

**Der Einfluss eines maternalen Diabetes mellitus Typ 1 auf
das AGE/RAGE-System während der Präimplantation am
Modell des Kaninchens**

Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Ernährungswissenschaften (Dr. troph.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät III
Agrar- und Ernährungswissenschaften,
Geowissenschaften und Informatik

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Diplom-Ernährungswissenschaftlerin Elisa Haucke
geboren am 07.07.1986 in Saalfeld (Saale)

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer
Prof. Dr. Gabriele Stangl
Prof. Dr. Gerald Münch

Datum der Verteidigung: 04. Mai 2015

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1. Zielstellung der Arbeit	1
1.2. Auswirkungen eines Diabetes mellitus auf die Schwangerschaft.....	2
1.3. <i>Advanced glycation endproducts</i> (AGEs)	3
1.3.1. AGE-Metabolismus	4
1.3.2. Charakterisierung der AGEs CML, Pentosidin und Argpyrimidin	6
1.3.3. Rezeptorunabhängige und rezeptorabhängige Wirkung von AGEs	8
1.3.4. <i>Receptor for advanced glycation endproducts</i> (RAGE)	9
1.3.5. AGE-induzierte ROS-Produktion.....	10
1.3.6. Einfluss von AGEs auf die Entstehung diabetischer Folgeerkrankungen	11
1.4. AGEs und RAGE während der Embryonalentwicklung	12
1.5. Das Versuchstiermodell des Kaninchens	13
1.5.1. Präimplantationsentwicklung des Kaninchens	13
1.5.2. Experimentell induzierter Diabetes mellitus Typ 1 durch Alloxan beim Kaninchen	17
2. Material und Methoden	18
2.1. Chemikalien, Enzyme und vorgefertigte Systeme	18
2.2. Geräte- und Softwareverzeichnis	20
2.3. Versuchsaufbau und Induktion eines Diabetes mellitus Typ 1	22
2.4. Gewinnung des Probenmaterials.....	23
2.4.1. Mikrosektion von Präimplantationsembryonen	23
2.4.2. Gewinnung der Blastozystenhöhlenflüssigkeit	24
2.4.3. Gewinnung der Plasmaproben	24
2.4.4. Entnahme von Uterus und Ovar.....	24
2.5. <i>In vitro</i> -Kultur von Kaninchenblastozysten	25
2.5.1. AGE-Akkumulation <i>in vitro</i>	25
2.5.2. DCFH-DA (2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat)-Färbung.....	25
2.6. Zellkultur	26

2.6.1. Kultivierung und Passagieren von RK 13-Zellen	26
2.6.2. Versuchsansätze zur Induktion von oxidativen Stress bei RK 13-Zellen	27
2.7. Proteinbiochemie	27
2.7.1. Proteinisolation	27
2.7.2. Proteinkonzentrationsbestimmung	28
2.7.2.1. Bradford-Reaktion	28
2.7.2.2. Bicinchinonsäure-Reaktion	28
2.7.3. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
2.7.4. Western Blot	29
2.7.5. Slot Blot	29
2.7.6. Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern	30
2.7.7. Quantifizierung	31
2.8. Immunhistochemie	31
2.8.1. Immunhistochemie an Gewebeschnitten	31
2.8.2. Immunhistochemie an separierten Keimscheiben	32
2.9. Bestimmung AGE-spezifischer Fluoreszenzen	33
2.10. Bestimmung freier AGEs in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit mittels HPLC/MS	33
2.11. Bestimmung von Methylglyoxal und Glyoxal mittels HPLC	33
2.12. Messung der proteasomalen Aktivität	34
2.13. RNA-Analytik	35
2.13.1. RNA-Isolierung und cDNA-Synthese am Gewebe	35
2.13.2. mRNA-direkt-Isolation und cDNA-Synthese bei Embryonen	36
2.13.3. DNase-Verdau	37
2.13.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
2.13.5. Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)	38
2.13.6. Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA und RNA	39
2.13.7. Klonierung von PCR-Fragmente	40
2.13.7.1. Ligation	40
2.13.7.2. Transformation	40

2.13.7.3. Selektion und Isolation von Plasmiden aus <i>Escherichia coli</i>	41
2.13.7.4. Restriktionsverdau von Plasmiden	41
2.13.7.5. Sequenzierung	41
2.13.7.6. Herstellung des Plasmidstandards	42
2.14. Statistische Analysen	42
3. Ergebnisse	44
3.1. Glyoxal und Methylglyoxal im Blutplasma diabetischer Kaninchen	44
3.2. Argpyrimidin, CML und Pentosidin im Blutplasma diabetischer Kaninchen.....	45
3.3. AGE-Modifikationen im Uterus der Kaninchen	46
3.4. AGE-Modifikationen im Ovar der Kaninchen	49
3.5. AGEs und AGE-Bildner in 6 Tage alten Kaninchenblastozysten	52
3.5.1 Immunhistochemischer Nachweis von AGEs in embryonalen Zellen	52
3.5.2. Detektion proteingebundener AGEs in Embryonen diabetischer Kaninchen	54
3.5.3. Detektion von Glyoxal und Methylglyoxal in Embryonen diabetischer Kaninchen	54
3.5.4. Nachweis fluoreszierender AGEs in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit	55
3.5.5. Bestimmung der Proteinkonzentration in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit	56
3.5.6. AGE-Fluoreszenz in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit von Embryonen diabetischer und gesunder Kaninchen.....	57
3.5.7. Nachweis und Detektion freier AGEs und oxidierter Metabolite in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit	58
3.5.8 Nachweis und Detektion von ROS in Blastozysten diabetischer und gesunder Kaninchen .	60
5.6. Aktivität der 20 S-Proteasomen in Blastozysten diabetischer und gesunder Kaninchen.....	61
3.7. <i>In vitro</i> -Kultur von 6 Tage alten Kaninchenblastozysten	62
3.7.1. AGE-Bildung in Blastozysten unter den Bedingungen der <i>in vitro</i> -Kultur	62
3.7.2. ROS-Bildung in Embryonen unter den Bedingungen der <i>in vitro</i> -Kultur	63
3.8. Vorkommen von RAGE in Kaninchenblastozysten.....	64
3.9. <i>AGER</i> -Expression in Blastozysten diabetischer und gesunder Kaninchen	66
4. Diskussion	67
4.1. Diabetes mellitus und AGE-Akkumulation im Plasma des Kaninchens	67
4.1.2. AGE-Akkumulation als ein Resultat der Hyperglykämie	67

4.1.2. Angriffspunkt Aminosäuren.....	68
4.1.3. Glyoxal und Methylglyoxal im Plasma der diabetischen Kaninchen	68
4.2. AGEs im Reproduktionstrakt – eine Bedeutung für die Fertilität?	70
4.2.2 AGE-Akkumulation im Endometrium diabetischer Kaninchen	71
4.2.1. AGE-Modifikationen im Kaninchenovar	73
4.3. Physiologische Rolle von AGEs in Präimplantationsembryonen	75
4.3.1. Einfluss eines maternalen Diabetes mellitus auf den AGE-Gehalt im Präimplantationsembryo	76
4.3.2 Einfluss eines maternalen Diabetes mellitus auf den oxidativen Status im Präimplantationsembryo	78
4.3.3. Die Blastozystenhöhlenflüssigkeit – ein Reservoir für AGEs?.....	78
4.4. AGEs – ein Pathomechanismus in der diabetischen Frühschwangerschaft?	79
4.4. AGE-Signaltransduktion im Präimplantationsembryo	82
5. Zusammenfassung	84
6. Literaturverzeichnis	87
7. Anhang.....	I
7.1. Abbildungsverzeichnis	I
7.2. Tabellenverzeichnis	II
7.3. Abkürzungsverzeichnis	III
7.4. Grenzwerte zur Diagnose von Gestationsdiabetes durch den oGTT	VII
7.5. Induktion von oxidativem Stress in RK 13-Zellen.....	VIII
7.6. Standard der Methylglyoxal- und Glyoxalbestimmung	IX
Lebenslauf.....	X
Publikationsverzeichnis	XI
Eidesstattliche Erklärung / <i>Declaration under Oath</i>.....	XIII
Danksagung.....	XIV

1. Einleitung

1.1. Zielstellung der Arbeit

Weltweit sind derzeit ca. 360 Millionen Menschen an Diabetes mellitus erkrankt (Stand 2014, Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2014). In Deutschland ist schätzungsweise jeder 13. Bundesbürger Diabetiker. Durch die rasant ansteigende Zahl an Erkrankten nimmt auch die Zahl der diabetischen Schwangerschaften zu. Inzwischen gehen etwa 0,8 % der Schwangerschaften mit einem Typ 1 oder Typ 2 Diabetes mellitus und ca. 5 % mit einem Gestationsdiabetes einher. In der weltweit angelegten Studie HAPO (*hyperglycemia adverse pregnancy outcome*) mit nahezu 25.000 Schwangeren wird ein deutlicher Einfluss einer mütterlichen Hyperglykämie auf das Neugeborene sichtbar. Mit steigenden Blutglukosewerten der Mutter erhöht sich das Risiko der Neugeborenen, makrosomal zu sein und an neonataler Hyperglykämie und Hyperinsulinämie zu leiden. Zudem nimmt die Anzahl der Frühgeburten und Geburtskomplikationen zu (HAPO Study Cooperative Research Group, 2002).

Eine erhöhte Blutglukose hat einen Anstieg der Glykierungsreaktionen mit der Bildung von *advanced glycation endproducts* (AGEs) im Blut und in Geweben zur Folge. Die nicht-enzymatisch ablaufenden Modifizierungen von Makromolekülen sind für die Entwicklung einer Vielzahl diabetesbedingter Komplikationen verantwortlich (siehe Kapitel 1.3.6). Es ist anzunehmen, dass AGEs mit Schwangerschaftskomplikationen assoziiert sind (siehe Kapitel 1.4.).

Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, im Rahmen der Grundlagenforschung die Auswirkungen einer maternalen Hyperglykämie auf den AGE-Gehalt in Embryonen sowie im Reproduktionstrakt der Mutter zu charakterisieren. Die Untersuchungen wurden am Tiermodell des Kaninchens vor der Implantation der Embryonen durchgeführt. Die Präimplantationsphase ist eine kritische Phase in der Schwangerschaft, da sich der Embryo nur über das uterine Milieu versorgen kann, und damit entscheidend von äußeren Faktoren abhängig ist (Watkins *et al.*, 2008; Watkins und Fleming, 2009).

Mittels Immunhistochemie, Slot Blot-Analysen, Fluoreszenzmessung und dem Goldstandard der AGE-Bestimmung – Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (HPLC/MS) – wurden AGEs im Uterus und im Ovar der Muttertiere sowie in deren 6 Tage alten Blastozysten bestimmt.

Da sich die Glykierungsreaktion und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) gegenseitig bedingen, wurde die ROS-Belastung des Embryos in einer diabetischen Schwangerschaft

untersucht. Mittels der *in vitro*-Kultur wurde eine AGE-Akkumulierung in 6 Tage alten Blastozysten nachgestellt und die Induzierbarkeit von oxidativem Stress untersucht. Der Rezeptor der AGE-vermittelten Stressantwort RAGE wurde ebenfalls in den Kaninchenembryonen nachgewiesen und seine Expression in 6 Tage alten Blastozysten diabetischer Muttertiere bestimmt.

1.2. Auswirkungen eines Diabetes mellitus auf die Schwangerschaft

Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselerkrankung, die auf einem absoluten oder relativen Insulinmangel beruht und durch einen chronisch erhöhten Blutzuckerspiegel gekennzeichnet ist. Es werden einzelne Formen unterschieden, die wie folgt charakterisiert werden können:

- **Diabetes mellitus Typ 1:** Zerstörung der pankreatischen β -Zellen, meist durch eine Autoimmunreaktion und erbliche Komponenten bedingt,
- **Diabetes mellitus Typ 2:** Verminderung der Insulinsensitivität und Einschränkung der β -Zellfunktion,
- **Gestationsdiabetes:** Störung der Blutzuckerhomöostase in der Schwangerschaft.

Noch zu Beginn des 20. Jahrhunderts war es Diabetikerinnen kaum möglich, Kinder zu gebären. Dank der Insulintherapie ist dies heutzutage möglich, wobei eine enge Blutzuckerkontrolle unabdingbar ist, um den Verlauf der Schwangerschaft und das Kind nicht zu gefährden. Der Grad der maternalen Hyperglykämie ist entscheidend für das Fehlbildungsrisiko beim Kind. Ab einem Wert von 120 mg/dl wird von einer erhöhten Fehlbildungswahrscheinlichkeit von 2,1 % ausgegangen. Bei Werten zwischen 121–260 mg/dl steigt das Risiko auf 5,2 % und bei Blutzuckerwerten > 260 mg/dl liegt das Fehlbildungsrisiko bei 30 % (Rosenn *et al.*, 1994; Schaefer *et al.*, 1997). Der Mangel an Insulin führt zu Entwicklungsstörungen (Thieme *et al.*, 2012). In der Tab. 1 sind die Auswirkungen eines maternalen Diabetes mellitus auf die Schwangerschaft zusammengefasst.

Tab. 1: Mögliche Komplikationen einer diabetischen Schwangerschaft.

(modifiziert nach: Ahmed, 2011)

	Komplikationen
Fötus	Frühe Wachstumsverzögerung, Fehlbildungen, Entwicklungsverzögerung des Nervensystems, Makrosomie, selektive Organvergrößerung, Linksherzsyndrom, chronische Hypoxie, Abort
Neugeborenes (Geburt)	Frühgeburt, Geburtsverletzungen, Atemnotsyndrom, metabolische Anpassungsstörung (Hypokalzämie, Hypomagnesiämie, Hypoglykämie, Gelbsucht, Polyglobulie)
Kind/Erwachsener	Diabetes mellitus, Adipositas, Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Um Komplikationen während der Schwangerschaft und bei der Geburt durch einen schlecht eingestellten Diabetes mellitus zu vermeiden, empfehlen die Deutsche Diabetes Gesellschaft und die Weltgesundheitsorganisation WHO, bei Schwangeren zwischen der 24. und 28. Schwangerschaftswoche einen oralen Glukosetoleranztest (oGTT) durchzuführen. Die diagnostischen Grenzwerte für den oGTT sind streng und leiten sich aus der HAPO-Studie ab. Die Grenzwerte der Diagnose von Gestationsdiabetes durch den oGTT sind dem Anhang beigefügt (siehe Kapitel 7.4.).

1.3. *Advanced glycation endproducts (AGEs)*

Der französische Naturwissenschaftler Louis Camille Maillard beschrieb im Jahre 1912 erstmalig die Reaktion der nicht-enzymatischen Bräunung durch das Erhitzen von reduzierenden Zuckern zusammen mit Aminosäuren. Was heute unter dem Namen Maillard-Reaktion bekannt ist, umfasst eine Vielzahl von verschiedenen chemischen Reaktionen, die aus der Lebensmittelherstellung nicht mehr wegzudenken sind, da sie zur Aromaverstärkung und zur Farbvertiefung beitragen. Dass die Maillard-Reaktion auch im Organismus eine Rolle spielt, zeigte 1968 Professor Samuel Rahbar. Er entdeckte vermehrt glykiertes Hämoglobin (HbA1c) bei Diabetikern (Azizi *et al.*, 2013). Bei gesunden Menschen liegen etwa 5 % des Hämoglobins in glykierter Form vor. Bei Diabetikern dagegen sind, je nach Glukosespiegel, 12 % und mehr des Hämoglobins glykiert (Koenig *et al.*, 1976). 1983 prägte Roth die Nomenklatur der Glykierungsreaktion durch die Termini „glykiertes“ und nicht „glykosyliertes“ Hämoglobin (Roth, 1983). Monnier und Cerami postulierten in den frühen 80er Jahren in der „glycation hypothesis of aging“, dass AGEs am Alterungsprozess beteiligt sind (Monnier und Cerami, 1981). Diese Hypothese wurde mittlerweile durch Brownlee, Lee und Cerami und Vlassara bestätigt (Lee und

Cerami, 1992; Brownlee, 1995; Peppas *et al.*, 2008). Eine gesteigerte AGE-Bildung *in vivo* ist mit pathologischen Veränderungen assoziiert (siehe Tab. 2).

1.3.1. AGE-Metabolismus

Die Bildung von AGEs ist ein langandauernder Prozess, welcher insbesondere Proteine mit einem geringen Umsatz betrifft (Linsenkristallin, Kollagen). Der Prozess der AGE-Bildung kann jedoch unter besonderen Bedingungen, wie z. B. einem erhöhten Substratangebot, bei erhöhter Temperatur oder bei oxidativem Stress beschleunigt werden, sodass sich seine Dauer auf wenige Stunden reduziert (Schiekofer *et al.*, 2003).

In der Übersicht 1 sind die Wege der AGE-Bildung vereinfacht dargestellt (siehe Abb. 1). In einer ersten Reaktion kommt es zur Kondensation einer Carbonylgruppe eines reduzierenden Zuckers mit einer α -Aminogruppe eines Proteins, Lipids oder einer Nukleinsäure. Dieser Schritt führt zur Bildung einer Schiff'schen Base und ist chemisch reversibel. Anschließend erfolgt eine Umlagerung der Schiff'schen Base zu dem stabileren Amadoriprodukt. Durch Degradierungs- und Umlagerungsreaktionen gehen aus den Amadoriprodukten schließlich AGEs hervor. Neben dem klassischen Weg der AGE-Bildung, welcher als *Hodge-Weg* bekannt ist, gibt es auch alternative Wege. Die Schiff'sche Base kann zu reaktiven α -Dicarbonylen umgebildet werden, welche irreversibel mit α -Aminogruppen von Proteinen reagieren und somit AGEs bilden (*Namiki-Weg*). Bei dem *Wolff-Weg* stammen die reaktiven Dicarbonyle aus der Autoxidation von Glukose. Glykierungsprozesse, welche in Anwesenheit von ROS ablaufen, werden als „*Glykoxidation*“ bezeichnet. Die Glykoxidation kann durch Anwesenheit von Übergangsmetallen beschleunigt werden. Die AGE-Bildung selbst wird durch das Vorhandensein von oxidativem Stress begünstigt, wodurch im Kohlenhydrat-, Lipid- und Aminosäurestoffwechsel reaktive Carbonylverbindungen entstehen.

Eine weitere Quelle der AGE-Bildung ist der Polyol-Stoffwechselweg. Hierbei wird Glukose in Sorbitol und anschließend in Fruktose enzymatisch konvertiert. Die Fruktose-Metabolite bilden α -Oxoaldehyde, die mit Aminosäureseitenketten zu AGEs weiterreagieren (Lorenzi, 2007).

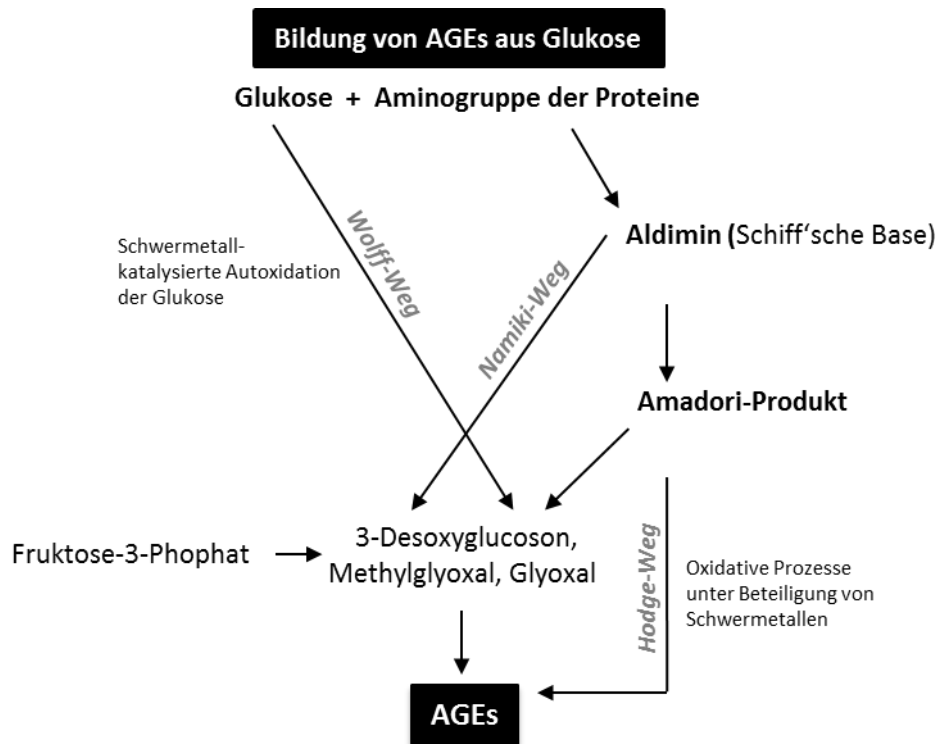


Abb. 1: Schema der Bildung von AGEs durch oxidative und nicht-oxidative Prozesse.

(modifiziert nach: Krantz, 2010)

Neben dem endogenen Bildungsweg hat auch die exogene Aufnahme von AGEs über die Nahrung einen Anteil an der AGE-Akkumulation im Körper. Die tägliche Aufnahme an AGEs schwankt zwischen 25 – 75 mg (Geissler *et al.*, 2010). Wie AGEs im Darm resorbiert werden, ist noch weitestgehend unklar. Angenommen wird, dass hochmolekulare AGE-Verbindungen aufgrund der Ausbildung von Quervernetzungen stärker gegen enzymatische Verdauung geschützt sind als niedermolekulare Verbindungen (Singh *et al.*, 2001). Niedermolekulare AGEs können prinzipiell durch einfache Diffusion das intestinale Epithel durchqueren oder durch endozytotische Prozesse aufgenommen werden. Ebenso können AGEs mit Hilfe von Transportproteinen vom Dünndarm in den Kreislauf gelangen (Geissler *et al.*, 2010). Man geht von einer Absorptionsrate von ca. 10 % der Nahrungs-AGEs aus.

Der Organismus besitzt verschiedene Abwehrmechanismen, die ihn vor einer übermäßigen Bildung und Akkumulation von AGEs schützen. Dazu zählen das Glyoxalase-System mit den Enzymen Glyoxalase I und II sowie die Aldo-Keto-Reduktase, welche reaktive Dicarbonyle detoxifizieren und somit die AGE-Bildung verhindern (McLellan *et al.*, 1994; Rahbar und Figarola, 2003; Rabbani und Thornalley, 2012).

Bei der Ausscheidung glykierter Endprodukte spielt die Niere eine wesentliche Rolle. AGEs werden von spezifischen Rezeptoren, die von Makrophagen exprimiert werden, gebunden und degradiert. Dadurch entstehen niedermolekulare AGEs, welche in den Blutstrom abgegeben und über den Urin ausgeschieden werden können (Nawroth *et al.*, 1999). Folglich ist bei einer Störung der Nierenfunktion eine Akkumulation von AGEs zu beobachten (Sell und Monnier, 1990; Thornalley und Rabbani, 2009). Auch die Leber scheint an der Umsetzung von AGEs beteiligt zu sein. *Scavenger*-Rezeptoren, welche in den sinusoidalen Kupfferzellen exprimiert werden, endozytieren AGEs aus dem Blutplasma und vermitteln vermutlich den intrazellulären Abbau (Smedsrød *et al.*, 1997).

1.3.2. Charakterisierung der AGEs CML, Pentosidin und Argpyrimidin

AGEs zeichnen sich durch eine verminderte Löslichkeit und Elastizität und durch eine erhöhte Proteolyse-resistenz aus (Brownlee 1992; Bailey *et al.* 1995). Sie bilden eine heterogene Gruppe verschiedener Verbindungen, die sich auf Grund ihrer chemo-physikalischen Eigenschaften in drei Gruppen einteilen lassen. Man unterscheidet zwischen fluoreszierenden, nicht-fluoreszierenden und quervernetzenden (*crosslinking*) AGEs. In der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich die AGEs N^ε-(Carboxymethyl)lysin (CML), Pentosidin und Argpyrimidin untersucht, was ein Spektrum aus unterschiedlichen AGEs darstellt. Die Strukturformeln sind in Abb. 2 dargestellt.

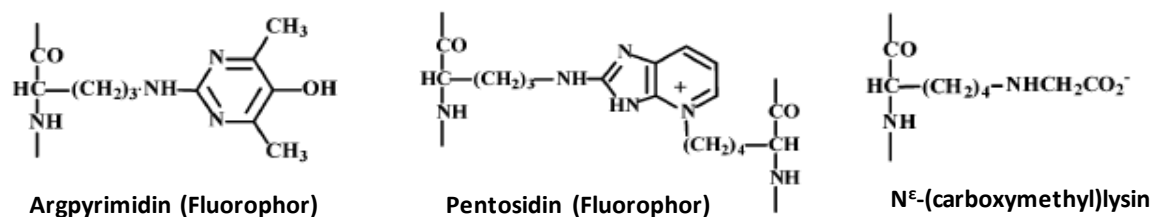


Abb. 2: Strukturformeln von Argpyrimidin, Pentosidin und CML

(modifiziert nach: Ahmed und Thornalley, 2003)

N^ε-(Carboxymethyl)lysin

CML ist das erste *in vivo* identifizierte AGE und ist seither auch das meistuntersuchtete AGE (Ahmed *et al.*, 1986). Es gehört zu den nicht-fluoreszierenden AGEs und bildet keine Quervernetzungen. 1989 beschrieben Dunn und Kollegen erstmalig eine altersabhängige CML-Akkumulation im Linsenprotein und definierten CML als Biomarker für das Altern *in vivo* (Dunn *et*

al., 1989, 1991). Kurze Zeit später wurde durch Dyer und Kollegen eine vergleichbar hohe CML-Akkumulation im Kollagen von Diabetikern gemessen (Dyer *et al.*, 1993).

CML ist ein Glykoxidationsprodukt der Reaktion von Glyoxal mit Lysin. Die Bildungswege von CML sind vielfältig und umfassen unter anderem als Ausgangspunkt die Autoxidation von Glukose und Lipiden. Da CML unter Radikaleinwirkung entsteht, wird es als Marker des oxidativen Stresses beschrieben (Shaw *et al.*, 2002). CML ist hauptsächlich intrazellulär nachweisbar (Krantz, 2010). Neben der CML-Akkumulation bei Diabetes mellitus wird auch bei anderen Erkrankungen eine erhöhte CML-Konzentration gemessen. So sind im Gehirn von Alzheimerpatienten (Kimura *et al.*, 1998), im Kollagen und Plasma bei Urämie (Sebeková *et al.*, 2001) und in der Leber unter oxidativen Stressbedingungen (Sochaski *et al.*, 2002) hohe CML-Spiegel charakteristisch. Mit zunehmendem Alter akkumuliert CML bei Ratten in Lipofuszingranula im Gehirn und in der Nebenniere (Shimokawa *et al.*, 1998).

Die exogene Aufnahme von CML ist bisher umstritten. Es gibt Studien, die zeigen, dass CML zu einem bestimmten Grad resorbiert werden kann (Bergmann *et al.*, 2001; Somoza *et al.*, 2006; Jara *et al.*, 2012; Roncero-Ramos *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2013); andere wiederum widerlegen diese Befunde (Foerster und Henle, 2003; Förster *et al.*, 2005; Dittrich *et al.*, 2006). Grundwald und Kollegen konnten *in vitro* bei Caco-2-Zellen (Darmzellen) zeigen, dass es keinen aktiven Transport für CML gibt, wohl aber eine passive Aufnahme durch Diffusion (Grunwald *et al.*, 2006).

Pentosidin

Ein weiterer Meilenstein in der AGE-Forschung war die Identifizierung des fluoreszierenden AGEs Pentosidin (Sell und Monnier, 1989). Das Fluoreszenzspektrum für Pentosidin wird bei einer Anregung von 340 nm und Emission von 405 nm angegeben (Schmitt *et al.*, 2005). Pentosidin bildet sich als *Crosslinker* (Imidazo-Pyridin-Struktur) zwischen einem Arginin- und einem Lysinrest. Ausgangsstoffe der Pentosidin-Bildung sind Ribose, Glukose, Fruktose oder Ascorbat (Grandhee und Monnier, 1991). Pentosidin ist in einer Vielzahl von Geweben nachweisbar, so im Haut- und Nierenkollagen, im Linsenkristallin, Plasma, Serum, Urin und in Synovialflüssigkeit (Sell *et al.*, 1991). Pentosidin akkumuliert mit zunehmendem Alter und bei Diabetes mellitus (Monnier *et al.*, 1986; Sell und Monnier, 1990). Die Intensität der AGE-spezifischen Fluoreszenz 340/405 nm korreliert direkt mit der Entstehung diabetischer Folgeerkrankungen (Monnier *et al.*, 1986).

Argpyrimidin

Argpyrimidin ist ein AGE, welches spezifisch aus der Reaktion von Arginin mit Methylglyoxal hervorgeht. Es ist fluoreszierend und nicht quervernetzend. Das Fluoreszenzspektrum von Argpyrimidin ist mit einer Anregung bei 335 nm und einer Emission bei 385 nm ähnlich dem des Pentosidins (Wilker *et al.*, 2001; Schmitt *et al.*, 2005). Argpyrimidin kann im Serum und im Nervengewebe (Nakadate *et al.*, 2009), im Linsenprotein (Wilker *et al.*, 2001), im Kollagen, in der Niere (Padival *et al.*, 2003) und in Tumoren (van Heijst *et al.*, 2006) nachgewiesen werden. In *in vitro*-Experimenten hat Argpyrimidin eine antioxidative Wirkung (Sreejayan *et al.*, 2008). Erhöhte Mengen an Argpyrimidin *in vivo* sind mit pathologischen Zuständen wie Diabetes mellitus (Krantz, 2010), Nephropathie und neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert (Shibata *et al.*, 2001).

1.3.3. Rezeptorunabhängige und rezeptorabhängige Wirkung von AGEs

Die Wirkung von AGEs wird in rezeptorabhängig und rezeptorunabhängig unterschieden.

Rezeptorunabhängig kann eine AGE-Bildung zu intra- oder intermolekularen Quervernetzungen führen oder Strukturen einzelner Proteine verändern. Quervernetzte Proteine weisen eine gesteigerte Proteolyseresistenz, eine erhöhte Denaturierungstemperatur und eine verminderte Löslichkeit auf (Avery und Bailey, 2006). Eine Folge der Strukturveränderung kann die Funktionsstörung spezifischer Proteine sein, wobei insbesondere Proteinmodifikationen innerhalb von Protein-Protein-, Protein-DNA- und Enzym-Substrat-Bindestellen biologische Bedeutung haben. Glykiertes Insulin ist beispielsweise weniger effektiv in der Vermittlung der Glukoseaufnahme als natives Insulin (Abdel-Wahab *et al.*, 1997; Boyd *et al.*, 2000). Glykierungen von Kollagen können die Integrin-Bindestellen verändern, was eine geringere Endothelzelladhäsion zur Folge hat (Bhatwadekar *et al.*, 2008; McDonald *et al.*, 2009). Die Glykierung von Albumin im N-Terminus verändert seine Struktur und damit seine Fähigkeit für elektrostatische Wechselwirkungen (Thornalley, 2008).

Bioinformatische Analysen von Proteinsequenzen ergeben, dass gerade rezeptorbindende Domänen reich an Arginin sind (Thornalley, 2008). Die meisten Proteinmodifikationen stammen aus der Reaktion von Methylglyoxal oder Glyoxal mit Arginin (Thornalley, 2008).

AGEs verfügen über ein komplexes Rezeptorsystem, welches sich grob in zwei Kategorien unterteilen lässt: Es gibt AGE-bindende Rezeptoren, die AGEs katabolisieren und degradieren, wie z. B. OST 48/AGE-R1, 80 K-H/AGE-R2 und verschiedene *Scavenger*-Rezeptoren (CD 36, SR-BI,

LOX-1, FEEL-1 und -2), und es gibt AGE-bindende Rezeptorproteine wie RAGE, die in der Lage sind, intrazelluläre Signalkaskaden zu aktivieren (Ott *et al.*, 2014).

1.3.4. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE)

RAGE ist ein Oberflächenrezeptor und gehört zur Gruppe der Immunglobulin-Superfamilie (Schmidt *et al.*, 1994). Als Oberflächenrezeptor besitzt er eine extrazelluläre Region, bestehend aus einer V-Domäne, welche Liganden bindet, sowie zwei C-Domänen. Daran schließt sich eine hydrophobe, membranüberspannende Domäne, gefolgt von einer kurzen zytoplasmatischen Region an, die für die Signaltransduktion von Bedeutung ist (Bierhaus *et al.*, 2005). Neben diesem *full length* RAGE mit all seinen Domänen existieren verschiedene Spleißvarianten, wie die *N-truncated* (fehlende V-Domäne) sowie *C-truncated* Form (fehlende Transmembrandomäne und C-Terminus) und die lösliche RAGE-Version (sRAGE) (Bierhaus *et al.*, 2005). Die genannten Spleißvarianten sind nicht in der Lage, eine Signaltransduktion in der Zelle weiterzuleiten (Yonekura *et al.*, 2003). RAGE wird durch das Gen *AGER* (NM_001136) codiert.

RAGE ist ein Multiligandenrezeptor, der neben AGEs auch eine Reihe weiterer Proteine, wie S100/Calgranulin, HMGB1 (*High-Mobility-Group-Protein B 1*), Amyloid β -Proteine und β -Faltblatt-Fibrillen bindet (siehe Abb. 3). Als Multiligandenrezeptor erkennt RAGE gemeinsame Merkmale beziehungsweise Strukturen seiner Liganden. Eine Aktivierung von RAGE durch AGEs führt zur Aktivierung von Ras-ERK 1/2 (Huttunen *et al.*, 1999a), Cdc42/Rac-1 (Huttunen *et al.*, 1999b), SAPK/JNK, p38-MAP-Kinase (Taguchi *et al.*, 2000) und der PI3-Kinase (Vincent *et al.*, 2007). Diese Signaltransduktionswege aktivieren Transkriptionsfaktoren wie das CREB-Protein (Huttunen *et al.*, 2002), Mitglieder der STAT-Familie (Huang *et al.*, 2001) und NF- κ B (Yan *et al.*, 1994). Der Transkriptionsfaktor NF- κ B induziert seine eigene Genexpression und die von *AGER* (Neumann *et al.*, 1999; Bierhaus *et al.*, 2005). Eine erhöhte Menge an RAGE-Liganden steigert die Menge an RAGE (Bierhaus *et al.*, 2005; Grimm *et al.*, 2012; Bhutada *et al.*, 2014).

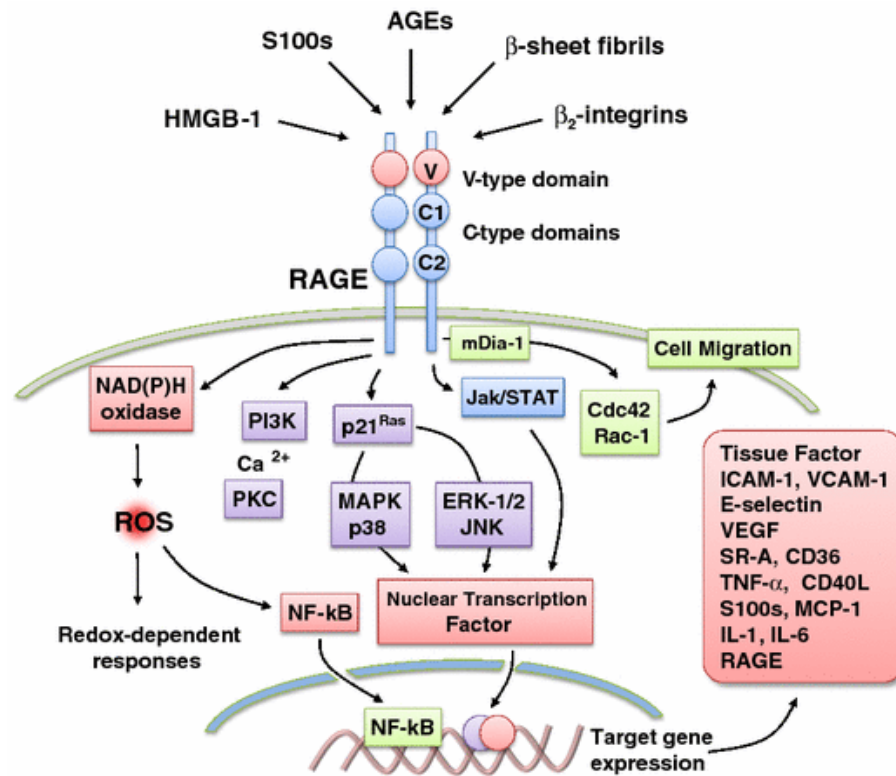


Abb. 3: Schematische Darstellung des RAGE-Signalweges.

Die RAGE-Liganden-Interaktion führt zur Aktivierung von MAPK, ERK-1/2, Jak/STAT, PI3-Kinase und Mitgliedern des Rho-GTPase-Signalweges (Cdc42 und Rac-1). Darüberhinaus induziert RAGE die Bildung von ROS durch die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase. Diese Signaltransduktionswege aktivieren Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B.

(Quelle: Vazzana *et al.*, 2009)

1.3.5. AGE-induzierte ROS-Produktion

Bedeutende Mengen an ROS entstehen als Nebenprodukte des normalen Zellmetabolismus. Bei pathologischen Zuständen wie z. B. Diabetes mellitus können verstärkt ROS gebildet werden. Eine Ursache dafür sind eine mitochondriale Dysfunktion und ein gesteigerter Polyol-Stoffwechsel mit einer vermehrten AGE-Bildung (Negre-Salvayre *et al.*, 2009). Die Glykierungsreaktionen selbst und die Aktivierung intrazellulärer Kaskaden über AGEs tragen zur ROS-Entstehung bei. AGE-RAGE-Interaktionen aktivieren den NAD(P)H-Oxidase-Komplex (siehe Abb. 3), welcher die Elektronen von NAD(P)H auf Sauerstoff unter Bildung von Superoxidanionen (O_2^-) überträgt. Die Superoxidanionen wiederum werden entweder spontan oder enzymatisch durch die Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reduziert. Infolge der verstärkten ROS-Bildung werden Proteinseitenketten zu Carbonylgruppen oxidiert. Diese Carbonylgruppen sind hochreaktiv und forcieren die AGE-Bildung. Somit führt oxidativer Stress über vermehrte AGE-Bildung zur Steigerung der ROS-Menge in der Zelle.

1.3.6. Einfluss von AGEs auf die Entstehung diabetischer Folgeerkrankungen

In der Pathogenese des Diabetes mellitus spielt die gesteigerte AGE-Bildung eine wichtige Rolle. In Tab. 2 ist die Schädigung von AGEs bei verschiedenen diabetischen Folgeerkrankungen zusammengefasst.

Tab. 2: AGE-bedingte Folgeerkrankungen bei Diabetes mellitus.

(Zusammenstellung aus Review von Ahmed und Thornalley, 2007; Krantz, 2010; Negre-Salvayre *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2014, 2001)

Erkrankung	AGE-bedingte Ursachen
Makroangiopathie (Atherogenese)	Oxidation und Glykoxidation von Lipoproteinen Aktivierung von Endothelzellen – Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen Chemotaktische Wirkung auf Leukozyten Förderung der Schaumzellbildung Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen Plaque-Ruptur durch chronische Entzündung
Cardiomyopathie	AGE-RAGE-Interaktionen beeinflussen den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel AGE-Akkumulation in Myofibrillen Versteifung des Herzmuskels
Nephropathie	Aktivierung glomerulärer Makrophagen AGE/RAGE-vermittelte tubuläre Fibrose Veränderte Permeabilität der glomerulären Basalmembran Glomeruläre Hypertrophie, Basalmembranverdickung und mesangiale Expansion
Periphere Neuropathie	Mikroangiopathie der <i>Vasa nervorum</i> Glykierung von Proteinen und Lipiden der Myelinscheiden Glykierung intraaxonaler Proteine, Beeinträchtigung des axonalen Transports Inhibierung der nervalen Regeneration durch glykiertes Lamin Induktion von oxidativen Stress durch RAGE in Nerven- und Gliazellen
Retinopathie	AGE/RAGE-induzierter oxidativer Stress in der Retina Quervernetzung der Linsenproteine – Linsentrübung Schädigung des Kapillarendothels Hemmung der Perizytenproliferation durch glykierte Matrix
Osteoporose	Beeinträchtigte Mineralisierung durch AGE-Akkumulation im Kollagen AGE-reprimierte Osteoklastendifferenzierung und -proliferation AGE-reprimierte Proteoglykan-Biosynthese der Chondrozyten RAGE-Expression auf Osteoklasten und Osteoblasten Vermindert Elastizität durch AGE-Akkumulation im Knorpel

1.4. AGEs und RAGE während der Embryonalentwicklung

Ein AGE-Vorkommen ist bei Mausembryonen ab dem Blastozystenstadium beschrieben (Hernebring *et al.*, 2006). In 10 Tage alten Rattenföten werden AGEs im Endo-, Meso- und Ektoderm gefunden. In Relation zu adultem Lungengewebe von Ratten weisen Rattenföten einen 8-fach höheren CML-Gehalt auf (Ling *et al.*, 2001).

Auch bei humanen embryonalen Stammzellen werden bereits eine Vielzahl an Proteinglykierungen und Proteincarbonylierungen gemessen (Hernebring *et al.*, 2006). Es wird vermutet, dass Stammzellen durch die Aktivierung der 20 S- und 26 S-Proteasomen während der Differenzierung eine Art Reinigungsmechanismus anschalten, um beschädigte Proteine zu beseitigen (Hernebring *et al.*, 2006).

Während der Embryonalentwicklung nimmt RAGE Einfluss auf das Wachstum und die Migration von Neuriten sowie auf die Entwicklung der Lunge (Hori *et al.*, 1995; Lizotte *et al.*, 2007), Übersicht in Ott *et al.* 2014). Die RAGE-Menge in der Lunge nimmt bis zum Erwachsenenalter stetig zu (Lizotte *et al.*, 2007). In anderen adulten Geweben nimmt RAGE ab. In humanen embryonalen Stammzellen (HUES 3) ist RAGE bereits frühzeitig vorhanden (unveröffentlichte Daten, Maria Barandalla).

Bei Ratten ist HMGB1 – ein potenter RAGE-Ligand – im Uterussekret implantationsabhängig reguliert. Er nimmt von der prärezeptiven bis hin zur rezeptiven Phase drastisch ab. Dieser Befund konnten beim Menschen bestätigt werden (Bhutada *et al.*, 2014). HMGB1 wird physiologisch durch das luminale Uterusepithel gebildet. RAGE ist ebenso im Epithel nachweisbar. Eine intrauterine Supplementierung von HMGB1 bei Ratten führt zu einer RAGE-Zunahme im Uterus, des Weiteren werden Nf- κ B aktiviert und TNF α und IL-6 exprimiert (ebd.). Eine HMGB1-Supplementierung in Konzentrationen der präkonzeptiven Phase verhindert die Einnistung der Blastozyste (ebd.).

RAGE^{-/-}-Mäuse, bei denen das Gen für RAGE deaktiviert ist, weisen einen normalen Phänotyp auf und sind fertil (Bierhaus *et al.*, 2004; Constien *et al.*, 2001; Liliensiek *et al.*, 2004). Es ist denkbar, dass *toll-like receptor* (TLR)-2 und TLR-4 – ebenso HMGB1-Rezeptoren – die Funktion von RAGE übernehmen (Yu *et al.*, 2006; Ibrahim *et al.*, 2013). Unklar ist, welchen Einfluss ein vermehrtes Aufkommen von RAGE während der Implantation hätte.

Nach der Plazentation können AGEs über RAGE in der Plazenta Entzündungsvorgänge induzieren. In humanen Chorionzotten der 6.–10. Schwangerschaftswoche ist RAGE sowohl im Synzytiotrophoblasten als auch im Zytotrophoblast vorhanden. Eine *in vitro*-Stimulation mit

AGEs führt zu einer erhöhten Produktion der inflammatorischen Proteine MIP-1 α und - β und zu einer gesteigerten Apoptoserate (Konishi *et al.*, 2004). Zellen aus humanem Uterusgewebe, welche nach der Geburt kultiviert und mit AGE-BSA stimuliert wurden, zeigen eine ähnliche inflammatorische Antwort. Die Inflammation geht mit einer gesteigerten Freisetzung von IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , Prostaglandin E₂ und E_{2 α} einher und wird von einer ERK-Phosphorylierung und NF- κ B-Aktivierung begleitet (Lappas *et al.*, 2007; Cooke *et al.*, 2009). Bei Präeklampsiepatientinnen werden erhöhte Level an AGEs und RAGE in den Plazenten gemessen (Chekir *et al.*, 2006). Es wird diskutiert, ob das AGE/RAGE-System zur Induktion von oxidativem Stress bei Präeklampsie beiträgt (Chekir *et al.*, 2006; Cooke *et al.*, 2009; Guedes-Martins *et al.*, 2013). Bei Diabetikerinnen korrelieren erhöhte Plasma-AGE-Werte mit hohen AGE-Werten im Nabelschnurblut neugeborener Kinder (Boutzios *et al.*, 2012). Die Bedeutung dieser Beobachtung ist noch unklar. Ein Einfluss auf die Schwangerschaft wird nicht ausgeschlossen.

1.5. Das Versuchstiermodell des Kaninchens

1.5.1. Präimplantationsentwicklung des Kaninchens

Das Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) ist ein seit langem bekanntes und genutztes Modell, um die embryonale Entwicklung zu untersuchen. Es bietet vielfältige Vorzüge im experimentellen Arbeiten und besitzt einen höheren phylogenetischen Verwandtschaftsgrad zum Menschen als Maus oder Ratte (Fischer *et al.*, 2012; Mapara *et al.*, 2012; siehe Abb. 4). Das Kaninchen hat mit ca. 8–9 Embryonen pro Muttertier eine natürlicherweise hohe Fruchtbarkeitsrate, welche experimentell durch eine Hormonbehandlung zusätzlich gesteigert werden kann (Fischer *et al.*, 2012). Mit einem durchschnittlichen Durchmesser von \varnothing 2–3 mm am Tag 6 *p.c.* bietet die Blastozyste genügend Material, um individuelle Embryonen zu analysieren. Der frühe Gastrulationsbeginn (Tag 6,0 *p.c.*) vor dem Implantationszeitpunkt am Tag 6,5–6,8 *p.c.* ermöglicht eine Untersuchung der Gastrulationsereignisse *in vivo* und *in vitro*. Die Blastozyste bettet sich nicht, wie bei der interstitiellen Implantation des Menschen, als Ganzes in das Stroma des Endometriums ein, sondern bleibt größtenteils im Uteruslumen liegen (Denker, 1975). Im Implantationsbereich ist der Prozess der Einnistung ähnlich dem des Menschen. Maus- und Rattenblastozysten dagegen zeigen eine exzentrische Implantation (Denker, 1975).

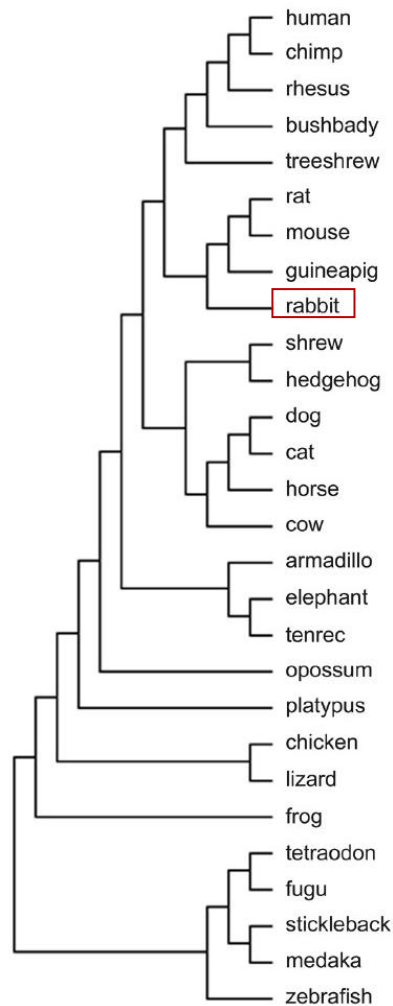


Abb. 4: Phylogenetischer Verwandtschaftsgrad verschiedener Versuchstiere.

(Quelle: Mapara *et al.*, 2012)

Die Präimplantationsphase beschreibt die erste Entwicklungsphase in der Embryogenese. Sie umfasst die Zeit von der Konzeption (Befruchtung) bis zur Implantation (Einnistung). Aus der Fusion von Oozyte und Spermatozoon im Eileiter bildet sich die Zygote. Die befruchtete Zygote beginnt mit einer Reihe von totaläqualen, nicht synchronen Teilungen (Furchungsteilungen). Dabei teilt sich die Zygote in einzelne Tochterzellen (Blastomere). Die Zellteilung ist eine numerische Vermehrung von Zellen durch Abschnürung, bei der sich der Embryo nicht vergrößert. Es wird kein neues Zytoplasma gebildet. Die Morula bildet sich während der Wanderung durch den Eileiter; um den Tag 2,5 *p.c.* Am Tag 3 *p.c.* folgen die Kompaktierung der Morula und die anschließende Blastozystenbildung mit einem Blastozöl. Unter dem Einfluss eines gerichteten Flüssigkeitsstroms entsteht in der Morula die sogenannte Blastozystenhöhle,

die im Folgenden expandiert und durch das extraembryonale Endoderm ausgekleidet wird. Die Zellen der Blastozyste differenzieren zu Embryoblast (Keimscheibe) und Trophoblast (siehe Abb. 5 A). Aus dem Embryoblasten geht der Embryo hervor, der Trophoblast wird zusammen mit maternalem Gewebe die Plazenta bilden. Auf dem Embryoblasten liegt zusätzlich eine Deckschicht, der Rauber'sche Trophoblast. Diese degeneriert ab dem 6. Tag *p.c.* Wenn die frühe Blastozyste am Tag 4–5 *p.c.* den Uterus erreicht, ist die Blastozystenbildung weitestgehend abgeschlossen. Die Kaninchenblastozyste ist von embryonalen, azellulären Hüllen umgeben, der *Zona pellucida* und einer Mukoproteinschicht. Die Neozona wird im späteren Verlauf die *Zona pellucida* ersetzen. Im Uterus wird außen das Gloiolemma aufgelagert. In Vorbereitung auf die Implantation bewirken proteolytische Enzyme eine Auflösung der Hüllen (Denker, 1977). Bereits vor der Implantation beginnt die Gastrulation. Bei der Entwicklung der undifferenzierten Keimscheibe bis zum Zeitpunkt der Implantation können 5 Entwicklungsphasen (Stadium 0–4) unterschieden werden (siehe Tab. 3 und Abb. 5 B und C).

Tab. 3: Einteilung der Gastrulationsstadien beim Kaninchenembryo in der Periimplantationsphase.
(aus Viebahn *et al.*, 1995)

Stadium	Morphologie der Keimscheibe
0	nach außen hin locker abgegrenzte Keimscheibe (Embryoblast) aus homogenen, morphologisch gleichen Zellen
1	lichtmikroskopische Verdichtung der Zellen am anterioren Pol entlang der Embryoblast-Trophoblast-Grenze (vorderer Randbogen (VRB))
2	Ausbildung der posterioren Gastrulaextension (PGE), welche aufgrund einer verringerten Zelldichte im posterioren Bereich heller erscheint
3	elongierte Keimscheibe mit erkennbaren Primitivstreifen (Ausbildung von posterior nach anterior)
4	Vollendung der Primitivstreifenbildung und Anlage des Primitivknotens (Hensen-Knoten) an dessen vorderen Pol (Hensen 1876)

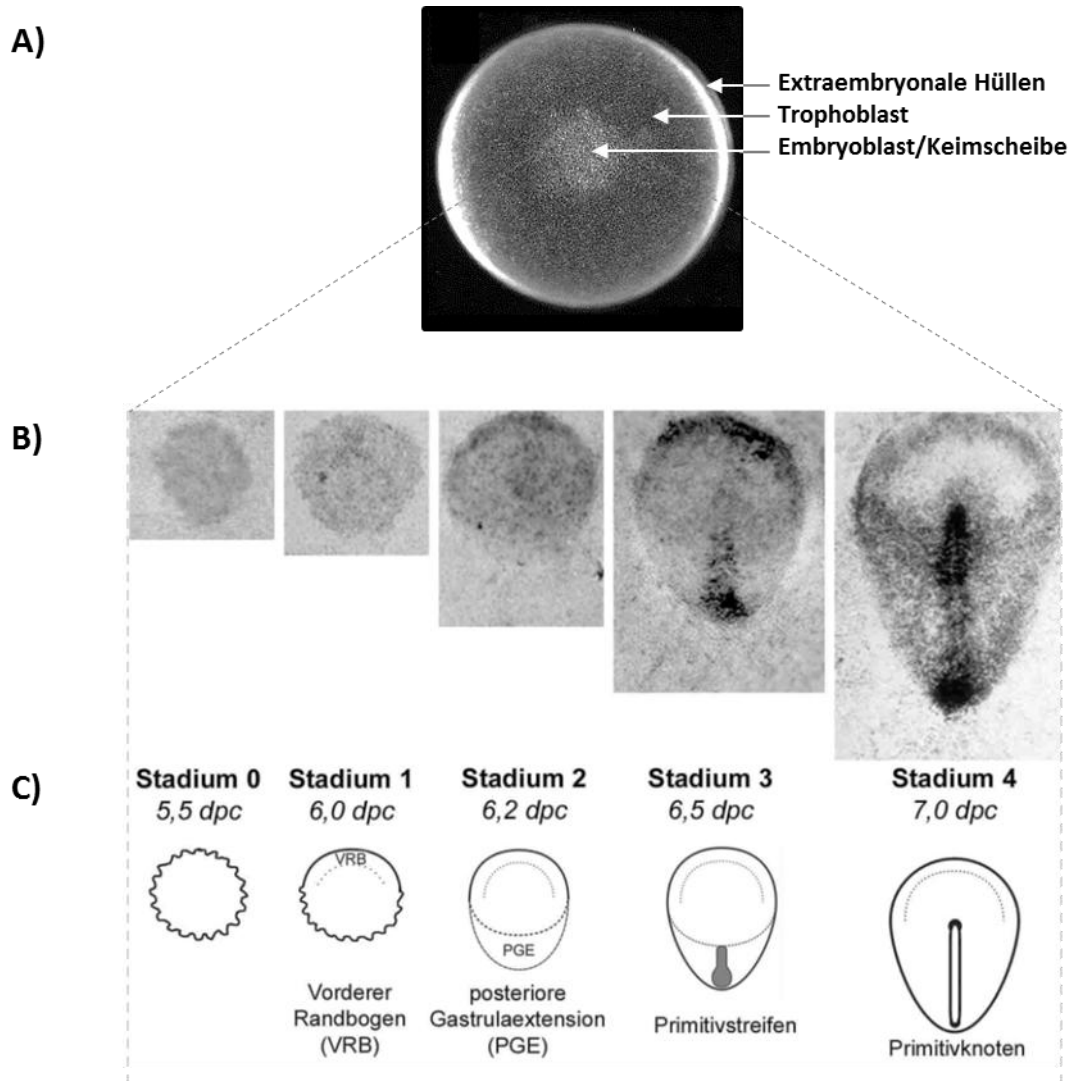


Abb. 5: Kaninchenblastozyste am Tag 6 *p.c.* mit der morphologischen Einteilung der frühen Keimscheibendifferenzierung.

(A) Kaninchenblastozyste am Tag 6 *p.c.* (modifiziert nach Idkowiak *et al.*, 2004)

(B) Dorsale Aufsicht der Kaninchenkeimscheibe (Embryoblast) der Stadien 0 – 4 vom Tag 5,5 – 7,0 *p.c.*

(C) schematische Darstellung der entsprechenden Gastrulationsstadien.

VRB = Vorderer Randbogen; PGE = posteriore Gastrulaextension.

(Quelle: Fischer *et al.*, 2012; Viebahn *et al.* 1995)

Die Einnistung der Blastozyste erfolgt am Tag 6,5 – 6,8 *p.c.* Das Wachstum des Präimplantationsembryos ist von der Nährstoffverfügbarkeit des maternalen Organismus, aber auch von endokrinen und parakrinen Regulationsmechanismen der Blastozyste abhängig. Bei den Blastozysten findet der hierfür nötige Stoff- und Hormonaustausch zwischen dem Endometrium und dem Trophoblasten statt.

1.5.2. Experimentell induzierter Diabetes mellitus Typ 1 durch Alloxan beim Kaninchen

Die diabetogen wirkende Chemikalie Alloxan ist in der Lage, spezifisch pankreatische β -Zellen zu zerstören und somit einen insulinpflichtigen Diabetes mellitus zu induzieren. Alloxan ist ein starkes Oxidationsmittel, welches nur in seiner reduzierten Form (Dialursäure) wirksam ist. Im extrazellulären Raum oder in der Abwesenheit von Glutathion als Reduktionsmittel ist Alloxan nicht toxisch. Durch seine geringe Halbwertszeit zerfällt es innerhalb weniger Minuten zu der nicht-diabetogenen Substanz Alloxansäure (Lenzen, 2008). Der hydrophile Charakter verhindert ein Eindringen in die Zelle über die Zellmembran. Aufgrund seiner Strukturähnlichkeit zu Glukose kann es wie Glukose selbst über den Glukosetransporter 2 (GLUT 2) in das Zytosol der pankreatischen β -Zellen gelangen. Auch andere Organe, die den GLUT 2 exprimieren (Darm, Niere und Leber), können so Alloxan aufnehmen. Die zytotoxische Wirkung von Alloxan in den β -Zellen verläuft in einer komplexen Reaktionskette über die Produktion von ROS. Dabei reduziert GSH Alloxan zur Dialursäure, welche spontan unter ROS-Bildung autooxidiert. Die β -Zelle, welche im Gegensatz zu anderen Zellen über eine schlechte antioxidative Abwehr verfügt, geht aufgrund der übermäßigen ROS-Einwirkung zugrunde. Die Alloxan-behandelten Tiere sind damit nicht mehr in der Lage, ausreichende Mengen Insulin zu produzieren und entwickeln eine Hyperglykämie.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien, Enzyme und vorgefertigte Systeme

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Agar-Agar	Carl-Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Oldendorf
AGE-BSA	BioVision, Heidelberg
Alloxan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aminomethylcumarin (AMC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ϵ -Aminocapronsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampicillin	Carl-Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
basales synthetisches Medium (BSM) II	Biochrom AG, Berlin
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bradford-Reagenz	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bromphenolblau	Fluka, Buchs
<i>Cell dissociation solution</i> (CDS)	Sigma, Steinheim
Chloralhydrat	Fuka Chemie AG, Steinheim
Chloroform	Carl-Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	WAK-Chemie Medical GmbH, Steinbach
5,6-Diamino-2,4-hydroxypyrimidinsulfat (DDP)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
2',7'-dichlorohydrofluorescindiacetat (DCFH-DA)	Life Technologies, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DTT (Dithiothreitol)	Carl-Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
dNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot
Domitor [®] SPC	Janssen Animal Health, Neuss
Essigsäure	Carl-Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Carl-Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
Formaldehyd	Calbiochem, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin
α -D-Glucose	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
L-Glutamin	PAA GmbH, Cölbe
Glycerin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Glycin	Carl-Roth, Karlsruhe
Glyoxal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Guanidiniumthiocyanat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Carl-Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe

Histoclear	Biozym, Oldendorf
Histomount	Biozym, Oldendorf
HPLC-Wasser	Millipore, Schwalbach
humanes Choriongonadotropin (hCG)	Intervet, Unterschleißheim
Humaninsulin basal	Lilly Deutschland GmbH, Gießen
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Carl-Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
Kalium-Aluminium-Sulfat	Merck, Darmstadt
Ketanest [®]	Pfizer, Karlsruhe
Kochsalzlösung (isotonisch)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Magermilchpulver	TSI GmbH und Co.KG, Zeven
Magnesiumchlorid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
β -Mercaptoethanol	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Methanol	Carl-Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
Methylglyoxal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Minimal Eagle Medium Earl's (MEM)	Biochrom AG, Berlin
Mowiol [®] 4-88 Reagent	Calbiochem, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl-Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
Natriumcitrat	Carl-Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumdo decylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumiodat	Merck, Darmstadt
Nonidet (NP40)	ICN Biomedicals, Inc., Ohio
N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Oligonukleotide	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Random Primer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Paraffin	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	PAA GmbH, Cölbe
Pentobarbital	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pepton	Carl-Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
Phenol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Phosphate buffered solution</i> (PBS Dulbeccos)	Biochrom AG, Berlin
Pikrinsäure	Merck, Darmstadt
Polyvinylalkohol (PVA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>pregnant mare serum gonadotropine</i> (PMSG)	Intervet, Unterschleißheim
Salzsäure 36 %	Carl-Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sucrose	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tris(hydroxymethyl)-aminoethan (TRIS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tween [®] 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
X-Gal	Carl-Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe

Xylol	Carl-Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
Ziegenserum	Dianova, Hamburg
Zitronensäure	Merck, Darmstadt
2-fach <i>Rapid Ligation Buffer</i>	Promega GmbH, Mannheim
5-fach Reaktionspuffer	Fermentas, St. Leon-Rot
10-fach PCR-Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot

Enzyme

Apal (10U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot
Crimson Taq™ DNA-Polymerase (5U/ml)	NEB, Frankfurt
Protease-Inhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
Phosphatase-Inhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
rRNasin® RNase Inhibitor (40U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot
MESA Blue qPCR® Mastermix Plus for SYBR®	Assay Eurogentec, Köln
RevertAid™ H Minus Reverse Transkriptase (200 U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot
SacI (10U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA-Ligase (3U/μl)	Promega GmbH, Mannheim

Hersteller**Vorgefertigte Systeme (Kits)**

BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
DNA-free™ (DNase-Treatment & Removal)	Ambion INC, Austin
Dynabeads® mRNA Direct™ Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Immobilon™ Western Detection Reagents	Millipore, Schwalbach
p-GEM-T-Vektor Kit	Promega GmbH, Mannheim
QiAquick® Gel Extraction Kit (250)	Qiagen, Hilden
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I PeqLab	Biotechnologie GmbH, Erlangen
MicroBCA Protein Assay Kit	Pierce, Rochford

Hersteller**2.2. Geräte- und Softwareverzeichnis****Geräte**

Agarosegel-Dokumentationsgerät	Labortechnik, Wasserburg
Biozero 8100E	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg
Brutschrank	Hereaus, Hanau
Brutschrank HERACell 150i	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bonn
Fusion FX7™ Multi-Imagingsystem	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Gelelektrophoresekammer Agagel	Mini und Maxi Biometra, Göttingen
Electrophoresis Power Supply EV 202	Consort, Turnhout (Belgien)
LaminAir® HP72 (halbsterile Werkbank)	Hereaus, Hanau
Kühlzentrifuge, Biofuge fresco 17	Hereaus, Hanau
Magnetrührer mit Heizung MR 2002	Heidolph, Schwabach
Mikroplattenreader Synergy MX	Biotek, Bad Friedrichshall
Mikroskop Nikon Eclipse	TS 100 Nikon, Japan
Mikroskop Olympus IX70	Olympus, Hamburg

Hersteller

Novex Elektrophoresekammer	Invitrogen, Karlsruhe
Precision® Xceed™ (Blutzuckermessgerät)	Abbott, Wiesbaden
Precellys24 lysis & homogenization (Homogenisator)	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Rotations-Vakuum-Konzentrator RVC 2-18	Christ, Osterode
Schüttler GFL 3006	GFL, Burgwedel
Semi-Dry-Blot	Biometra, Göttingen
Sicherheitswerkbank	HERAsafe® Hereaus, Hanau
Slot Blot	Biostep, Rabenau
Spektrophotometer NanoVue	GE Healthcare, München
StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems	Applied Biosystems, Darmstadt
Sterile Werkbank HERAsafe	Hereaus, Hanau
Stereomikroskop Stemi 2000	Carl Zeiss, Jena
Stereomikroskop Stemi SV 11	Carl Zeiss, Jena
Stereomikroskop SZH 10	Olympus, Jena
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen
Ultra-Turrax® T25	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
UV/VIS Spektrometer	Perkin Elmer, Weiterstadt
Waage BP 210 S & BP 3100 S	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Wärmeschrank, Hybridisierungsöfen	Biometra, Göttingen
Zentrifuge Biofuge 13	Hereaus, Hanau

Software

Basic Alignment Search Tool (BLAST)
BioCaptMW
FUSION-CAPT Steuerungs- und Analyse-Software
Generunner Software 3.05
SigmaPlot® 11

Hersteller

National Centre for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda (USA)
Vilber Lourmat, Eberhardzell
PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Hastings Software Inc., USA
Systat Software GmbH, Erkrath

2.3. Versuchsaufbau und Induktion eines Diabetes mellitus Typ 1

Für die Untersuchungen wurden 12 – 16 Wochen alte weibliche ZiKa-Hybridkaninchen (Körpergewicht 3,5 – 4,5 kg) der Firma R. Krieg aus Niederwünsch (Deutschland) eingesetzt. Die Tierhaltung erfolgte in Einzelkäfigen bei einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus. Den Tieren stand Trockenfutter (*Reika*, Kraftfutter) und Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Die Eingewöhnungsphase bis zum Versuchsbeginn betrug in etwa 3 Wochen. Pro Versuchsdurchgang (N) wurden 6 Tiere der Kontrollgruppe und 9 Tiere der diabetischen Gruppe zugeordnet.

Um einen Diabetes mellitus Typ 1 bei den Häsinnen zu induzieren, wurde den Tieren vor der Alloxangabe über Nacht das Futter entzogen, um während der Alloxangabe einen niedrigen Blutglukosewert zu haben. Die Kaninchen wurden mit Dormitor® *i.m.* (0,25 mg/kg Körpergewicht) beruhigt und anschließend mit Ketanest® S *i.m.* (15 mg/kg Körpergewicht) betäubt. Die Alloxanlösung (120 mg/kg Körpergewicht in 10 ml PBS gelöst) wurde 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. 10 min nach der Behandlung wurde den Tieren jeweils 25 ml einer 27,5 %-igen Glukoselösung (*s.c.*) in die linke und rechte Bauchfalte appliziert, um eine lebensbedrohliche Hypoglykämie (Freisetzung von Insulin aus den zerstörten β -Zellen) zu verhindern. Nach der Aufwachphase bekamen die Kaninchen trockenes Brot und Trinkwasser mit 5 % Glukose. Der Zustand der Tiere wurde in den darauffolgenden Stunden (ca. 24 – 48 h) streng überwacht. Mit der eintretenden Hyperglykämie wurden die Glukosetrinkflaschen und das zusätzliche Brot entfernt. Der Blutglukosespiegel wurde mit einem gewöhnlichen Blutglukosemessgerät (*ACCU CHEK, Roche*) dreimal täglich kontrolliert und durch entsprechende Insulinsupplementierung (1 – 3 I. E.) auf einem diabetischen Niveau von 25 – 30 mmol/l gehalten. Nachdem die Tiere mit der jeweiligen Insulindosis eingestellt waren, wurde der Blutzucker lediglich einmal pro Tag gemessen.

Der Versuchsaufbau ist in Abb. 6 dargestellt. Nach der Alloxangabe wurden die Kaninchen 9 – 11 Tage im diabetischen Zustand gehalten. Zur Steigerung der Embryonenzahl wurden die gesunden und diabetischen Kaninchen mit 150 I.E. *s.c.* injiziertem *pregnant mare serum gonadotropine* (PMSG) stimuliert und 3 Tage nach der Stimulation mit 2 gesunden Böcken gepaart. Direkt nach der Verpaarung wurde den Kaninchen 75 I.E. humanes Choriongonadotropin (HCG) in die *Vena auricularis lateralis* injiziert, um die Ovulation zu unterstützen. 6 Tage (d 6) nach der Paarung wurden die Kaninchen durch Injektion einer Überdosis Pentobarbital getötet und nach Eröffnung der Karotiden entblutet. Bei Versuchsansätzen mit d 3 und d 4 Embryonen wurden die Tiere entsprechend am 3. bzw. am 4.Tag nach der Verpaarung getötet.

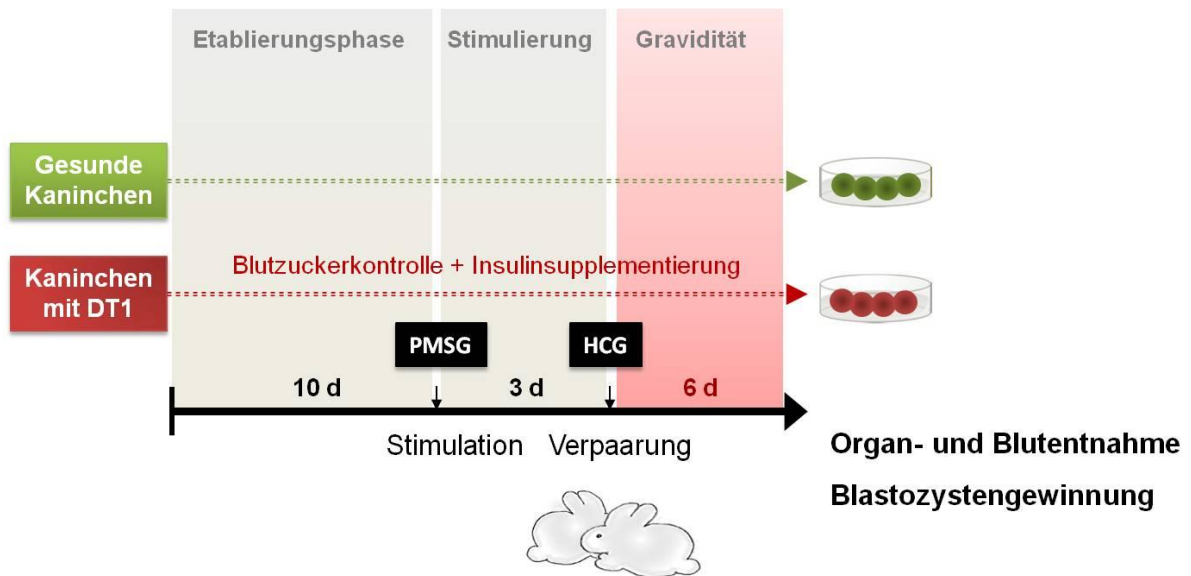


Abb. 6: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes.

Pregnant mare serum gonadotropine (PMSG), humanes Choriongonadotropin (HCG), Diabetes mellitus Typ I (DT1), (d) Tag

2.4. Gewinnung des Probenmaterials

2.4.1. Mikrosektion von Präimplantationsembryonen

Die Eileiter und Uteri wurden frei präpariert und die Embryonen mit sterilfiltriertem Spülmedium (basales synthetisches Medium (BSM II)) mit 0,1 % BSA) unter einer halbsterilen Werkbank aus dem Eileiter (d 3, d 4 *p.c.*) bzw. Uterus (d 4, d 6 *p.c.*) ausgespült. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde streng darauf geachtet, kein Blut der Muttertiere mitzuführen. Blastozysten am Tag 3 und 4 wurden lediglich für RNA-Analysen verwendet. Im Fokus dieser Arbeit standen die gastrulierenden Blastozysten am Tag 6.

Beim Umgang mit den Embryonen wurde stets 37 °C warmes Medium verwendet. Die Embryonen wurden zweimal im Spülmedium gewaschen. Bei den d 6 Blastozysten wurde das Gastrulationsstadium entsprechend der Morphologie der Keimscheibe ermittelt (siehe Abb. 5).

Den Blastozysten, die nicht in einer *in vitro*-Kultur verwendet werden sollten, wurden die embryonalen Hüllen in kaltem PBS + 0,1 % Polyvinylalkohol (PVA) mechanisch entfernt.

Für die RNA-Analytik wurde der Embryo als Gesamtembryo oder in Embryoblast (EB) und Trophoblast (TB) separiert in PBS aufgenommen und bei -80 °C gelagert. Die Separation der

beiden Zelllinien der Blastozyste wurde manuell mit Hilfe von Pinzetten in kaltem PBS + 0,1 % PVA durchgeführt.

Embryonen der Protein-Analytik wurden gepoolt, in RIPA-Puffer aufgenommen und bei -80 °C gelagert. Eine Proteinprobe umfasste ca. 10 Embryonen von mindestens 3 verschiedenen Muttertieren.

Für immunhistochemische Analysen wurden die Blastozysten für mindestens 2 h in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Anschließend wurde die Keimscheibe, welche den EB und umliegende TB-Zellen enthielt, aus der fixierten Blastozyste herausgeschnitten. Die Lagerung der Keimscheiben erfolgte bei -20 °C in 100 % Methanol.

RIPA-Puffer:

10x PBS	10 ml
Nonidet (NP40)	1 ml
SDS (10 %)	100 µl
Natriumdeoxycholat	0,5 g
<i>Aqua dest. ad</i>	100 ml

2.4.2. Gewinnung der Blastozystenhöhlenflüssigkeit

Zur Gewinnung der Blastozystenhöhlenflüssigkeit wurden die 6 Tage alten Blastozysten einzeln aus dem Uterus heraus präpariert und gründlich in kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde das jeweilige Gastrulationsstadium bestimmt. Die einzelne Blastozyste wurde auf ein steriles Urglasschälchen platziert, vom überschüssigen PBS sorgfältig befreit und mit einer Kanüle angestochen. Die austretende Blastozystenhöhlenflüssigkeit wurde abpipettiert, sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.4.3. Gewinnung der Plasmaproben

Direkt nach der Eröffnung der Karotiden wurde das Blut in S-Monovetten (EDTA-K) (*Sarstedt*) aufgefangen, gründlich durchmischt und bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden die Proben bei 1.000 *rpm* und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Das Plasma wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4.4. Entnahme von Uterus und Ovar

Die Uteri, einschließlich der Eileiter und der Ovarien, wurden entnommen und an einer semisterilen Arbeitsbank vom umliegenden Gewebe freipräpariert. Neben der Analyse des Gesamtuterus war es möglich, das Endometrium mechanisch mit einem Skalpell vom

Myometrium zu separieren. Die Gewebeproben wurden für die Proteinanalytik in flüssigem Stickstoff tiefgefroren oder für immunhistochemische Analysen in Bouin-Lösung fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet.

Bouin-Lösung:

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

2.5. *In vitro*-Kultur von Kaninchenblastozysten

Die gesammelten Blastozysten verschiedener Häsinnen wurden nach dem Ausspülen an das Kulturmedium adaptiert und anschließend zufällig auf die Kulturgruppen verteilt.

Kulturmedium (pH = 7,2 – 7,4):

Basales synthetisches Medium II (BSM II)	7,65 g/l
Penicillin	0,06 g/l
Glucose	1,8 g/l
BSA	15 g/l
NaHCO ₃	2,11 g/l
Streptomycin	0,15 g/l
NaCl	1,99 g/l

2.5.1. AGE-Akkumulation *in vitro*

Die *in vitro*-Kultur erfolgte für 6 h mit 0 mM, 10 mM und 25 mM Glukose in einem Inkubator mit 5 % O₂, 5 % CO₂ und 90 % N₂ bei 37 °C. Im Anschluss wurden die kultivierten Embryonen zweimal in kaltem PBS gewaschen und die Hüllen mechanisch entfernt. Für die Proteingewinnung wurden die Blastozysten in 100 µl RIPA aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

2.5.2. DCFH-DA (2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat)-Färbung

Die Bestimmung von ROS mittels der DCFH-DA-Färbung wurde an *ex vivo*-Blastozysten diabetischer und gesunder Kaninchen sowie an *in vitro*-kultivierten Blastozysten durchgeführt.

DCFH-DA wird intrazellulär durch den Einfluss von ROS zu dem grün-fluoreszierenden 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert. Die Fluoreszenz kann über ein Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden oder im Mikroplattenreader durch die Anregung bei der Wellenlänge 485 nm und einer Emission bei der Wellenlänge von 535 nm gemessen werden.

DCFH-DA wurde in einer Stammlösung von 1 mM in DMSO gelöst und lichtgeschützt bei -20 °C gelagert. Die Behandlung der Blastozysten erfolgte im lichtgedimmten Raum. Nach einer kurzen Adaptation an das Kulturmedium wurden die Blastozysten für 30 min in Kulturmedium mit

10 μM DCFH-DA im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Blastozysten zweimal im warmen Kulturmedium gewaschen. Für die *in vitro*-Kultur wurden die Blastozysten für 1 h mit 0, 100 und 250 μM H_2O_2 oder mit 0, 400 und 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ käuflich erworbenem AGE-BSA im Inkubator kultiviert. Nach der Kultur wurden die Blastozysten zweimal im Kulturmedium gewaschen. Die kultivierten Blastozysten und die *ex vivo*-Blastozysten wurden lichtgeschützt und bei Raumtemperatur (RT) für 20 min in 4 % PFA fixiert. Die fixierten Blastozysten wurden einzeln aus dem PFA entnommen, um mechanisch die Keimscheibe auszuschneiden. Die Keimscheiben wurden auf einem Objektträger mit einem Deckgläschen in Mowiol eingebettet und anschließend mit einem Fluoreszenzmikroskop visuell ausgewertet.

2.6. Zellkultur

Zur Etablierung der DCFH-DA-Färbung wurden Vorversuche an der Nierenzelllinie RK13 des Kaninchens durchgeführt.

2.6.1. Kultivierung und Passagieren von RK 13-Zellen

Die im flüssigen Stickstoff gelagerten RK 13-Zellen wurden durch Handwärme kurz angetaut und dann in eine vorbereitete Zellkulturflasche mit 7 ml Kulturmedium überführt. Nachdem die Zellen adhärirt waren, wurde das Medium gewechselt.

Kulturmedium:

MEM Earle's	500 ml
FKS	50 ml
L-Glutamin	6 ml
Penicillin/Streptomycin	6 ml

Die Kultur der adhären wachsenden RK 13-Zellen erfolgte in 50 ml Zellkulturflaschen (*Greiner Bio-One GmbH*) im Brutschrank mit 20 % O_2 und 5 % CO_2 bei 37 °C. Das Kulturmedium wurde alle 2 Tage gewechselt. Bei einer Konfluenz von 100 % wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml CDS (*cell dissociation solution*) und wiederholtem Klopfen von der Zellkulturflasche abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in 7 ml Kulturmedium aufgenommen. Für die neue Kulturflasche wurden 7 ml Medium und 1 ml der Zellsuspension zusammengegeben und durch kreisende Bewegungen der Zellkulturflasche vermischt.

Um RK 13-Zellen einzufrieren bzw. zu lagern, wurden die mit CDS abgelösten Zellen in 3 ml Medium aufgenommen und kurz auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde 10 min bei 1.000 *rpm* zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Kulturmedium mit 1 % DMSO resuspendiert und in ein

Kryoröhrchen überführt. Das Kryoröhrchen wurde über Nacht in einer mit Isopropanol gefüllten Gefrierbox bei -80 °C und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.6.2. Versuchsansätze zur Induktion von oxidativen Stress bei RK 13-Zellen

Für den Versuchsansatz wurden schwarze 96-Well-Platten mit durchsichtigem Boden (*Greiner Bio One*) verwendet. Pro Well wurden 20.000 Zellen eingesetzt. Die Zellzahl wurde durch Auszählen in einer Neugebauer Zählkammer bestimmt. Die über Nacht adhärenierten Zellen wurden einmal in PBS gewaschen und anschließend für 30 min in Medium mit 10 µM DCFH-DA im Brutschrank inkubiert. Das DCFH-DA haltige Medium wurde abgenommen und die Zellen zweimal in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen H₂O₂ im Medium inkubiert. Die Messung der DCF-Fluoreszenz (Anregung/Emission 485/535 nm) wurde unmittelbar nach Zugabe des Stressors im Mikroplattenreader gestartet. Der Verlauf der DCF-Bildung wurde für 3 h in Intervallen von 5 min verfolgt. Als Kontrolle wurden einerseits die Autofluoreszenz der Zellen (ohne DCFH-DA) sowie eine DMSO-Kontrolle gemessen.

2.7. Proteinbiochemie

Die chemische Zellyse der Embryo- und Gewebeproben erfolgte mittels RIPA-Puffer (Kapitel 2.4.1.). Der Puffer wurde bei 4 °C gelagert. Unmittelbar vor dessen Verwendung wurden Phosphatase (2 µl/100 µl)- und Protease (2 µl/100 µl)-Inhibitor hinzugegeben.

2.7.1. Proteinisolation

Die in 100 µl RIPA aufgenommen Embryonen wurden auf Eis aufgetaut und mit einer Spritze homogenisiert. Danach wurden die Proben für 30 min auf Eis inkubiert und bei 13.000 *rpm* und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Das tiefgefrorene Uterusgewebe wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und im pulverisierten Zustand in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde es mit 500 µl RIPA-Puffer versetzt. Den Endometriumproben wurden ohne vorheriges Mörsern 500 µl RIPA-Puffer zugegeben. Der mechanische Zellaufschluss erfolgte mit einem Homogenisator durch beschleunigte Keramikkügelchen für 15 sek bei 1.500 *rpm*. Danach wurden die Proben für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 13.000 *rpm* und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.7.2. Proteinkonzentrationsbestimmung

2.7.2.1. Bradford-Reaktion

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Gewebeproben und Embryonen erfolgte in Doppelbestimmung mittels der Bradford-Reaktion. Dazu wurden 200 µl Bradford-Reagenz, 800 µl *Aqua dest.* und 1 µl Proteinprobe in einem Ansatz gemischt und anschließend für 5 min bei RT inkubiert. Die Absorption wurde am Spektrophotometer bei 595 nm gemessen. Als Leerwert diente ein Ansatz aus 800 µl *Aqua dest.*, 200 µl Bradford-Reagenz und 1 µl RIPA. Die Proteinmenge wurde schließlich an Hand einer Eichkurve, welche mit bekannten Konzentrationen von BSA in RIPA erstellt wurde, errechnet.

2.7.2.2. Bicinchinonsäure-Reaktion

Die Proteinkonzentrationsbestimmung in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit erfolgte mit Hilfe des *Micro BCA Protein Assay Kit*, welcher auf der Methode eines kalorimetrischen Nachweises eines Bicinchinonsäure (BCA)/Cu⁺-Farbkomplexes beruht. Als Kalibrationsstandard diente eine BSA-Verdünnungsreihe in den Konzentrationen 0; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 20; 40 und 200 µg/ml. Zur Messung wurden 10 µl Blastozystenhöhlenflüssigkeit in 140 µl PBS verdünnt und anschließend 150 µl der *Working*-Reagenz hinzugegeben. Die *Working*-Reagenz wurde gemäß den Herstellerangaben hergestellt. Zum Reaktionsablauf wurde der Ansatz für 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Messung der Absorption bei 562 nm im Mikroplattenreader. Die Proteinmenge wurde anhand der Eichkurve der BSA-Verdünnungsreihe errechnet.

2.7.3. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte nach ihrer molekularen Größe in einem Polyacrylamidgel, welches sich aus Sammel- und Trenngel zusammensetzte. Dazu wurden vorgefertigte Gelkassetten der Firma Invitrogen verwendet.

	Sammelgel (5 %)	Trenngel (10 %)
H ₂ O	2,7 ml	4,0 ml
40 % Acrylamid	0,67 ml	3,3 ml
1,5 M Tris (pH = 8,8)	-	2,5 ml
1,0 M Tris (pH = 6,8)	0,5 ml	-
10 % SDS	0,04 ml	0,1 ml
10 % APS	0,04 ml	0,1 ml
TEMED	4 µl	4 µl

Den Proteinproben (25 µg Protein) wurde 5x SDS-Ladepuffer zugegeben, sodass eine Einfachkonzentrierung des Ladepuffers resultierte. Um ein einheitliches Volumen zu erhalten, wurden die Proben mit *Aqua dest.* aufgefüllt. Durch das anschließende Erhitzen für 10 min bei 70 °C und das im Ladepuffer befindliche SDS und β-Mercaptoethanol denaturierten die Proteine vollständig und erhielten eine negative Ladung. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer vertikalen Laufkammer (*NOVEX*, gefüllt mit Elektrophoresepuffer) durch ein gerichtetes elektrisches Feld, in dem die negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode wanderten.

Während des Laufs im Sammelgel wurde eine Spannung von 120 V angelegt. Nach Durchlaufen der Trennschicht wurde die Spannung auf 160 V erhöht. Zur Größenkontrolle wurde ein Proteinmarker (*PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas*) mitgeführt.

<u>10x Elektrophoresepuffer:</u>		<u>5x SDS-Ladepuffer:</u>	
TRIS (250 mM)	30,25 g	Glycerin	25 ml
Glycin (2,5 M)	144,25 g	TRIS-Puffer (1 M, pH = 6,8)	15,62 ml
SDS (10 %)	10 g	β-Mercaptoethanol	5 ml
<i>Aqua dest.</i>	<i>ad 1 l</i>	SDS (10 %)	5 g
		Bromphenolblau	2,5 g
		<i>Aqua dest. ad</i>	50 ml

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

2.7.4. Western Blot

Die Übertragung der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (*Millipore*) erfolgte im elektrischen Feld nach dem *Semidry*-Verfahren. Die mit Transferpuffer getränkten Filterpapiere, die Nitrozellulosemembran und das Polyacrylamidgel wurden nach einem festen Schema zusammengesetzt (siehe Abb. 7). Der zweistündige Blot erfolgte bei einer Spannung von 150 mA. Im Anschluss wurde die Proteinbeladung der Membran durch Ponceau S-Färbung sichtbar gemacht und mit dem *Fusion FX7™ Multi-Imagingsystem* detektiert.

	<u>Transferpuffer I</u>	<u>Transferpuffer II</u>	<u>Transferpuffer III</u>
TRIS	3,3 g (30 mM)	3 g (25 mM)	3 g (25 mM)
Methanol (100 %)	200 ml (20 %)	200 ml (20 %)	200 ml (20 %)
ε-Aminocaprinsäure	-	-	5,2 g (4 mM)
<i>Aqua dest.</i>	<i>ad 1 l</i>	<i>ad 1 l</i>	<i>ad 1 l</i>

2.7.5. Slot Blot

Zur Quantifizierung AGE-modifizierter Proteine in Plasma, Geweben und Embryonen wurde die Slot Blot-Technik angewandt. Dabei wurde ein Proteingemisch ohne vorherige elektrophoretische Auftrennung mit Hilfe des Slot Blot-Apparates durch Unterdruck direkt auf

die Nitrozellulosemembran aufgebracht (siehe Abb. 7). Es wurden jeweils 25 µg Protein für die Analysen verwendet.

Zur Untersuchung der Plasmaproben wurden diese vorher für 10 min bei 1.500 rpm zentrifugiert, um störende Blutfette zu separieren. Anschließend wurde sorgfältig durch die abgelagerte Fettschicht pipettiert, um 25 µg des Plasmaproteins in ein neues Reaktionsgefäß zu überführen.

Das entsprechende Volumen der verschiedenen Proteinmengen wurde mit PBS auf ein Endvolumen von 150 µl aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben im Wasserbad bei 80 °C für 10 min erhitzt. Vor und nach dem Aufbringen der Proben wurden die einzelnen Slots mit jeweils 150 µl PBS gespült. Die Proteinbeladung der Membran wurde mittels Ponceau S-Färbung dokumentiert.

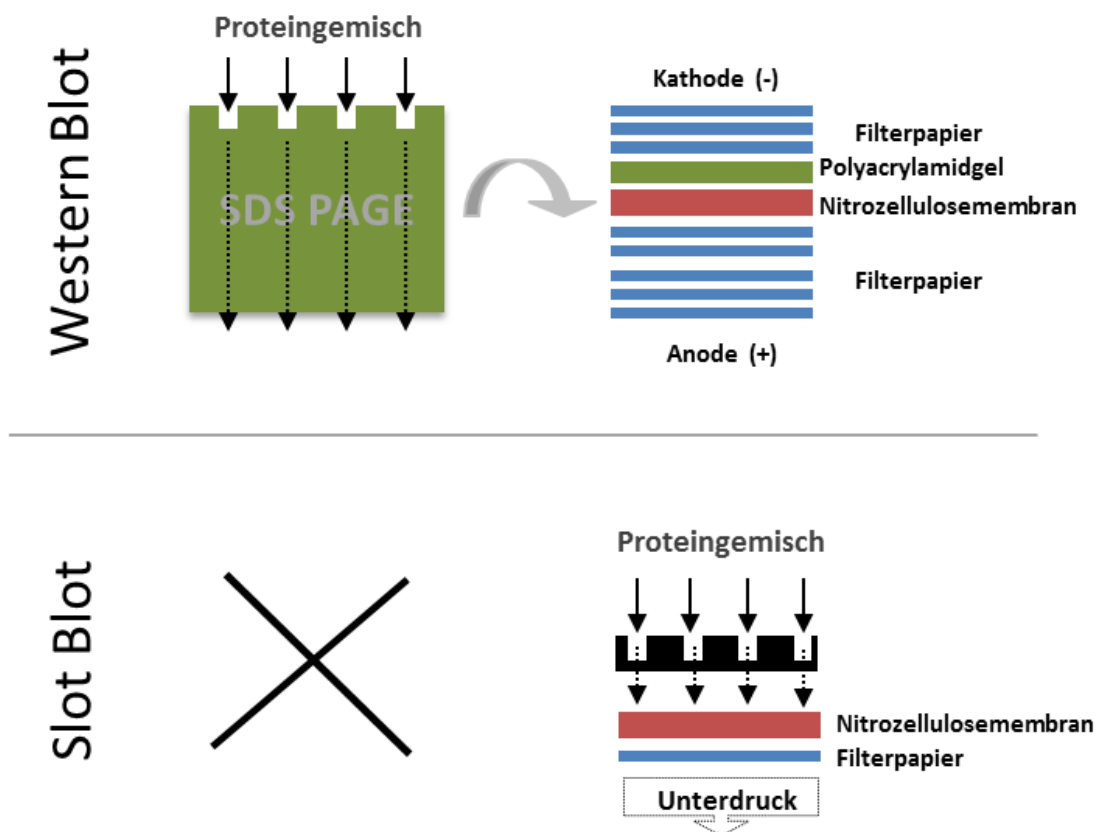


Abb. 7: Schematische Darstellung von Western Blot und Slot Blot.

2.7.6. Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern

Um unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran abzusättigen, erfolgte eine Blockierung mit 5 %-igem Milchpulver in TBS-T für 1 – 2 h bei RT. Danach wurde die Membran

mit dem entsprechenden Primärantikörper (siehe Tab. 4) für 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 5 min in TBS-T wurde die Membran mit einem Peroxidase (HRP)-gekoppelten sekundären Antikörper (siehe Tab. 4) erneut für 1 h bei RT inkubiert. Durch wiederholtes Waschen mit TBS-T für 3x5 min wurde der überschüssige ungebundene Sekundärantikörper entfernt. Vor der Detektion wurde die Membran in TBS gewaschen.

	<u>TBS</u>	<u>TBS-T</u>
1M TRIS-HCL (pH = 7,6)	10 ml	10 ml
NaCl	8,76 g	8,76 g
Tween-20	-	1 ml
<i>Aqua dest.</i>	<i>ad 1 l</i>	<i>ad 1 l</i>

Tab. 4: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für Western Blot und Slot Blot.

Primäre Antikörper	Verdünnung	Firma
Anti-Argpyrimidin, Maus, monoklonal IgG	1:100 in 5 % Milchpulver	<i>Biologo</i>
Anti-Pentosidin, Maus, monoklonal IgG	1:100 in 5 % Milchpulver	<i>Biologo</i>
Anti-CML, Maus, monoklonal IgG	1:100 in 5 % Milchpulver	<i>Biologo</i>
Anti-RAGE, Maus, monoklonal IgG	1:1000 in 5 % Milchpulver	<i>Abcam</i>
Sekundärer Antikörper		
Ziege-anti-Maus, HRP konjugiert	1:10000 in 3% BSA	<i>Dianova</i>

2.7.7. Quantifizierung

Die anschließende Detektion der untersuchten Proteine erfolgte durch Chemilumineszenzmessung mittels einer Luminolsubstratlösung (*Millipore*). Die an den Sekundärantikörper konjugierte HR-Peroxidase katalysierte die Oxidation von Luminol und löste damit eine Chemilumineszenz aus. Diese wurde mit dem *Fusion FX7™ Multi-Imagingsystem* gemessen und mit der dazugehörigen Software *Fusion 15.18.* ausgewertet. Dabei wurde die Intensität der Chemilumineszenz mit der Proteinbeladung (Ponceau S-Färbung) abgeglichen.

2.8. Immunhistochemie

Um AGE-Modifizierungen und den Rezeptor RAGE in Geweben und Embryonen zu lokalisieren, wurden immunhistochemische Methoden angewandt.

2.8.1. Immunhistochemie an Gewebeschnitten

Die Gewebe wurden in Bouin-Lösung fixiert und anschließend am automatischen Einbeter in Paraffin eingebettet. Aus den Paraffinblöckchen wurden mit einem Mikrotom 5 µm dünne

Gewebeschnitte angefertigt und auf einen Objektträger (*Starfrost*[®]) platziert. Anschließend wurden die Schnitte für mindestens 2 h bei 40 °C getrocknet.

Zur Verwendung der Schnitte wurden diese über Nacht bei 60 °C inkubiert um das Paraffin zu lösen. Anschließend wurden die Schnitte durch die absteigende Alkoholreihe geführt, wodurch das Gewebe rehydrierte.

2x Histoclear → Isopropanol → Ethanol 90 % → 80 % → 70 % → 50 % → 30 % → *Aqua dest.*
(5 min pro Lösungsmittel)

Um endogene Peroxidasen zu blockieren wurden die Schnitte für 20 min in einem 3 % H₂O₂ /Methanol-Gemisch lichtgeschützt inkubiert. Unspezifische Antikörperwechselwirkungen wurden durch eine einstündige Inkubation mit 10 % Ziegen Serum in PBS unterbunden. Die Schnitte wurden über Nacht mit dem Primärantikörper (1:100 in 1 % BSA/PBS) bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Schnitte wiederholt in PBS-T gewaschen. Die Bindung des HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-Sekundärantikörpers erfolgte für 1 h bei RT. Die Schnitte wurden anschließend erneut in PBS-T und einmal in reinem PBS gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), welches durch die Peroxidase oxidierte und zur Bildung eines braunen Präzipitates führte. Der Ablauf der Immunreaktion wurde lichtmikroskopisch verfolgt und durch Waschen in H₂O abgestoppt. Anschließend wurden die Zellkerne durch eine fünfminütige Inkubation mit Hämalaun angefärbt. Dem Entwässern der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe folgte die Einbettung mit Histomount.

Zur Kontrolle der spezifischen Bindung des Sekundärantikörpers wurden Schnitte ohne Primärantikörper, nur mit Sekundärantikörper und unter sonst gleichen Bedingungen mitgeführt. Die Waschschritte wurden getrennt voneinander durchgeführt.

Hämalaun nach Mayer (saurer Hämalaun):

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

2.8.2. Immunhistochemie an separierten Keimscheiben

Der Ablauf der Immunhistochemie an Keimscheiben war größtenteils identisch zu dem der Gewebeschnitte. Abweichend wurden die in Methanol gelagerten Keimscheiben direkt für 20 min in 3 % H₂O₂/Methanol inkubiert. Die Waschschritte erfolgten mit PBS + 0,1 % PVA, um ein Verkleben der Keimscheiben zu vermeiden. Vor dem Eindecken erfolgte keine Dehydrierung in einer Alkoholreihe. Zum Eindecken wurde Mowiol verwendet.

<u>Mowiol:</u>	
Glycerin	6,0 g
Mowiol® 4-88 Reagent	2,6 g
TRIS-Puffer (0,2 M, pH = 8,5)	12 ml
<i>Aqua dest.</i>	6 ml

2.9. Bestimmung AGE-spezifischer Fluoreszenzen

Die Messspektren bei den Wellenlängen 330/405 nm und 360/440 nm [Anregung/Emission] gelten als AGE-spezifisch (Schmitt *et al.*, 2005).

Die Messung AGE-spezifischer Fluoreszenzen in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit erfolgte unverdünnt in einer schwarzen Mikrovolumenplatte (*TAKE 3*, Biotek). Zuvor wurde getestet, ob eine Anregung bei 330 nm und 360 nm zu den spezifischen Emissionspeaks führte. Nachdem dies bestätigt werden konnte, wurde die AGE-spezifische Fluoreszenz in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit von Embryonen diabetischer und gesunder Mütter quantifiziert. Die Messung erfolgte jeweils in Doppelbestimmung mit 2 µl unverdünnter Probe.

2.10. Bestimmung freier AGEs in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit mittels HPLC/MS

In Vorbereitung auf die Messung wurden Pools an Blastozystenhöhlenflüssigkeit von 5 – 7 Blastozysten verschiedener Muttertiere gesammelt und bei -80 °C gelagert. Die Bestimmung freier AGEs und oxidierter Metabolite sowie die Quantifizierung von freiem CML in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit erfolgten in Zusammenarbeit mit Herrn Christian Henning aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Marcus A. Glomb am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Halle. Dazu wurde ein von der Arbeitsgruppe etabliertes Verfahren angewandt, welches auf der Verwendung von Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung basiert. Die Blastozystenhöhlenflüssigkeit wurde ohne weitere Vorbehandlung 1:10 verdünnt untersucht.

2.11. Bestimmung von Methylglyoxal und Glyoxal mittels HPLC

Die Quantifizierung von Methylglyoxal und Glyoxal wurde in Kooperation mit Herrn Dr. Alexander Navarette Santos aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Andreas Simm in der Klinik für Herz-Thorax-Chirurgie des Universitätsklinikums Halle durchgeführt und richtete sich nach der Methode von Espinosa-Mansilla (Espinosa-Mansilla *et al.*, 2007).

Zur Messung wurden Plasmaproben einzelner Kaninchen und Blastozysten eingesetzt. 10 – 11 Embryonen von mindestens 2 Muttertieren pro Versuch wurden gepoolt und nach Bestimmung

der Proteinkonzentration in gleichen Konzentrationen zur Messung eingesetzt. Die Proteine der Plasma- und Embryonenproben wurden anschließend durch Trifluoressigsäure (TFA, 1/10 des Probenvolumens) gefällt. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis wurden die Proben bei 13.000 *rpm* für 10 min zentrifugiert. 100 µl des gewonnenen Überstands wurden mit HPLC-Wasser auf 1 ml aufgefüllt und anschließend mit 0,125 ml Ammoniumchlorid (0,5 M; pH = 10) und 2,5 ml 5,6-Diamino-2,4-hydroxypyrimidinsulfat (DDP; 0,75 mM) versetzt. Unter konstantem Schütteln wurden die Proben für 90 min bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis heruntergekühlt und mit Citratpuffer (10 mM; pH = 6,0) auf 25 ml aufgefüllt. Der Gehalt an Methylglyoxal und Glyoxal in den Proben wurde anschließend über die HPLC bestimmt. Zur Erstellung einer Standardkurve wurde kommerziell erworbenes reines Methylglyoxal und Glyoxal (40 % wässrige Lösung) mit HPLC-Wasser in einer Konzentrationsreihe von 0, 100, 300, 900 und 2.700 nM verdünnt.

2.12. Messung der proteasomalen Aktivität

Der Aktivitätsnachweis des 20 S-Proteasoms erfolgte in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Tilman Grune im Institut für Ernährungstoxikologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Die Methode basiert auf dem Abbau von Fluoropeptiden. Als Fluorophor diente hierbei Aminomethylcumarin (AMC), welches in freier, nicht peptidgebundener Form fluoresziert. Die Spezifität der einzelnen Substrate für unterschiedliche Proteasen ist durch die Art und Zahl der einzelnen Aminosäuren des Peptids bedingt. Bei der Messung der 20 S-Proteasomenaktivität in den 6 Tage alten Blastozysten wurde der Abbau des Fluoropeptids Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Suc-LLVY-MCA) gemessen. Das vom AMC ausgehende Fluoreszenzsignal korreliert positiv mit der proteolytischen Aktivität des 20 S-Proteasoms.

In Vorbereitung wurden 10 – 12 Blastozysten in 70 µl Lysepuffer aufgenommen, mit einer Spritze homogenisiert, anschließend 4 mal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und jeweils bei 37°C wieder aufgetaut. Die Proben wurden für 10 min mit 13.000 *rpm* bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand als Zelllysat bei -80 °C bis zu weiterer Verwendung gelagert.

Lysepuffer:

Sucrose	250 mM
HEPES	25 mM
Magnesiumchlorid	10 mM
EDTA	1 mM
DTT (Dithiothreitol)	1,7 mM

Es wurden jeweils 10 µl Zelllysat entnommen und mit 120 µl der Stammlösung für 10 min bei RT schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde das Peptidsubstrat Suc-LLVY-MCA hinzugegeben und die Platte bei 37 °C lichtgeschützt für mindestens 30 min inkubiert. Die Substratspaltung wurde durch Fluoreszenzmessung bei einer Anregung von 360 nm und einer Emission bei 460 nm im Mikroplattenreader bestimmt. Für das Erstellen einer Eichgerade wurde nicht-peptidgebundenen, fluoreszierendes AMC benutzt. Die Proteasomaktivität als Summe der Aktivitäten von Lysat und Zellüberstand ist jeweils in pmol MCA-Umsatz pro mg Protein in der Minute angegeben. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford bestimmt.

Stammlösung:

TRIS Puffer (pH = 7,8)	225 mM
Potassiumchlorid	45 mM
Magnesiumacetat	7,5 mM
Magnesiumchlorid	7,5 mM
DTT	1 mM

2.13. RNA-Analytik

Zum Schutz vor RNAsen wurde ausschließlich Diethylpyrocarbonat-behandeltes, destilliertes Wasser (*DEPC-Aqua dest.*) verwendet. Alle Reaktionsgefäße wurden bei 180 °C hitzebehandelt und Kunststoff-Reaktionsgefäße wurden autoklaviert.

DEPC-Aqua dest.:

Aqua dest.

0,1 % Diethylpyrocarbonat → vierstündige Inkubation, anschließend zweimaliges Autoklavieren

2.13.1. RNA-Isolierung und cDNA-Synthese am Gewebe

Das tiefgefrorene Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und im pulverisierten Zustand in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das Gewebematerial in 800 µl Guanidiniumthiocyanat Hydrochlorid (GTC)-Lösung aufgenommen und mittels des *Ultra-Turrax® T25* mechanisch homogenisiert. Den Proben wurde 80 µl Natriumacetat (2 M, pH = 4,0) hinzugegeben, dann wurde kurz gemischt und anschließend wurden 800 µl Phenol und 200 µl Chloroform hinzugegeben. Nach kräftigem Mischen wurden die Proben für 20 min auf Eis inkubiert. Durch die anschließende Zentrifugation (30 min, 13.000 rpm, 4 °C) erfolgte die Phasentrennung in eine untere organische Phase, eine Interphase und eine wässrige obere Phase. Die Oberphase, welche die RNA enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Die Fällung erfolgte bei -80 °C für 30 min. Danach wurden die Proben für 30 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet zwei- bis dreimal mit 1 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen. Anschließend

wurde das Pellet für 5 min in einem Rotations-Vakuum-Konzentrator *RVC 2-18* getrocknet und in 50 µl DEPC-*Aqua dest.* gelöst. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C. Die Konzentration der RNA wurde mittels des *NanoVue*-Spektrometers bestimmt.

Guanidiniumthiocyanat Hydrochlorid (GTC)-Lysepuffer:

GTC	4 M
Natriumcitrat	25 mM
Natrium Lauroylsarcosinat	100 mM

→ Vor dem unmittelbaren Gebrauch der Lösung wurden 270 µl β-Mercaptoethanol zu 50 ml GTC-Lösung hinzugegeben.

Um zur RNA komplementäre DNA (cDNA) zu gewinnen, wurde eine Reverse Transkription (RT-PCR) durchgeführt. Dazu wurden 3 µg isolierte RNA mit 1 µl Random Primer (1 µmol) auf ein Gesamtvolumen von 11,5 µl mit DEPC-*Aqua dest.* aufgefüllt und für 5 min bei 65 °C im Thermocycler erhitzt. Dabei erfolgte die Anlagerung der Primer. Für den Ablauf der RT-PCR wurden auf Eis folgende Komponenten zusammengefügt:

5x Reaktionspuffer	4 µl	<u>Synthesebedingungen</u>
10 mM dNTP-Mix	2 µl	10 min 25 °C
RNase-Inhibitor	0,5 µl	60 min 42 °C
Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1 µl	10 min 70 °C

Der Ansatz wurde nach der Reaktion mit 80 µl Nuklease-freiem *Aqua dest.* auf 100 µl aufgefüllt und anschließend bei -20 °C gelagert.

Nuklease-freies *Aqua dest.*: *Aqua dest.* wurde in für 20 min mit UV-Licht bestrahlt und anschließend autoklaviert.

2.13.2. mRNA-direkt-Isolation und cDNA-Synthese bei Embryonen

Die RNA-Isolation aus einzelnen Embryonen erfolgte mit dem *Dynabeads® mRNA Direct™ Kit*. Über die kovalent an die Oberfläche gebundenen Oligo(dT)₂₅-Reste der magnetischen Dynabeads konnte die mRNA, welche über ihren Poly-A Schwanz bindet, direkt isoliert werden. Die in PBS-gelagerten Blastozysten (Kapitel 2.4.1.) wurden für 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das überschüssige PBS wurde abgenommen und das Pellet anschließend in 150 µl Lysepuffer resuspendiert. Es folgte eine 10-minütige Inkubation auf einem Schüttler bei RT. Währenddessen wurde die Dynabeadslösung wiederholt mit Bindepuffer gewaschen.

Pro Embryo wurden 13 µl Dynabeadslösung zugegeben und anschließend zweimal mit 100 µl Puffer A und dreimal mit 100 µl Puffer B mit dem *Magnetic Particle Concentrator* gewaschen. Der Waschüberstand wurde abgenommen und die Dynabeadslösung mit der gebundenen mRNA mit 11 µl Nuklease-freiem *Aqua dest.* versetzt. Durch 3-minütiges Erhitzen auf 65°C wurden die

Oligo(dT)₂₅-Reste der Dynabeads von der mRNA gelöst. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, um ein erneutes Binden der mRNA an die Dynabeads zu verhindern.

Lysepuffer (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 (0,1 M)	38,56 mg

Bindepuffer (50 ml):

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

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

Für die cDNA-Synthese wurde die gesamte mRNA-Menge der Embryonen eingesetzt. Der Ansatz war wie folgt:

10x PCR-Puffer (Mg ²⁺ -frei)	2 µl	<u>Synthesebedingungen</u>
50 mM MgCl ₂	2 µl	10 min 25 °C
10 mM dNTP	2 µl	60 min 42 °C
Random Primer	1 µl	5 min 99 °C
Reverse Transkriptase (200 U/µl)	0,5 µl	
RNase-Inhibitor (40 U/µg RNA)	0,2 µl	
<i>Aqua dest. ad</i>	9 µl	

Die Proben wurden mit *Aqua dest.* auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt und bei -20 °C gelagert.

2.13.3. DNase-Verdau

Verunreinigungen der RNA durch genomische DNA wurden durch einen enzymatischen Verdau beseitigt.

Der Ansatz pro 10 µg RNA war wie folgt:

10x Puffer mit MgCl ₂	3 µl
RNase-Inhibitor	0,5 µl
DNase I	2 µl
DEPC- <i>Aqua dest.</i>	<i>ad</i> 25 µl

Die Reaktion erfolgte bei 37 °C und wurde nach 30 min durch Zugabe von 3 µl *RQ1 DNase Stop Solution* und 10-minütiges Erhitzen auf 65 °C abgestoppt. Der Zustand der RNA wurde auf einem 1,2 %-iges Agarosegel kontrolliert. Eine Kontroll-PCR mit dem Referenz-Gen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) diente dem Ausschluss genomischer DNA. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

2.13.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde eingesetzt, um die Effizienz der cDNA-Synthese zu kontrollieren (1 µl cDNA) und um Genexpressionen qualitativ nachzuweisen (4 µl cDNA). Die Kontrolle der cDNA-Synthese erfolgte über die Amplifizierung des Referenzgens *GAPDH* (verwendete Primerpaare siehe Tab. 5). Bei jedem Ansatz wurden eine Negativ- und eine Positivkontrolle mitgeführt.

Folgende Komponenten wurden auf Eis zusammengegeben:

10x PCR-Puffer	5 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	0,5 µl
Primer vorwärts (10 µM)	0,5 µl
Primer rückwärts (10 µM)	0,5 µl
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µL)	0,125 µl
cDNA	1 µl oder 4 µl
<i>Aqua dest.</i>	<i>ad 25 µl</i>

Der Ablauf der PCR wurde im *Thermocycler T3000* unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Initialisierung	3 min	94 °C	} 40 Zyklen
Denaturierung	45 sek	94 °C	
Primerbindung	45 sek	60 °C	
Kettenverlängerung	1 min	72 °C	
Finale Kettenverlängerung	10 min	72 °C	

Der Reaktionsansatz wurde im Anschluss in einem 1,8 %-iges Agarosegel aufgetrennt, um das gewünschte Produkt gemäß seiner spezifischen Fragmentlänge zu identifizieren.

Tab. 5: Verwendete Primerpaare.

(bp = Basenpaare, T_m = Temperatur für Primerbindung)

Gen		Gensequenz 5'–3'	Produktgröße (bp)	T_m (C°)	Zyklen
<i>GAPDH</i>	fw	GCCGCTTCTCTCGTGACG	144	60 °C	40
	rev	ATGGATCATTGATGGCGACAACAT			
<i>AGER</i>	fw	GCTACTGCTCCACCTTCTGG	182	62 °C	40
	rev	GCAGTCAGAGCTGATGGTGA			

2.13.5. Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)

Die RT-qPCR ermöglicht durch den Einsatz eines Fluoreszenzfarbstoffes (*SYBR® Green*) und eines speziellen Gerätes (*StepOnePlus™ Real Time PCR-System*) die Amplifikation der PCR-Produkte schon während des Ablaufes der PCR zu detektieren. Zielgen der Untersuchung war *AGER*. Als interne Referenz diente das Referenz-Gen *GAPDH* (verwendete Primerpaare siehe Tab. 5). Um eine Verunreinigung des Ansatzes auszuschließen, wurde anstelle der cDNA eine

Negativkontrolle mit DEPC-*Aqua dest.* mitgeführt. Als Referenz wurde Plasmid-DNA in einer Verdünnungsreihe von 10^4 – 10^8 Molekülen mitgeführt, die das entsprechende PCR-Produkt enthielt (Kapitel 2.13.7.6.). Der Standard wurde mit denselben genspezifischen Primern zeitgleich mit den Proben in der RT-qPCR amplifiziert. Um zu gewährleisten, dass nur ein PCR-Produkt entsteht, wurde stets eine Schmelzpunktanalyse der PCR-Produkte durchgeführt.

Die RT-qPCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

⇒ 5 min	95 °C	Initialisierung	} 40 Zyklen
⇒ 10 sec	95 °C	Denaturierung	
⇒ 15 sec	60 °C (<i>GAPDH</i>)	Primerbindung	
	62 °C (<i>AGER</i>)		
⇒ 20 sec	72 °C	Kettenverlängerung	
Erstellen einer Schmelzkurve von 55 °C bis 95 °C im Intervall von 0,5 °C			

Die Auswertung der Messdaten erfolgte über den C_T -Wert (*threshold cycle*, Zyklenzahl) der Proben. Der C_T -Wert beschreibt den Wert, bei dem die Reporter-Fluoreszenz erstmalig die Hintergrundfluoreszenz überschreitet und damit den Startpunkt des exponentiellen Wachstums angibt. Der C_T -Wert wurde mit Hilfe einer über den Standard ermittelten Regressionsgeraden in die entsprechenden Molekülzahlen umgerechnet. Die Berechnung der relativen Transkriptmenge des Zielgens erfolgte in Bezug auf das Referenzgen GAPDH.

2.13.6. Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA und RNA

DNA (PCR-Produkte, Plasmide, Restriktionsfragmente) und RNA wurden je nach Anzahl der Basenpaare im 1-2 %-igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Separation erfolgte in einer horizontalen Gelkammer in 1x TAE-Puffer. Dazu wurden die Proben mit jeweils 3 µl Ladepuffer versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen. Durch das im Gel befindliche Ethidiumbromid konnten RNA und DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Dokumentation und Auswertung erfolgte über die *BioCaptMW*-Software. Zur Größenbestimmung wurde 1 µl eines 100 bp Größenmarkers im Gel mitgeführt.

Um für die Auftrennung von RNA eventuell vorhandene RNasen zu inhibieren, wurden Gelkammer und -schlitten sowie der Taschenkamm zuvor 15 min in 3 %-igem H_2O_2 inkubiert. Die Herstellung von 1x TAE Puffer erfolgte mit DEPC-*Aqua dest.*

Agarosegel

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

Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer aufgekocht. Nach Abkühlung erfolgte die Zugabe von Ethidiumbromid.

<u>10x TAE-Puffer (TRIS-Acetat-EDTA):</u>		<u>6x Ladepuffer:</u>	
TRIS	48,4 g	Glycerin	3 ml
Essigsäure (konzentriert)	11,4 ml	1x TAE-Puffer	7 ml
EDTA (0,5 M; pH = 8,0)	20 ml	Xylencyanol	0,025 g
<i>Aqua dest.</i>	<i>ad 1 l</i>		

2.13.7. Klonierung von PCR-Fragmente

Das PCR-Fragment von *AGER* wurde unter UV-Licht aus dem Agarose-Gel herausgeschnitten. Zur Orientierung diente der Größenmarker. Die Isolierung des DNA-Fragments aus dem Agarose-Gel erfolgte mittels des *QIAquick® Gel Extraction Kit* gemäß dem Herstellerprotokoll.

2.13.7.1. Ligation

Die Ligation wurde mit dem *p-GEM-T*-Vektor durchgeführt. Pro Reaktion wurden 8 µl gereinigtes PCR-Produkt eingesetzt. Das mit der Taq-DNA-Polymerase amplifizierte PCR-Produkt besitzt einen 3'-A-Überhang, welcher an den komplementären 3'-T-Überhang des *p-GEM-T*-Vektors bindet. Die Reaktion wurde über Nacht bei 12 °C mit folgendem Ansatz durchgeführt:

2x Rapid Ligationspuffer	10 µl
<i>p-GEM-T</i> -Vektor (50 ng/µl)	1 µl
T4 DNA-Ligase (3 U/µl)	1 µl
PCR-Produkt	8 µl

2.13.7.2. Transformation

Kompetente *Escherichia coli* XL-1 *blue* Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit dem Ligationsansatz sorgfältig vermischt. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis wurden die Zellen bei 42 °C für 45 sec hitzegeschockt und anschließend für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 400 µl LB-Medium (ohne Ampicillin) wuchsen die Zellen für 1 h bei 37 °C im Schüttelinkubator. Danach wurden jeweils 50, 100 und 200 µl des Ansatzes auf unterschiedlichen Selektionsplatten ausplattiert und die Platten über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

<u>LB-Medium (pH = 6,4 - 7,5):</u>	
Pepton	10 g
Natriumchlorid	10 g
Hefeextrakt	5 g
<i>Aqua dest.</i>	<i>ad 1 l</i>

→ Das zusammengestellte Medium wurde autoklaviert.

Agarplatte:

Dem oben genannten flüssigen LB-Medium wurde vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar-Agar hinzugefügt. Vor dem Gebrauch wurde dies erwärmt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Zu 200 ml Medium wurden 4 ml Ampicillin, 800 µl X-Gal und 80 µl IPTG hinzugefügt. Die Petrischalen wurden gefüllt. Die ausgehärteten Agarplatten wurden im Kühlschrank gelagert.

Stammlösungen:

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

2.13.7.3. Selektion und Isolation von Plasmiden aus Escherichia coli

Gemäß der Blau-Weiß-Selektion wurden weißen Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte gepickt und in 5 ml LB-Medium mit 0,1 mg/ml Ampicillin gegeben. Die Bakterien wuchsen über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator an. Die Isolation der Plasmide erfolgte mit Hilfe des *peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I*.

2.13.7.4. Restriktionsverdau von Plasmiden

Zur Kontrolle der Klonierung und der Größe des Inserts wurden die rekombinanten Plasmide durch Restriktionsverdau mit zwei Endonukleasen (ApaI und SacI) geschnitten. Für die Enzyme ApaI und SacI gibt es in der *multiple cloning site* jeweils eine spezifische Schnittstelle im Vektor.

Restriktionsansatz:

ApaI (10 U/µl)	0,5 µl
SacI (10 U/µl)	0,5 µl
Puffer B ⁺	1 µl
Plasmid-DNA	3 µl
<i>Aqua dest. ad</i>	10 µl

Der Plasmidverdau erfolgte für 1 h bei 37 °C im Wasserbad. Nach der Restriktion wurde der gesamte Ansatz auf ein 1,8 %-iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die erhaltenen Fragmente waren 80 Basenpaare länger als das eigentliche Produkt, da bei dem Verdau auch ein Teil der *multiple cloning site* des Vektors ausgeschnitten wurde.

Zur längerfristigen Aufbewahrung rekombinanter Klone wurde eine Glycerinkultur angelegt. Dafür wurden 600 µl der Übernachtskultur und 400 µl Glycerin in einem 2 ml-Reaktionsgefäß gründlich vermischt, für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.13.7.5. Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten erfolgte mit dem *Big Dye® Terminator v 1.1 Cycle 6Sequencing Kit*.

Big Dye® Terminator v 1.1 Cycle Sequencing RR24	2,0 µl
Big Dye® Terminator v 1.1 v 3.1 5x Sequencing Buffer	1,5 µl
T7.2-Primer (5 pM)	0,5 µl
<i>Aqua dest.</i>	4 µl
Plasmid	2 µl

Die Reaktion wurde im Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

⇒ 1min	96 °C	Initialisierung	
⇒ 10sec	96 °C	Denaturierung	} 25 Zyklen
⇒ 15sec	55 °C	Primerbindung	
⇒ 4min	60 °C	Kettenverlängerung	

Nach der Sequenzierungsreaktion erfolgte die Aufreinigung des Produktes. Dafür wurden 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 das erhaltene Präzipitat zweimal mit 70 %-igen Ethanol gewaschen und dabei einmal für 20 min und einmal für 10 min bei 13.000 *rpm* und 4 °C zentrifugiert. Der restliche Ethanol wurde abgenommen und die Proben 5 min vakuumgetrocknet. Die automatische Auftrennung am *ABI 3100 Genetic Analyzer C* der Firma *Applied Biosystems* wurde durch den Sequenzierservice im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität Halle (Saale) vorgenommen. Anschließend wurden die Sequenzdaten mit der Software *GeneRunner® V. 3.05* ausgewertet. Die Sequenzanalyse erfolgte mit Hilfe des *Nucleotide Basic Local Alignment Search Programs (BLASTn)*.

2.13.7.6. Herstellung des Plasmidstandards

Das PCR-Fragment von *AGER* wurde mit den spezifischen Primern (verwendete Primerpaare siehe Tab. 5) amplifiziert. Die Amplifikate wurden aufgereinigt, in das Plasmid kloniert und sequenziert. Die Konzentration der Plasmide wurde in Doppelbestimmung spektrophotometrisch am *NanoVue Plus Spectrophotometer* ermittelt. Für das Plasmid wurde anschließend eine Verdünnungsreihe in Zehnerschritten von 10^8 – 10^4 Molekülen in *Aqua dest.* hergestellt, welche als DNA-Standard für die RT-qPCR diente. Der Standard wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.14. Statistische Analysen

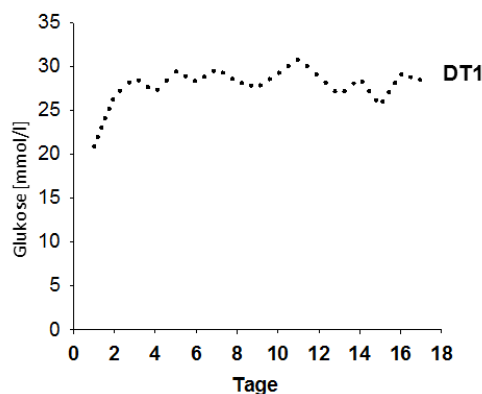
Für die statistischen Auswertungen der Daten wurde *SigmaPlot® 11* verwendet. Die Daten wurden auf Normalverteilung geprüft und mit dem t-Test ausgewertet. Die verschiedenen

Signifikanzniveaus wurden wie folgt gekennzeichnet: Irrtumswahrscheinlichkeit p kleiner 5% als $p^* < 0,05$, kleiner 1% als $p^{**} < 0,01$ und kleiner 0,1% als $p^{***} < 0,001$. Die Werte der Messungen wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (MM \pm SEM) angegeben. Es wurden folgende Symbole verwendet: MW = Mittelwert, SEM = Standardfehler des Mittelwertes, n = Zahl der Versuchsgruppen, N = Zahl der unabhängigen Versuche.

3. Ergebnisse

Die diabetischen Kaninchen wurden 16 – 18 Tage im hyperglykämischen Zustand gehalten. Der Blutzuckerwert wurde täglich bestimmt und dokumentiert (siehe Abb. 8 A). Der durchschnittliche mittlere Blutzuckerwert war bei Alloxan-behandelten Tieren 4,5-fach höher im Vergleich zu den gesunden Tieren (MW \pm SEM; gesund: $6,2 \pm 0,1$ mmol/l; DT1: $27,6 \pm 0,5$ mmol/l, $p < 0,001$; siehe Abb. 8 B).

A) Verlauf der Blutglukose



B) gemittelte Blutglukosewerte

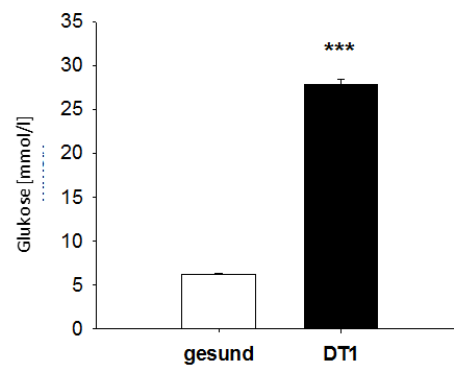


Abb. 8: Blutglukosewerte im Blutplasma diabetischer (DT1) und gesunder Kaninchen.

(A) Blutglukosewerte bei Kaninchen nach Behandlung mit Alloxan (Tag 0), über den Tag der Verpaarung (Tag 10 – 12) und während der Schwangerschaft (Tag 10/12 – 16/18).

(B) Mittlere Blutglukosewerte am Tag 6 *p.c.* bei diabetischen (DT1) und gesunden Kaninchen. Die Ergebnisse sind als MW \pm SEM mit *** $p < 0,001$ dargestellt.

3.1. Glyoxal und Methylglyoxal im Blutplasma diabetischer Kaninchen

Die Konzentrationen der AGE-Bildner Glyoxal und Methylglyoxal im Blutplasma wurden mittels HPLC anhand eines internen Standards bestimmt (siehe Anhang 7.6. Standard der Methylglyoxal- und Glyoxalbestimmung).

Die Methylglyoxalkonzentration war bei diabetischen und gesunden Tieren vergleichbar (MW \pm SEM; gesund: $5,0 \pm 0,4$ μ M, DT1: $5,4 \pm 0,6$ μ M; siehe Abb. 9). Die Glyoxalkonzentration war bei diabetischen Kaninchen tendenziell erhöht (MW \pm SEM; gesund: $0,42 \pm 0,06$ μ M, DT1: $0,6 \pm 0,08$ μ M, $p = 0,055$).

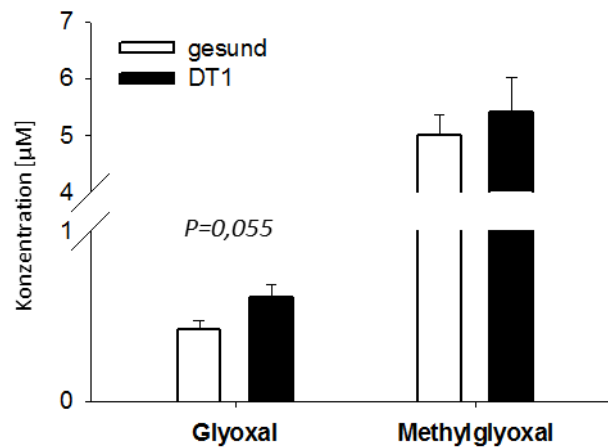


Abb. 9: Glyoxal- und Methylglyoxalkonzentration im Blutplasma diabetischer (DT1) und gesunder Kaninchen.

Die Konzentration von Glyoxal und Methylglyoxal wurde mittels HPLC quantifiziert. Die Ergebnisse sind als MW \pm SEM dargestellt. N = 3; n = 6; *p* wie angegeben.

3.2. Argpyrimidin, CML und Pentosidin im Blutplasma diabetischer Kaninchen

Eine diabetische Stoffwechselstörung ist mit steigender Plasma-AGE-Bildung assoziiert. Erhöhte Konzentrationen an Glukose, Glyoxal und Methylglyoxal können den Ablauf der nicht-enzymatischen Glykierungsreaktion forcieren.

Um die endogene AGE-Bildung im diabetischen Kaninchen zu validieren, wurde mittels Slot Blot die Proteinglykierung im Blutplasma bestimmt.

Die diabetischen Kaninchen hatten signifikant höhere Plasma-AGE-Werte im Vergleich zu den gesunden Tieren (siehe Abb. 10 A). Das proteingebundene AGE Pentosidin war um 70 %, proteingebundenes CML und Argpyrimidin waren um ca. 40 % erhöht.

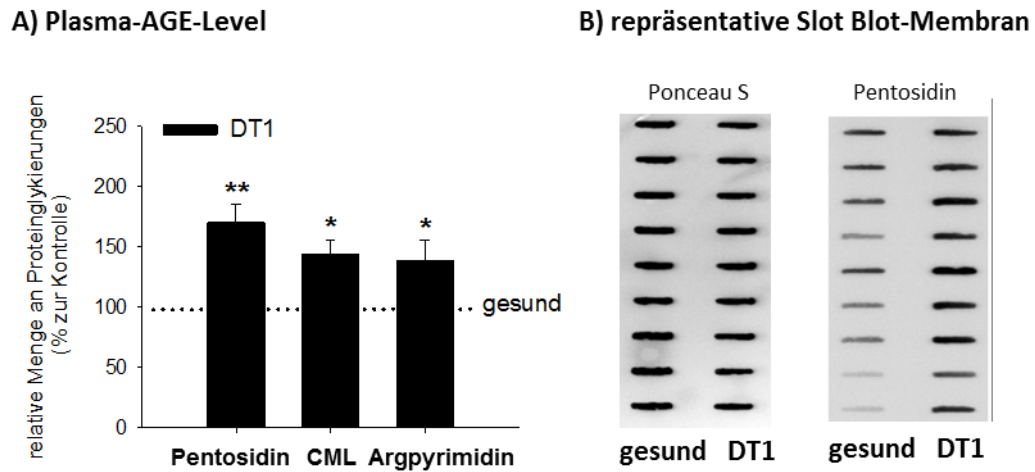


Abb. 10: Relative Menge proteingebundener AGEs im Blutplasma diabetischer (DT1) und gesunder Kaninchen am Tag 6 p.c..

(A) Relative Menge an proteingebundenem Pentosidin, CML und Argpyrimidin (gesund = 100 %). Die semiquantitative Analyse erfolgte mittels Slot Blot. Die Menge modifizierter Proteine wurde auf die Proteinbeladung der Nitrozellulosemembran (Ponceau S-Färbung) normiert. Die Ergebnisse sind als MW \pm SEM dargestellt. N = 3, n = 9; *P < 0,05 **P < 0,01. Eine repräsentative Slot Blot-Membran für Pentosidin-modifizierte Proteine ist in (B) dargestellt.

3.3. AGE-Modifikationen im Uterus der Kaninchen

Die Bestimmung der Proteinglykierung mittels Slot Blot erfolgte einerseits an Proben des kompletten Uterus mit Endometrium und Myometrium, andererseits an reinen Endometriumproben.

In beiden Untersuchungsmaterialien war kein Unterschied in der Menge der proteingebundenen AGEs Argpyrimidin, CML oder Pentosidin zwischen diabetischen und gesunden Tieren messbar (siehe Abb. 11).

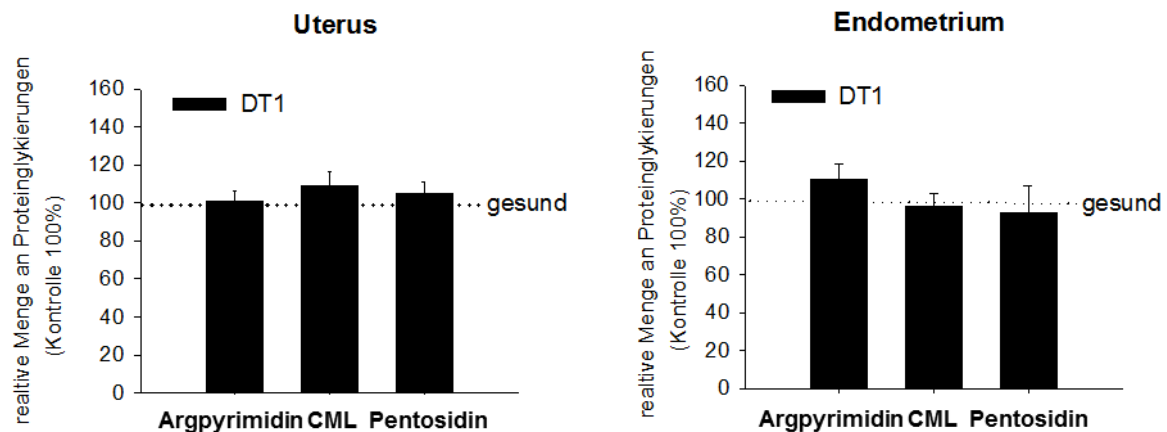


Abb. 11: Relative Menge proteingebundener AGEs im Uterus und im Endometrium diabetischer (DT1) und gesunder Kaninchen.

Relative Menge an proteingebundenem Argpyrimidin, CML und Pentosidin (gesund = 100 %). Die semiquantitative Analyse erfolgte mittels Slot Blot. Die Menge modifizierter Proteine wurde auf die Proteinbeladung der Nitrozellulosemembran (Ponceau S-Färbung) normiert. Die Ergebnisse sind als MW \pm SEM dargestellt. N = 3; n = 9.

Um AGEs im Uterus der Kaninchen zu lokalisieren und um weitere AGE-Modifikationen zu erfassen, wurde die Immunhistochemie angewandt (siehe Abb. 12). Dabei wurden AGE-spezifische Antikörper verwendet, die neben Proteinglykierungen AGE-Modifikationen an Lipiden, Nukleinsäuren und freie AGEs detektieren.

Argpyrimidin war zytoplasmatisch lokalisiert. Es zeigte sich eine Färbung des Endometriums mit Epithel und Stroma sowie des Myometriums.

CML war zytoplasmatisch lokalisiert und zeigte eine Färbung im endometrialen Epithel und im Myometrium.

Pentosidin zeigte neben einer zytoplasmatischen Färbung auch eine Kernfärbung. Pentosidin war stark im Epithel des Endometriums vorhanden.

Die Uteri diabetischer Kaninchen wiesen im endometrialen Epithel eine deutlich stärkere Färbung für Argpyrimidin, CML und Pentosidin als die gesunden Tiere auf.

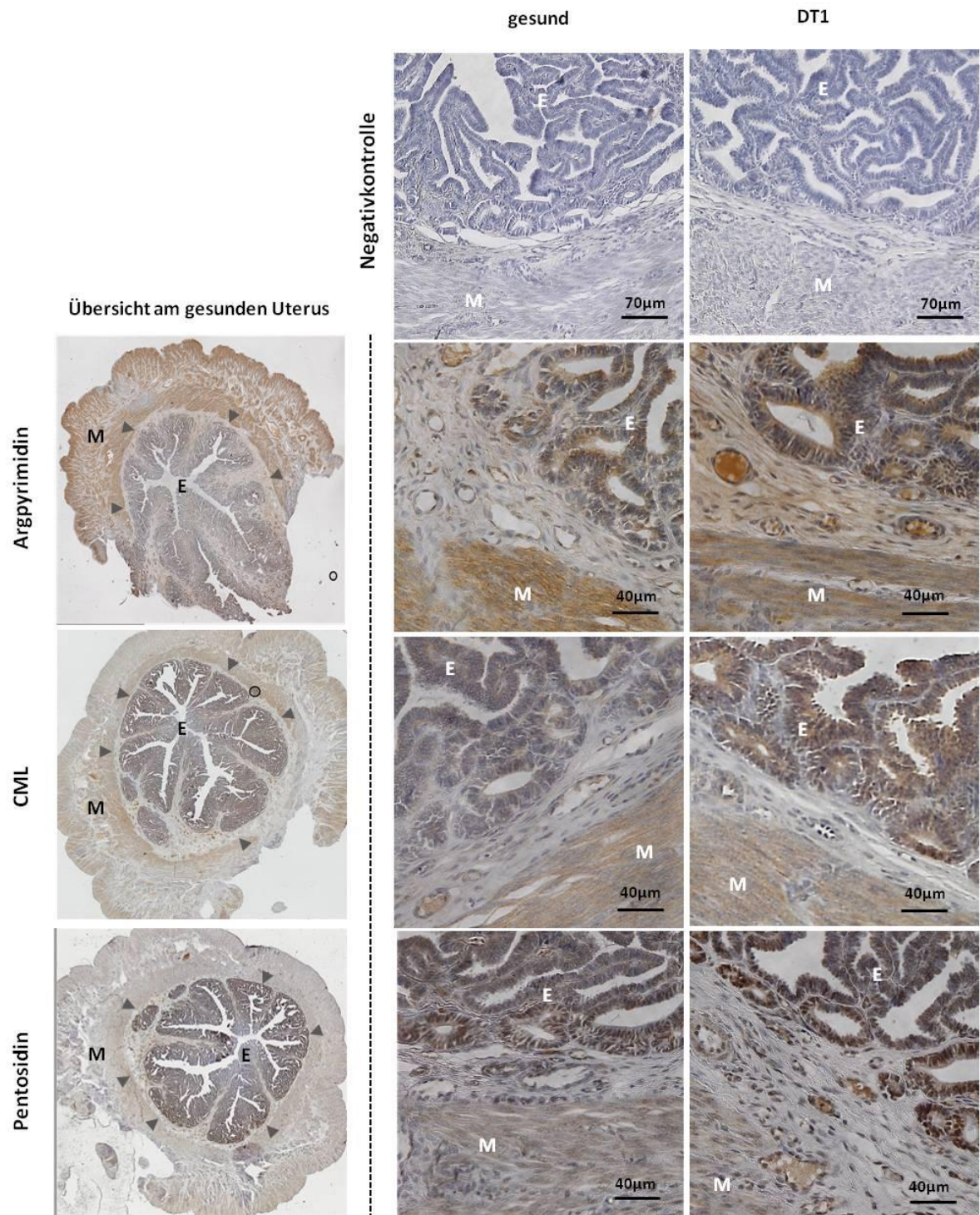


Abb. 12: Immunhistochemischer Nachweis von AGEs im Uterus diabetischer (DT1) und gesunder Kaninchen.

Die Übersicht zeigt den Uterus am gesunden Kaninchen. Die Pfeilspitzen markieren die Grenze zwischen Endometrium (E) und Myometrium (M). Die Braunfärbung markiert die Positivreaktion für Argpyrimidin, CML und Pentosidin. Die Kerne wurden durch Hämalaun blau angefärbt. Die Negativkontrolle zeigt die Kontrollreaktion des Sekundärantikörpers ohne einen spezifischen Primärantikörper. Die dargestellte Immunhistochemie ist repräsentativ für 3 Uteri pro Gruppe (N=3; n = 9).

3.4. AGE-Modifikationen im Ovar der Kaninchen

Ein AGE-Vorkommen im Ovar, und speziell in den Oozyten, wurde in der Immunhistochemie untersucht (siehe Abb. 13).

Die Färbung für **Argpyrimidin** und **Pentosidin** war in allen Kompartimenten des Ovars (Rinde, Stroma, Gelbkörper, Follikel) zu finden.

CML wurde hauptsächlich in den interstitiellen steroidogenen Zellen lokalisiert und nur wenig in den Follikeln sowie in den Eizellen.

Der Vergleich der Ovarien gesunder und diabetischer Tiere zeigte keine Unterschiede in der Verteilungs- und Färbungsintensität. Zur Illustration sind deshalb in Abb. 13 nur die Ausschnitte der Ovarien der gesunden Kaninchen dargestellt.

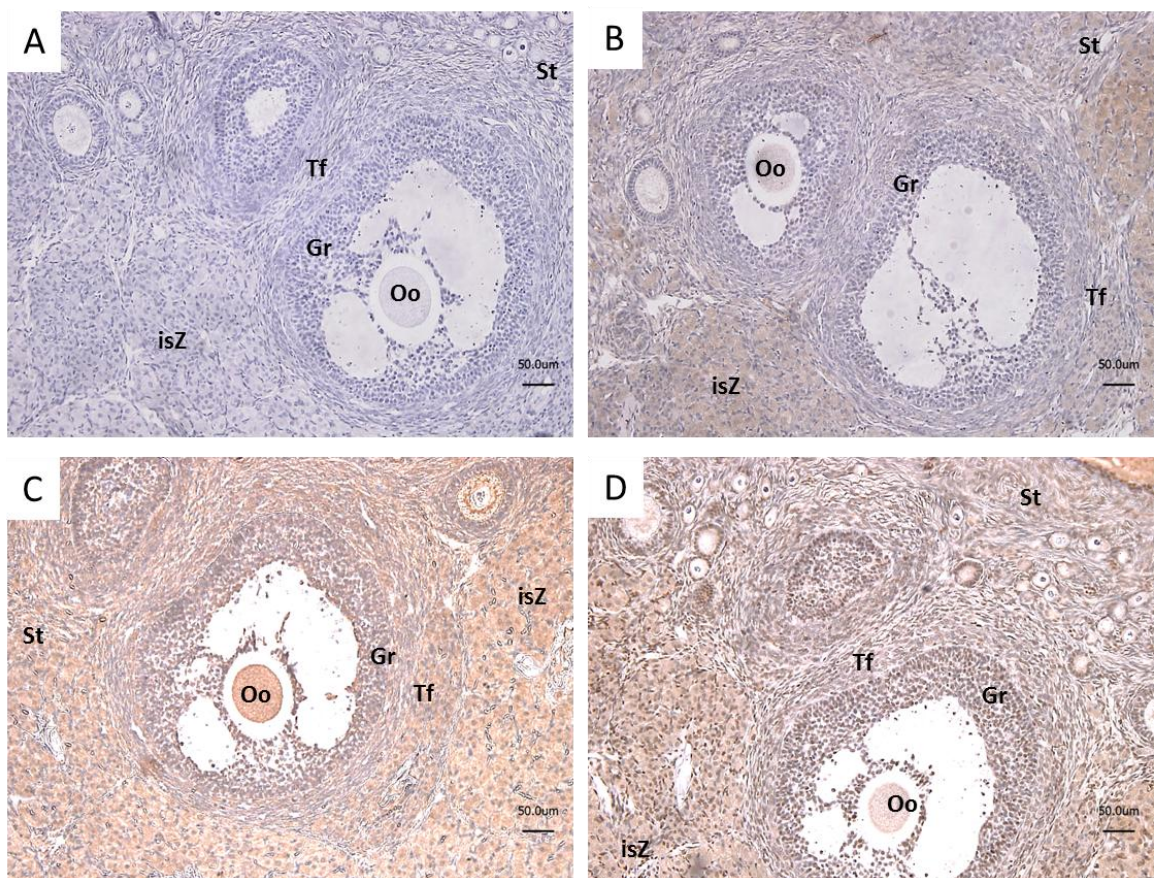


Abb. 13: Immunhistochemischer Nachweis von AGEs im Ovar gesunder Kaninchen.

A = Negativkontrolle, **B** = CML, **C** = Argpyrimidin, **D** = Pentosidin

Die Immunhistochemie zeigt eine positive Färbung (braun) des Stroma (**St**), der interstitiellen steroidogenen Zellen (**isZ**) und der Follikel, mit *Theca folliculi* (**Tf**), Granulosazellen (**Gr**) und Oozyten (**Oo**). Die Kerne wurden durch Hämalaun blau angefärbt. Die Negativkontrolle zeigt die Kontrollreaktion des Sekundärantikörpers ohne einen spezifischen Primärantikörper. Die dargestellte Immunhistochemie ist repräsentativ für 3 untersuchte Ovarien pro Gruppe. N = 3; n = 8.

Die Follikel (Primordial-, Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikel) wiesen die AGEs Argpyrimidin, CML und Pentosidin auf. Aufgrund eines ähnlichen Verteilungsmusters der AGEs in den verschiedenen Follikeln sind in Abb. 14 nur Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikel dargestellt.

Argpyrimidin zeigte eine zytoplasmatische Färbung, die besonders intensiv im Zytoplasma der Eizelle zu sehen war. Theka- und Granulosazellen zeigten ebenso eine positive Färbung.

CML wies in Eizellen sowie in Theka- und Granulosazellen eine schwache zytoplasmatische Färbung auf.

Pentosidin zeigte neben der zytoplasmatischen Färbung auch eine Kernfärbung in Theka- und Granulosazellen. In den Oozyten war ausschließlich das Zytoplasma gefärbt.

Der Vergleich der Follikel gesunder und diabetischer Tiere zeigte keine Unterschiede in der Verteilungs- und Färbungsintensität. Zur Illustration sind deshalb in Abb. 14 nur Ausschnitte der Follikel gesunder Kaninchen dargestellt.

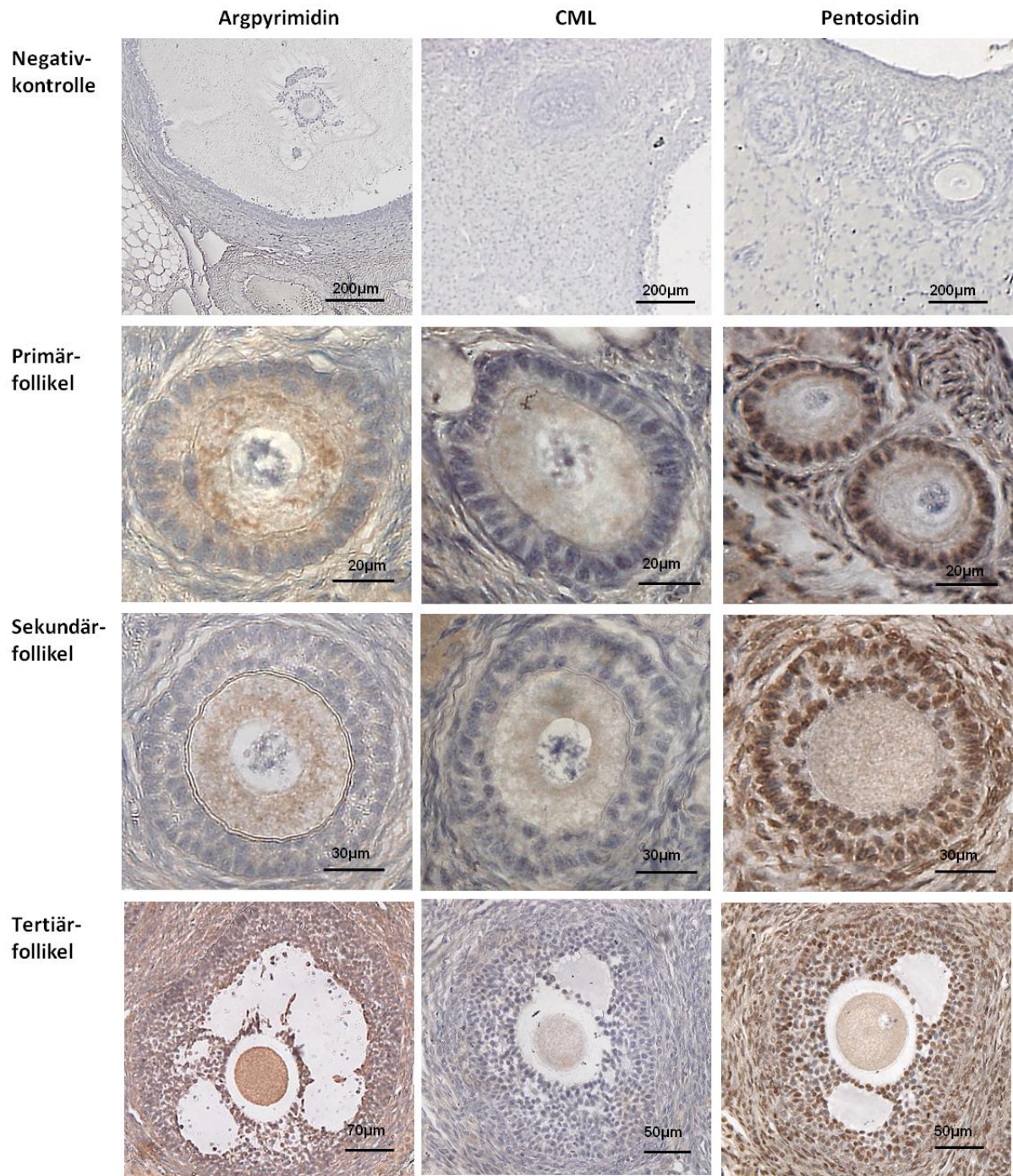


Abb. 14: Immunhistochemischer Nachweis von AGEs in den Eizellen gesunder Kaninchen.

Die Immunhistochemie zeigt eine positive Färbung (braun) des Zytoplasmas der Oozyten. Die Kerne wurden durch Hämalaun blau angefärbt. Die Negativkontrolle zeigt die Kontrollreaktion des Sekundärantikörpers ohne einen spezifischen Primärantikörper. Die dargestellte Immunhistochemie ist repräsentativ für 3 untersuchte Ovarien pro Gruppe. N = 3; n = 8.

3.5. AGEs und AGE-Bildner in 6 Tage alten Kaninchenblastozysten

Ein Nachweis von AGEs erfolgte einerseits intrazellulär in den embryonalen Zellen des Embryoblasten (EB) und Trophoblasten (TB) und andererseits extrazellulär in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit.

3.5.1 Immunhistochemischer Nachweis von AGEs in embryonalen Zellen

Die Immunhistochemie an 6 Tage alten Blastozysten gesunder Kaninchen zeigte ein Vorhandensein von Argpyrimidin, CML und Pentosidin (siehe Abb. 15). Die untersuchten AGEs waren hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert, außer in einigen markant gefärbten Zellen, die ebenso eine Kernfärbung aufwiesen.

Argpyrimidin war im EB und TB detektierbar. Im EB zeigte sich eine Färbung des Vorderen Randbogens.

CML zeigte eine diffuse Färbung von Zellen des EBs und des TBs. Die den EB bedeckenden Trophoblastzellen (Rauber'scher Trophoblast) waren ebenso CML-positiv.

Pentosidin wurde hauptsächlich im EB detektiert. Im TB waren nur wenige Zellen gefärbt.

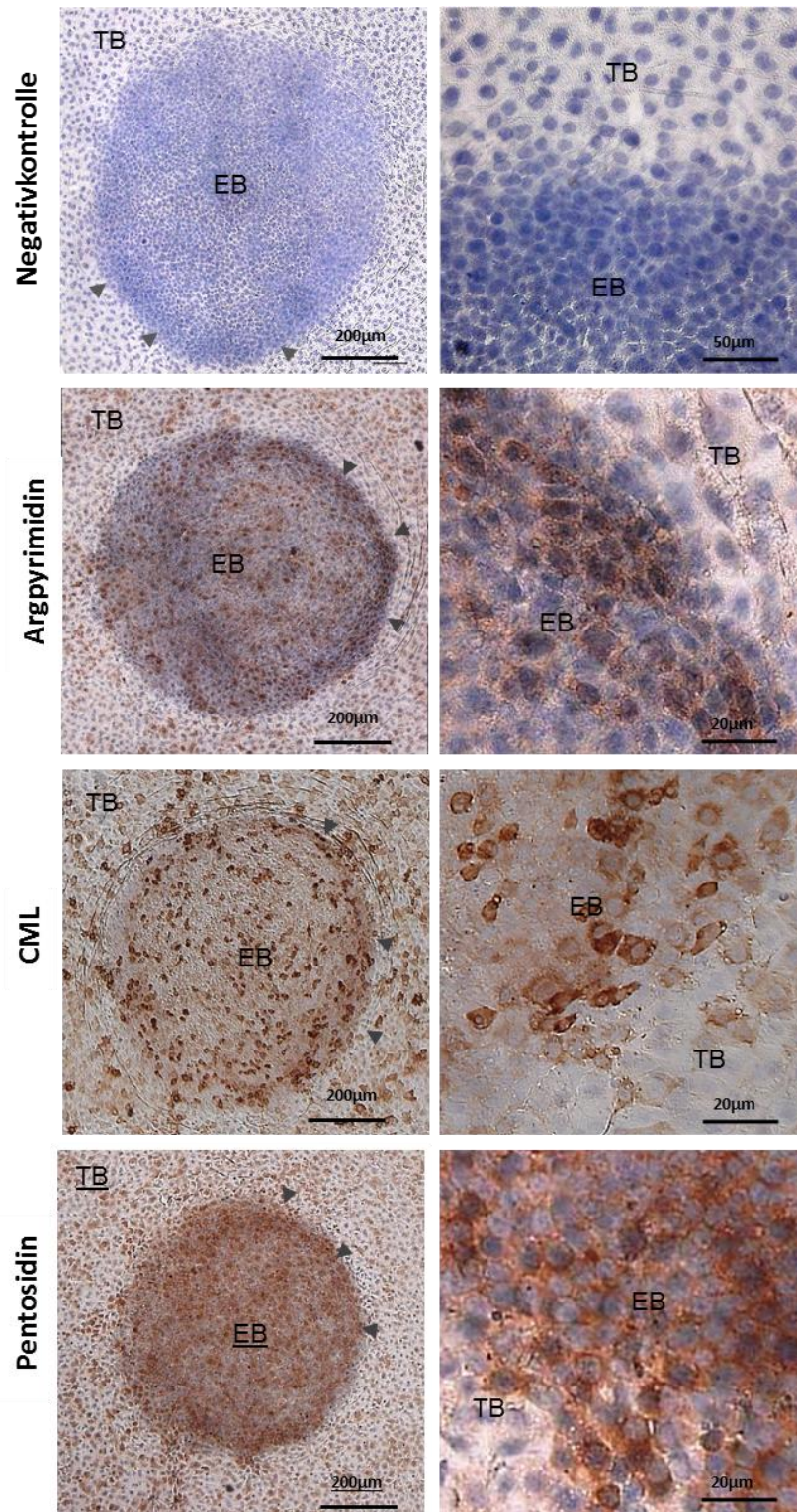


Abb. 15: Immunhistochemischer Nachweis von AGEs in 6 Tage alten Blastozysten gesunder Kaninchen.

Die Immunhistochemie zeigt eine positive Färbung (braun) für Argpyrimidin, CML und Pentosidin im Zytoplasma von Embryoblast (EB)- und Trophoblastzellen (TB). Auf dem EB können sich Rauber'scher Trophoblastzellen befinden. Die Pfeilspitzen markieren den Bereich des Vorderen Randbogens des Embryoblasten. Die Kerne wurden durch Hämalaun blau angefärbt. Die Negativkontrolle zeigt die Kontrollreaktion des Sekundärantikörpers ohne einen spezifischen Primärantikörper. Die dargestellte Immunhistochemie an einer Blastozyste ist repräsentativ für 6 untersuchte Blastozysten (n = 6).

3.5.2. Detektion proteingebundener AGEs in Embryonen diabetischer Kaninchen

Der Gehalt proteingebundener AGEs in Blastozysten gesunder und diabetischer Kaninchen wurde über die Slot Blot-Methode quantifiziert. Proteingebundenes Argpyrimidin war tendenziell ($p > 0,1$) und proteingebundenes CML war signifikant ($p = 0,02$) erhöht in den 6 Tage alten Blastozysten diabetischer Mütter. Der Gehalt an proteingebundenem Pentosidin war in Embryonen gesunder und diabetischer Kaninchen annähernd gleich (siehe Abb. 16).

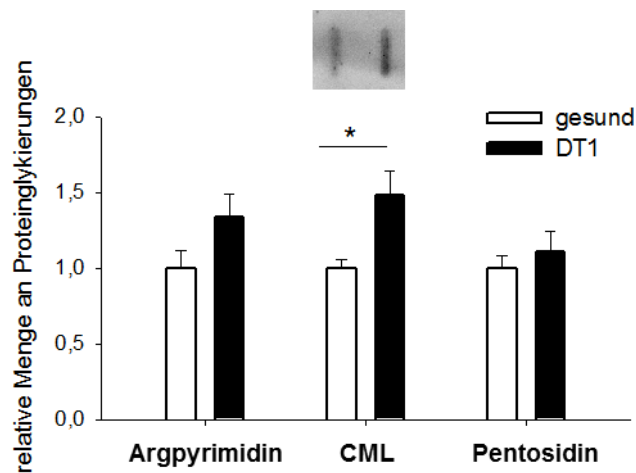


Abb. 16: Nachweis proteingebundener AGEs in 6 Tage alten Blastozysten diabetischer (DT1) und gesunder Kaninchen.

Relative Mengen an proteingebundenem Argpyrimidin, CML und Pentosidin. Die semiquantitative Analyse erfolgte mittels Slot Blot. Die gemessenen Werte wurden gegen den Proteingehalt der Probe (Ponceau S-Färbung) normiert und auf die Kontrollwerte (1) bezogen. Die Ergebnisse sind als $MW \pm SEM$ mit $*p < 0,05$ dargestellt. $N = 6$; $n = 6$ gepoolte Proben von jeweils 10 – 11 Blastozysten.

3.5.3. Detektion von Glyoxal und Methylglyoxal in Embryonen diabetischer Kaninchen

Die Konzentrationen der AGE-Bildner Glyoxal und Methylglyoxal in den Embryonen wurde mittels HPLC anhand eines internen Standards bestimmt (siehe Anhang 7.6.).

Die Konzentration des potenten AGE-Bildners Methylglyoxal wurde in EB und TB der 6 Tage alten Blastozysten mittels HPLC bestimmt. Die Einzelergebnisse der Messung sind in Tab. 6 aufgelistet. Die mittlere Methylglyoxalkonzentration war in Blastozysten diabetischer und gesunder Tiere durch eine große Schwankung der Werte nicht signifikant verändert ($MW \pm SEM$, gesund:

386 ± 100 nM, DT1: 702 ± 407 nM, siehe Abb. 17). Der Gehalt an Glyoxal lag in beiden Gruppen unter der Nachweisgrenze von 300 nM.

Tab. 6: Methylglyoxalgehalte 6 Tage alter Blastozysten diabetischer (DT1) und gesunder Kaninchen.

Die Bestimmung erfolgte mittels HPLC. Der Probeneinsatz wurde auf den Proteingehalt der Proben normiert. N = 3; n = 3 gepoolte Proben von jeweils 12 – 14 Blastozysten

Methylglyoxalkonzentration [nM]		
N	gesund	DT1
1	356	419
2	229	183
3	573	1504

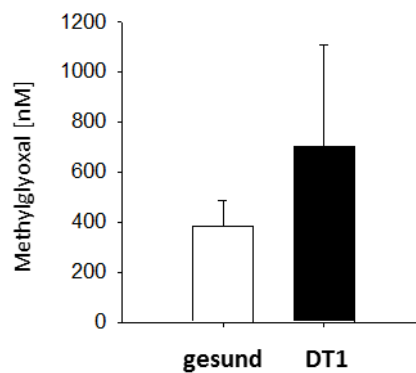


Abb. 17: Mittlere Methylglyoxalwerte in 6 Tage alten Blastozysten diabetischer (DT1) und gesunder Kaninchen.

Die Bestimmung erfolgte mittels HPLC. Der Probeneinsatz wurde auf den Proteingehalt der Proben normiert. Die Ergebnisse sind als MW \pm SEM dargestellt. N = 3 gepoolte Proben von jeweils 12 – 14 Blastozysten.

3.5.4. Nachweis fluoreszierender AGEs in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit

In der Blastozystenhöhlenflüssigkeit wurde das Spektrum fluoreszierender AGEs über Fluoreszenzmessung detektiert. Die Untersuchung der spezifischen AGE-Fluoreszenzen in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit ergab bei einer Anregung bei 330 nm und 360 nm die charakteristischen Emissionspeaks bei den Wellenlängen 405 nm und 440 nm (siehe Abb. 18).

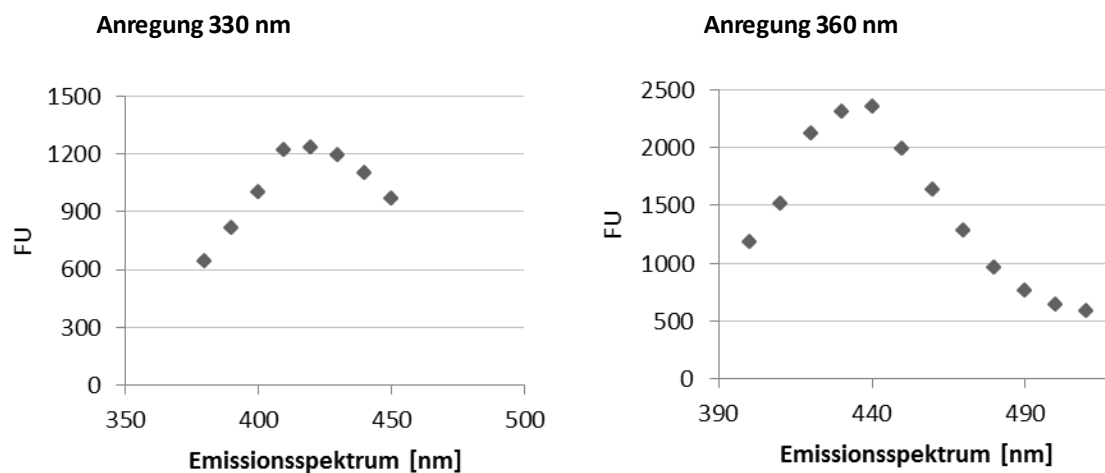


Abb. 18: Emissionsspektren AGE-spezifischer Fluoreszenzen [FU] bei den Anregungen 330 nm und 360 nm in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit 6 Tage alter Blastozysten.

Die Messung erfolgte im Mikroplattenreader an der unverdünnten Blastozystenhöhlenflüssigkeit mittels einer Mikrovolumenplatte (*Take 3, Biotek*).

Durch den Nachweis der AGE-spezifischen Fluoreszenzen in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit konnte die Methode eingesetzt werden, um diabetesbedingte Unterschiede im Gehalt fluoreszierender AGEs in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit zu untersuchen.

3.5.5. Bestimmung der Proteinkonzentration in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit

Als interne Referenz und indirekter Abgleich der AGE-Messung in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit diente die Protein- und Aminosäurekonzentration. Die Proteinkonzentration der Blastozystenhöhlenflüssigkeit musste aufgrund des geringen Materials an separaten Blastozysten mittels des *Micro BCA Protein Detection Kits* bestimmt werden. Die Proteinkonzentration in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit von Blastozysten diabetischer und gesunder Tiere war mit $0,43 \pm 0,012$ (MW \pm SEM) annähernd gleich (siehe Abb. 19). Auch die für die AGE-Modifikationen relevanten Aminosäuren Lysin (MW \pm SEM, gesund: 438 ± 44 μ M; DT1: 483 ± 27 μ M) und Arginin (MW \pm SEM, gesund: 318 ± 50 μ M; DT1: 316 ± 18 μ M) wiesen ebenso in beiden Gruppen annähernd gleiche Konzentrationen auf (Dissertation, Jacqueline Gürke).

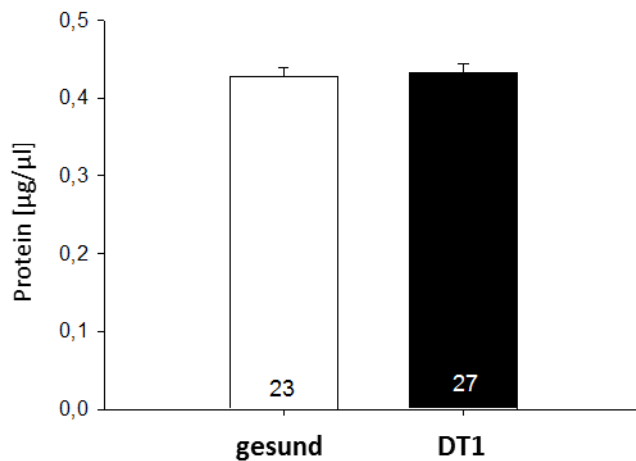


Abb. 19: Proteinkonzentration in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit von 6 Tage alten Blastozysten diabetischer (DT1) und gesunder Kaninchen.

Die Proteinkonzentration wurde mittels des *Micro BCA Protein Detection Kit* (Thermo Scientific) bestimmt. Die Anzahl der Proben (n) pro Gruppe (N = 4) wurde in die Diagrammsäule eingetragen. Die Ergebnisse sind als MW ± SEM dargestellt.

3.5.6. AGE-Fluoreszenz in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit von Embryonen diabetischer und gesunder Kaninchen

Bei Anregungen von 330 nm und 360 nm waren die gemessenen Emissionen bei 405 nm und 440 nm in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit von Embryonen diabetischer Kaninchen im Vergleich zu gesunden Tieren deutlich erhöht (siehe Abb. 20).

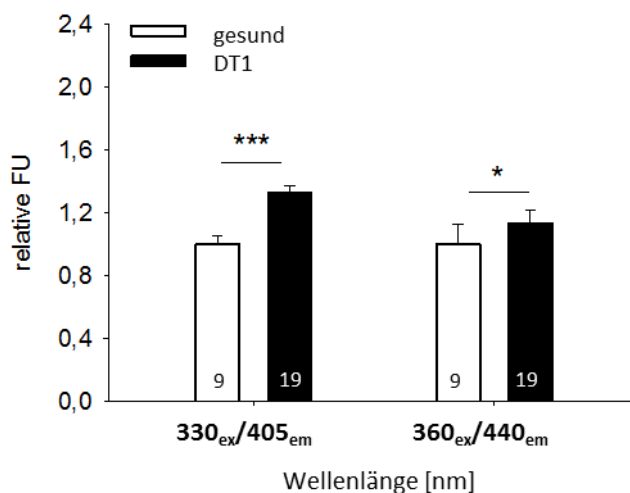


Abb. 20: AGE-spezifische Fluoreszenz in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit von 6 Tage alten Blastozysten diabetischer (DT1) und gesunder Kaninchen.

Angegeben sind die relativen Fluoreszenzwerte [FU] bei AGE-spezifischen Wellenlängen von 330/405nm und 360/440 nm (gesund = 1). Die Ergebnisse sind als MW ± SEM mit * $p < 0,05$ und *** $p < 0,001$ dargestellt. Die Anzahl der Proben pro Gruppe (n) wurde in die Diagrammsäule eingetragen.

Da der AGE-Gehalt in Stammzellen und Blastozysten als sehr dynamisch beschrieben wird (Hernebring *et al.*, 2006), wurde untersucht, ob es eine Abhängigkeit des AGE-Gehaltes hinsichtlich des Entwicklungsstandes am Tag 6 *p.c.* gibt. Die beiden AGE-spezifischen

Fluoreszenzen (Anregung/Emission; 330/405 nm und 360/440 nm) waren jeweils nicht unterschiedlich zwischen den Gastrulationsstadien 0,1 und 2 (siehe Abb. 21).

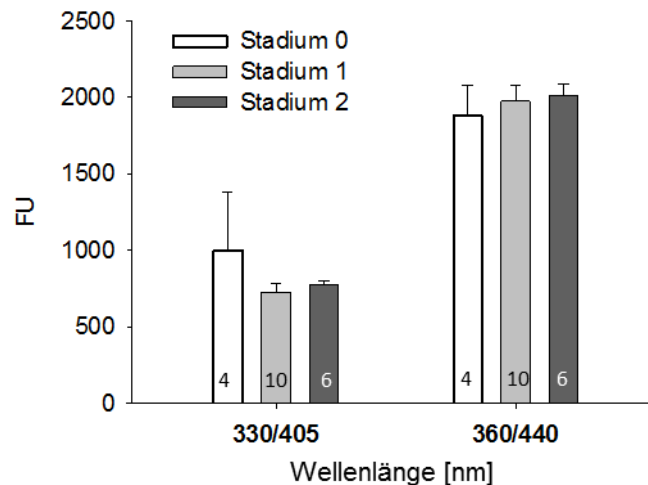


Abb. 21: AGE-spezifische Fluoreszenz in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit 6 Tage alter Kaninchenblastozysten der Gastrulationsstadien 0,1 und 2.

Angegeben sind die relativen Fluoreszenzwerte [FU] bei Messung der AGE-spezifischen Anregung/Emission der Wellenlängen 330/405nm und 360/440nm. Die Ergebnisse sind als MW \pm SEM dargestellt. Die Anzahl der Proben pro Gruppe (n) wurde in die Diagrammsäule eingetragen.

Stadium 0: 6 Tage alte Blastozyste ohne Gastrulationszeichen des EB,
 Stadium 1: 6 Tage alte Blastozyste mit Vorderen Randbogen (VRB) des EB,
 Stadium 2: 6 Tage alte Blastozyste mit VRB und posteriorer Gastrulaextension des EB.

3.5.7. Nachweis und Detektion freier AGEs und oxidierter Metabolite in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit

Mittels HPLC/MS, dem Goldstandard der AGE-Bestimmung, wurde die Blastozystenhöhlenflüssigkeit auf das Vorkommen spezifischer ungebundener AGEs sowie oxidierter Metabolite untersucht.

Es konnten folgende freie AGEs identifiziert werden: Formyllysin, Acetyllysin, Fructoselysin, Carboxyethylarginin und CML. N ϵ -Carboxyethyllysin (CEL), Lactoyllysin und Oxalyllysin befanden sich an der Nachweisgrenze. Pentosidin und Argpyrimidin konnten in ihrer ungebundenen Form nicht nachgewiesen werden. Die zwei untersuchten oxidierten Metabolite 2-Desoxyguanosin und Methioninsulfoxid waren nachweisbar. In der Tab. 7 sind die untersuchten Modifikationen mit deren relativer Präsenz aufgelistet.

Tab. 7: Freie AGEs und oxidierte Metabolite in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit von 6 Tage alten Kaninchenblastozysten.

(+) nachweisbar, (+/-) an der Nachweisgrenze, (-) nicht vorhanden

AGE	Nachweis	AGE	Nachweis
Formyllysin	+++	Threonyllysin	-
Acetyllysin	+++	8-Hydroxy-2-desoxyguanosin	-
Nε-Carboxymethyllysin (CML)	++	Lyxonyllysin	-
Carboxyethylarginin (CEA)	+	Xylonyllysin	-
Fructoselysin	+	Tetrahydropyrimidin	-
Nε-Carboxyethyllysin (CEL)	+/-	<i>Glyoxal-derived lysine dimer</i> (GOLD)	-
Lactoyllysin	+/-	Glyoxal-Lysin-Amid (GOLA)	-
Oxalyllysin	+/-	Lysin-Arginin <i>Crosslinker</i> (GODIC)	-
MG-H 3	-	Lysin-Arginin <i>Crosslinker</i> (MODIC)	-
MG-H 1	-	G-H3	-
Carboxymethylarginin (CMA)	-	Pentosidin	-
Glycerinyllysin	-	Pentosinan	-
Furosine	-	Glucosepan	-
GALA (Glycolsäure-Lysin-Amid)	-		
Argpyrimidin	-		

Oxidierte Metabolite	Nachweis
----------------------	----------

2-Desoxyguanosin	++
Methioninsulfoxid	++

Bedingt durch einen maternalen Diabetes mellitus akkumuliert proteingebundenes CML in den embryonalen Zellen 6 Tage alter Blastozyste (siehe Abb. 16). Da in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit der Blastozyste freies CML identifiziert werden konnte, wurde es für weitere quantitative Analysen ausgewählt. Ziel war es, den CML-Gehalt in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit von Embryonen diabetischer und gesunder Kaninchen zu vergleichen. Dabei ergab sich ein ähnliches Bild wie in den embryonalen Zellen. Freies CML war in der Tendenz ($p > 0,1$) höher in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit von Blastozysten diabetischer Mütter ($0,26 \pm 0,05 \mu\text{Mol/l}$) verglichen zur Kontrollgruppe ($0,18 \pm 0,02 \mu\text{Mol/l}$; siehe Abb. 22).

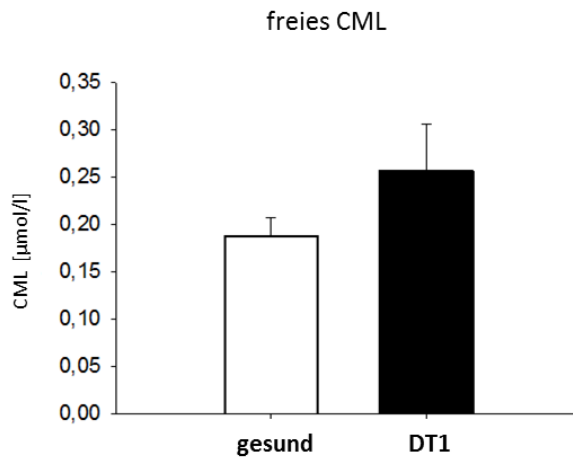


Abb. 22: Quantifizierung von freiem CML in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit von 6 Tage alten Blastozysten des Stadiums 1 diabetischer (DT1) und gesunder Kaninchen.

Die Quantifizierung erfolgte mittels HPLC-MS anhand eines CML-Standards. Die Ergebnisse sind als $MW \pm SEM$ dargestellt. $N = 4$; $n = 4$ gepoolte Proben von jeweils 5 – 7 Blastozysten.

3.5.8 Nachweis und Detektion von ROS in Blastozysten diabetischer und gesunder Kaninchen

Als indirekter Nachweis von oxidativem Stress wurde die DCFH-DA-Färbung angewandt. Die Stärke des Fluoreszenzsignals korreliert positiv mit dem Gehalt an ROS in Geweben bzw. Zellen. Intrazelluläre ROS bedingen die Oxidation des nicht-fluoreszierenden DCFH-DA zu dem grün-fluoreszierenden Produkt DCF. Durch Vorversuche an der RK 13-Zelllinie war die Methode etabliert und getestet worden (siehe Anhang 7.5. Induktion von oxidativem Stress in RK 13-Zellen).

Die Analyse erfolgte an einzelnen Blastozysten. Alle Embryonen wurden gleich behandelt und sind mit gleicher Belichtungszeit dargestellt (siehe Abb. 23). Tendenziell waren in der Gruppe der Blastozysten diabetischer Mütter mehr Blastozysten mit einem stärkeren Fluoreszenzsignal zu finden.

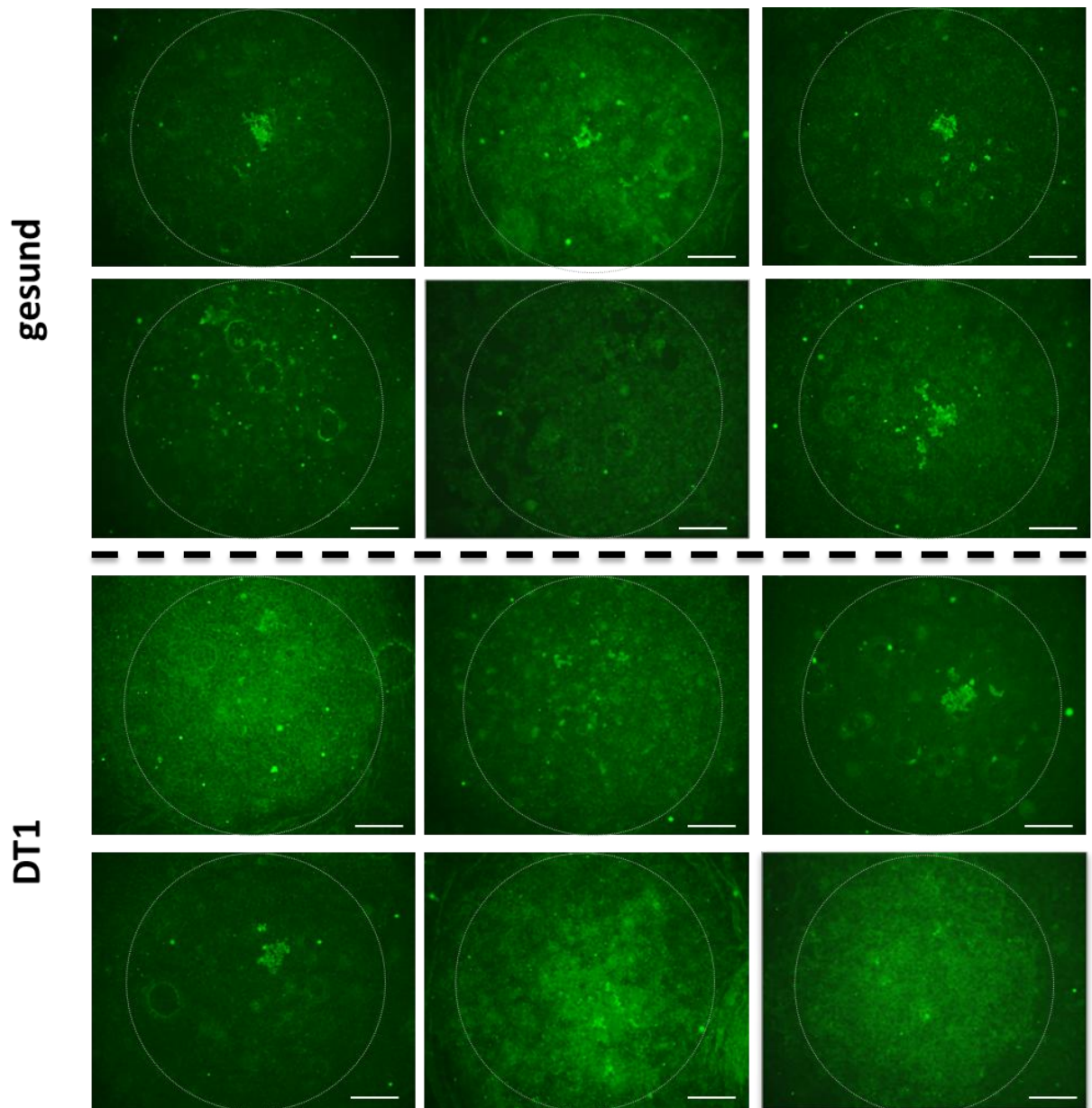


Abb. 23: Indirekter Nachweis von oxidativem Stress in Blastozysten gesunder und diabetischer (DT1) Kaninchen mittels DCFH-DA-Färbung.

Das grüne Fluoreszenzsignal entspricht dem durch reaktive Sauerstoffspezies oxidierten DCFH-DA. Der Kreis markiert die Grenze zwischen Embryoblast und Trophoblast. N = 2; n = 6.

Skala = 200 μ m

5.6. Aktivität der 20 S-Proteasomen in Blastozysten diabetischer und gesunder Kaninchen

Das 20 S-Proteasom ist verantwortlich für den Abbau geschädigter Proteine. Die Aktivität der 20 S-Proteasomen wurde in Blastozysten durch den Umsatz des Substrates Succinyl-leu-leu-val-tyr-7-amino-4-methylcoumarin (Suc-LLVY-MCA) mittels Fluoreszenzmessung ermittelt.

Die Aktivität der 20 S-Proteasomen war in den Blastozysten diabetischer und gesunder Kaninchen annähernd gleich (siehe Abb. 24).

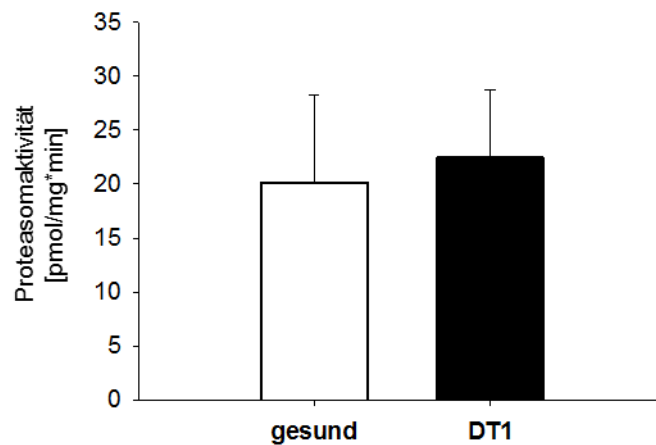


Abb. 24: Aktivität der 20 S-Proteasomen in Blastozysten gesunder und diabetischer (DT1) Kaninchen.

Die Aktivität des 20S-Proteasom wurde anhand des Umsatzes von Suc-LLVY-MCA mittels Fluoreszenzmessung bestimmt. Die Ergebnisse sind als MW \pm SEM dargestellt. N = 3; n = 3 gepoolte Proben von jeweils 10 – 12 Blastozysten.

3.7. *In vitro*-Kultur von 6 Tage alten Kaninchenblastozysten

3.7.1. AGE-Bildung in Blastozysten unter den Bedingungen der *in vitro*-Kultur

In Kurzzeit-kultivierten Blastozysten wurde die Bildung von AGEs in Embryonen unter den Bedingungen der *in vitro*-Kultur untersucht. Dazu wurden 6 Tage alte Blastozysten für 6 Stunden mit Glukose (0, 10 und 25 mM) in synthetischen Medium (BSM) bei 37 °C kultiviert. Bei einer Kultur mit 25 mM Glukose stieg der Pentosidingehalt in den Blastozysten um fast 75 % an (siehe Abb. 25).

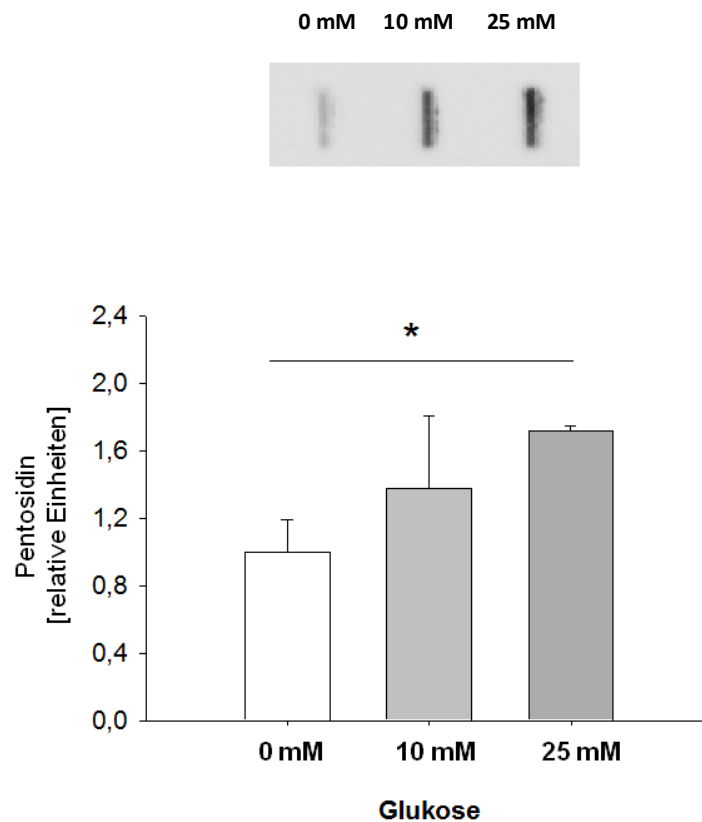


Abb. 25: Pentosidin-Akkumulation in *in vitro*-kultivierten 6 Tage alten Blastozysten nach Glukosestimulation.

Pentosidinbildung nach einer 6-stündigen Kultur mit 0, 10 und 25 mM Glukose. Die AGE-Akkumulation wurde mittels Slot Blot analysiert. Die Ergebnisse sind als MW \pm SEM mit $*p < 0,05$ dargestellt. N = 3; n = 3 gepoolte Proben von jeweils 8 – 10 Blastozysten.

3.7.2. ROS-Bildung in Embryonen unter den Bedingungen der *in vitro*-Kultur

In der *in vitro*-Kultur wurde untersucht, ob AGEs in Kaninchenblastozysten oxidativen Stress induzieren können (siehe Abb. 26). Dazu wurden 6 Tage alte Blastozysten mit DCFH-DA inkubiert und anschließend für eine Stunde mit AGE-BSA kultiviert. In einer induzierten Positivprobe wurde H_2O_2 als ROS-Induktor zur Kultur hinzugegeben. Die Blastozysten der Positivkontrolle zeigten eine deutliche Zunahme des Fluoreszenzsignals mit steigender H_2O_2 -Wirkung. Die Verwendung von AGE-BSA als Stressor hatte dagegen bei einer Konzentration von 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ keinen Effekt. Bei einer supraphysiologischen Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich eine leichte Zunahme der Fluoreszenz.

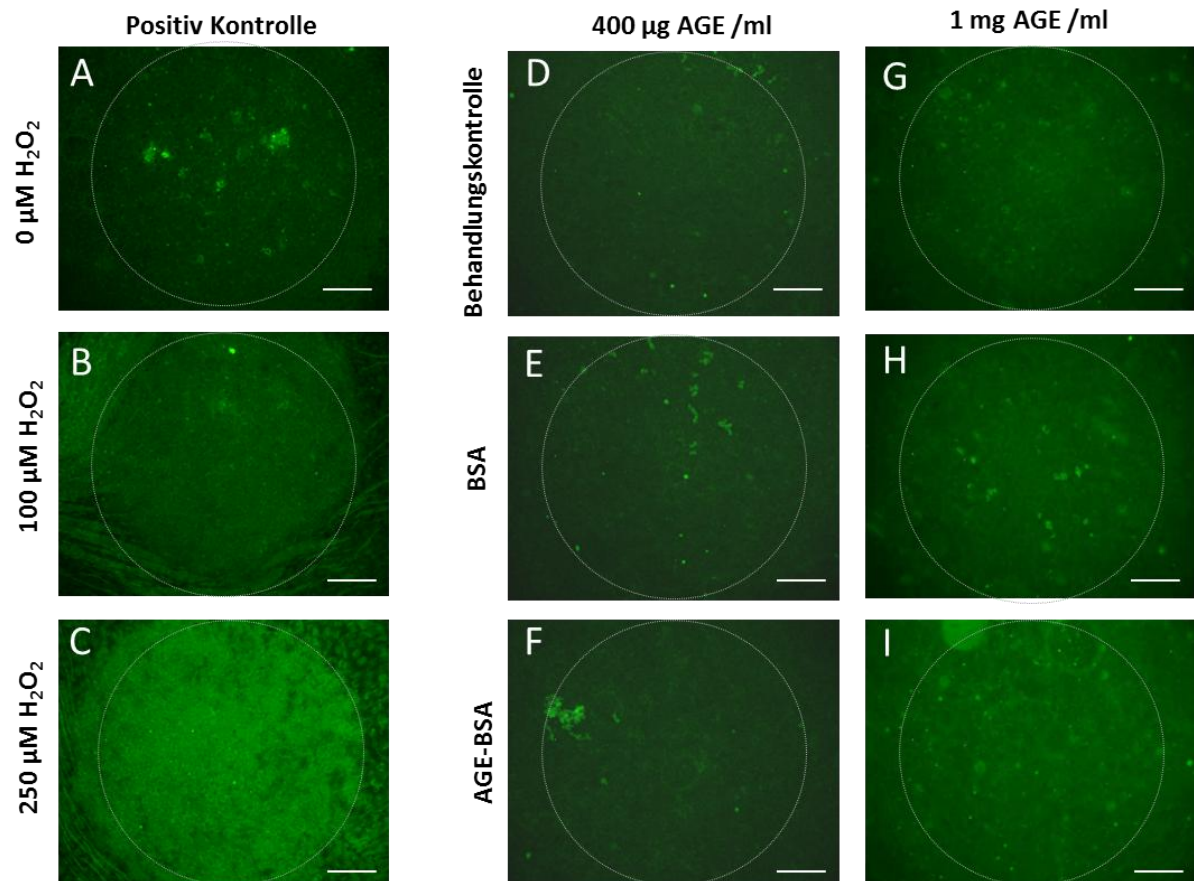


Abb. 26: Indirekter Nachweis von oxidativem Stress in *in vitro*-kultivierten Blastozysten mittels DCFH-DA-Färbung.

6 Tage alte Blastozysten wurden mit DCFH-DA inkubiert und anschließend für eine Stunde mit AGE-BSA (D–I) kultiviert. Als Positivkontrolle diente eine einstündige Kultur mit verschiedenen Konzentrationen H_2O_2 (A–C).

Skala = 200 μm

3.8. Vorkommen von RAGE in Kaninchenblastozysten

Die Expression von *AGER* wurde in Morulae (d3 *p.c.*), frühen Blastozysten am Tag 4 (d4 *p.c.*) und in der expandierten 6 Tage alten Blastozyste mittels RT-PCR untersucht. Die Blastozysten am Tag 6 wurden zusätzlich in die Gastrulationsstadien 0/1–3 unterteilt. *AGER* war ab dem frühen Blastozystenstadium (d4) in allen untersuchten Stadien nachweisbar (siehe Abb. 27 A)

Die Immunhistochemie an 6 Tage alten Blastozysten ergab eine membranständige Lokalisation für RAGE, so wie es für den *full length* RAGE beschrieben ist (siehe Abb. 27 B). Der verwendete RAGE-Antikörper richtete sich gegen die extrazelluläre Domäne (Aminosäure 90–357). Damit

erkannte dieser Antikörper ebenfalls sRAGE, welcher keine transmembrane und intrazelluläre Domäne besitzt. sRAGE wird über verschiedene Proteasen, u.a. ADAM 10, vom *full length* RAGE abgespalten (Raucci *et al.*, 2008) und ist extrazellulär zu finden. Die Daten aus der Immunhistochemie wiesen einen membranständigen Rezeptor nach, was dem *full length* RAGE entspricht. RAGE war hauptsächlich im Embryoblasten lokalisiert.

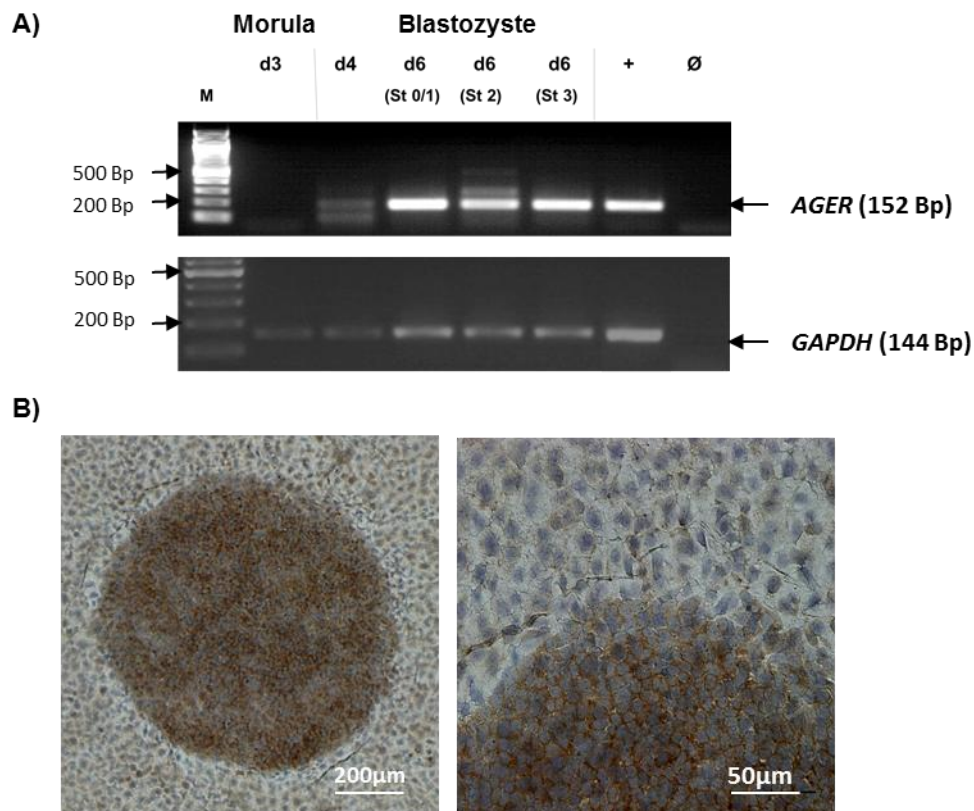


Abb. 27: RAGE-Vorkommen in Kaninchenembryonen.

A) Auftrennung der RT-PCR-Produkte für *AGER* im Agarosegel von Morulae (d3), frühen Blastozysten (d4) und expandierten Blastozysten (d6) der Gastrulationsstadien 0 – 3.

∅ - PCR-Kontrollreaktion ohne cDNA (Negativkontrolle),
+ - PCR-Kontrollreaktion an Lungengewebe (Positivkontrolle).

B) Immunhistochemischer Nachweis von RAGE (braun) an 6 Tage alten Blastozysten im Gastrulationsstadium 1. Die Kerne wurden mit Hämalaun (blau) gegengefärbt. Die dargestellte Immunhistochemie an einer Blastozyste steht repräsentativ für 8 untersuchte Blastozysten (n = 8) verschiedener Gastrulationsstadien.

3.9. *AGER*-Expression in Blastozysten diabetischer und gesunder Kaninchen

Mittels RT-qPCR wurde die *AGER*-mRNA-Menge in 6 Tage alten Blastozysten des Stadiums 0, 1 und 2 diabetischer und gesunder Kaninchen quantifiziert.

In den Blastozysten gesunder Tiere zeigte sich eine gastrulationsbedingte Abnahme der *AGER*-mRNA-Menge von Stadium 0 zu 1. Blastozysten diabetischer Mütter hatten eine signifikant höhere *AGER*-Transkriptmenge im Stadium 1 (siehe Abb. 28).

Der Nachweis von RAGE über Western Blot ergab ein zu schwaches Signal, wodurch quantitative Unterschiede in der *AGER*-Expression am Tag 6 nicht auf Proteinebene nachgewiesen werden konnten.

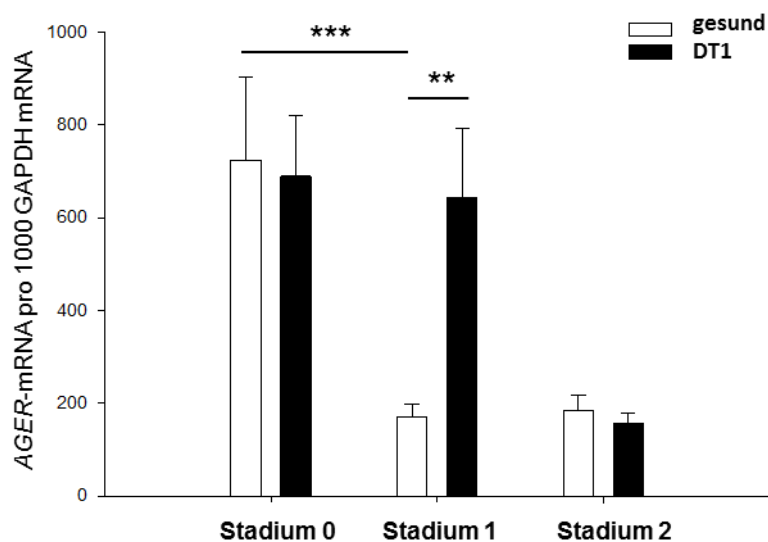


Abb. 28: Quantifizierung von *AGER*-mRNA in Kaninchenblastozysten.

Quantifizierung der Transkriptmengen von *AGER* (Kopien/1000 *GAPDH*-Moleküle) in 6 Tage alten Kaninchenblastozysten (Stadium 0 bis 2) mittels RT-qPCR. Die *AGER*-mRNA-Menge wurden durch einen Abgleich mit der *GAPDH*-mRNA-Menge derselben Probe errechnet. Die Ergebnisse sind als MW ± SEM dargestellt. N = 3; n > 10, mit **p < 0,01; *** p < 0,001.

4. Diskussion

4.1. Diabetes mellitus und AGE-Akkumulation im Plasma des Kaninchens

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen eines Insulinmangel-Diabetes auf die AGE-Bildung im Reproduktionstrakt (Ovar und Uterus) und in Embryonen zu untersuchen.

Eine Hyperglykämie führt in der Regel zu einem Anstieg der Plasma-AGE-Menge (Monnier *et al.*, 1992; Ahmed und Thornalley, 2003; Kilhovd *et al.*, 2003; Ahmed *et al.*, 2005). Zur Validierung des diabetischen Tiermodells wurden deshalb die Plasma-AGE-Werte in den Kaninchen charakterisiert.

4.1.2. AGE-Akkumulation als ein Resultat der Hyperglykämie

Im Blutplasma der diabetischen Kaninchen sind die untersuchten AGEs Argpyrimidin, CML und Pentosidin signifikant erhöht (siehe Abb. 10).

Das Gleichgewicht der Plasma-AGEs wird durch eine Balance aus endogener Bildung, exogener Zufuhr und renaler Ausscheidung bestimmt (Vlassara und Palace, 2002; Vlassara, 2005; Peppia *et al.*, 2008). Um zu gewährleisten, dass die AGE-Akkumulation eine Folge der gesteigerten endogenen Bildung ist, musste der Einfluss weiterer Parameter ausgeschlossen werden.

Über die Nahrung aufgenommene AGEs können im Plasma akkumulieren (Goldberg *et al.*, 2004; Uribarri *et al.*, 2005). Da diabetische wie Kontrolltiere das gleiche Futter bekamen, und die täglich aufgenommene Futtermenge in beiden Gruppen gleich war (unveröffentlichte Daten, Jacqueline Gürke), kann ausgeschlossen werden, dass die AGE-Akkumulation im diabetischen Kaninchen über das Futter erfolgte.

Die renale Ausscheidung von AGEs kann bei Niereninsuffizienz vermindert sein, woraus ein Anstieg der Plasma-AGEs resultiert (Makita *et al.*, 1991; Ahmed und Thornalley, 2003; Thomas *et al.*, 2005). Alloxan, welches den Kaninchen zur Induktion des Diabetes verabreicht wurde, wirkt potentiell nierentoxisch. Der GLUT 2, worüber Alloxan in die Zellen gelangt, wird neben den pankreatischen β -Zellen auch in der Leber, im Dünndarm und in der Niere exprimiert. Die Anordnung des GLUT 2 in der Niere richtet sich zum Tubulussystem hin, weswegen aus dem Blut anströmendes Alloxan die Niere nicht direkt schädigen kann. Um dennoch auszuschließen, dass die diabetischen Kaninchen durch die Alloxanbehandlung eine Niereninsuffizienz erlitten, wurde die Proteinkonzentration im Urin der gesunden und diabetischen Tiere bestimmt. In beiden

Gruppen konnten keine Proteine im Urin nachgewiesen werden, demnach lag keine Nierenfunktionsstörung bei den diabetischen Tieren vor.

Das starke Oxidationsmittel Alloxan bildet während seiner Autoxidation in den β -Zellen beachtliche Mengen an ROS. Eine ROS-Bildung durch Alloxan im Plasma wird jedoch ausgeschlossen, da nicht ausreichend Thiole (vorzugweise reduziertes Glutathion) vorhanden sind, um die Autoxidation von Alloxan im Blut zu initiieren (Lenzen, 2008). Auf Grund dessen wird nicht davon ausgegangen, dass es einen Einfluss einer Alloxan-vermittelten ROS-Produktion auf die Plasma-AGE-Bildung gab. Alloxan besitzt zudem eine sehr geringe Halbwertszeit und zerfällt im Körper binnen weniger Minuten in die nicht reaktive Alloxansäure (Lenzen, 2008).

4.1.2. Angriffspunkt Aminosäuren

Die erhöhten AGE-Gehalte korrelieren indirekt mit einer signifikanten Konzentrationsabnahme der freien Aminosäuren Lysin (17 %) und Arginin (47 %) im Plasma der diabetischen Tiere (Dissertation, Jacqueline Gürke). Dieser Zusammenhang lässt sich durch die endogene Modifizierung der Aminosäuren erklären.

Lysin und Arginin können aufgrund ihrer zusätzlichen Aminogruppe mit Zuckern und reaktiven α -Dicarbonylen reagieren, was die Initiationsreaktion der AGE-Bildung darstellt. Wichtige AGEs, die aus Reaktionen mit Arginin stammen, sind die G-H 1 und MG-H 1 (Ahmed und Thornalley, 2003; Ahmed *et al.*, 2005) und Argpyrimidin. AGEs, die aus einer Reaktion mit Lysin hervorgehen, sind CML, CEL und die *Crosslinker* GOLD und MOLD (Ahmed *et al.*, 2002; Thornalley, 2008). Durch deren Reaktion mit Zuckern oder α -Dicarbonylen nimmt die absolute Konzentration an Lysin und Arginin im Blutplasma ab. Die Detektion und Quantifizierung von MG-H 1, G-H 1, CEL, GOLD und MOLD im Blutplasma wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Arginin reagiert wesentlich häufiger mit Methylglyoxal und Glyoxal als Lysin (Thornalley, 2008), was die stärkere Abnahme von freiem Arginin im Plasma der diabetischen Kaninchen erklären kann. Die Abnahme der Lysin- und Argininkonzentration im Blut der diabetischen Kaninchen ist ein wichtiger Hinweis auf eine verstärkt ablaufende endogene AGE-Bildung.

4.1.3. Glyoxal und Methylglyoxal im Plasma der diabetischen Kaninchen

Der potente AGE-Bildner Glyoxal ist im Blutplasma der diabetischen Kaninchen tendenziell erhöht, wohingegen Methylglyoxal unverändert bleibt (siehe Abb. 9).

Glyoxal wie auch Methylglyoxal können im Plasma von Diabetikern auf das 6-fache ansteigen (McLellan *et al.*, 1994; Kilhovd *et al.*, 2003; Lapolla *et al.*, 2003). Die α -Dicarbonyle Glyoxal und Methylglyoxal sind chemisch wesentlich reaktiver als Glukose oder andere Zucker und damit potente Auslöser der AGE-Bildung (Thornalley, 2008).

Glyoxal ist ein Metabolit, welcher entweder aus dem Abbau von Glukose oder aus der Lipidperoxidation hervorgeht (Thornalley, 2008). Patienten mit Diabetes mellitus leiden neben einer Hyperglykämie auch häufig an Fettstoffwechselstörungen. Die mangelnde Insulinwirkung führt zu einer vermehrten Freisetzung von freien Fettsäuren und einer gesteigerten Triglycerid- und VLDL-Produktion (Kissebah *et al.*, 1976; Kilby *et al.*, 1998; Merzouk *et al.*, 2000). Im Tiermodell des diabetischen Kaninchens äußert sich dies in einer 6-fachen Erhöhung des Triglyceridgehaltes im Blutplasma der Kaninchen (Schindler *et al.*, 2014). Ebenso ist bei den diabetischen Kaninchen das Lipoproteinprofil verändert (unveröffentlichte Daten, Maria Schindler). Vermutlich sind die Hyperglykämie und die Hyperlipidämie die Ursache der erhöhten Glyoxalgehalte im Plasma der diabetischen Kaninchen.

Methylglyoxal entsteht hauptsächlich intrazellulär, wenn durch ein hohes Glukoseniveau Triosephosphate akkumulieren (Phillips und Thornalley, 1993) oder der Pentosephosphatweg gehemmt ist (Thornalley und Rabbani, 2009). Methylglyoxal verlässt die Zelle durch passive Diffusion (Phillips und Thornalley, 1993).

Die Messung von Methylglyoxal im Plasma gesunder und diabetischer Tiere zeigte keinen signifikanten Unterschied. Allerdings deutet die Akkumulation von Argpyrimidin im Plasma diabetischer Kaninchen darauf hin, dass vermehrt Methylglyoxal vorgelegen haben muss. Argpyrimidin geht aus der Reaktion von Methylglyoxal und Arginin hervor.

Ein Grund für diese Diskrepanz könnte in der Methylglyoxalbestimmung liegen. Die gültigen Messmethoden bergen die Gefahr, die eigentliche Konzentration auf das 10 – 1000-fache zu hoch einzuschätzen (Thornalley, 2008). Die verlässlichste Messmethode der beiden Metabolite ist die Derivatisierung von Methylglyoxal und Glyoxal mittels 1,2-Diaminobenzol mit anschließender Detektion durch eine Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (Thornalley, 2008). Diese Messmethode ist sehr aufwendig und konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht eingesetzt werden. Es wurde die Methode nach Espinosa-Mansilla angewandt, welche durch die effektiv verlaufende Derivatisierung, die große Reinheit der Standards und die einfache Handhabung häufig angewandt wird (Espinosa-Mansilla *et al.*, 2007). Dabei werden Glyoxal und Methylglyoxal durch die Zugabe von 5,6-Diamino-2,4-Hydroxypyrimidin (DDP) zu Lumazin und Methyllumazin derivatisiert, welche über deren spezifische Fluoreszenz mittels

HPLC detektiert werden können. Bei dieser Umsetzung sind allerdings Interferenzen bekannt, die das Messergebnis beeinflussen können. Eventuell führt das zu nicht-exakten Methylglyoxalwerten.

Die Angaben der Glyoxal- und Methylglyoxalkonzentration im humanen Plasma schwanken zwischen Werten von 100 – 1000 nM (Beisswenger *et al.*, 1999; Lapolla *et al.*, 2003; Nicolay *et al.*, 2006; Tatone *et al.*, 2010). Die zelluläre Konzentration für Methylglyoxal wird mit 1 – 5 μ M angegeben. Die Richtwerte für Glyoxal liegen bei 100 – 1000 nM (Dobler *et al.*, 2006; Nicolay *et al.*, 2006). Im Plasma der gesunden Kaninchen ergab die Messung der absoluten Werte für Glyoxal 420 ± 6 nM und 600 ± 8 nM im Plasma der diabetischen Tiere. Für Methylglyoxal lagen sie am oberen Vergleichswert bei $5,0 \pm 0,4$ μ M bei den gesunden Kaninchen und $5,4 \pm 0,6$ μ M bei den diabetischen Tieren. Die hohe Methylglyoxalkonzentration im Blutplasma der Kaninchen könnte ein Zeichen der Konzentrationsüberschätzung sein.

Bisher gibt es für Kaninchenplasmaproben keine direkten Vergleichswerte. Die Glyoxalkonzentration weicht nur bedingt von den Werten ab, die in der Literatur für humanes Plasma angegeben werden, was diese verlässlicher erscheinen lässt. Um das Ergebnis abzusichern, ist es notwendig, die Messung durch den Goldstandard der Methylglyoxal/Glyoxal Messung zu validieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die 2-wöchige Hyperglykämie in den diabetischen Kaninchen zu einer erhöhten endogenen AGE-Bildung im Blutplasma führt, was mit einer Abnahme an freiem Lysin und Arginin korreliert. Glyoxal ist ebenso tendenziell erhöht, was für einen Diabetes mellitus beschrieben ist. Diese Befunde zeigen, dass das Kaninchenmodell ein valider Ansatz für die Untersuchung endogener AGE-Bildung ist.

4.2. AGEs im Reproduktionstrakt – eine Bedeutung für die Fertilität?

Der Gedanke an einen Zusammenhang von AGE-Akkumulation und Fertilitätsstörungen ist relativ jung. AGEs sind bei vielen Krankheitsbildern der gemeinsame Nenner und dafür bekannt, in verschiedenen Organen wie Niere und Herz-Kreislauf-System eine direkte Schädigung zu vermitteln. Im männlichen wie im weiblichen Reproduktionstrakt kann es unter Umständen zu einer AGE-Akkumulation kommen.

Durch Untersuchungen des menschlichen Hodens ergaben sich erste Hinweise auf einen direkten Zusammenhang zwischen einer diabetesbedingten AGE-Akkumulation und männlicher Fertilität. Männer mit Diabetes mellitus sind subfertil (Alves *et al.*, 2013). Als ein

Hauptmechanismus männlicher Subfertilität wird oxidativer Stress angesehen (ebd.). Es wird angenommen, dass es durch oxidativen Stress zu einer erhöhten DNA-Fragmentierung im Spermatozoon kommt (Agbaje *et al.*, 2007). Die Steigerung der DNA-Fragmentierung in Spermien diabetischer Männer ist nachweisbar und korreliert positiv mit der Menge an RAGE (Karimi *et al.*, 2012). Es wurde gezeigt, dass CML im Keimepithel des Hodens diabetischer Männer sowie in deren Spermatozoen akkumuliert (Mallidis *et al.*, 2007). Der molekulare Mechanismus zu diesen Befunden ist bisher ungeklärt.

Im weiblichen Reproduktionstrakt, speziell im Ovar, wurde eine AGE-Akkumulation bislang nur im Zusammenhang mit dem Alter der Frau und beim Polyzystischen Ovarsyndrom (PCOS) untersucht. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, am Modell des Kaninchens erstmalig die AGE-Bildung im weiblichen Reproduktionstrakt unter dem Einfluss eines Diabetes mellitus zu untersuchen.

4.2.2 AGE-Akkumulation im Endometrium diabetischer Kaninchen

Im Kaninchenuterus sind AGEs in den glatten Muskelzellen des Myometriums, im Endothel kleiner Gefäße und im Epithel des Endometriums vorhanden. Das Endometrium des Kaninchens besitzt, gleich dem humanen, ein prismatisches, einschichtiges Epithel im Cavum und in den uterinen Drüsen. Im Gegensatz zur Frau hat das weibliche Kaninchen keinen Menstrualzyklus, wodurch das Endometrium beim Kaninchen nicht zyklisch abgestoßen wird. Dennoch kommt es auch beim Kaninchen zum Epithelwechsel im Endometrium. Dieser Unterschied ist zu beachten, sollte sich aber auf die Bewertung des Endometriums hinsichtlich einer AGE-Akkumulation nicht wesentlich auswirken. Die Induktion des Diabetes mellitus und die Untersuchung des Endometriums spielen sich in einem kurzen (14-tägigen) Zeitraum ab, wodurch eine langwierige AGE-Anreicherung auszuschließen ist.

Beim Kaninchen kommt es aufgrund der diabetesbedingten Hyperglykämie zu einer Akkumulation von Argpyrimidin, CML und Pentosidin im endometrialen Epithel (siehe Abb. 12).

Die gewonnenen Daten aus der Slot Blot-Untersuchung und die aus der Immunhistochemie unterscheiden sich. Die Analyse der AGE-Modifikationen des Endometriums im Slot Blot bestätigt nicht die AGE-Akkumulation, die in der Immunhistochemie ersichtlich wird. Im Slot Blot, ähnlich wie im Western Blot, wird ein Proteingemisch immunologisch untersucht. Da AGE-Modifikationen in vielseitiger Form auftreten z. B. an Nukleotiden, Phospholipiden, Proteinen oder als freie AGEs, wird durch den Slot Blot nicht das gesamte Modifikationsspektrum ermittelt.

Die Immunhistochemie bietet zudem den Vorteil, die zellspezifische Verteilung der AGE-Akkumulation sichtbar zu machen.

Die Beschaffenheit des Endometriums ist von großer Wichtigkeit für die Präimplantationsphase, und damit für den Erfolg der Implantation. Zwischen dem Endometrium und der *in utero*-befindlichen Blastozyste besteht ein abgestimmter Dialog, welcher über eine Fülle von Faktoren wie Hormonen, Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Proteinase u. a. geführt wird. Das endometriale Gewebe sezerniert wichtige Stoffe an der Implantationsstelle, die von der Blastozyste erkannt werden und deren Einnistung einleiten (Lopata, 1996).

In Zusammenfassung verschiedener Daten aus der Literatur kann davon ausgegangen werden, dass es als Folge einer lokalen AGE-Anreicherung zur Störung der Implantation kommen kann.

Wie eingangs beschrieben, zeigten Bhutada und Kollegen am Modell der Ratte, dass HMGB1, als hauptsächlicher RAGE-Ligand, während der Implantation herunterreguliert wird und eine Supplementierung von HMGB1 während der Implantation eine Einnistung der Blastozysten verhindert (Bhutada *et al.*, 2014). Die Mechanismen, die dazu führen, sind unklar. Dass RAGE im Endometrium von Ratten HMBG1-aktivierbar ist wurde durch eine intrauterine HMBG1-Supplementierung, die zu einer gesteigerten RAGE-Expression führt, bewiesen (ebd.). Auch im humanen Uterusgewebe wird RAGE exprimiert (Sharma *et al.*, 2010; Bhutada *et al.*, 2014). Eine RAGE-Aktivierung über AGEs und HMGB1 führt zu einer vermehrten Freisetzung von TNF- α (Luan *et al.*, 2010; Chuah *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013; Bhutada *et al.*, 2014; Ott *et al.*, 2014). Eine intrauterine Supplementierung von HMGB1 steigert die TNF- α -Expression im Endometrium (Bhutada *et al.*, 2014).

Bei diabetischen Ratten findet sich am Tag der Implantation eine gesteigerte TNF- α -Genexpression im Uterus (Pampfer, 2001). Diese erhöhte TNF- α -Expression ist im Epithel des Endometriums lokalisiert (ebd.).

Folgender Mechanismus diabetogener Implantationsstörung wäre demnach ableitbar: Unter physiologischen Bedingungen nehmen HMGB1 und RAGE während der Implantation ab. Die Hyperglykämie führt zur AGE-Akkumulation im Endometrium und dadurch zur Zunahme von RAGE. RAGE vermittelt eine Inflammationsreaktion, die die Implantation des Embryos gefährden kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit und Daten aus der Literatur sprechen demnach nachdrücklich dafür, die Auswirkungen einer AGE-Akkumulation im Uterus während der Präimplantation detailliert zu untersuchen.

4.2.1. AGE-Modifikationen im Kaninchenovar

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob es bei einer diabetischen Hyperglykämie auch zu einer Anreicherung von AGEs im Ovar der Kaninchen kommt.

Bei Frauen mit Diabetes mellitus ist die Ovarialfunktion beeinträchtigt. Im diabetischen Kaninchenmodell äußert sich dies in einer verringerten Ovulationsrate, was wiederum mit einer verringerten Anzahl an Embryonen am Tag 6 *p.c.* korreliert (Thieme *et al.*, 2012). Da das Follikelepithel im Ovar insulin sensitiv ist, führt ein Mangel an Insulin zu einer gestörten Follikelreifung (Ahmed, 2011). Neben der fehlenden Insulinwirkung wäre auch eine AGE-Toxizität ein denkbarer Mechanismus der Funktionsstörung im Ovar unter einem Diabetes mellitus.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Frauen mit PCOS AGEs in Granulosazellen akkumulieren (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2007). Ebenso wird im Mausmodell gezeigt, dass im Ovar „alter“ Mäuse die Expression des Methylglyoxal-detoxifizierenden Enzyms Glyoxalase 1 vermindert ist, was wiederum zu einer Anreicherung von AGEs führt (Tatone *et al.*, 2008, 2010). In beiden Fällen wird diskutiert, ob die AGE-Akkumulation ursächlich zu einer Störung der Ovarialfunktion im Alter und beim PCOS beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Vorhandensein von AGEs im Ovar im Kaninchen bestätigt. Die AGE-Modifikationen sind in der Rinde und im Mark detektierbar. Funktionell wichtig können die AGEs im Follikel sein. Selbst im Zytoplasma der Eizellen sind AGEs vorhanden.

Diamanti-Kandarakis und Kollegen finden RAGE im menschlichen Ovar, vor allem in der *Theca interna*-Zellen, in Granulosazellen, im Endothel und in Stromazellen (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2007). Nicht gesicherte Daten, die auf Kongress-Abstracts basieren, deuten darauf hin, dass AGEs auf Granulosazellen der Follikel Einfluss nehmen können. Eine Stimulation von Granulosazellen mit AGEs führt zu einer anormalen Aktivierung von ERK1/2 (Merhi, 2014). Weitere Untersuchungen zeigen, dass AGEs die insulinabhängige Akt-Phosphorylierung in Granulosazellen hemmen und zu einer verminderten GLUT 4-Translokation führen (ebd.). AGEs haben in diesen Versuchen die Potenz, mit dem Luteinisierenden Hormon zu interferieren (ebd.).

Die AGEs sind im Kaninchenovar spezifisch angeordnet. CML und Argpyrimidin sind zytoplasmatisch lokalisiert, wohingegen Pentosidin auch im Nukleus zu finden ist. In der Literatur ist das Gleichgewicht der AGE-Verteilung wie folgt beschrieben: 0,1 – 1 % Lysin- und Argininreste an Proteinen, 1 in 10^5 Nukleotiden der DNA und 0,1 % der Phospholipide sind AGE-modifiziert (Thornalley, 2008). Glykierte Nukleotide werden beim Exzisionsreparaturprozess (Murata-Kamiya *et al.*, 2000) und AGE-Phospholipide im Lipid-*turn over* (Requena *et al.*, 1997) beseitigt,

wodurch wiederum freie AGEs entstehen (Thornalley, 2008). Die eingesetzten monoklonalen Antikörper detektieren nach Herstellerangaben auch freie AGEs .

Warum gerade Pentosidin insbesondere im Kern nachweisbar ist, ist nicht bekannt. Interessanterweise sind die Nuklei der Oozyten, ebenso wie die Zellkerne im Embryo, frei von Pentosidin-Modifikationen. Spekulieren kann man über etwaige Mechanismen, die verhindern, dass es dort zu DNA-Schäden kommt.

CML akkumuliert im Ovar in den interstitiellen steroidogenen Zellen. Diese Zellen haben ein wabig strukturiertes Zytoplasma mit reichlich Zellorganellen, die für die Steroidsynthese notwendig sind. Dafür werden vermehrt Lipide in den Zellen eingelagert. Da die CML-Bildung eng an den Lipidmetabolismus gekoppelt ist, könnte dieser das vermehrte CML-Aufkommen verantworten.

In der Literatur wird eine AGE-Akkumulation in der Follikelflüssigkeit des Menschen mit der Fertilitätsrate und der Entwicklungskompetenz des Embryos korreliert. Die umfassende Untersuchung durch Jinno und Kollegen mit 157 *in vitro*-fertilisierten (IVF)-Patientinnen zeigt eine direkte Korrelation zwischen dem AGE-Gehalt (u. a. CML und Pentosidin) in der Follikelflüssigkeit und einem i) verringertem Eizellwachstum, ii) einer schlechteren Befruchtungsrate der Eizellen und iii) einer langsameren Entwicklung des Embryos (Jinno *et al.*, 2011). Unterstrichen werden diese Ergebnisse von einer zweiten Humanstudie von Fujii und Nakayama (2010). Die Autoren beweisen durch die Untersuchung von 28 IVF-Patientinnen, dass die Konzentration an sRAGE, der als AGE-Fänger gilt, in der Follikelflüssigkeit positiv mit der Eizellengewinnung korreliert (Fujii und Nakayama, 2010).

Da in der immunhistochemischen Betrachtung der Kaninchenovarien keine Follikelflüssigkeit mehr erhalten ist, lassen sich keine Aussagen dazu treffen, ob es, bedingt durch einen maternalen Diabetes mellitus, zu einer Anreicherung an AGEs in der Follikelflüssigkeit kommen kann. In der Rinde, im Mark und in den Follikeln mit den enthaltenen Eizellen waren keine diabetesbedingten Veränderungen hinsichtlich der AGE-Gehalte von Argpyrimidin, CML und Pentosidin ersichtlich.

Zusammenfassend lässt sich festhalten: Erkrankungen wie Diabetes mellitus und PCOS sowie das Altern sind mit erhöhten AGE-Gehalten im Reproduktionstrakt assoziiert. Eine Korrelation zwischen AGE-Akkumulation im männlichen wie im weiblichen Reproduktionstrakt und geminderter Fertilität ist bewiesen. Der genaue Mechanismus der AGE-Wirkung auf die Fertilität bleibt zu untersuchen.

4.3. Physiologische Rolle von AGEs in Präimplantationsembryonen

In den 6 Tage alten Kaninchenblastozysten wurden die AGEs Argpyrimidin, CML und Pentosidin nachgewiesen. Die Modifikationen sind diffus über Embryoblast und Trophoblast verteilt. Insbesondere die pluripotenten Zellen des Embryoblasten weisen eine hohe Anfärbbarkeit und damit hohe AGE-Gehalte auf.

Argpyrimidin ist verstärkt im Bereich des Vorderen Randbogens lokalisiert. Um diese Zuordnung zu validieren, wäre es notwendig, die Färbungsintensität in Relation zur Zelldichte zu stellen. Die Zellen des Hypoblasten verdichten sich am Vorderen Randbogen, der den zukünftigen kranialen Teil des Embryos markiert. Ein erhöhtes Vorkommen von Argpyrimidin-modifizierten Molekülen im Vorderen Randbogens wäre zu vermuten; welche Faktoren es jedoch beträfe, ist nicht bekannt.

Die Färbung für CML ist in bestimmten Zellen besonders intensiv zu sehen, u.a. in den Rauber'scher Trophoblastzellen. Die sonst überwiegend zytoplasmatische Färbung ist in den stark gefärbten Zellen auch im Kern zu finden. Die Rauber'scher Trophoblastzellen bedecken die Keimscheibe und gehen kurz vor der Implantation am Tag 6 *p.c.* durch Apoptose zugrunde (Williams und Biggers, 1990). Als Signal zur Einleitung von Apoptose wird u. a. oxidativer Stress vermutet. Da CML als Marker für oxidativen Stress bekannt ist, kann das Schicksal der Rauber'scher Trophoblastzellen eine Erklärung für die CML-Akkumulation in diesen embryonalen Zellen sein.

Auch in murinen embryonalen Stammzellen kommt CML vor (Hernebring *et al.*, 2006). Interessanterweise weisen Zellen mit viel CML gleichermaßen einen hohen Gehalt an carbonylierten Proteinen auf. Proteincarbonyle sind oxidierte Proteine, die unter Radikaleinwirkung in der Zelle entstehen. Die Korrelation zwischen CML-Akkumulation und einem vermehrten Auftreten von Proteincarbonylen in murinen embryonalen Stammzellen bestätigt indirekt den Zusammenhang zwischen CML-Bildung und oxidativem Stress.

Da AGEs als alters- und krankheitsassoziiert gelten, ist es überraschend, dass die Kaninchenblastozyste eine Vielzahl an AGE-Modifikationen aufweist. Vergleichbares wurde jedoch für Mausblastozysten beschrieben, welche eine AGE-Anreicherung in der inneren Zellmasse zeigen (Hernebring *et al.*, 2006). Es wird diskutiert, ob AGEs aus Gameten der Eltern an den Embryo weitergegeben werden. Dieser Ansatz ist denkbar, denn sowohl in Spermatozoen (Mallidis *et al.*, 2007) als auch im Zytoplasma von Eizellen (siehe Abb. 14) sind AGEs vorhanden.

Die Theorie, dass Blastozysten und Stammzellen sich während der Differenzierung von geschädigten Proteinen (u. a. CML-modifiziert) reinigen (Hernebring *et al.*, 2006), ist fraglich, da gerade CML als resistent gegenüber Proteasomenproteolyse gilt (Bulteau *et al.*, 2001). Die Überprüfung einer Stadienabhängigkeit der AGE-spezifischen Fluoreszenz gab keine Hinweise auf eine Abnahme der AGEs in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit (siehe Abb. 21). Aus *in vitro*-gewonnenen Daten ist bekannt, dass AGEs die Aktivität des 20 S-Proteasoms hemmen (Bulteau *et al.*, 2001; Grimm *et al.*, 2012). Vermutet wird, dass AGEs den Zugang zum aktiven Zentrum des 20 S-Proteasoms blockieren. Bei Kaninchenblastozysten konnte keine veränderte Proteasomenaktivität in Folge eines Diabetes mellitus gemessen werden (siehe Abb. 24). Eine Erklärung wäre, dass es sich bei den Embryonen um intakte *in vivo*-Systeme handelt, bei denen weitere Mechanismen zur Steuerung der Proteasomenaktivität beitragen.

4.3.1. Einfluss eines maternalen Diabetes mellitus auf den AGE-Gehalt im Präimplantationsembryo

Die vorrangig glukoseabhängigen AGEs Pentosidin und Argpyrimidin sind in Blastozysten diabetischer und gesunder Kaninchen nicht signifikant verändert, wobei Argpyrimidin in der Tendenz eine Erhöhung bei den diabetischen Blastozysten zeigt. CML, was auch durch die Autoxidation von Lipiden entstehen kann, kommt in den diabetischen Blastozysten vermehrt vor.

Die Kaninchenblastozyste ist umgeben vom Uterussekret. Die Stoffwechselstörung der Mutter ändert auch das die Blastozyste umgebende Milieu. Die mütterliche Hyperglykämie spiegelt sich im Uterussekret mit einem 2,5-fachen Anstieg der dortigen Glukosekonzentration wider (Ramin *et al.*, 2010). Ebenso korreliert die Hypercholesterinämie im maternalen Blut mit einem Anstieg der Cholesterinkonzentration im Uterussekret (Pendzialek und Schindler *et al.*, 2014). Der maternale Insulinmangel führt zu einem absoluten Insulinmangel an der Blastozyste (Ramin *et al.*, 2010). Bisher ist unklar, ob der Blastozyste durch den Insulinmangel weniger Glukose zur Verfügung steht. Bekannt ist, dass die Blastozyste die fehlende Insulinwirkung durch Adiponektin kompensieren und dadurch Glukose in die Zellen aufnehmen kann (Fischer *et al.*, 2010; Schindler *et al.*, 2013).

Pentosidin, ein AGE, welches aus der Reaktion mit Zuckern hervorgeht, ist unverändert. In der *in vitro*-Kultur ist nachweisbar, dass eine erhöhte Glukosekonzentration zu einem Anstieg an Pentosidin in der Kaninchenblastozyste führt (siehe Abb. 25). Die in der *in vitro*-Kultur eingesetzte Glukosekonzentration ist weitaus höher als die im Uterussekret. Im Uterussekret der

gesunden Kaninchen wird eine Glukosekonzentration von 0,5 mmol/l gemessen und bei den diabetischen Tieren steigt sie auf 1,5 mmol/l an (Ramin *et al.*, 2010). Da die nicht-enzymatisch ablaufende Glykierungsreaktion substrat- und zeitabhängig ist und die Kulturzeit der Kaninchenblastozysten auf 6 Stunden begrenzt war, wurden hohe Glukosekonzentrationen von 10 und 25 mmol/l in den Experimenten verwendet. Dass es in Kaninchenblastozysten diabetischer Häsinnen, trotz der erhöhten Glukosekonzentration im Uterussekret, nicht zu einem Anstieg an Pentosidin kommt, könnte einerseits ein Zeichen dafür sein, dass das Überangebot von Glukose nicht in die embryonalen Zellen gelangt, oder andererseits die generell relativ geringe Glukosekonzentration im Uterussekret nicht ausreicht, um mehr Pentosidin zu bilden.

Argpyrimidin, ein Produkt aus der Reaktion von Methylglyoxal mit Arginin, ist tendenziell erhöht. Methylglyoxal wird vorrangig durch eine hohe Glukosekonzentration gebildet, aber auch geringfügig durch den Ketonkörpermetabolismus und den Threoninabbau (Rabbani und Thornalley, 2012). Die Messung der Methylglyoxalkonzentration in Blastozysten diabetischer und gesunder Kaninchen zeigte große Schwankungen der Messwerte und keine signifikanten Unterschiede. Über 99 % des entstehenden Methylglyoxals werden durch die Glyoxalase 1 und die Aldo-Keto-Reduktase enzymatisch detoxifiziert (ebd.). Dieser Mechanismus könnte die Blastozyste vor einer Argpyrimidin-Akkumulation schützen.

Unter diabetischen Bedingungen reichert sich CML in den Kaninchenblastozysten an. Die Slot Blot-Untersuchungen zeigen, dass besonders zytosolische Proteine von CML-Modifikationen betroffen sind, was sich auch mit Daten aus anderen Arbeiten deckt (Krantz, 2010). CML ist ein Glykoxidationsprodukt aus der Reaktion von Glyoxal mit Lysinresten. Etwa 50 % des gesamten CML-Vorkommens *in vivo* ist auf die Autoxidation von Lipiden zurückzuführen, welche reaktive α -Dicarbonyle bildet (Gaens *et al.*, 2013; Krantz, 2010). Die Blastozysten diabetischer Kaninchen reichern Lipidvesikel an (Schindler *et al.*, 2014). Transkriptdaten zeigen, dass in den diabetischen Blastozysten nicht die endogene Fettsäuresynthese, sondern der Transport erhöht ist. Im maternalen Plasma verändert der Diabetes mellitus das Lipidmuster bei den Lipoproteinen. Cholesterin und freie Fettsäuren akkumulieren in den Lipoproteinen LDL und VLDL (Pendzialek und Schindler *et al.*, 2014). Die Blastozyste, die über Lipoproteine versorgt wird (Willnow *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2009), nimmt dadurch mehr Cholesterin und freie Fettsäuren auf.

Die Interpretation der Daten aus der vorliegenden Arbeit geben einen Hinweis darauf, dass im Embryo selbst AGEs gebildet werden. Die CML-Akkumulation in den Blastozysten diabetischer Mütter findet sich nicht in einer CML-Akkumulation in den Oozyten wieder. Die spezifische AGE-Bildung korreliert mit der veränderten Stoffwechsellage in der Blastozyste unter einem

maternalen Diabetes mellitus. CML, welches verstärkt auch durch die Lipidperoxidation gebildet wird, ist einerseits ein Marker für oxidativen Stress und spiegelt andererseits das Mehrangebot an Lipiden wider. Der unveränderte Gehalt an Pentosidin und eine marginale Zunahme von Argpyrimidin sind ein weiteres Zeichen dafür, dass der Glukosestoffwechsel nicht im Fokus der diabetischen Blastozyste steht, sondern der Lipidstoffwechsel.

4.3.2 Einfluss eines maternalen Diabetes mellitus auf den oxidativen Status im Präimplantationsembryo

Aus Untersuchungen an verschiedenen Zelllinien ist bekannt, dass hyperglykämische Kulturbedingungen zu oxidativem Stress führen und stressaktivierte Signalwege induziert werden (Moley *et al.*, 1998). Dies führt zur Bildung von Entzündungs- und Apoptosemediatoren (Moley *et al.*, 1998). In Kaninchenblastozysten konnte bereits gezeigt werden, dass ein maternaler Diabetes mellitus die Apoptoserate in den embryonalen Zellen steigert (Ramin *et al.*, 2010). Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels der DCFH-DA-Färbung der ROS-Gehalt in Blastozysten bestimmt. Diese Daten geben einen Hinweis darauf, dass in Blastozysten diabetischer Mütter vermehrt Radikale vorkommen, vor allem H_2O_2 (siehe Abb. 23). H_2O_2 steigert die Bildung von CML (Nagai *et al.*, 1997). Das erhöhte Lipidangebot und der oxidative Stress in den Blastozysten diabetischer Kaninchen könnten die gesteigerte CML-Bildung verantworten.

4.3.3. Die Blastozystenhöhlenflüssigkeit – ein Reservoir für AGEs?

Die Blastozystenhöhlenflüssigkeit ist ein bedeutendes Nährstoffreservoir für den Embryo (Gopichandran und Leese, 2003). Während der Präimplantationsphase werden die inneren Zellen über die Blastozystenhöhlenflüssigkeit versorgt (Robinson *et al.*, 1990). Die äußere Trophoblastenoberfläche resorbiert Nährstoffe aus dem Uterussekret und gibt diese in die Blastozystenhöhle ab. Hasting und Enders zeigten beim Kaninchen, dass die Transportvorgänge zwischen Trophoblastzellen und Blastozystenhöhle in beide Richtungen verlaufen (Hastings und Enders, 1974), was die Funktion der Blastozystenhöhlenflüssigkeit als Nährstoffreservoir unterstreicht. Wichtige Metabolite und Makromoleküle sind in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit nachweisbar: Laktat, Pyruvat, Glukose, Glukose-6-Phosphat, α -Ketoglutarinsäure, 6-Phosphoglukonsäure, Glutamat, ATP, NAD^+ , NADH und NAD(P)H (Gopichandran und Leese, 2003; D'Alessandro *et al.*, 2012), essentielle und nicht-essentielle Aminosäuren (Dissertation, Jacqueline Gürke), genomische DNA (Palini *et al.*, 2013) sowie microRNAs (unveröffentlichte Daten, Mareike Pendzialek, Dr. Julia Knelangen). Da somit die Ausgangsprodukte der AGE-

Bildung (bisher bekannt Glukose, Lysin und Arginin) in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit vorhanden sind, ist anzunehmen, dass auch dort AGEs gebildet werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal ein Vorkommen von AGEs in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit validiert. Mittels Fluoreszenzmessung konnten die spezifischen AGE-*Peaks* nachgewiesen werden (siehe Abb. 18). Über die analytische Auftrennung der Blastozystenhöhlenflüssigkeit in der HPLC-MS wurden verschiedene freie AGEs identifiziert. Es wurden Formyllysin, Acetyllysin, Fructoselysin und CML detektiert. Weitere AGEs wie Lactoyllysin, Oxalyllysin und CEL befanden sich an der Nachweisgrenze. Die vorhandenen AGEs Formyllysin und Acetyllysin sind Amid-AGEs, welche in *in vitro*-Versuchen durch Reaktionen mit Glukose, Glucoson oder Methylglyoxal geformt werden. Sie wurden *in vivo* bereits im humanen Plasma detektiert (Henning *et al.*, 2011). Ihre Konzentration im Plasma ist ähnlich der des CMLs und CELs (ebd.). Des Weiteren konnten Marker für oxidative Prozesse wie 2-Desoxyguanosin und Methioninsulfoxid bestimmt werden. 2-Desoxyguanosin ist ein Abbauprodukt der DNA nach Radikaleinwirkung. Methioninsulfoxid ist oxidiertes Methionin.

4.4. AGEs – ein Pathomechanismus in der diabetischen Frühschwangerschaft?

Aus den Messungen der AGEs und deren Verteilung im Uterus und Embryo ergibt sich ein komplexes Muster der Wechselwirkung bei Störung des mütterlichen Stoffwechsels durch einen Diabetes mellitus. Die Abb. 29 gibt eine Übersicht, die als Diskussionsgrundlage für das folgende Kapitel dient.

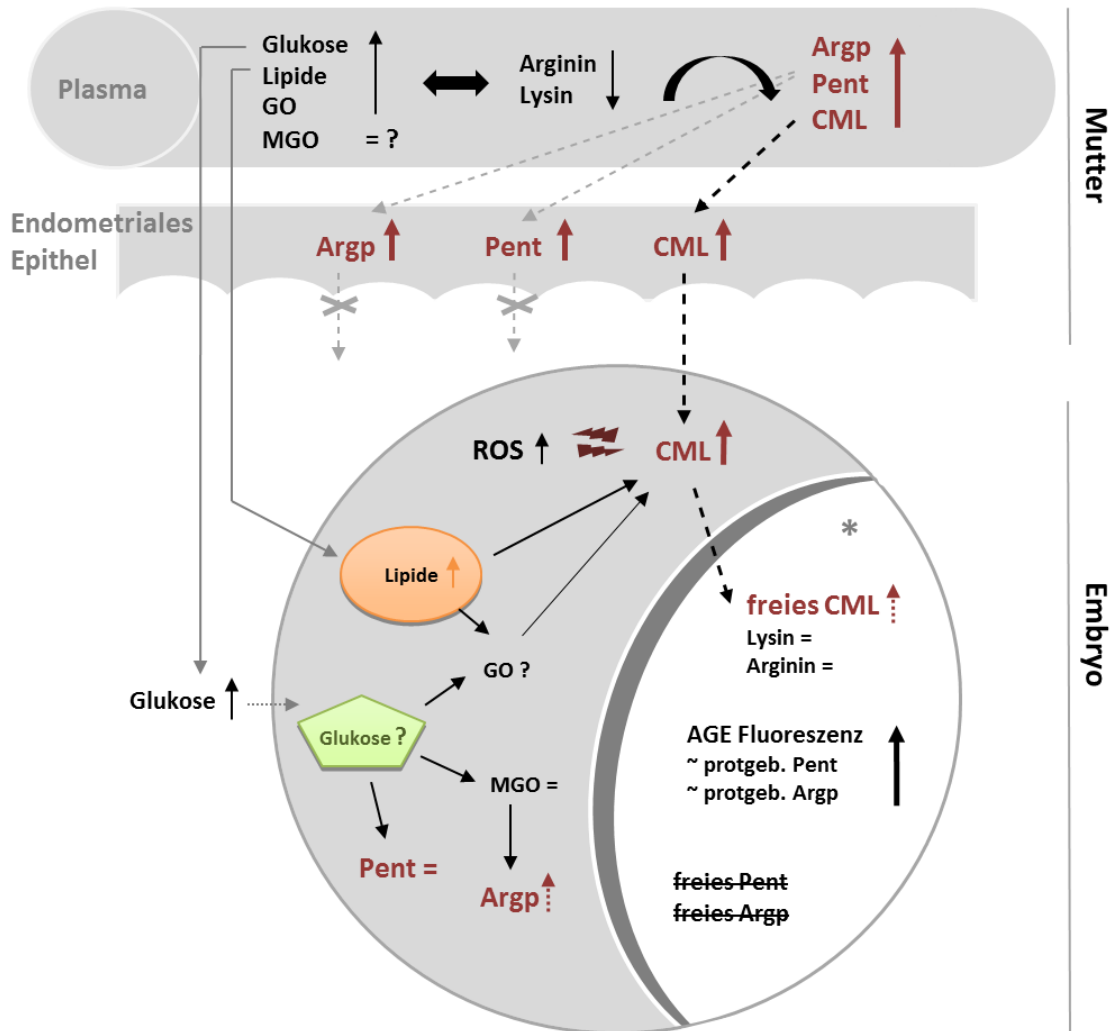


Abb. 29: Auswirkungen eines maternalen Diabetes mellitus auf den AGE-Metabolismus in Uterus und Präimplantationsembryo am Modell des Kaninchens.

GO = Glyoxal, MGO = Methylglyoxal, CML = Nε-Carboxymethyllysin, Pent = Pentosidin, Argp = Argpyrimidin, protgeb. = proteingebunden, gestrichelte Linie = mögliche Transportvorgänge, (=) unverändert, (▲) Anstieg, (▼) Verringerung, (*) Blastozystenhöhlenflüssigkeit.

Unter diabetischen Bedingungen kommt es in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit zu einem tendenziellen Anstieg an freiem CML und zu einer signifikanten Zunahme der fluoreszierenden AGEs bei Anregung/Emission 330/405 nm und 360/440 nm.

In *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen stellten Beier und Maurer fest, dass das Proteinmuster der Blastozystenhöhlenflüssigkeit dem des Uterussekrets folgt und weitestgehend entspricht (Beier und Maurer, 1975). Ändert sich das umgebende Medium, ändert sich dementsprechend das Proteinmuster in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit (ebd.). Das Nährstoffreservoir der Blastozyste

in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit passt sich demnach an das umgebende Milieu an. Dieser Zusammenhang wird in der eigenen Arbeitsgruppe belegt: Eine Erhöhung der verzweigtkettigen Aminosäuren, wie sie im Plasma der diabetischen Kaninchen zu finden ist, spiegelt sich in einer Erhöhung genau dieser Aminosäuren in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit wider (Dissertation, Jacqueline Gürke). Die verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin sind essentielle Aminosäuren, die nur von der Mutter an den Embryo herangetragen werden können.

Entgegen der Theorie – der ausschließlich endogenen AGE-Bildung – lässt dies die Frage aufkommen, ob AGEs von der Mutter auf den Embryo übertragen werden könnten? Die Ergebnisse der AGE-Messung im diabetischen Kaninchen geben einen Hinweis.

Im Plasma der diabetischen Kaninchen sind CML, Pentosidin und Argpyrimidin erhöht. Ein Anstieg dieser AGEs ist auch im Endometrium der diabetischen Kaninchen messbar. In der Blastozyste selbst und tendenziell in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit ist der CML-Wert erhöht. Im Kapitel 4.1.2. wurde erörtert, dass eine endogene AGE-Bildung mit einer Abnahme der Aminosäuren Arginin und Lysin einhergeht. In der Blastozystenhöhlenflüssigkeit kommt es nicht zu dieser Abnahme der Arginin- und Lysinkonzentration (Dissertation, Jacqueline Gürke), obwohl die AGE-spezifischen Fluoreszenzen signifikant und freies CML tendenziell erhöht sind. Die AGE-spezifischen Fluoreszenzen bei Anregung/Emission 330/405 nm und 360/440 nm, bei denen auch Argpyrimidin und Pentosidin fluoreszieren, zeigen in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit einen *Peak*, konnten jedoch nicht durch HPLC/MS als freies Argpyrimidin und Pentosidin detektiert werden. Das beweist, dass diese AGE-Modifikationen in gebundener Form vorkommen. Die unveränderte Konzentration der freien Aminosäuren Lysin und Arginin würde diese Erklärung bestätigen. Eine endogene Bildung der AGEs ist damit aber nicht ausgeschlossen. Der Nachweis der Erhöhung von freiem CML in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit diabetischer Embryonen gibt somit den entscheidenden Hinweis darauf, dass mütterliche AGEs auf den Embryo übertragen werden können. Ein aktiver Transport von CML ist bisher nicht bekannt. In Darmzellen ist passive Diffusion möglich (Geissler *et al.*, 2010).

Die Übertragung von AGEs von der Mutter auf den Präimplantationsembryo hat nicht nur Relevanz für die diabetische Schwangerschaft, sondern auch für verschiedene andere Situationen, die mit erhöhtem AGE-Vorkommen assoziiert sind, z. B. AGE-reiche Diäten (Goldberg *et al.*, 2004; Uribarri *et al.*, 2005, 2010), Altern (Lee und Cerami, 1992; Brownlee, 1995; Peppas *et al.*, 2008), Rauchen (Nicholl *et al.*, 1998; den Engelsens *et al.*, 2012) und Übergewicht (den Engelsens *et al.*, 2012; Gaens *et al.*, 2013).

4.4. AGE-Signaltransduktion im Präimplantationsembryo

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Befunde der vorliegenden Arbeit einen ersten Hinweis auf ein aktives RAGE/AGE-System in der Kaninchenblastozyste geben. Es wäre somit denkbar, dass AGEs über RAGE in der Blastozyste wirken können. Eine physiologische Rolle von RAGE während der Implantation bleibt zu untersuchen.

AGEs können durch den Rezeptor RAGE intrazelluläre Kaskaden auslösen. RAGE wurde auf Transkript- und Proteinebene in Kaninchenblastozysten nachgewiesen.

Die Expression von *AGER* im Präimplantationsembryo ist abhängig vom Entwicklungsstadium. Beim Kaninchen sind erste *AGER*-Transkripte ab der frühen Blastozyste detektierbar (Tag 4 *p.c.*, siehe Abb. 27). Bemerkenswert ist, dass die Anzahl der *AGER*-Transkripte in EB und TB am Tag 6 *p.c.* während der Gastrulation abnimmt, was einen Zusammenhang mit den biologischen Signalen der Implantation vermuten lässt.

Die Kaninchenblastozyste implantiert am Tag 6,5 – 6,8 *p.c.* Aus dem Rattenmodell ist bekannt, dass die Konzentration an HMGB1, als potenter RAGE-Ligand, während der Implantation im Uterussekret abnimmt. Es ist möglich, dass dazu korrelierend auch *AGER* herunterreguliert wird, um eine erfolgreiche Implantation zu garantieren.

Es ist bekannt, dass AGEs über RAGE intrazelluläre Kaskaden aktivieren können. Unklarheit herrscht allerdings über die strukturellen Voraussetzungen für die Bindung von AGEs an RAGE. Einerseits wird beschrieben, dass nur hochgradig modifizierte AGEs RAGE aktivieren können (Valencia *et al.*, 2004; Thornalley, 2007). Ein andere Studie kommt zu dem Schluss, dass Proteine in nanomolaren Bereich für die Liganden-Rezeptor-Interaktionen ausreichen (Kislinger *et al.*, 1999). Aufgereinigte AGEs, isoliert aus Diabetespatienten, können eine Aktivierung von RAGE in gleicher Weise wie *in vitro*-hergestellte AGEs induzieren (Schmidt *et al.*, 1995). Die *in vitro*-stimulierten Kaninchenblastozysten zeigen bei der einstündigen Kultivierung mit 400 µg AGE-BSA keine Stressreaktion in der DCFH-DA-Färbung. Aus Vorversuchen an RK 13-Zellen ergab sich, dass bei einer Kultur mit dem Stressor H₂O₂ der maximale Umsatz an DCFH-DA nach einer Stunde gemessen werden kann (siehe Anhang 7.5. Induktion von oxidativem Stress in RK 13-Zellen), weswegen diese Zeitspanne gewählt wurde. Die Verwendung sehr hoher und unphysiologischer AGE-BSA-Konzentrationen führt zu einer minimalen Zunahme der Fluoreszenzintensität nach einer Stunde, also zu einer Zunahme an ROS.

AGE-BSA ist ein häufig verwendetes Stimulationsmittel, um die AGE-Wirkung *in vitro* nachzustellen (Smedsrød *et al.*, 1997; Lappas *et al.*, 2007; Stensen *et al.*, 2014). Das eingesetzte

AGE-BSA unterscheidet sich jedoch meist von Studie zu Studie, da es verschiedene Methoden gibt, um die AGE-Bildung am BSA zu induzieren. In der vorliegenden Arbeit wurde AGE-BSA käuflich erworben, um Kontaminationen bei der Herstellung zu vermeiden. Die Glaubwürdigkeit verschiedener Studien wurde aufgrund von Endotoxin-kontaminierten AGE-Präparaten angezweifelt. Endotoxine aktivieren u. a. die gleichen proinflammatorischen Signale wie AGEs (Xie *et al.*, 1993; Dukic-Stefanovic *et al.*, 2003; Andreakos *et al.*, 2004).

Durch die Heterogenität der AGEs gestaltet es sich schwierig, *in vitro* spezifische AGE-Effekte nachzustellen. Dies könnte auch die Diskrepanz der verschiedenen Ergebnisse zur AGE-vermittelten Zellantwort erklären. Die kaum ersichtliche Reaktion der *in vitro*-stimulierten Blastozysten auf AGE-BSA lässt daher keine allgemeingültige Aussage zu. Neben dem Grad der Modifikation an einem Protein ist auch die Art der AGE-Modifikation relevant. So wird mehrfach gezeigt, dass CML RAGE aktivieren kann (Kislinger *et al.*, 1999; Holik *et al.*, 2013; Gaens *et al.*, 2014). Aufgrund der vorliegenden Datenlage wäre es daher interessant, die direkte Wirkung der Blastozysten auf CML zu untersuchen. *In vitro* konnte anhand der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y gezeigt werden, dass eine CML-Inkubation zu einer Hochregulation von RAGE führt (Holik *et al.*, 2013), ein Mechanismus der für RAGE bekannt ist. Eine Stimulation des RAGE durch RAGE-Liganden führt zur Steigerung seiner Expression (Bierhaus *et al.*, 2005; Grimm *et al.*, 2012; Bhutada *et al.*, 2014). Diese Korrelation ist ebenso im Kaninchenmodell ersichtlich. Blastozysten, die sich unter diabetischen Bedingungen entwickeln, akkumulieren CML und weisen eine gesteigerte *AGER*-mRNA-Menge auf.

5. Zusammenfassung

Eine diabetische Schwangerschaft ist eine Risikoschwangerschaft. Der Mechanismus der diabetesabhängigen Schwangerschaftskomplikationen wird intensiv untersucht. Diese Arbeit bietet einen neuen Ansatz, der dazu beitragen soll, diabetesbedingte Veränderungen während der Schwangerschaft besser zu verstehen. Eine gesteigerte Bildung von *advanced glycation endproducts* (AGEs) beim Diabetes mellitus spielt eine bedeutende Rolle in der Initiierung und der Progression diabetogener Komplikationen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden AGEs in Präimplantationsembryonen des Kaninchens und im Reproduktionstrakt (Ovar und Uterus) der Muttertiere nachgewiesen. Bedingt durch einen Diabetes mellitus kommt es beim Kaninchen und ihren Embryonen zu einer gesteigerten endogenen AGE-Bildung und möglicherweise auch zu einer Übertragung von AGEs von der Mutter zum Embryo.

Im Folgenden werden die einzelnen Erkenntnisse dieser Arbeit zusammengefasst.

- Eine 2-wöchige Hyperglykämie führt zu einem signifikanten Anstieg der AGEs Argpyrimidin, CML und Pentosidin im Blutplasma gravidierender Kaninchen. Der potente AGE-Bildner Glyoxal ist tendenziell erhöht, während die Methylglyoxalkonzentration sich nicht ändert.
- Wie in der Literatur für Mensch (Ahmed und Thornalley, 2003; Kilhovd *et al.*, 2003), Maus (Baba *et al.*, 2009) und Ratte (Degenhardt *et al.*, 2002; N *et al.*, 2003) beschrieben, führt eine Hyperglykämie in erster Linie zu einem Anstieg der Plasma-AGEs. In Berücksichtigung der Abnahme der Aminosäuren Lysin und Arginin im Blutplasma der diabetischen Kaninchen erklären sich die Zunahme von Argpyrimidin, CML und Pentosidin durch eine gesteigerte endogene AGE-Bildung.

AGE-Modifikationen im Reproduktionstrakt des Kaninchens:

- Im Ovar, einschließlich der Oozyten, und im Uterus kommen natürlicherweise AGEs vor, die sich in ihrer Lokalisation unterscheiden.

Bedingt durch einen maternalen Diabetes mellitus...

- reichern sich Argpyrimidin, CML und Pentosidin im endometrialen Epithel des Uterus an,
- kommt es im Ovar zu keinen ersichtlichen Veränderungen hinsichtlich der AGE-Gehalte.

AGE-Modifikationen und ROS im Präimplantationsembryo:

- Die 6 Tage alten Blastozysten weisen intrazelluläre AGEs (Argpyrimidin, CML und Pentosidin) auf. Dabei ergeben sich Unterschiede in der Verteilung.
- In der Blastozystenhöhlenflüssigkeit sind eine Vielzahl an ungebundenen AGEs wie Formyllysin, Acetyllysin, Fructoselysin, Carboxyethylarginin und auch CML, ebenso wie die oxidierten Metabolite 2-Desoxyguanosin und Methioninsulfoxid identifizierbar. Pentosidin und Argpyrimidin sind in ihrer ungebundenen Form nicht vorhanden.
- Während der Gastrulation bleiben die Werte fluoreszierender AGEs in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit unverändert.

Bedingt durch einen maternalen Diabetes mellitus...

- reichert sich CML signifikant und Argpyrimidin tendenziell in den embryonalen Zellen an,
- nimmt die Konzentration an freiem CML in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit tendenziell zu,
- nehmen die AGE-spezifischen Fluoreszenzen (330/405 nm und 360/440 nm) in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit signifikant zu und
- steigt die Anzahl an Blastozysten mit einer höheren ROS-Belastung.

Ein maternaler Diabetes mellitus hat keine Auswirkungen auf...

- die Konzentrationen an Pentosidin in den embryonalen Zellen,
- die Proteinkonzentration in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit und
- die Aktivität der 20 S-Proteasomen in den embryonalen Zellen.

RAGE im Präimplantationsembryo:

- *AGER*-mRNA wird im Kaninchen ab dem frühen Blastozystenstadium (Tag 4 *p.c.*) exprimiert.
- Am Tag 6 *p.c.* kommt es bei Embryonen vom Gastrulationsstadium 0 zu 1/2 zu einer signifikanten Abnahme der *AGER*-mRNA-Menge.
- In Blastozysten diabetischer Kaninchen ist die gastrulationsabhängige *AGER*-Expression gestört, da die Verringerung der Transkriptmenge im Stadium 1 unterbleibt.

In vitro-Kultur:

- In der *in vitro*-Kultur ist in den Kaninchenblastozysten eine AGE-Akkumulation durch Glukose induzierbar.
- *In vitro*-kultivierte Blastozysten reagieren bei einer supraphysiologischen Konzentration an AGE-BSA mit vermehrter oxidativer Stressantwort.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass eine 2-wöchige Hyperglykämie beim Kaninchen ausreicht, um eine Steigerung der endogenen AGE-Bildung zu induzieren. Da die Glykierungsreaktionen enzymunabhängig ablaufen und *in vivo* vor allem substrat- und zeitabhängig sind, kann man davon ausgehen, dass die gewonnenen Daten Relevanz für den Menschen besitzen. Die Tatsache, dass AGEs über diese kurze, experimentelle diabetische Phase im endometrialen Epithel und auch im sich entwickelnden Embryo beim Kaninchen akkumulieren, gibt einen deutlichen Hinweis darauf, dass AGEs in der frühen Schwangerschaft Einfluss nehmen können. Diese Ergebnisse bieten daher Anlass für weitere Untersuchungen.

Das Verstehen der Vorgänge, die zu Komplikationen bei einer diabetischen Schwangerschaft führen, ist die Voraussetzung für eine gezielte Behandlung. Um Komplikationen vorzubeugen, ist eine adäquate Blutzuckerkontrolle vor und während der Schwangerschaft unabdingbar.

6. Literaturverzeichnis

- Abdel-Wahab YH, O'Harte FP, Boyd AC, Barnett CR und Flatt PR** (1997) Glycation of insulin results in reduced biological activity in mice. *Acta Diabetologica* **34** 265–270.
- Agbaje IM, Rogers DA, McVicar CM, McClure N, Atkinson AB, Mallidis C und Lewis SEM** (2007) Insulin dependant diabetes mellitus: implications for male reproductive function. *Human Reproduction* **22** 1871–1877.
- Ahmed RG** (2011) Evolutionary interactions between diabetes and development. *Diabetes Research and Clinical Practice* **92** 153–167.
- Ahmed N und Thornalley PJ** (2003) Quantitative screening of protein biomarkers of early glycation, advanced glycation, oxidation and nitrosation in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry multiple reaction monitoring. *Biochemical Society Transactions* **31** 1417–1422.
- Ahmed N und Thornalley PJ** (2007) Advanced glycation endproducts: what is their relevance to diabetic complications? *Diabetes, Obesity & Metabolism* **9** 233–245.
- Ahmed MU, Thorpe SR und Baynes JW** (1986) Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *The Journal of Biological Chemistry* **261** 4889–4894.
- Ahmed N, Argirov OK, Minhas HS, Cordeiro CAA und Thornalley PJ** (2002) Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to Nepsilon-carboxymethyl-lysine- and Nepsilon-(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. *The Biochemical Journal* **364** 1–14.
- Ahmed N, Babaei-Jadidi R, Howell SK, Beisswenger PJ und Thornalley PJ** (2005) Degradation products of proteins damaged by glycation, oxidation and nitration in clinical type 1 diabetes. *Diabetologia* **48** 1590–1603.
- Alves MG, Martins AD, Rato L, Moreira PI, Socorro S und Oliveira PF** (2013) Molecular mechanisms beyond glucose transport in diabetes-related male infertility. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1832** 626–635.
- Andreakos E, Sacre SM, Smith C, Lundberg A, Kiriakidis S, Stonehouse T, Monaco C, Feldmann M und Foxwell BM** (2004) Distinct pathways of LPS-induced NF-kappa B activation and cytokine production in human myeloid and nonmyeloid cells defined by selective utilization of MyD88 and Mal/TIRAP. *Blood* **103** 2229–2237.
- Avery NC und Bailey AJ** (2006) The effects of the Maillard reaction on the physical properties and cell interactions of collagen. *Pathologie-Biologie* **54** 387–395.
- Azizi MH, Bahadori M und Azizi F** (2013) Breakthrough Discovery of HbA1c by Professor Samuel Rahbar in 1968. *Archives of Iranian Medicine* **16** 743–745.
- Baba SP, Barski OA, Ahmed Y, O'Toole TE, Conklin DJ, Bhatnagar A und Srivastava S** (2009) Reductive metabolism of AGE precursors: a metabolic route for preventing AGE accumulation in cardiovascular tissue. *Diabetes* **58** 2486–2497.

- Beier HM und Maurer RR** (1975) Uteroglobin and other proteins in rabbit blastocyst fluid after development in vivo and in vitro. *Cell and Tissue Research* **159** 1–10.
- Beisswenger PJ, Howell SK, Touchette AD, Lal S und Szwergold BS** (1999) Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. *Diabetes* **48** 198–202.
- Bergmann R, Helling R, Heichert C, Scheunemann M, Mäding P, Wittrisch H, Johannsen B und Henle T** (2001) Radio fluorination and positron emission tomography (PET) as a new approach to study the in vivo distribution and elimination of the advanced glycation endproducts N epsilon-carboxymethyllysine (CML) and N epsilon-carboxyethyllysine (CEL). *Die Nahrung* **45** 182–188.
- Bhatwadekar AD, Glenn JV, Li G, Curtis TM, Gardiner TA und Stitt AW** (2008) Advanced glycation of fibronectin impairs vascular repair by endothelial progenitor cells: implications for vasodegeneration in diabetic retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **49** 1232–1241.
- Bhutada S, Basak T, Savardekar L, Katkam RR, Jadhav G, Metkari SM, Chaudhari UK, Kumari D, Kholkute SD, Sengupta S et al.** (2014) High mobility group box 1 (HMGB1) protein in human uterine fluid and its relevance in implantation. *Human Reproduction (Oxford, England)* **29** 763–780.
- Bierhaus A, Haslbeck K-M, Humpert PM, Liliensiek B, Dehmer T, Morcos M, Sayed AAR, Andrassy M, Schiekofers S, Schneider JG et al.** (2004) Loss of pain perception in diabetes is dependent on a receptor of the immunoglobulin superfamily. *Journal of Clinical Investigation* **114** 1741–1751.
- Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, Stern DM und Nawroth PP** (2005) Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* **83** 876–886.
- Boutzios G, Livadas S, Piperi C, Vitoratos N, Adamopoulos C, Hassiakos D, Iavazzo C und Diamanti-Kandarakis E** (2012) Polycystic ovary syndrome offspring display increased oxidative stress markers comparable to gestational diabetes offspring. *Fertility and Sterility*.
- Boyd AC, Abdel-Wahab YH, McKillop AM, McNulty H, Barnett CR, O'Harte FP und Flatt PR** (2000) Impaired ability of glycated insulin to regulate plasma glucose and stimulate glucose transport and metabolism in mouse abdominal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta* **1523** 128–134.
- Brownlee M** (1995) Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annual Review of Medicine* **46** 223–234.
- Bulteau AL, Verbeke P, Petropoulos I, Chaffotte AF und Friguet B** (2001) Proteasome inhibition in glyoxal-treated fibroblasts and resistance of glycated glucose-6-phosphate dehydrogenase to 20 S proteasome degradation in vitro. *The Journal of Biological Chemistry* **276** 45662–45668.
- Chekir C, Nakatsuka M, Noguchi S, Konishi H, Kamada Y, Sasaki A, Hao L und Hiramatsu Y** (2006) Accumulation of advanced glycation end products in women with preeclampsia: possible involvement of placental oxidative and nitrative stress. *Placenta* **27** 225–233.
- Chuah YK, Basir R, Talib H, Tie TH und Nordin N** (2013) Receptor for Advanced Glycation End Products and Its Involvement in Inflammatory Diseases. *International Journal of Inflammation* **2013**.

- Constien R, Forde A, Liliensiek B, Gröne HJ, Nawroth P, Hämmerling G und Arnold B** (2001) Characterization of a novel EGFP reporter mouse to monitor Cre recombination as demonstrated by a Tie2 Cre mouse line. *Genesis (New York, N.Y.: 2000)* **30** 36–44.
- Cooke C-LM, Brockelsby JC, Baker PN und Davidge ST** (2009) The Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Is Elevated in Women with Preeclampsia.
- D'Alessandro A, Federica G, Palini S, Bulletti C und Zolla L** (2012) A mass spectrometry-based targeted metabolomics strategy of human blastocoele fluid: a promising tool in fertility research. *Molecular bioSystems* **8** 953–958.
- Degenhardt TP, Alderson NL, Arrington DD, Beattie RJ, Basgen JM, Steffes MW, Thorpe SR und Baynes JW** (2002) Pyridoxamine inhibits early renal disease and dyslipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. *Kidney International* **61** 939–950.
- Denker HW** (1975) [Implantation of rabbit embryo in the uterus: Significance of embryonic respectively endomethiol enzymes]. *Verhandlungen Der Anatomischen Gesellschaft* **69** 281–289.
- Denker HW** (1977) Implantation. The role of proteinases, and blockage of implantation by proteinase inhibitors. *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology* **53** 3–123.
- Diamanti-Kandarakis E, Piperi C, Patsouris E, Korkolopoulou P, Panidis D, Pawelczyk L, Papavassiliou AG und Duleba AJ** (2007) Immunohistochemical localization of advanced glycation end-products (AGEs) and their receptor (RAGE) in polycystic and normal ovaries. *Histochemistry and Cell Biology* **127** 581–589.
- Dittrich R, Hoffmann I, Stahl P, Müller A, Beckmann MW und Pischetsrieder M** (2006) Concentrations of Nepsilon-carboxymethyllysine in human breast milk, infant formulas, and urine of infants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54** 6924–6928.
- Dobler D, Ahmed N, Song L, Eboigbodin KE und Thornalley PJ** (2006) Increased dicarbonyl metabolism in endothelial cells in hyperglycemia induces anoikis and impairs angiogenesis by RGD and GFOGER motif modification. *Diabetes* **55** 1961–1969.
- Dukic-Stefanovic S, Gasic-Milenkovic J, Deuther-Conrad W und Münch G** (2003) Signal transduction pathways in mouse microglia N-11 cells activated by advanced glycation endproducts (AGEs). *Journal of Neurochemistry* **87** 44–55.
- Dunn JA, Patrick JS, Thorpe SR und Baynes JW** (1989) Oxidation of glycated proteins: age-dependent accumulation of N epsilon-(carboxymethyl)lysine in lens proteins. *Biochemistry* **28** 9464–9468.
- Dunn JA, McCance DR, Thorpe SR, Lyons TJ und Baynes JW** (1991) Age-dependent accumulation of N epsilon-(carboxymethyl)lysine and N epsilon-(carboxymethyl)hydroxylysine in human skin collagen. *Biochemistry* **30** 1205–1210.
- Dyer DG, Dunn JA, Thorpe SR, Bailie KE, Lyons TJ, McCance DR und Baynes JW** (1993) Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *The Journal of Clinical Investigation* **91** 2463–2469.
- Den Engelsen C, van den Donk M, Gorter KJ, Salomé PL und Rutten GE** (2012) Advanced glycation end products measured by skin autofluorescence in a population with central obesity. *Dermato-Endocrinology* **4** 33–38.

- Espinosa-Mansilla A, Durán-Merás I, Cañada FC und Márquez MP** (2007) High-performance liquid chromatographic determination of glyoxal and methylglyoxal in urine by prederivatization to lumazinic rings using in serial fast scan fluorimetric and diode array detectors. *Analytical Biochemistry* **371** 82–91.
- Fischer S, Santos AN, Thieme R, Ramin N und Fischer B** (2010) Adiponectin stimulates glucose uptake in rabbit blastocysts. *Biology of Reproduction* **83** 859–865.
- Fischer B, Chavatte-Palmer P, Viebahn C, Navarrete Santos A und Duranthon V** (2012) Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction (Cambridge, England)* **144** 1–10.
- Foerster A und Henle T** (2003) Glycation in food and metabolic transit of dietary AGEs (advanced glycation end-products): studies on the urinary excretion of pyrraline. *Biochemical Society Transactions* **31** 1383–1385.
- Förster A, Kühne Y und Henle T** (2005) Studies on absorption and elimination of dietary maillard reaction products. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1043** 474–481.
- Fujii EY und Nakayama M** (2010) The measurements of RAGE, VEGF, and AGEs in the plasma and follicular fluid of reproductive women: the influence of aging. *Fertility and Sterility* **94** 694–700.
- Gaens KH, Stehouwer CD und Schalkwijk CG** (2013) Advanced glycation endproducts and its receptor for advanced glycation endproducts in obesity. [Miscellaneous Article]. *Current Opinion in Lipidology February 2013* **24** 4–11.
- Gaens KHJ, Goossens GH, Niessen PM, van Greevenbroek MM, van der Kallen CJH, Niessen HW, Rensen SS, Buurman WA, Greve JWM, Blaak EE et al.** (2014) N^ε-(Carboxymethyl)lysine-Receptor for Advanced Glycation End Product Axis Is a Key Modulator of Obesity-Induced Dysregulation of Adipokine Expression and Insulin Resistance. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*.
- Geissler S, Hellwig M, Zwarg M, Markwardt F, Henle T und Brandsch M** (2010) Transport of the advanced glycation end products alanylpyrraline and pyrrolylalanine by the human proton-coupled peptide transporter hPEPT1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58** 2543–2547.
- Goldberg T, Cai W, Peppia M, Dardaine V, Baliga BS, Uribarri J und Vlassara H** (2004) Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *Journal of the American Dietetic Association* **104** 1287–1291.
- Gopichandran N und Leese HJ** (2003) Metabolic characterization of the bovine blastocyst, inner cell mass, trophectoderm and blastocoel fluid. *Reproduction (Cambridge, England)* **126** 299–308.
- Grandhee SK und Monnier VM** (1991) Mechanism of formation of the Maillard protein cross-link pentosidine. Glucose, fructose, and ascorbate as pentosidine precursors. *The Journal of Biological Chemistry* **266** 11649–11653.
- Grimm S, Ott C, Hörlacher M, Weber D, Höhn A und Grune T** (2012) Advanced-glycation-end-product-induced formation of immunoproteasomes: involvement of RAGE and Jak2/STAT1. *The Biochemical Journal* **448** 127–139.

- Grunwald S, Krause R, Bruch M, Henle T und Brandsch M** (2006) Transepithelial flux of early and advanced glycation compounds across Caco-2 cell monolayers and their interaction with intestinal amino acid and peptide transport systems. *The British Journal of Nutrition* **95** 1221–1228.
- Guedes-Martins L, Matos L, Soares A, Silva E und Almeida H** (2013) AGEs, contributors to placental bed vascular changes leading to preeclampsia. *Free Radical Research* **47** 70–80.
- HAPO Study Cooperative Research Group** (2002) The Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* **78** 69–77.
- Hastings RA und Enders AC** (1974) Uptake of exogenous protein by the preimplantation rabbit. *The Anatomical Record* **179** 311–330.
- Van Heijst JWJ, Niessen HWM, Musters RJ, Hinsbergh VWM van, Hoekman K und Schalkwijk CG** (2006) Argpyrimidine-modified Heat Shock Protein 27 in human non-small cell lung cancer: A possible mechanism for evasion of apoptosis. *Cancer Letters* **241** 309–319.
- Henning C, Smuda M, Girndt M, Ulrich C und Glomb MA** (2011) Molecular basis of maillard amide-advanced glycation end product (AGE) formation in vivo. *The Journal of Biological Chemistry* **286** 44350–44356.
- Hernebring M, Brolén G, Aguilaniu H, Semb H und Nyström T** (2006) Elimination of damaged proteins during differentiation of embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103** 7700–7705.
- Holik A-K, Rohm B, Somoza MM und Somoza V** (2013) N ε-Carboxymethyllysine (CML), a Maillard reaction product, stimulates serotonin release and activates the receptor for advanced glycation end products (RAGE) in SH-SY5Y cells. *Food & Function* **4** 1111–1120.
- Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen JX, Nagashima M, Lundh ER, Vijay S, Nitecki D et al.** (1995) The Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Is a Cellular Binding Site for Amphotericin: Mediation of neurite outgrowth and co-expression of RAGE and Amphotericin in the developing nervous system. *Journal of Biological Chemistry* **270** 25752–25761.
- Huang JS, Guh JY, Chen HC, Hung WC, Lai YH und Chuang LY** (2001) Role of receptor for advanced glycation end-product (RAGE) and the JAK/STAT-signaling pathway in AGE-induced collagen production in NRK-49F cells. *Journal of Cellular Biochemistry* **81** 102–113.
- Huttunen HJ, Fages C und Rauvala H** (1999a) Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE)-mediated Neurite Outgrowth and Activation of NF-κB Require the Cytoplasmic Domain of the Receptor but Different Downstream Signaling Pathways. *Journal of Biological Chemistry* **274** 19919–19924.
- Huttunen HJ, Fages C und Rauvala H** (1999b) Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-κB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry* **274** 19919–19924.
- Huttunen HJ, Kuja-Panula J und Rauvala H** (2002) Receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling induces CREB-dependent chromogranin expression during neuronal differentiation. *The Journal of Biological Chemistry* **277** 38635–38646.

- Ibrahim ZA, Armour CL, Phipps S und Sukkar MB** (2013) RAGE and TLRs: relatives, friends or neighbours? *Molecular Immunology* **56** 739–744.
- Idkowiak J, Weisheit G und Viebahn C** (2004) Polarity in the rabbit embryo. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **15** 607–617.
- Jara N, Leal MJ, Bunout D, Hirsch S, Barrera G, Leiva L und de la Maza MP** (2012) Dietary intake increases serum levels of carboxymethyl-lysine (CML) in diabetic patients. *Nutrición Hospitalaria* **27** 1272–1278.
- Jinno M, Takeuchi M, Watanabe A, Teruya K, Hirohama J, Eguchi N und Miyazaki A** (2011) Advanced glycation end-products accumulation compromises embryonic development and achievement of pregnancy by assisted reproductive technology. *Human Reproduction (Oxford, England)* **26** 604–610.
- Karimi J, Goodarzi MT, Tavilani H, Khodadadi I und Amiri I** (2012) Increased receptor for advanced glycation end products in spermatozoa of diabetic men and its association with sperm nuclear DNA fragmentation. *Andrologia* **44 Suppl 1** 280–286.
- Kilby MD, Neary RH, Mackness MI und Durrington PN** (1998) Fetal and maternal lipoprotein metabolism in human pregnancy complicated by type I diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **83** 1736–1741.
- Kilhovd BK, Giardino I, Torjesen PA, Birkeland KI, Berg TJ, Thornalley PJ, Brownlee M und Hanssen KF** (2003) Increased serum levels of the specific AGE-compound methylglyoxal-derived hydroimidazolone in patients with type 2 diabetes. *Metabolism: Clinical and Experimental* **52** 163–167.
- Kimura T, Takamatsu J, Miyata T, Miyakawa T und Horiuchi S** (1998) Localization of identified advanced glycation end-product structures, N epsilon(carboxymethyl)lysine and pentosidine, in age-related inclusions in human brains. *Pathology International* **48** 575–579.
- Kislinger T, Fu C, Huber B, Qu W, Taguchi A, Du Yan S, Hofmann M, Yan SF, Pischetsrieder M, Stern D et al.** (1999) N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *The Journal of Biological Chemistry* **274** 31740–31749.
- Kissebah AH, Alfarsi S, Adams PW und Wynn V** (1976) The metabolic fate of plasma lipoproteins in normal subjects and in patients with insulin resistance and endogenous hypertriglyceridaemia. *Diabetologia* **12** 501–509.
- Koenig RJ, Peterson CM, Jones RL, Saudek C, Lehrman M und Cerami A** (1976) Correlation of glucose regulation and hemoglobin A_{1c} in diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine* **295** 417–420.
- Konishi H, Nakatsuka M, Chekir C, Noguchi S, Kamada Y, Sasaki A und Hiramatsu Y** (2004) Advanced glycation end products induce secretion of chemokines and apoptosis in human first trimester trophoblasts. *Human Reproduction (Oxford, England)* **19** 2156–2162.
- Krantz S** (2010) Janusgesicht Glucose: Die Bedeutung der Maillard-Reaktion für das Altern, diabetische Folgeerkrankungen sowie degenerative und entzündliche Krankheitsprozesse. *tradition*.

- Lapolla A, Flamini R, Dalla Vedova A, Senesi A, Reitano R, Fedele D, Basso E, Seraglia R und Traldi P** (2003) Glyoxal and methylglyoxal levels in diabetic patients: quantitative determination by a new GC/MS method. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine: CCLM / FESCC* **41** 1166–1173.
- Lappas M, Permezel M und Rice GE** (2007) Advanced glycation endproducts mediate pro-inflammatory actions in human gestational tissues via nuclear factor- κ B and extracellular signal-regulated kinase 1/2. *Journal of Endocrinology* **193** 269–277.
- Lee AT und Cerami A** (1992) Role of glycation in aging. *Annals of the New York Academy of Sciences* **663** 63–70.
- Lenzen S** (2008) The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* **51** 216–226.
- Liliensiek B, Weigand MA, Bierhaus A, Nicklas W, Kasper M, Hofer S, Plachky J, Gröne H-J, Kurschus FC, Schmidt AM et al.** (2004) Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. *The Journal of Clinical Investigation* **113** 1641–1650.
- Ling X, Nagai R, Sakashita N, Takeya M, Horiuchi S und Takahashi K** (2001) Immunohistochemical distribution and quantitative biochemical detection of advanced glycation end products in fetal to adult rats and in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* **81** 845–861.
- Lizotte P-P, Hanford LE, Enghild JJ, Nozik-Grayck E, Giles B-L und Oury TD** (2007) Developmental expression of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) and its response to hyperoxia in the neonatal rat lung. *BMC Developmental Biology* **7** 15.
- Lopata A** (1996) Blastocyst-endometrial interaction: an appraisal of some old and new ideas. *Molecular Human Reproduction* **2** 519–525.
- Lorenzi M** (2007) The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: attractive, elusive, and resilient. *Experimental Diabetes Research* **2007** 61038.
- Luan Z-G, Zhang H, Yang P-T, Ma X-C, Zhang C und Guo R-X** (2010) HMGB1 activates nuclear factor- κ B signaling by RAGE and increases the production of TNF- α in human umbilical vein endothelial cells. *Immunobiology* **215** 956–962.
- Makita Z, Radoff S, Rayfield EJ, Yang Z, Skolnik E, Delaney V, Friedman EA, Cerami A und Vlassara H** (1991) Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *The New England Journal of Medicine* **325** 836–842.
- Mallidis C, Agbaje I, Rogers D, Glenn J, McCullough S, Atkinson AB, Steger K, Stitt A und McClure N** (2007) Distribution of the receptor for advanced glycation end products in the human male reproductive tract: prevalence in men with diabetes mellitus. *Human Reproduction* **22** 2169–2177.
- Mapara M, Thomas BS und Bhat KM** (2012) Rabbit as an animal model for experimental research. *Dental Research Journal* **9** 111–118.
- McDonald DM, Coleman G, Bhatwadekar A, Gardiner TA und Stitt AW** (2009) Advanced glycation of the Arg-Gly-Asp (RGD) tripeptide motif modulates retinal microvascular endothelial cell dysfunction. *Molecular Vision* **15** 1509–1520.

- McLellan AC, Thornalley PJ, Benn J und Sonksen PH** (1994) Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clinical Science (London, England: 1979)* **87** 21–29.
- Merhi Z** (2014) Advanced glycation end products and their relevance in female reproduction. *Human Reproduction (Oxford, England)* **29** 135–145.
- Merzouk H, Madani S, Korso N, Bouchenak M, Prost J und Belleville J** (2000) Maternal and fetal serum lipid and lipoprotein concentrations and compositions in type 1 diabetic pregnancy: relationship with maternal glycemic control. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **136** 441–448.
- Moley KH, Chi MM, Knudson CM, Korsmeyer SJ und Mueckler MM** (1998) Hyperglycemia induces apoptosis in pre-implantation embryos through cell death effector pathways. *Nature Medicine* **4** 1421–1424.
- Monnier VM und Cerami A** (1981) Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins. *Science (New York, N.Y.)* **211** 491–493.
- Monnier VM, Vishwanath V, Frank KE, Elmets CA, Dauchot P und Kohn RR** (1986) Relation between complications of type I diabetes mellitus and collagen-linked fluorescence. *The New England Journal of Medicine* **314** 403–408.
- Monnier VM, Sell DR, Nagaraj RH, Miyata S, Grandhee S, Odetti P und Ibrahim SA** (1992) Maillard reaction-mediated molecular damage to extracellular matrix and other tissue proteins in diabetes, aging, and uremia. *Diabetes* **41 Suppl 2** 36–41.
- Murata-Kamiya N, Kamiya H, Kaji H und Kasai H** (2000) Methylglyoxal induces G:C to C:G and G:C to T:A transversions in the supF gene on a shuttle vector plasmid replicated in mammalian cells. *Mutation Research* **468** 173–182.
- Karachalias N, Babaei-Jadidi R, Ahmed N und Thornalley PJ** (2003) Accumulation of fructosyl-lysine and advanced glycation end products in the kidney, retina and peripheral nerve of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochemical Society Transactions* **31** 1423–5
- Nagai R, Ikeda K, Higashi T, Sano H, Jinnouchi Y, Araki T und Horiuchi S** (1997) Hydroxyl radical mediates N epsilon-(carboxymethyl)lysine formation from Amadori product. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **234** 167–172.
- Nakadate Y, Uchida K, Shikata K, Yoshimura S, Azuma M, Hirata T, Konishi H, Kiyama H und Tachibana T** (2009) The formation of argpyrimidine, a methylglyoxal-arginine adduct, in the nucleus of neural cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **378** 209–212.
- Nakamura T, Sato E, Fujiwara N, Kawagoe Y, Ueda Y, Suzuki T, Yamada S, Takeuchi M, Fukami K, Ueda S et al.** (2009) Positive association of serum levels of advanced glycation end products and high mobility group box–1 with asymmetric dimethylarginine in nondiabetic chronic kidney disease patients. *Metabolism* **58** 1624–1628.
- Nawroth PP, Bierhaus A, Vogel GE, Hofmann MA, Zumbach M, Wahl P und Ziegler R** (1999) Nichtenzymatische Glykierung und oxidativer Streß bei chronischen Erkrankungen und Diabetes mellitus. *Medizinische Klinik* **94** 29–38.
- Negre-Salvayre A, Salvayre R, Augé N, Pamplona R und Portero-Otín M** (2009) Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. *Antioxidants & Redox Signaling* **11** 3071–3109.

- Neumann A, Schinzel R, Palm D, Riederer P und Münch G** (1999) High molecular weight hyaluronic acid inhibits advanced glycation endproduct-induced NF-kappaB activation and cytokine expression. *FEBS Letters* **453** 283–287.
- Nicholl ID, Stitt AW, Moore JE, Ritchie AJ, Archer DB und Bucala R** (1998) Increased levels of advanced glycation endproducts in the lenses and blood vessels of cigarette smokers. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* **4** 594–601.
- Nicolay JP, Schneider J, Niemoeller OM, Artunc F, Portero-Otin M, Haik G Jr, Thornalley PJ, Schleicher E, Wieder T und Lang F** (2006) Stimulation of suicidal erythrocyte death by methylglyoxal. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* **18** 223–232.
- Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T und Simm A** (2014) Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biology* **2** 411–429.
- Padival AK, Crabb JW und Nagaraj RH** (2003) Methylglyoxal modifies heat shock protein 27 in glomerular mesangial cells. *FEBS Letters* **551** 113–118.
- Palini S, Galluzzi L, De Stefani S, Bianchi M, Wells D, Magnani M und Bulletti C** (2013) Genomic DNA in human blastocoele fluid. *Reproductive Biomedicine Online* **26** 603–610.
- Pampfer S** (2001) Dysregulation of the cytokine network in the uterus of the diabetic rat. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)* **45** 375–381.
- Peppas M, Uribarri J und Vlassara H** (2008) Aging and glycoxidant stress. *Hormones (Athens, Greece)* **7** 123–132.
- Phillips SA und Thornalley PJ** (1993) Formation of methylglyoxal and D-lactate in human red blood cells in vitro. *Biochemical Society Transactions* **21** 163S.
- Rabbani N und Thornalley PJ** (2012) Methylglyoxal, glyoxalase 1 and the dicarbonyl proteome. *Amino Acids* **42** 1133–1142.
- Rahbar S und Figarola JL** (2003) Novel inhibitors of advanced glycation endproducts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **419** 63–79.
- Ramin N, Thieme R, Fischer S, Schindler M, Schmidt T, Fischer B und Navarrete Santos A** (2010) Maternal diabetes impairs gastrulation and insulin and IGF-I receptor expression in rabbit blastocysts. *Endocrinology* **151** 4158–4167.
- Rauci A, Cugusi S, Antonelli A, Barabino SM, Monti L, Bierhaus A, Reiss K, Saftig P und Bianchi ME** (2008) A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *The FASEB Journal* **22** 3716–3727.
- Reichard GA Jr, Skutches CL, Hoeldtke RD und Owen OE** (1986) Acetone metabolism in humans during diabetic ketoacidosis. *Diabetes* **35** 668–674.
- Requena JR, Ahmed MU, Fountain CW, Degenhardt TP, Reddy S, Perez C, Lyons TJ, Jenkins AJ, Baynes JW und Thorpe SR** (1997) Carboxymethylethanolamine, a biomarker of phospholipid modification during the maillard reaction in vivo. *The Journal of Biological Chemistry* **272** 17473–17479.

- Robinson DH, Smith PR und Benos DJ** (1990) Hexose transport in preimplantation rabbit blastocysts. *Journal of Reproduction and Fertility* **89** 1–11.
- Roncero-Ramos I, Delgado-Andrade C, Tessier FJ, Niquet-Léridon C, Strauch C, Monnier VM und Navarro MP** (2013) Metabolic transit of N ϵ -carboxymethyl-lysine after consumption of AGEs from bread crust. *Food & Function* **4** 1032–1039.
- Rosenn B, Miodovnik M, Combs CA, Khoury J und Siddiqi TA** (1994) Glycemic thresholds for spontaneous abortion and congenital malformations in insulin-dependent diabetes mellitus. *Obstetrics and Gynecology* **84** 515–520.
- Roth M** (1983) Glycated hemoglobin, 'not' glycosylated' or 'glucosylated. *Clinical Chemistry* **29** 1991.
- Schaefer UM, Songster G, Xiang A, Berkowitz K, Buchanan TA und Kjos SL** (1997) Congenital malformations in offspring of women with hyperglycemia first detected during pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **177** 1165–1171.
- Schiekofer S, Andrassy M, Chen J, Rudofsky G, Schneider J, Wendt T, Stefan N, Humpert P, Fritsche A, Stumvoll M et al.** (2003) Acute hyperglycemia causes intracellular formation of CML and activation of ras, p42/44 MAPK, and nuclear factor kappaB in PBMCs. *Diabetes* **52** 621–633.
- Schindler M, Fischer S, Thieme R, Fischer B und Navarrete Santos A** (2013) cAMP-Responsive Element Binding Protein: A Vital Link in Embryonic Hormonal Adaptation. *Endocrinology* **154** 2208–2221.
- Schindler M, Pendzialek M, Navarrete Santos AI, Plösch T, Seyring S, Gürke J, Haucke E, Knelangen JM, Fischer B und Navarrete Santos An** (2014) Maternal diabetes leads to unphysiological high lipid accumulation in rabbit preimplantation embryos. *Endocrinology* en20131760.
- Schmidt AM, Mora R, Cao R, Yan SD, Brett J, Ramakrishnan R, Tsang TC, Simionescu M und Stern D** (1994) The endothelial cell binding site for advanced glycation end products consists of a complex: an integral membrane protein and a lactoferrin-like polypeptide. *The Journal of Biological Chemistry* **269** 9882–9888.
- Schmidt AM, Hori O, Chen JX, Li JF, Crandall J, Zhang J, Cao R, Yan SD, Brett J und Stern D** (1995) Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *The Journal of Clinical Investigation* **96** 1395–1403.
- Schmitt A, Schmitt J, Münch G und Gasic-Milencovic J** (2005) Characterization of advanced glycation end products for biochemical studies: side chain modifications and fluorescence characteristics. *Analytical Biochemistry* **338** 201–215.
- Sebeková K, Blazíček P, Syrová D, Krivosíková Z, Spustová V, Heidland A und Schinzel R** (2001) Circulating advanced glycation end product levels in rats rapidly increase with acute renal failure. *Kidney International. Supplement* **78** S58–62.
- Sell DR und Monnier VM** (1989) Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *The Journal of Biological Chemistry* **264** 21597–21602.

- Sell DR und Monnier VM** (1990) End-stage renal disease and diabetes catalyze the formation of a pentose-derived crosslink from aging human collagen. *The Journal of Clinical Investigation* **85** 380–384.
- Sell DR, Nagaraj RH, Grandhee SK, Odetti P, Lapolla A, Fogarty J und Monnier VM** (1991) Pentosidine: a molecular marker for the cumulative damage to proteins in diabetes, aging, and uremia. *Diabetes/metabolism Reviews* **7** 239–251.
- Sharma I, Dhawan V, Saha SC, Rashmi B und Dhaliwal LK** (2010) Implication of the RAGE-EN-RAGE axis in endometriosis. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* **110** 199–202.
- Shaw JN, Baynes JW und Thorpe SR** (2002) N epsilon-(carboxymethyl)lysine (CML) as a biomarker of oxidative stress in long-lived tissue proteins. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* **186** 129–137.
- Shibata N, Nagai R, Uchida K, Horiuchi S, Yamada S, Hirano A, Kawaguchi M, Yamamoto T, Sasaki S und Kobayashi M** (2001) Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycooxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Research* **917** 97–104.
- Shimokawa I, Higami Y, Horiuchi S, Iwasaki M und Ikeda T** (1998) Advanced glycosylation end products in adrenal lipofuscin. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* **53** B49–51.
- Singh R, Barden A, Mori T und Beilin L** (2001) Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* **44** 129–146.
- Singh VP, Bali A, Singh N und Jaggi AS** (2014) Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology: Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* **18** 1–14.
- Smedsrød B, Melkko J, Araki N, Sano H und Horiuchi S** (1997) Advanced glycation end products are eliminated by scavenger-receptor-mediated endocytosis in hepatic sinusoidal Kupffer and endothelial cells. *The Biochemical Journal* **322 (Pt 2)** 567–573.
- Sochaski MA, Bartfay WJ, Thorpe SR, Baynes JW, Bartfay E, Lehotay DC und Liu PP** (2002) Lipid peroxidation and protein modification in a mouse model of chronic iron overload. *Metabolism: Clinical and Experimental* **51** 645–651.
- Somoza V, Wenzel E, Weiss C, Clawin-Rädecker I, Grübel N und Erbersdobler HF** (2006) Dose-dependent utilisation of casein-linked lysinoalanine, N(epsilon)-fructoselysine and N(epsilon)-carboxymethyllysine in rats. *Molecular Nutrition & Food Research* **50** 833–841.
- Sreejayan N, Yang X, Palanichamy K, Dolence K und Ren J** (2008) Antioxidant properties of argpyrimidine. *European Journal of Pharmacology* **593** 30–35.
- Stensen MH, Tanbo T, Storeng R und Fedorcsak P** (2014) Advanced glycation end products and their receptor contribute to ovarian ageing. *Human Reproduction* **29** 125–134.
- Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, Tanji N, Lu Y, Lalla E, Fu C et al.** (2000) Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature* **405** 354–360.

- Tatone C, Amicarelli F, Carbone MC, Monteleone P, Caserta D, Marci R, Artini PG, Piomboni P und Focarelli R** (2008) Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Human Reproduction Update* **14** 131–142.
- Tatone C, Carbone MC, Campanella G, Festuccia C, Artini PG, Talesa V, Focarelli R und Amicarelli F** (2010) Female reproductive dysfunction during ageing: role of methylglyoxal in the formation of advanced glycation endproducts in ovaries of reproductively-aged mice. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* **24** 63–72.
- Thieme R, Ramin N, Fischer S, Püschel B, Fischer B und Navarrete Santos A** (2012) Gastrulation in rabbit blastocysts depends on insulin and insulin-like-growth-factor 1. *Molecular and Cellular Endocrinology* **348** 112–119.
- Thomas MC, Forbes JM, Maclsaac R, Jerums G und Cooper ME** (2005) Low-molecular weight advanced glycation end products: markers of tissue AGE accumulation and more? *Annals of the New York Academy of Sciences* **1043** 644–654.
- Thornalley PJ** (2007) Dietary AGEs and ALEs and risk to human health by their interaction with the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE)--an introduction. *Molecular Nutrition & Food Research* **51** 1107–1110.
- Thornalley PJ** (2008) Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems - role in ageing and disease. *Drug Metabolism and Drug Interactions* **23** 125–150.
- Thornalley PJ und Rabbani N** (2009) Highlights and hotspots of protein glycation in end-stage renal disease. *Seminars in Dialysis* **22** 400–404.
- Uribarri J, Cai W, Sandu O, Peppia M, Goldberg T und Vlassara H** (2005) Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1043** 461–466.
- Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen X, Pyzik R, Yong A, Striker GE und Vlassara H** (2010) Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *Journal of the American Dietetic Association* **110** 911–916.e12.
- Valencia JV, Weldon SC, Quinn D, Kiers GH, DeGroot J, TeKoppele JM und Hughes TE** (2004) Advanced glycation end product ligands for the receptor for advanced glycation end products: biochemical characterization and formation kinetics. *Analytical Biochemistry* **324** 68–78.
- Vazzana N, Santilli F, Cucurullo C und Davì G** (2009) Soluble forms of RAGE in internal medicine. *Internal and Emergency Medicine* **4** 389–401.
- Viebahn C, Mayer B und Miething A** (1995) Morphology of incipient mesoderm formation in the rabbit embryo: a light- and retrospective electron-microscopic study. *Acta Anatomica* **154** 99–110.
- Vincent AM, Perrone L, Sullivan KA, Backus C, Sastry AM, Lastoskie C und Feldman EL** (2007) Receptor for advanced glycation end products activation injures primary sensory neurons via oxidative stress. *Endocrinology* **148** 548–558.
- Vlassara H** (2005) Advanced glycation in health and disease: role of the modern environment. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1043** 452–460.

- Vlassara H und Palace MR** (2002) Diabetes and advanced glycation endproducts. *Journal of Internal Medicine* **251** 87–101.
- Watkins AJ und Fleming TP** (2009) Blastocyst environment and its influence on offspring cardiovascular health: the heart of the matter. *Journal of Anatomy* **215** 52–59.
- Watkins A, Papenbrock T und Fleming T** (2008) The Preimplantation Embryo: Handle with Care. *Seminars in Reproductive Medicine* **26** 175–185.
- Wilker SC, Chellan P, Arnold BM und Nagaraj RH** (2001) Chromatographic Quantification of Argpyrimidine, a Methylglyoxal-Derived Product in Tissue Proteins: Comparison with Pentosidine. *Analytical Biochemistry* **290** 353–358.
- Williams BS und Biggers JD** (1990) Polar trophoblast (Raubert's layer) of the rabbit blastocyst. *The Anatomical Record* **227** 211–222.
- Willnow TE, Hammes A und Eaton S** (2007) Lipoproteins and their receptors in embryonic development: more than cholesterol clearance. *Development (Cambridge, England)* **134** 3239–3249.
- Wu X, Mi Y, Yang H, Hu A, Zhang Q und Shang C** (2013) The activation of HMGB1 as a progression factor on inflammation response in normal human bronchial epithelial cells through RAGE/JNK/NF- κ B pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry* **380** 249–257.
- Xie QW, Whisnant R und Nathan C** (1993) Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *The Journal of Experimental Medicine* **177** 1779–1784.
- Xu H, Wang Z, Wang Y, Hu S und Liu N** (2013) Biodistribution and Elimination Study of Fluorine-18 Labeled N ϵ -Carboxymethyl-Lysine following Intra-gastric and Intravenous Administration. *PLoS ONE* **8** e57897.
- Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D und Stern D** (1994) Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *The Journal of Biological Chemistry* **269** 9889–9897.
- Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Petrova RG, Abedin MJ, Li H, Yasui K, Takeuchi M, Makita Z, Takasawa S et al.** (2003) Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *The Biochemical Journal* **370** 1097–1109.
- Yu M, Wang H, Ding A, Golenbock DT, Latz E, Czura CJ, Fenton MJ, Tracey KJ und Yang H** (2006) HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock (Augusta, Ga.)* **26** 174–179.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema der Bildung von AGEs durch oxidative und nicht-oxidative Prozesse.....	5
Abb. 2: Strukturformeln von Argpyrimidin, Pentosidin und CML.....	6
Abb. 3: Schematische Darstellung des RAGE-Signalweges.....	10
Abb. 4: Phylogenetischer Verwandtschaftsgrad verschiedener Versuchstiere.....	14
Abb. 5: Kaninchenblastozyste am Tag 6 <i>p.c.</i> mit der morphologischen Einteilung der frühen Keimscheibendifferenzierung.....	16
Abb. 6: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes.....	23
Abb. 7: Schematische Darstellung von Western Blot und Slot Blot.....	30
Abb. 8: Blutglukosewerte im Blutplasma diabetischer (DT1) und gesunder Kaninchen.....	44
Abb. 9: Glyoxal- und Methylglyoxalkonzentration im Blutplasma diabetischer (DT1) und gesunder Kaninchen.....	45
Abb. 10: Relative Menge proteingebundener AGEs im Blutplasma diabetischer (DT1) und gesunder Kaninchen am Tag 6 <i>p.c.</i>	46
Abb. 11: Relative Menge proteingebundener AGEs im Uterus und im Endometrium diabetischer (DT1) und gesunder Kaninchen.....	47
Abb. 12: Immunhistochemischer Nachweis von AGEs im Uterus diabetischer (DT1) und gesunder Kaninchen.....	48
Abb. 13: Immunhistochemischer Nachweis von AGEs im Ovar gesunder Kaninchen.....	49
Abb. 14: Immunhistochemischer Nachweis von AGEs in den Eizellen gesunder Kaninchen.....	51
Abb. 15: Immunhistochemischer Nachweis von AGEs in 6 Tage alten Blastozysten gesunder Kaninchen.....	53
Abb. 16: Nachweis proteingebundener AGEs in 6 Tage alten Blastozysten diabetischer (DT1) und gesunder Kaninchen.....	54
Abb. 17: Mittlere Methylglyoxalwerte in 6 Tage alten Blastozysten diabetischer (DT1) und gesunder Kaninchen.....	55
Abb. 18: Emissionsspektren AGE-spezifischer Fluoreszenzen [FU] bei den Anregungen 330 nm und 360 nm in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit 6 Tage alter Blastozysten.....	56
Abb. 19: Proteinkonzentration in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit von 6 Tage alten Blastozysten diabetischer (DT1) und gesunder Kaninchen.....	57
Abb. 20: AGE-spezifische Fluoreszenz in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit von 6 Tage alten Blastozysten diabetischer (DT1) und gesunder Kaninchen.....	57
Abb. 21: AGE-spezifische Fluoreszenz in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit 6 Tage alter Kaninchenblastozysten der Gastrulationsstadien 0,1 und 2.....	58
Abb. 22: Quantifizierung von freiem CML in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit von 6 Tage alten Blastozysten des Stadiums 1 diabetischer (DT1) und gesunder Kaninchen.....	60
Abb. 23: Indirekter Nachweis von oxidativem Stress in Blastozysten gesunder und diabetischer (DT1) Kaninchen mittels DCFH-DA-Färbung.....	61
Abb. 24: Aktivität der 20 S-Proteasomen in Blastozysten gesunder und diabetischer (DT1) Kaninchen.....	62

Abb. 25: Pentosidin-Akkumulation in <i>in vitro</i> -kultivierten 6 Tage alten Blastozysten nach Glukosestimulation.	63
Abb. 26: Indirekter Nachweis von oxidativem Stress in <i>in vitro</i> -kultivierten Blastozysten mittels DCFH-DA-Färbung.....	64
Abb. 27: RAGE-Vorkommen in Kaninchenembryonen.....	65
Abb. 28: Quantifizierung von <i>AGER</i> -mRNA in Kaninchenblastozysten.	66
Abb. 29: Auswirkungen eines maternalen Diabetes mellitus auf den AGE-Metabolismus in Uterus und Präimplantationsembryo am Modell des Kaninchens.	80
Abb. 30: Zeitlicher Verlauf der Stressinduktion durch eine H ₂ O ₂ -Stimulation in RK 13-Zellen.	VIII
Abb. 31: Chromatogramm des Standards der Methylglyoxal- und Glyoxalbestimmung mittels HPLC.....	IX

7.2. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Mögliche Komplikationen einer diabetischen Schwangerschaft.....	3
Tab. 2: AGE-bedingte Folgeerkrankungen bei Diabetes mellitus.	11
Tab. 3: Einteilung der Gastrulationsstadien beim Kaninchenembryo in der Periimplantationsphase	15
Tab. 4: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für Western Blot und Slot Blot.	31
Tab. 5: Verwendete Primerpaare.....	38
Tab. 6: Methylglyoxalgehalte 6 Tage alter Blastozysten diabetischer (DT1) und gesunder Kaninchen.	55
Tab. 7: Freie AGEs und oxidierte Metabolite in der Blastozystenhöhlenflüssigkeit von 6 Tage alten Kaninchenblastozysten.....	59
Tab. 8: Neue Diagnosegrenzwerte für Gestationsdiabetes im venösen Plasma nach IADPSG-Konsensus-Empfehlungen im Vergleich zu den bisher gültigen	VII

7.3. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
<i>ad</i>	addiere
ADAM10	<i>A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10</i>
AGE	<i>Advanced glycation endproduct</i> (Glykierungsendprodukt)
AGE-BSA	Glykiertes BSA
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
<i>Aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
BCA	<i>bicinchoninic acid assay</i>
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
BSM II	Basales Synthetisches Medium II
ca.	circa
CD36	Fettsäuretranslokase
Cdc42	<i>cell division cycle 42</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDS	<i>Cell dissociation solution</i>
CEA	Carboxyethylarginin
CEL	N ^ε -(Carboxyethyl)lysin
cm ²	Quadratcentimeter
CMA	Carboxymethylarginin
CML	N ^ε -(Carboxymethyl)lysin
CO ₂	Kohlendioxid
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
C _T	<i>cycle threshold</i> , Zyklenzahl
Cu	Kupfer
d	Tag
DAB	Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DCF	2',7'-Dichlorofluoreszein
DCFH-DA	2',7'-Dichlorodihydrofluoreszeindiacetat
DDP	5,6-Diamino-2,4-Hydroxypyrimidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
DT1	Diabetes mellitus Typ I
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetra-acetat
EB	Embryoblast
Em	Emission
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
FEEL-1/2	<i>fasciclin, EGF-like, laminin-type EGF-like and link domain-containing scavenger receptor 1/2</i>
FKS	fötales Kälberserum

g	Gramm
GALA	Glycolaldehyd-Lysin-Amid (N6-Glycoloyllysin)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-H3	<i>Glyoxal derived Hydroimidazol</i> 5-(2-Imino-5-oxo-1-imidazolidinyl)norvalin)
G-H1	<i>Glyoxal derived Hydroimidazol</i> Nδ-(5-hydro-4-imidazol-2-yl)ornithin
GLUT	Glukosetransporter
GODIC	<i>Glyoxal derived imidazol crosslink</i> (2-ammonio-6-([2-[(4-ammonio-5-oxido-5-oxopentyl)amino]-4,5-dihydro-1H-imidazol-5-ylidene)amino)hexanoat)
GOLA	Glyoxal-lysin-amid (N6-{2-[(5-amino-5-carboxypentyl)amino]-2-oxoethyl}lysin
GOLD	<i>Glyoxal derived lysine dimer</i> (N6-{2-[(5-Amino-5-Carboxypentyl)amino]-2-oxoethyl}lysin)
GSH	Glutathion
GTC	Guanidiniunthiocyanathydrochlorid
h	Stunde
HAPO	<i>hyperglycemia adverse pregnancy outcome</i>
HbA1c	adultes Hemoglobin mit Glukose gebunden
hCG	humanes Choriongonadotropin
HMGB1	<i>high-mobility-group</i> -protein B1
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie
HRP	Meerrettichperoxidase, <i>horseradish peroxidase</i>
HUES	Humane embryonale Stammzellen
IADPSG	<i>International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Recommendations on the Diagnosis and Classification of Hyperglycemia in Pregnancy</i>
I.E.	Internationale Einheiten
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
<i>i.m.</i>	intramuskulär
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
JAK	Janus-Kinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
kDa	KiloDalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergröße
l	Liter
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LOX-1	<i>lectin-type oxidized LDL receptor</i>
M	Molar
mA	Milliampere
MCA	7-amino-4-methylcoumarin
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEM	Minimal Eagle Medium Earl's
min	Minuten
MG-H1	<i>methylglyoxal derived hydroimidazol</i> Nδ-(5-hydro-5-methyl-4-imidazol-2-yl)-ornithin)
MG-H3	<i>methylglyoxal derived hydroimidazol</i> 5-(2-amino-4-hydro-4-methyl-5-imidazol-1-yl)norvalin

MIP-1 α/β	<i>macrophage inflammatory proteins-1α/β</i>
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MOLIC	<i>methylglyoxal derived imidazol crosslink</i> (2-ammonio-6-([2-[(4-ammonio-5-oxido-5-oxopentyl)amino]-4-methyl-4,5-dihydro-1H-imidazol-5-ylidene]amino)hexanoat)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Versuchsgruppen
N	Anzahl der unabhängigen Versuch
N ₂	Stickstoff
Na	Natrium
NAD ⁺	oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
ng	Nanogramm
NF- κ B	nukleärer Faktor- <i>kappa</i> B
nm	Nanometer
O ₂ ⁻	Superoxidanionen
OD	optischer Dichte
oGTT	oraler Glukosetoleranztest
OST48	Oligosaccharyl-Transferase 48 (AGE-Rezeptor1)
p	Wahrscheinlichkeit
p38-MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PBS-T	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung + Tween
<i>p.c.</i>	<i>post coitum</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PG	Prostaglandin
PGE	posteriore Gastrulaextension
pmol	picomolar
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotropin
PVA	Polyvinylalkohol
P38 MAP-K	P38 mitogen-activated protein kinases
<i>rab</i>	<i>rabbit</i>
RAGE	Receptor for advanced glycation endproducts
Ras	<i>Rat sarcoma</i> , kleines G-Protein
Rac-1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RIPA	<i>Radio-Immunoprecipitation Assay-Buffer</i>
RNA	Ribonukleinsäure
Rho	<i>Ras homologue</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> , Reaktive Sauerstoffspezies
<i>rpm</i>	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SAPK	<i>stress-activated protein kinase</i>
s.c.	<i>subkutan</i>
sek	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
sRAGE	<i>soluble receptor for advanced glycation endproducts</i>
SRB1	<i>scavenger-Rezeptor B1</i>
SSW	Schwangerschaftswoche
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
Suc-LLVY	Succinyl-Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TB	Trophoblast
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetra methylethylenediamine
TFA	Trifluoressigsäure
TLR-2/4	<i>toll-like-receptor 2/4</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
T _m	Temperatur der Primerbindung
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween20	Polyoxyethylen-(20)-Sorbitanmonolaurat
U	Unit
u. a.	und anderem
V	Volt
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
VRB	Vorderer Randbogen
WHO	Weltgesundheitsorganisation
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
°C	Grad Celsius
80K-H	<i>tyrosine-phosphorylated protein / FGF signalling protein</i>

7.4. Grenzwerte zur Diagnose von Gestationsdiabetes durch den oGTT

Anhang zum Kapitel 1.2. *Auswirkungen eines Diabetes mellitus auf die Schwangerschaft.*

Tab. 8: Neue Diagnosegrenzwerte für Gestationsdiabetes im venösen Plasma nach IADPSG-Konsensus-Empfehlungen im Vergleich zu den bisher gültigen

(SSW) – Schwangerschaftswoche, (IADPSG) – *International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Recommendations on the Diagnosis and Classification of Hyperglycemia in Pregnancy*

(Quelle: Kleinwechter *et al.*, 2011)

Zeitpunkt 24. – 27. SSW	Neue Grenzwerte (nach IADPSG) in venösem Plasma		Alte Grenzwerte (nach Carpenter / Coustan) in venösem Plasma	
	(mg/dl)	(mmol/l)	(mg/dl)	(mmol/l)
nüchtern	92	5,1	95	5,3
nach 1 h	180	10,0	180	10,0
nach 2 h	153	8,5	155	8,6

7.5. Induktion von oxidativem Stress in RK 13-Zellen

RK 13-Zellen wurden mit DCFH-DA inkubiert und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen H_2O_2 stimuliert. Im Mikroplattenreader wurde in zeitlichen Intervallen von 10 min die Bildung von DCF detektiert. Intrazelluläre ROS bedingen die Oxidation des nichtfluoreszierenden DCFH-DA zu dem fluoreszierenden Produkt DCF. Das fluoreszierende Produkt DCF wurde mit der Wellenlänge von 485 nm angeregt. Die Emission wurde bei der Wellenlänge von 535 nm gemessen.

Mit steigender H_2O_2 -Einwirkung nimmt die Bildung von DCF zu (siehe Abb. 30). Eine Sättigung der DCFH-DA-Oxidation durch intrazelluläre Radikale ist nach ca. 1 h zu sehen.

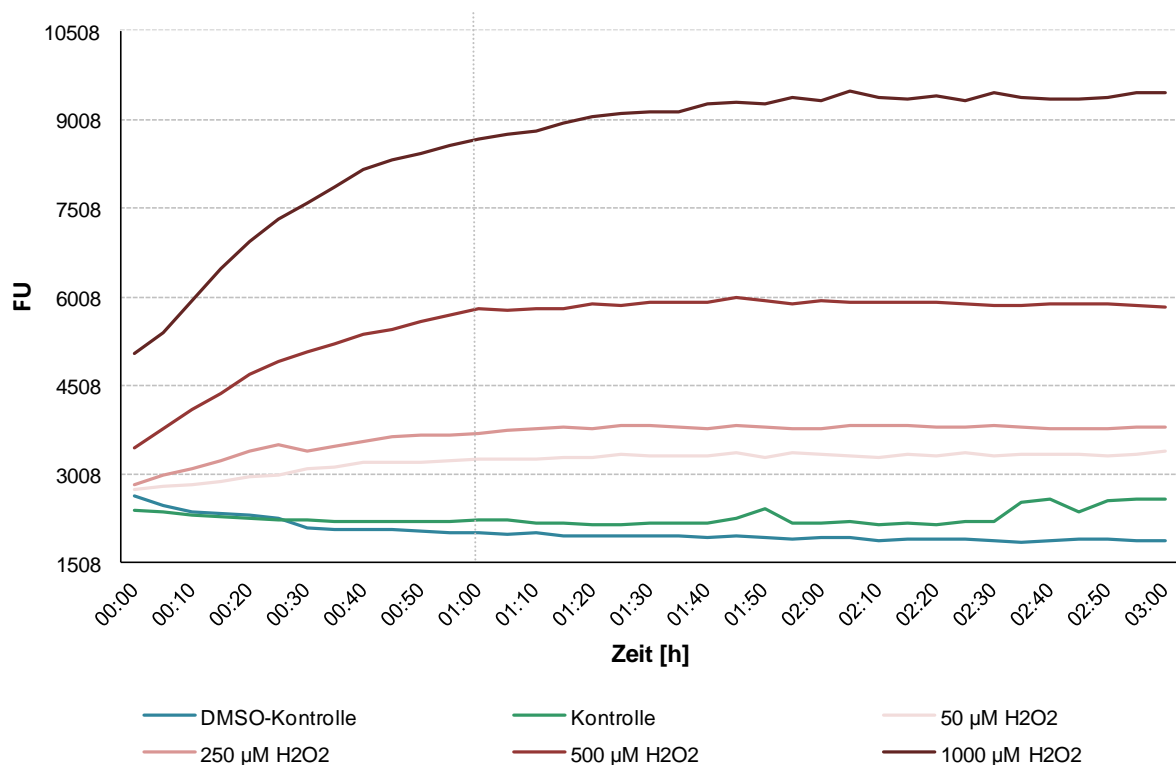


Abb. 30: Zeitlicher Verlauf der Stressinduktion durch eine H_2O_2 -Stimulation in RK 13-Zellen.

RK 13-Zellen wurden mit DCFH-DA inkubiert und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen H_2O_2 stimuliert. Die Bildung des fluoreszierenden DCF wurde in zeitlichen Intervallen von 10 min für 3 h im Mikroplattenreader detektiert. Die Fluoreszenz [FU] von DCF wurde mit der Wellenlänge von 485 nm angeregt. Die Emission wurde bei der Wellenlänge von 535 nm gemessen.

7.6. Standard der Methylglyoxal- und Glyoxalbestimmung

Anhang zu Kapitel 3.1. *Glyoxal und Methylglyoxal im Blutplasma diabetischer Kaninchen* und Kapitel 3.5.3. *Detektion von Glyoxal und Methylglyoxal in Embryonen diabetischer Kaninchen*.

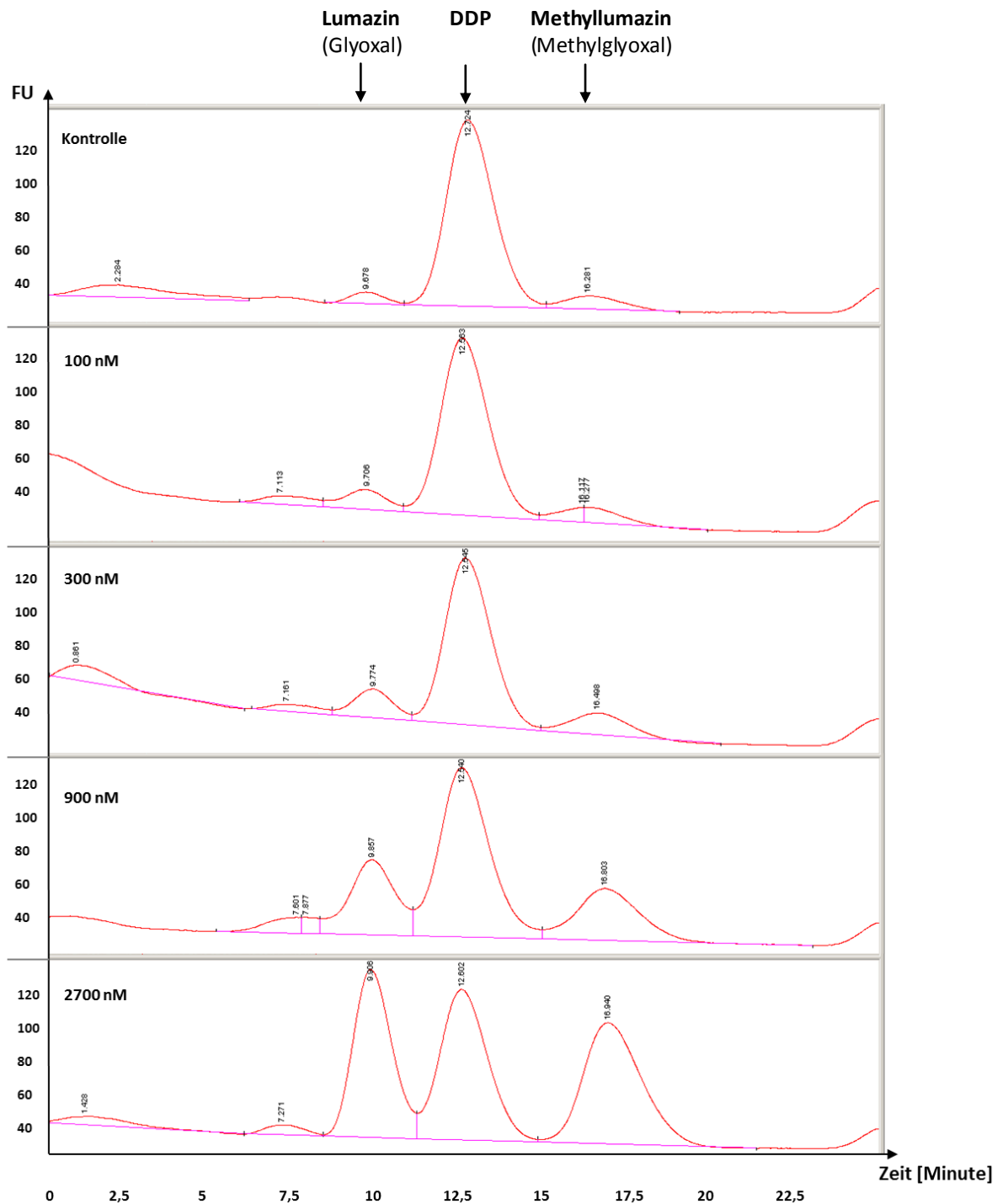


Abb. 31: Chromatogramm des Standards der Methylglyoxal- und Glyoxalbestimmung mittels HPLC.

Der Methylglyoxal- und Glyoxalstandard wurde in verschiedenen Konzentrationen mit HPLC-Wasser verdünnt. Methylglyoxal und Glyoxal wurden durch die Zugabe von DDP (5,6-Diamino-2,4-Hydroxypyrimidin) zu Lumazin und Methyllumazin derivatisiert, welche über deren spezifische Fluoreszenz [FU] detektiert werden.

Lebenslauf

Name: Elisa Haucke
Geburtsdatum: 07. 07. 1986
Geburtsort: Saalfeld (Saale)

AKTUELLE TÄTIGKEITEN

seit 09/2014 Projektmitarbeiterin in der Verbraucherzentrale Sachsen-Anhalt in Halle (Saale)
seit 01/2012 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität in Halle (Saale)

BERUFLICHER WERDEGANG

05 - 12/2011 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Universitätsklinik und Poliklinik für Herz-Thoraxchirurgie in Halle (Saale)

AKADEMISCHE AUSBILDUNG

seit 01/2012 Promotion im EU-Forschungsprojekt *EpiHealth* am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität in Halle (Saale)
10/2005 - 10/2010 Studium der Ernährungswissenschaften an der Martin-Luther-Universität in Halle (Saale)
09/1997 - 06/2005 Abitur am „Erasmus-Reinhold“ Gymnasium in Saalfeld (Saale)

BEGLEITENDE NEBENTÄTIGKEITEN

10/2012 - 03/2014 Tutorin im Praktikum „Anatomie und Mikroskopische Anatomie“ für Studierende der Ernährungs- und Naturwissenschaften und der Medizinischen Physik

AUSLANDSAUFENTHALTE

10/2010 – 05/2011 Neuseeland, *Work and Travel*

Publikationsverzeichnis

Manuskripte:

Haucke E, Navarrete-Santos AI, Simm A, Henning C, Glomb M, Guerke J, Schindler M, Fischer B, Navarrete Santos An. Accumulation of advanced glycation end products in the rabbit blastocyst under maternal diabetes. *Reproduction*, 2014 Aug. 148: 169-78. doi: 10.1530/REP-14-0149

Haucke E, Navarrete Santos A, Simm A, Silber RE, Hofmann B. Glycation of extracellular matrix proteins impairs migration of immune cells. *Wound Repair and Regeneration*, 2014 Mar-Apr; 22: 239-45. doi:10.1111/wrr.12144.

Schindler M, Pendzialek M, Navarrete Santos AI, Plösch T, Seyring S, Gürke J, **Haucke E**, Knelangen JM, Fischer B, Navarrete Santos An. Maternal diabetes leads to unphysiological high lipid accumulation in rabbit preimplantation embryos. *Endocrinology*, 2014 Apr. 155:1498-509. doi: 10.1210/en.2013-1760

Ott C*, Jacobs K*, **Haucke E***, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biology*, 2014 Jan 9. 2: 411-429. doi: 10.1016/j.redox.2013.12.016

Vorträge:

Haucke E, Navarrete Santos AI, Simm A, Henning C, Glomb M, Grune T, Fischer B, Navarrete Santos An. Accumulation of advanced glycation end products and the associated increase in oxidative stress in rabbit blastocysts of diabetic mothers. *Epiconcept workshop: Epigenetics for Improved Food Production: from Model to Practice*, 13th – 16th Oct 2013, Sant Feliu de Guíxols, Spain.

Haucke E, Navarrete Santos AI, Simm A, Henning C, Glomb M, Grune T, Fischer B, Navarrete Santos An. Metabolic stress in the diabetic rabbit blastocyst. *Stress and Ageing: from Molecular Biology to Clinical Perspectives – 10 years ageing meeting in Halle*, 6th – 8th Sep 2013, Halle (Saale), Germany.

Posterpräsentationen

Haucke E, Navarrete Santos AI, Simm A, Henning C, Glomb M, Grune T, Fischer B, Navarrete Santos An. Accumulation of advanced glycation end products and the associated increase in oxidative stress in rabbit blastocysts of diabetic mothers. *Epiconcept workshop: Epigenetics for Improved Food Production: from Model to Practice*, 13th – 16th Oct 2013, Sant Feliu de Guíxols, Spain.

Haucke E, Navarrete Santos AI, Simm A, Henning C, Glomb M, Grune T, Fischer B, Navarrete Santos An. Metabolic stress in the diabetic rabbit blastocyst. *Stress and Ageing: from Molecular Biology to Clinical Perspectives – 10 years ageing meeting in Halle*, 6th–8th Sep 2013, Halle (Saale), Germany.

Haucke E, Navarrete Santos AI, Thieme R, Simm A, Fischer B and Navarrete Santos An. AGEs and RAGE in the diabetic rabbit blastocyst. *Forschungstag der Medizin*, 19th Oct 2012. Halle (Saale), Germany.

Haucke E, Navarrete Santos AI, Thieme R, Simm A, Fischer B and Navarrete Santos An. AGEs and RAGE in the diabetic rabbit blastocyst. *11th International Symposium on the Maillard Reaction (ISMR)*, 16th – 20th Sep 2012, Nancy, France.

Haucke E, Navarrete Santos AI, Thieme R, Simm A, Fischer B and Navarrete Santos An. Advanced Glycation End Products and the Receptor for Advanced Glycation End Products in the Diabetic Rabbit Blastocyst. *63. Mosbacher Kolloquium der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie (GBM)*, 19th – 21st Mar 2012, Mosbach, Germany.
doi: 10.3288/contoo.paper.1869

Eidesstattliche Erklärung / *Declaration under Oath*

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

I declare under penalty of perjury that this thesis is my own work entirely and has been written without any help from other people. I used only the sources mentioned and included all the citations correctly both in word or content.

Datum/ *Date*

Unterschrift des Antragstellers / *Signature of the applicant*

Danksagung

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

Zu allererst danke ich herzlichst **Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer** für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie für die Möglichkeit meine Doktorarbeit am Institut für Anatomie und Zellbiologie anzufertigen. Im Besonderen danke ich Ihm für die Ermöglichung zur Teilnahme an zahlreichen z. T. internationalen Konferenzen.

Ein ganz großer Dank gilt **Frau PD Dr. Anne Navarrete Santos und Herrn Dr. Alexander Navarrete Santos** für die kompetente wissenschaftliche Betreuung und für die stete Anteilnahme an fachlichen wie auch privaten Freuden und Sorgen. Beide trugen entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Arbeitskollegen aus der Anatomie bedanken, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen. **Jacqueline Gürke, Mareike Pendzialek, Julia Knelangen Matthias Jung und Juliane-Susanne Schmidt** danke ich für die vielen anregenden Diskussionen, die leckeren Mittagspausen und die tolle Arbeitsatmosphäre. **Sabine Schrötter und Michaela Kirchstein** danke ich für die technische Unterstützung.

Hervorheben möchte ich an dieser Stelle die nette Zusammenarbeit mit den Kollegen aus der Herz-Thorax-Chirurgie der Universitätsklinik Halle (Saale). Es war mir immer eine Freude bei Euch, **Sandy Pöttsch, Bettina Weber, Kathleen Jacobs, Caroline Richter, Nicole Glaubitz und Samiya Al-Robaiy** zu sein.

Für die tollen Kooperationen die im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind, danke ich ganz herzlich **Christian Henning, Prof. Marcus A. Glomb, Sandra Reeg, Prof. Tilman Grune, Dr. Alexander Navarrete Santos und Prof. Andreas Simm.**

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie. Ihr habt mich während der gesamten Promotionszeit begleitet, unterstützt und meine Arbeit stets mit Interesse verfolgt.