

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

DISSERTATION

Der hepato-metabolische Phänotyp genetisch gesunder  
Nachkommen heterozygoter eNOS knock-out Elterntiere vor  
dem Hintergrund des Konzepts der Fetalen Programmierung im  
Mausmodell

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Hannah Marie Haumann

aus Marburg

Gutachter/in:     1. Prof. Dr. B. Hocher  
                          2. Prof. Dr. med. M. Schwab  
                          3. Prof. Dr. J.-P. Stasch

Datum der Promotion: 03.06.2012

Meinen Eltern: Edda und Richard

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
1.1	Das Konzept der Fetalen Programmierung	4
1.2	Tierexperimentelle Studien zur fetalen Programmierung	8
1.3	Mechanismen der intrauterinen Programmierung	10
1.4	Das Stickstoffmonoxid System und seine physiologische Bedeutung unter besonderer Berücksichtigung der Schwangerschaft	12
1.4.1	Die physiologische Bedeutung von Stickstoffmonoxid	12
1.4.2	Die NO-Synthasen	13
1.4.3	Phänotypische Merkmale von eNOS knock-out Tieren	13
1.4.4	Bedeutung von eNOS für das intrauterine Wachstum	15
1.5	Fetale Programmierung von Diabetes mellitus Typ II und Insulinresistenz	17
1.6	Die Rolle der Leber im Glukosestoffwechsel und bei der Ausbildung von Insulinresistenz	18
<b>2</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>23</b>
3.1	Geräte und Chemikalien	23
3.1.1	Technisches Gerät	23
3.1.2	Chemikalien	23
3.1.3	Verbrauchsmaterialien	24
3.1.4	Software	24
3.2	Tiere und Tierhaltung	25
3.2.1	Versuchstiere	25
3.2.2	Tierhaltung	25
3.2.3	Organentnahme	26
3.3	Versuchsdesign	26
3.4	Physiologische Methoden	28
3.4.1	Untersuchungen im Stoffwechsellkäfig	28
3.4.2	Nicht-invasive Puls- und Blutdruckmessung	28
3.5	Histologische Methoden	29
3.5.1	Konventionelle Histologie	29
3.5.1.1	Fixierung der Organe für Paraffinschnitte	29
3.5.1.2	Einbettung der Organe für Paraffinschnitte	29
3.5.1.3	Anfertigung der Schnittpräparate	29
3.5.1.4	Hämatoxylin Eosin Färbung der Leber	30
3.5.1.5	Auswertung der H.E. gefärbten Präparate	31
3.5.2	Kryohistologie	31
3.5.2.1	Herstellung der kryohistologischen Schnittpräparate	31
3.5.2.2	Oil Red O Färbung der Lebern	32
3.5.2.3	Auswertung der Oil red O gefärbten Präparate	33
3.6	Biochemische Methoden	33
3.6.1	Bestimmung der Nüchternglukosekonzentration aus Plasmen	33
3.6.2	Intraperitonealer Glukosetoleranztest	34
3.6.3	Ermittlung des Glykogengehaltes der Lebern	35
3.6.4	Bestimmung der Kreatininwerte aus Plasma und Urin	35
3.6.5	Bestimmung der Nüchterninsulinkonzentration aus Plasmen	36
3.6.6	Berechnung von HOMA- und QUICKI - Index aus Nüchternglukose- und -insulinkonzentrationen	36

<b>3.7 Molekularbiologische Methoden</b>	<b>37</b>
3.7.1 Genotypisierung der Tiere mittels PCR	37
3.7.1.1 DNA Isolation	37
3.7.1.2 eNOS WT PCR	37
3.7.1.3 PCR für eNOS knock-out Allel	38
3.7.1.4 Darstellung der PCR Produkte mittels Gelelektrophorese	39
3.7.2 Untersuchung der relativen Genexpression mittels quantitativer Real-Time PCR	39
3.7.2.1 RNA-Isolation mittels Single step Methode	40
3.7.2.2 RNA Quantifizierung	40
3.7.2.3 Überprüfung der Reinheit und Qualität der extrahierten RNA	41
3.7.2.4 Reverse Transkription	41
3.7.2.5 Primer und Primerdesign	42
3.7.2.6 Quantitative Real-Time PCR	44
3.7.2.7 Effizienzbestimmung der Reaktion	45
3.7.2.8 Berechnung der relativen Genexpression	45
<b>3.8 Statistische Auswertung</b>	<b>46</b>
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>47</b>
<b>4.1 Wachstum der Tiere</b>	<b>47</b>
4.1.1 Geburtsgewichte der Tiere	47
4.1.2 Körpergewichte während des Versuches	48
4.1.3 Körperlänge von Geburt bis zum 13. Lebenstag	56
<b>4.2 Absolute und relative Organgewichte</b>	<b>58</b>
<b>4.3 Parameter zur allgemeinen phänotypischen Charakterisierung der Tiere</b>	<b>59</b>
4.3.1 Blutdruckwerte	59
4.3.2 Parameter der Nierenfunktion	61
<b>4.4 Parameter zur Charakterisierung des Glukosestoffwechsels der Tiere</b>	<b>62</b>
4.4.1 Plasmaglukosekonzentrationen der nüchternen Tiere	62
4.4.2 Plasmainsulinkonzentrationen der nüchternen Tiere	63
4.4.3 Glukosesensitivitätsindices	64
4.4.3.1 HOMA Index	64
4.4.3.2 QUICKI Index	65
4.4.4 Intraperitonealer Glukosetoleranztest	65
4.4.4.1 Plasmaglukosekonzentrationen während des intraperitonealen Glukosetoleranztests	65
4.4.4.2 Area under the curve für Glukose im ipGTT	67
4.4.4.3 Plasmainsulinkonzentrationen während des ipGTT	68
4.4.4.4 Area under the curve für Insulin im ipGTT	68
<b>4.5 Der hepatische Phänotyp der Tiere</b>	<b>71</b>
4.5.1 H.E. Färbung	71
4.5.2 Oil red O Färbung	71
4.5.3 Glykogengehalt der Lebern	72
<b>4.6 Expressionsanalysen</b>	<b>74</b>
<b>5 Diskussion</b>	<b>77</b>
<b>5.1 Die Überprüfung der Advanced Fetal Programming Hypothese in einem Mausmodell mit heterozygotem eNOS Knock-out</b>	<b>78</b>
<b>5.2 Programmierung des hepatischen Phänotyps durch elterliches eNOS Knock-out</b>	<b>81</b>
<b>5.3 Never deny the fathers – mögliche Bedeutungen des paternalen eNOS Knock-outs</b>	<b>83</b>
<b>5.4 Sex matters – Hinweise auf geschlechtsspezifische Programmierung aus dem vorliegenden Modell</b>	<b>85</b>

<b>5.5 Diskussion ausgewählter Methoden</b>	<b>89</b>
5.5.1 Oil red O Methode zur Bestimmung des Lipidgehaltes der Lebern	89
5.5.2 Bestimmung des Glykogengehalts der Lebern	89
5.5.3 Expressionsanalyse mittels rtPCR	90
5.5.4 Intraperitonealer Glukosetoleranztest	91
<b>5.6 Schlussfolgerungen und Ausblick</b>	<b>91</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>93</b>
<b>7 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>104</b>
<b>8 Abbildungsverzeichnis</b>	<b>106</b>
<b>9 Zusammenfassung</b>	<b>107</b>
<b>10 Lebenslauf</b>	<b>109</b>
<b>11 Publikationsliste</b>	<b>110</b>
<b>12 Danksagung</b>	<b>111</b>
<b>13 Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>112</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Konzept der Fetalen Programmierung

Warum versterben in ärmeren, ländlichen Regionen Englands mehr Menschen an kardiovaskulären „Wohlstandserkrankungen“ als in reichen Bezirken Londons? Dies war die Ausgangsfrage, die Ende der 1980er Jahre durch den britischen Epidemiologen David Barker zur Entwicklung des Konzepts der *Fetalen Programmierung* führte (1). Barker bemerkte, dass das geographische Verteilungsmuster der Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen in England zwischen 1968 und 1978 in etwa der geographischen Verteilung der Neugeborenensterblichkeit zwischen 1921 und 1925 glich. Regionen mit hoher Säuglingssterblichkeit zeichneten sich durch eine etwa doppelt so hohe Prävalenz der koronaren Herzkrankheit (KHK) aus (1). Andere häufige Todesursachen hingegen zeigten eine weniger konsistente geographische Korrelation. Säuglingssterblichkeit, ebenso wie niedriges Geburtsgewicht, können als Parameter fetalen Wachstums verstanden werden. Barker folgerte daher, dass das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen in einem Zusammenhang mit beeinträchtigtem fetalem Wachstum stehen könnte. Armutsbedingte Mangelernährung der Mutter während der Schwangerschaft könnte eine mögliche zugrunde liegende Ursache darstellen. Daraufhin verfolgte Barker 5654 männliche Probanden aus der englischen Region Hertfordshire nach, welche zwischen 1911 und 1930 geboren waren (2). Es zeigte sich, dass das Risiko, im Alter von ca. 60 Jahren an einer KHK zu versterben, bei Probanden mit einem Geburtsgewicht von 2500 g im Vergleich zu Probanden mit einem Geburtsgewicht zwischen 2500 und 4000 g um etwa 25% erhöht ist (2)(3). Aus der Zusammenschau der Beobachtungen leitete er die sog. *Barker Hypothese* ab: Je leichter ein Kind auf die Welt kommt, desto höher ist sein Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen im Erwachsenenalter. In den folgenden Jahren nach Barkers erster Veröffentlichung 1986 zeigte eine Reihe epidemiologischer Assoziationsstudien eine Korrelation zwischen einigen kardiovaskulärer Risikofaktoren und Krankheiten mit niedrigem Geburtsgewicht (u.a. arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus) (4)(5). Auch Metaanalysen mit insgesamt 200.000 skandinavischen Teilnehmern zeigten bei männlichen Probanden einen linear inversen Zusammenhang zwischen dem mittleren systolischen Blutdruck in Adoleszenz und Erwachsenenalter und dem Geburtsgewicht (6).

Eine Auseinandersetzung mit der Idee der *Programmierung* fand auch schon lange vor Barkers Beobachtungen statt. Lamarck (1744-1892) spricht in seiner Evolutionstheorie von einer „Vererbung erworbener Eigenschaften“ unabhängig der klassischen Vererbungslehre als eine Ursache der Artenvielfalt (7). Der Verhaltensbiologe Konrad Lorenz (1930-1989) beschäftigte sich in den 1930-ern mit dem Konzept der *Prägung* und führte diesen Begriff in den verhaltensbiologischen Diskurs ein (8). In den 1970ern begründete Günter Dörner das Konzept der *Funktionellen Teratologie* und prägte den Begriff der *perinatalen Programmierung* (9). Dörner folgerte aus seinen Assoziationsstudien zum Zusammenhang von Diabetes mellitus und perinataler Ernährung, dass es zur Ausprägung perinatal angelegter Eigenschaften kommen kann, welche nicht durch Vererbung im mendelschen Sinne weitergegeben werden. Eine Gruppe um Alan Lucas beleuchtete Ende der 1980-er das Konzept unter dem speziellen Aspekt der Bedeutung neonataler und frühkindlicher Ernährung für die Entwicklung und das spätere Krankheitsrisiko und begründete die Idee des *Nutritional Programming* (10). Basierend auf Arbeiten von McCance und Widdowsen betont Lucas in seinem Programmierungskonzept, dass es nur während bestimmter *kritischer Zeitfenster* der Entwicklung zu längerfristigen Veränderungen eines Organismus kommen kann. Fetale Programmierung im engeren Sinne ist definiert als ein Prozess, bei dem durch äußere Faktoren, z.B. maternale Ernährung oder Hormone, während kritischer Zeitfenster der Entwicklung die künftige Struktur und Funktion von Organsystemen dauerhaft bestimmt wird (11).

Barker's Hypothese traf allerdings nicht nur auf Zustimmung. In Anlehnung an Arbeiten von Forsdahl et al. aus Norwegen sowie Beobachtungen von Hinkle et al. wurde die Kritik laut, dass die beobachteten Phänomene lediglich Ausdruck sozioökonomischer Faktoren, insbesondere des Kindesalters seien (12)(13). So beobachteten Hinkle et al. an mehreren Generationen Angestellter der Bell System Company in den USA, dass Kinder von Eltern, die zur sog. *White Collar* Gruppe der Arbeiter gerechnet wurden, eine niedrigere Inzidenz der KHK aufwiesen als jene, deren Eltern zur sog. *Blue Collar* Gruppe unter den Arbeitern zählten (*Blue Collar* Arbeiter führen stark körperliche belastende Tätigkeiten in der industriellen Produktion aus; *White Collar* Arbeiter klassischerweise Bürotätigkeiten). Schließlich konnten Rich-Edwards et al. 1997 anhand von Daten aus einer seit 1976 durchgeführten, systematischen Beobachtungsstudie an über 70.000 amerikanischen Krankenschwestern diese Kritik schwächen. Ihre Analysen zeigten, dass weder die Zugehörigkeit zu einer bestimmten



Ethnie, noch sozioökonomische Faktoren der Kindheit oder sog. *life style* Faktoren des Erwachsenenalters (z.B. Alkoholkonsum, körperliche Aktivität) den beobachteten Zusammenhang zwischen kardiovaskulärer Mortalität und niedrigem Geburtsgewicht wesentlich schwächen (14).

Neben der beschriebenen Kritik an Barker's Hypothese wurde zunehmend auch der Begriff *Programmierung* skeptisch diskutiert, da er in den Augen der Kritiker der

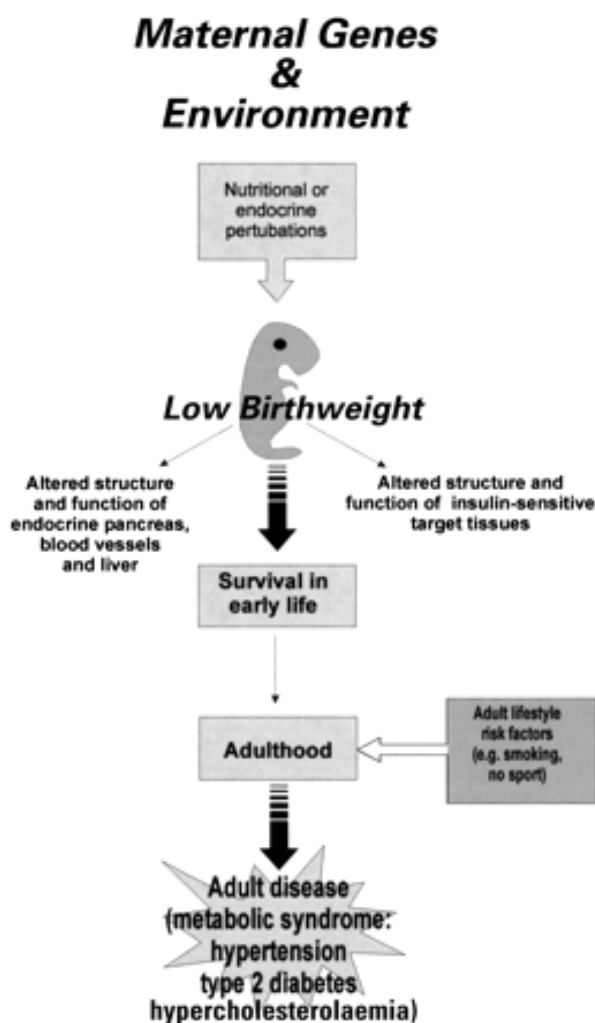


Abb. 1: Die *Advanced Fetal Programming* Hypothese

Formbarkeit von Organismen während der Entwicklung nicht hinreichend gerecht wird. Es entwickelte sich das Konzept der *Developmental Plasticity*, welches auf der sog. *Thrifty Phenotype* Hypothese beruht (15). Letztere ist eine Weiterentwicklung der ursprünglichen Barker'schen Hypothese und geht wiederum auf die sog. *Thrifty Genotype* Hypothese von Neel zurück (16). Unter der *Thrifty Phenotype* Hypothese wird zusammengefasst, dass ein Fetus, um sein Überleben *in utero* zu garantieren, alle bereitgestellten Nährstoffe bevorzugt für die Entwicklung lebensnotwendiger Organe einsetzt. Folglich kann dies bei Mangelzuständen zu dauerhaften Veränderungen von Struktur und Funktion in weniger präferierten Organen führen.

Demgegenüber stehen längerfristige Anpassungen des Organismus, welche nicht einen unmittelbaren Überlebensvorteil

bieten müssen, beim Konzept der *Developmental Plasticity* im Vordergrund (4). Im Sinne von *Developmental Plasticity* stellt das intrauterine Milieu ein Abbild postnataler Lebensbedingungen dar, und der sich entwickelnde Organismus passt Organstruktur und –funktion diesen Bedingungen an (17). Solche Anpassungen werden als *Predictive Adaptive Responses* bezeichnet. Stimmen intrauterines Abbild und postnatale

Lebensbedingungen nicht überein, besteht ein sog. *Mismatch*, wobei der Grad des Mismatch mit der Höhe des Krankheitsrisikos korreliert (17).

Auch die von Berthold Hocher aufgestellte *Advanced Fetal Programming* Hypothese (vgl. Abb. 1) stellt eine Weiterentwicklung von Barkers ursprünglichem Konzept dar (18). Hocher et al. konnten zeigen, dass maternale genetische Polymorphismen der  $\beta$ -Untereinheit des G-Proteins (825T Allel) unabhängig vom kindlichen Genotyp mit dem Geburtsgewicht korrelieren (19). In einer zweiten, unabhängigen Kohorte konnte 2002 ein Zusammenhang zwischen diesem Polymorphismus und einem verringertem Kopfumfang bei Neugeborenen nachgewiesen werden (20). Kurze Zeit später zeigten Wang et al. in einer Fall-Kontroll-Studie, dass maternale Polymorphismen zweier Enzyme der hepatischen Biotransformation (CYP1A1 und GSTT1) den Effekt von Rauchen während der Schwangerschaft auf das Geburtsgewicht beeinflussen (21). Zusammenfassend lassen diese Daten annehmen, dass neben Umwelteinflüssen und maternaler Gesundheit während der Schwangerschaft auch maternale Gene Determinanten des Geburtsgewichts, und damit des späteren Krankheitsrisikos, sind. Dabei ist der Einfluss maternaler Gene von Relevanz, selbst wenn diese nicht vererbt werden, oder sie auf den maternalen Phänotyp keine nachweisbaren Auswirkungen haben.

Einen alternativen Ansatz zur Erklärung des Zusammenhangs zwischen Geburtsgewicht und Krankheit im Erwachsenenalter bietet die von Hattersley und Tooke aufgestellte *Fetal Insulin* Hypothese (22). Sowohl intrauterine Wachstumseinschränkung als auch spätere Insulinresistenz stellen ihnen zufolge die gemeinsame phänotypische Ausprägung einer genetisch bedingten Insulinresistenz dar. Die fetale Insulinsekretion und -wirkung ist entscheidend an der intrauterinen Wachstumskontrolle, insbesondere während des letzten Schwangerschaftsdrittels, beteiligt. Insulinresistenz ist weiterhin ein wichtiger Faktor in der Entstehung von endothelialer Dysfunktion und damit letztlich von kardiovaskulären Erkrankungen.

Das zunehmende Verständnis von zugrunde liegenden Mechanismen fetaler Programmierung wird zur Weiterentwicklung der vorgestellten Konzepte in den kommenden Jahren führen.

## 1.2 Tierexperimentelle Studien zur fetalen Programmierung

Obwohl seit Barker eine Vielzahl epidemiologischer Daten einen Zusammenhang zwischen maternaler Ernährung und postnatalem Krankheitsrisiko wahrscheinlich machen, können epidemiologische Assoziationen nicht den Beweis einer Kausalität leisten. Verschiedenste Tiermodelle sind daher entwickelt worden, um im Sinne eines *proof of principle* epidemiologische Beobachtungen zu bestätigen und Mechanismen fetaler Programmierung genauer zu verstehen.

Eine Übersicht über die gängigen Tiermodelle im Kontext fetaler Programmierung ist in Tab. 1 dargestellt. In etwa 75% der Untersuchungen kommen Nagetiere, überwiegend Ratten, zum Einsatz, gefolgt von Schafen (ca. 12%) (23).

Intervention	Tierart
1. Modelle mit diätetischer Manipulation Globale Kalorienreduktion, Niedrig-Protein-Diät, Eisenmangel, Überernährung	Nager, Schaf, Schwein
2. Modelle mit operativen/hypoxischen Methoden Bilaterale Ligation der A. uterina, uteroplazentare Embolisation, Karunkolektomie, unilaterale Ligation der A. uterina, Hypoxiekammer	Nager, Schaf, Affe, Meerschweinchen, Schwein
3. Glukokortikoidbehandlung	Nager, Schaf
4. Maternaler Diabetes	Nager, Schaf
5. Stress	Nager
6. Genetische Manipulation	Nager

**Tab. 1: Übersicht über gängige Tiermodelle für die Untersuchung der Effekte intrauteriner Wachstumseinschränkung**

Alle in Tab. 1 aufgeführten Tiermodelle zeichnen sich durch modellspezifische Vorteile und Einschränkungen aus. Die Verabreichung einer Niedrig-Protein Diät (=low protein Diät) während der Schwangerschaft ist das am häufigsten verwendete Modell (24). Die spezifischen Effekte diätetischer Interventionen sind stark von der Diätzusammensetzung, dem Zeitpunkt der Intervention und der Spezies beeinflusst. Operative Methoden eignen sich besonders für größere Tiere, insbesondere Schafe und Ratten, und diese Tiermodelle stehen weniger unter dem Einfluss der maternalen Konstitution. Bezüglich der Exposition mit Glukokortikoiden während der Schwangerschaft sind in Abhängigkeit von Dosis und Frequenz der Applikation,

Glukokortikoidtyp, Geschlecht, Tierspezies und fetalem Entwicklungsstadium aus den bisherigen Untersuchungen große Unterschiede der Effekte erkenntlich (23).

Tiermodelle mit Deletion bzw. Überexpression von Genen kommen bisher verhältnismäßig wenig zum Einsatz. Beispielhaft haben Langenveld et al. den Effekt maternaler Hypercholesterinämie auf die postnatale Gefäßreagibilität *in vitro* aufgezeigt. Homozygote *Low Density Lipoprotein* (LDL) knock-out Tiere wurden so verpaart, dass sich ihre heterozygoten Nachkommen entweder in einer Wildtyp (WT) Mutter oder einer homozygoten, hypercholesterinämien knock-out Mutter entwickeln konnten (25). Trotz eines genetisch identischen Hintergrundes wiesen jene heterozygoten Nachkommen, welche intrauterin dem hypercholesterinämien Milieu ausgesetzt waren, eine vergleichsweise abnorme Gefäßreagibilität auf. Longo et al. beobachteten ähnliche Effekte auf die Gefäßresponsibilität auch bei heterozygoten Nachkommen homozygoter eNOS knock-out Tiere (26). Beispielhaft für eine Reihe weiterer Studien, in denen der Einfluss elterlicher Knock-outs bzw. Überexpression auf die nachfolgende Generation untersucht wurde, ist eine Studie von Crossey et al.. Sie konnten zeigen, dass die elterliche Überexpression von *Insulin like Growth Factor Binding Protein 1* (IGF-BP 1) zu einer intrauterinen Wachstumseinschränkung (IUGR, *Intrauterine Growth Restriction*) führt (27). Aus ihren Experimenten ließ sich allerdings aufgrund fehlender postnataler Beobachtung der Tiere keine mögliche Bedeutung für das spätere Krankheitsrisiko ableiten. Constância et al. konnten durch ein selektives plazentares Knock-out von *Insulin like Growth Factor 2* (IGF-2), einem Gen mit paternalem *Imprinting*, zeigen, dass die hierdurch induzierte eingeschränkte intrauterine Entwicklung zu einem postnatalen *catch-up* Wachstum führt (28). Ein *catch-up* Wachstumsmuster, wie in der Studie von Constancia et al. wiederum ist mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert (29). *Imprinting* ist ein epigenetischer Mechanismus und meint, dass Chromosomen mütterlicher und väterlicher Herkunft funktionell ungleich sind, wobei bei paternalem *Imprinting* das väterliche Chromosom von funktioneller Relevanz ist.

Auch wenn die beschriebenen Experimente einen Einfluss des elterlichen genetischen Hintergrundes auf die fetale Entwicklung nahe legen, kann eine Beeinflussung durch den fetalen Genotyp in den meisten dieser Modelle nicht sicher ausgeschlossen werden. Tierexperimente, in denen der Einfluss elterlicher genetischer Veränderungen auf den hepato-metabolischen Phänotyp bei WT Nachkommen – ohne Weitergabe des

elterlichen Allels - systematisch untersucht wurde, liegen zum gegebenen Zeitpunkt nicht vor.

### 1.3 Mechanismen der intrauterinen Programmierung

Intrauterine Programmierung ist grundsätzlich bei allen sich entwickelnden Organismen jedes Geburtsgewichtes möglich, wobei es an beiden Extremen des Gewichtsspektrums mit einer schlechteren Prognose verbunden zu sein scheint (17). Prinzipiell kann jede Ebene eines physiologischen Systems durch fetale Programmierung beeinflusst werden, und dies zu jeder Zeit des intrauterinen Lebens (17). Allerdings ist deutlich geworden, dass insbesondere während der Spätschwangerschaft - in der Phase zunehmender Zelldifferenzierung –externe Stimuli langfristige Veränderungen der Proteinsynthese induzieren können (17). Kinder von Müttern, die während einer Hungersnot in Amsterdam 1944-1945 schwanger waren, zeigten, verglichen mit Kindern von nicht exponierten Müttern, im oralen Glukostoleranztest signifikant höhere Glukosekonzentrationen (30). Ravelli et al. konnten dabei zeigen, dass die Veränderungen im oralen Glukosetoleranztest bei jenen Kindern besonders stark ausgeprägt waren, deren Mütter in der Spätschwangerschaft Hunger litten. Nyirenda et al. konnten auch an Ratten zeigen, dass lediglich eine Glukokortikoidgabe in der Spätschwangerschaft zu dauerhaft veränderter hepatischer Expression der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEP-CK) und des Glukokortikoidrezeptors (GR) bei den Nachkommen führt, und längerfristig bei diesen Glukoseintoleranz induziert (31).

Durch veränderte Proliferation, klonale Selektion und Apoptose beeinflusst das intrauterine Milieu Zellzahl- und -größe und somit in der Konsequenz die Funktion gesamter Organverbände. Brenner führt diesen möglichen Zusammenhang und die Bedeutung für das adulte Leben exemplarisch anhand der Nephrogenese in der sog. *Brenner Hypothese* aus (39). Er postuliert, dass 1. eine direkte Beziehung zwischen Geburtsgewicht und Nephronzahl bestehe, 2. eine inverse Korrelation zwischen Blutdruck und Geburtsgewicht ebenso wie 3. eine inverse Korrelation zwischen Nephronanzahl und Blutdruck.

Darüber hinaus wird auf genetischer Ebene eine Vielzahl von Erklärungsansätzen diskutiert. Vorweg sei hierzu bemerkt, dass monogene Veränderungen und Punktmutationen, wie z.B. der pankreatischen Glukokinase (GK), insgesamt zu selten

aufzutreten, um die Variation des kardiovaskulären Krankheitsrisikos über das gesamte Spektrum des Geburtsgewichtes zu erklären (17). Dennoch werden Polymorphismen, welchen eine Beeinflussung der Suszeptibilität für Stimuli der Programmierung zugeschrieben wird, als mögliche Ursache diskutiert. Einige, wie Polymorphismen des IGF-1 Gens und die *Insulin Gene Variable Number of Tandem Repeats Region* des Insulin Gens (VNTR-INS) wurden beispielsweise hinsichtlich ihres Einflusses auf das Geburtsgewicht analysiert; bisweilen zeigen sich allerdings inkonsistente Korrelationen (40)(41)(42)(43). Pfab et al. beispielsweise konnten an einer großen Berliner Kohorte, im Gegensatz zu kleineren älteren Studien, keinen Anhalt für einen Einfluss des Pro12Ala Polymorphismus des *Peroxisome Proliferator Activated Rezeptor gamma* (PPAR- $\gamma$ ) Gens auf fetales Wachstum und Insulinresistenz bei Geburt aufzeigen (44). Zunehmend rücken daher epigenetische Mechanismen ins Zentrum der Erklärungsansätze. Hierunter werden Veränderungen der DNA zusammengefasst, welche Einfluss auf die Genexpression nehmen, ohne die DNA-Sequenz zu verändern (u.a. Methylierung von Promotorbereichen, Acetylierung von Histonen, Imprinting, X-Inaktivierung). Bei schwangeren Mäusen führt beispielsweise die Vorenthaltung von Methylendonatoren zu einer herabgesetzten Cytosin-Methylierung im *Agouti Viable Yellow A<sup>vy</sup> Locus* und dadurch zu einem spezifischen Phänotyp (45). Hervorzuheben ist, dass Methylierungsmuster auch an folgende Generationen weitergegeben werden können (46). Die offensichtliche Möglichkeit der Vererbung epigenetischer Muster könnte einen Erklärungsansatz für die Breite phänotypischer Ausprägungen durch fetale Programmierung liefern. Zudem ist bekannt, dass epigenetische Mechanismen auch für jene *Imprinting* Prozesse von Bedeutung zu sein scheinen, welche an der Kontrolle von fetalem und plazentarem Wachstum maßgeblich beteiligt sind.

Auch das Geschlecht des Feten ist für Programmierungsprozesse von Relevanz, da sowohl in Tierexperimenten als auch epidemiologischen Studien geschlechtsspezifische Unterschiede beschrieben sind (u.a. (32)(33)). Bisweilen lag der Fokus der meisten tierexperimentellen und epidemiologischen Studien auf der Erforschung maternaler Faktoren und ihrer Einflüsse auf den fetalen Phänotyp. Eine Reihe neuerer humaner und auch tierexperimenteller Studien legt nahe, dass auch paternale Faktoren bedeutende Faktoren für fetale Programmierung sein könnten (34)(35)(36)(37)(38). Die Möglichkeit der Charakterisierung zugrunde liegender Mechanismen, unabhängig von intrauterin wirkenden, maternalen Faktoren, ist dabei von besonderer Relevanz.

Der Gesamteffekt intrauterin induzierter Veränderungen mit Bedeutung für das postnatale Leben ist somit wahrscheinlich multifaktoriell bedingt. Sowohl der spezifische Stimulus selbst, als auch der Zeitpunkt des Einwirkens, scheinen neben dem Geschlecht dabei von Bedeutung.

## **1.4 Das Stickstoffmonoxid System und seine physiologische Bedeutung unter besonderer Berücksichtigung der Schwangerschaft**

### **1.4.1 Die physiologische Bedeutung von Stickstoffmonoxid**

Ende der 1970-er untersuchte der Pharmakologe F. Murad die physiologischen Wirkungen von organischen Nitraten, welche u.a. zur Behandlung von Angina pectoris angewendet werden. Dabei entdeckte er, dass diese Substanzen Stickstoffmonoxid (NO) freisetzen und eine Vasodilatation herbeiführen. Auch R. F. Furchgott beschäftigte sich etwa zur gleichen Zeit mit den Auswirkungen von Nitraten auf Blutgefäße. Er stellte fest, dass eine bis dato unbekannte, vom Endothel ausgehende Substanz zu einer Relaxation der darunterliegenden Muskelschicht führt. Diese unbekannte Substanz nannte er *Endothelium Derived Relaxing Factor* (EDRF) (47). In den 1980-ern identifizierten L.J. Ignarro sowie R. M. Palmer schließlich unabhängig voneinander EDRF als NO (48)(49).

Das gasförmige NO ist ein sekundärer Botenstoff, welcher in einer Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) abhängigen Oxidation der Guanidino-Stickstoffgruppe des L-Arginins unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff entsteht, wobei als Nebenprodukte Citrullin und Wasser anfallen. Die beteiligten Kofaktoren (Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavinmononukleotid (FMN), Calmodulin und Tetrahydrobiopterin) sorgen für den Elektronentransfer von NADPH auf L-Arginin (50).

Die Synthese von NO findet in nahezu allen Zellen und Geweben von Säugetieren statt. NO diffundiert zu seinen Zielstrukturen und aktiviert dort die lösliche Form der Guanylatcyklase (sGC), durch welche zyklisches Guanosinmonophosphat cGMP) entsteht. cGMP ist in der Lage, verschiedene intrazelluläre Signalwege zu aktivieren (51). Bei Säugetieren sind die Wirkungen von NO vielfältig und reichen von der Erschlaffung der glatten Muskulatur über immunmodulatorische Prozesse bis hin zur Beeinflussung der Langzeitpotenzierung synaptischer Prozesse (51).

### 1.4.2 Die NO-Synthasen

Bisher sind drei Hauptisoformen der NO-Synthase (NOS) bekannt. Alle sind durch separate Gene kodiert und zeichnen sich durch gewebsspezifische Expression aus (52). Für alle NOS-Formen wurden die Bindungsstellen für die Kofaktoren und das Substrat L-Arginin sowie eine Homodimerisierungssequenz identifiziert (53).

Die neuronale NOS (nNOS, NOS I) ist konstitutiv in zentralen Neuronenverbänden sowie in Synapsen des autonomen Nervensystems, aber auch im Skelett- und Herzmuskel exprimiert. Das durch nNOS produzierte NO fungiert u.a. als Neurotransmitter. Darüber hinaus wird eine Beteiligung an Lern- und Gedächtnisprozessen sowie eine Bedeutung für Neuro- und Synaptogenese diskutiert (54). Eine Spleißvariante der nNOS ist die mitochondriale mtNOS (55).

Die induzierbare NOS (iNOS, NOS II) ist vorwiegend in Makrophagen zu finden. Ihre Expression wird maßgeblich durch proinflammatorische Zytokine und bakterielle Lipopolysaccharide induziert (56). Im Gegensatz zu den beiden anderen NOS-Isoformen arbeitet die iNOS kalziumunabhängig und produziert relativ große Mengen NO. Als sehr reaktionsfähiges, freies Radikal wirkt NO in hohen Konzentrationen apoptotisch und antimikrobiell (56).

Der dritte Typ der NOS-Familie ist die auf Endothelzellen konstitutiv exprimierte endotheliale NOS (eNOS, NOS III). Durch eNOS produziertes NO führt in glatten Muskelzellen von Gefäßwänden zur Relaxation. Die Beeinflussung von Thrombozytenaggregation, Leukozytenadhäsion und Angiogenese durch eNOS macht sie für die normale Endothelfunktion unabdingbar und gleichzeitig zu einem wichtigen Element in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen (57)(58).

### 1.4.3 Phänotypische Merkmale von eNOS knock-out Tieren

Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit verwendeten heterozygoten eNOS knock-out Tiere beschränken sich die folgenden Ausführungen im Wesentlichen auf Charakteristika dieser Tiere. Eine eindeutige phänotypische Charakterisierung heterozygoter eNOS knock-out Tiere (eNOS +/-) gestaltet sich schwierig. eNOS +/- Mäuse zeigen in mehreren Studien eine Erhöhung des Blutdrucks und Veränderungen der Vasomotorik, die im Vergleich zu homozygoten eNOS knock-out Tieren (eNOS -/-) ähnlich, aber insgesamt weniger stark ausgeprägt sind (26)(59)(60). Longo et al. konnten bei weiblichen, sieben bis acht Wochen alten Nachkommen aus einer



Verpaarung von eNOS  $-/-$  Tieren mit Wildtypen (WT) nur bei Tieren mit maternalem weitergegebenen eNOS knock-out Allel einen verringerten Karotisdurchmesser, eine herabgesetzte Acetylcholin-induzierte Vasokontraktion sowie eine verstärkte Vasoreagibilität gegenüber Phenylephrin und Calcium während *in vitro* Experimenten beobachten (26). Auch Van Vliet et al. konnten zeigen, dass heterozygote eNOS  $+/-$  Mäuse mit maternalem defektem knock-out Allel im Vergleich zu Tieren mit paternalem knock-out Allel signifikant höhere nächtliche diastolische Blutdrücke sowie eine verstärkte tageszeitliche Variabilität des systolischen, diastolischen und mittleren arteriellen Blutdrucks aufwiesen (60). Es könnte daher vermutet werden, dass die Herkunft des defekten Allels für die phänotypische Ausprägung von Bedeutung ist. Constantine et al. konnten zeigen, dass sich WT Nachkommen einer Verpaarung von eNOS  $+/-$  Müttern mit WT Vätern in Abhängigkeit der Herkunft des defekten maternalen Allels (letzteres wiederum von Mutter bzw. Vater) phänotypisch unterscheiden: Männliche WT mit maternalem eNOS knock-out Allel des heterozygoten Muttertiers zeigten einen höheren systolischen Blutdruck, mittleren arteriellen Druck und auch Pulsdruck sowie *in vitro* eine verstärkte Gefäßkontraktilität bei Behandlung mit Phenylephrin im Vergleich zu männlichen WT Tieren mit paternalem eNOS knock-out Allel des heterozygoten Muttertieres (61). Experimente mit Embryonentransfer von Longo et al. legen zudem nahe, dass Programmierung primär durch eine non-genetische, phänotypische Transmission und somit durch das abnorme intrauterine Milieu bedingt ist (62).

Kojda et al. beobachteten bei eNOS  $+/-$  Tieren während körperlicher Anstrengung ein Ausbleiben des Anstiegs von eNOS Protein und eNOS Expression, während in Ruhe im Vergleich zu WT Tieren keine phänotypischen Unterschiede bestanden (63)(64). Dies lässt vermuten, dass die funktionelle Kapazität eines vorhandenen eNOS Allels unter basalen Bedingungen per se keine phänotypischen Veränderungen zur Folge hat, sondern solche erst durch zusätzliche Stressfaktoren manifest werden. Im Gegensatz dazu zeigten Fagan et al., dass eNOS  $+/-$  Mäuse unter chronischer Hypoxie gleichermaßen eine pulmonale Hypertonie entwickeln wie eNOS  $-/-$  Tiere (65). Organspezifische Effekte von NO sind somit darüber hinaus wahrscheinlich von entscheidender Bedeutung.

Während Daten aus eu-/ hyperglykämischen Insulin- bzw. Glukose-*Clamp*-Versuchen zeigen, dass eNOS  $-/-$  Mäuse auf Ebene peripherer Organe sowie der Leber insulinresistent sind, sind bei eNOS  $+/-$  Mäusen metabolische Auffälligkeiten bisher

nicht beschrieben (66)(67). Schild et al. beschreiben bei eNOS -/- Mäusen im Vergleich zu WT signifikant erhöhte hepatische Glykogen- und Fetteinlagerungen sowie die Entwicklung von Übergewicht mit signifikant erhöhtem Anteil an viszeralem Fettgewebe (68). Dies ist, wie auch das Vorliegen von Hyperlipidämie bei eNOS -/- Tieren, bei eNOS +/- Tieren bisweilen nicht systematisch untersucht worden (67)(69).

#### 1.4.4 Bedeutung von eNOS für das intrauterine Wachstum

Entscheidend für regelrechtes fetales Wachstum ist die Versorgung des Feten mit Nährstoffen über die Plazenta. Deren Funktion wird von Mossmann treffend als

*„apposition or fusion of the fetal membranes to the uterine mucosa for the purpose of physiological exchange“*

beschrieben (70). Die Ausbildung eines spezifischen plazentaren Gefäßbettes ist dabei von entscheidender Bedeutung. Hierbei scheint NO eine wichtige Funktion als parakriner Mediator einzunehmen, da NO

- vasodilatatorisch auf plazentare Gefäße wirkt,
- beteiligt ist an der Aufrechterhaltung des niedrigen Gefäßwiderstandes der fetoplazentaren Gefäßeinheit,
- in der sich entwickelnden Plazenta die Angiogenese fördert,
- möglicherweise Mittler endovaskulärer Invasions- und *Remodeling* Prozesse ist,
- die plazentare Steroidsynthese und Hormonsekretion beeinflusst sowie
- ein potentieller Regulator des plazentaren Glukosetransportes ist (71).

Die verschiedenen NOS-Isoformen sind in Plazenten von Ratten, Mäusen, Schafen, Menschen sowie Rhesusaffen nachgewiesen worden (71). Die NO-Freisetzung durch eNOS ist dabei vermutlich maßgeblicher Regulator vaskulärer Adaptationsprozesse in der Schwangerschaft (72). eNOS wird sowohl in Trophoblasten, d.h. Zellen, die an der Adhäsion und Penetration des uterinen Endometriums bei der Implantation beteiligt sind, wie auch in extravillösen Trophoblasten exprimiert (73)(74). Letztere sind an der Regulation von Vasodilatation und Angiogenese in maternalen Zellverbänden während der Implantation beteiligt. In beiden genannten Zellpopulationen findet sich auch sGC, der intrazelluläre Mediator von NO (71).

Während der Schwangerschaft kommt es, insbesondere in der zweiten Schwangerschaftshälfte, zu einem Anstieg der Urinexkretion und der Plasmaspiegel von NO und cGMP bei schwangeren Ratten und Schafen (75)(76)(77). Folgerichtig ist

die experimentelle Hemmung der eNOS sowie verringerte systemische NO-Konzentrationen während der Schwangerschaft mit der Ausbildung einer IUGR assoziiert (78)(79)(80)(81). Hinsichtlich des kritischen Zeitfensters, während dessen veränderte NO Bereitstellung eine intrauterine Wachstumsretardierung induzieren kann, liegen bisweilen unterschiedliche Ergebnisse vor: In *post mortem* Untersuchungen definieren einige Autoren die Implantation und die frühe embryonale Entwicklung als die entscheidende vulnerable Phase (73). Hefler et al. und van der Heijden et al. hingegen beobachteten *post mortem* bei schwangeren eNOS  $-/-$  Mäusen die Manifestation der fetalen Wachstumsretardierung vorwiegend während des letzten Trimenons (ab Tag 17 post coitum) (81)(82).

Erstmalig beschrieben Pallares et al. *in vivo* den gesamten Verlauf von Schwangerschaften bei eNOS  $-/-$  Mäusen (83). Von Schwangerschaftsbeginn an beobachteten sie ein verringertes intrauterines Wachstum, wobei die stärkste Einschränkung während der Implantation sowie zwischen Schwangerschaftstag 8,5 und 13,5 bestand. Diese Beobachtungen stützen die Annahme, dass insb. die Spätschwangerschaft ein entscheidendes Zeitfenster für die Ausprägung von fetaler Wachstumsretardierung - und damit letztlich für die Induktion von fetaler Programmierung - ist (s.o.; vgl. Kap. 1.3). Eine erste *in vivo* Studie zur Charakterisierung von WT Nachkommen von eNOS  $+/-$  Elterntieren führten ebenfalls Pallares et al. durch (84). Mittels MRT verglichen sie an Tag 13,5 der Schwangerschaft die Entwicklung von WT Nachkommen von eNOS  $+/-$  Elterntieren mit jenen von eNOS  $+/-$  und eNOS  $-/-$  Nachkommen. Dabei zeigte sich eine signifikante Wachstumsretardierung lediglich bei eNOS  $-/-$  Nachkommen im Vergleich zur WT Gruppe.

Neben klassischen knock-out Modellen hat auch die Behandlung von Ratten mit dem NOS Inhibitor L-NAME zur Ausprägung von fetaler Wachstumsretardierung geführt (79)(80). Interessant ist, dass dieser Effekt durch Gabe von L-Arginin, einem NO Vorläufermolekül, aufgehoben werden konnte (85). *In vitro* Studien an *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVECs) zeigen bei Vorliegen von IUGR eine Einschränkung des plazentaren L-Arginin Transports und lassen Vermutungen über einen kausalen Zusammenhang veränderter Aminosäuretransportprozesse mit verringerten NO Konzentrationen, und folglich von intrauteriner Wachstumseinschränkung, zu (86).

Ein möglicher Erklärungsansatz für IUGR bietet die Beeinflussung des *Remodeling* plazentarer und uteriner Gefäße durch Veränderungen der eNOS Aktivität. Unter

*Remodeling* wird die Adaptation eines Gefäßbettes an veränderte physiologische Zustände verstanden, worunter die Migration und Proliferation glatter Muskel- und Endothelzellen sowie die Ausbildung einer Neointima fällt. Bei eNOS *-/-* Mäusen konnten Rudic et al. zeigen, dass im Vergleich zu Kontrolltieren nach Ligation der *A. carotis communis* die erwartete Abnahme des Lumendurchmessers der ipsilateralen *A. carotis externa* ausblieb (87). In ihrer Untersuchung manifestierte sich das veränderte *Remodeling* bei eNOS *-/-* Mäusen sogar im Sinne einer hyperplastischen Reaktion mit Zunahme der Wanddicke der *A. carotis externa* nach Ligation.

Auch während der Schwangerschaft weisen eNOS *-/-* Mäuse Einschränkungen von *Remodeling* Prozessen auf: Während der Schwangerschaft zeigt sich eine, im Vergleich zu WT, geringere Zunahme des Durchmessers der *A. uterina* sowie in dieser eine verringerte Enddifferenzierung und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (82). Van der Heijden et al. konnten weiterhin zeigen, dass *Remodeling* Prozesse pseudoschwangerer eNOS *-/-* Mäuse (bei Paarung mit einem vasktomierten männlichen Tier gleichen Alters) jenen schwangerer Kontrolltiere annähernd gleichen (88). Es lässt sich daher annehmen, dass *Remodeling* unabhängig vom Vorgang der Konzeption induziert wird und maternale Faktoren wie z.B. eNOS dabei von Bedeutung sein könnten (88).

Aus den vorliegenden Studien wird erkenntlich, dass das durch eNOS produzierte NO maßgeblich an regelrechtem intrauterinem Wachstum beteiligt ist.

### **1.5 Fetale Programmierung von Diabetes mellitus Typ II und Insulinresistenz**

Diabetes mellitus Typ II (DM Typ II) ist die häufigste Form des Diabetes mellitus. 2010 waren nach Schätzungen der *International Diabetes Federation (IDF)* etwa 285 Millionen Menschen, d.h. ca. 6,4% der Weltbevölkerung, betroffen (89). Initial kennzeichnend für das Vorliegen eines DM Typ II ist ein relativer Insulinmangel, welcher zunächst mit einem Anstieg der Plasmainsulinkonzentration einhergeht. Dieser relative Mangel ist durch eine Insulinresistenz von Skelettmuskulatur, Leber- und Fettgewebe bedingt und kann im weiteren Krankheitsverlauf in einen absoluten Insulinmangel übergehen.

Die Assoziation zwischen Insulinresistenz im späteren Leben und Geburtsgewicht ist in einer Vielzahl epidemiologischer Studien beschrieben. Die Gruppe um David Barker konnte zeigen, dass bei 64-jährigen männlichen Probanden aus der englischen Region

Hertfordshire eine inverse Korrelation zwischen Glukosetoleranz und Geburtsgewicht besteht (90). Ravelli et al. korrelierten eine verminderte Glukosetoleranz im Erwachsenenalter mit dem Auftreten einer Hungersnot in Holland 1944-1945 während des mittleren oder letzten Trimenon der Schwangerschaft der Mütter der untersuchten Probanden (30). In einer Untersuchung von Pfab et al. zeigte sich schon bei Geburt eine inverse Korrelation zwischen Geburtsgewicht und glykiertem Gesamthämoglobin, einem Surrogatparameter intrauteriner Glykämiekontrolle (91). Studien von Yajnik et al. legen nahe, dass schon im Alter von vier Jahren das Geburtsgewicht negativ mit Glukose- und Insulinantworten in Glukosetoleranztests korreliert (92). Auch Metaanalysen bestätigen diesen Zusammenhang und zeigen zudem die Unabhängigkeit von Ethnie und sozioökonomischen Status (93)(94).

Tierexperimentelle Studien des Zusammenhangs von intrauterinem Milieu und Determinanten des Glukosestoffwechsels sind zahlreich. Alle in Kap. 1.2 beschriebenen tierexperimentellen Modelle kommen dabei zur Anwendung. In Tab. 2 ist eine Auswahl der bei Ratten beobachteten Veränderungen des hepatischen Glukosestoffwechsels aus verschiedenen Tiermodellen zusammengestellt (95)(96). Darüber hinaus ist eine Reihe weiterer Parameter des Glukosestoffwechsels bekannt, welche durch fetale Programmierung beeinflusst werden können. Hierzu gehören Veränderungen von Plasmaglukose- und -insulinkonzentrationen, Auffälligkeiten in Insulinsensitivität und Glukosetoleranz sowie veränderte Aufnahme von Glukose in Skelettmuskulatur und Fettgewebe (95).

### **1.6 Die Rolle der Leber im Glukosestoffwechsel und bei der Ausbildung von Insulinresistenz**

Die hepatischen Stoffwechselwege von Glukose – und auch Lipiden – stehen maßgeblich unter dem Einfluss von Insulin und sind bei Vorliegen von Insulinresistenz verändert. Verdeutlicht wird dies durch *Liver Insulin Receptor knock-out* Mäuse (LIRKO Mäuse) mit spezifischem Knock-out hepatischer Insulinrezeptoren: Diese Tiere entwickeln, im Gegensatz zu Tieren mit spezifischem Knock-out des Insulinrezeptors in der Skelettmuskulatur oder des Fettgewebes, eine Insulinresistenz (97). Es zeigt sich, dass bei diesen Tieren die hepatische Glukoseproduktion unter Insulineinfluss nicht gehemmt wird und Schlüsselenzyme der Glukoneogenese vermehrt exprimiert werden.

Die Glukoseaufnahme in die Leber erfolgt maßgeblich über den Glukosetransporter GLUT 2. Im nächsten Schritt wird Glukose durch die GK phosphoryliert und auf diesem Weg in den Hepatozyten festgehalten. Die Expression der GK steht unter einer komplexen Regulation u.a. durch Insulin. Postprandial beispielsweise führt Insulin durch Verstärkung der Expression der GK zu einer vermehrten Glukoseaufnahme in die Leber (98).

Leber		
Hepatozyten	Expression	GLUT 1 mRNA ↑ PGC-1 mRNA ↑ Enzyme des Fettsäuremetabolismus ↑↓
	Proteinsynthese und -menge	IGF-BP Produktion ↑ Insulin Rezeptordichte ↑ Glukagon Rezeptordichte ↓
	Enzymaktivität und -menget	Glukokinase ↓ PEP-CK ↑ Glutathion Reduktase ↑
	Intermediärstoffwechsel	ATP (Adenosintriphosphat) Produktion ↓ Glukosefreisetzung ↑ Suppresison hepatischer Glukoseproduktion durch Insulin
	Zellzyklus	Proliferationsrate ↓
Organstruktur		Perivenöse Zellzahl ↓ Periportale Zellzahl ↑ Weniger, größere Leberlappen Glykogengehalt ↑↓

**Tab. 2: Übersicht über Effekte eingeschränkter intrauteriner Bedingungen bei Manipulation der maternalen Diät, Induktion utero-plazentarer Insuffizienz durch Ligation der A. uterina, maternalen Hypoxämie auf verschiedene Ebenen der Leberfunktion bei Ratten. GLUT 1: Glukosetransporter 1. PGC-1: *Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma Coactivator 1*.**

In Hepatozyten selbst führt Insulin zu einem Abfall des intrazellulären cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) Spiegels und induziert somit eine vermehrte Oxidation von Glukose in der Glykolyse, sowie die verstärkte Speicherung von Glukose in Form von Glykogen (99). Die Hauptfunktion der hepatischen Glykolyse dient u.a. der Bereitstellung von Kohlenstoffatomen für die *de novo* Lipidsynthese. Deren Schlüsselenzyme, die Acetyl-CoA Carboxylase und Fettsäuresynthase, stehen ebenfalls unter der Regulation von Insulin und Glukose (99). Die Expression und Transkription von Schlüsselenzymen der Glukoneogenese hingegen – der Glukose-6-Phosphatase (G6Pase) und der PEP-CK - wird durch Insulin unterdrückt (99). Dieser Vorgang ist durch ein komplexes Netzwerk von Transkriptionsfaktoren reguliert, an dem u.a. das *Carbohydrate Response Element Binding Protein* (CHREBP), der *Peroxisome*

*Proliferator Activated Receptor alpha* (PPAR- $\alpha$ ), PPAR- $\gamma$  und der *Sterol Regulatory Element Binding Protein Transcription Factor 1* (SREBP-1c) beteiligt sind (97).

Folglich führt hepatische Insulinresistenz zu einer verringerten Unterdrückung der Glukoneogenese und vermehrter Glukosefreisetzung aus der Leber mit konsekutiv erhöhten Plasmaglukosespiegeln. Zusätzlich ist das Auftreten einer Steatose mit dem Auftreten von Insulinresistenz assoziiert. Inwieweit dies Ausdruck einer alleinigen hepatischen Insulinresistenz ist - oder Ausdruck einer vermehrten Aufnahme freier Fettsäuren bei peripherer Insulinresistenz – ist bisweilen unklar (100).

## 2 Fragestellung

Trotz der Vielzahl epidemiologischer Studien, die einen Zusammenhang zwischen Geburtsgewicht und kardiovaskulären Erkrankungen im späteren Leben aufzeigen, muss berücksichtigt werden, dass diese empirischen und phänomenologischen Beschreibungen letztlich nicht *per se* Kausalität beweisen können. Auch die meisten vorliegenden tierexperimentellen Ansätze können Kausalität und Plausibilität der postulierten Assoziationen nicht endgültig beweisen. Durch Arbeiten von Hocher et al. und Wang et al. rücken im Sinne der *Advanced Fetal Programming* Hypothese maternale Gene als Determinanten fetalen Wachstums in den Fokus eines möglichen Erklärungsansatzes (18)(19)(21). Hocher et al. zeigten, dass Kinder, deren Mütter Trägerinnen des 825 T Allels der G-Protein  $\beta$ -Untereinheit sind, mit signifikant geringerem Geburtsgewicht auf die Welt kommen, wobei der Genstatus des Kindes bezüglich des Allels keine Rolle spielt. Wang et al. zeigten, dass die Effekte maternalen Nikotinkonsums während der Schwangerschaft auf die fetale Entwicklung durch maternale Enzyme der Biotransformation beeinflusst werden. Es lässt sich daher vermuten, dass der maternale Genstatus eine Determinante fetalen Wachstums ist, auch wenn solche maternalen Gene selbst nicht weitergegeben werden, und der Effekt somit nicht durch klassische Vererbungsmechanismen erklärt werden kann.

NO ist ein wichtiger Mediator für die Entwicklung des utero-plazentaren Gefäßbettes und ist an der Regulation des utero-plazentaren Blutflusses sowie des plazentaren Nährstofftransportes beteiligt (u.a.(78)(82)(86)). Hierüber beeinflusst NO intrauterines Wachstum. In der Plazenta wird es zum Großteil durch die eNOS produziert (71). Weiterhin ist niedriges Geburtsgewicht epidemiologisch und tierexperimentell mit der Entwicklung von Insulinresistenz und anderen kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert (u.a. (17)(30)(90)(91)(93)(94)(96)).

Insofern könnte ein maternaler Knockout im NO-System, der die Mutter phänotypisch nicht offensichtlich alteriert, aber Auswirkungen auf die plazentare NO-Verfügbarkeit hat, zu einer Beeinträchtigung intrauteriner Lebensbedingungen führen und eine dauerhafte Störung des Glukosestoffwechsels bei Nachkommen programmieren. Diese Hypothese soll in der vorliegenden Arbeit an einem Nagermodell untersucht werden.

Ein möglicher kausaler Zusammenhang zwischen maternalem Genotyp und intrauteriner Programmierung kann experimentell geprüft werden, indem ausschließlich WT Nachkommen von heterozygoten Eltern mit einem spezifischen Knock-out



untersucht werden und mit WT Nachkommen von WT Eltern verglichen werden. Bei einem solchen Design können etwaige Unterschiede zwischen den WT Nachkommen nicht durch klassische Genetik erklärt werden. In der vorliegenden Arbeit soll konkret untersucht werden, ob sich WT Nachkommen aus der Verpaarung von eNOS +/- Elterntieren mit WT bezüglich des hepatischen Phänotyps und des hepatischen Glukosestoffwechsels von ebenfalls genetisch gesunden Nachkommen einer reinen WT Verpaarung unterscheiden. Es sollen dabei sowohl die Nachkommen von eNOS +/- Müttern als auch eNOS +/- Vätern untersucht werden, da Hinweise auf die Programmierung phänotypischer Merkmale über die paternale Linie vorliegen (u.a. (17)(35)(36)(37)).

Folgende Fragestellungen sollen konkret untersucht werden:

- Unterscheiden sich WT Nachkommen von eNOS +/- Müttern, eNOS +/- Vätern und WT Eltern hinsichtlich des Geburtsgewichts und des postnatalen Wachstums bis zur 20. Lebenswoche?
- Unterscheiden sich die genannten Gruppen hinsichtlich ihrer Nierenfunktion und ihres Blutdrucks?
- Gibt es zwischen den genannten Gruppen Unterschiede hinsichtlich Nüchternplasmaglukose- und -insulinwerten zu verschiedenen Zeitpunkten postnatal, sowie in einem intraperitonealen Glukosetoleranztest?
- Existieren histologisch nachweisbare Unterschiede bezüglich des Leberphänotyps der genannten Gruppen bezüglich Läppchengröße und Lipidgehalt?
- Bestehen Unterschiede zwischen den genannten Gruppen hinsichtlich des hepatischen Glykogengehaltes?
- Wie sind die molekularen Mechanismen eventueller Unterschiede zwischen den Gruppen in der Glukosehomöostase? Gibt es konkret eine differentielle Expression von Kandidatengenen der Regulation des hepatischen Glukose- und Lipidstoffwechsels sowie der hepatischen Insulinwirkung?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Geräte und Chemikalien

##### 3.1.1 Technisches Gerät

Ausbettvorrichtung Microm EC-350, Thermo Scienfitic, Langenselbold  
 Digitalkamera EC 3, Leica, Nussloch  
 Digitalkamera CFW-1310C, Scion Corporation, Frederick, USA  
 Einbettvorrichtung Shandon Citadel 1000, Thermo Electron Corp., Langenselbold  
 Gelelektrophoresekammer Agagel Midi Wide, Biometra, Göttingen  
 Heizblock TestTube Thermostat TCR 100, Roth, Karlsruhe  
 Heizthermomixer HTMR 133, HLC-Haep Labor Consult, Bovenden  
 Homogenisator Polytron, Bachhofer, Reutlingen  
 Kryotom Jung Frigocut 2800E, Leica, Nussloch  
 Kühlplatte Midrom EC-351, Thermo Scienfitic, Langenselbold  
 Magnetrührgerät MR2000, Heidolph, Kehlheim  
 MacIntosh PowerBook G4, Apple, Cupertino, USA  
 Mikrotom Jung RM 2025, Leica, Nussloch  
 Mikroskop Axiovert 100, Zeiss, Jena  
 Mikroskop BH-2, Olympus, Hamburg  
 Mx 3000P real time Thermocycler, Stratagene, La Jolla, USA  
 Nicht-invasives Blutdruckmessgerät NIBP Controller mit Druckmanschette und Pulsaufnehmer, ADInstruments, Spechbach  
 pH Meter, Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Weilheim  
 Präzisionswaage BL 600, Sartorius, Göttingen  
 Präzisionswaage SBC 22, Scaltec, Göttingen  
 Präzisionsquarzküvette Suprasil, Hellma, Müllheim  
 Spannungsquelle Standard Power Pack 25, Biometra, Göttingen  
 Spektrophotometer für Mikrotiterplatten, BioRad, Hercules, USA  
 Spektrophotometer Beckmann DU 530, Beckman Coulter, Krefeld  
 Streckbad Kombination Typ 168000, Metax, Friedberg  
 Schüttler WT 17, Biometra, Göttingen  
 Stoffwechselkäfige, Tecniplast, Buguggiate, Italien  
 T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen  
 Tischzentrifuge für Elektrophorese Tubes, Roth, Karlsruhe  
 Tischzentrifuge Biofuge 13, Heraeus, Hanau  
 Vortex Genie 2, Bender und Hobein AG, Zürich, Schweiz  
 Wasserbad, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel

##### 3.1.2 Chemikalien

Aceton, J.T. Baker, Griesheim  
 Altromin Standard 1320, Ratte/ Maus Halteungsdiät, Altromin GmbH, Lage  
 Altromin Standard 1310, Ratte/Maus Zuchtdiät rohfaserreich, Altromin GmbH, Lage  
 Aqua ad iniectabilia, Braun, Melsungen  
 AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA Polymerase (5 Units/µl), Applied Biosystems, Darmstadt  
 Amyloglucosidase 30-60 U/mg Protein, Sigma Aldrich, Steinheim  
 APES 3'Aminopropyltriethoxysilan, Roth, Karlsruhe  
 Aquatex, Merck, Darmstadt  
 DEPC (Diethylene Pyrocarbonat) Wasser 1:1000 DEPC, Roth, Karlsruhe  
 Depex, Serva, Heidelberg  
 DFS-Taq DNA Polymerase (5 U/µl), Bioron, Ludwigsburg

dNTP Mix (40mM), Bioron, Ludwigsburg  
Dr. Lange Test Kreatinin (Jaffé Methode), Hach Lange GmbH, Berlin  
Ethanol, beta Arzneimittel, Berlin  
Ethidiumbromid (10mg/ml), Amresco Inc., Ohio, USA  
GeneAmp® 10X PCR Puffer II (1.5mL), Applied Biosystems, Darmstadt  
GeneAmp® dNTPs (10 mM), Applied Biosystems, Darmstadt  
Gene Ruler 1 kbp DNA Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot  
Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot  
Glukosereagenz, Sigma Aldrich, Steinheim  
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Darmstadt  
Kreatinin Standard Dr. Lange, Hach Lange GmbH, Berlin  
MgCl<sub>2</sub> Lösung (25mM), Applied biosystems, Darmstadt  
Paraffin Typ 6, Richard-Allan-Scientific, Langenselbold  
Paraffin Typ 9, Richard-Allan, Scientific, Langenselbold  
Proteinase K, Roche, Mannheim  
peqGoldTriFast, PEQLAB, Erlangen  
Reaction Buffer, Bioron, Ludwigsburg  
RNase Inhibitor, Applied Biosystems, Darmstadt  
SeaKem LE Agarose, Biozym, Hessisch Oldendorf  
Secutrol, Lange, Düsseldorf  
SYBR® Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, Darmstadt  
Tissue freezing medium, Jung, Nussloch  
TRIS Hydroxymethylaminomethan, Roth, Karlsruhe  
TURBO DNase, Ambion, Austin, USA  
Tween-20, SERVA Feinbiochemika GmbH, Heidelberg  
Alle sonstigen Chemikalien wurden verbrauchsfertig in analytischer Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Steinheim) bezogen.

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Einbettkassetten Histosette, Simport, Beloeil, Kanada  
Deckgläser 18x18mm, Menzel Gläser, Braunschweig  
Glasware von Schott, Mainz  
Mikrotiter-Platten 96 Loch, Greiner, Frickenhausen  
Objektträger Superfrost, Menzel Gläser, Braunschweig  
Objektträger Superfrost PLUS, Langenbrinck, Emmendingen  
Reaktionsgefäße Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA  
Safe Seal Reaktionsgefäße 1,5 ml, Sarstedt, Nürmbrecht  
Serologische Pipetten Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA  
Tissue Teck Cryomold Einbettkassette 10x10x5 cm, Sakura, Tokyo  
Therma Seal Adhesive Sealing Film, Excel Scientific, Victorville, USA

### 3.1.4 Software

Chart and Scope for Windows Vers. 4.1., AD Instruments, Spechbach  
ImageJ Bildverarbeitungsprogramm, National Institute of Health, Bethesda, USA  
LAS EZ Bildverarbeitungsprogramm, Leica Microsystems, Wetzlar  
Microplate Manager 5.2, BioRad, Hercules, USA  
MXPro QPCR software, Stratgene, La Jolla, USA  
Primer3, Whitehead Institute for Biomedical Research, S. Rozen and H. Skaletsky, USA  
SPSS 19.0, SPSS Inc., München

## 3.2 Tiere und Tierhaltung

### 3.2.1 Versuchstiere

eNOS  $-/-$  Mäuse der C57BL/6J Linie sowie entsprechende C57BL/6J eNOS WT Mäuse wurden der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. B. Hofer freundlicherweise von Prof. Axel Gödecke zur Verfügung gestellt. Der eNOS Knock-out wurde durch gezielte Insertion einer Neomycin-resistenten Kasette in Exon 24 und 25 konstruiert. Durch diese Veränderung der genomischen Sequenz kommt es zu einer Inaktivierung der Bindungsstelle für NADPH an die NO-Synthase und somit in der Folge zur Inaktivierung von eNOS (101). Männliche eNOS  $-/-$  Tiere wurden mit entsprechenden WT verpaart, um heterozygote eNOS  $+/-$  Tiere zu erhalten (F0). Weibliche eNOS  $+/-$  Tiere der F0 Generation wurden weiter mit männlichen WT verpaart und sowohl eNOS  $+/-$  als auch WT Nachkommen dieser Verpaarung (F1) im Experiment belassen. Durch selektive Verpaarung der heterozygoten Tiere der F1 Generation mit entsprechenden WT Tieren entstand eine F2 Generation. Nur WT Nachkommen der F2 Generation wurden in den Versuch eingeschlossen. Diese WT Tiere ergaben sich somit aus folgender Verpaarung (vgl. Abb. 2):

1. Weibliche eNOS  $+/-$  Tiere mit männlichen WT
2. Männliche eNOS  $+/-$  Tiere mit weiblichen WT
3. Weibliche WT mit männlichen WT (Kontrollgruppe).

### 3.2.2 Tierhaltung

Die Tiere wurden in Gruppen von maximal sechs Tieren, Mütter mit ihren Jungtieren in separaten Käfigen, gehalten. Die Umweltbedingungen der Tierhaltung wurden bei einer Raumtemperatur von  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , einer Luftfeuchte von  $45\% \pm 5\%$  und einer täglichen zwölfstündigen Lichtperiode von 6 bis 18 Uhr konstant gehalten. Die Tiere erhielten Standardfutter der Firma Altromin und Trinkwasser *ad libitum*. Trächtige und säugende Tiere erhielten ab dem siebten Tag nach Verpaarung bis zum Absetzen der Jungtiere Zuchtfutter der Firma Altromin.

Die Tierhaltung und alle durchgeführten Versuche erfolgten nach den Regeln des Deutschen Tierschutzgesetzes und wurden am 05.08.2004 von der Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales Berlin mit der Genehmigungsnummer G 0146/04 zugelassen.

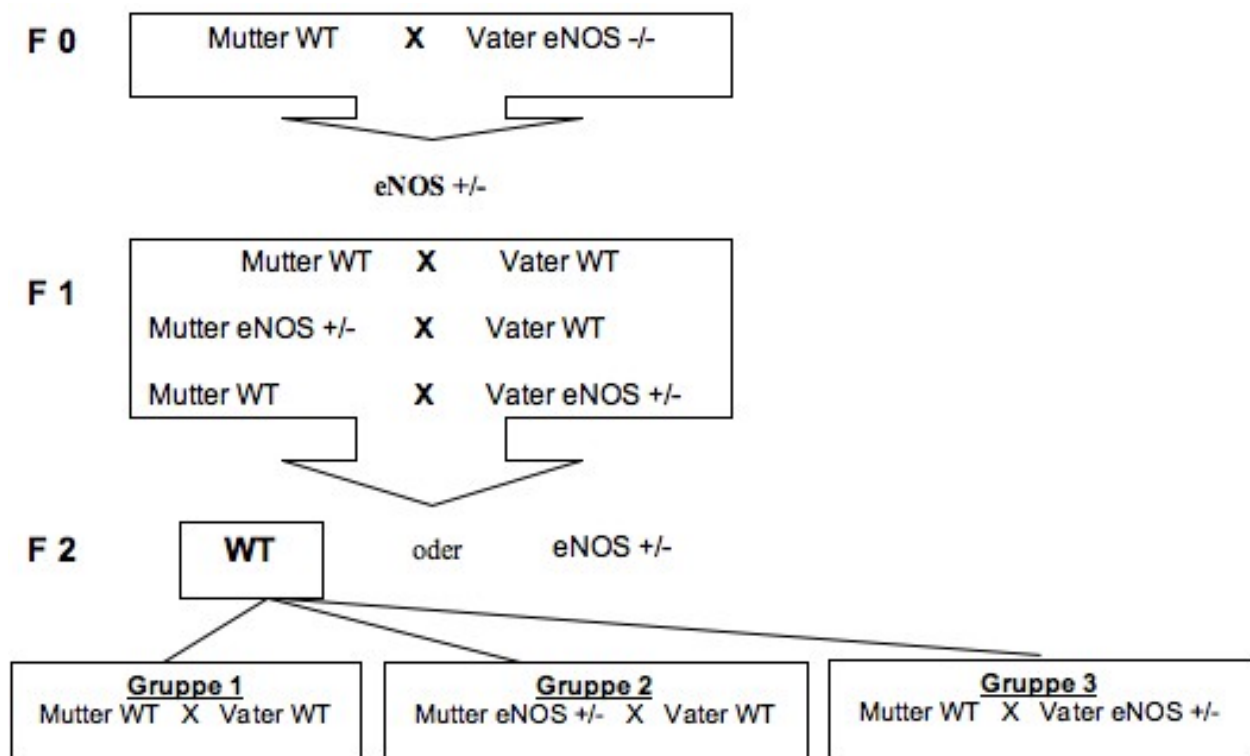


Abb. 2: Kreuzungsschema der Versuchstiere

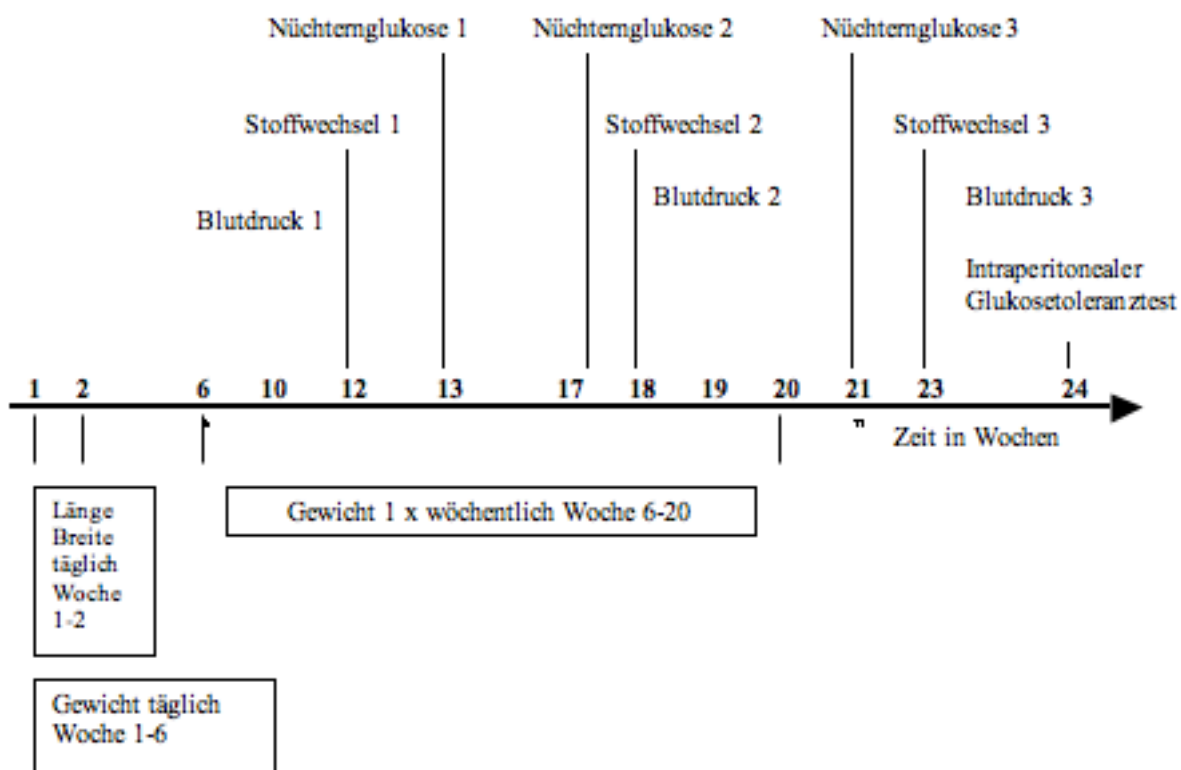
### 3.2.3 Organentnahme

In der 25. Lebenswoche wurden die Tiere nach Erfassung des Körpergewichtes durch Streckung unter Isoflurannarkose getötet. Die Organe wurden in folgender Reihenfolge entnommen und gewogen: Herz, Lunge, Leber, Milz, Pankreas, Niere, thorakale und abdominale Aorta. Ein Teil des Organs wurde in Formalin fixiert (vgl. Kap. 3.5.1.1), ein weiterer in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bei Tötung wurde zusätzlich aus der rechten Herzkammer Blut entnommen.

### 3.3 Versuchsdesign

Insgesamt wurden 134 eindeutig als Wildtypen identifizierte Tiere in den Versuch eingeschlossen. Eine Übersicht über den Versuchsablauf findet sich in Abb. 3. Die Tiere wurden über 25 Wochen hinweg gehalten. Das Körpergewicht der Tiere wurde von Geburt bis zum 40. Lebenstag täglich, danach bis zur 20. Lebenswoche wöchentlich gemessen. Körperlänge und -breite wurden täglich durchgehend von Geburt bis Tag 13 ermittelt. Die Körperlänge wurde durch Halten der Tiere auf dem Bauch und Erfassen

der Länge von Nasenwurzel zum Schwanzansatz erfasst. Durch Messung des Körperumfangs auf Höhe der untersten Rippe wurde die Körperbreite erfasst. Die Ergebnisse der Breitenmessung sind aufgrund der hohen Streubreite und Ungenauigkeit der Methode in der vorliegenden Arbeit nicht dargestellt. Mittels *tail-cuff* Plethysmographie wurden in den Wochen 10, 19 und 24 der systolische Blutdruck sowie die Herzfrequenz der Tiere gemessen. In Woche 13, 17 und 21 wurden Blutentnahmen für die Bestimmung der Nüchternglukosewerte und -insulinwerte vorgenommen. Ein intraperitonealer Glukosetoleranztest (ipGTT) wurde in Woche 24 durchgeführt. Die Messung des 24-Stunden-Urins in Stoffwechsellkäfigen erfolgte zu drei Zeitpunkten: in Woche 12, 18 und 23.



**Abb. 3: Versuchsdesign**

Mein Beitrag bestand aus der Mitarbeit am Tierversuch und der Bearbeitung der allgemein erhobenen Daten zum Geburtsgewicht, Wachstum sowie der Daten aus Stoffwechsellversuchen. Im Rahmen meiner Fragestellung konzentrierte ich mich weiterhin auf die Leber, sowie die Ergebnisse der Nüchternblutentnahmen und des ipGTT.

### 3.4 Physiologische Methoden

#### 3.4.1 Untersuchungen im Stoffwechselkäfig

Zur Erfassung der Nierenfunktion durch Kreatininmessungen aus Plasma und Urin wurden alle Tiere in Woche 12, 18 und 23 über 24 Stunden in einen Stoffwechselkäfig gesetzt. Die Käfige sind so konstruiert, dass Kot und Urin aufgefangen werden können. Vor und nach dem 24-stündigen Verbleib in den Stoffwechselkäfigen wurden die Tiere gewogen. Die Tiere erhielten lediglich Wasser *ad libitum* und Gurke zur Anregung der Urinproduktion. Die aufgenommenen Wasser- und Futtermengen und die Menge des abgesetzten Harns wurden protokolliert. Unmittelbar danach wurde eine Blutentnahme aus dem retrobulbären Venenplexus unter Isoflurannarkose durchgeführt. Das gewonnene Blut wurde mit Hilfe einer Spritze in ein mit 0,5 M EDTA beschichtetes Reaktionsgefäß ausgeblasen und anschließend zentrifugiert (5 min, 3000 rpm, RT). Das Plasma wurde abpipettiert, der Blutkuchen mit 50 µl 0,9%-iger NaCl Lösung versetzt und für weitere Analysen bei -20°C gelagert. Der gewonnene Urin wurde ebenfalls bei -20°C gelagert.

#### 3.4.2 Nicht-invasive Puls- und Blutdruckmessung

Mittels *tail-cuff* Plethysmographie der Schwanzarterie kann nicht-invasiv der systolische Blutdruck von Mäusen nach der Methode von Riva-Rocci (RR) gemessen werden. Die Tiere wurden für die Messungen einmal, mindestens einen Tag vor der eigentlichen Messung, trainiert. Die Messungen erfolgten immer zur gleichen Tageszeit, um zirkadiane Schwankungen zu minimieren. Für die Messung wurden die Tiere in eine spezielle Plexiglasröhre mit einer kleinen Öffnung an der Rückwand gebracht, aus welcher der Schwanz herausgeführt werden kann. Um eine Auskühlung der Tiere zu verhindern, wurde die Messung auf einer Wärmeplatte von 37°C durchgeführt. Die aufblasbare Druckmanschette wurde an die Schwanzwurzel angelegt, und ca. 1,5 cm distal davon der Pulsabnehmer. Mit der Aufzeichnung der systolischen Blutdruckwerte wurde nach 10 min bei ruhigem Tier und stabiler Pulsamplitude begonnen. Mit Hilfe der Powerlab Software® werden die Druck- und Pulswellen graphisch dargestellt. Im Abstand von 30 Sekunden wurden mindestens vier Messungen durchgeführt, um verlässliche Mittelwerte zu erhalten. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Chart and Scope for Windows, Version 4.1..

### 3.5 Histologische Methoden

#### 3.5.1 Konventionelle Histologie

##### 3.5.1.1 Fixierung der Organe für Paraffinschnitte

Durch die Formalinfixierung von Organen wird das Einsetzen postmortaler Veränderungen des Gewebes aufgehalten sowie die notwendige Härte des Gewebes für die folgenden Einbettungsprozesse erreicht. Hierzu wurden die Organe für 24 Stunden in eine 4%-ige Formaldehydlösung/PBS gelegt und anschließend für 24 Stunden in 70%-iges Ethanol überführt.

##### PBS Puffer pH=7,4

Natriumchlorid (NaCl)	8 g/l
Kaliumchlorid (KCl)	0,2 g/l
Dinatriumphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1,15 g/l
Kaliumdihydrogenphosphat (KaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,2 g/l

##### 3.5.1.2 Einbettung der Organe für Paraffinschnitte

Die Paraffineinbettung von Organen in Paraffin dient vornehmlich dem Erreichen einer genügend hohen Festigkeit des Gewebes, um für histologische Färbungen dünne und gleichmäßige Schnitte am Mikrotom herstellen zu können.

##### Praktische Durchführung:

Die Entwässerung der Organe erfolgte durch Behandlung in einer aufsteigenden Alkoholreihe: einmalig 70%-iges, zweimalig 96%-iges und dreimalig absolutes Ethanol; jeweils für eine Stunde. Anschließend wurden die Organe für vier Stunden in Xylol übertragen und dieser Schritt wiederholt. War der Alkohol vollständig ausgewaschen, sanken die Präparate zu Boden. Die Organe wurden dann für eine Stunde in 56°C warmes, reines Paraffin gegeben und diese Behandlung wiederholt, für zwei Stunden. Alle beschriebenen Schritte erfolgten automatisiert in einer Einbettvorrichtung. Am Ende des Prozesses wurden die Organe mit der Schnittfläche nach unten zeigend in Ausgießformen gelegt, mit 56°C warmen Paraffin übergossen, und ein Histokassettenboden von oben aufgelegt. Auf einer Kühlplatte erfolgte die Aushärtung.

##### 3.5.1.3 Anfertigung der Schnittpräparate

Am Mikrotom wurden 3 µm dicke Gewebsschnitte angefertigt. Nach Strecken in einem 45°C warmen Wasserbad wurden sie auf einen Objektträger aufgezogen und zunächst



auf einer Wärmeplatte getrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger für 30 min in einen 60°C warmen Wärmeschrank gestellt, um eine Fixierung der Schnitte auf den Objektträgern zu erlangen.

Um die Haftung des Gewebes auf den Objektträgern zu verbessern, wurden diese vor Verwendung durch Behandlung mit 3-Amino-Propyl-Triethoxysilan (APES) silanisiert. Dazu wurden alle Objektträger zur Entfettung für fünf min in 100% Aceton gebracht und anschließend für 5 min in eine 2%-ige APES/Aceton (v/v) Lösung getaucht. Die aufgebrauchten Alkylgruppen können mit dem Gewebe kovalente Bindungen eingehen. Die Objektträger wurden abschließend für 2 min in *Aqua dest.* gespült und über Nacht bei 30°C im Wärmeschrank getrocknet.

#### **3.5.1.4 Hämatoxylin Eosin Färbung der Leber**

Die Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung wird zu den Übersichtsfärbungen in der Histologie gerechnet. Für die Kernfärbung wird Hämalaun, ein stark positiv geladener Hämatoxylinlack des Aluminiums verwendet, welcher gut an das negativ geladene Kernchromatin bindet. Eosin ist ein saurer Xanthenfarbstoff, welcher Zytoplasma, Bindegewebe und Kollagenfasern kräftig rot anfärbt.

##### Praktische Durchführung:

Die Schnitte wurden zwei Mal für 5 min in Xylol getaucht. Daraufhin folgte die Bewässerung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (100%-iges, 95%-iges, 80%-iges, 70%-iges Ethanol; je zwei min), welche durch kurzes Spülen in *Aqua bidest.* abgeschlossen wurde. Anschließend folgte die Kernfärbung in Mayers Hämalaun für 4 min. Durch eine zehnmünütige Behandlung unter fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte gebläut. Überschüssiger Farbstoff wurde anschließend durch einen kurzen Spülschritt mit *Aqua bidest.* ausgewaschen und die Schnitte zur besseren Differenzierung kurz in 1% HCl-Alkohol getaucht. Erneut wurde für 7 min unter Leitungswasser gespült. Anschließend wurden die Präparate für 4 min in Eosinlösung gefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde durch Spülen in *Aqua bidest.* entfernt. In einer aufsteigenden Alkoholreihe (kurzes Spülen in 80%-iges Ethanol, 95%-iges Ethanol für 1 min, zwei Mal 100%-iges Ethanol für 2 min) wurden die Schnitte entwässert. Der Färbvorgang wurde durch zweimaliges Überführen in Xylol für jeweils 5 min abgeschlossen, die Schnitte mit Eindeckmedium unter einem Deckglas eingedeckt.

---

<u>Eosinlösung</u>	
Ethanol 100%	178ml
Eisessig	2ml
Eosinlösung (1% in <i>Aqua bidest</i> )	20ml

### 3.5.1.5 Auswertung der H.E. gefärbten Präparate

In Anlehnung an das von Burns et al. beschriebene Verfahren wurden der mittlere Radius der Leberläppchen ermittelt (102). Hierzu wurden eine Zentralvene und ihre dazugehörigen Portalfelder am Mikroskop Axiovert 100 (Zeiss) in 200-facher Vergrößerung aufgesucht. Portalfelder erkennt man an den drei dort anzutreffenden Strukturen Leberarterie, Lebervene und Gallengang. Die Zugehörigkeit von Lebervene und Portalvenenfeld ergibt sich aus der Verbindung der beiden Strukturen durch die Lebersinusoiden. Die gefärbten Präparate wurden durchmeandert und zwischen fünf und zehn Leberläppchen je Organ mit der Digitalkamera EC3 fotografiert. Anschließend wurde in ImageJ mittels der Funktion *Feret's diameter* (Analyze<Set Measurements<Feret's Diameter) der mittlere Abstand vom Zentrum der Zentralvene zum Portalfeld ermittelt. Für jedes Organ wurde der Mittelwert aus der Analyse aller Bilder gebildet.

### 3.5.2 Kryohistologie

Während der klassischen Formalinfixierung und Paraffineinbettung von Geweben werden Lipide durch die Alkoholbehandlung aus dem Gewebe herausgelöst. Für den histologischen Lipidnachweis kommen daher kryohistologische Präparate zum Einsatz.

#### 3.5.2.1 Herstellung der kryohistologischen Schnittpräparate

Etwa 0,5 x 0,5 cm große Stücke des stickstofffixierten Lebergewebes wurden entsprechend der Schnittfläche in eine Kryoeinbettkassette gelegt und vollständig mit Eindeckmedium für Gefrierschnitte bedeckt und bei -80°C gelagert. Am Kryotom wurden etwa 10 µm dicke Schnitte angefertigt. Dazu wurde das Präparat aus der Histokassette auf die Präparatehalterung am Kryotom übertragen. Für den Feinschnitt wurde eine Schnittdecke mit einem gekühlten Pinsel aufgefangen, auf den Schneidetisch geführt und dabei gestreckt. Ein Objektträger wurde dem Schnitt angenähert und der

Schnitt durch leichten Druck, unter Ausnutzen des Temperaturunterschiedes zwischen Gewebe und Objektträger, auf letzteren übertragen. Die fertigen Schnitte wurden bis zur Färbung bei -80°C gelagert.

### 3.5.2.2 *Oil Red O* Färbung der Lebern

Bei der von Lillie 1944 eingeführten Methode des Fettnachweises mit *Oil red O* werden gewebständige Lipide intensivrot angefärbt (103). *Oil red O* gehört zur Klasse der Sudanfarbstoffe, welche in Wasser fast unlöslich sind. *Oil red O* wird daher in einem organischen Lösungsmittel in Lösung gebracht, welches in Fetten relativ unlöslich ist und auch den Farbstoff nur teilweise löst. Farbstoffmoleküle können dann gemäß dem Verhältnis ihrer Löslichkeit zwischen Lipid und Lösungsmittel ausgetauscht werden. Zur Kernfärbung wurde die in Kap. 3.5.1.4 beschriebene Hämatoxylin Färbung verwendet.

#### Praktische Durchführung:

Für die Färbestammlösung wurde eine 0,5%-ige (w/v) *Oil red O* Lösung in 100%-igem Isopropanol hergestellt. Das Lösen des *Oil red O* in der Lösung wurde durch einstündige Behandlung in einem 56°C warmen Wasserbad und regelmäßiges Schwenken verbessert und die fertige Färbestammlösung über Nacht abgekühlt. Direkt vor Anwendung wurde aus sechs Teilen der Stammlösung und vier Teilen *Aqua bidest.* eine gebrauchsfertige Färbelösung hergestellt. Die fertige Färbelösung wurde zunächst für zehn min verschlossen stehen gelassen und anschließend gefiltert.

Vor dem Färben wurden die Gefrierschnitte für 30 min an der Luft getrocknet. Unter fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte für 5 min vorsichtig gewaschen und kurz in 60%-igem Isopropanol gespült. Für 15 min wurden die Schnitte in *Oil Red O* gefärbt und erneut kurz in 60%-igem Isopropanol gespült. Für die einminütige Kernfärbung mit Hämalaun wurden die Schnitte zunächst durch viermaliges Spülen in *Aqua bidest.* vorbereitet. Abschließend wurden die Präparate in *Aqua bidest.* für 5 min gebläut und in zwei weiteren Spülschritten (zunächst 3, dann 2 min in *Aqua bidest.*) von überschüssigem Farbstoff befreit. Unter einem Deckglas wurden die Präparate mit Aquatex® eingedeckt.

### 3.5.2.3 Auswertung der *Oil red O* gefärbten Präparate

Von den *Oil red O* gefärbten Präparaten wurden bei 400-facher Vergrößerung am Mikroskop BH-2 mit der Digitalkamera CFW-1310C möglichst viele Ausschnitte unter identischen Lichtbedingungen photographiert. Dabei sollten in den Bildausschnitten möglichst keine Gefäße enthalten sein.

Zur Bestimmung des Fettanteils wurden die Bilder morphometrisch analysiert. Hierzu wurde zunächst in dem Programm ImageJ der Kontrast zwischen den rot gefärbten Lipiden und der Hintergrundfärbung durch Veränderung der Farbbalance verstärkt (Image>Adjust>Color balance). Diese Kontrastschärfung wurde standardisiert für jedes photographierte Präparat vorgenommen, indem die minimale und maximale Sättigung für den Farbton Blau ermittelt wurde. Diese Messung wurde drei Mal für jedes Präparat wiederholt und der Mittelwert gebildet. Anschließend wurde die maximale Sättigung des Farbtons Magenta so eingestellt, dass die im Original rot gefärbten Lipidanteile des Gewebes sich von den Kernen differenzieren ließen. Auch dieser Wert wurde dreifach gemessen und der Mittelwert gebildet. Abschließend wurden die minimalen und maximalen Farbsättigungen jedes Bildes entsprechend angepasst (Image>Adjust>Color balance>Blue/Magenta>Set). Die Aufnahmen wurden dann in 8-bit-Grauwertbilder konvertiert. Mittels des Befehls Image>Adjust>Threshold wurde der Schwellenwert festgelegt, bis zu dem ein Pixel anhand der Farbtiefe als Signal (Fett) gewertet wird, und die Signalfläche in Pixel ermittelt (Analyze>Set Measurements>Area, Analyze>Measure). Die gleiche Messung wurde für den Schwellenwert durchgeführt, anhand dessen die gesamte Gewebsfläche je Photo als Signal gewertet wird.

Der Fettgehalt der Leber wurde als prozentualer Anteil der für Fett positiven Fläche an der Gesamtfläche des festgehaltenen Gewebes angegeben. Für jedes Organ wurde der Mittelwert aus der Analyse aller Ausschnitte gebildet.

## 3.6 Biochemische Methoden

### 3.6.1 Bestimmung der Nüchternglukosekonzentration aus Plasmen

Für die Nüchternglukosemessungen wurden die Tiere für 24 Stunden alleine in einem Käfig mit Wasser, aber ohne Futter, gehalten und abschließend retrobulbär Blut abgenommen (vgl. Kap. 3.4.1).

Die Plasmaglukosekonzentration wurde mittels Glukose (HK) Assay Kit bestimmt. Das enthaltene Glukosereagenz beinhaltet die beiden Enzyme Hexokinase (HK) und Glucose-6-Phosphatase (G6PDH) sowie die beiden Substrate Nikotinamid Adenin Dinukleotid (NAD) und ATP. In der an die Hexokinase-reaktion anschließende G6PDH-Reaktion ist die Menge des umgesetzten Glukose-6-Phosphates proportional zur Menge des umgesetzten Kosubstrates NAD. Diese Änderung lässt sich durch die Verfolgung der Extinktion bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 340$  nm bestimmen.

Praktische Durchführung:

In eine 96-well Platte wurden 10  $\mu$ l Plasma und 200  $\mu$ l des Glukosereagenz pipettiert und anschließend auf einem Schüttler für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Absorption bei der Wellenlänge  $\lambda = 340$  nm an einem Spektrophotometer für Mikrotiterplatten ermittelt. Als Kontrolle wurde Secutrol mit bekannter Glukosekonzentration, sowie Negativkontrollen mitgeführt. Zusätzlich wurde auf jeder Mikrotiterplatte eine Standardreihe mit Glukoselösungen in den Konzentrationen 0,1 bis 2,4 mg D-Glukose/ml mitgeführt. Aus der Steigung der Standardreihe und der gemessenen Absorption wurde die Glukosekonzentration der Probe errechnet. Alle Messungen erfolgten als Doppelbestimmung.

### 3.6.2 Intraperitonealer Glukosetoleranztest

Nach zwölfstündigem Fasten der Tiere wurde in Abhängigkeit vom Körpergewicht die gleiche Menge Glukose in Form von 10%-iger Glukoselösung intraperitoneal gespritzt (2 mg Glukose pro g Körpergewicht). Es wurde direkt vor Injektion, nach 15, 30 und 60 min retrobulbär Blut entnommen (vgl. Kap. 3.4.1). Aus den Plasmen wurde, wie in Kap. 3.6.1 beschrieben, die Glukosekonzentration bestimmt.

Für die Berechnung der *Area under the curve* (AUC) aus den ermittelten Glukosekonzentrationen im ipGTT wurde folgende Formel zu Grunde gelegt, wobei für t gilt: Zeit (in Minuten) zwischen entsprechenden Zeitpunkten im ipGTT:

$$AUC = 0,5 \times (\text{Glukosekonzentration } Z0 + \text{Glukosekonzentration } Z1) \times t \text{ (in min)}$$

Für die Berechnung der AUC von Insulin wurde entsprechend vorgegangen.

### 3.6.3 Ermittlung des Glykogengehaltes der Lebern

Glykogen besteht aus bis zu 50.000 Glukosebausteinen, welche über  $\alpha$ -1,4- und  $\alpha$ -1,6-glykosidische Bindungen an das zentral gelegene Protein Glykogenin gekoppelt sind. Das Enzym Amyloglukosidase gehört zur Klasse der Exoglukosidasen und ist in der Lage, sowohl  $\alpha$ -1,4- als auch  $\alpha$ -1,6-glykosidische Bindungen zu spalten. Durch seine Spezifität eignet es sich zum Nachweis von Glykogen in besonderem Maße (104).

#### Praktische Durchführung:

In der Regel wurden etwa 50 mg Leber verwendet. Das Gewebe wurde mit 250  $\mu$ l Kaliumhydroxid (1N) für 30 min in einem 95°C warmen Wasserbad inkubiert und anschließend mit 250  $\mu$ l Salzsäure (1N) neutralisiert. 150  $\mu$ l des entstandenen Homogenats wurden mit 50  $\mu$ l gesättigter Natriumsulfatlösung sowie 500  $\mu$ l 95%-iges Ethanol versetzt und das Gemisch in einem 85°C warmen Heizblock kurz zum Sieden gebracht, wobei das enthaltene Glykogen ausfiel. Die Proben wurden auf Eis gebracht und zentrifugiert (10 min, 3000 rpm, RT). Das Glykogenpellet wurde in 1 ml 60%-iges Ethanol resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 min, 3000 rpm, RT). Nach einem zweiten Waschen wurde das Pellet in 200  $\mu$ l Acetatpuffer resuspendiert. 100  $\mu$ l des resuspendierten Glykogens wurden mit 250  $\mu$ l Amyloglukosidaselösung (0,01% (w/v) in Acetatpuffer) bei 40 °C für zwei Stunden unter Schütteln inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von 50  $\mu$ l Perchlorsäure (3N) beendet. Die Proben wurden zentrifugiert (10 min, 3000 rpm, RT) und der Überstand mit 50  $\mu$ l Kaliumbicarbonat (3M) neutralisiert. Aus dem neutralisierten Überstand wurde mittels in Kap. 3.6.1 beschriebener Hexokinase-Methode die Glukosekonzentration bestimmt.

#### Acetatpuffer (0,2M; pH=4,8):

Natriumacetat	16,4 g/l
Essigsäure (96%-ig)	4,8 ml/l

Mit *Aqua bid.* ad 1000 ml lösen, pH-Wert einstellen.

### 3.6.4 Bestimmung der Kreatininwerte aus Plasma und Urin

Plasmakreatinin wurde nach der Methode von Jaffé ermittelt. Bei dieser kinetischen Messung wird ausgenutzt, dass Kreatinin in alkalischer Lösung mit Pikrinsäure einen gelb-roten Komplex bildet, welcher photometrisch erfasst werden kann. Die Messung erfolgte mittels Dr. Lange Test für Kreatinin auf Spektrophotometer Beckmann DU 530. Die Messtemperatur betrug 25°C, die Messung erfolgte automatisiert über zwei Minuten nach 30 s Vorlauf. Als Kontrolle diente ein Kreatinin Standard.

Die Messung der Urinkreatininwerte erfolgte im Labor von Herr Prof. Dr. J.-P. Stasch, Bayer Schering Pharma AG, mittels kinetischer Methode nach Jaffé auf Roche Diagnostics GmbH Hitachi 717/704.

Wird der Quotient aus Urin- und Plasmakreatininkonzentration multipliziert mit dem Urinfluss in ml/min, erhält man die glomeruläre Filtrationsrate (GFR).

$$GFR = \frac{\text{Urinkreatinin} \left( \frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right) \times \text{Harnvolumen (ml)}}{\text{Serumkreatinin} \left( \frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right) \times t \text{ (min)}}$$

Die GFR ist das Gesamtvolumen des Primärharns, das in einer definierten Zeiteinheit von allen Glomeruli beider Nieren zusammen gefiltert wird.

### 3.6.5 Bestimmung der Nüchterninsulinkonzentration aus Plasmen

Die Bestimmung der Insulinkonzentrationen aus Plasmen erfolgte in Kooperation mit der Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und Ernährungsmedizin, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, durch Herrn Dr. med. Mohammed Ayman Arafat.

### 3.6.6 Berechnung von HOMA- und QUICKI - Index aus Nüchtern glukose- und -insulinkonzentrationen

Neben direkten Glukose/Insulin-Clamp Versuchen haben sich indirekte Parameter etabliert, anhand derer sich Aussagen über die Insulinresistenz eines Individuums treffen lassen. Das HOMA-Modell (Homeostasis Modell Assessment) bietet einen einfach zu bestimmenden Insulinresistenz-Index, der gut mit dem M-Wert aus dem Clamptest korreliert (105). Ein niedriger Wert steht für eine hohe Insulinsensitivität, hohe Werte eher für eine Insulinresistenz. Der HOMA errechnet sich wie folgt:

$$HOMA = \frac{\left( \text{Nüchterninsulin} \left( \frac{\text{mU}}{\text{l}} \right) \times \text{Nüchtern glukose} \left( \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right) \right)}{22,5}$$

Der QUICKI-Index (Quantitative Insulin Sensitivity Check Index) nach Katz errechnet sich ebenfalls aus Nüchtern glukose- und der Nüchterninsulinkonzentration (106). Ein hoher Wert steht für eine niedrige Insulinsensitivität, niedrige Werte sprechen für das Vorliegen von Insulinresistenz.

$$QUICKI = \frac{1}{\lg \text{Nüchterninsulin} \left( \frac{\text{mU}}{\text{l}} \right) + \lg \text{Nüchtern glukose} \left( \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right)}$$

### 3.7 Molekularbiologische Methoden

#### 3.7.1 Genotypisierung der Tiere mittels PCR

Durch Nachweis des eNOS WT sowie des eNOS knock-out Allels, welches eine an Exon 24 und 25 eingefügte Neomycin Kasette besitzt, konnte jedes Tier genotypisiert werden. Alle Messungen erfolgten als Doppelbestimmung.

##### 3.7.1.1 DNA Isolation

In der sechsten bis achten Lebenswoche wurde den Tieren, wie in Kap. 3.4.1 beschrieben, Blut für die Genotypisierung abgenommen. 50 µl Plasma wurden mit 500 µl TE-Puffer versetzt und zentrifugiert (3 min, 13000 rpm, RT). Das Serum wurde verworfen und der zelluläre Bestandteil des Blutes insgesamt drei Mal in 500 µl TE-Puffer resuspendiert und zentrifugiert (je 1 min, 13000 rpm, RT). Anschließend wurden 100 µl Proteinase K Lösung hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 90 min bei 56°C inkubiert, die Reaktion danach durch 30-minütiges Erwärmen auf 95°C gestoppt und die Proben auf Eis abgekühlt.

##### K-Puffer (pH 8,3):

KCl	3,73 g/l
Tris	1,21 g/l
MgCl	0,51 g/l

##### Proteinase K Lösung:

K-Puffer	985 µl/ml
Proteinase K (100µg/ml)	10 µl/ml
Tween 20 (0,5%)	5 µl/ml

##### TE Puffer (pH 7,5, mit HCl titrieren):

Tris	1,21 g/l
EDTA	0,372 g/l

##### 3.7.1.2 eNOS WT PCR

Die PCR für das eNOS WT Allel wurde wie in Tab. 3 aufgeführt angesetzt. Die verwendeten Primer waren:



Primer 1: eNOS-WT 3 (DD): 5' AGGACATATGTTTGTCTGCGG 3'  
 Primer 2: eNOS-WT 4 (DD): 5' CTGAGGACTGCACCTGTTCA 3'.

Reagenz	Volumen pro Ansatz (µL)
Wasser ( <i>Aqua ad inject</i> )	13.728
10 x PCR Puffer	2.2
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.76
dNTP Mix (je 2,5 mM)	0.44
Primer 1 (10 nmol/l)	0.88
Primer 2 (10nmol/l)	0.88
Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0.132
Template DNA	1.98

Tab. 3: Reaktionsansatz für eNOS WT und NeoR PCR

Die PCR Reaktion wurde im Thermocycler unter den in Tab. 4 aufgeführten Reaktionsbedingungen durchgeführt.

Aktivierung/Denaturierung	94°C	6 min	} 39 x
<i>Annealing</i>	65°C	30 s	
Elongation	72°C	3 min	
Denaturierung	94°C	30 s	
<i>Finales Annealing</i>	65°C	30 s	
Finale Elongation	72°C	10 min	
Pause	15°C	∞	

Tab. 4: Reaktionsablauf der eNOS WT PCR

### 3.7.1.3 PCR für eNOS knock-out Allel

Der Reaktionsansatz PCR für das eNOS knock-out Allel NeoR (Neomycin-resistente Kasette) ist in Tab. 3 aufgeführt. Die verwendeten Primer waren:

Primer 1: NeoR2 ase 5' ACAAGACCGGCTTCCATCCG 3'

Primer 2: NeoR2 se 5' TTGTCAAGACCGACCTGTCC 3'

Die Reaktion wurde unter den in Tab. 4 aufgeführten Bedingungen durchgeführt, wobei eine *Annealing* Temperatur von 64°C eingestellt wurde.

### 3.7.1.4 Darstellung der PCR Produkte mittels Gelelektrophorese

Ein Agarosegel wurde (1,5% (w/v) in TBE Puffer) in einen Gelschlitten gegossen und das erstarrte Gel mit TBE-Puffer überschichtet. Die Probestaschen wurden jeweils mit 20 µl PCR-Reaktionsprodukt und 4 µl Ladepuffer beladen. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 100 Volt für 30 min durchgeführt. Abschließend wurde das Gel für 30 min in Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml in TBE) gebadet und die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht.

#### TBE Puffer:

Tris	10,8 g/l
Borsäure	5,5 g/l
EDTA (0,5 mM pH 8,0)	0,4 ml

#### Ladepuffer:

Bromphenolblau	0,25% (w/v)
Ficoll Typ 400	15% (w/v) in TBE-Puffer

### 3.7.2 Untersuchung der relativen Genexpression mittels quantitativer Real-Time PCR

Um eine Aussage über die Expression von Genen in Gewebe treffen zu können, eignet sich die Quantifizierung der zugehörigen RNA mittels quantitativer *Real-Time* PCR (rtPCR). Gegenüber der klassischen PCR ermöglicht die rtPCR durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter Stoffe die Beobachtung der Kinetik der Reaktion. Da RNA nicht direkt amplifiziert werden kann, muss sie durch reverse Transkription zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Ein häufig verwendeter Fluoreszenzfarbstoff für die rtPCR ist SYBR Green<sup>®</sup>, welcher mit kleinen Furchen der DNA interkaliert und sich durch hohe Sensitivität und Spezifität für doppelsträngige DNA auszeichnet. SYBR Green<sup>®</sup> emittiert während der Bindung Licht einer Wellenlänge von  $\lambda = 521 \text{ nm}$ . Das Fluoreszenzsignal wird am Ende der Elongationsphase gemessen, genau dann wenn in jedem Zyklus die maximale amplifizierte Menge an doppelsträngiger DNA vorliegt. Die Quantifizierung der Reaktionsprodukte erfolgt, indem für jede Probe die Zyklenzahl ermittelt wird, bei dem das detektierte SYBR Green<sup>®</sup> Signal einen Fluoreszenzschwellenwert erreicht, der die Hintergrundfluoreszenz der Probe überschreitet. Dieser Wert wird als  $C_t$ -Wert (*Threshold Cycle*) bezeichnet. Proben mit einer hohen cDNA Ausgangskonzentration für das untersuchte Gen überschreiten den Schwellenwert entsprechend früher. Um die Produktspezifität der SYBR Green<sup>®</sup> PCR zu kontrollieren, wird im Anschluss an jede PCR eine Schmelztemperaturanalyse angeschlossen.

### 3.7.2.1 RNA-Isolation mittels *Single step* Methode

Die *single step* Methode beruht auf der Trennung von RNA und DNA in einer sauren Lösung, welche Guanidiniumthiocyanate, Natriumacetat, Phenol und Chloroform enthält.

#### Praktische Durchführung:

Etwa 50 mg Leber wurden in 1,5 ml peqGoldTriFast mit einem elektronischen Homogenisator lysiert und 300 µl Chloroform zum Homogenat gegeben. Die Proben wurden kräftig geschüttelt, 3 min bei RT inkubiert und anschließend 15 min zentrifugiert (15 min, 4°C, 12000 g). Dabei entstand ein dreiphasiges Gemisch, welches eine untere rote Phenol-Chloroform Phase, eine Interphase und eine obere, RNA enthaltende, wässrige Phase enthielt. Zur abgenommenen oberen Phase wurden 0,7 ml Isopropanol hinzugegeben und für 10 min bei RT inkubiert, anschließend zentrifugiert (10 min, 12000 rpm, 4°C). Die darin enthaltene RNA fällt hierbei in einem gelartigen Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes aus. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml 75%-iges Ethanol gewaschen (10 min, 7500 rpm, 4°C). Die RNA wurde für 30 min an der Luft getrocknet und in 100 µl Diethylene Pyrocarbonat (DEPC) Wasser resuspendiert. Zur Beseitigung möglicher Verunreinigungen durch DNA-Reste wurde ein DNase Verdau angeschlossen. Hierzu wurden 2U TurboDNase und 11µl Turbo DNase Buffer zur RNA gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert, die Proben anschließend auf Eis abgekühlt. Zur weiteren Aufreinigung der RNA wurden 400 µl F Wasser und 500 µl Phenol/Chloroform Gemisch (1:1) zur Probe hinzugegeben und die Proben zentrifugiert (10 min, 10000 rpm, 4°C). Die bei Zentrifugation entstandene obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reagenzgefäß überführt und anschließend mit 500 µl Chloroform kräftig geschüttelt. Nach Zentrifugation (10 min, 10000 rpm, 4°C) wurde erneut die obere Phase abgenommen und aus dieser, wie zuvor beschrieben, die RNA ausgefällt und gewaschen. Abschließend wurde die getrocknete RNA in 50 µl DEPC Wasser aufgenommen, und bei -80°C gelagert.

### 3.7.2.2 RNA Quantifizierung

Die gewonnene RNA wurde 1:200 in DEPC Wasser verdünnt, die Extinktion bei  $\lambda=260$  nm gemessen und daraus wie folgt die Konzentration berechnet:

$$C (\mu\text{g}/\text{ml}) = \text{Extinktion}_{260\text{nm}} * \text{Verdünnung} * K$$

(K: optische Dichte, 40 µg/ml Einzelstrang-RNA (ssRNA))

Als Referenzwert wurde DEPC Wasser eingesetzt. Die Extinktion ist im linearen Bereich des Photometers (E zwischen 0,1 und 1) zu messen

### 3.7.2.3 Überprüfung der Reinheit und Qualität der extrahierten RNA

Durch Berechnung des Verhältnisses der Extinktion der Proben bei  $\lambda=260$  nm und  $\lambda=280$  nm kann die Reinheit der gewonnenen RNA ermittelt werden. Eine Ratio (A260/A280) zwischen 1,8 und 2,0 zeigt eine reine Probe an (vgl. Kap. 3.7.2.2.) . Die Qualität von isolierter RNA kann weiterhin mittels Elektrophorese in Agarosegel überprüft werden: 1  $\mu$ l der isolierten RNA wurde in 7  $\mu$ l DEPC Wasser aufgenommen und zu dem Gemisch 2  $\mu$ l RNA Ladepuffer gegeben und für 10 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde die Elektrophorese durchgeführt (vgl. Kap. 3.7.1.4). mRNA ist nur als diffuses Signal im Größenbereich unterhalb von 2 kb sichtbar, die typischen Banden der 18S und 28S rRNA bei 1,9 bzw. 5,0 kb hingegen sind deutlich abgrenzbar

RNA Ladepuffer (5x):

Ethidiumbromid 1  $\mu$ g/ml

Glycerin 30% (v/v)

Bromphenolblau 0,001% (w/v)

### 3.7.2.4 Reverse Transkription

Alle Reagenzien für die reverse Transkription stammten aus dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. Für die Synthese wurden 1  $\mu$ g RNA in 10  $\mu$ l DEPC Wasser eingesetzt. Die RNA wurde für 10 min bei 70°C mit 2,0  $\mu$ l RT Random Primern (10x) denaturiert und auf Eis gebracht. Anschließend wurde der in Tab. 5 aufgeführte Reaktionsansatz für die cDNA Synthese angesetzt.

Die cDNA-Synthese erfolgte im Thermocycler nach Herstellerangaben für 120 min bei 37°C und wurde durch fünfminütiges Erhitzen auf 85°C abgebrochen.

Reagenz	Volumen ( $\mu$ l)
RT Buffer (10x)	2,0
dNTPMix 100mM (25x)	0,8
Reverse Transkriptase Multi Scribe™ (50 U/ $\mu$ l)	1,0
RNAse Inhibitor	1,0
DEPC Wasser	3,2
Template RNA	10

Tab. 5 Reaktionsansatz reverse Transkription

Die cDNA Synthese wurde durch PCR (vgl. Tab. 7) mit den Primern für Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) für jede Probe überprüft. Hierzu wurde folgende Reaktion angesetzt (Tab. 6):

Reagenz	Volumen ( $\mu$ l)
SYBR Green <sup>®</sup> PCR Master Mix	12,5
DEPC Wasser	6,5
Forward Primer (10pM)	0,5
Reverse Primer (10pM)	0,5
cDNA (1:25)	5

**Tab. 6: Reaktionsansatz Überprüfung cDNA Synthese**

Aktivierung	95°C	10 min	} 40x
Denaturierung	95°C	15 s	
Annealing/Extension	60°C	1 min	
Pause	4°C	$\infty$	

**Tab. 7: PCR zur Überprüfung der cDNA Synthese**

### 3.7.2.5 Primer und Primerdesign

Die Primer für die rtPCR wurden mit Hilfe des Programms Primer3 entworfen. Die RNA-Sequenzen der Zielgene wurden den gängigen Datenbanken entnommen (Ensembl, NCBI Nucleotide). Es wurde darauf geachtet, dass die Primer nur exonspezifisch aus der jeweiligen mRNA Sequenz gewählt wurden bzw. dass Introns durch die Primer überspannt wurden. Die Primer wurden zusätzlich mit Hilfe des Programms BLAST auf möglicherweise vorliegende Single Nukleotid Polymorphismen (SNPs) und auf Spezifität für die Zielsequenz geprüft.

Es wurde darauf geachtet, dass

- die Primer eine Länge von etwa 20 Basenpaaren (BP) haben,
- der G- und C-Gehalt 20-60% beträgt,
- keine Poly-T-Abschnitte vorkommen (unspezifische Bindungen),
- die Schmelztemperatur der Primer etwa 60°C beträgt,
- keine 3' Komplementarität der Primer vorliegt und
- das Amplikon eine Länge von 100-300 BP hat.

Folgende Primer wurden verwendet:

Zielgen	Primerpaar	Länge des Amplikons (BP)
HPRT	fw 5'CAGGCCAGACTTTGTTGGAT '3 rev 5' TTGCGCTCATCTTAGGCTTT '3	147
Actin	fw 5' GATATCGCTGCGCTGGTC '3 rev 5' CATCACACCCTGGTGCCTA '3	123
18S	fw 5'CGGCTACCACATCCAAGGAA' 3 rev 5'GCTGGAATTACCGCGGCT ' 3	187
PPAR- $\gamma$	fw 5' CAGGCCTCATGAAGAACCTT' 3 rev 5' GGATCCGGCAGTTAAGATCA' 3	176
PPAR- $\gamma$ Transkript 1	fw 5' TGACAGACAAGATTTGAAAGAAGC' 3 rev 5' TCTTCCATCACGGAGAGGTC' 3	158
PPAR- $\gamma$ Transkript 2	fw 5'TTCTCCTGTTGACCCAGAGC' 3 rev 5'AGCTGATTCCGAAGTTGGTG' 3	119
PPAR- $\gamma$ CoA1- $\alpha$	fw 5'AGTCACCAAATGACCCCAAG' 3 rev 5'GGAGTTGTGGGAGGAGTTAGG' 3	106
PPAR- $\alpha$	fw 5' TCTGGAAGCTTTGGTTTTGC '3 rev 5' TTCGACACTCGATGTTTCAGG '3	176
GLUT 2	fw 5' GACGTCAATGGCACAGACAC '3 rev 5' GCCAACATTGCTTTGATCCT '3	209
GR	fw 5' ACACGTCAGCACCCATAAT '3 rev 5' AGGCCGCTCAGTGTTCCTA '3	159
FBPase	fw 5' ATCAAAGCCATCTCGTCTGC '3 rev 5' ATTTGCCCTCTTCTCAGGT '3	217
GK	fw 5' AAGTCCCACGATGTTGTTCC '3 rev 5' CTTCCCTGTAAGGCACGAAG '3	100
PEP-CK	fw 5' ATACATGGTGCGGCCTTTC '3 rev 5' GACAACACTGTTGGCTGGCTCT '3	204
G6Pase	fw 5' GACTGTGGGCATCAATCTCC '3 rev 5' TCACAGGTGACAGGGAAGT '3	165
IGF 1	fw 5' CGTCTTACACCTCTTCTACCTG '3 rev 5' CCTGTGGGCTTGTTGAAGTAA '3	151
IGF 2	fw 5' TCTACTTACAGCAGGCCTTCAA '3 rev 5' GGGTATCTGGGGAAGTCGTC '3	178
IGF-BP 1	fw 5' CAGCATGAAGAGGCAAAGG '3 rev 5' CTATAGGTGCTGATGGCGTTC '3	152
IGF-BP 2	fw 5' AGGTCCTGGAGCGGATCT '3 rev 5' CATCTTGCCTGCTTAAGGTTG '3	125
IGF-BP 3	fw 5' TGCTCCAGGAAACATCAGTG '3 rev 5' GGAGTGGATGGAACCTGGAA '3	110
H19	fw 5' GATGAAAGAAATGGTGCTACCC '3 rev 5' GCAGAGTTGGCCATGAAGAT '3	231
eNOS	fw 5' GGGAAAGCTGCAGGTATTTG '3 rev 5' GCTGAACGAAGATTGCCTCT '3	111
iNOS	fw 5' TGACACACAGCGCTACAACA '3 rev 5' CCATGATGGTCACATTCTGC ' 3	152
ACE	fw 5' AGCGGCAGCAGTACAACCTCT '3 rev 5' AGGATGTTGGTGAGCTCTGG '3	121
Angio	fw 5' CTGACCCAGTTCTTGCCACT '3 rv 5' CAGGCAGCTGAGAGAAACCT '3	162
TNF- $\alpha$	fw 5'AGCCTCTTCTCATTCTGCTT'3 rev 5'AGATGATCTGAGTGTGAGGGTCT' 3	150
FAS	fw 5'GGATTCGGTGTATCCTGCTG'3 rev 5'TGGGCTTGTCTGCTCTAAC' 3	171
CHREBP	fw 5'GAAGATGCTTATGTTGGCAATG'3 rev 5'GGCGGTAATTGGTGAAGAAA' 3	109

Zielgen	Primerpaar	Länge des Amplikons (BP)
CPT1a	fw 5'CGCACATTACAAGGACATGG'3 rev 5'TCTGCTCTGCCGTTGTTGT' 3	158
Lipe/HSL	fw 5'ACCTGCTTGGTTCAACTGGA'3 rev 5'CTGGCACCTCACTCCATAG'3	111
AMPK- $\alpha$ 2	fw 5'AAAGACATACGAGAACATGAATGG'3 rev 5'CTTCACAGCCTCATCGTCAA'3	105
FXR	fw 5'GAGGCCATGTTTCTTCGTTTC'3 rev 5'CTCATCAGAGATACCACTCTTTTCG'3	105
SREBF1c	fw 5'CTGTCCGGGGTAGCGTCTG'3 rev 5'CGGGAAGTCACTGTCTTGGT'3	112

Tab. 8: Verwendete Primer für rtPCR. 18S: 18S ribosomale RNA. PPAR-alpha: Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptor alpha. GLUT 2: Glukosetransporter 2. PPAR- $\gamma$  CoA1- $\alpha$ : PPAR gamma Coactivator 1 alpha. FBPase: Fruktose-1,6-Bisphosphatase. GK: Glukokinase. IGF-BP 1/2/3: Insulin-like growth Factor Binding Protein 1/2/3. H19: Imprinted Maternally Expressed Transcript (Non-Protein coding). ACE: Angiotensin Converting Enzyme. Angio: Angiotensinogen. TNF- $\alpha$ : Tumornekrosefaktor alpha. FAS: Fatty Acid Synthase. CPT1a: Carnitine Palmitoyltransferase 1A. Lipe/HSL: Hormone Sensitive Lipase. AMPK- $\alpha$  2: AMP (Adenosinmonophosphat) Activated Protein Kinase alpha 2 catalytic subunit. FXR: Fragile X Mental Retardation Syndrome related Protein.

### 3.7.2.6 Quantitative Real-Time PCR

Die Reaktion wurde wie in Tab. 9 beschrieben in einer 96-well Platte, immer als Triplet, angesetzt. In jeder Probe wurde zusätzlich die Expression der Housekeeping Gene HPRT, Aktin und 18S gemessen und eine Negativkontrolle mitgeführt. Als intra-experimentelle Kontrolle wurde zusätzlich ein Standard mit gepoolter cDNA auf jeder Platte mitgeführt.

Reagenz	Volumen (in $\mu$ l)
SYBR Green® PCR Master Mix	12,5
DEPC Wasser	6,5
Forward Primer (10 $\mu$ M)	0,5
Reverse Primer (10 $\mu$ M)	0,5
cDNA (2ng/ $\mu$ l)	5

Tab. 9: Reaktionsansatz für rtPCR

Die Reaktionen wurden im Mx3000P real time Thermocycler unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

1. Aktivierung der Polymerase bei 95°C für 10 min
  2. Denaturierung bei 95°C für 15 s
  3. Annealing und Extension bei 60°C für 1 min
  4. Erstellung von Dissoziationskurven für jede Probe durch schrittweise Erhöhung der Temperatur von 55 auf 95°C.
- } 40 x

### 3.7.2.7 Effizienzbestimmung der Reaktion

Die Berechnung der Effizienz der Reaktionen erfolgte mittels linearer Regressionsmethode. Hierbei werden mehrere Fluoreszenzwerte der exponentiellen Phase der PCR gegen die zugehörige Anzahl abgelaufener Reaktionszyklen logarithmisch aufgetragen und die Steigung der resultierenden Geraden berechnet (107). Hierbei gilt:

$$R_n = R_0 \times (1 + E)^n$$

und logarithmiert

$$\lg R_n = n \times \lg(1+E) + \lg R_0$$

wobei  $\lg(1+E)$  die Steigung  $m$  der Geraden entsprechend der allgemeinen Geradengleichung  $y = mx + b$  darstellt. Wenn für die Steigung gilt, dass

$$m = \lg(1+E)$$

so gilt folglich

$$E = 10^m - 1$$

( $n$ : Anzahl der Reaktionszyklen,  $R_n$ : Fluoreszenz bei  $n$  Zyklen,  $R_0$ : initiale Fluoreszenz,  $E$ : Effizienz)

Die Effizienz der Reaktion sollte für Housekeeper und Zielsequenzen bei  $E=1$ , entsprechend 100% liegen.

### 3.7.2.8 Berechnung der relativen Genexpression

Um die Expression von Zielsequenzen unterschiedlicher Proben direkt miteinander vergleichen zu können, müssten für jeden Reaktionsansatz gleiche Mengen an cDNA eingesetzt werden. Da dies nicht zu realisieren ist, hat sich die Berechnung der relativen Expressionsanalyse durchgesetzt. Bei der relativen Expressionsanalyse wird die Expression einer Zielsequenz bezogen auf die Expression derselben in einer Referenzgruppe. Im vorliegenden Fall wurde die Gruppe der Tiere mit WT Mutter sowie WT Vater als Referenzgruppe bestimmt. Insbesondere zum Ausgleich möglicher Unterschiede in der Menge eingesetzter cDNA zu Reaktionsbeginn dient weiterhin die Messung der Expression von sog. Housekeeping Genen für jede Probe. Housekeeping Gene sind Gene, deren Expression sich im Gewebe unabhängig von der Art der Behandlung konstant zeigt. Im vorliegenden Experiment wurde die gemessene



Expression der Zielsequenzen aller Proben gegenüber drei Housekeepern abgeglichen: HPRT,  $\beta$ -Aktin und 18S. Alle drei sind als Housekeeping Gene beschrieben (108) (109). Die gemessenen Expressionsdaten von Zielsequenzen können hierdurch in einem ersten Schritt auf die Expression von Housekeeping Genen normalisiert werden.

Im vorliegenden Experiment wurde aus den  $C_t$  Werten der drei Housekeeping Gene für jedes Tier ein Housekeeper Index gebildet, welcher sich aus dem geometrischen Mittel der jeweiligen  $C_t$  Werte errechnet. Zur Berechnung der relativen Expression eines Genes wurde

$$\frac{2^{C_t \text{ geometrisches Mittel housekeeper}}}{2^{C_t \text{ untersuchtes Transkript}}}$$

ermittelt, und dies zunächst für jedes Transkript.

Der errechnete Quotient wurde dann für die jeweilige Probe gegenüber der Referenzgruppe, im vorliegenden Fall den Nachkommen der Verpaarung von WT Mutter mit WT Vater, abgeglichen. Hierzu wurde jeder Wert durch den Mittelwert des oben aufgeführten Quotienten der Referenzgruppe dividiert.

Diese Methode kann nur dann zur Anwendung kommen, wenn die Effizienz der Reaktion der untersuchten Transkripte jener der Housekeeping-Gene gleicht.

### 3.8 Statistische Auswertung

Die gemessenen und errechneten Werte sind, sofern nicht abweichend bemerkt, als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm IBM SPSS Statistics, Version 19. Die Ergebnisse wurden mittels Kruskal-Wallis-H Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen getestet. Wenn sich in diesem Test ein signifikanter Unterschied zeigte, wurde auf Unterschiede zwischen den Gruppen mittels Mann-Whitney-U-Test getestet. Hierbei handelt es sich um einen nicht-parametrischen Test, der keine Normalverteilung innerhalb der Stichproben voraussetzt.

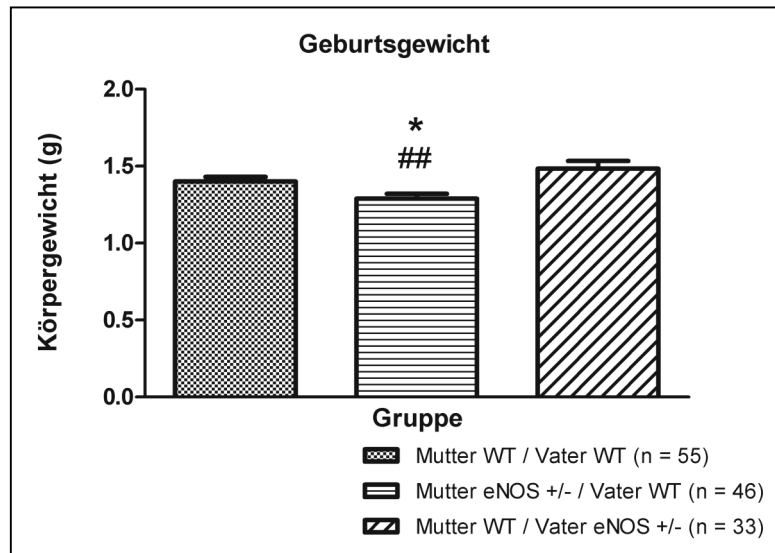
Bei einem p-Wert von kleiner oder gleich 0,05 wurde die Nullhypothese abgelehnt und die Verteilung der beiden Gruppen als unterschiedlich gewertet („signifikanter Unterschied“). Für die Expressionsdaten wurde aufgrund der Vielzahl der untersuchten Gene, und damit der Vielzahl der überprüften Hypothesen, eine Bonferroni-Korrektur vorgenommen und die Nullhypothese bei einem p-Wert von kleiner oder gleich 0,0018 als unterschiedlich zwischen den Gruppen gewertet („signifikanter Unterschied“).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Wachstum der Tiere

#### 4.1.1 Geburtsgewichte der Tiere

Die Körpergewichte bei Geburt von Tieren mit eNOS +/- Müttern waren im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen signifikant geringer (vgl. Abb. 4). Die prozentuale Reduktion des Körpergewichts im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe betrug 8%, und 13% verglichen mit Tieren von eNOS +/- Vätern. Im Mittel ergab sich eine absolute Reduktion des Körpergewichtes um 0,11 g bei Tieren mit eNOS +/- Müttern gegenüber Tieren der Kontrollgruppe, und 0,19 g gegenüber Tieren mit eNOS +/- Vätern.



**Abb. 4:** Körpergewichte bei Geburt der Tiere. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM in Gramm. \*  $p < 0,05$  vs. Mutter WT/Vater WT. ##  $p < 0,01$  vs. Mutter WT/Vater eNOS +/-.

Die geschlechtsspezifische Analyse ergab folgendes Bild (vgl. Abb. 5): Bei männlichen Tieren mit eNOS +/- Müttern zeigte sich eine signifikante Reduktion des Geburtsgewichtes. Die prozentuale Reduktion des Körpergewichts im Vergleich zu männlichen Tieren der Kontrollgruppe betrug 7%, und 17 % verglichen mit Tieren von eNOS +/- Vätern. Im Mittel ergab sich eine absolute Reduktion des Körpergewichtes von 0,095 g bei männlichen Tieren mit eNOS +/- Müttern gegenüber Tieren der Kontrollgruppe, und 0,26 g gegenüber männlichen Tieren mit eNOS +/- Vätern. Bei weiblichen Tieren hingegen fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

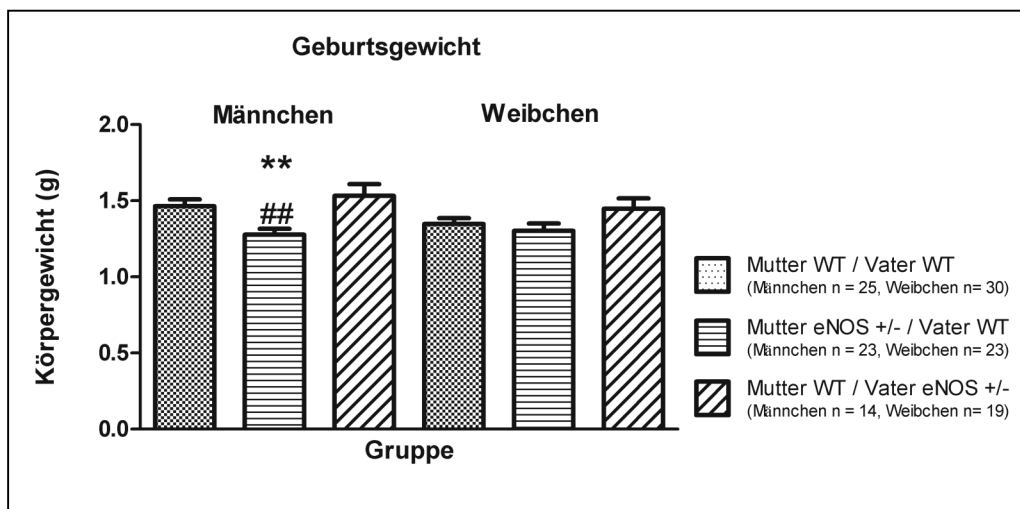


Abb. 5: Körpergewichte weiblicher und männlicher Tiere bei Geburt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM in Gramm. \*\*  $p < 0,01$  vs. Mutter WT/Vater WT. ##  $p < 0,01$  vs. Mutter WT/Vater eNOS +/-.

#### 4.1.2 Körpergewichte während des Versuches

Alle Tiere wurden vom ersten bis 40. Lebenstag täglich, danach vom 42. bis 140. Lebenstag wöchentlich gewogen. Die Gewichtsverläufe der Tiere sind in Abb. 6, Abb. 7 und Abb. 8 dargestellt. Charakteristisch für die Wachstumskurven der Tiere ist das vorübergehende Abflachen der Wachstumskurve zwischen dem 12. und 20. Lebenstag, welches mit dem sog. Weaning zusammenfällt.

Wie in Kap 4.1.1 gezeigt, wurden die Tiere mit eNOS +/- Müttern signifikant leichter als Kontrolltiere geboren. Dieser signifikante Unterschied blieb bis zum zweiten Lebenstag bestehen und verlor am dritten Lebenstag knapp seine Signifikanz ( $p = 0,051$ ). In den folgenden Tagen verloren sich signifikante Unterschiede zwischen den genannten Gruppen, und die Körpergewichte der Tiere mit eNOS +/- Müttern näherten sich jener der Kontrollgruppe an. Zwischen zehntem und elftem Lebenstag kreuzte die Wachstumskurve der Tiere mit eNOS +/- Müttern die der Kontrolltiere. Zwischen 13. und 32. Lebenstag sowie am 34. Lebenstag waren Tiere mit eNOS +/- Müttern dann signifikant schwerer als letztere.

Tiere mit eNOS +/- Vätern stellten bei Geburt, wenn auch nicht signifikant, die Gruppe mit den schwersten Tieren. Am siebten und neunten sowie zwischen dem 11. und 34. Lebenstag waren diese Tiere, verglichen mit Kontrolltieren, signifikant schwerer. Bis zum 98. Lebenstag näherten sich Tiere mit eNOS +/- Vätern zunehmend den Körpergewichten der Tiere der Kontrollgruppe an. Zwischen dem 119. und 126.

Lebenstag kreuzten die Kontrolltiere die Wachstumskurve dieser Gruppe. Tiere mit eNOS +/- Vätern letztere stellten bei Ende der Beobachtung, nicht signifikant, die Gruppe mit den leichtesten Tieren dar.

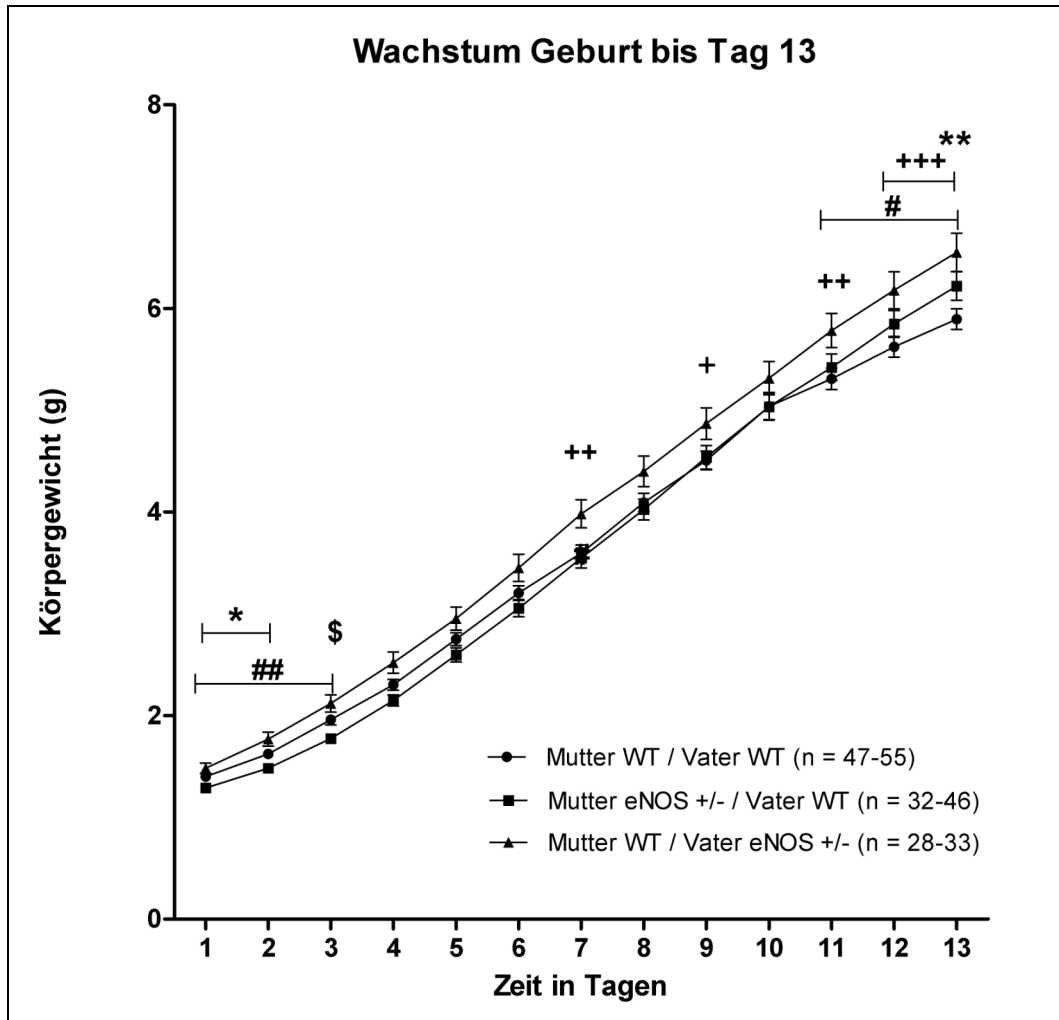
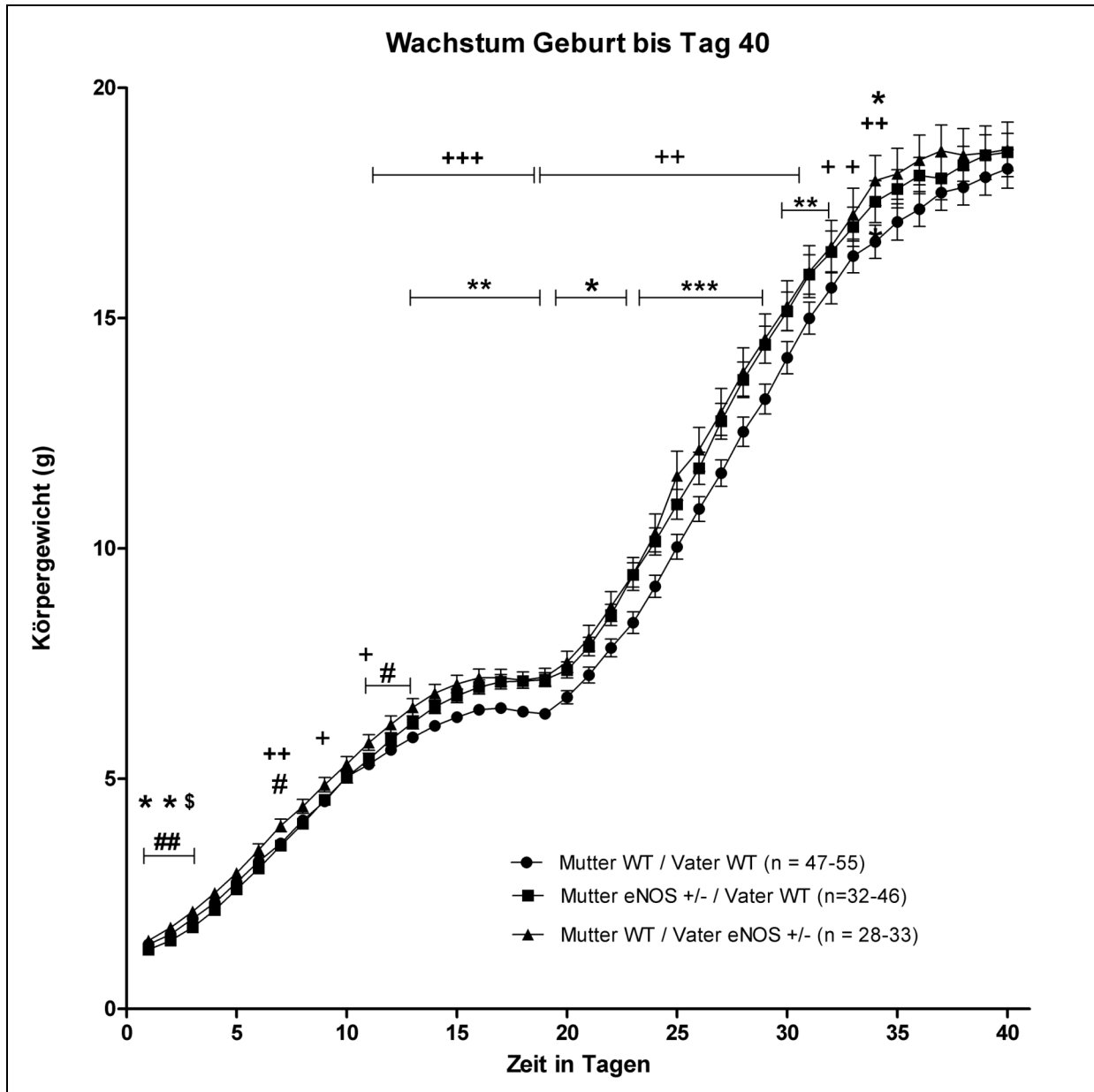


Abb. 6: Körpergewichte der Tiere von Geburt bis Tag 13. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$ SEM in Gramm. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \$  $p = 0,051$  Mutter eNOS +/- /Vater WT vs. Mutter WT/Vater WT. +  $p < 0,05$  ++  $p < 0,01$  +++  $p < 0,001$  Mutter WT/Vater eNOS +/- vs. Mutter WT/Vater WT. #  $p < 0,05$  ##  $p < 0,01$  Mutter eNOS +/- /Vater WT vs. Mutter WT/Vater eNOS +/-.

Zwischen den beiden Gruppen mit eNOS +/- Elterntieren bestanden zwischen erstem und drittem Lebenstag sowie an den Lebenstagen 7, 11, 12 und 13 signifikante Unterschiede. Tiere mit eNOS +/- Müttern waren in diesem Vergleich stets signifikant leichter. Über Tag 40 hinaus zeigten sich zwischen keinen der Gruppen signifikante Unterschiede (vgl. Abb. 8).

Nach geschlechtsspezifischer Analyse ergab sich folgendes Bild: Männliche Tiere mit eNOS +/- Müttern kamen, wie in Kap. 4.1.1 gezeigt, signifikant leichter als männliche Kontrolltiere auf die Welt. Dieser signifikante Unterschied bestand im Prinzip bis zum

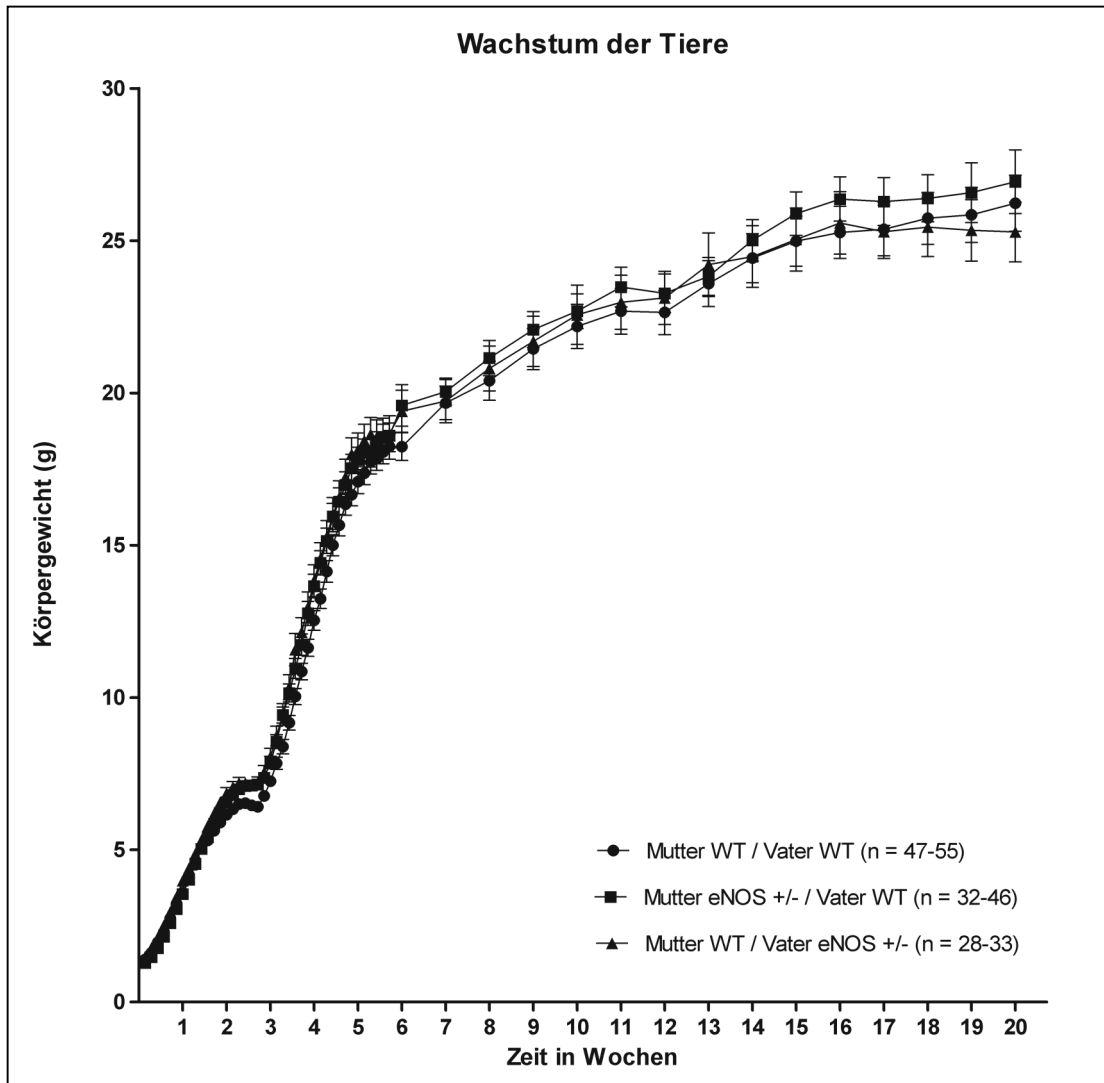
sechsten Lebenstag, wobei am vierten Lebenstag  $p$  mit 0,051 knapp nicht signifikant war. Zwischen 12. und 13. Lebenstag kam es bei männlichen Tieren mit eNOS +/- Müttern zu einer Kreuzung der Wachstumskurve über die Wachstumskurve der Kontrolltiere (vgl. Abb. 9).



**Abb. 7: Körpergewichte der Tiere Geburt bis Tag 40. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM in Gramm. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  Mutter eNOS +/- / Vater WT vs. Mutter WT / Vater WT. +  $p < 0,05$  ++  $p < 0,01$  +++  $p < 0,001$  Mutter WT / Vater eNOS +/- vs. Mutter WT / Vater WT. #  $p < 0,05$  ##  $p < 0,01$  Mutter eNOS +/- / Vater WT vs. Mutter WT / Vater eNOS +/-.**

Zwischen dem 37. und 38. Lebenstag kreuzte die Wachstumskurve dieser Tiere zunächst wieder die Wachstumskurve der Kontrollgruppe und stellte bis Tag 112 die Gruppe mit den leichtesten Tieren dar. Zwischen dem 112. und 119. Lebenstag kam es

zu einer Kreuzung der Wachstumskurve mit der Wachstumskurve der Tiere mit eNOS +/- Vätern. Zwischen dem 133. und 140. Lebenstag kam es zur erneuten Kreuzung der Wachstumskurve der Kontrollgruppe. Am Ende der Beobachtung repräsentierten folglich die männlichen Tiere mit eNOS +/- Müttern die Gruppe mit den schwersten Tieren, wenn auch nicht signifikant (vgl. Abb. 10).

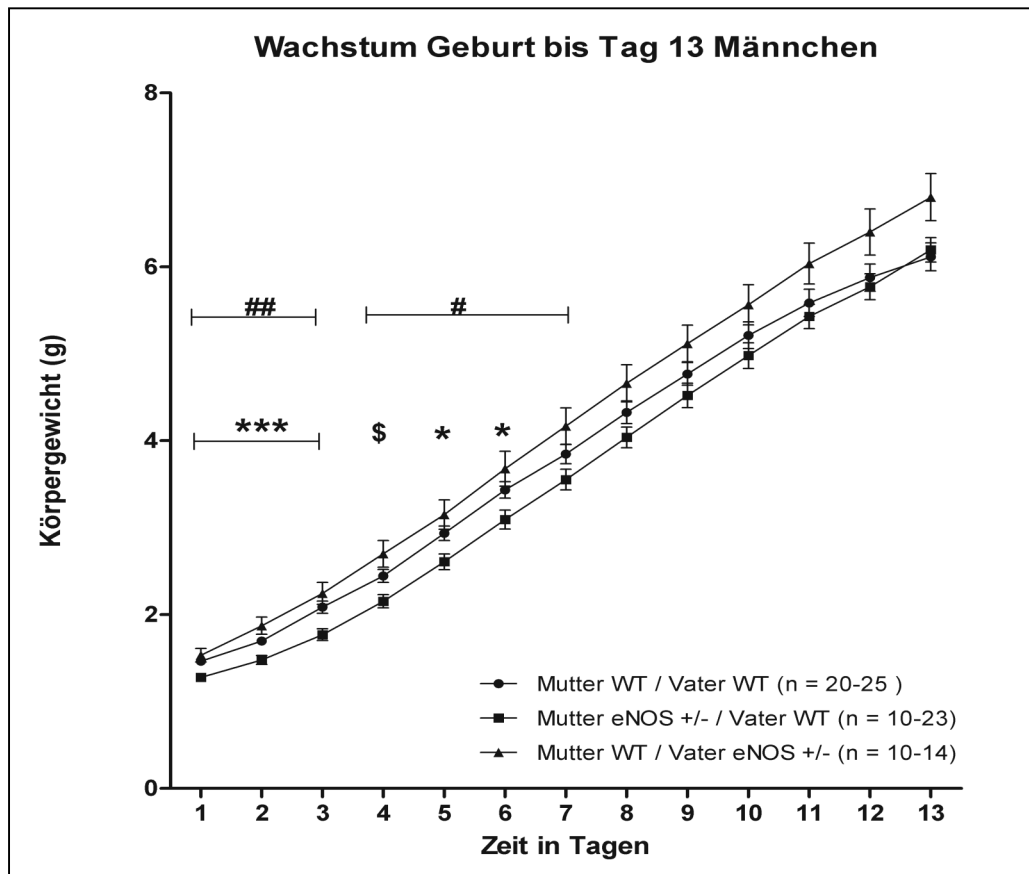


**Abb. 8: Körpergewichte der Tiere im gesamten Beobachtungszeitraum. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM in Gramm.**

Männliche Tiere mit eNOS +/- Vätern stellten von Geburt an, wenn auch nicht statistisch signifikant, die Gruppe mit den schwersten Tieren (vgl. Abb. 9, Abb. 10). Signifikant schwerer als die Kontrollgruppe zeigten sich diese Tiere lediglich am 42. Lebenstag. Bis zum 98. Lebenstag entwickelten sich diese Tiere in etwa gleich wie die Tiere der

Kontrollgruppe und waren dann während der restlichen Beobachtungszeit, wenn auch nicht signifikant, die leichtesten Tiere.

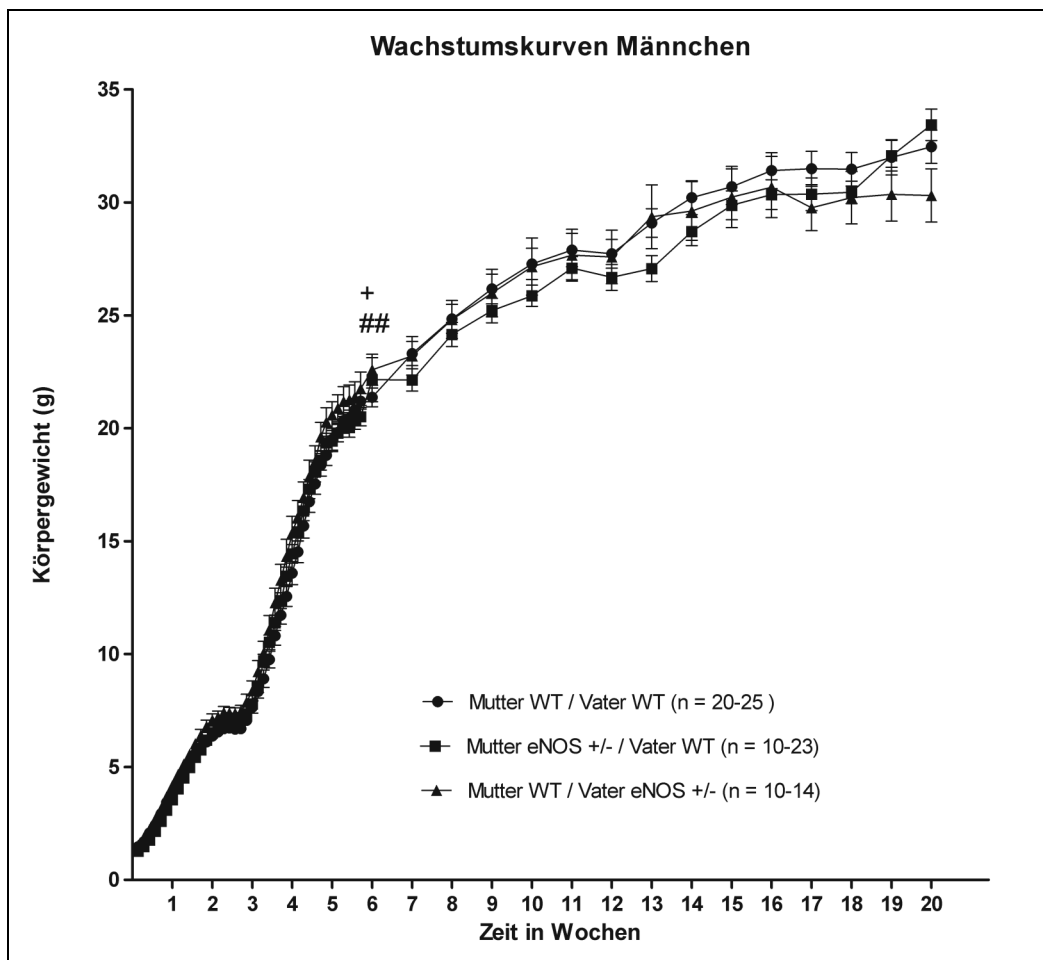
Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen männlicher Tiere mit eNOS +/- Elterntieren bestanden zwischen dem ersten und siebten Lebenstag sowie auch am 42. Lebenstag. Dabei waren Tiere mit eNOS +/- Müttern stets signifikant leichter.



**Abb. 9:** Körpergewichte der männlichen Tiere Geburt bis Tag 13. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM in Gramm. \*  $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,001$  Mutter eNOS +/- / Vater WT vs. Mutter WT / Vater WT. #  $p < 0,05$  ###  $p < 0,001$  Mutter eNOS +/- / Vater WT vs. Mutter WT / Vater eNOS +/- . \$  $p = 0,051$  Mutter eNOS +/- / Vater WT vs. Mutter WT / Vater WT.

Auch weibliche Tiere mit eNOS +/- Müttern waren bei Geburt, wenn auch nicht signifikant, die leichtesten Tiere (vgl. Abb. 5, Abb. 11). Signifikante Gewichtsunterschiede traten erst im späteren Wachstum auf (vgl. Abb. 12). Zwischen sechsten und siebten Lebenstag kam es zur Kreuzung der Wachstumskurve der weiblichen Tiere mit eNOS +/- Müttern über die Wachstumskurve der weiblichen Kontrolltiere. Im weiteren Verlauf - zwischen dem 12. und 31., dem 34. und 37. sowie zwischen 56. und 119. Lebenstag - zeichnete sich diese Gruppe, gegenüber der

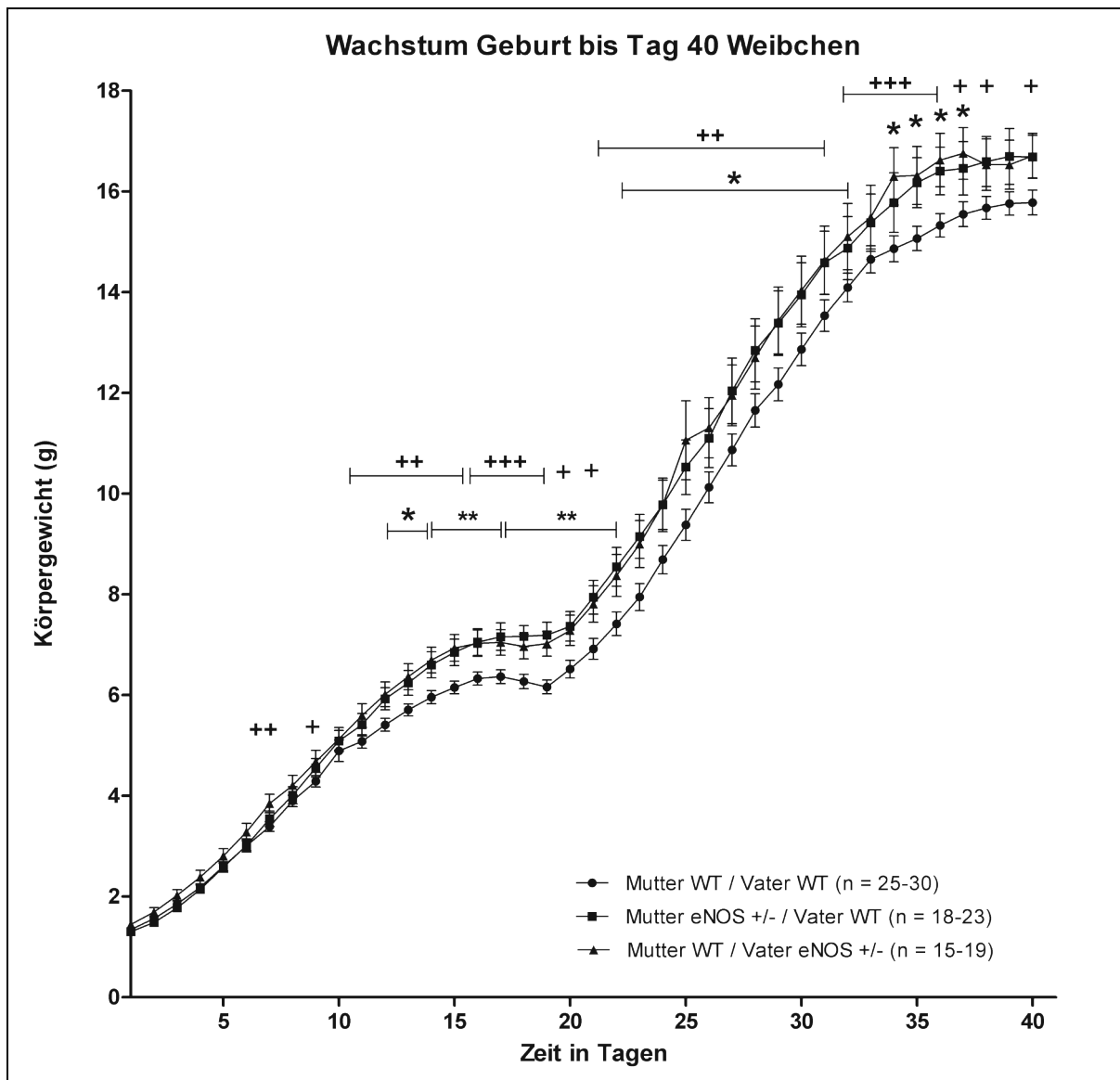
Kontrollgruppe durch signifikant schwerere Tiere aus. Auch am Ende der Beobachtung an Tag 140 waren sie signifikant schwerer als entsprechende Kontrolltiere.



**Abb. 10: Körpergewichte der männlichen Tiere Geburt bis Tag 140. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM in Gramm. +  $p < 0,05$  Mutter WT/Vater eNOS +/- vs. Mutter WT/Vater WT. ##  $p < 0,01$  Mutter eNOS +/-/Vater WT vs. Mutter WT/Vater eNOS +/-.**

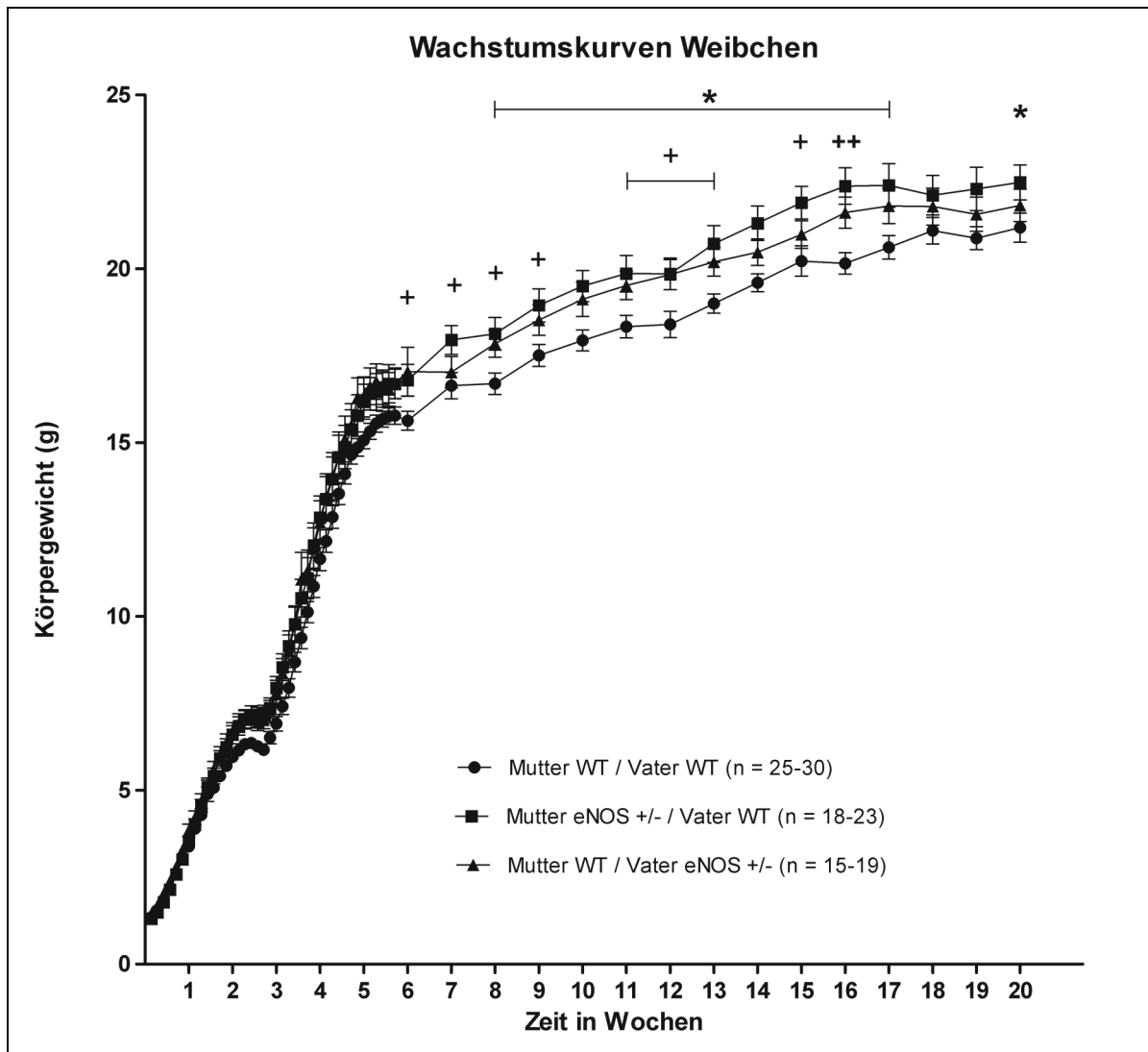
Weibliche Tiere mit eNOS +/- Vätern wiesen von Geburt an die höchsten Körpergewichte auf. Am siebten und neunten sowie zwischen 11. und 38. sowie am 40. Lebenstag waren sie signifikant schwerer gegenüber den Kontrolltieren. Auch zwischen dem 42. und 49. Lebenstag, an den Tagen 56 und 63, zwischen Tag 77 und 91 sowie an den Tagen 105 und 112 hatten Tiere dieser Gruppe signifikante höhere Körpergewichte verglichen mit Kontrolltieren (vgl. Abb. 11, Abb. 12). Zu keinem Zeitpunkt bestanden signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen mit eNOS +/- Elterntieren.





**Abb. 11: Gewichtsverlauf der weiblichen Tiere Geburt bis Tag 40. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM in Gramm. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  Mutter eNOS +/- / Vater WT vs. Mutter WT / Vater WT. +  $p < 0,05$  ++  $p < 0,01$  +++  $p < 0,001$  Mutter WT / Vater eNOS +/- vs. Mutter WT / Vater WT.**

Zusammenfassend ist somit zu bemerken, dass bei Tieren von eNOS +/- Müttern ab dem vierten Lebenstag kein signifikant verringertes Körpergewicht mehr auffiel. Zwischen der zweiten und fünften Lebenswoche (Tag 11 bis 34) waren Tiere mit eNOS +/- Müttern und eNOS +/- Vätern fast durchgehend signifikant schwerer verglichen mit den Kontrolltieren. Über den 40. Lebenstag hinaus bestanden keine Unterschiede. Männliche Nachkommen von eNOS +/- Müttern hatten bis zum sechsten Lebenstag ein gegenüber der Kontrollgruppe verringertes Körpergewicht, wobei sich dieser Unterschied im weiteren Wachstumsverlauf verlor.



**Abb. 12:** Gewichtsverlauf der weiblichen Tiere Geburt bis Tag 140. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM in Gramm. \*  $p < 0,05$  Mutter eNOS +/- / Vater WT vs. Mutter WT / Vater WT. +  $p < 0,05$  ++  $p < 0,01$  Mutter WT / Vater eNOS +/- vs. Mutter WT / Vater WT.

Bei weiblichen Tieren traten signifikante Unterschiede erst ab der zweiten Lebenswoche auf. Nach diesem Zeitpunkt stellten die weiblichen Kontrolltiere - weitestgehend durchgehend - die Gruppe mit signifikant leichteren Tieren dar, und dies gegenüber Tieren sowohl von eNOS +/- Müttern als auch eNOS +/- Vätern.

#### 4.1.3 Körperlänge von Geburt bis zum 13. Lebenstag

Die Längenmessung wurde täglich zwischen dem 1. und 13. Lebenstag durchgeführt. Übereinstimmend mit den obigen Daten zum Gewicht waren Tiere von eNOS +/- Müttern auch jene mit den kürzesten Körperlängen (vgl. Abb. 13). Am ersten und dritten Lebenstag waren ihre Körperlängen signifikant geringer gegenüber den Kontrolltieren. Zwischen dem ersten und dritten, als auch zwischen dem sechsten und achten Lebenstag, sowie an den Lebenstagen elf und zwölf zeigten sie sich ebenfalls signifikant kürzer als Tiere mit eNOS +/- Vätern. Letztere wiesen während des gesamten Beobachtungszeitraumes, ähnlich der Körpergewichte, die längsten Körper auf. Dieser Unterschied war signifikant gegenüber den Kontrolltieren an den Lebenstagen zwei, sechs, acht, elf und zwölf.

Bei geschlechtsspezifischer Analyse ergab sich folgendes Bild: Männliche Tiere mit eNOS +/- Müttern waren am ersten Lebenstag sowie zwischen den Tagen drei bis zwölf gegenüber den Kontrolltiere signifikant kürzer, wie auch diese Tiere die niedrigsten Körpergewichte aufwiesen (vgl. Abb. 14). Nachkommen von eNOS +/- Vätern waren während des gesamten Beobachtungszeitraumes die längsten Tiere, wobei sich ihre Körperlängen gegenüber den Kontrolltieren nur an Tag zwei und elf signifikant unterschieden. Verglich man beide Gruppen männliche Tiere mit eNOS +/- Eltern miteinander, zeigten sich zwischen ersten und zwölften Lebenstag signifikante Unterschiede, wobei Tiere mit eNOS +/- Müttern stets kürzer waren.

Weibliche Tiere mit eNOS +/- eNOS Müttern waren bei Geburt die kürzesten Tiere und wuchsen annähernd gleichförmig mit der Kontrollgruppe (vgl. Abb. 15). Ähnlich der Entwicklung der Körpergewichte kam es zwischen Tag neun und zehn zu einer deutlichen Längenzunahme gegenüber den Kontrolltieren, welche sich an Tag zehn durch signifikant längere Körper widerspiegelte. Weibliche Tiere mit eNOS +/- Vätern hingegen zeigten durchweg, bis einschließlich Tag zwölf, die längsten Körper - und diese Tiere waren auch durchweg die schwersten. Dies war signifikant verschieden verglichen mit den Kontrolltieren an den Tagen eins, zwei, sechs und zwölf. Weibliche Tiere der beiden Gruppen mit eNOS +/- Elterntieren unterschieden sich voneinander signifikant an den Tagen eins und drei, wobei Tiere mit eNOS +/- Müttern in diesem Vergleich stets signifikant kürzer waren.

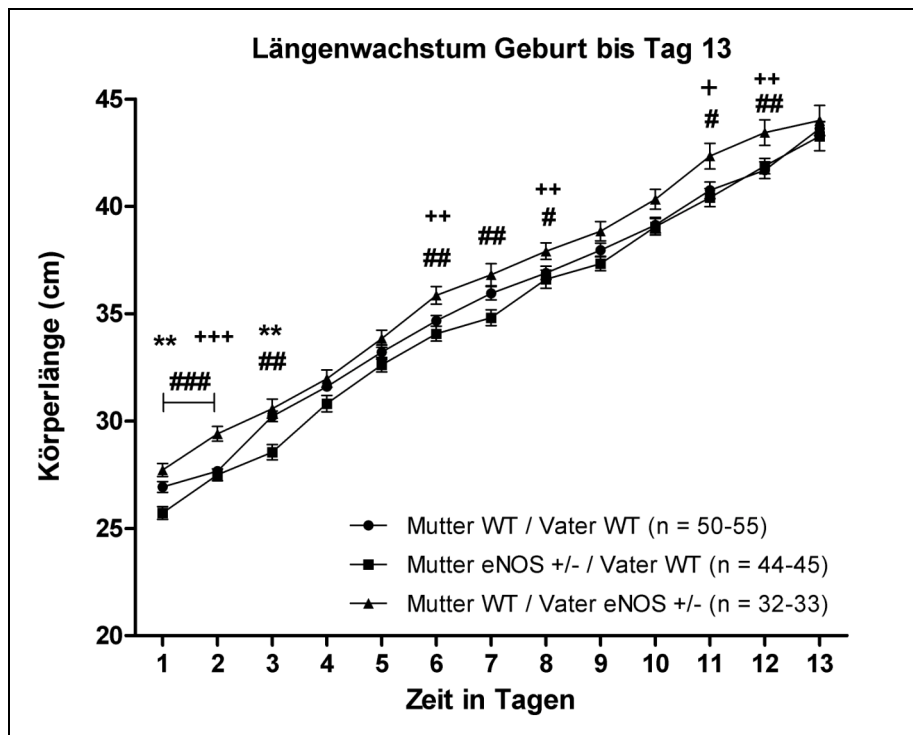


Abb. 13: Körperlänge aller Tiere Geburt bis Tag 13. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM in cm. \*\*  $p < 0,01$  Mutter eNOS +/- / Vater WT vs. Mutter WT / Vater WT. +  $p < 0,05$  ++  $p < 0,01$  +++  $p < 0,001$  Mutter WT / Vater eNOS +/- vs. Mutter WT / Vater WT. #  $p < 0,05$  ##  $p < 0,01$  ###  $p < 0,001$  Mutter eNOS +/- / Vater WT vs. Mutter WT / Vater eNOS +/-.

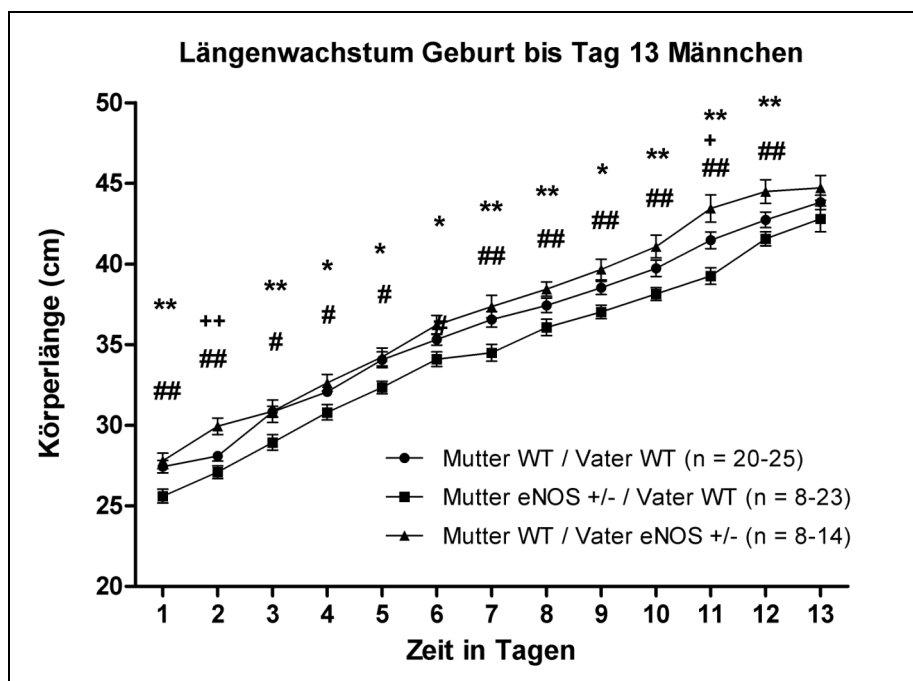


Abb. 14: Körperlänge männlicher Tiere Geburt bis Tag 13. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM in cm. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  Mutter eNOS +/- / Vater WT vs. Mutter WT / Vater WT. +  $p < 0,05$  ++  $p < 0,01$  Mutter WT / Vater eNOS +/- vs. Mutter WT / Vater WT. #  $p < 0,05$  ##  $p < 0,01$  Mutter eNOS +/- / Vater WT vs. Mutter WT / Vater eNOS +/-.

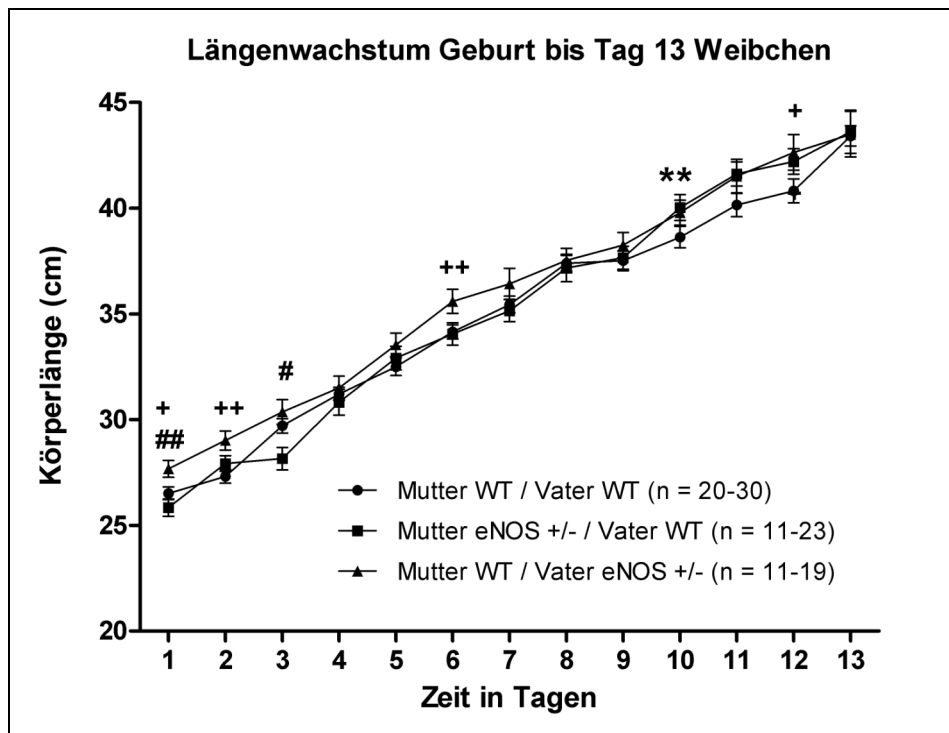


Abb. 15: Körperlänge weiblicher Tiere Geburt bis Tag 13. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM in cm. \*\*  $p < 0,01$  Mutter eNOS +/- / Vater WT vs. Mutter WT / Vater WT. +  $p < 0,05$  ++  $p < 0,01$  Mutter WT / Vater eNOS +/- vs. Mutter WT / Vater WT. #  $p < 0,05$  ##  $p < 0,01$  Mutter eNOS +/- / Vater WT vs. Mutter WT / Vater eNOS +/-.

#### 4.2 Absolute und relative Organgewichte

Weibliche Tiere mit eNOS +/- Müttern hatten signifikant schwerere Lebern als weibliche Tiere der Kontrollgruppe (vgl. Abb. 16). Darüber hinaus fanden sich hinsichtlich der absoluten Lebergewichte keine signifikanten Unterschiede. Die relativen Lebergewichte unterschieden sich nicht signifikant zwischen den verschiedenen Gruppen, auch nicht bei geschlechtsspezifischer Analyse (vgl. Tab. 10). Alle weiteren Organgewichte und Unterschiede zwischen den Gruppen sind in Tab. 12 aufgeführt.

	Mutter WT Vater WT			Mutter eNOS +/- Vater WT			Mutter WT Vater eNOS +/-		
	Alle	M	W	Alle	M	W	Alle	M	W
Relatives Lebergewicht (in %)	4,31 $\pm 0,06$	4,56 $\pm 0,07$	4,11 $\pm 0,08$	4,44 $\pm 0,06$	4,62 $\pm 0,09$	4,24 $\pm 0,05$	4,32 $\pm 0,01$	4,44 $\pm 0,09$	4,24 $\pm 0,15$

Tab. 10: Relatives Lebergewicht  $\pm$  SEM in Prozent des Körpergewichtes. M: Männchen; W: Weibchen.

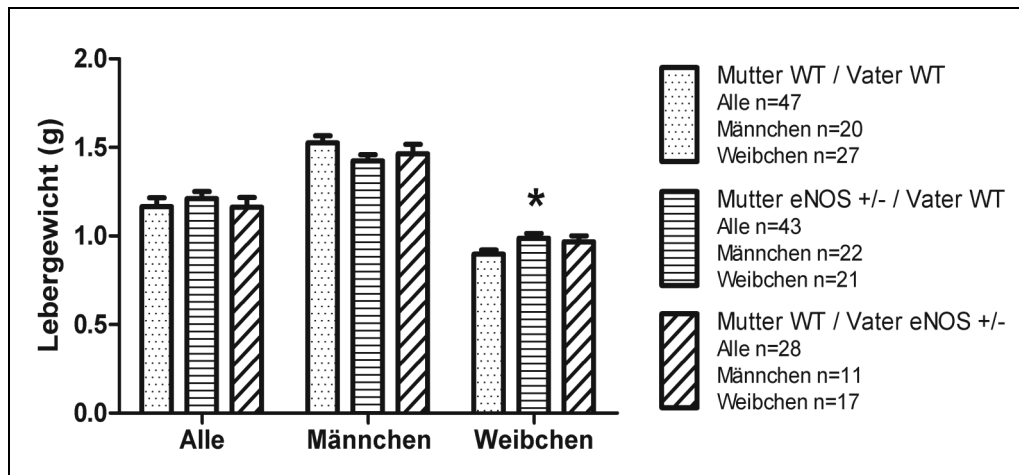


Abb. 16: Absolutes Lebergewicht. Mittelwerte  $\pm$  SEM in Gramm. \* $p < 0,05$  vs. Mutter WT/Vater WT.

### 4.3 Parameter zur allgemeinen phänotypischen Charakterisierung der Tiere

#### 4.3.1 Blutdruckwerte

Weibliche Tiere mit eNOS +/- Müttern sowie eNOS +/- Vätern hatten in Woche 10 einen gegenüber der weiblichen Kontrollgruppe signifikant niedrigeren systolischen Blutdruck (vgl. Tab. 11). In Versuchswoche 19 fanden sich keine signifikanten Unterschiede. In Versuchswoche 24 zeigten Tiere mit eNOS +/- Vätern einen gegenüber Tieren mit eNOS +/- Müttern, aber nicht gegenüber Kontrolltieren, signifikant höheren Blutdruck.

		Systolischer Blutdruck (mmHg) Woche 10	Systolischer Blutdruck (mmHg) Woche 19	Systolischer Blutdruck (mmHg) Woche 24
Mutter WT/ Vater WT	Alle	103,57 $\pm$ 3,11 (n=54)	100,99 $\pm$ 2,54(n=39)	100,90 $\pm$ 1,96 (n=51)
	M	92,80 $\pm$ 4,17 (n=25)	91,73 $\pm$ 2,56 (n=18)	95,64 $\pm$ 2,89 (n=25)
	W	112,86 $\pm$ 3,82 (n=29)	109,03 $\pm$ 2,67 (n=20)	105,96 $\pm$ 2,29 (n=26)
Mutter eNOS +/-/ Vater WT	Alle	98,74 $\pm$ 2,46 (n=49)	97,66 $\pm$ 3,28 (n=38)	100,22 $\pm$ 2,25 (n=43) #
	M	97,13 $\pm$ 2,92 (n=24)	90,39 $\pm$ 4,32 (n=19)	95,16 $\pm$ 3,31 (n=21)
	W	98,65 $\pm$ 3,75 (n=24) *	104,94 $\pm$ 4,45 (n=19)	105,06 $\pm$ 2,75 (n=22)
Mutter WT / Vater eNOS +/-	Alle	97,301 $\pm$ 2,45(n=32)	102,63 $\pm$ 2,38 (n=28)	106,32 $\pm$ 1,92 (n=28)
	M	93,76 $\pm$ 4,38 (n=12)	99,70 $\pm$ 3,30 (n=10)	99,81 $\pm$ 1,55 (n=10)
	W	100,87 $\pm$ 2,64 (n=19) *	104,46 $\pm$ 3,27 (n=16)	109,94 $\pm$ 2,50 (n=18)

Tab. 11: Systolischer Blutdruck in Versuchswoche 10, 19 und 24. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM in mmHg. \*  $p < 0,05$  vs. Mutter WT/Vater WT. #  $p < 0,05$  Mutter eNOS+/-/Vater WT vs. Mutter WT/Vater eNOS +/- . M: Männchen; W: Weibchen

	Milz		Niere li		Niere re		Lunge		Herz	
	Absolut	Relativ	Absolut	Relativ	Absolut	Relativ	Absolut	Relativ	Absolut	Relativ
<b>Mutter WT</b>										
Alle n=47-49	0,09 ±0,00	0,36 ±0,02	0,16 ±0,01	0,58 ±0,01	0,16 ±0,01	0,60 ±0,01	0,15 ±0,00	0,57 ±0,01	0,14 ±0,00	0,51 ±0,01
<b>Vater WT</b>										
M n=20-22	0,10 ±0,00	0,30 ±0,02	0,20 ±0,01	0,60 ±0,02	0,21 ±0,01	0,62 ±0,02	0,17 ±0,00	0,51 ±0,02	0,17 ±0,00	0,50 ±0,02
W n=26-28	0,09 ±0,01	0,40 ±0,03	0,12 ±0,00	0,56 ±0,01	0,13 ±0,00	0,59 ±0,01	0,13± 0,00	0,61 ±0,02	0,11 ±0,00	0,51 ±0,01
<b>Mutter eNOS +/-</b>										
Alle n=33-36	0,09 ±0,00	0,34 ±0,02	0,17 ±0,00	0,65 ±0,02 **	0,17 ±0,01	0,65 ±0,02	0,15± 0,00	0,58 ±0,02	0,15 ±0,01	0,55 ±0,01 *
M n=19-20	0,09 ±0,00	0,30 ±0,02	0,20 ±0,01	0,68 ±0,02 **	0,21 ±0,01	0,71 ±0,03 **	0,16± 0,01	0,53 ±0,02	0,18 ±0,01	0,58 ±0,02 *
<b>Vater WT</b>										
W n=15-19	0,09 ±0,00	0,37 ±0,02	0,14 ±0,01	0,62 ±0,04	0,14 ±0,00	0,58 ±0,01	0,14± 0,00	0,63 ±0,03	0,12 ±0,00 *	0,53 ±0,02
<b>Mutter WT</b>										
Alle n=26-28	0,09 ±0,01	0,36 ±0,02	0,16 ±0,01	0,59 ±0,01	0,16 ±0,01	0,62 ±0,01	0,15 ±0,01	0,59 ±0,02	0,13 ±0,01	0,49 ±0,01
<b>Vater eNOS +/-</b>										
M n=10-11	0,10 ±0,02	0,31 ±0,06	0,21 ±0,01	0,64 ±0,02	0,21 ±0,01	0,65 ±0,02	0,17 ±0,01	0,52 ±0,03	0,16 ±0,00	0,49 ±0,02
W n=15-17	0,09 ±0,00	0,39 ±0,02	0,13 ±0,00	0,57 ±0,02	0,14 ±0,00	0,59 ±0,02	0,14 ±0,01	0,63 ±0,03	0,11 ±0,00	0,49 ±0,02

Tab. 12: Relative und absolute Organgewichte. Absolute Organgewichte ± SEM in Gramm. Relative Organgewichte ± SEM in Prozent des Körpergewichtes. \* p<0,05 \*\* p<0,01 vs. Mutter WT/Vater WT. M: Männchen; W: Weibchen.

### 4.3.2 Parameter der Nierenfunktion

Weder in Woche 12 noch in Woche 23 zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich GFR und Kreatinin im 24-Stunden-Urin (vgl. Tab. 13 und Tab. 14). Lediglich in Woche 23 hatten Tiere mit eNOS +/- Müttern einen signifikant niedrigeren Plasmakreatininwert im Vergleich zur Kontrollgruppe.

		Kreatinin im 24-h-Urin (mg/24h)	Kreatinin im Plasma (mg/dl)	GFR (ml/min)
Mutter WT Vater WT	Alle (n=35-55)	0,20±0,03	0,60±0,02	0,03±0,00
	Männchen (n=19-25)	0,27±0,04	0,63±0,03	0,04±0,00
	Weibchen (n=16-30)	0,16±0,03	0,57±0,02	0,03±0,00
Mutter eNOS +/- Vater WT	Alle (n=20-48)	0,17±0,03	0,65±0,04	0,02±0,00
	Männchen (n=10-29)	0,15±0,04	0,67±0,06	0,02±0,00
	Weibchen (n=19-24)	0,19±0,03	0,63±0,05	0,03±0,00
Mutter WT Vater eNOS +/-	Alle (n=19-33)	0,17±0,03	0,61±0,04	0,03±0,00
	Männchen (n=7-12)	0,25±0,07	0,62±0,03	0,05±0,00
	Weibchen (n=13-21)	0,12±0,03	0,59±0,05	0,02±0,00

Tab. 13: GFR, Kreatinin im 24-h-Urin sowie Plasmakreatinin des Stoffwechselfersuches in Woche 12. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

		Kreatinin im 24-h-Urin (mg/24h)	Kreatinin im Plasma (mg/dl)	GFR (ml/min)
Mutter WT Vater WT	Alle (n=37-55)	0,24±0,03	0,59±0,02	0,04±0,00
	Männchen (n=16-25)	0,28±0,05	0,55±0,02	0,05±0,01
	Weibchen (n=21-30)	0,21±0,03	0,64±0,03	0,03±0,00
Mutter eNOS +/- Vater WT	Alle (n=36-48)	0,27±0,03	0,49±0,02 **	0,05±0,01
	Männchen (n=18-24)	0,27±0,04	0,47±0,03	0,05±0,01
	Weibchen (n=17-24)	0,27±0,04	0,50±0,02	0,05±0,01
Mutter WT Vater eNOS +/-	Alle (n=21-33)	0,29±0,04	0,53±0,01	0,05±0,01
	Männchen (n=8-18)	0,31±0,08	0,47±0,03	0,05±0,01
	Weibchen (n=15-21)	0,28±0,05	0,53±0,02	0,05±0,01

Tab. 14: GFR, Kreatinin im 24-h-Urin sowie Plasmakreatinin des Stoffwechselfersuches in Woche 23. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. \*\* p<0,01 vs. Mutter WT/Vater WT.



#### 4.4 Parameter zur Charakterisierung des Glukosestoffwechsels der Tiere

##### 4.4.1 Plasmaglukosekonzentrationen der nüchternen Tiere

Blutentnahmen bei nüchternen Tieren zur Glukosebestimmung fanden in den Versuchswochen 13, 17 und 21 statt. In Woche 13 und 17 fanden sich keine signifikante Unterschiede (vgl. Tab. 15).

		Nüchternglukose Woche 13 (mg/dl)	Nüchternglukose Woche 17 (mg/dl)
Mutter WT Vater WT	Alle	77,41±3,10 (n=52)	83,20±2,91 (n=47)
	Männchen	81,17±4,83 (n=22)	88,06±5,36 (n=21)
	Weibchen	74,66±4,04 (n=30)	79,27±2,86 (n=26)
Mutter eNOS +/- Vater WT	Alle	71,35±2,15 (n=47)	76,98±3,36 (n=39)
	Männchen	72,97±3,28 (n=24)	84,36±4,92 (n=20)
	Weibchen	69,66±2,80 (n=23)	69,20±3,95 (n=19)
Mutter WT Vater eNOS +/-	Alle	71,71±2,22 (n=36)	79,14±3,4 (n=30)
	Männchen	75,96±3,65 (n=13)	72,86±5,31 (n=10)
	Weibchen	69,31±2,72 (n=23)	82,28±4,38 (n=20)

**Tab. 15: Plasmaglukosekonzentrationen nüchterner Tiere in Woche 13 und 17. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM in mg/dl.**

In Woche 21 hatten die Tiere mit eNOS +/- Vätern signifikant höhere Nüchternglukosewerte im Vergleich zur Kontrollgruppe und zu den Tieren mit eNOS +/- Müttern (vgl. Abb. 17). Die beschriebenen signifikanten Unterschiede bestanden auch in der Subgruppe der weiblichen Tieren (vgl. Abb. 17). Bei männlichen Tiere hingegen deutete sich lediglich eine Tendenz zu höheren Nüchternglukosekonzentrationen bei der Gruppe mit eNOS +/- Vätern an.

Tiere mit eNOS +/- Müttern zeigten gegenüber der Kontrollgruppe signifikant verringerte Nüchternglukosewerte (vgl. Abb. 17). Dieser Unterschied deutete sich in der geschlechtsspezifischen Analyse bei weiblichen Tieren dieser Gruppe an, allerdings ohne statistische Signifikanz zu erreichen.

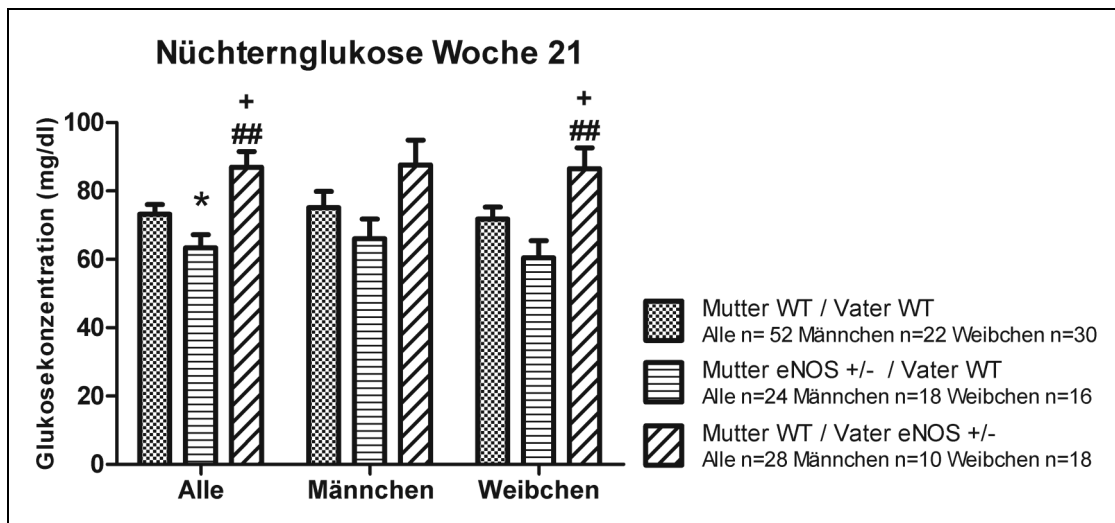


Abb. 17: Plasmaglukosekonzentrationen der nüchternen Tiere in Versuchswoche 21. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM in mg/dl. \*  $p < 0,05$  vs. Mutter WT/Vater WT. +  $p < 0,05$  vs. Mutter WT/Vater WT. ##  $p < 0,01$  vs. Mutter eNOS +/-/Vater WT.

#### 4.4.2 Plasmainsulinkonzentrationen der nüchternen Tiere

Insulinkonzentrationen wurden aus Nüchternplasmen in Versuchswoche 17 und 21 bestimmt. In Versuchswoche 17 zeigten sich signifikante Unterschiede nur bei männlichen Tieren (vgl. Abb. 18). Männliche Tiere mit eNOS +/- Vätern hatten verglichen mit Kontrolltieren und Tieren mit eNOS +/- Müttern signifikant höhere Plasmainsulinkonzentration.

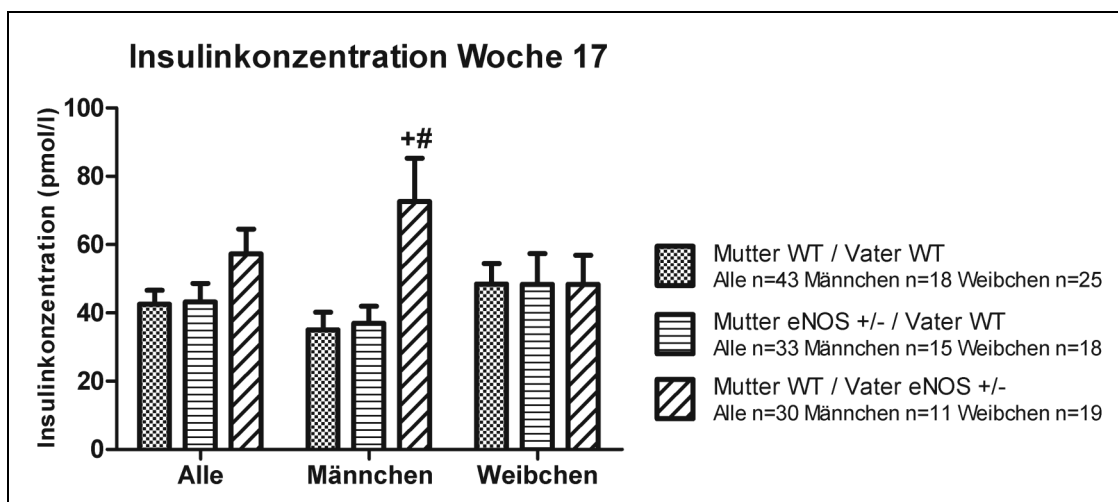


Abb. 18: Nüchterninsulinkonzentration in Versuchswoche 17. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM in pmol/l. +  $p < 0,05$  vs. Mutter WT/Vater WT. #  $p < 0,05$  vs. Mutter eNOS +/-/Vater WT.

In Woche 21 zeigten Tiere mit eNOS +/- Müttern eine geringere Plasmainsulinkonzentration, wobei dies nur signifikant gegenüber Tieren mit eNOS +/- Vätern war (vgl. Abb. 19). Gegenüber den Kontrolltieren zeigte sich diesbezüglich ebenfalls ein starker Trend mit  $p=0,054$ . Bei geschlechtsspezifischer Betrachtung ergab sich Folgendes: Männliche Tiere mit eNOS +/- Müttern hatten ebenfalls gegenüber Kontrolltieren und Tieren mit eNOS +/- Vätern eine signifikant geringere Plasmainsulinkonzentration. Bei weiblichen Tieren hingegen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Insgesamt deutete sich bei den Nüchterninsulinkonzentration ein Trend zu den höchsten Konzentrationen bei männlichen Tieren mit eNOS +/- Vätern an. Ein vergleichbares Bild boten auch die Ergebnisse des ipGTT (vgl. Abb. 20, Abb. 21).

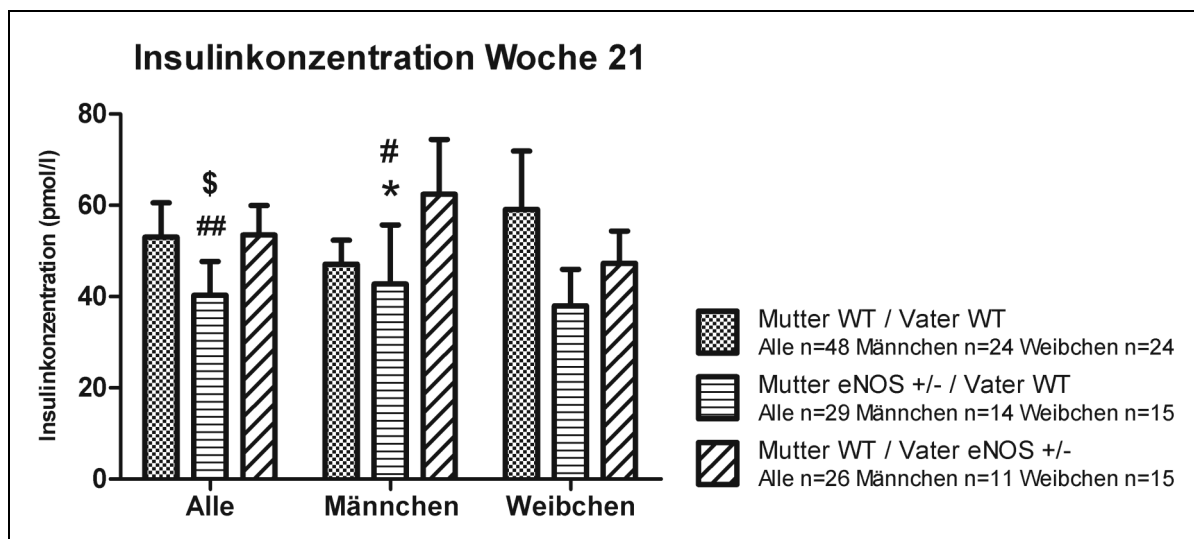


Abb. 19: Nüchterninsulinkonzentration in Versuchswoche 21. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM in pmol/l. \*  $p<0,05$  vs. Mutter WT/Vater WT. #  $p<0,05$  ##  $p<0,01$  vs. Mutter WT/Vater eNOS +/- . \$  $p=0,054$  vs. Mutter WT/Vater WT.

#### 4.4.3 Glukosesensitivitätsindices

##### 4.4.3.1 HOMA Index

In Versuchswoche 17 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des HOMA Index (vgl. Tab. 16). In Versuchswoche 21 ergab sich bei den Tieren mit eNOS +/- Müttern ein gegenüber den Kontrolltieren signifikant niedriger HOMA Index (vgl. Tab. 16). Dieses Ergebnis zeigte sich bei geschlechtsspezifischer Betrachtung auch bei männlichen Tieren. In beiden Fällen unterschieden sich der HOMA Index signifikant auch von den Tieren mit eNOS +/- Vätern. Die höchsten Indices zeigten sich in der

Gruppe mit Tieren von eNOS +/- Vätern, wobei dies in der geschlechtsspezifischen Analyse bei weiblichen Tieren nicht so ausgeprägt war.

#### 4.4.3.2 QUICKI Index

In Versuchswoche 17 und 21 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des QUICKI Index. Zur Übersicht vgl. Tab. 16.

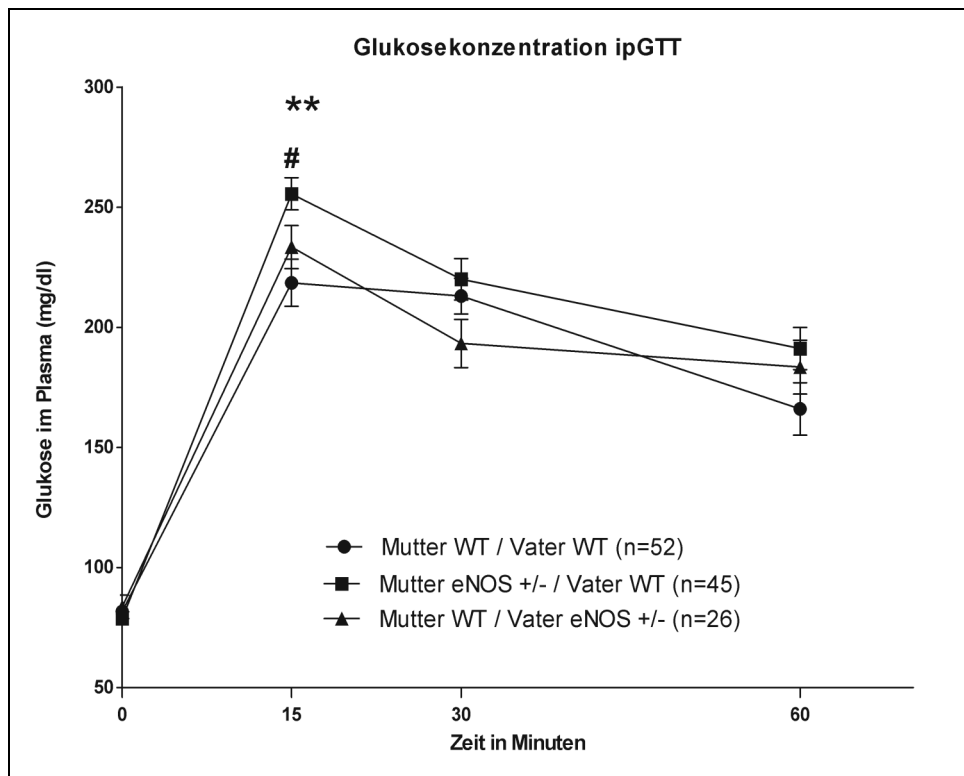
		HOMA Woche 17	HOMA Woche 21	QUICKI Woche 17	QUICKI Woche 21
Mutter WT Vater WT	Alle (n=43-49)	1,18±0,13	1,54±0,24	0,38±0,01	0,39±0,01
	M (n=18-24)	0,86±0,10	1,16±0,16	0,39±0,01	0,39±0,01
	W (n=25-27)	1,37±0,18	1,63±0,40	0,38±0,01	0,43±0,04
Mutter eNOS +/- Vater WT	Alle (n=28-34)	1,13±0,15	1,03±0,27*##	0,40±0,01	0,42±0,01
	M (n=15-16)	1,06±0,15	0,64±0,15*#	0,39±0,01	0,45±0,04
	W (n=14-18)	1,35±0,29	0,79±0,17	0,40±0,02	0,41±0,01
Mutter WT Vater eNOS +/-	Alle (n=27-30)	1,57±0,23	1,75±0,30	0,37±0,01	0,37±0,01
	M (n=10-12)	1,87±0,39	1,70±0,38	0,36±0,01	0,36±0,02
	W (n=16-18)	0,93±0,16	1,41±0,22	0,39±0,01	0,38±0,01

Tab. 16: HOMA und QUICKI Indices Woche 17 und 21. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  vs. Mutter WT/Vater WT. #  $p < 0,05$  ##  $p < 0,01$  vs. Mutter WT/Vater eNOS +/- . M: Männchen; W: Weibchen.

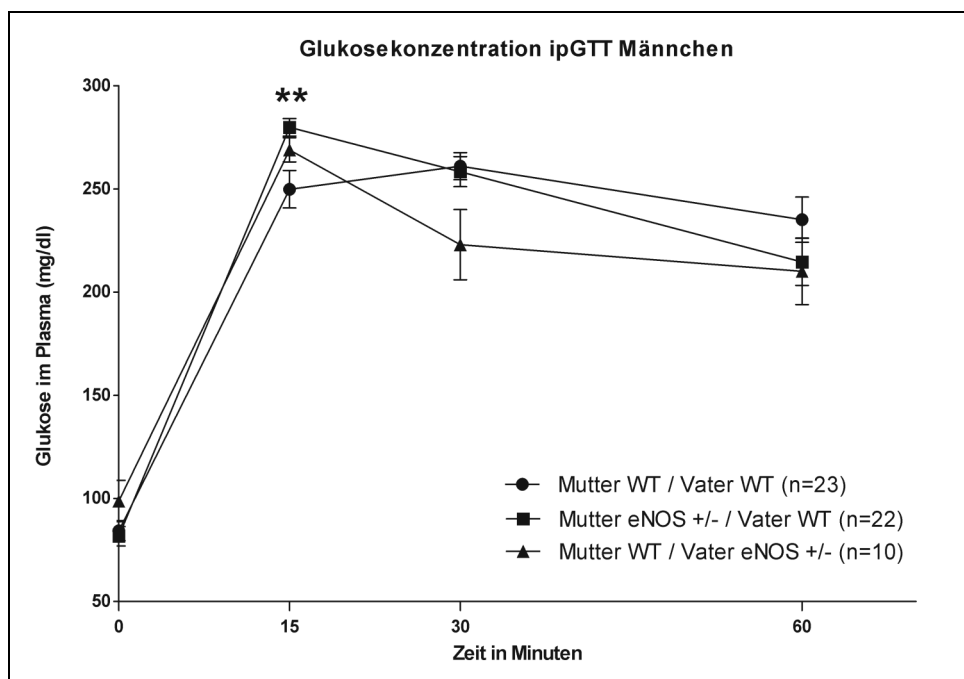
#### 4.4.4 Intraperitonealer Glukosetoleranztest

##### 4.4.4.1 Plasmaglukosekonzentrationen während des intraperitonealen Glukosetoleranztests

In Versuchswoche 24 wurde ein ipGTT durchgeführt (vgl. Kap. 3.6.2.). Signifikante Unterschiede der Plasmaglukosekonzentrationen zu den verschiedenen Zeitpunkten des ipGTT fanden sich lediglich 15 min nach Beginn der Glukosebelastung. Tiere mit eNOS +/- Müttern zeigten gegenüber den Kontrolltieren und den Tieren mit eNOS +/- Vätern signifikant höhere Glukosekonzentrationen (vgl. Abb. 20). Die geschlechtsspezifische Analyse zeigte, dass männliche Tiere mit eNOS +/- Müttern nach 15 min eine gegenüber den Kontrolltieren signifikant höhere Plasmaglukosekonzentration aufwiesen (vgl. Abb. 21). Bei weiblichen Tieren fanden sich keine signifikanten Unterschiede (vgl. Abb. 22).



**Abb. 20:** Plasmaglukosekonzentrationen während des ipGTT. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM in mg/dl. \*\*  $p < 0,01$  Mutter eNOS +/- / Vater WT vs. Mutter WT / Vater WT. #  $p < 0,05$  Mutter eNOS +/- / Vater WT vs. Mutter WT / Vater eNOS +/-.



**Abb. 21:** Plasmaglukosekonzentrationen männlicher Tiere während des ipGTT. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM in mg/dl. \*\*  $p < 0,01$  Mutter eNOS +/- / Vater WT vs. Mutter WT / Vater WT.

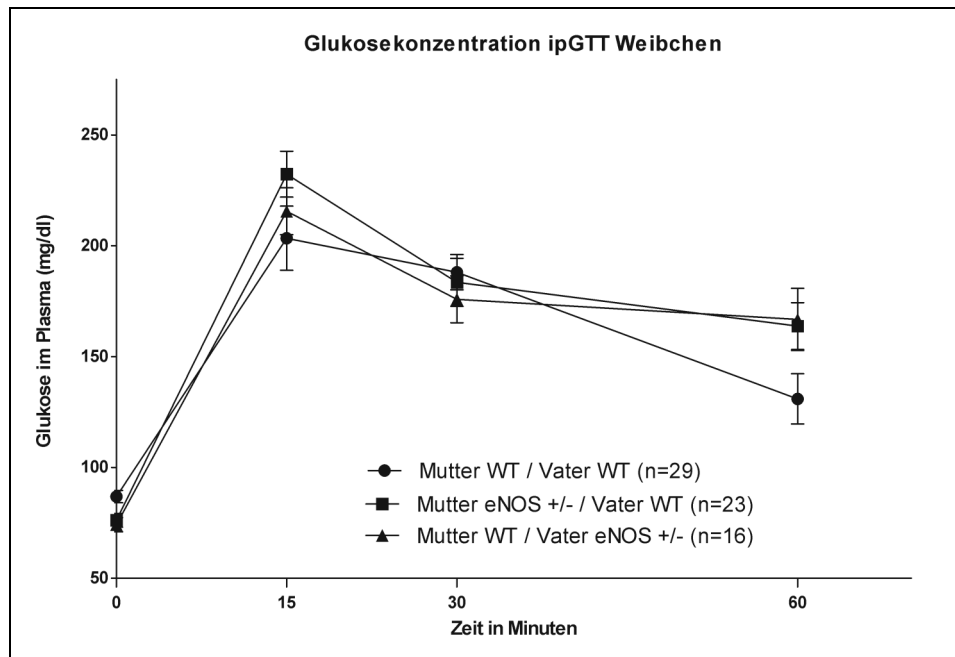


Abb. 22: Plasmaglukosekonzentrationen weiblicher Tiere während des ipGTT. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM in mg/dl.

#### 4.4.4.2 Area under the curve für Glukose im ipGTT

Aus den Glukosekonzentrationen zu den einzelnen Messpunkten wurde die AUC für Glukose während des ipGTT berechnet (vgl. Tab. 17, Abb. 20, Abb. 21, Abb. 22, Kap. 3.6.2). Tiere mit eNOS +/- Müttern wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe und zu den Tieren mit eNOS +/- Vätern eine signifikant höhere AUC für Glukose auf. In der geschlechtsspezifischen Analyse zeigte sich dieser Unterschied auch bei weiblichen Tieren. Bei männlichen Tieren hingegen bestanden keine signifikanten Unterschiede. Darüber hinaus wurde, zur Abschätzung der schnellen Insulinantwort auf die Glukosebelastung, die AUC von Glukose von Beginn bis nach 15 min des ipGTT errechnet und zwischen den Gruppen verglichen. Bei diesem Vergleich zeichneten sich wiederum Tiere mit eNOS +/- Müttern durch eine signifikant größere AUC gegenüber der Kontrollgruppe aus. Signifikante geschlechtsspezifische Unterschiede fanden sich nicht.

		AUC Glukose 0-15 min	AUC Glukose gesamt
Mutter WT	Alle (n=50)	2246,81±79,17	10747,36±457,24
	M (n=21)	2453,15±103,23	12490,69±643,38
Vater WT	W (n=29)	2147,73±100,48	9468,92±533,16
Mutter eNOS +/-	Alle (n=38)	2516,61±53,78 **	12458,58±356,42*#
	M (n=18)	2725,14±33,87	13886,29±247,10
Vater WT	W (n=20)	2337,49±89,30 *	10328,35±564,97
Mutter WT	Alle (n=24)	2399,91±85,02	10977,29±559,26
	M (n=9)	2706,06±123,15	13089,62±688,77
Vater eNOS +/-	W (n=15)	2170,69±73,90	9859,00±629,34

Tab. 17: AUC für Glukose (mg/dl x min) während des ipGTT als Mittelwerte ± SEM. \* p<0,05 \*\* p<0,01 vs. Mutter WT/Vater WT. # p<0,05 vs. Mutter WT/Vater eNOS +/- . M: Männchen; W: Weibchen.

#### 4.4.4.3 Plasmainsulinkonzentrationen während des ipGTT

Signifikante Unterschiede der Insulinkonzentrationen während des ipGTT fanden sich nach 15 und 60 min. Tiere mit eNOS +/- Vätern wiesen gegenüber der Kontrollgruppe und Nachkommen mit eNOS +/- Müttern signifikant höhere Konzentrationen auf (vgl. Abb. 23). Zu Beginn des ipGTT zeigte sich ein starker Trend zu signifikant höheren Insulinkonzentration bei Tieren mit eNOS +/- Vätern mit  $p=0,054$  gegenüber der Kontrollgruppe.

Die geschlechtsspezifische Betrachtung lieferte folgendes Ergebnis: Männliche Tiere mit eNOS +/- Vätern hatten zu Beginn des ipGTT die signifikant höchsten Plasmainsulinkonzentrationen, verglichen mit Kontrolltieren und Tieren mit eNOS +/- Müttern (vgl. Abb. 24). Bei weiblichen Tieren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (vgl. Abb. 25).

#### 4.4.4.4 Area under the curve für Insulin im ipGTT

Aus den Insulinkonzentrationen zu den einzelnen Messpunkten wurde die AUC für Insulin während des ipGTT berechnet (vgl. Tab. 18, Abb. 23, Abb. 24, Abb. 25, Kap. 3.6.2). Tiere mit eNOS +/- Vätern hatten eine signifikant höhere AUC für Insulin verglichen mit Tieren von eNOS +/- Müttern. Gegenüber der Kontrollgruppe gab es

ebenso einen starken Trend zu einer größeren AUC mit  $p=0,056$ . Die geschlechtsspezifische Analyse zeigte, dass männliche Tiere mit eNOS +/- Vätern im Vergleich zur Kontrollgruppe und Tieren mit eNOS +/- Müttern eine signifikant größere AUC aufwiesen. Bei weiblichen Tieren bestanden keine signifikanten Unterschiede.

		AUC Insulin 0-15 min	AUC Insulin gesamt
Mutter WT Vater WT	Alle (n=38)	748,87 ± 49,99	3679,02 ± 220,68
	M (n=18)	840,17 ± 89,48	4391,45 ± 371,60
	W (n=20)	702,21 ± 61,42	3301,59 ± 301,10
Mutter eNOS +/- Vater WT	Alle (n=29)	811,27 ± 35,69	3777,26 ± 148,17
	M (n=14)	808,23 ± 44,29	4469,43 ± 140,46
	W (n=15)	790,51 ± 59,57	3314,61 ± 119,43
Mutter WT Vater eNOS +/-	Alle (n=24)	998,68 ± 71,18 <b>++#</b>	4540,21 ± 385,85 <b>\$</b>
	M (n=9)	1185,24 ± 131,37 <b>+#</b>	6283,89 ± 823,7 <b>+#</b>
	W (n=15)	849,33 ± 63,05	3843,25 ± 279,98

Tab. 18: AUC für Insulin (pmol/ml x min) während des ipGTT als Mittelwerte ± SEM. +  $p<0,05$  ++  $p<0,01$  vs. Mutter WT/Vater WT. #  $p<0,05$  vs. Mutter eNOS +/-/Vater WT. \$  $p=0,056$  vs. Mutter WT/Vater WT. M: Männchen, W: Weibchen.

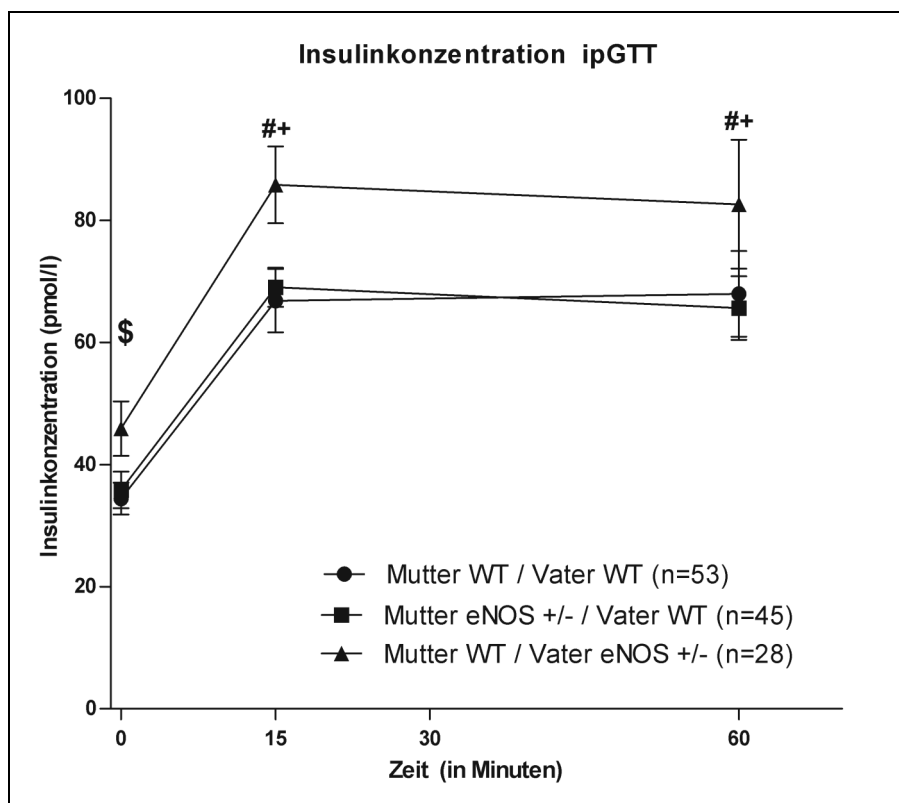
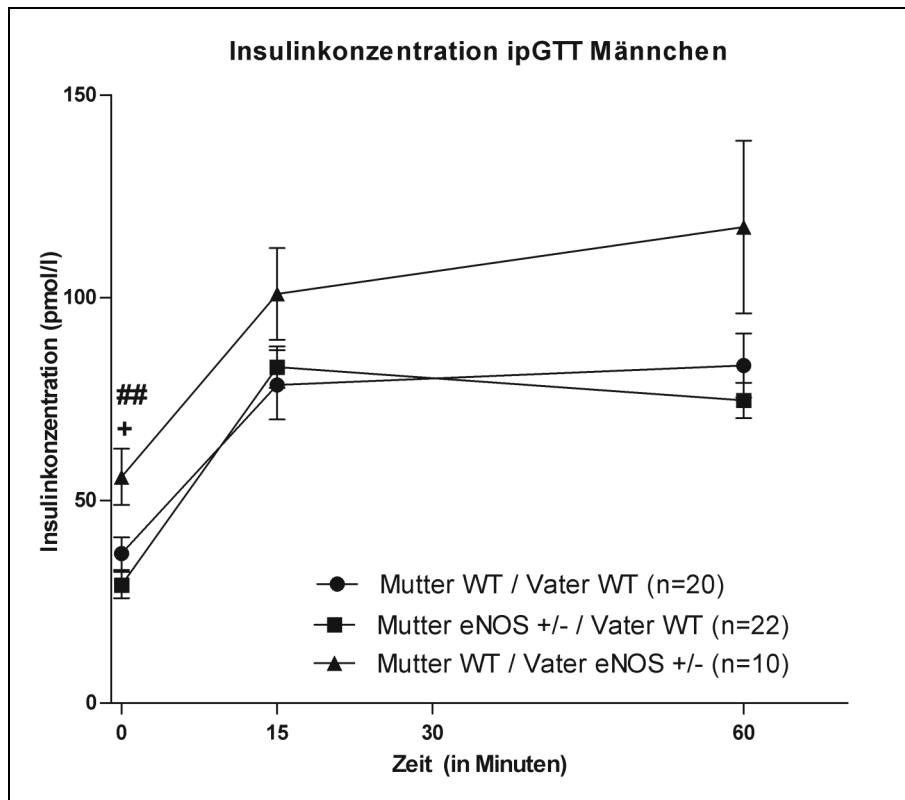
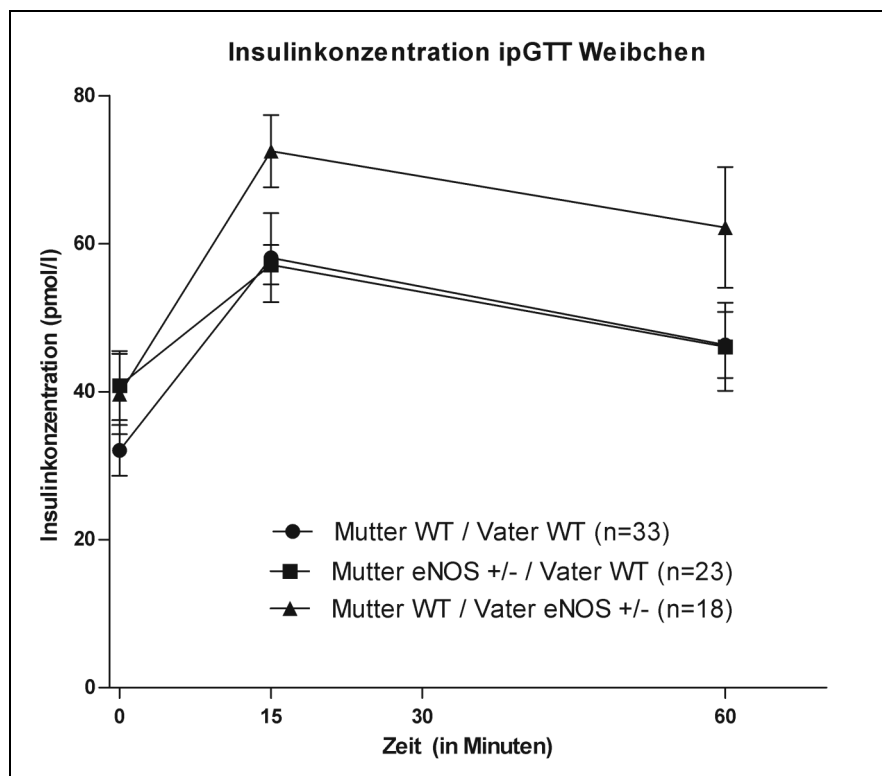


Abb. 23: Insulinkonzentrationen während des ipGTT. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM in pmol/ml. +  $p<0,05$  Mutter WT/Vater eNOS +/- vs. Mutter WT/Vater WT. #  $p<0,05$  ##  $p<0,01$  Mutter WT/Vater eNOS +/- vs. Mutter eNOS +/-/Vater WT. \$  $p=0,054$  Mutter WT/Vater eNOS +/- vs. Mutter WT/Vater WT.





**Abb. 24:** Insulinkonzentrationen männlicher Tiere während des ipGTT. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM in pmol/ml. +  $p < 0,05$  Mutter WT/Vater eNOS +/- vs. Mutter WT/Vater WT. ##  $p < 0,01$  Mutter WT/Vater eNOS +/- vs. Mutter eNOS +/-/Vater WT.



**Abb. 25:** Insulinkonzentrationen weiblicher Tiere während des ipGTT. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM in pmol/ml.

Auch für Insulin wurde die AUC von Insulin von Beginn des ipGTT bis 15 min danach zwischen den Gruppen verglichen. Bei diesem Vergleich zeichneten sich erneut die Tiere mit eNOS +/- Vätern gegenüber der Kontrollgruppe, aber auch gegenüber Tieren mit eNOS +/- Müttern, durch eine signifikant größere AUC aus. Diese signifikanten Unterschiede fanden sich auch bei männlichen Tieren, bei weiblichen Tieren hingegen fanden sich keine signifikanten Unterschiede (vgl. Tab. 18).

## 4.5 Der hepatische Phänotyp der Tiere

### 4.5.1 H.E. Färbung

Der ermittelte mittlere Radius der Leberläppchen der untersuchten Tiere unterschied sich zwischen keiner der Gruppen signifikant, auch nicht bei geschlechtsspezifischer Analyse. Die Ergebnisse sind zur Übersicht in Tab. 19 dargestellt.

		Mutter WT Vater WT	Mutter eNOS +/- Vater WT	Mutter WT Vater eNOS +/-
Größe der Leberläppchen (mm)	Alle	0,07±0,001 n=50	0,07±0,001 n=39	0,07±0,001 n=25
	Männchen	0,07±0,001 n=21	0,07±0,001 n=20	0,07±0,003 n=10
	Weibchen	0,07±0,002 n=29	0,07±0,001 n=19	0,07±0,002 n=15

Tab. 19: Größe der Leberläppchen. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM in mm.

### 4.5.2 Oil red O Färbung

Zur Auswertung wurde der prozentuale Anteil des *Oil red O* gefärbten Gewebes je Schnitt ermittelt. Hierbei zeigten sowohl die Tiere mit eNOS +/- Müttern als auch mit eNOS +/- Vätern gegenüber Kontrolltieren einen signifikant erhöhten Anteil *Oil red O* positiver Fläche (vgl. Abb. 26).

Bei geschlechtsspezifischer Betrachtung zeigte sich folgendes Bild: Die oben ausgeführten signifikanten Unterschiede bestanden auch bei weiblichen Tieren. Bei männlichen Tieren hingegen traten keine signifikanten Unterschiede auf.

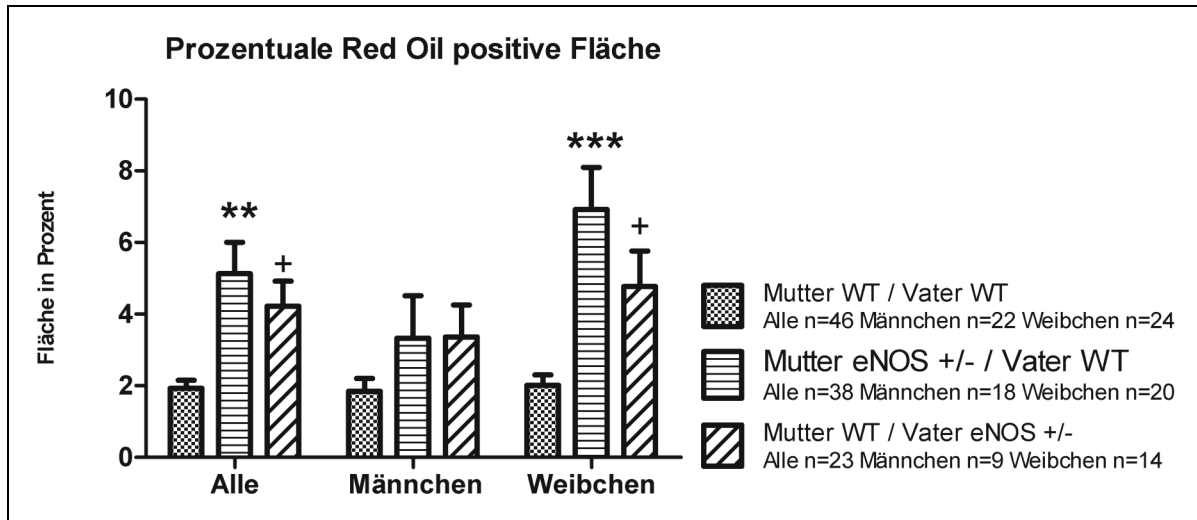


Abb. 26: Prozentualer Anteil Red Oil positiver Fläche. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM in Prozent. \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Mutter WT/Vater WT. +  $p < 0,05$  vs. Mutter WT/Vater WT.

#### 4.5.3 Glykogengehalt der Lebern

Tiere mit eNOS +/- Vätern zeigten gegenüber Kontrolltieren und auch gegenüber Tieren mit eNOS +/- Müttern einen signifikant höheren Glykogengehalt der Lebern (vgl. Abb. 27).

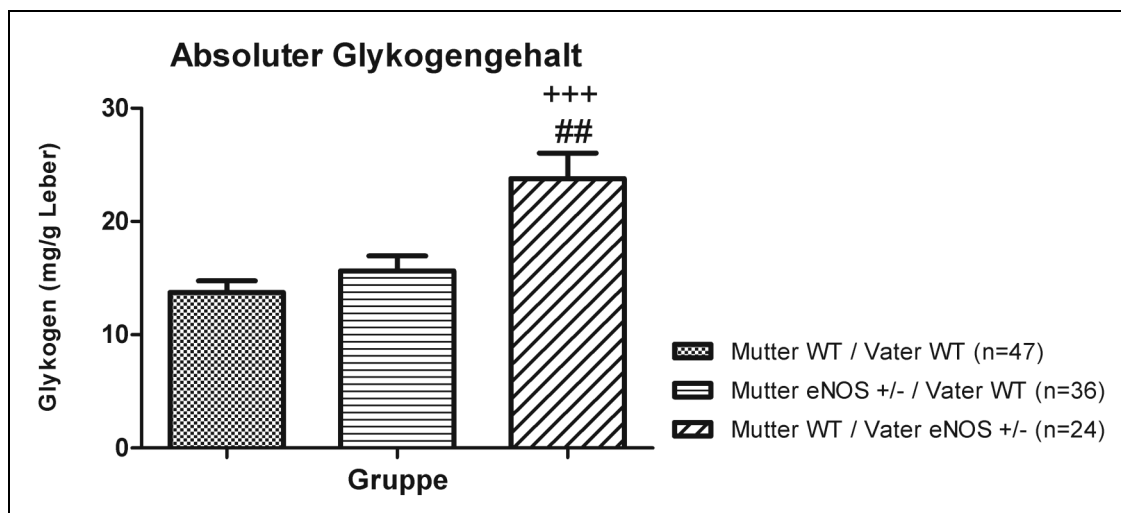


Abb. 27: Glykogengehalt der Lebern. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM in mg/g Leber. +++  $p < 0,001$  vs. Mutter WT/Vater WT. ##  $p < 0,01$  vs. Mutter eNOS +/-/Vater WT.

In der geschlechtsspezifischen Betrachtung bestanden die beschriebenen Unterschiede ausschließlich bei männlichen Tieren. Bei weiblichen Tieren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (vgl. Abb. 28).

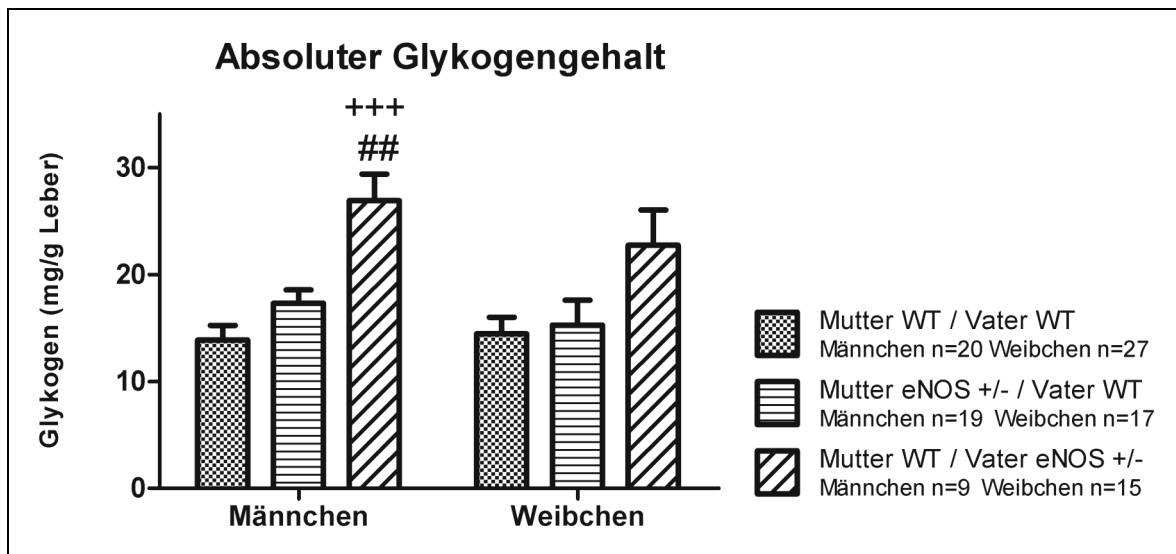


Abb. 28: Glykogengehalt der Lebern. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM in mg/g Leber. +++  $p < 0,001$  vs. Mutter WT/Vater WT. ##  $p < 0,01$  vs. Mutter eNOS +/-/Vater WT.

Darüber hinaus ist zu bemerken, dass die aufgeführten Unterschiede im Glykogengehalt der Lebern auch signifikant verschieden blieben, wenn die Glykogenkonzentration auf das absolute und relative Lebergewicht sowie das Körpergewicht der Tiere bei Tötung bezogen wurde (vgl. Tab. 20).

		Glykogengehalt (mg/g Leber) in Bezug zum absoluten Lebergewicht (g)	Glykogengehalt (mg/g Leber) in Bezug zum relativen Lebergewicht	Glykogengehalt (mg/g Leber) in Bezug zum Körpergewicht (g)
Mutter WT Vater WT	Alle (n=47)	13,36 $\pm$ 1,34	335,29 $\pm$ 27,64	0,55 $\pm$ 0,05
	M (n=20)	8,74 $\pm$ 0,84	297,01 $\pm$ 29,07	0,39 $\pm$ 0,04
	W (n=27)	16,73 $\pm$ 2,00	363,27 $\pm$ 45,52	0,67 $\pm$ 0,07
Mutter eNOS +/- Vater WT	Alle (n=36)	13,96 $\pm$ 1,31	364,86 $\pm$ 31,65	0,61 $\pm$ 0,06
	M (n=19)	12,23 $\pm$ 0,97	374,77 $\pm$ 32,88	0,57 $\pm$ 0,04
	W (n=17)	15,88 $\pm$ 2,50	353,78 $\pm$ 57,14	0,65 $\pm$ 0,11
Mutter WT Vater eNOS +/-	Alle (n=24)	22,45 $\pm$ 2,46 <b>+++</b>	575,73 $\pm$ 53,36 <b>+++</b>	0,96 $\pm$ 0,10 <b>++</b>
	M (n=9)	19,17 $\pm$ 1,23 <b>+++ ##</b>	629,57 $\pm$ 49,11 <b>+++ ##</b>	0,87 $\pm$ 0,06 <b>+++ ##</b>
	W (n=15)	24,42 $\pm$ 3,82	543,42 $\pm$ 80,37	1,02 $\pm$ 0,16

Tab. 20: Glykogenkonzentration im Gewebe bezogen auf absolutes und relatives Organgewicht sowie Körpergewicht der Tiere bei Tötung. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. ++  $p < 0,01$  +++  $p < 0,001$  vs. Mutter WT/Vater WT. ##  $p < 0,01$  vs. Mutter WT/Vater eNOS +/-.  
M: Männchen; W: Weibchen.

#### 4.6 Expressionsanalysen

Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse der relativen Expressionsanalysen mittels rtPCR im Folgenden tabellarisch dargestellt. Gene, bei welchen signifikante Unterschiede bestanden, sind hervorgehoben.

In Tab. 21 sind die Ergebnisse bei Betrachtung aller Tiere dargelegt. Signifikant höhere Expression der G6Pase fand sich bei Tieren mit eNOS +/- Vätern im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Glukosetransporter GLUT 2 der Leber war bei Tieren mit eNOS +/- Vätern im Vergleich zu Tieren mit eNOS +/- Müttern, jedoch nicht gegenüber Kontrolltieren, signifikant stärker exprimiert.

	Mutter WT Vater WT	Mutter eNOS +/- Vater WT	Mutter WT Vater eNOS +/-
<b>G6Pase</b>	1,00 ± 0,16	1,62 ± 0,25	<b>2,19 ± 0,27 +++</b>
<b>GLUT 2</b>	1,00 ± 0,12	0,93 ± 0,11	<b>1,59 ± 0,14 ###</b>
GR	1,00 ± 0,14	0,91 ± 0,07	1,49 ± 0,21
GK	1,00 ± 0,11	0,93 ± 0,19	1,06 ± 0,12
FBPase	1,00 ± 0,10	1,03 ± 0,06	1,18 ± 0,13
PEP-CK	1,00 ± 0,13	0,95 ± 0,07	1,22 ± 0,19
PPAR-γ	1,00 ± 0,11	0,68 ± 0,11	1,10 ± 0,15
PPAR-γ CoA1	1,00 ± 0,12	0,92 ± 0,13	1,38 ± 0,26
PPAR-γ 1	1,00 ± 0,10	0,93 ± 0,14	1,24 ± 0,17
PPAR-γ 2	1,00 ± 0,34	0,46 ± 0,09	0,66 ± 0,12
CHREBP	1,00 ± 0,07	0,76 ± 0,05	0,82 ± 0,08
SREBF1c	1,00 ± 0,12	0,66 ± 0,06	0,89 ± 0,11
TNF-α	1,00 ± 0,17	1,02 ± 0,16	0,83 ± 0,11
ACE	1,00 ± 0,10	0,92 ± 0,07	0,89 ± 0,15
Angio	1,00 ± 0,11	1,03 ± 0,11	1,11 ± 0,13
FXR	1,00 ± 0,08	0,81 ± 0,04	1,15 ± 0,16
CPT1a	1,00 ± 0,09	0,94 ± 0,08	1,14 ± 0,18
PPAR-α	1,00 ± 0,10	0,83 ± 0,07	1,21 ± 0,18
FAS	1,00 ± 0,14	0,77 ± 0,10	1,15 ± 0,18
Lipe/HSL	1,00 ± 0,08	0,90 ± 0,09	0,99 ± 0,10
AMPK-α 2	1,00 ± 0,09	0,97 ± 0,12	1,22 ± 0,14
IGF-1	1,00 ± 0,13	1,00 ± 0,07	1,22 ± 0,13
IGF-2	1,00 ± 0,16	1,00 ± 0,15	1,41 ± 0,30
IGF-BP 1	1,00 ± 0,35	2,02 ± 0,56	2,09 ± 0,74
IGF-BP 2	1,00 ± 0,10	1,42 ± 0,14	1,24 ± 0,10
IGF-BP 3	1,00 ± 0,13	1,00 ± 0,08	0,90 ± 0,10
eNOS	1,00 ± 0,10	0,90 ± 0,10	1,03 ± 0,12
iNOS	1,00 ± 0,16	1,34 ± 0,46	0,94 ± 0,17
H19	1,00 ± 0,63	7,78 ± 3,74	2,30 ± 1,60

Tab. 21: Relative Expression der Kandidatengene. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. In allen Gruppen n=19-20. +++ p<0,0018 vs. Mutter WT/Vater WT. ### p<0,0018 Mutter eNOS +/-Vater WT vs. Mutter WT/Vater eNOS +/-.

Weiterhin zeigten sich geschlechtsspezifische Unterschiede (vgl. Tab. 22 und Tab. 23): Bei männlichen Tieren von eNOS +/- Vätern fand sich eine signifikant erhöhte

Expression des Glukosetransporters GLUT 2 verglichen mit den beiden anderen Gruppen (vgl. Tab. 22). Für PPAR- $\gamma$  zeigte sich eine signifikant verringerte Expression bei männlichen Tieren mit eNOS +/- Müttern im Vergleich zu Tieren mit eNOS +/- Vätern. Darüber hinaus zeigten sich bei männlichen Tieren Unterschiede in der Expression von IGF-2, welches bei Nachkommen von eNOS +/- Müttern verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant verstärkt exprimiert war.

	Mutter WT Vater WT	Mutter eNOS +/- Vater WT	Mutter WT Vater eNOS +/-
G6Pase	1,00 $\pm$ 0,24	1,40 $\pm$ 0,21	2,22 $\pm$ 0,19
<b>GLUT 2</b>	1,00 $\pm$ 0,09	1,25 $\pm$ 0,15	<b>2,10 <math>\pm</math> 0,12 +++ ###</b>
GR	1,00 $\pm$ 0,15	1,42 $\pm$ 0,17	1,84 $\pm$ 0,15
GK	1,00 $\pm$ 0,17	1,32 $\pm$ 0,35	1,00 $\pm$ 0,16
FBPase	1,00 $\pm$ 0,10	1,30 $\pm$ 0,13	1,22 $\pm$ 0,16
PEP-CK	1,00 $\pm$ 0,11	1,41 $\pm$ 0,20	1,50 $\pm$ 0,27
<b>PPAR-<math>\gamma</math></b>	1,00 $\pm$ 0,18	<b>0,48 <math>\pm</math> 0,07 ###</b>	0,99 $\pm$ 0,11
PPAR- $\gamma$ CoA1	1,00 $\pm$ 0,14	1,55 $\pm$ 0,41	1,62 $\pm$ 0,14
PPAR- $\gamma$ 1	1,00 $\pm$ 0,11	0,62 $\pm$ 0,05	0,99 $\pm$ 0,11
PPAR- $\gamma$ 2	1,00 $\pm$ 0,43	0,23 $\pm$ 0,08	0,57 $\pm$ 0,14
CHREBP	1,00 $\pm$ 0,07	1,13 $\pm$ 0,08	0,77 $\pm$ 0,05
SREBF1c	1,00 $\pm$ 0,21	0,94 $\pm$ 0,14	0,90 $\pm$ 0,11
TNF- $\alpha$	1,00 $\pm$ 0,12	1,49 $\pm$ 0,36	0,67 $\pm$ 0,07
ACE	1,00 $\pm$ 0,12	1,54 $\pm$ 0,26	0,75 $\pm$ 0,67
Angio	1,00 $\pm$ 0,09	1,17 $\pm$ 0,14	1,05 $\pm$ 0,10
FXR	1,00 $\pm$ 0,08	1,00 $\pm$ 0,05	1,10 $\pm$ 0,08
CPT1a	1,00 $\pm$ 0,12	1,04 $\pm$ 0,14	0,92 $\pm$ 0,09
PPAR- $\alpha$	1,00 $\pm$ 0,14	2,18 $\pm$ 0,65	1,13 $\pm$ 0,12
FAS	1,00 $\pm$ 0,27	0,60 $\pm$ 0,08	0,74 $\pm$ 0,10
Lipe/HSL	1,00 $\pm$ 0,10	0,90 $\pm$ 0,11	0,85 $\pm$ 0,10
AMPK- $\alpha$ 2	1,00 $\pm$ 0,15	1,25 $\pm$ 0,26	1,12 $\pm$ 0,14
IGF-1	1,00 $\pm$ 0,13	1,49 $\pm$ 0,16	1,53 $\pm$ 0,11
<b>IGF-2</b>	1,00 $\pm$ 0,08	<b>1,76 <math>\pm</math> 0,22 ***</b>	1,63 $\pm$ 0,25
IGF-BP 1	1,00 $\pm$ 0,35	2,33 $\pm$ 0,56	2,24 $\pm$ 0,43
IGF-BP 2	1,00 $\pm$ 0,16	2,06 $\pm$ 0,31	1,47 $\pm$ 0,21
IGF-BP 3	1,00 $\pm$ 0,19	1,15 $\pm$ 0,14	0,83 $\pm$ 0,05
eNOS	1,00 $\pm$ 0,07	1,11 $\pm$ 0,13	1,04 $\pm$ 0,07
iNOS	1,00 $\pm$ 0,20	1,04 $\pm$ 0,24	0,84 $\pm$ 0,10
H19	1,00 $\pm$ 0,34	3,57 $\pm$ 2,48	2,73 $\pm$ 2,09

Tab. 22: Relative Expression der Kandidatengene bei männlichen Tieren. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. In allen Gruppen n=9-10. \*\*\* p<0,0018 vs. Mutter WT/Vater WT. +++ p<0,0018 vs. Mutter WT/Vater WT. ### p<0,0018 Mutter eNOS +/-/Vater WT vs. Mutter WT/Vater eNOS +/-.

Bei weiblichen Tieren zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Expression von Genen, die direkt Einfluss auf die Regulation des Glukosestoffwechsels nehmen (vgl. Tab. 23). Weibliche Tiere mit eNOS +/- Müttern hatten eine gegenüber Kontrolltieren signifikant verringerte Expression des Transkriptionsfaktors CHREBP. Eine gegenüber weiblichen Kontrolltieren signifikant verringerte Expression zeigte sich bei weiblichen Tieren mit eNOS +/- Müttern auch für den Transkriptionsfaktor SREBF1c und FXR.

	Mutter WT Vater WT	Mutter eNOS +/- Vater WT	Mutter WT Vater eNOS +/-
G6Pase	1,00 ± 0,20	1,78 ± 0,37	2,17 ± 0,43
GLUT 2	1,00 ± 0,13	0,78 ± 0,13	1,34 ± 0,18
GR	1,00 ± 0,13	0,70 ± 0,06	1,29 ± 0,22
GK	1,00 ± 0,16	0,57 ± 0,08	1,10 ± 0,16
FBPase	1,00 ± 0,11	0,86 ± 0,07	1,16 ± 0,16
PEP-CK	1,00 ± 0,15	0,72 ± 0,05	1,10 ± 0,24
PPAR-γ	1,00 ± 0,12	0,79 ± 0,14	1,18 ± 0,21
PPARγ CoA1	1,00 ± 0,06	0,68 ± 0,09	1,28 ± 0,34
PPAR-γ 1	1,00 ± 0,12	1,14 ± 0,14	1,40 ± 0,21
PPAR-γ 2	1,00 ± 0,20	1,21 ± 0,24	0,97 ± 0,16
<b>CHREBP</b>	1,00 ± 0,08	<b>0,52 ± 0,03 ***</b>	0,84 ± 0,11
<b>SREBF1c</b>	1,00 ± 0,11	<b>0,49 ± 0,04 ***</b>	0,85 ± 0,15
TNF-α	1,00 ± 0,22	0,79 ± 0,17	0,91 ± 0,09
ACE	1,00 0,15	0,69 0,08	0,97 0,22
Angio	1,00 ± 0,09	0,80 ± 0,04	1,13 ± 0,15
<b>FXR</b>	1,00 ± 0,08	<b>0,70 ± 0,06 ***</b>	1,18 ± 0,22
CPT1a	1,00 ± 0,12	0,86 ± 0,09	1,30 ± 0,16
PPAR-α	1,00 ± 0,12	2,30 ± 1,36	1,32 ± 0,27
FAS	1,00 ± 0,08	0,94 ± 0,17	1,58 ± 0,30
Lipe/HSL	1,00 ± 0,12	0,90 ± 0,14	1,12 ± 0,16
AMPK-α 2	1,00 ± 0,10	0,75 ± 0,07	1,30 ± 0,21
IGF-1	1,00 ± 0,14	0,78 ± 0,08	1,08 ± 0,15
IGF-2	1,00 ± 0,14	0,77 ± 0,18	1,34 ± 0,35
IGF-BP 1	1,00 ± 0,37	3,03 ± 1,39	2,06 ± 0,82
IGF-BP 2	1,00 ± 0,10	1,00 ± 0,10	1,09 ± 0,09
IGF-BP 3	1,00 ± 0,14	0,91 ± 0,07	0,94 ± 0,11
eNOS	1,00 ± 0,11	0,79 ± 0,12	1,02 ± 0,15
iNOS	1,00 ± 0,19	1,50 ± 0,67	1,00 ± 0,22
H19	1,00 ± 0,67	8,12 ± 3,67	2,26 ± 1,75

Tab. 23: Relative Expression der Kandidatengene bei weiblichen Tieren. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. In allen Gruppen n=9-10. \*\*\* p<0,0018 vs. Mutter WT/Vater WT.

## 5 Diskussion

Epidemiologische Daten und tierexperimentelle Modelle lassen annehmen, dass fetale Programmierung zu Veränderungen des Glukosestoffwechsels und des hepatischen Phänotyps führt (u.a. (17)(31)(90)(94)(93)). Das vorliegende Experiment zeigt, dass sowohl ein maternaler als auch ein paternaler heterozygoter Knock-out eNOS bei WT Nachkommen mit der Ausprägung eines spezifischen hepato-metabolischen Phänotyps assoziiert werden kann.

Tiere mit eNOS +/- Müttern wurden signifikant leichter geboren. Postnatal verlor sich der Gewichtsunterschied und insbesondere weibliche Tiere zeigten im Verlauf gegenüber Kontrolltieren signifikant höhere Körpergewichte. Weiterhin zeichneten sich Tiere dieser Gruppe durch eine signifikant höhere hepatische Lipidakkumulation aus, und dies war bei geschlechtsspezifischer Betrachtung insbesondere bei weiblichen Tieren ausgeprägt. Entsprechend hatten weibliche Tiere signifikant höhere absolute Lebergewichte. In Versuchswoche 21 wiesen Tiere mit eNOS +/- Müttern signifikant niedrigere Nüchternglukosekonzentrationen und einen staken Trend zu niedrigeren Nüchterninsulinkonzentrationen ( $p=0,054$  vs. Mutter WT/Vater WT) auf. Zusammengenommen kann dies als Ausdruck erhöhter Insulinsensitivität betrachtet werden. Mit zunehmendem Alter der Tiere fielen im ipGTT in Woche 24 leichte Anzeichen einer gestörten Glukosetoleranz auf: es zeigten sich signifikant höhere Glukosekonzentrationen nach 15 Minuten und eine signifikant höhere AUC für Glukose. Bei Nachkommen von eNOS +/- Vätern zeigte sich keine Beeinflussung des Geburtsgewichts. Dennoch wiesen Tiere dieser Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe in Woche 21 signifikant höhere Nüchternglukosewerte auf, und männliche Tiere hatten in Woche 17 signifikant höhere Nüchterninsulinwerte. Während des ipGTT hatten diese Tiere nach 15 und 60 Minuten die signifikant höchsten Insulinkonzentrationen. Die AUC für Insulin war gegenüber WT von Beginn bis nach 15 Minuten signifikant größer, über den gesamten ipGTT bestand ebenso ein starker Trend ( $p=0,056$  vs. Mutter WT/Vater WT). Bei geschlechtsspezifischer Betrachtung fielen ähnliche Befunde lediglich bei männlichen Tieren auf. Begleitet wurden die metabolischen Auffälligkeiten von einer verstärkten hepatischen Glykogen- und Lipideinlagerung. Bei geschlechtsspezifischer Analyse war erstere nur bei männlichen, letztere nur bei weiblichen Tieren signifikant erhöht. Zusammengenommen liefern diese Befunde, insbesondere bei männlichen Tieren, Hinweise auf das mögliche Vorliegen eines insulinresistenten Phänotyps.



### 5.1 Die Überprüfung der *Advanced Fetal Programming* Hypothese in einem Mausmodell mit heterozygotem eNOS Knock-out

Im vorliegenden Tiermodell wurden weibliche und männliche eNOS +/- Tiere mit WT verpaart und nur WT Nachkommen dieser Kreuzung untersucht (vgl. Kap. 3.2.1). Im Sinne der *Advanced Fetal Programming* Hypothese, welche primär auf Beobachtungen aus Assoziationsstudien basiert, stellen maternale Gene Determinanten fetalen Wachstums dar und nehmen somit Einfluss auf das Geburtsgewicht und das spätere Krankheitsrisiko (18)(19)(20)(21). Somit bietet sich durch den spezifischen, heterozygoten eNOS Knock-out der Elterntiere - bei ansonsten genetisch gleichen Tieren - die Möglichkeit einer kausalen Überprüfung dieser Hypothese für das eNOS Gen. Entscheidend und im Sinne der *Advanced Fetal Programming* Hypothese ist daher ein Befund: Nachkommen von eNOS +/- Müttern wurden gegenüber Nachkommen von WT Eltern signifikant leichter geboren. Es kann daher angenommen werden, dass bei maternalem heterozygotem eNOS Knock-out das intrauterine Milieu beeinflusst wird und sich dies im signifikant niedrigeren Geburtsgewicht widerspiegelt. Für Nachkommen heterozygoter eNOS knock-out Väter trifft diese Annahme hinsichtlich des Geburtsgewichtes nicht zu, auch wenn gegenüber der Kontrollgruppe phänotypische Veränderungen beobachtet werden (vgl. dazu Kap. 5.3.).

Erstaunlich ist diese Beobachtung, da bisher die Großzahl der Erkenntnisse zur Bedeutung von eNOS für das intrauterine Wachstum aus Modellen mit homozygoten eNOS knock-out Tieren bzw. der Verabreichung des NOS-Inhibitors L-NAME stammen (vgl. (81)(82)(71)(80)). Die Ergebnisse stützen im Sinne der Experimente von Kojda et al. die Theorie, dass die funktionelle Kapazität eines eNOS-Allels gewebeabhängig unter dem Einfluss von Stressfaktoren überschritten werden kann (64). Die physiologischen Adaptationsprozesse während der Schwangerschaft könnten solche Stressfaktoren darstellen und damit in der nachfolgenden Generation durch eine intrauterine Wachstumseinschränkung zur Ausbildung von Programmierungseffekten führen. Die signifikante Reduktion des Geburtsgewichts steht allerdings im Widerspruch zu einer *in vivo* Untersuchung mittels MRT von Pallares et al., die bis Tag 13,5 der Schwangerschaft keine signifikante Wachstumseinschränkung bei WT Nachkommen von eNOS +/- Elterntieren feststellen können (84). Allerdings zeigen van der Heijden et al. sowie Hefler et al., dass eine Wachstumseinschränkung durch Veränderungen im NO-Stoffwechsel bei Mäusen erst in der Spätschwangerschaft manifest wird (81)(82).

Der von Pallares et al. gewählte Beobachtungszeitpunkt könnte somit zu früh gewählt sein, um eine Wachstumsretardierung zu erfassen.

Als wichtige Einschränkung hinsichtlich der Überprüfung der *Advanced Fetal Programming* Hypothese sollte kritisch bemerkt werden, dass die Auswirkungen des maternalen heterozygoten eNOS Knock-outs auf Funktion und Morphologie des uteroplazentaren Gefäßbettes bzw. der Plazenta und den Verlauf der Schwangerschaft nicht systematisch erfasst wurden. Es kann somit keine Aussage über mögliche, wie von Rudic et al. und van der Heijden et al. beschriebene, Einschränkungen von Remodelingprozessen durch das heterozygote eNOS Knock-Out nachvollzogen werden (87)(82). Ebenso wenig kann eine Aussage darüber gemacht werden, zu welchem Zeitpunkt der Schwangerschaft die Wachstumseinschränkung bemerkbar wurde, und ob sich dies mit der Beobachtung deckt, wonach die stärkste Wachstumseinschränkung bei eNOS Defizienz im letzten Drittel der Schwangerschaft auftritt. Durch diese Einschränkung kann über mögliche zugrunde liegende Mechanismen der Wachstumsretardierung daher nur spekuliert werden.

In Anlehnung an Constancia et al. und Longo et al., deren Untersuchungen eine transgenerationale Weitergabe phänotypischer Merkmale - unabhängig des Genostatus - über das intrauterine Milieu nahe legen, muss in Bezug auf das vorliegenden Modell weiterhin einschränkend erwähnt werden, dass die Daten auf einen solchen möglichen Effekt nicht systematisch analysiert wurden (61)(62). Sowohl bei Constancia et al. als auch Longo et al. waren transgenerationale Effekte allerdings primär dann bemerkbar, wenn das defekte Allel über Muttertiere an nachfolgende Generationen weitergegeben wurde, bzw. sich Feten in homozygoten eNOS knock-out Müttern entwickelten. In der F0 Generation des vorliegenden Modells wurden nur männliche homozygote eNOS knock-out Tiere verwendet, um heterozygote eNOS knock-out Elterntiere zu züchten (vgl. Kap. 3.2.1.). Eine transgenerationale Weitergabe phänotypischer Eigenschaften über das intrauterine Milieu an die F1 Generation durch einen maternalen homozygoten eNOS knock-out ist daher ausgeschlossen. Lediglich Effekte durch den fetalen heterozygoten eNOS Knock-out können nicht sicher ausgeschlossen werden.

Weiterhin könnten Veränderungen der Reproduktivität durch den homozygoten bzw. heterozygoten eNOS Knock-out der männlichen Tiere an der unterschiedlichen phänotypischen Ausprägung beteiligt sein. Für Nachkommen homozygoter eNOS Tiere ist dies durch Hefler et al. und van der Heijden et al. beschrieben (81)(82). Eine

verringerte Anzahl lebensfähiger Neugeborener je Wurf konnte im vorliegenden Versuch jedoch nicht beobachtet werden (Daten AG Hocher, nicht gezeigt).

Neben dem signifikant reduzierten Geburtsgewicht von Tieren mit eNOS +/- Müttern stützt auch der spezifische hepatische Phänotyp der Tiere (vgl. Kap. 5.2.), sowie Auffälligkeiten in Parametern der Glukosehomöostase, die Annahme der *Advanced Fetal Programming* Hypothese. Tiere mit eNOS +/- Müttern wiesen im Alter von 21 Wochen eine vergleichsweise verbesserte Glukosetoleranz auf: In Versuchswoche 21 zeigten Tiere mit eNOS +/- Müttern gegenüber Kontrolltieren signifikant niedrigere Nüchternglukosewerte und einen deutlichen Trend zu niedrigeren Insulinkonzentrationen ( $p=0,054$  vs. Mutter WT/Vater WT). Zusätzlich hatten diese Tiere einen signifikant niedrigeren HOMA Index, einem Surrogatparameter für verbesserte Insulinsensitivität. Langley et al. beschreiben in einem *low protein* Modell (mit sechs bzw. neun Prozent Proteingehalt der Nahrung) vergleichbare Veränderungen bei weiblichen Ratten (110). Im Alter von neun Wochen imponierten diese Ratten im intravenösen Glukosetoleranztest mit signifikant niedrigeren AUCs von Glukose und niedrigeren Spitzenglukosekonzentrationen. Ebenfalls in einem *low protein* Modell von Ozanne et al. zeigt sich bei Ratten im Alter von drei Monaten eine im Vergleich zu Kontrolltieren verbesserte Insulinsensitivität sowohl des Fettgewebes als auch der Skelettmuskulatur (111)(112). In diesem Modell ist weiterhin zu beobachten, dass im Alter von 15 Monaten die entsprechenden Tiere eine gestörte Glukosetoleranz der Skelettmuskulatur aufweisen (113). Auffälligkeiten im Glukosetoleranztest sind häufig die früheste feststellbare Manifestation einer gestörten Glukosehomöostase und auch Tiere mit eNOS +/- Müttern hatten im ipGTT in Versuchswoche 24, also mit zunehmendem Alter, eine signifikant höhere AUC für Glukose, und dies bei fehlenden Veränderungen der Insulinkonzentrationen (114). Analog zu den angeführten Beobachtungen von Ozanne et al. könnte dieser Befund als möglicher Beginn einer Störung der Glukosetoleranz dieser Tiere betrachtet werden. Es sollte in diesem Zusammenhang erwähnt werden, dass Inselzahl, -größe und  $\beta$ -Zellfläche des Pankreas sich im vorliegenden Modell nicht unterscheiden (Daten S. Runge, AG Hocher; nicht veröffentlicht). Die Auffälligkeiten des Glukosestoffwechsels sind somit nicht durch rein strukturelle Alterationen des Pankreas erklärbar. Funktionelle Untersuchungen des Pankreas, der Leber, wie auch peripherer insulinabhängiger Gewebe sind jedoch, neben einer längerfristigen Beobachtung der Tiere, unabdingbar, um die mögliche Entwicklung einer Glukosetoleranzstörung abschließend beurteilen zu können.

Das vorliegende Modell liefert somit erstmals die Chance, die *Advanced Fetal Programming* Hypothese für das eNOS Gen nachzuvollziehen. Bedingt durch den maternalen eNOS Knock-out kam es neben einem signifikant reduzierten Geburtsgewicht zu phänotypischen Veränderungen der Leber bei WT Nachkommen.

## 5.2 Programmierung des hepatischen Phänotyps durch elterliches eNOS Knock-out

Tiere mit eNOS +/- Müttern zeigten im Vergleich zu Kontrolltieren einen signifikant höheren Lipidgehalt der Leber, und dies bei unveränderter hepatischer Glykogenkonzentration. Bisher gibt es nur wenige Studien, die den Zusammenhang von Geburtsgewicht und Leberverfettung, insbesondere in murinen Tiermodellen, analysiert haben. Daten aus dem Kollektiv der *British Women's Heart and Healthy Study* zeigen einen inversen Zusammenhang zwischen Surrogatparametern der Leberverfettung – Alanin-Aminotransferase (ALT) und Gamma-GT (GGT) - und dem Geburtsgewicht (115). Interessant ist, dass weder Alkoholkonsum noch *Waist-to-hip Ratio* in dieser Studie eine ähnlich starke Assoziation zeigen und damit eine starke Beeinflussung der Befunde durch den Lebensstil unwahrscheinlich scheint. Drake et al. stellen bei sechs Monate alten männlichen Ratten nach pränataler Dexamethasonexposition unter dem Einfluss einer *high fat* Diät erhöhte hepatische Triglyceridkonzentrationen ab dem Alter von drei Wochen fest (116). Eine *high fat* Diät allein hingegen führt nicht zu entsprechenden Veränderungen des Leberfettgehaltes. Sowohl die Daten von Drake et al. wie auch die *British Women's Heart and Healthy Study* legen somit grundsätzlich eine Beeinflussung des Leberfettgehaltes durch fetale Programmierung nahe und stärken somit die Annahme eines solchen Effekts auch im vorliegenden Modell.

In Zusammenhang mit dem erhöhten hepatischen Lipidgehalt ist weiterhin bemerkenswert, dass Tiere mit heterozygoten maternalen eNOS Knock-out in Versuchswoche 21 signifikant niedrigere Nüchtern glukosekonzentrationen sowie einen deutlichen Trend ( $p=0,054$  vs. Mutter WT/Vater WT) zu geringeren Nüchterninsulinkonzentrationen aufweisen. Als Ausdruck einer erhöhten Insulinsensitivität könnte dies einen möglichen Erklärungsansatz für die vermehrte Lipideinlagerung der Leber bieten (100). Pathogenetisch wird klassischerweise angenommen, dass steatotischen Veränderungen der Leber eine herabgesetzte periphere Insulinwirkung vorausgeht. Demgegenüber wird auch diskutiert, dass bei

verbesserter hepatischer Insulinsensitivität der Glukose- und Glykogenstoffwechsel verändert ist, während intrazelluläre Signalwege des hepatischen Lipidstoffwechsels davon nicht beeinflusst werden (100)(117). Hierdurch kann es zu einer vermehrten hepatischen Triglycerideinlagerung kommen. Dem Transkriptionsfaktor Foxo-1 wird dabei aufgrund seiner dualen Funktion im Lipid- und Glukosestoffwechsel eine regulatorische Schlüsselrolle zugesprochen. Es konnte gezeigt werden, dass seine Aktivierung bei herabgesetzter Insulinwirkung zu massiver Glukoseproduktion und gleichzeitig herabgesetzter Lipidproduktion in der Leber führt (117). Aufgrund des unselektiven Lipidnachweises mittels *Red Oil* Färbung, wie auch fehlenden Veränderungen der Expression von Genen unter dem Einfluss von Foxo-1, wie z.B. SREBP1c, bleibt ein solcher Erklärungsansatz letztlich spekulativ. Im Rahmen einer hepatischen Lipidakkumulation bei peripherer Insulinresistenz müsste jedoch das Vorliegen einer relativen Hyperinsulinämie erwartet werden, und diese wurde bei Tieren mit eNOS +/- Müttern nicht beobachtet.

Tiere mit eNOS +/- Vätern wiesen im Vergleich zu Kontrolltieren eine vermehrte Einlagerung von Glykogen und Lipiden in der Leber sowie eine signifikant stärkere Expression der G6Pase auf. Letzteres ist als Ausdruck vermehrter hepatischer Glukoneogenese bei hepatischer Insulinresistenz beschrieben, und nur durch wenige Studien in Frage gestellt worden (118). Physiologisch wird durch Insulin die Transkription der G6Pase und damit die hepatische Glukosefreisetzung gehemmt. Eine pharmakologische Inhibition der hepatischen G6Pase durch Carbenoxolon verbessert Insulinresistenz im Tierversuch (119). Die Daten von Vuguin et al. aus einem Modell der fetalen Programmierung bei Ligation der A. uterina zeigen bei Ratten bereits im Alter von sieben Wochen eine vermehrte hepatische Glukoseproduktion samt vermehrter Expression der G6Pase (120). Interessant ist weiterhin, dass die IUGR Tiere im Versuch von Vuguin et al. höhere Insulinkonzentrationen, bei unverändertem Leberglykogengehalt, aufweisen. Tiere mit eNOS +/- Vätern zeigten im ipGTT in Versuchswoche 24 ebenfalls signifikant erhöhte Insulinkonzentrationen, während dies zu früheren Zeitpunkten im Versuch nicht bemerkbar war. In Anlehnung an die Daten von Vuguin et al. kann daher diskutiert werden, ob der hepatische Phänotyp dieser Tiere durch das Vorliegen einer Insulinresistenz erklärbar wird: Die Entwicklung einer hepatischen Steatose ist eng mit dem Vorliegen einer peripheren Insulinresistenz von Skelettmuskulatur und Fettgewebe assoziiert. Durch die fehlende Unterdrückung der Lipolyse im peripheren Gewebe kommt es zu einer reaktiven Hyperinsulinämie und zu

einer vermehrten Aufnahme von freien Fettsäuren in die Leber (100). Die Ausprägung einer hepatischen Insulinresistenz wiederum wird als Folge einer Steatose verstanden (121). Tierexperimentell kann dieser Zusammenhang u.a. bei Ratten unter *high fat* Diät, wie auch bei hepatischer Überexpression der Lipoproteinlipase beobachtet werden. Bei Leptin defizienten (*ob/ob*) Mäusen geht eine Verbesserung der hepatischen Steatose sogar mit verbesserter hepatischer Insulinresistenz einher (100)(122)(123). Hepatische Insulinresistenz *per se* ist jedoch von einem verringerten hepatischen Glykogengehalt begleitet, da Insulin der entscheidende Mediator für die hepatische Glykogensynthese ist (99)(100). Es könnte daher vermutet werden, dass bei Tieren mit väterlichen heterozygoten eNOS Knock-out eine periphere, aber noch nicht vollständig ausgeprägte hepatische Insulinresistenz vorliegt. Um diese Hypothese weiter zu untermauern, sind allerdings Daten der Plasmalipide, funktionelle Daten zur hepatischen Glukosefreisetzung unter Insulineinfluss, wie auch Untersuchungen von Fettgewebe und Skelettmuskulatur hinsichtlich des Vorliegens einer Insulinresistenz notwendig.

Nachkommen von sowohl Müttern als auch Vätern mit heterozygotem eNOS Knock-out zeigen einen charakteristischen hepatischen Phänotyp. Die vorliegenden Daten liefern hinsichtlich zugrunde liegender Ursachen allerdings lediglich Anhaltspunkte.

### **5.3 *Never deny the fathers* – mögliche Bedeutungen des paternalen eNOS Knock-outs**

Aus dem vorliegenden Tiermodell wird erkenntlich, dass neben dem maternalen auch der paternale heterozygote eNOS Knock-out zur Ausprägung eines von reinen WT Tieren verschiedenen Phänotyp führte, und dies unabhängig von einer signifikanten Reduktion des Geburtsgewichtes. Paternale Programmierung, wie auch Programmierung unabhängig eines signifikant reduzierten Geburtsgewichtes, ist tierexperimentell beschrieben (24)(34)(35)(36). Die wichtigsten epidemiologischen Daten stammen aus drei Kohorten der nordschwedischen Provinz Överkalix (37). Nur Probanden, deren Väter während der Phase des langsamen Wachstums (acht bis neun Jahre für (Groß-) Väter, *slow growth period*) eine Hungersnot erlebten, haben ein erhöhtes Risiko, an kardiovaskulären Erkrankungen (u.a. arterielle Hypertonie und Myokardinfarkt) zu versterben. Demgegenüber geht eine gute Nahrungssituation der

Großväter der Probanden mit einem vierfach höheren Risiko für diabetes-assoziierte und kardiovaskuläre Todesursachen einher.

Neben dem in Kap. 5.2. beschriebenen hepatischen Phänotyp hatten Nachkommen von Vätern mit heterozygotem eNOS Knock-out signifikant erhöhte Nüchtern glukosewerte in Versuchswoche 21. Während des ipGTT zeichneten sich die Tiere im Vergleich zu Kontrolltieren durch signifikant höhere Insulinkonzentrationen aus. Auch die AUCs von Insulin während des ipGTT spiegelten dies wieder: von Beginn bis 15 min im ipGTT war diese signifikant ( $p < 0,01$ ) gegenüber Kontrolltieren erhöht. Über den gesamten Verlauf des ipGTT betrachtet, zeigte sich ein starker Trend ( $p = 0,056$  vs. Mutter WT/Vater WT) zur größten AUC von Insulin. Diese Beobachtungen lassen die Entwicklung einer Insulinresistenz vermuten, da in solch einem Fall erhöhte Insulinspiegel zur zellulären Glukoseverwertung nötig werden, und zumindest initial das Vorliegen einer Hyperinsulinämie bei Normo- bis Hyperglykämie charakteristisch ist.

Ng et al. zeigen bei weiblichen Mäusen, dass eine 10-wöchige paternale, präkonzeptionelle *high fat* Diät zu herabgesetzter Glukosetoleranz im ipGTT und primär erhöhten Insulinkonzentrationen führt (35). Sie können zeigen, dass bei 77 differentiell exprimierten, pankreatischen Genen jenes mit der höchsten Expression - *Il13ra2* – eine entsprechend signifikant verringerte Methylierung seines Promotors aufweist. *Il13ra2* ist ein Molekül des Jak-Stat Signalweges (Jak - Janus-Kinase, Stat – Signal Transducers and Activators of Transcription), welcher an der Regulation der Insulinausschüttung in pankreatischen  $\beta$ -Zellen beteiligt ist. Im Gegensatz dazu sind in einem Mausmodell, in dem durch mehrfaches präkonzeptionelles Fasten die paternale Ernährung alteriert wurde, signifikant verringerte Glukosekonzentrationen bei sechs, acht und zehn Wochen alten männlichen und weiblichen Nachkommen beschrieben (34). Diese unterschiedlichen Befunde bei Ng. et al und Anderson et al. lassen modellspezifische Effekte vermuten. Es wird dennoch deutlich, dass auch in anderen Modellen durch paternale Programmierung eine Beeinflussung des Glukosehaushaltes beobachtet werden kann.

Epigenetische Veränderungen als Schlüssel zur Erklärung paternaler Programmierung legen neben den Daten von Ng et al. auch Beobachtungen von Carone et al. in einem Modell mit paternaler *low protein* Diät nahe (36). Bei Analyse von etwa einem Prozent des Mausgenoms zeigen sich diskrete Unterschiede des Methylierungsgrades in CpG-Inseln (Cytosin-phosphatidyl-Guanin). Als CpG-Inseln werden DNA-Abschnitte von 0,5-2 kb Länge innerhalb eukaryotischer Promotoren mit statistisch erhöhter CpG Dichte

bezeichnet, welche an der Regulation von Genexpression beteiligt sind. Die Unterschiede des globalen Methylierungsgrades in diesem Modell schlagen sich nicht durchweg in entsprechend veränderter Genexpression nieder. Im Gegensatz zum bisweilen gängigen Konzept macht dies Unterschiede der Methylierung in Promotorbereichen jedes differentiell exprimierten Gens unwahrscheinlich. Carone et al. beobachten auch Veränderungen hepatischer Micro-RNAs und dies stärkt dennoch die Hypothese, dass epigenetische Mechanismen paternaler Programmierung zugrunde liegen könnten. Hinsichtlich des Phänotyps der Nachkommen von Vätern mit *low protein* Diät finden Carone et al. veränderte Expressionsmuster hepatischer Gene der DNA-Replikation und der Lipidsynthese und dies geht, entgegen dem im vorliegenden Versuch beobachteten Phänotyp, mit einem verringerten hepatischen Cholesterolgehalt einher. Eine Beeinflussung der Glukosehomöostase durch die paternale *low protein* Diät legen die Daten von Carone et al., im Gegensatz zu den Modellen von Ng et al und Anderson et al., allerdings nicht nahe.

Aus den vorliegenden Daten wird deutlich, dass Programmierung auch über die paternale Linie stattfand. Epigenetische Phänomene scheinen in diesem Zusammenhang von besonderer Relevanz und sind im vorliegenden Tierexperiment bislang nicht untersucht. Sie könnten hilfreich sein, Anhaltspunkte für zugrunde liegende Mechanismen aufzudecken.

#### **5.4 Sex matters – Hinweise auf geschlechtsspezifische Programmierung aus dem vorliegenden Modell**

Geschlechtsspezifische phänotypische Merkmalsausprägung im Kontext fetaler Programmierung ist vielfach beschrieben, auch wenn zugrunde liegende Mechanismen bisweilen schlecht verstanden sind (32)(33). Bei herabgesetzter Verfügbarkeit von NO, z.B. durch Knock-out der eNOS, ist eine Störung der Implantation sowie eingeschränktes Wachstums während dieser Phase beschrieben (73)(83)(124). Während der Implantationsphase kommen neben X- und Y-Chromosom-abhängigen Genexpressionsmustern mit Einfluss auf biochemische Regulationskreise zudem epigenetische Mechanismen zum Tragen (125). Diese Phase wird daher als ein entscheidendes Zeitfenster für die Entstehung geschlechtsabhängiger Effekte diskutiert. Eine signifikante Reduktion des Geburtsgewichtes war nur bei männlichen Tieren mit eNOS +/- Müttern zu beobachten. Diese Beobachtung stützt die These, dass männliche



Tiere suszeptibler gegenüber intrauterinen Stimuli fetaler Programmierung sind. In einigen, aber nicht allen, Tiermodellen, in denen durch diätetische Manipulation bei schwangeren Ratten die Entwicklung von arterieller Hypertonie, gestörter Insulinsekretion und -wirkung und Hyperlipidämie bei Nachkommen induziert wurde, kann ein solcher geschlechtsspezifischer Effekt beobachtet werden (126)(127)(128). Ursächlich wird dies mit einem im Vergleich zu weiblichen Embryonen stärkeren Wachstum vor Implantation bei männlichen Embryonen in Verbindung gebracht. Mangelnder Nährstoffversorgung und auch NO-Verfügbarkeit führt zu einer Wachstumseinschränkung in genau dieser Phase (125). Weiterhin diskutieren Gutiérrez-Adan et al. die geschlechtsspezifische Genexpression des X-Chromosomgekoppelten G6PDH Gens und daraus resultierende geschlechtsabhängige Unterschiede in der Kapazität zur Reduktion reaktiver Sauerstoffradikale, welche im Rahmen von IUGR vermehrt vorliegen, als Ursache der erhöhten Vulnerabilität männlicher Tiere (125)(129)(130).

Nur weibliche Tiere mit eNOS +/- Müttern hatten ein signifikant erhöhtes absolutes Lebergewicht, und dies ging einher mit einer signifikant höheren hepatischen Lipidakkumulation bei unverändertem hepatischen Glykogengehalt, sowie fehlendem Anhalt für das Vorliegen fibrotischer Veränderungen (Daten Y. Sharkovskva, AG Hoher, nicht gezeigt). Hinsichtlich des relativen Lebergewichtes bestanden keine signifikanten Unterschiede. Im Rahmen steatotischer Veränderungen kommt es regelmäßig zur Erhöhung des Lebergewichts und die relativ stärkste Lipidakkumulation bei Tieren dieser Gruppe liefert daher einen erklärenden Hinweis (100).

Ähnlich der vorliegenden Daten finden Qasem et al. in einem *low protein* Modell verringerte absolute Lebergewichte bei weiblichen und männlichen Ratten, ohne Einfluss auf das relative Organgewicht (131). Bei Qasem et al. zeichnen sich allerdings nur männliche Tiere durch einen erhöhten hepatischen Triglyceridgehalt aus. Erhuma et al. wiederum zeigen in einem weiteren *low protein* Modell an Ratten bei Vorliegen einer signifikanten hepatischen Steatose unveränderte relative und absolute Lebergewichte (132). Dahingegen finden Choi et al. in einem *low protein* Modell an Ratten ein erhöhtes relatives Lebergewicht, wobei dies nur bei männlichen Tieren auf eine vermehrte Triglycerid- und Cholesterineinlagerung zurückführbar ist (133).

In diesem Kontext ist zu bemerken, dass nur bei weiblichen Tieren mit eNOS +/- Müttern eine signifikant verringerte Expression von Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation des hepatischen Lipidstoffwechsels beteiligt sind, auffiel: SREBF1c,

CHREBP und FXR. Dies stärkt die Hypothese, dass es durch den heterozygoten eNOS knock-out zu einer Programmierung des Lipidstoffwechsels, insbesondere bei weiblichen Tieren gekommen ist. SREBF1c führt unter Insulineinfluss zur Aktivierung von Genen der Glykolyse, u.a. der GK, und der Lipidsynthese, und letzteres kann in einer primären Hepatozytenkultur für ACC (Acetyl-CoA Carboxylase 1), FAS (Fettsäuresynthase), und S14 (einem die Lipogenese stimulierenden, nukleären Protein) gezeigt werden (134)(135). Ein SREBF1c Knock-out führt nur zu einer etwa 50%-igen Reduktion der Fettsäuresynthese, und die Expression mehrerer Enzyme der Lipidsynthese wird durch den Knock-out nicht vollständig unterdrückt (136). CHREBP, ein 2001 erstmals beschriebener Transkriptionsfaktor, wird daher als einer der wichtigsten synergistischen Faktoren von SREBF1c diskutiert. CHREBP führt ebenfalls zur Induktion von Genen der Fettsäure- und Triglyceridsynthese unter dem Einfluss von Kohlenhydraten (137). Eine leberspezifische Inhibition von CHREBP mittels Adenovirus-vermittelter RNA-Interferenz verbessert bei Leptin-defizienten ob/ob Mäusen das Ausmaß hepatischer Steatose (138).

FXR nimmt, neben seiner entscheidenden regulatorischen Funktion für die Gallensäuresynthese, Einfluss auf den Lipidstoffwechsel und die Insulinsensitivität (139)(140). Seine Aktivierung führt in Leber und Plasma zu einer SREBF1c-vermittelten Verringerung der Triglyceridkonzentrationen (141). In einigen Diabetesmodellen findet sich eine verringerte FXR Expression, wobei hinsichtlich der Ausprägung einer hepatischen Insulinresistenz bisweilen widersprüchliche Ergebnisse vorliegen (140).

Die verringerte Expression von FXR könnte somit mit dem erhöhten Lipidgehalt in Verbindung gebracht werden. Entgegen der vorliegenden Expressionsdaten müsste dies jedoch mit einer höheren Expression von SREBF1c einhergehen. Weitere Gene, wie z.B. PEP-CK und FAS, welche unter dem Einfluss der genannten Transkriptionsfaktoren stehen, waren zudem nicht verschieden exprimiert. Die verringerte Expression von SREBF1c und CHREBP steht nach dem aktuellen Wissen daher im Widerspruch zum beobachteten Phänotyp. Eine verringerte Expression der Transkriptionsfaktoren bei Lipidakkumulation im Sinne einer Gegenregulation ist ebenfalls nicht bekannt. Zudem ist beschrieben, dass die Expression von FXR stark nahrungsabhängig ist und eine Beeinflussung der Daten hierdurch kann nicht ausgeschlossen werden (vgl. Kap. 5.5.2). Folglich kann diesem molekularen Netzwerk keine entscheidende Rolle für die Entstehung des Phänotyps zugeschrieben werden. Dennoch waren diese Gene die einzig differentiell exprimierten Gene bei weiblichen

Tieren von eNOS +/- Müttern. Eine weitere Exploration epigenetischer Mechanismen, regulatorischer Faktoren dieses Netzwerkes und deren Signalwege ist daher von Interesse.

Nur männliche Tiere mit eNOS +/- Vätern zeigten signifikant höhere Glykogenkonzentrationen der Leber ( $p < 0,001$  vs. Mutter WT/Vater WT). Zudem fiel gegenüber männlichen WT eine signifikant höhere Insulinkonzentration bei Beginn des ipGTT und eine signifikant erhöhte AUC für Insulin während des ipGTT auf. Dieser Phänotyp kann, wie bereits diskutiert, mit der Entwicklung einer zunehmenden Insulinresistenz in Zusammenhang gebracht werden. Im Einklang mit diesen Befunden zeigen Sugden et al., dass lediglich männliche Ratten, die während Gestation und Laktation einer *low protein* Diät ausgesetzt waren, eine relative Insulinresistenz aufweisen (127). Auch Zambrano et al. liefern Hinweise, dass männliche Tiere suszeptibler für die Entwicklung von Insulinresistenz sind, da sie im Vergleich zu weiblichen Tieren schon in jüngerem Alter eine Insulinresistenz entwickeln (142). Die signifikant erhöhte Expression des Glukosetransporters GLUT 2 stützt die Annahme weiter, dass es zur Ausprägung eines insulinresistenten Phänotyps bei männlichen Tieren mit eNOS +/- Vätern gekommen ist. GLUT 2 ist für etwa 90-97% des Transports von Glukose, Fruktose und Galaktose über die plasmatische, wie auch sinusoidale, Membran von Hepatozyten verantwortlich (143). Die niedrige Affinität des Transporters gegenüber Glukose ermöglicht einen bidirektionalen Fluss über die Zellmembran, der proportional zur intra-/extrazellulären Glukosekonzentration ist. Im Zusammenspiel mit der G6Pase bzw. der Hexokinase wird auf diesem Weg während Hungerphasen Glukose aus Hepatozyten in die Blutbahn freigesetzt, und nach der Nahrungsaufnahme Glukose in die Zelle aufgenommen. Unter Insulineinfluss wird GLUT 2 an der plasmatischen Hepatozytenmembran runterreguliert und die Endozytose des Insulinrezeptor-Insulinrezeptorsubstrat-Komplexes führt zur Internalisierung von GLUT 2 in die Zelle (144). Auf diesem Wege wird die hepatische Glukosefreisetzung reduziert und gleichzeitig, durch Inhibition glukoneogenetischer Enzyme, die endogene Glukoseproduktion unterbunden. Bei Hyperglykämie wird eine vermehrte Expression von GLUT 2 beobachtet, und dieser Effekt scheint der insulinabhängigen Downregulation überlegen. Bei Ratten mit Streptozotocin-induziertem Diabetes beispielsweise kommt es zu einer Normalisierung der Expression von GLUT 2 durch Korrektur der Hyperglykämie mittels Insulin (145). Entsprechend ist in einer Reihe von Tiermodellen bei Vorliegen von Insulinresistenz eine vermehrte Expression von GLUT 2

beobachtet worden (145)(146). Ozanne et al. zeigen diesen Zusammenhang auch bei männlichen Ratten nach *low protein* Diät während Schwangerschaft und Laktation (147). In ihrem Modell fällt eine signifikant höhere Insulinrezeptordichte auf Hepatozyten auf und bei Glukagonapplikation kommt es zu einer erhöhten hepatischen Glukosefreisetzung. In Anlehnung an die in Kap. 5.2. ausgeführten Zusammenhänge könnte somit auch die erhöhte Expression von GLUT 2 als ein Hinweis auf eine beginnende hepatische Insulinresistenz aufgefasst werden.

Es wird folglich deutlich, dass der heterozygote eNOS Knock-out grundsätzlich geschlechtsabhängige Programmierungseffekte induziert. Dabei scheinen männliche Tiere von eNOS +/- Vätern primär suszeptibel für die Entwicklung von Auffälligkeiten des Glukosestoffwechsels, während weibliche Tiere insbesondere Veränderungen des hepatischen Phänotyps aufweisen.

## **5.5 Diskussion ausgewählter Methoden**

### **5.5.1 *Oil red O* Methode zur Bestimmung des Lipidgehaltes der Lebern**

Die *Oil red O* Färbung nach Lille ist eine gut etablierte, aber unselektive Methode zur Darstellung von Triglyceriden und anderen Lipiden in Geweben. Anhand der vorliegenden Daten kann somit keine Aussage über die spezifische Zusammensetzung der eingelagerten Lipide getroffen werden. Auch die genaue Lokalisation der Lipideinlagerung wurde nicht systematisch untersucht. Ebenso wenig kann eine Aussage über begleitende, entzündliche Veränderungen getroffen werden, so dass lediglich das Vorliegen einer Lipideinlagerung, nicht aber weitere Ausprägungsgrade wie die Nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD, *Non Alcoholic Fatty Liver Disease*) oder die Nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH, *Non Alcoholic Steatohepatitis*) mit dieser Methode erkannt werden konnten.

### **5.5.2 Bestimmung des Glykogengehalts der Lebern**

In Anlehnung an die Methode von Bergmeyer et al. wurde mittels Amyloglukosidasemethode der Glykogengehalt der Lebern bestimmt (104). Der wichtigste Aspekt, der die Aussagekraft der Ergebnisse einschränkt, ist, dass die Tiere nicht alle zur gleichen Tageszeit getötet wurden und somit eine nahrungsabhängige Beeinflussung der Leberglykogenkonzentration nicht sicher ausgeschlossen werden

kann. Die Leber nimmt in Abhängigkeit des Blutglukosespiegels Glukose auf - oder setzt Glukose in die Blutbahn frei. Hohe postprandiale Insulinspiegel sind das erste Signal zum Aufbau von Glykogen. Untersuchungen von humanem Biopsiematerial und <sup>13</sup>C-NMRS Studien zeigen, dass während der postabsorptiven Phase der Leberglykogengehalt linear abnimmt, entsprechend eines etwa 40%-igen Anteils am Gesamtkörperumsatz von Glukose (148). Aufgrund der hohen Tierzahl sollte dennoch davon ausgegangen werden, dass sich ein solcher Effekt zufällig über alle Gruppen verteilt hat und somit als systematischer Fehler anzusehen ist. Ein Teil der beobachteten Variabilität des Phänotyps könnte jedoch hiermit möglicherweise erklärt werden, insbesondere auch hinsichtlich der Expressionsdaten.

### 5.5.3 Expressionsanalyse mittels rtPCR

Die Methode der rtPCR dient der Untersuchung der Expression von Genen. Entscheidende regulatorische Einflüsse auf die Translation sowie die posttranslationale Regulation können damit nicht erfasst werden. Da im vorliegenden Versuch aufgrund des beobachteten Phänotyps Enzyme des Intermediärstoffwechsels von besonderem Interesse waren, ist zu bemerken, dass mit dieser Methode über deren Aktivität keine Erkenntnis gewonnen werden kann. Damit fehlt die Möglichkeit der Beurteilung eines entscheidenden Aspekts der metabolischen Veränderungen. Weiterhin ist bezüglich der Ergebnisse der rtPCR zu bemerken, dass die beobachteten Expressionsunterschiede der meisten Gene zwischen den Gruppen relativ gering waren. Zudem fiel, wie in anderen Tiermodellen der fetalen Programmierung auch, eine vergleichbar hohe Variabilität der Expressionsdaten von identisch behandelten Tieren auf (z.B. (36)). Es ist daher zu diskutieren, ob es sich dabei um ein biologisches Phänomen im Rahmen von Programmierungsprozessen handeln könnte. Weiterhin könnte dies bedingt haben, dass - durch die Verwendung von Mittelwerten für die statischen Analysen und durch hohe interindividuelle Variabilität innerhalb einer Gruppe - bestehende Unterschiede zwischen den Gruppen nicht als signifikant auffielen. Zudem könnte dies durch den Abgleich gegen den Index von drei Housekeeper-Genen weiterhin begünstigt worden sein. Anhand der beobachteten interexperimentellen Varianz, Primereffizienz und der stabilen Ergebnisse für die verwendeten Housekeeper-Gene muss dennoch davon ausgegangen werden, dass es sich beim verwendeten Protokoll um eine sehr stabile, reproduzierbare und damit letztlich aussagekräftige Methode handelt.

#### 5.5.4 Intraperitonealer Glukosetoleranztest

Alle Tiere wurden vor Durchführung des ipGTT für sechs Stunden nüchtern gelassen. Allerdings wurden der ipGTT zu unterschiedlichen Tageszeiten durchgeführt, so dass eine Beeinflussung der Ergebnisse durch tageszeitliche Schwankungen der Cortisolkonzentrationen möglich scheint. Allerdings wurden die Tiere einer Gruppe nicht hintereinander untersucht, sondern diese mögliche Beeinflussung trifft auf Tiere aller Gruppen gleichermaßen zu. Allerdings ist es möglich, dass durch eine hierdurch erhöhte Variabilität sowohl Standardabweichung und –fehler beeinflusst wurden und somit mögliche Unterschiede nicht als signifikant detektierbar waren.

#### 5.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die von unserer Arbeitsgruppe um Berthold Hochoer in den wissenschaftlichen Diskurs eingeführte *Advanced Fetal Programming* Hypothese besagt, dass maternale Gene - ohne Weitergabe im Sinne der klassischen Vererbung – durch Beeinflussung des Schwangerschaftsverlaufes Programmierungseffekte auslösen, und bleibende Effekte auf die folgende Generation haben können. Diese Hypothese stützte sich bisher hauptsächlich auf Assoziationsstudien, die ihrer Natur gemäß keinen kausalen Beweis liefern können. Im vorliegenden Tiermodell wurden ausschließlich Wildtypnachkommen miteinander verglichen, die sich nur hinsichtlich des eNOS Genostatus ihrer Eltern, jedoch nicht bezüglich ihres eigenen unterscheiden. Es zeigte sich, dass der maternale eNOS Knockout im Sinne der *Advanced Fetal Programming* Hypothese als eine Determinante fetalen Wachstums zu werten ist und in der nachfolgenden Generation - ohne Weitergabe des Allels - zur Ausprägung eines spezifischen Phänotyps führt. Somit können die der *Advanced Fetal Programming* zugrunde liegenden Hypothesen für den heterozygoten eNOS Knock-out erstmalig bestätigt werden.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch durch den paternalen heterozygoten eNOS Knock-out offensichtlich fetale Programmierung induziert werden kann, welche zu dauerhaften Effekten auf den metabolischen Phänotyp führt. Paternale Programmierung findet im vorliegenden Versuch unabhängig vom Geburtsgewicht statt, so dass eine wesentliche Beeinflussung des intrauterinen Milieus (als klassischer Mechanismus der Programmierung) hier vermutlich nicht der kausale Mechanismus sein kann.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Effekte sowohl bei maternaler als auch paternaler induzierter Programmierung grundsätzlich geschlechtsspezifisch sind.

Die diskutierten Ergebnisse geben hinreichend Aufschluss über den beobachteten hepatisch-metabolischen Phänotyp, dringen aber hinsichtlich molekularer Ursachen vorerst nur bis zur Ebene einiger differentiell exprimierter Kandidatengene vor. In den letzten Jahren sind jedoch insbesondere epigenetische Mechanismen (z.B. differentielle Promotormethylierung) als ursächliche Faktoren der fetalen Programmierung erkannt worden. Im vorliegenden Versuch stehen Analysen epigenetischer Veränderungen zum aktuellen Zeitpunkt noch aus und konnten in die vorliegende Arbeit daher nicht mit aufgenommen werden. Es ist aber anzunehmen, dass durch diese Analysen besser verstanden werden kann, welche Mechanismen den beobachteten Effekten in unserem Modell zugrunde liegen. Zudem können sie einen Beitrag leisten, die - vermutlich unterschiedlichen - Mechanismen für Programmierung über den maternalen und paternalen Hintergrund zu erkennen. Ein weiterer Punkt, der durch zukünftige Untersuchungen geklärt werden sollte, ist die Frage inwieweit die beschriebenen Effekte in unserem Modell auch in zukünftigen Generationen nachweisbar sind. Diesbezüglich sind in den letzten Jahren sowohl in tierexperimentellen als auch in humanen Studien faszinierende Ergebnisse publiziert worden, welche die Weitergabe von durch Programmierung erworbenen Eigenschaften an nachfolgende Generationen vermuten lassen (149).

Seit den Beobachtungen von David Barker in England in den 80er Jahren, und davon ausgehend der Entwicklung des Konzeptes der Fetalen Programmierung, ist eine Fülle von Forschungsergebnissen auf diesem Gebiet publiziert worden. Ganz allgemein zeigt dieses Forschungsmaterial einen starken und dauerhaften Einfluss vieler modifizierbarer Größen (z.B. auch psychosozialer Stress, Ernährung, etc.) auf das allgemeine Erkrankungsrisiko und nicht - wie ursprünglich angenommen - nur auf das kardiovaskuläre Krankheitsrisiko. Daraus ergibt für das Gebiet der fetalen Programmierung eine Vielzahl an Implikationen für die präventive Medizin, welche eine weitere Exploration in Zukunft bedingen sollte.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1986 Mai;1:1077-81.
2. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 1989;2:577-80.
3. Osmond C, Barker DJ, Winter PD, Fall CH, Simmonds SJ. Early growth and death from cardiovascular disease in women. *BMJ* 1993;307:1519-24.
4. Silveira PP, Portella AK, Goldani MZ, Barbieri MA. Developmental origins of health and disease (DOHaD). *J Pediatr (RioJ)* 2007;83:494-504.
5. Eriksson J, Forsén T, Tuomilehto J, Osmond C, Barker D. Fetal and childhood growth and hypertension in adult life. *Hypertension* 2000;3:790-4.
6. Gamborg M, Byberg L, Rasmussen F, et al. Birth weight and systolic blood pressure in adolescence and adulthood: meta-regression analysis of sex- and age-specific results from 20 Nordic studies. *Am J Epidemiol* 2007;166:634-45.
7. Lamarck J. Philosophie Zoologique, ou exposition des Considérations relatives à l'histoire naturelle des Animaux; à la diversité de leur organisation et des facultés qu'ils en obtiennent. 1st ed. Paris, France: Dentu et l'Auteur, 1809.
8. Lorenz K. Der Kumpan in der Umwelt des Vogels. *Journal für Ornithologie* 1935;83:137-215 und 289-413.
9. Dörner G, Mohnike A, Thoenke H. Further evidence for the dependence of diabetes prevalence on nutrition in perinatal life. *Exp Clin Endocrinol* 1984;84:129-33.
10. Lucas A, Morley R, Cole TJ. Randomised trial of early diet in preterm babies and later intelligence quotient. *BMJ* 1998;317:1481-7.
11. Widdowson EM, McCance RA. A review: new thoughts on growth. *Pediatr Res* 1975;9:154-6.
12. Forsdahl A. Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic heart disease? *Br J Prev Soc Med* 1977;31:91-5.
13. Hinkle LE. Coronary heart disease and sudden death in actively employed American men. *Bull NY Acad Med* 1973;49:467-74.
14. Rich-Edwards JW, Stampfer MJ, Manson JE, et al. Birth weight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976. *BMJ* 1997;315:396-400.
15. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992;35:595-601.



16. NEEL JV. Diabetes mellitus: a „thrifty“ genotype rendered detrimental by „progress“? *Am J Hum Genet* 1962;14:353-62.
17. McMillen IC, Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* 2005;85:571-633.
18. Hocher B, Slowinski T, Bauer C, Halle H, Siffert W. The advanced fetal programming hypothesis. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:1298-9.
19. Hocher B, Slowinski T, Stolze T, Pleschka A, Neumayer H-H, Halle H. Association of maternal G protein beta 3 subunit 825T allele with low birthweight. *Lancet* 2000;355:1241-2.
20. Masuda K, Osada H, Iitsuka Y, Seki K, Sekiya S. Positive association of maternal G protein beta 3 subunit 825T allele with reduced head circumference at birth. *Pediatr Res* 2002;52:687-91.
21. Wang X, Zuckerman B, Pearson C, et al. Maternal cigarette smoking, metabolic gene polymorphism, and infant birth weight. *JAMA* 2002;287:195-202.
22. Hattersley AT, Tooke JE. The fetal insulin hypothesis: an alternative explanation of the association of low birthweight with diabetes and vascular disease. *Lancet* 1999;353:1789-92.
23. Vuguin PM. Animal models for small for gestational age and fetal programming of adult disease. *Horm Res* 2007;68:113-23.
24. McMullen S, Mostyn A. Animal models for the study of the developmental origins of health and disease. *Proc Nutr Soc* 2009;68:306-20.
25. Langenveld J, Lu F, Bytautiene E, Anderson GD, Saade GR, Longo M. In utero programming of adult vascular function in transgenic mice lacking low-density lipoprotein receptor. *Am J Obstet Gynecol* 2008;199:165.e1-5.
26. Longo M, Jain V, Vedernikov YP, et al. Fetal origins of adult vascular dysfunction in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R1114-21.
27. Crossey PA, Pillai CC, Miell JP. Altered placental development and intrauterine growth restriction in IGF binding protein-1 transgenic mice. *J Clin Invest* 2002 Aug;110:411-8.
28. Constância M, Hemberger M, Hughes J, et al. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature* 2002;417:945-8.
29. Ong KK. Size at birth, postnatal growth and risk of obesity. *Horm Res* 2006;65 Suppl 3:65-69.
30. Ravelli AC, van der Meulen JH, Michels RP, et al. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet* 1998;351:173-7.

31. Nyirenda MJ, Lindsay RS, Kenyon CJ, Burchell A, Seckl JR. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. *J Clin Invest* 1998;101:2174-81.
32. Brenner BM. The etiology of adult hypertension and progressive renal injury: an hypothesis. *Bull Mem Acad R Med Belg* 1994;149:121-7.
33. Vaessen N, Janssen JA, Heutink P, et al. Association between genetic variation in the gene for insulin-like growth factor-I and low birthweight. *Lancet* 2002 März;359:1036-7.
34. Maas JM, Mook-Kanamori DO, Ay L, et al. Insulin VNTR and IGF-1 Promoter Region Polymorphisms Are Not Associated with Body Composition in Early Childhood: The Generation R Study. *Horm Res Paediatr* 2010;73:120-7.
35. Frayling TM, Hattersley AT, McCarthy A, et al. A putative functional polymorphism in the IGF-I gene: association studies with type 2 diabetes, adult height, glucose tolerance, and fetal growth in U.K. populations. *Diabetes* 2002;51:2313-6.
36. Weedon MN, Clark VJ, Qian Y, et al. A common haplotype of the glucokinase gene alters fasting glucose and birth weight: association in six studies and population-genetics analyses. *Am J Hum Genet* 2006;79:991-1001.
37. Pfab T, Poralla C, Richter C-M, et al. Fetal and maternal peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 Pro12Ala does not influence birth weight. *Obesity* 2006;14:1880-5.
38. Croyley JE, Suter CM, Beckman KB, Martin DIK. Germ-line epigenetic modification of the murine A vy allele by nutritional supplementation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:17308-12.
39. Waterland RA, Jirtle RL. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol* 2003;23:5293-5300.
40. Grigore D, Ojeda NB, Alexander BT. Sex differences in the fetal programming of hypertension. *Gend Med* 2008;5 Suppl A:S121-132.
41. Moritz KM, Cuffe JSM, Wilson LB, et al. Review: Sex specific programming: a critical role for the renal renin-angiotensin system. *Placenta* 2010;31:S40-6.
42. Anderson LM, Riffle L, Wilson R, Travlos GS, Lubomirski MS, Alvord WG. Preconceptional fasting of fathers alters serum glucose in offspring of mice. *Nutrition* 2006;22:327-31.
43. Ng SF, Lin RY, 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. Carone BR, Fauquier L, Habib N, et al. Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell* 2010;143:1084-96.

45. Kaati G, Bygren LO, Edvinsson S. Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. *Eur J Hum Genet* 2002;10:682-8.
46. Pembrey ME, Bygren LO, Kaati G, et al. Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. *Eur J Hum Genet* 2006;14:159-66.
47. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-6.
48. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:9265-9.
49. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-6.
50. Nishida CR, de Montellano PR. Control of electron transfer in nitric-oxide synthases. Swapping of autoinhibitory elements among nitric-oxide synthase isoforms. *J Biol Chem* 2001;276:20116-24.
51. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329:2002-12.
52. Huang PL. Mouse models of nitric oxide synthase deficiency. *J Am Soc Nephrol* 2000;11 Suppl 16:S120-123.
53. Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Förstermann U, Murad F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett* 1993;316:175-80.
54. Zhou L, Zhu D-Y. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide* 2009;20:223-30.
55. Dedkova EN, Blatter LA. Characteristics and function of cardiac mitochondrial nitric oxide synthase. *J Physiol (London)* 2009;587:851-72.
56. Persichini T, Cantoni O, Suzuki H, Colasanti M. Cross-Talk Between Constitutive and Inducible NO Synthase: An Update. *Antioxid Redox Signaling* 2006;9:949-54.
57. Loscalzo J, Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis*;38:87-104.
58. Igarashi J, Michel T. S1P and eNOS regulation. *Biochim Biophys Acta* 2008;1781:489-95.
59. Shesely EG, Maeda N, Kim H-S, et al. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:13176-81.

60. Van Vliet BN, Chafe LL. Maternal endothelial nitric oxide synthase genotype influences offspring blood pressure and activity in mice. *Hypertension* 2007;49:556-62.
61. Costantine MM, Ghulmiyyah LM, Tamayo E, Hankins GDV, Saade GR, Longo M. Transgenerational effect of fetal programming on vascular phenotype and reactivity in endothelial nitric oxide synthase knockout mouse model. *Am J Obstet Gynecol* 2008;199:250.e1-7.
62. Longo M, Jain V, Langenveld J, et al. Embryo transfer prevents development of abnormal vascular function in offspring of endothelial nitric oxide synthase knockout mice. *J Soc Gynecol Investig* 2005;(11):294 A.
63. Kojda G, Laursen JB, Ramasamy S, et al. Protein expression, vascular reactivity and soluble guanylate cyclase activity in mice lacking the endothelial cell nitric oxide synthase: contributions of NOS isoforms to blood pressure and heart rate control. *Cardiovasc Res* 1999;42:206-13.
64. Kojda G, Cheng YC, Burchfield J, Harrison DG. Dysfunctional regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in response to exercise in mice lacking one eNOS gene. *Circulation* 2001;103:2839-44.
65. Fagan KA, Fouty BW, Tyler RC, et al. The pulmonary circulation of homozygous or heterozygous eNOS-null mice is hyperresponsive to mild hypoxia. *J Clin Invest* 1999;103:291-9.
66. Shankar RR, Wu Y, Shen HQ, Zhu JS, Baron AD. Mice with gene disruption of both endothelial and neuronal nitric oxide synthase exhibit insulin resistance. *Diabetes* 2000;49:684-7.
67. Duplain H, Burcelin R, Sartori C, et al. Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2001;104:342-5.
68. Schild L, Dombrowski F, Lendeckel U, Schulz C, Gardemann A, Keilhoff G. Impairment of endothelial nitric oxide synthase causes abnormal fat and glycogen deposition in liver. *Biochim Biophys Acta* 2008;1782:180-7.
69. Jobgen WS, Fried SK, Fu WJ, Meininger CJ, Wu G. Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *J Nutr Biochem* 2006;17:571-88.
70. Mossman HW. Classics revisited: Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. *Placenta* 1991;12:1-5.
71. Vatish M, Randeva HS, Grammatopoulos DK. Hormonal regulation of placental nitric oxide and pathogenesis of pre-eclampsia. *Trends Mol Med* 2006;12:223-33.
72. Purcell TL, Given R, Chwalisz K, Garfield RE. Nitric oxide synthase distribution during implantation in the mouse. *Mol Hum Reprod* 1999;5:467-75.

73. Gaglioti S, Scavone C, Bevilacqua E. Participation of the mouse implanting trophoblast in nitric oxide production during pregnancy. *Biol Reprod* 2000;62:260-8.
74. Nanaev A, Chwalisz K, Frank HG, Kohnen G, Hegele-Hartung C, Kaufmann P. Physiological dilation of uteroplacental arteries in the guinea pig depends on nitric oxide synthase activity of extravillous trophoblast. *Cell Tissue Res* 1995;282:407-21.
75. Bird IM, Zhang L, Magness RR. Possible mechanisms underlying pregnancy-induced changes in uterine artery endothelial function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;284:R245-58.
76. Sladek SM, Magness RR, Conrad KP. Nitric oxide and pregnancy. *Am J Physiol* 1997;272:R441-63.
77. Magness RR, Sullivan JA, Li Y, Phernetton TM, Bird IM. Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. VI. Ovarian and pregnancy effects on eNOS and NO(x). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H1692-8.
78. Thaete LG, Kushner DM, Dewey ER, Neerhof MG. Endothelin and the regulation of uteroplacental perfusion in nitric oxide synthase inhibition-induced fetal growth restriction. *Placenta* 2005;26:242-50.
79. Diket AL, Pierce MR, Munshi UK, et al. Nitric oxide inhibition causes intrauterine growth retardation and hind-limb disruptions in rats. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:1243-50.
80. Molnár M, Sütö T, Tóth T, Hertelendy F. Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in gravid rats produces sustained hypertension, proteinuria, thrombocytopenia, and intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:1458-66.
81. Hefler LA, Reyes CA, O'Brien WE, Gregg AR. Perinatal development of endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Biol Reprod* 2001;64:666-73.
82. van der Heijden OH, Essers YG, Fazzi G, Peeters LH, De Mey JR, van Eys GM. Uterine artery remodeling and reproductive performance are impaired in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Biol Reprod* 2005;72:1161-8.
83. Pallares P, Gonzalez-Bulnes A. Intrauterine growth retardation in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice is established from early stages of pregnancy. *Biol Reprod* 2008;78:1002-6.
84. Pallares P, Perez-Solana ML, Torres-Rovira L, Gonzalez-Bulnes A. Phenotypic Characterization by High-Resolution Three-Dimensional Magnetic Resonance Imaging Evidences Differential Effects of Embryo Genotype on Intrauterine Growth Retardation in NOS3-Deficient Mice. *Biol Reprod* 2011;84:866-71

85. Helmbrecht GD, Farhat MY, Lochbaum L, et al. L-arginine reverses the adverse pregnancy changes induced by nitric oxide synthase inhibition in the rat. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:800-5.
86. Casanello P, Sobrevia L. Intrauterine Growth Retardation Is Associated With Reduced Activity and Expression of the Cationic Amino Acid Transport Systems  $y^+/hCAT-1$  and  $y^+/hCAT-2B$  and Lower Activity of Nitric Oxide Synthase in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Circ Res* 2002;91:127-34.
87. Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest* 1998;101:731-6.
88. van der Heijden OH, Essers YG, Spaanderman MA, De Mey JR, van Eys GM, Peeters LH. Uterine artery remodeling in pseudopregnancy is comparable to that in early pregnancy. *Biol Reprod* 2005;73:1289-93.
89. Prevalence estimates of diabetes mellitus (DM) 2010. *Diabetes Atlas*. Brussels: International Diabetes Foundation 2010. (Accessed June 6 2011, at <http://www.diabetesatlas.org/content/prevalence-estimates-diabetes-mellitus-dm-2010>)
90. Hales CN, Barker DJ, Clark PM, et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* 1991;303:1019–22.
91. Pfab T, Slowinski T, Godes M, Halle H, Priem F, Hocher B. Low birth weight, a risk factor for cardiovascular diseases in later life, is already associated with elevated fetal glycosylated hemoglobin at birth. *Circulation* 2006;114:1687-92.
92. Yajnik CS, Fall CH, Vaidya U, et al. Fetal growth and glucose and insulin metabolism in four-year-old Indian children. *Diabet Med* 1995;12:330-6.
93. Harder T, Rodekamp E, Schellong K, Dudenhausen JW, Plagemann A. Birth weight and subsequent risk of type 2 diabetes: a meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2007;165:849-57.
94. Whincup PH, Kaye SJ, Owen CG, et al. Birth weight and risk of type 2 diabetes: a systematic review. *JAMA* 2008;300:2886-97.
95. Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ. Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *J Appl Physiol* 2006;21:29-37.
96. Armitage JA, Khan IY, Taylor PD, Nathanielsz PW, Poston L. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? *J Physiol (London)* 2004;561:355-77.
97. Postic C, Dentin R, Girard J. Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes Metab* 2004;30:398-408.
98. Massa ML, Gagliardino JJ, Francini F. Liver glucokinase: An overview on the regulatory mechanisms of its activity. *IUBMB Life* 201;63:1-6.

99. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. Biochemie und Pathobiochemie. 8th ed. Heidelberg, Germany: Springer, 2007.
100. Raddatz D, Ramadori G. Carbohydrate Metabolism and the Liver: Actual Aspects from Physiology and Disease. *Z Gastroenterol* 2007;45:51-62.
101. Gödecke A, Decking UK, Ding Z, et al. Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circ Res* 1998;82:186-94.
102. Burns SP, Desai M, Cohen RD, et al. Gluconeogenesis, glucose handling, and structural changes in livers of the adult offspring of rats partially deprived of protein during pregnancy and lactation. *J Clin Invest* 1997;100:1768-74.
103. Lillie R, Ashburn L. Supersaturated solutions of fat stains in dilute isopropanol for demonstration of acute fatty degeneration not shown by Herxheimers's technique. *Arch Path* 1943;432:432-440.
104. Bergmeyer H.U. Methoden der enzymatischen Analyse. 1st ed. Weinheim/Bergstr., Germany: Verlag Chemie, 1962.
105. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-9.
106. Katz A, Nambi SS, Mather K, et al. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2402-10.
107. Scheffe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel „gene expression's CT difference“ formula. *J Mol Med* 2006;84:901-10.
108. Gilsbach R, Kouta M, Bönisch H, Brüß M. Comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of real-time PCR data. *BioTechniques* 2006;40:173-7.
109. Frericks M, Esser C. A toolbox of novel murine house-keeping genes identified by meta-analysis of large scale gene expression profiles. *Biochim Biophys Acta* 2008;1779:830-7.
110. Langley SC, Browne RF, Jackson AA. Altered glucose tolerance in rats exposed to maternal low protein diets in utero. *Comp Biochem Physiol Physiol* 1994;109:223-9.
111. Ozanne SE, Wang CL, Coleman N, Smith GD. Altered muscle insulin sensitivity in the male offspring of protein-malnourished rats. *Am J Physiol* 1996;271:E1128-34.
112. Ozanne SE, Nave BT, Wang CL, Shepherd PR, Prins J, Smith GD. Poor fetal nutrition causes long-term changes in expression of insulin signaling components in adipocytes. *Am J Physiol* 1997;273:E46-51.

113. Ozanne SE, Olsen GS, Hansen LL, et al. Early growth restriction leads to down regulation of protein kinase C zeta and insulin resistance in skeletal muscle. *J Endocrinol* 2003;177:235-41.
114. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. Geneva, Switzerland: World Health Organization Publications. (Accessed March 10, 2011 at <http://www.who.int/diabetes/publications/en>)
115. Fraser A, Ebrahim S, Smith GD, Lawlor DA. The associations between birthweight and adult markers of liver damage and function. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2008;22:12-21.
116. Drake AJ, Raubenheimer PJ, Kerrigan D, McInnes KJ, Seckl JR, Walker BR. Prenatal dexamethasone programs expression of genes in liver and adipose tissue and increased hepatic lipid accumulation but not obesity on a high-fat diet. *Endocrinology* 2010;151:1581-7.
117. Matsumoto M, Han S, Kitamura T, Accili D. Dual role of transcription factor FoxO1 in controlling hepatic insulin sensitivity and lipid metabolism. *J Clin Invest* 2006;116:2464-72.
118. Samuel VT, Beddow SA, Iwasaki T, et al. Fasting hyperglycemia is not associated with increased expression of PEPCK or G6Pc in patients with Type 2 Diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:12121-6.
119. Liu Y, Nakagawa Y, Wang Y, et al. Reduction of hepatic glucocorticoid receptor and hexose-6-phosphate dehydrogenase expression ameliorates diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *J Mol Endocrinol* 2008;41:53-64.
120. Vuguin P, Raab E, Liu B, Barzilai N, Simmons R. Hepatic insulin resistance precedes the development of diabetes in a model of intrauterine growth retardation. *Diabetes* 2004;53:2617-22.
121. Bugianesi E, McCullough AJ, Marchesini G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology* 2005;42:987-1000.
122. Kim JK, Fillmore JJ, Chen Y, et al. Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:7522-7.
123. Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, Daley EA, Chisholm DJ, Storlien LH. Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats. *Diabetes* 1991;40:1397-1403.
124. Gouge RC, Marshburn P, Gordon BE, Nunley W, Huet-Hudson YM. Nitric oxide as a regulator of embryonic development. *Biol Reprod* 1998;58:875-9.
125. Gutiérrez-Adán A, Perez-Crespo M, Fernandez-Gonzalez R, et al. Developmental Consequences of Sexual Dimorphism During Pre-implantation Embryonic Development. *Reprod Domest Anim* 2006;41:54-62.



126. McMullen S, Langley-Evans SC. Sex-Specific Effects of Prenatal Low-Protein and Carbenoxolone Exposure on Renal Angiotensin Receptor Expression in Rats. *Hypertension* 2005;46:1374-80.
127. Sugden MC, Holness MJ. Gender-specific programming of insulin secretion and action. *J Endocrinol* 2002;175:757-67.
128. McMullen S, Langley-Evans SC. Maternal low-protein diet in rat pregnancy programs blood pressure through sex-specific mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R85-90.
129. Tiffin GJ, Rieger D, Betteridge KJ, Yadav BR, King WA. Glucose and glutamine metabolism in pre-attachment cattle embryos in relation to sex and stage of development. *J Reprod Fertil* 199;93:125-32.
130. Jones RH, Ozanne SE. Fetal programming of glucose-insulin metabolism. *Mol Cell Endocrinol* 2009;297:4-9.
131. Qasem RJ, Cherala G, D'mello AP. Maternal protein restriction during pregnancy and lactation in rats imprints long-term reduction in hepatic lipid content selectively in the male offspring. *Nutr Res* 2010;30:410-7.
132. Erhuma A, Salter AM, Sculley DV, Langley-Evans SC, Bennett AJ. Prenatal exposure to a low-protein diet programs disordered regulation of lipid metabolism in the aging rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;292:E1702-14.
133. Choi GY, Tosh DN, Garg A, Mansano R, Ross MG, Desai M. Gender-specific programmed hepatic lipid dysregulation in intrauterine growth-restricted offspring. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196:e1-7.
134. Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD, Uyeda K. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:7281-6.
135. Koo SH, Dutcher AK, Towle HC. Glucose and insulin function through two distinct transcription factors to stimulate expression of lipogenic enzyme genes in liver. *J Biol Chem* 2001;276:9437-45.
136. Liang G, Yang J, Horton JD, Hammer RE, Goldstein JL, Brown MS. Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *J Biol Chem* 2002;277:9520-8.
137. Iizuka K, Horikawa Y. ChREBP: a glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome. *Endocr J* 2008;55:617-24.
138. Dentin R, Benhamed F, Hainault I, et al. Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes* 2006;55:2159-70.
139. Ma K, Saha PK, Chan L, Moore DD. Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J Clin Invest* 2006;116:1102-9.

140. Cariou B. The farnesoid X receptor (FXR) as a new target in non-alcoholic steatohepatitis. *Diabetes Metab* 2008;34:685-91.
141. Zhu Y, Li F, Guo GL. Tissue-specific function of farnesoid X receptor in liver and intestine. *Pharm Res* 2011;63:259-65.
142. Zambrano E, Bautista CJ, Deás M, et al. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *J Physiol (London)* 2006;571:221-30.
143. Nathan JD, Zdankiewicz PD, Wang J, et al. Impaired hepatocyte glucose transport protein (GLUT2) internalization in chronic pancreatitis. *Pancreas* 2001;22:172-8.
144. Eisenberg ML, Maker AV, Slezak LA, et al. Insulin receptor (IR) and glucose transporter 2 (GLUT2) proteins form a complex on the rat hepatocyte membrane. *Cell Physiol Biochem* 2005;15:51-8.
145. Gelardi NL, Rapoza RE, Renzulli JF, Cowett RM. Insulin resistance and glucose transporter expression during the euglycemic hyperinsulinemic clamp in the lamb. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1999;277:E1142-9.
146. Yamamoto T, Fukumoto H, Koh G, et al. Liver and muscle-fat type glucose transporter gene expression in obese and diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;175:995-1002.
147. Ozanne SE, Smith GD, Tikerpae J, Hales CN. Altered regulation of hepatic glucose output in the male offspring of protein-malnourished rat dams. *Am J Physiol* 1996;270:E559-64.
148. Wahren J, Ekberg K. Splanchnic Regulation of Glucose Production. *Annu Rev Nutr* 2007;27:329-45.
149. Matthews SG, Phillips DIW. Minireview: transgenerational inheritance of the stress response: a new frontier in stress research. *Endocrinology* 2010;151:7-13.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK- $\alpha$ 2	AMP Activated Protein Kinase alpha 2, catalytic subunit
APES	3-Amino-Propyl-Triethoxysilan
Aqua dest	Aqua destillata, destilliertes Wasser
Aqua bidest	Aqua bidestilla, zweifach destilliertes Wasser
Aqua ad inject	Aqua ad iniectabilia
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area Under the Curve
BP	Basenpaare
CHREBP	Carbohydrate Response Element Binding Protein
CpG	Cytosin-Phosphatidyl-Guanin
C <sub>t</sub>	Threshold Cycle
CPT1A	Carnitine Palmitoyltransferase 1A
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	komplementäre DNA
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DM	Diabetes mellitus
DM Typ II	Diabetes mellitus Typ II
EDRF	Endothelium Derived Relaxing Factor
eNOS	endotheliale NO Synthase
eNOS -/-	homozygoter eNOS Knock-out
eNOS +/-	heterozygoter eNOS Knock-out
et al.	und andere
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAS	Fatty Acid Synthase, Fettsäuresynthase
FBPase	Fruktose-1,6-Bisphosphatase
FMN	Flavinmononucleotid
FXR	Fragile X Mental Retardation Syndrome Related Protein
GK	Glukokinase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GLUT 1/2	Glukosetransporter 1/2
GMP	Guanosinmonophosphat
GR	Glukokortikoidrezeptor
G6Pase	Glukose-6-Phosphatase
G6PDH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
HE	Hämatoxylin-Eosin
HOMA	Homeostasis Assesment Model
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells, Nabelschnurendothelzellen
HPRT	Hypoxanthin Phosphoribosyl Transferase
IGF-1/2	Insulin like Growth Factor 1/2
IGF-BP 1/2/3	Insulin like Growth Factor Bindeprotein 1/2
ipGTT	Intraperitonealer Glukosetoleranztest
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
insb.	insbesondere
IUGR	Intrauterine Growth Restriction, intrauterine Wachstumsretardierung

---

Kap.	Kapitel
KHK	Koronare Herzkrankheit
KO	Knock-out
LDL	Low Density Lipoprotein
Lipe/HSL	Hormone Sensitive Lipase, Hormonsensitive Lipase
min	Minute
mRNA	Messenger RNA
mtNOS	mitochondriale Stickstoffmonoxidsynthase
NAD	Nikotinamid Adenin Dinukleotid
NADP /H	Nicotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid Synthase
PCR	Polymerase Chain Reaktion; Polymerase Ketten Reaktion
PEP-CK	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase
PPAR- $\alpha/\gamma$	Peroxisom Proliferator Activated Receptor alpha/gamma
PPAR- $\gamma$ CoA1- $\alpha$	Peroxisom Proliferator Activated Receptor Coactivator 1 alpha
QUICKI	Quantitative Insulin Sensitivity Check Index
RNA	Ribodesoxynukleinsäure
rtPCR	Real Time Polymerase Ketten Reaktion
RR	Blutdruckmessung nach Riva-Rocci
RT	reverse Transkriptase, Raumtemperatur
sGC	soluble Guanylatcyclase, lösliche Form der Guanylatzyklase
sGMP	soluble Guanosinomonophosphat, lösliches Guanosinomonophosphat
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannte
sNP	Single Nukleotid Polymorphismus
SREBF1c	Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1
ssRNA	Einzelstrang RNA
Tab.	Tabelle
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
VNTR-INS	Variable Number of Tandem Repeats Region des Insulin Gens
WT	Wildtyp, Wildtyptier

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Die <i>Advanced Fetal Programming</i> Hypothese .....	6
aus: Hocher B, Slowinski T, Bauer C, Halle H, Siffert W. The advanced fetal programming hypothesis. <i>Nephrol Dial Transplant</i> 2001;16:1298-9.	
Abb. 2: Kreuzungsschema der Versuchstiere .....	26
Abb. 3: Versuchsdesign.....	27
Abb. 4: Körpergewichte bei Geburt der Tiere .....	47
Abb. 5: Körpergewichte weiblicher und männlicher Tiere bei Geburt.....	48
Abb. 6: Körpergewichte der Tiere von Geburt bis Tag 13.....	49
Abb. 7: Körpergewichte der Tiere Geburt bis Tag 40 .....	50
Abb. 8: Körpergewichte der Tiere im gesamten Beobachtungszeitraum.....	51
Abb. 9: Körpergewichte der männlichen Tiere Geburt bis Tag 13 .....	52
Abb. 10: Körpergewichte der männlichen Tiere Geburt bis Tag 140 .....	53
Abb. 11: Gewichtsverlauf der weiblichen Tiere Geburt bis Tag 40 .....	54
Abb. 12: Gewichtsverlauf der weiblichen Tiere Geburt bis Tag 140 .....	55
Abb. 13: Körperlänge aller Tiere Geburt bis Tag 13 .....	57
Abb. 14: Körperlänge männlicher Tiere Geburt bis Tag 13 .....	57
Abb. 15: Körperlänge weiblicher Tiere Geburt bis Tag 13 .....	58
Abb. 19: Absolutes Lebergewicht .....	59
Abb. 20: Plasmaglukosekonzentrationen der nüchternen Tiere in Versuchswoche 21. 63	
Abb. 21: Nüchterninsulinkonzentration in Versuchswoche 17 .....	63
Abb. 22: Nüchterninsulinkonzentration in Versuchswoche 21 .....	64
Abb. 23: Plasmaglukosekonzentrationen während des ipGTT .....	66
Abb. 24: Plasmaglukosekonzentrationen männlicher Tiere während des ipGTT .....	66
Abb. 25: Plasmaglukosekonzentrationen weiblicher Tiere während des ipGTT .....	67
Abb. 26: Insulinkonzentrationen während des ipGTT .....	69
Abb. 27: Insulinkonzentrationen männlicher Tiere während des ipGTT .....	70
Abb. 28: Insulinkonzentrationen weiblicher Tiere während des ipGTT .....	70
Abb. 29: Prozentualer Anteil Red Oil positiver Fläche .....	72
Abb. 30: Glykogengehalt der Lebern .....	72
Abb. 31: Glykogengehalt der Lebern .....	73

## 9 Zusammenfassung

**Hintergrund:** Im Sinne der *Advanced Fetal Programming* Hypothese stellen maternale Gene Determinanten fetalen Wachstums und damit des späteren Krankheitsrisikos dar. NO ist ein wichtiger Mediator für die Entwicklung und Regulation des utero-plazentaren Gefäßbettes und beeinflusst intrauterines Wachstum. eNOS ist an der Bereitstellung von NO in der Plazenta maßgeblich beteiligt. Intrauterine Wachstumseinschränkung ist mit der Entwicklung einer Insulinresistenz assoziiert. Ein maternaler heterozygoter eNOS Knock-out könnte somit durch Auswirkungen auf die plazentare NO Verfügbarkeit dauerhafte Störungen des Glukosestoffwechsels programmieren. Zudem liegen Hinweise auf Programmierungseffekte über die paternale Linie vor, so dass auch solche für den heterozygoten eNOS Knock-out überprüft werden sollen.

**Methoden:** Im Mausmodell wurden 134 ausschließlich genetisch gesunde Nachkommen heterozygoter eNOS knock-out Elterntiere über 25 Wochen gehalten. Es wurde untersucht, wie sich diese von genetisch gesunden Nachkommen einer reinen Wildtypverpaarung unterscheiden. Mögliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen genetisch gesunder Nachkommen können in diesem Design nicht durch klassische Vererbungsmechanismen erklärt werden. Von Geburt bis zur 20. Lebenswoche wurde das Körpergewicht der Tiere erfasst. Blutentnahmen für Nüchternglukosemessungen wurden in Woche 13, 17 und 21 vorgenommen. In Woche 24 wurde ein intraperitonealer Glukosetoleranztest (ipGTT) durchgeführt. Insulinkonzentrationen wurden aus Nüchternplasmen der Woche 17 und 21, sowie aus Plasmen des ipGTT, bestimmt. Nach Tötung der Tiere in Woche 25 wurden die Lebern entnommen und deren Gewicht erfasst. Histologisch wurde durch H.E. Färbung der mittlere Läppchendurchmesser und durch Oil Red O Färbung der Lipidgehalt der Lebern ermittelt. Mittels Amyloglukosidasemethode wurde der hepatische Glykogengehalt bestimmt. Die Expression wichtiger Kandidatengene für die Regulation des hepatischen Glukose- und Fettstoffwechsels sowie der hepatischen Insulinresistenz wurden mittels rtPCR gemessen. Zur Erfassung der Nierenfunktion wurden in Woche 12, 18 und 23 Stoffwechselfersuche durchgeführt und in Woche 10, 19 und 24 der systolische Blutdruck mittels *tail cuff* Methode gemessen.

**Ergebnisse:** Tiere mit eNOS +/- Müttern wurden signifikant leichter geboren, wobei dies auch auf männliche Tiere zutraf. Postnatal verlor sich der Gewichtsunterschied und Tiere dieser Gruppe waren vom 13. - 32. Lebenstag, weibliche Tiere auch darüber

hinaus, signifikant schwerer als Kontrolltiere. Eine hepatische Lipidakkumulation war das wesentliche phänotypische Merkmal, insbesondere bei weiblichen Tieren. Letztere hatten auch ein signifikant höheres absolutes Lebergewicht. In Woche 21 hatten diese Tiere signifikant niedrigere Nüchtern glukosekonzentrationen und einen starken Trend zu niedrigeren Nüchterninsulinkonzentrationen ( $p=0,054$  vs. Mutter WT/Vater WT). Im ipGTT in Versuchswoche 24 fielen signifikant höhere Glukosekonzentrationen nach 15 Minuten, wie auch eine signifikant höhere AUC für Glukose, auf.

Die Geburtsgewichte von Tieren mit eNOS +/- Vätern unterschieden sich nicht signifikant von Kontrolltieren, allerdings waren sie vom 11.–34. Lebenstag, weibliche Tiere auch darüber hinaus, signifikant schwerer. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wiesen diese Tiere in Woche 21 signifikant höhere Nüchtern glukosekonzentrationen auf. Männliche Tiere dieser Gruppe hatten zudem in Woche 17 signifikant höhere Nüchterninsulinkonzentrationen. Während des ipGTT hatten Tiere mit eNOS +/- Vätern die höchsten Insulinkonzentrationen. Die AUC für Insulin zeigte sich von 0-15 Minuten signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht, und einen entsprechend starken Trend für den gesamten ipGTT ( $p=0,054$  vs. Mutter WT/Vater WT). Ähnliche Veränderungen für Insulin hatten nur männliche Tiere. Weiterhin zeigten diese Tiere signifikant höhere hepatische Glykogen- und Lipideinlagerungen, wobei geschlechtsspezifisch erstere bei männlichen, letztere bei weiblichen Tiere ausgeprägt waren.

Die durchgeführten Expressionsanalysen lieferten Hinweise auf einige differentiell exprimierte Gene. Hinsichtlich weiterer phänotypischer Merkmale zeigten sich keine relevanten Gruppenunterschiede.

**Schlussfolgerungen:** Es konnte gezeigt werden, dass der maternale heterozygote eNOS Knockout im Sinne der *Advanced Fetal Programming* Hypothese in der nachfolgenden Generation zur Ausprägung eines niedrigeren Geburtsgewichtes sowie eines spezifischen hepato-metabolischen Phänotyps führt. Die der *Advanced Fetal Programming* Hypothese zugrunde liegenden Annahmen konnten somit für den maternale heterozygoten eNOS Knock-out bestätigt werden. Auch der paternale heterozygote eNOS Knock-out war mit der Ausprägung spezifischer phänotypischer Veränderungen des Glukosestoffwechsels und der Leber assoziiert. Grundsätzlich waren bei maternal und paternal induzierter Programmierung geschlechtsspezifische Effekte zu beobachten. Hinsichtlich molekularer Ursachen dringt die Studie nur bis zur Ebene einiger differentiell exprimierter Kandidatengene vor. Epigenetische Untersuchungen könnten zum weiteren ursächlichen Verständnis beitragen.

## **10 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



---

## 11 Publikationsliste

Folgenden Publikationen zum Gebiet der fetalen Programmierung sind unter meiner maßgeblichen Mitarbeit entstanden:

1. Schlemm L, Haumann HM, Ziegner M, Stirnberg B, Sohn A, Alter M, Pfab T, Kalache KD, Guthmann F, Hocher B: New evidence for the fetal insulin hypothesis: fetal angiotensinogen M235T polymorphism is associated with birth weight and elevated fetal total glycated hemoglobin at birth. J Hypertens. 2010 Apr; 28(4): 732-9.

2. Hocher B, Schlemm L, Haumann H, Poralla C, Chen YP, Li J, Guthmann F, Bamberg C, Kalache KD, Pfab T.: Interaction of maternal peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 Pro12Ala polymorphism with fetal sex affects maternal glycemic control during pregnancy. Pharmacogenet Genomics. 2010 Feb; 20(2): 139-42.

Darüber hinaus bin ich beteiligt gewesen an:

3. Hocher B, Schlemm L, Haumann H, Li J, Rahnenführer J, Guthmann F, Bamberg C, Kalk P, Pfab T, Chen YP: Offspring sex determines the impact of the maternal ACE I/D polymorphism on maternal glycaemic control during the last weeks of pregnancy. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2011 Mar 10 .Epub ahead of print.

## 12 Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. B. Hocher für die Überlassung eines spannenden Themas, das entgegengebrachte Vertrauen in meine Arbeit und die Unterstützung bei der Erstellung meiner Dissertation, aber auch bei anderen gemeinsamen Projekten.

Für die gute Zusammenarbeit während meiner Zeit im Labor bedanke ich mich bei Katharina Krause-Relle, die mit all ihrem Wissen viele Lösungen parat hatte. Ganz besonders bedanke ich mich bei Jan Rahnenführer, mit dessen Hilfe, Humor und vor allem „experimentellem“ know-how diese Arbeit maßgeblich gewachsen ist. Darüber hinaus gilt auch Karoline von Websky, Susi Heiden sowie Ludwig Schlemm ein Dank die Unterstützung und treue Begleitung sowie die eine oder andere Analyse und Manuskripterstellung. Yulija Sharkovska danke ich für die Unterstützung bei der Histologie.

Für ihre kritische Augen und ihr feedback bedanke ich mich bei Dr. med. Markus Alter und insbesondere auch bei PD Dr. med Philipp Kalk.

Für die Durchführung der Insulinmessungen bedanke ich mich herzlich bei Dr. med. A. Arafat. Den MitarbeiterInnen des Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie, Stuttgart, insbesondere Dr. rer. nat. E. Schäffeler und Prof. Dr. med M. Schwab, danke ich für die gute Zusammenarbeit und die spannenden Einblicke in ihre Arbeit.

Nicht zu vergessen: mein Dank für Pomp, Rückzugsmöglichkeit und vieles mehr an die Damen des Hobrechtpalastes – ihr wisst ja: „Love is like oxygen“.

Ganz von Herzen auch mein Dank an Edda, Richard, Eike und Sophie für das intensive Training im freien Assoziieren, das nötige Spielgeld und viel mehr als nur das ein oder andere wohlklingende „Et hätt noch emmer joot jejange“ aus euren Mündern.

### **13 Eidesstattliche Erklärung**

„Ich, Hannah Marie Haumann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der hepato-metabolische Phänotyp genetisch gesunder Nachkommen heterozygoter eNOS knock-out Elterntiere vor dem Hintergrund des Konzepts der Fetalen Programmierung im Mausmodell“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 26.07.2011

Hannah M. Haumann