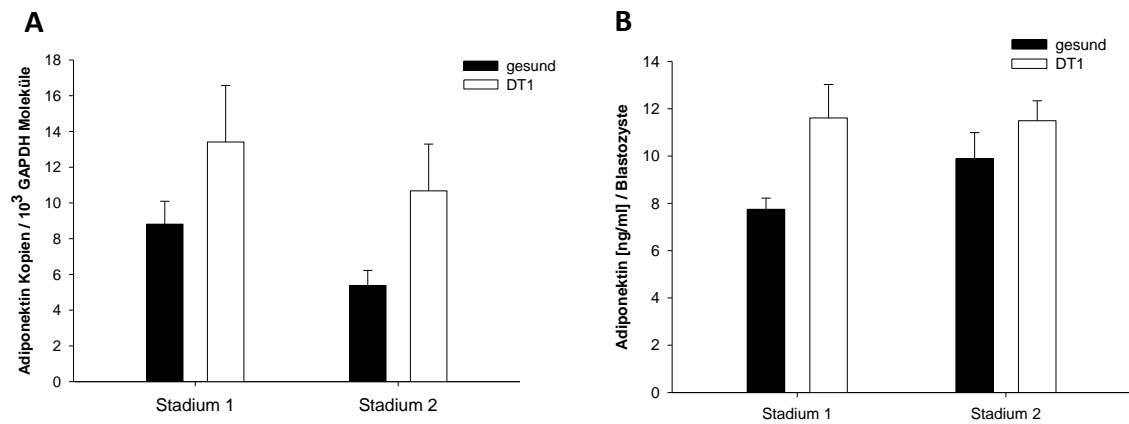


Abb. 17: Quantifizierung von Adiponektin-RNA und -Protein in Kaninchenblastozysten am Tag 6 p.c.

A Quantifizierung der Transkriptmenge von Adiponektin [Kopien / 10^3 GAPDH Moleküle] in 6 Tage alten *in vivo* Kaninchenblastozysten (Stadium 1 und 2) mittels *Real time PCR*. Die Adiponektin-Mengen wurden nach Abgleich gegen GAPDH derselben Probe ermittelt. N = 3, n = 12

B Quantifizierung der Proteinmenge von Adiponektin [ng / ml / Blastozyste] in 6 Tage alten Kaninchenblastozysten (Stadium 1 und 2) mittels ELISA. Der ELISA stellt das Ergebnis von 3 unabhängigen Experimenten (N=3) mit jeweils 3 Pools à 10 Blastozysten pro Experiment dar (n=30)

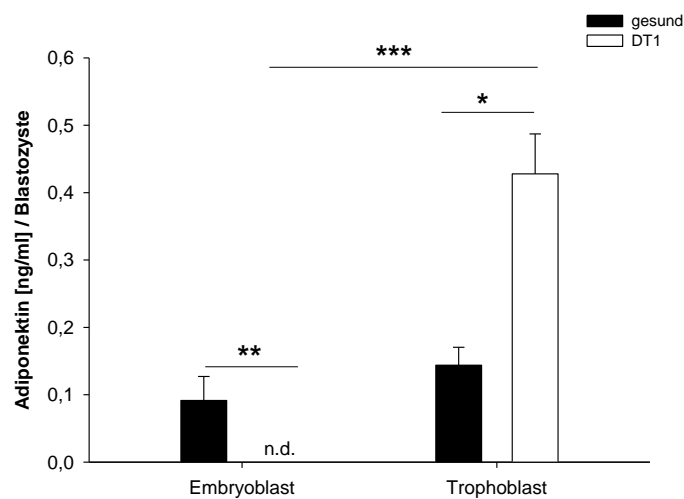


Abb. 18: Adiponektinkonzentration in Embryoblasten und Trophoblasten von 6 Tage alten Kaninchenblastozysten

Quantifizierung der Proteinmenge von Adiponektin [ng / ml] in separierten Embryoblasten und Trophoblasten (6dpc) mittels ELISA. Das Diagramm stellt den Mittelwert (Mw \pm SEM) von 3 unabhängigen Experimenten (N=3) mit jeweils 8 Blastozysten pro Experiment dar (n=8)

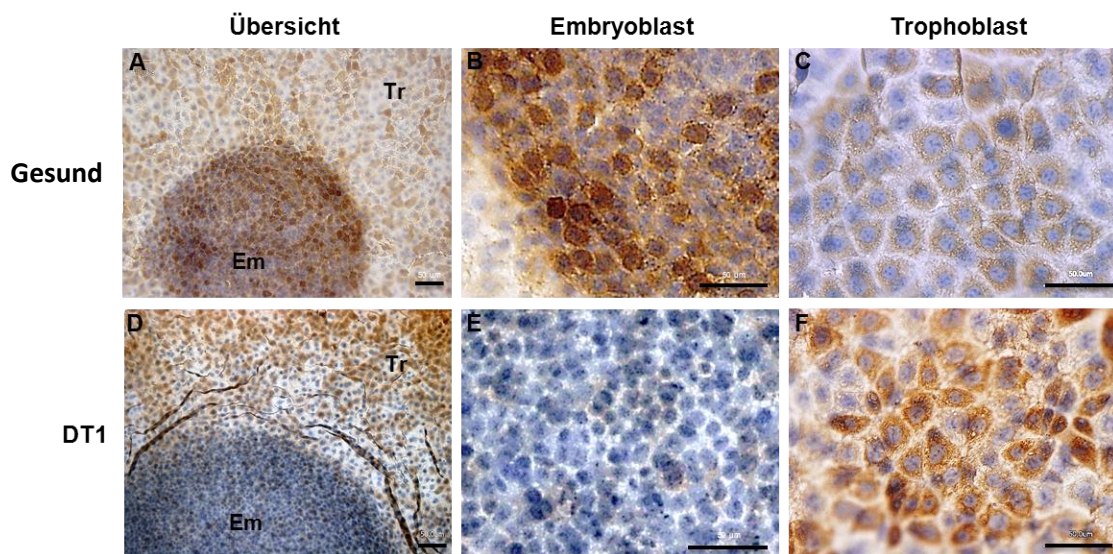


Abb. 19: Immunhistochemische Detektion von Adiponektin in der Kaninchenblastozyste

Adiponektin-IHC an Keimscheiben von 6 Tage alten Kaninchenblastozysten aus Kontrolltieren (**A** - **C**) und diabetischen Tieren (**D** - **F**). Neben der Übersicht (**A**; **D**) ist eine Vergrößerung des Embryoblasten (**B**; **E**) und des Trophoblasten (**C**; **F**) dargestellt. Die IHC zeigte eine positive Färbung (braun) des Embryoblasten (Em) (**A**; **B**) und Trophoblasten (Tr) (**A**; **C**) bei den Kontrollen. Unter dem Einfluss eines DT1 (**D**; **E**; **F**) war die Färbung des Embryoblasten (Em) (**D**; **E**) deutlich schwächer im Vergleich zu den Kontrollen während der Trophoblast (Tr) (**D**; **F**) eine stärkere Färbung aufweist. Die Kerne wurden durch Hämalaun (blau) gegengefärbt. Die dargestellte IHC an einer Blastozyste ist repräsentativ für 8 untersuchte Blastozysten (n = 8).

Maßstab = 50 µm

3.3.1.2 Adiponektinrezeptoren

Protein

AdipoR1 (siehe Abb. 20 A, B) und R2 (siehe Abb. 20 C, D) waren immunhistochemisch in den Blastozysten aus gesunden und diabetischen Tieren nachweisbar. Sie waren im Embryoblasten und Trophoblasten lokalisiert und wiesen hauptsächlich eine zytoplasmatische Färbung auf. Mit einer deutlich schwächeren Intensität lagen sie in der Zellmembran vor. Es zeigten sich keine Unterschiede in der AdipoR2-Lokalisation oder der Intensität der Immunhistochemie zwischen den Blastozysten aus gesunden oder diabetischen Tieren (siehe Abb. 20 C, D). Die AdipoR1-Immunhistochemie hingegen wies eine verstärkte Färbung des Embryoblasten und des Trophoblasten unter diabetischen Bedingungen auf, aber die Lokalisation des Rezeptors blieb unverändert (siehe Abb. 20 B).

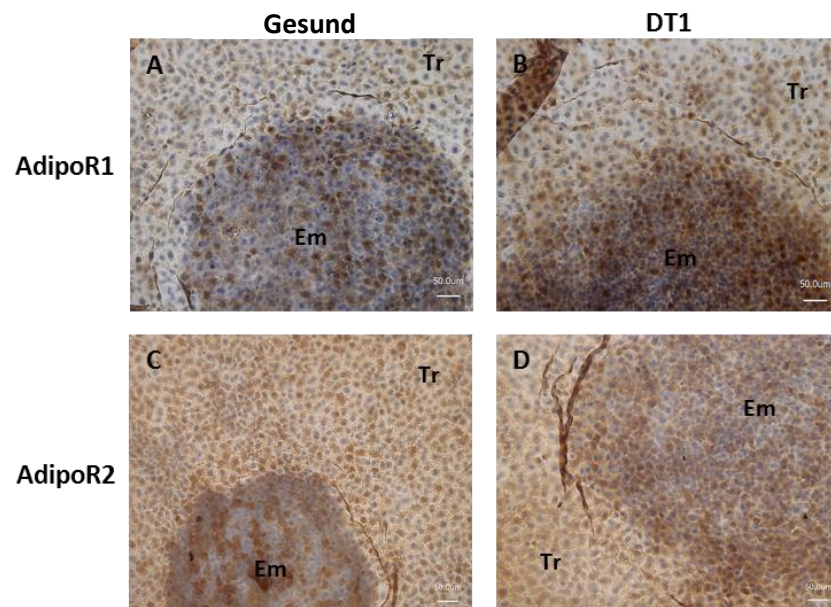


Abb. 20: Immunhistochemischer Nachweis von AdipoR1 und AdipoR2 in der Kaninchenblastozyste

IHC an Keimscheiben von 6 Tage alten *in vivo* Kaninchenblastozysten aus Kontrolltieren (**A; C**) und diabetischen Tieren (**B; D**). Die IHC zeigte eine positive Färbung des Embryoblasten (Em) und Trophoblasten (Tr) der Kontrollen (**A; C**) und unter dem Einfluss eines DT1 (**B; D**). AdipoR2 wies keinen Unterschied zwischen der Kontrolle (**C**) und dem DT1 (**D**) auf, während bei AdipoR1 unter diabetischen Bedingungen (**B**) Em und Tr eine stärkere Färbung zeigten. Die Kerne wurden mithilfe von Hämalaun (blau) gegengefärbt. Die dargestellte IHC an einer Blastozyste ist repräsentativ für 8 untersuchte Blastozysten ($n = 8$).

Maßstab = 50 μ m

RNA

Die AdipoR2-Transkriptmenge zwischen den untersuchten Gastrulationsstadien (0-2) blieb unverändert (siehe Abb. 21 B). Auch ein maternaler Diabetes zeigte keine Auswirkungen auf die AdipoR2-Transkriptmenge (siehe Abb. 21 B). Die Transkription von AdipoR1 war unter diabetischen Bedingungen in allen untersuchten Stadien (0 - 2) um mindestens das Dreifache hochreguliert (siehe Abb. 21 A). Während die mRNA-Menge zwischen den untersuchten Gastrulationsstadien konstant blieb.

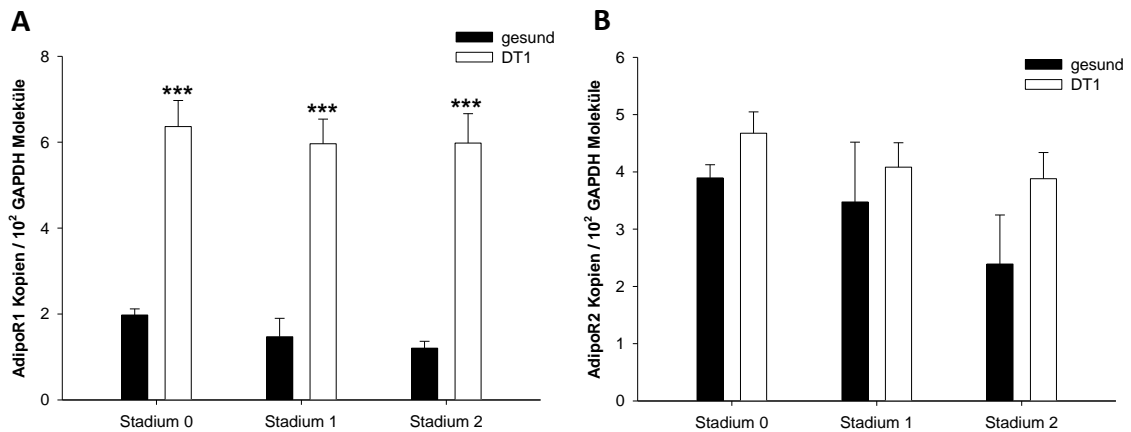


Abb. 21: Quantifizierung von AdipoR1- und -R2-mRNA in Kaninchenblastozysten

A Quantifizierung der Transkriptmengen von AdipoR1 [Kopien / 10^2 GAPDH Moleküle] und **B** AdipoR2 [Kopien / 10^2 GAPDH Moleküle] in 6 Tage alten *in vivo* Kaninchenblastozysten (Stadium 0 bis 2) mittels *Real time PCR*. Die AdipoR-Mengen wurden nach Abgleich gegen GAPDH derselben Probe ermittelt. N = 3, n = 12

3.3.2 Adiponektin und seine Rezeptoren auf maternaler Seite

Im Plasma und Endometrium gravider Kaninchen am Tag 6 *p.c.* wurden die Adiponektinmengen quantifiziert und von diabetischen und gesunden Tieren verglichen.

3.3.2.1 Adiponektin im Plasma

Mittels ELISA war eine ca. vierfache Steigerung der Adiponektinkonzentration im Plasma gravider diabetischer Kaninchen messbar (siehe Abb. 22). Die Konzentration im Plasma diabetischer Tiere betrug $4,6 \pm 1,2$ ng/ml [MW \pm SEM] gegenüber gesunden Kontrolltieren $1,2 \pm 0,4$ ng/ml [MW \pm SEM].

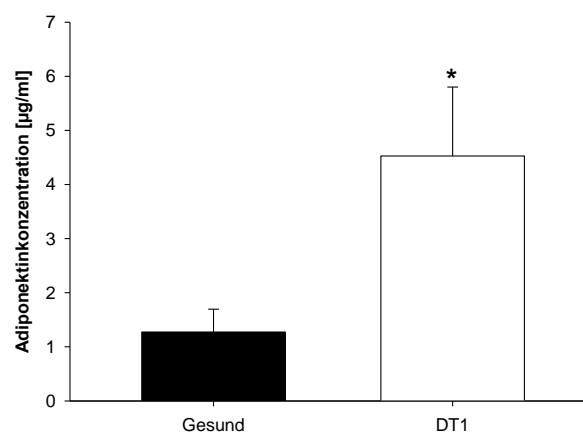


Abb. 22: Adiponektinkonzentrationen im Plasma gravider Kaninchen (6 *dpc*)

Quantifizierung der Adiponektinproteinmenge [μ g/ml] im Blutplasma gravider Kaninchen am Tag 6 *p.c.* mittels ELISA (Mw \pm SEM). Der ELISA stellt das Ergebnis von 3 unabhängigen Experimenten (N = 3) mit jeweils 5 Blutproben pro Experiment dar (n=5)

3.3.2.2 Adiponektin im Endometrium

Die mittels *Real time PCR* gemessene Adiponektin-Transkriptmengen waren in den Endometrien diabetischer und gesunder Tiere vergleichbar hoch (siehe Abb. 23 A).

Die Quantifizierung des Adiponektinproteins im Endometrium mittels *Western Blot* (siehe Abb. 23 C) ergab hingegen eine Verdoppelung der Proteinmenge im Endometrium diabetischer Tiere (siehe Abb. 23 C).

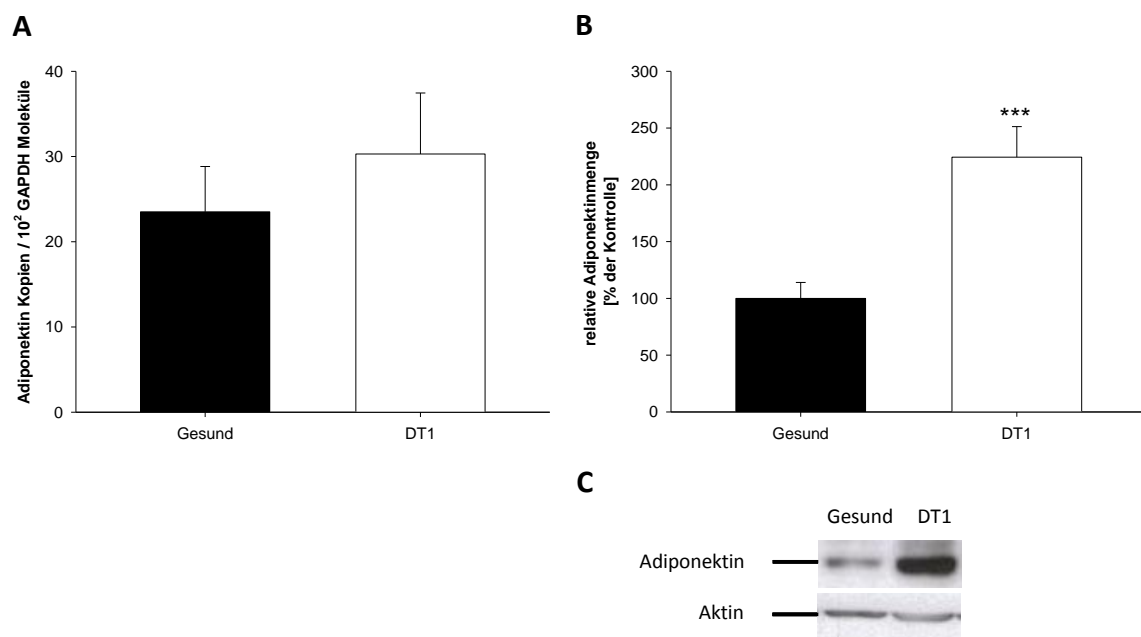


Abb. 23: Quantifizierung von Adiponektin im Endometrium gravider Kaninchen am Tag 6 p.c.

A Quantifizierung der Transkriptmenge von Adiponektin [Kopien / 10⁵ GAPDH Moleküle] im Endometrium gravider Kaninchen (6 dpc) mittels *Real time PCR*. Die Adiponektin-Mengen wurden nach Abgleich gegen GAPDH derselben Probe ermittelt (N = 3, n = 12; Mw ± SEM).

C Nachweis von Adiponektin im *Western Blot* und anschließende densitometrische Auswertung (**B**) der relativen Adiponektinproteinmenge im Endometrium (6 dpc) nach Abgleich gegen β -Aktin (Mw ± SEM). Der *Western Blot* stellt das Ergebnis von 3 unabhängigen Experimenten (N = 3) mit jeweils 10 Blastozysten pro Experiment dar (n=10).

3.3.2.3 Adiponektinrezeptoren im Endometrium

Um die beiden Adiponektinrezeptoren im Endometrium nachweisen zu können, wurde die Transkriptmenge von AdipoR1 und R2 mittels *Real time-PCR* quantifiziert.

Die mRNA-Mengen von AdipoR1 und R2 wiesen keine signifikanten Unterschiede im Endometrium der diabetischen Kaninchen auf.

Mittels *Western Blot*-Analysen konnte AdipoR1 im Endometrium nachgewiesen werden. Im Endometrium diabetischer Kaninchen kam es zu einer signifikanten Verdreifachung der AdipoR1-Proteinmenge.

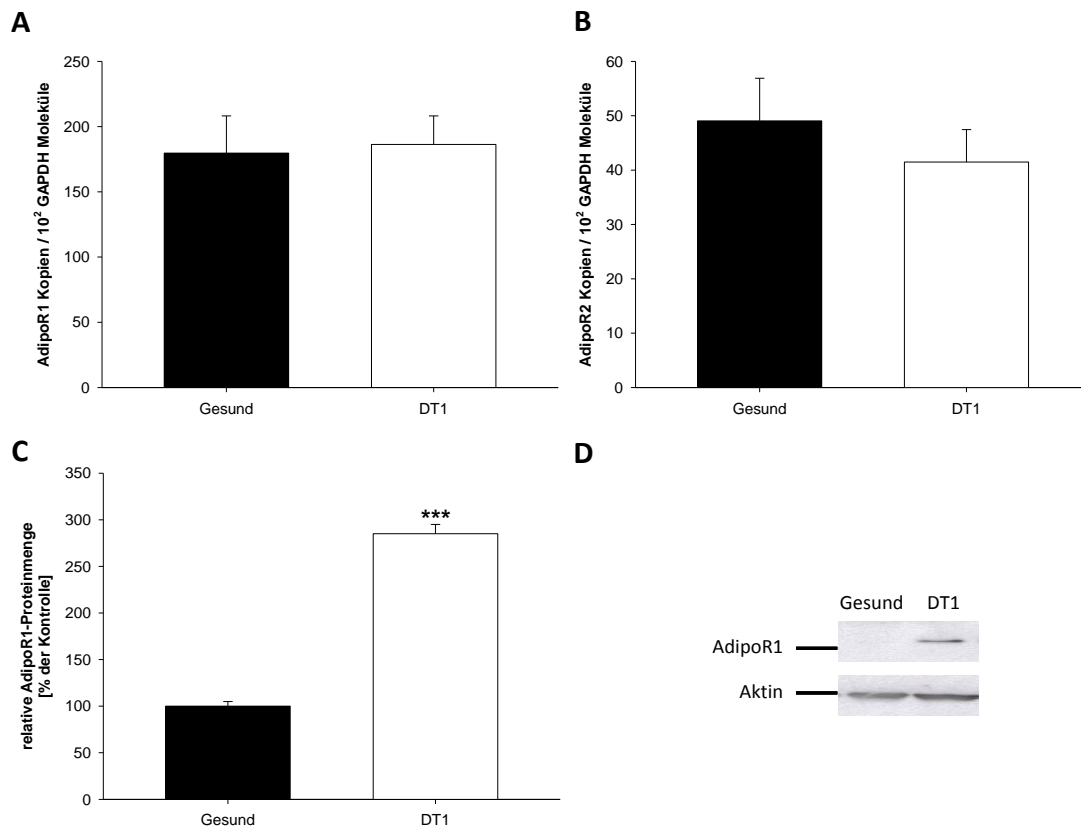


Abb. 24: Quantifizierung der Adiponektinrezeptoren im Endometrium gravider Kaninchen (6 dpc)

Quantifizierung der Transkriptmenge von AdipoR1 [Kopien / 10² GAPDH Moleküle] **(A)** und AdipoR2 [Kopien / 10² GAPDH Moleküle] im Endometrium (6 dpc) mittels *Real time PCR* **(B)**. Die AdipoR-Mengen wurden nach Abgleich gegen GAPDH derselben Probe ermittelt (N = 3, n = 12; Mw ± SEM).

Nachweis von AdipoR1 im *Western Blot* **(D)** und anschließende densitometrische Auswertung **(C)** der relativen AdipoR1-Proteinmenge im Endometrium (6 dpc) nach Abgleich gegen β-Aktin (Mw ± SEM). Der *Western Blot* stellt das Ergebnis von 3 unabhängigen Experimenten (N = 3) mit jeweils 10 Blastozysten pro Experiment dar (n=10)

3.4 Aktivierung des Adiponektin-Signalweges in Präimplantationsembryonen des Kaninchens durch Adiponektin in der *In-vitro*-Kultur

3.4.1 Aktivierung des Schlüsselenzyms AMPK

Metabolische Reaktionen als Antwort auf eine Adiponektin-Stimulation werden vorrangig über die Phosphorylierung der AMPK (pAMPK) vermittelt. Nach einer 15-minütigen *In-vitro*-Kultur wurden die Blastozysten aus gesunden Tieren mithilfe von *Western Blot*-Analysen untersucht. Die Supplementation mit 1 µg/ml Adiponektin steigerte die Phosphorylierung der AMPK in den kultivierten Blastozysten (Normoglykämie; 6 dpc) signifikant (siehe Abb. 25 A, B). Die Menge der phosphorylierten AMPK erhöhte sich annähernd um das Vierfache. Dies deutet auf einen funktionalen Adiponektin-Signalweg in Präimplantationsembryonen des Kaninchens am Tag 6 hin.

In den Blastozysten aus diabetischen Tieren wurden die Messpunkte nach der *In-vitro*-Kultur mit 5 und 15 min festgelegt. Es gab nur bei der kurzzeitigen Stimulation eine geringfügige AMPK-Phosphorylierung (siehe Abb. 25 A, B). Insgesamt fällt bei Blastozysten aus diabetischen Kaninchen die Aktivierbarkeit der AMPK deutlich geringer aus.

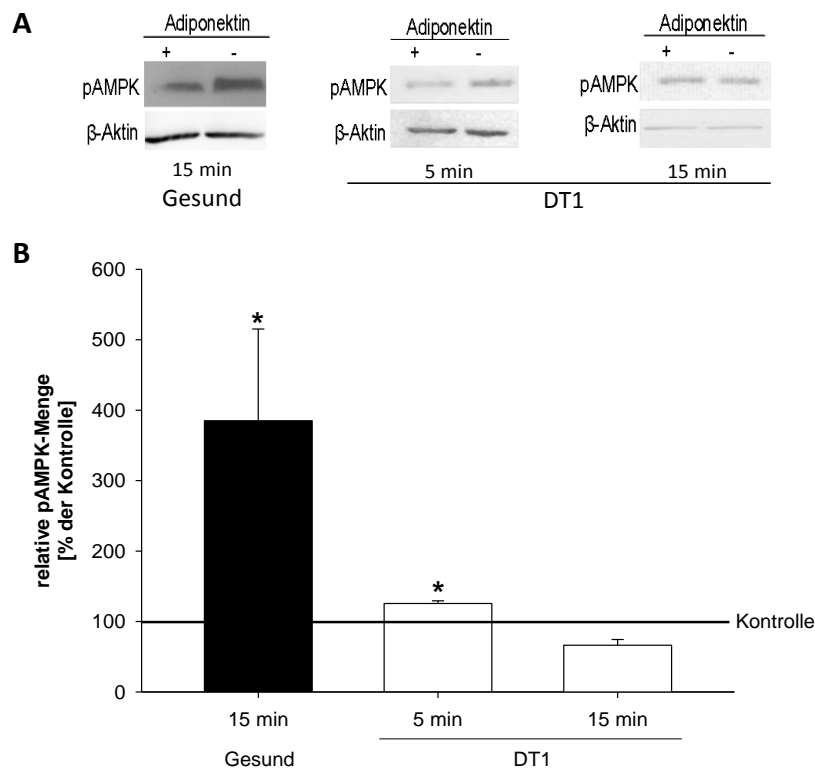


Abb. 25: Phosphorylierung der AMPK nach Adiponektin-Stimulation

Nachweis der pAMPK im *Western Blot* (A) und anschließende densitometrische Quantifizierung (B) der relativen pAMPK-Proteinmenge in Blastozysten (6 dpc) gesunder oder diabetischer Kaninchen (DT1), die für 5 oder 15 min mit Adiponektin (1 µg/ml) stimuliert wurden nach Abgleich gegen β-Aktin (Mw ± SEM). Als Kontrolle dienten Blastozysten, denen eine äquivalente Menge Kulturmedium zugegeben wurde. Die jeweils korrespondierende Kontrolle wurde 100 % gesetzt und ist als waagerechte Linie im Diagramm dargestellt. Der *Western Blot* stellt das Ergebnis von 3 unabhängigen Experimenten (N = 3) mit jeweils 10 Blastozysten pro Experiment dar (n=10)

3.4.2 Aktivierung des PI3-Kinase- / Akt-Signalweges durch Adiponektin in Kaninchenblastozysten

Eine 15-minütige Stimulation mit 1 µg/ml Adiponektin führte in den 6 Tage alten Kaninchenblastozysten zu einem signifikanten Anstieg der Akt-Phosphorylierung um 70% bis 740% (siehe Abb. 26 A, B).

In den Blastozysten aus diabetischen Tieren wurden die Zeitpunkte in der *in vitro*-Kultur mit 5 und 15 min festgelegt. Es gab nur bei der kurzzeitigen Stimulation eine um den Faktor 2

erhöhte Akt-Phosphorylierung (siehe Abb. 26 A, B). Wie zuvor für die AMPK gezeigt, fällt auch bei Akt die Aktivierbarkeit in den Blastozysten aus diabetischen Kaninchen geringer aus.

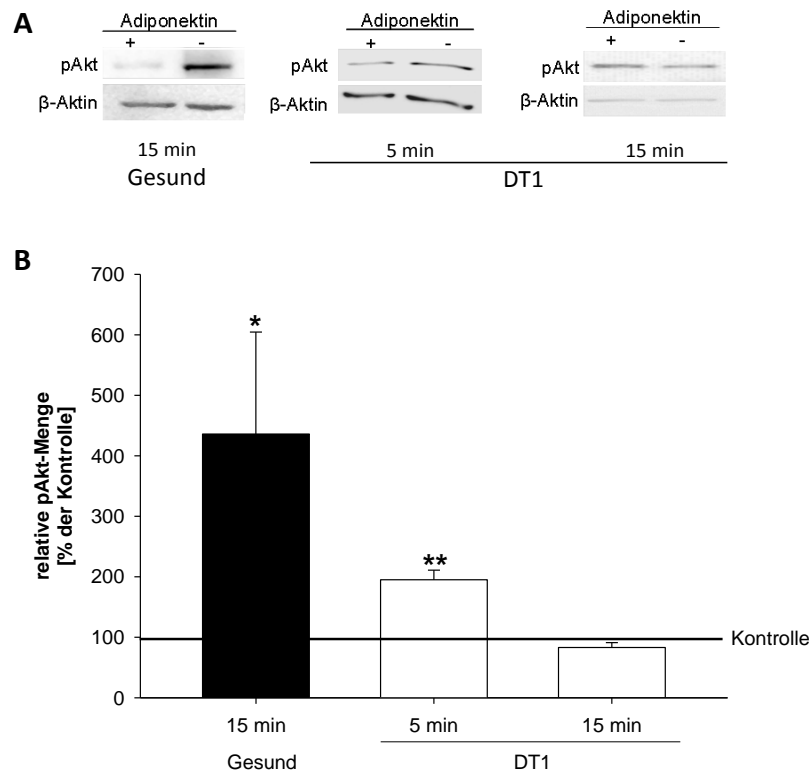


Abb. 26: Phosphorylierung von Akt nach Adiponektin-Stimulation in Kaninchenblastozysten

Nachweis der pAkt im *Western Blot* (A) und anschließende densitometrische Analyse (B) der relativen pAkt-Proteinmenge in Blastozysten (6 *dpc*) gesunder oder diabetischer Kaninchen (DT1), die für 5 oder 15 min mit Adiponektin (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) stimuliert wurden nach Abgleich gegen β -Aktin (Mw \pm SEM). Die korrespondierende Kontrolle wurde 100 % gesetzt und ist als waagerechte Linie im Diagramm dargestellt. Der *Western Blot* stellt das Ergebnis von 3 unabhängigen Experimenten (N = 3) mit jeweils 10 Blastozysten pro Experiment dar (n=10)

3.4.3 Wirkung von Adiponektin auf seine Rezeptoren

Um zu überprüfen, ob Adiponektin die Expression seiner beiden Rezeptoren in Embryonen transkriptionell reguliert, wurden Blastozysten (Stadium 0/1; 6 *dpc*) aus den Kontroll- und DT1-Tieren *in vitro* mit Adiponektin (1 und 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 1 und 4 Stunden stimuliert. Mittels *Real time PCR* wurde die Expression in den nach der Kultur separierten Embryoblasten und Trophoblasten analysiert.

3.4.3.1 AdipoR1

Nach einer ein- oder vierstündigen Stimulation mit Adiponektin (1 und 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zeigten sich im Embryoblasten und Trophoblasten der Blastozysten der DT1- und Kontrolltiere keine

Veränderungen der AdipoR1-Transkriptmenge (siehe Abb. 27 A - D). Auch zwischen Embryoblast und Trophoblast ließ sich kein signifikanter Unterschied mittels *Real time PCR* ermitteln.

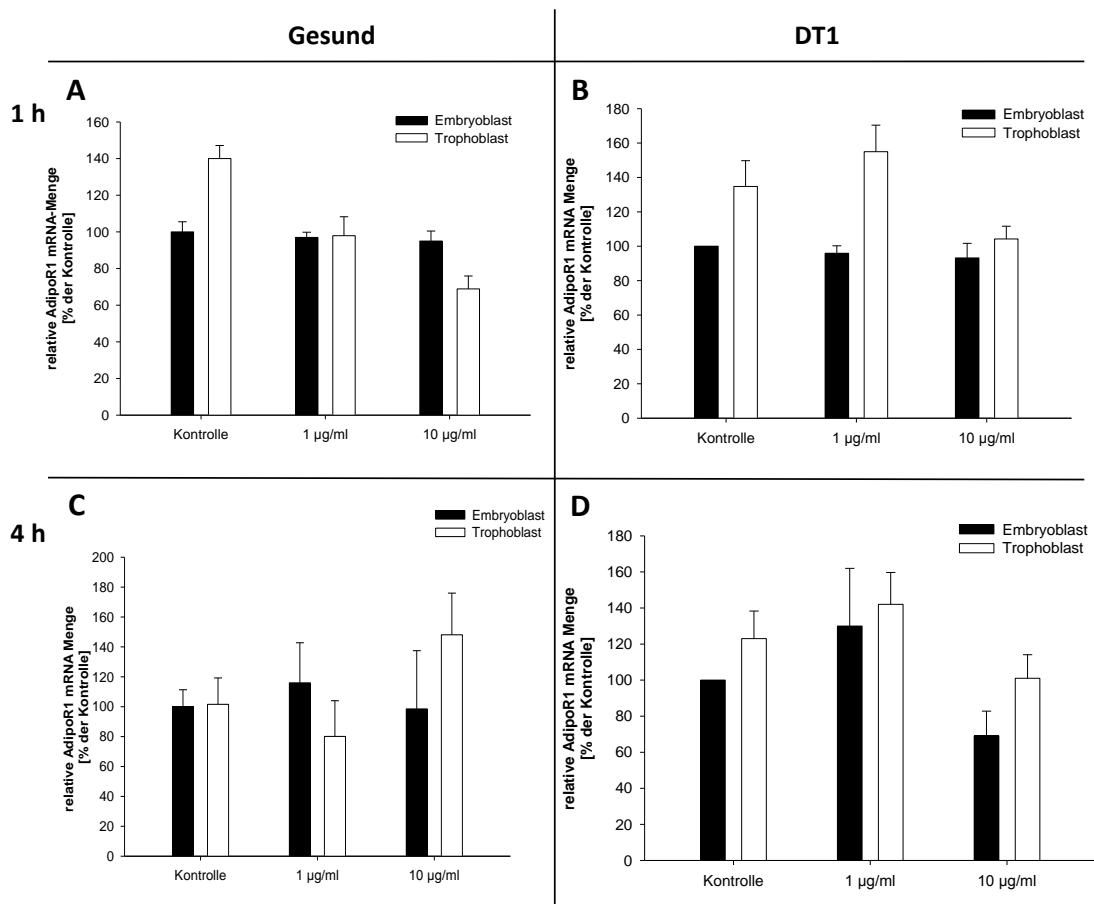


Abb. 27: Quantifizierung der AdipoR1-Transkriptmenge in Blastozysten (6 *dpc*, Stadium 0/1) nach Adiponektinstimulation

Quantifizierung der AdipoR1-Transkriptmenge [% der Kontrolle] in gesunden und diabetischen (DT1) Blastozysten nach einstündiger (A, B) oder vierstündiger Stimulation mit Adiponektin (C, D). Die AdipoR1-Mengen wurden nach Abgleich gegen GAPDH derselben Probe ermittelt (N = 3, n = 15; Mw ± SEM).

3.4.3.2 AdipoR2

Eine vierstündige Stimulation der Blastozysten (6 *dpc*) aus den gesunden Tieren mit Adiponektin (1 µg/ml) steigerte die AdipoR2-Transkriptmenge ausschließlich in den Embryoblastzellen um das Dreifache (siehe Abb. 28 C). Im gleichen Zeitintervall führte 10 µg/ml Adiponektin zu einer Erhöhung der AdipoR2-Transkriptmenge in beiden Zelllinien (siehe Abb. 28 C). Hier war die Expression im Embryoblasten signifikant um ca. den Faktor 10 erhöht und im Trophoblasten war sie verdoppelt.

In den DT1-Blastozysten konnte nach einer vierstündigen Stimulation für beide getesteten Konzentrationen kein Unterschied in der Transkriptmenge nachgewiesen werden (siehe Abb. 28 B). Allerdings zeigte eine einstündige Stimulation der DT1-Blastozysten für beide getesteten Adiponektinkonzentrationen (1 und 10 $\mu\text{g/ml}$) einen signifikanten Anstieg der AdipoR2-Transkriptmenge, jedoch ausschließlich in den Trophoblastzellen. Die niedrigere Konzentration bewirkte eine Verdopplung der AdipoR2-mRNA und die höhere Konzentration eine Steigerung um 50% (siehe Abb. 28 D).

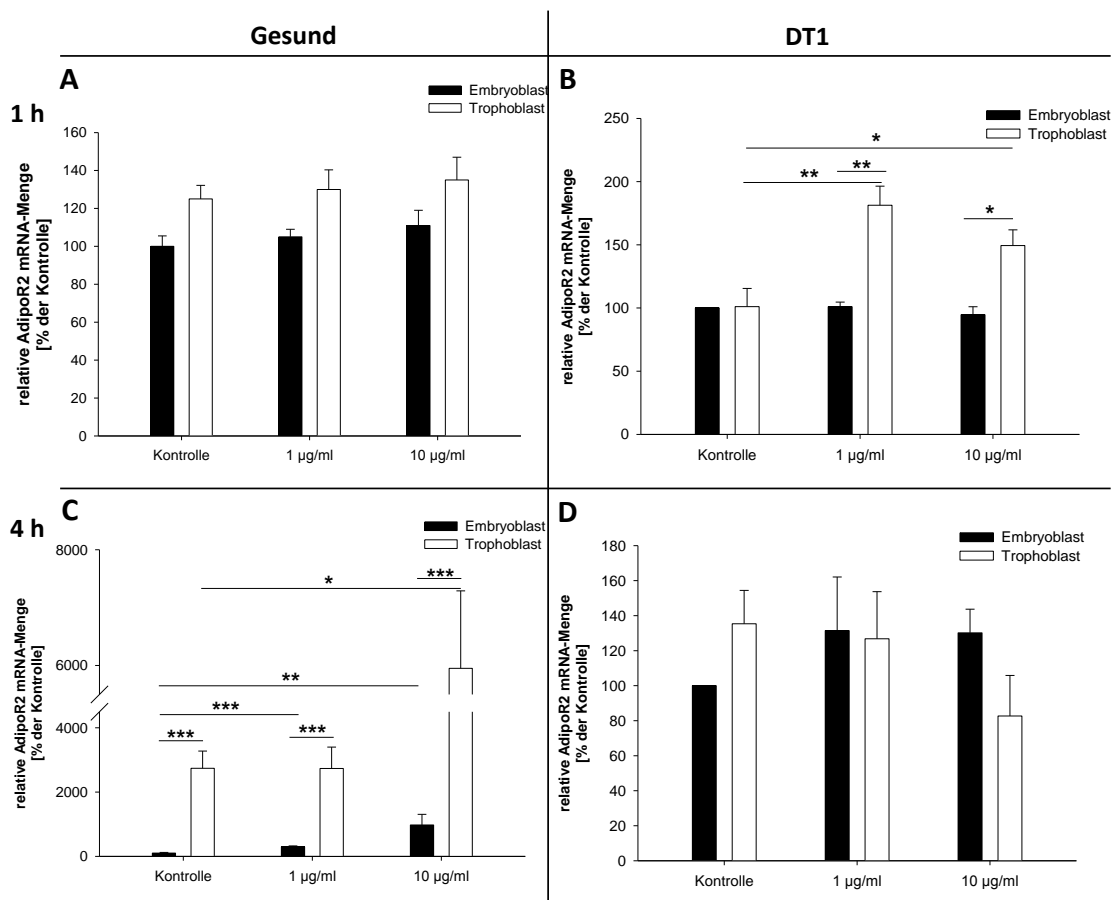


Abb. 28: Quantifizierung der AdipoR2-Transkriptmenge in Blastozysten (6 dpc, Stadium 0/1) nach Adiponektinstimulation

Quantifizierung der AdipoR2-Transkriptmenge [% der Kontrolle] in gesunden und diabetischen (DT1) Blastozysten nach einstündiger (A, B) oder vierstündiger Stimulation mit Adiponektin (C, D). Die AdipoR1-Mengen wurden nach Abgleich gegen GAPDH derselben Probe ermittelt (N = 3, n = 15; Mw \pm SEM).

3.4.4 Wirkung von Adiponektin auf den Glukosestoffwechsel von Kaninchenblastozysten

Die Beeinflussung des Glukosestoffwechsels durch Adiponektin wurde durch eine *In-vitro*-Kultur (1 und 4 h) von Blastozysten (Stadium 0/1; 6 *dpc*), die mit Adiponektin (1 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert worden waren, untersucht.

3.4.4.1 Glukoneogenese

In der *Real time PCR* zeigte das Schlüsselenzym der Glukoneogenese, die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK), in separierten Embryoblasten und Trophoblasten eine signifikante Herunterregulierung (siehe Abb. 29). Auffallend ist, dass in den diabetischen Blastozysten keine Veränderung der PEPCK-Transkriptmenge auftrat (siehe Abb. 29). Die PEPCK war unter diabetischen Bedingungen gering exprimiert.

In Blastozysten, die vor der Adiponektinstimulation mit *Compound C* (6-[4-(2-piperidin-1-yl-etoxy)-phenyl]-3-pyridin-4-yl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidine), einem spezifischen Inhibitor der AMPK, kultiviert worden waren, war die PEPCK-mRNA-Menge unverändert hoch. Der Adiponektineffekt blieb aus (siehe Abb. 30).

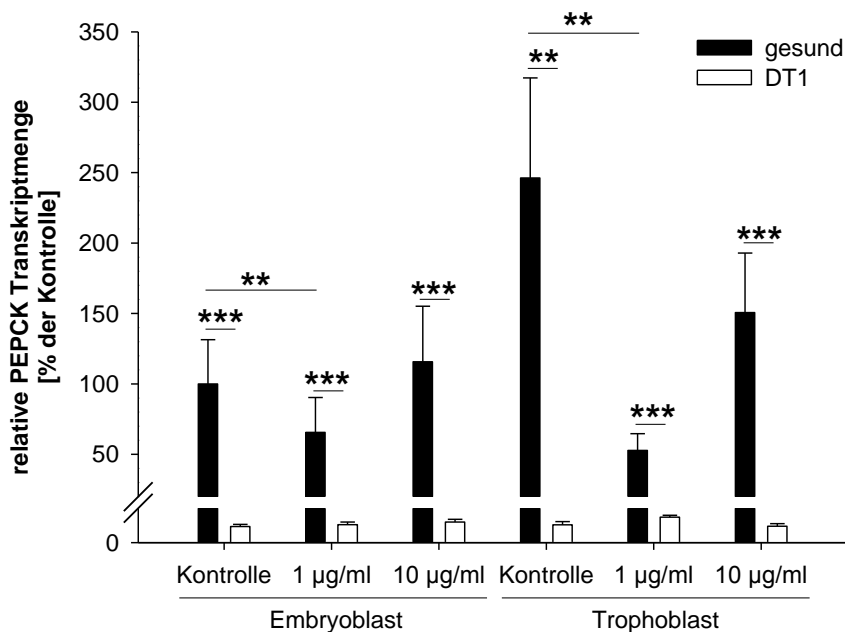


Abb. 29: Quantifizierung der PEPCK-Transkriptmenge in Blastozysten (6 *dpc*) nach *In-vitro*-Kultur mit Adiponektin

Relative PEPCK-Transkriptmenge [% der Kontrolle] in diabetischen und normoglykämischen Blastozysten nach einstündiger Stimulation mit Adiponektin (1 und 10 $\mu\text{g/ml}$) mittels *Real time PCR* quantifiziert. Die PEPCK-Mengen wurden nach Abgleich gegen GAPDH derselben Probe ermittelt (N = 3, n = 15; Mw \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

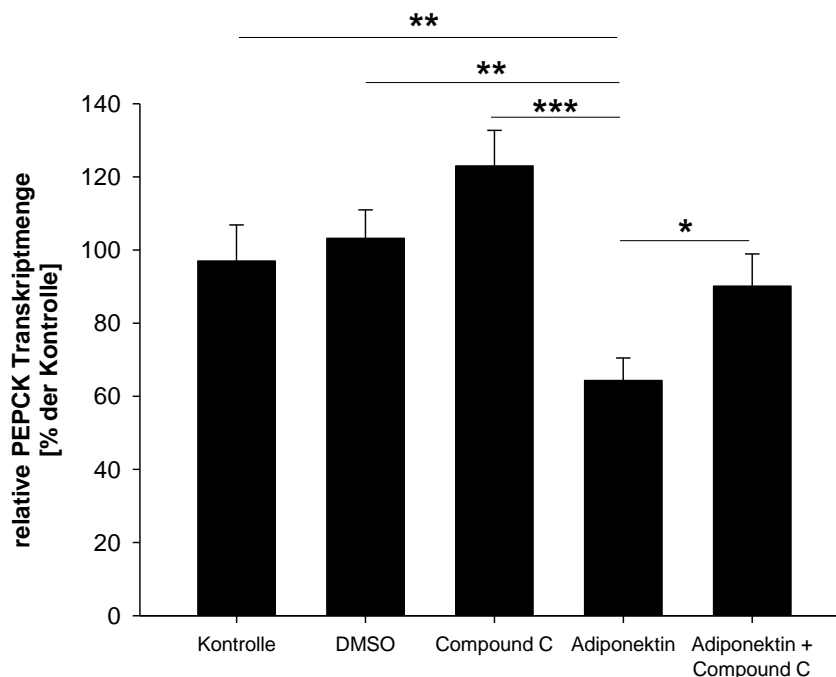


Abb. 30: Quantifizierung der PEPCK-Transkriptmenge in Blastozysten (6 dpc) nach *in vitro*-Kultur mit Adiponektin und einem AMPK-Inhibitor

Quantifizierung der relativen PEPCK-Transkriptmenge [% der Kontrolle] in Blastozysten aus gesunden Tieren nach *In-vitro*-Kultur mit dem AMPK-Inhibitor (Compound C), Lösungsmittel (DMSO) und Adiponektin (1 µg/ml) mittels *Real time PCR*. Die PEPCK-Mengen wurden nach Abgleich gegen GAPDH derselben Probe ermittelt (N = 3, n = 15; Mw ± SEM; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001)

3.4.4.2 Expression der Glukosetransporter 1 und 4

Um zu überprüfen, ob Adiponektin die Expression der Glukosetransporter 1 und 4 (GLUT1/4) beeinflusst, wurden Blastozysten (Stadium 0/1; 6 dpc) aus den Kontroll- und DT1-Tieren *in vitro* mit Adiponektin (1 und 10 µg/ml) stimuliert (1 und 4 h). Mittels *Real time PCR* wurde die Expression in den nach der Kultur separierten Embryoblasten und Trophoblasten analysiert.

3.4.4.2.1 Expression des Glukosetransporter 1

Unter normoglykämischen Bedingungen war nach einer einstündiger Stimulation kein Unterschied in der GLUT1-mRNA-Expression in den Blastozysten detektierbar (siehe Abb. 31 A). Nach einer vierstündigen Stimulation stieg die GLUT1-Transkriptmenge im Embryoblasten (1 und 10 µg/ml) und Trophoblasten (10 µg/ml) auf das Doppelte an (siehe Abb. 31 C).

In den Blastozysten aus diabetischen Tieren hingegen war die GLUT1-Transkriptmenge nach einer vierstündigen Adiponektin-Supplementation unverändert (siehe Abb. 31 D). Hier reagierten die Blastozysten, wie zuvor bereits festgestellt, zeitiger auf Adiponektin (1 h). Die Transkriptmenge von GLUT1 erhöhte sich hier ausschließlich im Trophoblasten um fast das Dreifache (siehe Abb. 31 B).

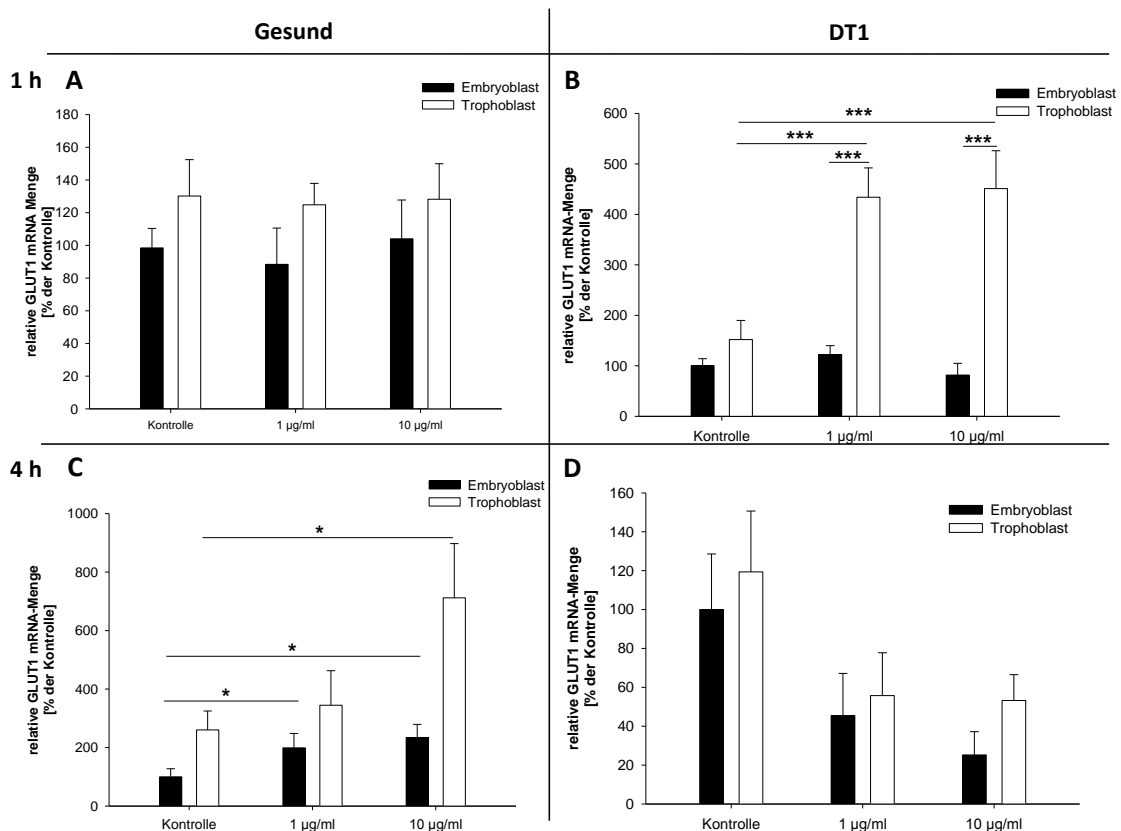


Abb. 31: Quantifizierung der GLUT1-Transkriptmenge in Blastozysten (6 dpc) gesunder und diabetischer (DT1) Tiere nach Adiponektinstimulation

Quantifizierung der relativen GLUT1-mRNA [% der Kontrolle] in Blastozysten aus gesunden Tieren nach einstündiger (A) oder vierstündiger (C) Stimulation mit Adiponektin und in Blastozysten aus diabetischen Tieren nach einstündiger (B) oder vierstündiger Stimulation mit Adiponektin (D). Die GLUT1-Mengen wurden nach Abgleich gegen GAPDH derselben Probe ermittelt (N = 3, n = 15; Mw ± SEM; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001)

3.4.4.2.2 Expression des Glukosetransporter 4

Eine Adiponektinstimulation führte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte zu einer veränderten GLUT4-Transkriptmenge, weder in den Blastozysten aus gesunden noch aus diabetischen Tieren (siehe Abb. 32). Einzig im Trophoblasten kam es zu einer gesteigerten GLUT4 mRNA-Menge im Vergleich zum korrespondierenden Embryoblasten (siehe Abb. 32).

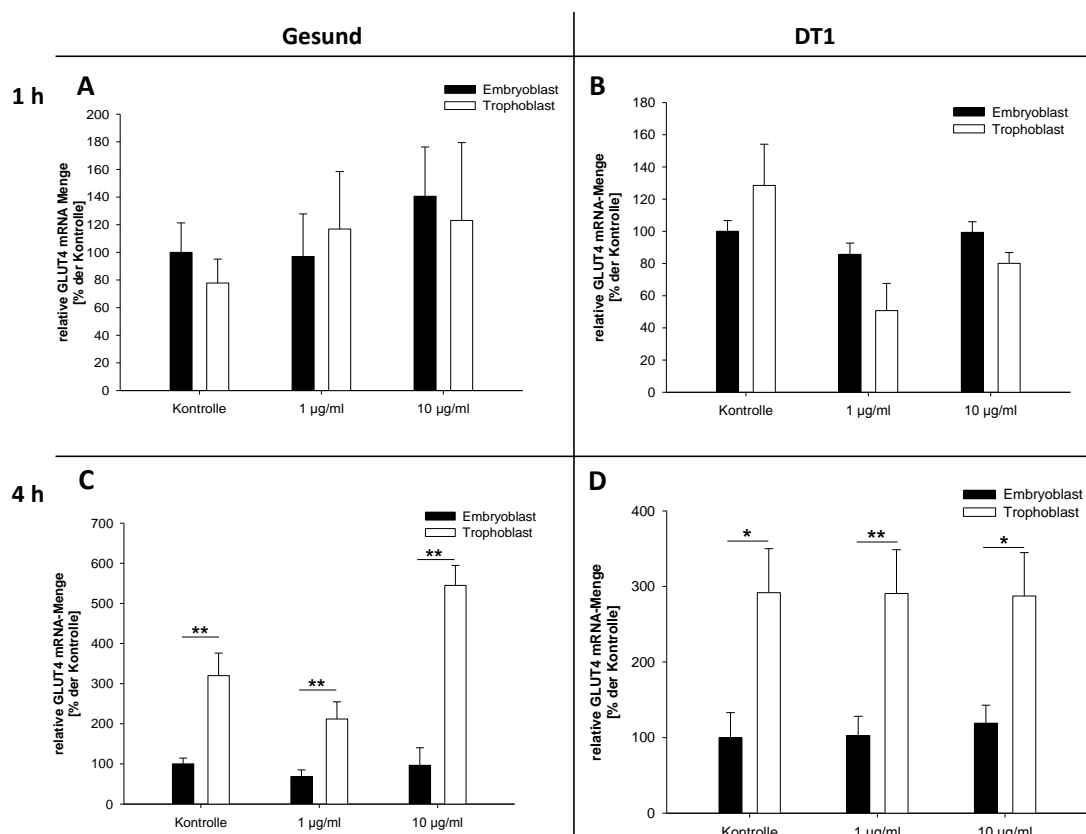


Abb. 32: Quantifizierung der GLUT4-Transkriptmenge in Blastozysten (6 dpc) gesunder und diabetischer (DT1) Tiere nach Adiponektinstimulation

Quantifizierung der relativen GLUT4-mRNA [% der Kontrolle] in Blastozysten aus gesunden Tieren nach einstündiger (A) oder vierstündiger (C) Stimulation mit Adiponektin und in Blastozysten aus diabetischen Tieren nach einstündiger (B) oder vierstündiger Stimulation mit Adiponektin (D). Die GLUT4-Mengen wurden nach Abgleich gegen GAPDH derselben Probe ermittelt (N = 3, n = 15; Mw ± SEM; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001)

3.4.4.3 GLUT4-Translokation

GLUT4 liegt ohne Stimulus in Vesikeln im Zytoplasma der Zellen vor. Nach einer Stimulation, z.B. mit Adiponektin oder Insulin, kommt es zu einer Translokation in die Plasmamembran.

Mittels Immunfluoreszenz wurde die Translokation von GLUT4 in den Blastozysten aus gesunden und diabetischen Tieren, die mit Adiponektin (1 µg/ml; 1 h) *in vitro* stimuliert worden waren, untersucht. In den unstimulierten Blastozysten war GLUT4 ausschließlich im Zytoplasma nachweisbar (siehe Abb. 33 D, F, K, M). Nach einer Inkubation mit Adiponektin veränderte sich die Lokalisation eindeutig. GLUT4 war nun in der Plasmamembran detektierbar (siehe Abb. 33 A, E, G, L).

In den Blastozysten der gesunder Tiere war diese Translokation hauptsächlich in den Zellen des Trophoblasten nachweisbar (siehe Abb. 33 A) und nur zu einem geringeren Anteil auch im Embryoblasten (siehe Abb. 33 E). In den Blastozysten der diabetischen Kaninchen kam es nach einer einstündigen Stimulation mit Adiponektin zu einer Translokation des GLUT4 in beiden

Zellkompartimenten (siehe Abb. 33 G, L). Ohne eine Stimulation mit Adiponektin war in den Blastozysten aus diabetischen Tieren nur wenig GLUT4 detektierbar (siehe Abb. 33 K, M), wenn man die Fluoreszenz mit den stimulierten oder den unstimulierten Kontrollblastozysten vergleicht (siehe Abb. 33 D, F, G, L).

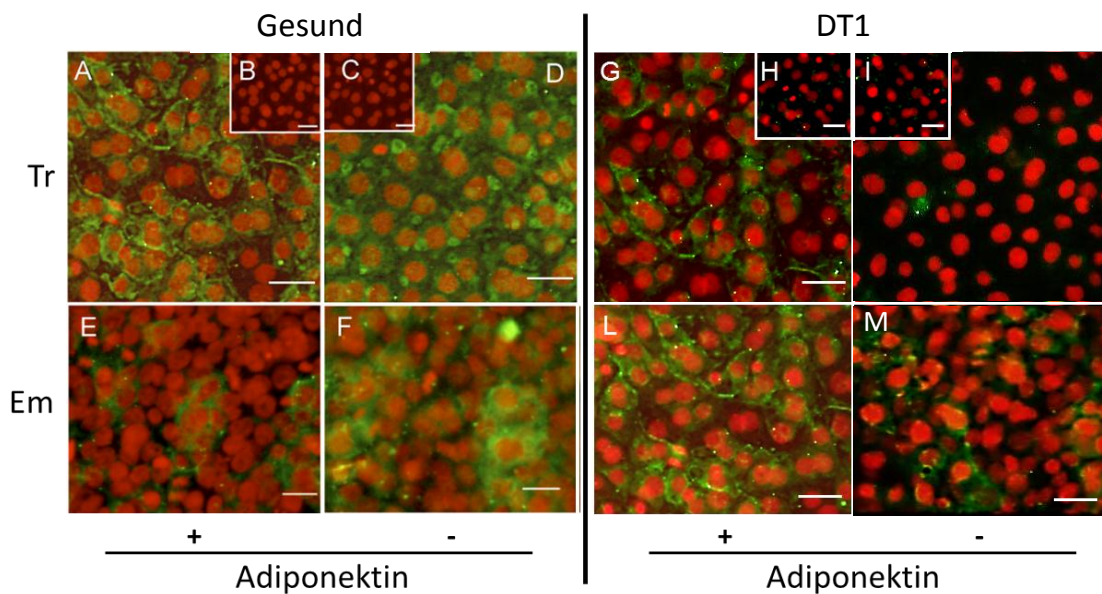


Abb. 33: Lokalisation von GLUT4 in der Kaninchenblastozyste (6 dpc) gesunder und diabetischer (DT1) Tiere

Immunfluoreszenz an Keimscheiben von 6 Tage alten Kaninchenblastozysten aus Kontrolltieren (gesund) **(A-F)** und diabetischen Tieren (DT1) **(G-M)** nach einer einstündigen Stimulation mit Adiponektin (1 µg/ml) **(A; B; E; G; H; L)** oder ohne **(C; D; F; I; K; M)**. Die Detektion des GLUT4 wurde mit einem FITC-markierten Sekundärantikörper (grün) durchgeführt. Die Kerne wurden mit 7-AAD (rot) gegengefärbt. Die Abbildungen **B, C, H** und **I** stellen die Kontrollreaktionen zu **A, D, G** und **H** dar. Eine Translokation des GLUT4 konnte sowohl unter normoglykämischen Bedingungen im Trophoblasten **(A)** als auch unter diabetischen Bedingungen im Trophoblasten **(G)** und Embryoblasten **(L)** gezeigt werden. Die dargestellte IF an einer Blastozyste steht repräsentativ für 7 untersuchte Blastozysten (n = 7).

Em – Embryoblast; Tr – Trophoblast; DT1 – Keimscheiben von Blastozysten aus diabetischen Kaninchen; Normoglykämie - Keimscheiben von Blastozysten aus normoglykämischen Kaninchen

Maßstab = 20 µm

3.4.4.4 Glukoseaufnahme

Die Grundaufnahme von Blastozysten aus normoglykämischen und diabetischen Kaninchen war identisch (siehe Abb. 34). Die Stimulation mit Adiponektin (1 µg/ml; 60 min) führte in beiden Versuchsgruppen zu einer signifikant gesteigerten Glukoseaufnahme. Die Blastozysten aus gesunden Kaninchen nahmen die 3,5-fache Menge an Glukose auf, während Blastozysten aus diabetischen Tieren nur eine um den Faktor 2,5 erhöhte Glukoseaufnahme zeigten (siehe Abb. 34). Dies bedeutet eine verringerte Glukoseaufnahme um 25%.

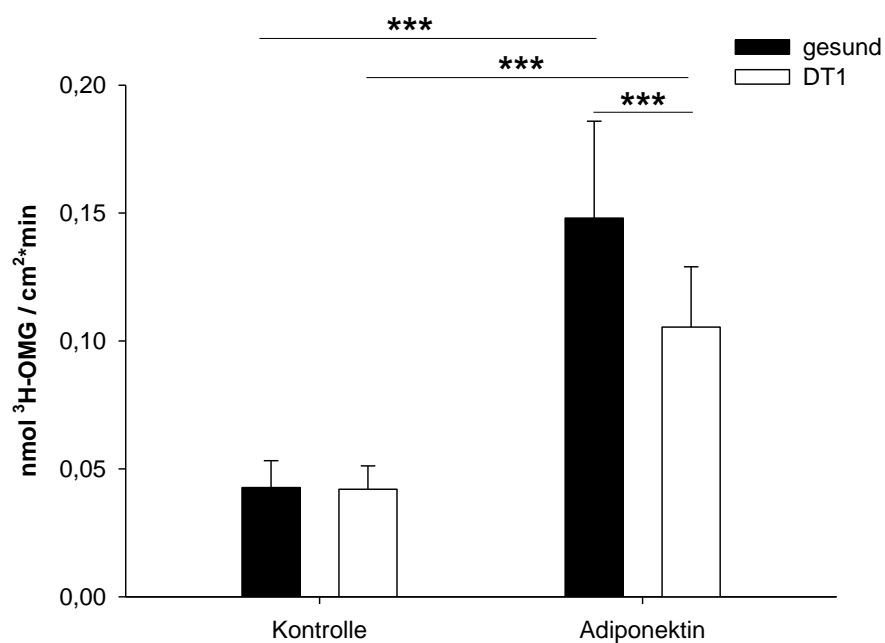


Abb. 34: Glukoseaufnahme in gesunden und diabetischen (DT1) Blastozysten (6 dpc) nach Adiponektinstimulation

Quantifizierung der Glukoseaufnahme in Blastozysten am Tag 6 nach einstündiger Stimulation mit Adiponektin (1 µg/ml) aus gesunden und diabetischen (DT1) Kaninchen. (N = 3, n = 25; Mw ± SEM; ***p<0,001)

4. Diskussion

4.1 Expression von Adiponektin und seinen Rezeptoren in Präimplantationsembryonen

Adiponektin ist für den Präimplantationsembryo der Säugetiere relevant. Bisher war bekannt, dass Adiponektin die Entwicklung von Schweine- und Mausembryonen *in vitro* verbessert [152,153,159]. Im Präimplantationsembryo des Kaninchens ist die Adiponektinexpression vom Entwicklungsstadium abhängig. Ein Adiponektintranskript ist an den Tagen 3 und 4 *p.c.* im Kaninchenembryo nicht nachweisbar (siehe Abb. 13) oder liegt in einer so geringen Menge vor, die unterhalb der methodischen Nachweisgrenze liegt. Erst ab Tag 5 *p.c.* konnte ein Transkript nachgewiesen werden. Am Tag 6 *p.c.* kam Adiponektin in allen untersuchten Gastrulationsstadien (0 bis 3) vor (siehe Abb. 13).

Mit der Entwicklung der Blastozyste kommt es zur Ausbildung des Embryoblasten und Trophoblasten. Adiponektin und seine beiden Rezeptoren werden in beiden Zelllinien in gleichem Maße exprimiert (siehe Abb. 13, Abb. 14, Abb. 15) [151,155].

Die Expression der beiden Adiponektinrezeptoren konnte vom Morulastadium (d3 *p.c.*) an bis zur expandierten Blastozyste (d6 *p.c.*) mit steigender Transkriptmenge nachgewiesen werden (siehe Abb. 13). Von anderen Säugern (Maus, Rind, Schwein) ist bereits bekannt, dass sowohl AdipoR1 als auch AdipoR2 in der Präimplantationsphase exprimiert werden [151–154,159]. In allen drei Spezies ist eine Expression von der Oozyte bis zur Blastozyste beschrieben (siehe Tabelle 1).

Wenn auch Unterschiede zwischen den Spezies in den verschiedenen Ontogenesestadien bestehen, so ist festzuhalten, dass über die Bildung von Adiponektin und die Expression der beiden Rezeptoren ein funktionaler Adiponektinsignalweg in der Präimplantationsphase – also bereits vor der Implantation - besteht.

4.2 Expression von Mitgliedern der Adiponektin-Signalkaskade in Präimplantationsembryonen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle wichtigen Signalmoleküle (ACC, AMPK, APPL1, CaMKK, LKB1 und PPAR α) der Adiponektinrezeptoren in Kaninchenblastozysten vorkommen (siehe Abb. 16; Tabelle 5). Überraschend ist der Befund, dass diese Gene zelllinienspezifisch exprimiert werden (siehe Abb. 16; Tabelle 5). Während der Embryoblast alle 6 untersuchten Gene exprimiert, sind die Transkripte der ACC und LKB1 im Trophoblasten nicht nachweisbar.

Ausgehend von der klassischen Sicht des Transkriptionsweges sollte die Proteinmenge in gleichem Maße wie die mRNA-Menge steigen oder sinken. Im Falle von LKB1 und ACC würde dies bedeuten, dass kein bzw. nur sehr wenig Protein im Trophoblasten vorliegt. Es ist dennoch möglich, dass aufgrund von posttranskriptionellen Modifikationen (siehe Kapitel 4.4.1.2) ausreichend Protein vorliegt. Zum Einen könnte eine höhere Proteinsynthese durch eine gesteigerte Translation bedingt sein oder zum Anderen durch eine Verringerung des Abbaus des jeweiligen Proteins. Somit könnte der bereits beschriebene Adiponektinsignalweg unverändert ablaufen (siehe Abb. 4).

Geht man aber davon aus, dass keine mRNA auch kein Protein bedeutet, dann müsste die Signaltransduktion im Trophoblasten an dieser Stelle abbrechen. Dies kann aber in der vorliegenden Arbeit widerlegt werden, da sowohl der Embryoblast als auch der Trophoblast auf eine Adiponektinstimulation reagiert (siehe Abb. 29, Abb. 33).

Somit kommt es im Trophoblasten zu einer Signaltransduktion über die Adiponektinrezeptoren, auch wenn diese sehr wahrscheinlich abweichend zu den bisher beschriebenen Kaskaden (siehe Abb. 4) abläuft, da die Ausstattung des Trophoblasten durch das Fehlen von ACC und LKB1 abweicht.

Das Fehlen der LKB1 im Trophoblasten ist hinsichtlich der Phosphorylierung der AMPK vermutlich nicht von großer Bedeutung, da die AMPK auch von der CaMKK aktiviert werden kann und somit die Signaltransduktion gewährleistet ist. Zudem kann die Aktivierung der AMPK über LKB1 zu einer Unterdrückung von Wachstum und Proliferation führen [222–226]. Da die Blastozyste zu diesem frühen Zeitpunkt der Schwangerschaft noch nicht an den mütterlichen Kreislauf angeschlossen ist, ist sie ausschließlich auf die Nährstoffe im Uterussekret angewiesen. Um zu verhindern, dass es durch ein schlechtes Nahrungsangebot während dieser Zeit zu einem Wachstumsstopp der Trophoblastzellen kommt, könnte die Expression der LKB1 im Trophoblasten herunterreguliert sein. Dies würde gewährleisten, dass der Embryo sich adäquat entwickeln kann, da mehr Trophoblastzellen eine bessere Versorgung des Embryoblasten bedeuten.

Die zelllinienspezifische Expression der ACC erscheint zunächst unlogisch. Die ACC ist das Schrittmacherenzym der Fettsäuresynthese und somit wichtig für die *de novo* Synthese von Fettsäuren, die relevant für das Wachstum und die weitere Entwicklung des Embryos sind. Dieser synthetisiert aus den Fettsäuren komplexe Lipide wie z.B. Sphingolipide, Glycolipide oder Cholesterolester, die für die Zellmembran, intrazelluläre Signalwege oder Triacylglyceridspeicher unerlässlich sind. Aus Studien ist bekannt, dass die Aktivität der ACC in der Plazenta jedoch gering ist [227–229]. Unter diesem Aspekt fügen sich die Expressionsdaten der ACC im Trophoblasten, der später zur Plazentabildung maßgeblich beiträgt, gut erklärlich ein.

Die Unterschiede im Expressionsprofil sind vermutlich den unterschiedlichen Schicksalen dieser beiden Zelllinien geschuldet. Der Embryoblast besteht aus pluripotenten Zellen, die den späteren Embryo bilden. Er wird von dem Trophoblasten umgeben, der sich in extraembryonale Gewebe differenziert und für die Plazentation verantwortlich ist. Er schirmt die Zellen des Embryoblasten bis zur Implantation vom Uterusmilieu ab und reguliert die Zusammensetzung der Blastozystenflüssigkeit über transzellulären Transport [230,231]. Damit ist er verantwortlich für die Zusammensetzung des Mikromillieus und Nährstoffreservoirs für den Embryoblasten. Auch Hexosen wie Glukose werden durch den Trophoblasten transportiert [177] und durch beide Zelllinien in vergleichbarem Umfang verbraucht [232]. Der Trophoblast ist für den Transport verantwortlich und gewährleistet die Glukosehomöostase in der Blastozystenflüssigkeit und damit eine konstante Energieversorgung des Embryoblasten. Ein gutes Maß für die weitere Entwicklung in diesen Zelllinien ist die Gastrulation der Keimscheibe.

Sie ist bei Blastozysten diabetischer Kaninchen verzögert [198]. Ob es sich um eine direkt durch den Embryoblasten oder um einen indirekt durch den Trophoblasten vermittelten Effekt oder um beides handelt, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Es bleibt aber festzuhalten, dass die Kaninchenblastozyste ein gutes Repertoire an *downstream Targets* der Adiponektinrezeptoren aufweist und somit die Signaltransduktion dieses Adipokins im Präimplantationsembryo gewährleistet ist.

Tabelle 5: Nachweis der RNA von Mitgliedern der Adiponektinsignalkaskade im Embryoblasten und Trophoblasten 6 Tage alter Kaninchenblastozysten

+ = positiver Nachweis; --- = negativer Nachweis

	Embryoblast	Trophoblast
ACC	+++	---
AMPK	+++	+
APPL1	+++	+++
CaMKK	+++	+
LKB1	+++	---
PPAR α	+++	+++

4.3 Hormonelle Interaktionen zwischen Adiponektin und Insulin

Adiponektin ist mit Adipositas und Adipositas-assoziierten Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2 negativ korreliert [44,73–77]. Adiponektin wird als potentielles, neues Medikament gegen Diabetes mellitus und das Metabolische Syndrom diskutiert, da es antidiabetische und antiatherogene Wirkungen hat [69].

Einige Adipokine können direkt oder indirekt die Insulinsensitivität beeinflussen, indem sie den Insulinsignalweg und / oder Moleküle des Glukose- und Lipidmetabolismus regulieren [46].

Adiponektin kann auf mehreren Wegen den Insulinsignalweg beeinflussen. Die Adiponektin-induzierte Aktivierung der AMPK führt dazu, dass die S6-Kinase (S6K) inhibiert wird und somit der inhibitorische Effekt dieser Kinase auf den Insulinsignalweg verhindert wird [233]. Das Insulinrezeptorsubstrat (IRS) 1 wird folglich nicht mehr durch die S6K am Serin phosphoryliert, so dass eine verstärkte Phosphorylierung des IRS1-Tyrosins ermöglicht wird. Das so aktivierte IRS1 steigert die Akt-Phosphorylierung als Antwort auf einen Insulinstimulus [233].

Durch die Bindung von Adiponektin an seine Rezeptoren und die darauf folgende Anlagerung von APPL1 an ihren N-Terminus kommt es zur Aktivierung der AMPK, die eine Interaktion mit Mitgliedern der Insulinsignalkaskade auslöst [233]. Über die AMPK kommt es zur Aktivierung des TSC1/2-Komplexes, indem TSC2 am Ser¹³⁴⁵ durch die AMPK phosphoryliert wird [234]. Die so aktivierte TSC2 agiert zusammen mit TSC1 als ein GTPase-aktivierendes Protein, das die

Aktivität von Rheb inhibiert [234,235]. Dies wiederum reduziert die mTOR/S6K vermittelte Serinphosphorylierung des IRS [236], so dass es zu einer verstärkten Phosphorylierung der IRS-Tyrosine kommt und somit zu einer Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges (siehe Abb. 26 und Abb. 35). Dieser reguliert sowohl die Glukoseaufnahme über die GLUT4-Translokation (siehe Abb. 33) als auch die Glukoneogenese durch eine Reduzierung der PEPCK-Transkriptmenge (siehe Abb. 29) über FOXO1. Schließlich ist Insulin selbst ein negativer Regulator der Adiponektinexpression [237–239]. Dieser Effekt wird zumindest in Teilen über verschiedene Signalwege (Erk1/2, PI3K, S6K und CREB) erzielt [149,240].

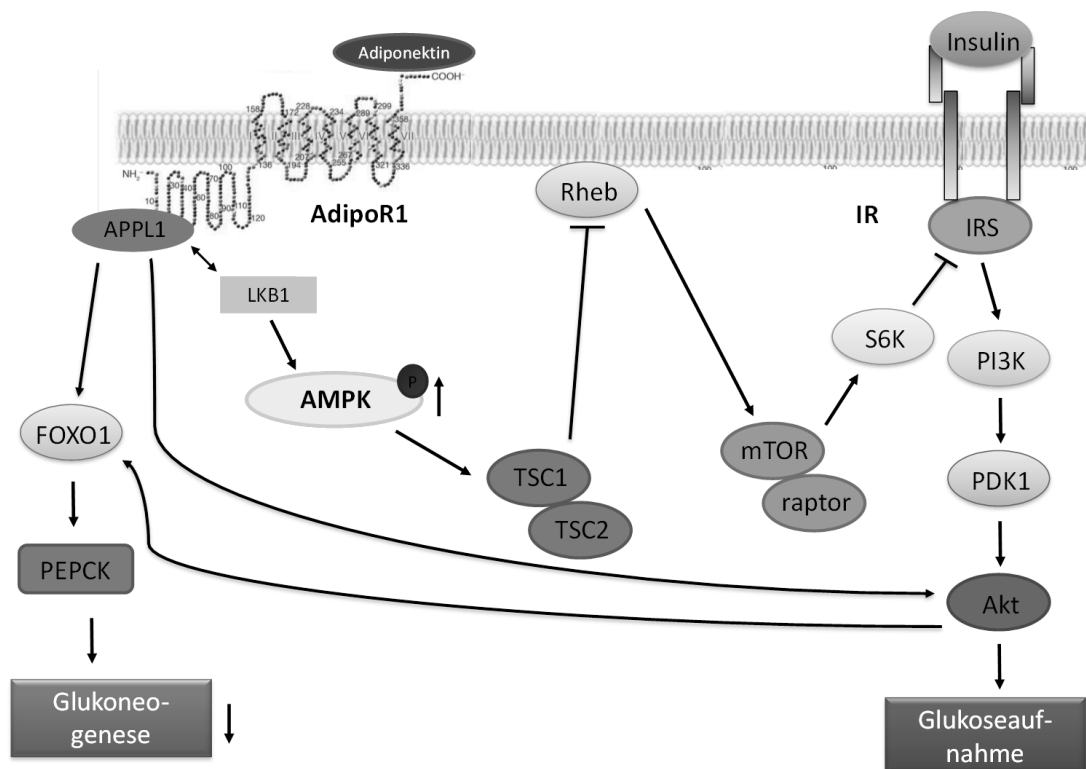


Abb. 35: Hormonelle Interaktion zwischen Insulin und Adiponektin

Adiponektin bindet an den Adiponektinrezeptor und aktiviert die AMPK via LKB1. Die Aktivierung des AMPK/TSC1/2-Signalweges reduziert die mTOR/S6K-vermittelte IRS-Serinphosphorylierung und dies führt zu einer gesteigerten IRS-Tyrosinphosphorylierung und somit zur Insulinsignalkaskade, die in einer gesteigerten Glukoseaufnahme und einer Inhibierung der Glukoneogenese resultiert.

Akt – Proteinase B; AdipoR1 – Adiponektinrezeptor 1; AMPK – AMP-aktivierte Proteinkinase; APPL1 – *Adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 1*; FOXO1 – *forkhead-box-protein O1*; IR – Insulinrezeptor; IRS – Insulin-Rezeptor-Substrat; LKB1 – Serin/Threoninkinase 11; mTOR – *mammalian target of rapamycin*; PI3K – Phosphoinositid-3-Kinase; PDK1 – *phosphoinositide-dependent kinase 1*; PEPCK – Phosphoenolpyruvatcarboxykinase; raptor – *regulatory associated protein of mTOR*; Rheb – *Ras-homolog-enriched-in-brain*; S6K – *protein S6 kinase*; TSC1/2 – *tuberous sclerosis protein 1/2*;
• – Phosphorylierung

4.4 Anpassung des embryonalen Adiponektin-AdipoR-Systems an einen mütterlichen Diabetes

Das Wachstum des Embryos ist von endokrinen und parakrinen Regulationsmechanismen sowie von der Nährstoffverfügbarkeit durch den mütterlichen Organismus abhängig. Der dafür notwendige Hormon- und Stoffaustausch erfolgt zunächst über das Uterussekret und den Trophoblasten. Trotz der großen Empfindlichkeit des Embryos gegenüber Veränderungen im Nährstoffangebot verfügt dieser über die Fähigkeit, sich an kurzfristige metabolische Modifikationen anzupassen. Diese Adaption an veränderte Entwicklungsbedingungen kann durch bisher ungeklärte molekulare Prozesse gespeichert werden und zu einer nachhaltigen Prägung der Embryonalzellen führen. Im weiteren Verlauf der Entwicklung und Differenzierung des geprägten Embryos kann es zu Abweichungen vom ursprünglichen metabolischen Programm der Zelle kommen, wodurch die Entwicklung des Organismus auf Dauer beeinflusst werden kann.

Ein absoluter Mangel an Insulin, wie bei einem Diabetes mellitus Typ 1, beeinträchtigt die Glukose- und damit Energieaufnahme in die Zelle und führt zu einem Anstieg der Glukosekonzentration im Blut (Hyperglykämie). Auch die Metabolisierung der Glukose ist gestört. Es werden die katabolen Stoffwechselwege der Lipolyse und Proteolyse aktiviert, um eine ausreichende Versorgung des Körpers mit der nötigen Energie zu gewährleisten.

In der vorliegenden Arbeit konnte die enge Verbindung zwischen dem mütterlichen Stoffwechsel und dem sich entwickelnden Embryo bereits für die Präimplantationsphase belegt werden. Ein insulinabhängiger Diabetes mellitus Typ 1 führt ohne adäquate Behandlung der Mutter in der Frühschwangerschaft zu Störungen in der Entwicklung und zu einem erhöhten Risiko für angeborene Fehlbildungen und spontane Aborte [183]. Als mögliche Ursachen der fetalen Fehlbildungen werden die durch den Insulinmangel erhöhte Glukosekonzentration und die daraus resultierenden metabolischen Störungen diskutiert [241]. Detailliertere Untersuchungen führten zu der Hypothese, dass für die Entstehung Diabetes-assoziiierter Fehlbildungen unter anderem die glukosevermittelte Apoptose verantwortlich ist [192,242]. Das erhöhte Glukosevorkommen wird mit der Beeinflussung der Expression regulatorischer Gene der Embryonalentwicklung und des Zellzyklus in Verbindung gebracht, was letztlich zu einem vorzeitigen Zelltod und einer abnormalen Morphogenese führen kann [184]. Bisher liegen erst sperrliche Befunde vor, wann in der Ontogenese diese Veränderungen auftreten und wirksam sind. Als vulnerable Phase wird unter anderem bereits die Präimplantation in Betracht gezogen [43]. Dabei ist es wichtig zu betonen, dass metabolische Veränderungen nicht nur die unmittelbaren Prozesse der Morphogenese der Blastozyste beeinflussen, sondern auch den fetalen und postnatalen Phänotyp. Zum Beispiel führt eine Proteinrestriktion weiblicher Ratten während der kurzen Präimplantationsphase zu einem gestörten Wachstum und einem erhöhten Blutdruck des Nachwuchses sowie einer veränderten Expression metabolischer Regulorenzyme in der fetalen Leber [22,243]. Im Schaf kommt es bei einer Unterernährung des Muttertieres noch vor der Befruchtung zu

Störungen in der Entwicklung des fetalen Gefäßsystems sowie des Stoffwechsels der Nachkommen [244,245].

Wichtig für das Anliegen der vorliegenden Arbeit ist der Hinweis, dass neben Diabetes auch eine unzureichende Versorgung des Organismus mit Proteinen zu einer signifikanten Abnahme des Peptidhormons Insulin führt, was eine Verringerung des Geburtsgewichtes zur Folge haben kann [22,246]. Die Beeinflussung der Nachkommen durch das intrauterine diabetische Milieu ist jedoch daneben der potenziell wichtigste Auslöser für die embryonalen Effekte [18,247]. Dies belegen klinische Daten. Frauen mit einem Diabetes mellitus sind subfertil; 15% der Schwangerschaften von Diabetikerinnen enden in einem Frühabort. Von den Kindern weisen 9 bis 20% Fehlbildungen auf und 45% leiden unter metabolischen Dysfunktionen [248,249].

4.4.1 Der Einfluss eines experimentell induzierten Diabetes mellitus Typ 1 *in vivo* auf Adiponektin und seine Rezeptoren

Die Entwicklung der Blastozysten wird durch einen Diabetes mellitus Typ 1 während der frühen Phase der Schwangerschaft maßgeblich beeinträchtigt. Die gemessene Glukosekonzentration im Uterussekret diabetischer Tiere und damit in der unmittelbaren Umgebung des Präimplantationsembryos ist um das Dreifache erhöht [198]. Die Blastozyste unterliegt je nach Ausprägung des Diabetes einem relativen bis absoluten Insulinmangel. Eine daraus resultierende Herabregulation der insulinregulierten Gene und der entsprechenden Rezeptoren führt zu einer Verzögerung der Präimplantationsentwicklung [198]. Weibliche Kaninchen mit einem Diabetes mellitus Typ 1 weisen 40% weniger Blastozysten im Vergleich zu den gesunden Tieren auf. Durch die Entwicklungsverzögerung konnten am Tag 6 *p.c.* keine Blastozysten des Stadiums 3 gewonnen werden, was deutlich macht, dass die Keimscheibenentwicklung (Gastrulation) verzögert ist [198].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein experimentell induzierter Diabetes mellitus Typ 1 einen Einfluss auf die *in vivo* Expression von Adiponektin und seinen beiden Rezeptoren AdipoR1 und R2 hat. Dabei treten deutliche Veränderungen im maternalen und embryonalen Adiponektin-Adiponektinrezeptor-System auf.

4.4.1.1 Auswirkungen eines experimentell induzierten Diabetes mellitus Typ 1 *in vivo* auf den mütterlichen Organismus

Adiponektin

Auf maternaler Seite zeigen sich Auswirkungen des experimentell induzierten Diabetes mellitus Typ 1 in der Erhöhung der Adiponektin-Plasmakonzentration um das Vierfache (siehe Abb. 22), ein Anstieg, der sich auch im Endometrium der graviden, diabetischen Kaninchen widerspiegelt (siehe Abb. 23).

Bisher ist bekannt, dass im humanen [250] und murinen [152] Endometrium Adiponektin exprimiert wird. Es spielt *in vivo* eine wichtige Rolle für die Rezeptivität des Uterus in der Maus [152]. Kim *et al.* konnten zeigen, dass Adiponektin auf mRNA- und Proteinebene in den Implantationsbereichen (IS) der Maus am Tag 5 bis 8 *p.c.* höher exprimiert ist als in den

Interimplantationsbereichen (IIS). Zudem konnten sie zeigen, dass bei einer künstlichen Dezidualisierung des Matuserut die endometrialen Stromazellen (ESC) die Proteinexpression von Adiponektin und seinen beiden Rezeptoren signifikant steigern und die ESC nach der Dezidualisierung Adiponektin sekretieren [152]. Daraus schlussfolgern sie, dass Adiponektin autokrin (vom Embryo selber produziert), parakrin (vom Endometrium oder Ovidukt sekretiert) und endokrin (endokrines Organ, z.B. Fettgewebe) eine wichtige Funktion für die Embryonalentwicklung und die Uterusrezeptivität hat.

In dieses Bild passt, dass die Adiponektinkonzentration in Frauen mit Endometriose [250], PCOS [251,252], Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 [253] verringert ist. Alle diese Krankheitsbilder sind mit Subfertilität und Fehlern bei der Implantation sowie mit gesteigerten Fehlgeburten assoziiert.

Aus humanen Studien ist bekannt, dass Adiponektin bei einem Diabetes mellitus Typ 1 in höheren Konzentrationen im Blut zirkuliert, während bei einem Diabetes mellitus Typ 2 eine verringerte Konzentration vorliegt [44,73–77]. Wichtig für das Verständnis und die Interpretation dieser vermeintlichen Gegensätze ist, dass ein Diabetes mellitus Typ 1 durch einen absoluten Insulinmangel charakterisiert ist, während ein Typ 2-Diabetes häufig auf einer Kombination von Insulinresistenz, Hyperinsulinismus, relativem Insulinmangel und / oder Sekretionsstörungen der pankreatischen β -Zellen beruht.

Insulin selber verhindert die Adiponektinexpression [237–239]. Die genaue Wirkung von Insulin auf die mRNA-Synthese von Adiponektin ist bislang noch nicht geklärt. Insulin wirkt über verschiedene Signalwege (Erk1/2, PI3K, S6K und CREB) [149,240]. In einer Studie von Fasshauer *et al.* konnte in 3T3-L1-Adipozyten gezeigt werden, dass eine pharmakologische Inhibition bestimmter *downstream* Signalproteine des Insulinsignalweges (p44/42 MAPK, PI3K, p70S6K) die inhibitorische Wirkung des Insulins auf die Adiponektinexpression aufhebt. Deshalb ist davon auszugehen, dass diese Signalmoleküle in einer komplexen und bisher noch nicht aufgeklärten Weise dafür verantwortlich sind, dass Insulin die mRNA-Synthese von Adiponektin negativ reguliert [149].

Ein potentieller Regulator der Adiponektintranskription ist das *cyclic AMP responsive element binding protein* (CREB) [240]. CREB wirkt in verschiedenen Signalwegen als *downstream* Effektor. Bisher sind mehr als 300 verschiedene Signale bekannt, die CREB aktivieren. Hierzu zählt unter anderem Insulin. Eine Phosphorylierung von CREB ist essentiell für die Bindung an das CREB-Bindeprotein (CBP) und die folgende Bindung an die *cyclic AMP response element-Box* (CRE-Box), wodurch die Transkription des Zielgens aktiviert wird, wie z.B. die der *activating transcription factors* (ATFs). Unter diesen gehört ATF3 zu den Repressoren, die direkt an das Adiponektin binden und somit die Transkription verhindern [254,255]. Insulin kann somit die Adiponektinexpression über einen CREB-ATF-vermittelten Weg inhibieren.

Bei einem Diabetes mellitus Typ 2 und einem Gestationsdiabetes liegt Insulin teilweise in hohen Konzentrationen vor, so dass es zu einer Inhibierung der Adiponektinexpression kommt. Anders ist die Situation bei einem Diabetes mellitus Typ 1. Hier entfällt die Inhibierung durch Insulin, was zu einer Steigerung der Expression von Adiponektin führt. Genau dies trifft für das

Endometrium und Plasma der untersuchten Kaninchen mit einem experimentell induzierten Diabetes mellitus Typ 1 zu. Adiponektin übernimmt in diesem Fall sogar in Teilen die Aufgaben des fehlenden Insulins, so dass die Glukoseaufnahme und die Inhibierung der Glukoneogenese zumindest partiell aufrechterhalten werden kann, während die Lipolyse unbeeinflusst bleibt.

AdipoR

Auch die Adiponektinrezeptoren werden durch einen experimentell induzierten Diabetes mellitus Typ 1 beeinflusst. Im Endometrium bleibt die mRNA-Expression beider Rezeptoren durch einen DT1 unbeeinflusst (siehe Abb. 24 A und B und Tabelle 6). Jedoch zeigte sich auf Proteinebene für AdipoR1 eine Hochregulierung (siehe Abb. 24 C und D und Tabelle 6). Wodurch dieses divergente Expressionsprofil zwischen mRNA und Protein entsteht, ist nicht eindeutig zu klären. Eine Diskussion zu diesem Phänomen folgt im Kapitel 4.3.1.2.

Unter diabetischen Bedingungen übernimmt AdipoR1 die Aufgabe, den Glukose- und Lipidstoffwechsel zu regulieren [256]. Bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass ein durch Streptozotolin induzierter Diabetes mellitus Typ 1 die Transkript- und Proteinmenge von AdipoR1 im Skelettmuskel hochreguliert, während der in der Leber exprimierte AdipoR2 unbeeinflusst bleibt [256]. Dies zeigt eine gewebspezifische Regulierung der AdipoR1-Expression durch Insulin. Ergebnisse neuerer Studien untermauern diese Befunde [257–259] und bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (siehe Abb. 24). Insulin bewirkt, dass der Transkriptionsfaktor FOXO1 inhibiert wird, so dass das AdipoR1-Gen nicht mehr abgelesen werden kann [260].

Kim *et al.* konnten zeigen, dass die beiden Adiponektinrezeptoren auf mRNA- und Proteinebene in den Implantationsbereichen (IS) der Maus am Tag 5 bis 8 *p.c.* höher exprimiert sind als in den Interimplantationsbereichen (IIS) [152]. Im humanen Endometrium sind AdipoR1 und R2 während der mittleren Sekretionsphase, welche dem Zeitraum der Implantation entspricht, auch stärker exprimiert [156].

Adiponektin und seine Rezeptoren sind somit wichtige Stellglieder für die Kommunikation zwischen Mutter und Embryo in der frühen Gravidität.

Tabelle 6: Vorkommen von Adiponektin und seinen Rezeptoren im Endometrium und in Blastozysten diabetischer Kaninchen (Tag 6 p.c.)

Die Veränderungen des RNA-Expressionsniveaus, (↑) erhöht, (=) unverändert und (↓) vermindert, beziehen sich auf Embryonen aus gesunden Tieren.

nd – nicht detektierbar

		Endometrium	Blastozyste
Adiponektin	RNA	=	↑
	Protein	↑	↑
AdipoR1	RNA	=	↑
	Protein	↑	nd
AdipoR2	RNA	=	=
	Protein	nd	nd

4.4.1.2 Anpassungen der embryonalen Adiponektin-AdipoR-Expression an einen mütterlichen Diabetes

In dieser Arbeit wurde bei einer gleichbleibenden mRNA-Menge in Embryonen aus diabetischen Tieren eine erhöhte Proteinmenge von Adiponektin und AdipoR1 gemessen. Dieser Unterschied in der Protein- und Genmenge suggeriert, dass Adiponektin und sein Rezeptor nicht auf der Transkriptionsebene, sondern posttranskriptionell reguliert werden. Für Adiponektin und AdipoR1 ist der Mechanismus einer posttranskriptionellen Regulation bisher unbekannt.

Es existieren Beispiele anderer Rezeptorproteine, die posttranskriptionell reguliert werden, z.B. der β 1-Adrenorezeptor [261], der NMDA-Rezeptor [262] und der Transferrin-Rezeptor [263]. Folgende Prozesse könnten die Ursache für eine höhere Adiponektinproteinsynthese sein: a) Steigerung der Translation und b) Verringerung des Abbaus des jeweiligen Proteins.

Über den Mechanismus, der den Abbau von Adiponektin und seinen Rezeptoren reguliert, ist bisher wenig bekannt. Unter anderem kann der Abbau durch oxidativen Streß [264] und durch *advanced glycation end-products* (AGEs) [265] beeinträchtigt werden. Eine andere Erklärung könnte sein, daß die beiden Proteine während eines experimentell induzierten Diabetes mellitus Typ 1 eine höhere Halbwertszeit aufweisen, was in einer höheren Proteinmenge resultiert. Ein so verringerter Abbau der beiden Proteine könnte die Diskrepanz zwischen erhöhten Protein- und unveränderten mRNA-Level während eines experimentell induzierten Diabetes mellitus Typ 1 erklären. Unterstützt wird dies durch die Tatsache, dass Adiponektin posttranslational hauptsächlich durch Glykosylierungen modifiziert wird [266]. Unter diabetischen Bedingungen – also bei konstanter Hyperglykämie – ist dieser Prozess sehr wahrscheinlich verändert und könnte die Funktion oder die Halbwertszeit von Adiponektin

beeinflussen. Es ist bekannt, dass Glykosylierungen von Adiponektin einen Einfluss auf dessen dreidimensionale Struktur haben und seine Konfiguration in eine biologisch aktivere Variante umwandeln [266]. In *ob/ob* Mäusen, die ein klassisches Tiermodell für den Typ 2 Diabetes darstellen, konnte eine erhöhte Halbwertszeit von Adiponektin gezeigt werden [267].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Unterschied zwischen mRNA und Protein im vorliegendem Fall durch den Diabetes selbst, eine erhöhte Halbwertszeit und/oder durch eine veränderte Translation zu erklären sind.

4.4.1.3 Auswirkungen eines experimentell induzierten Diabetes mellitus Typ 1 *in vivo* auf den Embryo

Adiponektin

Der unter diabetischen Bedingungen heranreifende Präimplantationsembryo (Stadium 0/1) weist 50% mehr Adiponektin auf als der Embryo aus den Kontrolltieren. Auf Transkriptionsebene ist diese Tendenz auch zu erkennen, so dass der Embryo selber die Adiponektinkonzentration hochreguliert und über das erhöhte maternale Angebot eine Steigerung der Adiponektinkonzentration bewirken kann.

Mittels Immunhistochemie und ELISA konnte eine differentielle Expression von Adiponektin im Embryoblasten und Trophoblasten nachgewiesen werden. Bei einem Diabetes mellitus Typ 1 war kein Adiponektin im Embryoblasten (siehe Abb. 19 D und E und Abb. 18) detektierbar, so dass davon auszugehen ist, dass Adiponektin unter diabetischen Bedingungen ausschließlich im Trophoblasten gebildet wird. Dies wird zum einen durch die verstärkte Färbung des Trophoblasten in der Immunhistochemie deutlich (siehe Abb. 19 D und F), zum anderen durch den Adiponektin-ELISA (siehe Abb. 18). In ihm konnte gezeigt werden, dass Adiponektin unter diabetischen Bedingungen im Trophoblasten stark hochreguliert ist, während im Embryoblasten Adiponektin unter der methodischen Nachweisgrenze lag.

Diese unterschiedliche Regulation der Adiponektinexpression in den beiden Zelllinien ist vermutlich einem abweichenden Insulin- und IGF-Signalweg geschuldet. In Kaninchenblastozysten konnte eine Insulin- und IGF-abhängige CREB-Aktivierung von Adiponektin *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, wodurch die Adiponektintranskription reduziert wird [268].

Da die Blastozyste auf maternales Insulin angewiesen ist und nicht in der Lage ist endogenes Insulin zu synthetisieren, wie auch andere Präimplantationsembryonen anderer Säuger [198,269–271], liegt in den Blastozysten aus den diabetischen Kaninchen kein Insulin vor [198]. Eine Aktivierung der PI3-Kinase ist ohne Insulin nicht möglich, so dass FOXO1 nicht deaktiviert werden kann. Die AdipoR1-Expression wird folglich nicht blockiert und es kommt zu einer verstärkten Expression (siehe Abb. 20 A). Wie zuvor schon beschrieben bleibt AdipoR2 unbeeinflusst von einem Diabetes (siehe Abb. 20 B), da hier keine Regulierung über Insulin vorliegt [256]. Insulin ist demzufolge ein negativer Regulator sowohl von AdipoR1 als auch von Adiponektin.

IGF1 und 2 sind in Blastozysten aus Kaninchen mit einem experimentell induzierten Diabetes mellitus Typ 1 hochreguliert, vermutlich um das fehlende, maternale Insulin zu kompensieren [272], denn sie werden unter anderem als Wachstumsfaktoren für den Embryoblasten in Betracht gezogen [272–275].

Im Embryoblasten konnte unter diabetischen Bedingungen eine gesteigerte IGF-Expression nachgewiesen werden [272]. Dies führt zu einer Aktivierung von CREB und dessen Lokalisation im Zellkern und verhindert somit die Expression von Adiponektin [268]. Dies spiegelt sich in dem drastischen Abfall der Adiponektinkonzentration im Embryoblasten unter diabetischen Bedingungen wieder (siehe Abb. 18 und Abb. 19).

Im Trophoblasten können IGF 1 und 2 das fehlende Insulin nicht ersetzen, da der IGF-Rezeptor dort nicht exprimiert wird [272,273]. Zudem konnte im Trophoblasten CREB nicht aktiviert werden [268], so dass die Adiponektinsynthese nicht inhibiert wird. Folglich liegt Adiponektin im Trophoblasten in höheren Konzentrationen vor. Die unterschiedliche Adiponektinexpression in den beiden Zelllinien lässt sich durch die unterschiedliche Signaltransduktion der IGFs im Embryoblasten und Trophoblasten erklären (siehe Abb. 36).

Wie zuvor schon beschrieben, ist der Trophoblast für die Zusammensetzung des Nährstoffangebots für den Embryoblasten verantwortlich, was auch für den Transport der Glukose zutrifft [177]. Insulin wirkt hauptsächlich über den Trophoblasten [273] und übt dort metabolische und mitogene Funktionen aus. Insulin steigert die Proliferation der Zellen und inhibiert die Glukoneogenese [273]. Im Embryoblasten ist ausschließlich eine mitotische Wirkung nachweisbar [273].

Während die IGFs im Embryoblasten den Mangel an Insulin kompensieren und die Glukoseaufnahme regulieren, übernimmt Adiponektin diese Aufgabe im Trophoblasten und sichert so die Entwicklung des Embryos unter diabetischen Bedingungen.

An diesem Beispiel kann der Einfluss, den die mütterliche Stoffwechsellage auf den Embryo nimmt, gut veranschaulicht werden. Desweiteren zeigt es die kompensatorische Plastizität von Stoffwechselwegen in der Blastozyste, die für ihr Überleben entscheidend sein können und dass eine Komponente der Kompensation des Insulinmangels durch Adiponektin erfolgt.

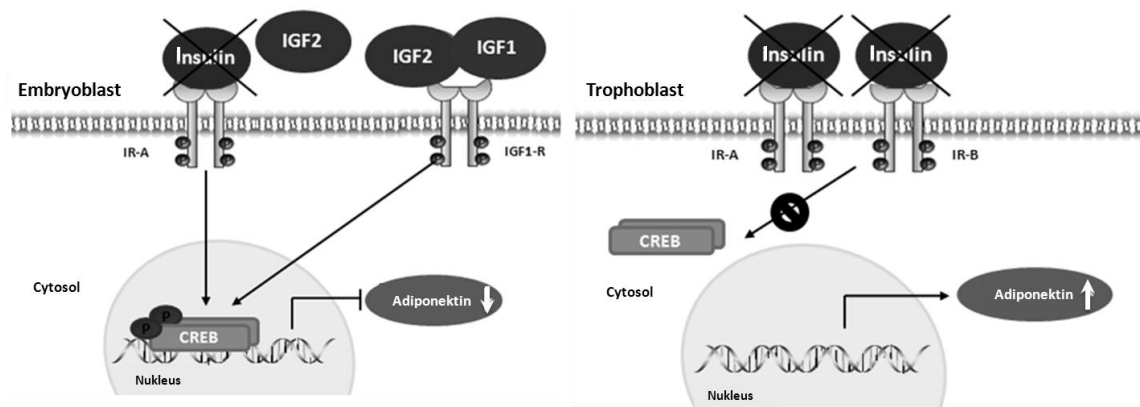


Abb. 36: Schema der Embryoblast- und Trophoblast-spezifischen Adiponektinexpression der Blastozyste bei Insulinmangel

Die Expression von IGF1 und IGF2 ist in der Blastozyste aus diabetischen Kaninchen stark erhöht. Embryoblast und Trophoblast unterscheiden sich in der Empfindlichkeit gegenüber IGFs aufgrund einer unterschiedlichen IR- und IGFR-Expression [198]. **(A)** Die gesteigerte IGF1- und 2-Expression und die verbesserte Sensitivität des Embryoblasten gegenüber den IGFs (IGF1R und IR-A werden exprimiert) führt zu einer Aktivierung von CREB und dessen Kernlokalisation. Dies resultiert in einer Herunterregulierung der Adiponektinsynthese, so dass Adiponektin im Embryoblasten nicht mehr detektierbar ist. **(B)** Im Trophoblasten wird IGFR kaum exprimiert, so dass IGFs hier nicht den Mangel an Insulin kompensieren können. CREB liegt inaktiviert im Cytosol vor und kann somit die Adiponektinexpression nicht inhibieren. Dies resultiert in einer höheren Expression von Adiponektin in den Trophoblastzellen.

CREB – *cAMP response element-binding protein*; IGF1/2 – *Insulin-like growth factor 1/2*; IGF1-R – IGF1-Rezeptor, IR-A – Insulinrezeptorisoform A; IR-B – Insulinrezeptorisoform B; P – Phosphorylierung (modifiziert nach Schindler und Fischer *et al.* 2013 [268])

AdipoR

Die beiden Adiponektinrezeptoren sind ebenso wie im Endometrium unterschiedlich reguliert. Der AdipoR2 zeigt eine konstante mRNA-Menge unbeeinflusst von einem Diabetes mellitus Typ 1, während die AdipoR1-Transkription um ca. das dreifache unter diabetischen Bedingungen gesteigert ist (siehe Abb. 21).

In Kaninchenblastozysten konnte eine Insulin- und IGF-abhängige Reduzierung der AdipoR1 - Transkription gezeigt werden [268]. Die transkriptionelle Regulierung von AdipoR1 durch Insulin ist bereits aus Geweben von Ratten und Mäusen bekannt [256,276]. Wie bereits zuvor im Kapitel 4.3.1.1 beschrieben, findet diese Regulierung durch Insulin über den Transkriptionsfaktor FOXO1 statt [260].

Die Regulierung der Adiponektin- und AdipoR1-Expression könnte Teil eines embryonalen Adaptationsprozesses sein. In dem der maternale Insulinmangel kompensiert wird, um den embryonalen Glukosemetabolismus aufrecht zu erhalten [155]. In dieses Bild passt, dass die Glukoseaufnahme in Blastozysten aus diabetischen und gesunden Kaninchen identisch ist (siehe Abb. 34).

Nicht nur Adiponektin, sondern auch AdipoR1 kann über Insulin reguliert werden. Unter diabetischen Bedingungen könnte dieses Sicherheitsnetz den Insulinmangel kompensieren und die weitere Embryonalentwicklung gewährleisten.

4.4.1.4 Zusammenfassung der Veränderungen eines experimentell induzierten Diabetes mellitus Typ 1 auf das Adiponektinsystem

In der nachfolgenden Grafik ist zusammenfassend dargestellt, welche Veränderungen ein experimentell induzierter Diabetes mellitus Typ 1 auf das Adiponektinsystem der Mutter und in der Kaninchenblastozyste hat.

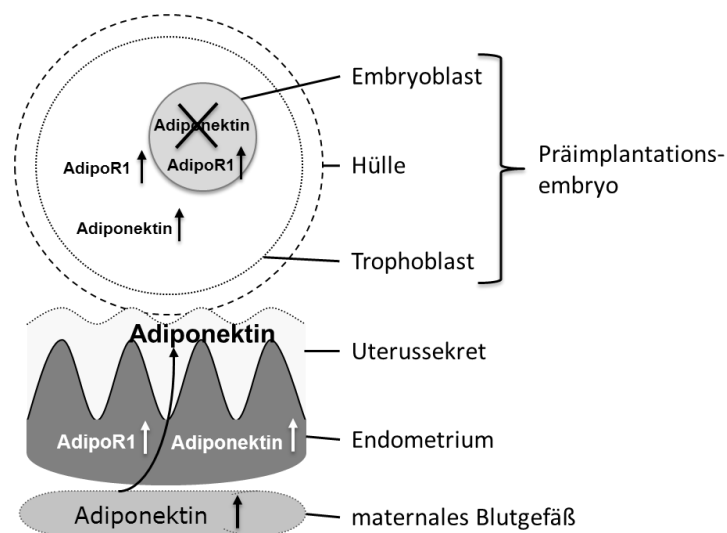


Abb. 37: Auswirkungen eines experimentell induzierten Diabetes mellitus Typ 1 auf das Adiponektin-Adiponektinrezeptor-System in der Kaninchenblastozyste und deren Umgebung

AdipoR1 – Adiponektinrezeptor 1; X – kein Adiponektin mehr nachweisbar

4.4.2 Beeinflussung des Glukosestoffwechsels der Kaninchenblastozyste durch Adiponektin

Adiponektin ist in der Lage, den Glukosestoffwechsel in Kaninchenblastozysten *in vitro* zu beeinflussen. Der funktionale Weg des Adiponektins startet mit der Phosphorylierung der AMPK und endet in einer gesteigerten Glukoseaufnahme über GLUT4 und einer Inhibierung der Glukoneogenese über die Reduktion der PEPCK-Expression.

4.4.2.1 Glukoseaufnahme

Bisher war es nicht möglich, in Kaninchenblastozysten eine GLUT4-Translokation oder eine gesteigerte Glukoseaufnahme durch Insulin nachzuweisen [277]. Adiponektin hingegen steigert die Glukoseaufnahme in die Kaninchenblastozysten um ca. 70%. Unter diabetischen Bedingungen fällt die Glukoseaufnahme um 25% geringer aus, was sich mit einer verringerten

GLUT4-Menge in den Blastozysten erklären lässt [198]. Dies führt zwar zu einer verringerten, aber immer noch ausreichenden, Glukoseaufnahme. Eine Aktivierung von GLUT4 findet bei Blastozysten aus diabetischen Tieren im Trophoblasten und Embryoblasten statt, während bei gesunden Tieren die Translokation fast ausschließlich im Trophoblasten nachweisbar ist (siehe Abb. 33).

Ein weiterer Grund für die verringerte, induzierbare Glukoseaufnahme könnten Veränderungen der GLUT1-Expression sein, dessen Expression auch durch Adiponektin reguliert wird [278]. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Induzierung in der Kaninchenblastozyste nachgewiesen werden (siehe Abb. 31). In den Blastozysten gesunder Tiere erfolgte diese Induktion nach vier Stunden hauptsächlich im Embryoblasten, während im Trophoblasten in den unter diabetischen Bedingungen heranreifenden Blastozysten dies bereits nach einer Stunde nachweisbar war. Warum Adiponektin einmal auf den Embryoblasten und einmal auf den Trophoblasten wirkt, bedarf weiterer Untersuchungen. Wie zuvor schon beschrieben, ist der Trophoblast für die Versorgung des Embryos relevant und eine erhöhte GLUT1-Expression verbessert die Glukoseaufnahme und somit die Versorgung des Embryos. Unter nicht-diabetischen Bedingungen weist der Trophoblast eine ausgewogene Menge an GLUT1 und 4 auf, während unter diabetischen Bedingungen GLUT4 herunter- und GLUT1 – vermutlich kompensatorisch – hochreguliert ist [198]. Da eine Induktion des GLUT4 ausschließlich nach vierstündiger *In-vitro*-Kultur unabhängig von Adiponektin nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 32 C und D), ist davon auszugehen, dass Adiponektin keinen Einfluss auf die Expression von GLUT4 nimmt. Aber dennoch scheint Adiponektin einen positiven Effekt auf das GLUT4-Protein auszuüben, denn unter diabetischen Bedingungen ist nach einer einstündigen Stimulation mit Adiponektin ein verstärktes GLUT4-Signal in der Immunfluoreszenz zu erkennen (siehe Abb. 33 G-M).

In der Kaninchenblastozyste ist davon auszugehen, dass die gesteigerte Glukoseaufnahme durch die beiden Glukosetransporter 1 und 4 vermittelt wird. Dies spricht auch für die konstant bleibende Glukosegrundaufnahme unter normoglykämischen und diabetischen Bedingungen. Ein plausibler Grund dafür ist, dass in den Blastozysten diabetischer Tiere, wie zuvor erwähnt, eine erhöhte Adiponektinkonzentration vorliegt (siehe Abb. 17). Dies ermöglicht der Blastozyste, die Glukosegrundaufnahme auf dem gleichen Niveau aufrecht zu erhalten.

Es zeigte sich zudem, dass die unter diabetischen Bedingungen heranreifende Blastozyste schneller auf Adiponektin reagiert und die GLUT1- Expression bereits nach einer Stunde und nicht erst nach vier Stunden induziert wird (siehe Abb. 31).

Die GLUT1-Expression wird nach vierstündiger Adiponektinstimulation in den Blastozysten aus diabetischen Kaninchen bereits wieder herunterreguliert (siehe Abb. 31). Es ist bekannt, dass GLUT1 bei niedrigen Glukosekonzentrationen vermehrt in der Membran lokalisiert ist, während hohe Glukosekonzentration, zumindest in der Plazenta, das Gegenteil bewirken [279–282]. Nach einer vierstündigen Kultivierung mit Adiponektin hat die Blastozyste vorerst genug

Glukose aufgenommen, so dass die Glukosekonzentration erhöht ist und infolgedessen die GLUT1-Expression herunterreguliert werden kann.

Bisher ist der Wirkmechanismus von Adiponektin noch nicht komplett aufgeklärt. Adiponektin ist in der Lage, über zwei separate Wege die Glukoseaufnahme zu induzieren – auf der einen Seite unabhängig und auf der anderen Seite abhängig vom klassischen Insulinsignalweg.

In dieses Bild passt, dass Adiponektin eine gesteigerte Phosphorylierung von Akt in den Kaninchenblastozysten hervorruft (siehe Abb. 26). Obwohl auch hier wieder nur zum früheren Zeitpunkt eine Phosphorylierung in den diabetisch Blastozysten auftrat (siehe Abb. 26 E und F) wurde sie unter normoglykämischen und diabetischen Bedingungen erreicht.

Ob die Akt-Phosphorylierung abhängig von der Aktivierung der AMPK ist, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar. Eine Adiponektin-vermittelte Aktivierung von Akt wurde auch in CWR22Rv1 Prostatakarzinomzellen [283], in bovinen Aortaepithelzellen [284] und in humanen Nabelschnurvenenendothelzellen [285] belegt. Ouchi und Kollegen konnten zeigen, dass Adiponektin die Phosphorylierung von AMPK und Akt steigert [285]. Diese Aktivierung war notwendig, um die endotheliale Stickstoffmonoxid Synthese (NOS3) und die Angiogenese zu aktivieren. Diese Signalwirkung konnte durch eine dominant-negative AMPK oder dominant-negative Akt verhindert werden. Die dominant-negative AMPK verhinderte die Phosphorylierung von Akt nach einer Adiponektinstimulation, während das dominant-negative Akt oder eine Vorbehandlung mit einem PI3K-Inhibitor (LY294002 oder Wortmannin) dies nicht konnten [285]. Aus diesen Daten geht hervor, dass die Phosphorylierung der AMPK vor der Aktivierung von Akt im Adiponektinsignalweg steht – zumindest in Endothelzellen. Dementsprechend ist es möglich, dass die Aktivierung von Akt auch in den Blastozysten abhängig von einer Aktivierung der AMPK ist.

APPL1 wurde als erstes AdipoR1/2-interagierendes Protein identifiziert [99]. APPL1 interagiert mit Rab5, einer kleinen GTPase [286], mit Akt und der PI3K [287]. Deshalb ist es auch möglich, dass Akt unabhängig von der AMPK nach einer Adiponektinstimulation phosphoryliert werden kann. Zusätzlich verbessert Adiponektin die Bindung zwischen APPL1 und Rab5, einem der Schlüsselmoleküle der Endozytose. Diese Interaktion führt zu einer verstärkten GLUT4-Translokation in die Membran und folglich zu einer gesteigerten Glukoseaufnahme [99].

Akt ist ein typischer *downstream* Mediator für metabolische Effekte des Insulins. Hierbei wird es durch die aktivierte PI3K phosphoryliert und einer der nachgeschalteten Effekte ist die GLUT4-Translokation und damit eine gesteigerte Glukoseaufnahme (siehe Abb. 34). Bereits auf dieser Ebene ist Adiponektin in der Lage, in den Insulinsignalweg einzugreifen und Funktionen des Insulins zu übernehmen.

4.4.2.2 Glukoneogenese

Blastozysten aus gesunden Kaninchen

Die Gegenspielerin der Glykolyse, die Glukoneogenese, wird in den Blastozysten aus gesunden Tieren inhibiert, da die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK) nach einer Adiponektinstimulation herunterreguliert wird (siehe Abb. 29). Die PEPCK ist eines der Schlüsselenzyme der Glukoneogenese und katalysiert Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat.

Im Embryoblasten und Trophoblasten wird die PEPCK exprimiert. Die Expression ist im Trophoblasten signifikant erhöht. Durch eine Stimulation mit Insulin kommt es ausschließlich im Trophoblasten zu einer Reduktion der PEPCK [273]. Adiponektin agiert daher in der Kaninchenblastozyste anders als Insulin, da Adiponektin die PEPCK-Expression in beiden Zelllinien reduziert (siehe Abb. 29) und die Glukoseaufnahme steigert (siehe Abb. 34).

Es zeigten sich unterschiedliche Effekte nach der Stimulation mit 1 und 10 µg/ml Adiponektin auf die PEPCK-Expression (siehe Abb. 29). Die beiden Konzentrationen wurden ausgewählt, da sie physiologische Serumkonzentration widerspiegeln. Bislang ist noch nicht bekannt, welche physiologischen Konzentrationen im Kaninchenuterus vorliegen, da die Werte unterhalb der methodischen Nachweisgrenze liegen. Aus der Literatur liegen zu so einem frühen Zeitpunkt der Schwangerschaft noch keine Daten vor. Ab dem zweiten Trimester konnte Adiponektin in der humanen Amnionflüssigkeit nachgewiesen werden [288]. Es wird davon ausgegangen, dass die Adiponektinquelle der Embryo selber ist, da die Adiponektinkonzentrationen in Abhängigkeit vom Geschlecht des Embryos (weiblich: Ø 34,8 µg/ml; männlich: Ø 18,2 µg/ml) und des Gestationsalters zum Zeitpunkt der Amniozentese variieren und es keinerlei Zusammenhänge zu maternalen Faktoren (BMI, Alter, Plasma) gibt [288].

Interpretiert man diese Befunde, dann ist es möglich, dass 10 µg/ml eine zu hohe Konzentration darstellen und der Rezeptor möglicherweise durch sein eigenes Substrat blockiert wird. Zudem müssen die unterschiedlichen Adiponektinisoformen in Betracht gezogen werden, denn es besteht die Möglichkeit, dass die unterschiedlichen Adiponektinisoformen ihre Quartärstruktur ändern und so ihre Bindungsfähigkeit mindern oder gänzlich verlieren.

Die verschiedenen Adiponektinkomplexe können *in vivo*, wenn sie erst einmal in den Kreislauf sezerniert wurden, nicht mehr interkonvertieren [289]. Unter *in vitro* Bedingungen sieht dies anders aus. Der pH-Wert und die Ca²⁺-Konzentration üben einen Einfluss speziell auf das humane HMW-Adiponektin aus [289]. Dies zerfällt bei pH-Werten unterhalb von pH 7 in LMW-, trimeres oder monomeres Adiponektin [289]. Wie zuvor schon erwähnt wurde kann monomeres- und trimeres-Adiponektin, aber nicht hexameres- oder HMW-Adiponektin die AMPK im Skelettmuskel aktivieren [66]. Eine weitere Erklärung ist, dass unterschiedliche Adiponektinkonzentrationen zu unterschiedlichen physiologischen Antworten führen. Adiponektin erzielt im Embryoblasten und Trophoblasten unterschiedliche Wirkungen (siehe Abb. 28; Abb. 29 A; Abb. 31 B und C und Abb. 33).

Der Adiponektinsignalweg wurde durch 10 µM Compound C, einem selektiven Inhibitor der AMPK [290], inhibiert. Compound C inhibiert keine strukturähnlichen Kinasen. Es verhinderte die Wirkung von Adiponektin auf die PEPCK in den Blastozysten. Mit diesem Versuch konnte bewiesen werden, dass Adiponektin in der Kaninchenblastozyste den Glukosestoffwechsel über die AMPK reguliert. Die dazugehörige Aktivierung der AMPK durch Adiponektin konnte in den Blastozysten der gesunden und DT1-Tiere gezeigt werden. Die Sensitivität der unter einem Diabetes mellitus Typ 1 herangereiften Blastozysten ist erniedrigt. Die Phosphorylierungskinetik sollte unter gesunden und diabetischen Bedingungen gleich sein, d.h.

die Phosphorylierung steigt am Anfang exponentiell an, erreicht ihren Höhepunkt um dann langsam wieder abzufachen. In den Blastozysten aus den gesunden Tieren konnte eine erhöhte Phosphorylierung nach 15 min festgestellt werden, in den diabetischen Tieren bereits nach 5 min, während nach 15 min keine Änderung mehr vorlag. Dies spricht dafür, dass nach 15 min die Aktivierung der AMPK bereits im flacher werdenden Bereich der Kurve ist und der Höhepunkt der Aktivierung zu einem früheren Zeitpunkt vorliegt, so dass in den Blastozysten aus den diabetischen Tieren ausschließlich nach 5 min ein verstärktes Phosphorylierungssignal detektiert werden kann. Vermutlich würde zu diesem Zeitpunkt das Signal in den Blastozysten aus gesunden Tieren noch weiter erhöht sein, denn die Kinetik bleibt davon unbeeinflusst. Insgesamt fällt bei Blastozysten aus diabetischen Tieren die Aktivierbarkeit der AMPK deutlich geringer aus.

Blastozysten aus diabetischen Kaninchen

Glukose reguliert ihre eigene Produktion durch die Glukoneogenese über einen *Feedback*-Mechanismus, der die PEPCK-Transkription inhibiert. In der adulten Leber ist Glukose ein bekannter transkriptioneller Regulator für Enzyme der Lipogenese, Glykolyse und Glukoneogenese [291–294]. Auch in der Kaninchenblastozyste konnte *in vitro* und *in vivo* diese regulatorische Wirkung auf Transkriptionsebene nachgewiesen werden [198]. Der genaue Wirkmechanismus der Glukose ist allerdings noch nicht bekannt. Es werden die beiden Transkriptionsfaktoren C/EBP β und FOXO1 in Betracht gezogen, da sie einerseits die PEPCK-Expression regulieren [295,296] und andererseits selber durch Glukose reguliert werden [297,298]. Die PEPCK-Expression wird auf Höhe der Transkription reguliert. Glukagon und Glukocortikoide wirken induzierend auf die Genexpression der PEPCK, während beispielsweise Insulin inhibierend wirkt [299–301]. Studien im Kaninchen kommen zu dem Schluss, dass die Glukoneogenese einen essentiellen metabolischen Signalweg in der Kaninchenblastozyste darstellt [273].

Wie bereits gezeigt werden konnte, ist die PEPCK-Expression bei einem experimentell induzierten Diabetes mellitus Typ 1 in der Kaninchenblastozyste signifikant reduziert, ursächlich hierfür ist vermutlich die erhöhte Glukosekonzentration im Uterussekret diabetischer Kaninchen [198]. Normalerweise reguliert Insulin die PEPCK-Expression herunter, aber unter diabetischen Bedingungen liegt kein Insulin vor, so dass auf der einen Seite die Glukose selber die PEPCK-Expression herunterreguliert und auf der anderen Seite liegt eine erhöhte Konzentration von Adiponektin in der Blastozyste vor, die wiederum die PEPCK-Expression reduziert. In dieses Bild passt, dass unter diabetischen Bedingungen ein weiterer Adiponektinstimulus die PEPCK-Expression der Blastozysten nicht beeinflusst, da deren Expression unter diabetischen Bedingungen nach der *In-vitro*-Kultur unterhalb von 5 % der Expression von Blastozysten aus gesunden Kaninchen liegt. Eine weitere Reduktion ist vermutlich nicht mehr möglich. Hinzu kommt, dass die Blastozyste unter diabetischen Bedingungen einem erhöhten Glukosespiegel ausgesetzt ist, so dass es nur logisch erscheint

das Schlüsselenzym der Glukoneogenese zu inhibieren, um einen weiteren Anstieg der Glukosekonzentration und möglicher fataler Nebenwirkungen entgegen zu wirken.

Unter diabetischen Bedingungen wird nicht nur die PEPCK-Expression inhibiert, sondern auch die der Hexokinase (HK) [198], die das Schlüsselenzym der Glykolyse ist. Die Herunterregulierung dieser beiden Enzyme hat Auswirkungen auf den Glukosestoffwechsel, wie z.B. die Verwendung als Substrat für die Energiegewinnung oder Biosynthese. Vermutlich kommt es hierbei zu einer intrazellulären Akkumulation von nicht-metabolisierter Glukose [198]. Genau diese Defizite im Metabolismus sind vermutlich ein Grund für die verzögerte Entwicklung der Blastozysten aus diabetischen Kaninchen. Aus Untersuchungen an verschiedenen Zelllinien ist bekannt, dass hyperglykämische Kultivierungsbedingungen zu oxidativem Stress führen und somit stress-aktivierte Signalwege induziert werden [192]. Dies führt zur Bildung von Entzündungs- und Apoptosemediatoren [192]. In Kaninchenblastozysten konnte gezeigt werden, dass eine Hyperglykämie zu einer gesteigerten Apoptoserate führt [198]. Die Verbindung zwischen Hyperglykämie, Entzündungen und der Aktivierung der Glukose-abhängigen Transkription fehlt bislang noch. Es wird angenommen, dass intrazelluläre Phosphorylierungsvorgänge verändert sind. Dies würde in einer Störung vieler Glukose-abhängiger Signalwege und zu metabolischen Dysfunktionen, Lipidakkumulation, Insulinresistenz, Diabetes und dem metabolischen Syndrom führen [302].

4.4.2.3 Zusammenfassung der Regulation des Glukosemetabolismus durch Adiponektin im Präimplantationsembryo des Kaninchens

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Adiponektin in der Lage ist, den Glukosemetabolismus in der Kaninchenblastozyste zu regulieren. Die Glukoneogenese wird inhibiert und die Glukoseaufnahme über GLUT1 und 4 gesteigert. Unter diabetischen Bedingungen (DT1) könnte Adiponektin für die Sicherstellung der Glukoseaufnahme äußerst relevant sein, da das dafür zuständige Insulin fehlt. Adiponektin stellt somit sicher, dass der Embryo trotz einer Hypoinsulinämie fähig ist, Glukose aufzunehmen und sich weiterentwickeln kann. Das Adiponektinsystem stellt unter den Bedingungen eines experimentell induzierten Diabetes mellitus Typ 1 ein Sicherheitsnetz dar, das bei Insulinmangel das weitere Überleben des Embryos sicherstellt.

In der nachfolgenden Grafik ist zusammenfassend dargestellt, wie Adiponektin den Glukosemetabolismus in der Blastozyste reguliert.

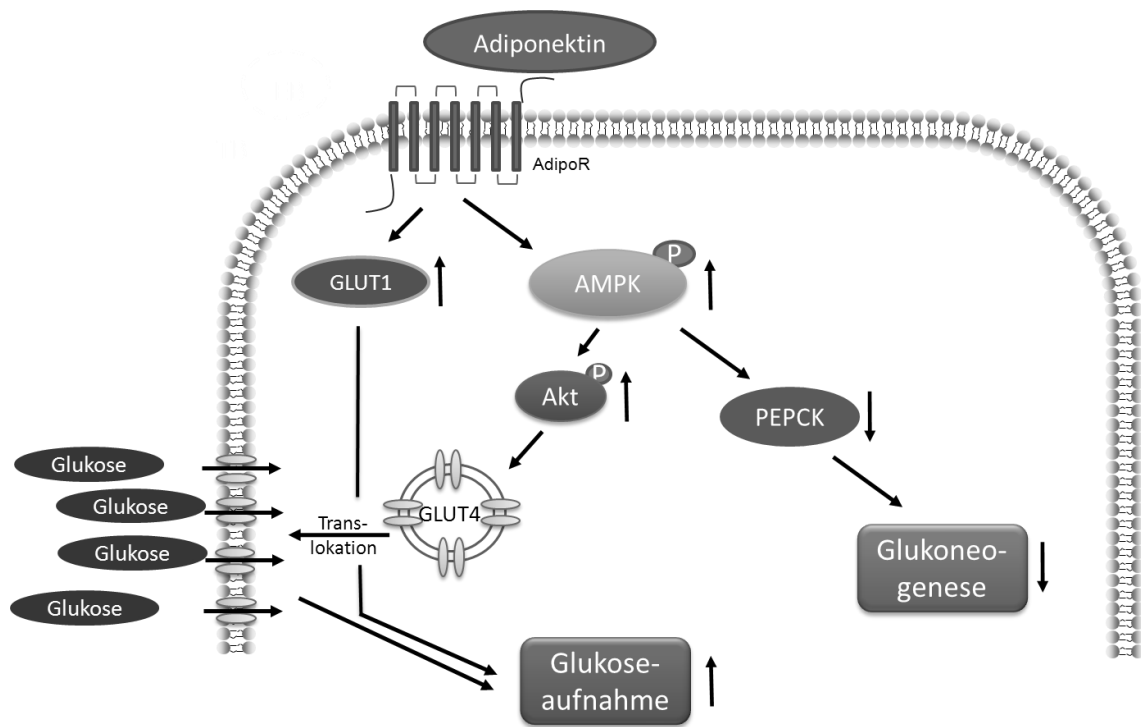


Abb. 38: Regulation des Glukosemetabolismus durch Adiponektin in Zellen der Kaninchenblastozyste

AdipoR1 – Adiponektinrezeptor 1; AMPK – AMP-aktivierte Proteinkinase; Akt – Proteinkinase B;
 GLUT1 – Glukosetransporter 1; PECK – Phosphoenolpyruvatcarboxykinase;
 P – Phosphorylierung

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig die Expression und Funktionalität von Adiponektin und seinen beiden Rezeptoren AdipoR1 und R2 in Präimplantationsembryonen des Kaninchens nachgewiesen. Präimplantationsembryonen aus stoffwechselgesunden und diabetischen Tieren unterscheiden sich dabei deutlich. Die Adiponektin-Signaltransduktion wirkt synergistisch zu Insulin und kompensiert somit möglicherweise den Insulinmangel bei Diabetes mellitus Typ 1.

Im Einzelnen wurden folgende neue Erkenntnisse gewonnen:

- Adiponektin wird am Tag 5 *p.c.* und Tag 6 *p.c.* in Blastozysten der Stadien 0-3 exprimiert.
- Die beiden Adiponektinrezeptoren (AdipoR1 und R2) werden ab dem Morulastadium (3 *dpc*) bis zum Blastozystenstadium am Tag 6 *p.c.* in allen untersuchten Stadien exprimiert.
- Die Expression von Adiponektin und seinen Rezeptoren erfolgt sowohl im Embryoblasten als auch im Trophoblasten von Blastozysten auf mRNA- und Proteinebene.
- Auf mRNA-Ebene konnte die Expression von ACC, AMPK, APPL1, CaMKK, LKB1 und PPAR α in Kaninchenblastozysten am Tag 6 *p.c.* im Stadium 0/1 gezeigt werden, wobei sich Embryoblast und Trophoblast im Expressionsmuster unterscheiden.

Ein experimentell induzierter Diabetes mellitus Typ 1 (DT1) führt zu folgenden Veränderungen in der Expression von Adiponektin und seinen Rezeptoren AdipoR1 und R2:

- auf maternaler Seite:
 - Die Transkriptmengen von Adiponektin, AdipoR1 und AdipoR2 im Endometrium diabetischer Tiere sind unverändert.
 - Adiponektin- und AdipoR1-Protein sind im Endometrium diabetischer Tiere signifikant hochreguliert.
 - Adiponektin ist im Serum gravider, diabetischer Kaninchen erhöht.
- bei Blastozysten:
 - Adiponektin ist im Stadium 1 auf mRNA- und Proteinebene hochreguliert.
 - Im Stadium 2 ist eine Tendenz zur erhöhten Adiponektin-mRNA-Menge messbar, keine Veränderung ergibt sich bei der Proteinmenge.
 - Die AdipoR1-Expression ist im Stadium 0-2 unter diabetischen Bedingungen signifikant gesteigert.
 - Die AdipoR2-Expression bleibt unbeeinflusst von einem experimentell induzierten DT1.

- Die Lokalisation und Rezeptorverteilung bleibt im Embryoblasten und Trophoblasten unter dem Einfluss eines DT1 unverändert.
- Adiponektin ist unter diabetischen Bedingungen in Blastozysten immunhistochemisch und mittels ELISA ausschließlich im Trophoblasten nachweisbar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Signaltransduktion und Funktion von Adiponektin für den Glukosestoffwechsel in Präimplantationsembryonen des Kaninchens untersucht.

- Adiponektin aktiviert die AMPK und Akt.
- Adiponektin bewirkt eine Expressionserhöhung von AdipoR2 und GLUT1 im Embryoblasten und Trophoblasten, während AdipoR1 und GLUT4 auf mRNA-Ebene unbeeinflusst bleiben.
- Die Glukoneogenese wird durch Adiponektin, gemessen über die Reduzierung der PEPCK, im Embryoblasten und Trophoblasten inhibiert.
- Die PEPCK-Expression wird über die AMPK reguliert.
- Die Glukoseaufnahme wird über die von Adiponektin stimulierte GLUT4-Translokation gesteigert.

Folgender Einfluss diabetischer Entwicklungsbedingungen auf die Adiponektinwirkungen in Blastozysten zeigte sich:

- Die Adiponektin-induzierte Aktivierung von AMPK und Akt fällt geringer aus.
- Adiponektin bewirkt eine Erhöhung der AdipoR2- und GLUT1-mRNA ausschließlich im Trophoblasten nach einstündiger Stimulation, während AdipoR1 und GLUT4 auf mRNA-Ebene unbeeinflusst bleiben.
- Die Glukoneogenese (gemessen über die Expression von PEPCK) wird durch Adiponektin unter diabetischen Bedingungen nicht beeinflusst.
- Die Glukoseaufnahme von Blastozysten aus diabetischen Kaninchen wird über eine GLUT4-Translokation und erhöhte GLUT1-Expression gesteigert.

Eine wichtige Schlussfolgerung aus der vorliegenden Arbeit ist, dass essentielle Weichenstellungen für die prä- und postnatale Entwicklung bereits in sehr frühen Phasen der Ontogenese erfolgen. Bei Störungen des Hormon- und Nährstoffangebotes der Mutter im Uterus sichern kompensatorische Mechanismen die Weiterentwicklung. So übernimmt bei einem Diabetes mellitus Typ 1 Adiponektin wichtige Funktionen des Insulins für den Glukosemetabolismus. Die kompensatorische Adaptation des Embryos kann jedoch zu längerfristigen Auswirkungen führen mit potentiell negativen Wirkungen im späteren Leben („metabolische Fehlprägung“). Adiponektin kann dabei eine zentrale Rolle zukommen.

Es ist eine zwingende Folgerung der vorliegenden Arbeit, dass eine adäquate Insulintherapie und konsequente Überwachung der Blutglukosekonzentrationen der Mutter vor, bei Eintritt und während der Schwangerschaft von größter prophylaktischer Bedeutung für die Gesundheit des Kindes ist.

6. Literaturverzeichnis

1. Harding JE. The nutritional basis of the fetal origins of adult disease. *Int J Epidemiol* 2001 ; 30 : 15–23.
2. Widdowson EM, McCance RA. A review: new thoughts on growth. *Pediatr. Res.* 1975 ; 9 : 154–156.
3. Desai M, Crowther NJ, Lucas A, *et al.* Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. *Br. J. Nutr.* 1996 ; 76 : 591–603.
4. Woodall SM, Johnston BM, Breier BH, *et al.* Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatr. Res.* 1996 ; 40 : 438–443.
5. Langley-Evans SC, Welham SJ, Sherman RC, *et al.* Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension. *Clin. Sci.* 1996 ; 91 : 607–615.
6. Ozanne SE, Hales CN. The long-term consequences of intra-uterine protein malnutrition for glucose metabolism. *Proc Nutr Soc* 1999 ; 58 : 615–619.
7. Kind KL, Clifton PM, Grant PA, *et al.* Effect of maternal feed restriction during pregnancy on glucose tolerance in the adult guinea pig. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2003 ; 284 : R140–152.
8. Kind KL, Simonetta G, Clifton PM, *et al.* Effect of maternal feed restriction on blood pressure in the adult guinea pig. *Exp. Physiol.* 2002 ; 87 : 469–477.
9. Gardner DS, Tingey K, Bon BWM Van, *et al.* Programming of glucose-insulin metabolism in adult sheep after maternal undernutrition. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2005 ; 289 : R947–954.
10. Gopalakrishnan GS, Gardner DS, Rhind SM, *et al.* Programming of adult cardiovascular function after early maternal undernutrition in sheep. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2004 ; 287 : R12–20.
11. Godfrey K, Robinson S, Barker DJ, *et al.* Maternal nutrition in early and late pregnancy in relation to placental and fetal growth. *BMJ* 1996 ; 312 : 410–414.
12. Shiell AW, Campbell-Brown M, Haselden S, *et al.* High-meat, low-carbohydrate diet in pregnancy: relation to adult blood pressure in the offspring. *Hypertension* 2001 ; 38 : 1282–1288.
13. Roseboom TJ, Meulen JH van der, Montfrans GA van, *et al.* Maternal nutrition during gestation and blood pressure in later life. *J. Hypertens.* 2001 ; 19 : 29–34.
14. Buckley AJ, Jaquiery AL, Harding JE. Nutritional programming of adult disease. *Cell Tissue Res.* 2005 ; 322 : 73–79.
15. Khan IY, Taylor PD, Dekou V, *et al.* Gender-linked hypertension in offspring of lard-fed pregnant rats. *Hypertension* 2003 ; 41 : 168–175.

16. Taylor PD, McConnell J, Khan IY, *et al.* Impaired glucose homeostasis and mitochondrial abnormalities in offspring of rats fed a fat-rich diet in pregnancy. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2005 ; 288 : R134–139.
17. Assche FA Van, Holemans K, Aerts L. Long-term consequences for offspring of diabetes during pregnancy. *Br. Med. Bull.* 2001 ; 60 : 173–182.
18. Dabelea D, Pettitt DJ. Intrauterine diabetic environment confers risks for type 2 diabetes mellitus and obesity in the offspring, in addition to genetic susceptibility. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 2001 ; 14 : 1085–1091.
19. Sobngwi E, Boudou P, Mauvais-Jarvis F, *et al.* Effect of a diabetic environment in utero on predisposition to type 2 diabetes. *Lancet* 2003 ; 361 : 1861–1865.
20. Buckley AJ, Keserü B, Briody J, *et al.* Altered body composition and metabolism in the male offspring of high fat-fed rats. *Metab. Clin. Exp.* 2005 ; 54 : 500–507.
21. Barker DJ, Osmond C, Simmonds SJ, *et al.* The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life. *BMJ* 1993 ; 306 : 422–426.
22. Kwong WY, Wild AE, Roberts P, *et al.* Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development* 2000 ; 127 : 4195–4202.
23. Langley-Evans SC. Hypertension induced by foetal exposure to a maternal low-protein diet, in the rat, is prevented by pharmacological blockade of maternal glucocorticoid synthesis. *J. Hypertens.* 1997 ; 15 : 537–544.
24. Kwong WY, Miller DJ, Ursell E, *et al.* Imprinted gene expression in the rat embryo-fetal axis is altered in response to periconceptual maternal low protein diet. *Reproduction* 2006 ; 132 : 265–277.
25. Mallinson JE, Sculley DV, Craigon J, *et al.* Fetal exposure to a maternal low-protein diet during mid-gestation results in muscle-specific effects on fibre type composition in young rats. *Br. J. Nutr.* 2007 ; 98 : 292–299.
26. Hales CN, Barker DJ, Clark PM, *et al.* Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* 1991 ; 303 : 1019–1022.
27. Mericq V, Ong KK, Bazaes R, *et al.* Longitudinal changes in insulin sensitivity and secretion from birth to age three years in small- and appropriate-for-gestational-age children. *Diabetologia* 2005 ; 48 : 2609–2614.
28. Syddall HE, Sayer AA, Simmonds SJ, *et al.* Birth weight, infant weight gain, and cause-specific mortality: the Hertfordshire Cohort Study. *Am. J. Epidemiol.* 2005 ; 161 : 1074–1080.
29. Ibáñez L, Ong K, Dunger DB, *et al.* Early development of adiposity and insulin resistance after catch-up weight gain in small-for-gestational-age children. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006 ; 91 : 2153–2158.
30. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, *et al.* Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 1989 ; 2 : 577–580.

31. Rich-Edwards JW, Stampfer MJ, Manson JE, *et al.* Birth weight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976. *BMJ* 1997 ; 315 : 396–400.
32. Rich-Edwards JW, Colditz GA, Stampfer MJ, *et al.* Birthweight and the risk for type 2 diabetes mellitus in adult women. *Ann. Intern. Med.* 1999 ; 130 : 278–284.
33. Rich-Edwards JW, Kleinman K, Michels KB, *et al.* Longitudinal study of birth weight and adult body mass index in predicting risk of coronary heart disease and stroke in women. *BMJ* 2005 ; 330 : 1115.
34. Frankel S, Elwood P, Sweetnam P, *et al.* Birthweight, body-mass index in middle age, and incident coronary heart disease. *Lancet* 1996 ; 348 : 1478–1480.
35. Stein CE, Fall CH, Kumaran K, *et al.* Fetal growth and coronary heart disease in south India. *Lancet* 1996 ; 348 : 1269–1273.
36. Osmond C, Barker DJ, Winter PD, *et al.* Early growth and death from cardiovascular disease in women. *BMJ* 1993 ; 307 : 1519–1524.
37. Leon DA, Lithell HO, Vågerö D, *et al.* Reduced fetal growth rate and increased risk of death from ischaemic heart disease: cohort study of 15 000 Swedish men and women born 1915–29. *BMJ* 1998 ; 317 : 241–245.
38. Huxley RR, Shiell AW, Law CM. The role of size at birth and postnatal catch-up growth in determining systolic blood pressure: a systematic review of the literature. *J. Hypertens.* 2000 ; 18 : 815–831.
39. Eriksson JG, Forsén T, Tuomilehto J, *et al.* Early growth and coronary heart disease in later life: longitudinal study. *BMJ* 2001 ; 322 : 949–953.
40. Forsén T, Osmond C, Eriksson JG, *et al.* Growth of girls who later develop coronary heart disease. *Heart* 2004 ; 90 : 20–24.
41. Eriksson J, Forsén T, Tuomilehto J, *et al.* Fetal and childhood growth and hypertension in adult life. *Hypertension* 2000 ; 36 : 790–794.
42. Eriksson JG, Forsén T, Tuomilehto J, *et al.* Early adiposity rebound in childhood and risk of Type 2 diabetes in adult life. *Diabetologia* 2003 ; 46 : 190–194.
43. Fleming TP, Kwong WY, Porter R, *et al.* The embryo and its future. *Biol. Reprod.* 2004 ; 71 : 1046–1054.
44. Jungheim ES, Moley KH. The impact of type 1 and type 2 diabetes mellitus on the oocyte and the preimplantation embryo. *Semin. Reprod. Med.* 2008 ; 26 : 186–195.
45. Watkins AJ, Wilkins A, Cunningham C, *et al.* Low protein diet fed exclusively during mouse oocyte maturation leads to behavioural and cardiovascular abnormalities in offspring. *J. Physiol. (Lond.)* 2008 ; 586 : 2231–2244.
46. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004 ; 89 : 2548–2556.
47. Hauner H. Secretory factors from human adipose tissue and their functional role. *Proc Nutr Soc* 2005 ; 64 : 163–169.

48. Halberg N, Wernstedt-Asterholm I, Scherer PE. The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2008 ; 37 : 753–768, x–xi.
49. Crouch E, Persson A, Chang D, *et al.* Molecular structure of pulmonary surfactant protein D (SP-D). *J. Biol. Chem.* 1994 ; 269 : 17311–17319.
50. McCormack FX, Pattanajitvilai S, Stewart J, *et al.* The Cys6 intermolecular disulfide bond and the collagen-like region of rat SP-A play critical roles in interactions with alveolar type II cells and surfactant lipids. *J. Biol. Chem.* 1997 ; 272 : 27971–27979.
51. Wong GW, Wang J, Hug C, *et al.* A family of Acrp30/adiponectin structural and functional paralogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004 ; 101 : 10302–10307.
52. Shapiro L, Scherer PE. The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Curr. Biol.* 1998 ; 8 : 335–338.
53. Vionnet N, Hani EH, Dupont S, *et al.* Genomewide search for type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites: evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24. *Am. J. Hum. Genet.* 2000 ; 67 : 1470–1480.
54. Takahashi M, Arita Y, Yamagata K, *et al.* Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2000 ; 24 : 861–868.
55. Yang W-S, Chuang L-M. Human genetics of adiponectin in the metabolic syndrome. *J. Mol. Med.* 2006 ; 84 : 112–121.
56. Menzaghi C, Trischitta V, Doria A. Genetic influences of adiponectin on insulin resistance, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Diabetes* 2007 ; 56 : 1198–1209.
57. Yang W-S, Yang Y-C, Chen C-L, *et al.* Adiponectin SNP276 is associated with obesity, the metabolic syndrome, and diabetes in the elderly. *Am. J. Clin. Nutr.* 2007 ; 86 : 509–513.
58. Menzaghi C, Ercolino T, Paola R Di, *et al.* A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 2002 ; 51 : 2306–2312.
59. Loos RJF, Ruchat S, Rankinen T, *et al.* Adiponectin and adiponectin receptor gene variants in relation to resting metabolic rate, respiratory quotient, and adiposity-related phenotypes in the Quebec Family Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 2007 ; 85 : 26–34.
60. Berthier M-T, Houde A, Côté M, *et al.* Impact of adiponectin gene polymorphisms on plasma lipoprotein and adiponectin concentrations of viscerally obese men. *J. Lipid Res.* 2005 ; 46 : 237–244.
61. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, *et al.* Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001 ; 98 : 2005–2010.
62. Waki H, Yamauchi T, Kamon J, *et al.* Generation of globular fragment of adiponectin by leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1. *Endocrinology* 2005 ; 146 : 790–796.

63. Pajvani UB, Du X, Combs TP, *et al.* Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J. Biol. Chem.* 2003 ; 278 : 9073–9085.
64. Waki H, Yamauchi T, Kamon J, *et al.* Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J. Biol. Chem.* 2003 ; 278 : 40352–40363.
65. Tsao T-S, Murrey HE, Hug C, *et al.* Oligomerization state-dependent activation of NF-kappa B signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30). *J. Biol. Chem.* 2002 ; 277 : 29359–29362.
66. Tsao T-S, Tomas E, Murrey HE, *et al.* Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways. *J. Biol. Chem.* 2003 ; 278 : 50810–50817.
67. Wang Y, Lam KSL, Chan L, *et al.* Post-translational modifications of the four conserved lysine residues within the collagenous domain of adiponectin are required for the formation of its high molecular weight oligomeric complex. *J. Biol. Chem.* 2006 ; 281 : 16391–16400.
68. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, *et al.* Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 2006 ; 116 : 1784–1792.
69. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr. Rev.* 2005 ; 26 : 439–451.
70. Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J. Biol. Chem.* 1996 ; 271 : 10697–10703.
71. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, *et al.* cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (adipose most abundant gene transcript 1). 1996. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012 ; 425 : 556–559.
72. Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, *et al.* Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J. Biochem.* 1996 ; 120 : 803–812.
73. Peake PW, Kriketos AD, Campbell LV, *et al.* The metabolism of isoforms of human adiponectin: studies in human subjects and in experimental animals. *Eur. J. Endocrinol.* 2005 ; 153 : 409–417.
74. Stefan N, Stumvoll M, Vozarova B, *et al.* Plasma adiponectin and endogenous glucose production in humans. *Diabetes Care* 2003 ; 26 : 3315–3319.
75. Mendez-Sanchez N, Chavez-Tapia N-C, Villa A-R, *et al.* Adiponectin as a protective factor in hepatic steatosis. *World J. Gastroenterol.* 2005 ; 11 : 1737–1741.
76. Méndez-Sánchez N, Chávez-Tapia NC, Medina-Santillán R, *et al.* The efficacy of adipokines and indices of metabolic syndrome as predictors of severe obesity-related hepatic steatosis. *Dig. Dis. Sci.* 2006 ; 51 : 1716–1722.
77. Tankó LB, Siddiq A, Lecoœur C, *et al.* ACDC/adiponectin and PPAR-gamma gene polymorphisms: implications for features of obesity. *Obes. Res.* 2005 ; 13 : 2113–2121.

78. Imagawa A, Funahashi T, Nakamura T, *et al.* Elevated serum concentration of adipose-derived factor, adiponectin, in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2002 ; 25 : 1665–1666.
79. Maahs DM, Ogden LG, Snell-Bergeon JK, *et al.* Determinants of serum adiponectin in persons with and without type 1 diabetes. *Am. J. Epidemiol.* 2007 ; 166 : 731–740.
80. Leth H, Andersen KK, Frystyk J, *et al.* Elevated levels of high-molecular-weight adiponectin in type 1 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008 ; 93 : 3186–3191.
81. Yamauchi T, Nio Y, Maki T, *et al.* Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat. Med.* 2007 ; 13 : 332–339.
82. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, *et al.* Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003 ; 423 : 762–769.
83. Zhou Y, Sun X, Jin L, *et al.* Expression profiles of adiponectin receptors in mouse embryos. *Gene Expr. Patterns* 2005 ; 5 : 711–715.
84. Almagouada F, Diaz-Ruiz A, Rabanal-Ruiz Y, *et al.* Adiponectin receptors form homomers and heteromers exhibiting distinct ligand binding and intracellular signaling properties. *J. Biol. Chem.* 2012 ;
85. Kosel D, Heiker JT, Juhl C, *et al.* Dimerization of adiponectin receptor 1 is inhibited by adiponectin. *J. Cell. Sci.* 2010 ; 123 : 1320–1328.
86. Wess J. G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J.* 1997 ; 11 : 346–354.
87. Yokomizo T, Izumi T, Chang K, *et al.* A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. *Nature* 1997 ; 387 : 620–624.
88. Scheer A, Fanelli F, Costa T, *et al.* Constitutively active mutants of the alpha 1B-adrenergic receptor: role of highly conserved polar amino acids in receptor activation. *EMBO J.* 1996 ; 15 : 3566–3578.
89. Deckert CM, Heiker JT, Beck-Sickinger AG. Localization of novel adiponectin receptor constructs. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 2006 ; 26 : 647–657.
90. Tang YT, Hu T, Arterburn M, *et al.* PAQR proteins: a novel membrane receptor family defined by an ancient 7-transmembrane pass motif. *J. Mol. Evol.* 2005 ; 61 : 372–380.
91. Karpichev IV, Cornivelli L, Small GM. Multiple regulatory roles of a novel *Saccharomyces cerevisiae* protein, encoded by YOL002c, in lipid and phosphate metabolism. *J. Biol. Chem.* 2002 ; 277 : 19609–19617.
92. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, *et al.* Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* 2002 ; 8 : 1288–1295.
93. James DE, Piper RC, Slot JW. Targeting of mammalian glucose transporters. *J. Cell. Sci.* 1993 ; 104 (Pt 3) : 607–612.

94. Karnieli E, Zarnowski MJ, Hissin PJ, *et al.* Insulin-stimulated translocation of glucose transport systems in the isolated rat adipose cell. Time course, reversal, insulin concentration dependency, and relationship to glucose transport activity. *J. Biol. Chem.* 1981 ; 256 : 4772–4777.
95. Cushman SW, Wardzala LJ. Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 1980 ; 255 : 4758–4762.
96. Suzuki K, Kono T. Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1980 ; 77 : 2542–2545.
97. Civitarese AE, Ukropcova B, Carling S, *et al.* Role of adiponectin in human skeletal muscle bioenergetics. *Cell Metab.* 2006 ; 4 : 75–87.
98. Guerre-Millo M. Adiponectin: an update. *Diabetes Metab.* 2008 ; 34 : 12–18.
99. Mao X, Kikani CK, Riojas RA, *et al.* APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function. *Nat. Cell Biol.* 2006 ; 8 : 516–523.
100. Zhou L, Deepa SS, Etzler JC, *et al.* Adiponectin activates AMP-activated protein kinase in muscle cells via APPL1/LKB1-dependent and phospholipase C/Ca²⁺/Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* 2009 ; 284 : 22426–22435.
101. Carlson CA, Kim KH. Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *J. Biol. Chem.* 1973 ; 248 : 378–380.
102. Tomas E, Tsao T-S, Saha AK, *et al.* Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002 ; 99 : 16309–16313.
103. Li L, Wu L, Wang C, *et al.* Adiponectin modulates carnitine palmitoyltransferase-1 through AMPK signaling cascade in rat cardiomyocytes. *Regul. Pept.* 2007 ; 139 : 72–79.
104. Yoon MJ, Lee GY, Chung J-J, *et al.* Adiponectin increases fatty acid oxidation in skeletal muscle cells by sequential activation of AMP-activated protein kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Diabetes* 2006 ; 55 : 2562–2570.
105. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, *et al.* The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat. Med.* 2001 ; 7 : 941–946.
106. Awazawa M, Ueki K, Inabe K, *et al.* Adiponectin suppresses hepatic SREBP1c expression in an AdipoR1/LKB1/AMPK dependent pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009 ; 382 : 51–56.
107. Zhou H, Song X, Briggs M, *et al.* Adiponectin represses gluconeogenesis independent of insulin in hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005 ; 338 : 793–799.
108. Barthel A, Schmoll D. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003 ; 285 : E685–692.

109. Sutherland C, O'Brien RM, Granner DK. New connections in the regulation of PEPCK gene expression by insulin. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 1996 ; 351 : 191–199.
110. Ceddia RB, Somwar R, Maida A, *et al.* Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells. *Diabetologia* 2005 ; 48 : 132–139.
111. Yoon YS, Ryu D, Lee MW, *et al.* Adiponectin and thiazolidinedione targets CRTC2 to regulate hepatic gluconeogenesis. *Exp. Mol. Med.* 2009 ; 41 : 577–583.
112. Cheng A, Saltiel AR. More TORC for the gluconeogenic engine. *Bioessays* 2006 ; 28 : 231–234.
113. Lee J-M, Seo W-Y, Song K-H, *et al.* AMPK-dependent repression of hepatic gluconeogenesis via disruption of CREB.CRTC2 complex by orphan nuclear receptor small heterodimer partner. *J. Biol. Chem.* 2010 ; 285 : 32182–32191.
114. Liao J, Barthel A, Nakatani K, *et al.* Activation of protein kinase B/Akt is sufficient to repress the glucocorticoid and cAMP induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *J. Biol. Chem.* 1998 ; 273 : 27320–27324.
115. Cheng KKY, Lam KSL, Wang Y, *et al.* Adiponectin-induced endothelial nitric oxide synthase activation and nitric oxide production are mediated by APPL1 in endothelial cells. *Diabetes* 2007 ; 56 : 1387–1394.
116. Nien JK, Mazaki-Tovi S, Romero R, *et al.* Plasma adiponectin concentrations in non-pregnant, normal and overweight pregnant women. *J Perinat Med* 2007 ; 35 : 522–531.
117. Kondo E, Sugiyama T, Kusaka H, *et al.* Adiponectin mRNA levels in parametrial adipose tissue and serum adiponectin levels are reduced in mice during late pregnancy. *Horm. Metab. Res.* 2004 ; 36 : 465–469.
118. Ryan EA, O'Sullivan MJ, Skyler JS. Insulin action during pregnancy. Studies with the euglycemic clamp technique. *Diabetes* 1985 ; 34 : 380–389.
119. Buchanan TA, Metzger BE, Freinkel N, *et al.* Insulin sensitivity and B-cell responsiveness to glucose during late pregnancy in lean and moderately obese women with normal glucose tolerance or mild gestational diabetes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1990 ; 162 : 1008–1014.
120. Catalano PM, Roman-Drago NM, Amini SB, *et al.* Longitudinal changes in body composition and energy balance in lean women with normal and abnormal glucose tolerance during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1998 ; 179 : 156–165.
121. Catalano PM, Hoegh M, Minium J, *et al.* Adiponectin in human pregnancy: implications for regulation of glucose and lipid metabolism. *Diabetologia* 2006 ; 49 : 1677–1685.
122. Langer O, Anyaegbunam A, Brustman L, *et al.* Gestational diabetes: insulin requirements in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1987 ; 157 : 669–675.
123. Kirwan JP, Hauguel-De Mouzon S, Lepercq J, *et al.* TNF-alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes* 2002 ; 51 : 2207–2213.

124. López-Bermejo A, Fernández-Real JM, Garrido E, *et al.* Maternal soluble tumour necrosis factor receptor type 2 (sTNFR2) and adiponectin are both related to blood pressure during gestation and infant's birthweight. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 2004 ; 61 : 544–552.
125. McLachlan KA, O'Neal D, Jenkins A, *et al.* Do adiponectin, TNFalpha, leptin and CRP relate to insulin resistance in pregnancy? Studies in women with and without gestational diabetes, during and after pregnancy. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2006 ; 22 : 131–138.
126. Retnakaran R, Hanley AJG, Raif N, *et al.* Reduced adiponectin concentration in women with gestational diabetes: a potential factor in progression to type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004 ; 27 : 799–800.
127. Brochu-Gaudreau K, Rehfeldt C, Blouin R, *et al.* Adiponectin action from head to toe. *Endocrine* 2010 ; 37 : 11–32.
128. Caja S, Torrente M, Martínez I, *et al.* Adiponectin values are unchanged during pregnancy in rats. *J. Endocrinol. Invest.* 2005 ; 28 : 609–615.
129. Czaja K. Transsynaptic connections between the hypothalamus and adipose tissue: relationship to reproduction. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2006 ; 62 : 45–53.
130. Fuglsang J, Skjaerbaek C, Frystyk J, *et al.* A longitudinal study of serum adiponectin during normal pregnancy. *BJOG* 2006 ; 113 : 110–113.
131. Nien JK, Mazaki-Tovi S, Romero R, *et al.* Adiponectin in severe preeclampsia. *J Perinat Med* 2007 ; 35 : 503–512.
132. Naruse K, Yamasaki M, Umekage H, *et al.* Peripheral blood concentrations of adiponectin, an adipocyte-specific plasma protein, in normal pregnancy and preeclampsia. *J. Reprod. Immunol.* 2005 ; 65 : 65–75.
133. Mazaki-Tovi S, Romero R, Vaisbuch E, *et al.* Dysregulation of maternal serum adiponectin in preterm labor. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 2009 ; 22 : 887–904.
134. Atègbo J-M, Grissa O, Yessoufou A, *et al.* Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006 ; 91 : 4137–4143.
135. Lain KY, Daftary AR, Ness RB, *et al.* First trimester adipocytokine concentrations and risk of developing gestational diabetes later in pregnancy. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 2008 ; 69 : 407–411.
136. Williams MA, Qiu C, Muy-Rivera M, *et al.* Plasma adiponectin concentrations in early pregnancy and subsequent risk of gestational diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004 ; 89 : 2306–2311.
137. Cheung NW, Byth K. Population health significance of gestational diabetes. *Diabetes Care* 2003 ; 26 : 2005–2009.
138. Worda C, Leipold H, Gruber C, *et al.* Decreased plasma adiponectin concentrations in women with gestational diabetes mellitus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2004 ; 191 : 2120–2124.

139. Kajantie E, Hytinantti T, Hovi P, *et al.* Cord plasma adiponectin: a 20-fold rise between 24 weeks gestation and term. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004 ; 89 : 4031–4036.
140. Sivan E, Mazaki-Tovi S, Pariente C, *et al.* Adiponectin in human cord blood: relation to fetal birth weight and gender. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003 ; 88 : 5656–5660.
141. Kotani Y, Yokota I, Kitamura S, *et al.* Plasma adiponectin levels in newborns are higher than those in adults and positively correlated with birth weight. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 2004 ; 61 : 418–423.
142. Budak E, Fernández Sánchez M, Bellver J, *et al.* Interactions of the hormones leptin, ghrelin, adiponectin, resistin, and PYY3-36 with the reproductive system. *Fertil. Steril.* 2006 ; 85 : 1563–1581.
143. Corbetta S, Bulfamante G, Cortelazzi D, *et al.* Adiponectin expression in human fetal tissues during mid- and late gestation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005 ; 90 : 2397–2402.
144. Mazaki-Tovi S, Kanety H, Pariente C, *et al.* Determining the source of fetal adiponectin. *J Reprod Med* 2007 ; 52 : 774–778.
145. Mazaki-Tovi S, Kanety H, Sivan E. Adiponectin and human pregnancy. *Curr. Diab. Rep.* 2005 ; 5 : 278–281.
146. Weyermann M, Beermann C, Brenner H, *et al.* Adiponectin and leptin in maternal serum, cord blood, and breast milk. *Clin. Chem.* 2006 ; 52 : 2095–2102.
147. Pinar H, Basu S, Hotmire K, *et al.* High molecular mass multimer complexes and vascular expression contribute to high adiponectin in the fetus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008 ; 93 : 2885–2890.
148. Carter BW, Schucany WG. Brown adipose tissue in a newborn. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2008 ; 21 : 328–330.
149. Fasshauer M, Klein J, Neumann S, *et al.* Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002 ; 290 : 1084–1089.
150. Viengchareun S, Zennaro M-C, Pascual-Le Tallec L, *et al.* Brown adipocytes are novel sites of expression and regulation of adiponectin and resistin. *FEBS Lett.* 2002 ; 532 : 345–350.
151. Schmidt T, Fischer S, Tsikolia N, *et al.* Expression of adipokines in preimplantation rabbit and mice embryos. *Histochem. Cell Biol.* 2008 ; 129 : 817–825.
152. Kim ST, Marquard K, Stephens S, *et al.* Adiponectin and adiponectin receptors in the mouse preimplantation embryo and uterus. *Hum. Reprod.* 2011 ; 26 : 82–95.
153. Čikoš Š, Burkuš J, Bukovská A, *et al.* Expression of adiponectin receptors and effects of adiponectin isoforms in mouse preimplantation embryos. *Hum. Reprod.* 2010 ; 25 : 2247–2255.
154. Maillard V, Uzbekova S, Guignot F, *et al.* Effect of adiponectin on bovine granulosa cell steroidogenesis, oocyte maturation and embryo development. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2010 ; 8 : 23.

155. Fischer S, Santos AN, Thieme R, *et al.* Adiponectin stimulates glucose uptake in rabbit blastocysts. *Biol. Reprod.* 2010 ; 83 : 859–865.
156. Takemura Y, Osuga Y, Yamauchi T, *et al.* Expression of adiponectin receptors and its possible implication in the human endometrium. *Endocrinology* 2006 ; 147 : 3203–3210.
157. Lord E, Ledoux S, Murphy BD, *et al.* Expression of adiponectin and its receptors in swine. *J. Anim. Sci.* 2005 ; 83 : 565–578.
158. Davis KE, Scherer PE. Adiponectin: no longer the lone soul in the fight against insulin resistance? *Biochem. J.* 2008 ; 416 : e7–9.
159. Chappaz E, Albornoz MS, Campos D, *et al.* Adiponectin enhances in vitro development of swine embryos. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2008 ; 35 : 198–207.
160. Wales RG, Whittingham DG, Hardy K, *et al.* Metabolism of glucose by human embryos. *J. Reprod. Fertil.* 1987 ; 79 : 289–297.
161. Dan-Goor M, Sasson S, Davarashvili A, *et al.* Expression of glucose transporter and glucose uptake in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum. Reprod.* 1997 ; 12 : 2508–2510.
162. Leese HJ, Barton AM. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *J. Reprod. Fertil.* 1984 ; 72 : 9–13.
163. Gardner DK, Leese HJ. The role of glucose and pyruvate transport in regulating nutrient utilization by preimplantation mouse embryos. *Development* 1988 ; 104 : 423–429.
164. Martin KL, Leese HJ. Role of glucose in mouse preimplantation embryo development. *Mol. Reprod. Dev.* 1995 ; 40 : 436–443.
165. Dufrasnes E, Vanderheyden I, Robin D, *et al.* Glucose and pyruvate metabolism in preimplantation blastocysts from normal and diabetic rats. *J. Reprod. Fertil.* 1993 ; 98 : 169–177.
166. Pike IL. Comparative studies of embryo metabolism in early pregnancy. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1981 ; 29 : 203–213.
167. Thompson JG, Partridge RJ, Houghton FD, *et al.* Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 1996 ; 106 : 299–306.
168. Khurana NK, Niemann H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biol. Reprod.* 2000 ; 62 : 847–856.
169. Gardner DK, Lane M, Batt P. Uptake and metabolism of pyruvate and glucose by individual sheep preattachment embryos developed in vivo. *Mol. Reprod. Dev.* 1993 ; 36 : 313–319.
170. Flood MR, Wiebold JL. Glucose metabolism by preimplantation pig embryos. *J. Reprod. Fertil.* 1988 ; 84 : 7–12.
171. Leese H. Energy metabolism of the blastocyst and uterus at implantation. In: *Blastocyst Implantation*. Editor K Yoshinaga; Adams publishing Group Ltd. 1989 ; 39–46.

172. Fischer B, Bavister BD. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J. Reprod. Fertil.* 1993 ; 99 : 673–679.
173. Johnson MT, Mahmood S, Patel MS. Intermediary metabolism and energetics during murine early embryogenesis. *J. Biol. Chem.* 2003 ; 278 : 31457–31460.
174. Navarrete Santos A, Augustin R, Lazzari G, *et al.* The insulin-dependent glucose transporter isoform 4 is expressed in bovine blastocysts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000 ; 271 : 753–760.
175. Augustin R, Pocar P, Navarrete-Santos A, *et al.* Glucose transporter expression is developmentally regulated in in vitro derived bovine preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 2001 ; 60 : 370–376.
176. Fischer PDB, Navarrete-Santos A. Glukose, Glukosetransporter und Insulin. *Reproduktionsmedizin* 2003 ; 19 : 195–201.
177. Robinson DH, Smith PR, Benos DJ. Hexose transport in preimplantation rabbit blastocysts. *J. Reprod. Fertil.* 1990 ; 89 : 1–11.
178. Brison DR, Leese HJ. Blastocoel cavity formation by preimplantation rat embryos in the presence of cyanide and other inhibitors of oxidative phosphorylation. *J. Reprod. Fertil.* 1994 ; 101 : 305–309.
179. Donnay I, Leese HJ. Embryo metabolism during the expansion of the bovine blastocyst. *Mol. Reprod. Dev.* 1999 ; 53 : 171–178.
180. Martin KL, Leese HJ. Role of developmental factors in the switch from pyruvate to glucose as the major exogenous energy substrate in the preimplantation mouse embryo. *Reprod. Fertil. Dev.* 1999 ; 11 : 425–433.
181. Cheța D, Dumitrescu C, Georgescu M, *et al.* A study on the types of diabetes mellitus in first degree relatives of diabetic patients. *Diabete Metab* 1990 ; 16 : 11–15.
182. Pipeleers D, In't Veld P, Pipeleers-Marichal M, *et al.* The beta cell population in type 1 diabetes. *Novartis Found. Symp.* 2008 ; 292 : 19–24; discussion 24–31, 122–129, 202–203.
183. Miodovnik M, Peros N, Holroyde JC, *et al.* Treatment of premature labor in insulin-dependent diabetic women. *Obstet Gynecol* 1985 ; 65 : 621–627.
184. Moley KH. Hyperglycemia and apoptosis: mechanisms for congenital malformations and pregnancy loss in diabetic women. *Trends Endocrinol. Metab.* 2001 ; 12 : 78–82.
185. Garner PR, D'Alton ME, Dudley DK, *et al.* Preeclampsia in diabetic pregnancies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1990 ; 163 : 505–508.
186. Barker DJP. *Mothers, Babies and Health in Later Life.* 2. A. Elsevier LTD, Oxford, 1998 : 217
187. Barker DJ. The malnourished baby and infant. *Br. Med. Bull.* 2001 ; 60 : 69–88.
188. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992 ; 35 : 595–601.

189. Ozanne SE, Hales CN. Early programming of glucose-insulin metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 2002 ; 13 : 368–373.
190. Bernasko J. Intensive insulin therapy in pregnancy: strategies for successful implementation in pregestational diabetes mellitus. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 2007 ; 20 : 125–132.
191. Moley KH, Chi MM, Mueckler MM. Maternal hyperglycemia alters glucose transport and utilization in mouse preimplantation embryos. *Am. J. Physiol.* 1998 ; 275 : E38–47.
192. Moley KH, Chi MM, Knudson CM, *et al.* Hyperglycemia induces apoptosis in pre-implantation embryos through cell death effector pathways. *Nat. Med.* 1998 ; 4 : 1421–1424.
193. Chi MM, Pingsterhaus J, Carayannopoulos M, *et al.* Decreased glucose transporter expression triggers BAX-dependent apoptosis in the murine blastocyst. *J. Biol. Chem.* 2000 ; 275 : 40252–40257.
194. Pampfer S, Hertogh R de, Vanderheyden I, *et al.* Decreased inner cell mass proportion in blastocysts from diabetic rats. *Diabetes* 1990 ; 39 : 471–476.
195. Vercheval M, Hertogh R De, Pampfer S, *et al.* Experimental diabetes impairs rat embryo development during the preimplantation period. *Diabetologia* 1990 ; 33 : 187–191.
196. Bavister BD. Glucose and culture of human embryos. *Fertil. Steril.* 1999 ; 72 : 233–234.
197. Leppens-Luisier G, Urner F, Sakkas D. Facilitated glucose transporters play a crucial role throughout mouse preimplantation embryo development. *Hum. Reprod.* 2001 ; 16 : 1229–1236.
198. Ramin N, Thieme R, Fischer S, *et al.* Maternal diabetes impairs gastrulation and insulin and IGF-I receptor expression in rabbit blastocysts. *Endocrinology* 2010 ; 151 : 4158–4167.
199. Graur D, Duret L, Gouy M. Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies). *Nature* 1996 ; 379 : 333–335.
200. Gorus FK, Malaisse WJ, Pipeleers DG. Selective uptake of alloxan by pancreatic B-cells. *Biochem. J.* 1982 ; 208 : 513–515.
201. Lenzen S, Munday R. Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. *Biochem. Pharmacol.* 1991 ; 42 : 1385–1391.
202. Munday R, Ludwig K, Lenzen S. The relationship between the physicochemical properties and the biological effects of alloxan and several N-alkyl substituted alloxan derivatives. *J. Endocrinol.* 1993 ; 139 : 153–163.
203. Malaisse WJ, Doherty M, Ladrière L, *et al.* Pancreatic uptake of [2-(14)C]alloxan. *Int. J. Mol. Med.* 2001 ; 7 : 311–315.
204. Munday R. Dialuric acid autoxidation. Effects of transition metals on the reaction rate and on the generation of “active oxygen” species. *Biochem. Pharmacol.* 1988 ; 37 : 409–413.

205. Winterbourn CC, Cowden WB, Sutton HC. Auto-oxidation of dialuric acid, divicine and isouramil. Superoxide dependent and independent mechanisms. *Biochem. Pharmacol.* 1989 ; 38 : 611–618.
206. Elsner M, Gurgul-Convey E, Lenzen S. Relative importance of cellular uptake and reactive oxygen species for the toxicity of alloxan and dialuric acid to insulin-producing cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2006 ; 41 : 825–834.
207. Jörns A, Munday R, Tiedge M, *et al.* Comparative toxicity of alloxan, N-alkylalloxans and ninhydrin to isolated pancreatic islets in vitro. *J. Endocrinol.* 1997 ; 155 : 283–293.
208. Grankvist K, Marklund S, Sehlin J, *et al.* Superoxide dismutase, catalase and scavengers of hydroxyl radical protect against the toxic action of alloxan on pancreatic islet cells in vitro. *Biochem. J.* 1979 ; 182 : 17–25.
209. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, *et al.* Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 1997 ; 46 : 1733–1742.
210. Tasaka Y, Inoue Y, Matsumoto H, *et al.* Changes in plasma glucagon, pancreatic polypeptide and insulin during development of alloxan diabetes mellitus in dog. *Endocrinol. Jpn.* 1988 ; 35 : 399–404.
211. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008 ; 51 : 216–226.
212. Yang XZ, Foote RH. Production of identical twin rabbits by micromanipulation of embryos. *Biol. Reprod.* 1987 ; 37 : 1007–1014.
213. Viebahn C, Mayer B, Miething A. Morphology of incipient mesoderm formation in the rabbit embryo: a light- and retrospective electron-microscopic study. *Acta Anat (Basel)* 1995 ; 154 : 99–110.
214. Daniel JC. Early Growth of Rabbit Trophoblast. *The American Naturalist* 1964 ; 98 : 85–98.
215. Viebahn C. The anterior margin of the mammalian gastrula: comparative and phylogenetic aspects of its role in axis formation and head induction. *Curr. Top. Dev. Biol.* 1999 ; 46 : 63–103.
216. Viebahn C, Mayer B, Hrabé de Angelis M. Signs of the principle body axes prior to primitive streak formation in the rabbit embryo. *Anat. Embryol.* 1995 ; 192 : 159–169.
217. Viebahn C. Epithelio-mesenchymal transformation during formation of the mesoderm in the mammalian embryo. *Acta Anat (Basel)* 1995 ; 154 : 79–97.
218. Hensen. Beobachtungen über die Befruchtung und Entwicklung des Kaninchens und Meerschweinchens. *Z. Anat. Entw.-Gesch.* 1876 ; 1 : 213.
219. Idkowiak J, Weisheit G, Viebahn C. Polarity in the rabbit embryo. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2004 ; 15 : 607–617.
220. Maurer R. Advances in rabbit embryo culture. In: Methods in mammalian reproduction, Editor J.C. Daniels. *J Academic Press* 1978 ; 259–272.

221. Fischer B. Development retardation in cultured preimplantation rabbit embryos. *J. Reprod. Fertil.* 1987 ; 79 : 115–123.
222. Tiainen M, Ylikorkala A, Mäkelä TP. Growth suppression by Lkb1 is mediated by a G(1) cell cycle arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999 ; 96 : 9248–9251.
223. Tiainen M, Vaahtomeri K, Ylikorkala A, *et al.* Growth arrest by the LKB1 tumor suppressor: induction of p21(WAF1/CIP1). *Hum. Mol. Genet.* 2002 ; 11 : 1497–1504.
224. Jimenez AI, Fernandez P, Dominguez O, *et al.* Growth and molecular profile of lung cancer cells expressing ectopic LKB1: down-regulation of the phosphatidylinositol 3'-phosphate kinase/PTEN pathway. *Cancer Res.* 2003 ; 63 : 1382–1388.
225. Kyriakis JM. At the crossroads: AMP-activated kinase and the LKB1 tumor suppressor link cell proliferation to metabolic regulation. *J. Biol.* 2003 ; 2 : 26.
226. Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J. Cell. Sci.* 2004 ; 117 : 5479–5487.
227. Hummel L, Zimmermann T, Schirrmeister W, *et al.* Synthesis, turnover and compartment analysis of the free fatty acids in the placenta of rats. *Acta Biol. Med. Ger.* 1976 ; 35 : 1311–1316.
228. Diamant YZ, Shafrir E. Enzymes of carbohydrate and lipid metabolism in the placenta and liver of pregnant rats. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1972 ; 279 : 424–430.
229. Diamant YZ, Mayorek N, Neumann S, *et al.* Enzymes of glucose and fatty acid metabolism in early and term human placenta. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1975 ; 121 : 58–61.
230. Borland RM, Biggers JD, Lechene CP. Studies on the composition and formation of mouse blastocoele fluid using electron probe microanalysis. *Dev. Biol.* 1977 ; 55 : 1–8.
231. Pampfer S. Apoptosis in rodent peri-implantation embryos: differential susceptibility of inner cell mass and trophectoderm cell lineages--a review. *Placenta* 2000 ; 21 Suppl A : S3–10.
232. Robinson DH, Benos DJ. Glucose metabolism in the trophectoderm and inner cell mass of the rabbit embryo. *J. Reprod. Fertil.* 1991 ; 91 : 493–499.
233. Wang C, Mao X, Wang L, *et al.* Adiponectin sensitizes insulin signaling by reducing p70 S6 kinase-mediated serine phosphorylation of IRS-1. *J. Biol. Chem.* 2007 ; 282 : 7991–7996.
234. Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, *et al.* LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr. Biol.* 2003 ; 13 : 2004–2008.
235. Inoki K, Li Y, Xu T, *et al.* Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev.* 2003 ; 17 : 1829–1834.
236. Ju J-S, Gitcho MA, Casmaer CA, *et al.* Potentiation of insulin-stimulated glucose transport by the AMP-activated protein kinase. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2007 ; 292 : C564–572.

237. Yu JG, Javorschi S, Hevener AL, *et al.* The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 2002 ; 51 : 2968–2974.
238. Möhlig M, Wegewitz U, Osterhoff M, *et al.* Insulin decreases human adiponectin plasma levels. *Horm. Metab. Res.* 2002 ; 34 : 655–658.
239. Brame LA, Considine RV, Yamauchi M, *et al.* Insulin and endothelin in the acute regulation of adiponectin in vivo in humans. *Obes. Res.* 2005 ; 13 : 582–588.
240. Qi L, Saberi M, Zmuda E, *et al.* Adipocyte CREB promotes insulin resistance in obesity. *Cell Metab.* 2009 ; 9 : 277–286.
241. Lucas MJ, Leveno KJ, Williams ML, *et al.* Early pregnancy glycosylated hemoglobin, severity of diabetes, and fetal malformations. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1989 ; 161 : 426–431.
242. Phelan SA, Ito M, Loeken MR. Neural tube defects in embryos of diabetic mice: role of the Pax-3 gene and apoptosis. *Diabetes* 1997 ; 46 : 1189–1197.
243. Kwong WY, Miller DJ, Wilkins AP, *et al.* Maternal low protein diet restricted to the preimplantation period induces a gender-specific change on hepatic gene expression in rat fetuses. *Mol. Reprod. Dev.* 2007 ; 74 : 48–56.
244. Edwards LJ, McMillen IC. Periconceptual nutrition programs development of the cardiovascular system in the fetal sheep. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2002 ; 283 : R669–679.
245. Gardner DS, Pearce S, Dandrea J, *et al.* Peri-implantation undernutrition programs blunted angiotensin II evoked baroreflex responses in young adult sheep. *Hypertension* 2004 ; 43 : 1290–1296.
246. Kwong WY, Osmond C, Fleming TP. Support for Barker hypothesis upheld in rat model of maternal undernutrition during the preimplantation period: application of integrated “random effects” statistical model. *Reprod. Biomed. Online* 2004 ; 8 : 574–576.
247. Dabelea D, Pettitt DJ, Jones KL, *et al.* Type 2 diabetes mellitus in minority children and adolescents. An emerging problem. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 1999 ; 28 : 709–729, viii.
248. Casson IF, Clarke CA, Howard CV, *et al.* Outcomes of pregnancy in insulin dependent diabetic women: results of a five year population cohort study. *BMJ* 1997 ; 315 : 275–278.
249. Penney GC, Mair G, Pearson DWM. Outcomes of pregnancies in women with type 1 diabetes in Scotland: a national population-based study. *BJOG* 2003 ; 110 : 315–318.
250. Takemura Y, Osuga Y, Harada M, *et al.* Serum adiponectin concentrations are decreased in women with endometriosis. *Hum. Reprod.* 2005 ; 20 : 3510–3513.
251. Carmina E, Chu MC, Moran C, *et al.* Subcutaneous and omental fat expression of adiponectin and leptin in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.* 2008 ; 89 : 642–648.

-
252. Carmina E, Bucchieri S, Mansueto P, *et al.* Circulating levels of adipose products and differences in fat distribution in the ovulatory and anovulatory phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.* 2009 ; 91 : 1332–1335.
253. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, *et al.* Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001 ; 86 : 1930–1935.
254. Kim HB, Kong M, Kim TM, *et al.* NFATc4 and ATF3 negatively regulate adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 2006 ; 55 : 1342–1352.
255. Koh EH, Park J-Y, Park H-S, *et al.* Essential role of mitochondrial function in adiponectin synthesis in adipocytes. *Diabetes* 2007 ; 56 : 2973–2981.
256. Inukai K, Nakashima Y, Watanabe M, *et al.* Regulation of adiponectin receptor gene expression in diabetic mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2005 ; 288 : E876–882.
257. Civitarese AE, Jenkinson CP, Richardson D, *et al.* Adiponectin receptors gene expression and insulin sensitivity in non-diabetic Mexican Americans with or without a family history of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 2004 ; 47 : 816–820.
258. Staiger H, Kaltenbach S, Staiger K, *et al.* Expression of adiponectin receptor mRNA in human skeletal muscle cells is related to in vivo parameters of glucose and lipid metabolism. *Diabetes* 2004 ; 53 : 2195–2201.
259. Wang H, Zhang H, Jia Y, *et al.* Adiponectin receptor 1 gene (ADIPOR1) as a candidate for type 2 diabetes and insulin resistance. *Diabetes* 2004 ; 53 : 2132–2136.
260. Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, *et al.* Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J. Biol. Chem.* 2004 ; 279 : 30817–30822.
261. Kirigiti P, Bai Y, Yang YF, *et al.* Agonist-mediated down-regulation of rat beta1-adrenergic receptor transcripts: role of potential post-transcriptional degradation factors. *Mol. Pharmacol.* 2001 ; 60 : 1308–1324.
262. Cebers G, Cebere A, Kovács AD, *et al.* Increased ambient glutamate concentration alters the expression of NMDA receptor subunits in cerebellar granule neurons. *Neurochem. Int.* 2001 ; 39 : 151–160.
263. Tong X, Kawabata H, Koeffler HP. Iron deficiency can upregulate expression of transferrin receptor at both the mRNA and protein level. *Br. J. Haematol.* 2002 ; 116 : 458–464.
264. Conconi M, Szweda LI, Levine RL, *et al.* Age-related decline of rat liver multicatalytic proteinase activity and protection from oxidative inactivation by heat-shock protein 90. *Arch. Biochem. Biophys.* 1996 ; 331 : 232–240.
265. Bulteau AL, Verbeke P, Petropoulos I, *et al.* Proteasome inhibition in glyoxal-treated fibroblasts and resistance of glycated glucose-6-phosphate dehydrogenase to 20 S proteasome degradation in vitro. *J. Biol. Chem.* 2001 ; 276 : 45662–45668.

-
266. Wang Y, Xu A, Knight C, *et al.* Hydroxylation and glycosylation of the four conserved lysine residues in the collagenous domain of adiponectin. Potential role in the modulation of its insulin-sensitizing activity. *J. Biol. Chem.* 2002 ; 277 : 19521–19529.
267. Halberg N, Schraw TD, Wang ZV, *et al.* Systemic fate of the adipocyte-derived factor adiponectin. *Diabetes* 2009 ; 58 : 1961–1970.
268. Schindler M, Fischer S, Thieme R, *et al.* Cyclic AMP responsive element binding protein—a vital link in embryonic hormonal adaptation. *Endocrinology* 2013 ; Epub ahead of print.
269. Heyner S, Rao LV, Jarett L, *et al.* Preimplantation mouse embryos internalize maternal insulin via receptor-mediated endocytosis: pattern of uptake and functional correlations. *Dev. Biol.* 1989 ; 134 : 48–58.
270. Schultz GA, Hogan A, Watson AJ, *et al.* Insulin, insulin-like growth factors and glucose transporters: temporal patterns of gene expression in early murine and bovine embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 1992 ; 4 : 361–371.
271. Lighten AD, Hardy K, Winston RM, *et al.* Expression of mRNA for the insulin-like growth factors and their receptors in human preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 1997 ; 47 : 134–139.
272. Thieme R, Schindler M, Ramin N, *et al.* Insulin growth factor adjustment in preimplantation rabbit blastocysts and uterine tissues in response to maternal type 1 diabetes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2012 ; 358 : 96–103.
273. Navarrete Santos A, Ramin N, Tonack S, *et al.* Cell lineage-specific signaling of insulin and insulin-like growth factor I in rabbit blastocysts. *Endocrinology* 2008 ; 149 : 515–524.
274. Kaye PL, Bell KL, Beebe LF, *et al.* Insulin and the insulin-like growth factors (IGFs) in preimplantation development. *Reprod. Fertil. Dev.* 1992 ; 4 : 373–386.
275. Pantaleon M, Jericho H, Rabnott G, *et al.* The role of insulin-like growth factor II and its receptor in mouse preimplantation development. *Reprod. Fertil. Dev.* 2003 ; 15 : 37–45.
276. Cui X-B, Wang C, Li L, *et al.* Insulin decreases myocardial adiponectin receptor 1 expression via PI3K/Akt and FoxO1 pathway. *Cardiovasc. Res.* 2012 ; 93 : 69–78.
277. Navarrete Santos A, Tonack S, Kirstein M, *et al.* Insulin acts via mitogen-activated protein kinase phosphorylation in rabbit blastocysts. *Reproduction* 2004 ; 128 : 517–526.
278. Vu V, Dadson K, Odisho T, *et al.* Temporal analysis of mechanisms leading to stimulation of glucose uptake in skeletal muscle cells by an adipokine mixture derived from primary rat adipocytes. *Int J Obes (Lond)* 2011 ; 35 : 355–363.
279. Hauguel-de Mouzon S, Leturque A, Alsat E, *et al.* Developmental expression of Glut1 glucose transporter and c-fos genes in human placental cells. *Placenta* 1994 ; 15 : 35–46.
280. Gordon MC, Zimmerman PD, Landon MB, *et al.* Insulin and glucose modulate glucose transporter messenger ribonucleic acid expression and glucose uptake in trophoblasts

- isolated from first-trimester chorionic villi. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1995 ; 173 : 1089–1097.
281. Hahn T, Barth S, Weiss U, *et al.* Sustained hyperglycemia in vitro down-regulates the GLUT1 glucose transport system of cultured human term placental trophoblast: a mechanism to protect fetal development? *FASEB J.* 1998 ; 12 : 1221–1231.
282. Illsley NP, Sellers MC, Wright RL. Glycaemic regulation of glucose transporter expression and activity in the human placenta. *Placenta* 1998 ; 19 : 517–524.
283. Barb D, Neuwirth A, Mantzoros CS, *et al.* Adiponectin signals in prostate cancer cells through Akt to activate the mammalian target of rapamycin pathway. *Endocr. Relat. Cancer* 2007 ; 14 : 995–1005.
284. Chen H, Montagnani M, Funahashi T, *et al.* Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2003 ; 278 : 45021–45026.
285. Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, *et al.* Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2004 ; 279 : 1304–1309.
286. Miaczynska M, Christoforidis S, Giner A, *et al.* APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell* 2004 ; 116 : 445–456.
287. Mitsuuchi Y, Johnson SW, Sonoda G, *et al.* Identification of a chromosome 3p14.3-21.1 gene, APPL, encoding an adaptor molecule that interacts with the oncoprotein-serine/threonine kinase AKT2. *Oncogene* 1999 ; 18 : 4891–4898.
288. Baviera G, Corrado F, Dugo C, *et al.* Midtrimester Amniotic Fluid Adiponectin in Normal Pregnancy. *Clinical Chemistry* 2007 ; 53 : 1723–1724.
289. Schraw T, Wang ZV, Halberg N, *et al.* Plasma Adiponectin Complexes Have Distinct Biochemical Characteristics. *Endocrinology* 2008 ; 149 : 2270–2282.
290. Zhou G, Myers R, Li Y, *et al.* Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* 2001 ; 108 : 1167–1174.
291. Towle HC, Kaytor EN, Shih HM. Regulation of the expression of lipogenic enzyme genes by carbohydrate. *Annu. Rev. Nutr.* 1997 ; 17 : 405–433.
292. Girard J, Ferré P, Fougelle F. Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. *Annu. Rev. Nutr.* 1997 ; 17 : 325–352.
293. Ma L, Robinson LN, Towle HC. ChREBP*MLx is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver. *J. Biol. Chem.* 2006 ; 281 : 28721–28730.
294. Meugnier E, Rome S, Vidal H. Regulation of gene expression by glucose. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007 ; 10 : 518–522.
295. Croniger C, Trus M, Lysek-Stupp K, *et al.* Role of the isoforms of CCAAT/enhancer-binding protein in the initiation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription at birth. *J. Biol. Chem.* 1997 ; 272 : 26306–26312.

296. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, *et al.* Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* 2003 ; 423 : 550–555.
297. Kuo M, Zilberfarb V, Gangneux N, *et al.* O-glycosylation of FoxO1 increases its transcriptional activity towards the glucose 6-phosphatase gene. *FEBS Lett.* 2008 ; 582 : 829–834.
298. Housley MP, Rodgers JT, Udeshi ND, *et al.* O-GlcNAc regulates FoxO activation in response to glucose. *J. Biol. Chem.* 2008 ; 283 : 16283–16292.
299. Pilkis SJ, Granner DK. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Physiol.* 1992 ; 54 : 885–909.
300. Hanson RW, Reshef L. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* 1997 ; 66 : 581–611.
301. Quinn PG, Yeagley D. Insulin regulation of PEPCK gene expression: a model for rapid and reversible modulation. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* 2005 ; 5 : 423–437.
302. Uyeda K, Repa JJ. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab.* 2006 ; 4 : 107–110.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Adiponektinisoformen	3
Abb. 2: Schematische Darstellung von Adiponektin und Komplement 1q.	3
Abb. 3: Struktur der Adiponektinrezeptoren.....	5
Abb. 4: Adiponektin-Signalkaskade in der Skelettmuskulatur und der Leberzelle	7
Abb. 5: Schema des Zeitverlaufs der Blutglukosekonzentration bei Versuchstieren nach Alloxaninjektion	13
Abb. 6: Kaninchenblastozyste am Tag 6 <i>p.c.</i>	14
Abb. 7: Morphologische Einteilung der frühen Keimscheibendifferenzierung beim Kaninchen	15
Abb. 8: Schema des Versuchsablaufes.....	16
Abb. 9: Tägliches Behandlungsschema der zwei Versuchstiergruppen.....	17
Abb. 10: Vektorkarte des pGEM [®] -T Vektors (Promega, Mannheim)	30
Abb. 11: Schema des Aufbaus einer Western-Blot-Kammer	39
Abb. 12: Ablaufschema des Adiponektin-ELISAs	41
Abb. 13: Expression von Adiponektin, AdipoR1 und AdipoR2 in Präimplantationsembryonen des Kaninchens	43
Abb. 14: Lokalisation von Adiponektin in der Kaninchenblastozyste	44
Abb. 15: Lokalisation von AdipoR1 und AdipoR2 in der Kaninchenblastozyste	44
Abb. 16: Expression von Mitgliedern der Adiponektin-Signalkaskade in Präimplantationsembryonen des Kaninchens	45
Abb. 17: Quantifizierung von Adiponektin-RNA und -Protein in Kaninchenblastozysten am Tag 6 <i>p.c.</i> ...	47
Abb. 18: Adiponektinkonzentration in Embryoblasten und Trophoblasten von 6 Tage alten Kaninchenblastozysten.....	47
Abb. 19: Immunhistochemische Detektion von Adiponektin in der Kaninchenblastozyste.....	48
Abb. 20: Immunhistochemischer Nachweis von AdipoR1 und AdipoR2 in der Kaninchenblastozyste	49
Abb. 21: Quantifizierung von AdipoR1- und -R2-mRNA in Kaninchenblastozysten.....	50
Abb. 22: Adiponektinkonzentrationen im Plasma gravider Kaninchen (6 <i>dpc</i>)	50
Abb. 23: Quantifizierung von Adiponektin im Endometrium gravider Kaninchen am Tag 6 <i>p.c.</i>	51
Abb. 24: Quantifizierung der Adiponektinrezeptoren im Endometrium gravider Kaninchen (6 <i>dpc</i>)	52
Abb. 25: Phosphorylierung der AMPK nach Adiponektin-Stimulation	53
Abb. 26: Phosphorylierung von Akt nach Adiponektin-Stimulation in Kaninchenblastozysten	54
Abb. 27: Quantifizierung der AdipoR1-Transkriptmenge in Blastozysten (6 <i>dpc</i> , Stadium 0/1) nach Adiponektinstimulation.....	55
Abb. 28: Quantifizierung der AdipoR2-Transkriptmenge in Blastozysten (6 <i>dpc</i> , Stadium 0/1) nach Adiponektinstimulation.....	56
Abb. 29: Quantifizierung der PEPCK-Transkriptmenge in Blastozysten (6 <i>dpc</i>) nach <i>In-vitro</i> -Kultur mit Adiponektin	57
Abb. 30: Quantifizierung der PEPCK-Transkriptmenge in Blastozysten (6 <i>dpc</i>) nach <i>in vitro</i> -Kultur mit Adiponektin und einem AMPK-Inhibitor	58
Abb. 31: Quantifizierung der GLUT1-Transkriptmenge in Blastozysten (6 <i>dpc</i>) gesunder und diabetischer (DT1) Tiere nach Adiponektinstimulation	59
Abb. 32: Quantifizierung der GLUT4-Transkriptmenge in Blastozysten (6 <i>dpc</i>) gesunder und diabetischer (DT1) Tiere nach Adiponektinstimulation	60
Abb. 33: Lokation von GLUT4 in der Kaninchenblastozyste (6 <i>dpc</i>) gesunder und diabetischer (DT1)	61
Abb. 34: Glukoseaufnahme in gesunden und diabetischen (DT1) Blastozysten (6 <i>dpc</i>) nach	62
Abb. 35: Hormonelle Interaktion zwischen Insulin und Adiponektin	66
Abb. 36: Schema der Embryoblast- und Trophoblast-spezifischen Adiponektinexpression der	74
Abb. 37: Auswirkungen eines experimentell induzierten Diabetes mellitus Typ 1 auf das Adiponektin- .	75

Abb. 38: Regulation des Glukosemetabolismus durch Adiponektin in Zellen der Kaninchenblastozyste .	81
Abb. 39: Modell eines Amplifikationsdiagramms der <i>Real Time</i> PCR.....	XI
Abb. 40: AMPK-Phosphorylierung von RK13-Zellen	XIII

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Adiponektin und seine beiden Rezeptoren in der Präimplantationsphase verschiedener Säuger	10
Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide für die <i>Real Time</i> PCR, PCR und Sequenzierung.....	27
Tabelle 3: Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie	35
Tabelle 4: Verwendete Primär- und Sekundäantikörper	40
Tabelle 5: Nachweis der RNA von Mitgliedern der Adiponektinsignalkaskade im Embryoblasten und Trophoblasten 6 Tage alter Kaninchenblastozysten	65
Tabelle 6: Vorkommen von Adiponektin und seinen Rezeptoren im Endometrium und in Blastozysten diabetischer Kaninchen (Tag 6 <i>p.c.</i>)	71
Tabelle 7: Beispielauswertung einer <i>Real time</i> PCR nach der Molekülwertmethode	XII

7.3 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACC	Acetyl-Coenzym A Carboxylase
ACO	Acetyl-CoA Oxidase
AdipoR	Adiponektinrezeptor
Akt	Protein-Kinase B (PKB)
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
APES	3(Triethoxysilyl)propylamin
APPL	<i>Adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
BSM II	Basales Synthetisches Medium II
C1q	Komplement 1q
Ca	Calcium
CaMKK1	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD36	<i>Cluster of Differentiation 36</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CREB	<i>cAMP-response element-binding protein</i>
CRTC2	<i>CREB-regulated transcription coactivator 2</i>
CT	<i>Cycle Treshold</i>
d	Tag
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotid-Triphosphat
dpc	Tag <i>post coitum</i>
DPX	Einbettmedium für ICH
DT1	experimentell induzierter Diabetes mellitus Typ 1
DTT	Dithiothreitol
EB	Embryoblast
EC50	mittlere effektive Konzentration

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Em	Embryoblast
ER	<i>Endoplasmatisches Retikulum</i>
Erk1/2	<i>extracellular signal regulated kinase 1/2</i>
FG	Fragmentlänge
FKS	fötales Kälberserum
FOXO	<i>Forkhead boxO</i> Transkriptionsfaktor
g	Gramm
G	Gauche
G6P	Glukose-6-Phosphatase
gAdiponektin	globuläres Adiponektin
GAPDH	Glycerolaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GLUT	Glukosetransporter
h	Stunde
hCG	humanes Choriongonadotropin
HK	Hexokinase
HRP	Meerrettichperoxidase, <i>horseradish peroxidase</i>
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor, <i>insulin-like growth factor</i>
IGFBP	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-Bindeprotein, <i>insulin-like growth factor binding protein</i>
IGF-R	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-Rezeptor, <i>Insulin-like growth factor receptor</i>
IHC	Immunhistochemie
IPTG	Isopropylthio- β -D-galactosid
IR	Insulinrezeptor
IR-A	Insulinrezeptor-Isoform A
IR-B	Insulinrezeptor-Isoform B
IRR	Insulinrezeptor- <i>related</i> Rezeptor
IRS	Insulinrezeptor-Substrat, <i>insulin receptor substrate</i>
JAK-STAT	<i>Janus-activated kinase/signal transducer and activator of transcription</i>
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
K	Kalium
K	Kontrolle
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
kg	Kilogramm
KLSM	<i>konfokales Laser Scanning Mikroskop</i>
KM	Kulturmedium
KO	<i>Knock-Out</i>
l	Liter
LKB1	Serin/Threoninkinase 11
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MEM	Minimal <i>Eagle</i> Medium
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MOPS	<i>(N-Morpholino)propanesulfonic acid</i>
mRNA	messenger RNA
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
Mw	Mittelwert
Na	Natrium
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OD	optische Dichte
P38MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pACC	phosphorylierte ACC, phospho-ACC
pAkt	phosphoryliertes Akt, phospho-Akt
pAMPK	phosphorylierte AMPK, phospho-AMPK
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung, <i>phosphat buffered saline</i>
PBST	Phosphat buffered Saline + Tween
p.c.	<i>post coitum</i>
PCO	Polyzystisches Ovar
PCR	Polymerase Kettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
PDK1	<i>phosphoinositide-dependent kinase</i>
PEPCK	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase
pErk	phosphoryliertes Erk, phospho-Erk
PFA	Paraformaldehyd
PGE	posteriore Gastrulaextension
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKC	Proteinkinase C
pM	Picomolar
PMSG	<i>pregnant mare serum gonadotropin</i>
PPAR α	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor alpha
PS	Primitivstreifen
PVA	Polyvinylalkohol
rab	Kaninchen, <i>rabbit</i>
rab5	<i>RAS-related protein 5</i>
raptor	<i>regulatory associated protein of mTOR</i>
Rheb	<i>Ras-homolog-enriched-in-brain</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per million</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunde
S6K	Protein S6-Kinase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SEM	Standardfehler
SGLT	Natrium-Glukose-Kotransporter
SHP	<i>orphan nuclear receptor small heterodimer partner</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TB	Trophoblast
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung, <i>Tris buffered saline</i>
TEMED	Tetra-Ethyl-Methyl-Ethylen-Diamin
TFB	<i>transformation buffer</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Tr	Trophoblast
TSC1/2	<i>tuberous sclerosis protein 1/2</i>
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	<i>Unit</i>
UCP2	<i>Mitochondrial uncoupling protein 2</i>
SREBP1c	<i>sterol regulatory element-binding protein 1c</i>
V	<i>Volt</i>
VRB	vorderer Randbogen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid
7-AAD	7-Amino-Aktinomycin
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
$^{\circ}$ C	Grad Celcius

Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

7.4 Geräte- und Softwareverzeichnis**7.4.1 Geräte**

ABI-PRISM 5700	<i>Sequence Detection</i> System Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Agarosegel-Dokumentationsgerät	LTF Labortechnik, Wasserburg, Deutschland
Axiocam Digitalkamera	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Brutschrank BB6060	Haereus, Hanau, Deutschland
ChemiDoc-It <i>Imaging</i> System	UVP, Cambridge, UK
ELISA Reader SLT SPECTRA II	SLT Labinstruments Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axioplan	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Gelkammer	Biometra, Göttingen, Deutschland
halbsterile Werkbank	Haereus, Hanau, Deutschland
konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	Leica Microsystems, Heidelberg, Deutschland
Kühlzentrifugen	Haereus, Hanau, Deutschland
Mikrotom	Medizinische Diagnostik-Methoden GmbH, Gießen, Deutschland
NanoVue Spektrometer	GE Healthcare, München, Deutschland
NOVEX Gelkammern	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DNA Engine Opticon® 2 System	MJ Research, München, Deutschland
Precision Xceed Blutzucker-Messsystem	Abbott GmbH Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Precision Xtra Plus Teststreifen	Abbott GmbH Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Precision Xtra Plus β -Keton Teststreifen	Abbott GmbH Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Stereomikroskop	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Thermocycler TRIO-Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
Ultra-Turrax T25	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG –IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
UV/VIS Spektrometer	Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland
Western Blot Apparatur	Biometra, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge Biofuge	Haereus, Hanau, Deutschland

7.4.2 Software

Bio1D Software	LTF, Wasserburg, Deutschland
BioCaptMW	LTF, Wasserburg, Deutschland
easy Win fitting E1.0a	SLT Labinstruments Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Generunner Software 3.05	Hastings Software Inc., USA
Software Axiovision 2.05	Zeiss, Jena, Deutschland

7.5 Chemikalien- und Verbrauchsmaterialienverzeichnis

5xRT-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
7-Amino-Actinomycin-D (7-AAD)	Molecular Probes, Eugene, USA
10x PCR-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Adiponectin (human) ELISA Kit	AdipoGen Inc., Incheon, Korea
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf Deutschland
Alloxan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck KG, Darmstadt, Deutschland
Ampecillin	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
<i>Basal synthetic medium II (BSM II)</i>	Seromed, Berlin, Deutschland
BigDye® Terminator v1.1. Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Bovine serum albumin (BSA)	Fluka, Seelze, Deutschland
Borsäure	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bradford Reagenz	BioRad, München, Deutschland
Bromphenolblau	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Calciumchlorid	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Chlorhydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
D-(+)-Glukose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)	Sigma Research Genetics, Taufkirchen, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma Research Genetics, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

Di-Natriumhydrogenphosphat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DNase I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
DNA ladder 1Kb Gene Ruler	Fermentas GmbH. St. Leon-Rot, Deutschland
dNTP (100mM)	Fermentas GmbH. St. Leon-Rot, Deutschland
DPX	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DTT	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium	GIBCO, Karlsruhe, Deutschland
Dynabeads® Oligo(dT)25	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
e-Amino-n-Caprinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Einwegspritze	Omnifix, B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Eisessig	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ficoll 400	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Formaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
fötales Kälberserum (FKS) ausgewählte Charge	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Geneticin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
GFX Micro Plasmid Prep Kit	GE Healthcare, München, Deutschland
3-O-Methyl-D-Glukose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
3-O-Methyl-D-[1- ³ H]Glukose	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Glycerol	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Guanidiniumthiocyanat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hefe-Extrakt	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
humanes Choriongonadotropin (hCG)	Bayer Schering Pharma, Berlin, Deutschland
Hybond-ECL Nitrocellulose Membran	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland

Hyperfilm ECL (18x24 cm)	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Igepal Ca-630	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Immobilon Western Detection Reagenz	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Insulin (bovin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Insuman [®] Rapid 40 I.E./ml	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
<i>Insulin-like growth factor 1 (IGF1)</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Isopropanol	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isoprpylthio- β -D-galactosid (IPTG)	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumacetat	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Kalium-Aluminium-Sulfat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kalium-di-hydrogenphosphat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Lantus [®] 100Einheiten/ml	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Lithiumchlorid	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Magnesiumchlorid	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Magnesiumsulfat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mangan(II)chlorid-dihydrat (Manganchlorid)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Metaphore Agarose	FMC, Rockland, USA
Methanol (100%)	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
MEM Earle Medium	Biochrom, Berlin, Deutschland
Minimal Eagle Medium	Biochrom, Berlin, Deutschland
MOPS (3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid),	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Moviol [®] 4-88	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Natrium-Deoxycholat	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumiodat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumlaurosylsarcosinat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat	Biochrom, Berlin, Deutschland
Oligonukleotide	Biomers, Ulm, Deutschland
Paraffin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PBS	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin	GIBCO, Karlsruhe, Deutschland
Pentobarbital	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Pepsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Pepton	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
pGEMT-Vektor Kit	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Phenol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Phosphatase-Inhibitor	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Protease-Inhibitor	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Pikrinsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG)</i>	Intervet, Unterschleißheim, Deutschland
Polyvinylalkohol (PVA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Proteinmarker <i>broad-range</i> Marker	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Proteinmarker <i>prestained protein ladder</i>	Fermentas GmbH. St. Leon-Rot, Deutschland
Quia Quick Gel Extraction Kit	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
<i>random</i> Primer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
REIKA GmbH Kraftfutter	Reinsdorfer Kraftfutterwerk, Reinsdorf, Deutschland
Restriktionsenzyme	Fermentas GmbH. St. Leon-Rot, Deutschland
Restriktionspuffer	Fermentas GmbH. St. Leon-Rot, Deutschland
RNase-Inhibitor	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Rubidiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Salzsäure (36%)	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
S-Monovette® Gerinnung Citrat 1:10	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette® Hämatologie kalium-EDTA	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Deutschland
Sodium-dodecyl-sulfat (SDS)	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
SYBR Green® Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tetra-Ethyl-Methyl-Ethylen-Diamin (TEMED)	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tris-Base	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tris/HCl	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Trypsin	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
X-GAL	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylencyanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ziegenserum	Dianova, Hamburg, Deutschland
Zitronensäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

7.6 Antikörperverzeichnis

Alexa fluor® 488 <i>Goat Anti Mouse</i>	Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland
<i>Donkey Anti Goat</i> , HRP-konjugiert	Dianova, Hamburg, Deutschland
<i>Goat Anti Adiponectin Receptor1</i>	Cell Signaling Technology; Schwalbach, Deutschland
<i>Goat Anti Adiponectin Receptor2</i>	Cell Signaling Technology; Schwalbach, Deutschland
<i>Goat Anti Mouse</i> , HRP-konjugiert	Dako, Hamburg, Deutschland
<i>Goat Anti Rabbit</i> , HRP-konjugiert	Dako, Hamburg, Deutschland
<i>Mouse Anti Adiponectin (19F1)</i>	Abcam, Cambridge, UK
<i>Mouse Anti Adiponectin Receptor1</i>	Abcam, Cambridge, UK
<i>Mouse Anti β-Actin</i> mAb Isotyp IgG1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
<i>Mouse Anti GLUT4</i>	Abcam, Cambridge, UK
<i>Rabbit Anti phospho-Akt (Ser 473)</i> pAb	Cell Signaling Technology; Schwalbach, Deutschland

Rabbit Anti phospho-AMPK α (Thr 172)

Cell Signaling Technology; Schwalbach,
Deutschland

Rabbit Anti phospho-Acetyl-CoA
Carboxylase (Ser 79)

Cell Signaling Technology; Schwalbach,
Deutschland

7.7 Beispiel für die Auswertung einer *Real Time PCR*

Bei der *Real Time PCR* wird durch den PCR-Zyklus bestimmt, bei welchem die Amplifikation des PCR-Produktes erstmals detektiert werden kann. Je höher die Kopienzahl des Zielgens in der PCR ist, desto eher kann eine Amplifikation und ein Anstieg in der Fluoreszenz beobachtet werden. Im Anfangsbereich der PCR gibt es kaum Änderungen des Fluoreszenzsignals. Diese Intensität wird als *baseline* bezeichnet. Ein Anstieg des Signals über die *baseline* zeigt eine Akkumulation des PCR-Produktes. Eine gewählte feste Fluoreszenz kann nun oberhalb der *baseline* gelegt werden. Der Parameter *threshold cycle* (CT) ist definiert als der Zyklus, in dem die Fluoreszenz den *threshold* überschreitet. In der Wasserkontrolle (*no template*) steigt das Fluoreszenzsignal nicht an. Ein Diagramm des Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge für verschiedene Verdünnung gegen den CT-Wert ergibt eine lineare Gerade. Diese Gerade bestimmt den CT-Bereich, in welchem ein linearer Zusammenhang zwischen Fluoreszenz und Template-Menge besteht. Dieser Bereich muss für jedes Gen bestimmt werden.

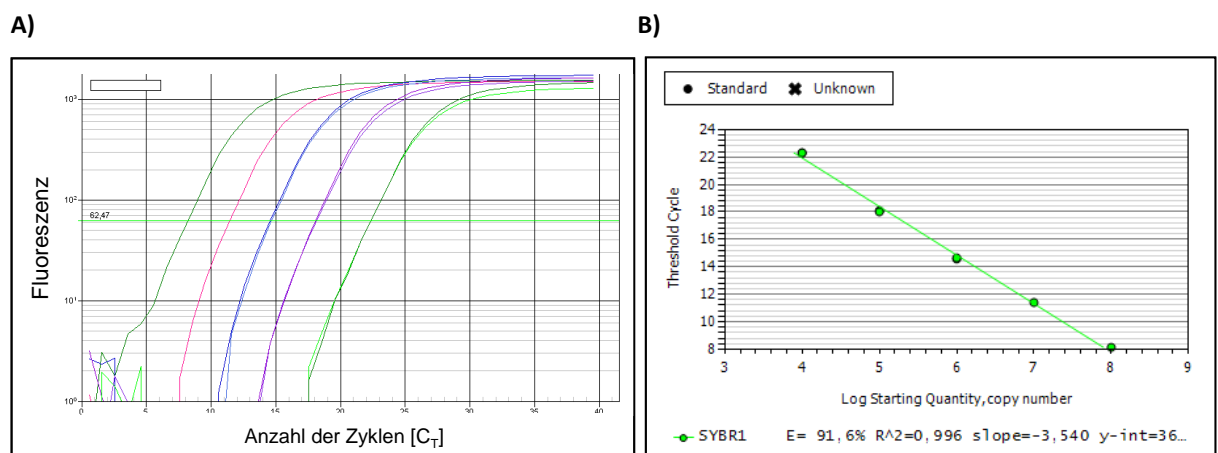


Abb. 39: Modell eines Amplifikationsdiagramms der *Real Time PCR*.

- A) Dargestellt sind exemplarisch die Fluoreszenzkurven einer Plasmidstandard-Konzentrationsreihe, die mittels *Real Time PCR* amplifiziert wurde. Die Fluoreszenzintensität (Fluoreszenz) ist gegen die Anzahl der durchlaufenen Zyklen (C_T) aufgetragen. Der *threshold* (—) bestimmt den Zyklus bei dem es zur Akkumulation des PCR-Produktes kommt.
- B) Standardkurve für ein ein Zielgen (—). Von einer Plasmidstandard-Konzentrationsreihe wurden die C_T -Werte ermittelt und gegen den logarithmischen Konzentrationswert (Log) aufgetragen.

In der *Real Time* PCR wurden sowohl die Molekülwerte für das Standardgen (GAPDH) als auch für das Zielgen (hier PEPCK) mit Hilfe verschiedener Verdünnungen des DNA-Standards bestimmt (Kapitel 2.5.7.8.). Über die Verdünnungsreihe konnte eine Regressionsgerade aufgestellt werden, in dem der CT-Wert gegen den dekadischen Logarithmus der eingesetzten Molekülzahl aufgetragen wird. Über die Gleichung der Regressionsgeraden kann der CT-Wert in die Molekülzahl umgerechnet werden.

Tabelle 7: Beispielauswertung einer *Real time* PCR nach der Molekülwertmethode

	Tier-Nr.	GAPDH	PEPCK	PEPCK/GAPDH	MW	STABWN	FEHLER	T-TEST
K	125	24000	19334	0,81	1,23	0,52	0,16	0.00004
	126	48600	63623	1,31				
	127	28700	58655	2,04				
	128	53100	17494	0,33				
	129	12900	15779	1,22				
	130	13800	25066	1,82				
	142	48400	79187	1,64				
	146	94900	52966	0,56				
	145	5210	7602	1,46				
	149	56500	60647	1,07				
Adiponektin	139	61800	39965	0,65	0,41	0,24	0,06	
	141	39100	43660	1,12				
	144	34900	25914	0,74				
	176	77600	22334	0,29				
	181	73200	20844	0,28				
	182	119000	25411	0,21				
	185	58300	16452	0,28				
	188	250000	108174	0,43				
	189	87500	21720	0,25				
	207	90700	24209	0,27				
	210	90500	24936	0,28				
	211	120000	37462	0,31				
	212	207000	79040	0,38				
	216	177000	46350	0,26				
	220	229000	107254	0,47				

7.8 AMPK-Phosphorylierung in RK13-Zellen

Zum Test der Wirksamkeit wurde rekombinantes humanes Adiponektin in den Konzentrationen 1 und 10 $\mu\text{g/ml}$ für 15 min an der Kaninchen-Nierenzelllinie RK13 eingesetzt. Zudem wurde als Kontrolle für die Phosphorylierung den Zellen Metformin (10 mM) hinzugegeben. Metformin ist ein bekannter Aktivator der AMPK. Anschließend wurde die Proteinisolierung durchgeführt und die Phosphorylierung der AMPK im *Western Blot* untersucht (siehe Abb. 40). Der Kontrolle wurde nur Medium zugegeben. Die Stimulation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Adiponektin resultierte in einer signifikanten Erhöhung der pAMPK-Menge. Mit der Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ Adiponektin wurden 6 Tage *p.c.* alte Kaninchenembryonen auf die Aktivierung der AMPK untersucht.

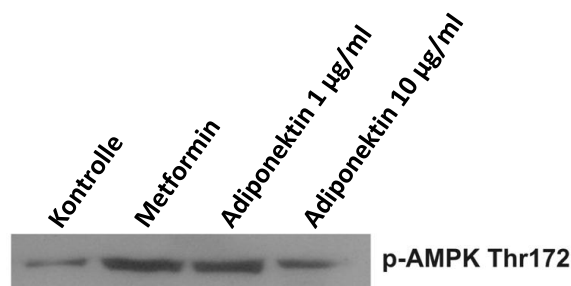


Abb. 40: AMPK-Phosphorylierung von RK13-Zellen

Western Blot der Phosphorylierung der AMPK in kultivierten RK13-Zellen nach Behandlung mit Metformin (10 mM), 1 und 10 $\mu\text{g/ml}$ Adiponektin (ACRP30) für 15 min. Als Kontrolle dienten RK13-Zellen, denen eine äquivalente Menge Kulturmedium zugeben wurde und als Positivkontrolle diente die Behandlung der RK13-Zellen mit Metformin. Das Experiment wurde in zwei unabhängigen Versuchen durchgeführt (N = 2).

Kultivierung der RK13-Zelllinie

Neben Kaninchenembryonen wurden die Zelllinie RK13 zur Versuchsstandardisierung und für Vorversuche analysiert. Bei der Zelllinie RK13 handelt es sich um eine Nierenzelllinie des Kaninchens, die aus einem 5 Wochen alten Kaninchen gewonnen wurde. Die Zelllinie wurde bei einer Temperatur von 37°C, 20% O₂ und 5% CO₂ in dem unten genannten Medium kultiviert.

Für die Stimulation mit Adiponektin wurden ca. 70%-80% konfluente Zellen genutzt. Nach Inkubation der Zellen in verschiedenen Zeitintervallen wurden die Zellen zweimal mit PBS-Puffer gespült. Zur RNA-Isolierung wurden sie in 800 μl LyseD-Puffer vom Kulturgefäß abgelöst und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Für die Proteinisolierung wurden die Zellen in 800 μl RIPA-Puffer aufgenommen.

Kulturmedium für RK 13-Zellen

MEM (Minimal <i>Eagle</i> Medium)	500 ml
FKS	50 ml
Glutamin	6 ml
Penicillin/Streptomycin	6 ml

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Fischer
Akademischer Grad: Dipl. Biol.
Vorname: Sünje
Geburtsdatum: 22. April 1981
Geburtsort: Heide (Dithmarschen)
Geschlecht: weiblich
Adresse: Brandenburgerstraße 4
06114 Halle an der Saale
Nationalität: Deutsch

Akademischer Werdegang

Seit 02/2007 **Promotion** am Institut für Anatomie und Zellbiologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer

01/2006 – 09/2006 **Diplomarbeit** am Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz in der Arbeitsgruppe „Molekulare Neurodegeneration“ von Prof. Dr. Claus U. Pietrzik – *Diplomarbeit 1,8*; Titel: Die Funktion des Sorting Nexin 17 auf die Prozessierung von APP und LRP

04/2003 – 12/2005 **Hauptstudium** mit Spezialisierung auf Zoologie (Hauptfach), Mikrobiologie (Hauptfach) und Physiologische Chemie – *Diplomprüfung: 1,6*

04/2001 – 03/2003 **Grundstudium** der Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz – *Vordiplom: 2,4*

08/1991 – 06/2000 Nordsee-Gymnasium-Büsum (heute: Schule am Meer) in Büsum – *Abitur 2,7*

Wissenschaftliche Besuche

05/2009 – 07/2009 Discipline of Obstetrics and Gynaecology, Research Centre for Early Origin of Health and Disease, Robinson Institute, University of Adelaide, Adelaide, Australia
Prof. Julie A. Owens
Erlernung verschiedener miRNA-Arrays im Rahmen des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD)

Begleitende Nebentätigkeiten

2005 – 2006 Wissenschaftliche Hilfskraft im Praktikum „Biochemie für Studierende der Medizin“ an der Medizinischen Fakultät der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

2005 – 2006 Tutor im Seminar „Biochemie für Studierende der Medizin“ an der Medizinischen Fakultät der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

10/2008 – 03/2009 Wissenschaftliche Hilfskraft im Praktikum „Anatomie und Mikroskopische Anatomie“ für Studierende der Ernährungs- und Naturwissenschaften und der Medizinischen Physik

04/2013 – 07/2013 Wissenschaftliche Hilfskraft im Praktikum „Mikroskopische Anatomie“ für Studierende der Medizin

Besondere Kenntnisse

Fortbildungen Sachkundenachweis nach §4 des Tierschutzgesetzes

Intensivkurs „Grundlagen der Säuger-Zell- und Gewebekultur und aktuelle Aspekte der Stammzellforschung“

Halle an der Saale, den

Sünje Fischer

9. Publikationsverzeichnis

Zeitschriftenartikel

1. Schmidt T, **Fischer S**, Tsikolia N, Navarrete Santos A, Rohrbach S, Ramin N, Thieme R and Fischer B (2008) Expression of adipokines in preimplantation rabbit and mice embryos. *Histochem Cell Biol.* 2008 Jun;129(6):817-25. Epub 2008 Mar 11
2. Ramin N and Thieme R, Schindler M, **Fischer S**, Schmidt T, Fischer B and Navarrete Santos A (2010) Maternal diabetes impairs gastrulation and insulin and IGF-I receptor expression in rabbit blastocysts. *Endocrinology.* 2010 Sep;151(9):4158-67. Epub 2010 Jul 14
3. **Fischer S**, Navarrete Santos A, Thieme R, Ramin N and Fischer B (2010) Adiponectin stimulates glucose uptake in rabbit blastocysts. *Biol Reprod.* 2010 Nov;83(5):859-65. Epub 2010 Aug 4
4. Thieme R and Ramin N, **Fischer S**, Püschel B, Fischer B and Navarrete Santos A (2011) Gastrulation in rabbit blastocysts depends on insulin and insulin-like-growth-factor 1. *Mol Cell Endocrinol.* 2012 Jan 2;348(1):112-9. Epub 2011 Jul 30.
5. Königsdorf CMA, Navarrete Santos A, **Fischer S**, Schmidt JS and Fischer B (2012) Expression profile of fatty acid metabolism genes in preimplantation blastocysts of obese and non-obese mice. *Obes Facts.* 2012;5(4):575-86. Epub 2012 Sep 5.
6. Thieme R and Schindler M, Mühleck B, **Fischer S**, Fischer B and Navarrete Santos A (2012) Insulin growth factor adjustment in preimplantation rabbit blastocysts and uterine tissues in response to maternal type 1 diabetes. *Mol Cell Endocrinol.* 2012 Jul 6;358(1):96-103. Epub 2012 Mar 20.
7. Schindler M and **Fischer S**, Thieme R, Fischer B and Navarrete Santos A (2013) Cyclic AMP responsive element binding protein- a vital link in embryonic hormonal adaptation. *Endocrinology.* 2013; Epub ahead of print

Abstracts für Poster und Kurzvorträge

2007

Fischer S, Schmidt T, Ramin N, Navarrete Santos A, Thieme R, Fischer B (2007) Expression of adiponectin and its receptors in rabbit blastocysts. (24th Workshop of the Anatomical Society, September 26 – 28 2008, Würzburg, Germany, DOI 10.3337 /anatges.2007.0004

2008

Fischer S, Navarrete Santos A, Ramin N, Thieme R, Fischer B (2008) Expression of adipokines in pre- and periimplantation rabbit embryos. The Society for Reproduction and Fertility CONFERENCE AND EXHIBITION 2008, June 29th –July 1st 2008, Edinburgh, Scotland

Navarrete Santos A, Ramin N, Thieme R, **Fischer S**, Fischer B (2008) Hyperglycaemia affects expression of metabolically and developmentally relevant genes in the rabbit blastocyst 25th Workshop of the Anatomical Society, September 24th – 26th 2008, Würzburg, Germany

Thieme R, Ramin N, **Fischer S**, Fischer B and Navarrete Santos A (2008) Insulin and IGF1 promote mesodermal differentiation in rabbit blastocysts. First General Conference of Maternal Interaction With Gametes and Embryo - GEMINI - COST Action FA0702, October 9 – 11 2008, Volos, Greece

Fischer S, Thieme R, Ramin N, Navarrete Santos A and Fischer B (2008) Adiponectin signalling in the pre- and periimplantation rabbit blastocysts. First General Conference of Maternal Interaction With Gametes and Embryo - GEMINI - COST Action FA0702, October 9 – 11 2008, Volos, Greece

Navarrete Santos A, Ramin N, Thieme R, **Fischer S** and Fischer B (2008) Insulin like growth factors adjust selective effects on the embryoblast and the trophoblast during blastocyst development. First General Conference of Maternal Interaction With Gametes and Embryo - GEMINI - COST Action FA0702, October 9th – 11th 2008, Volos, Greece

2009

Fischer S, Thieme R, Ramin N, Navarrete Santos A and Fischer B (2009) Adiponectin signalling in the preimplantation rabbit blastocyst. 42. Jahrestagung über Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, gleichzeitig 34. Veterinär-humanmedizinische Gemeinschaftstagung, February 26th – 27th 2009, Leipzig, Germany

Thieme R, Ramin N, **Fischer S**, Fischer B and Navarrete Santos A (2009) Decreased number of blastocysts and altered embryonic gene expression in alloxan induced diabetic rabbits. 42. Jahrestagung über Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, gleichzeitig 34. Veterinär-humanmedizinische Gemeinschaftstagung, February 26th - 27th 2009, Leipzig, Germany

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

Navarrete Santos A, Ramin N, Thieme R, **Fischer S** and Fischer B (2009) Metabolic genes are dysregulated in blastocysts grown in diabetic rabbits. 104th Annual Meeting of the Anatomical Society, March 27th – 30th 2009, Antwerpe, Belgium - [Lectureabstracts - Joint Meeting 2009 Anatomische Gesellschaft - Nederlandse Anatomen Vereniging - 104th Annual Meeting Antwerpen 2009 - DOI 10.3337/anatges.2009.0008](#)

Navarrete Santos A, Ramin N, Thieme R, **Fischer S** and Fischer B (2009) Metabolic genes are dysregulated in blastocysts grown in diabetic rabbits. 104th Annual Meeting of the Anatomical Society, March 27th – 30th 2009, Antwerpe, Belgium - [Posterabstracts - Joint Meeting 2009 Anatomische Gesellschaft - Nederlandse Anatomen Vereniging - 104th Annual Meeting Antwerpen 2009 - DOI 10.3337/anatges.2009.0009](#)

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

Schindler M, Thieme R, Ramin N, **Fischer S**, Fischer B and Navarrete Santos A (2009) Influence of maternal diabetes on the uterus and the embryo during the preimplantation period. XXIII Bilateral Symposium Halle-Posznan, May 15th – 17th 2009, Posznan, Poland

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

Fischer S, Thieme R, Navarrete Santos A and Fischer B (2009) Adiponectin influence the glucose metabolism of the preimplantation embryo of the rabbit. Second General Conference of Maternal Interaction with Gametes and Embryo - GEMINI - COST Action FA0702, October 1st – 3rd 2009, Alghero, Italy

Navarrete Santos A, Thieme R, Ramin N, **Fischer S**, Schindler M and Fischer B (2009) What can we learn about embryo-maternal interactions from diabetic animal models? Second General Conference of Maternal Interaction with Gametes and Embryo - GEMINI - COST Action FA0702, October 1st – 3rd 2009, Alghero, Italy

Thieme R, Schindler M, Ramin N, **Fischer S**, Hirche F, Fischer B and Navarrete Santos A (2009) Effects of diabetes type 1 on the preimplantation uterine milieu in rabbits. Second General Conference of Maternal Interaction with Gametes and Embryo - GEMINI - COST Action FA0702, October 1st – 3rd 2009, Alghero, Italy

2010

Thieme R, Schindler M, Ramin N, **Fischer S**, Hirche F, Fischer B, Navarrete Santos A (2010) An in vivo diabetes type 1 rabbit model to study embryonic dysfunction under hyperglycaemia. 43. Jahrestagung Physiologie u. Pathologie der Fortpflanzung, gleichzeitig 35. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, 24th – 26th February 2010, Munich, Germany (Reproduction in Domestic Animals: Volume 45 Issue s1 p53; DOI: 10.1111/j.1439-0531.2009.01589.x)

Navarrete Santos A, Thieme R, Ramin N, **Fischer S**, Schindler M, Fischer B (2010) Metabolic adaptation of rabbit blastocyst to short time hyperglycaemia in vitro. 43. Jahrestagung Physiologie u. Pathologie der Fortpflanzung, gleichzeitig 35. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, 24th – 26th February 2010, Munich, Germany (Reproduction in Domestic Animals: Volume 45 Issue s1 p36; DOI: 10.1111/j.1439-0531.2009.01589.x)

Schindler M, Thieme R, **Fischer S**, Hirche F, Fischer B, Navarrete Santos A (2010) Changes in the preimplantation uterine milieu induced by a maternal diabetes type 1 in the rabbit. 43. Jahrestagung Physiologie u. Pathologie der Fortpflanzung, gleichzeitig 35. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, 24th – 26th February 2010, Munich, Germany (Reproduction in Domestic Animals: Volume 45 Issue s1 p46; DOI: 10.1111/j.1439-0531.2009.01589.x)

Schindler M, Thieme R, **Fischer S**, Hirche F, Fischer B, Navarrete Santos A (2010) Influence of maternal diabetes type 1 on the uterus during the preimplantation period in the rabbit. 53. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, 3rd – 6th March 2010, Leipzig, Germany

Navarrete Santos A, Thieme R, Ramin N, **Fischer S**, Schindler M, Fischer B (2010) Maternal diabetes influences the IGF system in the preimplantation rabbit blastocyst. 105th Annual Meeting of the Anatomical Society, 26th – 29th March 2010, Hamburg, Germany

Thieme R, Schindler M, Ramin N, **Fischer S**, Fischer B, Navarrete Santos A (2010) Adaption of rabbit preimplantation blastocysts to maternal type 1 diabetes. The Power of Programming, 6th – 8th May 2010, Munich, Germany

Thieme R, Schindler M, **Fischer S**, Fischer B, Navarrete Santos A (2010) Mesoderm differentiation is delayed due to type 1 diabetes and induced by insulin in preimplantation rabbit blastocysts. Third General Conference of Maternal Interaction with Gametes and Embryo - GEMINI - COST Action FA0702, October 1st – 2nd 2010, Soustons, France

Navarrete Santos A, Thieme R, Schindler M, Rolland A, **Fischer S**, Chavatte-Palmer P, Fischer B (2010) Insulin growth factor adjustment in preimplantation rabbit blastocysts and uterine tissues in response to maternal diabetes. Third General Conference of Maternal Interaction With Gametes and Embryo - GEMINI - COST Action FA0702, October 1st – 2nd 2010, Soustons, France

Thieme R, Schindler M, **Fischer S**, Fischer B and Navarrete Santos A (2010) Insulinabhängige Induktion der Gastrulation in 6 Tage alten Kaninchenblastozysten. 10. Treffen des Arbeitskreises Molekularbiologie der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin (DGGEF), November 5th – 6th 2010, Düsseldorf, Germany

2011

Schindler M and **Fischer S**, Thieme R, Fischer B and Navarrete Santos A (2011) Insulin and IGF1 dependent adiponectin expression is mediated by CREB in rabbit blastocysts. 54. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE), March 30th – April 2nd 2011, Hamburg, Germany

Fischer S, Schindler M, Thieme R, Navarrete Santos A, Fischer B (2011) Maternal Diabetes Type I influences the adiponectin system in the rabbit preimplantation embryo. 6th International Conference on the Female Reproductive Tract, May 20th – 23rd 2011, Frauenchiemsee, Germany

Schindler M, **Fischer S**, Thieme R, Fischer B, Navarrete Santos A (2011) CREB expression and activation is regulated by insulin and IGF1 in rabbit blastocysts. 6th International Conference on the Female Reproductive Tract, May 20th – 23rd 2011, Frauenchiemsee, Germany

Schindler M, **Fischer S**, Thieme R, Fischer B, Navarrete Santos A (2011) CREB-mediated embryo-maternal crosstalk in rabbit blastocysts. Batsheva de Rothschild Seminar on Periconceptional developmental Programming - GEMINI - COST Action FA0702, May 31st – June 3rd 2011, Jerusalem, Israel

Thieme R, **Fischer S**, Schindler M, Fischer B and Navarrete Santos A (2011) Disturbed glucose supply, transport and intracellular metabolism in preimplantation embryos of diabetic rabbits. The Society for Reproduction and Fertility CONFERENCE 2011, July 11th – 13th 2011, Brighton, England <http://www.srf-reproduction.org/meetings/conf2011/srf2011draftprogramme.pdf>

Schindler M and **Fischer S**, Thieme R, Fischer B and Navarrete Santos A (2011) Diabetic pregnancy complication: Altered embryonic CREB signalling in blastocysts from diabetic

rabbits. Prevention and Intervention: from Molecular Biology to Clinical Perspectives, September 16th – 18th 2011, Halle (Saale), Germany

Thieme R, **Fischer S**, Schindler M, Püschel B, Fischer B and Navarrete Santos A (2011) Insulin Accelerates Mesoderm Induction Via Wnt Signalling in Preimplantation Rabbit Blastocysts. 7th World Congress on Developmental Origins of Health and Disease 2011, September 18th – 21st 2011, Portland, Oregon, USA

Schindler M, **Fischer S**, Navarrete Santos A, Thieme R, Fischer B and Navarrete Santos A (2011) Adipogenesis is elevated by an increased adiponectin level. 4th general meeting of the COST Action (FA0702) "Maternal Interactions with Gametes and Embryos", 29th September – 2nd October 2011, Gijon, Spain

2012

Gürke J, Thieme R, Schindler M, **Fischer S**, Hirche F, Fischer B, Navarrete Santos A (2012) Altered amino acid metabolism in preimplantation embryos from diabetic rabbits. 45. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung gleichzeitig 37. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung und 1. Deutsch-Polnische Gemeinschaftstagung, 29th February – 2nd March 2012, Berlin, Germany

Schindler M, Seyring S, **Fischer S**, Navarrete Santos A (2012) Altered triglyceride accumulation in blastocysts from diabetic rabbits (2012) 45. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung gleichzeitig 37. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung und 1. Deutsch-Polnische Gemeinschaftstagung, 29th February – 2nd March 2012, Berlin, Germany

Schindler M, **Fischer S**, Navarrete Santos A, Thieme R, Fischer B and Navarrete Santos A (2012) Adiponectin stimulates adipogenic differentiation in embryonic stem cells. 49. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V. 14th-16th March 2012. Freising-Weihenstephan, Germany.

Schindler M and **Fischer S**, Thieme R, Fischer B and Navarrete Santos A, Thieme R, Fischer B, Navarrete Santos A (2012) CREB-mediated embryo-maternal crosstalk in rabbit blastocysts. COST Action TD1101 RGB-Net- A Collaborative European Network on Rabbit Genome Biology: First RGB-Net meeting 28th-30th March 2012. Bologna, Italy.

Gürke J, Thieme R, Schindler M, **Fischer S**, Hirche F, Fischer B, Navarrete Santos A (2012) Ein maternaler Diabetes mellitus in der Präimplantationsphase beeinflusst den Aminosäurestoffwechsel des Embryos. 47. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) 16th-19th May 2012. Stuttgart, Germany. DOI: 10.1055/s-0032-1314532

Schindler M and **Fischer S**, Gürke J, Thieme R, Fischer B, Navarrete Santos A (2012) CREB-vermittelte Adiponektinexpression unter diabetischen Entwicklungsbedingungen in Kaninchenblastozysten. 47. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) 16th-19th May 2012. Stuttgart, Germany. DOI: 10.1055/s-0032-1314653

Thieme R, Schindler M, Ramin N, **Fischer S**, Muhleck B, Fischer B, Navarrete Santos A (2012) Insulin growth factor adjustment in preimplantation rabbit blastocysts and uterine tissues in response to maternal type 1 diabetes. Joint International Congress of the American-Society-for-Reproductive-Immunology (ASRI) and the European-Society-for-Reproductive-Immunology (ESRI) 30th May – 2nd June 2012. Hamburg, Germany. DOI: 10.1016/j.jri.2012.03.248

2013

Schindler M, **Fischer S**, Thieme R, Gürke J, Hauke E, Knelangen JM, Fischer B and Navarrete Santos A (2013) The diabetic rabbit as a model of human metabolic diseases. COST Action TD1101 RGB-Net- A Collaborative European Network on Rabbit Genome Biology: WG3-meeting: "Rabbit ES and iPS cells as basic biology model and rabbit models of diseases" 26-27 March 2013. Gödöllő, Ungary.

10. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe und die Arbeit weder in gleicher noch ähnlicher Form einer anderen Prüfungskommission zur Begutachtung vorgelegt habe. Diese Arbeit habe ich selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Des Weiteren erkläre ich, dass gegen meine Person keine Vorstrafen bestehen und keine Ermittlungsverfahren anhängig sind.

Halle an der Saale, den

Sünje Fischer

11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Ich bedanke mich bei **Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer** für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Institut für Anatomie und Zellbiologie anzufertigen. Durch Motivation und Kritik an richtiger Stelle hat er Selbstvertrauen vermittelt und mich zu selbstständiger Arbeit angeregt. Seine immerwährende Diskussionsfreude war ein steter Quell neuer Ideen und Denkansätze. Für die stetige Unterstützung und für die Hilfestellung bei der Realisierung von Teilnahmen an Kongressen und einem Aufenthalt im Ausland danke ich ganz besonders.

Herrn Prof. Dr. Gerald Moritz danke ich für die Möglichkeit, dass ich meine Doktorarbeit außerhalb des biologischen Fachbereichs anfertigen konnte. Sein stetiges Interesse an meiner Arbeit, seine Diskussionsfreude und der Blickwinkel eines „Außenstehenden“ trugen zur Verbesserung meiner Arbeit bei.

Mein besonderer Dank gilt **Frau Dr. Anne Navarrete Santos**, der guten Seele der Arbeitsgruppe. Sie begleitete mich beständig durch diese Arbeit und hatte immer ein offenes Ohr, sowohl für fachliche als auch private Freuden und Sorgen. Ihre ruhige, besonnene und kritische Analyse von gewonnenen Ergebnissen hat mich gelehrt Dinge zu hinterfragen, alles aus mehreren Perspektiven zu betrachten und nichts als gegeben zu akzeptieren.

Weiterhin möchte ich mich für eine angenehme und freundschaftlich kollegiale Arbeitsatmosphäre sowie viele hilfreiche Tipps, das stete Interesse an meiner Arbeit und angeregte Diskussionen bei **Maria Schindler, René Thieme, Julia Knelangen, Jacqueline Gürke, Ronald Biemann, Kristina Schädlich** und **Juliane-Susanne Schmidt** bedanken.

Ein besonderer Dank gilt dabei den guten Seelen des Labors **Sabine Schrötter, Michaela Kirstein** und **Franziska Knöfel** für viele praktische Tipps und Tricks, die stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei Laborarbeiten sowie viele heitere Stunden im Labor.

Danken möchte ich auch **meiner Familie** und **Freunden**, die mich während meines Studiums begleitet, unterstützt und immer wieder aufgemuntert haben. Ganz besonders gilt dieser Dank meinem **Mann Sven**, der so manche meiner Verzweiflungen, Launen und Höhenflüge ertragen musste und natürlich meinen „Kleinen“, **Joana, Nele und Tarje**, die mit einem Lächeln mir wieder Kraft und Motivation geschenkt haben, wenn mal nicht alles glatt lief!

Die vorliegende Arbeit wurde durch das **Roux-Programm der Medizinischen Fakultät** und durch den **DAAD** finanziell unterstützt.