

Aus dem Center for Cardiovascular Research (CCR)
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung des Einflusses einer parentalen Hochsalzdiät auf
das renale Renin-Angiotensin-Aldosteron-System der
Nachkommen erster Generation am Modell der Ratte

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Teresa Maria Augustina Johanna Ritter
aus Oelde

Datum der Promotion: 04.03.2022

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	7
TABELLENVERZEICHNIS	8
1. ZUSAMMENFASSUNG	9
<hr/>	
1.1 DEUTSCH	9
1.2 ENGLISH	11
2. EINLEITUNG	12
<hr/>	
2.1 LITERATURÜBERSICHT	12
2.1.1 MODELLE FETALER PROGRAMMIERUNG	12
2.1.2 MECHANISMEN FETALER PROGRAMMIERUNG	14
2.1.3 PATERNALE PROGRAMMIERUNG	16
2.1.4 ALIMENTÄRE PROGRAMMIERUNG UND KRANKHEITSENTSTEHUNG	17
2.1.5 HOCHSALZDIÄT UND BEEINFLUSSUNG DES BLUTDRUCKS	19
2.1.6 RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERON-SYSTEM	21
2.1.7 HOCHSALZDIÄT UND PROGRAMMIERTE VERÄNDERUNGEN DES RAAS	23
2.2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	24
3. MATERIAL	26
<hr/>	
3.1 VERWENDETE GERÄTE	26
3.2 VERWENDETE CHEMIKALIEN	27
3.3 VERWENDETE LÖSUNGEN	28
3.4 VERWENDETE ANTIKÖRPER	30
3.5 SOFTWARE	31
4. METHODEN	32
<hr/>	
4.1 TIERVERSUCH	32
4.1.1 HINTERGRUND UND VERSUCHSZWECK	32
4.1.2 VERSUCHSDIÄTEN	32
4.1.3 TIERHALTUNG	33
4.1.4 ZÜCHTUNG DER VERSUCHSTIERE	34

4.1.5 MESSUNG VON KÖRPERGEWICHT	36
4.1.6 BLUTDRUCKMESSUNG	36
4.1.7 FINALISIERUNG DER VERSUCHSTIERE	37
4.2 WESTERN BLOT	37
4.2.1 HERSTELLUNG VON GEWEBEHOMOGENATEN	38
4.2.2 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	38
4.2.3 PROTEINTRANSFER DURCH WESTERN-BLOT	39
4.2.4 PROTEINDETEKTION MIT SPEZIFISCHEN ANTIKÖRPERN	40
4.2.5 AUSWERTUNG	41
4.2.6 STATISTIK	43
5. ERGEBNISSE	44
<hr/>	
5.1 HÄMODYNAMIK	44
5.1.1 BLUTDRUCK	44
5.2 GEWICHTE	47
5.2.1 GEBURTSGEWICHT	47
5.2.2 GEWICHTSVERLAUF	48
5.2.3 FINALGEWICHT	51
5.2.4 ABSOLUTES NIERENGEWICHT	52
5.2.5 RELATIVES NIERENGEWICHT	53
5.3 WESTERN BLOT	56
5.3.1 ANGIOTENSIN-II-REZEPTOR-TYP-1 (AT ₁ -REZEPTOR)	56
5.3.2 ANGIOTENSIN-II-REZEPTOR-TYP-2 (AT ₂ -REZEPTOR)	58
5.3.3 MINERALOKORTIKOID-REZEPTOR (MCR)	59
5.3.4 RENIN	60
6. DISKUSSION	62
<hr/>	
6.1 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	62
6.2 PROGRAMMIERUNG DER HÄMODYNAMIK	63
6.2.1 BLUTDRUCK	63
6.3 PROGRAMMIERUNG DER GEWICHTE	66
6.3.1 KÖRPERGEWICHT	66
6.3.2 NIERENGEWICHT	68
6.4 PROGRAMMIERUNG DES RENALEN RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERON-SYSTEMS	70

6.4.2 ANGIOTENSIN-II-REZEPTOR-TYP-1 (AT ₁ -REZEPTOR)	70
6.4.3 ANGIOTENSIN-II-REZEPTOR-TYP-2 (AT ₂ -REZEPTOR)	71
6.4.4 MINERALOKORTIKOID-REZEPTOR (MCR)	72
6.4.5 RENIN	73
6.5 GESCHLECHTSSPEZIFISCHE UNTERSCHIEDE DER FETALEN PROGRAMMIERUNG	74
6.6 EINFLUSS DER PATERNALEN PROGRAMMIERUNG	76
6.7 LIMITATIONEN DER ARBEIT	78
7. AUSBLICK UND FAZIT	80
<hr/>	
8. ANHANG	82
<hr/>	
8.1 LITERATURVERZEICHNIS	82
8.2 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	92
8.3 ANTEILSERKLÄRUNG	93
8.4 PUBLIKATIONSLISTE	94
8.5 LEBENSLAUF	95
8.6 DANKSAGUNG	97

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
ADH	Antidiuretischen Hormons
ANG I	Angiotensin I
ANG II	Angiotensin II
ANOVA	Analysis of variance
AT₁	Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-1
AT₂	Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-2
bpm	beats per minute
BSA	Bovine serum albumin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOHaD	Developmental Origins of Health and Disease
dpi	Dots per inch
ECL	Enhanced chemiluminescence
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
et al.	Und andere
F0	Parentalgeneration
F1	Erste Filialgeneration
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Horseradish peroxidase
HS	Hochsalzdiät
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
LGA	large for gestational age
MCR	Mineralokortikoid-Rezeptor
MQ-H₂O	Milli-Q Purification System aufbereitetes Wasser
NaCl	Natriumchlorid
NaN₃	Natriumazid
NO	Stickstoffmonoxid

PAA	Polyacryl acid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standarddiät
SDA	Natriumdiacetat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standard error of the mean / Standardfehler
TBS-T	Tris buffered Saline–Tween
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Kreuzungsschema der Versuchstiere	S. 36
Abb. 2:	Schema der Proteindetektion	S. 41
Abb. 3:	Beispielbild belichteter, entwickelter und eingescannter Fotos der zu bestimmenden Proteinbanden	S. 42
Abb. 4:	Mittlerer systolischer Blutdruck der Versuchstiere	S. 45
Abb. 5:	Mittlerer systolischer Blutdruck aller Versuchstiere aufgeteilt nach Versuchsdiäten	S. 46
Abb. 6:	Geburtsgewichte der Versuchstiere	S. 47
Abb. 7:	Gewichtsverlauf der Versuchstiere von Tag 1 – 35	S. 48
Abb. 8:	Gewichtsverlauf der Versuchstiere von Woche 1 – 24	S. 50
Abb. 9:	Mittleres Finalgewicht der Versuchstiere	S. 51
Abb.10:	Mittleres absolutes Nierengewicht der Versuchstiere	S. 52
Abb. 11:	Mittleres relatives Nierengewicht der Versuchstiere	S. 53
Abb. 12:	Mittleres relatives Nierengewicht der Versuchstiere aufgeteilt nach Geschlecht und Versuchsdiäten	S. 55
Abb. 13:	Mittlere relative Expression des Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-1	S. 57
Abb. 14:	Mittlere relative Expression des Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-2	S. 58
Abb. 15:	Mittlere relative Expression des Mineralokortikoid-Rezeptors	S. 60
Abb. 16:	Mittlere relative Expression des renalem Renin	S. 61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Liste aller verwendeter Geräte	S. 26
Tabelle 2:	Liste aller verwendeter Chemikalien	S. 27
Tabelle 3:	Liste aller verwendeter Antikörper	S. 30
Tabelle 4:	Liste aller verwendeter Programme	S. 31
Tabelle 5:	Überblick über die verwendeten Versuchsdäten	S. 33
Tabelle 6:	Fütterungs- und Verpaarungsschema der F0-Generation	S. 34
Tabelle 7:	Fütterungs- und Verpaarungsschema der F1-Generation	S. 35
Tabelle 8:	Mittleres absolutes Nierengewicht der weiblichen Versuchstiere aufgeteilt nach Versuchsgruppen	S. 52
Tabelle 9:	Mittleres absolutes Nierengewicht der männlichen Versuchstiere aufgeteilt nach Versuchsgruppen	S. 53
Tabelle 10:	Mittleres relatives Nierengewicht der weiblichen Versuchstiere aufgeteilt nach Versuchsgruppen	S. 54
Tabelle 11:	Mittleres relatives Nierengewicht der männlichen Versuchstiere aufgeteilt nach Versuchsgruppen	S. 54
Tabelle 12:	Zusammenfassung der programmierenden Effekte auf die untersuchten Parameter	S. 62

1. ZUSAMMENFASSUNG

1.1 Deutsch

Einleitung Fetale Programmierung beschreibt die Beeinflussbarkeit des genetischen Materials der Eltern sowie der intrauterinen Entwicklung der Nachkommen durch verschiedene Umweltfaktoren. Als eine der ersten Arbeiten zu dem Thema stellte die Barker Hypothese einen Zusammenhang zwischen Mangelernährung während der Embryogenese und daraus resultierend niedrigem Geburtsgewicht und dem späteren Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen her. Je nach Zeitpunkt der Beeinflussung können diese Programmierungen lebenslange Auswirkungen hervorrufen. Ernährung nimmt in diesem Zusammenhang eine besondere Stellung ein. Tierstudien, welche sich mit Diät-assoziierten Einflüssen auf die Entwicklung, insbesondere mit Fehlernährung *in utero* befassen, zeigen beim Nachwuchs programmierbare strukturelle Veränderungen von Organen zentraler Bedeutung. Als molekulargenetisches Äquivalent nimmt man eine Vielzahl epigenetischer Modifikationen an. Aktuell wird der Einfluss von salzreicher Nahrung im Zusammenhang mit der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen kontrovers diskutiert. Hierbei stehen besonders Veränderungen des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und deren Auswirkungen im Fokus. Der Schwerpunkt dieser Promotionsarbeit liegt auf der Untersuchung der Programmierbarkeit des renalen RAAS durch die parentale Hochsalzdiät als externem Faktor.

Methoden Im durchgeführten Ratten-Fütterungsversuch sollte der Einfluss einer Hochsalzdiät als externem Faktor mit besonderem Hinblick auf programmierbare Veränderungen des renalen RAAS in der ersten Nachkommengeneration (F1) untersucht werden. Es erfolgten klinische Untersuchungen sowie die Typisierung der Komponenten des renalen RAAS mithilfe von Western Blots.

Ergebnisse Maternale Programmierungseffekte der Hochsalzdiät zeigten sich an einer erhöhten relativen Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-1-Expression (AT₁) und einem erhöhten Finalgewicht. Im Hinblick auf die relative Expression des Mineralokortikoid-Rezeptors (MCR) und von Renin, kam die maternale Programmierung erst durch den gleichzeitigen Konsum der Hochsalzdiät zum Tragen. Hämodynamik und Finalgewicht waren durch paternale Programmierungseffekte beeinflussbar. Zudem führte die

Hochsalzdiät an sich zu einem Anstieg des Blutdrucks und Nierengewichts sowie zu einem Abfall der relativen Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-2-Expression (AT₂).

Schlussfolgerung In der vorliegenden Studie konnten sowohl maternal als auch paternal programmierende Effekte beobachtet werden. Ob zur klassischen Barker Hypothese vergleichbare epigenetische Mechanismen vorliegen, muss jedoch erst durch nachfolgende Untersuchungen überprüft werden. Viele Veränderungen zeigen sich geschlechtsabhängig, kongruent zu Ergebnissen tierexperimenteller Studien zum Thema fetale Programmierung. Speziell konnten programmierende Effekte auf die Hämodynamik und das renale RAAS der F1-Generation nachgewiesen werden. Manche der gezeigten Effekte scheinen aber auch ausschließlich auf die Hochsalzdiät zurückzugehen, beziehungsweise werden erst durch die gleichzeitige Hochsalzdiät manifest.

Abkürzungen: RAAS - Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, AT₁ - Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-1, MCR – Mineralokortikoid-Rezeptor, AT₂ - Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-2, F1 – erste Filialgeneration

1.2 English

Introduction Fetal programming refers to the link between environmental factors and intrauterine development as well as paternal genetics. 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, during a critical phase of the intrauterine development some environmental factors can impact fetal programming resulting in lifelong consequences. Nutrition seems to take a special role in this. Studies of animals, especially those subject to under-nutrition *in utero* generally exhibit changes in the structure of key organs. Epigenetic changes are thought to be the molecular equivalent. The link between a high salt diet and the prevalence of cardiovascular disease is discussed adversely. Focusing on the changes in the RAAS with its consequences, this thesis aims to investigate the programming effects of a parental high salt diet on the renal RAAS in the offspring.

Methods A rat-feeding study was designed to show the influence of a high salt diet as a programming environmental factor on the renal RAAS in the F1-generation. The components of the renal RAAS were analyzed by Western Blot.

Results Maternal programming effects might be seen in the increase of relative AT₁-receptor expression and the final bodyweight. An elevation of the relative expression of MCR and renin required a concomitant feeding of a high salt diet. Blood pressure, heart rate and final weight seem to be influenced by paternal programming. Furthermore, the high salt diet itself led to a rise in blood pressure and increased kidney weight as well as a lower relative AT₂-receptor expression.

Conclusions In the present study we could show maternal as well as paternal programming effects. To see if there are epigenetic changes as proposed by the original Barker hypothesis, further investigations are required. Comparable with other animal studies on the issue of fetal programming, we found many sex-specific effects. Specifically programming effects influencing the blood pressure and the renal RAAS were detected in the F1-generation. Some of the effects seen in this study seem to be due to the high salt diet postnatally itself rather than fetal programming.

Abbreviations: RAAS – renin-angiotensin-aldosterone-system, AT₁ - angiotensin-II-receptor-type-1, MCR – mineralcorticoid-receptor, AT₂ - angiotensin-II-receptor-type-2, F1 – first offspring

2. EINLEITUNG

2.1 Literaturübersicht

Nach heutigem Verständnis beeinflussen sich Ernährung und Gesundheit maßgeblich und zwar schon lange vor der Geburt. Zu keinem Zeitpunkt in unserer Entwicklung sind wir so abhängig von unseren Nahrungsressourcen wie während der Embryo- und Fetogenese. Der Ausspruch „Du bist, was du isst“ gilt mehr denn je.

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehören zu den Haupttodesursachen weltweit. Ihre Entstehung und steigende Prävalenz steht in enger Beziehung mit sich ändernden Ernährungsgewohnheiten¹⁻³. Ein besonderes Augenmerk wird hierbei auch auf unseren Salzkonsum gelegt. Salz ist ein essentieller Bestandteil gesunder Ernährung, aber scheint in falscher Dosis auch krankheitsfördernd zu wirken. Insbesondere Bluthochdruck und dessen Folgeerkrankungen wie Koronare Herzkrankheit und Schlaganfall werden mit einem erhöhten Salzkonsum in Verbindung gebracht^{4,5}. Daher wird zunehmend nach pathogenetischen Zusammenhängen und Mechanismen der ernährungsbedingten Krankheitsentstehung gesucht. Es stellt sich die Frage, in wie weit die Genetik von der Ernährung beeinflusst wird, bzw. in wie weit etwaige Veränderungen der Genetik die Gesundheit beeinflussen. Darüber hinaus konnten bereits in vielen epidemiologischen und tierexperimentellen Studien Hinweise gefunden werden, dass diätische Einflüsse bereits während der Prä- und Perinatalperiode eine entscheidende Rolle spielen für den Gesundheitszustand im Verlauf des Lebens bzw. die Anfälligkeit für bestimmte Erkrankungen⁶⁻¹⁰. Demnach scheint nicht nur die eigene Ernährung, sondern auch die Ernährung der Vorfahren einen Einfluss auf die Gesundheit zu haben.

2.1.1 Modelle fetaler Programmierung

Das Grundkonzept einer umweltbedingten *Programmierung* phänotypischer Merkmale kann bis auf die Thesen des Biologen Jean-Baptiste Lamarck im 18. Jahrhundert zurückgeführt werden. Dieser ging davon aus, dass Tiere mit einem veränderten Gebrauch ihrer Organe auf wechselnde Umweltbedingungen reagieren und es somit zu

Modifikationen dieser Organe komme, die sie wiederum weitervererben würden ¹¹. Nach der Widerlegung dieser Thesen durch Genetiker wie Gregor Mendel und Erkenntnisse der modernen Molekulargenetik prägte Günter Dörner in den 70er Jahren den Begriff der *intrauterinen Programmierung* und beschrieb damit die Langzeiteffekte eines gestörten intrauterinen Milieus. Als Begründer der *funktionellen Teratologie* postulierte er, dass alternierende intrauterine Hormon- und Zytokinexposition zu Stoffwechselstörungen führen können ¹². Etwa zur gleichen Zeit stellte James V. Neel seine *Thrifty Genotype Hypothese* vor, die aus der Beobachtung hervorging, dass bestimmte Populationen, deren Nahrungsressourcen limitiert sind, vermehrt zu Insulinresistenz neigen. Seiner Theorie zufolge stellte diese genetische Variante (*Thrifty Genotype*) in einer hungernden Population einen Selektionsvorteil dar und habe sich damit bis hin zur modernen Gesellschaft durchgesetzt. Und dies obschon sie unter heutigen Bedingungen einen Überlebensnachteil darstellen würden, da sie bei ausreichendem Zugang zu Ressourcen Übergewicht zur Folge habe ¹³. 1989 veröffentlichte David Barker einen Artikel der die Basis für die *Developmental Origins of Health and Disease* (DOHaD) Hypothese schuf. Hierin stellte er die Verbindung zwischen niedrigem Geburtsgewicht, als indirekten, klinischen Marker unzureichender intrauteriner Entwicklung und einem erhöhten Risiko für spätere kardiovaskuläre Erkrankungen her. Weiterhin besagt die nach ihrem Erstbeschreiber auch *Barker Hypothese* genannte Theorie, dass Umweltfaktoren in einer kritischen Phase der Entwicklung *fetale Programmierung* mit lebenslangen Auswirkungen hervorrufen können ¹⁰. Entscheidend geprägt wurde der Begriff der *fetalen Programmierung* außerdem durch die Zusammenarbeit von Barker und Hales ¹⁴, die in ihrer *thrifty phenotype hypothesis* beschrieben, dass umgebungsbedingte Einflussfaktoren, insbesondere das metabolische und hormonelle Milieu *in utero*, das Risiko erhöhen, im Verlauf des Lebens kardiovaskuläre und metabolische Erkrankungen zu entwickeln. Seither wurde diese Hypothese durch zahlreiche epidemiologische Studien in verschiedenen Ländern und Populationen weltweit und einer Vielzahl verschiedener Tiermodelle bestätigt. Prinzipiell geht man bei der Fetalen Programmierung also davon aus, dass verschiedene Umweltfaktoren die Ausbildung verschiedener Phänotypen verursachen. Darüberhinausgehend beschrieben Hochar et al. basierend auf tierexperimentellen und klinischen Studienergebnissen die *advanced fetal programming hypothesis* ^{15,16}, laut welcher auch verschiedene maternale Gene zu einer Mangelsituation des Kindes und somit einer Programmierung von Erkrankungen führen

können. Demnach sind sowohl Umwelt- als auch genetische Faktoren der Mutter ursächlich für fetale Programmierung.

2.1.2 Mechanismen fetaler Programmierung

Die Fähigkeit des Organismus, bereits im Mutterleib den Phänotyp auf wechselnde Umwelteinflüsse, insbesondere Gesundheits- und Ernährungszustand der Mutter, hin anzupassen, ist überlebenswichtig^{17,18}. Man bezeichnet diese Adaption als *Plastizität*¹⁹ und deren molekulare Entsprechung als *fetale Programmierung*²⁰. Darunter versteht man eine Interaktion zwischen genetischen sowie epigenetischen und umweltbedingten Faktoren des Organismus mit dem Ziel der optimierten Nutzung intrauteriner Ressourcen und einer bestmöglichen Angepasstheit an wechselnde postnatale Gegebenheiten^{17,21}. Im Zuge dessen werden langfristige Modifikationen der Genexpression und damit einhergehende Veränderungen der Physis, des Metabolismus und der Entwicklung von Organsystemen programmiert, um ein bestmögliches Überleben des Fetus zu erreichen^{21,22}. Diese Adaptionen können vaskuläre, metabolische oder endokrine Prozesse umfassen, die die Entwicklung, Funktion und Struktur von verschiedenen Organen beeinflussen²³. Findet ein bestimmtes Ereignis, das die normale physiologische Entwicklung des Fetus stört oder unterbricht, während einer vulnerablen oder kritischen fetalen Entwicklungsphase statt, können sich dessen Effekte durch Anpassung des Fetus dauerhaft manifestieren^{22,24}.

Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der fetalen Programmierung sind bislang nur unzureichend verstanden, jedoch nimmt man mittlerweile an, dass sie auf epigenetische Modifikationen der DNA zurückzuführen sind²⁵. Den Begriff Epigenetik führte C. H. Waddington²⁶ 1942 ein. Er wollte das Phänomen beschreiben, dass Unterschiede zwischen zwei von einer Stammzelle entstammten Zellreihen existieren, die weder durch den genetischen Code noch als phänotypische Variation erklärbar sind. Aktuell bezeichnet die Epigenetik eine Art Zusatzinformation zum genetischen Code, die im Code selbst nicht vorhanden ist. Verschiedenste epigenetische Regulationsmechanismen sind bereits bekannt, welche die Expression von Genen beeinflussen. Im Wesentlichen spielen hierbei drei epigenetische Prozesse eine Rolle: DNA Methylierung, Histon Acetylierung und die Expression von nichtkodierender-RNA,

wie z.B. der micro-RNA^{9,27}. Hypermethylierung einer Region kann zur Transkriptionshemmung führen, wohingegen eine Hypomethylierung zur Transkriptionsaktivierung führen kann. Ebenso bestimmt der Acetylierungszustand der Histone ob ein Gen stillgelegt oder vermehrt abgelesen wird. Micro-RNA beeinflusst ebenso die DNA Methylierung, aber auch die Gen-Expression posttranskriptional^{25,27}. Epigenetische Muster werden während der fetalen Entwicklung und Zelldifferenzierung durch einen gut organisierten Prozess generiert. Nichtsdestotrotz ist die Modifikation des Epigenoms ein sehr dynamischer und reaktionsfähiger Vorgang, welcher, besonders in frühen Entwicklungsphasen, sensibel auf Umwelteinflüsse reagiert um den Fetus möglichst optimal anzupassen²⁸. Die momentane Datenlage suggeriert, dass die epigenetische Programmierung maßgeblich durch das intrauterine Milieu beeinflusst werden kann, welches wiederum durch Ernährung und Hormonhaushalt der Mutter sowie auch die Leistung der Plazenta maßgeblich bestimmt wird^{29,30}. Die veränderte Epigenetik bedingt dann ihrerseits die Genexpression im fetalen Gewebe, wodurch letztlich die künftige Funktion der sich gerade entwickelnden Organe und damit Erkrankungen im zukünftigen Leben verursacht werden könnten bzw. die Vulnerabilität gegenüber bestimmter Erkrankung programmiert werden kann^{20,31}. Beispiele epigenetischer Regulation von Genen, welche im Zusammenhang mit kardiovaskulären oder metabolischen Erkrankungen stehen, sind etwa Gene des Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren-System (PPARs) oder des Glukokortikoid-Rezeptors sowie des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems^{32,33}.

Epigenetische Modifizierungen und deren phänotypische Entsprechungen weisen mitunter eine sehr lange Latenz auf und können sich auch erst im Erwachsenenalter manifestieren³⁴. Noch ist nicht genau bekannt, wann und für wie lange epigenetische Plastizität möglich ist. Man nimmt jedoch ein Zeitfenster zwischen perikonzeptioneller Periode bis in die postnatale Phase an²⁰. Aus Studien an genetisch identen eineiigen Zwillingen ist sogar bekannt, dass Umwelteinflüsse zeitlebens epigenetische Modifikationen bewirken können³⁵. Bei der Entwicklung der meisten Organe hingegen scheint sich diese vulnerable Phase ausschließlich auf die Schwangerschaft zu begrenzen³⁶.

Die epidemiologische Beobachtung, dass ähnliche Phänotypen und daraus resultierend ähnliche Krankheitsbilder, von verschiedenen Ernährungssituationen der Mütter

ausgehend, entstehen können, führt zu der Annahme, dass fetale Programmierung durch eine kleine Anzahl von Adaptionsprozessen erfolgt^{23,37}. Mehrere Studien legen zudem nahe, dass ein auf diese Art entstandener Phänotyp auch in die folgenden Generationen weitervererbt werden kann, teilweise mit geschlechtsspezifischen Unterschieden³⁸⁻⁴⁰. Beschrieben wurde dieser Zusammenhang in den verschiedensten Populationen und durch tierexperimentelle Daten, unabhängig von Alter, Geschlecht und ethnischem Hintergrund⁴¹.

Fetale Programmierung kann demnach also als adaptive Antwort des Feten auf seine pränatale und frühe postnatale Umwelt gewertet werden, die über epigenetische Prozesse im Genom konserviert wird.

2.1.3 Paternale Programmierung

Obschon der Zusammenhang zwischen perikonzeptioneller Ernährung der Mutter und der Inzidenz von Krankheiten beim Nachwuchs Gegenstand aktueller Forschung ist, bleibt unser Verständnis vom Einfluss der väterlichen Ernährung während der Konzeption bislang weitestgehend schlecht definiert⁴². Neuere Studien gehen jedoch fest von einer paternalen Beeinflussung der fetalen Programmierung aus⁴²⁻⁵⁰. So konnte gezeigt werden, dass den Vater betreffende diätische aber auch mentale Umweltfaktoren den Phänotyp des Nachwuchses beeinflussen können. Ein 2010 in China durchgeführtes Tierexperiment im Rattenmodell zeigt, dass paternale Adipositas bei den weiblichen Nachkommen zu epigenetischen Veränderungen der Beta-Zell-Funktion führt und somit deren Insulin-Resistenz programmiert und ebenfalls in einem adipösen Phänotyp im Erwachsenenalter resultiert⁴³. Interventionen mit dem Ziel, die metabolische Gesundheit des Vaters vor der Konzeption zu verbessern, führten zu einer partiellen Normalisierung aberranter epigenetischer Signale der Spermien und damit zu einer Verbesserung des gesundheitlichen Zustandes der weiblichen Nachkommen⁴⁴. Bei Mäusen konnte eine Beeinflussung der vaskulären Funktion sowie der Glukosetoleranz beim Nachwuchs proteinarm gefütterter Männchen festgestellt werden⁴². Weiterhin existieren bereits Studien am Menschen, die eine paternale Programmierung nahelegen. Beispielsweise beschrieben Chen *et al.*⁴⁵, dass der paternale BMI das Wachstum männlicher Nachkommen beeinflusst. Darüber hinaus wurde in Indien anhand einer generationsübergreifenden Studie der Zusammenhang

zwischen dem Geburtsgewicht beider Eltern und der Entwicklung eines metabolischen Syndroms bei deren Kindern nachgewiesen ⁴⁶. Des Weiteren suggeriert die aktuelle Datenlage, dass Diabetes beim Vater das Geburtsgewicht der Nachkommen verringere ⁴⁷⁻⁴⁹. Bei der Erforschung des paternalen Einflusses auf die fetale Programmierung liegt der Fokus aktuell insbesondere auf möglichen epigenetischen Veränderungen der Spermien, speziell in Form von RNA-Modifikationen ⁵⁰.

2.1.4 Alimentäre Programmierung und Krankheitsentstehung

Tierstudien, welche sich mit Diät-assoziierten Einflüssen auf die Entwicklung, im Besonderen mit Fehlernährung *in utero*, befassen, zeigen programmierbare strukturelle Veränderungen von Organen zentraler Bedeutung beim Nachwuchs ³⁶. Der Einfluss insbesondere der maternalen Ernährung und damit des intrauterinen Nährstoffangebotes auf diese Veränderungen konnte in einer Vielzahl von Tierversuchen beobachtet werden ^{30,41,51-54}. Epidemiologische Studien zeigen, dass nutritielle Defizite während der Schwangerschaft mit einem erhöhten Risiko für metabolische und kardiovaskuläre Erkrankungen im späteren Leben verbunden sind ⁵³. Mithilfe epidemiologischer Daten des „niederländischen Hungerwinters“ während des zweiten Weltkriegs sowie mehrerer Studien aus Großbritannien, Europa und den USA, konnte ein direkter Zusammenhang zwischen einem niedrigen Geburtsgewicht und der späteren Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen und den damit verbundenen Krankheitsbildern wie Schlaganfall, insulinunabhängiger Diabetes mellitus und Hypertension hergestellt werden ⁵⁵⁻⁶⁰.

Die Anpassung fetalen Gewebes an wechselnde endokrine und metabolische Gegebenheiten im Mutterleib ist physiologisch und überlebenswichtig für das Kind. Sie sorgen für eine optimale Entwicklung im Rahmen des intrauterinen Milieus. Besteht etwa eine Nährstoffknappheit durch Mangelernährung der Mutter, kommt es zu einer Ressourcenfokussierung auf absolut lebensnotwendige Organe wie dem Gehirn. Damit einhergehend kann es zu einer suboptimalen Genese anderer Organe wie den Nieren und dem endokrinen Pankreas kommen ^{45,61}. Des Weiteren können anhaltende, strukturelle und funktionseinschränkende Störungen dieser Organe hierdurch entstehen ^{23,51}. Eine Reduktion der Nephron-Anzahl wurde zum Beispiel im Anschluss an eine

pränatal proteinarme Diät bei Ratten^{53,62}, Mäusen⁶³ und Schafen⁶⁴ beobachtet. Beim Menschen korreliert die Nephron-Anzahl direkt mit dem Geburtsgewicht und verhält sich umgekehrt proportional zum Blutdruck⁶⁵. Darüber hinaus zeigt maternale Mangelernährung im Rattenmodell auch eine Reduktion des absoluten Pankreasgewichts und der Inselzell-Masse beim Nachwuchs⁶⁶. Überdies scheint bei einer Vielzahl von Spezies ein intrauteriner Nährstoffmangel auch die Entwicklung des muskuloskeletalen Stützapparates zu beeinflussen⁶⁷. All diese Veränderungen erklärt man sich durch Remodellingvorgänge, welche assoziiert zu sein scheinen mit der Störung zellulärer Proliferation und Differenzierung während der fetalen Entwicklung im Zusammenhang mit epigenetischen Modulationen³⁶. In mehreren Studien konnte zudem gezeigt werden, dass auch eine maternale Überernährung und LGA- (*large for gestational age*) Geburtlichkeit negative Folgen für den Nachwuchs haben kann⁶⁸. LGA-Nachwuchs, typischerweise mit mütterlichem Übergewicht und Gestationsdiabetes assoziiert, zeigt einen erhöhten viszeralen Körperfettanteil und besitzt damit ein erhöhtes Risiko, im späteren Leben Pathologien aus dem Formenkreis des metabolischen Syndroms zu entwickeln^{54,69}. Neben den beschriebenen Effekten von Hauptnährstoffen rücken neuerdings auch Vitamine und Spurenelemente mehr in den Fokus. Folsäure und die Vitamine B2, B6 und B12 sind beispielsweise unter anderem an der Methylierung der DNA beteiligt^{70,71}. Somit können sie die Programmierung des Epigenoms mit beeinflussen. Auch andere Mikronährstoffe wie etwa Vitamin A und C, Eisen, Zink und Flavonoide scheinen eine Rolle zu spielen⁷².

Stimmen die Umweltverhältnisse intrauterin und postpartal nicht überein, sind die auf Mangel programmierten Organe beispielsweise einem Nahrungsüberfluss ausgesetzt, entsteht ein Missverhältnis und daraus resultierend eine metabolische und hormonelle Unangepasstheit des Organismus (*match/mismatch-Hypothese*). In diesen Fällen bedeutet die fetale Programmierung einen Überlebensnachteil für das Individuum^{28,38}. Heute weiß man, dass diese Maladaptationen in Korrelation mit der Entwicklung einer Reihe von Erkrankungen verschiedener physiologischer Systeme im späteren Leben stehen^{36,38,41}. Hierzu gehören insbesondere Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems wie beispielsweise Bluthochdruck und Koronare Herzkrankheit. Darüber hinaus sind aber ebenso Stoffwechselerkrankungen aus dem Formenkreis des metabolischen Syndroms wie Diabetes mellitus Typ II, Hyperlipidämie und Adipositas zu nennen^{7,8,14,51}. Chronische Erkrankungen können so vorprogrammiert sein, auch wenn per se

dafür keine genetische Veranlagung besteht⁷³. Ist das Individuum jedoch aufgrund von ohnehin bestehenden genetischen Faktoren prädispositioniert gegenüber bestimmter Erkrankungen, so potenziert sich sein Morbiditätsrisiko mit der Fehlprogrammierung noch weiter^{9,17}. Das Ausmaß des Einflusses umwelt- und lebensstilbedingter Risikofaktoren (wie beispielsweise Rauchen, Alkohol, Mangel an Bewegung usw.) auf die Entstehung von Erkrankungen im späteren Leben ist somit auch abhängig von der Fähigkeit des Organismus, schädigende Einflüsse zu kompensieren^{18,39}. Folglich ergibt sich daraus die Annahme, dass die Exposition gegenüber Risikofaktoren an sich weniger entscheidend ist für die Krankheitsentstehung, als vielmehr die programmierte Empfindlichkeit des Individuums gegenüber dem etwaigen Risikofaktor⁷⁴. In diesem Zuge soll die sogenannte *Salz-Sensitivität* erwähnt werden, die im Folgenden weiter beschrieben wird.

2.1.5 Hochsalzdiät und Beeinflussung des Blutdrucks

Die Beeinflussung des Blutdrucks ist komplex und Erkrankungen wie die arterielle Hypertension als multifaktoriell bedingt anzusehen. Die Forschung des letzten Jahrhunderts, insbesondere Daten aus interventionellen⁷⁵⁻⁷⁷, epidemiologischen^{75,78,79} und tierexperimentellen⁸⁰⁻⁸² Studien dokumentiert eindrücklich den Zusammenhang zwischen Salzkonsum und der Entstehung von Bluthochdruck. Dennoch ist der pathogenetische Mechanismus noch nicht komplett verstanden. Die Annahme, dass Salz alleinig durch eine Expansion des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens wirke, wurde durch die Demonstration wasserfreier Natriumspeicherung in Körpergeweben durch Machnik *et al.*⁸³ weitestgehend widerlegt⁸⁴. Die Sekretion kardiotonischer Steroide wie Marinobufagenin⁸⁵ und die Aktivierung renaler und epithelialer Natrium-Kanäle (ENaC) werden derzeit als mögliche Erklärungsansätze diskutiert⁸⁶. Darüber hinaus wurde herausgefunden, dass eine salzreiche Diät in Tiermodellen zu einer Beeinträchtigung der Stickstoffmonoxid-Ausschüttung (NO) in den Widerstandgefäßen führt^{87,88}. NO dient unter anderem als endogener Regulator des Gefäßdurchmessers (führt zu einer Dilatation), der glomerulären Filtrationsrate sowie der Natriumausscheidung. Ist dieser Mechanismus beeinträchtigt, kann es konsekutiv zu einem vermehrten peripheren Widerstand, einer Natrium- und Flüssigkeitsretention und folglich erhöhtem Blutdruck kommen⁸⁹. Des Weiteren verhindert NO die Produktion des

transforming growth factors- β (TGF- β), welcher sich seinerseits negativ auf die Compliance der Gefäße auswirkt und die Konstriktion der Arterien fördert⁹⁰.

Über die letzten Jahre hat sich der Begriff der *Salz-Sensitivität* etabliert, wodurch die verschiedenen Variationen der Blutdruckänderung bezüglich Diäten unterschiedlichen Salzgehaltes beschrieben werden. Es wird diskutiert, ob diese *Sensitivität* auf programmierte epigenetische Veränderungen zurückzuführen ist, beispielsweise von zentralen blutdruckregulierenden Systemen wie dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System⁹¹. Es wird angenommen, dass mindestens ein Drittel der Bevölkerung weltweit *salzsensitiv* ist und aufgrund einer zu hohen täglichen Salzzufuhr an einem erhöhten Blutdruck leidet^{92,93}. Zu den Risikofaktoren, die eine *Salz-Sensitivität* verstärken, gehören ethnische Zugehörigkeit (insbesondere Afroamerikaner), intrinsische Nierenerkrankungen und Alter⁹¹. Zudem zeigten de Boer *et al.*⁹⁴, dass junge gesunde Erwachsene mit einem niedrigen Geburtsgewicht eine erhöhte *Salz-Sensitivität*, im Sinne einer verstärkten Blutdrucksteigerung unter salzreicher Diät, aufwiesen. In Tierversuchen scheinen überdies die folgenden Parameter die Reaktion der Versuchstiere auf diätisches Salz zu modifizieren: Das Alter, in dem die Salzaufnahme beginnt, das Geschlecht des Tieres, der durchschnittliche tägliche Salzkonsum, die Zeitspanne während der Salz gefüttert wird, aber eben auch die genetische Sensitivität gegenüber einer Hochsalzdiät⁸¹.

Laut epidemiologischen Hochrechnungen kann die Inzidenz von Schlaganfällen und Koronarer Herzkrankheit bereits durch eine Verringerung des täglichen Salzverzehrs von aktuell durchschnittlich 8-12 g pro Tag auf 5-6 g pro Tag um bis zu 18 bzw. 24 % gesenkt werden⁹⁵. Einer Cochrane-Metaanalyse aus dem Jahre 2013 zufolge besteht eine direkte Dosis-Wirkung-Beziehung zwischen Salz und Blutdruck. Je größer die Reduktion des Salzkonsums, desto größer ist der blutdrucksenkende Effekt⁷⁵. In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass der Blutdruck der Versuchstiere mit zunehmendem Salzgehalt der Nahrung steigt⁸¹. Aktuellen Studien zufolge erhöht aber auch eine sehr geringe Salzaufnahme von unter 3 g pro Tag das kardiovaskuläre Risikoprofil durch die pathologische Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems⁹⁶.

2.1.6 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist ein Regelkreislauf bestehend aus vielen Enzymen und Hormonen und reguliert im Wesentlichen den Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushalt (vor allem das Extrazellulärvolumen) im Körper sowie den renalen und peripheren Gefäßwiderstand. Somit fungiert das RAAS als eines der wichtigsten Regulatoren des arteriellen Blutdrucks^{97, 98}. Die physiologische Funktion des RAAS ist es, das zirkulierende Blutvolumen und den Blutdruck innerhalb normaler physiologischer Grenzen konstant zu halten^{99,100}. Die Komponenten des RAAS stehen in enger Wechselwirkung zueinander. Am Ende einer Reihe von enzymatischen Spaltungen entsteht das Effektorpeptid Angiotensin II, welches über Rezeptoren an den Zielstrukturen im Gehirn, Gefäßen, Herz und Niere wirkt. Neben dem zirkulierenden RAAS existieren auch lokale gewebsständige RAAS im Gehirn, Myokard, Gefäßwänden und vielen weiteren Gewebetypen, welche die Organfunktion unabhängig vom zirkulierenden Counterpart beeinflussen^{101,102}. In der Niere ist das RAAS vornehmlich im proximalen Tubulus lokalisiert¹⁰³.

Die RAAS Kaskade beginnt mit der Ausschüttung von Renin aus den juxtaglomerulären Zellen der afferenten Arteriolen der Niere. Die Sekretion von Renin wird durch folgende Stimuli gefördert: Natriummangel, Hypovolämie und erniedrigtem Blutdruck sowie verminderte Nierendurchblutung und Katecholaminfreisetzung. Renin ist eine Protease und spaltet aus der Leber stammendes Angiotensinogen in Angiotensin I. Dieses wird wiederum vom Angiotensin-konvertierenden Enzym (ACE) und zu einem kleineren Teil durch das Enzym Chymase zu Angiotensin II (ANG II) konvertiert. Die Wirkung von ANG II wird durch zwei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt: Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-1 (AT₁) und Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-2 (AT₂)¹⁰⁴. Vereinfacht dargestellt, vermitteln beide Rezeptoren genau gegensätzliche Reaktionen. In der Niere bewirkt ANG II über die Bindung an AT₁ eine Vasokonstriktion der efferenten und afferenten Arteriolen sowie eine gesteigerte Natrium- und Flüssigkeitsretention und eine erhöhte Kaliumausscheidung¹⁰⁵. Auch die ANG II induzierte Aldosteron-Sekretion aus der Nebennierenrinde ist AT₁ vermittelt. Aldosteron ist ein Mineralokortikoid, welches in Verbindungstubuli und Sammelrohren der Niere über die Aktivierung von Mineralokortikoid-Rezeptoren einen vermehrten Einbau von Natriumkanälen (ENaC) und -transportern (Na⁺/K⁺-ATPase) in die Plasmamembran zum Interstitium bewirkt.

Hierdurch wird der Natriumtransport über das Epithel erleichtert, was osmotisch bedingt eine vermehrte Wasserrückresorption zur Folge hat. Gleichzeitig kommt es zu einer erhöhten Ausscheidung von Kalium- und Ammoniumionen sowie Protonen. Darüber hinaus wirkt Aldosteron auch am Darmepithel und an den Speichel- und Schweißdrüsen, wodurch im Darmsekret, Speichel und Schweiß die Natriumkonzentration sinkt und die Kaliumkonzentration steigt. Insgesamt bewirkt Aldosteron also einen Anstieg des Extrazellulärvolumens, eine Abnahme der Kaliumkonzentration und einen Anstieg des pH-Wertes im Blut ¹⁰⁶. Die Bindung von ANG II an AT₂ resultiert unter anderem in antiinflammatorischen, vasodilatatorischen und antifibrotischen Reaktionen. Über die genauen physiologischen und pathophysiologischen Funktionen des AT₂ wird jedoch weiterhin kontrovers diskutiert ¹⁰⁷. In der Hypophyse bewirkt ANG II eine Freisetzung des Antidiuretischen Hormons (ADH), welches wiederum über die Fusion von Aquaporin 2 mit der Membran der Sammelrohre zu einer gesteigerten Rückresorption von Wasser aus dem Primärharn ins Blut führt ^{99,108}.

All diese Mechanismen steigern das extrazelluläre Volumen, wodurch ANG II eine zentrale Rolle sowohl in der kurz- als auch langfristigen Regulation des Blutdrucks spielt. Des Weiteren beeinflusst gewebeständig synthetisiertes ANG II durch parakrine und autokrine Effekte die Struktur und Funktion der arteriellen Gefäße und führt so zu kardiovaskulärem *remodelling*. Andere postulierte Effekte von ANG II sind erhöhter oxidativer Stress, Förderung der Leukozytenadhäsion und -migration, Steigerung inflammatorischer Reaktionen sowie Stimulation der Thrombozytenaggregation und Aktivierung des Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ 1 ¹⁰⁹. Hierdurch bewirkt ANG II direkt eine endotheliale Dysfunktion und begünstigt die Entstehung von Arteriosklerose. Somit trägt ANG II neben seiner blutdrucksteigernden Wirkung auch direkt zu Endorganschäden bei ¹⁰⁴. In verschiedenen klinischen Studien konnte zwischen hohen ANG II Konzentrationen und der Entstehung von kardiovaskulären und renalen Erkrankungen ein Zusammenhang hergestellt werden ^{110,111}. Folglich konnte gezeigt werden, dass Medikamente, die das RAAS beeinflussen, vornehmlich Inhibitoren des ACE und AT₁-Rezeptor-Blocker, nicht nur für die Therapie der arteriellen Hypertension geeignet sind, aber auch kardiovaskuläres *remodelling* und damit partiell die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen verhindern ^{111,112}.

2.1.7 Hochsalzdiät und programmierte Veränderungen des RAAS

Wie bereits beschrieben ist das RAAS der Niere für die Flüssigkeits- und Elektrolythämostase des Körpers zuständig und somit auch für die Regulation des arteriellen Blutdrucks verantwortlich ⁹⁷. In einigen Kurzzeit-Studien, in denen der Salzkonsum der Probanden reduziert wurde, konnte eine pathologische Aktivierung des RAAS und des sympathischen Nervensystems beobachtet werden ¹¹³. Graudal und Jürgens interpretieren die beschriebenen Schwankungen des Plasma Renin- und ANG II- sowie des Aldosteron-Spiegels als physiologische Gegenregulation auf den anfänglichen Blutdruckabfall ¹¹⁴. Dieser Kompensationsmechanismus ist umso stärker ausgeprägt, desto schneller und stärker die Reduktion des Salzkonsums ist und deutlich schwächer bei moderater Langzeitreduktion ⁷⁵. Metaanalysen zeigen, dass ein erhöhter Renin-Plasmaspiegel zwar kurzfristig mit einer erhöhten Mortalität assoziiert ist, jedoch langfristig die Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen nicht steigert ¹¹⁵. Im Fall der Yanomamo Indianer, welche nur 0,4 g NaCl pro Tag konsumieren, zeigten sich erhöhte Renin-Plasmaspiegel und Aldosteron-Konzentrationen, die über dem zehnfachen Normalwert lagen. Dennoch wurde keine erhöhte Morbidität bei dieser Population festgestellt ¹¹⁶.

Ramos *et al.* ¹¹⁷ haben in ihren Versuchen an Ratten herausgefunden, dass eine maternale Hochsalzdiät mit geschlechtsspezifischen Veränderungen der Reaktionsfähigkeit des RAAS assoziiert ist und bestätigen damit eine weitverbreitete Annahme ¹¹⁸. Sie beziehen sich auf Hochsalzversuche an weiblichen Wistar Ratten, denen zeitlebens bis nach dem Absetzen ihrer Nachkommen eine Hochsalzdiät verabreicht wurde. Als Resultat zeigten sich dort wie auch in anderen Rattenmodellen ein erhöhter Blutdruck und ein verändertes renales sowie systemisches RAAS bei den Nachkommen ¹¹⁹. Des Weiteren werden erniedrigte ANG I und II Level und erhöhte AT₁-Rezeptor Expressionen in den Plazenten trächtiger Ratten beschrieben, denen eine Hochsalzdiät gefüttert wurde ¹²⁰. Ding *et al.* bestätigten mit ihrem Rattenmodell diese Ergebnisse ⁵². Bei den männlichen Nachkommen des Versuchs von Ramos *et al.* wurde das RAAS dahingehend durch die maternale Hochsalzdiät modifiziert, dass sie im Vergleich zur Kontrollgruppe reduzierte Aldosteron- und Renin-Plasmaspiegel und erhöhte renale Renin-Spiegel aufwiesen. Im Vergleich dazu zeigten sich bei den weiblichen Nachkommen keine signifikanten RAAS Alterationen ¹¹⁷. Leandro *et al.* ¹²⁰

berichten ebenfalls von einem erniedrigten Renin-Plasmaspiegel bei trächtigen Wistar Ratten infolge einer Hochsalzdiät. Sie vermuten, dass die Föten hierdurch in einer reninarmen und salzreichen Umgebung heranwachsen und ihr eigener niedriger Renin-Plasmaspiegel im Erwachsenenalter somit als Adaption an die vorhergesagte Umwelt postpartal zu werten sei. Bezüglich des renalen ANG II-Spiegels konnte bei den Nachkommen salzreich gefütterter Weibchen eine deutliche Erhöhung festgestellt werden ¹¹⁹. In einigen Studien wird davon ausgegangen, dass die lokale Aktivierung des RAAS notwendig sei, um eine dem Salzkonsum angemessene Entwicklung der Nieren mit effizienter Natriumexkretion und Konstanthalten des Blutdrucks, zu gewährleisten ¹⁰⁹. Ein niedriger Aldosteron-Spiegel wird laut Moritz et al. bei erhöhtem ANG II-Spiegel erwartet, da dieser als Gegenregulator der Aldosteron Produktion dient. Diese Observation unterstützt wiederum die Vorstellung einer Adaption des RAAS mit dem Ziel der Konstanthaltung des Blutdrucks beim Nachwuchs ¹¹⁸.

2.2 Zielsetzung der Arbeit

Kardiovaskuläre Krankheiten sind weltweit auf dem Vormarsch und wie bereits erwähnt weisen eine Vielzahl von epidemiologischen Studien und tierexperimentellen Daten auf eine Korrelation zwischen *in utero* Programmierung des Fetus durch Umwelteinflüsse und einer Entwicklung von Erkrankungen im Erwachsenenalter hin. Um die Mechanismen dieser Programmierung besser zu verstehen, auch in Hinblick auf die Vererbung der programmierten Effekte auf nachfolgende Generationen, wurde das im Weiteren beschriebene Tierexperiment angestrebt. Weiterhin wurde nach jetzigem Kenntnisstand noch in keinem vergleichbaren Tierexperiment auf die Relevanz der paternalen Vererbung eingegangen.

Der Schwerpunkt dieser Promotionsarbeit liegt auf der Untersuchung der Programmierbarkeit des renalen RAAS durch die parentale Hochsalzdiät. Besonders wurde auf den Zusammenhang zwischen einer salzreichen Ernährung und der Entstehung von Bluthochdruck durch Veränderungen des RAAS eingegangen. Mit dem der Arbeit zu Grunde liegenden standardisierten Tierversuch (Rattenmodell) und den anschließenden labortechnischen Verfahren (besonders Western Blot) sollten die in der Literaturübersicht skizzierten Hypothesen insbesondere bezüglich des RAAS, überprüft

werden. Darüber hinaus wurden das Geburtsgewicht, Wachstumsverhalten, Blutdruck, Organgewichte und Laborparameter der Nachkommen untersucht. Dies dient unter anderem der Aufdeckung einer etwaigen intrauterinen Wachstumsretardierung und den damit in Zusammenhang gebrachten metabolischen, physiologischen und morphologischen Veränderungen. Hämodynamische Daten wie Blutdruck und Puls wurden im Hinblick auf Veränderungen des RAAS betrachtet.

Aus diesen Kenntnissen und Überlegungen ergeben sich für die vorgelegte Arbeit folgende Fragestellungen:

1. Inwieweit beeinflusst eine salzreiche Ernährung der Elterntiere den Phänotyp ihrer Nachkommen hinsichtlich Wachstumsverhalten, Hämodynamik sowie des renalen RAAS? Bestehen hierbei geschlechtsspezifische Unterschiede?
2. Inwieweit beeinflusst eine salzreiche Ernährung der Nachkommen deren Phänotyp hinsichtlich Wachstumsverhalten, Hämodynamik sowie des renalen RAAS? Bestehen hierbei geschlechtsspezifische Unterschiede?
3. Macht es einen Unterschied, ob die Diät der Nachkommen, der der Eltern entspricht oder nicht (*match/mismatch*)?

Diese Arbeit soll helfen die fetale Programmierung von lebenslangen Krankheitsrisiken besser zu verstehen. Insbesondere auch der Frage nach der Rolle des Vaters bezüglich der fetalen Programmierung soll in dieser Arbeit ein Stück nähergekommen werden. Die Ergebnisse dieses Forschungsbereichs nehmen schon heute Einfluss auf die Perinatal- und Präventivmedizin und implizieren noch unabsehbare Möglichkeiten in der primären Prävention.

3. MATERIAL

3.1 Verwendete Geräte

Tabelle 1: Liste aller im Rahmen der Arbeit verwendeter Geräte, in alphabetischer Ordnung, mit Typenbezeichnung und Hersteller.

Gerät	Hersteller
CanoScan 4400F	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
Druck-/Pulsmesseinheit	PowerLab, AD Instruments , NSW, Australien
Elektrophoresekammer TV200	Biotop, Jahnsdorf, Deutschland
Entwicklermaschine Curix 60	AGFA, Morsel, Belgien
Feinwaage BL1500S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Film Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Filterpapier	Whatman, Dassel, Deutschland
Heiz-Blockthermostat HBT-1-131	DITABIS AG, Pforzheim, Deutschland
Hybridisierungssofen Duo-Therm OV5	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Magnetrührgerät MR 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG
Mikroliterpipetten (10µl - 1000µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Netzgerät Biometra standard (P25)	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Nitrozellulosemembran (BA83)	Whatman, Dassel, Deutschland
pH-Meter WTW pH537	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Präzisionswaage Scaltec SBC22	Scaltec Instruments, Göttingen, Deutschland
Safelock-Tubes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schüttler WT-17	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Semidry-Blotter Trans-Blot® SD	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Serologische Pipetten, steril	Greiner-Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Spectrophotometer Benchmark Plus	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ultraschall-Homogenisator Sonoplus	Bandelin, Berlin, Deutschland
Vortex Mixer	Neo Lab, Heidelberg, Deutschland
Wasseraufbereiter Milli Q	Mili-Q Purification System, Billerica, USA
Zentrifuge Biofuge 13	Heracus Sepatech GmbH, Deutschland

3.2 Verwendete Chemikalien

Tabelle 2: Liste aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeter Chemikalien, in alphabetischer Ordnung, mit Hersteller.

Chemikalien	Hersteller
25x complete protease inhibitor	Roche diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Fluka, Hamburg, Deutschland
Bovine serum albumin (BSA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natrumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natrumazid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
p-Cumarinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Polyacryl acid (PAA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PageRuler (Prestained Protein Ladder)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
Ponceau-S	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Rotiload 1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Flüssiger Stickstoff	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SDA (Natriumdiacetat)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton-X100	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween-20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

3.3 Verwendete Lösungen

Alle nachfolgend genannten Lösungen wurden selbst hergestellt.

Trenngelpuffer (1,5 M Tris, pH 8,8)

36,6 g Tris
 200 ml MQ-H₂O
 pH 8,8 einstellen
 anschließend autoklavieren

Sammelgelpuffer (1,0 M Tris, pH 6,8)

12,12 g Tris
 100 ml MQ-H₂O
 pH 6,8 einstellen
 anschließend autoklavieren

Tris buffered Saline Tween (20 mM Tris, 140 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween-20, pH 7,6)

<u>10x TBS:</u>	<u>1x TBS-T:</u>
24,2 g Tris	100 ml 10x TBS
80 g NaCl	900 ml destilliertes H ₂ O
auf 1 Liter mit destilliertem H ₂ O auffüllen	1 ml Tween-20
pH 7,6 einstellen	

Elektrophorese Laufpuffer (25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS)

<u>5x Elektrophorese Puffer:</u>	<u>1x Elektrophorese Puffer:</u>
15,25 g Tris	200 ml 5x Elektrophorese Puffer
94 g Glycin	auf 1 Liter mit destilliertem H ₂ O auffüllen
50 ml 10% SDS	
auf 1 Liter mit destilliertem H ₂ O auffüllen	

Transfer Puffer (184 mM Glycin, 24 mM Tris, 20% (v/v) Methanol)

5x Transfer Puffer:

69,2 g Glycin

14,5 g Tris

auf 1 Liter mit destilliertem H₂O auffüllen

1x Transfer Puffer:

100 ml 5x Transfer Puffer

100 ml Methanol

300 ml destilliertes H₂O

Ponceau Lösung (0,1% (w/v) Ponceau-S in 5% (v/v) Essigsäure)

0,04 g Ponceau-S

2 ml Essigsäure

38 ml destilliertes H₂O

Stripping Puffer (25mM Glycin, 1% (w/v) SDS, pH 2)

0,935 g Glycin

50 ml 10% SDS

auf 0,5 Liter mit destilliertem H₂O auffüllen

pH 2 einstellen

Luminol

0,8858 g in 20 ml Dimethylsulfoxid gelöst

p-Cumarinsäure

0,2956 g in 20 ml Dimethylsulfoxid gelöst

Enhanced Chemiluminescence (ECL) Mix 1

1 ml Luminol

440 µl p-Cumarinsäure

88,5 ml destilliertes H₂O

in einem lichtundurchlässigen Gefäß aufbewahren

Enhanced Chemiluminescence (ECL) Mix 2

64 µl H₂O₂

10 ml 1 M Tris

90 ml destilliertes H₂O

pH 8,5 einstellen

in einem lichtundurchlässigen Gefäß aufbewahren

Lysepuffer mit Proteinaseinhibitor

0,025 g SDA
0,25 ml 1 M Tris
0,5 ml NaCl 1,5 M
0,05 ml SDS 10%
0,05 ml Triton X-100
0,2 ml 25x complete Protease Inhibitor
0,5 ml NaN₃ 0,2%
3,45 ml MQ-H₂O

3.4 Verwendete Antikörper

Tabelle 3: Liste aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeter Antikörper mit Seriennummer, Ursprungsgattung, Klonalität und Hersteller.

Antikörper	Hersteller
AT ₁ (sc-579) polyclonal rabbit IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
AT ₂ (sc-9040) polyclonal rabbit IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
MCR (sc-11412) polyclonal rabbit IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
Renin (AP00945PU-N) polyclonal sheep IgG	Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland
GAPDH (sc-365062) monoclonal mouse IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
Goat anti rabbit IgG-HRP (sc-2054)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
Donkey anti sheep IgG-HRP (sc-2473)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
Goat anti mouse igG-HRP (sc-2005)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland

3.5 Software

Tabelle 4: Liste aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeter Programme mit Versionsnummerierung und Hersteller.

Software	Hersteller
Alpha Ease™ FC 3.1.2	Alpha Innotech, Miami, FL, USA
Excel® 14.0.0	Microsoft® Corporation
GraphPad Prism® 5.0	GraphPad® Software Inc., San Diego, CA, USA
Microplate Manager 5.2	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Power Lab Software 4.4.1	AD Instruments, NSW, Australien
SPSS® 16.0	SPSS® Inc., Chicago, IL, USA

4. METHODEN

4.1 Tierversuch

4.1.1 Hintergrund und Versuchszweck

Der Prozess der intrauterinen Entwicklung während der Schwangerschaft wird getragen durch ein hochkomplexes physiologisches System aus hormonellen, nervalen, peripheren und zentralen Regulationsnetzwerken. Umweltfaktoren können dieses Zusammenspiel maßgeblich beeinflussen und stören.

In diesem Fütterungsversuch sollte insbesondere der Einfluss der Diätzusammensetzung als externer Faktor untersucht werden mit besonderem Hinblick auf Veränderungen des RAAS in der Niere. Zur Aufklärung der molekularen Mechanismen, die diesen Interaktionen zu Grunde liegen, musste biologisches Probenmaterial aus den Nieren der Versuchstiere gewonnen werden. Auch die Effekte der Nahrungszusammensetzung auf Parameter von Herz-Kreislauf-Erkrankungen sowie auch die Geschlechtsabhängigkeit der physiologischen Auswirkungen der unterschiedlichen Salzdiäten konnte während des Versuches untersucht werden. Derzeit sind keine Alternativmethoden bekannt, die einen Tierversuch zur Untersuchung der Programmierung kardiovaskulärer Erkrankungen während der fetalen Entwicklung und während einer Schwangerschaft am Gesamtorganismus ersetzen könnten.

4.1.2 Versuchsdiäten

Der Versuch wurde so angelegt, dass der Einfluss einer paternalen bzw. maternalen Hochsalzdiät auf den Phänotyp der Nachkommen erster und zweiter Generation geschlechtsspezifisch und bis in das Erwachsenenalter der Tiere untersucht werden konnte. Verwendet wurden hierzu insgesamt zwei Versuchsdiäten unterschiedlichen Salzgehaltes:

- | | | |
|----|----------------------|------------------------------------|
| I | Standarddiät (0,2 %) | (Altromin GmbH, Lage, Deutschland) |
| II | Hochsalzdiät (4 %) | (Altromin GmbH, Lage, Deutschland) |

Beide Diäten entsprachen der gleichen Nährstoffzusammensetzung und unterschieden sich lediglich im Salzgehalt. Die salzreiche Diät wurde den Tieren über einen Zeitraum von 8 Wochen verabreicht. Dies sollte sicherstellen, dass sowohl die Spermatogenese der männlichen Tiere, als auch der Zyklus der weiblichen Tiere durch den hohen Salzgehalt beeinflusst werden.

Während der Haltung und Beobachtung erhielten die Versuchstiere eine speziell auf ihre Bedürfnisse abgestimmte Haltungsdiät. Im Verlaufe der Trächtigkeit und Laktation wurden die Muttertiere umgestellt auf eine proteinreichere Zuchtdiät. Beide Diäten entsprachen derselben Zusammensetzung und unterschieden sich lediglich im Salzgehalt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Überblick über die verwendeten Versuchsdiäten. I) sind die Versuchsdiäten mit Standard-Salzgehalt (Standarddiät) und II) sind die Versuchsdiäten der Hochsalzdiät.

Diät	Proteingehalt [%]	Fettgehalt [%]	Kohlenhydratgehalt [%]	NaCl-Gehalt [%]
I) Haltungsdiät	24	11	65	0,2
I) Zuchtdiät	27	13	60	0,2
II) Haltungsdiät	24	11	65	4
II) Zuchtdiät	27	13	60	4

Die Fütterung der verschiedenen Diäten stellte grundsätzlich keine Belastung für die Tiere dar. Alle Diäten waren bedarfsdeckend, so dass Mangelzustände unter chronischer Fütterung nicht auftraten.

4.1.3 Tierhaltung

Eine den Anforderungen des § 2 des Tierschutzgesetzes entsprechende Unterbringung und Pflege einschließlich der Betreuung der Tiere sowie ihre medizinische Versorgung wurde sichergestellt.

Alle Versuchstiere wurden unter kontrollierten Umgebungsbedingungen mit 20°C Raumtemperatur, 46% Luftfeuchtigkeit und einer Lichtperiode von 6.00 Uhr bis 18.00 Uhr gehalten. Den Tieren wurden Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung gestellt. Bei dem pelletierten Futter handelte es sich um ein standardisiertes Ratten-Alleinfuttermittel.

Die Belastung der Versuchstiere wurde auf ein Mindestmaß reduziert. Darüber hinaus wurden schmerzhaft eingriffe nur unter Allgemeinnarkose durchgeführt.

4.1.4 Züchtung der Versuchstiere

Zur Durchführung des Versuches wurden nach dem Absetzen 21 Tage alte weibliche und männliche Wistar-Ratten eingesetzt. Die Tiere wurden eigens für den Versuch gezüchtet (Herkunft: Charles Rivers Laboratories).

Die Ratten der Elterngeneration F0 wurden entsprechend ihres Gewichts und ihrer Größe in 3 Versuchsgruppen eingeteilt (siehe Tabelle 6). Gruppe 1 diente hierbei als Kontrollgruppe, erhielt während des gesamten Versuchsverlaufes Standardfutter und wurde diätetisch nicht beeinflusst. In Gruppe 2 erhielten nur die Männchen, in Gruppe 3 nur die Weibchen eine Hochsalzdiät. Dies diente der Untersuchung von geschlechtsspezifischen Unterschieden in der maternalen bzw. paternalen Diät auf den Phänotyp der Nachkommen der F1-Generation.

F0-Generation:

Tabelle 6: Fütterungs- und Verpaarungsschema der F0-Generation.

Gruppe	Tieranzahl	Geschlecht	Diät
1	15	weiblich	Standard
	5	männlich	Standard
2	15	weiblich	Standard
	5	männlich	Hochsalz
3	15	weiblich	Hochsalz
	5	männlich	Standard
			Gesamtzahl: 60

Nach 8-wöchiger Fütterungszeit der entsprechenden Diäten wurden die Tiere innerhalb ihrer Gruppen weiterverpaart (Tabelle 7). Hierzu wurden jeweils ein Männchen und ein Weibchen für 3 Tage in einen Käfig zusammengesetzt. Die Männchen erhielten in dieser Zeit das gleiche Futter wie die Weibchen. Wenngleich sich die Diäten der Elterntiere in Gruppe 2 und 3 unterschieden, wurden aufgrund der kurzen Interaktionszeit (3 Tage Verpaarung) und der vorangegangenen 8-wöchigen

Fütterungsphase die diätetischen Effekte auf die Männchen als vernachlässigbar angesehen. Im Laufe der Trächtigkeit (ca. 20 Tage) und während der Laktation (21 Tage) verblieben die Weibchen der Gruppe 3 unter der salzreichen Versuchsdät. Dies diente der Sicherstellung, dass alle Phasen der fetalen Entwicklung bis hin zum Absetzen der Jungtiere unter der Versuchsdät erfolgten.

Die Jungtiere der F1-Generation wurden nach dem Absetzen (21 Tage) in weitere 6 Versuchsgruppen (4-9) eingeteilt. Sie erhielten bis hin zum Erreichen des Erwachsenenalters (6 Monate) entweder Standarddiät (Gruppen 4,6,8) oder Hochsalzdiät (Gruppen 5,7,9). Die Fütterung erfolgte nach dem *match/mismatch*-System. Das heißt, die Tiere erhielten entweder die Diät, die den Elterntieren während der intrauterinen fetalen Entwicklung gefüttert wurde (*match*), oder eine demgegenüber abweichende Diät (*mismatch*). Die Gruppen 4,6,8 dienten hierbei als Vergleichsgruppe für die Gruppen 5,7,9. Die Tiergruppen wurden zudem nach Geschlecht getrennt. Dies diente der Untersuchung von geschlechtsspezifischen Unterschieden in der fetalen Entwicklung nach diätetischer Salzbeeinflussung der Elterntiere.

F1-Generation:

Tabelle 7: Fütterungs- und Verpaarungsschema der F1-Generation.

F0	F1	Tieranzahl	Geschlecht	Diät
1	4	13	weiblich	Standard
		14	männlich	Standard
	5	14	weiblich	Hochsalz
		15	männlich	Hochsalz
2	6	16	weiblich	Standard
		15	männlich	Standard
	7	15	weiblich	Hochsalz
		15	männlich	Hochsalz
3	8	28	weiblich	Standard
		34	männlich	Standard
	9	30	weiblich	Hochsalz
		33	männlich	Hochsalz
				Gesamtzahl: 242

Ab einem Alter von 16 Wochen wurden die F1-Tieren der Gruppen 4,6,8,9 ebenso verpaart wie die F0-Tieren. Deren Nachkommen (F2-Generation) wurden nach dem Absetzen (21 Tage) in die Gruppen 10 bis 17 eingeteilt. Für diese Arbeit wurden nur die Daten der Tiere der F1-Generation verwendet, auf die F0- und F2-Generation wird daher im Folgenden nicht weiter eingegangen.

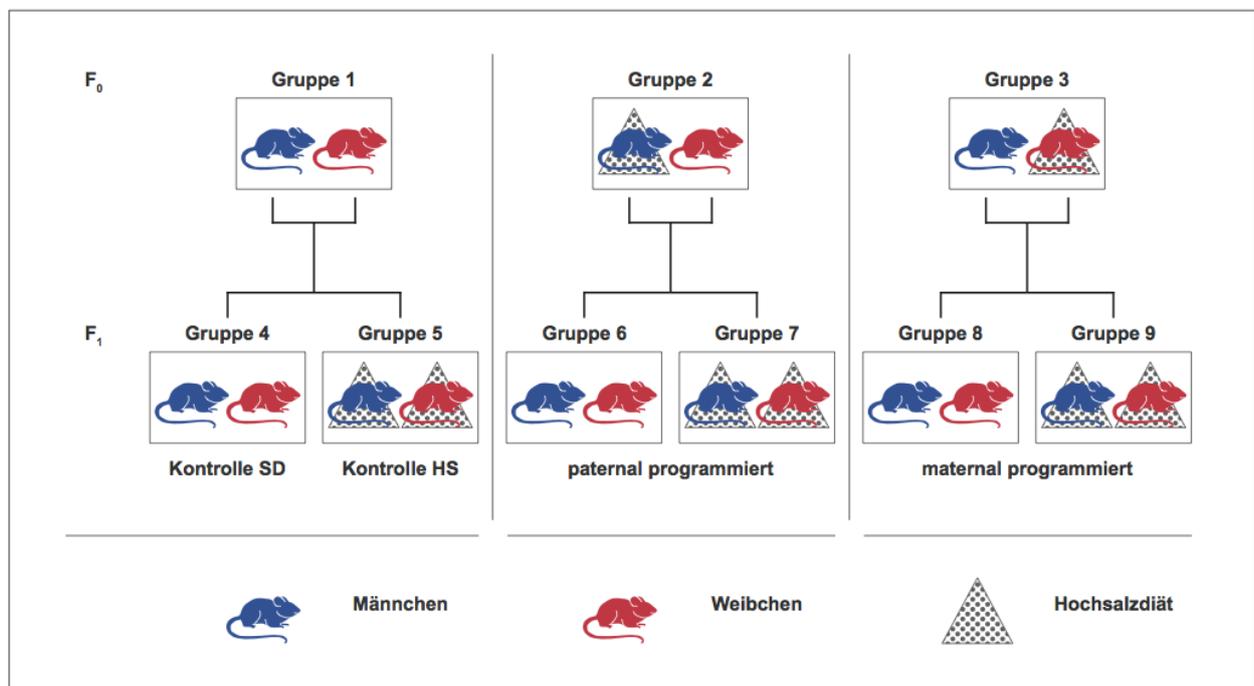


Abb. 1: Kreuzungsschema der Versuchstiere

4.1.5 Messung von Körpergewicht

Die Versuchstiere der F1-Generation wurden nach der Geburt bis zum 35. Lebensstag täglich gewogen. Danach 2x in der Woche. Dadurch wird der Einfluss der Salzdiät auf die Gewichtszunahme der Jungtiere bis in das Erwachsenenalter untersucht.

4.1.6 Blutdruckmessung

Die Messung erfolgte nichtinvasiv und für die Tiere schmerzlos mittels der *Tail-Cuff-Methode*. Hierbei wird unter Verwendung einer Druckmanschette und eines piezoelektrischen Pulsaufnehmers am Schwanz der Tiere, der systolische arterielle Blutdruck und die Herzfrequenz bestimmt. Um stressbedingte Blutdruckschwankungen

zu minimieren und die Tiere an die Messbedingungen zu gewöhnen, wurden die Ratten zuvor mehrfach mit dem Versuchsprocedere konfrontiert. Die Belastung war nach der Gewöhnung gering. Die Blutdruckmessungen erfolgten monatlich, um den Tieren eine ausreichende Erholungsphase zwischen den Messungen zu gewährleisten. Die mehrmaligen Erhebungen waren notwendig, um die Effekte der hohen Salzzufuhr mit dem Blutdruckverhalten korrelieren zu können.

4.1.7 Finalisierung der Versuchstiere

Die Tiere der F1-Generation wurden insgesamt über einen Versuchszeitraum von 24 Wochen beobachtet und anschließend in tiefer Isoflurannarkose (1,5 - 2,5 %) getötet. Entsprechend der Berliner Tierschutz-Versuchstierverordnung (§2) erfolgte anschließend die schmerzlose Tötung der Tiere durch Öffnung der großen Blutgefäße. Isofluran wirkt ausreichend analgetisch, stark muskelrelaxierend und ist aufgrund seiner schnellen An- und Abflutung gut steuerbar. Isofluran hat eine geringe Metabolisierungsrate von 0,2 % und ist daher nicht leber- oder nierentoxisch.

4.2 Western Blot

Mit der Western-Blot-Methode wurden die relativen Mengen des Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-1 (AT₁R) und Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-2 (AT₂R) sowie des Mineralokortikoid-Rezeptors (MCR) und Renin im Nierengewebe der Versuchstiere der F1-Generation ermittelt. Alle Messdurchgänge wurden mindestens drei Mal durchgeführt, wobei die Proben jeweils doppelt aufgetragen wurden. Für jede Probe ergaben sich somit 6 Untersuchungsergebnisse.

Prinzip:

Zunächst wurden die in den Proben zu untersuchenden Proteine anhand ihres Molekulargewichts durch Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Anschließend wurden sie auf eine Trägermembran übertragen und mittels primärer und sekundärer Antikörperbindung spezifisch detektiert. Abschließend folgte die Entwicklung der Membran mittels Chemilumineszenz und die Belichtung der Fotofilme in der Dunkelkammer. Eine parallel durchgeführte Amplifikation des ubiquitär vorkommenden

Housekeeping-Proteins Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), ermöglichte eine semiquantitative Analyse der Rezeptorexpressionen und so den Vergleich zwischen den Gruppen.

4.2.1 Herstellung von Gewebehomogenaten

Aus den nach der Organentnahme bei -80 °C eingefrorenen Nieren wurden, in noch tiefgefrorenem Zustand, möglichst gleichgroße, keilförmige Stücke herausgeschnitten. Hierbei wurde versucht alle Nierenabschnitte gleichermaßen zu treffen. Die Organe wurden unter Flüssigstickstoffbehandlung pulverisiert und dann in Lysepuffer mit Proteinaseinhibitor (siehe 3.3) überführt. Pro 100 mg pulverisierter Probe wurde 1 ml Lysepuffer hinzugefügt. Nach Durchmischen der Proben wurden sie mittels Ultraschall-Sonde homogenisiert (6 Durchgänge für 10 s , 5 Zyklen bei 75 %), für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert (13000 U/min bei 4 °C über 12 Minuten). Danach wurde der Überstand abgenommen und eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Im nächsten Schritt wurden von allen Proben Aliquote mit 5 µg/µl Protein hergestellt und bei -20 °C eingefroren. Weiterhin wurde eine Probenmischung aus allen Proben ebenfalls mit einer Konzentration von 5 µg/µl erstellt, die im weiteren Verlauf zur Erstellung der Standardreihen für die Western-Blots diente.

4.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der größenabhängigen Auftrennung von Proteinen aus Probelösungen. Überschüssige Proteine werden durch zugesetztes SDS (Natriumdodecylsulfat) gebunden und erhalten dadurch eine negative Ladung proportional zu ihrem Molekulargewicht. Bei Anlegen eines Spannungsfeldes wandern die SDS-Protein-Komplexe in der Gelmatrix zur Kathode und werden ihrer Molmasse entsprechend aufgetrennt.

Bei der verwendeten Methode nach Lämmli wurden die Proben zunächst in einem Sammelgel mit 5 % Polyacrylamid konzentriert und anschließend im 8 %-igen Trenngel aufgetrennt (siehe Kapitel 3.3). Es wurden dabei vertikale Doppel-Elektrophoresekammern verwendet.

Zunächst wurden die Glasplatten, Spacer, Kämme (48 Geltaschen) und Gießhalterung (*wide format mini gels*) mit Ethanol gereinigt. Weiterhin wurden 25 ml 8 %-iges (v/v) Trenngel (siehe Kapitel 3.3) hergestellt und nach korrekter Zusammensetzung der Glasplatten in der Gießhalterung zwischen die Platten eingefüllt. Zur Herstellung einer glatten Gelkante wurde das Gemisch mit 0,5 ml Isopropanol überschichtet. Nach einstündiger Polymerisation bei Raumtemperatur wurde das Isopropanol wieder abgegossen, die Kämme eingesetzt und ca. 10 ml Sammelgel (siehe Kapitel 3.3) dazugegeben, welches 30 Minuten auspolymerisierte. Nach Einsetzen der Gelhalterung in die Elektrophoresekammer wurde 1 Liter Elektrophoresepuffer (siehe Kapitel 3.3) hinzugegeben.

Die vorbereiteten Aliquots der Proben wurden mit reduzierendem Ladepuffer (Rotiload 1, Roth) und Wasser (MQ-H₂O) versetzt und über 5 Minuten bei 95 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und zentrifugiert. Mit Hilfe des Gemisches aus allen Proben wurde eine Verdünnungsreihe abfallender Konzentration (30, 25, 20, 15, 10 µg/µl) angefertigt und ebenfalls mit Ladepuffer versetzt. Im Folgenden wurden je 12 µl der Proben doppelt auf das Gel aufgetragen. Zur besseren Bestimmung des Molekulargewichts wurde ebenfalls ein gefärbtes Proteingemisch bekannter Molekulargewichtsgrößen (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) auf den Gelen aufgebracht. Die anschließende Elektrophorese wurde im Kühlraum bei 4 °C mit zunächst 80 Volt für ca. 30 Minuten durchgeführt und danach mit 120 Volt für ungefähr 1,5 Stunden fortgesetzt.

4.2.3 Proteintransfer durch Western-Blot

Die durch die vorangegangene SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden nach der Semi-Dry-Methode auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Dabei dienten die in Transferpuffer getränkten Lagen Whatman-Papier zwischen den Graphitplatten des Semidry-Blotters als Pufferreservoir, wodurch ein kontinuierliches Puffersystem genutzt werden konnte. Es wurde ein homogenes elektrisches Feld erzeugt, worin die Proteine bei einer Stromstärke von 2 mA/cm² für eine Stunde aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulosemembran übertragen wurden. Zur Kontrolle des Transfers wurde

die Nitrozellulosemembran nach dem Blotten reversibel durch Ponceau S angefärbt und mit TBS-T-Puffer wieder entfärbt.

4.2.4 Proteindetektion mit spezifischen Antikörpern

Nach dem Proteintransfer wurden die Membranen zur Blockierung freier, unspezifischer Proteinbindungsstellen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 5 %-Milch-TBS-Tween-Lösung inkubiert. Danach wurden die Nitrozellulosemembranen dreifach mit TBS-Tween gewaschen und rotierend über Nacht mit den Primärantikörpern in den folgenden Konzentrationen inkubiert:

AT₁R – 1:1000, AT_{2A}R – 1:1000, MCR – 1:1000, Renin – 1:5000, GAPDH – 1:500.000

Die Primärantikörper wurden jeweils in 5 %-iger Milch und TBS-Tween Lösung verdünnt. Da die Zielproteine unterschiedliche Molekulargewichte und damit Wanderungsverhalten im Gel aufweisen, konnten die Nitrozellulosemembranen der Länge nach zerschnitten werden, so dass eine gleichzeitige Inkubation mit mehreren Antikörpern erfolgen konnte.

Im Anschluss wurden die Membranen erneut für insgesamt eine halbe Stunde mit TBS-Tween gewaschen, um den nicht gebundenen Überschuss an Primärantikörpern zu entfernen. Dann wurde der Sekundärantikörper 1:10000 in 4 %-igem BSA verdünnt und für eine Stunde hinzugegeben. Die jeweiligen Sekundärantikörper richteten sich hierbei immer gegen spezifische Epitope der zuvor verwendeten Primärantikörper und waren zudem konjugiert mit dem Enzym horseradish peroxidase (HRP).

Daraufhin wurde erneut dreifach für insgesamt eine halbe Stunde mit TBS-Tween gewaschen. Die Sichtbarmachung der gebundenen Antikörper erfolgte mittels Chemilumineszenz. Hierfür wurden die Detektionsreagenzien (ECL Mix 1 und 2) im Verhältnis 1:1 gemischt und für 2 Minuten auf die Membranen gegeben. Das in den Reagenzien befindliche Luminol wurde durch die an den Sekundärantikörper gebundene HRP in seine oxidierte Form überführt. Hierdurch entstand Chemilumineszenz, welche durch Röntgenfilm detektiert wurde. Die Exposition der ECL (enhanced chemiluminescence) -Hyperfilme erfolgte je nach Bedarf für 3 Sekunden bis zu 10 Minuten in einer Filmkassette. Darauf folgte die Entwicklung des Filmes in der vollautomatischen Entwicklermaschine.

Die Nitrozellulosemembranen wurden nachfolgend mit Stripping-Puffer für 30 Minuten bei 50 °C in einem Hybridisierungsofen inkubiert und anschließend wiederverwendet.

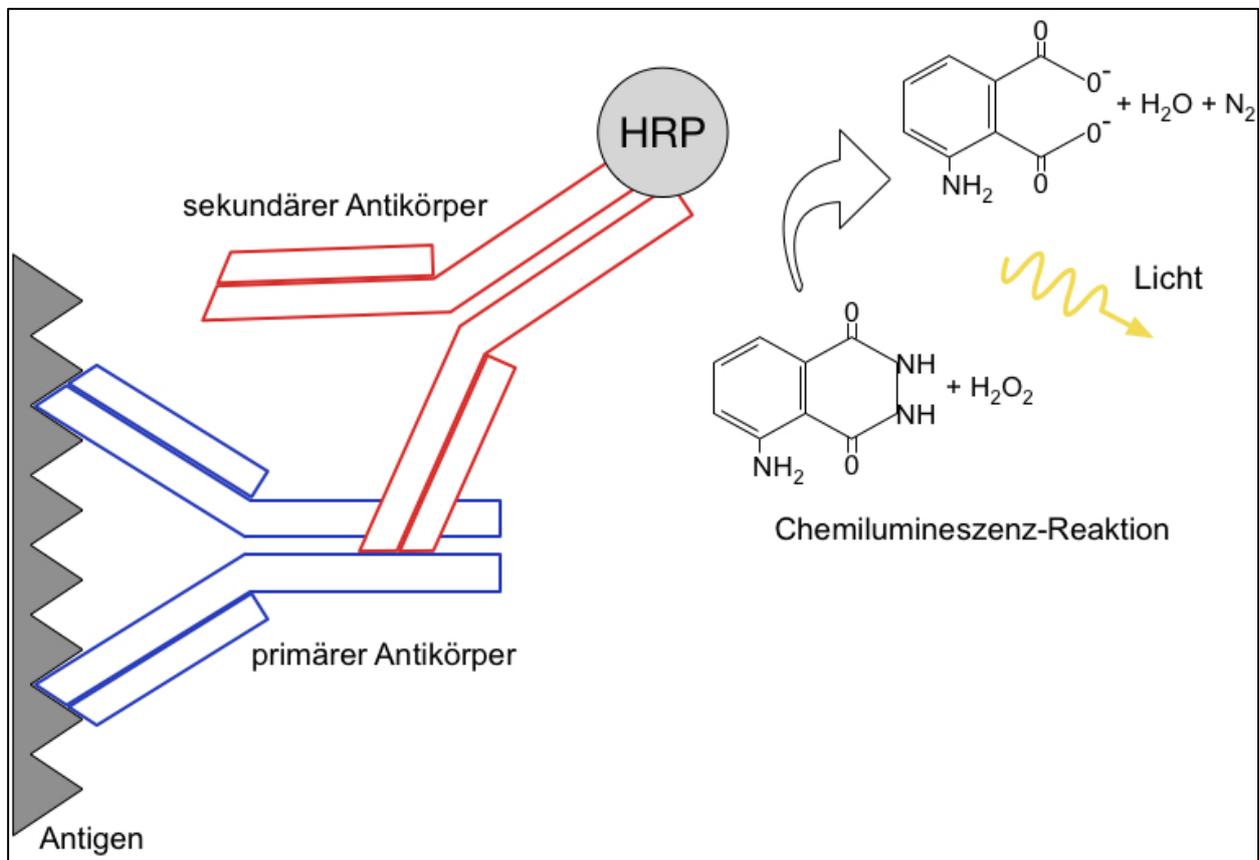


Abb. 2: Schema der Proteindetektion.

Der primäre Antikörper bindet an sein Antigen (Protein/Rezeptor) und an diesen bindet über bestimmte Epitope der sekundäre Antikörper. Dieser ist mit dem Enzym HRP gekoppelt. HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form. Die hierbei entstehende Lumineszenz kann auf einem Röntgenfilm detektiert werden. Nach der Entwicklung der Filme werden so die Proteinbanden sichtbar gemacht.

4.2.5 Auswertung

Die angefertigten Fotos wurden bei einer Auflösung von 600 dpi eingescannt und anschließend mittels Alpha Ease™ (Version 3.1.2) die Signalintensität der auf dem Film erkennbaren proteinspezifischen Banden ermittelt. Hierbei wurde aus der Verdünnungsreihe für jedes detektierte Protein und jede Membran eine Referenzgerade generiert. Zunächst wurde hierfür von dem durch Alpha Ease™ (Version 3.1.2) bestimmten *integrated density value* (Signalintensität der vermessenen Bande) der Zielproteinbande das Produkt aus der Fläche der vermessenen Bande und der

durchschnittlichen Intensität des Hintergrundes subtrahiert. Im zweiten Schritt zog man von dem erhaltenen Wert den y- Achsenabschnitt n ab und dividierte durch den linearen Faktor m der Geradengleichung ($y = mx + n$). Auf diese Art wurden die absoluten Werte der Einzelproben mit der Standardreihe abgeglichen. Somit wurde für jede Probe die relative Konzentration der Rezeptoren bzw. Renin und GAPDH ermittelt und danach ein Quotient zwischen Protein und GAPDH gebildet. Da der GAPDH-Gehalt von Probe zu Probe identisch sein sollte, diente dieser Abgleich dazu, eine relative Proteinkonzentration des Zielproteins zu bestimmen. Ferner erlaubte diese Praxis auch eine Fehlerkorrektur der Gesamtmenge an Protein, im Falle von Fehlern bzw. inkompletter Übertragung während eines Blots. Somit konnte zwar nicht die reale Proteinmenge bestimmt werden, aber die einzelnen Banden miteinander verglichen und so relative Änderungen der Proteinkonzentration angegeben werden. Eine Methode, die es ermöglicht unterschiedliche Bedingungen der Experimente auszugleichen. Alle Messungen wurden mindestens dreimal durchgeführt, wobei die Proben pro Durchgang jeweils doppelt aufgetragen wurden. Somit konnte für jedes gemessene Protein 6 Werte ermittelt werden, mit deren Mittelwert im Folgenden gerechnet wurde.

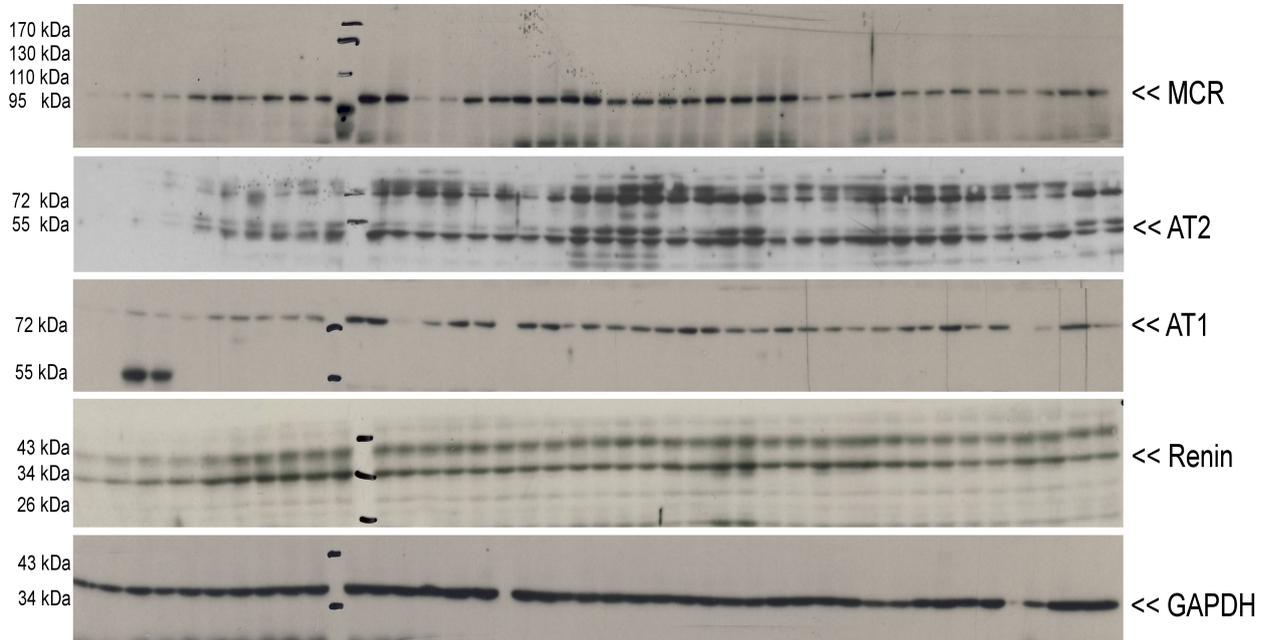


Abb. 3: Beispielbild belichteter, entwickelter und eingescannter Fotos der zu bestimmenden Proteinbanden.

Von oben nach unten: Proteinbanden des MCR bei 102 Kilodalton (kDa), AT₂ bei 50 kDa (Doppelbande gewertet), AT₁ bei 70 kDa, Renin bei 34 kDa (obere Bande am ehesten Prorenin), GAPDH bei 30 kDa. Am linken Bildrand ist die atomare Masse der eingezeichneten Markerbanden beschrieben.

4.2.6 Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit den Programmen SPSS® 16.0 für Windows sowie GraphPad Prism® 5 für Windows. Die Daten wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Tests bezüglich ihrer Normalverteilung getestet. Lag diese vor, wurde je nach Anzahl der Gruppen bzw. Variablen mittels one-way-ANOVA oder two-way-ANOVA statistisch signifikante Unterschiede ermittelt und diese anschließend post-hoc mittels Bonferroni-Test überprüft. Lag für die untersuchten Daten keine Gaußsche Normalverteilung vor, wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test mit Dunnet-Test post-hoc für nichtparametrische Daten verwendet. Als signifikant wurden Werte von $p \leq 0,05$ angenommen und in den Graphiken mit * / + / # gekennzeichnet. Signifikanzlevel von $p \leq 0,01$ wurden mit ** / ++ / ## sowie $p \leq 0,001$ mit *** / +++ / ### markiert. War die Irrtumswahrscheinlichkeit größer als 0,05 ($p > 0,05$), so wurde die Nullhypothese angenommen und die Unterschiede als nicht signifikant gewertet. Die Daten wurden für alle Messreihen geschlechtsspezifisch aufgeteilt und als Mittelwerte mit Angabe des Standardfehlers des Mittelwerts (standard error of the mean = SEM) dargestellt.

5. ERGEBNISSE

Im Folgenden werden die erhobenen Daten nach ihrer statistischen Verifizierung als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Es wurden sechs Gruppen der F1 Nachkommen Generation untersucht, welche bis hin zum Erreichen des Erwachsenenalters (24 Wochen) entweder Standarddiät (Kontrolle SD, Paternal SD, Maternal SD) oder Hochsalzdiät (Kontrolle HS, Paternal HS, Maternal HS) erhielten. Im Nachfolgenden werden die Abkürzungen SD für Standarddiät und HS für Hochsalzdiät verwendet. Die Fütterung erfolgte nach dem match/mismatch-System, das heißt, die Tiere erhielten entweder die Diät, die den Elterntieren gefüttert wurde (match), oder eine davon abweichende Diät (mismatch). Die Standarddiät-Gruppen dienten hierbei als Vergleichsgruppe für die Hochsalzdiät-Gruppen. Als Kontrollgruppen (Kontrolle SD, Kontrolle HS) werden die Nachkommen des in der F0 Generation ausschließlich SD gefütterten Elternpaares herangezogen, da in ihrem Fall keine Programmierung durch die parentale Diät vorliegt.

Bei allen sechs Gruppen wurden allgemeine Daten wie Verlauf des Körpergewichts und des Blutdrucks sowie die Organgewichte der nach der Tötung entnommenen Nieren erhoben. Den Schwerpunkt dieser Arbeit stellt die Untersuchung einer etwaigen Diät-assoziierten Programmierbarkeit des RAAS der Niere dar. Hierbei steht vor allem das Immunoblotting der zentralen RAAS Proteine im Vordergrund. Weitere Daten, die während des Versuchs erhoben wurden, wie z. B. die Ergebnisse der Histologie, Urinuntersuchungen oder des Glukosestoffwechsels sind nicht Bestandteil dieser Promotion und werden hier nicht weiter vorgestellt.

5.1 Hämodynamik

5.1.1 Blutdruck

Der systolische Blutdruck der Versuchstiere wurde nichtinvasiv mittels Tail-Cuff-Methode gemessen (vgl. Kap. 4.1.6).

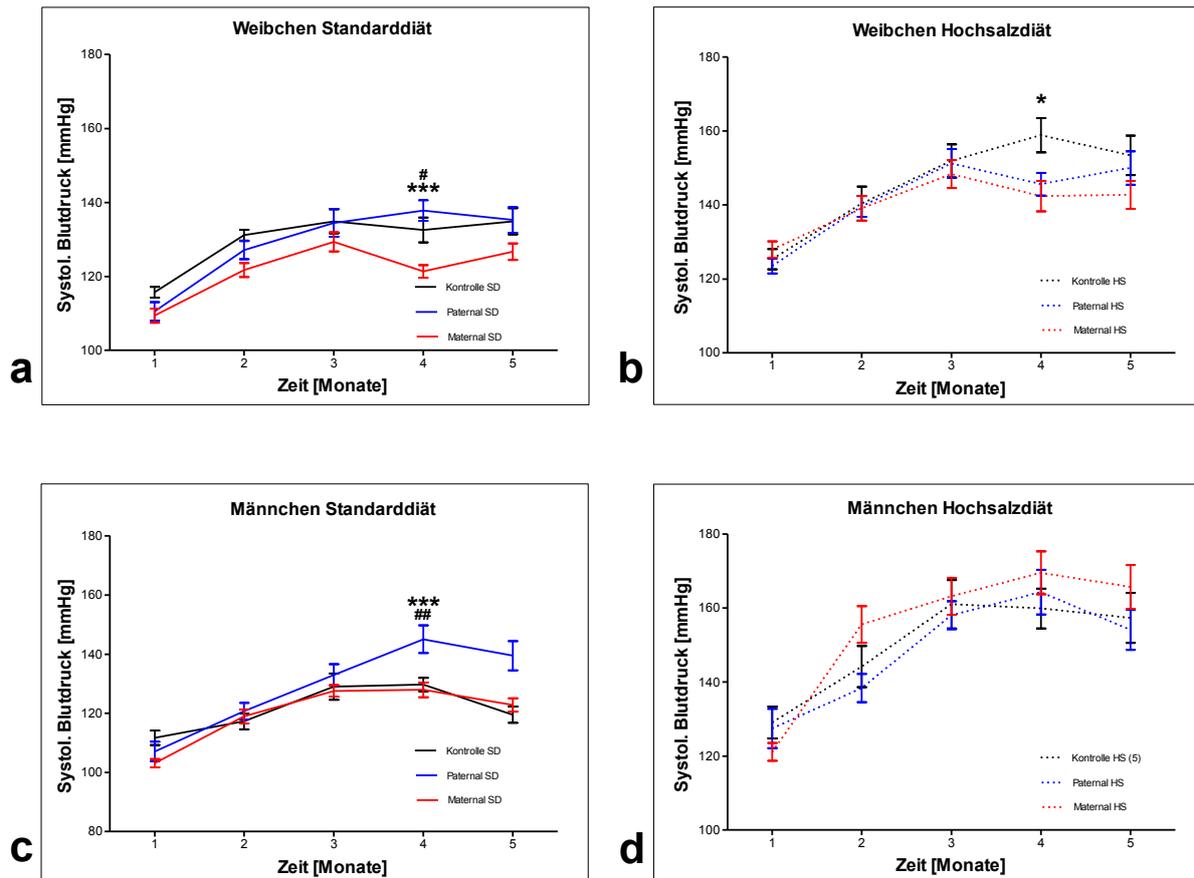


Abb. 4: Mittlerer systolischer Blutdruck der Versuchstiere aufgeteilt nach Geschlecht und den verschiedenen Versuchsdiäten über fünf Monate.

Angegebene Werte: Mittelwert \pm Standardfehler, $n = 13-34$, two-way ANOVA mit adjustiertem p-Wert nach Bonferroni-Testung **a**: Weibchen Standarddiät ***: $p \leq 0,001$ Paternal SD vs. Maternal SD, #: $p \leq 0,05$ Kontrolle SD vs. Maternal SD **b**: Weibchen Hochsalzdiät *: $p \leq 0,05$ Kontrolle HS vs. Maternal HS und Paternal HS **c**: Männchen Standarddiät ***: $p \leq 0,001$ Paternal SD vs. Maternal SD, ##: $p \leq 0,01$ Paternal SD vs. Kontrolle SD **d**: keine signifikanten Unterschiede.

Bei den weiblichen Tieren der SD-Gruppen zeigte sich bei den maternal programmierten Versuchstieren gegenüber den anderen beiden Gruppen ein im vierten Lebensmonat durchschnittlich signifikant niedrigerer mittlerer systolischer Blutdruck ($121,4 \pm 3,4$ mmHg, $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle SD ($132,6 \pm 3,6$ mmHg) und $p \leq 0,001$ vs. Paternal SD ($137,8 \pm 4,9$ mmHg)). Bei den mit HS gefütterten weiblichen Versuchstieren der Kontrollgruppe konnte im vierten Lebensmonat ein gegenüber den anderen beiden Gruppen signifikant höherer ($158,9 \pm 5,9$ mmHg, $p \leq 0,05$) mittlerer Blutdruck gemessen werden. Im Verlauf hob sich dieser Unterschied wieder auf.

In der Gruppe der mit SD gefütterten Männchen wurde bei den paternal programmierten Versuchstieren ebenfalls im vierten Lebensmonat ein gegenüber der Kontrollgruppe und der maternal programmierten Tiere signifikant höherer Blutdruck

gemessen ($145,1 \pm 6,8$ mmHg, $p \leq 0,01$ vs. Kontrolle SD ($129,7 \pm 3,4$ mmHg) und $\leq 0,001$ Maternal SD ($127,9 \pm 4,5$ mmHg)). Bei den männlichen Versuchstieren der HS-Gruppe zeigten sich dagegen bezüglich des systolischen Blutdrucks keine signifikanten Unterschiede.

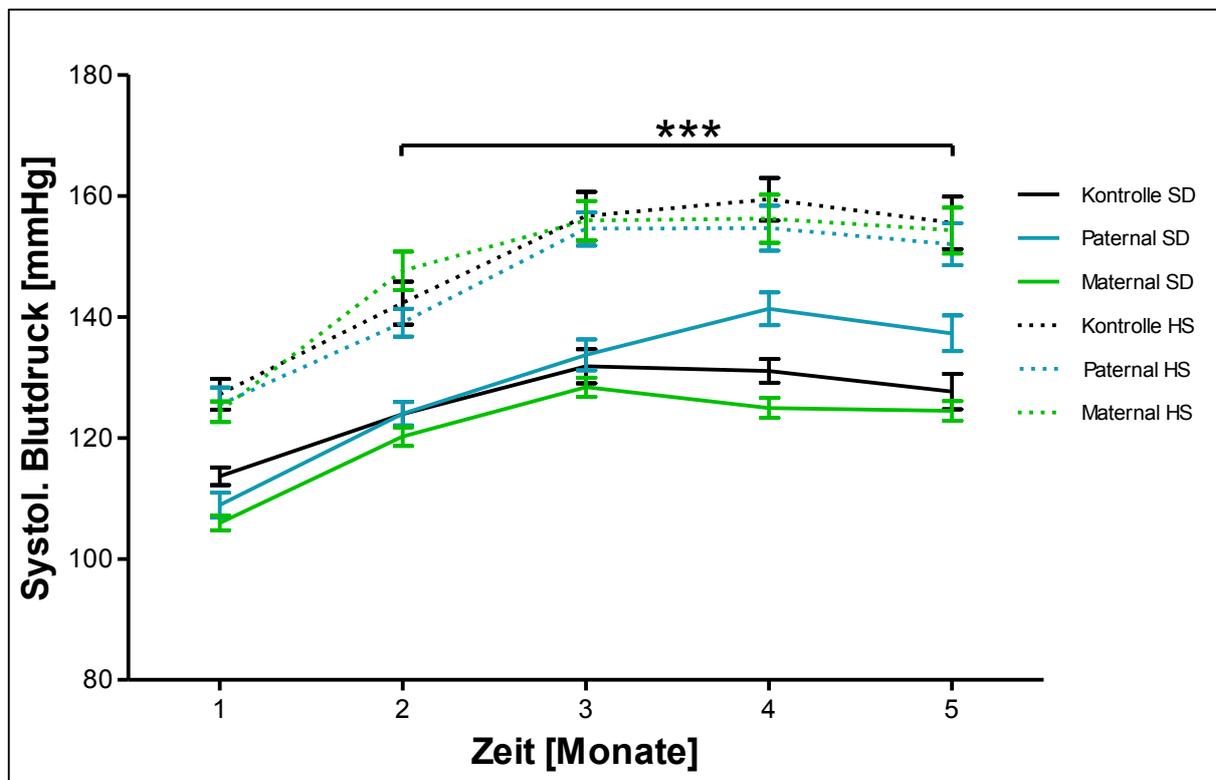


Abb. 5: Mittlerer systolischer Blutdruck aller Versuchstiere aufgeteilt nach Versuchsdiäten zu den verschiedenen Messzeitpunkten.

Angegebene Werte: Mittelwert \pm Standardfehler, $n = 27-67$, two-way ANOVA mit adjustiertem p -Wert nach Bonferroni-Testung: ***: $p \leq 0,001$ Hochsalzdiät-Gruppen vs. Standarddiät-Gruppen.

Vergleicht man alle Versuchsgruppen unabhängig vom Geschlecht miteinander (siehe Abb. 5), zeigte sich ab dem zweiten Monat ein hochsignifikanter Unterschied ($p \leq 0,001$) zwischen dem mittleren systolischen Blutdruck der mit HS gefütterten Versuchstiere ($144,2 - 156,6 \pm 1,9 - 2,37$) und den Tieren, denen SD gefüttert wurde ($122,0 - 130,1 \pm 3,3 - 5,8$ mmHg). Im Mittel hatten die HS-Tiere einen systolischen Blutdruck von $147,1 \pm 1,0$ mmHg und die SD-Tieren einen systolischen Blutdruck von $123,9 \pm 0,6$ mmHg. Insgesamt bestand also durchschnittlich ein Druckunterschied von rund 23,2 mmHg. Dieser Effekt blieb bis zum Versuchsende (168. Tag) bestehen. Zwischen den Gruppen mit gleicher Versuchsdiät bestand kein signifikanter Blutdruckunterschied.

5.2 Gewichte

5.2.1 Geburtsgewicht

Als Geburtsgewicht wurde das am 1. Lebenstag erhobene Gewicht in Gramm herangezogen. Bezüglich des Geburtsgewichts ergaben sich weder bei den männlichen, noch bei den weiblichen Tieren aller Versuchsgruppen, signifikante Unterschiede (siehe Abb. 6).

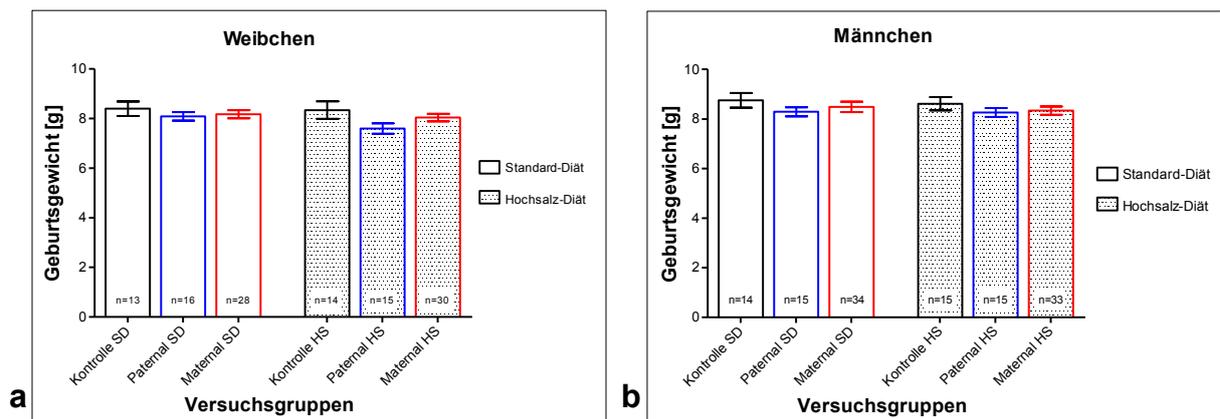


Abb. 6: Geburtsgewichte der Versuchstiere aufgeteilt nach Geschlecht und Versuchsgruppen.

Angegebene Werte: Mittelwert \pm Standardfehler sowie Anzahl der Versuchstiere (n) pro Versuchsgruppe, **a**: keine signifikanten Unterschiede **b**: keine signifikanten Unterschiede.

5.2.2 Gewichtsverlauf

Zur Erstellung der Wachstumskurven wurden die zu verschiedenen Zeitpunkten erhobenen Körpergewichte der Tiere (erster bis 35. Lebenstag tägliches Wiegen, 35. bis 168. Lebenstag zwei Mal wöchentliches Wiegen) verwendet. (Abb. 7)

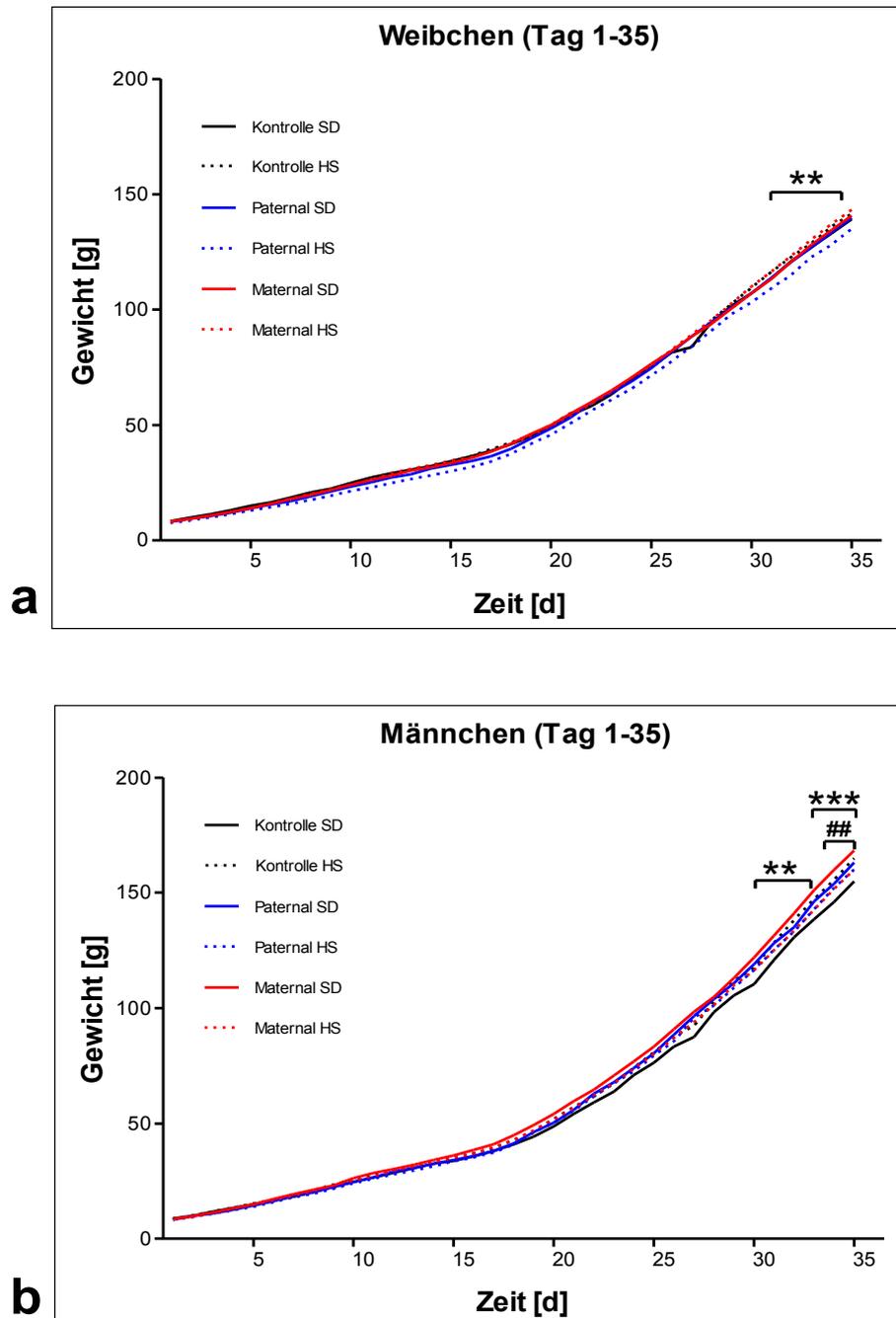


Abb. 7: Gewichtsverlauf der Versuchstiere von Tag 1 – 35 aufgeteilt nach Geschlecht und Versuchsgruppen.

Angegebene Werte: Mittelwerte, n= 13-34, **a**: **: $p \leq 0,01$ Maternal HS vs. Paternal HS (Tag 32-35) **b**: **: $p \leq 0,01$ Maternal SD vs. Kontrolle SD (Tag 27-32), ***: $p \leq 0,001$ Maternal SD vs. Kontrolle SD, ##: $p \leq 0,01$ Kontrolle HS vs. Kontrolle SD (Tag 34-35).

Im Falle der Weibchen wogen während der ersten 35 Tage die paternal programmierten Tiere aus der HS-Gruppe zu jedem Zeitpunkt am wenigsten. Signifikante Gewichtsunterschiede ($p \leq 0,01$) ergaben sich aber erst vom 32. – 35. Lebenstag zwischen den maternal und paternal programmierten Tieren der HS-Gruppe.

Bei den männlichen Versuchstieren wogen die maternal programmierten Tiere der SD-Gruppe durchschnittlich im Verlauf am meisten und die mit SD gefütterten Kontrolltiere am wenigsten. Aber auch hier zeigten sich erst ab dem 27. Lebenstag signifikante Unterschiede ($p \leq 0,01$ / $p \leq 0,001$). Zusätzlich ergab sich ein signifikanter ($p \leq 0,01$) Gewichtsunterschied zwischen den beiden Kontrollgruppen der verschiedenen Versuchsdäten.

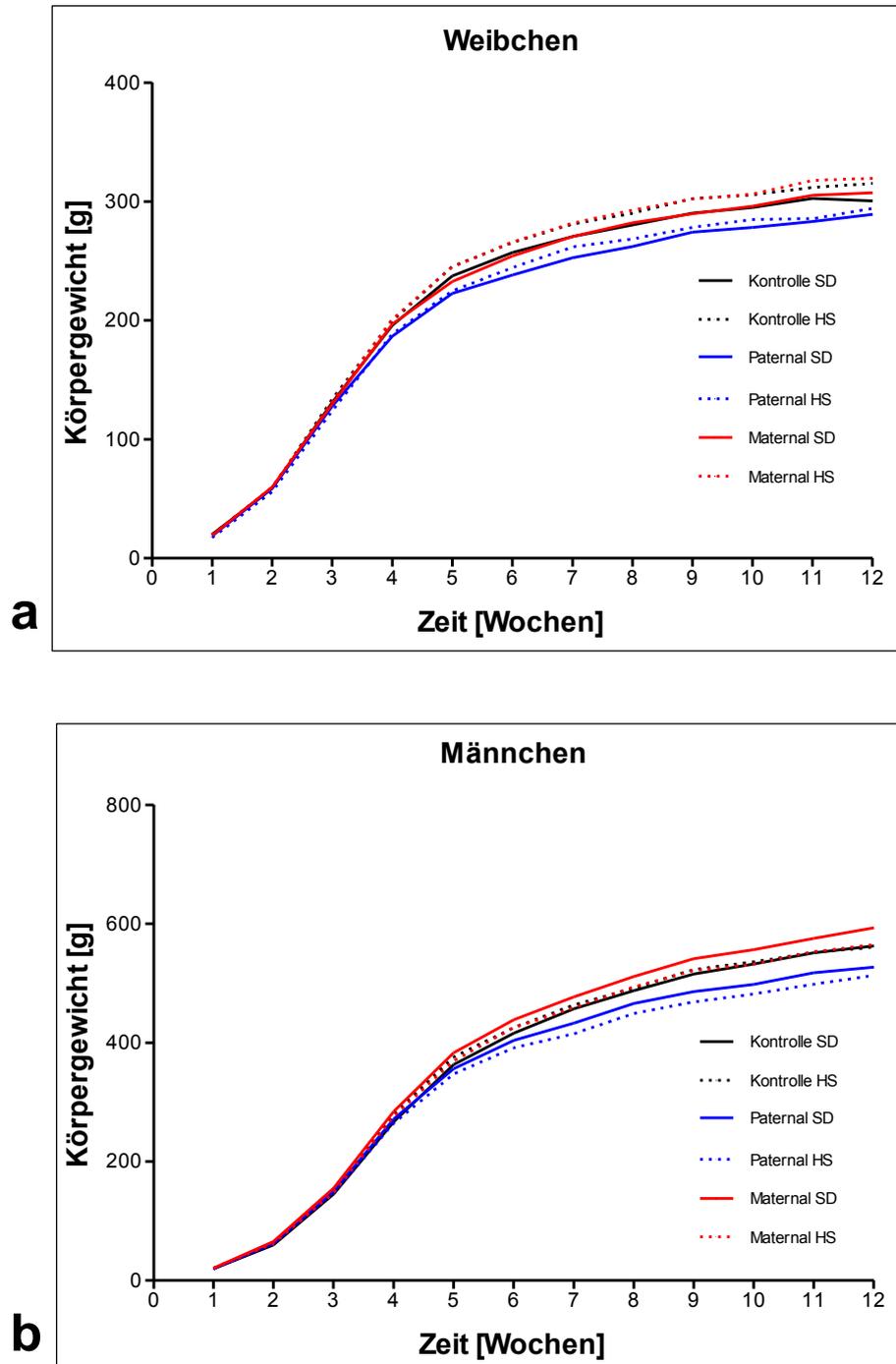


Abb. 8: Gewichtsverlauf der Versuchstiere von Woche 1 – 24 aufgeteilt nach Geschlecht und Versuchsgruppen.

Angegebene Werte: Zur besseren Übersicht sind jeweils 2 Wochen zusammengefasst, Mittelwerte, n= 13-34 **a:** keine signifikanten Unterschiede **b:** keine signifikanten Unterschiede

Bei der Betrachtung der Gewichtsverläufe über 24 Wochen ergaben sich keine weiteren signifikanten Unterschiede (siehe Abb. 8).

Unabhängig vom Geschlecht und der eigenen Diät wogen die paternal programmierten Tiere im Verlauf weniger als alle anderen Versuchstiere. Ferner wogen die maternal

programmierten Versuchstiere im Verlauf unabhängig von Geschlecht und eigener Diät mehr als alle anderen Tiere.

5.2.3 Finalgewicht

Das kurz vor der Tötung der Versuchstiere erhobene Gewicht wird nachfolgend als Finalgewicht bezeichnet (Abb. 9).

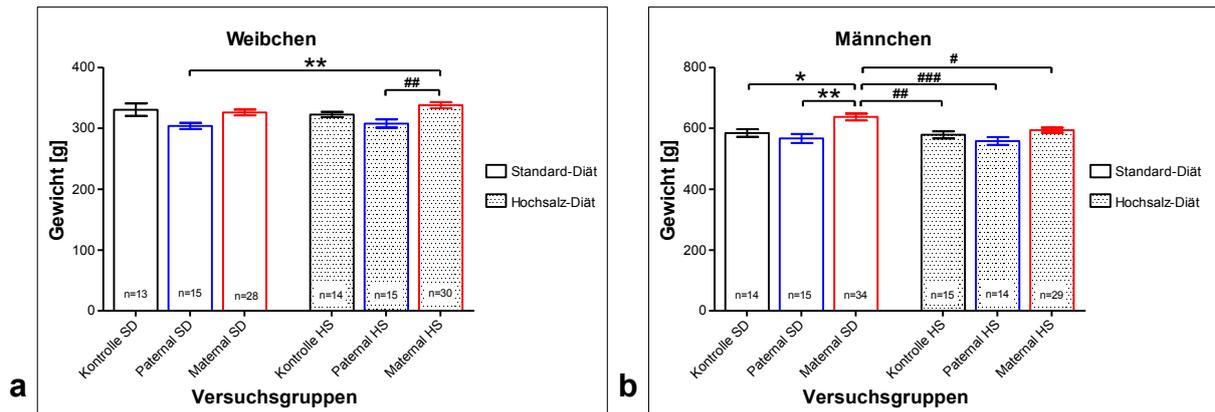


Abb. 9: Mittleres Finalgewicht der Versuchstiere aufgeteilt nach Geschlecht und Versuchsgruppen.

Angegebene Werte: Mittelwert \pm Standardfehler, sowie Anzahl der Versuchstiere (n) pro Versuchsgruppe
a: **: $p \leq 0,01$ Paternal SD vs. Maternal HS, ##: $p \leq 0,01$ Paternal HS vs. Maternal HS
b: *: $p \leq 0,05$ Maternal SD vs. Kontrolle SD, **: $p \leq 0,01$ Maternal SD vs. Paternal SD, #: $p \leq 0,05$ Maternal SD vs. Maternal HS, ###: $p \leq 0,001$ Maternal SD vs. Paternal HS.

Bei den weiblichen Versuchstieren wogen die maternal programmierten Tiere der HS-Gruppe im Mittel signifikant mehr ($338,0 \pm 5,2g$, $p \leq 0,01$), als die Weibchen der paternal programmierten HS- ($307,9 \pm 6,7g$) und SD-Gruppe ($304,0 \pm 4,9g$). Zwischen den übrigen Versuchsgruppen bestanden zum Zeitpunkt der Tötung keine signifikanten Gewichtsunterschiede.

Bei den männlichen Versuchstieren wogen die maternal programmierten Tiere der SD-Gruppe signifikant mehr ($p \leq 0,05$ vs. Maternal HS und Kontrolle SD / $p \leq 0,01$ vs. Paternal SD und Kontrolle HS / $p \leq 0,001$ vs. Paternal HS) als die Tiere aller anderen Versuchsgruppen. Hierbei war der Gewichtsunterschied zu den Tieren der paternalen HS-Gruppe am größten ($p \leq 0,001$). Darüber hinaus gab es keine signifikanten Gewichtsunterschiede zwischen den übrigen Versuchsgruppen.

5.2.4 Absolutes Nierengewicht

Das Gewicht der Nieren wurde direkt nach deren Entnahme gemessen.

Bezüglich des absoluten Nierengewichts der Weibchen ergab sich ein hochsignifikanter Gewichtsunterschied ($p \leq 0,001$) zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen der unterschiedlichen Versuchsdäten (SD vs. HS) (siehe Abb. 10a).

Bei den männlichen Versuchstieren war der Gewichtsunterschied zwischen den maternal programmierten Tieren der HS-Gruppe und den mit SD gefütterten Versuchstieren am größten ($p \leq 0,001$) (siehe Abb. 10b). Signifikante Gewichtsunterschiede ergaben sich aber auch zwischen den maternal und paternal programmierten Tieren der HS ($p \leq 0,05$) sowie zwischen den Kontrolltieren der HS und den Kontrolltieren sowie den paternal programmierten Tieren der SD-Gruppe ($p \leq 0,05$) (siehe Tabelle 8 und 9).

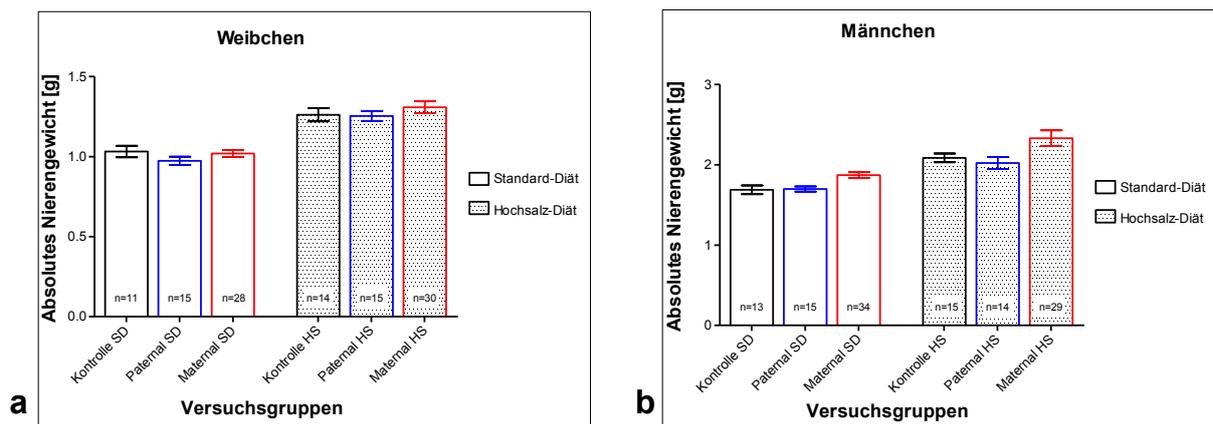


Abb. 10: Mittleres absolutes Nierengewicht der Versuchstiere aufgeteilt nach Geschlecht und Versuchsgruppe.

Angegebene Werte: Mittelwert \pm Standardfehler sowie Anzahl der Versuchstiere (n) pro Versuchsgruppe.

Tabelle 8: Mittleres absolutes Nierengewicht der weiblichen Versuchstiere aufgeteilt nach Versuchsgruppen.

Angegebene Werte: Mittelwert \pm Standardfehler, ***: $p \leq 0,001$ alle Hochsalzdiät-Gruppen vs. alle Standarddiät-Gruppen

Versuchsgruppen (Weibchen)	Mittleres absolutes Nierengewicht [g]
Kontrolle SD	1,03 \pm 0,04
Paternal SD	0,97 \pm 0,03
Maternal SD	1,02 \pm 0,02
Kontrolle HS	1,26 \pm 0,04 ***
Paternal HS	1,25 \pm 0,03 ***
Maternal HS	1,31 \pm 0,04 ***

Tabelle 9: Mittleres absolutes Nierengewicht der männlichen Versuchstiere aufgeteilt nach Versuchsgruppen.

Angegebene Werte: Mittelwert \pm Standardfehler, *: $p \leq 0,05$ Kontrolle HS vs. Kontrolle SD, #: $p \leq 0,05$ Kontrolle HS vs. Paternal SD, +: $p \leq 0,05$ Maternal HS vs. Paternal HS, ***: $p \leq 0,001$ Maternal HS vs. Paternal SD, ####: $p \leq 0,001$ Maternal HS vs. Maternal SD, +++: $p \leq 0,001$ Maternal HS vs. Kontrolle SD.

Versuchsgruppen (Männchen)	Mittleres absolutes Nierengewicht [g]
Kontrolle SD	1,69 \pm 0,05
Paternal SD	1,70 \pm 0,03
Maternal SD	1,87 \pm 0,04
Kontrolle HS	2,09 \pm 0,05 *, #
Paternal HS	2,02 \pm 0,07
Maternal HS	2,33 \pm 0,09 +, ***, ####, +++

5.2.5 Relatives Nierengewicht

Das Gewicht der Nieren wurde nach deren Entnahme gemessen und auf das Körpergewicht der Tiere bezogen.

Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsdäten, jedoch nicht innerhalb der Gruppen mit gleicher Diät (siehe Abb. 12). Die Versuchsgruppen mit Hochsalzdiät (Kontrolle HS, Paternal HS, Maternal HS) hatten sowohl bei den Weibchen, als auch bei den Männchen gegenüber den Versuchsgruppen mit Standarddiät (Kontrolle SD, Paternal SD, Maternal SD) signifikant höhere relative Nierengewichte (siehe Tabelle 10 und 11).

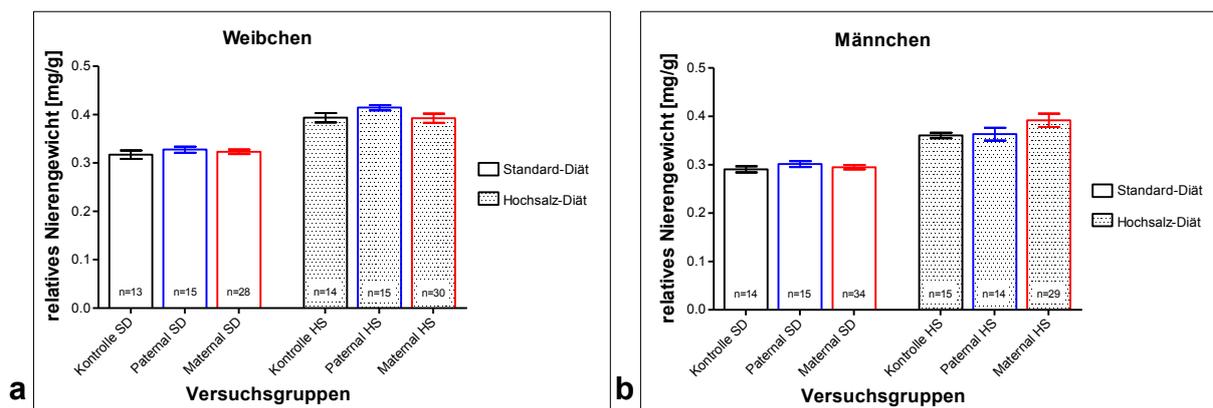


Abb. 11: Mittleres relatives Nierengewicht der Versuchstiere aufgeteilt nach Geschlecht und Versuchsgruppen.

Angegebene Werte: Mittelwert \pm Standardfehler, sowie Anzahl der Versuchstiere (n) pro Versuchsgruppe

Tabelle 10: Mittleres relatives Nierengewicht der weiblichen Versuchstiere aufgeteilt nach Versuchsgruppen.

Angegebene Werte: Mittelwert \pm Standardfehler, *: $p \leq 0,05$ vs. Paternal SD, **: $p \leq 0,01$ vs. Maternal SD, ***: $p \leq 0,001$ vs. Kontrolle SD, ####: $p \leq 0,001$ vs. Kontrolle SD und Paternal SD und Maternal SD, ++: $p \leq 0,01$ vs. Paternal SD, +++: $p \leq 0,001$ vs. Kontrolle SD und Maternal SD.

Versuchsgruppen (Weibchen)	Mittleres relatives Nierengewicht [g]
Kontrolle SD	0,27 \pm 0,03
Paternal SD	0,33 \pm 0,01
Maternal SD	0,32 \pm 0,01
Kontrolle HS	0,38 \pm 0,01 *.,***,****
Paternal HS	0,41 \pm 0,01 ####
Maternal HS	0,39 \pm 0,01 ++,+++

Tabelle 11: Mittleres relatives Nierengewicht der männlichen Versuchstiere aufgeteilt nach Versuchsgruppen.

Angegebene Werte: Mittelwert \pm Standardfehler, *: $p \leq 0,05$ vs. Paternal SD, **: $p \leq 0,01$ vs. Maternal SD, ***: $p \leq 0,001$ vs. Kontrolle SD, #: $p \leq 0,05$ vs. Paternal SD, ####: $p \leq 0,001$ vs. Kontrolle SD und Maternal SD, +++: $p \leq 0,001$ vs. Kontrolle SD und Paternal SD und Maternal SD.

Versuchsgruppen (Männchen)	Mittleres relatives Nierengewicht [g]
Kontrolle SD	0,27 \pm 0,02
Paternal SD	0,30 \pm 0,01
Maternal SD	0,30 \pm 0,01
Kontrolle HS	0,36 \pm 0,01 *.,***,****
Paternal HS	0,36 \pm 0,01 #, ####
Maternal HS	0,39 \pm 0,01 +++

Beim Vergleich der mittleren relativen Nierengewichte der Versuchstiere, aufgeteilt nach Geschlecht und Versuchsdiät, zeigte sich, dass die mit HS gefütterten Versuchstiere (Weibchen und Männchen) jeweils hochsignifikant höhere relative Nierengewichte ($p \leq 0,001$) aufwiesen, als ihre mit SD gefütterten Artgenossen (siehe Abb. 12). Zudem zeigte sich, dass die relativen Nierengewichte der mit SD gefütterten Weibchen signifikant ($p \leq 0,05$) höher waren, als die der mit SD gefütterten Männchen.

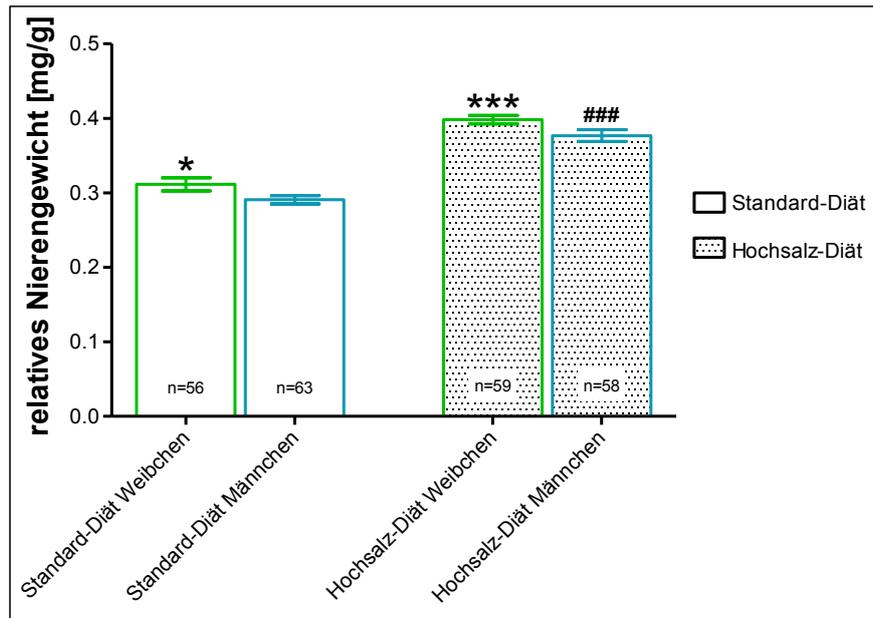


Abb. 12: Mittleres relatives Nierengewicht der Versuchstiere aufgeteilt nach Geschlecht und Versuchsdiäten.

Angegebene Werte: Mittelwerte \pm Standardfehler, sowie Anzahl der Versuchstiere (n), *: $p \leq 0,05$ Standarddiät Weibchen vs. Standarddiät Männchen, ***: $p \leq 0,001$ Hochsalzdiät Weibchen vs. Standarddiät Weibchen und Männchen, ###: $p \leq 0,001$ Hochsalzdiät Männchen vs. Standarddiät Weibchen und Männchen.

5.3 Western Blot

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Western Blot Untersuchungen der rechten Nieren nach untersuchten Proteinen aufgeteilt und graphisch dargestellt. Die in den Graphen als „*Relative Expression*“ angegebene Größe bezeichnet die zu dem jeweiligen GAPDH-Gehalt der Proben relative Proteinkonzentration.

5.3.1 Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-1 (AT₁-Rezeptor)

Bei den weiblichen Versuchstieren der SD-Gruppe zeigte sich bei den maternal programmierten Tieren eine signifikant höhere relative Proteinexpression, als bei den paternal programmierten ($p \leq 0,01$) und den Kontrolltieren ($p \leq 0,001$). In der Gruppe der mit HS gefütterten Weibchen war ebenfalls bei den maternal programmierten Tieren die relative Proteinkonzentration signifikant höher, als bei den beiden anderen Gruppen ($p \leq 0,01$ vs. Paternal HS und $p \leq 0,001$ vs. Kontrolle HS). Darüber hinaus unterschieden sich die paternal programmierten Versuchstiere in ihrer relativen Proteinexpression signifikant ($p \leq 0,001$) von den Kontrolltieren der HS-Gruppe.

Bei den männlichen Ratten der SD-Gruppe war die relative Expression des AT₁-Rezeptors bei der Kontrollgruppe signifikant niedriger, als bei den maternal- ($p \leq 0,05$) und paternal programmierten ($p \leq 0,01$) Versuchstieren. Im Falle der mit HS gefütterten Männchen zeigte sich die relative Expression bei den maternal programmierten Ratten, als signifikant höher ($p \leq 0,01$) im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe.

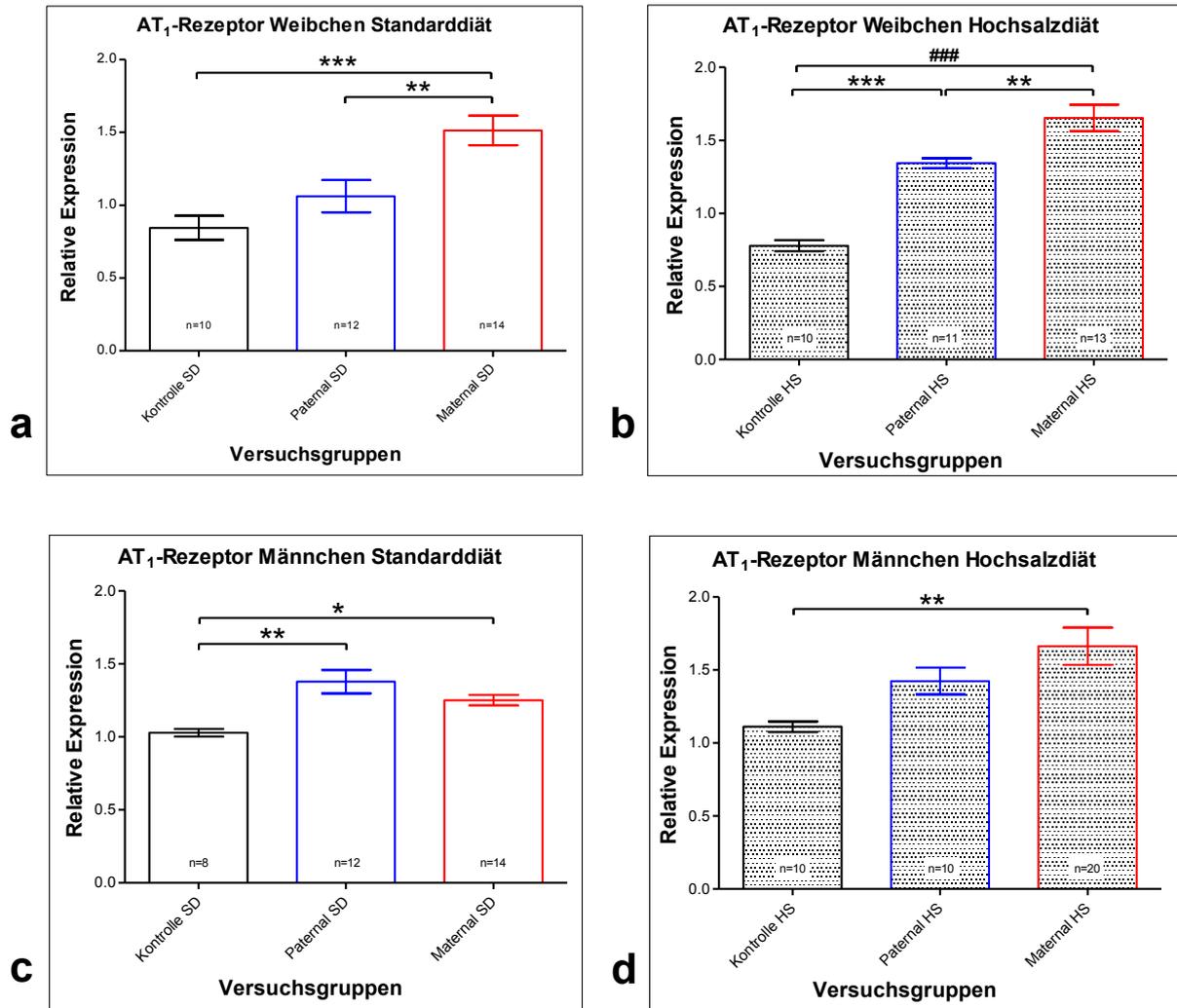


Abb. 13: Mittlere relative Proteinexpression des Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-1 aufgeteilt nach Geschlecht und Versuchsgruppen.

Angegebene Werte: Mittelwert \pm Standardfehler, sowie Anzahl der Versuchstiere (n) pro Versuchsgruppe, **a:** Weibchen Standarddiät **: $p \leq 0,01$ Maternal SD vs. Paternal SD, ***: $p \leq 0,001$ Maternal SD vs. Kontrolle SD **b:** Weibchen Hochsalzdiät **: $p \leq 0,01$ Maternal HS vs. Paternal HS, ***: $p \leq 0,001$ Paternal HS vs. Kontrolle HS, ###: $p \leq 0,001$ Maternal HS vs. Kontrolle HS **c:** Männchen Standarddiät *: $p \leq 0,05$ Maternal SD vs. Kontrolle SD, **: $p \leq 0,01$ Paternal SD vs. Kontrolle SD **d:** Männchen Hochsalzdiät **: $p \leq 0,01$ Maternal HS vs. Kontrolle HS.

5.3.2 Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-2 (AT₂-Rezeptor)

Bezüglich der relativen Expression des AT₂-Rezeptors zeigte sich nur bei den mit SD gefütterten Weibchen ein signifikanter Unterschied ($p \leq 0,01$) zwischen der Kontrollgruppe und den paternal programmierten Versuchstieren. Bei den weiblichen Versuchstieren denen HS gefüttert wurde sowie bei allen männlichen Ratten, zeigten sich diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede. Insgesamt ist die AT₂-Rezeptor Expression bei den mit HS gefütterten Tieren niedriger, als bei denen die mit SD gefüttert wurden.

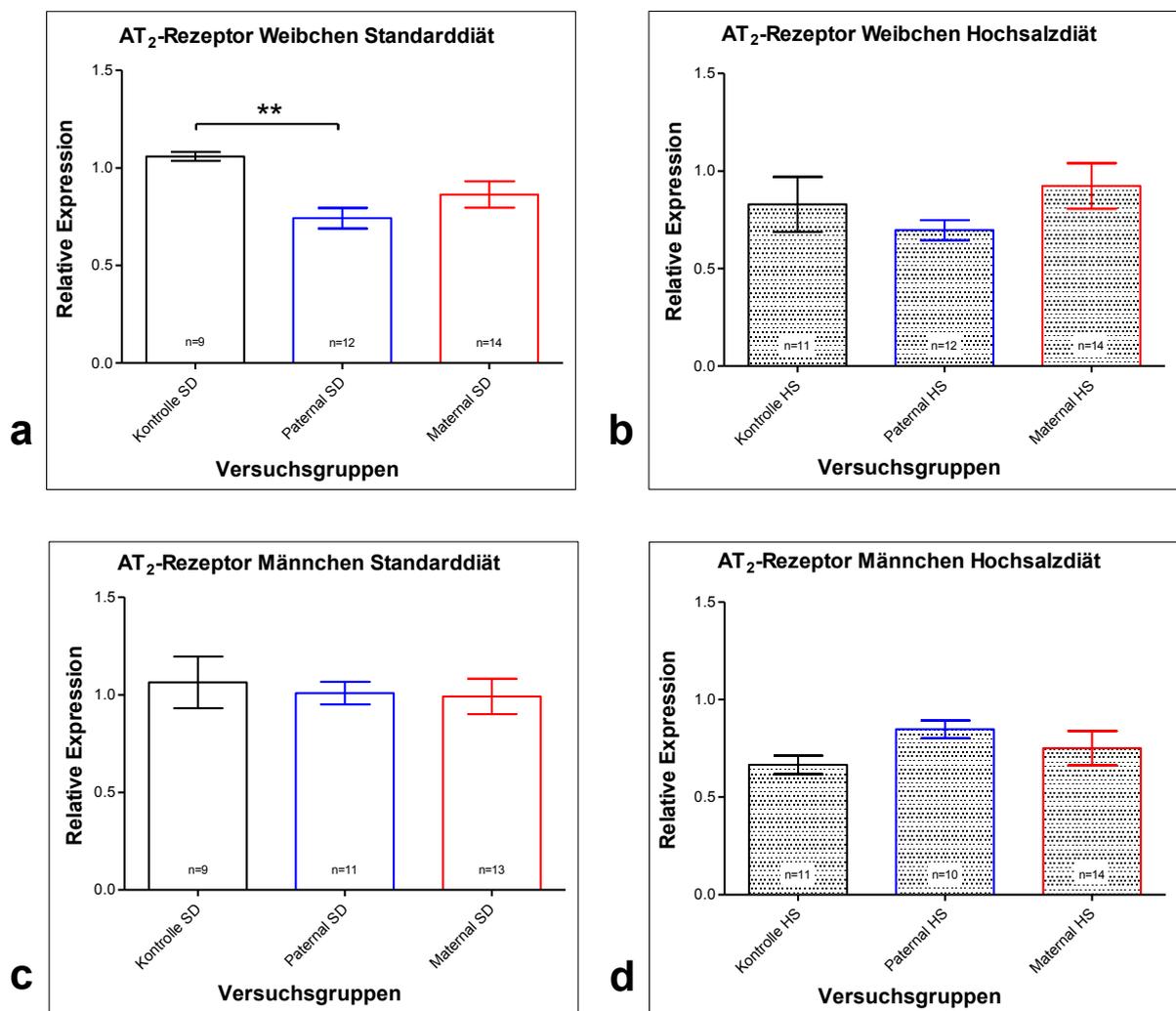


Abb. 14: Mittlere relative Proteinexpression des Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-2 aufgeteilt nach Geschlecht und Versuchsgruppen.

Angegebene Werte: Mittelwert \pm Standardfehler, sowie Anzahl der Versuchstiere (n) pro Versuchsgruppe, **a**: Weibchen Standarddiät **: $p \leq 0,01$ Kontrolle SD vs. Paternal SD **b**: Weibchen Hochsalzdiät, keine signifikanten Unterschiede **c**: Männchen Standarddiät, keine signifikanten Unterschiede **d**: Männchen Hochsalzdiät, keine signifikanten Unterschiede.

5.3.3 Mineralokortikoid-Rezeptor (MCR)

Bezüglich des Mineralokortikoid-Rezeptors konnte jeweils nur bei den mit HS gefütterten Weibchen und Männchen ein signifikanter Unterschied in der relativen Expression ermittelt werden. Bei den Weibchen zeigte sich bei den maternal programmierten HS-Tieren eine signifikant höhere ($p \leq 0,05$) relative Expression als bei den HS-Kontrolltieren. Bei den Männchen war die relative Proteinexpression ebenfalls bei den maternal programmierten HS-Tieren am höchsten und dabei signifikant höher ($p \leq 0,05$), als bei den paternal programmierten HS-Tieren.

Bei den mit SD gefütterten Versuchstieren, gab es weder bei den Weibchen, noch bei den Männchen signifikante Unterschiede. Vergleicht man die relative Expression aller Weibchen und Männchen aufgeteilt in die 6 Gruppen, ergeben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

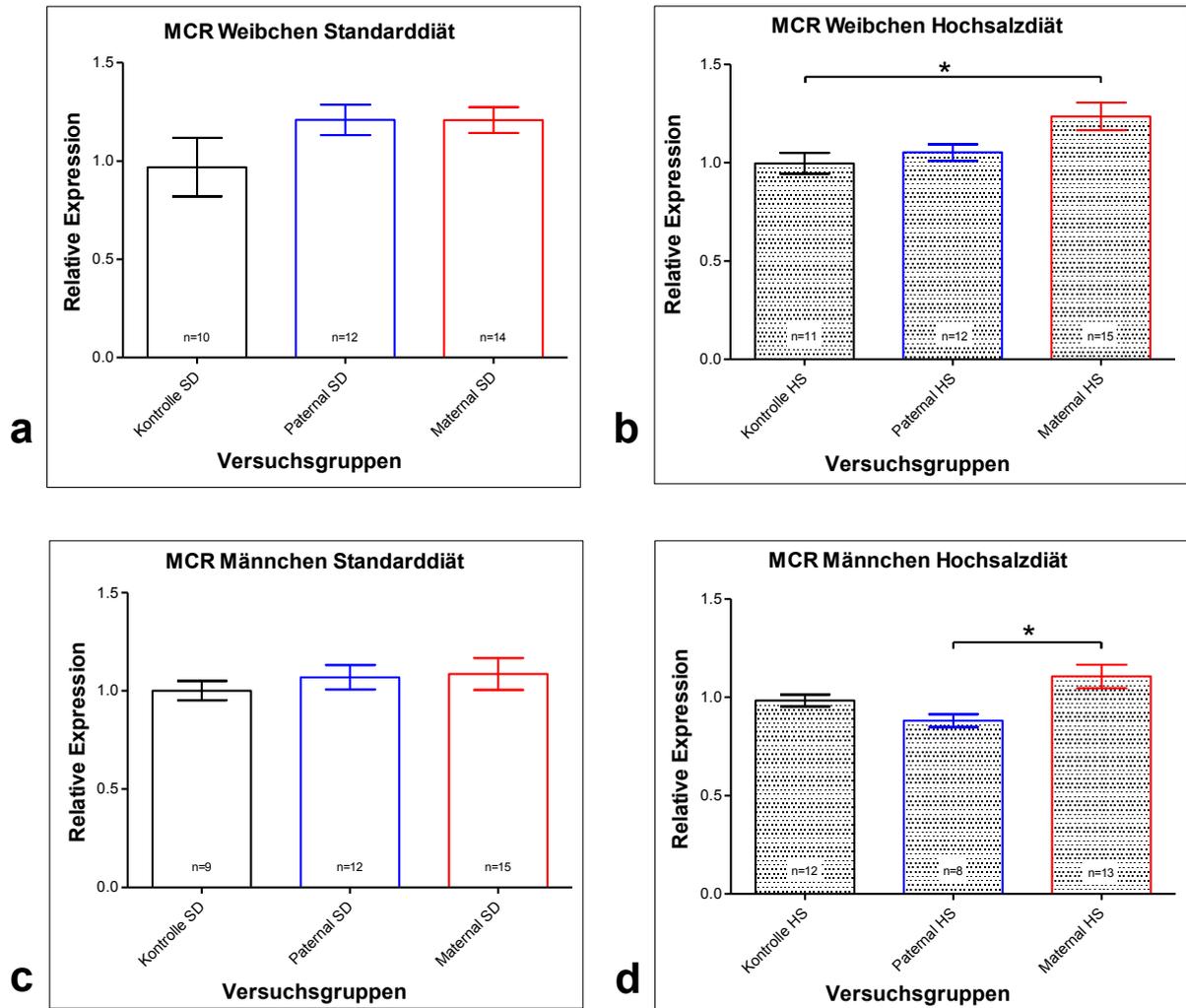


Abb. 15: Mittlere relative Proteinexpression des Mineralokortikoid-Rezeptors aufgeteilt nach Geschlecht und Versuchsgruppen.

Angegebene Werte: Mittelwert \pm Standardfehler, sowie Anzahl der Versuchstiere (n) pro Versuchsgruppe, **a**: Weibchen Standarddiät, keine signifikanten Unterschiede **b**: Weibchen Hochsalzdiät *: $p \leq 0,05$ Maternal HS vs. Kontrolle HS **c**: Männchen Standarddiät, keine signifikanten Unterschiede **d**: Männchen Hochsalzdiät *: $p \leq 0,05$ Maternal HS vs. Paternal HS.

5.3.4 Renin

Auch bei der relativen Proteinexpression von Renin zeigten sich nur bei den mit HS gefütterten Versuchstieren signifikante Unterschiede. Bei den Weibchen war die relative Expression bei den maternal programmierten Tieren signifikant höher, als bei den paternal programmierten- ($p \leq 0,01$) und den Kontrolltieren ($p \leq 0,01$). Das Gleiche galt für die mit HS gefütterten männlichen Ratten. Hingegen ergaben sich bei den mit SD gefütterten Versuchstieren weder bei den Weibchen, noch bei den Männchen

signifikante Unterschiede der relativen Proteinexpression. Insgesamt war die Renin Expression bei den mit HS gefütterten Tieren niedriger als bei den mit SD gefütterten Tieren.

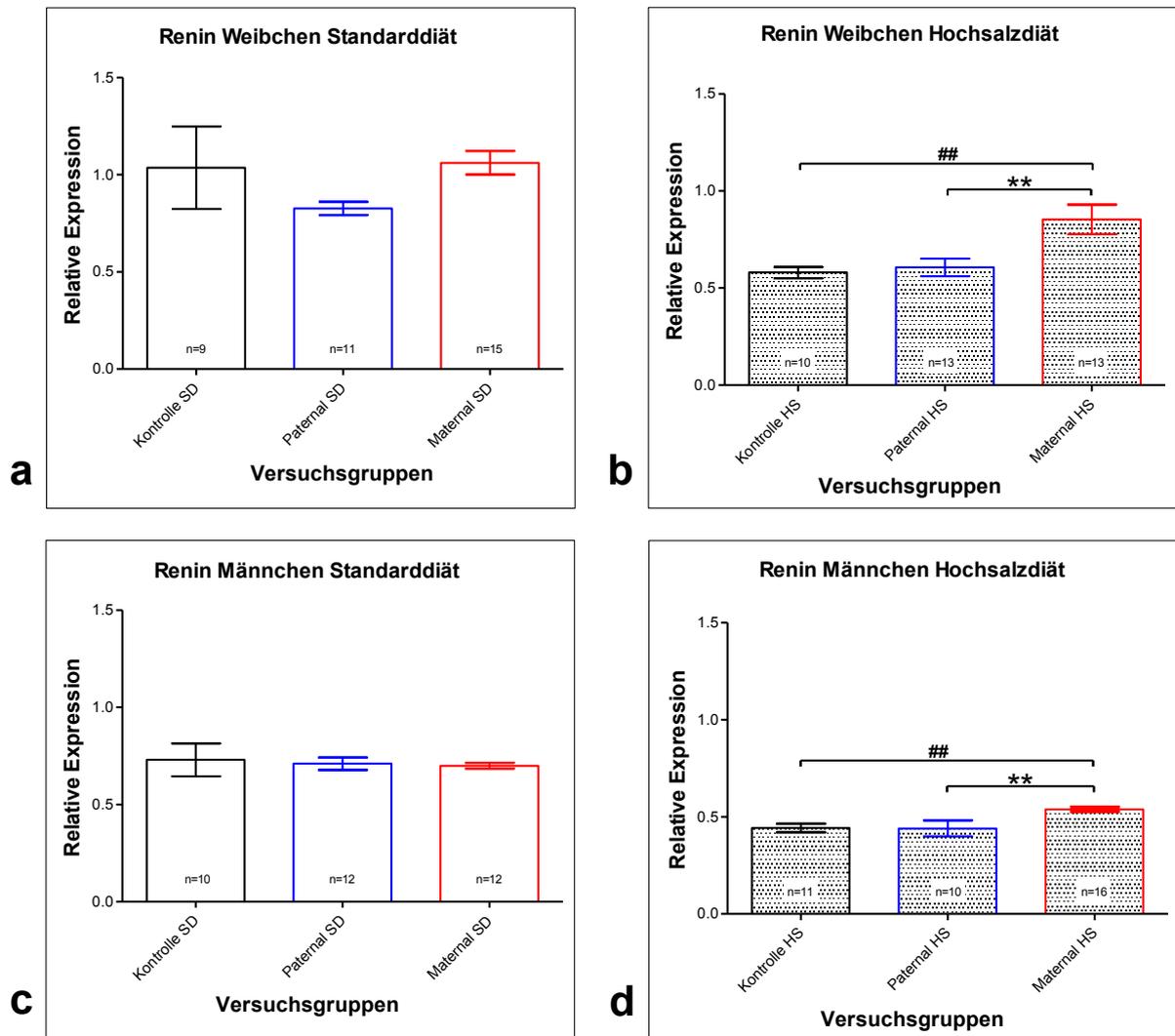


Abb. 16: Mittlere relative Proteinexpression des renalen Renin aufgeteilt nach Geschlecht und Versuchsgruppen.

Angegebene Werte: Mittelwert \pm Standardfehler, sowie Anzahl der Versuchstiere (n) pro Versuchsgruppe, **a**: Weibchen Standarddiät, keine signifikanten Unterschiede **b**: **: $p \leq 0,01$ Maternal HS vs. Paternal HS, ##: $p \leq 0,01$ Maternal HS vs. Kontrolle HS **c**: Männchen Standarddiät, keine signifikanten Unterschiede **d**: Männchen Hochsalzdiät **: $p \leq 0,01$ Maternal HS vs. Paternal HS, ##: $p \leq 0,01$ Maternal HS vs. Kontrolle HS.

6. DISKUSSION

6.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In Tabelle 12 sind die programmierenden Effekte auf die untersuchten klinischen und laborchemischen Parameter zusammengefasst.

Tabelle 12: Zusammenfassung der programmierenden Effekte auf die untersuchten Parameter.

Programmierungseffekte aufgeteilt nach maternal, paternal und durch die Hochsalzdiät selbst bedingt. Es sind nur Parameter angegeben, die signifikant verändert waren.

↑: Zunahme durch jeweiligen Programmierungseinfluss, ↓: Abnahme durch jeweiligen Programmierungseinfluss, ↗: Zunahme bei gleichzeitigem Konsum einer Hochsalzdiät.

	Maternal	Paternal	Hochsalzdiät
Blutdruck	-	↑	↑
Geburtsgewicht	-	-	-
Finalgewicht	↑	↓	-
Nierengewicht	-	-	↑
AT ₁	↑	-	-
AT ₂	-	-	↓
MCR	↗	-	-
Renin	↗	-	-

6.2 Programmierung der Hämodynamik

6.2.1 Blutdruck

Bei der Betrachtung des systolischen Blutdrucks der Versuchstiere fällt zunächst der hochsignifikante ($p \leq 0,001$) Unterschied zwischen den mit HS und den mit SD gefütterten Tieren auf. Unabhängig vom eigenen Geschlecht und der Diät der Elterntiere wiesen die Tiere der HS-Gruppe einen signifikant höheren Blutdruck auf. Zwischen den Tieren denen die gleiche Versuchsdiaät gefüttert wurde zeigten sich keine signifikanten Blutdruckunterschiede. Ein durch die elterliche Diät bedingter programmierender Effekt auf den Blutdruck der Tiere war hier zunächst also nicht ersichtlich.

Mehrere Studien haben in den letzten zwei Jahrzehnten gezeigt, dass Nieren- und Herz-Kreislauf-Erkrankungen, insbesondere Bluthochdruck, in der fetalen Entwicklung programmiert werden können^{19,51,121}. In Studien mit einem ähnlichen Versuchsaufbau wie dem vorliegenden, wie etwa bei Contreras et al.⁸⁰ und Ramos et al.¹¹⁷ kam man ebenfalls zu dem Ergebnis, dass unabhängig von der Diät der Eltern bei denjenigen Tieren, denen eine Hochsalzdiät gefüttert wurde, ein höherer Blutdruck zu messen ist. Ebenso betonen Daten aus epidemiologischen⁷⁹, interventionellen^{122,123}, genetischen^{124,125}, Tier-⁸² sowie Migrationsstudien¹²⁶ den Einfluss von Salzkonsum auf die Regulation des Blutdrucks. Zahlreiche Metaanalysen von randomisierten Studien zu den positiven Auswirkungen einer salzarmen Diät wurden in den letzten Jahren publiziert^{127,128}. Hier wird die direkte Beziehung von Salzkonsum und kardiovaskulärem Risiko eindeutig belegt^{4,84,129}, beziehungsweise gezeigt, dass eine Einschränkung der Salzzufuhr mit einer Senkung des Blutdrucks einhergeht. Dieser Effekt konnte sowohl bei hyper-, als auch normotensiven Probanden und unabhängig vom Geschlecht und der ethnischen Zugehörigkeit bestätigt werden^{5,78}. Des Weiteren zeigt sich, dass bereits eine moderate Reduktion des Salzverzehrs den Blutdruck verringert und sich damit das kardiovaskuläre Risikoprofil insgesamt verbessert⁷⁵. Unabhängig vom Blutdruck zeigen neuere klinische Studien auch andere salzassoziierte Effekte, die ihrerseits zu Organschäden führen. So wird beispielsweise von einem vergrößertem linken Ventrikel¹³⁰, einer verringerten arteriellen Compliance und damit verbunden einer erhöhten Pulsdruckamplitude⁷⁶ berichtet. Darüber hinaus wurden infolge einer Hochsalzdiät ein abgeschwächter Barorezeptor-Reflex¹³¹, eine erhöhte glomeruläre

Filtrationsrate sowie eine später auftretende Glomerulosklerose ¹³² beobachtet. Am Beispiel von Ratten, deren Muttertiere sowohl perinatal, als auch während der Laktation einer Hochsalzdiät ausgesetzt waren, beobachtet man im Erwachsenenalter neben der Entwicklung einer arteriellen Hypertension ebenfalls vermehrt myokardiale- und Glomerulosklerose sowie Proteinurie ^{80,133,134}. Diese Ergebnisse weisen wiederum auf einen programmierenden Effekt des Salzes hin.

Ferner scheinen Zeitpunkt und Dauer des Salzkonsums entscheidende Auswirkungen auf die Entwicklung eines arteriellen Hypertonus zu haben. So fanden Porter et al. ¹³⁵ heraus, dass etwa der alleinig pränatale Konsum einer Hochsalzdiät durch die Mutter im Rattenmodell nicht ausreicht, um bei den Nachkommen einen Bluthochdruck zu programmieren. Sie fanden hingegen eine verstärkte Stressreaktion der mit Hochsalz gefütterten Weibchen auf äußere Einflüsse. Hieraus schlossen sie, dass auch trotz keiner signifikanten Blutdrucksteigerung der mit Hochsalz gefütterten Tiere eine programmierbare Veränderung der Stressbewältigung langfristig auch das kardiovaskuläre Risiko steigert.

Darüber hinaus bestehen verschiedene Meinungen darüber, was als Hochsalz-beziehungsweise Standarddiät im Rattenmodell gewertet werden soll. So wurde in der vorliegenden Arbeit eine Diät mit einem Salzgehalt von 0,2 % als Standarddiät gefüttert, wenngleich diese beispielsweise in anderen Studien als *low-salt*-Diät genutzt wurde ⁸¹.

Während die Auswirkungen einer reduzierten Hochsalzdiät auf den Blutdruck ausführlich untersucht wurden, sind die Auswirkungen der chronisch zu hohen Salzaufnahme im Tierversuch bislang zu wenig einheitlich erforscht. Beispielsweise ist bislang nur sehr begrenzt untersucht worden inwieweit die Salzaufnahme vor, während und nach der Schwangerschaft die prä- und postnatale Entwicklung des Blutdrucks und der Nierenfunktion und damit die spätere Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen beeinflusst. Die Ergebnisse der vorliegenden Tierstudie sind im Hinblick auf das inhomogene Studiendesign und Versuchsgruppengröße nur begrenzt vergleich- und interpretierbar. Zu diesem Schluss kamen auch bereits andere Arbeitsgruppen wie etwa Ramos et al. ¹¹⁷. So wurden die Tiere während der Trächtigkeit entweder nur für einen kurzen Zeitabschnitt einer salzreichen Diät ¹³⁵ oder zusätzlichem intrauterinem Stress ⁹⁰ ausgesetzt bzw. speziell gezüchtete salzsensitive ¹³⁶ oder spontan

hypertensive^{134,137} Tierstämme eingesetzt. Einige Studien gehen sogar von einer Salz-Resistenz der im vorliegenden Versuch verwendeten Wistar-Ratten aus¹³⁸.

Der in dieser Arbeit beschriebene Rattenterversuch unterscheidet sich von anderen Studien mit ähnlichem Aufbau in der Dauer des Salzkonsums der Eltern- sowie Nachkommen-Generation und ebenso in der Tatsache, dass hierbei ein besonderes Augenmerk auf den Einfluss der paternalen Programmierung gelegt wurde.

Um die etwaigen programmierenden Effekte der elterlichen Diät auf den Blutdruck der Nachkommen unabhängig vom Unterschied der eigenen Diät (HS vs. SD) und ohne geschlechtsspezifische Druckunterschiede zu betrachten, wurden jene Tiere denen die gleiche Versuchsdiät wie einem Elternteil gefüttert wurde mit der Kontrollgruppe sowie aufgeteilt nach Geschlecht in vier verschiedenen Gruppen verglichen.

Hierbei zeigt sich bei den mit SD gefütterten Tieren unabhängig vom Geschlecht jeweils ein signifikant höherer Blutdruck bei den paternal programmierten Tieren. Zu diskutieren wäre, ob dieser Sachverhalt als Hinweis auf eine paternale Programmierung gewertet werden kann. Allerdings lässt sich der Druckunterschied in beiden Fällen (Männchen und Weibchen) nur einmalig nach vier Monaten darstellen und ist davor und danach nicht mehr signifikant. Bei den mit HS gefütterten Tieren tritt lediglich bei den Weibchen ein einmalig signifikanter Druckunterschied zwischen den der Kontrollgruppe abstammenden Tieren und den maternal und paternal programmierten Tieren auf.

Bluthochdruck manifestiert sich bei Ratten wie auch beim Menschen meist erst im späteren Lebensalter, sodass die Länge der vorliegenden Studie diskutiert werden muss. In Modellen an Ratten tritt eine Blutdruckerhöhung meist erst nach 100 Tagen (\approx 3,5 Monaten) auf^{139,140}. Dies bietet einen Erklärungsansatz, warum der Blutdruck der Tiere in der zu diskutierenden Studie nicht früher signifikant höher war. In dieser Studie wurde die Blutdruckmessung zu fünf Zeitpunkten in einem Zeitraum über 24 Wochen (6 Monate) durchgeführt. Ein übersehener Effekt aufgrund eines zu kurzen Beobachtungszeitraums scheint also unwahrscheinlich. Das Angleichen der Blutdrücke über die Zeit könnte als Kompensationsverhalten, der Tiere mit einem zuvor signifikant höheren Blutdruck, gewertet werden.

Die hier vorgestellten Ergebnisse lassen des Weiteren an die *match-/mismatch-Hypothese* (Kapitel 2.1.4.) denken, der zufolge diskrepante Umweltverhältnisse prä- und postnatal durch die Unangepasstheit des Organismus Krankheiten zur Folge

haben. Im vorliegenden Versuch bestünde also sowohl bei den mit SD gefütterten Tieren im Vergleich zum mit HS gefütterten Vater, als auch bei den mit HS gefütterten Nachkommen der mit SD gefütterten Kontrolltiere ein sogenanntes *mismatch*. Weiterhin wird in manchen Studien auch davon ausgegangen, dass erst die Kombination aus fetaler Programmierung und Zivilisationsumgebung (fette Ernährung, Stress, wenig Bewegung etc.) zur Erkrankung führen^{94,135}. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Tiere der F1 Generation unter zivilisationsbedingten Risiken nicht eine noch deutlicher ausgeprägte Erkrankungsrate aufgewiesen hätten. 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.

Insgesamt ist bei der Betrachtung der Blutdrücke im zeitlichen Verlauf ein Anstieg des Blutdrucks bei allen Versuchstieren zu verzeichnen. Altersabhängige Veränderungen der vaskulären *compliance*, kardialer Kontraktilität und Baroreflex-Funktion sind gut dokumentiert und es ist davon auszugehen, dass sie zur Entwicklung des Hypertonus bei den alternden Tieren beitragen^{136,140}.

6.3 Programmierung der Gewichte

6.3.1 Körpergewicht

Bei der Betrachtung des Geburtsgewichts ergab sich weder zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen und deren unterschiedlichen Diäten noch zwischen den Geschlechtern ein signifikanter Unterschied.

Dies überrascht insofern, als dass in vielen tierexperimentellen Studien diätische Manipulationen in einer intrauterinen Wachstumsretardierung resultierten und diese den Einfluss eines Umwelteffektes auf die Mutter gerade am reduzierten Gewicht der Nachkommen festmachen^{36,41,51,135,140}. Durch epidemiologische und tierexperimentelle Studien wurde insbesondere auch ein Zusammenhang zwischen niedrigem Geburtsgewicht und der Entwicklung von Bluthochdruck hergestellt^{7,10}. Der Niederländer de Boer⁹⁴ sah diesen Sachverhalt durch eine programmierte Salz-Sensitivität begründet. In der Studie von Mao *et al.*¹²¹ zeigte sich allerdings kongruent

zu dem vorliegenden Versuch ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Körper- und Nierengewicht der Nachkommen Hochsalz- bzw. Standarddiät gefütterten Muttertiere.

Auch Studien zum Thema Hochsalzdiät stellen einen Bezug zwischen durch die Hochsalzdiät intrauterin verändertem RAAS und verringertem Geburtsgewicht her. In diesem Fall wird spekuliert, ob die Änderungen des RAAS auch eine Veränderung des fetoplazentaren Blutflusses und dadurch des fetalen Nährstoffangebots mit sich bringt und damit schließlich das intrauterine Wachstum und letztlich das Geburtsgewicht beeinflusst. Oder aber, dass die intrauterine Wachstumsretardierung ihrerseits zu einer suboptimalen Entwicklung der Nieren mit konsekutiver Funktionseinschränkung und Hypertonus führt. Untersuchungen der klassischen *Barker Hypothese* zeigen je nach Ausmaß des Umwelteffektes jedoch auch unterschiedlich starke Ausprägungen der Gewichtsreduktion. So sahen Ozaki *et al.*¹³⁹ die fetale Programmierung in ihrem Versuch, bei einem signifikant reduzierten Geburtsgewicht als Folge einer um 30% reduzierten Kalorienzufuhr der Muttertiere, als bestätigt. Und dies obgleich die Tiere bereits am 20. Tag identische Gewichte wie die Tiere der Kontrollgruppe hatten. Im Gegensatz dazu zeigten die Tiere bei Vickers *et al.*¹⁴⁰ das signifikant reduzierte Gewicht bis zum 22. Tag. Die Kalorienzufuhr dort wurde sogar um 70% reduziert. Auch unter Proteinmangeldiät der Muttertiere bei Langley *et al.*¹⁴¹ 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%. Dies zeigt, dass unterschiedlich starke Umwelteinflüsse zu unterschiedlicher Ausprägung der Gewichtsreduktion führen können. Bezogen auf eine Hochsalzdiät mit 8% NaCl konnten Porter *et al.*¹³⁵ keine diätspezifische Veränderung im Gewicht der Nachkommen zeigen, wohingegen Maia *et al.*¹⁴² sehr wohl ein vermindertes Geburtsgewicht des Nachwuchses hochsalzgefütterter Mütter feststellten. Es bleibt also unbeantwortet, ob eine höher angesetzte Hochsalzdiät im vorliegenden Versuchsaufbau einen entsprechenden Effekt auf das Geburtsgewicht gezeigt hätte. Leandro *et al.*¹²⁰ beschreiben in dem von ihnen durchgeführten Rattenmodell allerdings ebenfalls, dass die Nachkommen erster Generation sowohl bei maternaler Standard- als auch Hochsalzdiät sich im Geburtsgewicht nicht unterschieden. Lediglich die Nachkommen von mit Niedrigsalzdiät gefütterten Weibchen wogen signifikant weniger. Eventuell beeinflusst also eine alimentäre Programmierung durch Salz das

Geburtsgewicht der Nachkommen Generation nicht in gleichem Maße wie eine kalorienreduzierte Ernährung.

Die Wachstumskurven der weiblichen und männlichen Versuchstiere beschrieben unabhängig von der Versuchsgruppe nahezu den gleichen Verlauf. Allgemein wurde die Wachstumsphase bei allen Gruppen geschlechtsunabhängig durch eine kurzfristige Stagnation des Wachstums in der dritten Lebenswoche unterbrochen. Dieses Phänomen ist erklärbar durch die Futterumstellung der Tiere von der Muttermilch auf feste Nahrung. Alle Versuchstiere nahmen mit zunehmendem Alter in nahezu gleichem Maße an Körpergewicht zu. Lediglich kurz vor der Tötung ergaben sich signifikante Unterschiede, auf die im folgenden Kapitel eingegangen wird.

Vickers *et al.*¹⁴⁰ zeigten in ihrem vergleichbaren Versuch ebenso kein erhöhtes Gewicht der F1 Generation im Verlauf, aber eine Blutdruckerhöhung. Wobei wenige tierexperimentelle Studien zur *klassischen Barker Hypothese* das Gewicht der F1 Generation beobachtet haben.

Bei der Betrachtung des kurz vor der Tötung erhobenen Finalgewichts waren sowohl bei den Weibchen als auch bei den Männchen die maternal programmierten Tiere der HS- beziehungsweise SD-Gruppe am schwersten und die paternal programmierten Tiere am leichtesten. Da die maternal programmierten Tiere der HS-Gruppe ebenfalls die höchste relative Expression des AT₁-Rezeptors aufwiesen, könnte man ihr signifikant höheres Gewicht auch mit einer Elektrolyt- und damit verbunden Wasserretention in Verbindung bringen¹⁴³. Für zukünftig geplante Versuche könnte bei der Betrachtung von Gewichtsverläufen auch das Nachvollziehen von Fressverhalten und mengenmäßiger Nahrungsaufnahme der Versuchstiere interessant sein.

6.3.2 Nierengewicht

Im Folgenden wird insbesondere auf das relative Nierengewicht eingegangen, da die Korrelation zwischen Körpergewicht und Nierengewicht aussagekräftiger erscheint.

Bei der Betrachtung des absoluten und mehr noch des relativen Nierengewichts fällt der hochsignifikante Unterschied der Nierengewichte der mit HS und SD gefütterten Tiere auf. Hierbei scheint letztlich auch das Geschlecht kaum eine Rolle zu spielen. Und darüber hinaus auch kein programmierender Effekt zum Tragen zu kommen, da zwischen den jeweils paternal beziehungsweise maternal programmierten Tieren und

jenen aus der Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied bezüglich des Nierengewichts besteht. Passend hierzu wurde im Versuch von Leandro *et al.*¹²⁰ ebenfalls bei den Tieren der Hochsalz-Gruppe ein erhöhtes Nierengewicht festgestellt. Interessanter Weise haben die mit HS gefütterten Tiere sowohl das höchste relative Nierengewicht, als auch den höchsten Blutdruck. Strukturelle Veränderungen wie etwa Fibrosierung der Nieren, welche sowohl die physiologische Blutdruckregulierung, als auch das Gewicht der Nieren bedingen, scheinen plausibel. Hierzu passend konnte in verschiedenen Arbeiten ein Zusammenhang zwischen Überexpression von MCR und einem hierüber Aldosteron-vermittelten fibroplastischen Umbau des Tubulointerstitiums der Nieren gezeigt werden¹⁴⁴. Der zuvor genannte hochsignifikante Unterschied des relativen Nierengewichts der HS und SD gefütterten Tiere könnte also auch mit der gezeigten erhöhten MCR Expression in den HS gefütterten Tieren zusammenhängen. Die hier diskutierten Ergebnisse sind vergleichbar mit Daten aus tierexperimentellen Studien zur fetalen Programmierung, in denen verschiedene Umwelteinflüsse (geringes Geburtsgewicht^{65,94}, maternale Proteinmangeldiät¹⁴⁵, Minderperfusion der Uterusarterie⁹⁷ usw.) zu verringerter Nierenfunktion¹⁴⁵, Reduktion der Glomerulaanzahl¹⁴⁵, Nierenhypertrophie¹⁴⁵ und Blutdruckerhöhung^{94,97} führten. Insbesondere zeigte die Studie von Koleganova *et al.*¹⁴⁶, dass eine maternale Hoch- sowie auch Niedrigsalzdiät ebenfalls in die renale Physiognomie des Nachwuchses eingreift, die Expression von Proteinen in der Niere modifiziert und schließlich die Anzahl der Glomerula herabsetzt, wodurch das Risiko der Entwicklung eines Hypertonus im späteren Leben steigt. Das lässt darauf schließen, dass durch unterschiedliche Umwelteinflüsse eine veränderte Programmierung des renalen Phänotyps stattfindet. Kongruent dazu weist die vorliegende Studie Hinweise dafür auf, dass der Konsum einer Hochsalzdiät einen programmierenden Effekt auf den renalen Phänotyp haben könnte. In der 2019 veröffentlichten Studie von Oloyo *et al.*¹⁴⁷ konnte hierzu passend ebenfalls eine Zunahme des relativen Nierengewichts nach Hochsalzkonsum nachgewiesen werden. Dort interpretieren die Autoren der Studie diese als Resultat einer renalen Hypertrophie, um die gesteigerte Resorption von Elektrolyten und Aufrechterhaltung der Natriurese zu gewährleisten. Im Unterschied zu dem vorliegenden Versuch, in welchem kein geschlechterspezifischer Unterschied der Nierenphysiognomie nach Hochsalzdiät festgestellt werden konnte, waren es bei Oloyo *et al.*¹⁴⁷ allein die männlichen Sprague-Dawley Ratten, deren relatives Nierengewicht nach Hochsalzdiät erhöht war.

Da während der Fertigstellung dieser Arbeit keine histologischen Daten zu den Nieren zur Verfügung standen, können im Weiteren zur Morphologie der Nieren nur Spekulationen angestellt werden. Ein histomorphologischer Faktor, der bei Menschen und im Rattenmodell beispielsweise mit arterieller Hypertonie assoziiert wird ist die Nephronanzahl und die Glomerulumgröße. Wobei eine erniedrigte Nephronanzahl mit einem erhöhten Blutdruck einhergehen kann und sich bei hypertensiven Probanden in verschiedenen Arbeiten vergrößerte Glomerula zeigten¹⁴⁸.

Wie bereits im Kapitel 5.2.1 erwähnt, wurde in Studien an Ratten, deren Muttertiere einer Hochsalzdiät ausgesetzt waren, neben der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie auch die Ausprägung einer myokardialen und renalen Fibrose beobachtet^{80,132-134}. Letztlich ist unklar, ob die Fibrose den Hypertonus oder umgekehrt bedingt. Weiterhin wären zur weiteren Abklärung der Nierenfunktion beziehungsweise einer etwaigen Nierenfunktionsstörung weitere Testverfahren, wie etwa eine Bestimmung der Kreatinin-Clearance, der glomerulären Filtrationsrate und Urinuntersuchungen etc. vonnöten.

6.4 Programmierung des renalen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

6.4.2 Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-1 (AT₁-Rezeptor)

Unabhängig vom Geschlecht und der Diät ist ein deutlicher maternaler Programmierungseffekt zu sehen. Sowohl bei den Weibchen als auch bei den Männchen war die relative AT₁-Rezeptor-Expression im untersuchten Nierengewebe der maternal programmierten Tiere signifikant höher als die der Kontrollgruppe und zwar unabhängig von der eigenen Diät. Ding *et al.*⁵² beobachteten ähnlich hierzu in ihrer 2010 publizierte Studie eine signifikante Steigerung der AT₁-Rezeptor-Expression in kardialen Zellen des Nachwuchses als Folge einer maternalen Hochsalzdiät. Des Weiteren wiesen Leandro *et al.*¹²⁰ in den Plazenten von mit HS gefütterten trächtigen Ratten eine signifikant gesteigerte Expression des AT₁-Rezeptors nach. Mao *et al.*¹²¹ konnten schließlich in ihrem 2013 durchgeführten Fütterungsversuch auch eine durch Hochsalz programmierbare Veränderung des renalen RAAS zeigen.

Klinisch und präklinische sowie tierexperimentelle Studien unterstützen die Annahme, dass ANG II über die pathologische Aktivierung von AT₁-Rezeptoren eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Hypertension spielt^{105,109}. Interessanterweise waren im vorliegenden Versuch keinesfalls die Versuchstiere mit der höchsten AT₁-Rezeptor-Expression auch diejenigen mit dem höchsten Blutdruck. Die maternal programmierten Weibchen der SD-Gruppe beispielsweise hatten gegenüber allen Weibchen gleicher Diät zwar die höchste AT₁-Rezeptor-Expression aber gleichzeitig auch den niedrigsten Blutdruck (siehe Kapitel 4.2.1 und 4.4.1). Ebenso verhält es sich bei den Weibchen der HS-Gruppe. Dies widerspricht Beobachtungen wie etwa von Van Haaster *et al.*¹⁴⁹ wonach eine Reduktion der AT₁-Rezeptoren des proximalen Tubulus zu niedrigeren Blutdruckwerten und eine Überexpression im Allgemeinen zu erhöhten Blutdruckwerten führte. Einschränkend ist diesbezüglich aber auch darauf hinzuweisen, dass im vorliegenden Versuch nur das RAAS der Niere untersucht wurde und nicht etwa z.B. in den Blutgefäßen.

6.4.3 Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-2 (AT₂-Rezeptor)

Bei der Betrachtung der relativen renalen Expression des AT₂-Rezeptors zeigen sich außer bei den mit Standarddiät gefütterten Weibchen keine signifikanten Unterschiede. Dies zeigten auch Ding *et al.*⁵², die in ihrem Versuch, wie auch in der vorliegenden Arbeit, zwar einen Anstieg der AT₁- jedoch nicht der AT₂-Rezeptor Expression messen konnten. An dieser Stelle ist wieder zu diskutieren, ob die verabreichte Hochsalzdiät selbst wie auch die Diät der Eltern schlichtweg keinen programmierenden Effekt auf den AT₂-Rezeptor hat, oder ob auch hier wie im Fall des Geburtsgewichts diskutiert, eventuell keine ausreichende Dosis der Hochsalzdiät erreicht wurde, um eine Expressionsveränderung zu bewirken. Im Fütterungsversuch von Mao *et al.*¹²¹ zeigte sich bei den hochsalzprogrammierten Tieren bei der Geburt eine signifikant erhöhte Expression des AT₂-Rezeptors, allerdings konnte dies bei den Tieren nach 90 Tagen nicht mehr nachgewiesen werden. Hier findet sich also ein möglicher Hinweis darauf, dass fetal programmierte Alterationen im RAAS nach der Geburt und im Verlauf des Lebens auch wieder verändert werden könnten. Demnach könnte im vorliegenden Versuch so eine etwaige frühe Veränderung des AT₂-Rezeptors möglicherweise nicht

nachgewiesen worden sein. Was hingegen auffällt ist die Tatsache, dass die AT₂ Expression bei den mit HS gefütterten Tieren niedriger war als bei denen die mit SD gefüttert wurden. Somit ist von einer geringeren, vom AT₂-Rezeptor vermittelten, vornehmlich vasodilatorischen Wirkung auszugehen. Dies könnte auch dazu beitragen, dass die mit HS gefütterten Tiere einen deutlich höheren Blutdruck hatten.

6.4.4 Mineralokortikoid-Rezeptor (MCR)

Bezüglich des MCR zeigt sich geschlechtsunabhängig bei den maternal programmierten, mit HS gefütterten Tieren eine signifikant höhere relative Expression. Bei den mit SD gefütterten Tieren ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Diese Daten deuten darauf hin, dass der maternale Programmierungseffekt erst durch die zusätzliche eigene Hochsalzdiät demaskiert wird. In diesem Zusammenhang ist die programmierbare *Salz-Sensitivität* zu diskutieren. Im Sinne eines metabolischen *matches* (siehe Kapitel 2.1.5) stimmen die Ernährung der Mutter während der Schwangerschaft, damit einhergehend das Milieu intrauterin und die eigene Ernährung des Nachkommens überein, da sowohl Mutter als auch Kind die HS Diät erhalten. Die *in utero* programmierte *Salz-Sensitivität* würde dann zu einer Prädisposition des Nachkommens gegenüber salzreicher Ernährung führen. Konsumiert der Nachkomme also eine Hochsalzdiät käme es damit eventuell, wie in einigen Tierversuchen⁸¹ und epidemiologischen Studien⁹¹⁻⁹⁴ gezeigt, zu einer Vielzahl an Veränderungen der Hämodynamik und regulatorischer Systeme wie dem RAAS. Übertragen auf das hier gezeigte Modell bietet dies eventuell einen Erklärungsansatz für die erhöhte relative MCR Expression der maternal programmierten Tiere, denen ebenfalls die HS gefüttert wurde im Vergleich zu den maternal programmierten Tieren, welche selbst SD bekamen.

Eine vermehrte Aktivierung des MCR durch vermehrtes Aldosteron im Plasma führt erwiesenermaßen zu einem erhöhten Blutdruck¹⁰⁶. Interessanterweise konnte im Verlauf bei den mit HS gefütterten Weibchen der Kontrollgruppe einmalig ein signifikant höherer Blutdruck gemessen werden, als bei den mit HS gefütterten maternal programmierten Weibchen, obwohl letztere eine signifikant höhere MCR Expression hatten (siehe Kapitel 5.1.1 und 5.3.3). Im vorliegenden Versuch wurde allerdings nicht

die Aktivierung, sondern die Expression des MCR bestimmt und diese scheint sich nicht in gleicher Weise auf den Blutdruck auszuwirken. Zu diskutieren bliebe, ob ein erhöhter Blutdruck, wie im Falle der mit HS gefütterten Weibchen der Kontrollgruppe, die Expression des MCR herunterreguliert, sozusagen als negativer Feedback Mechanismus um eine weitere Erhöhung des Blutdrucks zu verhindern. Gleichzeitig kann diese Behauptung allerdings bei der Betrachtung der mit HS gefütterten Männchen nicht gehalten werden. Hier zeigen die maternal programmierten Männchen sowohl den höchsten systolischen Blutdruck (nicht signifikant) als auch eine signifikant höhere relative Expression des MCR.

6.4.5 Renin

Vergleichbar mit den Ergebnissen der relativen MCR-Expression (Kapitel 6.4.4) zeigen sich nur bei den mit HS gefütterten Tieren maternale Programmierungseffekte anhand der signifikant erhöhten Renin-Expression. In allen anderen Gruppen zeigte sich keine Programmierbarkeit. Auch hier ist zu diskutieren, ob die eigene Hochsalzdiät im Sinne eines metabolischen *maches* zur mütterlichen Hochsalzdiät zu werten ist und hier sozusagen durch die eigene HS, die programmierte Prädisposition zum Tragen kommt. Eine erhöhte relative Expression des renalen Renins scheint sich jedoch nicht auf eine Erhöhung des Blutdrucks auszuwirken. Betrachtet man den Verlauf der systolischen Blutdrücke der Versuchstiere, so weisen die mit HS gefütterten Tieren mit maternaler Programmierung nicht wie erwartet einen höheren Blutdruck auf. Ganz im Gegenteil ist er bei den Weibchen sogar am niedrigsten (nicht signifikant). Des Weiteren ist zu beobachten, dass die mit HS gefütterten Tiere geschlechtsunabhängig eine niedrigere relative Renin Expression haben im Vergleich zu den mit SD gefütterten Versuchstieren. Dies kann im Hinblick auf die signifikant erhöhten Blutdrücke der mit HS gefütterten Tiere als Kompensationsmechanismus gewertet werden. Wenn man sich die blutdrucksteigernde Wirkung des Renins als Aktivator des RAAS in Erinnerung ruft, dann erscheint eine Senkung der relativen Reninexpression als adäquater Feedbackmechanismus. Im Rattenterversuch von Leandro et al.¹²⁰ wurde ebenfalls bei den mit HS gefütterten Tieren eine niedrigere Reninexpression als bei den mit SD gefütterten Tieren beobachtet. Sie vermuten, dass die Föten hierdurch in einer Renin-armen und salzreichen Umgebung heranwachsen und ihr eigener niedriger Renin-

Plasmaspiegel im Erwachsenenalter somit als Adaption an die vorhergesagte Umwelt postpartal zu werten sei. Bei den männlichen Nachkommen des Versuchs von Ramos et al. wurde das RAAS dahingehend durch die maternale Hochsalzdiät modifiziert, dass sie im Vergleich zur Kontrollgruppe reduzierte Aldosteron- und Renin-Plasmaspiegel und erhöhte renale Renin-Spiegel aufwiesen. Im Vergleich dazu zeigten sich bei den weiblichen Nachkommen keine signifikanten RAAS Alterationen¹¹⁷. Da im vorliegenden Versuch nur die Reninexpression in der Niere und nicht zusätzlich die Reninspiegel im Plasma bestimmt wurden, kann man jedoch keinen direkten Vergleich ziehen.

6.5 Geschlechtsspezifische Unterschiede der fetalen Programmierung

Die Existenz geschlechtsspezifischer Effekte auf die Nachkommenschaft im Rahmen der parentalen fetalen Programmierung ist aus epidemiologischen sowie auch aus tierexperimentellen Studien hinreichend bekannt. Eine Vielzahl an Studien zur fetalen Programmierung konnte zeigen, dass derselbe Reiz, je nach Geschlecht der Nachkommen, unterschiedliche Langzeitwirkungen auslösen kann¹⁵⁰. Ferner wurde etwa die Ungleichheit bezüglich des Zeitpunkts des Krankheitsauftretens und der Schwere des Verlaufs zwischen Weibchen und Männchen aufgezeigt^{117,118}. Insbesondere auch bezüglich der Inzidenz und Mortalität kardiovaskulärer Erkrankungen (Koronare Herzkrankheit, Herzversagen, kardiale Hypertrophie und plötzlicher Herztod) und dem Auftreten von arterieller Hypertonie sind geschlechtsspezifische Unterschiede dokumentiert^{97,151}. Des Weiteren scheinen auch die Art und die Länge der Exposition gegenüber dem programmierenden Umweltfaktor unterschiedliche Auswirkungen auf die Geschlechter zu haben. Studien in denen die Mutter während der Schwangerschaft einem schweren Proteinmangel ausgesetzt war, zeigen zwar eine Entwicklung von Bluthochdruck bei den Nachkommen beider Geschlechter, ist der Proteinmangel jedoch geringer ausgeprägt entsteht der Bluthochdruck im Zuge der geringeren Nephron-Anzahl, nur noch bei den männlichen Nachkommen^{97,150}. Hingegen zeigte sich in Modellen, in denen der programmierende Effekt durch eine Diät-induzierte Adipositas der Mutter erfolgte, dass ausschließlich die weiblichen Nachkommen mit einer erhöhten Hypertonie-Prävalenz reagierten. Dies lässt darauf schließen, dass eine geschlechtsspezifisch unterschiedliche Sensitivität gegenüber diätischer Manipulation auch stark vom jeweiligen Insult abhängt⁹⁷.

In der vorliegenden Studie konnten insgesamt bei den Männchen höhere Blutdrücke gemessen werden als bei den Weibchen, jedoch scheinen sich die programmierenden Effekte zu ähneln. Die SD gefütterten paternal programmierten Tiere wiesen geschlechtsunabhängig den höchsten systolischen Blutdruck auf, was auf einen paternalen Programmierungseffekt hinweist.

Neuere Studien gehen davon aus, dass Modulationen des RAAS durch die jeweiligen Sexualhormone zu den Unterschieden im RAAS beitragen und somit auch eine differente Blutdruckkontrolle bedingen^{142,147}. Geschlechtsspezifische Auswirkungen der Programmierung auf das RAAS sind bekannt, z.B. durch Mangelernährung. Gilbert et al.¹⁴³ berichten etwa von unterschiedlicher Proteinexpression verschiedener Komponenten des RAAS. Ihre Studie an Schafen erbrachte eine bei den männlichen Versuchstieren signifikant höhere Expression des AT₁-Rezeptors im Vergleich zu den Weibchen. Im Gegensatz dazu war die Expression des AT₂-Rezeptors bei den weiblichen Versuchstieren erniedrigt und unverändert bei den männlichen. Interessanterweise fanden sich im Falle des ACE und Renin keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Expression. Auch in Versuchen an Ratten zeigt sich eine vom Geschlecht abhängige Reaktion des Blutdrucks auf chronische ANG II Exposition. So konnten beispielsweise Brosnihan et al.¹⁵² zeigen, dass Östrogen per se die Expression des AT₂-Rezeptors in weiblichen Ratten erhöht, welcher eine vornehmlich vasodilatative und damit blutdrucksenkende Wirkung vermittelt. Im zu diskutierenden Versuch scheint die Hochsalzdiät unabhängig vom Geschlecht eine Verminderung der AT₂ Expression zu bedingen. Dies könnte mitunter auch den erhöhten Blutdruck der mit HS gefütterten Tiere erklären.

Des Weiteren fanden Ramos et al.¹¹⁷ heraus, dass die von ihnen untersuchten Veränderungen des RAAS beim Nachwuchs von Wistar-Ratten, als Folge einer maternalen Hochsalzdiät, ebenfalls geschlechtsspezifischen Unterschieden unterliegen. Im Versuch von Hinojosa-Laborde et al. an weiblichen Dahl-Ratten wurde der Zusammenhang zwischen renalem RAAS und der Entwicklung postmenopausaler Hypertonie untersucht. Nach Ovariectomie entwickelten die Ratten spontan Bluthochdruck, den man sich durch die signifikant erhöhte AT₁-Rezeptor-Dichte im Vergleich zu den intakten Weibchen der Kontrollgruppe und den mit Östrogen substituierten ovariectomierten Tieren erklärte. Da allerdings auch bei den alternden intakten Weibchen mit zunehmendem Alter und abnehmendem Östrogenspiegel der Blutdruck stieg, schloss man, dass Östrogen einer pathologisch erhöhten Aktivität des

RAAS protektiv entgegenwirkt¹³⁶. Bezüglich der AT₁-Rezeptorexpression konnten im vorliegenden Versuch keine durch das Geschlecht bedingten Unterschiede festgestellt werden. In beiden Fällen zeigte sich unabhängig von der Versuchsdiet eine signifikant erhöhte AT₁-Expression bei den maternal programmierten Tieren. Im Versuch von Hinojosa-Laborde et al. wurden die weiblichen Tiere bis zu 12 Monaten alt. Eventuell wurde ein etwaiger geschlechtsspezifischer Unterschied also durch das noch zu junge Alter (6 Monate) der Weibchen verdeckt.

Weitere Hinweise, ob es zu einer entsprechend geschlechtsspezifischen Beeinflussung des renalen Phänotyps sowie der Entwicklung einer Hypertonie bei der F1 Generation kam, könnten noch ausstehende histologische Auswertungen der Nieren belegen. Hier könnten etwa Fibroseanzeichen oder die Nephronanzahl untersucht werden. Andere tierexperimentelle Studien zur fetalen Programmierung zeigten mitunter bei den männlichen Nachkommen eine stärkere Reduktion der Glomerula Anzahl und nachfolgend eine Hypertonie-Entwicklung^{118,151}.

6.6 Einfluss der paternalen Programmierung

Lag der Forschungsfokus bislang vor allem auf maternal medierter fetaler Programmierung, mehren sich inzwischen Hinweise, dass auch der Vater eine entscheidende Rolle in der Modifikation des Phänotyps seiner Nachkommen spielt und somit befassen sich immer mehr Studien mit dem Thema der paternalen Programmierung^{42-49,56,153}. Kaati et al.¹⁵⁴ untersuchten anhand einer schwedischen Kohorte die Korrelation zwischen dem Nahrungsangebot von Vater und Großvater und dem Risiko für deren männliche Nachkommen an kardiovaskulären Erkrankungen oder Diabetes zu versterben. Interessanterweise scheint ein Nahrungsmangel des Vaters, ganz im Gegensatz zur maternalen Programmierung, das kardiovaskuläre Risiko zu senken. Dies zeigt, dass paternale Programmierung existiert, aber ggf. andere oder sogar gegensätzliche Auswirkungen hat im Vergleich zur Programmierung durch die Mutter. Im vorliegenden Versuch war dies beispielsweise beim Blutdruck der mit SD gefütterten Tiere zu beobachten. Hier zeigte sich bei den paternal programmierten Tieren der höchste und bei den maternal programmierten Tieren der niedrigste Blutdruck.

Im zu diskutierenden Versuch zeigt sich eine paternale Programmierung des systolischen Blutdrucks der mit Standarddiät gefütterten Nachkommen unabhängig vom Geschlecht. Bei den mit Hochsalzdiät gefütterten Tieren der F1-Generation scheint dies nicht der Fall zu sein.

Bezüglich des Finalgewichts der Versuchstiere ergibt sich ebenfalls der Hinweis auf paternale Programmierung. So weisen alle Tiere, deren Vater einer Hochsalzdiät ausgesetzt war unabhängig vom eigenen Geschlecht und der Versuchsdiät ein geringeres Finalgewicht als die anderen Nachkommen auf. Auch in anderen Studien wurde der Einfluss der paternalen Programmierung auf das Gewicht der Nachkommen dokumentiert. So zeigen Pembrey et al.⁴⁰ eine Korrelation zwischen frühem Nikotinabusus der Väter und dem erhöhten BMI von deren 9-jährigen Söhnen.

Wie auch bei der Programmierung durch die Mutter haben verschiedenen Studien das veränderte Geburtsgewicht als Nachweis eines Programmierungseffektes hervor. So weisen Chen et al.⁴⁵ eine Korrelation zwischen BMI des Vaters und dem Geburtsgewicht der Söhne nach und verschiedene Studien verweisen auf einen Zusammenhang zwischen der paternalen Diabetes-Erkrankung und dem Gewicht der Nachkommen bei Geburt. Im Gegensatz dazu und vereinbar mit den Ergebnissen der Geburtsgewichte in der vorliegenden Studie sahen Leon et al.⁵⁶ allerdings keine Korrelation zwischen dem Gewicht des Vaters und dem Geburtsgewicht der Kinder. Man kann daraus schließen, dass die fehlende Gewichtsveränderung in der vorliegenden Studie eine Programmierung über eine paternale Linie nicht ausschließt. Bezüglich des AT₁-Rezeptors zeigte sich eine gegenüber der Kontrollgruppe deutlich erhöhte, im Falle der mit HS gefütterten Weibchen und der mit SD gefütterten Männchen sogar signifikant höhere Expression. Allerdings signifikant niedriger als bei den maternal programmierten Tieren. In der Studie von Grasmann et al.¹⁵⁵ untersuchte man den unterschiedlichen Effekt parentalen Diabetes auf die Nachkommenschaft und fand heraus, dass maternaler Diabetes eher zu metabolischen Effekten bei den Nachkommen und paternaler Diabetes zu skeletalen Veränderungen beim Nachwuchs führt. So kann vermutet werden, dass das Ausmaß des paternalen Einflusses auf bestimmte Parameter geringer ist, als der maternale Einfluss und umgekehrt.

Bezüglich des Einflusses einer paternalen Programmierung der Nierenfunktion fehlen bislang Studien. Hier könnten tierexperimentelle Versuche klären, inwieweit die vorliegenden Ergebnisse vergleichbar sind. Insgesamt zeigt die vorliegende Studie,

dass ein paternaler Einfluss im Sinne der fetalen Programmierung vorliegt. Mit weiteren Studien könnte geklärt werden in welchen Bereichen die Auswirkungen größer sind (z.B. Skelettsystem) oder wie sich zusätzliche zivilisationsbedingte Risiken auswirken. Insbesondere auf metabolische Effekte wurde hier nicht eingegangen, obschon sich, wie oben beschrieben, in anderen Studien diesbezüglich deutliche paternale Programmierungseffekte gezeigt haben.

6.7 Limitationen der Arbeit

Im vorliegenden Versuch wurde die systolische Blutdruckmessung mittels nicht-invasiver *Tail-Cuff-Methode* durchgeführt wobei diesbezüglich immer noch die invasiven Messmethoden als Gold-Standard angesehen werden müssen¹⁵⁶. Als klare Nachteile dieser Methoden sind allerdings die Invasivität und der technische Aufwand des operativen Eingriffes sowie die damit einhergehenden möglichen Komplikationen, bis hin zum Tod des Versuchstieres, zu nennen. Im Falle des vorliegenden Versuches schloss sich eine invasive Blutdruckmessung insofern aus, als dass mehrere Blutdruckmessungen an den Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt wurden und das Risiko des vorzeitigen Versterbens der Versuchstiere als zu groß erachtet wurde. Zudem zeigt das angewandte Messprinzip eine mit den invasiven Methoden vergleichbar hohe Reliabilität und kann prinzipiell unbegrenzt häufig eingesetzt werden ohne dem Tier körperlich zu schaden¹⁵⁷. Nachteil der nicht-invasiven Methode ist, dass die Ratten Zeit brauchen sich an die Messung zu gewöhnen und möglichst mehrere Messungen aufeinanderfolgend durchgeführt werden sollten, was einen zeitlichen Aufwand bedeutet. In der vorliegenden Arbeit wurde dies berücksichtigt (siehe Kapitel 3.1.6). Insofern sind dadurch kaum Fehler in den Messungen zu erwarten. Ferner ist diese Methode auch von der Übung und Genauigkeit und nicht zuletzt von der Geduld des Untersuchers abhängig. Da sämtliche Messungen durch denselben Untersucher durchgeführt wurden, sind hierdurch keine Unterschiede zwischen den Gruppen zu erwarten.

Mit Hilfe des Western Blots wurden in dieser Arbeit die relativen Mengen der zentralen am renalen RAAS beteiligten Proteine aus dem Lysat des Nierengewebes bestimmt. Die Western Blot Untersuchung eignet sich zur semiquantitativen Analyse, erbringt aber keine Aussage über die Lokalisation der Rezeptoren oder Proteine. Da für die Analyse

ganze Nieren, also Proben, die Nierenmark und –rinde beinhalteten, verwendet wurden, kann über die lokalen Veränderungen der Rezeptoren-Dichte in diesen sehr unterschiedlichen Regionen der Niere keine Aussage gemacht werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind vorsichtig zu beurteilen, da gegenläufige Regulationen der Rezeptorexpressionen in den beiden Bereichen der Niere möglicherweise durch die gemeinsame Untersuchung verborgen blieben. Aufgrund von Berichten über geschlechtsspezifische Unterschiede der RAAS Komponenten und deren unterschiedliche Auswirkung auf den Blutdruck^{109,117,136}, werden in dieser Arbeit die Ergebnisse der Western Blot Untersuchung des RAAS auch entsprechend aufgetrennt nach dem Geschlecht betrachtet und diskutiert.

Abschließend sei angemerkt, dass es vor allem durch die geschlechtsspezifische Aufteilung zu einer empfindlichen Abnahme des Stichprobenumfangs kam. Dadurch nahm der Standardfehler zu und obwohl sich die empirischen Mittelwerte zwischen den Vergleichsgruppen deutlich unterschieden, wurden die Signifikanzgrenzen oft knapp verfehlt. Daher ist zu vermuten, dass es bei einer größeren Stichprobe häufiger zu signifikanten Unterschieden zwischen den Versuchsgruppen gekommen wäre.

7. AUSBLICK UND FAZIT

In der vorliegenden Studie konnten sowohl maternal als auch paternal programmierende Effekte beobachtet werden. Ob zur klassischen Barker Hypothese vergleichbare epigenetische Mechanismen vorliegen, muss durch nachfolgende Analysen bzw. Studien überprüft werden. Auch ist zu vermuten, dass sich paternale Programmierung ggf. auf andere Bereiche auswirkt als die maternale Programmierung¹⁵⁴, so dass Untersuchungen zu weiteren bislang nicht berücksichtigten Organsystemen (z.B. das Skelettsystem) angeschlossen werden sollten. Epigenetische Veränderungen finden, wie in Kapitel 6.6. diskutiert, ebenso über die paternale Linie statt¹⁵³. Weiterführende Erkenntnisse zu Mechanismen der paternalen Programmierung könnten dazu beitragen, den präventivmedizinischen Fokus auch auf den Gesundheitszustand und die Umweltbedingungen des Vaters zu lenken. Da gezeigt werden konnte, dass auch das präkonzeptionelle, perikonzeptionelle und frühe postkonzeptionelle Milieu den Phänotyp der Nachkommenschaft beeinflussen kann, sollte die fetale Programmierung auch in der reproduktionsmedizinischen Forschung vermehrt berücksichtigt werden. Ein besseres Verständnis davon, in welchem Maße und in welchen Fällen das Geschlecht die fetale Programmierung beeinflusst, könnte dabei helfen, das individuelle Erkrankungsrisiko besser einzuschätzen.

Kongruent zu Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen zeigten sich viele Effekte in dieser Studie geschlechtsabhängig. Zum besseren Verständnis der zugrundeliegenden Pathogenetik müssten weitere Versuche und Untersuchungen vor allem auf epigenetischer und genetischer Ebene erfolgen.

Vereinfacht dargestellt scheint die fetale Programmierung eine Möglichkeit in der Evolution zu sein, um innerhalb einer Generation die Nachkommen phänotypisch an bestehende Umweltbedingungen anzupassen. Die epigenetischen Prozesse, die diese Programmierung tragen, stellen einen sehr viel schnelleren Prozess dar, als das wesentlich langsamere Evolutionskonzept vom *survival off the fittest*, das bislang als gegeben angenommen wird. In einer Welt wie der unsrigen, in der sich Nahrungsressourcen und Umweltbedingungen rasant verändern, kann es schnell zu einer Diskrepanz zwischen antizipierter und tatsächlicher Umwelt kommen. Schnell entsteht eine Unangepasstheit, welche zu Erkrankungen beiträgt. Die Zunahme von

chronischen Zivilisationserkrankungen in Gesellschaften unter sozioökonomischem Wandel könnte so erklärt werden ¹⁹.

Untersuchungen an menschlichen Kohorten, Tiermodellen und Zellsystemen tragen weiterhin zur Erkenntnisgewinnung bei. Eine der größten Herausforderungen wird es sein, dieses Wissen für die öffentliche Gesundheit zu nutzen und entsprechende Empfehlungen zu formulieren. 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 ¹⁹, 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 der fetalen Programmierung, vor allem im Hinblick auf individuelle Erkrankungsrisiken bei gleichen Zivilisationsrisiken, könnte zur besseren Bekämpfung vieler chronischer Krankheiten beitragen.

8. ANHANG

8.1 Literaturverzeichnis

1. A global brief on hypertension. Silent killer, global public health crisis. Geneva: World Health Organization (WHO); 2013.
2. Mendis S, Davis S, Norrving B. Organizational Update: The World Health Organization Global Status Report on Noncommunicable Diseases 2014; One More Landmark Step in the Combat Against Stroke and Vascular Disease. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2015.
3. World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2011.
4. He FJ, MacGregor GA. Salt, blood pressure and cardiovascular disease. *Current opinion in cardiology* 2007;22:298-305.
5. Strazzullo P, D'Elia L, Kandala NB, Cappuccio FP. Salt intake, stroke, and cardiovascular disease: meta-analysis of prospective studies. *Bmj* 2009;339:b4567.
6. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 1989;2:577-80.
7. Campbell DM, Hall MH, Barker DJ, Cross J, Shiell AW, Godfrey KM. Diet in pregnancy and the offspring's blood pressure 40 years later. *British journal of obstetrics and gynaecology* 1996;103:273-80.
8. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992;35:595-601.
9. Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *The New England journal of medicine* 2008;359:61-73.
10. Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *Bmj* 1989;298:564-7.
11. Lamarck J-BPAdMd. Philosophie Zoologique, ou exposition des considérations relatives à l'histoire naturelle des Animaux, &c: Paris; 1809.
12. Dorner G. Problems and terminology of functional teratology. *Acta biologica et medica Germanica* 1975;34:1093-5.
13. Neel JV. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *American journal of human genetics* 1962;14:353-62.
14. Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *British medical bulletin* 2001;60:5-20.
15. 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.
16. Hocher B, Slowinski T, Bauer C, Halle H. The advanced fetal programming hypothesis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2001;16:1298-9.
17. Gluckman PD, Hanson MA, Beedle AS. Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. *American journal of human biology : the official journal of the Human Biology Council* 2007;19:1-19.
18. Langley-Evans SC, Gardner DS, Welham SJ. Intrauterine programming of cardiovascular disease by maternal nutritional status. *Nutrition* 1998;14:39-47.

19. Gluckman PD, Hanson MA. Developmental plasticity and human disease: research directions. *Journal of internal medicine* 2007;261:461-71.
20. Bateson P, Barker D, Clutton-Brock T, Deb D, D'Udine B, Foley RA, Gluckman P, Godfrey K, Kirkwood T, Lahr MM, McNamara J, Metcalfe NB, Monaghan P, Spencer HG, Sultan SE. Developmental plasticity and human health. *Nature* 2004;430:419-21.
21. Hochberg Z, Feil R, Constancia M, Fraga M, Junien C, Carel JC, Boileau P, Le Bouc Y, Deal CL, Lillycrop K, Scharfmann R, Sheppard A, Skinner M, Szyf M, Waterland RA, Waxman DJ, Whitelaw E, Ong K, Albertsson-Wikland K. Child health, developmental plasticity, and epigenetic programming. *Endocrine reviews* 2011;32:159-224.
22. Santos MS, Joles JA. Early determinants of cardiovascular disease. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 2012;26:581-97.
23. Langley-Evans SC. Fetal programming of CVD and renal disease: animal models and mechanistic considerations. *The Proceedings of the Nutrition Society* 2013;72:317-25.
24. Crews D, McLachlan JA. Epigenetics, evolution, endocrine disruption, health, and disease. *Endocrinology* 2006;147:S4-10.
25. Sookoian S, Gianotti TF, Burgueno AL, Pirola CJ. Fetal metabolic programming and epigenetic modifications: a systems biology approach. *Pediatric research* 2013;73:531-42.
26. Waddington CH. The epigenotype. 1942. *International journal of epidemiology* 2012;41:10-3.
27. Sebert S, Sharkey D, Budge H, Symonds ME. The early programming of metabolic health: is epigenetic setting the missing link? *The American journal of clinical nutrition* 2011;94:1953S-8S.
28. Godfrey KM, Lillycrop KA, Burdge GC, Gluckman PD, Hanson MA. Epigenetic mechanisms and the mismatch concept of the developmental origins of health and disease. *Pediatric research* 2007;61:5R-10R.
29. Hocher B. Fetal programming of cardiovascular diseases in later life - mechanisms beyond maternal undernutrition. *The Journal of physiology* 2007;579:287-8.
30. Wu G, Bazer FW, Cudd TA, Meininger CJ, Spencer TE. Maternal nutrition and fetal development. *The Journal of nutrition* 2004;134:2169-72.
31. Szyf M. The early life environment and the epigenome. *Biochimica et biophysica acta* 2009;1790:878-85.
32. Bogdarina I, Welham S, King PJ, Burns SP, Clark AJ. Epigenetic modification of the renin-angiotensin system in the fetal programming of hypertension. *Circulation research* 2007;100:520-6.
33. Jiang X, Yan J, West AA, Perry CA, Malysheva OV, Devapatla S, Pressman E, Vermeylen F, Caudill MA. Maternal choline intake alters the epigenetic state of fetal cortisol-regulating genes in humans. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2012;26:3563-74.
34. Gluckman PD, Hanson MA, Spencer HG. Predictive adaptive responses and human evolution. *Trends in ecology & evolution* 2005;20:527-33.
35. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suner D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling C, Carlsson E, Poulsen P, Vaag A, Stephan Z, Spector TD, Wu YZ, Plass C, Esteller M. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102:10604-9.

36. Langley-Evans SC, McMullen S. Developmental origins of adult disease. *Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre* 2010;19:87-98.
37. McMullen S, Langley-Evans SC, Gambling L, Lang C, Swali A, McArdle HJ. A common cause for a common phenotype: the gatekeeper hypothesis in fetal programming. *Medical hypotheses* 2012;78:88-94.
38. Ozanne SE, Hales CN. The long-term consequences of intra-uterine protein malnutrition for glucose metabolism. *The Proceedings of the Nutrition Society* 1999;58:615-9.
39. Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *The New England journal of medicine* 1976;295:349-53.
40. Pembrey ME. Male-line transgenerational responses in humans. *Human fertility* 2010;13:268-71.
41. McMillen IC, Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiological reviews* 2005;85:571-633.
42. Watkins AJ, Sinclair KD. Paternal low protein diet affects adult offspring cardiovascular and metabolic function in mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2014;306:H1444-52.
43. 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.
44. McPherson NO, Owens JA, Fullston T, Lane M. Preconception diet or exercise interventions in obese fathers normalizes sperm microRNA profile and metabolic syndrome in female offspring. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2015:ajpendo 00013 2015.
45. Chen YP, Xiao XM, Li J, Reichetzer C, Wang ZN, Hoche B. Paternal body mass index (BMI) is associated with offspring intrauterine growth in a gender dependent manner. *PloS one* 2012;7:e36329.
46. Veena SR, Geetha S, Leary SD, Saperia J, Fisher DJ, Kumaran K, Coakley P, Stein CE, Fall CH. Relationships of maternal and paternal birthweights to features of the metabolic syndrome in adult offspring: an inter-generational study in South India. *Diabetologia* 2007;50:43-54.
47. Lindsay RS, Dabelea D, Roumain J, Hanson RL, Bennett PH, Knowler WC. Type 2 diabetes and low birth weight: the role of paternal inheritance in the association of low birth weight and diabetes. *Diabetes* 2000;49:445-9.
48. Hypponen E, Smith GD, Power C. Parental diabetes and birth weight of offspring: intergenerational cohort study. *Bmj* 2003;326:19-20.
49. Wannamethee SG, Lawlor DA, Whincup PH, Walker M, Ebrahim S, Davey-Smith G. Birthweight of offspring and paternal insulin resistance and paternal diabetes in late adulthood: cross sectional survey. *Diabetologia* 2004;47:12-8.
50. Chen Q, Yan W, Duan E. Epigenetic inheritance of acquired traits through sperm RNAs and sperm RNA modifications. *Nat Rev Genet* 2016;17:733-43.
51. Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 1993;341:938-41.
52. Ding Y, Lv J, Mao C, Zhang H, Wang A, Zhu L, Zhu H, Xu Z. High-salt diet during pregnancy and angiotensin-related cardiac changes. *Journal of hypertension* 2010;28:1290-7.
53. Langley-Evans SC, Welham SJ, Jackson AA. Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. *Life sciences* 1999;64:965-74.

54. Remacle C, Bieswal F, Bol V, Reusens B. Developmental programming of adult obesity and cardiovascular disease in rodents by maternal nutrition imbalance. *The American journal of clinical nutrition* 2011;94:1846S-52S.
55. Clausen JO, Borch-Johnsen K, Pedersen O. Relation between birth weight and the insulin sensitivity index in a population sample of 331 young, healthy Caucasians. *American journal of epidemiology* 1997;146:23-31.
56. Leon DA, Koupil I, Mann V, Tuvemo T, Lindmark G, Mohsen R, Byberg L, Lithell H. Fetal, developmental, and parental influences on childhood systolic blood pressure in 600 sib pairs: the Uppsala Family study. *Circulation* 2005;112:3478-85.
57. Lithell HO, McKeigue PM, Berglund L, Mohsen R, Lithell UB, Leon DA. Relation of size at birth to non-insulin dependent diabetes and insulin concentrations in men aged 50-60 years. *Bmj* 1996;312:406-10.
58. Phipps K, Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Clark PM. Fetal growth and impaired glucose tolerance in men and women. *Diabetologia* 1993;36:225-8.
59. Rich-Edwards JW, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Gillman MW, Hennekens CH, Speizer FE, Manson JE. Birthweight and the risk for type 2 diabetes mellitus in adult women. *Annals of internal medicine* 1999;130:278-84.
60. Barker DJ. The developmental origins of chronic adult disease. *Acta paediatrica* 2004;93:26-33.
61. Ravelli AC, van der Meulen JH, Michels RP, Osmond C, Barker DJ, Hales CN, Bleker OP. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet* 1998;351:173-7.
62. Vehaskari VM, Aviles DH, Manning J. Prenatal programming of adult hypertension in the rat. *Kidney international* 2001;59:238-45.
63. Hoppe CC, Evans RG, Bertram JF, Moritz KM. Effects of dietary protein restriction on nephron number in the mouse. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2007;292:R1768-74.
64. 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. *The Journal of physiology* 2005;565:137-47.
65. Douglas-Denton RN, McNamara BJ, Hoy WE, Hughson MD, Bertram JF. Does nephron number matter in the development of kidney disease? *Ethnicity & disease* 2006;16:S2-40-5.
66. Petrik J, Reusens B, Arany E, Remacle C, Coelho C, Hoet JJ, Hill DJ. A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II. *Endocrinology* 1999;140:4861-73.
67. Brameld JM. The influence of undernutrition on skeletal muscle development. *The British journal of nutrition* 2004;91:327-8.
68. Catalano PM, Thomas AJ, Huston LP, Fung CM. Effect of maternal metabolism on fetal growth and body composition. *Diabetes care* 1998;21 Suppl 2:B85-90.
69. Heerwagen MJ, Miller MR, Barbour LA, Friedman JE. Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2010;299:R711-22.
70. Vanhees K, Vonhogen IG, van Schooten FJ, Godschalk RW. You are what you eat, and so are your children: the impact of micronutrients on the epigenetic programming of offspring. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2014;71:271-85.
71. Shorter KR, Felder MR, Vrana PB. Consequences of dietary methyl donor supplements: Is more always better? *Progress in biophysics and molecular biology* 2015.

72. Sable P, Kale A, Joshi A, Joshi S. Maternal micronutrient imbalance alters gene expression of BDNF, NGF, TrkB and CREB in the offspring brain at an adult age. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 2014;34:24-32.
73. Roseboom TJ, van der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Ravelli AC, Schroeder-Tanka JM, van Montfrans GA, Michels RP, Bleker OP. Coronary heart disease after prenatal exposure to the Dutch famine, 1944-45. *Heart* 2000;84:595-8.
74. Schwab M. [Intrauterine programming of disorders of brain function in later life]. *Gynäkologisch-geburtshilfliche Rundschau* 2009;49:13-28.
75. He FJ, Li J, Macgregor GA. Effect of longer term modest salt reduction on blood pressure: Cochrane systematic review and meta-analysis of randomised trials. *Bmj* 2013;346:f1325.
76. du Cailar G, Mimran A, Fesler P, Ribstein J, Blacher J, Safar ME. Dietary sodium and pulse pressure in normotensive and essential hypertensive subjects. *Journal of hypertension* 2004;22:697-703.
77. Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek E, Vollmer WM, Svetkey LP, Sacks FM, Bray GA, Vogt TM, Cutler JA, Windhauser MM, Lin PH, Karanja N. A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. *The New England journal of medicine* 1997;336:1117-24.
78. He FJ, MacGregor GA. A comprehensive review on salt and health and current experience of worldwide salt reduction programmes. *Journal of human hypertension* 2009;23:363-84.
79. Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. Intersalt Cooperative Research Group. *Bmj* 1988;297:319-28.
80. Contreras RJ, Wong DL, Henderson R, Curtis KS, Smith JC. High dietary NaCl early in development enhances mean arterial pressure of adult rats. *Physiology & behavior* 2000;71:173-81.
81. Dahl LK, Knudsen KD, Heine MA, Leitl GJ. Effects of chronic excess salt ingestion. Modification of experimental hypertension in the rat by variations in the diet. *Circulation research* 1968;22:11-8.
82. Denton D, Weisinger R, Mundy NI, Wickings EJ, Dixon A, Moisson P, Pingard AM, Shade R, Carey D, Ardaillou R. The effect of increased salt intake on blood pressure of chimpanzees. *Nature medicine* 1995;1:1009-16.
83. Machnik A, Neuhofer W, Jantsch J, Dahlmann A, Tammela T, Machura K, Park JK, Beck FX, Muller DN, Derer W, Goss J, Ziomber A, Dietsch P, Wagner H, van Rooijen N, Kurtz A, Hilgers KF, Alitalo K, Eckardt KU, Luft FC, Kerjaschki D, Titze J. Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism. *Nature medicine* 2009;15:545-52.
84. Titze J, Ritz E. Salt and its effect on blood pressure and target organ damage: new pieces in an old puzzle. *Journal of nephrology* 2009;22:177-89.
85. Bagrov AY, Shapiro JI, Fedorova OV. Endogenous cardiostericoids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. *Pharmacological reviews* 2009;61:9-38.
86. Oberleithner H. A physiological concept unmasking vascular salt sensitivity in man. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2012;464:287-93.
87. Fujiwara N, Osanai T, Kamada T, Katoh T, Takahashi K, Okumura K. Study on the relationship between plasma nitrite and nitrate level and salt sensitivity in human

- hypertension : modulation of nitric oxide synthesis by salt intake. *Circulation* 2000;101:856-61.
88. Starmans-Kool MJ, Stanton AV, Xu YY, Mc GTSA, Parker KH, Hughes AD. High dietary salt intake increases carotid blood pressure and wave reflection in normotensive healthy young men. *Journal of applied physiology* 2011;110:468-71.
 89. Tolins JP, Shultz PJ. Endogenous nitric oxide synthesis determines sensitivity to the pressor effect of salt. *Kidney international* 1994;46:230-6.
 90. Sanders PW. Vascular consequences of dietary salt intake. *American journal of physiology Renal physiology* 2009;297:F237-43.
 91. Weinberger MH. Salt sensitivity of blood pressure in humans. *Hypertension* 1996;27:481-90.
 92. Ritz E. Salt and hypertension. *Nephrology* 2010;15 Suppl 2:49-52.
 93. Meneton P, Jeunemaitre X, de Wardener HE, MacGregor GA. Links between dietary salt intake, renal salt handling, blood pressure, and cardiovascular diseases. *Physiological reviews* 2005;85:679-715.
 94. de Boer MP, Ijzerman RG, de Jongh RT, Eringa EC, Stehouwer CD, Smulders YM, Serne EH. Birth weight relates to salt sensitivity of blood pressure in healthy adults. *Hypertension* 2008;51:928-32.
 95. Klaus D, Hoyer J, Middeke M. Salt restriction for the prevention of cardiovascular disease. *Deutsches Arzteblatt international* 2010;107:457-62.
 96. O'Donnell M, Mentz A, Rangarajan S, McQueen MJ, Wang X, Liu L, Yan H, Lee SF, Mony P, Devanath A, Rosengren A, Lopez-Jaramillo P, Diaz R, Avezum A, Lanus F, Yusuf K, Iqbal R, Ilow R, Mohammadifard N, Gulec S, Yusufali AH, Kruger L, Yusuf R, Chifamba J, Kabali C, Dagenais G, Lear SA, Teo K, Yusuf S. Urinary sodium and potassium excretion, mortality, and cardiovascular events. *The New England journal of medicine* 2014;371:612-23.
 97. Ojeda NB, Grigore D, Alexander BT. Developmental programming of hypertension: insight from animal models of nutritional manipulation. *Hypertension* 2008;52:44-50.
 98. Hall JE, Brands MW, Henegar JR. Angiotensin II and long-term arterial pressure regulation: the overriding dominance of the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 1999;10 Suppl 12:S258-65.
 99. Harrison-Bernard LM. The renal renin-angiotensin system. *Advances in physiology education* 2009;33:270-4.
 100. Herichova I, Szantoova K. Renin-angiotensin system: upgrade of recent knowledge and perspectives. *Endocrine regulations* 2013;47:39-52.
 101. Rush JW, Aultman CD. Vascular biology of angiotensin and the impact of physical activity. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme* 2008;33:162-72.
 102. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiological reviews* 2006;86:747-803.
 103. Dzau VJ. Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation* 1988;77:14-13.
 104. Remuzzi G, Perico N, Macia M, Ruggenenti P. The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. *Kidney international Supplement* 2005:S57-65.
 105. Navar LG, Inscho EW, Majid SA, Imig JD, Harrison-Bernard LM, Mitchell KD. Paracrine regulation of the renal microcirculation. *Physiological reviews* 1996;76:425-536.

106. Hollenberg NK. Aldosterone in the development and progression of renal injury. *Kidney international* 2004;66:1-9.
107. Foulquier S, Steckelings UM, Unger T. Perspective: A tale of two receptors. *Nature* 2013;493:S9.
108. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacological reviews* 2000;52:415-72.
109. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacological reviews* 2007;59:251-87.
110. Mitchell KD, Braam B, Navar LG. Hypertensinogenic mechanisms mediated by renal actions of renin-angiotensin system. *Hypertension* 1992;19:118-27.
111. Weir MR, Dzau VJ. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *American journal of hypertension* 1999;12:205S-13S.
112. Hoogwerf BJ, Young JB. The HOPE study. Ramipril lowered cardiovascular risk, but vitamin E did not. *Cleveland Clinic journal of medicine* 2000;67:287-93.
113. He FJ, Markandu ND, MacGregor GA. Importance of the renin system for determining blood pressure fall with acute salt restriction in hypertensive and normotensive whites. *Hypertension* 2001;38:321-5.
114. Graudal NA, Hubeck-Graudal T, Jurgens G. Effects of low sodium diet versus high sodium diet on blood pressure, renin, aldosterone, catecholamines, cholesterol, and triglyceride. *The Cochrane database of systematic reviews* 2011:CD004022.
115. Parikh NI, Gona P, Larson MG, Wang TJ, Newton-Cheh C, Levy D, Benjamin EJ, Kannel WB, Vasani RS. Plasma renin and risk of cardiovascular disease and mortality: the Framingham Heart Study. *European heart journal* 2007;28:2644-52.
116. Oliver WJ, Cohen EL, Neel JV. Blood pressure, sodium intake, and sodium related hormones in the Yanomamo Indians, a "no-salt" culture. *Circulation* 1975;52:146-51.
117. Ramos DR, Costa NL, Jang KL, Oliveira IB, da Silva AA, Heimann JC, Furukawa LN. Maternal high-sodium intake alters the responsiveness of the renin-angiotensin system in adult offspring. *Life sciences* 2012;90:785-92.
118. Moritz KM, Cuffe JS, Wilson LB, Dickinson H, Wlodek ME, Simmons DG, Denton KM. Review: Sex specific programming: a critical role for the renal renin-angiotensin system. *Placenta* 2010;31 Suppl:S40-6.
119. da Silva AA, de Noronha IL, de Oliveira IB, Malheiros DM, Heimann JC. Renin-angiotensin system function and blood pressure in adult rats after perinatal salt overload. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* 2003;13:133-9.
120. Leandro SM, Furukawa LN, Shimizu MH, Casarini DE, Seguro AC, Patriarca G, Coelho MS, Dolnikoff MS, Heimann JC. Low birth weight in response to salt restriction during pregnancy is not due to alterations in uterine-placental blood flow or the placental and peripheral renin-angiotensin system. *Physiology & behavior* 2008;95:145-51.
121. Mao C, Liu R, Bo L, Chen N, Li S, Xia S, Chen J, Li D, Zhang L, Xu Z. High-salt diets during pregnancy affected fetal and offspring renal renin-angiotensin system. *J Endocrinol* 2013;218:61-73.
122. Hasandokht T, Farajzadegan Z, Siadat ZD, Paknahad Z, Rajati F. Lifestyle interventions for hypertension treatment among Iranian women in primary health-care settings: Results of a randomized controlled trial. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences* 2015;20:54-61.

123. Wang Y, Liu FQ, Wang D, Mu JJ, Ren KY, Guo TS, Chu C, Wang L, Geng LK, Yuan ZY. Effect of salt intake and potassium supplementation on serum renalase levels in Chinese adults: a randomized trial. *Medicine* 2014;93:e44.
124. McCarthy NS, Vangjeli C, Cavalleri GL, Delanty N, Shianna KV, Surendra P, O'Brien E, Munroe PB, Masca N, Tomaszewski N, Samani NJ, Stanton AV. Two further blood pressure loci identified in ion channel genes with a gene-centric approach. *Circulation Cardiovascular genetics* 2014;7:873-9.
125. Lifton RP. Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science* 1996;272:676-80.
126. Poulter NR, Khaw KT, Hopwood BE, Mugambi M, Peart WS, Rose G, Sever PS. The Kenyan Luo migration study: observations on the initiation of a rise in blood pressure. *Bmj* 1990;300:967-72.
127. Hooper L, Bartlett C, Davey SG, Ebrahim S. Advice to reduce dietary salt for prevention of cardiovascular disease. *The Cochrane database of systematic reviews* 2004:CD003656.
128. Midgley JP, Matthew AG, Greenwood CM, Logan AG. Effect of reduced dietary sodium on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Jama* 1996;275:1590-7.
129. Stolarz-Skrzypek K, Staessen JA. Reducing Salt Intake for Prevention of Cardiovascular Disease-Times Are Changing. *Advances in chronic kidney disease* 2015;22:108-15.
130. Schmieder RE, Messerli FH, Garavaglia GE, Nunez BD. Dietary salt intake. A determinant of cardiac involvement in essential hypertension. *Circulation* 1988;78:951-6.
131. Creager MA, Roddy MA, Holland KM, Hirsch AT, Dzau VJ. Sodium depresses arterial baroreceptor reflex function in normotensive humans. *Hypertension* 1991;17:989-96.
132. du Cailar G, Ribstein J, Mimran A. Dietary sodium and target organ damage in essential hypertension. *American journal of hypertension* 2002;15:222-9.
133. Cabral EV, Vieira-Filho LD, Silva PA, Nascimento WS, Aires RS, Oliveira FS, Luzardo R, Vieyra A, Paixao AD. Perinatal Na⁺ overload programs raised renal proximal Na⁺ transport and enalapril-sensitive alterations of Ang II signaling pathways during adulthood. *PloS one* 2012;7:e43791.
134. Yu HC, Burrell LM, Black MJ, Wu LL, Dilley RJ, Cooper ME, Johnston CI. Salt induces myocardial and renal fibrosis in normotensive and hypertensive rats. *Circulation* 1998;98:2621-8.
135. Porter JP, King SH, Honeycutt AD. Prenatal high-salt diet in the Sprague-Dawley rat programs blood pressure and heart rate hyperresponsiveness to stress in adult female offspring. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2007;293:R334-42.
136. Hinojosa-Laborde C, Craig T, Zheng W, Ji H, Haywood JR, Sandberg K. Ovariectomy augments hypertension in aging female Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* 2004;44:405-9.
137. Koga Y, Hirooka Y, Araki S, Nozoe M, Kishi T, Sunagawa K. High salt intake enhances blood pressure increase during development of hypertension via oxidative stress in rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 2008;31:2075-83.
138. Svitok P, Molcan L, Vesela A, Kruzliak P, Moravcik R, Zeman M. Increased salt intake during early ontogenesis lead to development of arterial hypertension in salt-resistant Wistar rats. *Clin Exp Hypertens* 2015;37:142-7.

139. Ozaki T, Nishina H, Hanson MA, Poston L. Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring. *The Journal of physiology* 2001;530:141-52.
140. Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2000;279:E83-7.
141. Langley SC, Jackson AA. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clinical science* 1994;86:217-22; discussion 121.
142. Maia DRR, Lopes KL, Heimann JC, Furukawa LNS. High maternal sodium intake alters sex-specific renal renin-angiotensin system components in newborn Wistar offspring. *J Dev Orig Health Dis* 2016;7:282-9.
143. Kitada K, Daub S, Zhang Y, Klein JD, Nakano D, Pedchenko T, Lantier L, LaRocque LM, Marton A, Neubert P, Schroder A, Rakova N, Jantsch J, Dikalova AE, Dikalov SI, Harrison DG, Muller DN, Nishiyama A, Rauh M, Harris RC, Luft FC, Wassermann DH, Sands JM, Titze J. High salt intake reprioritizes osmolyte and energy metabolism for body fluid conservation. *J Clin Invest* 2017;127:1944-59.
144. Viengchareun S, Le Menuet D, Martinerie L, Munier M, Pascual-Le Tallec L, Lombes M. The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nucl Recept Signal* 2007;5:e012.
145. 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. *Pediatric nephrology* 1994;8:175-80.
146. Koleganova N, Piecha G, Ritz E, Becker LE, Muller A, Weckbach M, Nyengaard JR, Schirmacher P, Gross-Weissmann ML. Both high and low maternal salt intake in pregnancy alter kidney development in the offspring. *American journal of physiology Renal physiology* 2011;301:F344-54.
147. Oloyo AK, Imaga NOA, Fatope Y, Sofola OA. Sex differences in cardiac and renal responses to a high salt diet in Sprague-Dawley rats. *Heliyon* 2019;5:e01665.
148. 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.
149. van Haaster MC, McDonough AA, Gurley SB. Blood pressure regulation by the angiotensin type 1 receptor in the proximal tubule. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2018;27:1-7.
150. Ojeda NB, Intapad S, Alexander BT. Sex differences in the developmental programming of hypertension. *Acta physiologica* 2014;210:307-16.
151. Gilbert JS, Nijland MJ. Sex differences in the developmental origins of hypertension and cardiorenal disease. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2008;295:R1941-52.
152. Brosnihan KB, Li P, Ganten D, Ferrario CM. Estrogen protects transgenic hypertensive rats by shifting the vasoconstrictor-vasodilator balance of RAS. *The American journal of physiology* 1997;273:R1908-15.
153. Carone BR, Fauquier L, Habib N, Shea JM, Hart CE, Li R, Bock C, Li C, Gu H, Zamore PD, Meissner A, Weng Z, Hofmann HA, Friedmann N, Rando OJ. Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell* 2010;143:1084-96.

154. Kaati G, Bygren LO, Edvinsson S. Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. *European journal of human genetics* : EJHG 2002;10:682-8.
155. Grasemann C, Devlin MJ, Rzeczowska PA, Herrmann R, Horsthemke B, Hauffa BP, Grynopas M, Alm C, Bouxsein ML, Palmert MR. Parental diabetes: the Akita mouse as a model of the effects of maternal and paternal hyperglycemia in wildtype offspring. *PLoS one* 2012;7:e50210.
156. Jamieson MJ, Gonzales GM, Jackson TI, Koerth SM, Romano WF, Tan DX, Castillon F, Skinner MH, Grossmann M, Shepherd AM. Evaluation of the IITC tail cuff blood pressure recorder in the rat against intraarterial pressure according to criteria for human devices. *American journal of hypertension* 1997;10:209-16.
157. Gangwar A, Kumar P, Rawat A, Tiwari S. Noninvasive measurement of systolic blood pressure in rats: a novel technique. *Indian journal of pharmacology* 2014;46:351-2.

8.2 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Teresa Maria Augustina Johanna Ritter, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung des Einflusses einer parentalen Hochsalzdiät auf das renale Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, der Nachkommen erster Generation, am Modell der Ratte“ 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet. Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

8.3 Anteilserklärung

Teresa Ritter hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Originalarbeit

- 1) Putra SE, Tsuprykov O, Von Websky K, Ritter T, Reichetzedder C, Hoher B.
Dealing with large sample sizes: comparison of a new one spot dot blot method to western blot. Clin Lab. 2014;60(11):1871-7.

Beitrag im Einzelnen:

- Durchführung der Western Blots
- Zurverfügungstellung der statistischen Auswertung der aus den Western Blots generierten Primärdaten, die als Vergleichsdaten zur *one spot dot blot method* dienten
- Mitarbeit an der Erstellung des Manuskripts

PD Dr. Christian Freise
Unterschrift, Datum und Stempel
des betreuenden Hochschullehrers

Teresa Ritter
Unterschrift der Doktorandin

8.4 Publikationsliste

- 1) Putra SE, Tsuprykov O, Von Websky K, Ritter T, Reichetzedler C, Hoher B. *Dealing with large sample sizes: comparison of a new one spot dot blot method to western blot.* Clin Lab. 2014;60(11):1871-7.

8.5 Lebenslauf

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

8.6 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Berthold Hoher möchte ich für die freundliche Überlassung meines Dissertationsthemas und für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes herzlich danken. Seine Unterstützung und seine konstruktiven Anregungen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. PD Dr. Christian Freise möchte ich für die unkomplizierte und freundliche Weiterbetreuung danken.

Ein ganz besonderer Dank gebührt Dr. Christoph Reichetzedler, ohne dessen kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit ich diese Arbeit so nicht hätte bewerkstelligen können. Für sein großes Engagement bei der Betreuung meiner Promotion und für seine ständige Hilfsbereitschaft bin ich sehr dankbar.

Für die Hilfestellungen bei den Versuchsdurchführungen und die häufigen kreativen Diskussionen möchte ich Jan Rahnenführer meinen Dank aussprechen. Auch Dr. Karoline von Websky, die mir viele konstruktive Anregungen für meine Arbeit gab, möchte ich herzlichen danken. Oleg Tsuprykov und Sulisty Emantoko Dwi Putra danke ich für die technische Assistenz und die guten Tipps bei der Durchführung der Western Blots.

Meiner Familie, insbesondere meinem Vater und meinem Bruder möchte ich für ihre große Unterstützung danken. Ich danke meinen Freunden, die wie Familie für mich sind.

