

Aus dem Center for Cardiovascular Research
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der renale Phänotyp genotypisch gesunder Wildtypnachkommen
heterozygoter eNOS-knock-out-Eltern (Mausmodell) im Kontext
der fetalen Programmierung

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sarah Durach

aus Mölln

Datum der Promotion: 08.12.2017

Meinen Eltern: Silke und Leo

Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	6
1. Einleitung.....	9
1.1 Fetale Programmierung und Epigenetik.....	9
1.1.1 Epidemiologische Daten zur Fetalen Programmierung.....	9
1.1.2 Tierexperimentelle Untersuchungen zur Fetalen Programmierung.....	11
1.1.3 Epigenetik.....	13
1.1.4 „Advanced Fetal Programming“ Hypothese.....	14
1.2 Das NO System und seine physiologische Bedeutung.....	14
1.2.1 Das eNOS knock-out Tiermodell.....	15
1.3 Nierenmorphologie und Funktion.....	16
1.3.1 Niere- Aufbau und Funktion.....	16
1.3.2 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS).....	17
2. Fragestellung der Arbeit.....	20
3. Material und Methoden.....	22
3.1 Material:.....	22
3.1.1 Geräte:.....	22
3.1.2 Chemikalien:.....	22
3.1.3 Puffer und Lösungen:.....	23
3.1.4 Software:.....	23
3.2 Methode.....	24
3.2.1 Tiere und Tierhaltung.....	24
3.2.2 Studiendesign.....	24
3.2.3 Genotypisierung.....	27
3.2.4 Gewichts- und Wachstumsmessung.....	27

Inhaltsverzeichnis

3.2.5	Nicht invasive Blutdruckmessung	27
3.2.6	Untersuchung im Stoffwechselläufig	27
3.2.7	Organentnahme.....	29
3.2.8	Immunfluoreszenz	34
3.2.9	Western Blot	34
3.3	Statistik	35
4.	Ergebnisse	37
4.1	Geburtsgewicht	37
4.2	Körpergewicht	38
4.3	Nierengewicht	38
4.3.1	Gesamtes Nierengewicht.....	38
4.3.2	Relatives Nierengewicht	39
4.4	Systolischer Blutdruck	40
4.5	Nierenfunktionsparameter	41
4.5.1	Glomeruläre Filtrationsrate (GFR).....	41
4.5.2	Glomeruläre Filtrationsrate in Relation zum Körpergewicht.....	43
4.5.3	Albumin-Kreatinin-Ratio im Urin.....	44
4.6	Ergebnisse der histologische Untersuchungen.....	45
4.6.1	Glomerulosklerose.....	45
4.6.2	Interstitielle Fibrose.....	45
4.6.3	Perivaskuläre Fibrose	46
4.6.4	Media-Lumen-Ratio der intrarenalen Arterien	47
4.7	Renin-positive Glomeruli	47
4.8	Renale ACE-Expression.....	48
4.9	Renale AT ₂ -Rezeptor Expression.....	49

Inhaltsverzeichnis

4.10	Aldosteron im 24h-Sammelurin	49
4.11	Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse.....	51
5.	Diskussion	53
5.1	Geburts- und Körpergewicht und Nierengewichte	53
5.2	Regulation des systolischen Blutdrucks	54
5.3	Veränderung der Nierenfunktion	55
5.4	Histologische Veränderungen in der Niere.....	59
5.5	Renin-Angiotensin-Aldosteron System.....	60
5.5.1	Reninpositive Glomeruli, renale ACE-Konzentration und renale Expression von AT ₂ -Rezeptoren	60
5.5.2	Aldosteron.....	64
5.6	Geschlechterspezifische Unterschiede	65
5.7	Paternale Programmierung.....	66
5.8	Schlussfolgerung und Ausblick	68
6.	Literaturverzeichnis.....	70
7.	Abkürzungsverzeichnis	80
8.	Tabellenverzeichnis	82
9.	Abbildungsverzeichnis	83
10.	Lebenslauf	84
11.	Danksagung	86
12.	Eidesstattliche Versicherung.....	87

Abstract

Hintergrund: Fetale Programmierung beschreibt die Veränderung des Phänotyps durch pränatale Umwelteinflüsse, unabhängig vom vererbten genetischen Material. Als Auslöser für fetale Programmierung sind verschiedene Einflüsse, wie z.B. intrauterine Mangelsituationen identifiziert worden. Wirken solche Auslöser innerhalb eines sensiblen Zeitfensters während der intrauterinen Periode auf den Fetus ein, können diese zu einer Veränderung des Geburtsgewichtes und des arteriellen Blutdrucks führen. Im Sinne der „Advanced Fetal Programming“ Hypothese rücken maternale Gene als Determinanten fetalen Wachstums in den Fokus. Hervorzuheben ist hier, dass dieser Effekt nicht durch klassische Vererbungsmechanismen erklärt werden kann. Die maternalen Gene selbst werden nicht weitergegeben. Es handelt sich hierbei vielmehr um genetische Polymorphismen, die die Durchblutung der Plazenta beeinflussen. Der renale Phänotyp, die Nierenfunktion und Veränderungen der Expression der Komponenten des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems sollten im heterozygoten eNOS knock-out Modell sowohl für maternale wie für paternale Programmierung überprüft werden.

Methoden: Im Mausmodell wurden 134 homozygote eNOS Wildtyp Nachkommen eingeschlossen: Gruppe 1 hatte homozygote eNOS Wildtyp Eltern, Gruppe 2 heterozygote eNOS +/- Müttern und Gruppe 3 heterozygote eNOS +/- Vätern. Es wurde das Geburtsgewicht, das Körpergewicht und das Nierengewicht am Ende des Versuchs bestimmt. Zu drei Zeitpunkten wurden Stoffwechselfersuche durchgeführt, in denen folgende Parameter analysiert wurden: Kreatinin-clearance, Albumin-Kreatinin-Ratio, Aldosteron im Urin, systolischer Blutdruck. Die Nieren wurden histologisch auf Glomerulosklerose, interstitielle und perivaskuläre Fibrose und Media-Lumen-Ratio der intrarenalen Gefäße untersucht. Mittels Immunfluoreszenz und Western Blot wurden reninpositive Glomeruli und die renale Expression von ACE und AT₂-Rezeptoren bestimmt.

Ergebnisse: Das Geburts- und Körpergewicht sowie das relative Nierengewicht waren bei den Männchen von heterozygoten eNOS knock-out Müttern geringer als bei Tieren der Kontrollgruppe. Auch bei den Weibchen der heterozygoten eNOS knock-out Mütter zeigte sich eine Veränderung des Phänotyps. Ihre Körpergewichte und Nierengewichte waren signifikant höher, die GFR war im Stoffwechselfersuch 1 zunächst erniedrigt, im Stoffwechselfersuch 3 dann erhöht. Bei den weiblichen Nachkommen von heterozygoten eNOS knock-out Vätern war das Körpergewicht ebenfalls höher als das der Kontrollgruppe. Bei diesen Weibchen wurden im Stoffwechselfersuch 3 eine erhöhte GFR und mehr reninpositive Glomeruli gemessen. Bei den männlichen Nachkommen heterozygoter eNOS knock-out Vätern wurden erhöhte Aldosteronwer-

Abstract

te im Urin und erhöhte Albuminurie gemessen. Zwischen keiner der Gruppen gab es Unterschiede bei den systolischen Blutdruckwerten.

Schlussfolgerungen: Durch das erniedrigte Geburtsgewicht konnte also gezeigt werden, dass Gene - ohne Weitergabe im Sinne der klassischen Vererbung - Programmierungseffekte auslösen, und bleibende Effekte auf die folgende Generation haben können. Allerdings führte dies nicht zu Veränderungen der systolischen Blutdruckwerte. Weiterhin zeigten sich aber Veränderungen bezüglich der Nierenfunktion und bei den Komponenten des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. In wie weit diese Veränderungen in der Niere ein plausibles Erklärungsmodell für die Entstehung von veränderten systolischen Blutdruckwerten im Rahmen der fetalen Programmierung darstellen, kann allerdings nicht abschließend geklärt werden. Weiterhin untermauert dieser Versuch aber die Bedeutung der „Advanced Fetal Programming“ Hypothese sowie der maternalen und paternalen Programmierung für die Entstehung von Volkskrankheiten im Erwachsenenalter.

Abstract (english version)

Background: Fetal programming describes changes in the phenotype due to prenatal environmental influences irrespective of inherited genes. Many stimuli that provoke fetal programming have been identified. During a critical period of intrauterine development such stimuli can lead to reduced birth weight and hypertension. The „Advanced Fetal Programming“ hypothesis proposes an additional stimulus: maternal and paternal genes may determine fetal growth and disease in adult life independent of the fetal genome. We tested the extended Barker hypothesis using an eNOS knock-out mouse model as a model for lower birth weight, hypertension, modified renal phenotype and changes in RAAS.

Methods: The study included 134 eNOS wild-type (WT) animals divided into three groups: offspring of eNOS wild-type parents, offspring of heterozygous eNOS knock-out mothers and offspring of heterozygous eNOS knock-out fathers. The procedure included weight determination, a metabolism trial during week 12, 18 and 23 to obtain blood and urine samples and removal of organs postnatal day 168. The following parameters were measured: creatinine clearance, albuminuria and aldosterone. Kidney samples were stained and renal morphology analysed. Renal protein levels and cellular distribution of renin, ACE and AT2-receptor were determined using Western Blot analysis and immunofluorescence.

Results: The birth weight and bodyweight of the male offspring (WT) of the heterozygous eNOS knock-out mothers was significantly reduced in comparison to offspring of eNOS WT parents.

Abstract

The female offspring of heterozygous eNOS knock-out mothers had a significantly increased bodyweight and heavier kidneys. Further they showed a significantly higher creatinine clearance (metabolism trial III). The female offspring of heterozygous eNOS knock-out fathers also had a significantly heavier bodyweight as well as significantly heightened creatinine clearance (metabolism trial III) and higher renal expression of renin. Male offspring of heterozygous eNOS knock-out fathers showed elevated urine aldosterone levels and higher albuminuria levels. No difference was observed in blood pressure measurement.

Conclusions: In terms of a reduced birth weight this study showed that there was a fetal programming of the wild-type F1 generation of the heterozygous eNOS knock-out mothers. This is in line with the extended Barker hypothesis but does not provide information about the genesis. No changes in blood pressure could be observed. Nevertheless, changes in renal function and in expression of RAAS were found in offspring of both heterozygous eNOS knock-out mothers and fathers, suggesting hints for paternal programming and sex specific effects. The clarification of the mechanisms behind these biological phenomena needs further investigation.

1. Einleitung

1.1 Fetale Programmierung und Epigenetik

Die Fetale Programmierung beschreibt die irreversible Veränderung der Ausprägung von Merkmalen (Phänotyp), die unabhängig vom vererbten genetischen Material sind. Das Konzept der „Funktionellen Teratologie“ wurde in den 1970ern durch Günter Dörner begründet. Dörner folgerte aus seinen Assoziationsstudien vom Zusammenhang von Diabetes mellitus Typ 2 und perinataler Ernährung, dass es zur Ausprägung perinatal angelegter Eigenschaften kommen kann, welche nicht durch Vererbung im mendelschen Sinne weitergegeben werden [1]. Die Terminologie „Fetale Programmierung“ entstand in den 1980er Jahren und wurde maßgeblich von Lucas et al. geprägt. Ende der 1980-er beleuchtete 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“. Lucas betonte in seinem Programmierungskonzept, dass es nur während bestimmter kritischer Zeitfenster der intrauterinen Periode zu längerfristigen Veränderungen eines fetalen Organismus kommen kann [2, 3].

Der Erste, der das Phänomen der fetalen Programmierung beim Menschen in einer großen epidemiologischen Studie beobachtete, war David Barker [4]. Vor mehr als dreißig Jahren konnte er den Zusammenhang zwischen niedrigem Geburtsgewicht und arterieller Hypertonie im späteren Erwachsenenalter aufzeigen. Barker hatte dazu mehr als 15.000 Männer untersucht, die in den Jahren 1930-1935 geboren wurden. Hebammen im britischen Herfordshire hatten die Daten, wie Geburtsgewicht, Größe etc. dieser Männer als Neugeborene dokumentiert. Barker untersuchte 1980 die nunmehr erwachsenen Männer und entdeckte, dass Männer, die ein niedriges Geburtsgewicht hatten, statistisch signifikant öfter an Volkskrankheiten wie arterieller Hypertonie und Diabetes mellitus Typ 2 erkrankt waren [4]. Die als Barker-Hypothese bekannt gewordene Hypothese besagt, dass durch eine Mangelsituation im Mutterleib typische Volkskrankheiten wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus Typ 2 und Hypercholesterinämie in sensiblen Zeitfenstern im Fetus programmiert werden können, unabhängig von den genetischen Erbanlagen und Umwelteinflüssen im späteren Erwachsenenalter [5].

1.1.1 Epidemiologische Daten zur Fetalen Programmierung

Der Zusammenhang zwischen niedrigem Geburtsgewicht und arterieller Hypertonie konnte mehrfach in epidemiologischen Studien (z.B. Nurse Health Study [6], Helsinki Birth Cohort [7], Health Professionals Follow-up Study [6]) dargestellt werden.

Einleitung

In derselben Population in Herdfordshire, welche Barker untersucht hatte, konnten Hales et al. eine inverse Korrelation zwischen dem Geburtsgewicht, Glucosetoleranz und Insulinresistenz feststellen [8]. Sie konnten demonstrieren, dass Individuen mit dem niedrigsten Geburtsgewicht, im Vergleich zu schwereren Neugeborenen, ein sechsfach erhöhtes Risiko aufwiesen, im weiteren Leben eine eingeschränkte Glucosetoleranz bzw. Diabetes mellitus Typ 2 zu entwickeln. Sie postulierten daraufhin die „thrifty phenotype“ Hypothese, welche die Anpassungen des Organismus an die in utero vorliegende Nährstoffmangelsituation beschreibt, die auf eine effiziente Nährstoffversorgung ausgerichtet sind. Diese pränatal sinnvollen Adaptionsvorgänge bleiben postnatal bestehen und führen bei einem Nährstoffüberangebot im späteren Leben zu einem für den Organismus nachteiligen Effekt. Dieser nachteilige Effekt wird in der Literatur als „mismatch“ titulierte [8].

Weitere epidemiologische Beobachtungen untermauern die „thrifty phenotype“ Hypothese. Sowohl in der Helsinki Birth Cohort als auch in der Kohorte in Herdfordshire gab es Individuen, welche bei Geburt „Small for Gestational Age“ (SGA) waren, im späteren Kindes- und Erwachsenenalter aber eine beschleunigte Zunahme des Wachstums und des Gewichtverlaufs zeigten und eine höhere Mortalität für Diabetes mellitus Typ 2 aufwiesen. Der Effekt des beschleunigten Wachstums und der Gewichtszunahme wird in der Literatur als „Catch-up growth“ titulierte [7, 8].

Weiterhin finden sich epidemiologische Hinweise auf einen transgenerationalen Effekt der fetalen Programmierung. In der schwedischen Kommune Overkalix konnte ein Zusammenhang zwischen der unbeschränkten Verfügbarkeit für Nahrung der F0 Generation mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für Diabetes mellitus Typ 2 und kardiovaskuläre Erkrankungen in der F2 Generation hergestellt werden [9]. Hatte der Großvater in seiner Kindheit unbegrenzten Zugang zu Nahrung, zeigte sich dann bei den erwachsenen Enkelkinder eine erhöhte Mortalität in Bezug auf Diabetes mellitus Typ 2 [10]. Ein weiterer Hinweis für die transgenerationale fetale Programmierung konnten auch Pembry et al. in derselben Population zeigen [11]. Sie fanden eine erhöhte Mortalität für die Enkelkinder, deren Großeltern unbegrenzten Zugang zu Nahrung hatten. Es zeigten sich hierbei zudem geschlechterspezifische Unterschiede. Hatte der Großvater väterlicherseits unbegrenzten Zugang zu Nahrung, zeigte sich eine erhöhte Mortalität bei den männlichen Enkelkindern. Die Nahrungsaufnahme der Großmütter väterlicherseits war hingegen mit einer Veränderung des Phänotyps der weiblichen Enkelkinder assoziiert. Es gibt also nicht nur Effekte durch maternale Programmierung, sondern auch durch paternale Programmierung. Die Effekte der paternalen Programmierung konnten zum ersten Mal von Ng et al. gezeigt werden. Sie fütterten männlichen Ratten eine Hochfetttdiät, dies führte zu Adipositas, gestörter Glucosetoleranz und gestörter Insulinsekretion bei den Ratten. Diese Ratten wurden dann mit

Einleitung

normalgewichtigen Weibchen verpaart. Bei den Nachkommen entwickelten die Weibchen der F1 Generation dann ebenfalls Adipositas und zeigten eine frühe Manifestation einer gestörten Glucosetoleranz und Insulinsekretion [12].

Auch im proteinarmen Diät Modell gibt es Hinweise auf die Effekte der paternalen Programmierung. Watkins et al. fütterten männlichen Mäusen 7 Wochen vor der Verpaarung eine proteinarme Diät. Bei Geburt fanden sie eine reduzierte Männchen-Weibchen-Ratio in den Würfen. Zudem hatten die männlichen Nachkommen ein erhöhtes Geburtsgewicht, auch nach zwei bis drei Lebenswochen waren sie schwerer als die Tiere der Vergleichsgruppe. Als adulte Mäuse waren die Männchen, deren Väter eine proteinarme Diät erhalten hatten, relativ hypotensiv, hatte einen erhöhten Puls und waren adipös. Sowohl männliche als auch weibliche Mäuse hatten eine gestörte vaskuläre Funktion und eine gestörte Glucosetoleranz im Vergleich zu Tieren, deren Väter eine normale Diät erhalten hatte [13].

Durch die Verabreichung einer Hochfettdiät, welche bei den Vätern Adipositas auslöste, konnte eine Reduktion der Fertilität in der F1 und F2 Generation in männlichen und weiblichen Mäusen festgestellt werden [14]. Fullston et al. vermuteten eine Veränderung des Epigenom von Spermien und/oder Veränderungen der Sexualhormone als Ursache für paternale Programmierung.

1.1.2 Tierexperimentelle Untersuchungen zur Fetalen Programmierung

Die meisten tierexperimentellen Studien zur fetalen Programmierung sind mit Ratten oder Mäusen durchgeführt wurden. Tabelle 1 gibt eine Übersicht, auf welche Arten intrauterine Mangelsituationen herbeigeführt wurden.

Tabelle 1: Tabellarische Übersicht über Interventionsmöglichkeiten und verschiedene Tierarten

Intervention	Tierart
1. Diätetische Manipulation Protein / kalorienarme Diät, Protein / kalorienreiche Diät, Zinkmangel, Vitamin D Mangel, salzreiche Kost	Maus, Ratte, Hamster, Meerschweinchen, Schaf, Schwein
2. Modelle mit operativen/hypoxischen Methoden Bi / Unilaterale Ligatur der A. uterina, Plazentaemboli-	Maus, Ratte, Schaf

Einleitung

sation, Hypoxiekammer, Entfernung der Karunkel	
3. Intrauterine Dexamethasonexposition	Maus, Ratte, Schaf, Schwein, Meerschweinchen, Seidenäffchen
4. Stress	Maus
5. Genetische Manipulation	Maus, Ratte

Die meisten Studien manipulieren die mütterliche Diät, durch kalorienreduzierte Kost [15-17], hochkalorische Diät [14, 18], oder eiweißarme Diät [19-21], um eine intrauterine Mangelsituation bzw. Stresssituation auszulösen. In diesen tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass die Nachkommen der beeinflussten Muttertiere ein niedrigeres Geburtsgewicht aufwiesen und einen erhöhten systolischen Blutdruck (5-30 mmHg) hatten als die Nachkommen der Kontrollgruppe [19, 21-25].

Auch durch Spurenelementmangel konnten Veränderungen des Phänotyps in den F1 und F2 Generationen beobachtet werden. Beach et al. fanden 1982 bei Nachkommen von Mäusen mit einem nachgewiesenem Zinkmangel in der Trächtigkeit eine kompromittierte Funktion des Immunsystems [26]. Ein ausgeprägter Vitamin D Mangel in der Trächtigkeit führte bei den Mäusenachkommen in der F1 und F2 Generation zu Veränderungen der renalen Morphologie [27].

Glucocorticoide sind potente Regulatoren der Genexpression [28]. Die Plazenta exprimiert das Enzym 11 Beta-hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 2 (11 β -HSD Typ II), welches Glucocorticoide abbauen und so den Fötus vor Glucocorticoidexposition schützen kann [29]. Benediktsson et al. fanden im Rattenmodell, dass die plazentare 11 β -HSD Typ II Aktivität mit dem Geburtsgewicht und invers mit dem Plazentagewicht korreliert [30]. Die Hypothese, dass erhöhte fetale Glucocorticoidexposition zur Programmierung von arterieller Hypertonie führt, ist in der Literatur akzeptiert [31, 32].

Auffällig ist, dass es innerhalb dieser Studien eine große Variation bezüglich der Charakteristika des Phänotyps der F1 Generation gibt. Dies mag teilweise an den unterschiedlichen Diäten, den unterschiedlichen Zeiten, zu denen die unterschiedlichen Parameter gemessen wurden oder den unterschiedlichen Tiermodellen liegen. Auch zwischen den operativen Maßnahmen, eine intrauterine Mangelsituation zu simulieren, gibt es Unterschiede. Die bilaterale chirurgische

Einleitung

Ligatur der A. uterina zeigt einen Effekt auf das Geburtsgewicht und die Leptinspiegel der F1 Generation [24, 33], aber erhöhte arterielle Blutdrücke und Glucoseintoleranz konnten auch in der F2 Generation beobachtet werden [25]. Bisher gibt es erst wenige Studien, die im Tiermodell nach einem transgenerationalen Effekt auf die F2- und F3-Generation suchen. Aber auch hier verdichten sich die Hinweise, dass es zu Veränderungen des Phänotyp der F2 Generation kommen kann [34, 35].

1.1.3 Epigenetik

Epigenetik beschreibt biologische Mechanismen, die über Modifikationen der DNA regulierend auf die Gen-Aktivität einwirken. Die DNA-Sequenz selbst ändert sich dabei jedoch nie. Es wird davon ausgegangen, dass epigenetische Mechanismen es einem Organismus ermöglichen, auf Umwelteinflüsse durch Änderungen der Genexpression zu reagieren. Derzeit werden v.a. drei epigenetische Mechanismen, welche hinter dem Phänomen der fetalen Programmierung stecken, proklamiert, auf welche im Folgenden eingegangen wird. Die Methylierung von Cytosin-Basen der DNA spielt eine entscheidende Rolle und gehört zu den am besten erforschten Mechanismen der Epigenetik [36].

Cytosin-phosphatidyl-Guanin (CpG)-Inseln sind DNA-Sequenzen im Genom mit erhöhter CpG-Dichte, sie sind vorwiegend mit den Promoterregionen von Genen assoziiert und dienen der Regulation der Expression von Genen. Die CpG-Inseln sind überwiegend unmethyliert. Die veränderte Methylierung von CpG-Inseln in den Promoterregionen von Genen führt dazu, dass diese genetische Information nicht mehr abgelesen werden kann. Durch das so genannte Silencing dieser genetischen Information kommt es konsekutiv zu Änderungen der biologischen Funktion [36].

Die fetale Programmierung via Histonmodifikation ist weniger gut beschrieben. Histone sind Proteine, welche bei Eukaryoten im Zellkern gefunden werden und welche die DNA in strukturelle Einheiten (Nukleosomen) verpacken und ordnen [37]. Eine Reihe von Änderungen der Histone, darunter Methylierung, Phosphorylierung und Acetylierung, sind möglich. Dadurch kann die Interaktion zwischen Histonen und DNA und somit die Genexpression verändert werden [38].

Ein weiterer Mechanismus, der hinter dem Effekt der fetalen Programmierung vermutet wird, ist Mikro-RNA (miRNA) und die long non-coding RNA (linc-RNA) [36, 39]. MiRNA sind kleine, nicht-kodierende Sequenzen, welche aber die Translation von Genen beeinflussen können. MiRNA Expression wird bekanntermaßen durch Umweltfaktoren, wie z.B. Zigarettenrauchen

[40] und Ernährungsgewohnheiten [41] verändert. Bisher gibt es wenige Hinweise, dass Veränderungen der mi-RNA über Generationen weitergeben werden können [34].

1.1.4 „Advanced Fetal Programming“ Hypothese

Durch Arbeiten von Hocher et al. und Wang et al. rücken maternale Gene als Determinanten fetalen Wachstums im Sinne der „Advanced Fetal Programming“ Hypothese in den Fokus [42], [43]. Hocher et al. zeigten, dass Kinder, deren Mütter Trägerinnen des 825 T Allels der G-Protein β -Untereinheit sind, mit signifikant geringerem Geburtsgewicht auf die Welt kommen, wobei der Genostatus 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 [44]. Hervorzuheben ist hier, dass dieser Effekt nicht durch klassische Vererbungsmechanismen erklärt werden kann. Die maternalen Gene selbst werden nicht weitergegeben. Es handelt sich hierbei vielmehr um genetische Polymorphismen, die vermutlich über die Durchblutung der Plazenta das intrauterine Milieu beeinflussen können [25].

1.2 Das NO System und seine physiologische Bedeutung

Das gasförmige Stickstoffmonoxid (NO) ist ein wichtiger interzellulärer Mediator, welcher aber auch sehr kurzlebig ist [45]. Die Synthese von NO findet in nahezu allen Zellen und Geweben von Säugetieren statt. NO diffundiert zu seinen Zielstrukturen. 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. Es wird durch NO-Synthasen (NOS) aus Arginin unter Bildung von Citrullin freigesetzt [46]. Es gibt drei gewebespezifische Formen der NOS: 1. neuronale NOS wird vorwiegend im zentralen Nervensystem und an den Synapsen des autonomen Nervensystems, aber auch im Skelett- und Herzmuskel exprimiert. 2. induzierbare NOS findet sich vorwiegend in Makrophagen und führt hier zu einer NO vermittelten apoptotischen und antimikrobiellen Wirkung und 3. endotheliale NOS (eNOS, NOS 3) wird auf Endothelzellen exprimiert. Mit Hilfe der eNOS wird aus L-Arginin Stickstoffmonoxid (NO) in Endothelzellen gebildet. Ausgelöst wird die Bildung durch Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle. NO diffundiert sehr schnell innerhalb der Zellen, aber auch über die Zellmembran hinaus und in den Extrazellulärraum. NO stimuliert die lösliche Guanylatzyklase. Dies führt zur Bildung von cGMP, dies führt wiederum zur Senkung der zytosolischen Calciumkonzentration und somit u.a. zur Vasodilatation arterieller Gefäße. NO reguliert also den Tonus der arteriellen Gefäße und ist damit ein entscheidender Faktor bei der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase. Darüber hinaus kontrolliert NO die Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur, sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und

Einleitung

anderen vaskulären Genprodukten. Des Weiteren hemmt NO die Aktivierung von Thrombozyten und ist an den Prozessen der Zellmigration, der Angiogenese und der Steuerung der vaskulären Permeabilität beteiligt [45, 47].

Entscheidend ist dieses System auch bei der Perfusion der Plazenta. So konnten NO-Synthetasen nicht nur im Synzytiotrophoblast, den plazentaren Stammzotten, sondern auch im Endothel der Nabelarterie nachgewiesen werden [48]. NO ist weiterhin an der Aufrechterhaltung des niedrigen Gefäßwiderstandes der fetoplazentaren Gefäßeinheit beteiligt und beeinflusst die plazentare Steroidsynthese und Hormonsekretion. NO ist zudem ein potentieller Regulator des plazentaren Glucosetransportes [49]. Da die Versorgung des Feten mit Nährstoffen über die Plazenta für ein regelrechtes fetales Wachstum essentiell ist, resultiert die experimentelle Hemmung der eNOS in der Ausbildung einer IUGR [50, 51].

1.2.1 Das eNOS knock-out Tiermodell

Mäuse mit homozygoter eNOS-Defizienz (eNOS $-/-$) sind hypertensiv, haben eine niedrigere Herzfrequenz und zeigen eine ausgeprägte Proteinurie [52]. Während der Trächtigkeit konnten sowohl Hinweise auf eine veränderte Plazentaperfusion, als auch auf einen veränderten Nährstofftransport über die Plazenta gefunden werden. Die homozygote eNOS knock-out F1-Generation weist ein signifikant niedrigeres Geburtsgewicht auf als die Kontrollgruppe. Das homozygote eNOS knock-out Modell ist mittlerweile ein etabliertes Modell zur Imitation der intrauterinen Wachstumsretardierung (IUGR) [53]. Auch heterozygote eNOS knock-out Mäuse zeigen erhöhte nächtliche systolische Blutdruckwerte im Vergleich zur Kontrollgruppe [52, 54]. Zudem zeigten Versuche an isoliertperfundierten Herzen eine 70%ige Reduktion der Vasodilatation der Koronargefäße nach Perfusion mit Acetylcholin im Vergleich zu Wildtypen [55]. Dies unterstreicht die Bedeutung des eNOS-Genostatus bei der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase.

Constantine et al. konnten zeigen, dass sich WT Nachkommen von eNOS +/- Müttern und WT Vätern in Abhängigkeit der Herkunft des defekten maternalen Allels 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 [56]. 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 systo-

lischen, diastolischen und mittleren arteriellen Blutdrucks aufweisen [54]. Es wird daher vermutet, dass die Herkunft des defekten Allels für die phänotypische Ausprägung von Bedeutung ist. Experimente mit Embryonentransfer von Longo et al. legen zudem nahe, dass Programmierung durch eine nongenetische Transmission und durch eine intrauterine Mangelsituation über veränderte Plazentaperfusion bedingt ist [57].

1.3 Nierenmorphologie und Funktion

1.3.1 Niere- Aufbau und Funktion

Nephronen setzen sich aus einem Glomerulum und dem Tubulusapparat zusammen. Nephronen bilden sich beim Menschen von der 8. Schwangerschaftswoche bis zur 36. Schwangerschaftswoche. Fallen Nephronen durch Verletzung oder Erkrankung im weiteren Verlauf des Lebens aus, können keine neuen Nephronen gebildet werden, dies gilt ebenfalls für Nephronen der Maus. Ein einzelnes Glomerulum besteht aus einer afferenten Arteriole und einer efferenten Arteriole [58, 59]. Die Bowman Kapsel umschließt jeweils ein Glomerulum, durch die Bowman-Kapsel wird das Blut aus den zuführenden Gefäßschlingen als Ultrafiltrat abgepresst. Das Ultrafiltrat gelangt dann in den proximalen Teil des Tubulusapparats, dem Pars convolutum. Während das Ultrafiltrat die weiteren Teile des Tubulussystems durchläuft (absteigender und aufsteigender Schenkel der Henleschleife, distaler Tubulus) werden Wasser, sowie Elektrolyte und Glucose, Phosphat, Aminosäuren rückresorbiert und Medikamente, Abfallprodukte des Stoffwechsels wie z.B. Harnstoff und überschüssiges Wasser und Elektrolyte eliminiert. Albumin gelangt in der gesunden Niere nicht bzw. nur in sehr geringen Mengen durch das Glomerulum in das Tubulussystem und in den Harn. Nur nach körperlicher Anstrengung, fieberhaften Infekten oder Infektionen der ableitenden Harnwege kann auch bei Nierengesunden eine erhöhte Menge Albumin im Urin nachgewiesen werden. Ansonsten weist die Albuminurie auf eine glomeruläre oder tubuläre Störung innerhalb der Nieren hin [58].

Die Kontaktstelle zwischen der afferenten Arteriole und dem Endstück des aufsteigenden Schenkels der Henle-Schleife nennt man juxtaglomerulärer Apparat (JXA). Er dient der Steuerung des Wasser- und Elektrolythaushalts und damit des Blutdrucks. Er besteht aus drei Teilen: der Macula densa (Zylinderepithelzellen des Tubulus), renin-bildenden myoepithelialen Zellen in der Wand des Vas afferens und extraglomerulären Mesangiumzellen. Der distale Tubulus Pars convolutum setzt kurz hinter der Macula densa an. Die hohen tubulären Zellen der Macula densa messen den Natrium- und Chlorid-Ionen-Konzentrationsgradienten zwischen Blut und Urin. Ist die Chloridkonzentration im Urin hoch, wird Adenosin ausgeschüttet, welches durch Vasokonstriktion des Vas afferens zu einer Verminderung der Glomerulären Filtrationsrate (GFR)

Einleitung

und somit auch des Harnflusses in der Henle-Schleife führt. Ist die Natriumkonzentration im Urin unterhalb des physiologischen Wertes, wird aus den myoepithelialen Zellen des Vas afferens Renin in das Blut freigesetzt. Eine Kaskade von im weiteren Verlauf genauer erläuterten Schritten führt so zu einem systemischen Anstieg des Blutdrucks, zu einer Steigerung der GFR und zu einem gesteigerten Volumen von Primärharn [59].

Die von allen Glomeruli beider Nieren gebildete Filtratmenge pro Minute wird als glomeruläre Filtrationsrate bezeichnet. Zur Aufrechterhaltung der Homöostase muss die GFR möglichst konstant gehalten werden. Liegt die GFR zu hoch, durchläuft das Ultrafiltrat das Tubulussystem zu schnell, um die vollständige Rückresorption zu ermöglichen, und so gehen diese Substanzen in der Harnausscheidung verloren. Liegt die GFR zu niedrig, werden Substanzen nur unzureichend ausgeschieden. Die Aufrechterhaltung der GFR wird über den Plasmafluss in den afferenten und efferenten Arteriolen und über die verfügbare Filtrationsoberfläche reguliert. Die GFR wird über drei Mechanismen kontrolliert: Renale Selbstregulierung: 1. myogene Selbstregulierung der afferenten Arteriolen, tubuloglomeruläres Feedback, 2. Nervale Innervation und 3. Angiotensin II und ANP [59].

1.3.2 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Renin wird als enzymatisch inaktive Vorstufe (Prorenin) von den Epitheloidzellen des JXA synthetisiert und in Speichergranula verpackt. Die Exozytose aus den Speichergranula wird auf bestimmte Reize hin eingeleitet. Diese Reize sind: 1. Adrenalin via beta-Adrenorezeptoren, 2. niedriger Chloridgehalt im Harn gemessen von Tubuluszellen der Macula densa, 3. niedriger Blutdruck gemessen von Barorezeptoren im Vas afferens, 4. niedrige Durchblutung der Nierenkörperchen, 5. verminderte GFR. Renin wird also immer dann freigesetzt, wenn der Blutdruck abfällt und/oder ein Verlust von Blutvolumen auftritt [39].

Die Ausschüttung von Renin wird durch das atriale natriuretische Peptid (ANP), welches von Zellen im rechten Vorhof des Herzens freigesetzt wird, sobald dieser durch ein erhöhtes Blutvolumen gedehnt wird, sowie in einer direkten Rückkopplungsschleife durch Angiotensin II gehemmt [39].

Renin ist eine Protease, welche das in der Leber gebildete Angiotensinogen in Angiotensin I umwandelt. Neben dieser enzymatischen Funktion des Renins wurde durch Nguyen et al. eine weitere Funktion entdeckt [60]. In den Glomeruli und in dem Gefäßsystem der Niere konnten sie einen Prorenin-Rezeptor identifizieren. In Zellkulturen konnte durch die Aktivierung dieses Rezeptors eine Stimulation profibrotischer und proinflammatorischer Aktivität, unabhängig von An-

Einleitung

ngiotensin II, gezeigt werden. In neuen Studien wurde sogar eine Rolle des Prorenin-Rezeptors bei der Entstehung von Nierenerkrankungen wie z.B. der diabetischen Nephropathie diskutiert [61].

Durch das membrangebundene, v.a. in Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Lunge, aber auch der Niere vorkommende Angiotensin Converting Enzyme (ACE) wird Angiotensin I durch die Abspaltung von zwei weiteren Aminosäuren in die wirksame Form Angiotensin II umgewandelt. Die Wirkungen von Angiotensin II im Organismus werden durch die Rezeptoren AT₁ (bei Nagetieren und Menschen gibt es die Rezeptoren AT_{1a} und AT_{1b}) und AT₂, welche zu den „seven-transmembranen“ Rezeptoren gezählt werden, vermittelt. Im Menschen wird der AT₁-Rezeptor an der Niere, dem Herzen, den Blutgefäßen, der Nebenniere und der Leber exprimiert. Der AT₁-Rezeptor ist in erster Linie für die bekannten Wirkungen von Angiotensin II verantwortlich. Die blutdruckregulatorischen Wirkungen von Angiotensin II umfassen:

1. Potente Vasokonstriktion der peripheren Gefäße, was direkt zu einer Erhöhung des Blutdruckes führt,
2. Vasokonstriktion der Vasa efferentia in der Niere und dadurch Aufrechterhaltung der glomerulären Filtration bei verminderter Nierendurchblutung,
3. Freisetzung von ADH aus der Hypophyse, welches zu einer verminderten Wasserausscheidung durch die Nieren führt, und im ZNS einen vermehrten Salzhunger und Durstgefühl auslöst,
4. Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde [45].

AT₂-Rezeptoren sind hauptsächlich in fetalem Gewebe präsent und nehmen in ihrer Anzahl nach der Geburt rasch ab. Im Erwachsenenalter werden normalerweise nur wenige AT₂-Rezeptoren exprimiert, sie kommen dennoch im renalen und adrenalen Gewebe sowie im ZNS vor. Die AT₂-Rezeptoren vermittelten Wirkungen sind im Allgemeinen gegenteilig zu den AT₁-Rezeptoren vermittelten Wirkung. So ist der AT₁-Rezeptor als Vasopressor, proliferativ und profibrotisch zu charakterisieren, während hingegen der AT₂-Rezeptor als Vasodilatator und anti-proliferativ zu charakterisieren ist [62]. Ebenfalls als Vasodilatator, anti-proliferativ und anti-fibrotisch ist das Angiotensin 1 – 7 zu charakterisieren, das lange Zeit als inaktives Abbauprodukt von Angiotensin II galt. Angiotensin 1 – 7 entfaltet seine Wirkung über den Mas-Rezeptor und gilt wegen seiner gegenregulatorischen Rolle gegenüber dem Angiotensin II als potentieller Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer kardiovaskulärer Medikamente [39, 45].

Einleitung

Alle Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems kommen im Plasma, sowie lokal im Gewebe vor.

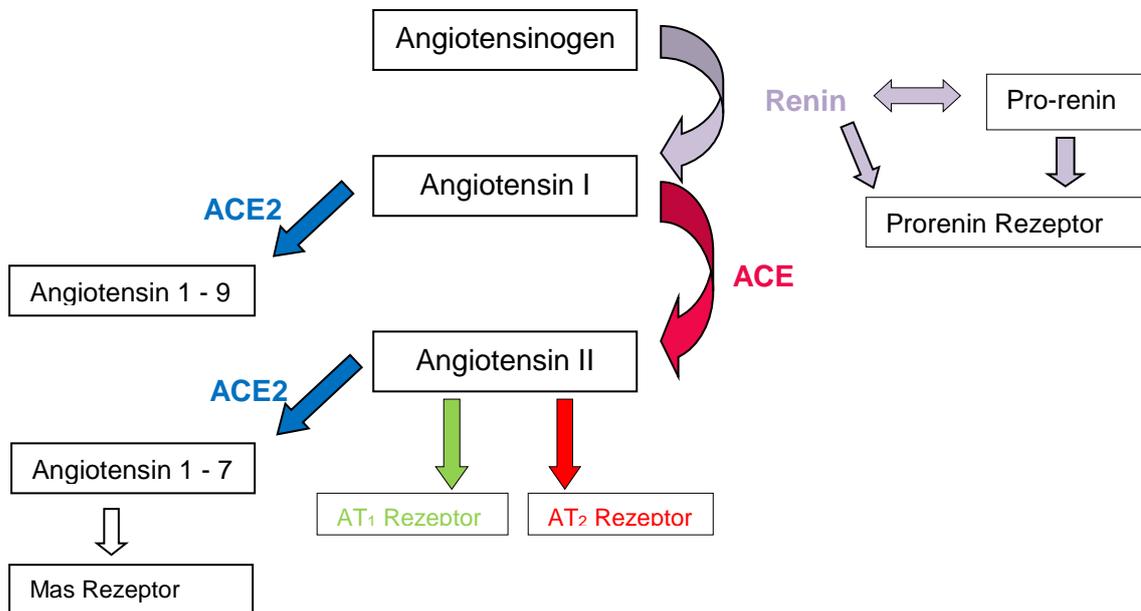


Abbildung 1: vereinfachtes Schema des Renin-Angiotensin-Systems

Das Mineralokortikoid Aldosteron wird in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde aus Cholesterin über die Zwischenstufe Progesteron gebildet [39]. Angiotensin II kommt eine entscheidende Rolle bei der Biosynthese von Aldosteron zu, da es die Bereitstellung des Cholesterols aus Cholesterolestern durch die Cholesteroleseter-Hydrolase ermöglicht. Ein weiterer wichtiger Regulator für die Produktion von Aldosteron ist der Kaliumwert im Plasma. Aldosteron entfaltet seine Wirkung über einen Rezeptor aus der Großfamilie der Steroidhormone. Diese befinden sich in besonders hoher Konzentration v.a. an den Sammelrohren in der Niere. An der Niere wirkt Aldosteron über vermehrten Einbau von endothelialen Natriumkanälen (EnaC) in die Hauptzellen des distalen Tubulusapparat und des kortikalen Sammelrohrs und fördert so den Rücktransport von Natrium und Wasser aus dem Urin ins Blut. Hierdurch steigen der Kochsalzgehalt des Blutes und das Blutvolumen und somit auch der Blutdruck. Mit der gesteigerten Natriumretention kommt es zu einer gesteigerten Ausscheidung von Kalium-, Wasserstoff- und Ammoniumionen, sowie zu einer Abnahme der Kaliumkonzentration im Plasma [39]. Weber et al. konnten bereits 1992 zeigen, dass Aldosteron Fibrose in den Herzen von Ratten induziert [63]. Durch die RALES- und EPHEBUS Studien wurde die Hypothese bestätigt, dass das kardi-ale Remodelling bei Herzinsuffizienz durch die Gabe von Spironolacton und Epleneron günstig beeinflusst werden kann [64, 65]. Weiterhin gibt es auch Hinweise, dass Aldosteron dazu beiträgt, Schäden an der Niere durch die Aufrechterhaltung von Zellwachstum und Inflammation zu beschleunigen und so renale Fibrose zu induzieren [66].

2. Fragestellung der Arbeit

Im Tierexperiment sollte überprüft werden, ob die Verpaarung von heterozygoten, weiblichen eNOS +/- knock-out Mäusen und genotypisch gesunden männlichen (Wildtyp) Mäusen bzw. heterozygoten, männlichen eNOS +/- knock-out Mäusen und genotypisch gesunden weiblichen (Wildtyp) Mäusen bei genotypisch gesunden (Wildtyp) Nachkommen zu einer signifikanten Änderung des Geburtsgewichts, zu Änderungen im Blutdruck, morphologischen Veränderungen in der Niere, Änderungen der Nierenfunktion sowie Änderungen im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System führt.

Wir postulieren, dass maternale Gene, die an der Kontrolle der Plazentadurchblutung beteiligt sind, Determinanten des fetalen Nahrungsangebots sind. Maternale Gene beeinflussen so indirekt die fetale Ernährung und damit auch die fetale Programmierung kardiovaskulärer Erkrankungen [42]. Hocher et al. konnten bereits zeigen, dass es bei genotypisch gesunden Nachkommen aus dieser Verpaarung zu einem signifikant niedrigerem Geburtsgewicht im Vergleich zu Nachkommen von genotypisch gesunden Mäusen kommt [42]. Dieses Experiment zeigte, dass der maternale eNOS Gen-Status unabhängig vom fetalen eNOS Gen das Geburtsgewicht entscheidend modulieren kann. Insofern könnte ein maternaler Knock-out 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 Änderung des Phänotyps bei Nachkommen programmieren. Bei einem solchen Design können etwaige Unterschiede zwischen den WT Nachkommen nicht durch klassische Genetik erklärt werden. Ebenfalls hatten Hocher et al. zeigen können, dass der paternale eNOS Gen-Status zu einer Reduktion des Körpergewichts der Nachkommen führte [67]. Ob durch maternale und/oder paternale Programmierung auch der Phänotyp der Nachkommen bezogen auf Nierenmorphologie, Nierenfunktion, das RAAS und systolische Blutdruckwerte verändert werden kann, gilt es jetzt herauszufinden.

Folgende Fragestellungen sollen konkret beantwortet werden:

1. Ergeben sich Veränderungen des renalen Phänotyps bei den genotypisch gesunden Nachkommen von heterozygoten eNOS knock-out-Mäusen (eNOS +/-) im Vergleich zu den genotypisch gesunden Nachkommen von Wildtypeltern?

Fragestellung der Arbeit

2. Gibt es Veränderungen bei maternalen bzw. paternalen Programmierung bezüglich der Nierenfunktion und Veränderungen der Expression der Komponenten des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems?
3. Stehen diese Veränderungen im Zusammenhang mit Geburtsgewicht und systolischen Blutdruckwerten?

3. Material und Methoden

3.1 Material:

3.1.1 Geräte:

Gerät	Firma
CobasIntegra 800	Roche
Digitalkamera CFW-1310C	Scion Cooperation
Digitalkamera EC3	Leica
DU 530 UV/VIS Life Science Spectrophotometer	Beckmann Coulter
Gewebeeinbettautomat ShandonCitadel 1000	Thermo Electron Corporation
Leica DMRB Mikroskop	Leica
Mikroskop Axiovert 100	Zeiss
Mikroskop BH	Olympus

3.1.2 Chemikalien:

Substanz	Firma
A ₁ R-Antagonist, SLV329	Solvay Pharmaceuticals
Aceton	J.T.Baker
Aminomethan	Carl-Roth
Ammoniumperoxodisulfat	Fluka
Benzamidin	Fluka
CoomassieBrilliantBluo G-250	Merck
DePex	SERVA Electrophoresis
Dithiotheritol	Sigma
Ethanol 100%	Herbeta Arzneimittel
Eisenhämaetoxilin nach Weigert	Carl-Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl-Roth
Fixierer G354	Agfa
Formaldehydlösung 37%	J.T. Baker
Furosemid – Furosemid-ratiopharm®250	Ratiopharm
Glycine	Carl Roth
Haltungsdiät 1320 für Ratten und Mäuse	Altromin
Harnstoff	Biorad
H ₂ O ₂ 30%	Merck
Isofluran - Forene®	Abbott AG
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Ketamin - Ketavet®	Pfizer
Leupeptin	Sigma
Mayers Häkalaunlösung	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumdodcylsulfat	Carl Roth
Paraffin Typ 6	Richard-Allan-Scientific
Paraffin Typ 9	Richard-Allan-Scientific

Material und Methoden

Periodsäure	Merck
Pikrinsäure-Lösung	Fluka
Pikro-Fuchsin van Gieson	Waldeck GmbH
Phosphorsäure	Carl-Roth
Resorcin-Fuchsin nach Weigert	Waldeck GmbH
Rotiphorese® Gel 30	Carl-Roth
Salzsäure 37%	Merck
SCHIFFS Reagenz	Merck
Tetramethylethyldiamin	Merck
Thioacetamid	Merck
Thioharnstoff	Carl-Roth
Tween 20	Carl-Roth
Xylazin - Rompun®	Bayer
Xylol	Carl-Roth

3.1.3 Puffer und Lösungen:

Lösung	Bestandteile	Konzentration
1%ige Perjodsäure	Perjodsäure	10 g/l
Aqua dest		
Formalinlösung 4%	Formalin	40 g/
HCl	166µl HCl, 199,8 ml absol. Ethanol	0,01mol
Jaffé-Reagenz	Pikrinsäure 12,5 mmol/l, Pufferlösung NaOH 400mmol/l und Dinatriumhydrogenphosphat 10 mmol/l	
Pikrinsäurelösung	Pikrinsäure	12,5mmol/l
Schiffsche Reagenz	Fuchsin	0,2 g
Sirius Rot in gesättigte Pikrinsäurelösung	Sirius Rot	1 g/l

Puffer	Bestandteil	Konzentration
Elektrophorese Laufpuffer	25 mmol/l Tris, 250 mmol/l Glycin, 0,1% SDS	
PBS-Puffer	123 mM NaCl, 2,4 mM KCl, 5,8 mM N ₂ HPO ₄ , 1,3 mM KH ₂ PO ₄	8 g/l
Pufferlösung	400 mmol/l NaOH, 10 mmol/l Dinatriumhydrogenphosphat	0,2 g/l
Stripping Puffer	25 mmol/l Glycin, 1,0% SDS	
TBS-T	20 mmol/l Tris Base, 140 mmol/l NaCl, 0,1% Tween20	
Transfer Puffer	184 mmol/l Glycin, 24 mmol/l Tris Base, 20% Methanol	

3.1.4 Software:

Software	Firma
AlphaEaseFC	Alpha Innotec Corporation

Material und Methoden

GraphPad Prism version 5.00
ImageJ 1.36b
Las EZ
Powerlab
SPSS 19.0

Graph Pad Prism
National Institutes of Health
Leica Microsystems
AdInstruments
SPSS Inc.

3.2 Methode

3.2.1 Tiere und Tierhaltung

Für unseren Versuch wurden Mäuse der Linie eNOS Düsseldorf (C57BL/6) im Alter zwischen fünf und acht Monaten als Elterntiere benutzt. Die in diesem Versuch verwendeten eNOS-defizienten Mäuse wurden von Prof. Gödecke, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, hergestellt. Es handelt sich um Mäuse mit C57BL/6-Stammhintergrund. Das Fehlen der eNOS in Herz, Leber, Lunge und Niere der transgenen Tiere wurde mittels Western-Blot und Immunhistologie bestätigt. Sämtliche Tiere wurden in Gruppen von ein bis sechs Exemplaren, in Standardkäfigen mit Versteckmöglichkeiten gehalten. Die Unterbringung der Tiere erfolgte in der Tierhaltung der Freien Universität in Dahlem, Berlin. Die Umweltbedingungen im Tierstall waren standardisiert; die Lichtperiode war täglich von 6.00 bis 18.00 Uhr, die Lufttemperatur betrug +20°C und die Luftfeuchtigkeit 45(±5)%.

Die Tiere erhielten Futter von Altromin und Leitungswasser ad libitum. Die Tierexperimente fanden über den Zeitraum vom 23.04.2006 bis zum 04.11.2007 statt und wurden unter Beachtung des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt (Anzeigennummer: G0146/04).

3.2.2 Studiendesign

Es wurden weibliche und männliche Wildtypen (♀ eNOS +/+ ♂ eNOS +/+); heterozygote eNOS-knock-out Weibchen und männliche Wildtypen (♀ eNOS +/- ♂ eNOS +/+) und schließlich weibliche Wildtypen und heterozygote eNOS knock-out Männchen (♀ eNOS +/+ ♂ eNOS +/-) miteinander verpaart (siehe Abbildung 2).

Material und Methoden

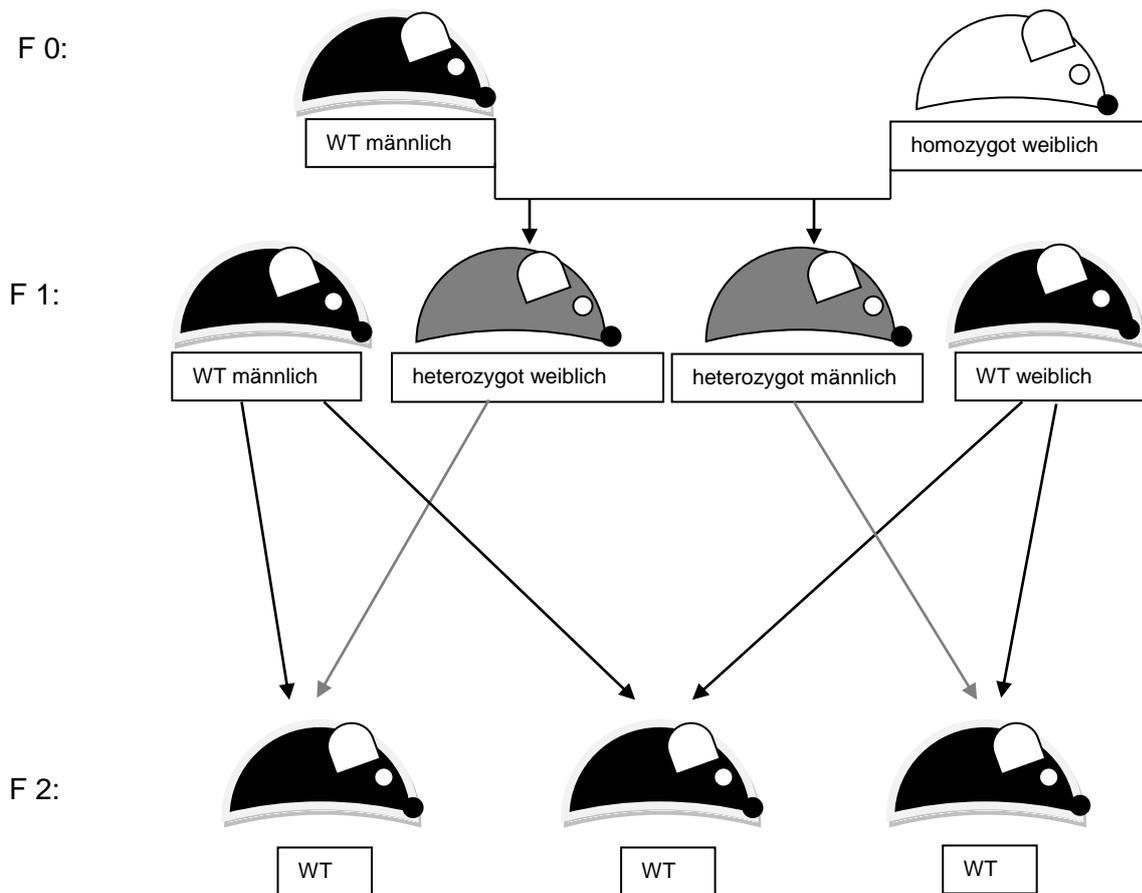


Abbildung 2: Verkreuzungsschema

Die Nachkommen dieser Verpaarungen wurden in der siebten Lebenswoche mittels PCR genotypisiert. Nur die Wildtypen wurden in die Studie eingeschlossen. Die Nachkommen wurden je nach Genotyp der Eltern in die drei Gruppen eingeteilt. Insgesamt wurden 134 Tiere in die Studie eingeschlossen. Tabelle 2 zeigt die Aufteilung der Tiere in die untersuchten Gruppen, sowie die geschlechterspezifische Verteilung.

Tabelle 2: Anzahl und Verteilung der Versuchstiere auf die untersuchten Gruppen.

	Gruppe 1: Mutter WT/Vater WT	Gruppe 2: Mutter eNOS+/-/Vater WT	Gruppe 3: Mutter WT/Vater eNOS+/-
Gesamt	55	46	33
Männlich	25	23	12
Weiblich	30	23	21

Material und Methoden

Abbildung 3 zeigt den Versuchsablauf. Die in die Studie eingeschlossenen Nachkommen wurden gewogen, der Blutdruck der Tiere wurde zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen und es erfolgte dreimal ein Versuch im Stoffwechsellkäfig. Nach 24 Wochen erfolgte, nach einer erneuten Erfassung der Körpergewichte, die Tötung der Versuchstiere durch Blutentzug in tiefer Isoflurannarkose mit anschließender Entnahme der Organe.

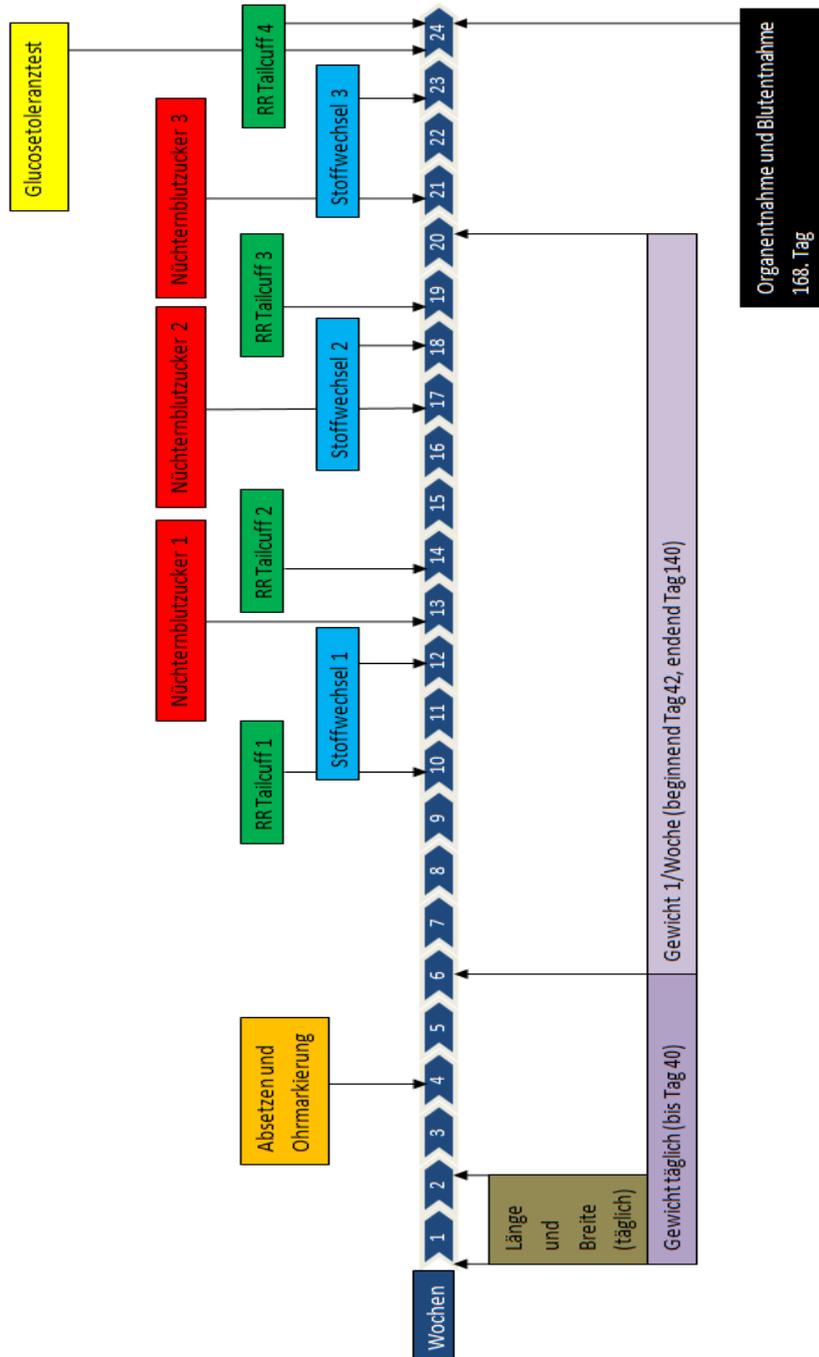


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Versuchsablauf.

3.2.3 Genotypisierung

In der siebten Lebenswoche wurde der Genotyp der Jungtiere mittels PCR bestimmt. Hierzu wurde in Isofluran Kurznarkose eine Blutprobe aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen. Der Genstatus eines jeden Tieres wurde doppelt bestimmt. Nur Wildtypen wurden eingeschlossen, heterozygote Mäuse wurden aus dem Versuch ausgeschlossen.

3.2.4 Gewichts- und Wachstumsmessung

Die Tiere wurden am 1. und 140. Lebenstag gewogen.

3.2.5 Nicht invasive Blutdruckmessung

Die Messung des systolischen Blutdrucks wurde in der 10., 19. und 24. Woche vorgenommen. Hierzu wurde ein automatisches nicht-invasives Messsystem, die Tail-Cuff-Phlethysmographie angewandt. Die Tiere wurden vor der eigentlichen Messung einmal trainiert. Es wurde gewartet bis die Tiere sich beruhigt hatten und sich nicht mehr bewegten, sichtbar an einer stabilen Pulssamplitude. Erst dann, frühestens jedoch nach 10 min Gewöhnung an den Restraîner, wurden die eigentlichen Messungen durchgeführt. Die Messungen erfolgten immer zur selben Tageszeit, um Schwankungen im Blutdruck durch den Tag-Nacht-Rhythmus der Tiere zu verringern. In der Praxis sind pro Tier mindestens 4 Messungen nötig, um einen verlässlichen Mittelwert des Blutdrucks zu erhalten. Jedes Tier wurde 15 Mal gemessen und hieraus der Mittelwert für den systolischen Blutdruck errechnet. Der Cuff wurde nach der Größe der Schwanzarterie, also auch unter Berücksichtigung des Alters der Tiere, ausgewählt. Somit sollten eventuelle Wachstumseffekte berücksichtigt werden.

3.2.6 Untersuchung im Stoffwechselkäfig

Insgesamt dreimal wurden die Tiere im Stoffwechselkäfig untersucht und zwar in der 12., 18. und 23. Lebenswoche. Jedes Tier verblieb einzeln für jeweils 24h im Stoffwechselkäfig. Die Tiere erhielten während dieser Zeit lediglich Wasser und, zur Anregung der Urinproduktion, ein Stück Gurke, jedoch kein Trockenfutter. Die aufgenommenen Wasser- und Futtermengen, die Menge des abgesetzten Harns, sowie Besonderheiten wurden protokolliert. Unmittelbar nach dem Stoffwechselversuch wurde eine Blutentnahme aus dem retroorbitalen Venenplexus unter Inhalationsnarkose mit Isofluran durchgeführt. Die Blutproben wurden eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen und danach mit einer Geschwindigkeit von 3500 U/min für 15 min zentrifugiert. Die auf diese Weise gewonnenen Seren und der während des Stoffwechseler-

suchs gesammelte Urin wurden anschließend bis zur weiteren Verwendung (z.B. Bestimmung der Kreatinin-Clearance) bei -20°C aufbewahrt.

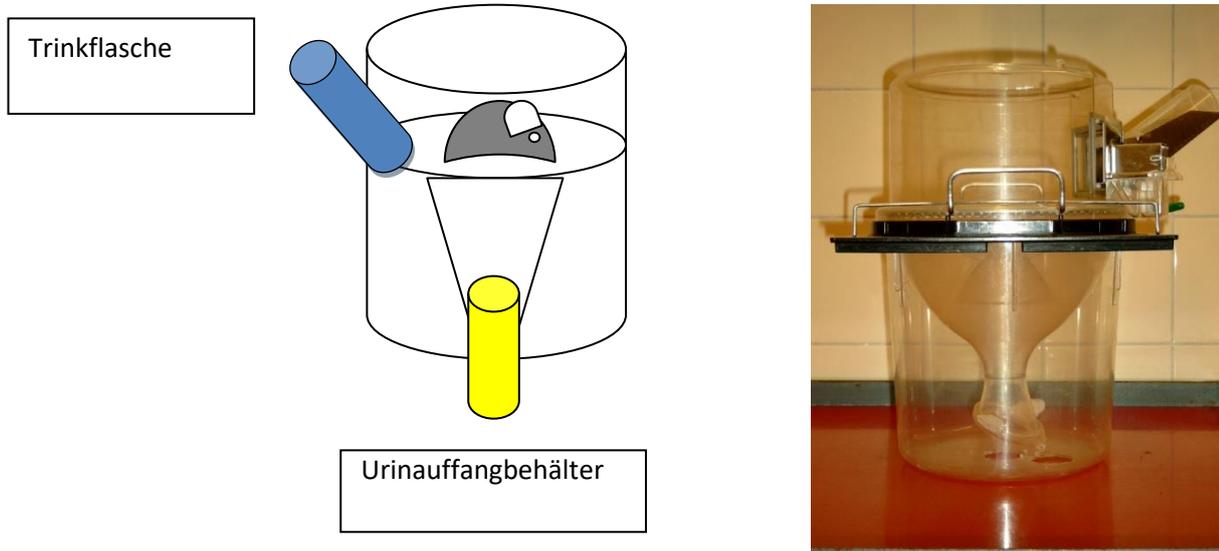


Abbildung 4: Stoffwechselkäfig

3.2.6.1 Serum- und Urinuntersuchung:

Aus dem gewonnenen Urin und dem Blut wurde die Kreatinin-Clearance als Surrogatparameter für die glomeruläre Filtrationsrate bestimmt. Die zentrifugierten Urin- und Serumproben wurden mit dem Jaffé Kinetic Test auf die folgenden Parameter untersucht: Kreatinin und Albumin. Der Urin wurde dazu 1:10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, das Serum wurde unverdünnt gemessen. Es wurde jeweils 10 µl Probe und 100µl Jaffé-Reagenz in eine Uvette gegeben. Die Bestimmung des Kreatinins erfolgte dann mittels DU 530 Beckmann UV/VIS Life Science Spectrophotometer. Dabei misst das Photometer bei einer Messtemperatur von 25°C den Farbumschlag nach einer Vorlaufzeit von 15 Sekunden und nach 2 min, der durch die Komplexbildung von Kreatinin und Pikrinsäure in alkalischer Lösung entsteht. Die Kreatininbestimmung beruht auf einer kinetischen Messung.

$$C_{\text{Kreatinin}} = \frac{E_{A2} - E_{A1}}{E_{S2} - E_{S1}} \times 2,0$$

E_A = Extinktion der Analyse; E_S = Extinktion des Standards

Kreatinin bildet in alkalischer Lösung mit Pikrat einen orange gefärbten Komplex. Dessen Farbtintensität wird direkt proportional der Kreatininkonzentration bei 505 nm photometrisch gemessen. Um die Messung von Pseudokreatininen weitestgehend zu verhindern, geht die Anfangs-

Material und Methoden

und Endreaktion nicht in die Messung ein. Die Kreatininkonzentration wurde aus der Extinktion der Proben und der Extinktion eines Standards (Kreatininkonzentration von 2 mg/dl) berechnet.

Aus den Urinproben wurden dann mittels der entsprechenden Test-Kits in einem automatisierten Analysegerät im Institut für klinische Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin als weitere Parameter Albumin- und Aldosteronkonzentration bestimmt. Desweiteren konnte über die im Stoffwechsellkäfig gesammelte Urinmenge (VU) die absolute Albumin- beziehungsweise Aldosteronexkretion E über die Formel bestimmt werden:

$$E(\text{g}/24\text{h}) = \text{VU}(\text{l}/24\text{h}) \times \text{CP}/\text{A}(\text{g}/\text{l})$$

Hierbei stellt CP/A die Albumin- beziehungsweise Aldosteronkonzentration im Urin dar. Die Aldosteronbestimmung im 24h-Sammelurin gilt als Goldstandardmethode zur Bestimmung von Aldosteron. Diese Methode, wenngleich auch sehr aufwändig, ermöglicht im Gegensatz zu Einzelmessung im Blut oder im Urin eine sehr genaue Aussage über die genaue Aldosteronmenge im Organismus. Die Aldosteronkonzentration im 24h-Sammelurin wurde in unserem Versuchsaufbau in der 12. Lebenswoche (Stoffwechselversuch 1), sowie in der 23. Lebenswoche der Mäuse (Stoffwechselversuch 3) gemessen.

3.2.6.2 Ermittlung der Glomerulären Filtrationsrate (GFR):

Die GFR wurde ermittelt, indem man den Quotienten aus Kreatininkonzentration im Urin und Serum mit dem Urinfluss in ml/min multipliziert.

$$\text{GFR} = C_{\text{ser.crea}} \times C_{\text{ur.crea}} / V_{\text{Harn}}$$

C = Konzentration, V = Urinflussvolumen pro Zeiteinheit

Die GFR ist vom Körpergewicht abhängig, in der Klinik behilft man sich deshalb oft mit der Cockcroft-Gault-Formel. Deshalb wurde die GFR in diesem Versuch in Relation zum Körpergewicht der jeweiligen Versuchstiere gesetzt, um eine bessere Aussage über die Nierenfunktion machen können.

3.2.7 Organentnahme

Unmittelbar nach der Tötung wurden sowohl die rechte als auch die linke Niere entnommen und gewogen. Die linke Niere wurde dann in eine Einbettkassette gelegt und zum Fixieren in eine 4%ige Formalin/PBS-Lösung und anschließend 24 h in eine 70%ige Ethanol-Lösung gelegt. Dies fixiert das Gewebe und verhindert Autolyse oder Fäulnis. Die rechte Niere wurde in ein

Reaktionsgefäß verbracht und sofort mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Die Kühlung und Aufbewahrung erfolgte danach bei -80°C.

3.2.7.1 Paraffineinbettung

Bei der Paraffineinbettung wurden die fixierten Präparate zunächst mit ansteigenden Konzentrationen von Alkohol entwässert und in Aceton eingelegt. Danach überführte man die Präparate in eine gesättigte Paraffinlösung. Das Aceton verdunstete, die Paraffin-Konzentration stieg bis auf nahezu 100 %. Anschließend wurden die Präparate mit heißem Paraffin eingeblockt. Nach dem Auskühlen erhielt man schnittfeste Paraffinblöcke in welche die Präparate eingebettet wurden.

Die Paraffineinbettung erfolgte automatisch mit dem Gewebeeinbettautomat. Anschließend wurden die Organe am Paraffin-Automaten in Histo-Ausgussformen eingebettet. Auf der angeschlossenen Kühlplatte wurden die fertigen Proben ausgehärtet. Danach war das Gewebe hart und stabil genug und konnte nach kurzer Zeit am Mikrotom geschnitten werden.

3.2.7.2 Herstellung der Gewebsschnitte

Mit dem Mikrotom wurden 3 µm dicke Gewebsschnitte hergestellt. Die Schnitte wurden in einem 45°C warmen Wasserbad auf Objektträger aufgebracht. Dann wurden Objektträger samt Gewebeschnitt auf einer Wärmeplatte getrocknet, danach für 30 min in einem 60°C warmen Wärmeschrank gestellt, um eine Fixierung der Schnitte auf den Objektträgern zu erreichen.

3.2.7.3 Färbungen

Die Nierenschnitte wurden mit Sirius-Red-, Elastica van Gieson- und Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung (PAS) angefärbt. Alle Färbungen liefen in den folgenden vier Schritten ab [68]:

Entparaffinieren und Bewässern: Das Paraffin wurde aus den Nierenschnitten gewaschen, indem die Schnitte für zweimal 5 min in Xylol eingelegt wurden. Danach wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (jeweils 2 min in 100%igem, 96%igem, 80%igem und 70% bzw. 50%igem Ethanol) langsam bewässert, um sie so für die wasserlöslichen Farbstoffe zugänglich zu machen.

Einsatz der Färbelösung: Mit Hilfe der unterschiedlichen Färbelösungen wurden unterschiedliche Zielstrukturen in den Nierenschnitten angefärbt.

Material und Methoden

Entwässern: Anschließend entzog man den gefärbten Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils kurz in 70%igem und 80%igem Ethanol, und jeweils 2 min in 96%igem und 100%igem Ethanol) sukzessive das Wasser und verwahrte sie vorübergehend bis zum Eindecken in Xylol auf, welches sich sowohl mit Alkohol als auch mit Paraffin gleichermaßen mischte.

Eindecken: Anschließend wurden alle Schnitte mit einem Tropfen DePeX und einem Deckglas eingedeckt.

3.2.7.3.1 Sirius-Rot-Färbung

Der Farbstoff Picro-Sirius Rot ist ein anionischer Farbstoff, dessen NaSO_3 -Seitengruppen sich mit den basischen Gruppen von Kollagen verbinden. Die natürliche Doppelbrechung von kollagenen Bindegewebsfasern wird so verstärkt. Kollagen erscheint dem menschlichen Auge rot.

Durchführung:

1. Entparaffinieren
2. Bewässern
3. 60 min in 0,1%ig gelöstem Sirius Rot in gesättigter Pikrinsäure-Lösung
4. Kurz mit 0,01M HCl in Ethanol spülen
5. Entwässern
6. Eindecken

Auswertung:

Die Sirius Rot gefärbten Schnitte wurden mit einem Olympus BH2 Mikroskop bei 20-facher Vergrößerung untersucht. Zur morphometrischen Analyse wurden pro Nierenpräparat 30 Ausschnitte mit einer Digitalkamera aufgenommen. Die Ausschnitte enthielten keine Gefäße und keine Glomeruli und waren frei von Artefakten. Zur Bestimmung des Kollagenanteils pro Bildausschnitt wurden die Aufnahmen in dem Programm ImageJ in 8-Bit-Grauwertbilder konvertiert. Mit Hilfe des Befehls Image>Adjust>Threshold, wurde der Schwellenwert festgelegt, bis zu dem ein Pixel anhand der Farbtiefe als Signal (Kollagen) gewertet wurde. Dann wurde die Signalfläche (Analyze>Set Measurements>Area, Analyze>Measure) in Pixel ermittelt. Die Anzahl der Sirius Rot positiven Fläche an der Gesamtfläche des Bildes werden als interstitielle Fibrose gewertet. Für jedes Organ wurde der Mittelwert aus der Analyse aller Bilder gebildet.

Die Ermittlung der perivaskulären Fibrose erfolgte mit einem Scoring System am Mikroskop in 40-facher Vergrößerung. Es wurden fünf Scoring-Gruppen benannt, die die Menge an perivas-

Material und Methoden

kulärem Bindegewebe im Verhältnis zu Media-Breite in Prozent wiedergeben: Score 1: 0-25%, Score 2: 25-50%, Score 3: 50-75%, Score 4: 75-100%, Score 5:> 100%.

Im Schnitt wurden quer angeschnittene Arterien aufgesucht, bewertet und einer der fünf Gruppen zugeordnet. Anschließend wurde gezählt, wie viele Gefäße zu jeweils welchem Score gehören und nach folgender Formel wurde dann der Index für perivaskuläre Fibrose errechnet.

$$\text{Index} = (1 \times \text{Anzahl der zu Score 1 gehörenden Gefäße}) + (2 \times \text{Anzahl der zu Score 2 gehörenden Gefäße}) + (3 \times \text{Anzahl der zu Score 3 gehörenden Gefäße}) + (4 \times \text{Anzahl der zu Score 4 gehörenden Gefäße}) + (5 \times \text{Anzahl der zu Score 5 gehörenden Gefäße}) / \text{Anzahl der untersuchten Gefäße}$$

Da es sich hierbei um eine sehr subjektive Methode handelt, wurden alle Schnitte durch zwei Personen beurteilt, die hinsichtlich der Gruppenzugehörigkeit verblindet waren. Ein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen wurde nur dann als solcher anerkannt, wenn er sich aus dem gemessenen Index beider Personen ergab.

3.2.7.3.2 Elastica van Gieson-Färbung

Diese Färbung dient zur Beurteilung der intrarenalen Arterien. Durch das basische Resorcin-Fuchsin werden die sauren aus Elastomuzin bestehenden Hüllschichten der elastischen Fasern dunkel violett angefärbt. Die Kerne werden durch Eisenhämatoxylin blau, das Zytoplasma durch die feindispers gelösten Pikrinsäure rot und Bindegewebesstrukturen durch den grobdispers gelösten Säurefuchsin dunkelrot angefärbt.

Durchführung:

1. Entparaffinieren
2. Bewässern
3. 10 min in Resorcin-Fuchsin nach Weigert
4. 3 min spülen unter Leitungswasser
5. Kurz in 1%ige HCL-Ethanol-Lösung eintauchen
6. 7 min spülen unter fließendem Leitungswasser
7. Kurz spülen mit Aqua dem.
8. 1 min in 70%igen Ethanol
9. 2 min in 80%igen Ethanol
10. 3 min in Eisenhämatoxylin nach Weigert
11. 3 min spülen unter fließendes Leitungswasser

Material und Methoden

12. Kurz in 1%ige HCl-Ethanol-Lösung eintauchen
13. 7 min spülen unter fließendes Leitungswasser
14. Kurz spülen mit Aqua dem.
15. Kurz in van Gieson-Gemisch eintauchen
16. Entwässern
17. Eindecken

Auswertung:

Die quer angeschnittenen intrarenalen Arterien in den Elastica van Gieson gefärbten Schnitte wurden mit einem Mikroskop aufgesucht und mit einer Digitalkamera bei 20-facher Vergrößerung fotografiert. In dem Programm ImageJ wurden die äußeren und inneren Begrenzung der Media der Arterie umfahren, markiert und die Fläche gemessen. Zudem wurde die Fläche des Lumen bestimmt. Aus diesen bestimmten Flächen wurde dann der Quotient Mediafläche/Lumenfläche berechnet. Dies ist die Ratio von Media zu Lumen.

3.2.7.3.3 PAS-Färbung

Mit der PAS-Färbung werden kohlenhydrathaltige Komponenten, wie sie bei Glomerulosklerose vorkommen, dargestellt. Durch die Periodsäure werden die Glycolgruppen zu Aldehydgruppen oxidiert und erhalten somit eine reduzierende Wirkung. Die in dem Schiff'sche Reagenz enthaltene fuchsinschwefelige Säure bindet sich an die Aldehydgruppen und bildet einen stabilen Farbkomplex. PAS-positive Materialien stellen sich rosa bis rot dar, durch die Gegenfärbung mit Hämalun werden die Zellkerne blauviolett angefärbt.

Durchführung:

1. Entparaffinieren
2. Bewässern
3. 2 min in 50%igen Ethanol
4. Kurz Spülen mit A.dem.
5. 6 min in 1%ige Periodsäure
6. Spülen mit Leitungswasser
7. Spülen mit A. dem.
8. 7 min in 40%iger Schiff'sche Reagenz
9. 5 min spülen unter fließendem Leitungswasser
10. 1,5 min in Hämalun nach Mayer
11. 10 min spülen unter fließendem Leitungswasser

12. Entwässern

13. Eindecken

Auswertung:

Die Glomerulosklerose wurde als Vorhandensein von PAS-positivem Material im Glomerulum definiert. Es wurden alle Glomeruli eines Schnittes mit Hilfe der folgenden semiquantitativen Scores beurteilt: Score 1: weniger als 25% PAS-positiver Anteil von der gesamten Glomerulusfläche, Score 2: PAS-positive Fläche zwischen 25 und 50%, Score 3: PAS-positive Fläche zwischen 50 und 75%, Score 4: PAS-positive Fläche zwischen 75 und 100%.

Aus den sämtlichen Scores eines Schnittes wurde der Mittelwert errechnet, der dann als Glomerulosklerose-Status des Organs gewertet wurde. Die Beurteilung wurde ebenfalls von zwei unabhängigen, verblindeten Untersuchern durchgeführt.

3.2.8 Immunfluoreszenz

Die immunhistochemische Färbung wurde an den Paraffinschnitten der Nieren durch Fr. Dr. med. Franziska Theilig im Institut für Vegetative Anatomie der Charité-Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Die Organschnitte wurden mit 5%iger Milch/PBS-Puffer geblockt. Dann wurden die Schnitte mit den entsprechenden Antikörpern (DAKO, Dinova) inkubiert. Die Konzentration der Renin-Antikörper betrug: 1-500; cy 2 – 1:200; cy 3 – 1:250. Das Gewebe von mindestens sechs Mäusen wurde nach der Perfusionsfixation evaluiert. Die Spezifität wurde durch die parallele Inkubation von konsekutiven Schnitten kontrolliert, jedes wurde mit einer Einzelprobe inkubiert. Die Schnitte wurden unter einem Leica DMRB Mikroskop ausgewertet. Dabei wurde der Schnitt mäanderförmig durchgemustert und jedes renin-positive Glomerulum gezählt. Jeder Schnitt wurde zweimal durchgezählt und anschließend aus den beiden Ergebnissen der Mittelwert gebildet.

3.2.9 Western Blot

Die Gewebeaufbereitung und Proteinextraktion wurde unter der Verwendung von RIPA-Extraktionspuffer versetzt mit einem Proteaseinhibitorgemisch durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde mit dem BCA Test laut Herstellerangaben ermittelt (BCA assay kit #23227, Pierce). Zuvor wurden die SDS-PAGE Proben im Verhältnis 1:4 mit reduzierendem Ladepuffer (Roti Load 1, Roth) versetzt. SDS Page wurde unter Verwendung von 10%igem Trenngel (10% (v/v) Acrylamid / Bisacrylamid-Gemisch, 25% (v/v), Trenngelpuffer (1,5 M Tris pH 8,8), 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) APS, 0,04% (v/v) TEMED) und 5%igem Sammelgel (5% (v/v) Acrylamid / Bisacrylamid-Gemisch, 12,5% (v/v)) durchgeführt. Die Proteine aus den SDS-Gelen wurden mit-

Material und Methoden

tels semi dry Technik (TransBlot SD, BioRad) auf eine Nitrocellulose Membran (ECL-Hybond, Amersham) übertragen. Der Transfer wurde mittels Ponceau-Färbung überprüft. Die Membran wurde mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert: ACE H-170, sc-20791, rabbit polyclonal, Santa Cruz; AT₂-Rezeptor H-143, sc-9040, rabbit polyclonal, Santa Cruz anti-Aktin Antikörper (A5060, rabbit polyclonal, Sigma). Anschließend wurde der sekundäre, (goat anti rabbit IgG-HRP, sc-2054, Santa Cruz) 1 h bei Raumtemperatur damit inkubiert. Für die Detektion wurde die Membran in ECI Mix (1:1 Gemisch ECL-Lösung gemäß des Herstellerprotokolls) inkubiert und zur Belichtung eines Chemolumineszenz Filmes (ECL Hyperfilm, Amersham) genutzt. Die Proteinsignale wurden entsprechend der Herstellerangaben für ACE bei ungefähr 170 kDa, für den AT₂-Rezeptoren bei 50 kDa und für Aktin bei 43 kDa detektiert.

Zur densitometrischen Auswertung wurden die belichteten Filme eingescannt (Cannon Scanner) und mit dem Computerprogramm AlphaEaseFC (Alpha Innotech Corp.) ausgewertet. Die Proteinbanden wurden quantifiziert, indem sie manuell eingegrenzt und die Intensitäten der enthaltenen Pixel (Abstufung von 0 für weiß bis 255 für schwarz) über der Bandenfläche integriert wurden. Aus den Intensitäten der definierten Gesamtproteinmengen wurde eine Eichgerade erstellt. Mittels dieser wurde für die Intensitäten der aufgetragenen Proben eine Proteinmenge berechnet. Diese spiegelt nicht den tatsächlichen Proteingehalt wieder, sondern bezieht sich auf den Gesamtproteingehalt der Standardreihe und ist eine Normalisierung zum Vergleich von Filmen mit verschiedenen Belichtungszeiten. Die ermittelten Mengen des untersuchten Proteins wurden auf die gleichermaßen berechneten Mengen des internen Standards Actin bezogen. Für jedes Tier wurden die relativen Proteinmengen gegen den Mittelwert der Kontrollgruppe normalisiert. Diese Methode wurde durch Hr. Dr. med. Jan Rahnenführer (AG Hoher, Center for Cardiovascular Research, Charité Universitätsmedizin Berlin) durchgeführt. Die Daten wurden mir freundlicherweise durch ihn überlassen.

3.3 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit dem GraphPad Prism durchgeführt. Die Normalverteilung der Daten wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Z-Tests und des Shapiro-Wilk-Tests getestet. Lag eine Normalverteilung vor, wurde zunächst mit ANOVA zwischen den Gruppen auf Signifikanz geprüft und anschließend der unpaired t-Test benutzt, um die einzelnen Gruppen miteinander auf statistische Unterschiede zu überprüfen. Lag keine Normalverteilung vor, wurden zunächst alle Gruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test verglichen und dann kam der Mann-Whitney-U-Test zur Anwendung. Die Nullhypothese dieses Tests besagt, dass es keinen Unterschied zwischen der Verteilung der beiden Gruppen gibt. Bei einem p-Wert von kleiner oder gleich 0,05 wird diese Nullhypothese abgelehnt und die Verteilung der beiden Gruppen als sig-

Material und Methoden

nifikt unterschiedlich gewertet. P-Werte $\leq 0,05$ wurde mit # vs. Gruppe 1 bzw. § vs. Gruppe 2 markiert. P-Werte $<0,001$ wurden mit ## vs. Gruppe 1 bzw. §§ vs. Gruppe 2 markiert. Eine Tendenz wurde angenommen bei einem p-Wert $>0,05 \leq 0,07$ und mit T markiert.

4. Ergebnisse

4.1 Geburtsgewicht

Die Geburtsgewicht der Tiere mit eNOS +/- Müttern (Gruppe 2) war im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen signifikant geringer.

Das Geburtsgewicht der Tiere in Gruppe 2 betrug 0,11 g weniger als das der Kontrollgruppe mit Wildtypeltern, Gruppe 1. Die prozentuale Reduktion des Geburtsgewichts im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe betrug 8%. Im Vergleich zu den Tieren mit eNOS +/- Vätern (Gruppe 3) waren die Tiere in Gruppe 2 0,19 g leichter, das entspricht einer prozentualen Reduktion des Geburtsgewichts um 13%.

Die geschlechtsspezifische Analyse ergab folgendes Bild: Bei männlichen Tieren mit eNOS +/- Müttern zeigte sich ein signifikant niedrigeres Geburtsgewichtes. Die prozentuale Reduktion des Körpergewichts im Vergleich zu männlichen Tieren der Kontrollgruppe betrug 7%, und 17 % verglichen mit Tieren der Gruppe 3. Im Mittel ergab sich eine absolute Reduktion des Körpergewichts von 0,19 g der Männchen der Gruppe 2 gegenüber Tieren der Kontrollgruppe, und 0,27 g gegenüber männlichen Tieren mit eNOS +/- Vätern. Bei weiblichen Tieren hingegen fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

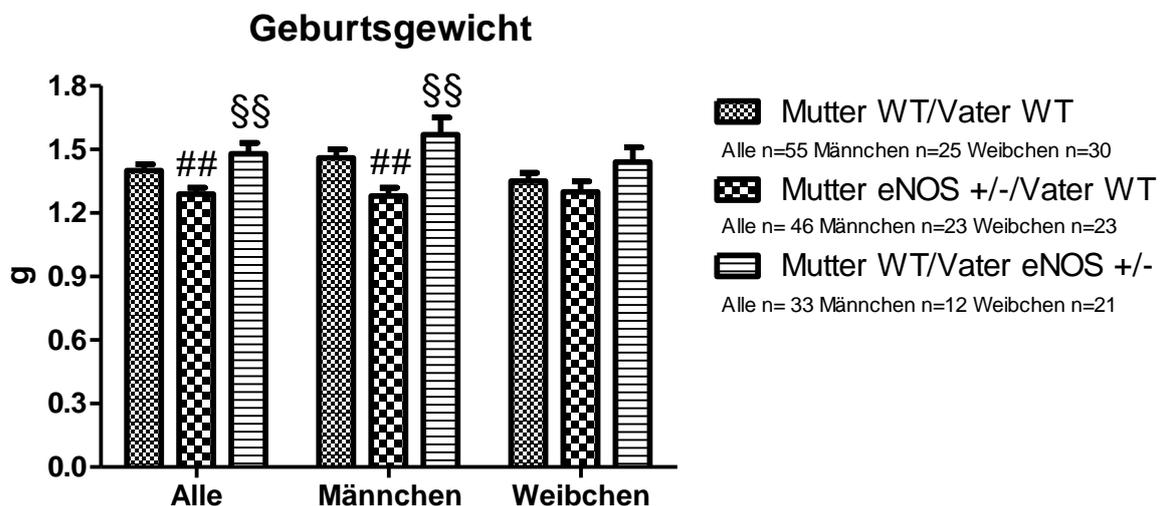


Abbildung 5: Graphische Darstellung des Geburtsgewichts der untersuchten Gruppen. Die Angabe der Daten erfolgt in Mittelwert +/- SD. ##: $p < 0,01$ vs. Gruppe 1, §§: $p < 0,01$ vs. Gruppe 2. Mann-Whitney-U-Test.

4.2 Körpergewicht

Vergleicht man die Körpergewichte aller Tiere zwischen den untersuchten Gruppen am Ende des Versuchs, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Teilt man die Tiere geschlechter-spezifisch auf, ergaben sich gegenläufige Ergebnisse. Die Männchen der Gruppe 2 hatten mit 3,51 g, das entspricht ca. 10%, ein signifikant niedrigeres Körpergewicht als die Männchen der Gruppe 1 (siehe Abbildung 6). Die Weibchen hatten am Ende des Versuchs hingegen sowohl in der Gruppe 2 als auch in der Gruppe 3 ein signifikant höheres Körpergewicht als die Weibchen der Kontrollgruppe.

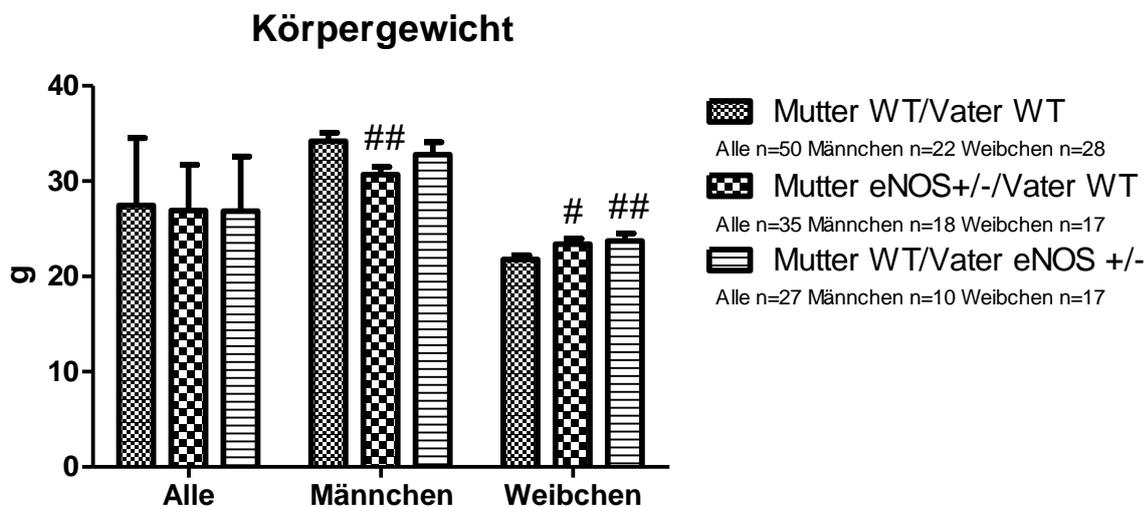


Abbildung 6: Graphische Darstellung des Körpergewichts der untersuchten Gruppen. Die Angabe der Daten erfolgt in Mittelwert +/- SD. ##: p< 0,01 vs. Gruppe 1, #:p<0,05 vs. Gruppe 1, Mann-Whitney-U-Test.

4.3 Nierengewicht

4.3.1 Gesamtes Nierengewicht

Addiert man die beiden Einzelgewichte der rechten und linken Niere zusammen und vergleicht dieses Gesamtgewicht, so ergaben sich bei allen Tieren und bei den Männchen keine signifikanten Unterschiede. Bei den Weibchen ergab sich, dass das mittlere Nierengewicht in Gruppe 2 (0,279 g +/-0,06 SD) schwerer ist, als das in Gruppe 1 (0,249 g +/-0,03 SD) mit einem p-Wert von 0,03. Die Organgewichte in Gruppe 3 (0,277g +/-0,06 SD) waren tendenziell schwerer als die der Kontrollgruppe mit einem p-Wert von 0,06.

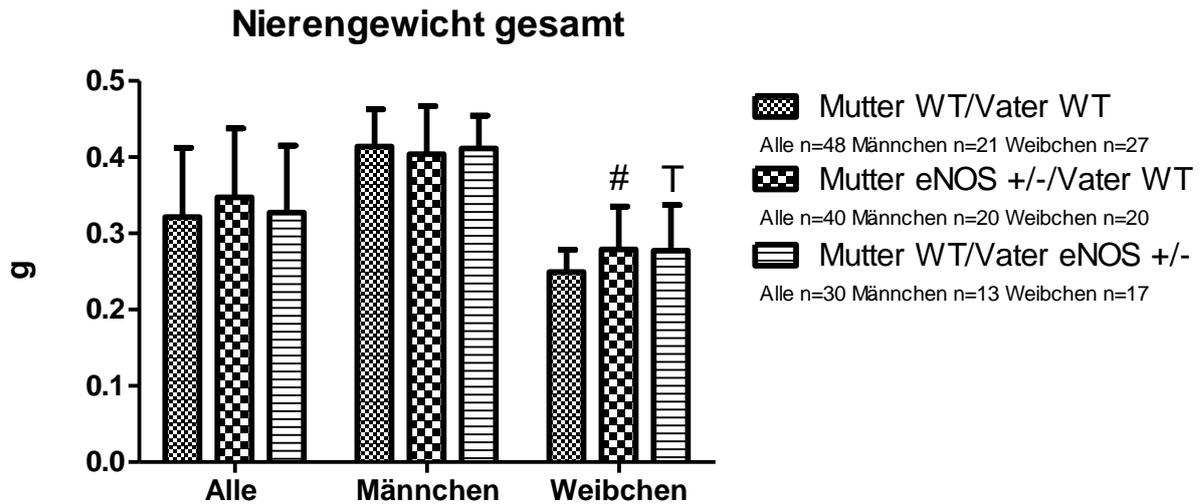


Abbildung 7: Graphische Darstellung des gesamten Nierengewichts der untersuchten Gruppen. Die Angabe der Daten erfolgt in Mittelwert +/- SD. Gruppe #: $p=0,03$ vs. Gruppe 1, T: $p=0,06$ vs. Gruppe 1, Mann-Whitney-U-Test.

4.3.2 Relatives Nierengewicht

Um eine bessere Aussage über die Organgewichte treffen zu können, wurden diese mit den Körpergewichten zum Zeitpunkt der Tötung ins Verhältnis gesetzt. Hiernach ergab sich folgendes Bild. Betrachtet man die Summe der beiden Nierengewichte im Verhältnis zum Körpergewicht bei allen Tieren, zeigte sich, dass das Verhältnis der Nierengewichte zum Körpergewicht in der Gruppe 2 höher lag als in Gruppe 1 ($p=0,04$). Auch bei den Männchen der Gruppe 2 lag das Verhältnis beider Nierengewichte zum Körpergewicht statistisch signifikant höher als in Gruppe 1 ($p=0,01$). Bei den weiblichen Tieren fanden sich beim Verhältnis des Nierengewichts zum Körpergewicht keine signifikanten Unterschiede.

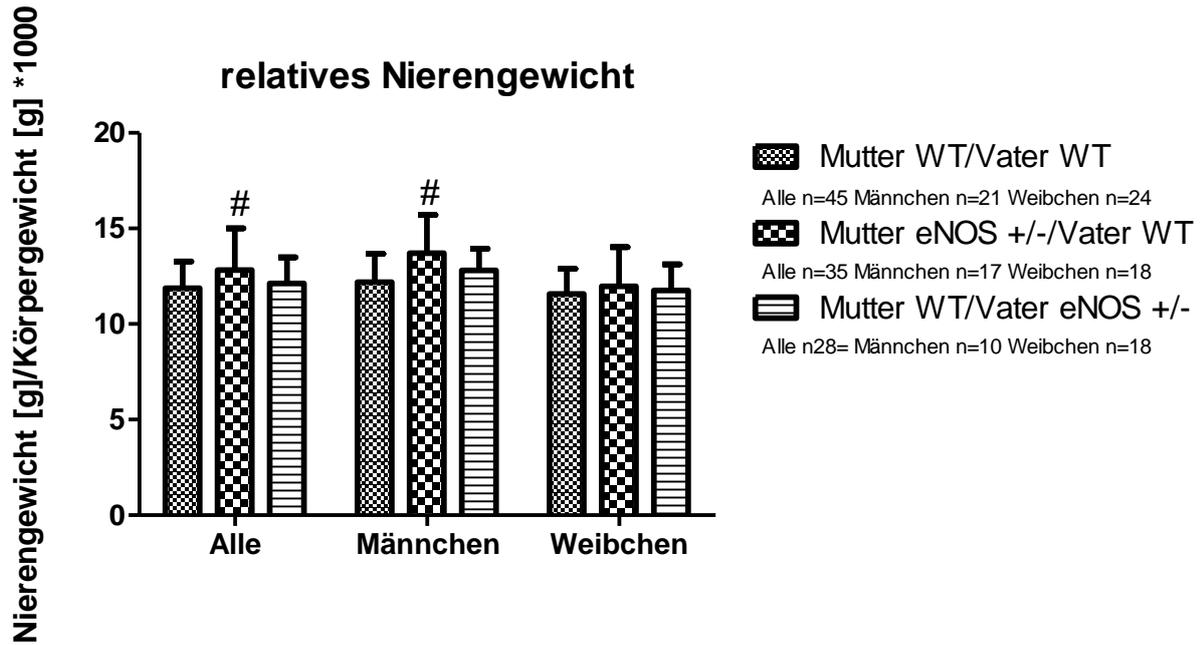


Abbildung 8: Graphische Darstellung des relativen Nierengewichts der untersuchten Gruppen. Die Angabe der Daten erfolgt in Mittelwert +/- SD. #: p=0,04 vs. Gruppe 1, Mann-Whitney-U-Test bzw #=0,01 vs. Gruppe 1, unpaired t-test.

4.4 Systolischer Blutdruck

Die Mittelwerte der in der 10., 19. und 24. Woche des Versuches gemessenen systolischen Blutdruckwerte unterschieden sich nicht statistisch signifikant. Auch aufgeteilt nach Geschlecht ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den systolischen Blutdruckwerten der drei Gruppen. Die Mittelwerte +/- Standardabweichungen sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Tabellarische Darstellung der Mittelwerte +/- SD der systolischen Blutdruckwerte in mmHg aller Tiere der untersuchten Gruppen nach Geschlecht aufgeteilt. Es ergeben sich hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Statistischer Test: Mann-Whitney-U-Test.

Gruppe	Geschlecht	10.Lebenswoche	19.Lebenswoche	24.Lebenswoche
Mutter WT/Vater WT	Alle Tiere	103,57±3,11 n=54	106,16±5,75 n= 40	102,85±2,33 n= 53
	Männchen	92,8±4,17 n=25	102,84±12,34 n=18	95.64±2.90 n=25

Ergebnisse

	Weibchen	112,86±3,83 n=29	108,91±3,18 n=22	109.29±3.14 n=28
Mutter eNOS +/- /Vater WT	Alle Tiere	98,53±2,54 n=46	98,57±3,36 n=36	99,66±2,31 n=41
	Männchen	97,57±3,44 n=23	91,67±4,36 n=18	93.95±3.24 n=20
	Weibchen	99,48±3,82 n=23	105,48±4,67 n=18	105.10±2.88 n=21
Mutter WT/Vater eNOS +/-	Alle Tiere	99,12±2,99 n=33	103,98±2,66 n=27	106,32±1,92 n=28
	Männchen	93,76±4,34 n=12	99,7±3,3 n=10	99,81±1,55 n=10
	Weibchen	102,18±3,9 n=21	106,5±3,69 n=17	109.94± 2.50 n=18

4.5 Nierenfunktionsparameter

4.5.1 Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

In unserem Versuchsaufbau wurden die Versuchstiere zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten im Stoffwechsellkäfig untersucht, um die Nierenfunktion zu bestimmen. Stoffwechsellversuch 1 wurde in der 12. Lebenswoche, Stoffwechsellversuch 2 in der 18. Lebenswoche und Stoffwechsellversuch 3 in der 23. Lebenswoche durchgeführt.

Die Ergebnisse der Glomerulären Filtrationsrate im Stoffwechsellversuch 1, 2 und 3 sind in Tabelle 4 dargestellt. Im Stoffwechsellversuch 1 fand sich bei den Weibchen mit heterozygoten eNOS knock-out Vätern eine tendenziell niedrigere GFR als in der Kontrollgruppe ($p=0,06$). Nur bei den im Stoffwechsel 3 gemessenen Werten fand sich eine statistisch signifikante Abweichung. Bei allen Tieren fand sich eine signifikant höhere GFR in Gruppe 3 im Vergleich zur Kontroll-

Ergebnisse

gruppe. Bei den Weibchen fand sich eine statistisch signifikant höhere GFR in den Gruppen 2 und 3 im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Tabelle 4: Tabellarische Darstellung der errechneten GFR der Stoffwechselversuche in der 12., 18. und 23. Lebenswoche. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM in ml/min. T:p=0,06 vs. Gruppe 1, #:p<0,05 vs. Gruppe 1, ##: p<0,001 vs. Gruppe 1. Statistischer Test: Mann-Whitney-U-Test

Gruppe	Geschlecht	Stoffwechselversuch1	Stoffwechselversuch2	Stoffwechselversuch3
Mutter WT/Vater WT	Alle	0,034 (+/-0,004) n=29	0,019 (+/-0,003) n=31	0,042 (+/-0,004) n=34
	Männchen	0,037 (+/-0,006) n=16	0,021 (+/-0,003) n=15	0,062 (+/-0,008) n=13
	Weibchen	0,030 (+/-0,004) n=13	0,018 (+/-0,004) n=16	0,030 (+/-0,003) n=21
Mutter eNOS +/-Vater WT	Alle	0,024 (+/-0,003) n=19	0,017 (+/-0,003) n=16	0,049 (+/-0,004) n=29
	Männchen	0,023 (+/-0,007) n=6	0,024 (+/-0,003) n=7	0,05 (+/-0,007) n=17
	Weibchen	0,025 (+/-0,003) n=13	0,018 (+/-0,005) n=9	0,051 (+/-0,003) ## n=12
Mutter WT/Vater eNOS +/-	Alle	0,034 (+/-0,000) n=17	0,027 (+/-0,006) n=15	0,056 (+/-0,006)# n=22
	Männchen	0,05 (+/-0,007) n=5	0,015 (+/-0,003) n=4	0,06 (+/-0,011) n=8
	Weibchen	0,021 (+/-0,004) T n=12	0,032 (+/-0,007) n=11	0,054 (+/-0,005) ## n=14

Ergebnisse

4.5.2 Glomeruläre Filtrationsrate in Relation zum Körpergewicht

Tabelle 5 zeigt die Mittelwerte +/-Standardfehler der Glomerulären Filtrationsrate im Verhältnis zum Körpergewicht gemessen im Stoffwechselfersuch 1, 2 und 3. Im Stoffwechselfersuch 1 ergab sich bei den Tieren mit heterozygoten eNOS knock-out Müttern eine signifikant niedrigere GFR als in der Kontrollgruppe. Aufgeteilt nach Geschlecht ergab sich eine signifikante GFR in Relation zum Körpergewicht bei den Weibchen mit heterozygoten eNOS knock-out Vätern.

Im Stoffwechselfersuch 2 ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Im Stoffwechselfersuch 3 ergaben sich signifikant erhöhte GFR Werte in Relation zum Körpergewicht bei allen Tieren der Gruppe 2 und 3 im Vergleich zur Gruppe 1. Aufgeschlüsselt nach Geschlecht zeigte sich die erhöhte GFR Werte in Relation zum Körpergewicht bei den Weibchen der Gruppen 2 und 3 im Vergleich zur Kontrollgruppe, Gruppe 1. Bei den Männchen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Ergebnisse der Glomerulären Filtrationsrate im Verhältnis zum Körpergewicht in ml/min/g im Stoffwechselfersuch 1, 2 und 3. Die Werte sind angegeben als Mittelwert +/- SEM. #: p<0,05 vs. Gruppe 1; ##: p<0,01 vs. Gruppe 1. Statistischer Test: Mann-Whitney-U-Test.

Gruppe	Geschlecht	Stoffwechselfersuch1	Stoffwechselfersuch 2	Stoffwechselfersuch 3
Mutter WT/Vater WT	Alle	1,43 +/-0,13 n=29	0,76 +/-0,10 n=31	1,55 +/-0,14 n= 34
	Männchen	1,32 +/-0,18 n=16	0,82 +/-0,12 n=15	1,79 +/-0,25 n=13
	Weibchen	1,56 +/-0,21 n=13	0,86 +/-0,17 n=16	1,40 +/-0,15 n=21
Mutter eNOS +/-Vater WT	Alle	1,03 +/-0,11 # n=19	0,80 +/-0,12 n=16	1,88 +/-0,15 # n= 29
	Männchen	0,86 +/-0,28 n=6	0,55 +/-0,08 n=7	1,58 +/-0,22 n=17
	Weibchen	1,05 +/-0,14 n=13	1,04 +/-0,26 n=9	2,26 +/-0,15 ## n=12

Ergebnisse

Mutter WT/Vater eNOS +/-	Alle	1,26 +/-0,15 n=17	1,05 +/-0,20 n=15	2,13 +/-0,20 ## n= 22
	Männchen	1,67 +/-0,25 n=5	0,51 +/-0,06 n=4	1,90 +/-0,32 n=8
	Weibchen	0,99 +/-0,21 # n=12	1,23 +/-0,27 n=11	2,40 +/-0,22 ## n=14

4.5.3 Albumin-Kreatinin-Ratio im Urin

Die im Urin gemessene Albuminkonzentration im Stoffwechsel 3 wurde ins Verhältnis zur Kreatininkonzentration im Urin gesetzt. Abbildung 9 zeigt die Mittelwerte +/- Standardabweichungen der Albumin-Kreatinin-Ratio. Es ergab sich eine signifikant höhere Albumin-Kreatinin-Ratio im Urin bei den Männchen der Gruppe 3 im Vergleich zur Gruppe 2, aber nicht zur Kontrollgruppe, Gruppe 1. Bei den Weibchen fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

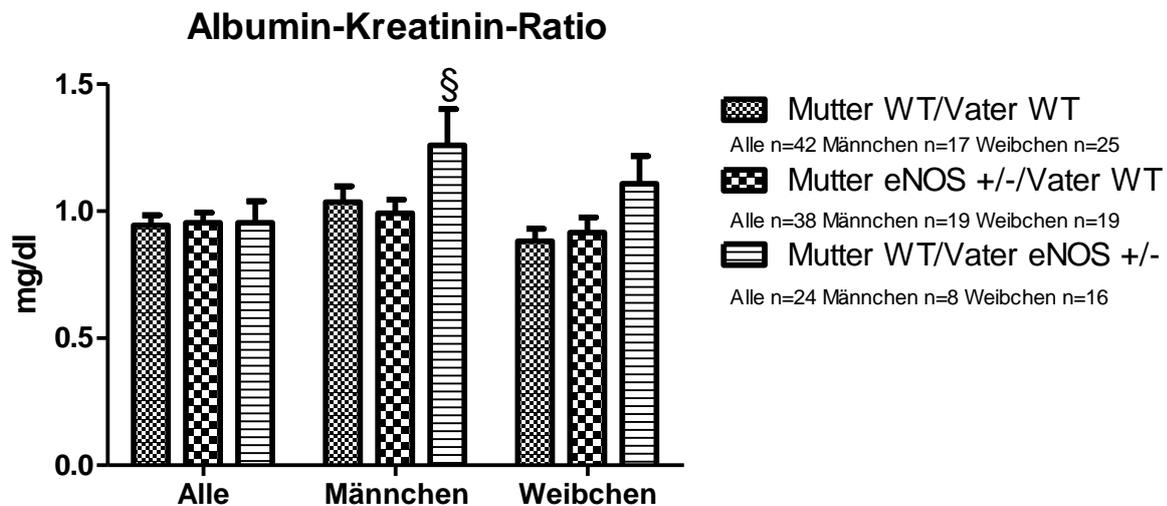


Abbildung 9: Graphischer Vergleich Albumin-Kreatinin-Ratio im Urin im Stoffwechselversuch 3. aller Tiere der untersuchten Gruppen. Die Angabe der Daten erfolgt in Mittelwert +/- SD. §: p < 0,05 vs. Gruppe 2. Statistischer Test: unpaired t-Test.

4.6 Ergebnisse der histologische Untersuchungen

4.6.1 Glomerulosklerose

Die Mittelwerte +/- Standardabweichung für den Glomerulosklerose-Score sind in Abbildung 10 dargestellt. Die Werte unterschieden sich bei allen Tieren, den Männchen und den Weibchen nicht statistisch signifikant voneinander.

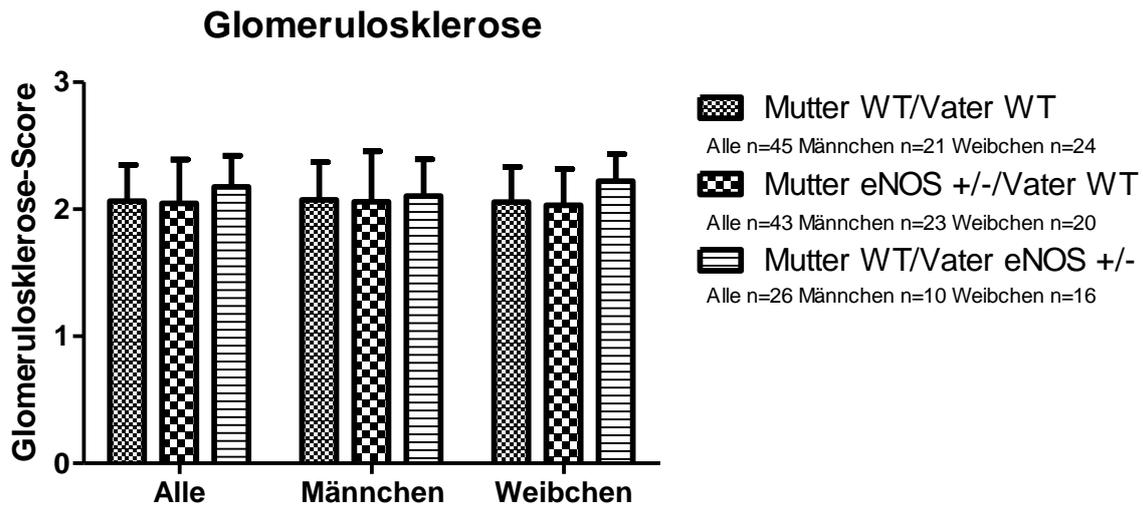


Abbildung 10: Graphischer Vergleich des Glomerulosklerose-Scores der Niere aller Tiere der untersuchten Gruppen. Die Angabe der Daten erfolgt in Mittelwert +/- SD. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Statistischer Test: Mann-Whitney-U-Test.

4.6.2 Interstitielle Fibrose

Die Mittelwerte für die Anzahl der fibrosepositiver gemessenen Pixel +/- Standardabweichung sind in Abbildung 11 dargestellt. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

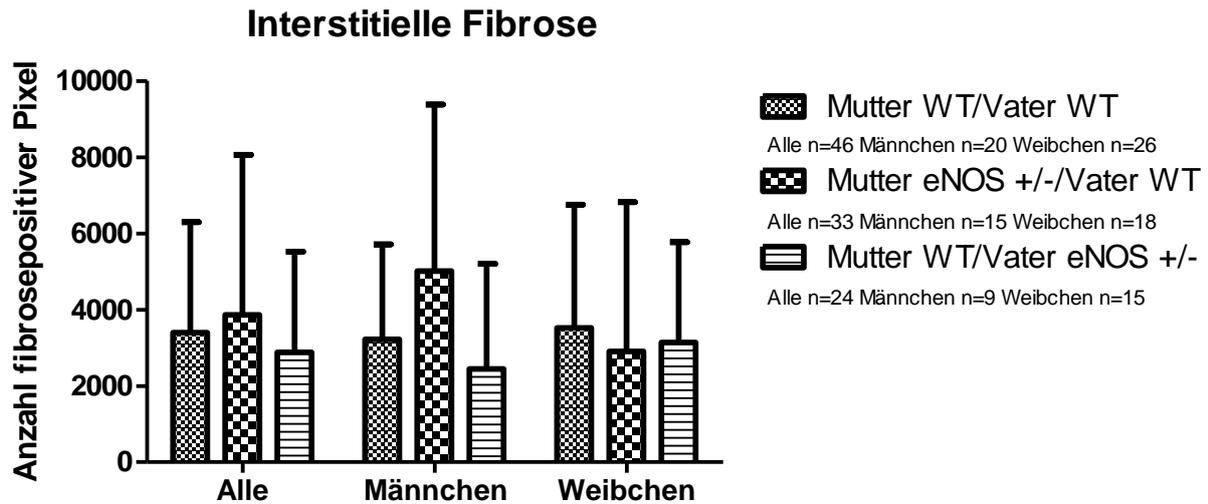


Abbildung 11: Graphische Darstellung der interstitiellen Fibrose der untersuchten Gruppen im Vergleich. Die Angabe der Daten erfolgt in Mittelwert +/- SD. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Statistischer Test: Mann-Whitney-U-Test.

4.6.3 Perivaskuläre Fibrose

Die Mittelwerte +/- Standardabweichung für den perivaskuläre Fibrose-Index sind in Abbildung 12 dargestellt. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

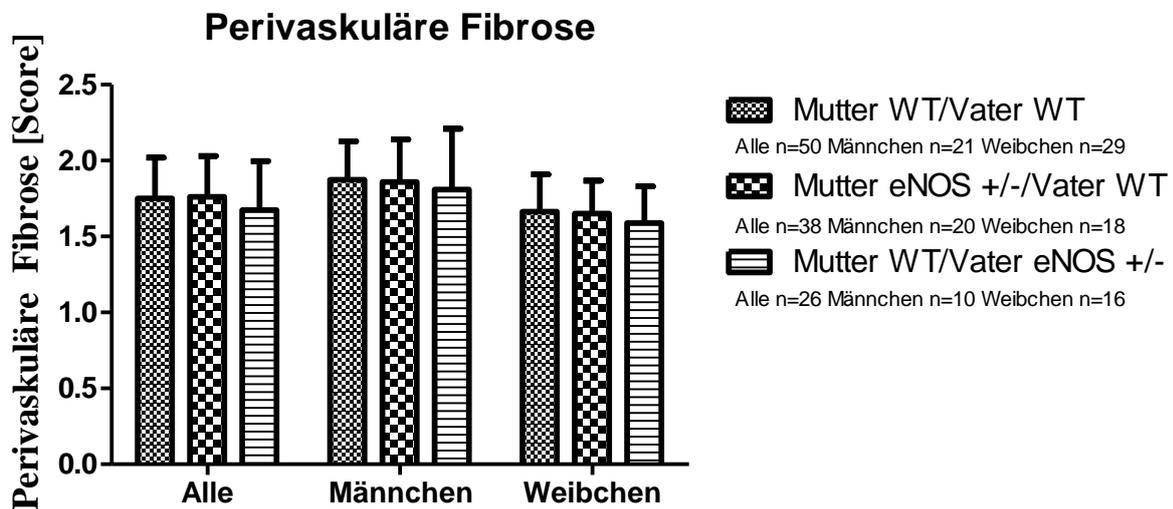


Abbildung 12: Graphische Darstellung der perivaskulären Fibrose aller Tiere der untersuchten Gruppen im Vergleich. Die Angabe der Daten erfolgt in Mittelwert +/- SD. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Statistischer Test: unpaired-t-Test.

4.6.4 Media-Lumen-Ratio der intrarenalen Arterien

Die renale arterielle Gefäßwanddicke war bei allen Tieren statistisch signifikant höher in Gruppe 3 als in Gruppe 2, aber nicht als in der Kontrollgruppe, Gruppe 1.

Nach Geschlecht aufgeteilt ergab sich folgendes Bild: Bei den Männchen waren die renale arterielle Gefäßwanddicke in Gruppe 3 statistisch signifikant höher als in Gruppe 2, aber ebenfalls nicht als in der Kontrollgruppe. Bei den Weibchen ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede.

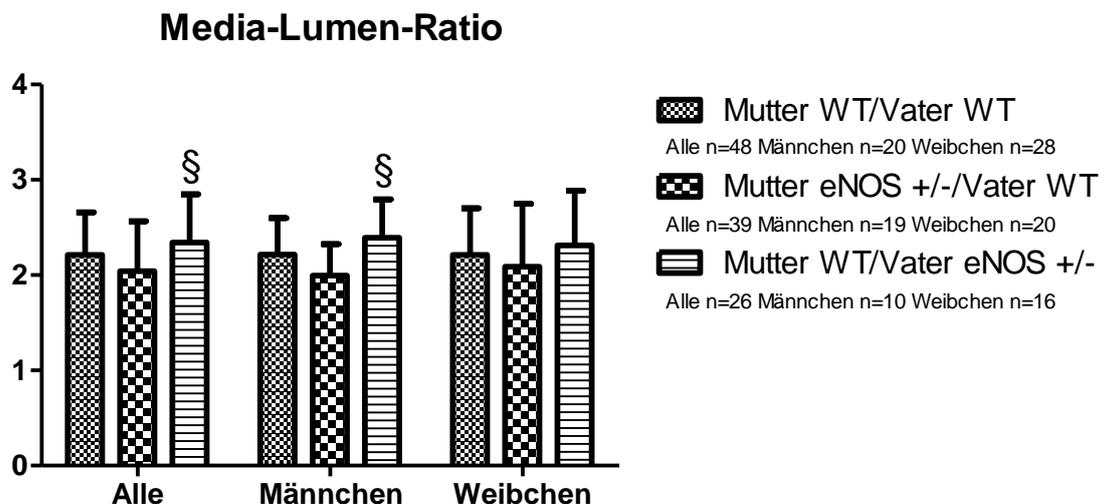


Abbildung 13: Graphische Darstellung der Media-Lumen-Ratio der intrarenalen Arterien aller Tiere der untersuchten Gruppen. Die Angabe der Daten erfolgt in Mittelwert +/- SD. §: $p = 0,02$ vs. Gruppe 2, Mann-Whitney-U-Test.

4.7 Renin-positive Glomeruli

Die Auswertung der mittels Immunfluoreszenz angefärbten Schnitte ergab die Anzahl reninpositiver Glomeruli pro jeweiligem Schnitt. Die Mittelwerte +/- Standardabweichung sind in Abbildung 14 dargestellt. Es zeigte sich in Gruppe 3 ein statistisch signifikant höheres Verhältnis von renin-positiven Glomeruli zur Gesamtglomerulizahl als in der Kontrollgruppe und als in Gruppe 2.

Trennt man die Tiere geschlechterspezifisch auf, fand sich ebenfalls eine signifikant höhere Anzahl renin-positiver Glomeruli bei den Weibchen mit heterozygoten eNOS +/- Vater im Vergleich zur Kontrollgruppe und im Vergleich zur Gruppe 2. Bei den Männchen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

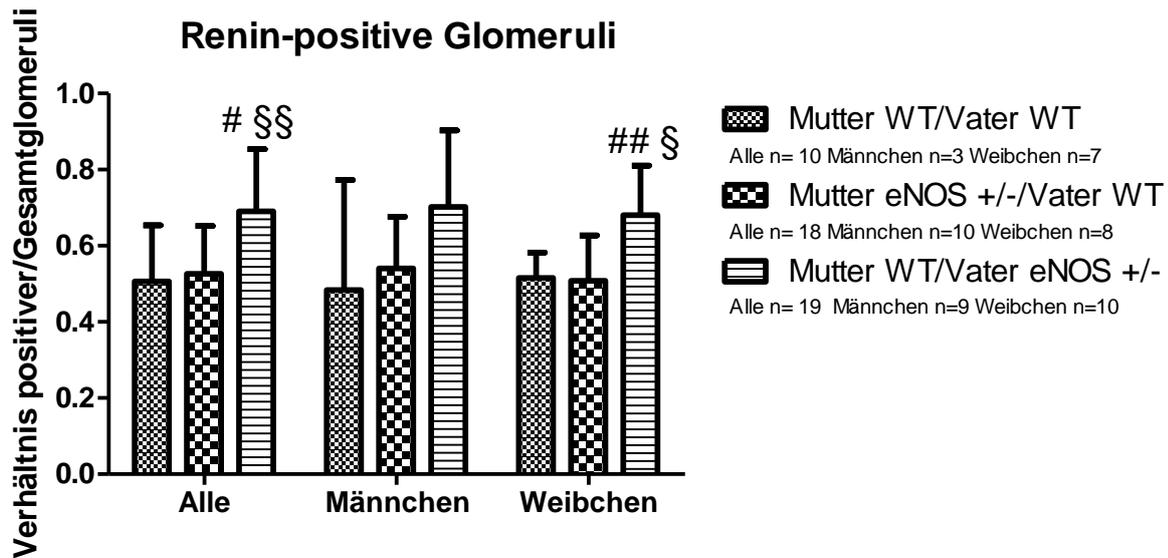


Abbildung 14: Graphische Darstellung des Verhältnis reninpositiver Glomeruli/Gesamtglomeruli aller Tiere der untersuchten Gruppen. Die Angabe der Daten erfolgt in Mittelwert +/- SD #: $p=0,01$ vs. Gruppe 1, §§: $p<0,01$ vs. Gruppe 2 (Mann-Whitney-U-Test), ##: $p<0,01$ vs. Gruppe 1, §: $p=0,01$ vs. Gruppe 2 (unpaired t-Test).

4.8 Renale ACE-Expression

Die Mittelwerte +/- Standardfehler für die relative ACE-Proteinkonzentration in der Niere sind in der Abbildung 15 dargestellt. Bei der renalen ACE-Expression fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

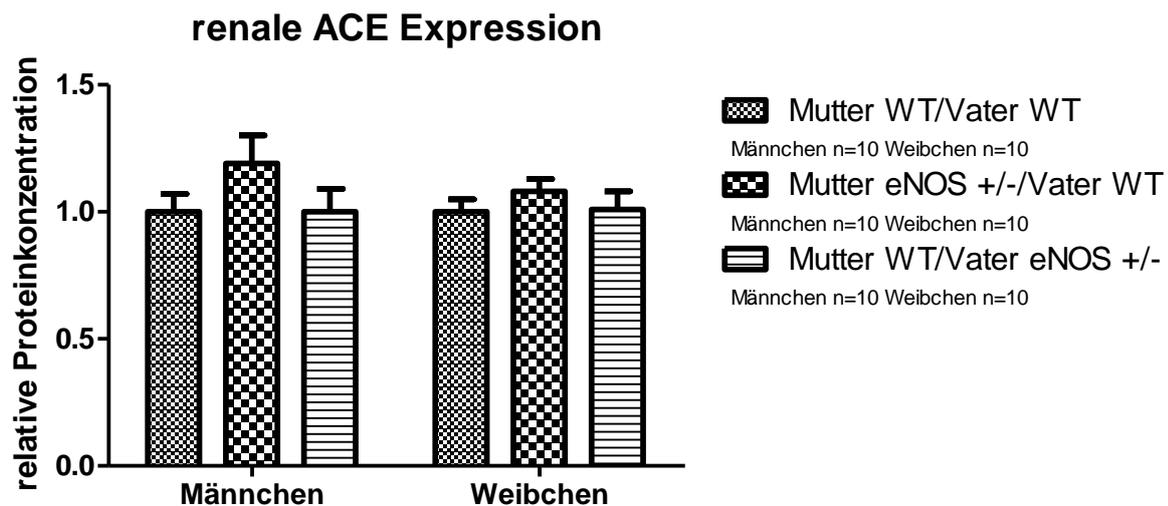


Abbildung 15: Graphische Darstellung der renalen relativen ACE-Konzentration der Männchen und der Weibchen der untersuchten Gruppen. Die Angabe der Daten erfolgt in Mittelwert +/- SEM. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Statistischer Test: unpaired t-Test.

4.9 Renale AT₂-Rezeptor Expression

Die Mittelwerte +/- Standardfehler für die relative AT₂-Rezeptordichte in der Niere sind in Abbildung 16 dargestellt. Auch hier ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen.

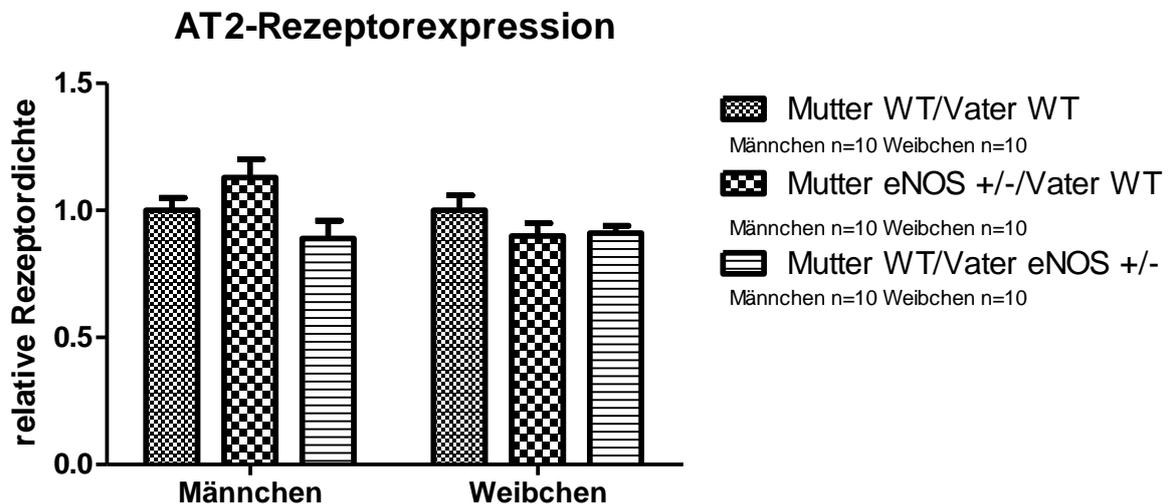


Abbildung 16: Graphische Darstellung der relativen renalen AT₂-Rezeptordichte der Männchen und der Weibchen der untersuchten Gruppen. Die Angabe der Daten erfolgt in Mittelwert +/- SEM. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Statistischer Test: unpaired t-Test.

4.10 Aldosteron im 24h-Sammelurin

Im Stoffwechselfersuch 1 zeigte sich eine statistisch signifikante Erhöhung der Aldosteronkonzentration aller Tiere in der Gruppe 3 im Vergleich zur Kontrollgruppe, Gruppe 1 und zur Gruppe 2. Nach geschlechterspezifischer Aufteilung bestätigte sich bei den Männchen eine signifikant höhere Aldosteronkonzentration in Gruppe 3 im Vergleich zur Kontrollgruppe und eine signifikant höhere Aldosteronkonzentration als in Gruppe 2. Bei den Weibchen lagen die Mittelwerte der Aldosteronkonzentration aus dem 24h-Sammelurin durchweg höher als bei den Männchen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen.

In der 23. Lebenswoche wurde im Stoffwechselfersuch 3 erneut die Aldosteronkonzentration im 24h-Sammelurin bestimmt. Bei allen Tieren ergab sich eine erhöhte Aldosteronkonzentration in der Gruppe 3 im Verhältnis zur Gruppe 2, aber nicht zur Kontrollgruppe, Gruppe 1. Aufgeteilt nach Geschlecht ergab sich bei den Männchen eine höhere Konzentration von Aldosteron in der Gruppe 3, allerdings war diese Erhöhung mit einem $p=0,058$ nicht statistisch signifikant. Bei den Weibchen wurden auch im Stoffwechsel 3 deutlich höhere Konzentrationen von Aldosteron

Ergebnisse

aus dem 24h-Sammelurin gemessen als bei den Männchen. Es ergeben sich hier keine statistischen Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen.

Tabelle 6: Tabellarische Darstellung der Aldosteronkonzentration im 24h-Sammelurin im Stoffwechselforschung 1 und 3 aller Tiere der untersuchten Gruppen. Die Angabe der Daten erfolgt in Mittelwert +/- SD. #: p<0,05 vs. Gruppe 1, ##: p<0,01 vs. Gruppe 1, §: p<0,05 vs. Gruppe 2, T: p=0,058 vs. Gruppe 1, Mann-Whitney-U-Test.

Gruppe	Geschlecht	Stoffwechselforschung 1	Stoffwechselforschung 3
Mutter WT/Vater WT	Alle	0,16 +/-0,28 n=40	0,38 +/-0,54 n=43
	Männchen	0,027 +/-0,02 n=18	0,12 +/-0,14 n=17
	Weibchen	0,27 +/-0,35 n=22	0,55 +/-0,63 n=26
Mutter eNOS +/-Vater WT	Alle	0,14 +/-0,19 n=34	0,33 +/-0,49 n=38
	Männchen	0,03 +/-0,04 n=13	0,14 +/-0,14 n=19
	Weibchen	0,21 +/-0,21 n=21	0,53 +/-0,63 n=19
Mutter WT/Vater eNOS +/-	Alle	0,26 +/-0,28 # §§ n=22	0,54 +/-0,51 § n=24
	Männchen	0,10 +/-0,10 ## § n=8	0,25 +/-0,25 T n=8
	Weibchen	0,34 +/-0,31 n=14	0,68 +/-0,55 n=16

4.11 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

Tabelle 7: Synopsis der Ergebnisse der Auswertung von Hämodynamik, Wachstumsverlauf, Körper- und Organgewicht, Nierenfunktion, Histologie, sowie RAAS im Gruppenvergleich. Nähere Erläuterungen im Text. A= Alle Tiere gesamt, ♂= Männchen, ♀=Weibchen, ↓ ↑ vs. Gruppe 1, ↑ ↓ vs. Gruppe 2.

Gewichte, Blutdruck			
	Mutter WT/Vater WT	Mutter eNOS+/- /Vater WT	Mutter WT/Vater eNOS+/-
Geburtsgewicht (g)	=	A↓ ♂↓	=
Körpergewicht (g)	=	♂↓ ♀↑	♀↑
Nierengewicht (g)	=	♀↑	♀ T↑
Relatives Nierengewicht	=	A↑ ♂↑	=
systolischer Blutdruck	=	=	=
Nierenfunktion			
	Mutter WT/Vater WT	Mutter eNOS+/- /Vater WT	Mutter WT/Vater eNOS+/-
GFR Stoffwechsel 1	=	=	♀ T↓
GFR Stoffwechsel 2	=	=	=
GFR Stoffwechsel 3	=	♀↑	A↑ ♀↑
Relative GFR Stoffwechsel 1	=	A↓	♀↓
Relative GFR Stoffwechsel 2	=	=	=
Relative GFR Stoffwechsel 3	=	A↑ ♀↑	A↑ ♀↑
Albumin-Kreatinin-Ratio im Urin	=	=	♂ ↑
Histologie			
	Mutter WT/Vater WT	Mutter eNOS+/- /Vater WT	Mutter WT/Vater eNOS+/-
Glomerulosklerose	=	=	=
Interstitielle Fibrose	=	=	=
Perivaskuläre Fibrose	=	=	=
Media-Lumen-Ratio	=	=	A↑
Renin-Angiotensin-Aldosteron-System			
	Mutter WT/Vater WT	Mutter eNOS+/- /Vater WT	Mutter WT/Vater eNOS+/-

Ergebnisse

Reninpositive Glomeruli	=	=	A↑↑ ♀↑↑
Renale ACE Expression	=	=	=
Renale AT ₂ -Rezeptordichte	=	=	=
Aldosteron im 24h Urin - Stoffwechsel 1	=	=	A↑ ♂↑
Aldosteron im 24h Urin - Stoffwechsel 3	=	=	A↑ ♂TT↑

5. Diskussion

5.1 Geburts- und Körpergewicht und Nierengewichte

Das Geburtsgewicht aller Tiere und bei den Männchen der Gruppe 2 war im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt. Am Ende des Versuchs waren die Männchen der Gruppe 2 weiterhin signifikant leichter als die Tiere der Kontrollgruppe. Fanden sich bei den Weibchen zum Zeitpunkt der Geburt keine Gewichtsunterschiede, zeigte sich jedoch am Ende des Versuchs, dass die Weibchen der Gruppe 2 und 3 signifikant schwerer waren als die Weibchen der Kontrollgruppe.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass männliche Nachkommen von eNOS +/- Müttern gegenüber Nachkommen von WT Eltern signifikant leichter geboren werden. Es kann daher angenommen werden, dass bei maternalem heterozygotem eNOS knock-out das intrauterine Milieu, im Sinne einer intrauterinen Mangelsituation beeinflusst wurde. Dies spiegelt sich im signifikant niedrigeren Geburtsgewicht wieder. Bei den männlichen Nachkommen ist es hierbei, im Sinne einer Gewichtsreduktion, zu einem ausgeprägteren Effekt gekommen als bei Weibchen.

Bei den Nachkommen heterozygoter eNOS knock-out Väter fanden sich keine Änderungen hinsichtlich des Geburtsgewichtes, Veränderungen des renalen Phänotyps konnten allerdings beobachtet werden.

Bei den Weibchen der Gruppe 2 fanden sich signifikant schwerere Nieren. Bei den Weibchen der Gruppe 3 fanden sich ebenfalls tendenziell schwerere Nieren als in der Kontrollgruppe. Das relative Nierengewicht ist bei allen Tieren und den Männchen der Gruppe 2 im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht.

Während die Literatur einheitlich den Effekt eines erniedrigten Geburtsgewichts einer „fetal programmierten“ F1 Generation nachweisen kann, sind die Ergebnisse bezüglich des Nierengewichts uneinheitlich. Erhöhte fetale Nierengewichte konnten auch bei Schafen, welche intrauterin Dexamethason exponiert wurden, durch Moritz et al. nachgewiesen werden [69]. MacLaughlin et al. hingegen konnten keine Veränderungen des fetalen Gewichtes, sowie des absoluten und relativen Nierengewichts am 55. Trächtigkeitstag von Nachkommen von Schafen, deren Mütter einer perikonzeptionellen Mangelernährung ausgesetzt waren, im Vergleich zur Kontrollgruppe sehen [70]. Es wurde jedoch eine inverse Beziehung zwischen dem Gewichtsverlust der Mutter während der perikonzeptionellen Mangelernährung und dem relativen Nierengewicht am 55. Trächtigkeitstag gesehen. Dies legt einen Mechanismus nahe, der das Wachstum der fetalen Niere in der Phase des maternalen Gewichtsverlusts perikonzeptionell schützt.

5.2 Regulation des systolischen Blutdrucks

Die systolischen Blutdruckwerte unterschieden sich zu keinem der drei gemessenen Zeitpunkte in den drei Gruppen. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, ist es in tierexperimentellen Studien hinreichend gelungen durch Interventionen der mütterlichen Diät, Manipulation der Plazenta etc. erhöhte systolische Blutdruckwerte in der F1 Generation zu programmieren [71, 72]. Zumeist entwickelt sich ein Bluthochdruck oft erst im späteren Lebensalter der Tiere, Blutdruckerhöhung bei Ratten konnten ab 3.-4. Lebenswoche (15-30mmHg), einhergehend mit niedrigerer Herzfrequenz gefunden werden [71]. In den Modellen mit Ratten konnte nach spätestens 100 Tagen [71, 72] und bei Mäusen nach 10 (Weibchen) bzw. 15 (Männchen) Wochen erhöhte systolische Blutdrücke gemessen werden [73]. Der erhöhte Blutdruck bleibt bis zur 44. Lebenswoche bestehen und man geht davon aus, dass dies lebenslang so bleibt [71, 72]. In unserem Versuchsaufbau wurden die systolischen Blutdrücke in der 10., 18. und 23. Lebenswoche gemessen. Damit scheidet ein zu junges Lebensalter der Versuchstiere als Grund für die fehlende Programmierung des systolischen Blutdrucks eher aus. Das verwendete eNOS-knock-out Tiermodell ist prinzipiell dennoch geeignet, um als Modell für fetale Programmierung zu fungieren. Insbesondere in Hinblick darauf, dass das Geburtsgewicht erniedrigt war, und somit von einer intrauterinen Mangelsituation auszugehen ist. Die Bestimmung des systolischen Blutdrucks mittels Tail-cuff Methode gilt als störanfällig [74]. Die Tiere sind aufgeregt, gewöhnen sich nur langsam an die Messungen, es entstehen ggf. Messfehler durch Bewegungsartefakte. Um diese Fehlerquelle zu minimieren wurden die Tiere mehrfach gemessen. Als Gold-Standard zur Messung des systolischen Blutdrucks gilt weiterhin die invasive Messung [74]. Die invasive Messung geht nicht nur mit einem deutlich erhöhten technischen Aufwand, aber auch mit deutlich erhöhtem Komplikationsrisiko bis zum Tod des Versuchstieres ein. Deshalb wurde in unserem Versuchsaufbau von einer invasiven Messmethode Abstand genommen.

Möglicherweise war der Stimulus, also der heterozygote Knock-out des eNOS-Gens, nicht ausreichend, um Veränderungen des systolischen Blutdrucks zu erzeugen. Woods et al. konnten zum Beispiel zeigen, dass je weniger Proteine (30% vs. 70%) Ratten während der Trächtigkeit erhielten, desto ausgeprägter die Effekte auf den systolischen Blutdruck und auch auf das Geburtsgewicht der F1 Generation waren [75]. Es wäre auch möglich, dass es im Verlauf des Lebens der F1 Generation weitere Stimuli (second hit) im Sinne der „thrifty phenotype“ Hypothese hätte geben müssen, um einen Unterschied im systolischen Blutdruck zu sehen. Um eine solche Situation zu simulieren, hätten man die F1 Generation postnatal z.B. mit einer hyperkalorischen oder salzreichen Diät füttern können. Edwards et al. konnten z.B. durch die postnatale Infusion von Angiotensin II höhere systemische Blutdruckreaktion bei den „fetal programmier-

ten“ Tieren nachweisen [76]. Eine ähnliche Intervention wäre in unserem Versuchsaufbau auch denkbar gewesen.

5.3 Veränderung der Nierenfunktion

In unserem Versuch fand sich eine tendenziell erniedrigte GFR im Stoffwechsel 1 bei den Weibchen mit einem heterozygoten eNOS +/- Vater. Die GFR normalisierte sich dann im Laufe des Versuchs, im Stoffwechselversuch 3 wurde eine erhöhte GFR der Weibchen der Gruppen 2 und 3 im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen.

Die GFR ist vom Körpergewicht abhängig, im klinischen Alltag behilft man sich deshalb oft mit der Cockcroft-Gault-Formel. Deshalb wird die GFR in diesem Versuch in Relation zum Körpergewicht der jeweiligen Versuchstiere gesetzt, um eine bessere Aussage über die Nierenfunktion machen zu können. Im Stoffwechselversuch 1 findet sich eine niedrige GFR in Relation zum Körpergewicht bei den Weibchen mit einem heterozygoten eNOS +/- Vater. Im Verlauf normalisierte sich die GFR/Körpergewicht und es lassen sich im Stoffwechselversuch 3 erhöhte Werte der Weibchen mit sowohl heterozygoten eNOS+/- Müttern und heterozygoten eNOS +/- Vätern nachweisen.

In unserem Versuchsaufbau war also eine anfänglich reduzierten Nierenfunktion bei den Weibchen mit heterozygoten Vätern (Gruppe 3 vs. Gruppe 1) beobachtet worden. Die reduzierte Nierenfunktion in der 12. Woche deckt sich mit dem Ergebnis, dass die Tiere dieser Gruppe 3 signifikant weniger und größere Glomeruli hatten, wie durch Endres im selben Tierexperiment gezeigt werden konnte [77]. Eine Kompensation einer erniedrigten Nephronanzahl über die vergrößerte Oberfläche pro Glomerulum und über eine kompensatorische Hyperfiltration bis zu 80% wird beschrieben [59]. Die statistisch signifikante Erhöhung der GFR der F1 Generation in der 23. Woche bei den Weibchen in Gruppe 3 und die vergrößerte Oberfläche pro Glomerulum sind Hinweise darauf. Die Bedeutung einer Hyperfiltration über die erhöhte GFR ist nicht bekannt. Bei den untersuchten Tieren fand sich kein offensichtlicher Anhalt für ein erhöhtes Herzzeitvolumen wie bei arteriellem Hypertonus, Hyperthyreose oder Gravidität.

Die Werte für die GFR in Stoffwechselversuch 2 sind niedriger als in Stoffwechselversuch 1 und 3, allerdings nicht statistisch signifikant. Schaut man sich die Daten im Scatterplot an, fällt die große Varianz der Daten auf. Allerdings besteht aufgrund der Verteilung der Messwerte kein Anhalt, an der Korrektheit der Daten zu zweifeln.

Albumin im Urin ist ein sensitiver Marker für generalisierte endotheliale Dysfunktion [78], [79]. Sowohl bei Nagern, als auch beim Menschen ist eine hohe Variabilität der Albuminausschei-

Diskussion

dung bekannt. Denn Albumin kann auch aus vielen anderen Gründen vorübergehend im Urin nachweisbar sein, etwa nach anstrengendem körperlichen Training oder bei einem Harnwegsinfekt. Deshalb hätte man diese Messung an mindestens zwei unterschiedlichen Zeitpunkten durchführen müssen. Außerdem könnte die Fallzahl zu klein gewesen sein, um Unterschiede erkennen zu können. Die männlichen Nachkommen eines eNOS +/- Vater hatten eine erhöhte Albumin-Kreatinin Ratio im Vergleich zur Gruppe 2, aber nicht zur Kontrollgruppe.

Die Niere ist in der Intaktheit ihrer Morphologie entscheidend für die Regulation des Blutdrucks und der Elektrolythomöostase. Schädigungen des Nierenparenchyms und die Nierenarterienstenose führen symptomatisch zur sekundären arteriellen Hypertonie. Dass ein Zusammenhang zwischen der Intaktheit der Niere und kardiovaskulären Erkrankungen besteht, ist seit Einführung der Hämodialyse und dem damit aufgetretenen hohen Risiko für kardiovaskulären Tod bekannt. Erst seit Kurzem sind auch schon geringe renale Dysfunktionen als starke kardiovaskuläre Risikofaktoren anerkannt [80]. Als entscheidende Dysfunktionen wurden u.a. die Mikroalbuminurie und eine reduzierte GFR identifiziert.

Eine interessante Hypothese, welche eine Funktionsstörung der Niere mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko verbindet, findet sich in der fetalen Programmierung. Der Erste, der in durch proteinreduzierte Kost programmierten Rattennachkommen nicht nur erhöhte systolische Blutdruckwerte sondern auch signifikant weniger Glomeruli fand, war Zeman im Jahr 1968 [81]. Auch in menschlichen Föten fand sich eine Assoziation von niedrigem Geburtsgewicht (IUGR) mit einem angeborenen Mangel an Nephronen und einer kompensatorischen Glomerulumhypertrophie [82]. Histologisch konnte in mehreren Studien eine signifikante Reduktion der Nephronenzahl, z.B. um 30% im Rattenmodell reproduziert werden [83-87]. Manalich et al. fanden bei Babies mit einem Geburtsgewicht von weniger als 2500 g (SGA) 12% weniger Nephronen als in der Kontrollgruppe [88]. Brenner führt den möglichen Zusammenhang einer reduzierten Nephronzahl und die Bedeutung für das adulte Leben in der sog. *Brenner Hypothese* aus [84]. Er postuliert, dass eine direkte Beziehung zwischen dem Geburtsgewicht und der Nephronzahl bestehe. Zudem postuliert Brenner eine inverse Korrelation zwischen Blutdruck und Geburtsgewicht, ebenso wie eine inverse Korrelation zwischen Nephronanzahl und Blutdruck.

Nwagwu et al. konnten zudem zeigen, dass mit der reduzierten Nephronanzahl eine kompensatorische Glomerulumhypertrophie und single-nephron Hyperfiltration ($GFR\uparrow$) einhergeht [89]. Durch die verminderte Anzahl von Nephronen sinkt konsekutiv die renale Natriumausscheidung, es entwickelt sich eine essentielle Hypertonie in deren Verlauf es, unterstützt durch die Glomerulumhypertrophie, zur Ausbildung von Glomerulosklerose kommt. Dies führt zum Verlust

Diskussion

von weiterem funktionalem renalen Gewebe und schließlich zur Niereninsuffizienz [82]. Woods adaptierte daraus folgendes Schema [90]:

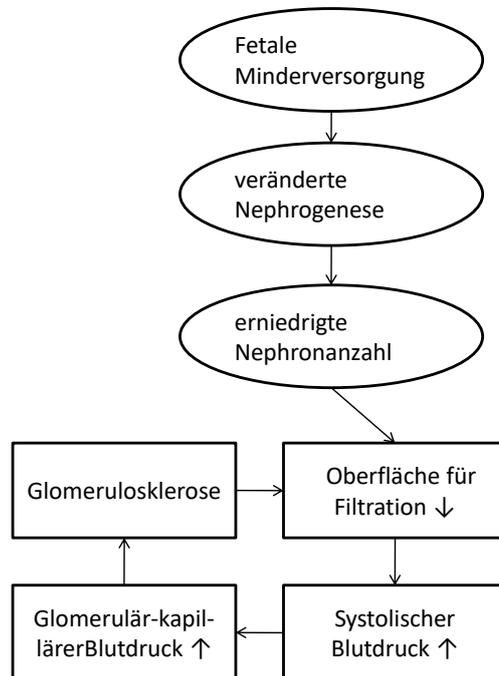


Abbildung 17: Zusammenhang zwischen fetaler Minderversorgung, reduzierter Nephronzahl und der Entwicklung von arterieller Hypertonie und chronischer Nierenerkrankung.

Im Kontext der fetalen Programmierung können abhängig vom Stimulus unterschiedlich stark ausgeprägte Unterschiede bei der Nierenfunktion programmiert werden. So kann bei Ratten durch eine „stark“ proteinarme oder niedrigproteinhaltige Diät der Muttertiere eine Reduktion der GFR (Inulin-clearance) von 15-20% in der männlichen und weiblichen F1 Generation programmiert werden. Sowohl männliche als auch weibliche Ratten zeigten zudem höhere systolische Blutdruckwerte als die Kontrollgruppe [75, 91]. In einem weniger strengen low-protein Modell konnten in der F1 Generation derselben Rattenart bei den Weibchen keine Unterschiede im systolischen Blutdruck und der GFR gesehen werden.

Die Mehrzahl der Studien konnte eine signifikant verminderte GFR in den „fetal programmierten“ F1 Generation zeigen [69]. Auch Xie et al. konnten im low-protein Modell zeigen, dass die GFR von Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt war. Genau wie in unserem Versuch konnten keine Unterschiede bezüglich des Serumkreatinins gefunden werden. Allerdings fanden sich in dem Versuch von Xie et al. erniedrigte Kreatininwerte im Urin nach 3 und 8 Wochen. Es fand sich desweiteren eine inverse Korrelation zwischen dem systolischen

Diskussion

Blutdruck und der GFR nach 8 Wochen [92]. Es gibt aber auch Studien, welche keine Unterschiede bei der GFR in „fetal programmierten“ Tieren finden konnten. Im Dexamethasonmodell bei Ratten konnten Ortiz et al. eine normale GFR trotz einer reduzierten Nephronanzahl messen [93]. Auch in einem Rattenmodell, in welchem die Mütter während der Trächtigkeit mit einer salzreichen Diät gefüttert wurden, fanden Woods et al. eine normale Nephronanzahl und normale GFR [91]. Ojeda et al. fanden im Modell der fetalen Programmierung über eine chirurgische Minderung der Uterusperfusion bei Ratten zunächst ebenfalls keinerlei GFR Veränderung [94]. Unter der Simulation einer milden renalen Perfusionminderung (Ischämie) kam es in der programmierten F1 Generation zu einem signifikant höheren Abfall der GFR als in der Kontrollgruppe. Ojeda et al. werteten dieses Ergebnis als ein erhöhtes Risiko der programmierten F1 Generation bei renaler Minderperfusion, ein akutes Nierenversagen zu entwickeln. In unserem Versuchsaufbau ist keine Provokation der Nierenfunktion durchgeführt worden. Eventuell gab es auch in unserem Modell eine Programmierung der Nierenfunktion, die sich unter Normbedingungen nicht als Erkrankung zeigt. Diese Programmierung ginge aber mit einem erhöhten Risiko für bestimmte Krankheiten bei wie z.B. akutes Nierenversagen einher und würde auch deren Krankheitsverlaufes beeinflussen. Auch wäre es denkbar, dass die fetale Programmierung die Schwere anderer renaler Krankheiten beeinflusst. So zeigten Plank et al. im Rattenmodell einen schwereren Verlauf der mesangioproliferativen Glomerulonephritis in der durch maternale Proteinmangelernährung programmierte F1-Generation als in der Kontrollgruppe [95].

Zur Errechnung der GFR wurde die Kreatininkonzentration in Urin und Plasma mittels Jaffé-Methode bestimmt. Die Methode gilt als Standardverfahren, auch wenn sie verschiedene Nachteile aufweist. Die Jaffé-Methode besitzt eine relativ geringe Spezifität, was zur Überschätzung des Kreatininwertes führen kann [96]. Dies liegt u.a. daran, dass es bei Komplexbildung mit Pikrinsäure zu einer Kreuzreaktion mit anderen Substanzen kommen kann. Zu diesen Substanzen gehören z.B. Bilirubin, Medikamente wie Acetylsalicylsäure, Gadolinium-Kontrastmittel und Hämoglobin. Als weitere Verfahren zur Bestimmung des Kreatinins stehen enzymatische Tests oder die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatografie zur Verfügung. Diese sind allerdings deutlich kostenintensiver und zeitaufwändiger. Desweiteren sind auch für die enzymatischen Tests Wechselreaktionen mit den o.g. Substanzen beschreiben. Weiterhin muss bei der Jaffé-Methode angenommen werden, dass die Überschätzung des Kreatininwertes bei höheren Werten zunimmt und eine geringere Sensitivität der Methode bei Werten unter 50 $\mu\text{mol/l}$ vorliegt. Bei dieser Studie waren weder sehr hohe Kreatininwerte (z.B. akutes Nierenversagen) noch besonders niedrige Kreatininwerte (z.B. bei starker Abnahme der Muskelmasse) erwartet worden, deshalb erschien uns die Berücksichtigung dieses Problems als nicht notwendig. Der

Diskussion

Goldstandard zu Berechnung der Glomerulären Filtrationsrate ist die Bestimmung der Inulin-Clearance, da dieses zu 100% renal eliminiert wird und nicht von der Muskelmasse, Alter, Geschlecht etc. beeinflusst wird.

Obwohl der Mechanismus zwischen arterieller Hypertonie und veränderter Natriumfiltration durch veränderte Nephronanzahl und reduzierte GFR etabliert ist, könnte dieser noch komplexer sein und noch andere renale Komponenten mit einschließen. Desweiteren könnten die Mechanismen, wie arterielle Hypertonie programmiert wird, in den unterschiedlichen Tiermodellen, welche verwendet wurden, ebenfalls unterschiedlich sein [97, 98].

5.4 Histologische Veränderungen in der Niere

Die Auswertung der histopathologischen Untersuchungen des Nierenparenchyms ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Mäuse waren zu dem Zeitpunkt der Organgewinnung 24 Wochen alt. Möglicherweise hätten sich histopathologische renale Veränderungen erst im späteren Lebensalter von Mäusen nachweisen lassen.

Woods et al. beschrieben in der F1 Generation von Ratten, deren Mütter während der Trächtigkeit eine Diät mit ausgeprägter Proteinrestriktion erhalten hatten, signifikant mehr tubuläre Dilatation, tubuläre Atrophie und interstitielle Fibrose [91]. Diese Veränderungen waren deutlicher bei den Männchen zu sehen und waren, je älter die Tiere wurden, stärker ausgeprägt.

Weiterhin ist in der Literatur wenig zu histologischen Veränderungen der Nierenmorphologie bei fetaler Programmierung beschrieben. Battista et al. fanden bei Ratten im IUGR Modell mittels natriumarmer Diät (0,02% Natrium in der Nahrung) keine Änderungen der Nierengewichte und keine Veränderungen in den histologischen Untersuchungen der Nierenschnitte (Nephronarchitektur und Glomeruloskleroscore). Die Tiere zeigten in der 12. Lebenswoche erhöhte Blutdruckwerte und erniedrigtes fraktioniertes Natrium im Urin sowie erhöhte Kreatininwerte bei den Weibchen [99].

Eine interessante Arbeit von Plank et al. wurde bei Ratten, deren Mütter eine proteinarme Diät während der Trächtigkeit erhalten hatten, durchgeführt. In der 8. Woche wurde mittels Injektion von anti-Thy-1-Antikörper eine akute mesangioproliferative Glomerulonephritis induziert. Die Tiere wurden am 4. und 14. Lebenstag getötet. An Tag 4 zeigten die Ratten der F1 Generation mehr Glomerulosklerose und tubulointerstitielle Läsionen. An Tag 14 konnten bei den Tieren der F1 Generation mehr Inflammationsmarker nachgewiesen werden. Sie hatten einen höheren Glomeruloskleroscore und mehr Ablagerung von Kollagen

I und IV in der Niere. Daraus schlussfolgerten Plank et al., dass heftigere Entzündungsreaktion und verminderte Fähigkeit zur Regeneration im proteinarmen Modell ultimativ zu mehr Glomerulosklerose führen [95]. Diese Ergebnisse konnten bei derselben Rattenart im Modell der Ligatur der A. uterina reproduziert werden [100].

5.5 Renin-Angiotensin-Aldosteron System

5.5.1 Reninpositive Glomeruli, renale ACE-Konzentration und renale Expression von AT₂-Rezeptoren

Das Verhältnis reninpositiver Glomeruli zur Gesamtanzahl der Glomeruli war bei allen Tieren und bei den Weibchen mit heterozygoten eNOS +/- Vater im Vergleich zur Kontrollgruppe in diesem Versuch erhöht. Die Weibchen dieser Gruppe hatten auch signifikant schwerere Nieren und signifikant weniger Glomeruli als die Vergleichsgruppe [77]. Bei den Männchen fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

Bei der Bestimmung des renalen ACE und der renalen Expression von AT₂-Rezeptoren wurden in unserem Versuch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden. Die Messungen mittels Western Blot hätten standardmäßig doppelt durchgeführt werden müssen. Eine Aufschlüsselung der relativen renalen ACE-Expression und AT₂-Rezeptordichte auf die unterschiedlichen Zonen der Niere, kortikal oder submedullär, wäre interessant gewesen. Zudem ist es bedauerlich, dass nicht ausreichend Material vorhanden war, um die relative AT₁-Rezeptordichte zu messen.

Eine Limitation bei der Auswertung der Bestimmung der renalen reninpositiven Glomeruli mittels Immunfluoreszenz auf Renin ist die Anzahl der untersuchten Männchen in den Gruppen. In der Gruppe 3 ist bei den Männchen n<5, dadurch könnte die statistische Aussagekraft vermindert sein.

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS) scheint neben reduzierter Nephronzahl und der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse eine entscheidende Rolle bei der fetalen Programmierung zu spielen [101, 102]. Dem RAAS kommt neben der Regulation des Blutdrucks eine entscheidende Rolle bei der Nephrogenese zu. Während der Entwicklung der Niere sind die Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems hoch exprimiert [103]. Bei der Nephrogenese vermittelt Angiotensin II über den AT₁-Rezeptor Wachstum und Proliferation der renalen Tubuli [104]. Die Wirkung am AT₂-Rezeptor ist gegenläufig, anti-proliferativ und vermittelt Apoptose [105]. Während der Nephrogenese ist ein Gleichgewicht zwischen der Achse ACE/Angiotensin II/AT₁-Rezeptor (vasokonstriktive und proliferative Wirkung) und der gegenläu-

Diskussion

figen Achse Angiotensin (1-7)/ACE2/AT₂-Rezeptor (vasodilatativ und apoptoseeinleitend) von entscheidender Bedeutung [106, 107].

Ratten, deren Mütter eine proteinarme Diät in der Trächtigkeit erhalten hatte, zeigten in der Labyrinthzone der Plazenta eine erniedrigte Expression von ACE2. Es wird vermutet, dass die erniedrigte Expression von ACE2 und damit auch eine erniedrigte Expression von Angiotensin (1-7) zu Wachstumsretardierung und damit assoziierter Programmierung von Hypertension führen [108]. In der Nierenautopsie von unerklärten Totgeburten mit normaler oder IUGR Schwangerschaft konnten mittels Immunhistochemie und in situ Hybridisierung Renin enthaltende Zellen angefärbt werden. Gemessen wurde in der superfiziellen, mittleren und tiefen Zone des Nierencortex. In Kontrollgruppe fanden sich in der frühen Gestation viele reninpositive Zellen in der tiefen Zone, in späterer Gestation dann weniger. Gegenteilig verhielt es sich in der Kontrollgruppe in der superfiziellen Zone. Bei den IUGRs blieb die Menge von reninpositiven Zellen in frühem und spätem Gestationsalter gleich, somit fand sich relativ zu viel Renin in der tiefen Zone des Nierencortex [109].

Es konnten weiterhin deutlichen Veränderungen der einzelnen Komponenten des RAAS sowohl im Human- als auch im Tiermodell bei veränderten Phänotypen der F1 Generation entdeckt werden [70, 80]. Bei Schafen, welche zwischen dem 26. und 28. Tag der Trächtigkeit Dexamethasoninfusionen erhielten, entwickelten Männchen und Weibchen der F1 Generation erhöhte Blutdruckwerte. Außerdem zeigte sich eine veränderte Genexpression für Angiotensinogen im Hypothalamus und den AT₁-Rezeptor in der Medulla oblongata. Dieser Effekt war ab der späten Trächtigkeit, bei den Weibchen sogar fortbestehend bis zum 7. Lebensjahr, nachweisbar [110]. Bei IUGR-Schwangerschaften konnten im fetalen Nabelschnurblut erhöhte Level für Angiotensin II und eine erniedrigte Dichte von vaskulärem AT₁-Rezeptor gemessen werden. Diese Ergebnisse gehen mit der akuten Runterregulation der Rezeptoren durch erhöhte Angiotensin II Level einher [111]. Langley-Evans entwickelte aus diesen Erkenntnissen unten abgebildetes Fließschema [112]:

Diskussion

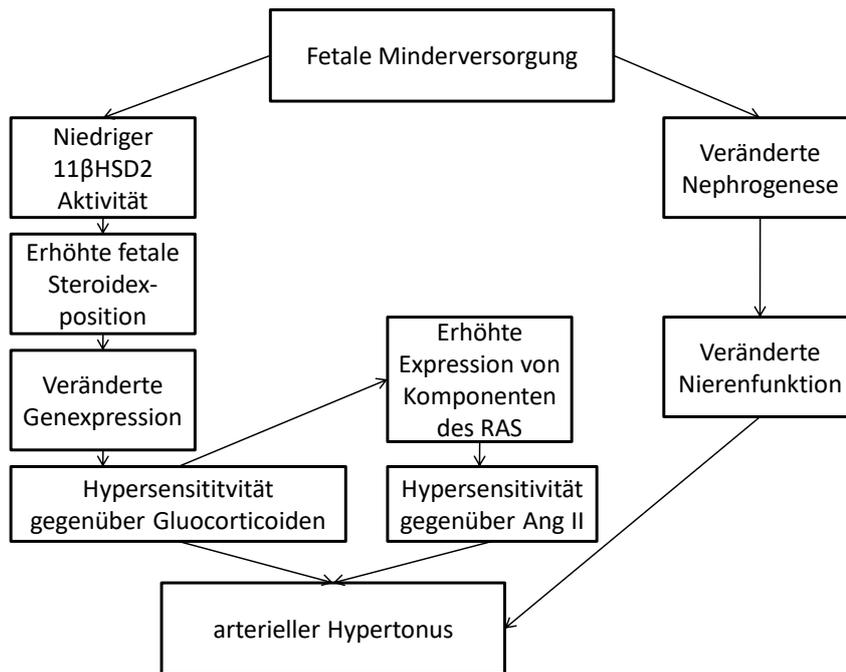


Abbildung 18: Zusammenhang zwischen fetaler Minderversorgung, reduzierter Nephronzahl, dem RAS und der Entwicklung von arterieller Hypertonie

Ichihara et al. postulieren, dass die Komponenten des RAAS postpartal erhöht scheinen und über eine erhöhte Natriumretention einen arteriellen Hypertonus bedingen können. Während der Nephrogenese scheinen die Komponenten des RAAS allerdings supprimiert, darin vermuteten Ichihara et al. die Ursache für die erniedrigte Anlage der Nephronanzahl [113]. Dies untermauern auch die Ergebnisse von Konje et al. in SGA-Babies. Die Plasmapreninaktivität in der Nabelschnur von Babies, welche IUGR ausgesetzt waren, war im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht [114]. Gegenläufig dazu wurde in einer Kohortenstudie von erwachsenen Männern in der 50. Lebensdekade eine positive Korrelation zwischen der Plasmapreninaktivität und dem Geburtsgewicht gefunden [115].

Moritz et al. konnten den Zeitraum, in dem signifikante Änderungen des RAAS programmierbar sind, im Schafsmodell auf die frühe Gestation eingrenzen [69]. Während bei Schafen als sensibles Zeitfenster für die Programmierung das frühe 1. Trimenon gilt, ist dies bei Ratten das 2. Trimenon. Dies geht wohl mit dem Zeitpunkt der embryonalen Nephrogenese einher [97, 116]. Beim Menschen konnten Kingdom et al. eine inverse Beziehung zwischen der Plasmapreninkonzentration im Nabelschnurblut bei Entbindung und dem Geburtsgewicht nachweisen. Ferner fand sich auch eine inverse Beziehung zwischen der Plasmapreninkonzentration und dem

Diskussion

renalen anterior-posterior Diameter. Das kritische Zeitfenster für die „fetale Programmierung“ der Niere grenzen Kingdom et al. auf die 26.-34. Schwangerschaftswoche ein [111].

Im Tierversuch konnte im proteinarmen Diät Modell eine Blutdrucksteigerung von 20-30 mmHg in den erwachsenen Rattennachkommen programmiert werden [117]. Fetale, neonatale und adulte Ratten aus diesem Versuch wiesen erhöhte pulmonale und Plasma ACE-Aktivität auf [118]. Die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie konnte durch die Gabe von Enalapril bzw. Captopril (ACE-Hemmer) bzw. von Losartan (AT₁-Rezeptor-Blocker) bei Nachwuchs im Alter von 2-4 Wochen im low-protein Modell verhindert werden [117, 119, 120]. Eine Blutdrucksenkung konnte durch die Gabe von Nifedipin (Calciumantagonist) im selben Versuch nicht erreicht werden [117]. Die Langzeitwirkungen auf den Blutdruck im mit antihypertensiver Medikation behandelten Nachwuchs sind nicht untersucht. Nicht nur durch die periphere, aber auch durch die zentrale Blockierung vom Angiotensin II, wurde der Blutdruck bei Tieren mit niedrigem Geburtsgewicht und später erhöhtem Blutdruck so stark gesenkt, dass sich statistisch kein Unterschied in der Höhe mehr zur Kontrollgruppe zeigte [120, 121].

Diese Beobachtungen lassen auf erhöhte Level von Angiotensin II und/oder AT₁-Rezeptorexpression in den ersten Lebenswochen der „fetal programmierten“ Tiere schließen [97, 122, 123]. Tatsächlich ist die Plasma Renin Aktivität, Plasma Angiotensin II Werte und die ACE Werte sowohl in 4 als auch in 13 Wochen alten Tieren, deren Mütter eine proteinarme Diät erhalten hatten, erhöht [109]. Grigore et al. konnte bei Ratten nach bilateraler Ligatur der A. uterina am 21.-22. Tag der Trächtigkeit nachweisen, dass bei den IUGR Neugeborenen die Renin mRNA und Renin im renalen Gewebe reduziert war [124]. Dieser Effekt hob sich nach 6 Wochen auf. Nach 16 Wochen ist Renin mRNA erhöht, ebenso die mRNA für Angiotensinogen. Keine Unterschiede fanden sich bezüglich der ACE oder AT₁-Rezeptor mRNA.

Neben diesen zu erwartenden Ergebnissen fanden Woods et al. aber auch in neugeborenen IUGR Ratten erniedrigte Reninkonzentration und AT₁-Rezeptorexpression in der Niere [75]. Wang et al. fanden in fetalen Nieren von humanen IUGR Schwangerschaften ein niedrigeres Nierengewicht und Nierenvolumen, sowie ebenfalls erniedrigte Renin und Angiotensin Expression in den fetalen Nieren [125]. Ebenfalls bei Ratten [124] und Schafen [73] führte die placentare Insuffizienz zu signifikant niedrigerer renaler Renin mRNA und renaler Angiotensin II Konzentration bei Geburt. Zudem fanden Vehaskari et al bei 4 Wochen alten Ratten, deren Mütter eine proteinarme Diät erhalten hatten, erniedrigte Plasma Renin Aktivität, diese Werte normalisierten sich aber nach 13 Wochen [126]. Im Schafmodell ließen sich keine Unterschiede der Komponenten des peripheren RAAS finden [127].

Diskussion

Wie bereits erwähnt, wird eine übermäßige Aktivierung der Renin/ACE/AT₁-Rezeptoren-Achse bei der fetalen Programmierung vermutet. Wir konnten eine Vermehrung der reninhaltigen Zellen im renalen Gewebe bei den Tieren mit eNOS +/- Vätern nachweisen. Somit wäre es durchaus interessant gewesen, zu untersuchen, ob es auch Veränderungen bei der AT₁-Rezeptordichte gegeben hat. Dazu passend, hätte man auch eine erhöhte Expression der AT₁-Rezeptoren erwartet. Im Alter von vier Wochen war die renale AT₁-Rezeptorproteinexpression (gemessen durch Western blotting und bindinganalyses) in männlichen durch proteinarme Diät programmierten Ratten erhöht. Im selben Versuch wurde eine erhöhte AT₁-Rezeptor mRNA Expression im Alter von 4 Wochen und 10 Wochen gemessen [122, 123]. Die AT₂-Rezeptorexpression war dagegen in 4 Wochen alten proteinarme Diät programmierten Ratten vermindert [75, 128]. Hingegen führte in der F1 Generation von Schafen die Plazentaembolisation zu niedrigem Geburtsgewicht, aber keinesfalls zu Änderung der AT₁- oder AT₂-Rezeptor mRNA Expression [129].

Die Plasma ACE-Aktivität und die Plasma Angiotensin II Level war auch bei 8-13-jährigen Jungen, die zu klein und leicht für ihr Alter bei Geburt waren (SGA), im Vergleich zu einer Kontrollpopulation erhöht. Diese Ergebnisse korrelierten mit systolischen Blutdruckwerten und korrelierten invers mit dem Geburtsgewicht [130].

5.5.2 Aldosteron

Wir fanden in der Gruppe der Männchen mit heterozygoten eNOS +/- Vätern signifikant höhere Aldosteronkonzentrationen im 24h Urin als in der Kontrollgruppe. Es fanden sich im sowohl im Stoffwechselfersuch 1 erhöhte Aldosteronkonzentration als auch im Stoffwechselfersuch 3 eine tendenziell erhöhte Aldosteronkonzentration im 24h Urin. Somit muss hier von einem sekundären Hyperaldosteronismus ausgegangen werden. Bei den Weibchen fanden sich hingegen keine signifikanten Unterschiede. Es fällt auf, dass die Aldosteronwerte bei den Weibchen generell viel höher liegen als bei den Männchen. Als eine mögliche Ursache wurde die Möglichkeit eine Kreuzreaktion bei der Messmethode mit Östrogenen (Estron, Estradiol oder Estriol) zu diskutiert. Eine erneute Messung des Aldosterons und der gleichzeitigen Östrogenmessung wäre wünschenswert, ist aber aufgrund der limitierten Menge an Urin nicht mehr möglich.

Es finden sich in der Literatur bezüglich der Mineralocorticoidaktivität im Modell der fetalen Programmierung widersprüchliche Resultate. Washburn et al. fanden bei männlichen Adoleszenten, die aufgrund von Präeklampsie mit einem niedrigem Geburtsgewicht geboren waren, signifikant höhere Plasmaaldosteronwerte. Dies war v.a. mit einem erhöhten Body-Mass-Index vergesellschaftet [131].

Diskussion

Vehaskari et al. konnten in Rattennachkommen, deren Mütter während der Trächtigkeit eine proteinreduzierte Diät erhalten hatte, sowohl erhöhte systolische Blutdruckwerte als auch erhöhte Plasma Aldosteronwerte messen [123].

In der großen epidemiologischen Humanstudie, der Framingham-Studie, konnte gezeigt werden, dass bereits erhöhte Aldosteron Werte innerhalb des physiologischen Normbereichs (hochnormal) zu der Entwicklung von Hypertonie prädisponiert [132]. Zahlreiche weitere humane Querschnittsstudien belegen, dass 15% der Hypertoniepatienten erhöhte Aldosteron/Renin Ratio haben [133, 134].

Reynolds et al. unterzogen den Patienten der Herfordshire Kohorte einen Dexamethason-hemmtest und ACTH-Stimulationstest. Dabei fanden sie bei den Probanden einen höheren Anstieg der Aldosteron- und Cortisolwerte, welche auch höhere arterielle Blutdruckwerte und ein erniedrigtes Gewicht bei Geburt aufwiesen. Die inverse Beziehung bestand auch zwischen Aldosteronwerten nach Dexamethason- und ACTH-Test und dem Gewicht im zweiten Lebensjahr. Auch nach Adjustierung bezüglich des Alters, Adipositas, Glucocorticoidmetaboliten (Urin) und andere potentielle Confounder blieb diese Beziehung signifikant [135]. Diese Ergebnisse stützen die Theorie, dass intrauterine Mangelsituationen die HPA-Achse und eine erhöhte Mineralokortikoidaktivität programmieren. In unserer Studie konnten erhöhten Aldosteronwerte im 24h Urin bei den Männchen der Gruppe 3 gefunden werden, allerdings hat dies nicht zu einer signifikanten Veränderung der systolischen Blutdruckwerte geführt. Auch unterschied sich weder das Geburtsgewicht noch das Körpergewicht dieser Tiere von der Kontrollgruppe.

5.6 Geschlechterspezifische Unterschiede

Die Ergebnisse dieses Versuches legen unterschiedliche Effekte der fetalen Programmierung nahe, je nachdem ob es sich um einen weiblichen oder männlichen Nachkommen handelt. Beim Gewicht der Mäuse zeigen sich z.B. sogar gegenläufige Ergebnisse. Die Männchen mit eNOS +/- Müttern sind zum Zeitpunkt der Geburt und in der 24. Lebenswoche signifikant leichter als die Tiere der anderen Gruppen. Die Weibchen mit eNOS +/- Müttern und Vätern sind dagegen in der 24. Lebenswoche signifikant schwerer als die Tiere in der Kontrollgruppe. Auch sind die Nieren dieser Weibchen signifikant schwerer als die der Kontrollgruppe. Der Effekt, dass es geschlechterspezifische Unterschiede bei der fetalen Programmierung gibt, ist bekannt, aber noch nicht vollständig verstanden. Bei Weibchen findet sich in multiplen Tierversuchen zur fetalen Programmierung eine niedrigere Inzidenz für Bluthochdruck und vaskuläre Dysfunktion als bei Männchen [136]. Auch Woods et al. fanden bei männlichen Ratten häufiger eine reduzierte Nephronanzahl und arteriellen Hypertonus im Erwachsenenalter [75, 91]. Bei Ratten

Diskussion

konnten Moritz et al. durch die bilaterale Ligatur der A. uterina am 18. Tag der Trächtigkeit, Wachstumsretardierung in beiden Geschlechtern, aber nur bei den Männchen hypertensive Blutdruckwerte verzeichnen [87]. Gallo et al. bestätigen, dass man in der F1 Generation eher bei den männlichen Tiere höhere Blutdrücke und eine gestörte Nierenfunktion feststellen kann. Ebenfalls entwickeln diese Männchen eher Nierenerkrankungen und Diabetes mellitus Typ 2. Weibliche Tiere haben dagegen subtilere Änderungen in der Organstruktur und Funktion, z.B. gestörte Glucosetoleranz und Steatosis hepatis [137].

Es wird vermutet, dass die Geschlechtshormone hier eine Rolle spielen. Über Testosteron und Östrogene vermutet man die Modulation des RAAS als möglichen kausalen Mechanismus [136]. Eine Supprimierung der Komponenten des RAAS konnten Woods et al. im proteinarmen Modell nur bei männlichen, nicht aber bei weiblichen Ratten der F1 Generation nachweisen [75]. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist das Gleichgewicht zwischen der vasokonstriktiven Achse (ACE/Angiotensin II/ AT₁-Rezeptor) und der vasodilatativen Achse (Angiotensin(1-7)/ACE2/ AT₂-Rezeptor) Achse (vasodilatativ) essentiell für die Nephrogenese [106, 107]. Es wird vermutet, dass Testosteron mehr Renin und damit den vasopressiven und proliferativen Arm der Achse stimuliert und Östrogene mehr die ACE2 und AT₂-Rezeptoren und damit den vasodilatativen und apoptotischen Arm der Achse stimulieren [138]. Dies untermauert die Studie von Wlodek et al., in welcher in der Niere die Tendenz zur erhöhten Expression von AT₁-Rezeptoren im Alter von 6 Monaten [139], aber nur bei männlichen Ratten gefunden wurde. Nach 18 Monaten ließ sich diese Tendenz nicht mehr nachweisen. Bei weiblichen Ratten konnte weder im Alter von 6 noch 18 Monaten eine Veränderung der AT₁-Rezeptordichte nachgewiesen werden [87].

5.7 Paternale Programmierung

In unserem Versuch zeigten sich unterschiedliche Veränderungen des renalen Phänotyps, je nachdem ob die Mutter oder der Vater heterozygot bezüglich des eNOS Gens war. Bei der maternalen Programmierung konnte bei den Männchen ein niedrigeres Geburts- und Körpergewicht sowie relatives Nierengewicht bei den Männchen festgestellt werden. Bei den Weibchen mit heterozygoten eNOS +/- Müttern fand sich hingegen ein erhöhtes Körpergewicht und Nierengewicht. Bei der paternalen Programmierung war das Körpergewicht bei den Weibchen höher, die weiblichen Tiere hatten tendenziell schwere Nieren. Die Weibchen mit heterozygoten eNOS +/- Vätern hatten zudem signifikant weniger Nephrone, die GFR war im Stoffwechselforschung 1 erniedrigt und im Stoffwechsel 3 erhöht. Desweiteren hatten die Weibchen mehr reninpositive Glomeruli als die Weibchen in der Vergleichsgruppe. Bei den Männchen mit heterozy-

Diskussion

goten eNOS +/- Vätern zeigten sich weniger Veränderungen des renalen Phänotyps. Auffallend waren erhöhte Aldosteronwerte im 24h Urin bei den Männchen.

Die genauen Mechanismen über welche Effekte paternale Programmierung ausgelöst werden kann, sind nicht bekannt. Aktuell werden die Veränderung der Sexualhormone, Veränderung der Spermien und deren molekulare Zusammensetzung diskutiert [140]. Die zwei Hauptmechanismen für die Ursache von paternaler Programmierung, ausgelöst durch Adipositas des Vaters, scheinen 1) Schäden der Spermien DNA, welche zu de novo Mutationen im Embryo führen 2) epigenetische Änderungen der Spermien, im Sinne von Veränderung durch microRNA, Methylierung, oder Acetylierung zu sein [140, 141].

Ein erst im Juni 2016 Review von Li et al. gibt eine detaillierte Übersicht über die bisher zum Thema der paternalen Programmierung publizierten Paper. Auch diese hier aufgelisteten Arbeiten zeichnen sich, wie generell alle Studien zum Thema Fetal Programmierung, durch eine Vielfalt an unterschiedlichen Manipulationen und gemessen Parametern aus. Ebenso waren die Zeitpunkte, während derer die Manipulationen stattfanden unterschiedlich: während der Embryonalphase der Väter, während der Präpubertät und Spermatogenese sowie perikonzeptionell [142].

Als Beispiel für eine Manipulation während der Embryonalphase: Bei einer proteinarmen Diät während der gesamten Trächtigkeit im ICR-Mausmodell konnte ein erniedrigtes Geburtsgewicht sowie eine gestörte Glucosetoleranz in der F1 Generation programmiert werden. Die gestörte Glucosetoleranz ließ sich auch in der F2 Generation nachweisen, sowohl über maternale als auch paternale Programmierung. Aber ein erniedrigtes Geburtsgewicht ließ sich nur via paternale Programmierung in der F2 Generation nachweisen. Der vermutete Mechanismus hierbei wird durch eine veränderte Funktion der β -Zellen des Pankreas vermutet. Es konnte eine veränderte Expression des Sur1-Gens, welches für die Regulation der ATP-anhängigen Kaliumkanäle der β -Zellen verantwortlich ist, nachgewiesen werden [143].

Als Beispiel für eine Manipulation während der Spermatogenese: Nachkommen von männlichen Mäusen vom C57BL/6-Stamm, welche von der 5. Lebenswoche bis 9 Wochen vor der Verpaarung mit einer fettreichen Diät (60%) gefüttert wurden, zeigten ein vermindertes embryonales Wachstum, sowie ein vermindertes Wachstum der Placenta. In dieser F1 Generation konnte eine reduzierte Anzahl an Blastozysten nachgewiesen werden. Über Histonmodifikation (H3K27me3) konnte zudem eine veränderte plazentare Genexpression gemessen werden [144].

Diskussion

Als Beispiel für perikonzeptionelle Manipulation: das Spermia von männlichen Mäusen vom C57Bl6 Stamm wurde 1500 mmol/l Wasserstoffperoxid 1h vor der Befruchtung ausgesetzt. Die Weibchen der F1 Generation dieser Väter zeigte eine veränderte Körperzusammensetzung und Glucoseregulation als die Kontrollgruppe. Die genauen Mechanismen hier sind nicht bekannt, die Autoren proklamieren aber, dass die Behandlung des Spermias mit Wasserstoffperoxid über zelluläre und mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu schlechterer embryonaler Entwicklung und vermindertem fetalem Wachstum führt [145].

Aktuell bestätigt die vorhandene Literatur also, dass es den Effekt der paternalen Programmierung gibt. Welche Stimuli zu einem veränderten Phänotyp der F1 und F2 Generationen führen, sowie welche genauen Mechanismen sich dahinter verbergen, sind aber weiterhin unbekannt. Weitere Forschung auf diesem Gebiet wird in den nächsten Jahren hoffentlich mehr Klarheit darüber bringen.

5.8 Schlussfolgerung und Ausblick

In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass genotypisch gesunde Nachkommen von heterozygoten eNOS knock-out-Mäusen (eNOS +/-) im Vergleich zu den genotypisch gesunden Nachkommen von Wildtypeltern Veränderungen des Geburtsgewichts und des renalen Phänotyps aufweisen.

Sowohl das Geburtsgewicht als auch das finale Körpergewicht der männlichen Nachkommen von heterozygoten eNOS +/- Müttern und Wildtyp Vätern war signifikant geringer. Darüber hinaus wiesen diese Tiere ein signifikant höheres relatives Nierengewicht auf. Bei den männlichen Nachkommen von Wildtyp Müttern und eNOS +/- Vätern konnte eine erhöhte Mikroalbuminurie und höhere Aldosteronkonzentrationen im 24h Urin im Stoffwechselfersuch 1 und 3 gemessen werden.

Das Körpergewicht der weiblichen Nachkommen von heterozygoten eNOS +/- Müttern und Wildtyp Vätern und Wildtyp Müttern und heterozygoten eNOS +/- Vätern war signifikant höher als das der weiblichen Nachkommen von Wildtyp Eltern. Die weiblichen Nachkommen von Wildtyp Müttern und heterozygoten eNOS +/- Vätern hatten im Stoffwechselfersuch 1 eine signifikant niedrigere GFR, im Stoffwechselfersuch 3 konnte dann eine signifikant erhöhte GFR gemessen werden. Bei diesen Weibchen konnten ebenfalls signifikant mehr renin-positive Glomeruli gemessen werden. Bei weiblichen Nachkommen von heterozygoten eNOS +/- Müttern und Wildtyp Vätern konnte im Stoffwechsel 3 ebenfalls eine signifikant höhere GFR gemessen werden.

Diskussion

Es konnte also gezeigt werden, dass Gene - ohne Weitergabe im Sinne der klassischen Vererbung - Programmierungseffekte auslösen und bleibende Effekte auf die folgende Generation haben können. Zudem fanden sich unterschiedliche Effekte bei maternalen und paternalen Programmierung.

Allerdings konnten keine Veränderungen der systolischen Blutdruckwerte gesehen werden. In wie weit Veränderungen in der Niere ein plausibles Erklärungsmodell für die Entstehung von veränderten systolischen Blutdruckwerten im Rahmen der fetalen Programmierung darstellen, konnte abschließend nicht geklärt werden. Desweiteren bleibt zu erwähnen, dass die signifikanten Ergebnisse unserer Studie nur explorativen Charakter haben. Zukünftige Studien zur confirmatorischen Validierung dieser Ergebnisse sind erforderlich. Weiterhin untermauert dieser Versuch aber die Bedeutung von maternalen und paternalen Programmierung für die Entstehung von Volkskrankheiten im Erwachsenenalter.

6. Literaturverzeichnis

1. Dorner, G., A. Mohnike, and H. Thielke, *Further evidence for the dependence of diabetes prevalence on nutrition in perinatal life*. *Exp Clin Endocrinol*, 1984. **84**(2): p. 129-33.
2. Lucas, A., *Programming not metabolic imprinting*. *Am J Clin Nutr*, 2000. **71**(2): p. 602.
3. Lucas, A., R. Morley, and T.J. Cole, *Randomised trial of early diet in preterm babies and later intelligence quotient*. *BMJ*, 1998. **317**(7171): p. 1481-7.
4. Barker, D.J. and C. Osmond, *Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales*. *Lancet*, 1986. **1**(8489): p. 1077-81.
5. Barker, D.J., et al., *Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease*. *BMJ*, 1989. **298**(6673): p. 564-7.
6. Chasan-Taber, L., et al., *Prospective study of oral contraceptives and hypertension among women in the United States*. *Circulation*, 1996. **94**(3): p. 483-9.
7. Eriksson, J.G., et al., *Childhood growth and hypertension in later life*. *Hypertension*, 2007. **49**(6): p. 1415-21.
8. Hales, C.N. and D.J. Barker, *Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis*. *Diabetologia*, 1992. **35**(7): p. 595-601.
9. Bygren, L.O., S. Edvinsson, and G. Brostrom, *Change in food availability during pregnancy: Is it related to adult sudden death from cerebro- and cardiovascular disease in offspring?* *Am J Hum Biol*, 2000. **12**(4): p. 447-453.
10. Kaati, G., L.O. Bygren, and S. Edvinsson, *Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period*. *Eur J Hum Genet*, 2002. **10**(11): p. 682-8.
11. Pembrey, M.E., et al., *Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans*. *Eur J Hum Genet*, 2006. **14**(2): p. 159-66.
12. Ng, S.F., et al., *Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring*. *Nature*, 2010. **467**(7318): p. 963-6.
13. Watkins, A.J. and K.D. Sinclair, *Paternal low protein diet affects adult offspring cardiovascular and metabolic function in mice*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014. **306**(10): p. H1444-52.
14. Fullston, T., et al., *Diet-induced paternal obesity in the absence of diabetes diminishes the reproductive health of two subsequent generations of mice*. *Hum Reprod*, 2012. **27**(5): p. 1391-400.
15. Blondeau, B., et al., *Endocrine pancreas development is altered in fetuses from rats previously showing intra-uterine growth retardation in response to malnutrition*. *Diabetologia*, 2002. **45**(3): p. 394-401.

Literaturverzeichnis

16. Thamocharan, M., et al., *Transgenerational inheritance of the insulin-resistant phenotype in embryo-transferred intrauterine growth-restricted adult female rat offspring*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**(5): p. E1270-9.
17. Radford, E.J., et al., *An unbiased assessment of the role of imprinted genes in an intergenerational model of developmental programming*. PLoS Genet, 2012. **8**(4): p. e1002605.
18. Dunn, G.A. and T.L. Bale, *Maternal high-fat diet effects on third-generation female body size via the paternal lineage*. Endocrinology, 2011. **152**(6): p. 2228-36.
19. Torrens, C., et al., *Maternal protein restriction in the rat impairs resistance artery but not conduit artery function in pregnant offspring*. J Physiol, 2003. **547**(Pt 1): p. 77-84.
20. Peixoto-Silva, N., et al., *Maternal protein restriction in mice causes adverse metabolic and hypothalamic effects in the F1 and F2 generations*. Br J Nutr, 2011. **106**(9): p. 1364-73.
21. Harrison, M. and S.C. Langley-Evans, *Intergenerational programming of impaired nephrogenesis and hypertension in rats following maternal protein restriction during pregnancy*. Br J Nutr, 2009. **101**(7): p. 1020-30.
22. Torrens, C., L. Poston, and M.A. Hanson, *Transmission of raised blood pressure and endothelial dysfunction to the F2 generation induced by maternal protein restriction in the F0, in the absence of dietary challenge in the F1 generation*. Br J Nutr, 2008. **100**(4): p. 760-6.
23. Langley-Evans, S.C., D.S. Gardner, and A.A. Jackson, *Association of disproportionate growth of fetal rats in late gestation with raised systolic blood pressure in later life*. J Reprod Fertil, 1996. **106**(2): p. 307-12.
24. Anderson, C.M., et al., *Placental insufficiency: programming of leptin secretion, blood pressure, and postnatal growth in two generations of Sprague-Dawley rats*. Biol Res Nurs, 2009. **10**(3): p. 284-91.
25. Anderson, C.M., et al., *Placental insufficiency leads to developmental hypertension and mesenteric artery dysfunction in two generations of Sprague-Dawley rat offspring*. Biol Reprod, 2006. **74**(3): p. 538-44.
26. Beach, R.S., M.E. Gershwin, and L.S. Hurley, *Nutritional factors and autoimmunity. III. Zinc deprivation versus restricted food intake in MRL/1 mice--the distinction between interacting dietary influences*. J Immunol, 1982. **129**(6): p. 2686-92.
27. Nascimento, F.A., et al., *Maternal vitamin D deficiency delays glomerular maturity in F1 and F2 offspring*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e41740.
28. Langley-Evans, S.C., *Intrauterine programming of hypertension by glucocorticoids*. Life Sci, 1997. **60**(15): p. 1213-21.
29. Seckl, J.R., *Glucocorticoids, feto-placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, and the early life origins of adult disease*. Steroids, 1997. **62**(1): p. 89-94.

Literaturverzeichnis

30. Benediktsson, R., et al., *Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension*. Lancet, 1993. **341**(8841): p. 339-41.
31. Stewart, P.M. and J.I. Mason, *Cortisol to cortisone: glucocorticoid to mineralocorticoid*. Steroids, 1995. **60**(1): p. 143-6.
32. Edwards, C.R., et al., *Dysfunction of placental glucocorticoid barrier: link between fetal environment and adult hypertension?* Lancet, 1993. **341**(8841): p. 355-7.
33. Persson, E. and T. Jansson, *Low birth weight is associated with elevated adult blood pressure in the chronically catheterized guinea-pig*. Acta Physiol Scand, 1992. **145**(2): p. 195-6.
34. Aiken, C.E. and S.E. Ozanne, *Transgenerational developmental programming*. Hum Reprod Update, 2014. **20**(1): p. 63-75.
35. Youngson, N.A. and E. Whitelaw, *Transgenerational epigenetic effects*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2008. **9**: p. 233-57.
36. Lorenzen, J.M., F. Martino, and T. Thum, *Epigenetic modifications in cardiovascular disease*. Basic Res Cardiol, 2012. **107**(2): p. 245.
37. Woroniecki, R., A.B. Gaikwad, and K. Susztak, *Fetal environment, epigenetics, and pediatric renal disease*. Pediatr Nephrol, 2011. **26**(5): p. 705-11.
38. Zentner, G.E. and S. Henikoff, *Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications*. Nat Struct Mol Biol, 2013. **20**(3): p. 259-66.
39. Püschel, G.P., Kühn, H., Kietzmann, T., Höhne, W. , *Taschenlehrbuch Biochemie*. 2011, Stuttgart Thieme Verlag. 908
40. De Flora, S., et al., *Smoke-induced microRNA and related proteome alterations. Modulation by chemopreventive agents*. Int J Cancer, 2012. **131**(12): p. 2763-73.
41. Parasramka, M.A., et al., *MicroRNAs, diet, and cancer: new mechanistic insights on the epigenetic actions of phytochemicals*. Mol Carcinog, 2012. **51**(3): p. 213-30.
42. Hocher, B., et al., *The advanced fetal programming hypothesis*. Nephrol Dial Transplant, 2001. **16**(6): p. 1298-9.
43. Hocher, B., et al., *Association of maternal G protein beta3 subunit 825T allele with low birthweight*. Lancet, 2000. **355**(9211): p. 1241-2.
44. Wang, X., et al., *Maternal cigarette smoking, metabolic gene polymorphism, and infant birth weight*. JAMA, 2002. **287**(2): p. 195-202.
45. Schmidt, R.F., Lang, F., Heckmann, M., *Physiologie des Menschen*. Vol. 31. 2010: Springer Verlag. 979
46. Schartl, M., Gessler, M, von Eckardstein, A., *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen*. 2009, München: Elsevier Verlag. 1034

Literaturverzeichnis

47. Gimbrone, M.A., Jr., et al., *Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **902**: p. 230-9; discussion 239-40.
48. Rutherford, R.A., et al., *Nitric oxide synthase in human placenta and umbilical cord from normal, intrauterine growth-retarded and pre-eclamptic pregnancies*. Br J Pharmacol, 1995. **116**(8): p. 3099-109.
49. Vatish, M., H.S. Randeve, and D.K. Grammatopoulos, *Hormonal regulation of placental nitric oxide and pathogenesis of pre-eclampsia*. Trends Mol Med, 2006. **12**(5): p. 223-33.
50. Thaete, L.G., et al., *Endothelin and the regulation of uteroplacental perfusion in nitric oxide synthase inhibition-induced fetal growth restriction*. Placenta, 2005. **26**(2-3): p. 242-50.
51. Hefler, L.A., et al., *Perinatal development of endothelial nitric oxide synthase-deficient mice*. Biol Reprod, 2001. **64**(2): p. 666-73.
52. Shesely, E.G., et al., *Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(23): p. 13176-81.
53. Kusinski, L.C., et al., *eNOS knockout mouse as a model of fetal growth restriction with an impaired uterine artery function and placental transport phenotype*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2012. **303**(1): p. R86-93.
54. Van Vliet, B.N. and L.L. Chafe, *Maternal endothelial nitric oxide synthase genotype influences offspring blood pressure and activity in mice*. Hypertension, 2007. **49**(3): p. 556-62.
55. Godecke, A., et al., *Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice*. Circ Res, 1998. **82**(2): p. 186-94.
56. Costantine, M.M., et al., *Transgenerational effect of fetal programming on vascular phenotype and reactivity in endothelial nitric oxide synthase knockout mouse model*. Am J Obstet Gynecol, 2008. **199**(3): p. 250 e1-7.
57. Longo M, J.V., Langenveld J, Vedernikov YP, Bukowski R, Anderson GD, Garfield RE, Saade GR, *Embryo transfer prevents development of abnormal vascular function in offspring of endothelial nitric oxide synthase knockout mice*. . J Soc Gynecol Investig, 2004. **11**: p. 294 A.
58. Spornitz, U.M., *Anatomie und Physiologie*. 6. Auflage ed. 2010: Springer Berlin. 533
59. Tortora, T.J.a.D., B.H., *Anatomie und Physiologie*. 2006, Weinheim: Axel R. Pries. 1438.
60. Nguyen, G., et al., *Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin*. J Clin Invest, 2002. **109**(11): p. 1417-27.
61. Crowley, S.D. and T.M. Coffman, *Recent advances involving the renin-angiotensin system*. Exp Cell Res, 2012. **318**(9): p. 1049-56.
62. Sampson, A.K., et al., *Enhanced angiotensin II type 2 receptor mechanisms mediate decreases in arterial pressure attributable to chronic low-dose angiotensin II in female rats*. Hypertension, 2008. **52**(4): p. 666-71.

Literaturverzeichnis

63. Weber, K.T., et al., *Myocardial fibrosis: role of angiotensin II and aldosterone*. Basic Res Cardiol, 1993. **88 Suppl 1**: p. 107-24.
64. Pitt, B., *Effect of aldosterone blockade in patients with systolic left ventricular dysfunction: implications of the RALES and EPHEBUS studies*. Mol Cell Endocrinol, 2004. **217**(1-2): p. 53-8.
65. Pitt, B., et al., *The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators*. N Engl J Med, 1999. **341**(10): p. 709-17.
66. Remuzzi, G., D. Cattaneo, and N. Perico, *The aggravating mechanisms of aldosterone on kidney fibrosis*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(8): p. 1459-62.
67. Hocher, B., *More than genes: the advanced fetal programming hypothesis*. J Reprod Immunol, 2014. **104-105**: p. 8-11.
68. Heiden, S., *Einfluss des A1-Adenosin-Rezeptorantagonisten SLV329 auf die Nierenfunktion im Modell der Thioacetamid-induzierten Leberzirrhose der Ratte*, in *Institut für Veterinär-Physiologie des Fachbereichs Veterinärmedizin* 2010, Freie Universität Berlin Berlin.
69. Moritz, K.M., et al., *Maternal glucocorticoid treatment programs alterations in the renin-angiotensin system of the ovine fetal kidney*. Endocrinology, 2002. **143**(11): p. 4455-63.
70. MacLaughlin, S.M., et al., *Periconceptional undernutrition and being a twin each alter kidney development in the sheep fetus during early gestation*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2010. **298**(3): p. R692-9.
71. Langley, S.C. and A.A. Jackson, *Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets*. Clin Sci (Lond), 1994. **86**(2): p. 217-22; discussion 121.
72. Ozaki, T., et al., *Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring*. J Physiol, 2001. **530**(Pt 1): p. 141-52.
73. Gilbert, J.S., et al., *Maternal nutrient restriction in sheep: hypertension and decreased nephron number in offspring at 9 months of age*. J Physiol, 2005. **565**(Pt 1): p. 137-47.
74. Johns, C., et al., *Models of experimental hypertension in mice*. Hypertension, 1996. **28**(6): p. 1064-9.
75. Woods, L.L., et al., *Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats*. Pediatr Res, 2001. **49**(4): p. 460-7.
76. Edwards, L.J., et al., *Restriction of placental and fetal growth in sheep alters fetal blood pressure responses to angiotensin II and captopril*. J Physiol, 1999. **515 (Pt 3)**: p. 897-904.
77. Endres, A., *Fetale Programmierung der Nephronenzahl und Glomerulumgröße im endothelialen NO-Synthetase (eNOS) Knock-out Tiermodell*, in *Department of Medicine - Charité - University Medicine Berlin*. 2014, Freie Universität Berlin: Berlin.

Literaturverzeichnis

78. Deckert, T., et al., *Albuminuria reflects widespread vascular damage. The Steno hypothesis*. Diabetologia, 1989. **32**(4): p. 219-26.
79. Kannel, W.B., et al., *The prognostic significance of proteinuria: the Framingham study*. Am Heart J, 1984. **108**(5): p. 1347-52.
80. Amann, K., C. Wanner, and E. Ritz, *Cross-talk between the kidney and the cardiovascular system*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(8): p. 2112-9.
81. Zeman, F.J., *Effects of maternal protein restriction on the kidney of the newborn young of rats*. J Nutr, 1968. **94**(2): p. 111-6.
82. Zandi-Nejad, K., V.A. Luyckx, and B.M. Brenner, *Adult hypertension and kidney disease: the role of fetal programming*. Hypertension, 2006. **47**(3): p. 502-8.
83. Langley-Evans, S.C., A.J. Langley-Evans, and M.C. Marchand, *Nutritional programming of blood pressure and renal morphology*. Arch Physiol Biochem, 2003. **111**(1): p. 8-16.
84. Brenner, B.M., D.L. Garcia, and S. Anderson, *Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other?* Am J Hypertens, 1988. **1**(4 Pt 1): p. 335-47.
85. Woods, L.L., *Neonatal uninephrectomy causes hypertension in adult rats*. Am J Physiol, 1999. **276**(4 Pt 2): p. R974-8.
86. Zimanyi, M.A., J.F. Bertram, and M.J. Black, *Nephron number and blood pressure in rat offspring with maternal high-protein diet*. Pediatr Nephrol, 2002. **17**(12): p. 1000-4.
87. Moritz, K.M., et al., *Uteroplacental insufficiency causes a nephron deficit, modest renal insufficiency but no hypertension with ageing in female rats*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 11): p. 2635-46.
88. Manalich, R., et al., *Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: a histomorphometric study*. Kidney Int, 2000. **58**(2): p. 770-3.
89. Nwagwu, M.O., A. Cook, and S.C. Langley-Evans, *Evidence of progressive deterioration of renal function in rats exposed to a maternal low-protein diet in utero*. Br J Nutr, 2000. **83**(1): p. 79-85.
90. Woods, L.L., *Chapter 11 Renal Disease and Fetal Undernutrition*, in *Fetal Nutrition and adult disease. Programming of Chronic Disease through Fetal Exposure to Undernutrition*. . 2004: Division of Nutritional Biochemistry, School of Biosciences, University of Nottingham, UK. p. 1.
91. Woods, L.L., D.A. Weeks, and R. Rasch, *Programming of adult blood pressure by maternal protein restriction: role of nephrogenesis*. Kidney Int, 2004. **65**(4): p. 1339-48.
92. Xie, Z., et al., *Effect of low birth weight on impaired renal development and function and hypertension in rat model*. Ren Fail, 2012. **34**(6): p. 754-9.
93. Ortiz, L.A., et al., *Effect of prenatal dexamethasone on rat renal development*. Kidney Int, 2001. **59**(5): p. 1663-9.

Literaturverzeichnis

94. Ojeda, N.B., *Low birth weight increases susceptibility to renal injury in a rat model of mild ischemia-reperfusion*. Am J Physiol Renal Physiol, 2011. **301**(2): p. F420-6.
95. Plank, C., et al., *Intrauterine growth retardation aggravates the course of acute mesangioproliferative glomerulonephritis in the rat*. Kidney Int, 2006. **70**(11): p. 1974-82.
96. Benkert A., M.B., Schössler W., Warsinke A., *Mischen und gleich messen: Creatinin spezifisch und einfach bestimmen mit dem Size Exclusion Redox-labeled Immunoassay (SERI)*. Biospectrum 2008. **7**: p. 31-33.
97. Vehaskari, V.M. and L.L. Woods, *Prenatal programming of hypertension: lessons from experimental models*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(9): p. 2545-56.
98. Black, M.J., et al., *Is there an association between level of adult blood pressure and nephron number or renal filtration surface area?* Kidney Int, 2004. **65**(2): p. 582-8.
99. Battista, M.C., et al., *Intrauterine growth restriction in rats is associated with hypertension and renal dysfunction in adulthood*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **283**(1): p. E124-31.
100. Plank, C., et al., *Intrauterine growth restriction following ligation of the uterine arteries leads to more severe glomerulosclerosis after mesangioproliferative glomerulonephritis in the offspring*. Am J Nephrol, 2010. **32**(4): p. 287-95.
101. Dotsch, J., C. Plank, and K. Amann, *Fetal programming of renal function*. Pediatr Nephrol, 2012. **27**(4): p. 513-20.
102. Bagby, S.P., *Maternal nutrition, low nephron number, and hypertension in later life: pathways of nutritional programming*. J Nutr, 2007. **137**(4): p. 1066-72.
103. Guron, G. and P. Friberg, *An intact renin-angiotensin system is a prerequisite for normal renal development*. J Hypertens, 2000. **18**(2): p. 123-37.
104. Wolf, G. and E.G. Neilson, *Angiotensin II as a renal growth factor*. J Am Soc Nephrol, 1993. **3**(9): p. 1531-40.
105. Wolf, G., *Angiotensin II and tubular development*. Nephrol Dial Transplant, 2002. **17 Suppl 9**: p. 48-51.
106. Fyhrquist, F. and O. Saijonmaa, *Renin-angiotensin system revisited*. J Intern Med, 2008. **264**(3): p. 224-36.
107. Santos, R.A., A.J. Ferreira, and E.S.A.C. Simoes, *Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis*. Exp Physiol, 2008. **93**(5): p. 519-27.
108. Gao, H., U. Yallampalli, and C. Yallampalli, *Maternal protein restriction reduces expression of angiotensin I-converting enzyme 2 in rat placental labyrinth zone in late pregnancy*. Biol Reprod, 2012. **86**(2): p. 31.
109. Kingdom, J.C., et al., *Intrauterine growth restriction is associated with persistent juxtamedullary expression of renin in the fetal kidney*. Kidney Int, 1999. **55**(2): p. 424-9.

Literaturverzeichnis

110. Dodic, M., et al., *Programming effects of short prenatal exposure to dexamethasone in sheep*. Hypertension, 2002. **40**(5): p. 729-34.
111. Kingdom, J.C., et al., *Fetal angiotensin II levels and vascular (type I) angiotensin receptors in pregnancies complicated by intrauterine growth retardation*. Br J Obstet Gynaecol, 1993. **100**(5): p. 476-82.
112. Langley-Evans, S.C., et al., *Intrauterine programming of hypertension: the role of the renin-angiotensin system*. Biochem Soc Trans, 1999. **27**(2): p. 88-93.
113. Ichihara, A., et al., *Renal renin-angiotensin system*. Contrib Nephrol, 2004. **143**: p. 117-30.
114. Konje, J.C., et al., *Human fetal kidney morphometry during gestation and the relationship between weight, kidney morphometry and plasma active renin concentration at birth*. Clin Sci (Lond), 1996. **91**(2): p. 169-75.
115. Martyn, C.N., A.F. Lever, and J.J. Morton, *Plasma concentrations of inactive renin in adult life are related to indicators of foetal growth*. J Hypertens, 1996. **14**(7): p. 881-6.
116. Edwards, L.J. and I.C. McMillen, *Maternal undernutrition increases arterial blood pressure in the sheep fetus during late gestation*. J Physiol, 2001. **533**(Pt 2): p. 561-70.
117. Sherman, R.C. and S.C. Langley-Evans, *Early administration of angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril, prevents the development of hypertension programmed by intrauterine exposure to a maternal low-protein diet in the rat*. Clin Sci (Lond), 1998. **94**(4): p. 373-81.
118. Langley-Evans, S.C. and A.A. Jackson, *Captopril normalises systolic blood pressure in rats with hypertension induced by fetal exposure to maternal low protein diets*. Comp Biochem Physiol A Physiol, 1995. **110**(3): p. 223-8.
119. Ceravolo, G.S., et al., *Enalapril and losartan restored blood pressure and vascular reactivity in intrauterine undernourished rats*. Life Sci, 2007. **80**(8): p. 782-7.
120. Pladys, P., et al., *Role of brain and peripheral angiotensin II in hypertension and altered arterial baroreflex programmed during fetal life in rat*. Pediatr Res, 2004. **55**(6): p. 1042-9.
121. Moritz, K.M., et al., *Fetal renal and blood pressure responses to steroid infusion after early prenatal treatment with dexamethasone*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **288**(1): p. R62-6.
122. Sahajpal, V. and N. Ashton, *Increased glomerular angiotensin II binding in rats exposed to a maternal low protein diet in utero*. J Physiol, 2005. **563**(Pt 1): p. 193-201.
123. Vehaskari, V.M., D.H. Aviles, and J. Manning, *Prenatal programming of adult hypertension in the rat*. Kidney Int, 2001. **59**(1): p. 238-45.
124. Grigore, D., et al., *Placental insufficiency results in temporal alterations in the renin angiotensin system in male hypertensive growth restricted offspring*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **293**(2): p. R804-11.

Literaturverzeichnis

125. Wang, Y.P., et al., *Effects of a restricted fetal growth environment on human kidney morphology, cell apoptosis and gene expression*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2014.
126. Vehaskari, V.M., et al., *Kidney angiotensin and angiotensin receptor expression in prenatally programmed hypertension*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **287**(2): p. F262-7.
127. Peers, A., et al., *The peripheral renin-angiotensin system is not involved in the hypertension of sheep exposed to prenatal dexamethasone*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2001. **28**(4): p. 306-11.
128. McMullen, S., D.S. Gardner, and S.C. Langley-Evans, *Prenatal programming of angiotensin II type 2 receptor expression in the rat*. Br J Nutr, 2004. **91**(1): p. 133-40.
129. Zohdi, V., et al., *Nephrogenesis and the renal renin-angiotensin system in fetal sheep: effects of intrauterine growth restriction during late gestation*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **293**(3): p. R1267-73.
130. Franco, M.C., et al., *Circulating renin-angiotensin system and catecholamines in childhood: is there a role for birthweight?* Clin Sci (Lond), 2008. **114**(5): p. 375-80.
131. Washburn, L.K., et al., *The renin-angiotensin-aldosterone system in adolescent offspring born prematurely to mothers with preeclampsia*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2014.
132. Rasch, R., E. Skriver, and L.L. Woods, *The role of the RAS in programming of adult hypertension*. Acta Physiol Scand, 2004. **181**(4): p. 537-42.
133. Newton-Cheh, C., et al., *Clinical and genetic correlates of aldosterone-to-renin ratio and relations to blood pressure in a community sample*. Hypertension, 2007. **49**(4): p. 846-56.
134. Vasan, R.S., et al., *Serum aldosterone and the incidence of hypertension in nonhypertensive persons*. N Engl J Med, 2004. **351**(1): p. 33-41.
135. Reynolds, R.M., et al., *Programming of hypertension: associations of plasma aldosterone in adult men and women with birthweight, cortisol, and blood pressure*. Hypertension, 2009. **53**(6): p. 932-6.
136. Grigore, D., N.B. Ojeda, and B.T. Alexander, *Sex differences in the fetal programming of hypertension*. Gend Med, 2008. **5 Suppl A**: p. S121-32.
137. Gallo, L.A., et al., *Cardio-renal and metabolic adaptations during pregnancy in female rats born small: implications for maternal health and second generation fetal growth*. J Physiol, 2012. **590**(Pt 3): p. 617-30.
138. Fischer, M., A. Baessler, and H. Schunkert, *Renin angiotensin system and gender differences in the cardiovascular system*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(3): p. 672-7.
139. Wlodek, M.E., et al., *Normal lactational environment restores nephron endowment and prevents hypertension after placental restriction in the rat*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(6): p. 1688-96.

Literaturverzeichnis

140. Kumar, M., et al., *Novel insights into the genetic and epigenetic paternal contribution to the human embryo*. Clinics (Sao Paulo), 2013. **68 Suppl 1**: p. 5-14.
141. McPherson, N.O., et al., *Paternal obesity, interventions, and mechanistic pathways to impaired health in offspring*. Ann Nutr Metab, 2014. **64**(3-4): p. 231-8.
142. Li, J., et al., *Paternal programming of offspring cardiometabolic diseases in later life*. J Hypertens. 2016 Jul 21. [Epub ahead of print].
143. Jimenez-Chillaron, J.C., et al., *Intergenerational transmission of glucose intolerance and obesity by in utero undernutrition in mice*. Diabetes 2009; **58**:460–468.
144. Binder, N.K., et al., *Paternal diet-induced obesity retards early mouse embryo development, mitochondrial activity and pregnancy health*. PLoS One 2012; **7**:e52304.
145. Lane, M., et al., *Oxidative stress in mouse sperm impairs embryo development, fetal growth and alters adiposity and glucose regulation in female offspring*. PLoS One 2014; **9**:e100832.

7. Abkürzungsverzeichnis

11 β -HSD Typ II	11 Beta-hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 2
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ADH	Antidiuretisches Hormon
ANP	atriale natriuretische Peptid
Aqua bidest	Aqua bidestilla, zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest	Aqua destillata, destilliertes Wasser
Aqua dem	Aqua demineralisata
Aqua ad inject	Aqua ad iniectabilia
CpG	Cytosin-Phosphatidyl-Guanin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
EnaC	endothelialer Natriumkanal
eNOS	endotheliale NO Synthase
eNOS -/-	homozygoter eNOS Knock-out
eNOS +/-	heterozygoter eNOS Knock-out
et al.	und andere
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
Ggf.	gegebenenfalls
h	Stunden
IUGR	Intrauterine Growth Restriction, intrauterine Wachstumsretardierung
JXA	juxtaglomerulärer Apparat
KO	knock-out
linc-RNA	long non-coding RNA
min	Minute
mRNA	Messenger RNA

Abkürzungsverzeichnis

NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid Synthase
PCR	Polymerase Chain Reaction; Polymerase Ketten Reaktion
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	Ribodesoxynukleinsäure
rtPCR	Real Time Polymerase Ketten Reaktion
RR	Blutdruckmessung nach Riva-Rocci
SGA	small for gestational age
sog.	Sogenannte
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp, Wildtyptier
ZNS	Zentrales Nerven System

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tabellarische Übersicht über Interventionsmöglichkeiten und verschiedene Tierarten	11
Tabelle 2: Anzahl und Verteilung der Versuchstiere auf die untersuchten Gruppen.	25
Tabelle 3: Tabellarische Darstellung der systolischen Blutdruckwerte.....	40
Tabelle 4: Tabellarische Darstellung der GFR.....	42
Tabelle 5: Zusammenfassung der Ergebnisse der GFR im Verhältnis zum Körpergewicht	43
Tabelle 6: Tabellarische Darstellung der Aldosteronkonzentration im 24h-Sammelurin	50
Tabelle 7: Synopsis der Ergebnisse der Auswertung von Hämodynamik, Wachstumsverlauf, Körper- und Organgewicht, Nierenfunktion , Histologie, sowie RAAS im Gruppenvergleich	51

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: vereinfachtes Schema des Renin-Angiotensin-Systems	19
Abbildung 2: Verkreuzungsschema	25
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Versuchsablauf.	26
Abbildung 4: Stoffwechselläufig.....	28
Abbildung 5: Graphische Darstellung des Geburtsgewichts	37
Abbildung 6: Graphische Darstellung des Körpergewichts.	38
Abbildung 7: Graphische Darstellung des gesamten Nierengewichts.	39
Abbildung 8: Graphische Darstellung des relativen Nierengewichts	40
Abbildung 9: Graphischer Vergleich Albumin-Kreatinin-Ratio im Urin.	44
Abbildung 10: Graphischer Vergleich des Glomerulosklerose-Scores der Niere.....	45
Abbildung 11: Graphische Darstellung der interstitiellen Fibrose	46
Abbildung 12: Graphische Darstellung der perivaskulären Fibrose.....	46
Abbildung 13: Graphische Darstellung der Media-Lumen-Ratio der intrarenalen Arterien	47
Abbildung 14: Graphische Darstellung des Verhältnis reninpositiver Glomeruli/Gesamtglomeruli	48
Abbildung 15: Graphische Darstellung der renalen relativen ACE-Konzentration	48
Abbildung 16: Graphische Darstellung der relativen renalen AT ₂ -Rezeptordichte.....	49
Abbildung 17: Zusammenhang zwischen fetaler Minderversorgung, reduzierter Nephronzahl und der Entwicklung von arterieller Hypertonie und chronischer Nierenerkrankung.....	57
Abbildung 18: Zusammenhang zwischen fetaler Minderversorgung, reduzierter Nephronzahl, dem RAS und der Entwicklung von arterieller Hypertonie.....	62

10. Lebenslauf

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

Lebenslauf

11. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Berthold Hocher für die Überlassung eines spannenden Themas, das entgegengebrachte Vertrauen und die Betreuung und Beratung während der Erstellung dieser Arbeit bedanken. Da Prof. Dr. Hocher an die Universität Potsdam wechselte, erklärte sich PD Dr. Philipp Kalk bereit, die Betreuung meiner Doktorarbeit zu übernehmen. Für die komplikationslose Übernahme und nahtlose Weiterbetreuung und Beratung möchte ich mich bei ihm besonders bedanken.

Desweiteren möchte ich mich für gute Zusammenarbeit und zahlreiche Hilfestellungen bei der gesamten Laborarbeitsgruppe bedanken: Katharina Krause-Relle, Susi Heiden, Yulija Sharokovska und Jan Rahnenführer. Insbesondere bedanke ich mich bei Karoline von Websky und Christoph Reichetzeder, die mir mit all ihrem Wissen und durch ihre unermüdliche Hilfe zur Seite standen.

Für die Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung bedanke ich mich herzlich bei Prof. Dr. Franziska Theilig.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern und meiner Familie, die mich bis heute auf meinem Lebensweg immer in Allem unterstützt haben. Ich danke zudem Veronika Lang für ihre Hilfestellungen und ihren Humor. Ich bin gespannt, wer von uns sich zuerst auf das Radl schwingen muss. Der größte Dank geht an meinen Mann Christian für die nie enden wollende Motivation, seine grenzenlose Unterstützung, sein Verständnis und Liebe.

12. Eidesstattliche Versicherung

Ich, Sarah Durach, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Der renale Phänotyp genotypisch gesunder Wildtypnachkommen heterozygoter eNOS-knock-out-Eltern (Mausmodell) im Kontext der fetalen Programmierung selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

.....

Ort, Datum

.....

Unterschrift