

Aus dem Institut für Pharmakologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Fetale Programmierung der Nephronenzahl und  
Glomerulumgröße im endothelialen NO-Synthetase (eNOS)  
Knock-out Tiermodell

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anna Maria Gertrud Endres

aus Weiden i. d. OPf

Datum der Promotion: 14.02.2014

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
<b>1. Abstrakt deutsch und englisch</b>	<b>5</b>
<b>2. Einleitung und Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>8</b>
2.1. Geburtsgewicht und kardiovaskuläre Erkrankungen	8
2.2. Geburtsgewicht und arterielle Hypertonie	8
2.3. Barker Hypothese und fetale Programmierung	9
2.4. Erweiterte Barker Hypothese	9
2.5. Nephronenzahl, Glomerulumgröße und arterielle Hypertonie	10
2.6. Fetale Programmierung der Nephronenzahl	11
2.7. Stickstoffmonoxid (NO)	12
2.8. eNOS Knock-out-Mausmodell	13
2.9. Zielsetzung der Arbeit	13
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>14</b>
3.1. Material	14
3.1.1. Materialien, Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen	14
3.1.2. Lösungs- und Pufferansätze	15
3.1.3. Geräte	16
3.2. Methoden	17
3.2.1. Tierversuchsaufbau	17
3.2.1.1. Tierhaltung	17
3.2.1.2. Züchtung	18
3.2.1.3. Gewichtsbestimmung	19
3.2.1.4. Bestimmung des Genotyps	19
3.2.1.4.1. Blutentnahme zur Genotypisierung	19
3.2.1.4.2. DNA-Isolierung	19
3.2.1.4.3. Standard-PCR und Agarosegelelektrophorese	19
3.2.1.5. Organentnahme	21
3.2.2. Biochemische Methoden	22
3.2.2.1. Stoffwechselfersuch	22
3.2.2.2. Bestimmung der GFR	22
3.2.3. Physiologische Methode	23
3.2.3.1. Blutdruckmessung	23

3.2.4. Histologische Methoden	24
3.2.4.1. Fixierung	24
3.2.4.2. Einbettung in Paraffin	24
3.2.4.3. Silanisierung der Objektträger	24
3.2.4.4. Serienschnitttechnik	25
3.2.4.5. HE – Färbung	25
3.2.4.6. Glomerula – Größen – Messung	26
3.2.4.7. Glomerula – Anzahl – Bestimmung	26
3.2.5. Statistik	27
<b>4. Ergebnisse</b>	28
4.1. Körpergewicht der Tiere	28
4.1.1. Geburtsgewicht	28
4.1.2. Gewichtsverlauf	30
4.1.3. Endgewicht	36
4.2. Nierengewicht	37
4.3. Stoffwechselfersuch	38
4.3.1. Urinmenge	38
4.3.2. Kreatininclearance	40
4.3.3. Kreatininclearance/Körpergewicht	45
4.4. Blutdruck	48
4.4.1. Blutdruck 10. Woche, 19. Woche, 24. Woche	48
4.4.2. Blutdruckverlauf	49
4. 5. Histologische Ergebnisse	51
4.5.1. Glomerulaanzahl und Glomerulaanzahl/Gewicht linke Niere	51
4.5.2. Glomerulumfläche	53
4.5.3. Glomerulumumfang	55
4.5.4. Glomerulumvolumen	57
<b>5. Diskussion</b>	59
5.1. Vergleich der Ergebnisse mit der aktuellen Studienlage	60
5.1.1. Überprüfung der erweiterten Barker Hypothese	60
5.1.2. Hat der maternale heterozygote eNOS Knock-out Einfluss auf den renalen Phänotyp der Wildtypnachkommen?	64
5.1.3. Gibt es einen Einfluss durch den paternalen heterozygoten eNOS	65

Knock-out?	
5.1.4. Existieren geschlechtsspezifische Unterschiede?	67
5.2. Limitation der Arbeit: Genese der eruierten Effekte	70
5.3. Diskussion spezieller Methoden	73
5.3.1. Züchtung der F1 Generation	73
5.3.2. Anzahl und Verteilung der Versuchstiere	73
5.3.3. Kreatinkonzentrationsbestimmung mittels Jaffé Methode	74
5.3.4. Blutdruckmessung mittels Tail-cuff Methode	74
5.3.5. Bestimmung der Glomerulumgröße	75
5.3.6. Ermittlung der Anzahl der Glomerula	76
5.4. Konsequenzen der Arbeit für aktuelle Forschungsschwerpunkte	77
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>80</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>90</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>92</b>
<b>9. Anhang</b>	<b>93</b>
9.1. Eidesstattliche Versicherung	93
9.2. Lebenslauf	94
9.3. Danksagung	96

## 1. Abstrakt deutsch und englisch

### Hintergrund:

Die Barker Hypothese, gegründet auf dem Zusammenhang zwischen niedrigem Geburtsgewicht und Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen, besagt, dass Umweltfaktoren in einer kritischen Phase der intrauterinen Entwicklung fetale Programmierung mit lebenslangen Auswirkungen hervorrufen. Tierexperimentell konnte unter anderem eine Korrelation zwischen erniedrigtem Geburtsgewicht und dem renalen Phänotyp (verringerte Glomerulaanzahl bei vergrößerter Oberfläche) mit Hypertonie als Folge nachgewiesen werden. Die erweiterte Barker Hypothese vermutet, dass Gene ohne direkte Vererbung kongruent zur Umwelt ein erniedrigtes Geburtsgewicht sowie einen veränderten Phänotyp zur Folge haben.

### Methoden:

137 homozygote eNOS-Wildtypiere (F1 Generation eines eNOS Knock-out Mausmodells) wurden eingeschlossen, aufgeteilt in Tiere mit Wildtypeltern, Tiere mit heterozygoten Müttern und Tiere mit heterozygoten Vätern. Es erfolgten Gewichtsbestimmungen, Kreatininkonzentrationsbestimmung (Jaffé-Methode), Blutdruckmessung (Tail-Cuff-Methode) und Tötung mit Organentnahme am 168. Lebensstag. Die Glomerulaanzahl pro Niere wurde lichtmikroskopisch gezählt. 40 Glomerula pro Niere wurden mit ImageJ vermessen.

### Ergebnisse:

Das Geburtsgewicht der männlichen Wildtypnachkommen der heterozygoten eNOS Knock-out Mütter sowie das Gewicht in den ersten Lebenswochen ihrer gesamten Wildtypnachkommen war signifikant reduziert. Die Weibchen hatten signifikant schwerere Nieren, beide Geschlechter hatten eine signifikant geringere Kreatininclearance (Stoffwechselfersuch I) und signifikant weniger und größere Glomerula. Blutdruckmessung, Stoffwechselfersuch II und III ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Nachkommen der heterozygoten eNOS Knock-out Mütter und den Vergleichstieren.

Geburtsgewicht und Gewichtsverlauf der Nachkommen der Vergleichsgruppe und der heterozygoten eNOS Knock-out Väter unterschieden sich nicht. Deren weibliche Nachkommen hatten signifikant schwerere Nieren, eine Tendenz zu geringerer Kreatininclearance (Stoffwechselfersuch I) und signifikant weniger Glomerula als die

Vergleichsgruppe. Alle Tiere mit heterozygoten eNOS Knock-out Vätern hatten eine Tendenz zur geringeren Glomerulaanzahl. Die männlichen Nachkommen hatten signifikant größere Glomerula. Blutdruck, Nierenfunktion der Männchen und Nierenfunktion der Weibchen (Stoffwechselfersuch II und III) unterschieden sich nicht.

### **Schlussfolgerungen:**

Diese Studie konnte an Hand des reduzierten Geburts/Kindheitsgewichtes zeigen, dass eine fetale Programmierung der Wildtyp F1 Generation der heterozygoten eNOS Knock-out Mütter ohne Übertragung des Gens stattfand. Dies beweist die erweiterte Barker Hypothese, gibt allerdings keinen Aufschluss über die Genese. Eine Programmierung konnte ebenso über die paternale Linie dargestellt werden. Viele Effekte der Arbeit zeigen sich geschlechtsabhängig, kongruent zu Ergebnissen der klassischen Barker Hypothese. Speziell eine Programmierung der Nierenmorphologie (reduzierte Glomerulaanzahl) wurde nachgewiesen. Trotzdem kam es nicht zu einer langfristigen Einschränkung der Nierenfunktion oder zur Hypertonie. Weitere Untersuchungen müssen noch zur Klärung der Genese beitragen. Das zunehmende Verständnis der Mechanismen sowohl der klassischen als auch der erweiterten fetalen Programmierung könnte zum besseren Verständnis vieler chronischer Krankheiten beitragen, vor allem im Hinblick auf individuelle Erkrankungsrisiken bei gleichen Zivilisationsrisiken.

### **Background:**

The original Barker hypothesis postulates that people with a low birth weight are at greater risk of developing coronary heart disease. According to this theory, environmental factors in a critical phase of the intrauterine development result in fetal programming with lifelong consequences. Animal experiments showed a correlation between a lower birth weight and the renal phenotype (reduced glomerular number at a larger surface area) resulting in hypertension. The extended Barker hypothesis assumes that genes without direct inheritance due to environmental factors result in a lower birth weight and a modified phenotype.

### **Methods:**

The study tested 137 homozygous eNOS wild-type animals (F1 generation of a eNOS knock-out mouse model) divided into three groups: offspring of wild-type parents, offspring of heterozygous mothers and offspring of heterozygous fathers. The procedure included weight determination, determination of creatinine levels (Jaffé method), blood

pressure determination (Tail-Cuff method) and killing with removal of organs on the 168th day of life. The glomerular number per kidney was counted under the light microscope. From each kidney, 40 glomeruli were measured using ImageJ.

**Results:**

The birth weight of the male wild-type offspring of the heterozygous eNOS knock-out mothers was significantly reduced; so was the weight of all of the wild-type offspring of them during the first weeks after birth. The females had significantly heavier kidneys, females and males showed a significantly lower creatinine clearance (metabolism trial I) as well as significantly less and larger glomeruli. Blood pressure measurement, metabolism trials II and III showed no significant differences between the offspring of heterozygous eNOS knock-out mothers and the control animals.

No difference was observed in the birth weight and the weight development between the offspring of the control group and those of heterozygous eNOS knock-out fathers, whose female offspring had significantly heavier kidneys, a tendency towards a lower creatinine clearance (metabolism trial I) and significantly fewer glomeruli than the control group. All animals with heterozygous eNOS knock-out fathers tended to a reduced glomerular number. The male offspring had significantly larger glomeruli. Blood pressure and renal function of males and females (metabolism trial II and III) showed no differences.

**Conclusions:**

By means of the reduced birth weight the study showed that there was a fetal programming of the wild-type F1 generation of the heterozygous eNOS knock-out mothers without a transfer of genes. This proves the extended Barker hypothesis but does not provide information about the genesis. A programming was also shown from the paternal line. In compliance with findings of the classic Barker hypothesis, the experiment shows many sex-specific effects. Especially a programming of the kidney morphology (reduced number of glomeruli) was proven. Nevertheless, no long-term impairment of the kidney function or hypertension occurred. The clarification of the genesis requires further investigation. An increased understanding of the mechanisms of the classic and the extended fetal programming could lead to an improved understanding of many chronic diseases, especially regarding the individual risks of diseases under the condition of similar risks of civilization.

## **2. Einleitung und Zielsetzung der Arbeit**

### **2.1. Geburtsgewicht und kardiovaskuläre Erkrankungen**

Häufig wird davon ausgegangen, dass Zivilisationskrankheiten, wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Hypertonus, Schlaganfall, Diabetes mellitus Typ 2 oder das metabolische Syndrom bedingt sind durch die ungesunde Lebensweise der westlichen Gesellschaften und durch genetische Prädisposition. Allerdings zeigen auch viele Studien geografische Unterschiede, die durch oben genannte Erklärungen nicht nachvollziehbar sind. Die erste Studie, die einen Hinweis auf die intrauterine Entwicklung als Risikofaktor gab, entdeckte in England und Wales eine geografische Beziehung zwischen der Todesrate an koronarer Herzkrankheit und hoher Geburtensterblichkeit in bestimmten Bezirken<sup>1, 2</sup>. 1989 wurden 5654 Männer aufgesucht, die zwischen 1911 und 1930 in einer Region in England geboren worden waren und deren Geburtsgewicht und deren Gewicht nach einem Jahr aufgezeichnet worden war. Die Männer mit dem geringsten Geburtsgewicht und geringstem Gewicht nach einem Jahr hatten die höchste Todesrate durch ischämische Herzkrankheit<sup>2</sup>. Die Ergebnisse waren unabhängig von der Schwangerschaftsdauer und mussten somit auf ein verlangsamtes fetales Wachstum zurückgeführt werden. Dieser Zusammenhang wurde auch in Norwegen und Finnland nachgewiesen<sup>3, 4</sup>. Letztendlich kam man zu dem Schluss dass ärmlischer Lebensstandard prä- und postnatal zu einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen führt. Zur genaueren Beurteilung erfolgte die Differenzierung der Kindersterblichkeit in neonatal (bis eine Woche nach Geburt) und postneonatal. Dabei zeigte sich, dass besonders die neonatalen Todesfälle, die mit einem geringen Geburtsgewicht einhergingen, eine Korrelation mit der Todesrate an Koronarer Herzkrankheit und Schlaganfall aufwiesen<sup>2</sup>. Diese Studien führten zu der Hypothese dass eine Mangelernährung in utero und in der Kindheit Körperstruktur, Physiologie und Metabolismus dauerhaft verändert und zu koronarer Herzkrankheit führt<sup>5</sup>.

### **2.2. Geburtsgewicht und arterielle Hypertonie**

Mehrere epidemiologische Studien konnten ebenso einen Zusammenhang zwischen einem erniedrigten Geburtsgewicht und einem erhöhten arteriellen Blutdruck im späteren Lebensalter herstellen<sup>6</sup>. Dabei gibt es jedoch Unterschiede im Ausmaß der Erhöhung. Huxley et al. sowie Law et al. zeigten z.B. 2-4 mmHg pro kg verringertem

Körpergewicht<sup>7, 8</sup>. Allerdings fiel auf, dass je größer die Studie war, umso geringer war der Effekt<sup>7</sup>. Sie fanden in kleinen Studien mit unter 1000 Teilnehmern einen Effekt von 1,9 mmHg/kg. Im Gegensatz dazu bestand nur ein Unterschied von 0,6mmHg/kg in größeren Studien mit über 3000 Teilnehmern. Die Autoren gingen dabei davon aus, dass es sich um einen Publikations-Bias handelt und nahmen deshalb den Wert von 0,6mmHg/kg als realistischer an und gingen somit von einem sehr geringen Zusammenhang zwischen niedrigem Geburtsgewicht und arterieller Hypertonie aus<sup>9</sup>. Die Studie von Davies et al. stützte diese Meinung jedoch nicht. Diese Studie hatte 25 874 Teilnehmer. Es zeigte sich eine Erhöhung des Blutdrucks um 0,8-1,1 mmHg/kg, geschlechtsunabhängig. Der Zusammenhang zwischen Geburtsgewicht und arterieller Hypertonie nahm mit dem Alter zu und zeigte sich am deutlichsten in der Gruppe der über 55jährigen. Obwohl das Ergebnis nicht stark von der Studie von Huxley et al. abweicht, gingen die Autoren hier aber von einem eher unterschätzten Effekt aus, da der Effekt wesentlich deutlicher (1,6 mmHg/kg) bei Daten war, welche direkt aus dem Krankenhaus bezogen wurden, im Vergleich zu Aussagen der Probanden. So gehen Davies et al. davon aus, dass sich dieser Fehler bei größeren Studien auswirkt und zu einer Abschwächung des Effektes führt<sup>10, 11</sup>.

### **2.3. Barker Hypothese und fetale Programmierung**

Die Beziehung zwischen niedrigem Geburtsgewicht und einem erhöhtem Risiko für spätere kardiovaskuläre Erkrankungen ist unter „Barker Hypothese“ nach ihrem Erstbeschreiber benannt<sup>2</sup>.

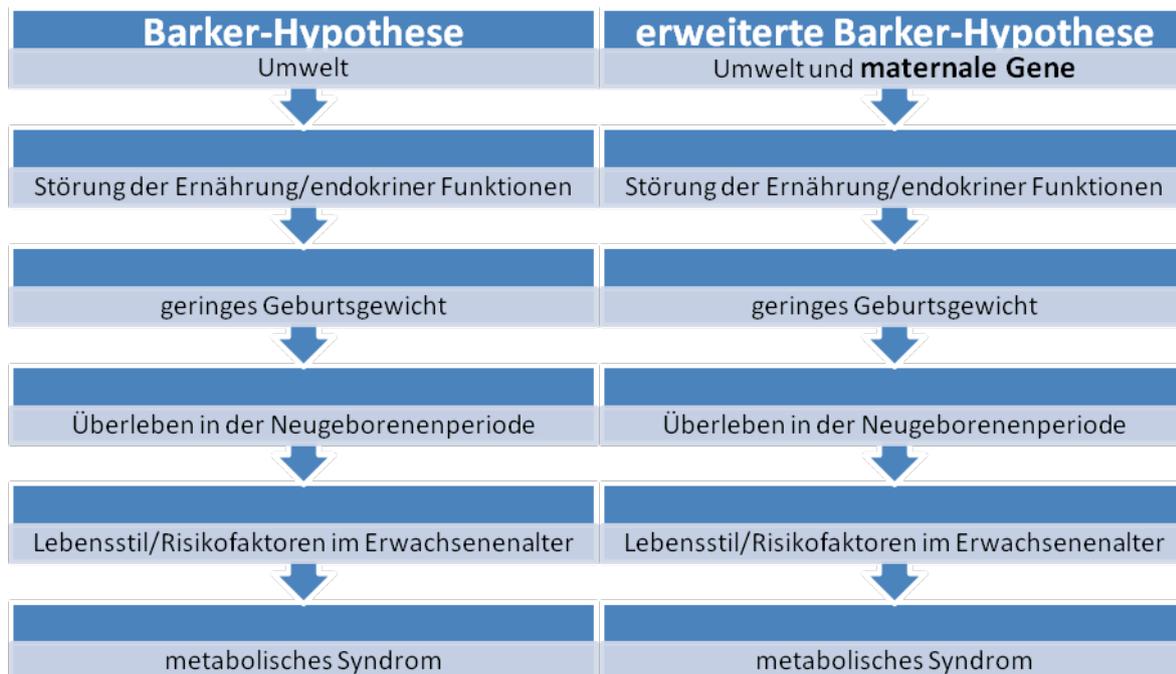
Ernährungszustand, Hormone und Metabolismus der Mutter führen zur Programmierung der Struktur und der Physiologie des Nachwuchses. Dies wird beschrieben als Plastizität der Entwicklung. Plastizität beschreibt die Fähigkeit eines Genotyps verschiedene physiologische und morphologische Phänotypen während seiner Entwicklung auszubilden, um sich bestimmten Umweltbedingungen anzupassen. Dies hat im evolutionären Kontext Vorteile. Der Phänotyp ist so bestmöglich an seine Umwelt angepasst. Es gibt dabei immer einen kritischen Zeitraum, in dem ein System plastisch, also veränderbar ist. Danach verliert es seine Plastizität und behält die Funktion bei. Bei den meisten Organen und Systemen spielt sich dieser kritische Zeitraum in utero ab.<sup>5</sup>

### **2.4. Erweiterte Barker-Hypothese**

Prinzipiell geht man bei der Fetalen Programmierung davon aus, dass die Umwelt die Ausbildung eines bestimmten Phänotyps verursacht. Nun fand man heraus dass auch

Kinder von gesunden Müttern, die aber einen Gendefekt tragen ein vermindertes Geburtsgewicht haben. Hocher et al. stellten fest, dass gesunde Frauen, die aber das 825 T Allel des GNB 3 Gens trugen, Kinder mit einem geringeren Geburtsgewicht gebären<sup>12</sup>. Dieses Allel ist assoziiert mit Hypertonie, Fettleibigkeit und einer Prädisposition bei Typ 2 Diabetes Patienten zum terminalen Nierenversagen<sup>13</sup>. Die erweiterte Barker Hypothese besagt, dass nicht nur maternale Mangelernährung sondern auch maternale Gene zu einer Mangelsituation des Fetus führen können und damit die Anpassung des Fetus an diese „Umwelt“ induzieren. Dies führt letztendlich wiederum zur Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen bzw. zur Entwicklung des metabolischen Syndroms im Erwachsenenleben, wie in Abbildung-1 dargestellt.<sup>14</sup>

Abbildung-1: Vergleich Barker-Hypothese und erweiterte Barker-Hypothese



### **2.5 Nephronenzahl, Glomerulumgröße und arterielle Hypertonie**

Es stellt sich nun die Frage nach dem Mechanismus, der vom erniedrigtem Geburtstgewicht zur arteriellen Hypertonie führt. Ein Faktor, der assoziiert wird mit arterieller Hypertonie ist die Nephronenzahl und die Glomerulumgröße. Die erste Beschreibung von Nephronenzahlen findet sich bereits Ende des 19. Jahrhunderts. Dort wurden ähnliche Zahlen gefunden wie sie uns heute bekannt sind. Außerdem wurde damals schon die Abnahme der Anzahl der Glomerula im Alter festgestellt<sup>15, 16</sup>. Den ersten Zusammenhang zwischen Nephronenzahl und einem erhöhtem Blutdruck stellte

Haymann et al. in den 1930ern fest<sup>17</sup>. Sie beschrieben eine Glomerulazahl von 750 000 bis 1,2 Millionen pro Niere. Gleichzeitig stellten sie fest, dass Probanden mit erniedrigter Glomerulazahl vor dem Tod gehäuft einen systolischen Blutdruck von > 150mmHg aufwiesen. Außerdem fanden sich bei allen Probanden mit Glomerulazahlen < 700 000 vor dem Tod eine Kreatinin-Clearance von < 50ml/min<sup>17</sup>. Später untermauerte die Studie von Keller et al. den Zusammenhang zwischen erniedrigter Nephronenzahl und arterieller Hypertonie: Bei der Untersuchung der Nephronenzahl der Nieren von hypertensiven Unfallopfern im Vergleich zu nichthypertensiven Unfallopfern konnte festgestellt werden, dass die Nieren der hypertensiven Probanden weniger als die Hälfte der Nephronenzahl der gesunden Probanden aufwiesen, sowie das doppelte Glomerulavolumen<sup>18, 19</sup>. In Studien mit Probanden aus unterschiedlichen Ethnien konnten ebenfalls niedrigere Nephronenzahlen bei hypertensiven Probanden in der weißen Population festgestellt werden. Wobei Ethnien mit erhöhtem Risiko für Bluthochdruck wie Aborigines und amerikanische Ureinwohner generell eine niedrigere Nephronenzahl aufwiesen<sup>18, 20</sup>. Allerdings zeigte sich unter den Amerikanern afrikanischer Herkunft, welche ebenfalls ein erhöhtes Risiko für Bluthochdruck haben, keine erniedrigte Nephronenzahl<sup>18, 21</sup>. Vergrößerte Glomerula zeigten aber alle hypertensiven Probanden, sowie auch die Ethnien mit erhöhtem Bluthochdruckrisiko<sup>22-25</sup>.

## **2.6. Fetale Programmierung der Nephronenzahl**

Die menschliche Nephrogenese findet in der 34. bis 36. Schwangerschaftswoche statt<sup>26</sup>. Dabei kommt es auch zur Bildung der endgültigen Anzahl an Nephronen. Letztendlich gibt es eine großen Varianz zwischen den Individuen, von 250 000 bis 2 Millionen<sup>27, 19</sup>. Es wurden auch große Unterschiede zwischen Ethnien und Geschlechtern gefunden<sup>20, 21</sup>. Sowohl der genetische Hintergrund als auch Umwelteinflüsse beeinflussen die Nephrogenese. So finden sich eine verringerte Anzahl an vergrößerten Nephronen bei einer PAX2 Genmutation<sup>28</sup>. Gleichzeitig verringern aber auch Umwelteinflüsse, z.B. Niedrig-Protein-Diät<sup>29</sup>, Vitamin A Mangel<sup>30</sup>, mechanische Obstruktion der abführenden Harnwege<sup>31</sup> und nephrotoxische Medikamente<sup>32</sup> während der vulnerablen Phase die Nephronenzahl. Letztendlich ist auch ein geringes Geburtsgewicht mit einer erniedrigten Nephronenzahl vergesellschaftet<sup>27, 33</sup>. Somit führen Umwelteinflüsse während der Phase der Nephrogenese zu einer verminderten Nephronenzahl<sup>10</sup>. Brenner et al. schlussfolgerten dass eine verminderte Nephronenzahl bei Geburt zur Kompensation durch eine

Hyperfiltration der verbleibenden Glomerula führt. Diese wiederum schädigt die Glomerula und führt zur Glomerulosklerose wodurch weitere Nephrone zugrunde gehen. Schlussendlich führt dieser circulus vitiosus zu systemischer Hypertonie, Proteinurie und letztendlich zum Nierenversagen<sup>34, 35</sup>.

## **2.7. Stickstoffmonoxid (NO)**

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein vasodilatierendes Hormon. Vor dessen Entdeckung sprach man von einer vasorelaxierenden Substanz dem „endothelium-derived relaxing-factor“ (EDRF)<sup>36-39</sup>. Es wird gebildet von der NO-Synthetase, einer Oxygenase, durch Umwandlung von L-Arginin in NO und L-Citrullin unter Umwandlung von NADPH zu NADP<sup>+</sup><sup>40-44</sup>. Die Synthese des NO wird beeinflusst durch verschiedene Substanzen wie Acetylcholin, ATP, ADP, Substanz P, Bradykinin, Histamin, Thrombin, Serotonin und Vasopressin, aber auch z.B. durch Scherkräfte<sup>36</sup>. Es gibt drei Formen der NO-Synthetase: die neuronale NOS (nNOS), die endotheliale NOS (eNOS) und die durch Zytokine induzierbare NOS (iNOS). Alle drei sind membranständig<sup>36, 45-47</sup>. nNOS kommt in Neuronen, aber auch bei anderen Zellen vor und wirkt vasodilatierend und als Neurotransmitter. iNOS ist an der Immunantwort beteiligt und wirkt toxisch an Bakterienwänden und Zellmembranen. eNOS findet sich unter anderem in den Endothelzellen der Gefäße. Es zeigt sich für Vasorelaxation verantwortlich<sup>48-51, 47, 52</sup>.

NO spielt eine sehr wichtige Rolle bei verschiedensten physiologischen Vorgängen als Signalmolekül. Dazu zählen die Regulation des Gefäßsystems, der Tonus der glatten Muskulatur, die Inhibition der Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen, zelluläre Zytotoxizität, Hemmung der Thrombozytenaggregation und Einleitung der Apoptose der Endothelzellen. NO bindet im Zytosol an die zyklische Guanylatzyklase. Dort wird daraufhin der second messenger cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat) gebildet. cGMP wiederum aktiviert die Proteinkinase G. Diese phosphoryliert die leichte Kette des Myosins, wodurch die Aktinfilamente sich nicht mehr anlagern können. Außerdem phosphoryliert die Proteinkinase G kalziumabhängige Kaliumkanäle, was diese öffnet und zu einer Hyperpolarisation führt. Letztendlich verhindert der Mechanismus eine Muskelkontraktion<sup>53, 48, 49, 40, 54, 52, 55</sup>.

Diese Vorgänge spielen auch alle eine Rolle, wenn sich der Uterus während der Schwangerschaft wandelt. Der Nachweis der iNOS und eNOS in der Plazenta und in einem schwangeren Uterus wurde mehrfach erbracht<sup>56, 57</sup>. Eine unspezifische Hemmung der NOS-Isoformen während einer Schwangerschaft führt im Tierexperiment zur Ausbildung von Präeklampsie ähnlichen Symptomen<sup>58</sup>. Die Inhibition der iNOS führt

zur Reduzierung der Dezidua<sup>59</sup>. Eine weitere Studie zeigte, dass die Dezidua von eNOS Knock-out Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen weniger Zellen aufweist und die Arterien der Dezidua verdickte Wände haben. Somit hat eNOS eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der intakten Dezidua und in der Entwicklung der uterinen Vaskularisation<sup>60</sup>.

### **2.8. eNOS Knock-out-Mausmodell**

Die in dieser Arbeit verwendeten eNOS defizienten Mäuse mit C57BL/6-Stammhintergrund, wurden von Prof. Gödecke, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, hergestellt. Mittels Western-Blot und Immunhistologie wurde das Fehlen der eNOS in Herz, Leber, Lunge, und Niere der transgenen Tiere abgesichert. Das Fehlen der eNOS führte bei den Tieren zu erhöhtem Blutdruck ( $135 \pm 15$  mmHg versus  $107 \pm 8$  mmHg in Wildtypen). Die Tiere zeigten zwar keine kardiale Hypertrophie, aber eine 70 prozentige Reduktion der Vasodilatation der Koronargefäße nach Perfusion mit Acetylcholin im Vergleich zu Wildtypen. Der basale koronararterielle Druck war unverändert.<sup>61, 62</sup>.

Für den Versuch wurden nur heterozygote Tiere dieses Tiermodells verwendet.

### **2.9. Zielsetzung der Arbeit**

Im Gegensatz zur klassischen Barker Hypothese konnte die erweiterte Barker Hypothese bislang noch nicht durch tierexperimentell beweisende Studien untermauert werden. Hierzu existiert ausschließlich eine Assoziationsstudie<sup>12</sup>. Diese Arbeit soll nun die erweiterte Barker-Hypothese tierexperimentell überprüfen. Hierzu wurden heterozygote eNOS Knock-out Tiere mit Wildtyptieren verpaart. Es wurden Wildtypkinder von heterozygoten Müttern und Wildtypkinder von heterozygoten Vätern mit Wildtypkindern von Wildtypeltern verglichen. Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen ob der heterozygote eNOS Knock-out der Mutter oder des Vaters auf das Wildtypkind ohne Vererbung des genetischen Defekts einen zur klassischen Barker Hypothese kongruenten Einfluss hat. Überprüft werden Geburtsgewicht, Körpergewicht im Verlauf, Entwicklung einer Hypertonie im Rahmen eines metabolischen Syndroms und besonders Auswirkungen auf den renalen Phänotyp (Glomerulaanzahl).

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Materialien, Chemikalien und fertige Lösungen

- 1,5ml-Reaktionsgefäße, frei von humaner DNA, DNase und RNase, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Agarose, SeaKem® LE Agarose, Cambrex, Rockland, ME, USA
- Borsäure, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Deckgläschen, R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
- Depex, Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA
- Desinfektionsmittel, Sterillium®, Bode Chemie, Hamburg, Deutschland
- dNTPs (100mM), Bioron, Ludwigshafen, Deutschland
- Eisenhämatoxylin nach Weigert, Lösung A + B, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Eisessig, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Eosin, C.I. 45380, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Ethanol, Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland
- Ethidiumbromid, amresco®, 10mg/ml-Lösung, Solon, Ohio, USA
- flüssiger Stickstoff
- Formaldehyd 37%ig, JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA
- Handschuhe, Latex
- HCl 37%ig, rauchend
- Jaffé-Reagenz
- Kanülen (27G), Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
- KCl, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Kreatininstandard (2 mg/dl)
- Meyers Hämalaulösung, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- MgCl<sub>2</sub>, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Mikro-Haematokrit-Kapillaren, Typ A, Natrium-heparinisiert, Brand, Wertheim, Deutschland
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Na-EDTA, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

- NaOH, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Narkotikum: Isofluran, FORENE®, Nr. B506, Abbott, Ludwigshafen, Deutschland
- Objektträger, Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
- Paraffin 6, Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
- Paraffin 9, Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
- Pipettenspitzen, steril, PCR-clean, verschieden Größen, VWR, Deutschland
- Primer, TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland
- Proteinase K, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Skalpelle, Typ 10, Feather, Osaka, Japan
- sterile 0,9%-ige Kochsalzlösung, Braun, Melsungen, Deutschland
- Taq DNA Polymerase (5 Units / $\mu$ L) + zugehörige Lösungen, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA:
  - 10 x PCR Puffer
  - AmpliTaq Gold® DNA Polymerase
  - MgCl<sub>2</sub>-Lösung (25 mM)
- Tris (Tri-hydroxymethyl-aminomethan), Pufferan®, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Tween
- Wasser, Wasser PCR grade + autoklaviert, Ambion, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
- wässrige Pikrinsäure (ca. 13 g/l), Fluka, Sigma Aldrich Chemie, Deutschland
- Xylol, JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA

### 3.1.2. Lösungs- und Pufferansätze

- 0,1 %ige Eosinlösung: (Eosin 0,1 % w/v, 100 $\mu$ L Eisessig, abs. Ethanol)
- 0,5 M EDTA-Lösung (0,5 M Na-EDTA, Wasser PCR grade + autoklaviert, Lösung wird nach Mischen nochmals autoklaviert)
- 4% Formalin in PBS (108 ml 37%-ige Formalinlösung + 892 ml PBS-Puffer)
- Blaumarker (0,25% Bromphenolblau, 15% Ficoll Typ 400, in 1x TBE-Puffer lösen)
- Ethidiumbromid-TBE-Puffer (1000 mL TBE-Puffer, 0,625 mg Ethidiumbromid)
- Jaffé-Reagenz: Pikrinsäure 12,5 mmol/l, Pufferlösung NaOH 400mmol/l und Dinatriumhydrogenphosphat 10 mmol/l
- K-Puffer (50 mmol KCl, 10 mmol Tris, 2,5 mmol MgCl, Wasser PCR grade + autoklaviert, pH 8,3, Puffer wird nach Mischen nochmals autoklaviert)

- Lysis-Puffer (10 µL Proteinase-K-Lösung + 5µl Tween + 985 µL K-Puffer)
- PBS-Puffer (123 mM NaCl, 2,4 mM KCl, 5,8 mM N<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- Proteinase-K-Lösung (100µg Proteinase K + 1 ml K-Puffer)
- TBE-Puffer (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 20 mM Na-EDTA, Wasser bidest, pH 8,5)
- TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM Na-EDTA, Wasser)

### 3.1.3. Geräte

- Blutentnahme und Genotypisierung:
  - Eppendorf-Pipetten (0,1-10µl, 10-100µl, 100-1000µl) Eppendorf, Hamburg, Deutschland
  - Zentrifuge: Biofuge 13, Heraeus, Berlin, Deutschland
  - INTAS Gel-Imager + PC-Arbeitsstation + Software GDS 1.5.0.1, Göttingen, Deutschland
  - Waage 0,1 - 600 g, BCL 600, Sartorius, Göttingen, Deutschland
  - Feinwaage 0,001 - 210g, SBC 22, Scaltec, Göttingen, Deutschland
  - Thermoblock, Thermostat TCR 100, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
  - T3Thermocycler, Biometra, Göttingen, Deutschland
  - Wasserbad, Typ 1013, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
  - Elektrophoresekammer, Agagel Midi-Wide, Biometra, Göttingen, Deutschland
  - Power Pack P25, Biometra, Göttingen, Deutschland
- Stoffwechselfersuch und GFR-Bestimmung:
  - Stoffwechselkäfige für Mäuse, Spezialanfertigung von Schering, Deutschland
  - Mikro-Haematokrit-Kapillaren, Typ A, Natrium-heparinisiert, Brand, Wertheim, Deutschland
  - Beckman DU® 350, Life Science UV/Vis-Spektrophotometer
  - Eppendorfküvette für kleine Proben (Uvette)
  - Zentrifuge: Biofuge 13, Heraeus, Berlin, Deutschland
- Schwanzplethysmographie:
  - Druck- Pulsmesseinheit, PowerLab / 4 SP, AD Instruments, NSW, 2153 AUSTRALIA

- Power Lab Software, Chart and Scope for Windows, Version 4.4.1., AD Instruments, NSW, 2153 AUSTRALIA
- Druck- Pulsmesseinheit und Software, LE 5007 Automatic Blood Pressure Computer, Letitia Scientific Instruments, Panlab s.l., Barcelona, Spanien
- Wärmeplatte, Präzitherm 28-1, Störk-Tronic, Deutschland
- Fixiereinheit für Mäuse, MLA5018 Rodent Restrainer (bis 50g), NSW, 2153 AUSTRALIA
- Organentnahme, Einbetten und Schneiden der Organe:
  - Präparierschere, Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
  - Knüpfpinzetten, Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
  - Einbettstation, Shandon Citadel 1000, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
  - Ausbettstation, Microm EC 350, Walldorf, Deutschland
  - Histokinette TP1020 Leica, Nußloch
- Färbung und Mikroskopie:
  - Wärmeschrank ST6030, Heraeus, Berlin, Deutschland
  - Mikroskop, BH-2, Olympus, Hamburg, Deutschland
  - Farbkamera, Model CFW-1310 C mit dem dazugehörigen Programm Scion Visicapture Application Version 1.0, Scion Corporation, Frederick, MD, USA
  - Programm ImageJ, Version 1.61 (eine Shareware des National Institut of Health, USA)
  - Neubauerzählkammer
- Statistik:
  - SPSS Version 15.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA

## **3.2. Methoden**

### 3.2.1. Tierversuchsaufbau

#### 3.2.1.1. Tierhaltung

Der Tierversuchsverlauf erstreckte sich vom 23.4.2006 bis zum 4.11.2007. Er wurde in zwei aufeinanderfolgenden Etappen durchgeführt. Die Tiere wurden im Tierstall der Freien Universität Berlin in Dahlem gehalten bei 20°Grad Umgebungstemperatur, 46% Luftfeuchtigkeit und einem Tag- und Nachrhythmus mit einer Lichtperiode von 6.00 bis 18.00 Uhr. Sie lebten in Gruppen zu ca. 1-6 Tieren (meist 3) in ca. 810cm<sup>2</sup> großen

Käfigen(Höhe 15cm). Die Tiere erhielten Haltungsdiät von Altromin und Leitungswasser ad libidum. Die Jungtiere wurden von den Müttern gesäugt. In den Käfigen waren Spiel und Versteckmöglichkeiten in Form von Zellstoff und einem Häuschen vorhanden. Die Tierhaltung und alle durchgeführten Versuche erfolgten nach den Regeln des Deutschen Tierschutzgesetzes und wurden am 05.08.2004 von der Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales Berlin mit der Genehmigungsnummer G 0146/04 zugelassen.

### 3.2.1.2. Züchtung

Es wurden ursprünglich bereits in der Literatur beschriebene transgene Mäusestämme der Linie C57BL/6 eNOS Knock-out Mäuse verwendet<sup>61, 62</sup>. Davon wurden nur heterozygote Tiere verwendet, die mit Wildtypieren verpaart wurden, im Alter von 5 und 8 Monaten, siehe Tabelle-1.

Tabelle-1: Verpaarungsschema

Gruppen	Mutter	Vater	Kinder (F1 Generation)
Wildtypeltern	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp
Gruppe +/- Mutter	heterozygot	Wildtyp	50 % Wildtyp 50 % heterozygot
Gruppe +/- Vater	Wildtyp	heterozygot	50% Wildtyp 50% heterozygot

Eingeschlossen wurden nur Wildtypiere der F1 Generation. Nach der Verpaarung erhielt man insgesamt 137 Wildtypiere, die sich wie in Tabelle-2 zu sehen auf die unterschiedlichen Gruppen verteilen:

Tabelle-2: Verteilung der F1 Generation auf die Gruppen

Gruppen	Männchen	Weibchen	Gesamt
Gruppe Wildtypeltern	25	30	55
Gruppe +/- Mutter	23	23	46
Gruppe +/- Vater	12	21	33

Die Gruppe Wildtypeltern ist definiert als Wildtypiere, deren Eltern beide Wildtypiere waren. Gruppe +/-Mutter ist definiert als Wildtypiere deren Mutter heterozygot für den eNOS Knock-out war und deren Vater ein Wildtypier war. Gruppe +/-Vater ist definiert als Wildtypiere deren Vater heterozygot für den eNOS Knock-out war und deren Mutter ein Wildtypier war.

#### 3.2.1.3. Gewichtsbestimmung

Vom 1. bis zum 40. Lebenstag wurden die Tiere täglich gewogen. Danach wurden die Tiere einmal wöchentlich gewogen, beginnend mit dem 42. Lebenstag, abschließend mit dem 140. Lebenstag.

#### 3.2.1.4. Bestimmung des Genotyps

Um die heterozygoten Tiere aus dem Versuch auszuschließen, wurde der Genstatus der Tiere in einer Doppelbestimmung in der 7. Lebenswoche mittels Wildtyp- und NeoR-PCR ermittelt.

##### 3.2.1.4.1. Blutentnahme zur Genotypisierung

Dazu wurde den Tieren in der 6. Lebenswoche mit einem Kapillarröhrchen aus dem retrobulbären Venenplexus unter einer Inhalationsnarkose mit Isofluran Blut entnommen. Das Blut wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen, welche 10 µl 0,5 M EDTA enthielten. Anschließend wurde das Blut 5 Minuten mit 2000 Upm zentrifugiert, das Plasma verworfen und die Zellen 1:2 mit isotoner NaCl-Lösung versetzt und gemischt.

##### 3.2.1.4.2. DNA-Isolierung

50 µl des mit NaCl-Lösung versetzten Blutes wurde mit 500 µl TE-Puffer gemischt und drei Minuten mit 13000 Upm zentrifugiert. Viermal wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 500µl TE-Puffer wieder gelöst und erneut eine Minute mit 13000 Upm zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde in 100µl Lysis-Puffer resuspendiert und mindestens 90 Minuten im Thermoblock bei 56°C inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt nach 30 Minuten bei 95°C. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt und bei -20°C gelagert.

##### 3.2.1.4.3. Standard-PCR und Agarosegelelektrophorese

Zur Unterscheidung der Wildtypiere und der heterozygoten Tiere wurde mittels PCR bei den Wildtypieren das eNOS-Gen identifiziert und bei den heterozygoten Tieren der Knock-out des eNOS-Gens.

Die verwendeten Primer sind in Tabelle-3.1 aufgelistet. Tabelle-3.2 zeigt die benutzten PCR-Ansätze. Die Amplifikation ist in Tabelle-3.3 und Tabelle-3.4 dargestellt.

Tabelle-3.1: verwendete Primer

PCR:	Primer	Sequenz	Bandengröße
eNOS-WT	eNOS-WT 3	5' Agg ACA TAT gTT TgT CTg Cgg 3'	ca. 900bp
	eNOS-WT 4	5' CTg Agg ACT gCA CCT gTT CA 3'	
NeoR-PCR	NeoR2 ase	5' ACA AgA CCg gCT TCC ATC Cg 3'	ca. 275 bp
	NeoR2 se	5' TTg TCA AgA CCg ACC TgT CC 3'	

Tabelle-3.2: PCR-Ansatz

Material	Volumen pro Ansatz (22µl)	Ansatz für 50 Proben
Wasser (aqua ad inject.)	13,728	686,4
10 x PCR Puffer	2,2	110,0
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,76	88,0
dNTPs (Mix) (2,5 mM)	0,44	22,0
Primer 1 (10 nmol/L)	0,88	44,0
Primer 2 (10nmol/L)	0,88	44,0
Taq DNA Polymerase (5 Units /µL)	0,132	6,6
Template (ca. 25-50 µg/mL)	1,98	99,0
Total (Summe in µl)	22	1100,0

Tabelle-3.3: eNOS-WT-PCR

	Temperatur	Zeit	Anmerkungen
Temperatur Heizdeckel	105°C		
Vorlauftemperatur	94°C		
erste Denaturierung	94°C	6 min	
weitere Denaturierungsschritte	94°C	30 sek	Diese Schritte wiederholen sich 39 Mal
Annealing	60°C	30 sek	
Elongation	72°C	2 min	
letzter Elongationsschritt	72°C	10 min	
Lagertemperatur des PCR-Produkts bis zur Entnahme	10°C		

Tabelle-3.4: NeoR-PCR

	Temperatur	Zeit	Anmerkungen
Temperatur Heizdeckel	105°C		
Vorlauftemperatur	94°C		
erste Denaturierung	94°C	6 min	
weitere Denaturierungsschritte	94°C	30 sek	diese Schritte wiederholen sich 39 Mal
Annealing	60°C	30 sek	
Elongation	72°C	2 min	
letzter Elongationsschritt	72°C	10 min	
Lagertemperatur des PCR-Produkts bis zur Entnahme	10°C		

Danach wurden die PCR-Produkte auf ein 1,5 % Agarose Gel aufgetragen. Es wurde anschließend eine Elektrophorese bei 100 V, 250 mA für circa 20 Minuten durchgeführt. Darauf folgend wurden die amplifizierten DNA-Fragmente mit 0,05% (0,5 µg/ml) Ethidiumbromid gefärbt. Die Fragmente wurden sichtbar gemacht durch UV-Licht mittels Transilluminator. Die Produktgröße der eNOS WT PCR ist bei 900 bp und die der NeoR PCR bei ca. 275 bp. Mit der eNOS-WT-PCR wurde das Vorliegen eines eNOS-Wildtyp-Allels nachgewiesen und mit der NeoR-PCR wurde das Vorliegen eines eNOS-Allels mit Insertion einer Neomycin-Kassette nachgewiesen (eNOS Knockout - Allel). Das Gel konnte somit unter UV-Licht betrachtet und ausgewertet werden. Wenn nur eine Bande in der eNOS-WT-PCR zu erkennen war, handelte es sich um einen homozygoten eNOS-Wildtyp. Wenn nur eine Bande in der NeoR-PCR zu sehen war, lag ein homozygoter eNOS Knock-out vor. Wenn beide PCR-Produkte Banden zeigten, lag ein heterozygoter eNOS Knock-out vor.

Es wurden nur Tiere eingeschlossen, die einen homozygoten eNOS-Wildtyp hatten.

#### 3.2.1.5. Organentnahme

Am 168. Lebenstag wurden die Tiere mit Isofluran betäubt bis zum Atemstillstand und anschließend gestreckt. Das Körpergewicht wurde bestimmt. Bauch- und Brustraum der Tiere wurden eröffnet und die Organe wurden präpariert. Aus der rechten Herzkammer wurde Blut entnommen. Tabelle-4 listet die entnommenen Organe auf, teils wurden sie in 4 % Formalin fixiert und teils in Stickstoff gefroren und bei -80°Grad eingelagert.

Tabelle-4: entnommene Organe

Organ	4% Formalin	Stickstoff
Herz	Herzspitze	Herzbasis
Linke und Rechte Niere	Linke Niere	Rechte Niere
Pankreas	Kopf	Schwanz
Lunge	Linker Flügel	Rechter Flügel
Leber	Großer Lappen	Mehrere kleine Lappen und die Gallenblase
Aorta	Thorakal	Abdominal
Nebenniere		beide
Milz	Linke Hälfte	Rechte Hälfte

Die Organe wurden einzeln gewogen.

### 3.2.2. Biochemische Methoden

#### 3.2.2.1. Stoffwechselfersuch

Zur Gewinnung von Urin und zur späteren Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate wurden pro Tier jeweils 3 Stoffwechselfersuche in der 12., 18. und 23. Lebenswoche durchgeführt. Jedes Tier kam dabei für 24 Stunden in einen Einzelkäfig (Stoffwechselkäfig) und erhielt nur Wasser und ein Stück Gurke. Vermerkt wurden das Gewicht des Tieres vor und nach dem Versuch, außerdem die getrunkene Wassermenge, die verzehrte Gurkenmenge (g) und die Urinmenge (ml/24h). Nach den 24 Stunden wurde den Tieren retrobulbär Blut entnommen. Das Blut wurde zentrifugiert, der Plasmaanteil wurde abpipettiert. Sowohl Urin, also auch Plasma wurden bis zur Weiterverwendung tiefgefroren.

#### 3.2.2.2. Bestimmung der GFR

Aus dem gewonnenen Urin und dem Blut wurde später die Kreatinin-Clearance als Surrogatparameter für die glomeruläre Filtrationsrate bestimmt. Dazu wurde die Kreatinin-Konzentration im Urin und im Plasma mittels eines vorgefertigten Testkits nach der Jaffé-Methode und einer photometrischen Messung bestimmt. Bei der Jaffé-Reaktion bildet Kreatinin in alkalischer Lösung mit Pikrinsäure einen gelbroten Komplex, dessen Farbe photometrisch bestimmt werden kann. Der Urin wurde dazu 1:10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, das Plasma wurde unverdünnt gemessen. Es wurde jeweils 10 µl Probe und 100 µl Jaffé-Reagenz (Pikrinsäure und Puffer) in eine

spezielle Eppendorfküvette (Uvette) gegeben und photometrisch die Extinktion bestimmt. Die Kreatininkonzentration wurde aus der Extinktion der Proben und der Extinktion eines Standards (Kreatininkonzentration von 2 mg/dl) berechnet. Dann wurde die GFR mit der Formel  $GFR = (C(\text{urin}) \times V(\text{urin})) / (\text{Zeit} \times C(\text{plasma}))$  bestimmt.

### 3.2.3. Physiologische Methode

#### 3.2.3.1. Blutdruckmessung

Um den Blutdruck der Tiere zu bestimmen, wurde in der 10., 19. und 22. - 24. Lebenswoche eine Blutdruckmessung mit einem automatischen nicht invasiven Messsystem durchgeführt. Es handelte sich dabei um eine Druck/Pulsmesseinheit der Firma AD Instruments (PowerLab / 4 SP). Das Monitoring, die Messung sowie die Auswertung wurden computergestützt (Software: AD Instruments, Power Lab, Software: Chart and Scope for Windows, Version 4.4.1.) vorgenommen. Der Blutdruck wird dabei mittels Tail-Cuff-Methode an der Schwanzarterie am wachen Tier gemessen. Das Tier wurde in einer Plexiglasröhre fixiert, welche der Größe des Tieres angepasst werden kann, auf einer Wärmeplatte von 37° C. Dadurch wird die Schwanzarterie hyperämisiert. Die Druckmanschette, die mit der Messeinheit verbunden ist, wird an der Schwanzwurzel befestigt und wird über einen Druckgenerator langsam in 5 mmHg Schritten aufgeblasen. Direkt hinter der Druckmanschette wird ein piezoelektrischer Pulsaufnehmer befestigt. Sobald die Schwanzarterie durch den Druck vollständig verschlossen ist, erkennt der Pulssensor keine Pulsation mehr. Als Pulssensor ist ein optischer Pulsaufnehmer in der Druckmanschette eingebaut. Der Optosensor, eine Infrarotleuchtdiodenkombination im Pulsaufnehmer misst den Lichtdurchgang durch den Schwanz. Über die Veränderung des Durchmessers der Arterie durch Blutdruckänderungen wird der Lichtdurchgang beeinflusst. Dies wird vom Optosensor registriert. Nach der Umwandlung in ein elektrisches Signal, Verstärkung und Filterung erhält man eine Pulskurve und eine Blutdruckkurve zur Auswertung. Die erste Blutdruckmessung wird nach einer minimalen Eingewöhnungszeit des Tieres von 10 Minuten vorgenommen. Dabei wird die Druckmanschette auf 215 mmHg aufgeblasen, so dass keine Pulskurve mehr zu erkennen ist. Die Blutdruckmessung erfolgt nach der Korotkoff-Methode, so dass derjenige Druck als systolischer arterieller Druck gewertet wurde, bei dem beim Ablassen der Luft die Pulskurve wieder erscheint. Bei der Auswertung wurden nur Kurven verwendet bei denen ein eindeutiger Beginn der Amplitude zu erkennen war. Zu jedem Tier bei jedem Messzeitpunkt wurden 15 Messungen vorgenommen, die dann zu einer Mittelwertbildung herangezogen wurden.

### 3.2.4. Histologische Methoden

#### 3.2.4.1. Fixierung

Die Fixierung soll postmortale Veränderungen, wie z.B. Autolyse oder Fäulnis, am Gewebe verhindern. Außerdem vermeidet man durch eine Fixierung, dass Zellbestandteile bei histochemischen Reaktionen herausgelöst werden. Zusätzlich kann man das Organ nach der Fixierung besser schneiden, da es danach härter ist.

Für die Paraffineinbettung werden die Organe in 4 % Formalin fixiert. Über Formaldehyd können sich zwischen freien Aminogruppen der Proteine Methylbrücken bilden, was zur Vernetzung unter den Proteinen führt. Letztendlich erreicht man eine Polymerisierung der Proteine und eine Stabilisierung der Lipide. Auch wenn der Fixierungsvorgang zu Veränderungen des Gewebes führt, können die Zellzustände dennoch beurteilt werden, da die Veränderungen standardisiert und bekannt sind.

#### 3.2.4.2. Einbettung in Paraffin

Damit man das Gewebe dünn und genau schneiden kann, muss es härter und stabiler werden. Dazu dient das Einbetten in Paraffin. Dies erfolgt im Einbettautomat Shandon Citadel 1000: Zuerst wird das Gewebe (in Histokassetten verpackt) mit einer Alkoholreihe (70%, 96%, 3×100% Ethanol, jeweils 1 Stunde) entwässert. Dann folgt ein Schritt mit Aceton (30 Minuten). Danach kommt das Gewebe für 1 Stunde in flüssiges Paraffin 6 (56 °C). Anschließend wird das Gewebe in Paraffin 9 aufbewahrt. Im Microm EC 350 werden die Organe dann ausgebettet. Dazu werden sie aus der Histokassette entnommen und in vorgewärmte Metallkassetten überführt. Diese werden mit flüssigem Paraffin gefüllt, während das Organ mit vorgesehener Anschnittfläche mit einer Pinzette nach unten auf den Boden gedrückt wird. Dann wird alles auf einer kalten Metallplatte abgekühlt. Zum Schluss härtet der Paraffin-Organ-Block auf einer Kälteplatte aus und kann im festen Zustand dann aus der Metallkassette entnommen werden.

#### 3.2.4.3. Silanisierung der Objektträger

Um eine möglichst optimale Haftung der Schnitte auf den Objektträgern zu erreichen, werden diese silanisiert. Die Objektträger werden dabei zuerst 5 Minuten in Aceton gegeben, dann 5 Minuten in eine 2% APES/Aceton-Lösung aus 196ml Aceton und 4ml APES (Aminopropyltriethoxy-Silane) und abschließend 2-3 Minuten in Aqua bidest gespült. Danach werden die Objektträger über Nacht an der Luft getrocknet. Durch das Silanisieren haben die Objektträger eine Beschichtung aus Silanen. Es handelt sich dabei um ein Siliciumgrundgerüst mit Wasserstoff, das als Haftbeschichtung dient.

#### 3.2.4.4. Serienschneittechnik

Mit dem Schlittenmikrotom Leica JUNG RM 2025 wurden die Nieren komplett seriell geschnitten, mit einer Schnittdicke von 3 µm. Auf Objektträger fixiert wurden immer der 13., 14., und 15. Schnitt. Dadurch erhielt man Schnitte im Abstand von 45 µm. Ziel dabei war es den Abstand so zu wählen, dass große Glomerula nicht doppelt angeschnitten werden. Dabei wurde in Kauf genommen, dass kleinere Glomerula unter Umständen nicht bemerkt werden. Zusätzlich wurden pro Niere 20 Extraschnitte für anderweitige Untersuchungen gefertigt.

#### 3.2.4.5. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Bei der HE-Färbung werden 2 Farbstoffe verwendet. Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff aus dem Blauholzbaum. Damit er färbend wirkt, wird er zu Hämalaun (basischer Hämateinlack) umgewandelt. Dieser Farbstoff färbt alle sauren bzw. basophilen Strukturen blau, vor allem Zellkerne, auf Grund der darin enthaltenen DNA. Eosin ist ein synthetischer Farbstoff und färbt alle basischen bzw. acidophilen Strukturen rot, vor allem Zellplasmaproteine. So dient die HE-Färbung hauptsächlich als Übersichtsfärbung. Der Ablauf der Färbung ist in Tabelle-5 beschrieben.

Tabelle-5: Färbeprotokoll HE

Lösung	Zeit	Anmerkung
Xylol	5 min	Entparaffinierung
Xylol	5 min	
100% Ethanol	2 min	Bewässerung
96% Ethanol	2 min	
80% Ethanol	2 min	
70% Ethanol	2 min	
Aqua bidest	kurz spülen	
Hämalaun nach Mayer	1 min 30 sek	Färbung
Fließendes Leitungswasser	10 min	
Aqua bidest	kurz spülen	
Eosin	30 sek	Färbung
Aqua bidest	kurz spülen	
80% Ethanol	kurz	Entwässern
96% Ethanol	2 min	

100%Ethanol	2 min	
Xylol	5 min	Intermedium
Xylol	5 min	
Eindecken der Objektträger mit Objektträger-Gläschen und DePeX		

### 3.2.4.6. Glomerula – Größen – Messung

Von einem Schnitt pro Niere wurden in der 20fachen-Vergrößerung Fotos von 40 Glomerula pro Niere mit einem Mikroskop und einer mit dem Mikroskop verbundenen Videokamera (Hitachi KP 140) erstellt. Dafür wurden die HE gefärbten Schnitte verwendet. Diese Fotos wurden dann mit dem Programm Image J (Version 1.36b) ausgewertet. Dabei wurden alle Glomerula bezüglich ihrer Fläche und ihres Umfangs ausgemessen. Dazu wurde die Fläche der Glomerula per Hand markiert. Die Ergebnisse wurden zuerst in Pixel festgehalten. Später wurden die Pixeldaten in metrische System umgerechnet. Um einen Umrechnungsfaktor zu bekommen, wurde eine Neubauerzählkammer, mit festen Maßen von  $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$  fotografiert und die Fläche auf die gleiche Weise markiert. Dies wurde zehnmal wiederholt. Aus diesen Werten wurden Mittelwerte bestimmt und folgender Umrechnungsfaktor festgesetzt:

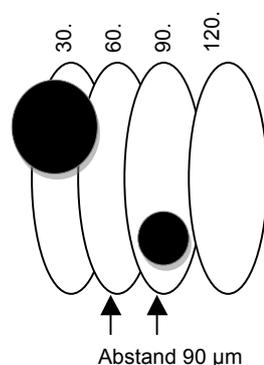
$$1\ \mu\text{m} = 3,277\ \text{Pixel}$$

$$1\ \mu\text{m}^2 = 10,413\ \text{Pixel}$$

### 3.2.4.7. Glomerula – Anzahl – Bestimmung

Jede linke Niere wurde komplett in Serienschnitten aufgearbeitet. In jedem 30. Nierenschnitt (mit Abständen von  $90\ \mu\text{m}$ ) wurde jedes Glomerulum gezählt, unabhängig von Größe und Form, siehe Abbildung-2. Somit erhielt man eine absolute Zahl pro Niere.

Abbildung-2: Zählung der Glomerula



### 3.2.5. Statistik

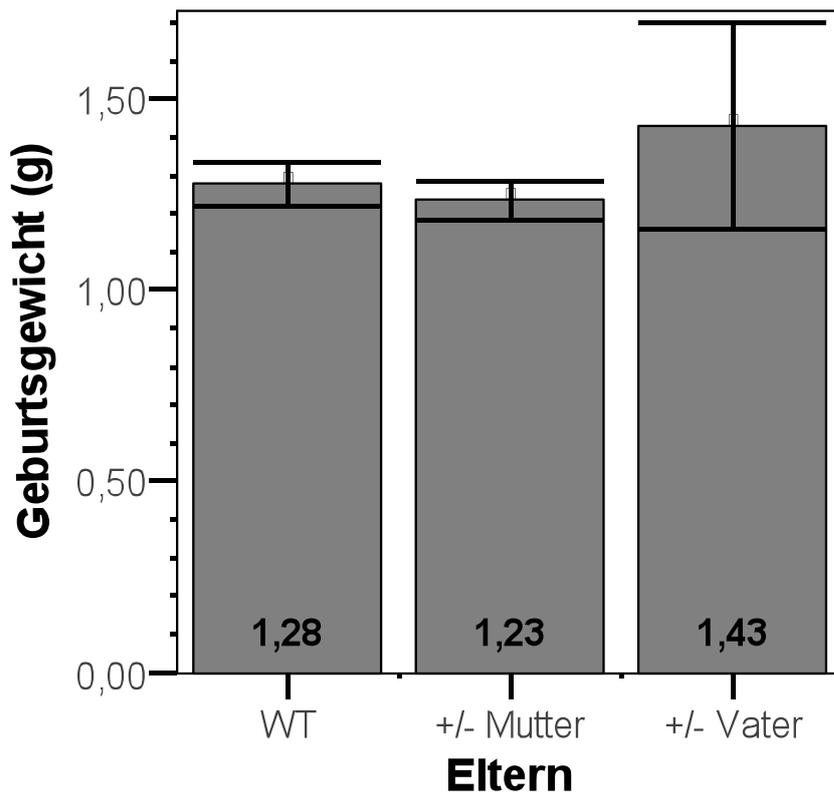
Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS 15.0. Mittels Kolmogorov-Smirnov –Test wurden die Daten bezüglich ihrer Normalverteilung getestet. Diese lag bei allen Daten vor, so dass statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit dem T-Test für unverpaarte Stichproben ermittelt wurden. Als signifikant wurden Werte von  $p \leq 0,05$  angenommen. Dies wurde in den Grafiken und Tabellen der Ergebnisse mit den Symbolen °, \* und # markiert. Eine Tendenz wurde angenommen bei  $0,05 < p \leq 0,07$ . In den Tabellen sind die Mittelwerte mit Standardfehler angegeben.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Körpergewicht der Tiere

#### 4.1.1. Geburtsgewicht

Das Geburtsgewicht war bei den Tieren aller drei Gruppen ohne signifikanten Unterschied, siehe Grafik-1.

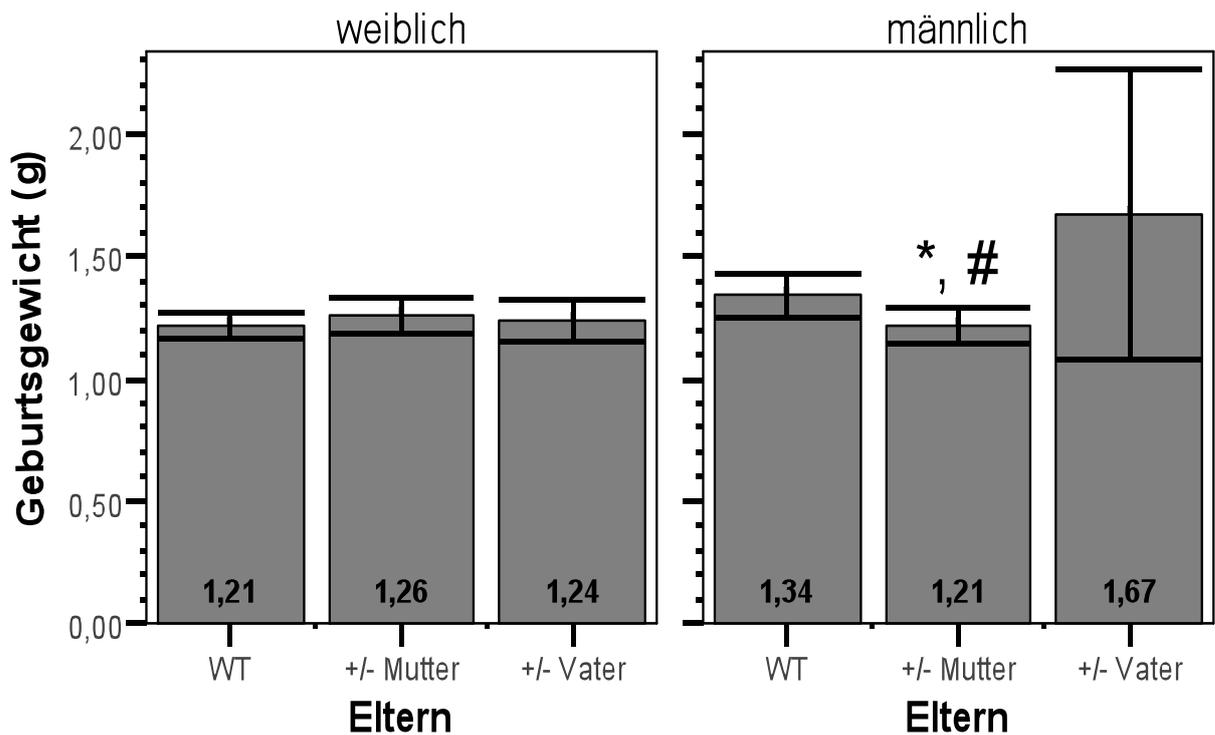


Grafik-1: Geburtsgewicht, Aufteilung nach Gruppen

*Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler*

*(WT n=48, +/- Mutter n=45, +/- Vater n=27 )*

Bei der Aufteilung nach Geschlechtern zeigten sich bei den Weibchen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Bei den Männchen hingegen zeigte sich ein signifikant geringeres Geburtsgewicht bei der Gruppe mit heterozygoten Müttern im Vergleich sowohl zur Gruppe mit Wildtyp Eltern als auch zur Gruppe mit heterozygoten Vätern (Grafik-2).



Grafik-2: Geburtsgewicht Aufteilung nach Gruppe und Geschlecht

Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler

( weiblich: WT n=26, +/- Mutter n=22, +/- Vater n=17 )

( männlich: WT n=22, +/- Mutter n=23, +/- Vater n=10 )

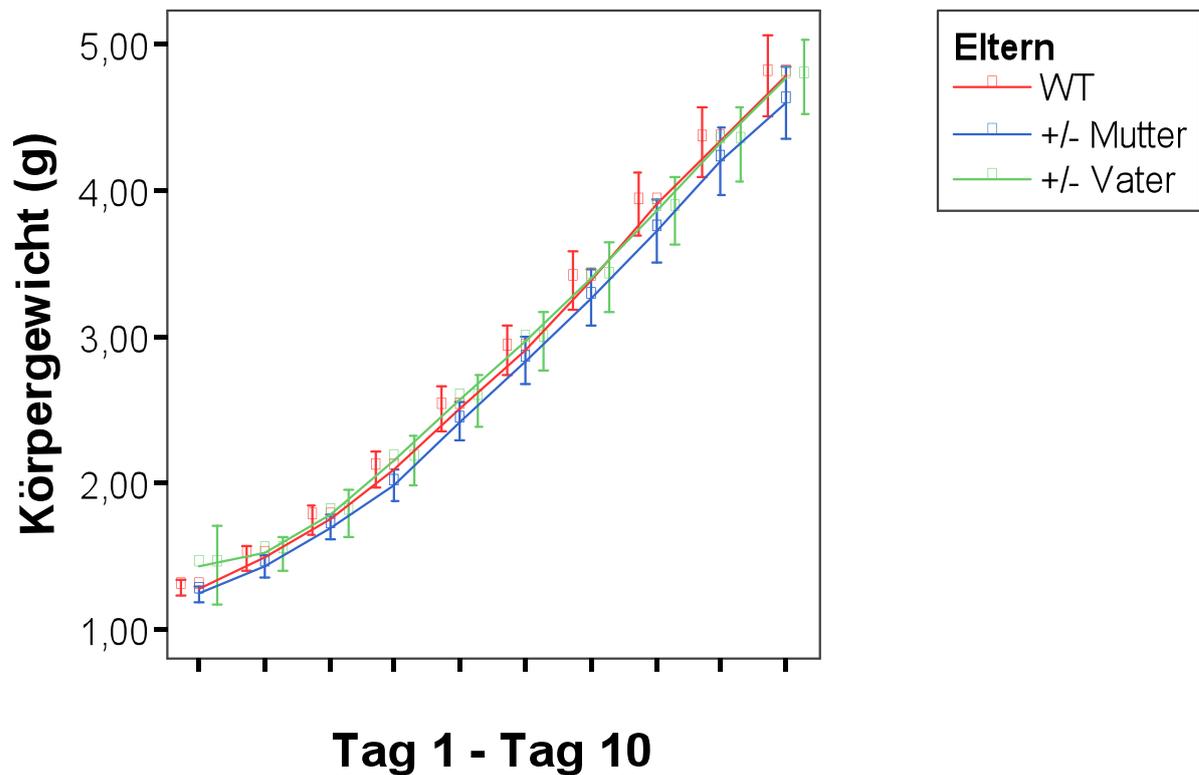
T-Test

\*  $P = 0,039$  +/-Mutter vs Wildtyp

#  $P = 0,035$  +/-Mutter vs +/-Vater

#### 4.1.2. Gewichtsverlauf der Tiere

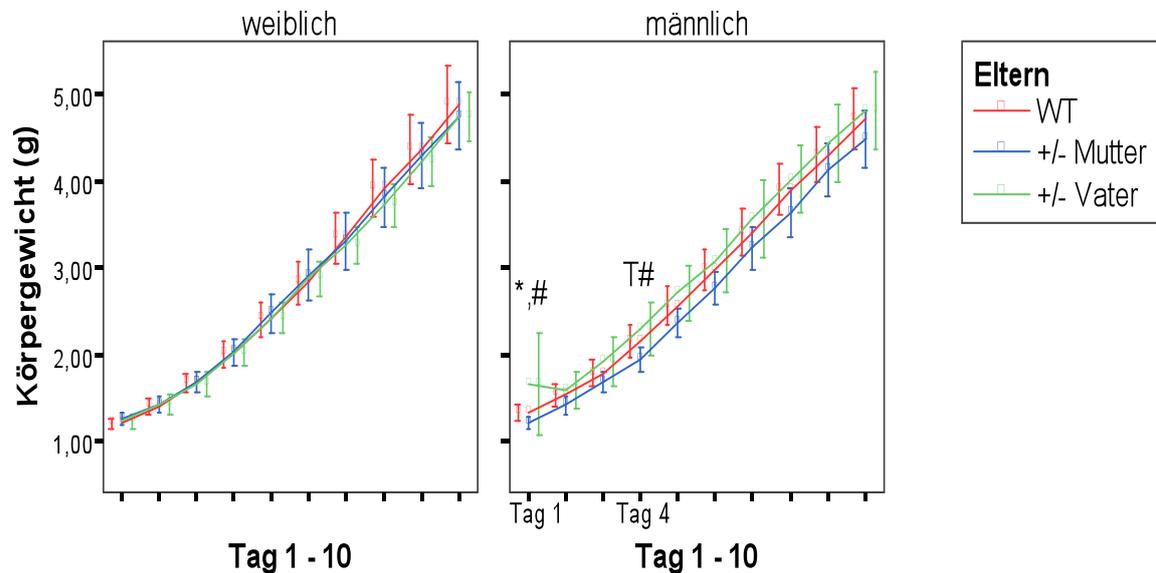
Es ist innerhalb der ersten 10 Tage kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen im Gewichtsverlauf zu beobachten, Insgesamt nimmt das Gewicht aller Tiere in den ersten Tagen nach der Geburt stark zu, siehe Grafik 3.



Grafik-3 Verlauf Gewicht Tag 1 – Tag 10 Aufteilung nach Gruppen

*Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler*

Nach Aufteilung nach Geschlechtern zeigt sich bei den Männchen, dass die Gruppe mit heterozygoten Müttern ein signifikant niedrigeres Gewicht hat als die Gruppe mit Wildtypeltern und die Gruppe mit heterozygoten Vätern am Tag 1 und eine Tendenz dazu am Tag 4 (Grafik-4).



Grafik-4 Verlauf Gewicht Tag 1 – Tag 10 Aufteilung nach Gruppen und Geschlecht

Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler

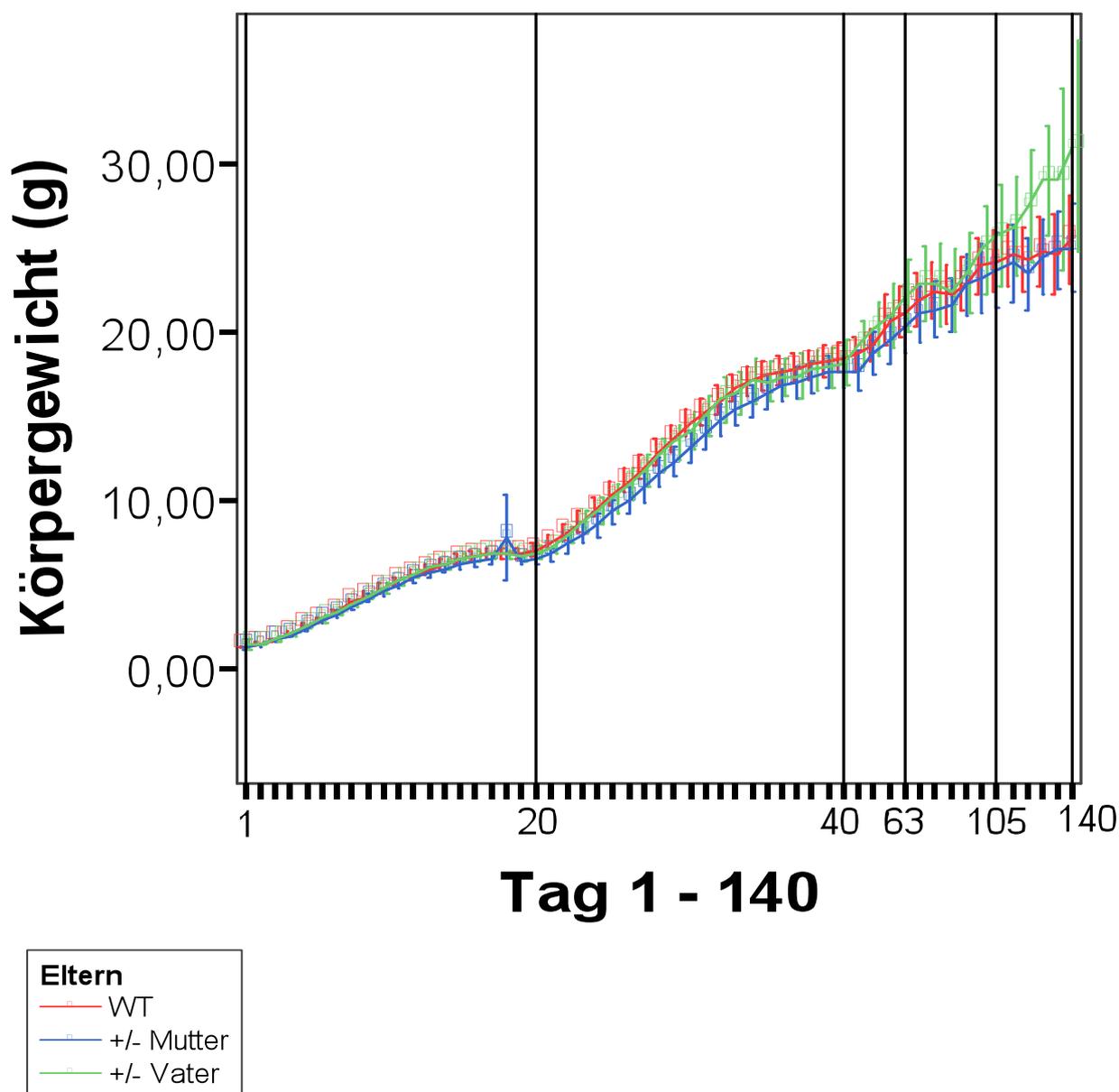
T-Test

\* (Tag 1)  $p = 0,039$  +/- Mutter vs Wildtyp

# (Tag 1)  $p = 0,035$  +/- Vater vs +/- Mutter

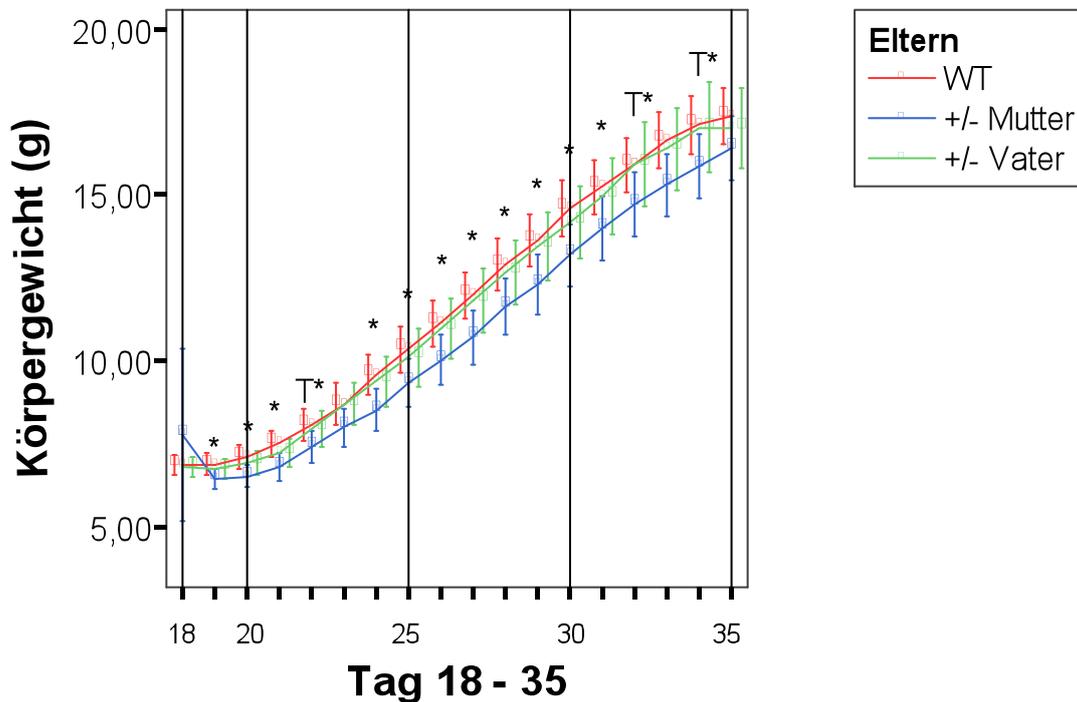
T# (Tag 4)  $p = 0,058$  +/- Vater vs +/- Mutter

In der Gesamtübersicht vom 1. bis zum 140. Tag zeigen die drei Gruppen einen recht ähnlichen Verlauf (Grafik-5). Anfangs haben die Tiere mit heterozygoten Vätern das höchste Gewicht. Diesen Platz nehmen dann aber ab dem 19. Tag die Tiere mit den Wildtypeltern ein. Ab dem 42. Tag bis zum Ende haben dann aber wieder die Tiere mit den heterozygoten Vätern das höchste Gewicht. Die Tiere mit den heterozygoten Müttern zeigen durchgehend das niedrigste Gewicht. Sie haben ein deutlich niedrigeres Gewicht im Zeitraum Tag 19 bis Tag 34, davon signifikant niedriger an den Tagen 19, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 33 und eine Tendenz dazu an den Tagen 22, 32 und 34, siehe Grafik-6.



Grafik-5 Verlauf Übersicht Gewicht Tag 1 – Tag 140 Aufteilung nach Gruppen

*Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler*



Grafik-6 Verlauf Gewicht Tag 18 – Tag 35 Aufteilung nach Gruppen

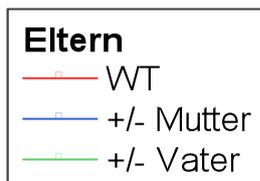
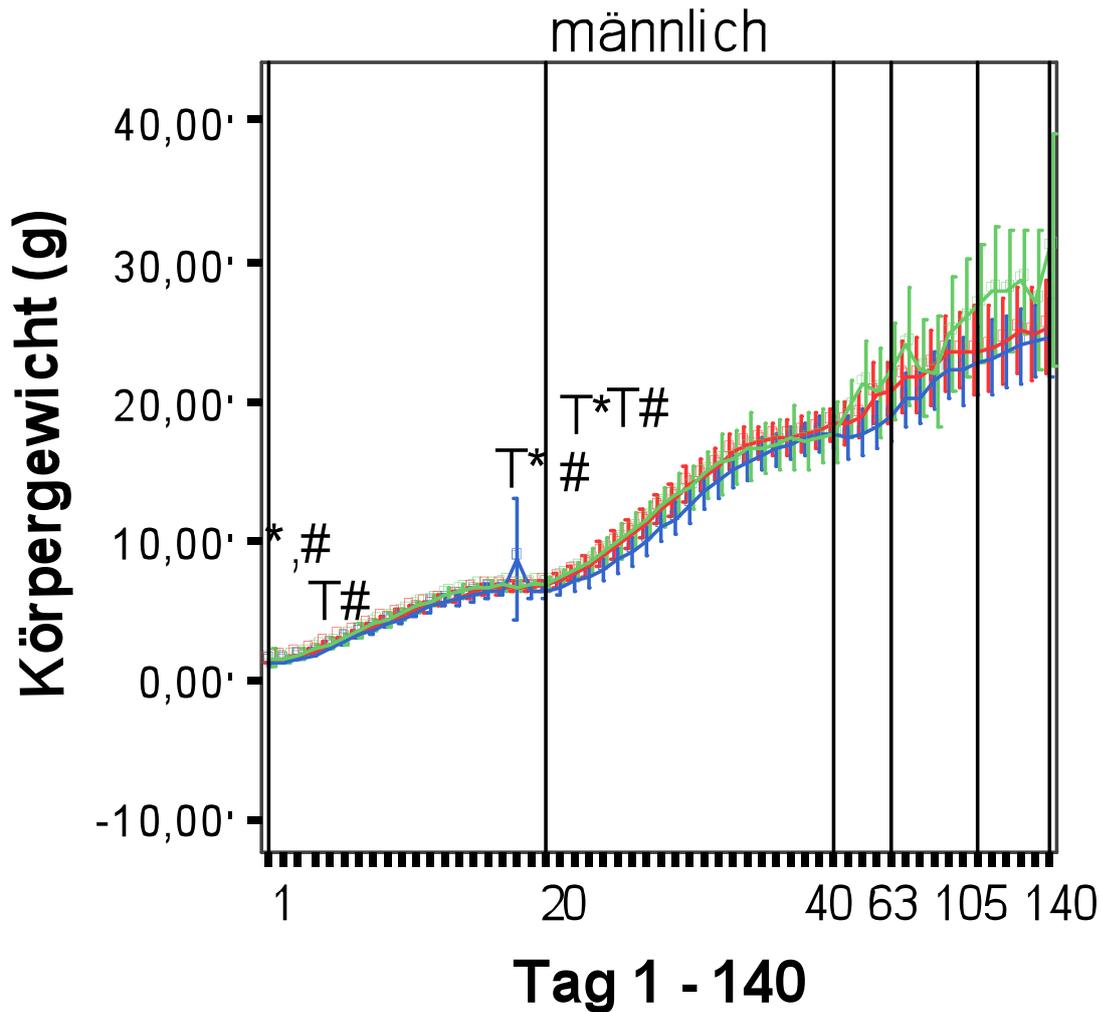
*Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler*

*T-Test*

*\* (Tag 19,20,21,24,25,26,27,28,29,30,31,33)  $p < 0,05$  +/- Mutter vs Wildtyp*

*T\* (Tag 22,32,34)  $0,05 < p < 0,07$  +/- Mutter vs Wildtyp*

Nach der Aufteilung nach Geschlechtern fällt auf, dass sich innerhalb der Weibchen keine signifikanten Unterschiede unter den drei Gruppen finden lassen, siehe Grafik-7.2. Alle drei Gruppen liegen sehr eng beieinander, vor allem am Anfang. Das niedrigste Gewicht haben durchgehend die Tiere mit den heterozygoten Müttern. Unter den Männchen (Grafik 7.1) hat die Gruppe mit den heterozygoten Müttern durchgehend das geringste Gewicht. Es zeigt sich unter den Männchen eine Tendenz zu einem niedrigeren Gewicht der Tiere mit heterozygoten Müttern im Vergleich zu denen mit Wildtypeltern an Tag 21 und an Tag 24, eine Tendenz zu einem niedrigeren Gewicht im Vergleich zu denen mit heterozygoten Vätern am Tag 4 und 26 und ein signifikant niedrigeres Gewicht als die Tiere mit Wildtypeltern am Tag 1 und als die Tiere mit heterozygoten Vätern am Tag 24.



Grafik-7.1 Verlauf Übersicht Gewicht Tag 1 – Tag 140 Aufteilung nach Gruppen und Geschlecht (Darstellung männlich)

Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler

T-Test

Männchen:

\* (Tag 1)  $p = 0,039$  +/- Mutter vs Wildtyp

T\* (Tag 21)  $p = 0,07$  +/- Mutter vs Wildtyp

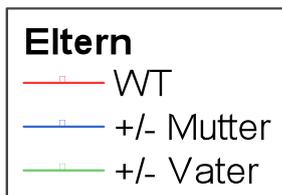
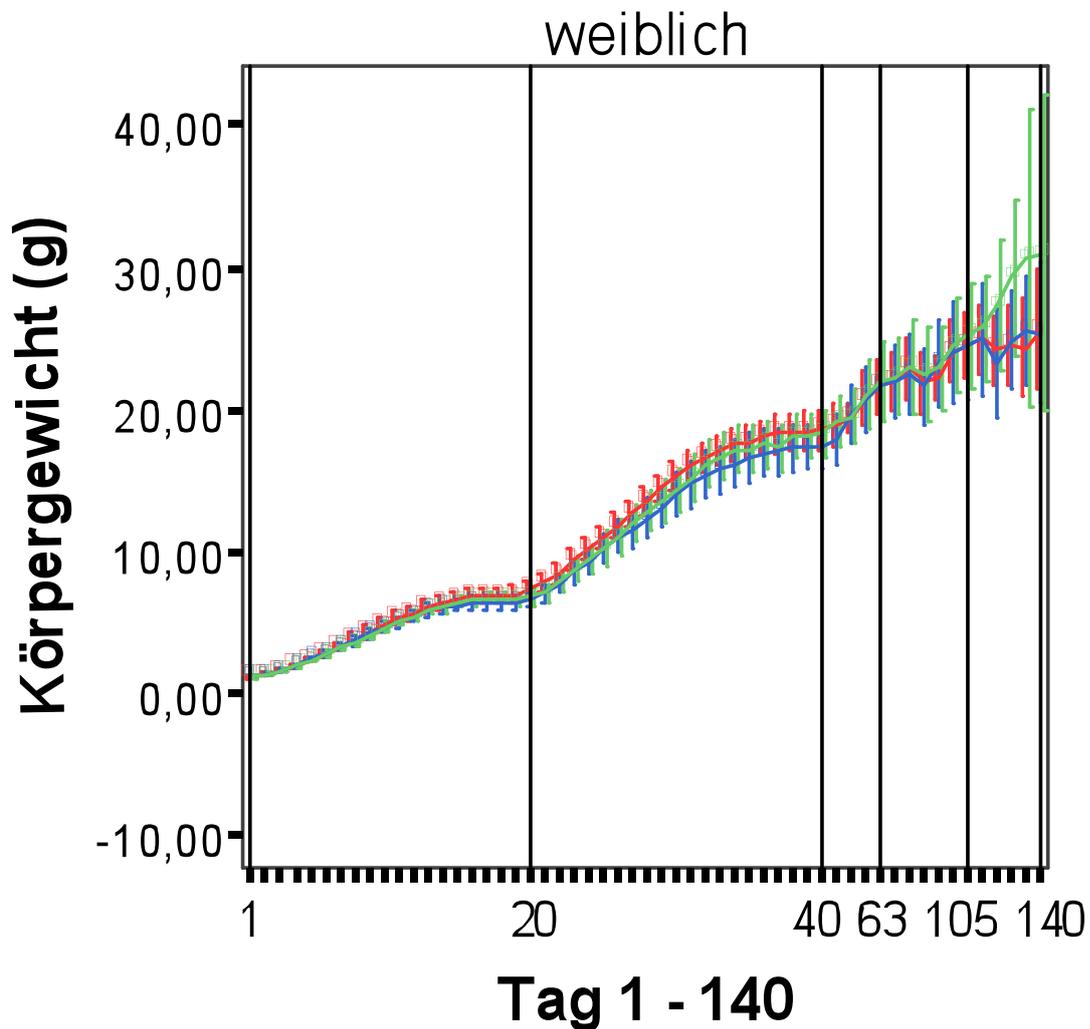
T\* (Tag 24)  $p = 0,053$  +/- Mutter vs Wildtyp

# (Tag 1)  $p = 0,035$  +/- Vater vs +/- Mutter

T# (Tag 4)  $p = 0,058$  +/- Vater vs +/- Mutter

# (Tag 24)  $p = 0,045$  +/- Vater vs +/- Mutter

T # (Tag 26)  $p = 0,059$  +/- Vater vs +/- Mutter

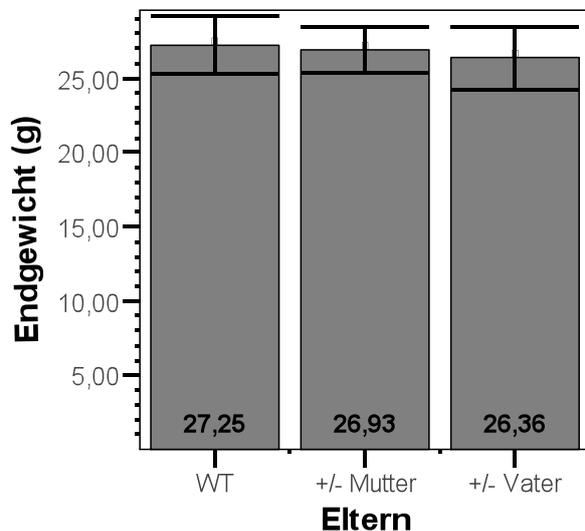


Grafik-7.2 Verlauf Übersicht Gewicht Tag 1 – Tag 140 Aufteilung nach Gruppen und Geschlecht (Darstellung weiblich)

Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler

#### 4.1.3. Endgewichte der Tiere

Bei den Endgewichten fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen, siehe Grafik - 8 .

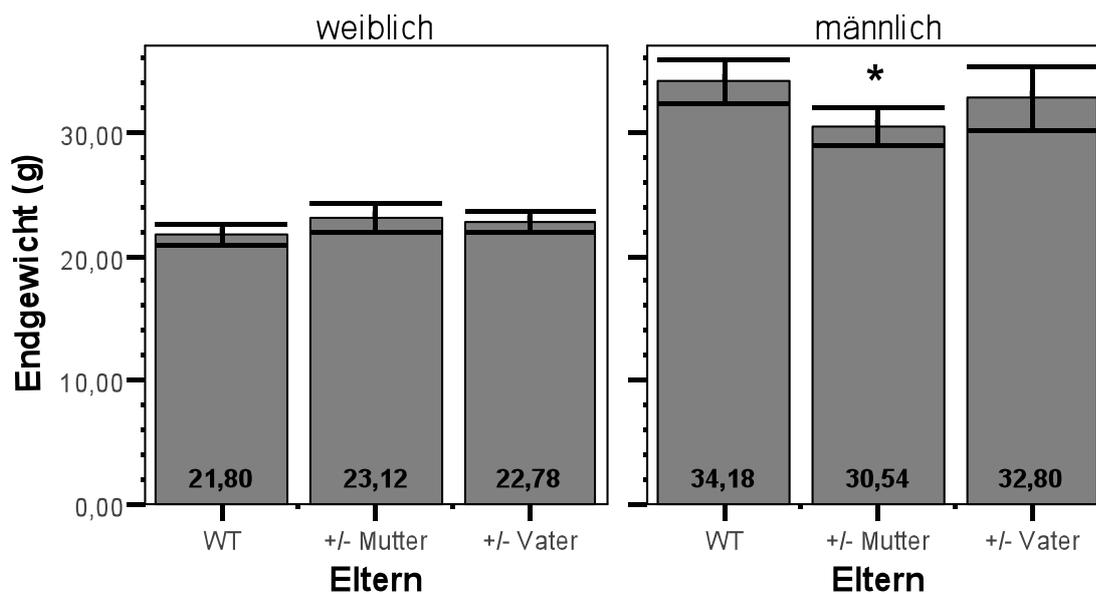


Grafik-8 Endgewicht Aufteilung nach Gruppe

Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler

( WT n=50, +/- Mutter n=37, +/- Vater n=28 )

Bei der Aufteilung nach Geschlechtern fand sich auch kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen unter den Weibchen, siehe Grafik-9. Bei den Männchen hingegen zeigte sich ein signifikant niedrigeres Endgewicht der Gruppe mit heterozygoten Müttern im Vergleich zur Gruppe mit Wildtypeltern, siehe Grafik-9.



Grafik - 9 Endgewicht Aufteilung nach Gruppen und Geschlecht

Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler

( weiblich: WT n=28, +/- Mutter n=18, +/- Vater n=18 )

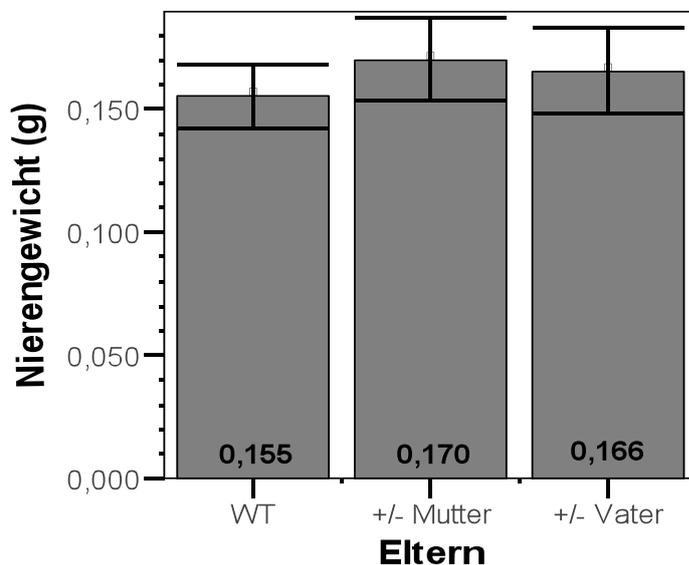
( männlich: WT n=22, +/- Mutter n=19, +/- Vater n=10 )

T-Test

Männchen\*  $p = 0,004$  +/- Mutter vs Wildtyp

#### 4.2.Nierengewicht (linke Niere)

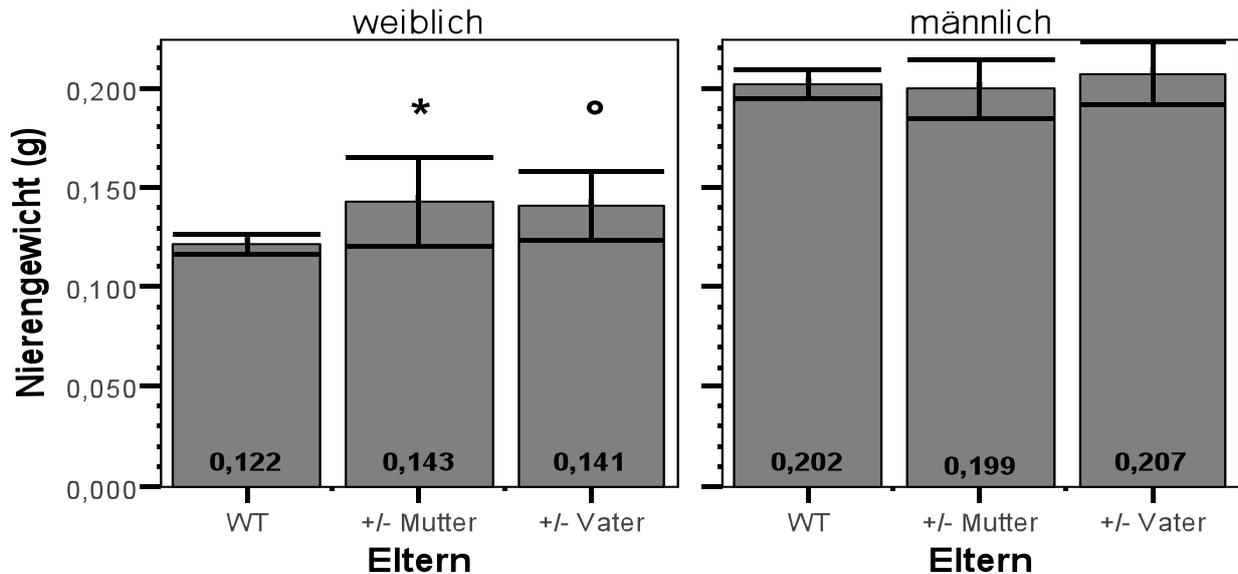
Hier blieben die gesamtgeschlechtlichen Gruppen ohne signifikanten Unterschied, siehe Grafik - 10. Jedoch erwies sich die Gruppe mit heterozygoten Müttern, als auch die Gruppe mit heterozygoten Vätern als signifikant erhöht im Vergleich zur Gruppe mit Wildtypeltern innerhalb der weiblichen Population. In der männlichen Population zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, siehe Grafik - 11.



Grafik - 10 Nierengewicht Aufteilung nach Gruppe

Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler

( WT n=45, +/- Mutter n=35, +/- Vater n=37 )



Grafik – 11 Nierengewicht Aufteilung nach Gruppen und Geschlecht

Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler

( weiblich: WT n=26, +/- Mutter n=18, +/- Vater=17 )

( männlich: WT n=19, +/- Mutter n=17, +/- Vater N=10 )

T-Test

Weibchen

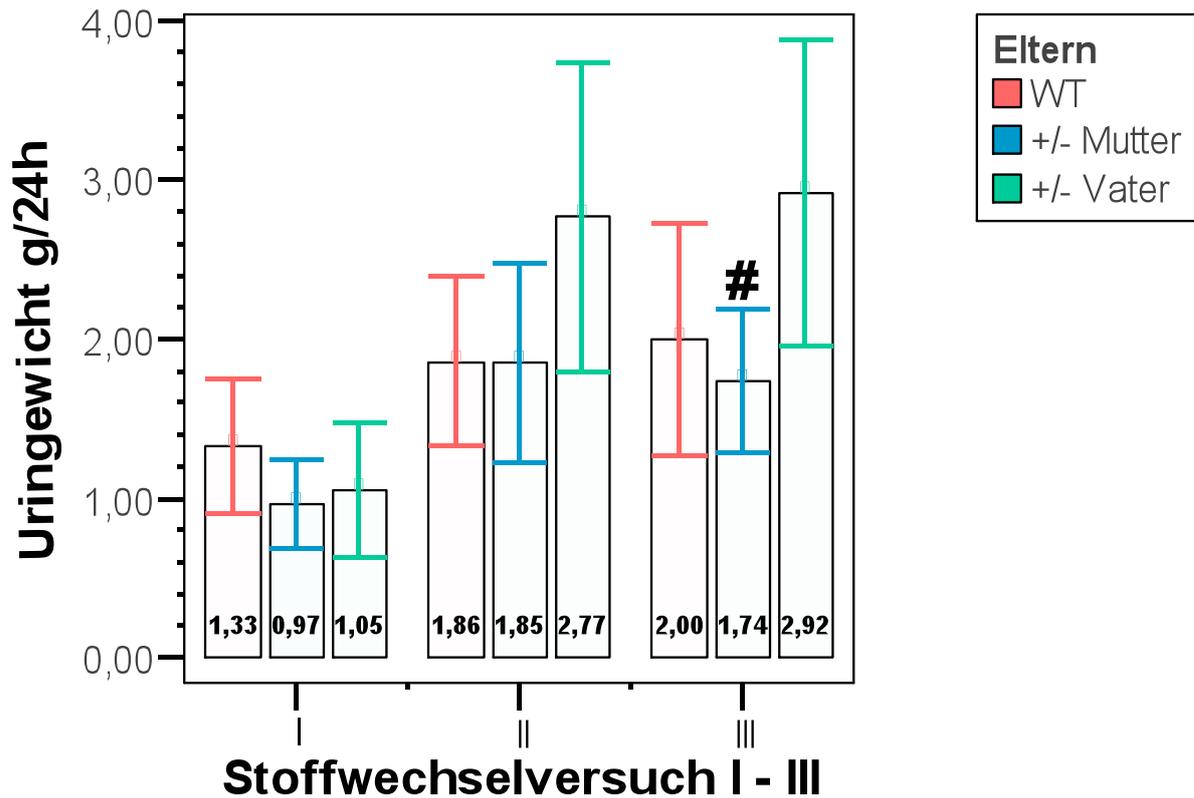
\*  $p = 0,037$  +/-Mutter vs Wildtyp

°  $p = 0,015$  +/-Vater vs Wildtyp

### 4.3. Stoffwechselfersuch

#### 4.3.1. Urinmenge

Im Stoffwechselfersuch I und II zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Urinmengen innerhalb der Gruppen. Im Stoffwechsel III hingegen zeigte sich ein signifikant erniedrigtes Uringewicht der Tiere mit den heterozygoten Müttern im Vergleich zu den Tieren mit den heterozygoten Vätern(Grafik-12). In der Aufteilung nach den Geschlechtern konnte dieser Unterschied allerdings nicht gezeigt werden (Grafik-13).



Grafik -12 Stoffwechselversuch I – III Uringewicht g/24h Aufteilung nach Gruppen

*Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler*

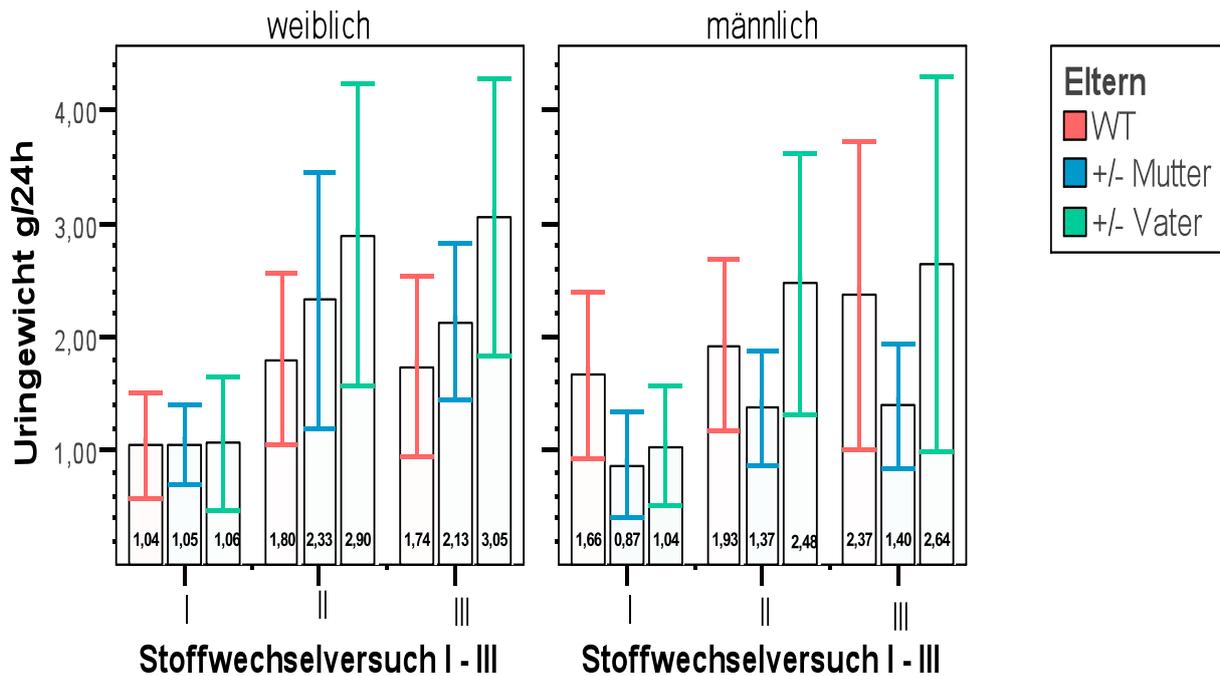
*(Stoffwechsel I: WT n=48, +/- Mutter n=37, +/- Vater n=28)*

*(Stoffwechsel II: WT n=53, +/- Mutter n=42, +/- Vater n=28)*

*(Stoffwechsel III: WT n=43, +/- Mutter n=41, +/- Vater n=24)*

*T-Test*

*# p = 0,01 +/-Mutter (III) vs +/-Vater (III)*



Grafik - 13 Stoffwechselforschung I – III Uringewicht g/24h Aufteilung nach Gruppen und Geschlecht

*Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler*

*(Stoffwechsel I weiblich: WT n=26, +/- Mutter n=20, +/- Vater n=18)*

*(Stoffwechsel II weiblich: WT n=28, +/- Mutter n=21, +/- Vater n=19)*

*(Stoffwechsel III weiblich: WT n=25, +/- Mutter n=19, +/- Vater n=16)*

*(Stoffwechsel I männlich: WT n=22, +/- Mutter n=17, +/- Vater n=10)*

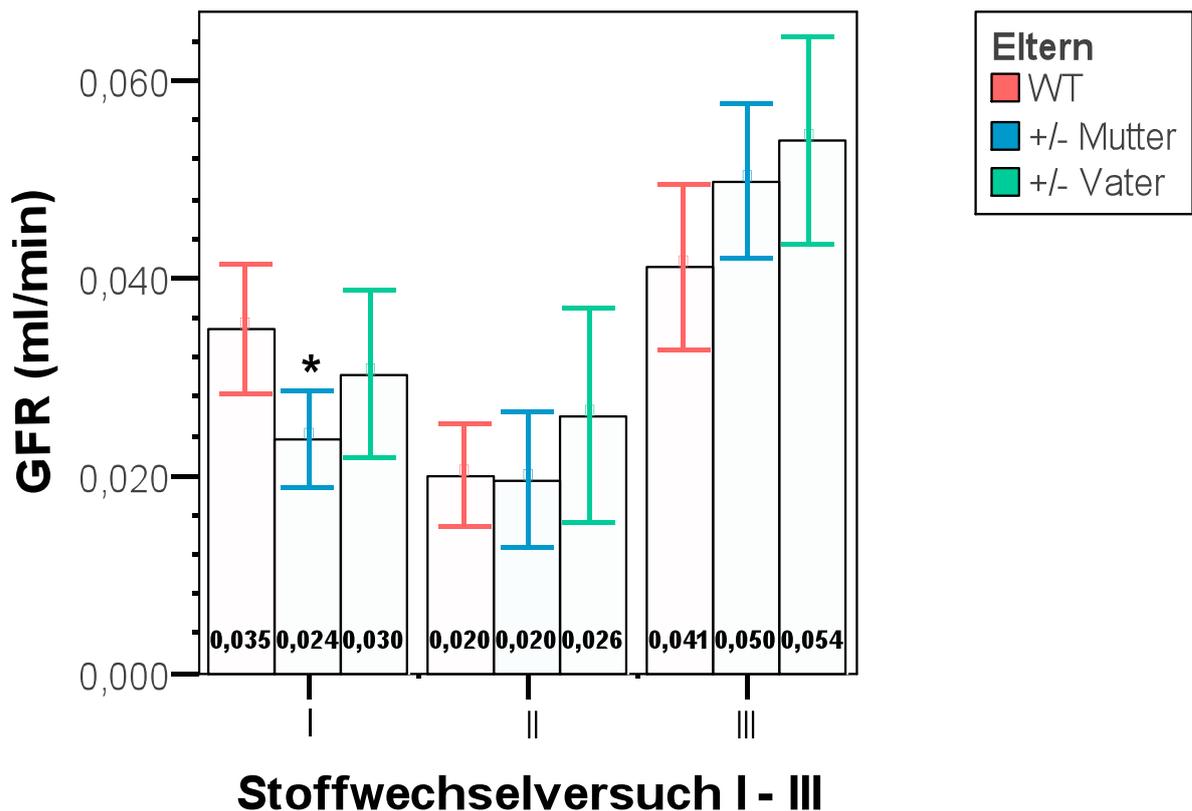
*(Stoffwechsel II männlich: WT n=25, +/- Mutter n=21, +/- Vater n=9)*

*(Stoffwechsel III männlich: WT n=18, +/- Mutter n=22, +/- Vater n=8)*

#### 4.3.2. Kreatinin-clearance

Innerhalb der drei Gruppen während der drei Messzeitpunkte Stoffwechsel I, II und III, zeigte sich eine signifikant erniedrigte Kreatinin-clearance unter den Tieren mit heterozygoten Müttern im Vergleich zu denen mit Wildtypeltern zum Messzeitpunkt Stoffwechsel I (Grafik 14). Außerdem zeigte sich bei den Tieren mit heterozygoten Vätern zum Messzeitpunkt Stoffwechsel III eine Tendenz zu einer erhöhten Kreatinin-clearance im Vergleich zu der Gruppe mit Wildtypeltern (Grafik 14). In der Aufteilung nach Geschlechtern gab es unter den Weibchen zum Messzeitpunkt Stoffwechsel III sowohl bei den Tieren mit heterozygoten Müttern, als auch bei denen mit heterozygoten Vätern eine signifikant erhöhte Kreatinin-clearance im Vergleich zu

denen mit Wildtypeltern (Grafik 15). Außerdem fand sich eine Tendenz unter den Weibchen mit heterozygoten Vätern zum Messzeitpunkt Stoffwechsel I zu einer niedrigeren Kreatinin-clearance als die Weibchen mit Wildtypeltern (Grafik 15). Unter den Männchen zeigte sich im Rahmen des Zeitpunktes Stoffwechsel I eine signifikant erniedrigte Kreatinin-clearance derjenigen mit heterozygoten Müttern im Vergleich zu denjenigen mit Wildtypeltern und auch im Vergleich zu denjenigen mit heterozygoten Vätern (Grafik 15).



Grafik - 14 Stoffwechselversuch I – III Kreatinin-clearance Aufteilung nach Gruppen

*Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler*

*(Stoffwechsel I: WT n=32, +/- Mutter n=27, +/- Vater n=21)*

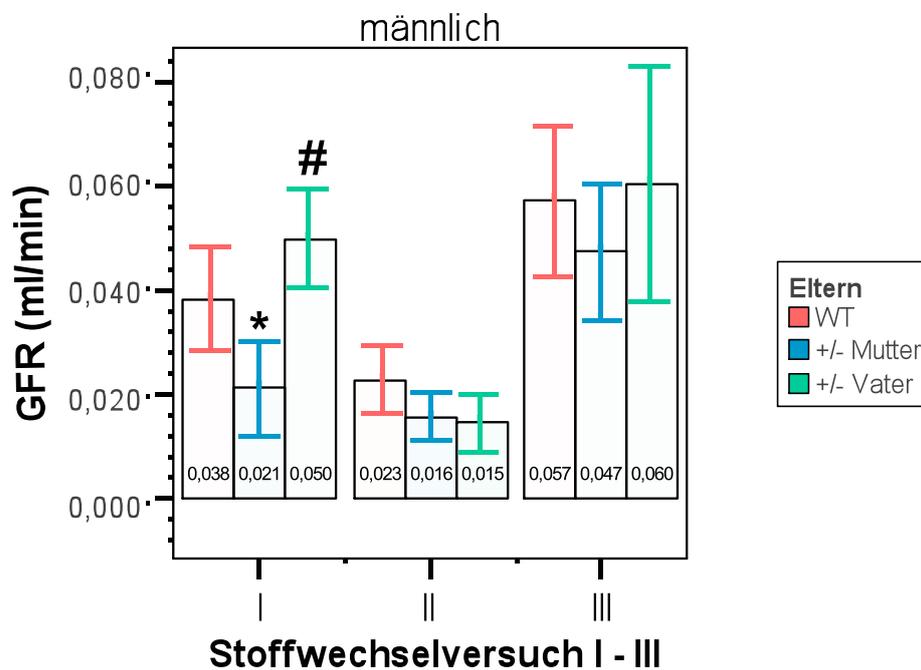
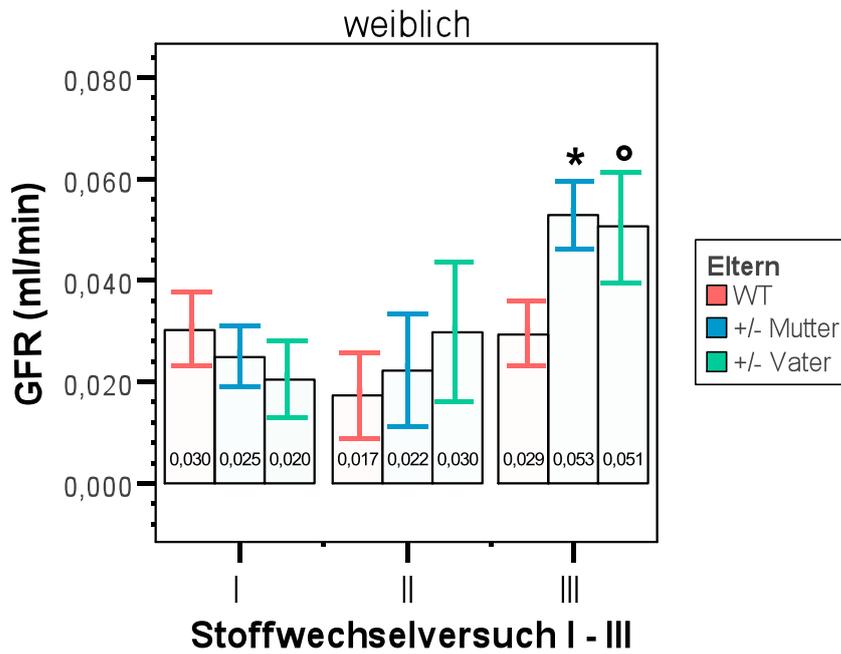
*(Stoffwechsel II: WT n=34, +/- Mutter n=22, +/- Vater n=16)*

*(Stoffwechsel III: WT n=38, +/- Mutter n=34, +/- Vater n=23)*

*T-Test*

\*  $p = 0,008$  +/- Mutter (I) vs Wildtyp (I)

$T^\circ p = 0,060$  +/- Vater (III) vs Wildtyp (III)



Grafik - 15 Stoffwechselversuch I – III Kreatinin-clearance Aufteilung nach Gruppen und Geschlecht

Angebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler

(Stoffwechsel I weiblich: WT n=14, +/- Mutter n=17, +/- Vater n=14)

(Stoffwechsel II weiblich: WT n=17, +/- Mutter n=13, +/- Vater n=12)

(Stoffwechsel III weiblich: WT n=22, +/- Mutter n=15, +/- Vater n=15)

(Stoffwechsel I männlich: WT n=18, +/- Mutter n=10, +/- Vater n=7)

(Stoffwechsel II männlich: WT n=17, +/- Mutter n=9, +/- Vater n=4)

(Stoffwechsel III männlich: WT n=16, +/- Mutter n=19, +/- Vater n=8)

#### T-Test

##### Weibchen:

\*  $p = 0,000$  +/- Mutter (III) vs Wildtyp (III)

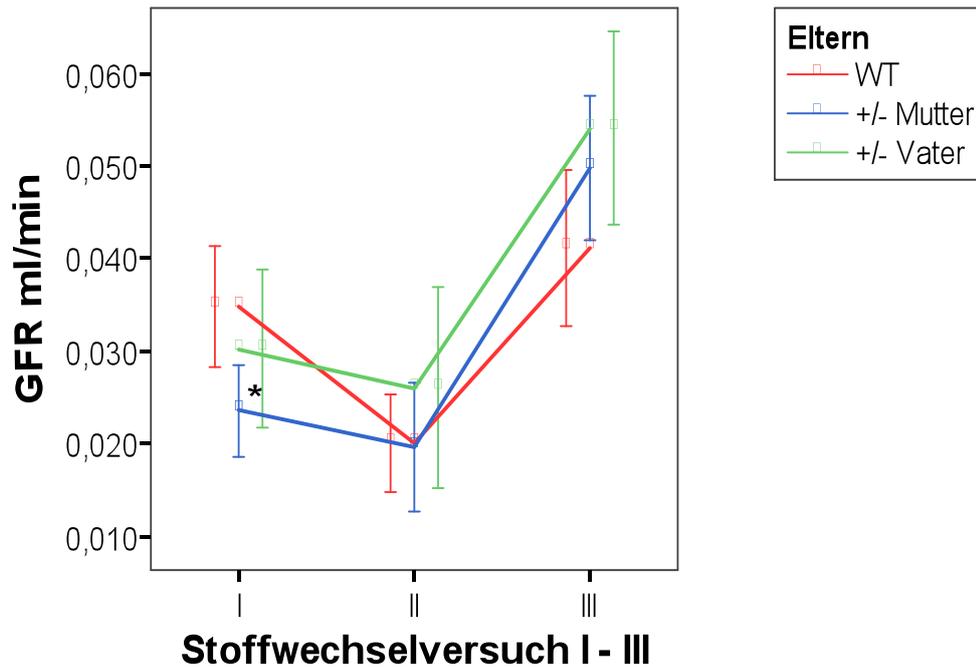
°  $p = 0,003$  +/- Vater (III) vs Wildtyp (III), T° $p = 0,069$  +/- Vater (I) vs Wildtyp (I)

##### Männchen:

\*  $p = 0,018$  +/- Mutter (I) vs Wildtyp (I)

#  $p = 0,001$  +/- Vater (I) vs +/- Mutter (I)

Im Verlauf innerhalb der drei Stoffwechselfersuche zeigte sich zum Messzeitpunkt Stoffwechselfersuch I der höchste Kreatininclearance – Wert bei der Gruppe mit den Wildtypeltern, gefolgt von der Gruppe mit den heterozygoten Vätern, vor der Gruppe mit den heterozygoten Müttern. Die Gruppe mit den heterozygoten Müttern hat eine signifikant niedrigere Kreatininclearance als die Gruppe mit Wildtypeltern (Grafik 16). Bei allen drei Gruppen ist ein Abfall der Kreatininclearance zum Messzeitpunkt Stoffwechselfersuch II zu erkennen (Grafik 16). Zum Messzeitpunkt Stoffwechsel III haben sich alle drei Gruppen einander angenähert und weisen keine statistisch signifikanten Unterschiede mehr auf (Grafik 16).



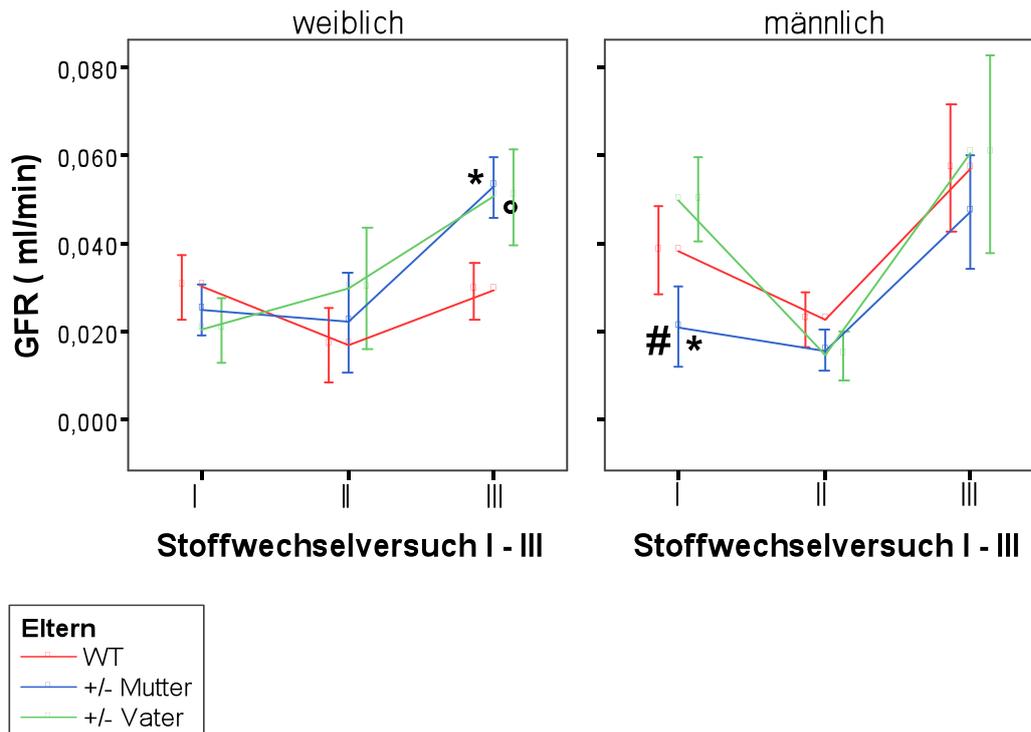
Grafik - 16 Verlauf Stoffwechsel I-III Kreatininclearance Aufteilung nach Gruppen

Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler

T-Test

\*  $p = 0,008$  +/- Mutter (I) vs Wildtyp (I)

Nach der Aufteilung nach Geschlechtern zeigt sich bei beiden ein in den Grundzügen ähnlicher Verlauf, wobei jedoch unter den Weibchen keine signifikanten Unterschiede zum Messzeitpunkt Stoffwechsel I und II auffallen (Grafik 17). Zum Messzeitpunkt Stoffwechsel III haben die Weibchen mit den heterozygoten Müttern und die mit den heterozygoten Vätern eine signifikant höhere GFR als die Gruppe mit Wildtypeltern (Grafik 17). Wohingegen bei den Männchen zum Messzeitpunkt Stoffwechsel I die Gruppe mit den heterozygoten Müttern eine signifikant niedrigere GFR als die Gruppe mit den heterozygoten Vätern und die Gruppe mit den Wildtypeltern hat (Grafik 17). Nachfolgend nähern sich alle Gruppen an und es lassen sich keine signifikanten Unterschiede mehr feststellen (Grafik 17).



Grafik - 17 Verlauf Stoffwechsel I-III Kreatinin-clearance Aufteilung nach Gruppen und Geschlecht

Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler

T-Test

Weibchen:

\*  $p = 0,000$  +/- Mutter (III) vs Wildtyp (III)

°  $p = 0,003$  +/- Vater (III) vs Wildtyp (III)

Männchen:

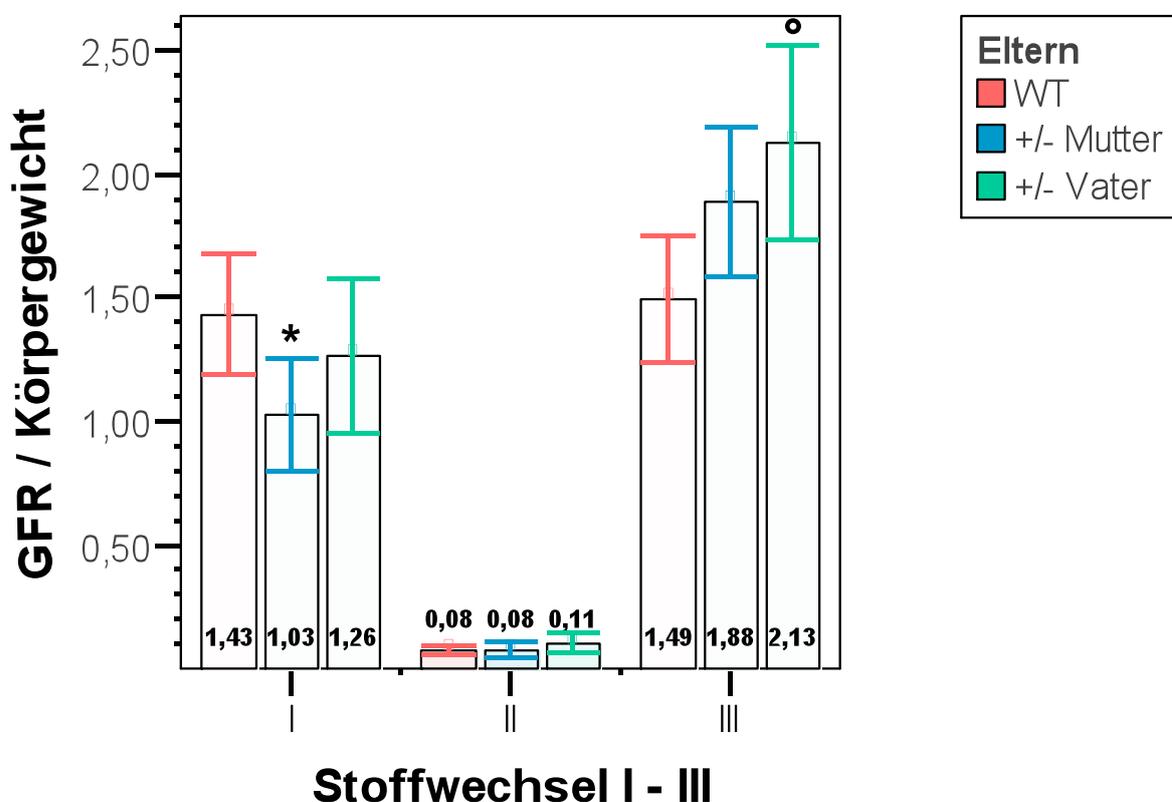
\*  $p = 0,018$  +/- Mutter (I) vs Wildtyp (I)

#  $p = 0,001$  +/- Mutter (I) vs +/- Vater (I)

#### 4.3.3. Kreatinin-clearance/Körpergewicht

Innerhalb der drei Gruppen während der drei Messzeitpunkte Stoffwechsel I, II und III, zeigte sich eine signifikant erniedrigte Kreatinin-clearance/Körpergewicht unter den Tieren mit heterozygoten Müttern im Vergleich zu denen mit Wildtypeltern zum Messzeitpunkt Stoffwechsel I und eine signifikant erhöhte Kreatinin-clearance/Körpergewicht unter den Tieren mit heterozygoten Vätern im Vergleich zu denen mit Wildtypeltern zum Messzeitpunkt Stoffwechsel III (Grafik 18). Außerdem fand sich bei den Tieren mit heterozygoten Müttern zum Messzeitpunkt Stoffwechsel III eine Tendenz zu einer erhöhten Kreatinin-clearance/Körpergewicht im Vergleich zu der Gruppe mit Wildtypeltern (Grafik 18). In der Aufteilung nach

Geschlechtern gab es unter den Weibchen zum Messzeitpunkt Stoffwechsel III sowohl bei den Tieren mit heterozygoten Müttern als auch bei denen mit heterozygoten Vätern eine signifikant erhöhte Kreatininclearance/Körpergewicht im Vergleich zu denen mit Wildtypeltern (Grafik 19). Außerdem fand sich eine Tendenz unter den Weibchen mit heterozygoten Vätern zum Messzeitpunkt Stoffwechsel I zu einer niedrigeren Kreatininclearance/Körpergewicht als die Weibchen mit Wildtypeltern (Grafik 19). Untern den Männchen zeigte sich im Rahmen des Zeitpunktes Stoffwechsel I eine signifikant erniedrigte Kreatininclearance derjenigen mit heterozygoten Müttern im Vergleich zu denjenigen mit Wildtypeltern und auch im Vergleich zu denjenigen mit heterozygoten Vätern (Grafik 19).



Grafik - 18 Stoffwechselfersuch I – III Kreatininclearance/Körpergewicht Aufteilung nach Gruppen

Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler

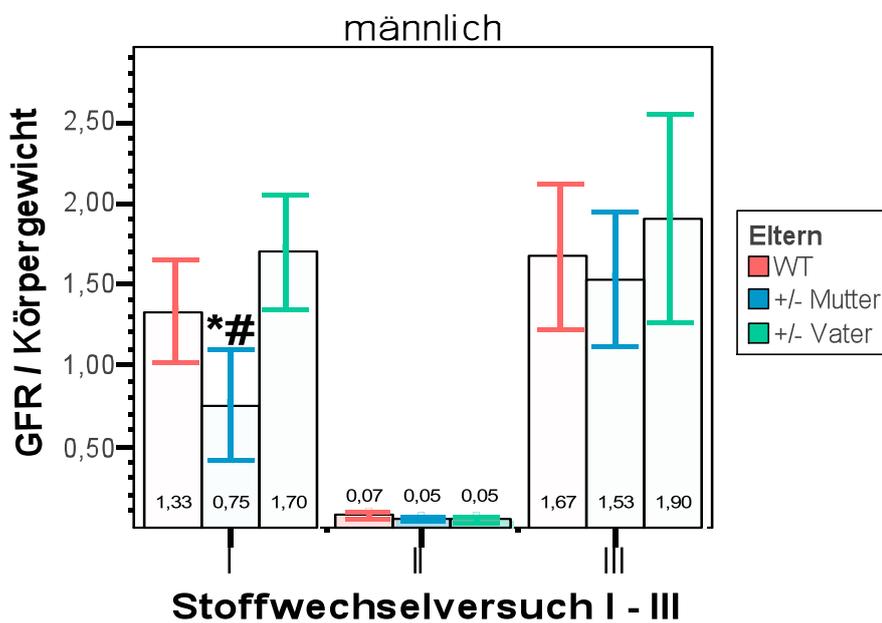
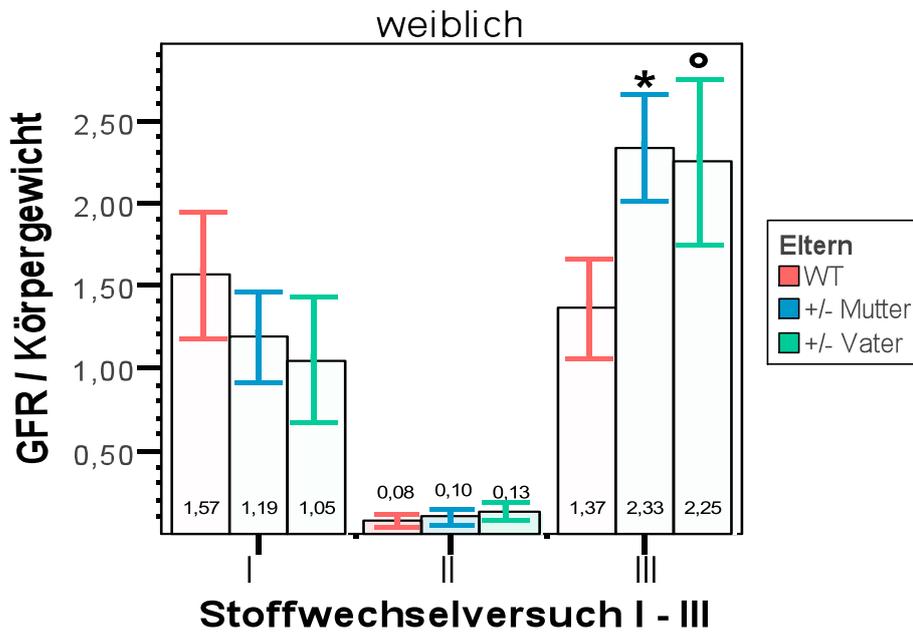
Probengröße (n) idem zu Grafik - 14

T-Test

\*  $p = 0,0018$  +/- Mutter (I) vs Wildtyp (I)

T\*  $p = 0,053$  +/- Mutter (III) vs Wildtyp (III)

°  $p = 0,01$  +/- Vater (III) vs Wildtyp (III)



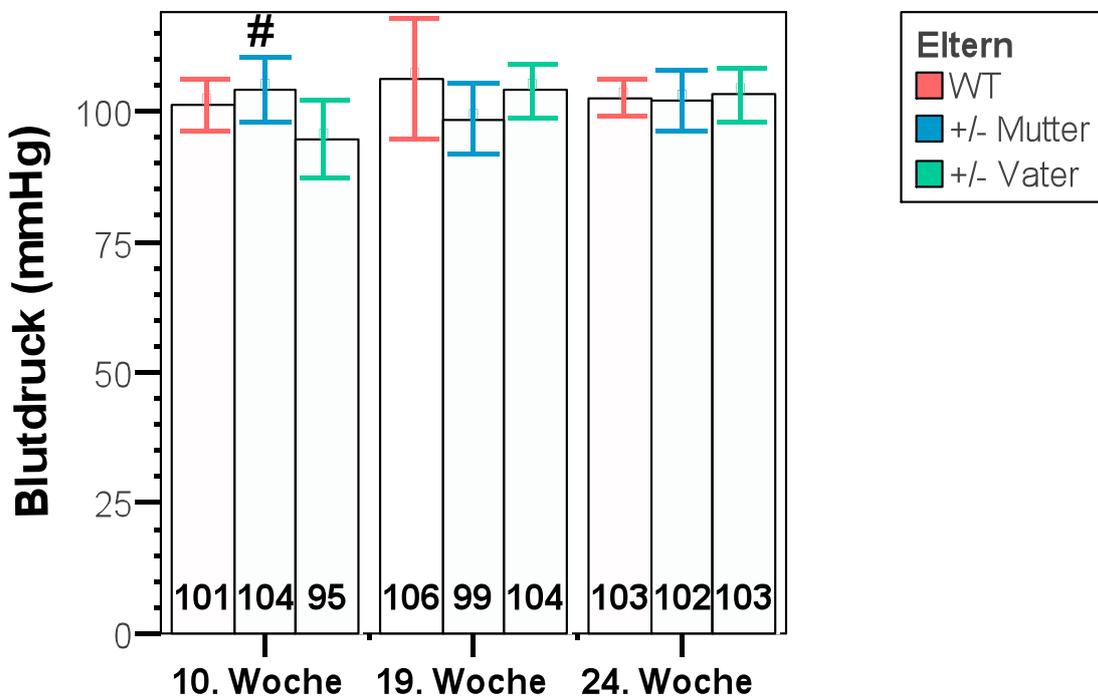
Grafik - 19 Stoffwechselversuch I – III Kreatininclearance/Körpergewicht Aufteilung nach Gruppen und Geschlecht

*Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler*

*Probengröße (n) idem zu Grafik – 15*

*T-Test**Weibchen:* $T^{\circ}p = 0,066$  +/- Vater (I) vs Wildtyp (I)\*  $p = 0,000$  +/- Mutter (III) vs Wildtyp (III)°  $p = 0,006$  +/- Vater (III) vs Wildtyp (III)*Männchen:*\*  $p = 0,022$  +/- Mutter (I) vs Wildtyp (I)#  $p = 0,002$  +/- Mutter (I) vs +/- Vater (I)**4.4. Blutdruck****4.4.1. Blutdruck 10., 19. und 24. Woche**

Innerhalb der drei Gruppen während der drei Messzeitpunkte 10., 19. und 24. Woche, zeigte sich während des Messzeitpunktes 10. Woche ein signifikant erhöhter Blutdruck der Gruppe mit den heterozygoten Müttern im Vergleich zu der Gruppe mit den heterozygoten Vätern (Grafik 20). Nach der Aufteilung der Geschlechter, zeigte sich dieser signifikante Unterschied ebenfalls in der Gruppe der Männchen (Grafik 21). Desweiteren zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.



Grafik - 20 Blutdruck 10., 19. und 24. Woche, Aufteilung nach Gruppen

*Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler*

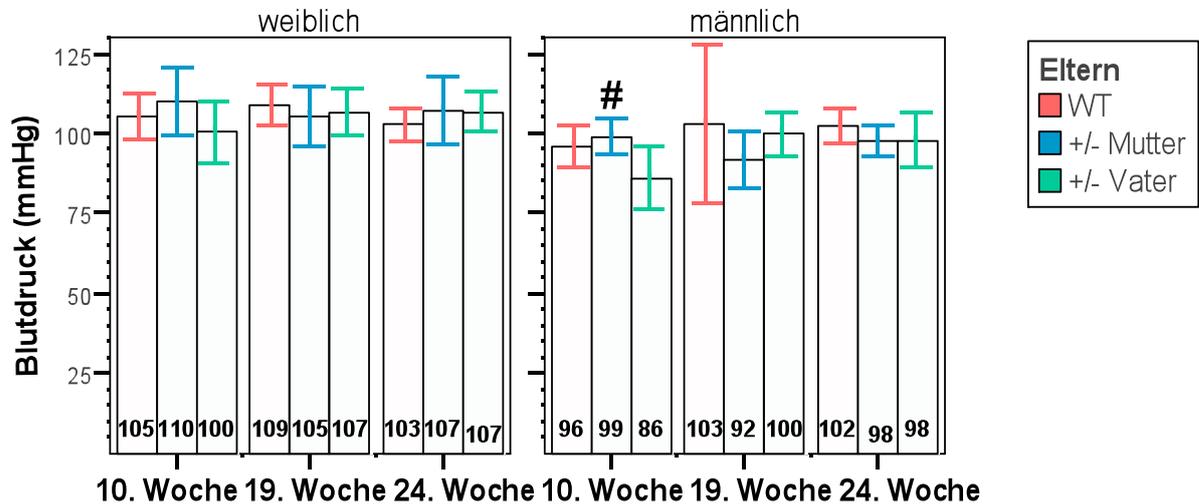
*(10. Woche: WT n=59, +/- Mutter n=44, +/- Vater n=30)*

(19. Woche: WT n=40, +/- Mutter n=36, +/- Vater n=27)

(24. Woche: WT n=53, +/- Mutter n=41, +/- Vater n=28)

T-Test

#  $p = 0,048$  +/- Mutter vs +/- Vater (10. Woche)



Grafik - 21 Blutdruck 10., 19. und 24. Woche, Aufteilung nach Gruppen und Geschlecht

Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler

(10. Woche weiblich: WT n=34, +/- Mutter n=21, +/- Vater n=18)

(19. Woche weiblich: WT n=22, Mutter n=18, +/- Vater n=17)

(24. Woche weiblich: WT n=32, +/- Mutter n=19, +/- Vater N=17)

(10. Woche männlich: WT n=25, +/- Mutter n=23, +/- Vater n=12)

(19. Woche männlich: WT n=18, +/- Mutter n=18, +/- Vater n=10)

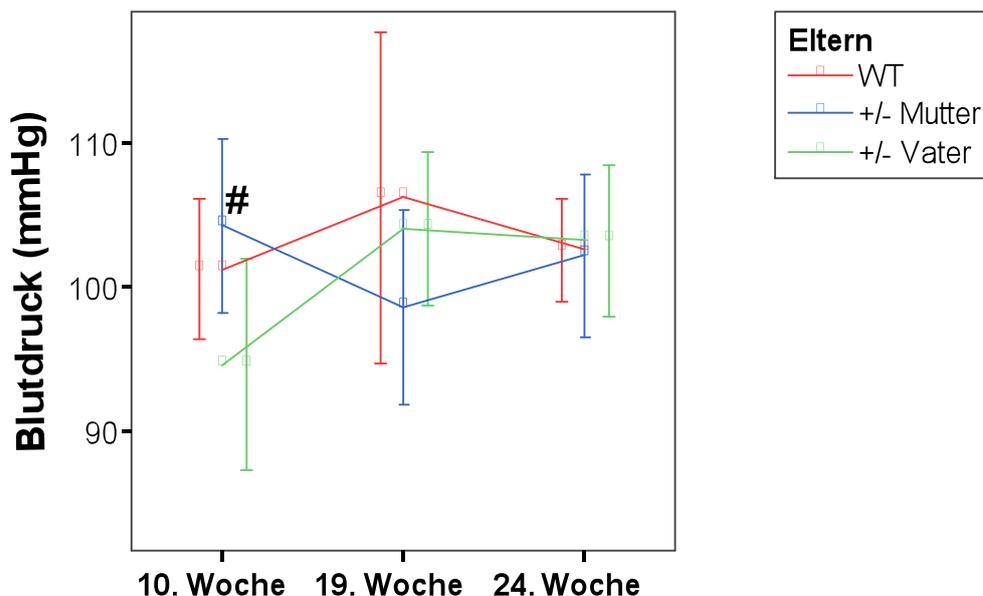
(24. Woche männlich: WT n=21, +/-Mutter n=22, +/- Vater n=11)

T-Test

Männchen: #  $p = 0,031$  +/- Mutter vs +/- Vater (10. Woche)

#### 4.4.2. Blutdruckverlauf

Im Verlauf zeigte sich zum Messzeitpunkt 10. Woche der höchste Blutdruck- Wert bei der Gruppe mit den heterozygoten Müttern signifikant höher als die Gruppe mit den heterozygoten Vätern (Grafik 22). Mit Schwankungen zur zweiten Messung hin nähern sich alle Gruppen zum dritten Messzeitpunkt deutlich einander an. Signifikante Unterschiede sind dann nicht mehr zu verzeichnen (Grafik 22).



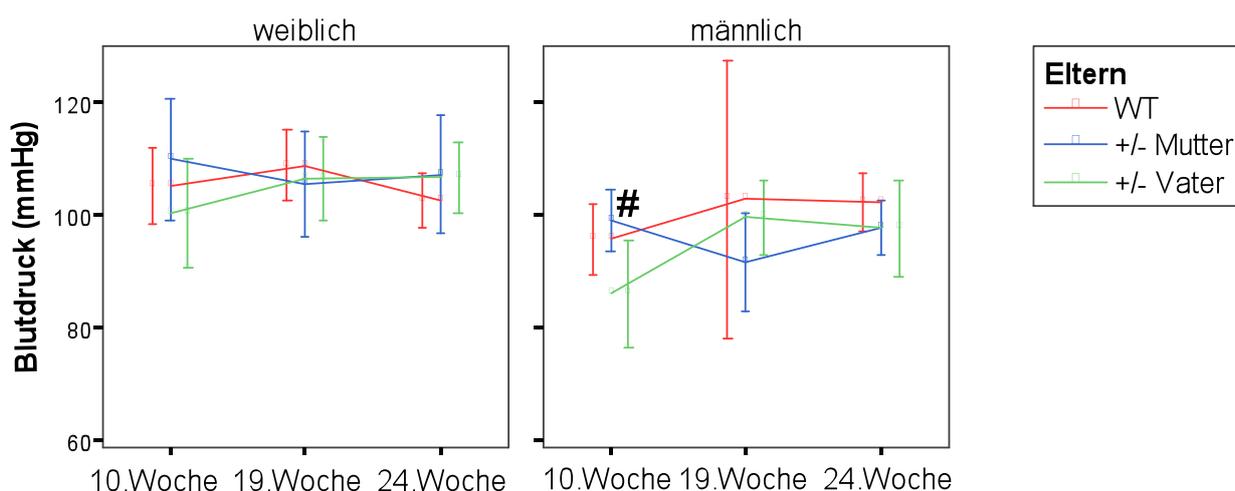
Grafik - 22 Blutdruckverlauf Aufteilung nach Gruppen

Angegebene Werte = Mittelwerte +/- zweifacher Standardfehler

T-Test

#  $p(10. \text{ Woche}) = 0,048$  +/- Mutter vs +/- Vater

Nach der Aufteilung nach Geschlechtern zeigt sich der signifikant höhere Blutdruck der Gruppe mit den heterozygoten Müttern zu der Gruppe mit den heterozygoten Vätern zum Zeitpunkt 10. Woche nur unter den Männchen (Grafik 23). Letztendlich zeigen die Tiere im Verlauf bei beiden Geschlechtern keine signifikanten Unterschiede bezüglich ihrer Blutdruckwerte (Grafik 23).



Grafik - 23 Blutdruckverlauf Aufteilung nach Gruppen und Geschlecht

Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler, T-Test

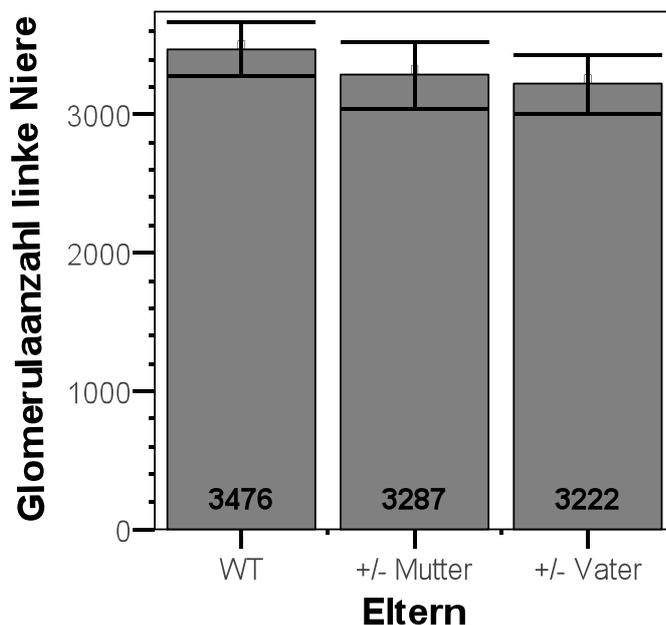
Männchen: #  $p(10. \text{ Woche}) = 0,031$  +/- Mutter vs +/- Vater

## 4.5. Histologische Ergebnisse

### 4.5.1. Glomerulaanzahl und Glomerulaanzahl/Gewicht linke Niere

Bei der gesamten Glomerulaanzahl zeigte sich kein signifikanter Unterschied unter den Gruppen, weder gesamt noch nach Geschlechtern aufgeteilt (Grafik 24). Allerdings fand sich unter den Männchen die Tendenz, dass die Gruppe mit den heterozygoten Müttern eine niedrigerer Anzahl an Glomerula hat, als die mit den Wildtypeltern, siehe Grafik 25. Wenn man die Glomerulaanzahl im Bezug zum Gewicht der linken Niere betrachtet findet sich ein signifikant erniedrigter Wert der Gruppe mit den heterozygoten Müttern im Vergleich zu der mit den Wildtypeltern (Grafik 26). Die Tendenz dazu zeigt sich auch bei der Gruppe mit den heterozygoten Vätern, siehe Grafik 26.

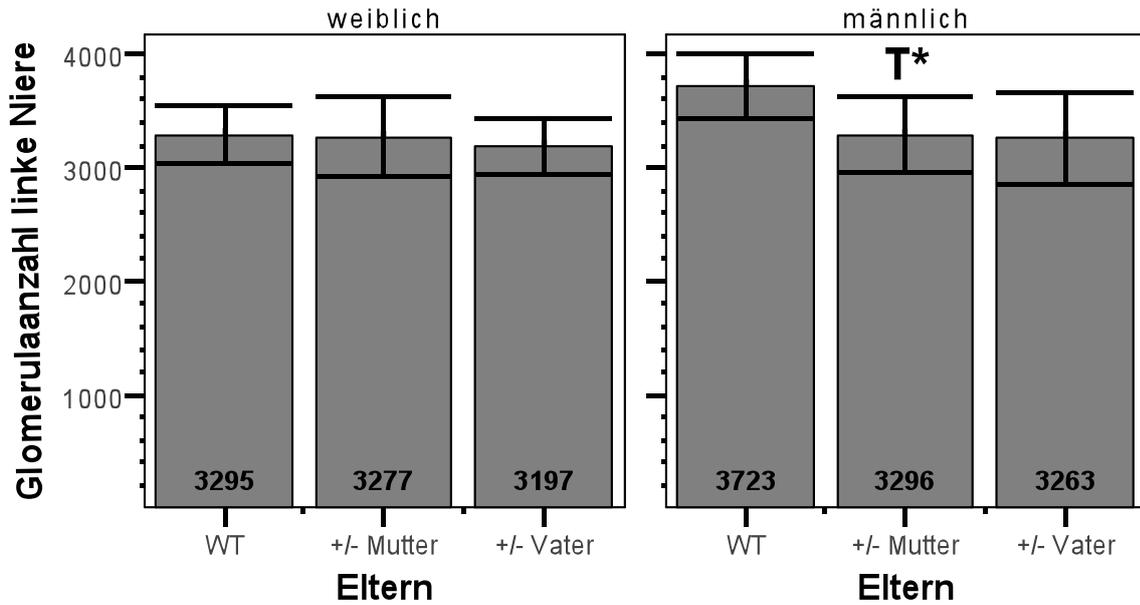
Nach Aufteilung nach Geschlechtern, präsentieren die Weibchen mit einem heterozygoten Vater einen signifikant erniedrigten Wert im Vergleich zu denen mit Wildtypeltern (Grafik 27). Eine Tendenz dazu zeigen auch die Weibchen mit heterozygoten Müttern, siehe Grafik 27. Unter den Männchen fanden sich keine signifikanten Unterschiede oder Tendenzen (Grafik 27).



Grafik - 24 Glomerulaanzahl linke Niere, Aufteilung nach Gruppen

*Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler*

*(WT n=45, +/- Mutter n=35, +/- Vater n=26)*



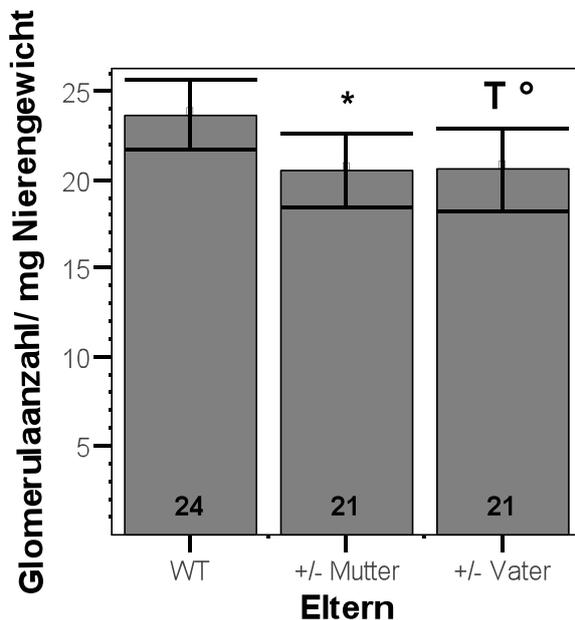
Grafik - 25 Glomerulaanzahl linke Niere, Aufteilung nach Gruppen und Geschlecht

Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler

(weiblich: WT n=26, +/- Mutter n=18, +/- Vater n=16)

(männlich: WT n=19, +/- Mutter n=17, +/- Vater N=10)

T-Test Männchen: T \* p = 0,061 +/- Mutter vs Wildtyp



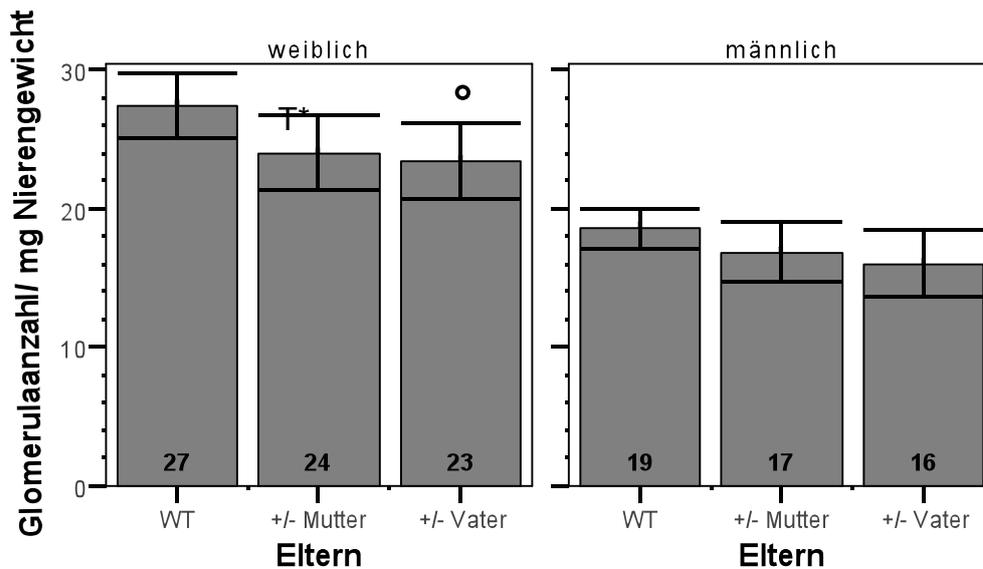
Grafik - 26 Glomerulaanzahl/Gewicht linke Niere, Aufteilung nach Gruppen

Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler

(WT n=45, +/- Mutter n=35, +/- Vater n=26)

T-Test

\* p = 0,033 +/- Mutter vs Wildtyp, T ° p = 0,051 +/- Vater vs Wildtyp



Grafik - 27 Glomerulaanzahl/Gewicht linke Niere, Aufteilung nach Gruppen und Geschlecht

Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler

(weiblich: WT n=26, +/- Mutter n=18, +/- Vater n=16)

(männlich: WT n=19, +/- Mutter n=17, +/- Vater N=10)

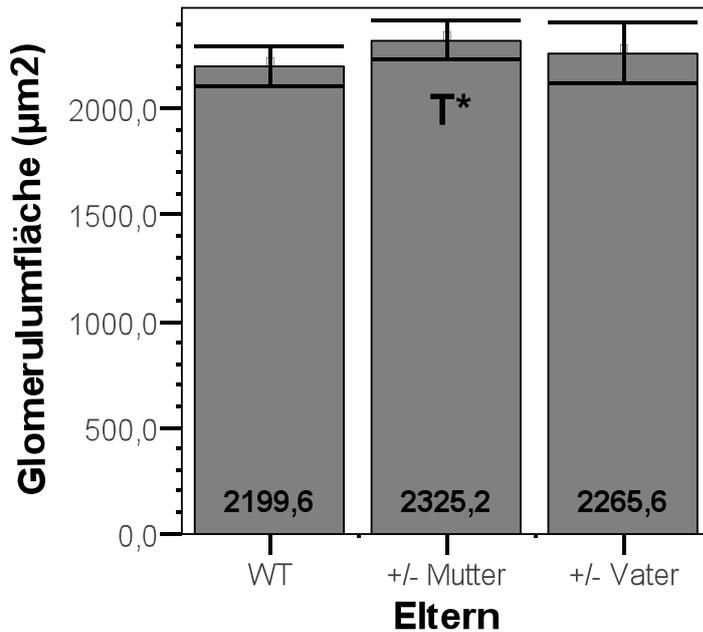
T-Test: Weibchen

°  $p = 0,033$  +/- Vater vs. Wildtyp

T \*  $p = 0,066$  +/- Mutter vs Wildtyp

#### 4.5.2. Glomerulumfläche

Bezüglich der Fläche der Glomerula zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Allerdings fand sich die Tendenz zu einer vergrößerten Glomerulumfläche der Tiere mit heterozygoten Müttern im Vergleich zu denen mit Wildtypeltern (Grafik 28).



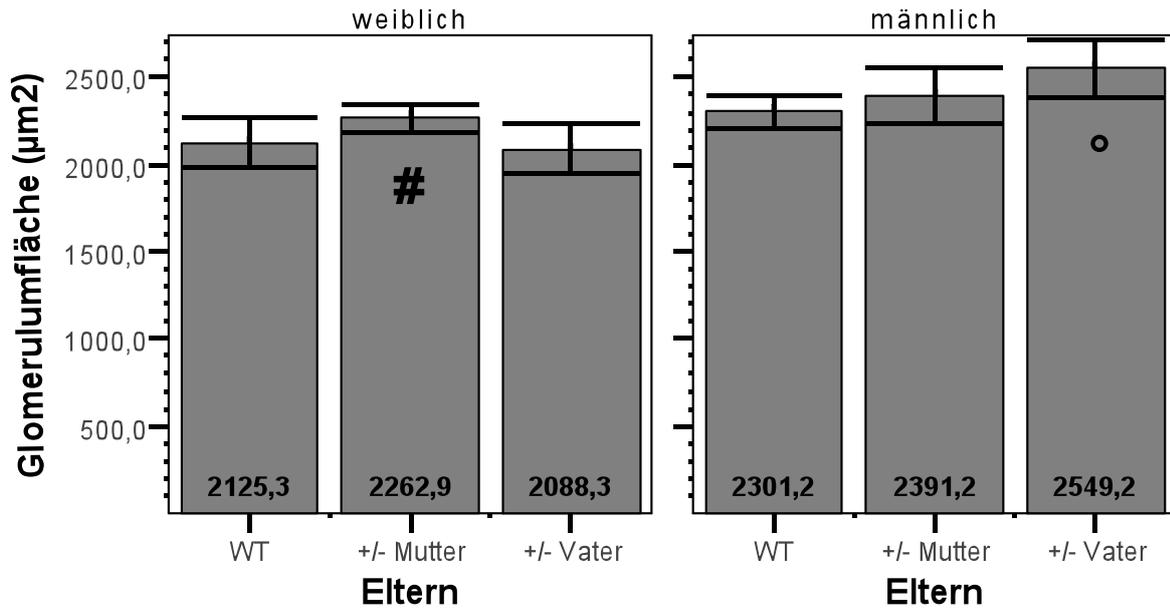
Grafik - 28 Glomerulumfläche, Aufteilung nach Gruppen

*Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler*

*(WT n=45, +/- Mutter n=35, +/- Vater n=26)*

*\* T p = 0,059 +/- Mutter vs Wildtyp*

Nach der Aufteilung in Männchen und Weibchen, zeigten die Weibchen mit heterozygoten Vätern eine signifikant erniedrigte Glomerulumfläche im Vergleich zu denen mit heterozygoten Müttern (Grafik 29). Unter den Männchen zeigten diejenigen mit heterozygoten Vätern eine signifikant erhöhte Glomerulumfläche im Vergleich zu denjenigen mit Wildtypeltern (Grafik 29).



Grafik - 29 Glomerulumfläche, Aufteilung nach Gruppen und Geschlecht

Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler

(weiblich: WT n=26, +/- Mutter n=18, +/- Vater n=16)

(männlich: WT n=19, +/- Mutter n=17, +/- Vater N=10)

T-Test

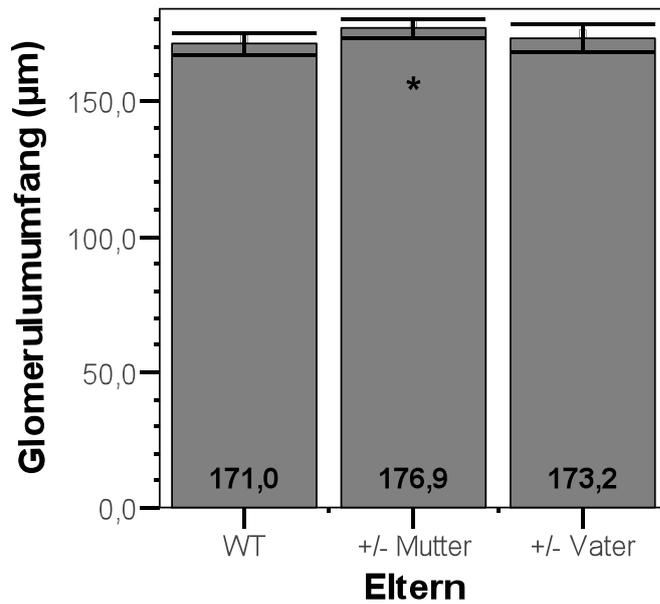
Weibchen : #  $p = 0,041$  +/- Mutter vs. +/- Vater

Männchen: °  $p = 0,019$  +/- Vater vs Wildtyp

#### 4.5.3. Glomerulumumfang

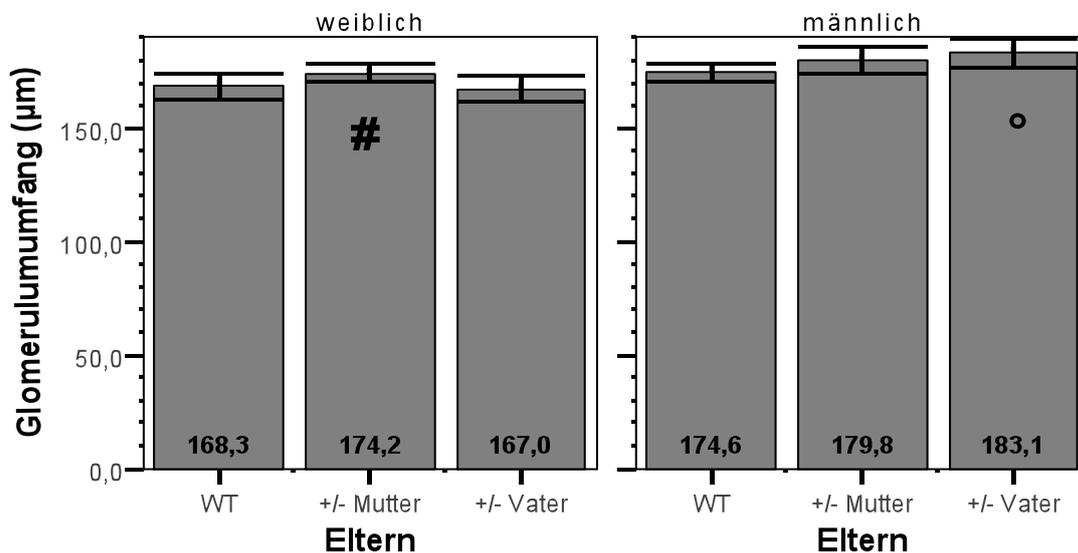
Beim Glomerulumumfang zeigte sich ein signifikant erhöhter Wert der Tiere mit heterozygoten Müttern im Vergleich zu den Wildtypen, siehe Grafik 30.

Die Weibchen mit heterozygoten Müttern zeigten einen signifikant höheren Glomerulumumfang im Vergleich zu denen mit heterozygoten Vätern (Grafik 31). Unter den Männchen zeigten diejenigen mit heterozygoten Vätern einen signifikant erhöhten Glomerulumumfang im Vergleich zu denjenigen mit Wildtypeltern (Grafik 31).



Grafik - 30 Glomerulumumfang, Aufteilung nach Gruppen

Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler, (WT n=45, +/- Mutter n=35, +/- Vater n=26), T-Test\* p = 0,026 +/- Mutter vs Wildtyp



Grafik - 31 Glomerulumumfang, Aufteilung nach Gruppen und Geschlecht

Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler,  
 (weiblich: WT n=26, +/- Mutter n=18, +/- Vater n=16)  
 (männlich: WT n=19, +/- Mutter n=17, +/- Vater N=10)

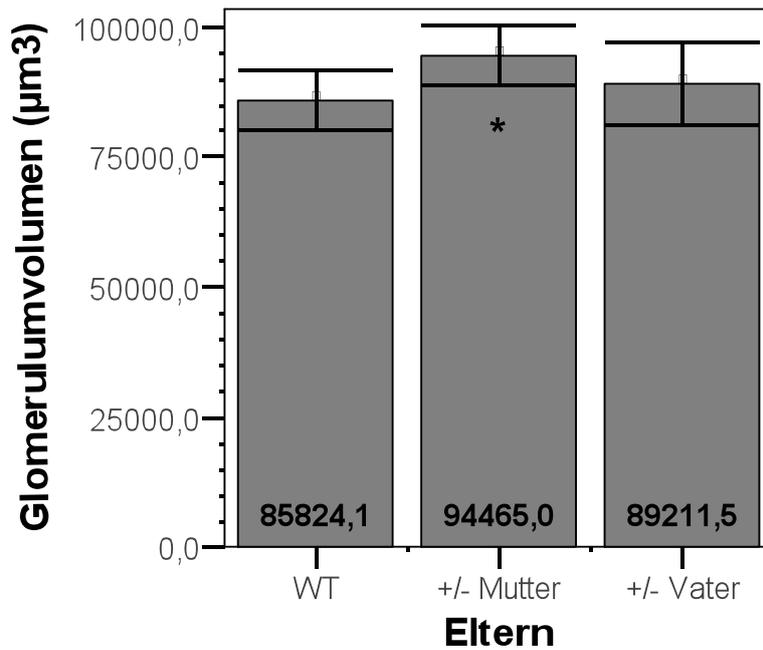
T-Test

Weibchen : #  $p = 0,043$  +/- Mutter vs. +/- Vater

Männchen:°  $p = 0,034$  +/- Vater vs Wildtyp

#### 4.5.4. Glomerulumvolumen

Die Gruppe mit den heterozygoten Müttern zeigte ein signifikant höheres glomeruläres Volumen als die Gruppe mit den Wildtypeltern, siehe Grafik 32.



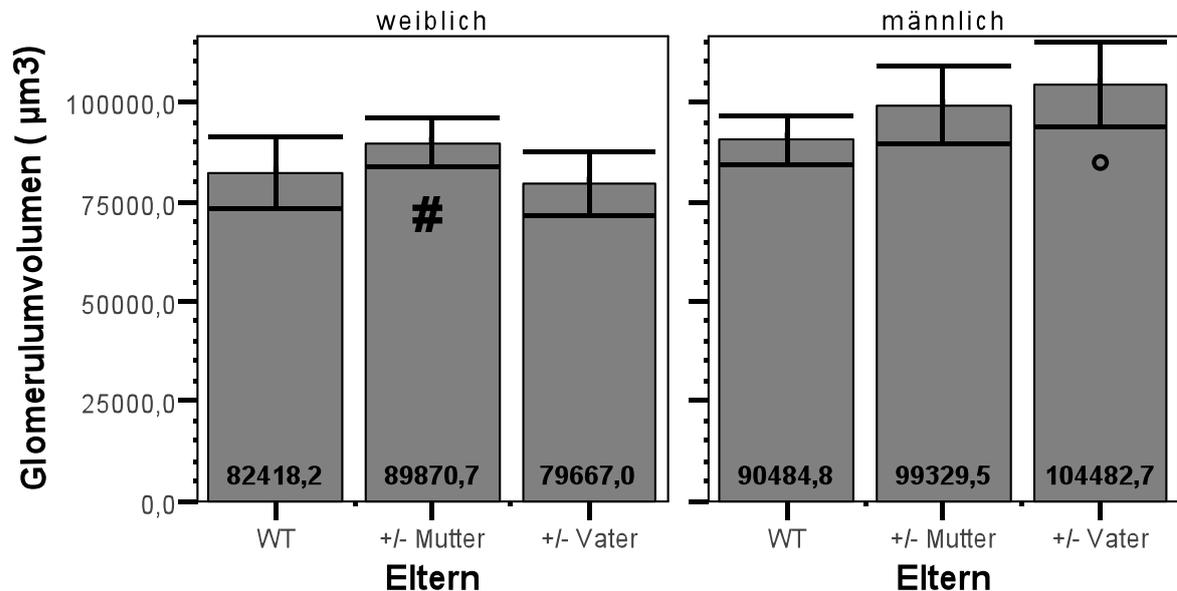
Grafik - 32 Glomerulumvolumen, Aufteilung nach Gruppen

Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler

(WT n=45, +/- Mutter n=35, +/- Vater n=26)

T-Test\*  $p = 0,038$  +/- Mutter vs Wildtyp

Die Weibchen mit den heterozygoten Vätern hatten ein signifikant niedrigeres Glomerulumvolumen als diejenigen mit den heterozygoten Müttern, siehe Grafik 33. Bei den Männchen zeigte sich ein signifikant erhöhtes glomeruläres Volumen bei denjenigen mit den heterozygoten Vätern im Vergleich zu denen mit Wildtypeltern, siehe Grafik 33.



Grafik - 33 Glomerulumvolumen, Aufteilung nach Gruppen und Geschlecht

*Angegebene Werte = Mittelwerte +/- Standardfehler*

*(weiblich: WT n=26, +/- Mutter n=18, +/- Vater n=16)*

*(männlich: WT n=19, +/- Mutter n=17, +/- Vater N=10)*

*T-Test*

*Weibchen :*

*# p = 0,049 +/- Mutter vs. +/- Vater*

*Männchen:*

*° p = 0,038 +/- Vater vs Wildtyp*

## 5. Diskussion

Diese Arbeit sollte tierexperimentell die erweiterte Barker Hypothese überprüfen, sowie klären ob der maternale als auch, ob der paternale heterozygote eNOS Knock-out bei Wildtypnachkommen einen Einfluss auf den renalen Phänotyp hat.

Die Ergebnisse des Experiments werden im Folgenden zusammengefasst:

Das Geburtsgewicht der männlichen Wildtypnachkommen der heterozygoten eNOS Knock-out Mütter war signifikant erniedrigt. Das Gewicht der gesamten Wildtypnachkommen der eNOS Knock-out Mütter war in den ersten Lebenswochen signifikant reduziert.

Ebenso sahen wir Auswirkungen des maternalen heterozygoten eNOS Knock-out auf den renalen Phänotyp der Wildtypnachkommen.

Die Weibchen hierunter hatten signifikant schwerere Nieren, die Nierenfunktion beiderlei Geschlechts blieb in den ersten Wochen hinter den Vergleichstieren zurück (signifikant geringere Kreatininclearance/Körpergewicht bei Stoffwechselfersuch I) und die Tiere hatten signifikant weniger und größere Glomerula.

Es war auch eine Veränderung des Blutdrucks erwartet worden. Dies bestätigte sich nicht, hier konnten keine signifikanten Unterschiede zu den Nachkommen der Wildtyptiere festgestellt werden.

Die anfangs schlechtere Nierenfunktion erholte sich im Verlauf und zeigte zuletzt keinen statistisch signifikanten Unterschied zu den Vergleichstieren.

Durch den paternalen heterozygoten eNOS Knock-out zeigte sich bei den Nachkommen ein etwas anderes phänotypisches Muster. Weder beim Geburtsgewicht noch im weiteren Gewichtsverlauf gab es bei diesen Nachkommen einen signifikanten Unterschied zu den Nachkommen der Wildtypeltern.

Auffällig war aber, dass es bei den weiblichen Nachkommen Auswirkungen auf den renalen Phänotyp gab. So hatten die Weibchen signifikant schwerere Nieren, beim ersten Stoffwechselfersuch eine Tendenz zu geringerer Kreatininclearance und signifikant weniger Glomerula als die Vergleichsgruppe. Alle Nachkommen hatten eine

Tendenz zu einer geringeren Glomerulaanzahl als die Vergleichsgruppe. Die Männchen hatten signifikant größere Glomerula.

Die Nierenfunktion der Weibchen erholte sich ebenso wie bei den Nachkommen des maternalen heterozygoten eNOS Knock-outs. Der Blutdruck wies keine signifikanten Unterschiede auf.

## **5.1. Vergleich der Ergebnisse mit der aktuellen Studienlage**

### 5.1.1. Überprüfung der erweiterten Barker Hypothese

Diese Studie wollte tierexperimentell die erweiterte Barker Hypothese überprüfen, welche sich bislang auf Assoziationsstudien stützte<sup>14, 12, 13</sup>.

Es sollte ein kausaler Zusammenhang zwischen der maternalen Heterozygotie für einen Gendefekt und dem Geburtsgewicht der Wildtyp Nachkommenschaft hergestellt werden. Ohne Beeinflussung der Umweltbedingungen der F1 Generation sollte weiterhin beobachtet werden ob die Entwicklung eines metabolischen Syndroms stattfindet.

Tatsächlich war das Geburtsgewicht der männlichen Wildtypnachkommen der heterozygoten Mütter in dieser Studie niedriger. Die männlichen und weiblichen Tiere hatten nach 18 Tagen ein statistisch signifikant niedrigeres Gewicht über 15 Tage.

Auch tierexperimentelle Studien zur klassischen Barker Hypothese haben den Einfluss eines Umwelteffektes auf die Mütter am reduzierten Gewicht der Nachkommen festgemacht<sup>63-66</sup>. Insofern kann kongruent dazu für diese Studie gelten, dass das hier reduzierte Geburtsgewicht und Gewicht der ersten Lebenswochen als Bestätigung für die erweiterte Barker Hypothese gelten kann. Zu diskutieren ist weiterhin, warum es nicht zu einer statistisch signifikanten Reduktion des Geburtsgewichtes bei allen Tieren kam. Auch Studien zur klassischen Barker Hypothese zeigen unterschiedlich starke Ausprägungen der Gewichtsreduktion z.B. je nach Ausmaß des Umwelteffektes. Ozaki et al. sahen bei signifikant reduziertem Geburtsgewicht bei um 30% reduzierter Kalorienzufuhr für die Muttertiere die fetale Programmierung bestätigt, wobei die Tiere aber am 20. Tag bereits identische Gewichte mit der Kontrollgruppe hatten<sup>65</sup>. Im Gegensatz dazu zeigten die Tiere bei Vickers et al. das signifikant reduzierte Gewicht bis zum 22. Tag. Die Kalorienzufuhr hier wurde sogar um 70% reduziert<sup>66</sup>. Auch unter Proteinmangeldiät für die Muttertiere bei Langley et al. zeigte sich die signifikante Geburtsgewichtsreduktion der Nachkommenschaft erst bei einer Reduktion des Proteinanteils im Futter von 18% auf 6% jedoch noch nicht bei einer Reduktion auf 9%<sup>64</sup>. Eine Hypoxie bzw. Sauerstoffreduktion in der Umgebung der Muttertiere bewirkte

erst nach 11 Tagen Hypoxie eine signifikante Geburtsgewichtsreduktion. Der Versuch wurde mit 3 Stunden Hypoxie begonnen<sup>63</sup>.

Dies zeigt das unterschiedlich starke Umwelteinflüsse zu unterschiedlicher Ausprägung der Gewichtsreduktion führen. Insofern kann auf Grund der nachgewiesenen Gewichtsreduktion geschlossen werden, dass in der vorliegenden Studie eine Programmierung im Sinne der erweiterten Barker-Hypothese stattfindet. Zu vermuten ist aber, dass das Ausmaß der Programmierung in diesem Modell zumindest auf die Wachstumsretardierung geringer ist, als in anderen Modellen zur klassischen Barker Hypothese mit Proteinrestriktion oder hypokalorischer Diät.

Ähnliche Ergebnisse im Rahmen eines eNOS Knock-out Tiermodells bezüglich eines reduzierten Gewichtes zeigten bislang vor allem Studien mit homozygoten eNOS-Knock-out Müttern und Nachkommen<sup>67-69</sup> oder bei direkter Hemmung der eNOS<sup>70-72</sup>. Die Gewichtsreduktion zeigte sich dort ab dem letzten Drittel der Schwangerschaft und in den ersten Lebenswochen<sup>67</sup>. Eine Hemmung der eNOS führt letztendlich zu signifikant erniedrigter NO Konzentration sowohl bei der Mutter als auch beim Fetus<sup>71</sup> was als zentrales Signalmolekül die Entwicklung des Gefäßsystems sowie die Funktion der Plazenta maßgeblich beeinflusst<sup>73</sup>. Hierüber sind eine Anzahl an komplexen Mechanismen beschrieben die in ihrer Gesamtheit zur Wachstumsretardierung führen: Mangelnde Oxygenierung durch verringerte Vaskularisierung der Plazenta, Anämie des Feten<sup>68</sup>, erhöhte Konstriktion der Uterusarterie, verringerter Nährstofftransport, eine erhöhte Menge an freien Radikalen<sup>69</sup>, verringerter Blutfluss innerhalb der Uterusarterie<sup>74</sup> und ein verminderter Umbau der Uterusarterie<sup>75</sup> konnten nachgewiesen werden. Zu diskutieren ist, ob diese Mechanismen die bei homozygoten Tieren zur Wachstumsretardierung führen auch in der vorliegenden Studie als Ursache des verringerten Körpergewichts in Frage kommen. Interessant dafür ist, ob die Effekte durch den elterlichen oder den fetalen Knock-out entstehen. Lediglich wenn der elterliche Knock-out entscheidend ist, wäre es möglich das in der zu diskutierenden Arbeit ähnliche Veränderungen zur Wachstumsretardierung führen, wie in den homozygoten eNOS-Knock-out-Modellen. Kulandavelu et al. verglich diesbezüglich heterozygote eNOS Knock-out Feten von Wildtypmüttern mit heterozygoten Feten von homozygoten eNOS Knock-out Müttern. Zwischen diesen zeigte sich kein signifikanter Gewichtsunterschied woraus sie schlossen, dass nur der fetale Genotyp, aber nicht der maternale Genotyp das Gewicht beeinflusst<sup>68</sup>. Was Kulandavelu et al. aber nicht bedenken ist die Möglichkeit, dass sowohl die paternale als auch die maternale

Homozygotie eine Auswirkung haben könnten und deshalb keinen Unterschied untereinander zeigen. Auch zeigen Studien dass Veränderungen an der Uterusarterie bzw. der Blutfluss der Uterusarterie durch den homozygoten eNOS Knock-out der Mütter beeinflusst werden<sup>74, 75</sup>. In Zusammenschau kann zumindest gesagt werden, dass sowohl der maternale als auch der fetale Genotyp Einfluss auf die folgende Wachstumsretardierung des Feten haben. Insofern wäre eine Kongruenz der Mechanismen die zur Wachstumsretardierung führen zwischen dem homozygoten Tiermodell und der vorliegenden Studie möglich. Voraussetzung dafür wäre aber, dass auch heterozygote eNOS Knock-out Tiere entsprechende Veränderungen aufweisen. So zeigen sie bei Kulandavelu et al. ein signifikant niedrigeres Gewicht als Wildtypiere<sup>68</sup> sowie generelle Gefäßveränderungen (Karotiden, Mesenterialarterien)<sup>76</sup>, welche auch am Uterus oder an der Plazenta eine Rolle spielen könnten.

Es kann somit daraus geschlossen werden, dass zu den homozygoten Tiermodellen kongruente Mechanismen zur Wachstumsretardierung in dieser Studie möglich sind. Sie müssen aber durch Untersuchungen der Plazenta, der Feten und der Uterusarterie überprüft werden.

Bezüglich des metabolischen Syndrom beobachtete diese Studie im weiteren Verlauf Blutdruck, Glukosetoleranz und das Gewicht der Tiere. Die Lipidwerte der Tiere wurden nicht bestimmt. Lediglich der Beginn einer Störung der Glukosetoleranz konnte nachgewiesen werden (*Dissertation Hanna Haumann Ag Hocher*). Dies könnte zumindest ein erster Hinweis auf ein erhöhtes Risiko der Nachkommenschaft für das metabolische Syndrom sein.

Weder bzgl. der Blutdruckwerte noch bzgl. der Endgewichte der Tiere konnten signifikante Unterschiede nachgewiesen werden.

Tierexperimentelle Studien zur klassischen Barkerhypothese zeigen jedoch einen signifikanten Blutdruckanstieg sowohl z.B. bei Kalorienreduktion<sup>77, 65, 66</sup> als auch z.B. bei Proteinrestriktion<sup>78, 79, 64</sup>. Da sich Bluthochdruck oft erst im späteren Lebensalter manifestiert muss die Länge des Beobachtungszeitraums der Studie diskutiert werden. Die RR-Erhöhung zeigte sich in allen genannten Studien erst nach einigen Wochen. In den Modellen mit Ratten nach spätestens 100 Tagen<sup>65, 66</sup> und bei Mäusen nach 10 (Weibchen) und 15 (Männchen) Wochen<sup>79</sup>. In dieser Studie wurde die Blutdruckmessung bis zur 22. – 24. Woche durchgeführt. Ein übersehener Effekt auf Grund eines zu kurzen Beobachtungszeitraums scheint unwahrscheinlich.

Auch das verwendete Tiermodell scheint prinzipiell geeignet zur Programmierung einer Hypertonie: da ein Mangel an NO zu Hypertonie führt<sup>80</sup> zeigen auch Modelle mit einem homozygoten eNOS Knock-out oder die Hemmung der eNOS bei Ratten die Entwicklung einer Hypertonie<sup>81, 82</sup>. Ebenso wies Van Vliet et al. bei heterozygoten eNOS Knock-out Mäusen eine signifikante Blutdruckerhöhung im Vergleich zu Wildtyptieren nach. Allerdings war das Ausmaß der Blutdruckerhöhung deutlich niedriger als bei den homozygoten eNOS Knock-out Mäusen<sup>83</sup>.

Das unterschiedliche Ausmaß der Blutdruckerhöhung bei Van Vliet et al. könnte ein Hinweis sein, dass das Ausmaß der Beeinflussung der Wildtypnachkommenschaft bei heterozygoten Müttern oder Vätern im Vergleich noch geringer ist und die erweiterte Barker Hypothese zu weniger schweren Auswirkungen führt als die klassische Barker Hypothese im vorliegenden Fall.

Dafür spricht auch die fehlende Gewichtszunahme im Alter der F1 Generation dieser Studie. Wobei wenig tierexperimentelle Studien zur klassischen Barker Hypothese das Gewicht der F1 Generation langfristig beobachtet haben. Vickers et al. zeigten ebenso kein erhöhtes Gewicht der F1 Generation im Verlauf, aber eine Blutdruckerhöhung<sup>66</sup>.

Fraglich ist, warum diese Studie zwar im Bezug auf das Geburtsgewicht vergleichbar ist mit Studien zur klassischen Barker Hypothese, aber wenig Effekte im Sinne eines metabolischen Syndroms zeigt.

Dies könnte daran liegen, dass bei Zivilisationserkrankungen weitere Faktoren außer der Programmierung notwendig sind um tatsächlich zu einer Erkrankung zu führen. So konnte Vickers et al. nachweisen, dass die F1 Generation von Müttern (Ratten), welche eine kalorienreduzierte Ernährung während der Schwangerschaft erhalten hatten, bei freier Nahrungsaufnahme deutlich mehr fressen. Dieser Effekt steigerte sich wenn eine hyperkalorische Diät angeboten wurde, sowie mit höherem Alter der Tiere. Die Tiere nahmen außerdem prozentual mehr zu und der Blutdruck stieg prozentual mehr an als bei der Vergleichsgruppe. Als Ursache konnte eine erhöhte Leptin- und Insulinkonzentration nachgewiesen werden<sup>66</sup>. Ebenso zeigten de Boer et al. dass junge Erwachsene mit geringem Geburtsgewicht eine erhöhte Salzsensitivität aufwiesen, im Sinne einer verstärkten Blutdruckerhöhung unter salzreicher Diät<sup>84</sup>. Diese Studien zeigen, dass erst die Kombination aus fetaler Programmierung und Zivilisationsumgebung zur Erkrankung führt.

Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Wildtyp F1 Generation der heterozygoten Elterntiere dieser Studie eine höhere Erkrankungsrate unter

zivilisationsbedingten Risiken (fettreiches übermäßiges Nahrungsangebot, salzreiche Ernährung etc.) hätte, als die Vergleichsgruppe. Hier könnten weitere Studien zur Überprüfung durchgeführt werden. Dies könnte letztendlich zur Klärung beitragen warum manche Individuen unter gleichen zivilisationsbedingten Risiken erkranken und manche nicht.

#### 5.1.2. Hat der maternale heterozygote eNOS-Knock-out Einfluss auf den renalen Phänotyp der Wildtypnachkommen?

Diese Studie zeigte Auswirkungen des maternalen heterozygoten eNOS-Knock-out auf den renalen Phänotyp der Wildtypnachkommen. Bzgl. der Nierenfunktion hatten die Tiere eine erniedrigte Kreatininclearance im ersten Stoffwechselfersuch. Ebenso war die Nierenmorphologie verändert. Die Tiere hatten größere Glomerula in geringerer Anzahl bezogen auf das Nierengewicht. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit tierexperimentellen Studien zur klassischen Barker Hypothese: Mütterliche Natriummangeldiät<sup>85</sup>, Minderperfusion der Uterusarterie<sup>86, 87</sup>, maternale Proteinmangeldiät<sup>86, 88</sup> und natürlich niedriges Geburtsgewicht<sup>87</sup> führten zu verringerter Nierenfunktion<sup>85, 86, 87, 88</sup>, Reduktion der Glomerulaanzahl<sup>86, 87, 88</sup>, Nierenhypertrophie<sup>86</sup> und Blutdruckerhöhung<sup>88</sup>. Durch unterschiedliche Umwelteinflüsse findet eine veränderte Programmierung des renalen Phänotyps statt.

Kongruent dazu bestätigt die vorliegende Studie dass im Rahmen der erweiterten Barker Hypothese ebenso eine veränderte Programmierung des renalen Phänotyps existiert. In dieser Studie konnte allerdings lediglich eine verringerte GFR nach 12 Wochen, jedoch nicht bei den späteren Messungen (18. Woche und 23. Woche) festgestellt werden, im Gegensatz zu der Studie von Xie et al.<sup>88</sup>. Aber auch andere tierexperimentelle Studien fanden ein unterschiedliches Ausmaß bzgl. der eingeschränkten Nierenfunktion. So sahen z.B. Ojeda et al. nach einer klassischen Programmierung über Uterusminderperfusion zunächst keinerlei GFR Veränderung. Dann zeigte sich aber unter milder Ischämie und Reperfusion der Niere ein signifikanter GFR-Abfall bei der programmierten F1 Generation. Ojeda et al. schließen daraus auf ein erhöhtes Risiko der programmierten F1 Generation für ein akutes Nierenversagen<sup>89</sup>. Somit könnte vermutet werden, dass dort wie auch in der vorliegenden Studie eine Programmierung vorliegt, die sich unter Normbedingungen nicht als Erkrankung zeigt, aber das Risiko für bestimmte Krankheiten bei zusätzlichen Faktoren erhöht oder auch die Schwere des Krankheitsverlaufes dann beeinflusst. So zeigten Plank et al. im Rattenmodell einen schwereren Verlauf der mesangioproliferativen Glomerulonephritis

bei durch maternale Proteinmangelernährung programmierten Ratten als bei der Vergleichsgruppe<sup>90</sup>.

Um dies für die erweiterte Barker Hypothese zu klären, könnten fortführende Studien zusätzliche Risikofaktoren für ein akutes Nierenversagen zum Zeitpunkt der wieder normalisierten Kreatininclearance einbringen.

Auffällig ist auch, dass es letztendlich zu einer Kompensation der anfänglich reduzierten Nierenfunktion in unserer Studie kommt. Die reduzierte Nierenfunktion in der 12. Woche deckt sich mit dem Ergebnis der reduzierten Nephronenanzahl. Eine Kompensation einer erniedrigten Glomerulaanzahl über die vergrößerte Oberfläche pro Nephron und über eine kompensatorische Hyperfiltration wird beschrieben<sup>91</sup>. Die erhöhte Kreatininclearance der F1 Generation unserer Studie in der 23. Woche (bei den Weibchen statistisch signifikant) und die vergrößerte Oberfläche pro Nephron sind Hinweise darauf. Allerdings existiert keine Definition einer Hyperfiltration über die Kreatininclearance<sup>92, 93</sup>. Weiteren Aufschluss ob eine pathologisch erhöhte glomeruläre Filtration besteht, könnte die Bestimmung einer Albuminurie in weiterführenden Untersuchungen geben.

In dieser Studie zeigt sich zwar eine reduzierte Nephronenanzahl, diese geht aber nicht mit einer Blutdruckerhöhung einher.

Auf Grund der reduzierten Nephronenzahl und der dadurch bedingten und bereits vermuteten Hyperfiltration<sup>94, 35</sup> lässt sich eine Vorstufe von Bluthochdruck bei der F1 Generation unserer Studie vermuten<sup>92</sup>. Zum Zeitpunkt des Versuchsendes befand sich die F1 Generation bzgl. der Nierenfunktion noch in einer Hyperfiltrationsphase. Es kam noch nicht zur Abnahme der Nierenfunktion. Kongruent dazu kann vermutet werden, dass es somit auch noch nicht zur Hypertonie kam, trotz der verringerten Glomerulaanzahl<sup>85, 93, 88</sup>. Um dies zu überprüfen müsste in zukünftigen Studien ggf. ein verlängertes bzw. an die Nierenfunktion angepasstes Studiendesign gewählt werden, indem erst bei Abnahme der Nierenfunktion im Alter eine weitere Blutdruckmessung stattfindet. Wie bereits in Kapitel 5.1.1. diskutiert, könnte auch hier die Reduktion der Glomerulaanzahl in unserer Studie nicht direkt zur Erkrankung sondern nur zur Erhöhung des Krankheitsrisikos führen<sup>95</sup>.

### 5.1.3. Gibt es einen Einfluss durch den paternalen heterozygoten eNOS-Knock-out ?

In dieser Studie sollte festgestellt werden, ob ein paternaler heterozygoter eNOS Knock-out Einfluss auf die Wildtyp-F1-Generation hat.

Im Sinne der Barker Hypothese müssten sich Unterschiede im Geburtsgewicht und in der Entwicklung eines metabolischen Syndroms ergeben. Dies konnte unsere Studie so nicht zeigen.

Lediglich als Hinweis auf die Entwicklung eines metabolischen Syndroms zeigten die Nachkommen signifikant erhöhte Nüchternblutglukosewerte in Woche 21 (Dissertation Hanna Haumann Ag Hoher), aber keine weiteren Symptome.

Einige Studien berichten, ähnlich zur klassischen Barker Hypothese über paternale Programmierung beim Menschen<sup>96-99</sup>. Fast kongruent zur klassischen Barker Hypothese zeigen Kaati et al eine Korrelation zwischen dem Nahrungsangebot für Väter oder Großeltern der paternalen Linie und dem Risiko an kardiovaskulären Erkrankungen oder Diabetes zu versterben. Sie geben allerdings keine Auskunft über das Geburtsgewicht der Kinder. Interessant ist der Aspekt, dass im Gegensatz zur maternalen Programmierung hier ein Nahrungsmangel bei Vätern das Risiko an kardiovaskulären Erkrankungen vermindert<sup>97</sup>. Dies zeigt, dass paternale Programmierung existiert, aber ggf. andere oder sogar gegensätzliche Auswirkungen hat im Vergleich zur maternalen Programmierung. Unklar ist auch ob zum Nachweis der Programmierung eine Gewichtsveränderung vorliegen muss. So zeigen zwar Chen et al. eine Korrelation zwischen BMI des Vaters und dem Geburtsgewicht der Söhne<sup>96</sup> genauso wie Pembrey et al. eine Korrelation zwischen frühem Nikotinabusus der Väter und dem erhöhten BMI der Söhne (9.Lebensjahr) nachweisen<sup>99</sup>. Im Gegensatz dazu sahen Leon et al. allerdings keine Korrelation zwischen Vater und Kind, allerdings aber eine Korrelation zwischen Mutter und Kind bzgl. des Gewichtes<sup>98</sup>. Man kann daraus schließen, dass die fehlende Gewichtsveränderung in der vorliegenden Studie eine Programmierung über eine paternale Linie nicht ausschließt.

Tierexperimentelle Ergebnisse zeigen die Möglichkeit einer paternalen Programmierung über z.B. Proteinrestriktion<sup>100</sup>, den Nachweis eines transgenerationalen Effektes über die paternale Linie<sup>101</sup>, Nahrungsmangel<sup>102</sup> oder fettreiche Nahrungszufuhr<sup>103</sup>. Diese tierexperimentellen Studien wiesen vor allem immer einen Effekt im Glukosestoffwechsel nach. Dies ist durchaus mit der vorliegenden Studie vergleichbar (Dissertation Hanna Haumann Ag Hoher).

Fraglich ist warum sich keine weiteren Symptome eines metabolischen Syndroms zeigen. Möglich wäre, dass die paternale Programmierung zu anderen Erkrankungen bzw. Veränderungen führt. So zeigten Grasemann et al. dass eine Heterozygotie für das Tiermodell „hypoinsulinemic hyperglycemia in Akita mice“ für die F1-

Wildtypgeneration zwar sowohl über die paternale als auch die maternale Linie Auswirkungen hat, allerdings unterschiedliche. So hatte die F1-Wildtypgeneration von hyperglykämischen Müttern vor allem auffällige metabolische Werte (z.B. Nüchtern-glucose), wohingegen die F1-Wildtypgeneration von hyperglykämischen Vätern vor allem Veränderungen des Skelettsystems zeigten<sup>104</sup>. Die metabolischen Werte bei der paternalen Programmierung waren zwar ebenso auffällig bei Grasmann et al., allerdings in geringerem Ausmaß als bei der maternalen Programmierung<sup>104</sup>. So kann vermutet werden, dass das Ausmaß des paternalen Einflusses für bestimmte Parameter geringer ist, als der maternale Einfluss. Unter Umständen ist in der vorliegenden Studie somit die Auswirkung der paternalen Programmierung auf den Blutdruck noch geringer als die der maternalen. Bleibt, dass ähnlich zum maternalen Einfluss hier ggf. weitere zivilisationsbedingte Risiken fehlen um tatsächlich zur Ausprägung einer Erkrankung zu führen, siehe Kapitel 5.1.1. .

Interessant ist die Beeinflussung des renalen Phänotyps in dieser Studie. Die Nachkommen hatten eine Tendenz zu einer geringeren Glomerulanzahl, unter den Weibchen sogar signifikant. Die weiblichen Nachkommen zeigten ebenso die Tendenz zur verringerten Kreatininclearance im Rahmen des 1. Stoffwechselfersuches.

Hier kann ebenso angeführt werden, dass die Auswirkungen des paternalen Einflusses in diesem Bereich ggf. geringer sind als die maternalen.

Eine vergleichbare paternale Programmierung der Nephronenzahl im Sinne der klassischen Barker-Hypothese findet sich bei Harrison et al. Dort zeigt sich eine verringerte Nephronenzahl nach mütterlicher Proteinmangelernährung sowohl in der F1 wie auch in der F2-Generation und dort sowohl über die maternale als auch die paternale Linie<sup>105</sup>. Bzgl. des Einflusses einer paternalen Programmierung der Nierenfunktion fehlen bislang Studien. Hier könnten Studien zur klassischen Barker Hypothese klären in wie weit die vorliegenden Ergebnisse vergleichbar sind.

Insgesamt zeigt die vorliegende Studie dass ein paternaler Einfluss im Sinne der erweiterten Barker Hypothese vorliegt. Mit weiteren Studien könnte geklärt werden in welchen Bereichen die Auswirkungen größer sind (z.B. Skelettsystem) oder wie sich zusätzliche zivilisationsbedingte Risiken auswirken.

#### 5.1.4. Existieren geschlechtsspezifische Unterschiede ?

Zunächst sollen hier die geschlechtsspezifischen Unterschiede des Einflusses des maternalen Knock-outs auf die Wildtyp-F1-Generation diskutiert werden.

Interessant ist, dass die männlichen Nachkommen ein signifikant erniedrigtes Geburtsgewicht aufweisen und langfristig das geringste Gewicht zeigen, einschließlich eines signifikant erniedrigten Endgewichtes.

Zwar sehen die ersten epidemiologischen Studien keinen Unterschied in der fetalen Programmierung zwischen den Geschlechtern<sup>106</sup> aber mittlerweile kristallisieren sich doch Differenzen in bestimmten Bereichen auch bei humanen Studien heraus. Nach Forsén et al. haben Frauen mit kleiner Körpergröße bei Geburt ein erhöhtes Risiko an einer koronaren Herzkrankheit zu versterben. Wohingegen Männer mit schmalen Körperumfang bei Geburt dieses Risiko teilen<sup>107</sup>. Zu vermuten ist, dass Auswirkungen auf beiderlei Geschlechter existieren; Art, Intensität oder betroffenes Organ bzw. System aber durchaus unterschiedlich sein können. So führte Rauchen in der Schwangerschaft zwar geschlechtsunabhängig zu einem erniedrigten Geburtsgewicht, aber lediglich die männlichen Nachkommen zeigten eine schnelle Gewichtszunahme in der Kindheit<sup>108</sup>. Gerade tierexperimentelle Studien untermauern die geschlechtsabhängigen Auswirkungen der Programmierung, wobei die Effekte je nach Modell sehr unterschiedlich sind. Unterschiedliche Ausprägung der Gewichtsverläufe und des intrauterinen Wachstums werden bislang selten beschrieben. Lediglich Grasemann et al. bemerkten dass die männlichen Nachkommen der Mütter mit Hyperglykämie das niedrigste Geburtsgewicht zeigten<sup>104</sup>, vergleichbar mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.

Zu bemerken ist, dass in der zu diskutierenden Studie auch geschlechtsabhängig keine Unterschiede in den Blutdruckwerten gesehen werden konnten. Im Gegensatz dazu sahen Goyal et al. unter Proteinrestriktion der Mütter die Entwicklung einer schweren Hypertonie unter den Weibchen, im Gegensatz zu einer mäßigen unter den Männchen<sup>79</sup>. Mehrere Studien (Proteinrestriktion oder erhöhte Salzaufnahme bei den schwangeren Muttertieren) beschreiben eine frühere oder deutlichere Entwicklungen von Hypertonie unter Männchen<sup>109, 110, 65, 111, 112</sup>. Zum Teil konnte erst durch verstärkte Proteinrestriktion oder erhöhte Salzaufnahme eine Hypertonieentwicklung unter den Weibchen gezeigt werden<sup>111, 112</sup>.

Insgesamt sind in diesen Studien die Männchen stärker betroffen. Wichtig erscheint, dass selbst unterschiedliche Proteinkonzentration zu verschiedenen Effekten führen können. Interessant ist hierbei, dass im Gegensatz zur Mangelernährung, die anscheinend eher die männlichen Nachkommen betrifft, eine hyperkalorische, fettreiche

Nahrungszufuhr für die Muttertiere nun bei den Weibchen zur Blutdruckerhöhung führt und nicht bei den Männchen<sup>113</sup>.

Bleibt hier die Frage warum sich in dieser Studie keine Blutdruckerhöhung unter den Männchen zeigte, die doch stärker beeinflusst scheinen (niedrigeres Geburtsgewicht). Am wichtigsten bleibt auch hier, dass die mütterliche Heterozygotie wohl zu einer Programmierung führte aber der Effekt nicht groß genug für eine statistisch signifikante Blutdruckerhöhung war. Trotzdem ist davon auszugehen, dass bei entsprechenden zusätzlichen Risiken eine relevante Blutdruckveränderung zu beobachten wäre. Vermutlich würden wir diese vor allem und als erstes unter den männlichen Nachkommen sehen. Ein Hinweis darauf ist, dass die männlichen Nachkommen bezüglich ihres renalen Phänotyps stärker beeinflusst sind. Die Nierenfunktion bei ihnen ist deutlicher reduziert (Stoffwechselfersuch 1: signifikant erniedrigte Kreatininclearance). Ebenso zeigt sich die verringerte Glomerulaanzahl bei den Männchen bereits als absolute Zahl, bei den Weibchen hingegen erst nach Bezug auf das Nierengewicht. Auch andere tierexperimentelle Studien zur fetalen Programmierung zeigten unter männlichen Nachkommen eine stärkere Reduktion der Glomerulaanzahl und nachfolgend eine Hypertonieentwicklung<sup>114, 115, 111</sup>.

Weitere Hinweise, ob es zu einer entsprechenden stärkeren Beeinflussung des renalen Phänotyps, sowie der Entwicklung einer Hypertonie bei der männlichen F1 Generation kam, könnten die noch ausstehenden Daten bzgl. des RAS-Systems liefern (Daten Sarah Hübner Ag Hoher). Das RAS-System zeigt sich entscheidend für die Nephrogenese, letztendlich die Glomerulaanzahl und die Entwicklung der Hypertonie. Auf das RAS System sind geschlechtsspezifische Auswirkungen der Programmierung bekannt<sup>116, 115</sup>, z.B. Veränderungen durch Sexualhormone<sup>109</sup>.

Auch die Wildtyp-F1-Generation mit paternalem Knock-out zeigt geschlechtsspezifische Ergebnisse. Gewicht oder Blutdruckwerte waren zwar nicht auffällig, aber in Bezug auf den renalen Phänotyp sind die Weibchen durch die Programmierung über die paternale Linie stärker betroffen. So hatten lediglich die Weibchen ein signifikant erhöhtes Nierengewicht, eine Tendenz zur erniedrigten Kreatininclearance bei Stoffwechselfersuch I, eine signifikant erhöhte Kreatininclearance bei Stoffwechselfersuch III und eine signifikant erniedrigte Glomerulaanzahl/Nierengewicht. Andere Studien zur klassischen Barker-Hypothese zeigten ebenso, dass die paternale Programmierung geschlechtsabhängige Ergebnisse liefert. Je nach untersuchtem Bereich zeigten sich Männchen oder Weibchen stärker beeinflusst. So sahen

Grasemann et al. praktisch keine Effekte bei den Weibchen hyperglykämischer Väter, wohingegen die männlichen Nachkommen eine Wachstumsretardierung, eine erhöhte Nüchternblutglukose und Skelettveränderungen aufwiesen<sup>104</sup>. Chen et al. demonstrierten eine Korrelation zwischen BMI der Väter und dem Geburtsgewicht, sowie dem Kortisolspiegel der Söhne, jedoch nicht zwischen dem paternalen BMI und dem Geburtsgewicht der Töchter<sup>96</sup>. Auch früher paternaler Nikotinabusus führte lediglich bei den Söhnen zu einem erhöhten BMI in der Kindheit<sup>99</sup>. Eine Nahrungsminderversorgung von Großvätern der paternalen Linie führte lediglich bei den männlichen Nachkommen zu einer erhöhten kardiovaskulären Sterblichkeit. Pembrey et al. schlossen daraus, dass es sich um eine Geschlechtschromosomen abhängige Programmierung handeln könnte<sup>99</sup>. Gegen eine generell Y Chromosom gebundene paternale Programmierung spricht, dass ebenso Auswirkungen auf die weiblichen Nachkommen durch eine paternale Programmierung beschrieben wurden. Weibchen der F1 Generation von Vätern, welche eine hochkalorische Nahrung erhalten hatten, hatten eine geminderte Insulinsekretion, sowie eine geminderte Glukosetoleranz<sup>103</sup>. Die hochkalorische Diät von Muttertieren führte bei Dunn et al. in der F3 Generation lediglich bei den Weibchen und nur über die paternale Linie zu einer erhöhten Körpergröße<sup>101</sup>.

Programmierung über die paternale Linie scheint sich je nach Modell unterschiedlich auf die Geschlechter auszuwirken, sowohl in der Stärke als auch in der Art des Effektes bzw. in der Art des betroffenen Organs oder Systems. Insofern sind die Ergebnisse dieser Studie durchaus vergleichbar mit Studien zur klassischen Barker Hypothese (paternale Linie): sie liefert die Tatsache, dass eine paternale Programmierung stattfand, sowie dass diese sich hauptsächlich auf die weiblichen Nachkommen auswirkt. Um aber genauere Aussagen bzw. Vorhersagen treffen zu können fehlen eine ausreichende Anzahl an Studien, ähnlich zur Studienanzahl zur maternalen Programmierung. Gerade bzgl. Nierenfunktion, -morphologie und Hypertonie fehlen zum Vergleich geschlechterspezifische Ergebnisse zur klassischen Barkerhypothese (paternale Linie).

### **5.2. Limitation der Arbeit: Genese der eruierten Effekte**

Zu erwähnen ist, dass die vorliegende Arbeit ausschließlich das Endresultat des Experiments darstellt. Die Haupteinschränkung liegt darin, dass keine Untersuchung der Genese der Ergebnisse erfolgte.

In der klassischen Barker Hypothese wird das Hauptaugenmerk auf die Wachstumsretardierung gelegt. Diese wird als Ausdruck der Anpassung des Fetus an

seine intrauterine Umwelt gesehen, die vom Nahrungsangebot für die Mutter sowie von der Funktionsfähigkeit der Plazenta abhängt. Dies kann aber keine Erklärung liefern, warum manche Veränderungen über mehrere Generationen bestehen, erst in der F2- oder F3-Generation auftauchen oder auch über den Vater eine fetale Programmierung erfolgen kann<sup>100, 117, 97, 118-120</sup>.

Diese Diskrepanz führte zur Erkenntnis, dass epigenetische Mechanismen die fetale Programmierung verursachen. Den Begriff Epigenetik führte C. H. Waddington ein. Er wollte das Phänomen beschreiben, dass Unterschiede zwischen zwei Zellreihen von einer Stammzelle existieren, die weder durch den genetischen Code noch als phänotypische Variation erklärbar sind<sup>121</sup>. Aktuell bezeichnet die Epigenetik eine Art Zusatzinformation zum genetischen Code, die im Code selbst nicht vorhanden ist<sup>122, 123</sup>. Verschiedenste epigenetische Regulationsmechanismen sind bereits bekannt, welche die Expression von Genen beeinflussen. Hierzu zählen der DNA Methylierungszustand, die Veränderung von Histonen, oder der Einfluss von microRNA (small not coding RNA)<sup>124-126</sup>. Hypermethylierung einer Region kann zur Transkriptionshemmung führen, wohingegen eine Hypomethylierung zur Transkriptionsaktivierung führen kann<sup>127-130</sup>. Ebenso bestimmt der Acetylierungszustand der Histone ob ein Gen stillgelegt oder vermehrt abgelesen wird<sup>131, 132</sup>. Micro-RNA beeinflusst ebenso die DNA Methylierung, aber auch die Gen Expression posttranskriptional<sup>133, 134</sup>. Der Einfluss dieser Mechanismen wird besonders bei dem Phänomen der „imprinted genes“ klar: der Methylierungszustand der Promotorregionen entscheidet ob das paternale oder das maternale Gen abgelesen wird<sup>135, 130</sup>. Auch die Zelldifferenzierung oder die Stilllegung des X Chromosoms scheinen vom Methylierungszustand abzuhängen<sup>127, 136</sup>. Gerade Perikonzeptionell und in der Embryogenese ist die DNA Syntheserate sehr hoch, so dass auch viele Änderungen möglich sind<sup>124</sup>. Außerdem erfolgt eine fast vollständige Demethylierung der maternalen und paternalen DNA während der Befruchtung, mit nachfolgender de novo Methylierung<sup>137, 138</sup>. Ebenso sind mehrere epigenetische Mechanismen zur korrekten Spermatogenese entscheidend<sup>139</sup>. In diesen Bereichen sind Veränderungen durch Umweltbedingungen durchaus denkbar. Zudem konnte bereits nachgewiesen werden, dass die unterschiedliche Zufuhr von Methylgruppen, Vitamin B12 oder Folsäure, welche für die Methylierung benötigt werden, auch zur unterschiedlichen Genexpression mit unterschiedlichen Phänotypen führte<sup>124, 126</sup>. Das entsprechende epigenetische Veränderungen in der fetalen Programmierung greifen, konnte nachgewiesen werden, sowohl human- (Hypomethylierung bzgl. des

ILG2 Genes, bei Erwachsenen, die pränatal dem niederländischem Hunger Winter ausgesetzt waren<sup>140</sup>), als auch tierexperimentell (z.B. Hypomethylierung und Histonmodifikation im Proteinrestriktionsmodell<sup>141, 142</sup>). Ebenso wurden bezüglich der paternalen Programmierung tierexperimentell Veränderungen der DNA Methylierung gezeigt<sup>100</sup>.

Kongruente Veränderungen für die erweiterte Barker Hypothese wären möglich, ob diese vorliegen wurde in der vorliegende Studie nicht untersucht.

Auch für die fetale Programmierung der Hypertonie, sowie der Nierenmorphologie sind generationenübergreifende und paternale Effekte bekannt<sup>105</sup>, so dass hier auch von epigenetischen Regulationsphänomenen auszugehen ist.

Es zeigte sich, dass bei Proteinrestriktionsmodellen mit zur DNA Methylierung notwendigen Aminosäuren die Veränderungen des Blutdruckes besonders ausgeprägt waren<sup>143</sup>. Epigenetische Modifikationen beeinflussen so die Nephrogenese, die Glomerulaanzahl und zuletzt die Entwicklung einer Hypertonie<sup>144</sup>. Die Reduktion der Glomerulaanzahl könnte durch Beeinflussung der Transkription des Wachstumsfaktors GDNF erfolgen<sup>145</sup> oder durch eine erhöhte Apoptoseaktivität<sup>146, 147, 148</sup>. Sowohl ein Modell zur Proteinrestriktion<sup>148</sup> als auch zur Plazentainsuffizienz<sup>147</sup> zeigten Veränderungen der Transkription „Apoptose regulierender Gene“ in der Nephrogenese durch veränderte DNA Methylierung<sup>147, 148</sup>. Auch Veränderungen der Aktivität des RAS beeinflussen die Nephrogenese, sowie die Hypertonieentwicklung<sup>149, 29, 150</sup>. So konnte gezeigt werden, dass sich die ACE mRNA Expression durch den Methylierungszustand bestimmter CpG Inseln, sowie den Acetylierungszustand der dort befindlichen Histone gewebespezifisch verändert<sup>151</sup>.

Ob die geschilderten Effekte auch in dieser Arbeit zur Reduktion der Nephronenzahl geführt haben, muss durch nachfolgende Studien noch geklärt werden.

Um die geschlechtsspezifischen Veränderungen im Rahmen der fetalen Programmierung zu klären, können ebenso epigenetische Mechanismen herangezogen werden. So könnte das Phänomen des Gene Imprinting<sup>135</sup>, oder aber auch eine Vererbung über die Geschlechtschromosomen möglich sein<sup>99</sup>. Zuletzt darf der Einfluss der Sexualhormone gerade auf die Entwicklung einer Hypertonie nicht vernachlässigt werden. So führt Testosteron zur Blutdruckerhöhung, was Versuche mit Kastration<sup>152</sup>/Androgenrezeptorhemmung<sup>153</sup> oder Testosterongabe an ovariectomierten Ratten nachweisen<sup>152, 154</sup>. Interessant ist, dass sich dies besonders bei fetal programmiertem Nachwuchs zeigt<sup>155</sup>. Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass

Testosteron die Angiotensinogen mRNA Expression beeinflusst<sup>156</sup>. Östrogen hingegen scheint eine protektive Wirkung zu haben. So führen Ovariectomie und Menopause zum Blutdruckanstieg<sup>157, 158</sup>. Dies konnte auch bei programmiertem Nachwuchs (Plazentainsuffizienz) gezeigt werden. Entscheidend war hierbei, dass nur die programmierten weiblichen Nachkommen nach Ovariectomie einen signifikanten Blutdruckanstieg hatten, nicht aber die Kontrollgruppe<sup>159</sup>.

Epigenetik scheint geschlechtsabhängig unterschiedlich stattzufinden und außerdem durch Sexualhormone im Effekt moduliert zu werden<sup>109</sup>.

Ob dies auch mögliche Erklärungsansätze für die erweiterte Barker Hypothese sind, müssen nachfolgende Untersuchungen klären.

### **5.3. Diskussion spezieller Methoden**

#### **5.3.1. Züchtung der F1 Generation**

Wie bereits im Methodenteil beschrieben, erfolgte eine Verpaarung von entweder heterozygoten Weibchen mit Wildtypmännchen oder von Wildtypweibchen mit heterozygoten Männchen. Eingeschlossen wurde dann die Wildtyp F1 Generation. Hierbei muss allerdings bemerkt werden, dass auf Grund der kleinen Würfe der Weibchen und der damit zunächst zu geringen Versuchstieranzahl die Verpaarung wiederholt wurde. Somit gibt es bei den eingeschlossenen Tieren bzgl. des Alters der Mutter Unterschiede. So bleibt zu bedenken, dass sich auch Effekte durch das unterschiedliche Alter der Mütter bei der Schwangerschaft ergeben könnten. Verschiedene Studien zeigen beim Menschen ein erniedrigtes Geburtsgewicht bei der Nachkommenschaft von Müttern mit höherem Alter<sup>160, 161</sup>. Allerdings wurde ebenso ein erhöhtes Risiko für Makrosomie beim Feten von Müttern mit höherem Alter beschrieben<sup>162</sup>.

Gallo et al. zeigten auch bei Ratten ein verringertes Geburtsgewicht bei älteren Muttertieren (12 Monate im Vergleich zu 4 Monaten)<sup>163</sup>. Letztendlich scheint eine Beeinflussung des Phänotyps der F1 Generation durch ein höheres Alter der Mütter zumindest möglich. Dies wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Es wurden keine unterschiedlichen Gruppen gebildet. Dies hätte zu sehr niedrigen Fallzahlen geführt, die keine zuverlässigen statistischen Ergebnisse mehr erbracht hätten.

#### **5.3.2. Anzahl und Verteilung der Versuchstiere**

Insgesamt konnten 137 Tiere eingeschlossen werden. Auf Grund der Anzahl konnten mit anderen Studien vergleichbare Ergebnisse produziert werden. Tierexperimentelle Studien zur klassischen Barker Hypothese zeigen ähnliche Zahlen<sup>89, 87</sup>. Allerdings muss

berücksichtigt werden, dass diese 137 Tiere sich auf drei Gruppen aufteilen, welche noch nach Geschlechtern getrennt wurden. Diese Verteilung ist nicht ausgeglichen. So kommen Gruppen mit doch kleinerer Versuchstieranzahl zustande, z.B. lediglich 12 Männchen mit heterozygoten Vätern, im Gegensatz zu Gruppen mit deutlich höherer Tieranzahl (30 Weibchen mit Wildtypeltern). Die Bandbreite zeigt, dass hierdurch auch in der Auswertung Verfälschungen der Ergebnisse zustande kommen können. Schließlich führen zu geringe Fallzahlen dazu, dass einzelne Extremwerte stärker ins Gewicht fallen.

### 5.3.3. Kreatininkonzentrationsbestimmung mittels Jaffé-Methode

Zur Abschätzung der GFR erfolgte die Kreatinin-Clearance Bestimmung. Dafür wurde die Kreatininkonzentration in Urin und Plasma mittels Jaffé-Methode bestimmt. Die Methode gilt als Standardverfahren<sup>164</sup>, auch wenn sie verschiedene Nachteile aufweist. Als weitere Verfahren stehen enzymatische Tests oder die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatografie zur Verfügung. Vorteil der Jaffé-Methode ist, dass sie kostengünstig, schnell und einfach handhabbar ist<sup>164</sup>. Allerdings hat die Jaffé-Methode eine relativ geringe Spezifität, was zur Überschätzung des Kreatininwertes führen kann. Dies liegt daran, dass Interferenzen mit anderen Substanzen auftreten. Dazu gehört Bilirubin<sup>165</sup>, Medikamente wie Acetylsalicylsäure<sup>166</sup>, aber auch Gadolinium-Kontrastmittel<sup>167</sup> und Hämoglobin<sup>168</sup>. Teilweise zeigen aber auch enzymatische Methoden dasselbe Problem<sup>166</sup>. Da aber bei dieser Studie keine Belastung des Materials durch andere Substanzen zu erwarten war, ist keine Überschätzung des Ergebnisses durch die Jaffé-Methode zu befürchten.

Ein weiteres Problem ist, dass die Überschätzung des Kreatininwertes bei höheren Werten zunimmt<sup>168</sup> und eine geringere Sensitivität der Methode bei Werten unter 50µmol/l beschrieben wurde<sup>169</sup>. Da bei dieser Studie weder ein Nierenversagen und damit sehr hohe Kreatininwerte noch besonders niedrige Kreatininwerte (z.B. bei starker Abnahme der Muskelmasse) erwartet wurden, erschien uns die Berücksichtigung dieses Problems als nicht notwendig. Zudem war für diese Studie der Unterschied zwischen den Gruppen, welche alle mittels der gleichen Methode untersucht wurden entscheidend. Die Ermittlung von Extremwerten war nicht zu erwarten.

### 5.3.4. Blutdruckmessung mittels Tail-Cuff-Methode

In dieser Studie wurde zur Blutdruckmessung eine nicht-invasive Tail-Cuff-Methode mit einer oszillometrischen Messung verwendet.

Als Gold-Standard zur Blutdruckmessung müssen aber die invasiven Messmethoden angesehen werden<sup>170, 171</sup>. Deren Nachteil ist die Invasivität und der damit einhergehende technische Aufwand eines operativen Eingriffes mit dessen Komplikationen bis zum Tod des Versuchstieres. Gerade weil in dieser Studie die Tiere mehrerer Blutdruckmessungen, sowie noch weiterer Untersuchungen unterzogen wurden und auch eine bestimmte Zeitspanne überleben sollten, schloss sich eine invasive Blutdruckmessung aus.

Das von uns angewandte Prinzip zeigt eine hohe Reliabilität vergleichbar mit invasiven Messungen<sup>170</sup>. Außerdem verfügt das Prinzip über eine gute Korrelation zu invasiven Methoden<sup>172</sup>. Nachteil der nicht-invasiven Methode ist, dass die Mäuse Zeit brauchen sich an die Messung zu gewöhnen und möglichst mehrere Messungen aufeinanderfolgen durchgeführt werden sollten<sup>170, 172</sup>. Dies wurde bei dieser Studie alles beachtet, siehe Methodenteil. Insofern sind dadurch kaum Fehler in den Messungen zu erwarten. Zuletzt ist diese Methode abhängig von der Genauigkeit und Geduld des Untersuchers. Da sämtliche Messungen durch denselben Untersucher durchgeführt wurden, sind hierdurch keine Unterschiede zwischen den Gruppen zu erwarten.

#### 5.3.5. Bestimmung der Glomerulumgröße

Zur Bestimmung der Glomerulumgröße entnahmen wir eine Stichprobe, in der wir Umfang und Fläche per Hand vermaßen und schlossen auf die Grundgesamtheit.

Zu diskutieren ist, dass andere Studien<sup>173-175</sup> zur Glomerulumgröße sowohl bei menschlichen als auch bei tierischen Nieren stereologische Methoden wie z.B. das Cavalieri Prinzip zur Volumenbestimmung des Glomerulums verwenden<sup>176</sup>.

Insofern können wir unsere Ergebnisse schwer mit anderen Studienergebnissen vergleichen.

Wir bestimmten das Volumen eines Glomerulums anhand der Kugelformel aus der gemessenen Fläche. Hier ist letztendlich zu kritisieren, dass ein Glomerulum nur sehr annäherungsweise als Kugel gelten kann. Außerdem kann das Glomerulum welches vermessen wird an völlig unterschiedlichen Punkten angeschnitten worden sein, so dass auch unterschiedliche Flächen resultieren. Zusätzlich ist das Vermessen per Hand wieder von der Genauigkeit des Untersuchers abhängig. Die erwähnten Punkte könnten alle zu einer Verfälschung des Ergebnisses führen. Daher führten wir mehrere Messungen aufeinanderfolgend durch und bestimmten Durchschnittswerte. Alle Gruppen wurden mit den gleichen Methoden und durch denselben Untersucher bearbeitet. Insofern sind zwar die absoluten Ergebnisse schwer in Relation zu anderen

Studien zu stellen, trotzdem können Unterschiede im Sinne von signifikant größer oder kleiner zwischen den Gruppen festgestellt werden.

### 5.3.6. Ermittlung der Anzahl der Glomerula

Als technisch modernste Methode findet sich die Bestimmung der Glomerulaanzahl mit Hilfe von MRT-Bildern, z.B. bei Rattennieren<sup>177</sup>. Für diese Arbeit konnte dies allerdings nicht verwendet werden, da in angefertigten Probedildern der Mäusenieren keine ausreichende Differenzierung der Glomerula möglich war, bei unzureichender Auflösung des MRT-Bildes.

Somit erfolgte die Entscheidung für eine histologische Methode zur Bestimmung der Glomerulaanzahl. Gerade Methoden zur Bestimmung der Anzahl von Strukturen im Nierengewebe wurden immer wieder diskutiert. Es handelt sich bei diesen Methoden durchgehend um stereologische statistische Hochrechnungsmodelle. Die am häufigsten verwendete und als Goldstandard bezeichnete Methode ist „Fractionator/Dissector“<sup>178, 19, 179</sup>. Bei dieser Methode wird über eine Stichprobe die Gesamtheit der Zahl geschätzt. Man wählt eine dreidimensionale Probe des Gewebes und bestimmt im Fall der Glomerulaanzahl, die Anzahl der Glomerula die zu Beginn der Probe, bzw. im ersten Schnitt noch sichtbar sind und am Ende der Probe nicht mehr sichtbar bzw. verschwunden sind<sup>176</sup>. Um eine größere Genauigkeit zu erhalten, können beliebig viele Stichproben entnommen werden. Wenn das Volumen der dreidimensionalen Probe bekannt ist, kann die Dichte der gezählten Struktur bestimmt werden und wenn das Volumen des ganzen Organs bekannt ist kann die komplette Anzahl der Struktur im Organ geschätzt werden<sup>176</sup>. Mittels dieser Methode kann mit reduziertem Arbeitsaufwand eine annähernd genaue Anzahl der Glomerula bestimmt werden. Problematisch erscheint, dass die Berechnung anhand der Dichte der Strukturen anhand einer Stichprobe impliziert, dass die Strukturen völlig symmetrisch und gleichmäßig im Organ verteilt sind. Davon kann aber nicht generell ausgegangen werden. Die Anzahl der Glomerula in dieser Arbeit wurde orientierend an der Fractionator/Dissector Methode bestimmt. Um aber ein möglichst präzise Aussage über die Anzahl der Glomerula zu erhalten, entschieden wir uns, das Organ komplett aufzuarbeiten, wie im Methodenteil beschrieben. Insofern war es nicht notwendig, bei höherem Arbeitsaufwand, die Anzahl von einer Stichprobe aus zu schätzen.

Es besteht die Möglichkeit, dass wir die Anzahl der Glomerula sowohl unter- als auch überschätzt haben. Glomerula, die genau zwischen zwei Schnitten lagen und einen Durchmesser unter 90µm hatten wurden übersehen. Glomerula, die einen Durchmesser

über 90µm hatten und so lagen, dass sie zweimal angeschnitten wurden, wurden doppelt gezählt. Dieses Problem lag aber bei allen Gruppen gleichermaßen vor. Da es aber Gruppen gab, deren Glomerula signifikant größer waren (Tiere mit heterozygoten Müttern), haben gerade diese Gruppen das Risiko, dass hier die Glomerulaanzahl falsch hoch gezählt wurde. Zuletzt bleibt zu erwähnen, dass die Methode untersucherabhängig ist. Es können je nach Gründlichkeit Zählfehler und Fehler beim Schneiden und Zählen der Paraffinschnitte auftreten. Da aber sämtliche Organe durch denselben Untersucher bearbeitet wurden, sollte sich dieser Fehler auf alle Gruppen verteilen und somit nicht zu signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen führen.

#### **5.4. Konsequenzen der Arbeit für aktuelle Forschungsschwerpunkte**

Diese Studie konnte zeigen, dass eine fetale Programmierung der Wildtyp F1 Generation von heterozygoten eNOS Knock-out Eltern stattfand, ohne dass es zu einer Übertragung des Gens kam. Damit liefert diese Studie erstmalig den tierexperimentellen Nachweis der erweiterten Barker Hypothese. Wie in Kapitel 5.2. bereits erörtert, liefert die Arbeit keinen Aufschluss über die Genese bzw. den Mechanismus der erweiterten Barker Hypothese. Ob zur klassischen Barker Hypothese ähnliche epigenetische Mechanismen vorliegen, sollte durch nachfolgende Studien überprüft werden.

Dies erscheint zudem wichtig, weil unter Umständen über Knock-out Tiermodelle eine spezifischere Untersuchung der einzelnen epigenetischen Mechanismen möglich wäre im Gegensatz zu Tiermodellen mit Umweltveränderungen, welche auch immer sehr viele Veränderungen und Mechanismen gleichzeitig auslösen. Mit genaueren Erkenntnissen der epigenetischen Veränderungen könnte auch zukünftig ein medikamentöses Eingreifen in die Epigenetik bei Zivilisationskrankheiten möglich werden, ähnlich zu bereits in der Testphase befindlichen Medikamenten in der Tumorthherapie<sup>144</sup>.

Zusätzlich konnte in dieser Studie ebenso eine Programmierung über die paternale Linie in der erweiterten Barker Hypothese aufgezeigt werden. Wie die paternale Programmierung hier stattfindet, muss mit weiteren Studien geklärt werden. Auch ist zu vermuten, dass sich paternale Programmierung ggf. auf andere Bereiche auswirkt als die maternale Programmierung<sup>104, 97</sup>, so dass Untersuchungen zu weiteren bislang nicht berücksichtigten Organsystemen (z.B. das Skelettsystem) angeschlossen werden sollten. Insgesamt ist es wichtig sowohl bezüglich der klassischen als auch der erweiterten Barker Hypothese die Väter wesentlich stärker zu berücksichtigen. Epigenetische Veränderungen finden, wie in Kapitel 5.2. diskutiert, ebenso über die

paternale Linie statt<sup>100</sup>. Weitere Erkenntnisse könnten dazu beitragen, den präventivmedizinischen Fokus auch auf den Gesundheitszustand und die Umweltbedingungen des Vaters zu lenken.

Viele Effekte dieser Arbeit zeigen sich geschlechtsabhängig, kongruent zu Ergebnissen der klassischen Barker Hypothese<sup>109</sup>. Über Ursache oder Genese dessen gibt die vorliegende Arbeit allerdings keine Auskunft. Hierzu müssten weitere Studien folgen. Ein besseres Verständnis wann und wie das Geschlecht die fetale Programmierung sowohl im klassischen als auch im erweiterten Sinne beeinflusst, könnte zur verbesserten Einschätzung eines Erkrankungsrisikos dienen.

Es konnte ebenso eine Programmierung der Nierenmorphologie in dieser Studie festgestellt werden. Trotzdem kam es nicht zu einer langfristigen Einschränkung der Nierenfunktion oder zur Hypertonie obwohl bereits eine Hyperfiltration als Zeichen einer veränderten Nierenfunktion vermutet wurde. Hier sind weitere noch ausstehende Untersuchungen, v.a. zum Renin-Angiotensin-Aldosteron-System zum weiteren Verständnis entscheidend. Wichtig ist dies auch, um das Erkrankungsrisiko der Wildtyp F1 Generation beurteilen zu können.

Letztendlich scheint die fetale Programmierung eine Möglichkeit der Evolution zu sein, um Nachkommen schnell an eine bestimmte Umwelt anzupassen. Beeindruckend ist dies, da mithilfe der Epigenetik eine vererbare Anpassung des Phänotypes an die Umwelt innerhalb einer Generation erfolgen kann, wohingegen man zuvor von wesentlich langsameren evolutionären Schritten im Sinne eines „survival of the fittest“ ausging<sup>180, 125, 123</sup>. Problematisch ist dies dann, wenn eine Diskrepanz zwischen postnataler und pränataler Umwelt vorliegt, oder wenn ein elterlicher Gendefekt eine „andere“ pränatale Umwelt vortäuscht. So könnte fetale Programmierung, die nicht zur Umwelt passt, zu Erkrankungen beitragen. Die Zunahme von chronischen Zivilisationserkrankungen in Gesellschaften unter sozioökonomischem Wandel könnte so erklärt werden<sup>181</sup>.

So kann in dieser Arbeit ein erhöhtes Risiko für chronische Erkrankungen, z.B. arterielle Hypertonie oder chronische Niereninsuffizienz, für die Wildtyp F1 Generation vorliegen. Dies lässt die veränderte Nierenmorphologie vermuten. Zum Krankheitsfall kommt es aber wahrscheinlich erst durch weitere Risikofaktoren im Sinne eines „second hit“. Hier müssen noch Studien, welche die Wildtyp F1 Generation einem solchen „second hit“ (z.B. salzreiche Ernährung, fettreiche Ernährung, nephrotoxische Substanzen) aussetzen, angeschlossen werden.

Durch die weitere Erforschung der fetalen Programmierung könnten sich neue Behandlungsmöglichkeiten chronischer Erkrankungen ergeben:

Wichtig wäre durch Studien zu klären inwiefern beim Menschen noch postnatale Plastizität existiert und ob eine Umprogrammierung postnatal, wie bereits in einigen tierexperimentellen Studien nachgewiesen<sup>182, 183</sup>, möglich und letztendlich anwendbar ist.

Präventivmaßnahmen könnten bereits durch Aufklärung perikonzeptionell tragen. Risikogruppen könnten ab der Geburt identifiziert und postnatal individuell präventivmedizinisch betreut werden.

Das zunehmende Verständnis der Mechanismen sowohl der klassischen als auch der erweiterten fetalen Programmierung, vor allem im Hinblick auf individuelle Erkrankungsrisiken bei gleichen Zivilisationsrisiken, könnte zur besseren Bekämpfung vieler chronischer Krankheiten beitragen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Barker DJ, Bagby SP, Hanson MA. Mechanisms of disease: in utero programming in the pathogenesis of hypertension. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006;2:700-7.
2. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 1989;2:577-80.
3. Falkner B. Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic heart disease? . *Br J Prev Soc Med* 1977;31:91-5.
4. Notkola V, Punsar S, Karvonen MJ, Haapakoski J. Socio-economic conditions in childhood and mortality and morbidity caused by coronary heart disease in adulthood in rural Finland. *Soc Sci Med* 1985;21:517-23.
5. Barker DJ. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* 2007;261:412-7.
6. Leon D, Koumpilova I. Birth weight, blood pressure, and hypertension. Epidemiological studies. In: Barker DJP eds *Fetal Origins of Cardiovascular and Lung Disease* New York, USA: Marcel Dekker 2001:23–48.
7. Huxley RR, Shiell AW, Law CM. The role of size at birth and postnatal catch-up growth in determining systolic blood pressure: a systematic review of the literature. *J Hypertens* 2000;18:815-31.
8. Law CM, Shiell AW. Is blood pressure inversely related to birth weight? The strength of evidence from a systematic review of the literature. . *J Hypertens* 1996;14:935–41.
9. Huxley R, Neil A, Collins R. Unravelling the fetal origins hypothesis: is there really an inverse association between birthweight and subsequent blood pressure? *Lancet* 2002;360:659-65.
10. Barker DJ. Birth weight and hypertension. *Hypertension* 2006;48:357-8.
11. Davies AA, Smith GD, May MT, Ben-Shlomo Y. Association between birth weight and blood pressure is robust, amplifies with age, and may be underestimated. *Hypertension* 2006;48:431-6.
12. Hocher B, Slowinski T, Stolze T, Pleschka A, Neumayer HH, Halle H. Association of maternal G protein beta3 subunit 825T allele with low birthweight. *Lancet* 2000;355:1241-2.
13. Siffert W. G protein beta 3 subunit 825T allele, hypertension, obesity, and diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1298-306.
14. Hocher B, Slowinski T, Bauer C, Halle H. The advanced fetal programming hypothesis. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:1298-9.
15. Dunnill MS, Halley W. Some observations on the quantitative anatomy of the kidney. *J Pathol* 1973;110:113–21.
16. Nyengaard JR, Bendtsen TF. Glomerular number and size in relation to age, kidney weight, and body surface in normal man. *Anat Rec* 1992;232:194-01.
17. Hayman JM, Martin JW, Miller M. Renal function and the number of glomeruli in the human kidney. *Arch Intern Med* 1939;64:69–83.
18. Hoy WE, Bertram JF, Denton RD, Zimanyi M, Samuel T, Hughson MD. Nephron number, glomerular volume, renal disease and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008;17:258-65.
19. Keller G, Zimmer G, Mall G, Ritz E, Amann K. Nephron number in patients with primary hypertension. *N Engl J Med* 2003;348:101-8.

20. Hoy WE, Hughson MD, Singh GR, Douglas-Denton R, Bertram JF. Reduced nephron number and glomerulomegaly in Australian Aborigines: a group at high risk for renal disease and hypertension. *Kidney Int* 2006;70:104-10.
21. Hughson MD, Douglas-Denton R, Bertram JF, Hoy WE. Hypertension, glomerular number, and birth weight in African Americans and white subjects in the southeastern United States. *Kidney Int* 2006;69:671-8.
22. Abdi R, Slakey D, Kittur D, Racusen LC. Heterogeneity of glomerular size in normal donor kidneys: impact of race. *Am J Kidney Dis* 1998;32:43-6.
23. Bertram JF, Young RJ, P. K-S. Glomerulomegaly in Australian Aborigines. *Nephrology* 1998;4:S46-S53.
24. Pesce CM, Schmidt C, Fogo A. Glomerular size and the incidence of renal disease in African Americans and Caucasians. *Clin Invest* 1994;7:355-8.
25. Schmidt K, Pesce C, Liu Q. Large glomerular size in Pima Indians: lack of change with diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 1992; 3:229-35.
26. Ingelfinger JR. Disparities in renal endowment: causes and consequences. *Adv Chronic Kidney Dis* 2008;15:107-14.
27. Hughson M, Farris AB, Douglas-Denton R, Hoy WE, Bertram JF. Glomerular number and size in autopsy kidneys: the relationship to birth weight. *Kidney Int* 2003;63:2113-22.
28. Salomon R, Tellier AL, Attie-Bitach T, et al. PAX2 mutations in oligomeganephronia. *Kidney Int* 2001;59:457-62.
29. Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR, Rasch R. Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatr Res* 2001;49:460-7.
30. Lelièvre-Pégorier M, Vilar J, Ferrier ML, et al. Mild vitamin A deficiency leads to inborn nephron deficit in the rat. *Kidney Int* 1998;54:1455-62.
31. Chevalier RL, Thornhill BA, Chang AY. Unilateral ureteral obstruction in neonatal rats leads to renal insufficiency in adulthood. *Kidney Int* 2000;58:1987-95.
32. Puddu M, Fanos V, Podda F, Zaffanello M. The kidney from prenatal to adult life: perinatal programming and reduction of number of nephrons during development. *Am J Nephrol* 2009;30:162-70.
33. Hughson MD. Low birth weight and kidney function: is there a relationship and is it determined by the intrauterine environment? *Am J Kidney Dis* 2007;50:531-4.
34. Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens* 1988;1:335-47.
35. Brenner BM, Lawler EV, Mackenzie HS. The hyperfiltration theory: a paradigm shift in nephrology. *Kidney Int* 1996;49:1774-7.
36. Furchgott RF. Introduction to EDRF research. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;22 Suppl 7:S1-2.
37. Ignarro LJ, Buga GM, Byrns RE, Wood KS, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide possess identical pharmacologic properties as relaxants of bovine arterial and venous smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;246:218-26.
38. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS, Chaudhuri G. Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;244:181-9.
39. Vanhoutte PM. How We Learned to Say NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:1156-60.
40. Moncada S, Palmer RM. Biosynthesis and actions of nitric oxide. *Semin Perinatol* 1991;15:16-9.

41. Moncada S, Palmer RM. Inhibition of the induction of nitric oxide synthase by glucocorticoids: yet another explanation for their anti-inflammatory effects? *Trends Pharmacol Sci* 1991;12:130-1.
42. Mungrue IN, Bredt DS, Stewart DJ, Husain M. From molecules to mammals: what's NOS got to do with it? *Acta Physiol Scand* 2003;179:123-35.
43. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988;333:664-6.
44. Stuehr DJ, Griffith OW. Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1992;65:287-346.
45. Kanai AJ, Pearce LL, Clemens PR, et al. Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:14126-31.
46. Lacza Z, Snipes JA, Zhang J, et al. Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS. *Free Radic Biol Med* 2003;35:1217-28.
47. Oess S, Icking A, Fulton D, Govers R, Muller-Esterl W. Subcellular targeting and trafficking of nitric oxide synthases. *Biochem J* 2006;396:401-9.
48. Cooke JP, Dzau VJ. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med* 1997;48:489-509.
49. Dias-Junior CA, Cau SB, Tanus-Santos JE. [Role of nitric oxide in the control of the pulmonary circulation: physiological, pathophysiological, and therapeutic implications]. *J Bras Pneumol* 2008;34:412-9.
50. Huang PL. Mouse models of nitric oxide synthase deficiency. *J Am Soc Nephrol* 2000;11 Suppl 16:S120-3.
51. Kleinert H, Schwarz PM, Forstermann U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem* 2003;384:1343-64.
52. Radomski MW. Nitric oxide: biological mediator, modulator and effector. *Ann Med* 1995;27:321-9.
53. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991;67:1033-6.
54. Pohl U, Busse R. EDRF increases cyclic GMP in platelets during passage through the coronary vascular bed. *Circ Res* 1989;65:1798-803.
55. Stamler J, Mendelsohn ME, Amarante P, et al. N-acetylcysteine potentiates platelet inhibition by endothelium-derived relaxing factor. *Circ Res* 1989;65:789-95.
56. Norman JE, Thompson AJ, Telfer JF, Young A, Greer IA, Cameron IT. Myometrial constitutive nitric oxide synthase expression is increased during human pregnancy. *Mol Hum Reprod* 1999;5:175-81.
57. Sladek SM, Kanbour-Shakir A, Watkins S, Berghorn KA, Hoffman GE, Roberts JM. Granulated metrial gland cells contain nitric oxide synthases during pregnancy in the rat. *Placenta* 1998;19:55-65.
58. Yallampalli C, Garfield RE. Inhibition of nitric oxide synthesis in rats during pregnancy produces signs similar to those of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:1316-20.
59. Chwalisz K, Winterhager E, Thienel T, Garfield RE. Synergistic role of nitric oxide and progesterone during the establishment of pregnancy in the rat. *Hum Reprod* 1999;14:542-52.
60. Burnett TG, Tash JS, Hunt JS. Investigation of the role of nitric oxide synthase 2 in pregnancy using mutant mice. *Reproduction* 2002;124:49-57.
61. Godecke A, Decking UK, Ding Z, et al. Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circ Res* 1998;82:186-94.

62. Hocher B, Thone-Reineke C, Rohmeiss P, et al. Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension. *J Clin Invest* 1997;99:1380-9.
63. Huang ST, Vo KC, Lyell DJ, et al. Developmental response to hypoxia. *Faseb J* 2004;18:1348-65.
64. Langley SC, Jackson A. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin Sci (Lond)* 1994;86:217-22.
65. Ozaki T, Nishina H, Hanson MA, Poston L. Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring. *J Physiol* 2001;530:141-52.
66. Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;279:E83-7.
67. Hefler LA, Reyes CA, O'Brien WE, Gregg AR. Perinatal development of endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Biol Reprod* 2001;64:666-73.
68. Kulandavelu S, Whiteley KJ, Bainbridge SA, Qu D, Adamson SL. Endothelial NO synthase augments fetoplacental blood flow, placental vascularization, and fetal growth in mice. *Hypertension* 2013;61:259-66.
69. Kusinski LC, Stanley JL, Dilworth MR, et al. eNOS knockout mouse as a model of fetal growth restriction with an impaired uterine artery function and placental transport phenotype. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2012;303:R86-93.
70. Diket AL, Pierce MR, Munshi UK, et al. Nitric oxide inhibition causes intrauterine growth retardation and hind-limb disruptions in rats. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:1243-50.
71. Neerhof MG, Synowiec S, Khan S, Thaete LG. Pathophysiology of chronic nitric oxide synthase inhibition-induced fetal growth restriction in the rat. *Hypertens Pregnancy* 2011;30:28-36.
72. Thaete LG, Kushner DM, Dewey ER, Neerhof MG. Endothelin and the regulation of uteroplacental perfusion in nitric oxide synthase inhibition-induced fetal growth restriction. *Placenta* 2005;26:242-50.
73. Krause BJ, Hanson MA, Casanello P. Role of nitric oxide in placental vascular development and function. *Placenta* 2011;32:797-805.
74. Kulandavelu S, Whiteley KJ, Qu D, Mu J, Bainbridge SA, Adamson SL. Endothelial nitric oxide synthase deficiency reduces uterine blood flow, spiral artery elongation, and placental oxygenation in pregnant mice. *Hypertension* 2012;60:231-8.
75. van der Heijden OW, Essers YP, Fazzi G, Peeters LL, De Mey JG, van Eys GJ. Uterine artery remodeling and reproductive performance are impaired in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Biol Reprod* 2005;72:1161-8.
76. Longo M, Jain V, Vedernikov YP, et al. Fetal origins of adult vascular dysfunction in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R1114-21.
77. Gilbert JS, Lang AL, Grant AR, Nijland MJ. Maternal nutrient restriction in sheep: Hypertension and decreased nephron number in offspring at 9 months of age. *J Physiol* 2005;565:137-47.
78. Brawley L, Poston L, Hanson MA. Mechanisms underlying the programming of small artery dysfunction: review of the model using low protein diet in pregnancy in the rat. *Arch Physiol Biochem* 2003;111:23-35.
79. Goyal R, Longo LD. Maternal protein deprivation: sexually dimorphic programming of hypertension in the mouse. *Hypertens Res* 2013;36:29-35.

80. Hermann M, Flammer A, Luscher TF. Nitric oxide in hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2006;8:17-29.
81. Arnal JF, el Amrani AI, Chatellier G, Menard J, Michel JB. Cardiac weight in hypertension induced by nitric oxide synthase blockade. *Hypertension* 1993;22:380-7.
82. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 1995;377:239-42.
83. Van Vliet BN, Chafe LL. Maternal endothelial nitric oxide synthase genotype influences offspring blood pressure and activity in mice. *Hypertension* 2007;49:556-62.
84. de Boer MP, Ijzerman RG, de Jongh RT, et al. Birth weight relates to salt sensitivity of blood pressure in healthy adults. *Hypertension* 2008;51:928-32.
85. Battista MC, Oligny LL, St-Louis J, Brochu M. Intrauterine growth restriction in rats is associated with hypertension and renal dysfunction in adulthood. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;283:E124-31.
86. Merlet-Benichou C, Gilbert T, Muffat-Joly M, Lelievre-Pegorier M, Leroy B. Intrauterine growth retardation leads to a permanent nephron deficit in the rat. *Pediatr Nephrol* 1994;8:175-80.
87. Schreuder MF, Nyengaard JR, Fodor M, van Wijk JA, Delemarre-van de Waal HA. Glomerular number and function are influenced by spontaneous and induced low birth weight in rats. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:2913-9.
88. Xie Z, Dong Q, Ge J, Chen P, Li W, Hu J. Effect of low birth weight on impaired renal development and function and hypertension in rat model. *Ren Fail* 2012;34:754-9.
89. Ojeda NB. Low birth weight increases susceptibility to renal injury in a rat model of mild ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011;301:F420-6.
90. Plank C, Ostreicher I, Hartner A, et al. Intrauterine growth retardation aggravates the course of acute mesangioproliferative glomerulonephritis in the rat. *Kidney Int* 2006;70:1974-82.
91. Schreuder M, Delemarre-van de Waal H, van Wijk A. Consequences of intrauterine growth restriction for the kidney. *Kidney Blood Press Res* 2006;29:108-25.
92. Palatini P. Glomerular hyperfiltration: a marker of early renal damage in pre-diabetes and pre-hypertension. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:1708-14.
93. Luyckx VA, Brenner BM. Low birth weight, nephron number, and kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2005;97:S68-77.
94. Brenner BM, Chertow GM. Congenital oligonephropathy and the etiology of adult hypertension and progressive renal injury. *Am J Kidney Dis* 1994;23:171-5.
95. Zohdi V, Sutherland MR, Lim K, Gubhaju L, Zimanyi MA, Black MJ. Low Birth Weight due to Intrauterine Growth Restriction and/or Preterm Birth: Effects on Nephron Number and Long-Term Renal Health. In: *Int J Nephrol*; 2012:Epub.
96. Chen YP, Xiao XM, Li J, Reichetzedder C, Wang ZN, Hocher B. Paternal body mass index (BMI) is associated with offspring intrauterine growth in a gender dependent manner. In: *PLoS One*; 2012:e36329.
97. Kaati G, Bygren LO, Edvinsson S. Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. *Eur J Hum Genet* 2002;10:682-8.
98. Leon DA, Koupil I, Mann V, et al. Fetal, developmental, and parental influences on childhood systolic blood pressure in 600 sib pairs: the Uppsala Family study. *Circulation* 2005;112:3478-85.
99. Pembrey ME, Bygren LO, Kaati G, et al. Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. *Eur J Hum Genet* 2006;14:159-66.

100. Carone BR, Fauquier L, Habib N, et al. Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell* 2010;143:1084-96.
101. Dunn GA, Bale TL. Maternal high-fat diet effects on third-generation female body size via the paternal lineage. *Endocrinology* 2011;152:2228-36.
102. Anderson LM, Riffle L, Wilson R, Travlos GS, Lubomirski MS, Alvord WG. Preconceptional fasting of fathers alters serum glucose in offspring of mice. *Nutrition* 2006;22:327-31.
103. Ng SF, Lin RC, Laybutt DR, Barres R, Owens JA, Morris MJ. Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* 2010;467:963-6.
104. Grasemann C, Devlin MJ, Rzeczowska PA, et al. Parental diabetes: the Akita mouse as a model of the effects of maternal and paternal hyperglycemia in wildtype offspring. In: *PLoS One*; 2012:e50210.
105. Harrison M, Langley-Evans SC. Intergenerational programming of impaired nephrogenesis and hypertension in rats following maternal protein restriction during pregnancy. *Br J Nutr* 2009;101:1020-30.
106. Curhan GC, Chertow GM, Willett WC, et al. Birth weight and adult hypertension and obesity in women. *Circulation* 1996;94:1310-5.
107. Forsen T, Eriksson JG, Tuomilehto J, Osmond C, Barker DJ. Growth in utero and during childhood among women who develop coronary heart disease: longitudinal study. *Bmj* 1999;319:1403-7.
108. Suzuki K, Kondo N, Sato M, Tanaka T, Ando D, Yamagata Z. Gender differences in the association between maternal smoking during pregnancy and childhood growth trajectories: multilevel analysis. *Int J Obes (Lond)* 2011;35:53-9.
109. Grigore D, Ojeda NB, Alexander BT. Sex differences in the fetal programming of hypertension. *Gen Med* 2008;5 Suppl A:S121-32.
110. Kwong WY, Wild AE, Roberts P, Willis AC, Fleming TP. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development* 2000;127:4195-202.
111. Woods LL, Ingelfinger JR, Rasch R. Modest maternal protein restriction fails to program adult hypertension in female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;289:R1131-6.
112. Vehaskari VM, Woods LL. Prenatal programming of hypertension: lessons from experimental models. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:2545-56.
113. Khan IY, Taylor PD, Dekou V, et al. Gender-linked hypertension in offspring of lard-fed pregnant rats. *Hypertension* 2003;41:168-75.
114. Gilbert JS, Ford SP, Lang AL, et al. Nutrient restriction impairs nephrogenesis in a gender-specific manner in the ovine fetus. *Pediatr Res* 2007;61:42-7.
115. Moritz KM, Cuffe JS, Wilson LB, et al. Review: Sex specific programming: a critical role for the renal renin-angiotensin system. *Placenta* 2010;31 Suppl:S40-6.
116. Gilbert JS, Nijland MJ. Sex differences in the developmental origins of hypertension and cardiorenal disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;295:R1941-52.
117. Jimenez-Chillaron JC, Isganaitis E, Charalambous M, et al. Intergenerational transmission of glucose intolerance and obesity by in utero undernutrition in mice. *Diabetes* 2009;58:460-8.
118. Li YF, Langholz B, Salam MT, Gilliland FD. Maternal and grandmaternal smoking patterns are associated with early childhood asthma. *Chest* 2005;127:1232-41.

119. Painter RC, Osmond C, Gluckman P, Hanson M, Phillips DI, Roseboom TJ. Transgenerational effects of prenatal exposure to the Dutch famine on neonatal adiposity and health in later life. *Bjog* 2008;115:1243-9.
120. Thamocharan M, Garg M, Oak S, et al. Transgenerational inheritance of the insulin-resistant phenotype in embryo-transferred intrauterine growth-restricted adult female rat offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;292:E1270-9.
121. Waddington CH. The epigenotype. *Int J Epidemiol* 1942;41:10-3.
122. Calkins K, Devaskar SU. Fetal origins of adult disease. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2011;41:158-76.
123. Ubeda F, Wilkins JF. Imprinted genes and human disease: an evolutionary perspective. *Adv Exp Med Biol* 2008;626:101-15.
124. Galjaard S, Devlieger R, Van Assche FA. Fetal growth and developmental programming. *J Perinat Med* 2013;41:101-5.
125. Lillycrop KA. Effect of maternal diet on the epigenome: implications for human metabolic disease. *Proc Nutr Soc* 2011;70:64-72.
126. Zeisel SH. Epigenetic mechanisms for nutrition determinants of later health outcomes. *Am J Clin Nutr* 2009;89:1488S-93S.
127. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002;16:6-21.
128. Jeltsch A. Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *Chembiochem* 2002;3:274-93.
129. Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet* 2000;1:11-9.
130. Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* 2008;9:465-76.
131. Felsenfeld G, Groudine M. Controlling the double helix. *Nature* 2003;421:448-53.
132. Quina AS, Buschbeck M, Di Croce L. Chromatin structure and epigenetics. *Biochem Pharmacol* 2006;72:1563-9.
133. Bayne EH, Allshire RC. RNA-directed transcriptional gene silencing in mammals. *Trends Genet* 2005;21:370-3.
134. Kim DH, Saetrom P, Snove O, Jr., Rossi JJ. MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:16230-5.
135. Li E, Beard C, Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 1993;366:362-5.
136. Waterland RA, Jirtle RL. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol* 2003;23:5293-300.
137. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001;293:1089-93.
138. Reik W, Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2001;2:21-32.
139. Godmann M, Lambrot R, Kimmins S. The dynamic epigenetic program in male germ cells: Its role in spermatogenesis, testis cancer, and its response to the environment. *Microsc Res Tech* 2009;72:603-19.
140. Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, et al. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:17046-9.
141. Burdge GC, Slater-Jefferies J, Torrens C, Phillips ES, Hanson MA, Lillycrop KA. Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. *Br J Nutr* 2007;97:435-9.

142. Lillycrop KA, Phillips ES, Jackson AA, Hanson MA, Burdge GC. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J Nutr* 2005;135:1382-6.
143. McMillen IC, Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* 2005;85:571-633.
144. Liakopoulos V, Georgianos PI, Eleftheriadis T, Sarafidis PA. Epigenetic mechanisms and kidney diseases. *Curr Med Chem* 2011;18:1733-9.
145. Cullen-McEwen LA, Kett MM, Dowling J, Anderson WP, Bertram JF. Nephron number, renal function, and arterial pressure in aged GDNF heterozygous mice. *Hypertension* 2003;41:335-40.
146. Vehaskari VM, Aviles DH, Manning J. Prenatal programming of adult hypertension in the rat. *Kidney Int* 2001;59:238-45.
147. Pham TD, MacLennan NK, Chiu CT, Laksana GS, Hsu JL, Lane RH. Uteroplacental insufficiency increases apoptosis and alters p53 gene methylation in the full-term IUGR rat kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;285:R962-70.
148. Welham SJ, Wade A, Woolf AS. Protein restriction in pregnancy is associated with increased apoptosis of mesenchymal cells at the start of rat metanephrogenesis. *Kidney Int* 2002;61:1231-42.
149. Vehaskari VM, Stewart T, Lafont D, Soyey C, Seth D, Manning J. Kidney angiotensin and angiotensin receptor expression in prenatally programmed hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;287:F262-7.
150. Woods LL, Rasch R. Perinatal ANG II programs adult blood pressure, glomerular number, and renal function in rats. *Am J Physiol* 1998;275:R1593-9.
151. Riviere G, Lienhard D, Andrieu T, Vieau D, Frey BM, Frey FJ. Epigenetic regulation of somatic angiotensin-converting enzyme by DNA methylation and histone acetylation. *Epigenetics* 2011;6:478-89.
152. Reckelhoff JF. Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension* 2001;37:1199-208.
153. Reckelhoff JF, Granger JP. Role of androgens in mediating hypertension and renal injury. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999;26:127-31.
154. Shapiro J, Christiana J, Frishman WH. Testosterone and other anabolic steroids as cardiovascular drugs. *Am J Ther* 1999;6:167-74.
155. Ojeda NB, Grigore D, Yanes LL, et al. Testosterone contributes to marked elevations in mean arterial pressure in adult male intrauterine growth restricted offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;292:R758-63.
156. Chen YF, Naftilan AJ, Oparil S. Androgen-dependent angiotensinogen and renin messenger RNA expression in hypertensive rats. *Hypertension* 1992;19:456-63.
157. Schulman IH, Aranda P, Raji L, Veronesi M, Aranda FJ, Martin R. Surgical menopause increases salt sensitivity of blood pressure. *Hypertension* 2006;47:1168-74.
158. Zandi-Nejad K, Luyckx VA, Brenner BM. Adult hypertension and kidney disease: the role of fetal programming. *Hypertension* 2006;47:502-8.
159. Ojeda NB, Grigore D, Robertson EB, Alexander BT. Estrogen protects against increased blood pressure in postpubertal female growth restricted offspring. *Hypertension* 2007;50:679-85.
160. Khoshnood B, Wall S, Lee KS. Risk of low birth weight associated with advanced maternal age among four ethnic groups in the United States. *Matern Child Health J* 2005;9:3-9.
161. Luque Fernandez MA. Trends in the risk of late fetal mortality, prematurity and low birth weight associated with advanced maternal age in Spain [1996-2005]. *Gac Sanit* 2008;22:396-403.

162. Walsh JM, McAuliffe FM. Prediction and prevention of the macrosomic fetus. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012;162:125-30.
163. Gallo LA, Tran M, Moritz KM, Jefferies AJ, Wlodek ME. Pregnancy in aged rats that were born small: cardiorenal and metabolic adaptations and second-generation fetal growth. *Faseb J* 2012;26:4337-47.
164. Peake M, Whiting M. Measurement of serum creatinine--current status and future goals. *Clin Biochem Rev* 2006;27:173-84.
165. Kuster N, Bargnoux AS, Pageaux GP, Cristol JP. Limitations of compensated Jaffe creatinine assays in cirrhotic patients. *Clin Biochem* 2012;45:320-5.
166. Greenberg N, Roberts WL, Bachmann LM, et al. Specificity characteristics of 7 commercial creatinine measurement procedures by enzymatic and Jaffe method principles. *Clin Chem* 2012;58:391-401.
167. Haylor J, Vickers ME, Morcos SK. Interference of gadolinium-based contrast agents with the measurement of serum creatinine by the Jaffe reaction. *Br J Radiol* 2009;82:438-9.
168. Keppler A, Gretz N, Schmidt R, et al. Plasma creatinine determination in mice and rats: an enzymatic method compares favorably with a high-performance liquid chromatography assay. *Kidney Int* 2007;71:74-8.
169. Benkert A, Micheel B, Schössler W, Warsinke A. Mischen und gleich messen: Creatinin spezifisch und einfach bestimmen mit dem Size Exclusion Redox-labeled Immunoassay. *Methoden Biospektrum* 2008;7:31-3.
170. Johns C, Gavras I, Handy DE, Salomao A, Gavras H. Models of experimental hypertension in mice. *Hypertension* 1996;28:1064-9.
171. Mills PA, Huetteman DA, Brockway BP, et al. A new method for measurement of blood pressure, heart rate, and activity in the mouse by radiotelemetry. *J Appl Physiol* 2000;88:1537-44.
172. Krege JH, Hodgin JB, Haganan JR, Smithies O. A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. *Hypertension* 1995;25:1111-5.
173. Altunkaynak ME, Ozbek E, Altunkaynak BZ, Can I, Unal D, Unal B. The effects of high-fat diet on the renal structure and morphometric parametric of kidneys in rats. *J Anat* 2008;212:845-52.
174. McNamara BJ, Diouf B, Hughson MD, Hoy WE, Bertram JF. Associations between age, body size and nephron number with individual glomerular volumes in urban West African males. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:1500-6.
175. Puelles VG, Zimanyi MA, Samuel T, et al. Estimating individual glomerular volume in the human kidney: clinical perspectives. *Nephrol Dial Transplant* 2008;27:1880-8.
176. Nyengaard JR. Stereologic methods and their application in kidney research. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1100-23.
177. Beeman SC, Zhang M, Gubhaju L, et al. Measuring glomerular number and size in perfused kidneys using MRI. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011;300:F1454-7.
178. Cullen-McEwen LA, Douglas-Denton RN, Bertram JF. Estimating total nephron number in the adult kidney using the physical disector/fractionator combination. *Methods Mol Biol* 2012;886:333-50.
179. Zhong J, Perrien DS, Yang HC, et al. Maturation regression of glomeruli determines the nephron population in normal mice. *Pediatr Res* 2012;72:241-8.
180. Gluckman PD, Hanson MA. Developmental origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective. *Pediatr Res* 2004;56:311-7.
181. Gluckman PD, Hanson MA. Developmental plasticity and human disease: research directions. *J Intern Med* 2007;261:461-71.

182. Burdge GC, Lillycrop KA, Phillips ES, Slater-Jefferies JL, Jackson AA, Hanson MA. Folic acid supplementation during the juvenile-pubertal period in rats modifies the phenotype and epigenotype induced by prenatal nutrition. *J Nutr* 2009;139:1054-60.
183. Vickers MH, Gluckman PD, Coveny AH, et al. Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology* 2005;146:4211-6.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

%	= Prozent
+/-	= Heterozygotie
27 G	= 27 Gauge = Kanülengröße
ACE	= Angiotensin Converting Enzyme
ADP	= Adenosindiphosphat
Ag	= Arbeitsgruppe
APES	= Aminopropyltriethoxy-Silane
ATP	= Adenosintriphosphat
BMI	= Body Mass Index
bp	= Basenpaar
Bzgl.	= Bezüglich
C	= Konzentration
cGMP	= Zyklisches Guanosinmonophosphat
cm	= Zentimeter
cm <sup>2</sup>	= Quadratzentimeter
CpG	= Cytosin-phosphatidyl-Guanin
DNA	= Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	= Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDRF	= Endothelium-derived relaxing factor
EDTA	= Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	= endotheliale NO-Synthetase
et al.	= und andere
F1	= Nachkommen 1. Generation
F2	= Nachkommen 2. Generation
F3	= Nachkommen 3. Generation
g	= Gramm
g/l	= Gramm pro Liter
GFR	= Glomeruläre Filtrationsrate
GNB	= Guanine nucleotide-binding
HCL	= Hydrochlorid
HE	= Hämatoxylin-Eosin

iNOS	=	Induzierbare NO-Synthetase
KCL	=	Kaliumchlorid
Kg	=	Kilogramm
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	=	Kaliumdihydrogenphosphat
M	=	Mol
mA	=	Milliamper
mg	=	Milligramm
mg/dl	=	Milligramm pro Deziliter
mg/ml	=	Milligramm pro Milliliter
MgCl <sub>2</sub>	=	Magnesiumchlorid
min	=	Minute
ml	=	Milliliter
ml/24h	=	Milliliter pro 24 Stunden
ml/min	=	Milliliter pro Minute
mM	=	Millimol
mmHg	=	Millimeter Quecksilbersäule
mmol/l	=	Millimol pro Liter
mRNA	=	Messenger Ribonukleinsäure
N	=	Probengröße
Na	=	Natrium
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	=	Dinatriumhydrogenphosphat
NADP	=	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	=	Natronlauge
NeoR	=	Neomycin Resistance
Nmol/l	=	Nanomol pro Liter
nNOS	=	Neuronale NO-Synthetase
NO	=	Stickstoffmonoxid
PBS - Puffer	=	phosphate buffered saline
PCR	=	Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	=	pondus Hydrogenium
RAS System	=	Renin Angiotensin Aldosteron System
RNA	=	Ribonukleinsäure
sek	=	Sekunde

Taq	=	Thermus aquaticus
TBE	=	Tris-Borat-EDTA
TE	=	Tris-EDTA
Tris	=	Tri-hydroxymethyl-amino-methan
Upm	=	Umdrehungen pro Minute
UV-Licht	=	Ultraviolettes Licht
V	=	Volt
V	=	Volumen
w/v	=	Massenprozent / Volumen
WT	=	Wildtyp
z.B.	=	Zum Beispiel
$\mu\text{g/ml}$	=	Mikrogramm pro Milliliter
$\mu\text{l}$	=	Mikroliter
$\mu\text{m}$	=	Mikrometer
$\mu\text{m}^2$	=	Quadratmikrometer
$\mu\text{m}^3$	=	Kubikmikrometer

## 8. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b>	Vergleich Barker-Hypothese und erweiterte Barker-Hypothese nach Hoher B, Slowinski T, Bauer C, Halle H, Siffert W. The advanced fetal programming hypothesis. Nephrol Dial Transplant 2001;16:1298-9.	Seite 10
<b>Abbildung 2</b>	Zählung der Glomerula	Seite 26

## 9. Anhang

### 9.1. Eidesstattliche Versicherung

#### Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Anna Endres, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Fetale Programmierung der Nephronenzahl und Glomerulumgröße im endothelialen NO-Synthetase (eNOS) Knock-out Tiermodell“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

**9.2. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



### **9.3. Danksagung**

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. B. Hocher bedanken. Durch ihn hatte ich die Möglichkeit zu einem spannenden Thema diese Dissertation zu verfassen. Auch möchte ich mich bedanken für den komplikationslosen Betreuungs-Wechsel auf Grund des Wechsels von Prof. Dr. B. Hocher an die Universität Potsdam. Hier gilt mein Dank PD Dr. med Thimo Pfab, der mich nahtlos weiter betreute und bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützte.

Desweiteren möchte ich mich für gute Zusammenarbeit und zahlreiche Hilfestellungen bei der gesamten Laborarbeitsgruppe bedanken, vor allem bei PD Dr. med Philipp Kalk, Katharina Krause-Relle, Karoline von Websky, Susi Heiden und Yulija Sharkovska.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meinen Eltern, meiner Schwester Eva und meinem Mann Markus, die mir über viele Abgründe hinweg halfen und jede meiner Entscheidungen unterstützten.