

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

DISSERTATION

Fetale Programmierung von Wildtyp- Nachkommen heterozygoter eNOS- defizienter Mäuse

– Morphologische und funktionelle Veränderungen des
endokrinen Pankreas –

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Silke Runge aus Berlin

Gutachter:

1. Prof. Dr. B. Hoher
2. Prof. Dr. J.-P. Stasch
3. Prof. Dr. F. Lang

Datum der Promotion: 22.06.2014

Inhaltsverzeichnis

1	Literaturübersicht	7
1.1	Fetale Programmierung	7
1.2	Modelle und Mechanismen der fetalen Programmierung.....	12
1.3	Die Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS)	19
1.4	Pathophysiologie von eNOS-Knockout Mäusen.....	20
1.5	Stickstoffmonoxid und Schwangerschaft	21
1.6	Programmierung von Glukosestoffwechselstörungen und Pankreasmorphologie	22
1.7	Mechanismen und Modelle von Pankreasentwicklungsstörungen	24
2	Fragestellung.....	26
3	Material und Methoden	27
3.1	Geräte und Chemikalien	27
3.1.1	Technische Geräte	27
3.1.2	Chemikalien	28
3.1.3	Verbrauchsmaterialien	30
3.1.4	Software	30
3.2	Tiere und Tierhaltung	30
3.2.1	Versuchstiere.....	30
3.2.2	Kreuzungsschema.....	31
3.2.3	Tierhaltung	32
3.3	Versuchsaufbau	33
3.4	Molekularbiologische und physiologische Messmethoden	34

3.4.1	Genotypisierung.....	34
3.4.2	Blutdruckmessung	37
3.4.3	Untersuchungen im Stoffwechsellkäfig	38
3.4.4	Messung Nüchternglukosekonzentration und Nüchterninsulinkonzentration.....	38
3.4.5	Intraperitonealer Glukosetoleranztest.....	39
3.5	Histologische Methoden	40
3.5.1	Organentnahme und Fixierung.....	40
3.5.2	Einbettung.....	40
3.5.3	Anfertigung der Gewebeschnitte	41
3.5.4	Hämatoxylin-Eosin Färbung der Pankreas.....	41
3.5.5	Immunhistochemische Färbung der β -Zellen.....	43
3.6	Auswertung der histologischen Färbungen	46
3.6.1	Auswertung der HE-Färbung der Pankreas	46
3.6.2	Auswertung der Insulinfärbung.....	47
3.6.3	Statistik.....	48
4	Ergebnisse.....	49
4.1	Geburtsgewicht	49
4.2	Wachstumsverlauf	50
4.3	Längenwachstum.....	57
4.4	Organgewichte	59
4.5	Systolischer Blutdruck.....	60
4.6	Glukosestoffwechselfparameter	62

4.6.1	Nüchternglukosekonzentration	62
4.6.2	Nüchterninsulinkonzentration.....	64
4.6.3	HOMA- und QUICKI-Index.....	66
4.6.4	Intraperitonealer Glukosetoleranztest.....	66
4.7	Histologie der Pankreas.....	70
5	Diskussion.....	74
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	74
5.2	Geburtsgewichte und Wachstumsverlauf	75
5.2.1	Maternale Programmierungseffekte	75
5.2.2	Paternale Programmierung des Wachstumsverlaufs.....	80
5.3	Glukosestoffwechsel	81
5.3.1	Maternale Programmierung des Glukosestoffwechsels	81
5.3.2	Paternale Programmierung des Glukosestoffwechsels.....	84
6	Fazit und Ausblick.....	89
7	Limitationen der Arbeit.....	90
	Literaturverzeichnis.....	93
	Abkürzungsverzeichnis	106
	Abbildungsverzeichnis.....	107
	Eidesstattliche Versicherung	109
	Lebenslauf.....	110

Zusammenfassung

Hintergrund: Zahlreiche Studien konnten einen Zusammenhang zwischen niedrigem Geburtsgewicht bzw. fetaler Deprivation und einer erhöhten Krankheitsveranlagung für diverse Erkrankungen im Erwachsenenalter darstellen. Im Sinne der *Advanced Fetal Programming* Hypothese stellt auch das mütterliche Genom eine wesentliche Determinante des fetalen Wachstums und damit des späteren Krankheitsrisikos dar. Mit dem der Arbeit zu Grunde liegenden standardisierten Tierversuch (Mausmodell) soll der Einfluss eines mütterlichen bzw. väterlichen heterozygoten eNOS-Knockout auf den Phänotyp der Wildtypnachkommen untersucht werden. Für das Experiment wurde ein eNOS-knockout gewählt, da die endotheliale NO-Synthase (eNOS) eine wesentliche Rolle bei der Ausbildung des plazentaren Gefäßbettes spielt und somit die maternale NO-Verfügbarkeit indirekt die Nährstoffversorgung des Feten moduliert.

Methoden: In dem zugrunde liegenden Mausmodell wurden ausschließlich Wildtypnachkommen heterozygoter eNOS-Knockout Elterntiere 25 Wochen lang untersucht. Die Tiere wurden aufgrund des Genotyps ihrer Eltern in drei Gruppen eingeteilt: Gruppe 1: Vater WT / Mutter WT; Gruppe 2: Vater WT / Mutter eNOS+/- Gruppe 3: Vater eNOS +/- Mutter WT. Somit können phänotypische Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen auf den jeweiligen elterlichen Genotyp zurückgeführt werden. Es wurden die Geburtsgewichte, die Wachstumsverläufe, verschiedene Glukosestoffwechselfparameter, die Organgewichte und die Blutdrücke erhoben. Nach 25 Wochen wurden die Tiere getötet und das endokrine Pankreas histologisch und immunhistologisch untersucht.

Ergebnisse: Der maternale eNOS-Knockout führte bei den männlichen Wildtypnachkommen zu einem signifikant niedrigeren Geburtsgewicht und Körperlänge. Darüber hinaus, zeigten sie postnatales Aufholwachstum. Jenes führte im Wachstumsverlauf dazu, dass sie kurzzeitig sogar signifikant schwerer waren als die Tiere der Kontrollgruppe. Eine Tendenz zu einem höheren Körpergewicht im Vergleich zu den anderen beiden experimentellen Gruppen blieb bis zum Versuchsende bestehen jedoch bei fehlender Signifikanz. Der paternale eNOS-Knockout nahm keinen signifikanten Einfluss auf die Geburtsgewichte der Wildtypnachkommen. Im Wachstumsverlauf waren jedoch die Nachkommen fast durchgehend signifikant

schwerer im Vergleich zu den anderen beiden experimentellen Gruppen. Der maternale eNOS-KO führte bei den Wildtypnachkommen zu einer signifikant höheren Insulinsensitivität in der 21. Versuchswochenwoche. Der paternale eNOS-Knockout führte bei den Wildtypnachkommen zu einer signifikant erhöhten Insulinresistenz in der 21. Versuchswochenwoche. Die Morphologie und Funktion des endokrinen Pankreas wurden weder durch den maternalen noch durch den paternalen eNOS-Knockout signifikant verändert.

Schlussfolgerungen: Es konnte gezeigt werden, dass das mütterliche sowie das väterliche Genom im Sinne der *Advanced Fetal Programming* Hypothese Einfluss auf die phänotypische Ausprägung der Wildtypnachkommen nimmt. Vor allem bei den paternalen Programmierungseffekt steht die Epigenetik im Zentrum der Erklärungsansätze.

Abstract

Background: Numerous studies have shown a link between low birth weight and fetal deprivation and an increased predisposition to various diseases in adulthood. The Advanced Fetal Programming Hypothesis proposes that the maternal genome a determinant of fetal growth and disease risk in adulthood. With the standardized animal experiments (mouse model) underlying the work is based, the influence of a maternal or paternal heterozygous eNOS-knockout on the phenotype of the wildtype offspring can be analyzed. For the experiment, an eNOS-knockout was chosen because the endothelial NO synthase plays an essential role in the formation of the placental vascular bed and thus indirectly modulate the NO availability of the nutrients the fetus.

Methods: In the underlying mouse model only wild type offspring of heterozygous eNOS-knockout animals were studied for 25 weeks. The animals were divided into three groups on the basis of the genotype of their parents: Group 1: Father WT / WT mother; Group 2: WT Father / Mother eNOS + / - Group 3: Father eNOS + / - / WT mother. Thus phenotypic differences between the groups of animals on the respective parental genotype can be traced. The birth weights, growth patterns, different glucose metabolic parameters, organ weights, blood pressures were compared. After 25 weeks,

the animals were killed and the endocrine pancreas examined histologically and immunohistochemically.

Results: The maternal eNOS-knockout resulted in male wildtype offspring in a significantly lower birth weight and a significantly lower body length. The wildtype male offspring of the experimental group two (mother eNOS-KO/father WT) showed postnatal catch-up growth. This resulted in the growth curve to the fact that they were significantly heavier even briefly as the animals in the control group. The paternal eNOS knockout took no significant influence on the birth weights of the wild-type offspring. In the course of growth, however, the offspring were almost continuously significantly heavier compared to the other two experimental groups. The maternal eNOS-knockout resulted in the wildtype offspring in a significantly higher insulin sensitivity. The paternal eNOS-knockout resulted in the wildtype offspring in a significantly increased insulin resistance. The morphology and function of the endocrine pancreas were not significantly altered by the maternal or the paternal eNOS-knockout.

Conclusions: It was shown that the maternal and the paternal genome in the sense of the Advanced Fetal Programming Hypothesis influence the phenotypic expression of the wildtype offspring. Especially in the paternal programming effect caused by the heterozygous eNOS-knockout epigenetics is at the center of explanations.

1 **Literaturübersicht**

1.1 **Fetale Programmierung**

„Ein guter Start ist schon der halbe Erfolg“ [Platon]. Diese Aussage scheint auch auf die menschliche Gesundheit zuzutreffen.

Günther Dörner von der Berliner Charité führte 1972 den Begriff der perinatalen Programmierung ein. Sein Forschungsschwerpunkt war die neuroendokrinologische Entwicklungsbiologie. Es gelang ihm anhand eines Rattenmodells darzustellen, dass der mütterliche Hormonspiegel während der Schwangerschaft das spätere Sexualverhalten der Nachkommen beeinflusst (1). In den späten 1980er Jahren und den frühen 1990er Jahren wurde dieser Begriff von dem Epidemiologen David Barker übernommen. Seine Arbeitsgruppe veröffentlichte damals eine Serie von Arbeiten, in denen der Zusammenhang zwischen niedrigem Geburtsgewicht und einer erhöhten adipogenen, diabetogenen und kardiovaskulären Krankheitsveranlagung dargestellt wurde (2) (3) (4). Hinweisgebend war die deutliche Übereinstimmung des geographischen Verteilungsmusters für niedriges Geburtsgewicht und hohe Säuglingssterblichkeit um 1900 mit den Mortalitätsraten bezüglich der koronaren Herzkrankheit (KHK) zwischen 1968 und 1978 in England und Wales. Große epidemiologische Folgestudien bestätigten diesen Zusammenhang (5) (6). Barker schlussfolgerte, entgegen der allgemeinen Lehrmeinung, dass die vorgeburtliche Zeit die menschliche Gesundheit weitreichender prägt als der nachgeburtliche Lebensstil. Ein entscheidender Beleg für die Richtigkeit seiner Annahme wurde erst 1995 durch den indischen Diabetologen Yainik CS. erbracht. Mittels einer prospektiven und retrospektiven Kohortenstudie konnte Yainik CS. zeigen, dass die indische Landbevölkerung zwar jede erdenkliche Empfehlung für ein gesundes Leben erfüllte (die Nahrung bestand überwiegend aus Rohkost, sie legten weite Strecken am Tag zu Fuß zurück und blieben zeitlebens eher BMI schwach) und trotzdem erkrankten sie häufiger an Diabetes mellitus Typ II (DMT2), in einem jüngeren Alter und bei einem relativ niedrigeren BMI im Vergleich zu den weißen Kaukasiern. Gleichzeitig liegt das durchschnittliche Geburtsgewicht der indischen Landbevölkerung deutlich unter 2,5 kg (7). Ein Geburtsgewicht unter 2500g ist bei einem reif geborenen Kind definitionsgemäß reduziert und lässt auf eine intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR) schließen (8). Diese Ergebnisse bekräftigten Barkers Annahme, dass ein niedriges Geburtsgewicht

unabhängig vom Lebensstil mit einer erhöhten Krankheitsveranlagung im Erwachsenenalter in unmittelbarem Zusammenhang steht. Die Liste der Erkrankungen die mit IUGR assoziiert sind, konnte in den vergangenen Jahren durch zahlreiche Studien erweitert werden. Bis heute konnte eine inverse Korrelation zwischen Geburtsgewicht und einer Krankheitsveranlagung für folgende Krankheiten gezeigt werden: Bluthochdruck, chronische Bronchitis, Arteriosklerose, Asthma, Osteoporose, Malignome, Niereninsuffizienz, das metabolische Syndrom (Subsumierung von Diabetes Typ II, verminderte Glukosetoleranz, Insulinresistenz, Hyperlipidämie und Adipositas), endokrinologische Krankheiten, Brustkrebs und Schizophrenie. Diese Zusammenhänge wurden in den verschiedensten Veröffentlichungen unabhängig von Spezies, Geschlecht und ethnischer Herkunft beschrieben (9) (10) (11). Auch die intellektuellen und sozialen Fähigkeiten scheinen durch IUGR langfristig beeinträchtigt zu sein (12).

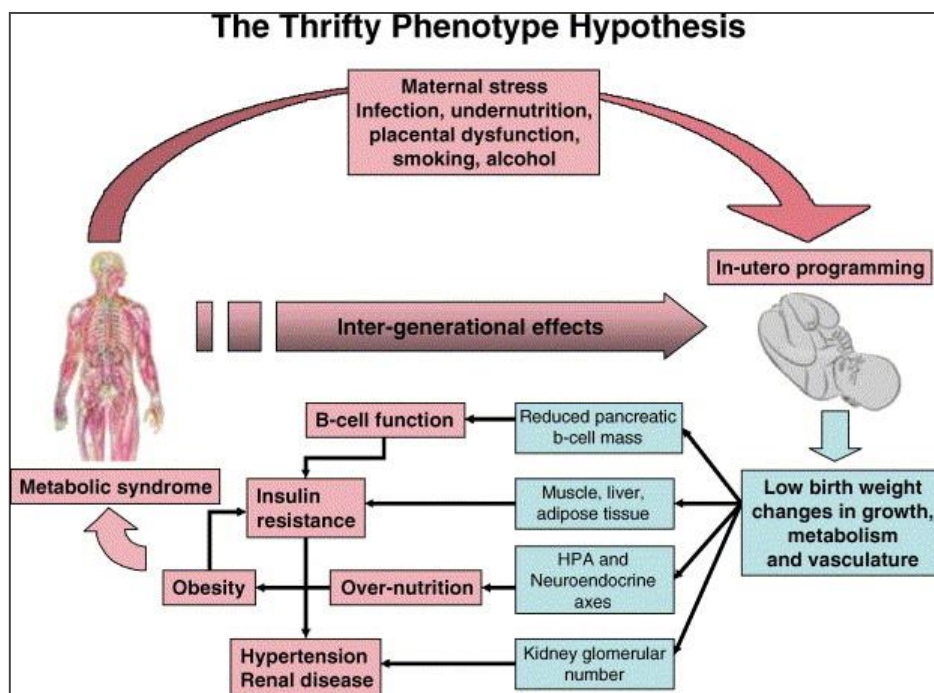


Abbildung 1: Die „*Thrifty Phenotype*“ Hypothese (13)

Aufbauend auf die Beobachtungen von Barker kam es zu einer Reihe von Weiterentwicklungen der Barkerschen Hypothese. So formulierten Hales und Barker 1992 die „Thrifty-Phenotyp“ Hypothese. Darin postulierten sie, dass der fetale Organismus unter intrauteriner Mangelversorgung kompensatorische Lebensstrategien entwickelt. Dabei wird die Versorgung lebenswichtiger Organe zu Ungunsten anderer

aufrechterhalten. Dieser Kompensationsmechanismus, der ein Überleben unter mangelnder Nahrungsmittelverfügbarkeit sichern soll, begünstigt jedoch langfristig die Entwicklung des metabolischen Syndroms (14).

Die „*Thrifty-Phenotyp*“ Hypothese ist eine Anlehnung an die „*Thrifty-Genotyp*“ Hypothese, welche 1962 von Neel formuliert wurde (Abbildung 1). Neel ging allerdings davon aus, dass Nahrungsmangel einen großen evolutionären Druck darstellt und zur Selektion der sogenannten „sparsamen Gene“ führt, welche die metabolische Effizienz in Richtung Insulinresistenz maximieren und unter Nahrungsmangel das Überleben sichern. Die genetisch bedingte Insulinresistenz schützt einerseits vor lebensbedrohlichen Hypoglykämien, in Zeiten des Überflusses erhöht sie jedoch das Risiko an einem metabolischen Syndrom zu erkranken (15). Dies entspricht auch der Hypothese von Hattersley und Tooke. Denn sie gehen mit der „*Fetal Insulin*“ Hypothese davon aus, dass eine genetisch bedingte Insulinresistenz zu pränataler Dystrophie führt, da Insulin in seiner Wirkung als anaboles Hormon nur eingeschränkt wirkt und somit ein wesentlicher intrauteriner Wachstumsstimulus abgeschwächt wird (16). Beide Ansätze betonen, dass vor allem eine genetisch veranlagte Insulinresistenz die Ursache für eine IUGR und deren Folgen ist. Bisher konnten mittels genomweiten Analysen auch zahlreiche Gene identifiziert werden, die mit DMT II assoziiert sind (17). Die Mutation im Glukokinase-Gen kann hier stellvertretend genannt werden. Genträger dieser Mutation zeigen ein niedriges Geburtsgewicht und ein erhöhtes Risiko eine Insulinresistenz zu entwickeln (18). Dieser Ansatz ist jedoch sehr umstritten, da monogenetische Defekte dieser Art eher selten sind und somit nicht das häufige Auftreten von DMT II im Zusammenhang mit IUGR erklären können. Zudem ist es bisher nicht gelungen genetische Marker zu finden die eine Insulinresistenz vorhersagen (19).

Auch Gluckmann und Hanson knüpften mit ihrem Modell der „*Predictive Adaptive Responses*“ an Barkers Beobachtungen an. Sie postulierten, dass solche intrauterinen Anpassungsprozesse eine Möglichkeit des werdenden Organismus darstellen sich kurzfristig auf herrschende Umweltbedingungen einzustellen. Entspricht die tatsächliche spätere Umwelt dieser Anpassung nicht und die auf Mangel optimierten Organe sind einem Nahrungsüberfluss ausgesetzt (*mismatch*), führt diese Fehlanpassung im Laufe des Lebens zu einem erhöhten Krankheitsrisiko (20). Dies entspricht der Beobachtung, dass das Risiko an einem DMT II zu erkranken ohne die typisch starke postnatale

Gewichtszunahme (*catch up growth*) und ohne einen gesteigerten Body Mass Index (BMI) im Erwachsenenalter nicht steigt (21).

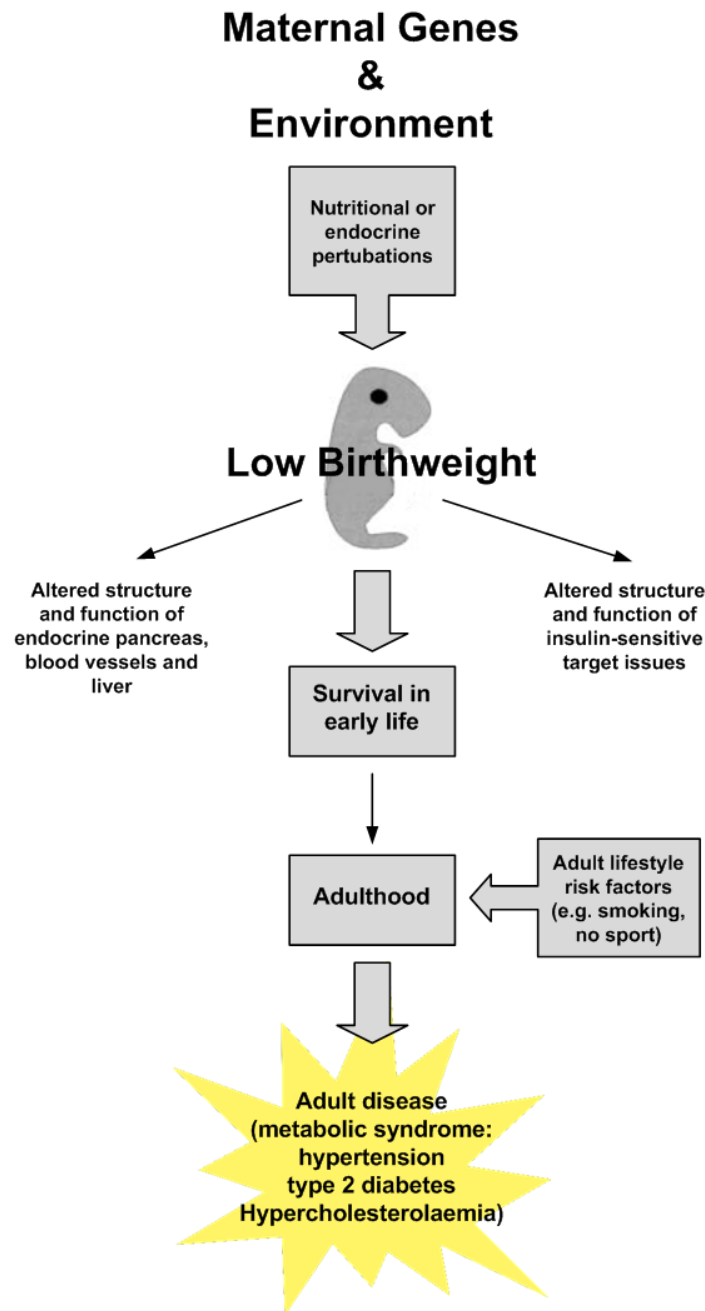


Abbildung 2: Darstellung der Advanced Fetal Programming Hypothesis nach Hocher

Weiterführende Untersuchungen von Hocher et al. konnten zeigen, dass auch das mütterliche Genom das Geburtsgewicht der Nachkommen beeinflusst (Abbildung 2). Mütterliche Genpolymorphismen in der β Untereinheit des G-Proteins (825T Allel) determinieren das Geburtsgewicht und den Kopfumfang, auch wenn diese Genvarianten nicht auf die Nachkommen übertragen werden (22). Um den Einfluss des

mütterlichen Genoms, im Sinne der fetalen Programmierung, deutlich zu machen, wurde die „*Advanced Fetal Programming*“ Hypothese formuliert (23). Gemäß dieser Hypothese konnte auch gezeigt werden, dass die Genpolymorphismen des Cytochrom P-450 Gens (CYP1A1) sowie des Glutathion-S-Transferase-Gens (GSST1) dafür verantwortlich zu sein scheinen, dass Tabakbestandteile von der werdenden Mutter individuell unterschiedlich verstoffwechselt werden. Denn das Geburtsgewicht von Kindern rauchender Mütter mit diesen Genpolymorphismen war deutlich niedriger als bei Neugeborenen rauchender Mütter ohne diese Genpolymorphismen (24).

Zunehmend deuten Arbeiten der vergangenen Jahre daraufhin, dass auch über den paternalen Weg fetale Programmierungen induziert werden können. Beispielhaft stellen die Daten einer epidemiologischen Humanstudie der schwedischen Kleinstadt Överkalix zwischen 1890-1920 dar, dass die Nahrungsmittelversorgung der Großväter väterlicherseits während ihrem 9.-12. Lebensjahr Einfluss auf die Lebenserwartung ihrer Enkelsöhne nimmt. Allerdings waren es nicht die hungernden Großväter, die ihren Enkelsöhnen eine verkürzte Lebenserwartung bescherten, sondern die Großväter, die in ihrer Vorpubertärenzeit einem Nahrungsüberfluss ausgesetzt waren. Dieser Nahrungsmittelüberfluss ließ das Risiko für DMT II und KHK unter ihren Enkelsöhnen deutlich ansteigen und das nur bei einem Nahrungsüberangebot im Alter von 9 bis -12 Jahren. Dieses Alter, indem sich die ersten Spermien entwickeln, gilt als Phase langsamen Wachstums und liegt zeitlich vor dem ersten pubertären Wachstumsschub. Dies wird als Hinweis in Richtung epigenetischer Gametenprägung gedeutet (25) (26). Für die Enkeltöchter erwies sich das Hungern ihrer Großmütter väterlicherseits während ihrer ersten drei Lebensjahre als ungünstig. Die Wirkung des väterlichen Rauchverhaltens auf die Söhne folgt einem ähnlichen geschlechtsspezifischen und altersspezifischen Muster. Der BMI der Söhne war deutlich höher, wenn die Väter im Alter von 9-12 Jahren schon rauchten. Fingen die Väter später an zu rauchen, zeigten die Söhne keine BMI Erhöhung. Auf den BMI der Töchter nahm das Rauchverhalten der Väter zu keinem Zeitpunkt Einfluss (27). Dies deutet daraufhin, dass der Lebensstil der männlichen Vorfahren väterlicherseits zwischen dem 9. bis-12. Lebensjahr, der sogenannten „*slow growth period*“, weitreichende Konsequenzen für die Gesundheit der männlichen Nachkommen hat. Standen bisher immer die Phasen schnellen Wachstums im Mittelpunkt des Interesses, machten beiden Studien deutlich, dass auch die Frühphase der Spermienentwicklung ein hohes Risikopotential für die folgende Generation birgt. Solche paternalen Programmierungseffekte lassen sich nicht auf

pränatale Reifungsbedingungen zurückführen und haben in den letzten Jahren dazu geführt, dass die Epigenetik zunehmend ins Zentrum der Erklärungsansätze rückt.

Interessanterweise liegen auch erste Hinweise vor, dass nicht nur der mütterliche und väterliche Genotyp unabhängig von der Vererbung Einfluss auf den Phänotyp der Nachkommen hat, sondern dass auch der kindliche Genotyp die mütterliche Physiologie während der Schwangerschaft verändern kann. Solch eine Einflussnahme könnte die Reifungsbedingungen des Fetus optimieren (28). Mütter, die ein Kind mit Beckwith-Widemann Syndrom erwarteten, zeigten ein deutlich höheres Risiko an einem Gestationsdiabetes (GDM) und/oder einem Schwangerschaftshypertonus (PIH) zu erkranken im Vergleich zu Schwangerschaften mit nicht betroffenen Geschwisterkindern (29). Kinder mit diesem Syndrom neigen zu Makrosomie und Tumorbildung. Hier ist anzumerken, dass eine Blutdruckerhöhung während der Schwangerschaft im physiologischen Bereich die Plazentadurchblutung verbessert (30). Ein milder GDM wiederum induziert aufgrund des erhöhten fetalen Blutzuckerspiegels eine vermehrte Insulinsekretion. Insulin als anaboles Wachstumshormon, steigert demzufolge das Wachstum des Feten (31).

Zusammenfassend wird derzeit davon ausgegangen, dass die Organe während des fetalen Lebens kritische Zeitfenster durchlaufen, welche oft nur einige Tage bis Wochen lang sind und sich durch schnelle Zellteilung charakterisieren (32). *Programming* bezeichnet nun eine Entwicklung, bei der es durch suboptimale Bedingungen während dieser sensiblen Phase zu irreversiblen morphologischen und funktionellen Veränderungen der Organe kommt (33). Zunehmend wird deutlich, dass es sich bei der fetalen Programmierung um einen vielschichtigen Kommunikationsprozess zwischen Umwelt und Epigenom/Genom des heranwachsenden Organismus handelt. Allerdings werden die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen noch nicht ausreichend verstanden.

1.2 Modelle und Mechanismen der fetalen Programmierung

Die in epidemiologischen Studien beobachteten Assoziationen auf dem Gebiet der fetalen Programmierung konnten durch zahlreiche tierexperimentelle Arbeiten verifiziert werden. Diese Versuche wurden bisher an Ratten, Mäusen, Meerschweinchen, Schafen und nichtmenschlichen Primaten durchgeführt. Die Manipulationen waren

diätischer, pharmakologischer, genetischer oder chirurgischer Art. Am häufigsten kam das Modell der mütterlichen diätetischen Manipulation zum Einsatz.

Diätetische Manipulation

Ein wichtiger Faktor für das fetale Wachstum ist die intrauterine Verfügbarkeit von Proteinen. Daher lässt sich vor allem durch eine mütterliche, isokalorische Proteinmangelernährung der Zusammenhang zwischen niedrigem Geburtsgewicht und einer erhöhten adipogenen, diabetogenen und kardiovaskulären Krankheitsveranlagung der Nachkommen im Erwachsenenalter gut darstellen (34). Schon bei Säuglingen, lange vor der klinischen Manifestation einer Glukosestoffwechselstörung, lässt sich eine inverse Korrelation zwischen Total Glykosyliertem Hämoglobin (TGH) und Geburtsgewicht nachweisen (35). Auch eine Mangelversorgung mit Kalorien, Vitaminen, Mineralstoffen oder Spurenelementen sowie eine hohe Fettzufuhr bei trächtigen Tieren haben Einfluss auf die Programmierung lebenslanger Krankheitsrisiken (36). So induziert zum Beispiel ein Mangel der Aminosäure Taurin eine erhöhte Apoptoserate der β -Zellen des Pankreas und führt zu einer irreversibel reduzierten β -Zellmasse (37). Auch Epigenetische Methylierungsprozesse sind von der Verfügbarkeit von Methylgruppen und weiterer Kofaktoren abhängig. Methylgruppendonoren sind u.a. Vitamin B₁₂, Folsäure und die Aminosäure Methionin. Vor allem die Phasen schneller Zellteilungen in der frühen Entwicklung sind sehr vulnerabel für einen Mangel an Vitamin B₁₂, Folsäure und Methionin. Ein Folsäuremangel verursacht zum einen eine DNA-Hypomethylierung und zum anderen eine eingeschränkte DNA-Synthese und Reparatur (38). Auf der zellulären Ebene führen solche Prozesse zu veränderten Syntheseraten von Enzymen, Wachstumsfaktoren und Rezeptoren (39).

Darüber hinaus konnten auch durch Alterationen der väterlichen Diät im Maus-/Rattenmodell Programmierungseffekte dargestellt werden. Eine hohe paternale präkonzeptionelle Fettzufuhr führt zum Beispiel zu langfristigen Fehlregulationen der Glukosestoffwechselprozesse bei deren weiblichen Nachkommen (40). Eine paternale präkonzeptionelle Proteinmangelernährung veränderte wiederum die Expression hepatischer Cholesterinbiosynthese relevanter Gene (41). Daten einer epidemiologischen Humanstudie der schwedischen Kleinstadt Överkalix zwischen 1890-1920 zeigten, dass auch die Nahrungsmittelversorgung der Großväter väterlicherseits während ihrem 9.-12. Lebensjahr Einfluss auf die Lebenserwartung ihrer

Enkelsöhne nimmt. Solche Phänomene können weder durch klassische Genetik noch durch ein suboptimales intrauterines Milieu erklärt werden und brachten somit die Epigenetik in den wissenschaftlichen Diskurs.

Anthropometrische Daten

Ein Geburtsgewicht unter 2500g ist bei einem reif geborenen Kind definitionsgemäß reduziert und lässt auf eine intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR) schließen (8). Jedoch zeigt der Zusammenhang zwischen Geburtsgewicht und lebenslangen Krankheitsveranlagungen einen U-förmigen Verlauf. Somit sind beide Gewichtsextreme (<2500g / >4500g) am Anfang des Lebens langfristig nachteilig (42). Die spätere Ausprägung fetal programmierter Glukosestoffwechselstörung wird durch verschiedene Faktoren moduliert, zum Beispiel durch die Art des postnatalen Wachstumsmusters. Bei Kindern „*small for gestational age*“ (SGA) findet in der frühen postnatalen Periode ein deutliches Aufholwachstum bezüglich des Körpergewichts und der Körpergröße statt. Bezog sich das sogenannte postnatale Aufholwachstum eher auf das Körpergewicht, waren die Nüchterninsulinwerte zum Zeitpunkt der Geburt und im Alter von einem Jahr signifikant erhöht. Bezog sich das Aufholwachstum eher auf die Körperlänge war die postprandiale Insulinsekretion erhöht (43). Aus zahlreichen Studien geht hervor, dass das langfristige *Outcome* der SGA Kinder durch das Aufholwachstum nicht verbessert wird (21). Dies wird unter anderem mit der disproportionalen Fettakkumulation begründet. Sie ist charakteristisch für postanales Aufholwachstum und führt vornehmlich zur Zunahme des Körperfettes und weniger zur Zunahme der Muskel- oder Organmasse. Dieses Phänomen wird auch „*catch-up fat*“ genannt (44). Des Weiteren erfolgt die Fettspeicherung vornehmlich in den viszeralen und weniger in den subkutanen Fettdepots (45). Die viszeralen Fettdepots dienen als Produzent diverser proinflammatorischer Mediatoren (Interleukine, Tumornekrosefaktor, Alpha etc.). Diese Mediatoren sind an der Entstehung von Arteriosklerose und Diabetes maßgeblich beteiligt (46). Auch der Zeitpunkt der intrauterinen Mangelversorgung moduliert unterschiedliche Krankheitsveranlagungen. Ist die frühe fetale Versorgung mangelhaft, neigen die Nachkommen zu einem erhöhten BMI (47). Durch Mangelversorgung im dritten Trimenon steigt das Risiko einen DMT II zu entwickeln. Besonders ausgeprägt ist dieser Zusammenhang bei den männlichen Nachkommen. Solche geschlechtsspezifischen Unterschiede sind typisch für einen Großteil der

Studienergebnisse, allerdings ist die Geschlechtsspezifität der verschiedenen Studien oft widersprüchlich und noch nicht ausreichend verstanden (48).

Chirurgische Manipulation

Durch Embolisation der Plazenta oder durch Ligatur der Umbilicalarterie konnte im Mausmodell das Geburtsgewicht der Feten um bis zu 50 % gesenkt und der Blutdruck um bis zu 10 mmHg erhöht werden. Auch die perinatale Morbidität, Mortalität und die Prävalenz für Glukosestoffwechselerkrankungen im Erwachsenenalter stieg deutlich an. Chirurgisch provozierte plazentare Mangel durchblutung verminderte die Zellzahl der Organe und dies konnte durch adäquate postnatale Ernährung nicht kompensiert werden (34).

Pharmakologische Manipulation

Die häufigste pharmakologische Manipulation erfolgte durch die Gabe von Streptozocin (STO). Diese Substanz besitzt eine spezifische Toxizität auf β -Zellen der Inselorgane und induziert somit eine diabetische Stoffwechsellage bei den Versuchstieren. STO gelangt über den GLUT-2 Transporter in die β -Zellen und entfaltet dort seine DNA schädigende Wirkung. Jedoch ist die Verwendung von STO durch die Verfügbarkeit von genetisch manipulierten Diabetes-Mäusen in den letzten Jahren zurückgegangen. Bedeutsam blieb allerdings die Möglichkeit durch die Dosis von STO die Schwere des Diabetes zu beeinflussen. So konnte man zeigen, dass leichter mütterlicher Diabetes zu hohem Geburtsgewicht und einer β -Zell Hypertrophie führt wohingegen schwerer Diabetes eher ein niedriges Geburtsgewicht, eine verringerte Inselgröße und eine verringerte β -Zell Masse zur Folge hatte. Mit Hilfe dieser pharmakologischen Modulation konnte gezeigt werden, dass ein milder Gestationsdiabetes aufgrund des erhöhten fetalen Blutzuckerspiegels eine vermehrte Insulinsekretion induziert. Insulin als anaboles Wachstumshormon führt in erhöhter Konzentration zu fetaler Makrosomie. Unter einem ausgeprägten Gestationsdiabetes entwickelt sich allerdings eine fetale Insulinresistenz und demzufolge wird das fetale Wachstum reduziert (31). Bemerkenswert waren die transgenerationalen Effekte, denn auch die Geburtsgewichte und die Pankreasmorphologie der nächsten Generation (F2) änderten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Jungtiere aus beiden Generationen (F1, F2) entwickelten

Glukosestoffwechselstörungen im Erwachsenenalter, trotz adäquater an die Kontrollgruppe angepasster Lebensbedingungen (49).

Hormonelle Regulation

Auch die Auswirkungen der fetalen Glukokortikoidexposition sind von großem Interesse und eine weitere Stellschraube innerhalb der vorgeburtlichen Entwicklungsabläufe. Es konnte eine fünffach höhere Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) Konzentration im Nabelschnurblut von wachstumsretardierten Neugeborenen gemessen werden. Dies spricht für eine Überfunktion der fetalen Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse). Die Überfunktion der HPA-Achsen Aktivität scheint bis ins Erwachsenenalter zu persistieren und dauerhaft die Empfindlichkeit der Organe gegenüber Kortisol zu erhöhen. Diese Effekte zeigen eine hohe Geschlechtsspezifität, jedoch widersprechen sich die Studien diesbezüglich (34) (50). Es stellt sich die Frage, ob die erhöhte Kortisolsensitivität Einfluss auf die Entwicklung einer pathologischen Insulinresistenz nimmt. Viele Merkmale des metabolischen Syndroms (z.B. Insulinresistenz, Hypertonus) sind auch bei der Cushing-Krankheit zu finden und stehen beispielhaft für die antagonistische Wirkung von Insulin und Kortisol auf den Blutzuckerspiegel (51). Nicht zuletzt wegen solcher Zusammenhänge wird die HPA-Achse als Angriffsort für die fetale Prägung der Insulinresistenz im Erwachsenenalter diskutiert (52). In einem Rattenexperiment konnte gezeigt werden, dass intrauterine Proteinmangelernährung nicht nur die zirkadiane ACTH-Sekretion, sondern auch die Reaktion der Nebenschilddrüse auf ACTH verändert. Nicht nur die Kortisonkonzentration, sondern auch die Rezeptordichte der Organe determiniert die Kortisonwirkung (34). Glukokortikoide induzieren die Expression zahlreicher Gene, welche für die optimale Organogenese während des fetalen Lebens von Bedeutung sind. Jedoch beginnt die fetale Nebenniere mit der Kortisolproduktion erst in den späten Schwangerschaftswochen, zu diesem Zeitpunkt ist die Organogenese größtenteils abgeschlossen. Daraus kann geschlossen werden, dass der Fetus auf mütterliches Kortisol angewiesen ist. Dessen Transport über die Plazenta wird über die 11- β -HSD2-Aktivität reguliert. So weisen Plazenten unter Proteinmangelversorgung eine verminderte 11- β -HSD2-Aktivität auf, wodurch das mütterliche Kortisol vermehrt die Plazenta passieren kann. Diese vermehrte fetale Kortisolkonzentration verändert den Sollwert der fetalen HPA-Achse (53). Eine starke Evidenz dafür kommt aus

pharmakologischen Studien. Mit dem synthetisch hergestellten Glukokortikoid Dexamethason (DEX) und dem β -HSD2-Inhibitor Carbenoxolon (CBX) konnte demonstriert werden, dass pränatale CBX-Behandlung das Geburtsgewicht reduziert und die Ratten Symptome des metabolischen Syndroms entwickelten (34). Auch die Expression von glukokortikoidempfindlichen Genen, wie zum Beispiel das der hepatische Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) oder das der hepatischen Glukokortikoidrezeptoren, werden durch Dexamethasongabe in der Spätschwangerschaft erhöht (54). Die PEPCK kann als Schlüsselenzym der Glukoneogenese die hepatische Glukosebereitstellung erhöhen und somit eine diabetische Stoffwechsellage begünstigen (55). Neben Glukokortikoiden ist die PEPCK auch Angriffspunkt für andere regulierende Hormone oder Moleküle, zum Beispiel für Glukagon, Insulin, γ Interferon und Retinsäure (56). Zusammenfassend kann man davon ausgehen, dass Glukokortikoide einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf den Glukosestoffwechsel haben.

Genetische Manipulation

Der Forschung steht derzeit ein beträchtliches Reservoir genetisch manipulierter Tiere zur Verfügung. Diese werden vor allem in Studien eingesetzt, welche die Auswirkungen bestimmter Gene im Fokus haben. Auf dem Gebiet der fetalen Programmierung von Glukosestoffwechselstörungen finden insbesondere Mäuse mit einem gezielten IGF-1-, IGF-2-, IRS-1-Knockout oder dem Knockout eines gewebespezifischen Insulinrezeptors häufig Verwendung. Aber auch Mäuse mit Störungen in der HPA-Achse werden genutzt, um die Mechanismen der fetalen Programmierung zu ergründen.

Auch das der Arbeit zugrunde liegende Mausmodell basiert auf genetisch manipulierten Mäusen. Es soll der Einfluss eines mütterlichen bzw. väterlichen heterozygoten eNOS-*Knockouts* auf den Phänotyp der Wildtyp Nachkommen untersucht werden. Tiermodelle, bei denen ausschließlich die Effekte des elterlichen Genotyps auf den Nachwuchs betrachtet werden, kommen bisher verhältnismäßig selten vor. Es konnte bereits mittels eines solchen Modells die Auswirkung mütterlicher Hypercholesterinämie auf die Gefäßreagibilität der Nachkommen dargestellt werden. Die Gefäßreagibilität der heterozygoten Nachkommen verschlechterte sich unter dem intrauterinen Einfluss eines hohen mütterlichen Cholesterinspiegels. Der hohe mütterliche Cholesterinspiegel wurde durch ein gezieltes homozygotes Knockout des *Low density Lipoprotein* (LDL)

verursacht (57). Auch heterozygote Nachkommen homozygoter eNOS-Knockout Mäuse entwickelten eine abnorme Gefäßreagibilität und wiesen kleinere Geburtsgewichte auf (58) (59). Diese Form der Tiermodelle erlaubt jedoch keine eindeutige Zuordnung des fetalen Phänotyps zum maternalen oder paternalen Genotyp, da bei diesen Modellen auch die Nachkommen homozygot oder heterozygot für den Knockout waren. Bei dem Tiermodell, das dieser Arbeit zu Grunde liegt, werden daher nur Nachkommen berücksichtigt, die den elterlichen Knockout nicht geerbt haben. Dieses bisher selten angewandte Modell soll untersuchen inwieweit ein elterlicher heterozygoter Knockout Auswirkungen auf das intrauterine Milieu hat und somit fetale Programmierungseffekte induziert.

Epigenetik

Fetale Programmierung wird als adaptive Antwort des Fetus auf seine vorgeburtliche und frühe nachgeburtliche Umwelt verstanden. Mittlerweile nimmt die Epigenetik eine zentrale Rolle unter den Erklärungsmodellen ein. Über epigenetische Prozesse können solche frühen Erfahrungen langfristig im Genom konserviert werden. Oft bezeichnet man das Epigenom als zweiten Code, da es die Genfunktion durch gezieltes an- und ausschalten der Gene festlegt. Diese Genregulation erfolgt durch Chromatinmodifikation, DNA-Methylierung, Acetylierung von Histonen, Imprinting und X-Inaktivierung (60). Am besten untersucht sind derzeit die Methylierung von Cytosinen, aber auch die posttranslationale Modifikation der Histone durch Phosphorylierung, Acetylierung, Ubiquitinierung und Methylierung gehören zu den wichtigen epigenetischen Modifikationsmöglichkeiten. Die DNA-Methyltransferasen sind Enzyme, die die Methylierungsprozesse katalysieren und stehen daher im Interesse der aktuellen Forschungen (61). Derzeit sind zwei wichtige Reprogrammierungsphasen bei Säugetieren bekannt. Das sind die Phasen der Gametogenese, vor allem wichtig für das genomische Imprinting, und die frühe Embryonalphase. In beiden Phasen kommt es zu einer erhöhten Demethylierungs- und Remethylierungsaktivität mit der Folge einer langfristigen Festlegung der Genaktivität. Aber auch in späteren Lebensphasen kommt es zu Veränderungen des Epigenoms (62). Für den ungestörten Ablauf dieser Prozesse ist eine ausreichende Verfügbarkeit von Vitamin B₁₂, Folsäure und der Aminosäure Methionin wichtig (38). Beispielhaft für die Steuerung des Phänotyps durch das Epigenom und den Auswirkungen eines intrauterinen Substratmangels steht das

Agouti-Maus Experiment. Bei der Agouti-Maus konnte durch die Folsäure-, VitaminB₁₂- und der Cholinzufuhr der werdenden Mütter die Fellfarbe ihrer Nachkommen verändert werden. War die Zufuhr der drei Substrate hoch waren die Nachkommen schlank, gesund und hatten eine dunkle Fellfarbe. War die Zufuhr der Substrate niedrig neigten die Nachkommen zu Fettleibigkeit, waren krankheitsanfällig und hatten eine gelbliche Fellfarbe. Gleichzeitig wurde bei den Nachkommen der Agouti-Mäuse ein verändertes Methylierungsmuster des für die Fellfarbe verantwortlichen Gens aufgezeigt (63). Derzeit wird davon ausgegangen, dass epigenetische Markierungen an die nächsten Generationen vererbt werden können. Die Weitergabe epigenetischer Muster erfolgt nach heutigem Kenntnisstand generationsübergreifend, geschlechtsspezifisch und ist abhängig davon von welchem Elternteil eine epigenetische Modellierung weitergegeben wurde (64). Da die Epigenomforschung noch am Anfang ihrer Entwicklung steht dürfte ihr Erkenntnispotential längst nicht ausgeschöpft sein. Es ist daher anzunehmen, dass mit der weiteren Entschlüsselung des epigenetischen Codes die Chancen die Phänomene der fetalen Programmierungsprozesse aufzuklären wachsen.

1.3 Die Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS)

Von den Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) sind derzeit drei verschiedenen Isoformen bekannt. Die neuronale NOS (nNOS, NOS I), die induzierbare NOS (iNOS, NOS II) und die endotheliale NOS (eNOS, NOS III). Die Namensgebung geht auf das Gewebe zurück, indem sie zuerst entdeckt wurden. Inzwischen ist bekannt, dass sie auch in anderen Geweben vorkommen. Diese drei Isoformen werden auf unterschiedlichen Genen kodiert, was ein selektives Ausschalten möglich macht. Alle drei Isoformen katalysieren die Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin. Hierbei entsteht unter Verbrauch von Sauerstoff, mehreren Kofaktoren und NADPH das gasförmige Stickstoffmonoxid (NO). Bevor es zu dieser Reaktion kommen kann, muss die NOS an das Regulatorprotein Calmodulin (CaM) binden. Bei der eNOS und der nNOS verlangt diese Bindung eine erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration, während die iNOS unabhängig von der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ist (65). Als vierte Isoform wird die mtNOS beschrieben, die in den Mitochondrien vorkommt und den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch, das Zellwachstum und die Apoptose reguliert. Da es sich um eine Splicingvariante der nNOS handelt, wird die Einordnung als vierte Isoform derzeit kontrovers diskutiert (66).

Die eNOS wird vornehmlich von Gefäßendothelzellen exprimiert. Durch die gefäßdilatorische Wirkung von NO spielt dieses Enzym eine zentrale Rolle in der Blutdruckregulation und der Endothelfunktion. Die NO-Synthese wird durch endotheliale Scherkräfte, inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone oder bakterielle Endotoxine stimuliert (67) (68). NO aktiviert die Guanylatzyklase, was über den cGMP-Anstieg zur Relaxation der Gefäßmuskelzellen führt (65). Neben der gefäßerweiternden Wirkung des Stickstoffmonoxids verhindert es auch die Thrombozytenaggregation und das Einwandern von Leukozyten in die Gefäßwände (69). In der Schwangerschaft wird die eNOS in der Plazenta von den Syncytiotrophoblasten und von den Endothelzellen der primitiven villösen Kapillaren exprimiert. Die Konzentration steigt bis zur Mitte der Schwangerschaft an und bleibt dann im Verlauf der Schwangerschaft konstant (70).

Die iNOS (NOS II) wird unter anderem von Leukozyten gebildet und ist die vorherrschende Form in der Plazenta. Ihre Aktivität steigt fortwährend an und erreicht in der Mitte der Schwangerschaft ihren Höhepunkt (71).

1.4 Pathophysiologie von eNOS-Knockout Mäusen

Mäuse mit homozygoten Defizit im eNOS-Gen sind in der Regel hyperten (72). Dies konnte eindrucksvoll durch Bubikat et al. demonstriert werden. Homozygote eNOS-Knockout Mäuse hatten einen durchschnittlichen systolischen Blutdruck von 135 ± 15 mmHg im Vergleich zu WT Mäusen mit einem durchschnittlichen systolischen Blutdruck bei 107 ± 8 mmHg (73). Zudem zeigen homozygote eNOS-Knockout Mäuse Defizite bei der Angiogenese und Arteriogenese, was auf die fehlende antiproliferative Wirkung des Stickstoffs auf die glatten Gefäßmuskelzellen zurückgeführt wird (74). Eine der einflussreichsten Pathomechanismen bei der Entstehung der Arteriosklerose und der arteriellen Hypertonie ist die endotheliale Dysfunktion. Die mangelnde Verfügbarkeit von NO spielt wiederum bei der endothelialen Dysfunktion eine wichtige Rolle. Die unzureichende NO-Verfügbarkeit führt zu einer erhöhten Expression des endothelialen P-Selektin. Dies wiederum verbessert die Leukozytenhaftung an der endothelialen Gefäßoberfläche. Die Leukozytenhaftung und Einwanderung der Leukozyten in die Gefäßwand sind wichtige Pathomechanismen bei der Entstehung der Arteriosklerose (69). Auch die Thrombozytenaggregation wird unter NO-Mangel erleichtert und führt zu einer erhöhten Koagulierbarkeit des Blutes und erhöht somit die Thrombosegefahr (75).

In der Lunge beugt NO der Bildung einer pulmonalen Hypertonie und der damit verbundenen rechtsventrikulären Hypertrophie vor (76).

Neben der vielzähligen direkten Wirkungen auf das Gefäßbett, zeigt NO eine Reihe weiterer wichtiger systemischer Funktionen. NO ist zum Beispiel für Wachstum und Differenzierung der braunen Fettzellen von Bedeutung. Die braunen Fettzellen sind relevant für die Thermogenese und den Energiestoffwechsel (77). Hypertonie, Arteriosklerose und eingeschränkte Gefäßreagibilität sind auch die zugrunde liegenden Mechanismen für die erhöhte Anfälligkeit der eNOS-defizienten Maus für Schlaganfälle (78). Interessanterweise konnten Studien an eNOS-defizienten Mäusen zeigen, dass NO maßgeblich an der Regulation des Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsels beteiligt ist (79) (80) (81). NO erhöhte den Glukosestoffwechsel der insulinempfindlichen Organe (Leber, Muskel, Fett) unter anderem über das Hochregulieren der GLUT-Transporter während NO-Mangel die Insulinresistenz erhöhte (82) (81). Ebenfalls beispielhaft für die Bedeutung von NO bezüglich des Glukosestoffwechsels stehen Mäuse mit einer erhöhten Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase Aktivität (DDAH). DDAH metabolisiert asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA), welches wie N_γ-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) im Organismus physiologisch vorkommt. Bei beiden handelt es sich um Inhibitoren der NO-Synthese. Demzufolge weisen Mäuse mit einer erhöhten DDAH-Aktivität höhere NO-Spiegel auf (83). Interessanterweise zeigen die Mäuse mit einem erhöhten NO-Spiegel auch eine erhöhte Insulinempfindlichkeit (84).

Bei den beschriebenen Veröffentlichungen wurde jedoch ausschließlich mit homozygoten eNOS-KO Mäusen gearbeitet. Veröffentlichungen die sich mit dem Phänotyp heterozygoter eNOS-KO Mäuse beschäftigten deuten daraufhin, dass der heterozygote Knockout unter basalen Bedingungen keine wesentliche Beeinträchtigung der Körperphysiologie zur Folge hat. Lediglich unter erschwerten Bedingungen mangelt es an Kompensationsmöglichkeiten (85). Nur für die Aufrechterhaltung eines normalen Lungendrucks scheinen mehr als 50% der eNOS-Aktivität von Nöten zu sein (86).

1.5 Stickstoffmonoxid und Schwangerschaft

Der Vasodilatator Stickstoffmonoxid ist während der Schwangerschaft an der Regulation der Plazentadurchblutung, der Throphoblasteninvasion an Apoptoseprozessen sowie an der Entwicklung des Plazentagefäßbettes beteiligt (87) (88). Intrauterine Wachstumsretardierung, Gestationsdiabetes und Präeklampsie sind

mit Dysfunktionen des vaskulären Gefäßbettes assoziiert (89). NO reguliert dabei nicht nur den uteroplazentaren Blutfluss, sondern auch die Vaskulogenese und Angiogenese der entstehenden Plazenta (90). Die genauen Mechanismen sind allerdings noch nicht vollständig verstanden. Im Mausmodell konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass bei homozygoten eNOS-KO Müttern der uteroplazentare Blutfluss, der Durchmesser der A. uterina und die Länge der Spiralarterien reduziert waren. Zusätzlich konnte man einen signifikanten Blutdruckanstieg bei den Nachkommen darstellen (91). Da bei diesen Studien ausschließlich mit homozygoten Knockout Mäusen gearbeitet wurde waren auch deren Nachkommen heterozygot für das eNOS-Gen. Somit kann ein Einfluss des kindlichen Knockouts auf die beschriebenen pathophysiologischen Veränderungen bei den Nachkommen nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Wird die NO-Synthese der trächtigen Maus durch NOS-Inhibitoren oder durch einen iNOS-Knockout gehemmt, führt dies zu einer IGUR und einer erhöhten perinatalen Mortalität (92). Die gleichen Effekte kann man bei mütterlichen Argininmangel (essentielle Aminosäure der NO-Synthese) beobachten. Erhöhte Argininingabe wiederum kann fetale Wachstumseinschränkung, verursacht durch Hypoxie oder NOS-Inhibitoren, aufheben (93). Verminderte NO Verfügbarkeit führt vor allem in der Spätschwangerschaft zu Wachstumseinschränkungen (92) (58). Zusammenfassend weisen die vorliegenden Arbeiten darauf hin, dass die eNOS an der Regulation des utero-plazentaren Blutflusses maßgeblich beteiligt ist, wobei der genaue Mechanismus noch nicht hinreichend verstanden ist.

1.6 Programmierung von Glukosestoffwechselstörungen und Pankreasmorphologie

Im Tiermodell konnten die höchsten β -Zellreplikationsraten in der späten Schwangerschaft gemessen werden (94). Nachgeburtlich nimmt die Wachstumsrate der β -Zellen stetig ab und im Erwachsenenalter ist die Mitoserate der β -Zellen sehr gering (95). Während des Abstillens der Ratten in der zweiten bis dritten Lebenswoche kommt es unter den β -Zellen zu einer Apoptosewelle. Da sich jedoch die Gesamt- β -Zellmasse nicht wesentlich verändert, liegt es nahe, dass auch die Neogenese zu diesem Zeitpunkt hoch ist und somit der Verlust ausgeglichen wird (96). Diese Beobachtungen sind gut vereinbar mit der Erkenntnis, dass gerade intrauterine Mangelernährung in der späten Schwangerschaft das Risiko an Glukosestoffwechselstörungen zu erkranken,

erhöht (97). Diese sogenannte Remodellierungsphase bringt auch einen anderen β -Zelltyp hervor. Die neue β -Zellpopulation reagiert empfindlicher auf Glukose als die fetalen β -Zellen, welche empfindlicher auf Aminosäuren reagieren und weniger empfindlich auf Glukose (98). Wurde der Fetus einer globalen Nährstoffreduktion ausgesetzt, zum Beispiel durch beidseitige Ligatur der A. uterina, kam es zu einer Reduktion des gesamten Pankreasgewebes. Innerhalb der Inselzellen verringerte sich nicht nur die β -Zellmasse, sondern auch die Anzahl der Inselorgane und die Insulinkonzentration in den β -Zellen und dem Blutplasma (99). Unter einer intrauterinen Proteinmangeldiät zeigten die Nachkommen eine Abnahme der β -Zellmasse und der Insulinkonzentration in den β -Zellen. Dies konnte mit einer erhöhten Apoptoserate der β -Zellen in Zusammenhang gebracht werden (100), während eine globale Nährstoffreduktion eher die zelluläre Neogenese reduzierte (99). Eine Proteinmangelernährung der trächtigen Ratte führte bei ihren Nachkommen auch zu einer Abnahme der β -Zellreaktion auf die Aminosäuren Taurin und Arginin (101). Taurin ist die am häufigsten vorkommende freie Aminosäure im Körper und wird über mehrere Zwischenschritte durch die Cysteinsulfinsäure-Decarboxylase synthetisiert (102). Die Bedeutung der Aminosäure Taurin ist vielseitig, unter anderem beeinflusst sie die β -Zellfunktion. Einige Arbeiten belegen die apoptoseverhindernde Wirkung von Taurin (103) (104). In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass sich unter prä- und postnataler Proteinmangelernährung die β -Zellsensitivität gegenüber NO und IL-1 erhöht. Man vermutet, dass diese Sensitivitätssteigerung der Grund für die verringerte β -Zellmasse ist, da NO und IL-1 beta die Apoptose dieser Zellen begünstigt. Taurin wiederum reduziert die apoptosesteigernde Wirkung von NO und IL-1 beta. Wurde das Trinkwasser der trächtigen Ratte mit Taurin angereichert, war die β -Zellreduktion der Nachkommen trotz prä- und postnataler Proteinmangelernährung weniger stark ausgeprägt (37).

Auch Zeitpunkt und Art der intrauterinen Nährstoffeinschränkung haben Einfluss auf die Pankreasmorphologie der Nachkommen. Im Rattenexperiment führte vor allem eine proteinarme Ernährung in der letzten Schwangerschaftswoche zu einem signifikanten Rückgang der β -Zellmasse bei den Nachkommen. Dieser Effekt konnte bei ausschließlich kalorienreduzierter Ernährung in der letzten Schwangerschaftswoche nicht beobachtet werden (105). Bei Ratten scheint somit das kritische Zeitfenster für die Entwicklung der β -Zellmasse in den letzten Schwangerschaftswochen zu liegen. Diese

nachteilige Entwicklung der Pankreasmorphologie konnte trotz adäquater postnataler Ernährung nicht vollständig kompensiert werden (105). Im Alter von acht Monaten führte die reduzierte β -Zellmasse der Rattennachkommen zu einer erhöhten Nüchternglukosekonzentration und einem um 40% reduzierten basalen Insulingehalt (106). Wird die isokalorische Proteinmangeldiät nachgeburtlich fortgesetzt, verringert sich nicht nur die β -Zellmasse und deren Insulingehalt, sondern dies führt auch zur Ausbildung kleinerer Inselorgane und zur Erhöhung der β -Zellapoptoserate in der postnatalen Remodellierungsphase (107). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Blutgefäßdichte des Pankreas unter intrauteriner Proteinmangelernährung sinkt (108). Auch die Affinität der β -Zellen gegenüber Glukose und Aminosäuren nimmt ab, was eine reduzierte Insulinsekretion zur Folge hat. Dieser Zusammenhang korreliert mit dem Aktivitätsverlust der mitochondrialen Glycerophosphatdehydrogenase (GPD) der β -Zellen (109). Bei der GPD handelt es sich um ein Enzym der Mitochondrienmembran. Dieses Enzym sorgt für die Bereitstellung des Substrats Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NAD^+). NAD^+ wird in der Glykolyse für die Herstellung des Hauptenergieträgers Adenosintriphosphat (ATP) verbraucht. Sinkt nun die NAD^+ Konzentration, sinkt auch die ATP-Konzentration. Die β -Zelle wiederum benötigt ausreichend ATP für eine suffiziente Insulinsekretion (110).

1.7 Mechanismen und Modelle von Pankreasentwicklungsstörungen

Noch sind die biochemischen und biomolekularen Mechanismen, welche die Veränderungen der endokrinen Pankreasmorphologie erklären, nicht vollständig verstanden. Derzeit gibt es jedoch verschiedene Erklärungsansätze, wie zum Beispiel die Abnahme der Stammzellzahl (111). Auch wird diskutiert, dass Wachstumsfaktoren (IGF-1, IGF-2, VEGF, Fibroblastenwachstumsfaktor 7) an einer dysfunktionalen Programmierung der β -Zell-Ontogenese beteiligt sind. Einen wichtigen Hinweis lieferte der Nachweis von Sequenzveränderungen bei Genen der IGF-Achse unter MODY-Diabetikern (*Maturity-onset Diabetes of the young*). Demzufolge könnten diese Wachstumsfaktoren einen Angriffspunkt für Programmierungseffekte der endokrinen Pankreasmorphologie darstellen (112). Diese Annahme wird durch die Erkenntnis gestützt, dass die physiologische Inselzellapoptosewelle bei neugeborenen Ratten zeitlich mit einem deutlichen Expressionsverlust von IGF-2 zusammen fällt. Somit scheint IGF-2 die Zelle vor der Apoptose zu schützen. Dies stimmt mit der Erkenntnis überein, dass eine vorgeburtliche Proteinmangelernährung, welche mit Verlust der IGF-

2 Expression einhergeht, zu einer verringerten β -Zellanzahl bei den Nachkommen führt (113). Einige Wissenschaftler postulieren, dass der Rückgang der IGF-2 Expression des Pankreas Folge eines Aminosäuredefizits unter pränataler Proteinmangelversorgung sein könnte. Vorrangig diskutiert wird dabei der schon erwähnte Taurinmangel. Auch wenn Taurin nicht zu den essentiellen Aminosäuren gehört, werden doch andere essentielle Aminosäuren für dessen Biosynthese benötigt. Der Grund dafür, dass gerade ein Taurinmangel mit dem β -Zellverlust in Zusammenhang gebracht wird, liegt darin begründet, dass eine Taurin-Supplementierung diesen β -Zellverlust sowie die Abnahme der IGF-2 Expression verringert (114). Taurin scheint auch eine Rolle bei der Vaskularisation zu spielen, da diese trotz prä- und postnataler Proteinmangelernährung durch Tauringabe deutlich verbessert wird (115).

Die endokrine Pankreasmorphologie wird auch durch mütterliche Glukokortikoide beeinflusst. Hohe maternale Glukokortikoidkonzentrationen resultierten in einer Abnahme der fetalen β -Zellmasse. So konnte bei unterernährten trächtigen Ratten nach mütterlicher Adrenalectomie oder durch Gabe eines Glukokortikoidsynthese-Hemmers die fetale β -Zellmasse deutlich erhöht werden (116). Eine Dexamethasongabe während der letzten Schwangerschaftswochen wiederum verringerte die fetale β -Zellmasse und deren Insulingehalt (117).

Bemerkenswert sind die transgenerationalen Effekte. Es konnte gezeigt werden, dass auch die Nachkommen der ehemals intrauterin mangelernährten Mütter eine verringerte β -Zellanzahl, eine verringerte Inselzellanzahl und einen verringerten Insulingehalt der β -Zellen aufweisen (118).

2 Fragestellung

Die derzeit vorliegenden empirischen und tierexperimentellen Daten auf dem Gebiet der fetalen Programmierung können letztlich noch keine Kausalität der untersuchten Zusammenhänge liefern. Zumal die biochemischen und biomolekularen Mechanismen noch nicht lückenlos verstanden sind. Durch die Arbeitsgruppe um Prof. Hocher wurde ergänzend das elterliche Genom in den wissenschaftlichen Diskurs der fetalen Programmierung eingebracht. Denn es konnte gezeigt werden, dass mütterliche Gen-Polymorphismen auch wenn diese nicht an die nächste Generation vererbt werden, das kindliche Geburtsgewicht und damit, im Sinne des Konzepts der fetalen Programmierung, das spätere Krankheitsrisiko beeinflussen (22). Somit ist anzunehmen, dass nicht nur die vorgeburtliche Nährstoffverfügbarkeit, sondern auch das mütterliche Genom eine wesentliche Determinante des kindlichen Geburtsgewichtes darstellt und somit die fetalen Reifungsbedingungen beeinflusst. Um den Einfluss des mütterlichen Genoms auf die vorgeburtlichen Reifungsbedingungen deutlich zu machen, wurde die *Advanced Fetal Programming* Hypothese formuliert (23). Mit dem der Arbeit zu Grunde liegenden standardisierten Tierversuch (Mausmodell) soll diese Hypothese überprüft werden. Diesbezüglich wird der Einfluss eines mütterlichen bzw. väterlichen heterozygoten eNOS-Knockout auf den Phänotyp der Wildtypnachkommen untersucht. Es wird, im Sinne der *Advanced Fetal Programming* Hypothese angenommen, dass die Veränderung des elterlichen eNOS-Gens einen Effekt auf die Organmorphologie und Organfunktion ihrer Nachkommen hat, obwohl diese den *Knockout* der Eltern nicht geerbt haben. Hierzu wurden ausschließlich WT-Nachkommen miteinander verglichen. Die Tiere unterschieden sich lediglich hinsichtlich des Genotyps ihrer Eltern. Darüber hinaus werden Geburtsgewichte, Wachstumsverhalten, Blutdrücke, Organgewichte und Glukosestoffwechselfparameter der Nachkommen untersucht. Dies dient der Aufdeckung einer intrauteriner Wachstumsretardierung und der damit in Zusammenhang gebrachten metabolischen, physiologischen und morphologischen Veränderungen (21) (119).

Für das Experiment wurde ein eNOS-KO gewählt, da die endotheliale NO-Synthase (eNOS) eine wesentliche Rolle bei der Ausbildung des plazentaren Gefäßbettes spielt und somit die NO-Verfügbarkeit indirekt die Nährstoffversorgung des Fetus moduliert (120). Auch die Tatsache, dass Genpolymorphismen im eNOS-Gen beim Menschen bekannt sind und mit pathologischen Schwangerschaftsverläufen, kardiovaskulären

Erkrankungen und Diabetes mellitus in Verbindung gebracht werden macht es zu einem interessanten Zielgen (121). Um konsekutive Programmierungseffekte darzustellen, wurden in diesem Experiment verschiedene Organe (Herz, Niere, Leber, Pankreas) und Stoffwechselprozesse der Wildtypmäuse systematisch biochemisch, molekularbiologisch und histologisch aufgearbeitet.

Der Schwerpunkt dieser Promotionsarbeit liegt auf den Veränderungen bezüglich des Glukosestoffwechsels und der histologischen Aufarbeitung des Pankreas. In zahlreichen vorausgegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sich die fetale endokrine Pankreasmorphologie und -funktion unter intrauteriner Nährstoffreduktion verändert und diese Veränderungen das Risiko an Glukosestoffwechselstörungen zu erkranken lebenslang erhöhen (99) (105). Die Arbeit soll helfen die fetale Programmierung von lebenslangen Krankheitsrisiken besser zu verstehen. Die Ergebnisse dieses Forschungsbereichs nehmen schon heute Einfluss auf die Perinatal- und Präventivmedizin und implizieren noch unabsehbare Möglichkeiten in der primären Prävention.

3 *Material und Methoden*

3.1 *Geräte und Chemikalien*

3.1.1 *Technische Geräte*

Stoffwechselkäfige für Mäuse, Buguggiate, Techniplast, Italien

Mikrotom Jung RM 2025, Leica, Nussloch

Magnetrührergerät MR 2000 Heidolph

Nicht-invasives Blutdruckmessgerät mit Pulsaufnehmer, AD Instruments

Druck- und Pulseinheit, LE 5007, Letitia Scientific Instruments

Paraffinautomat Microm EC-350, Thermo Scientific

Digitalkamera CFW-1310C, Scion Corporation

Digitalkamera CWF 1310C mit Programm Scion Visicapture Application Version 1.0, USA

Gelelektrophoresekammer Agagel Midi Wide, Biometra

Kühlplatte Microm EC-351, Thermo Scientific

Notebook Dell XPS M1330
Mikroskop BH2, Olympus
Präzisionswaage SBC 22 Scaltec, Göttingen
Kompaktwaage BL 600, Sartorius, Göttingen
Präzisionquarzküvette Suprasil, Hellma, Müllheim
pH Meter, Welheim
Thermocycler T3, Biometra
Spannungsquelle Standart Power Pack 25 , Biometra Göttingen
Vortexer Lab dancer, IKA
Gefrierschrank G2713, Liebherr
Tischzentrifuge 13, Heraeus
Wasserbad und Wärmeplatte 16800, Medax Nagel GmbH
Wärmeschrank ST6030, Heraeus
Ausbettvorrichtung, Microm EC 350, Walldorf, Deutschland
Einbettvorrichtung, Shandon Citadel 1000, Thermo Scientific, Deutschland
Eppendorf-Pipetten, Hamburg
Mikrohämatokrit Kapillare, Brand
Spektrophotometer für Mikrotiterplatten, BioRad, Hercules,USA
Power Macintosh 7500/100, Apple Macintosh
Dampfgarer Multigourmet plus, Braun

3.1.2 Chemikalien

Tierhaltung

Altromin 1320 Standardfutter
Altromin 1310 Standardfutter für stillende und trächtige Tiere
Isofluran Forene, Abbott

Einbettung und HE- Färbung

Xylol J.T. Baker
Ethanol 100%, Carl Roth
Aqua bidest, Braun
Mayers Hämalaun, Merck

Salzsäure 37%, Merck

Eosin, Carl Roth

Formaldehydlösung 37% Baker

Natriumchlorid, Carl Roth

Paraffin Typ 6, Richard-Allan- Scientific

Paraffin Typ 9, Richard-Allan- Scientific

Depex Serva Electrophoresis GmbH

PBS-Puffer: 8g NaCL, 0,2g KCL, 1,15g Dinatriumphosphat, 0,2g

Kaliumdihydrogenphosphat pH-7,4

APES (3-Aminopropyltriethoxysilan)

Genotypisierung

NaCL-Lösung, Carl Roth

Primer: Neo R2 ase 5'ACAAGACCGGCTTCCATCCG3' TIB Molbiol GmbH

Primer: Neo R2 se 5'TTGTC AAGACCGACCTGTCC3' TIB Molbiol GmbH

Primer: eNOS-WT 3 (DD) 5'AGGACATATGTTTGTCTGCGG 3' TIB Molbiol GmbH

Primer: eNOS-WT 4 (DD) 5'CTGAGGACTGCACCTGTTCA 3' TIB Molbiol GmbH

TE-Puffer : 1,21g Tris, 8g NaCL, 1l Aqua bidest, 1ml Tween, pH 7,6

K-Puffer: 0,932g KCL, 0,302g TRIS, 0,127g MgCL, 0,25l Aqua bidest, pH-8,3

Lysis-Puffer: 985µl K-Puffer, 10µl Proteinase K, 5µl Tween 20

TBE-Puffer: Tris 10,8 g/l, Borsäure 5,5 g/l, EDTA 0,5 mM 0,4 ml

Ladepuffer: Bromphenolblau 0,25% , Ficoll Typ 400

PCR Puffer: Gene Amp., Applied Biosystems

dNTPs Gene Amp., 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) Applied Biosystems

Immunhistologie

TBS (Waschpuffer): 6,057g Tris, 8,76g NaCl, 1l Aqua dest., 1ml Tween, pH-Wert 7,4

Tris-EDTA-Puffer: 1,21g Tris, 0,37g EDTA, 0,5ml Tween, 1l Aqua dest., pH-Wert 9

PBS-Puffer: 8g NaCL, 0,2g KCL, 1,15g Na₂HPO₄, 0,2g KH₂PO₄. 1l Aqua dest., pH-Wert 7,4

TBS-BSA: 200ml TBS+0,2-2g BSA

Dako ChemMate, Antikörper Diluent CodeNo S2022

DakoCytomation Liquid DAB+Substrat Chromogen System K3467

30% iges H₂O₂

Aqua bidest, Braun

Mayers Hämalaun, Merck

Primärantikörper: anti-Insulin ab7842, Abcam Limited

Sekundärantikörper: anti-IgG ab 6907 Abcam Limited

Sonstiges

Glukosereagenz Sigma, Aldrich, Steinheim

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Einbettkassette, Histosette, Simport

Deckgläser 18x18mm, Menzel

Mikrotom Blade R35, Feather

Objektträger Superfrost, Menzel Gläser, Braunschweig

3.1.4 Software

Image J 1.37v, Shareware des National Institutes of Health, USA

Software SPSS Version 21.0, SPSS, USA

AD Instruments, Power Lab (RR-Messung)

Chart and Scope Version 4.4.1, AD instruments (RR-Messung)

GraphPadprism Version 5

3.2 Tiere und Tierhaltung

3.2.1 Versuchstiere

Im Rahmen des Versuchs wurden männliche, homozygote eNOS-Knockout (KO) Mäuse der C57BL/6 Linie mit entsprechenden weiblichen C57BL/6 Wildtyp Mäusen verpaart. Diese transgenen Tiere stammen von Prof. Axel Gödecke (Heinrich-Heine Universität Düsseldorf) und wurden unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

Um diese homozygote eNOS-KO-Linie zu etablieren, wurden embryonale Mausstammzellen gewonnen und ein das Zielgen ausschaltender Zielvektor eingeschleust. Bei dem inaktivierten eNOS-Gen handelt es sich um die NADPH Bindungsstelle der NO-Synthase im Exon 24 und 25. Der Zielvektor enthielt zwischen zwei längeren DNA-Fragmenten, die dem Zielgen homolog waren, eine eingeführte DNA-Sequenz mit integrierter Neomycin Resistenz, die auf der einen Seite das Zielgen ersetzte und zum anderen eine positiv-negativ Selektion durch die erworbene Neomycin (Antibiotikum)-Resistenz möglich machte. Der Zielvektor wurde anschließend *in vitro* durch homologe Rekombination in die Mausstammzellen eingeschleust. Nach Zugabe von Neomycin zum Kulturmedium vermehrten sich nur die Zellen, bei denen das Zielgen inaktiviert wurde und durch das Neomycinresistenzgen ersetzt wurde. Die so veränderten Stammzellen wurden in einen frühen Mäuseembryo (Blastozysten-Stadium) injiziert und weiblichen Mäusen implantiert, diese entwickelten sich zu Mosaik-Mäusen (Chimären) und wurden ausgetragen. Man spricht bei der ersten Generation gentechnisch veränderter Tiere von Mosaik-Tieren bzw. Chimären, da die veränderten Stammzellen in einem Mehrzellstadium befindliche Eizelle übertragen wurde, und die hervorgehenden Nachkommen aus einem Gemisch gentechnisch veränderter und nicht gentechnisch veränderter Zellen entstehen. Da diese Mäuse nun auch Keimzellen mit dem eNOS-Knockout (eNOS-KO) enthalten, verpaarte man sie mit Wildtypmäusen und erhielt unter anderem heterozygote eNOS-KO Mäuse. Werden diese untereinander verpaart, gehen aus dieser Verpaarung auch homozygote eNOS-KO Mäuse hervor und diese wurden dann für unsere Versuchstierkreuzung verwendet (122).

3.2.2 Kreuzungsschema

Die männlichen homozygoten eNOS-KO Mäuse wurden mit weiblichen Wildtypen (F0-Generation) verpaart, um ausschließlich heterozygote eNOS-KO Mäuse zu erhalten. Diese heterozygoten eNOS-KO Mäuse (F1-Generation) wurden nun mit den jeweils anders geschlechtlichen Wildtypen gekreuzt. In der mitgeführten Kontrollgruppe wurden männliche und weibliche Wildtypen miteinander verpaart. Die Nachkommen dieser Verpaarung (F2-Generation) sind sowohl Wildtypen als auch heterozygote eNOS-KO Mäuse. Für die Erhebung der nachfolgenden Daten wurden ausschließlich Wildtypen berücksichtigt (vgl. Abbildung 3), welche aufgrund des Genotyps ihrer Eltern in drei Gruppen eingeteilt wurden.

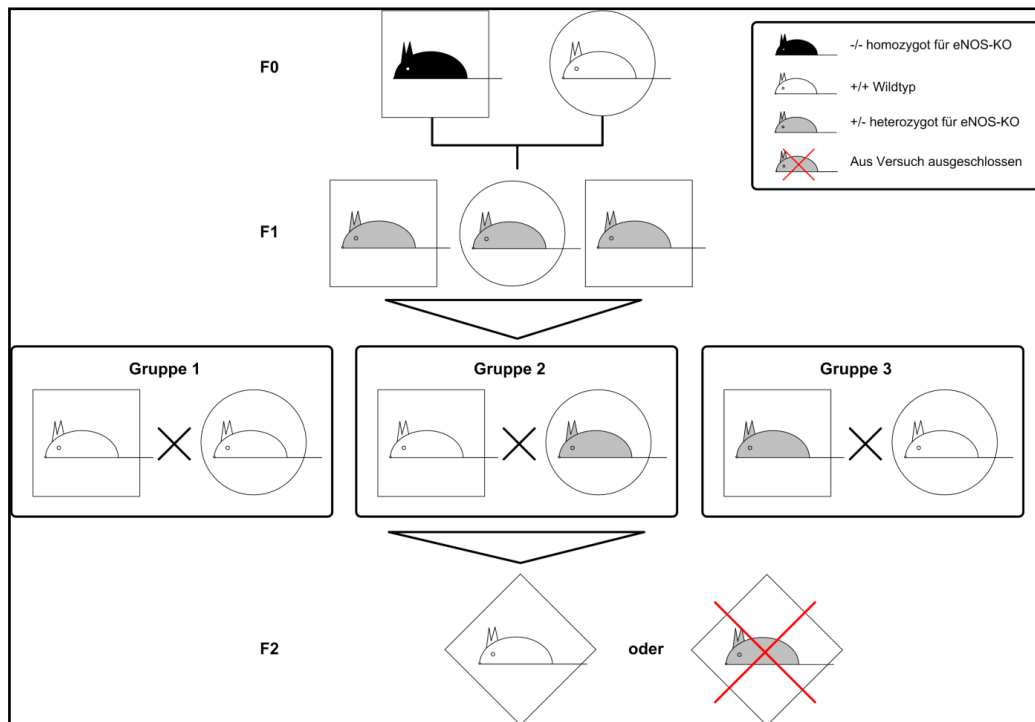


Abbildung 3: Kreuzungsschema

- Gruppen:**
- | | |
|----------|---------------------------------------|
| 1: WT F2 | Vater WT / Mutter WT (Kontrollgruppe) |
| 2: WT F2 | Vater WT / Mutter +/- |
| 3: WT F2 | Vater +/- / Mutter WT |

3.2.3 Tierhaltung

Die Tierhaltung und Züchtung erfolgte im Tierstall des Instituts für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität Berlin durch Mitarbeiter (Tierärzte und Biotechnologen) der Arbeitsgruppe um Prof. Hoher. Pro Käfig wurden maximal 6 Tiere gehalten, Mütter und ihre Jungtiere wurden von den anderen Tieren getrennt. Die Mäuse wurden unter artgerechten und standardisierten Umgebungsbedingungen gezüchtet und aufgezogen. Die Raumtemperatur wurde bei 20°C, die Luftfeuchtigkeit bei 46% konstant gehalten, die Lichtperiode war ebenfalls mit 12h (von 6:00 bis 18:00 Uhr) festgelegt. Die Mäuse wurden mit pelletiertem Standardfutter der Firma Altromin und Trinkwasser ad libitum versorgt. Die trächtigen und säugenden Tiere bekamen spezielles Zuchtfutter der Firma Altromin. Die Tierhaltung und Tierversuche entsprachen den strengen Standards des deutschen Tierschutzgesetzes und wurden

am 05.08.2004 von der Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales Berlin zugelassen (Genehmigungsnummer G0146/04).

3.3 Versuchsaufbau

Der Tierversuch wurde für 25 Wochen konzipiert und resultierte in der Tötung der Tiere und deren Organentnahme. Die Datenerhebung im laufenden Tierversuch und die Organentnahmen wurden von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe um Prof. Hocher geleistet. Die Auswertung der erhobenen Daten wie das Geburtsgewicht, die Organgewichte, das Wachstum und die Daten aus den Stoffwechselfersuchen wurden unter verschiedenen Fragestellungen von mehreren Promovenden vorgenommen. Mein Beitrag bestand aus der histologischen Bearbeitung des Pankreas und Auswertung der Stoffwechseldaten, mit Schwerpunkt auf den Glukosestoffwechsel. Der Tierversuch begann mit 150 Tieren, im Verlauf starben 14 Tiere und 2 Weitere konnten nicht eindeutig genotypisiert werden. Somit wurden insgesamt 134 Wildtypnachkommen der drei Verpaarungsgruppen in den Versuch eingeschlossen. Die Tiere wurden bis zu ihrem 40. Lebenstag täglich gewogen, anschließend bis fünf Wochen vor ihrem Tod nur noch wöchentlich. Die Körperlänge, gemessen von der Nasenwurzel bis zum Schwanzansatz, wurde bis zum 13. Lebenstag täglich bestimmt. Aus diesen Messdaten konnte der Body-Mass-Index (BMI) der ersten 13 Tage errechnet werden. Der systolische Blutdruck und die Herzfrequenz wurde in der 10., 14., 19. und 24. Lebenswoche mit der Tail-Cuff-Methode (vgl. Kap. 3.4.2) gemessen. Nüchternglukosebestimmung und Nüchterninsulinwerte (vgl. Kap. 3.4.4) wurden in der 13., 17. und 21. Woche bestimmt. In der 24. Woche erfolgte ein intraperitonealer Glukosetoleranztest (vgl. Kap.3.4.5). Um den 24h-Sammelurin der Mäuse zu gewinnen, wurden sie zu drei Zeitpunkten (Woche 12, 18 und 23) in einem eigens dafür konzipierten Stoffwechselkäfig (vgl. Kap. 3.4.3) gehalten.

Vor der Tötung wurden die Körpergewichte der Mäuse nochmal erfasst. Anschließend wurden folgende Organe entnommen, gewogen und sowohl für die weitere molekularbiologische als auch für die histologische Analyse aufgearbeitet: Herz, Lunge, Leber, Milz, Pankreasschwanz (wurde nicht gewogen), Niere, Aorta.

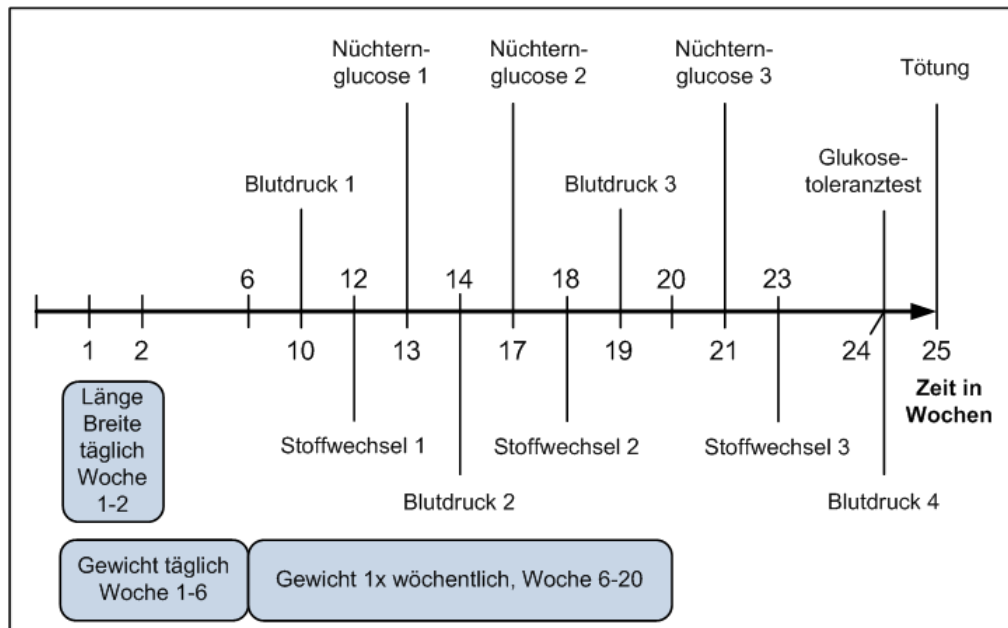


Abbildung 4: Versuchsablauf

3.4 Molekularbiologische und physiologische Messmethoden

3.4.1 Genotypisierung

Blutabnahme

In der sechsten bis achten Lebenswoche wurden die Mäuse genotypisiert, um sicherzustellen, dass die Versuchstiere aus der F2-Generation ausschließlich Wildtypen hinsichtlich der eNOS sind. Hierzu wurde nicht nur der eNOS-WT, sondern in einer DNA-Doppelbestimmung auch der eNOS-KO Typ nachgewiesen. Die Blutabnahme erfolgte unter Isofluraninhalationsnarkose aus dem retrobulbären Venenplexus. Das Blut wurde mit einer Hämatokritkapillare abgenommen und mit einer Spritze in ein Reaktionsgefäß (1,5ml und 0,5M EDTA beschichtet) ausgepustet, anschließend fünf Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert, die zellulären Bestandteile abpipettiert und mit 50µl 0,9%iger NaCl-Lösung versetzt. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei -20°C aufbewahrt.

DNA-Isolierung

Zur DNA-Isolierung wurden die Proben mit 500µl TE-Puffer gemischt, bei 13000 Upm 3 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 500µl TE-Puffer resuspendiert und nochmals bei 13000 Upm eine Minute zentrifugiert. Dieser Vorgang

wurde dreimal wiederholt. Das resultierende Pellet wurde abpipettiert und mit 100µl Lysis-Puffer resuspendiert um anschließend für 90 min bei 56°C inkubiert zu werden. Um die Reaktion zu stoppen wurde die Probe auf 95°C erhitzt, anschließend auf Eis gekühlt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

PCR

Um festzustellen, dass bei einer Maus ein eNOS-KO Allel vorliegt, musste mittels NeoR-PCR die Insertion der Neomycinkassette nachgewiesen werden. Dieser Nachweis erfolgte mit einem speziellen Primer der die Insertion erkennt und bindet. Das eNOS-WT Allel wurde ebenfalls mit speziellen Primer direkt nachgewiesen. In beiden Fällen muss zuerst durch PCR die DNA vervielfältigt werden, damit sie anschließend mit Hilfe der Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden kann.

Tabelle 1 beschreibt den Ansatz für die eNOS-WT PCR und Tabelle 2 den Ansatz für den eNOS-KO PCR. Der Ablauf der PCR ist für beide Nachweisverfahren gleich und wird in Tabelle 3 dargestellt.

Reagenz	Konzentration	Volumen pro Ansatz (µl)
Aqua ad. Inject. Steril	-	13,728
10xPCR-Puffer	-	2,2
MgCL2	25 mM	1,76
dNTPs (Mix)	2,5 mM	0,44
eNOS-WT 3 (Primer 1)	10 nmol/L	0,88
eNOS-WT 4 (Primer 2)	10 nmol/L	0,88
Taq DNA Polymerase	5 U/µl	0,132
Template	-	1,98
Total (Summe)		22

Tabelle 1: Reaktionsansatz für eNOS-WT PCR

Primer 1: eNOS-WT 3 (DD): 5'AGGACATATGTTTGTCTGCGG 3'

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

Reagenz	Konzentration	Volumen pro Ansatz (µl)
Aqua ad. Inject. Steril	-	13,728
10xPCR-Puffer	-	2,2
MgCL2	25 mM	1,76
dNTPs (Mix)	2,5 mM	0,44
NeoR2ase (Primer 1)	10 nmol/L	0,88
NeoR2se (Primer 2)	10 nmol/L	0,88
Taq DNA Polymerase	5 U/µl	0,132
Template	-	1,98
Total (Summe)		22

Tabelle 2: Reaktionsansatz für eNOS-KO PCR

Primer 1: NeoR2 ase: 5'ACAAGACCGGCTTCCATCCG 3'

Primer 2: NeoR2 se: 5'TTGTC AAGACCGACCTGTCC 3'

Ablauf	Temperatur	Dauer	Zyklen
Aktivierung	94°C		
Denaturierung	94°C	6 Minuten	
Annealing	60°C	30 Sekunden	
Elongation	72°C	2 Minuten	39x
Denaturierung	94°C	30 Sekunden	
Finales Annealing	65°C	30 Sekunden	
letzter Elongationsschritt	72°C	10 Minuten	
Lagerung	10°C	Bis zur Weiterverarbeitung	

Tabelle 3: Reaktionsablauf der PCR

Agarose - Gelelektrophorese

Um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wurde das PCR-Produkt auf ein 1,5%iges (TBE-Puffer) Agarose-Gel aufgetragen und eine Spannung von 100V für 30 min angelegt. Zuvor wurde die DNA-Probe mit einem Ladepuffer versetzt. Dieser Ladepuffer enthielt Bromphenolblau als Farbstoff und Glycerin um die Probe zähflüssiger zu machen. Diese Zähflüssigkeit sorgt dafür, dass die Probe nicht aus der Ladetasche fließt. Die resultierenden Banden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht. Das DNA-

Fragment der eNOS-WT PCR liegt bei 900 bp und das DNA-Fragment der eNOS-KO PCR liegt bei 275 bp. Aufgrund des geringeren Molekulargewichts wurde die Bande des eNOS-KO DNA-Fragments näher am positiven Pol der Elektrophoresekammer sichtbar und das eNOS-WT DNA-Fragment findet sich aufgrund des höheren Molekulargewichts näher beim negativen Pol ein. War nur die eNOS-WT Bande zu erkennen, lag ein WT vor. War nur eine eNOS-KO Bande erkennbar, lag dem ein homozygoter eNOS-KO (eNOS^{-/-}) zu Grunde, waren jedoch beide Banden erkennbar, handelte es sich um einen heterozygoten eNOS-KO (eNOS^{+/-}) Genotyp.

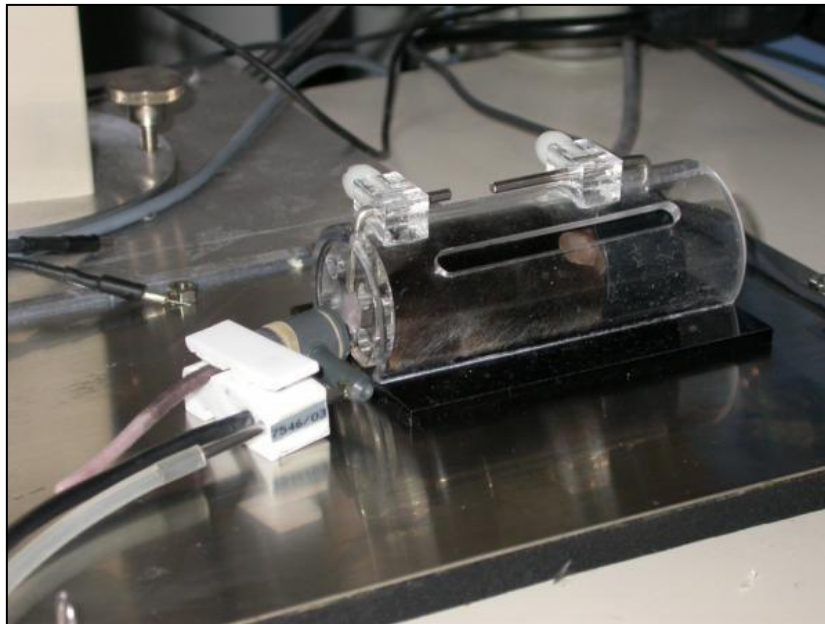


Abbildung 5: Tail-Cuff-Methode (123)

3.4.2 Blutdruckmessung

Die systolische Blutdruckmessung und die Messung der Herzfrequenz erfolgten mittels Schwanzmanometrie (Abbildung 5). Hierzu wurde die Maus in einer größenverstellbaren Plexiglasröhre fixiert und der Schwanz über eine Öffnung an der Hinterseite herausgeführt. Somit konnte an der Schwanzwurzel die Druckmanschette mit dem dazugehörigen Pulsaufnehmer angebracht werden. Um eine ausreichende Schwanzperfusion zu erreichen, wurde die Maus während der Messung auf einer Wärmeplatte bei 37,3°C platziert. Durch computergestützte spezielle Software war kontinuierlich die Herzfrequenz und der mittlere systolische Blutdruck über eine Druckkurve sichtbar. Erst nach 10 minütiger Eingewöhnung und gleichbleibender Herzfrequenz wurde mit der Aufzeichnung begonnen. Im Abstand von 30 Sekunden

waren mindesten vier Messungen nötig, um verlässliche Mittelwerte der Herzfrequenz und des systolischen Blutdrucks zu erhalten. Um die Vergleichbarkeit der Messungen zu erhöhen und zirkadiane Schwankungen zu verringern, erfolgten die Messungen immer zur gleichen Tageszeit. Um die Tiere an diese Prozedur zu gewöhnen, wurden sie mindestens einen Tag vor den Aufzeichnungen trainiert. Die Messung erfolgte mit dem PowerLab 4SP der Firma AD Instruments und der dazugehörigen Software Chart and Scope für Windows Version 4.1.

3.4.3 Untersuchungen im Stoffwechselkäfig

In den Wochen 12, 18 und 23 (vgl. Abbildung 4: Versuchsablauf) wurden die Mäuse zur Gewinnung von 24h-Sammelurin für 24 Stunden in einem Stoffwechselkäfig gehalten. Der verwendete Stoffwechselkäfig ist speziell auf Mäuse angepasst und wird genutzt, um Urin und Kot möglichst sauber zu trennen und zu sammeln. Im Stoffwechselkäfig erhielten die Tiere ausschließlich Wasser ad libitum. Einfuhr und Ausfuhr wurden protokolliert und abschließend erfolgte eine Blutabnahme (vgl. Kap. 3.4.1). Diese wurde 5 Minuten bei 3000 Rpm zentrifugiert, das Plasma wurde abpipettiert und der gewonnene Blutkuchen mit 0,9%iger NaCl-Lösung versetzt und zusammen mit dem Urin bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Die gewonnenen Proben konnten später zur Bestimmung renaler Parameter verwendet werden.

3.4.4 Messung Nüchternglukosekonzentration und Nüchterninsulinkonzentration

Diese Messungen erfolgten aus dem Plasma der Tiere, welche vor der Blutabnahme (vgl. Kap.3.4.1) 24 Stunden nüchtern gehalten wurden. Die Bestimmung der Glukosekonzentration im Plasma erfolgte unter Verwendung eines gekoppelten optisch-enzymatischen Verfahrens. Hierzu wurde ein kommerzielles Glukose-Test-Kit verwendet, welches die benötigten Enzyme und Substrate (Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PDH), Hexokinase (HK), NAD⁺ und ATP) enthielt. Das Enzym Hexokinase phosphoryliert die Glukose unter Verbrauch von ATP, diese phosphorylierte Glukose wurde anschließend von dem Enzym G6PDH oxidiert, bei dieser Reaktion kommt es gleichzeitig zur Reduktion von NAD⁺ \rightleftharpoons NADH⁺. Durch diesen Substratumsatz (NAD⁺ \rightleftharpoons NADH⁺) kam es zu einem photometrisch messbaren Absorptionsanstieg von 260 nm auf 340 nm, welcher zur Glukosekonzentration in der Probe proportional ist. Die Messung der Nüchterninsulinkonzentration erfolgte in

Kooperation mit Hr. Dr. med. M.A. Arafat (Campus Benjamin Franklin). Hierzu wurden 10µl Plasma und 200µl des Glukosereagenz vermischt, anschließend für 15 Minuten inkubiert und der Absorptionsanstieg an einem Spektrometer ermittelt. Alle Messungen erfolgten als Doppelbestimmungen. Es wurden Negativ- und Positivkontrollen mitgeführt. Aus den erhobenen Daten konnte der HOMA- und QUICKI-Index berechnet werden. Beide Indices sind etablierte Berechnungen der Insulinresistenz aus Nüchternglukose und Nüchterninsulinkonzentration. Der HOMA-Index (*Homeostasis Model Assessment*) wird wie folgt berechnet:

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

Der Normalwert des Homa Index liegt bei < 1 , je größer der Wert, desto wahrscheinlicher liegt eine Insulinresistenz vor.

Der QUICKI-Index (*Quantitativ Insulin Sensitivity Index*) (124) ist ebenfalls eine anerkannte Methode, um die Insulinresistenz abzuschätzen. Dieser Index wichtet die Daten nicht linear wie der HOMA-Index, sondern logarithmisch und stellt somit vor allem die Unterschiede in den kleineren Zahlbereichen präziser dar:

$$\text{QUICKI} = \frac{1}{\log(\text{Nüchterninsulin} \left(\frac{\text{mU}}{\text{l}} \right)) + \log(\text{Nüchternglukose} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right))}$$

Je niedriger der Wert, desto wahrscheinlicher liegt eine Insulinresistenz vor.

Die genaueste und eleganteste Methode, um die Insulinresistenz abzuschätzen, ist bisher jedoch der euglykämisch-hyperinsulinämische Clamp -Test. Aufgrund des hohen zeitlichen und technischen Aufwands dieser Methode, wurde im Rahmen dieses Versuchs auf den HOMA-und QUICKI-Index zurückgegriffen (125).

3.4.5 Intrapertonealer Glukosetoleranztest

Mit dem oralen Glukosetoleranztest kann zu einem frühen Zeitpunkt über einen verzögerten Abfall der Blutglukosekonzentration eine gestörte Glukoseverwertung nachgewiesen werden. Um die Glukoseverwertung der Mäuse zu beurteilen, wurde den Mäusen in der 25. Lebenswoche nach 12 stündiger Nahrungskarenz intraperitoneal eine Glukoselösung appliziert. Jedem Tier verabreichte man 0,02 ml / g KG der

10%igen Glukoselösung, das entspricht 2 mg Glukose / g KG. Die Blutabnahme (vgl. Kap. 3.4.1) erfolgte zum Zeitpunkt Null, 15, 30 und 60 min nach intraperitonealer Injektion. Die Glukosekonzentration wurde aus dem Plasma der Tiere (vgl. Kap. 3.4.1) anhand einer gekoppelten photometrisch-enzymatischen Methode bestimmt (vgl. Kap.3.4.4).

3.5 Histologische Methoden

3.5.1 Organentnahme und Fixierung

Die Versuchstiere wurden im Alter von 25 Wochen, bis zum Einsetzen des Atemstillstandes, mit Isofluran narkotisiert und anschließend wurde zur sicheren Tötung noch eine zervikale Dislokation durchgeführt. Unmittelbar darauf wurden folgende Organe entnommen und gewogen: Herz, Lunge, Leber, Milz, Pankreasschwanz, Niere, Aorta. Da das Pankreas ein äußerst empfindliches Organ ist und sich schlecht, vor allem bei den Größenverhältnissen einer Maus, von den umliegenden Organen abgrenzen lässt wurde nur der besser zugängliche Pankreasschwanz entnommen und im Ganzen fixiert. Da für die Fragestellung dieser Arbeit ausschließlich der endokrine Anteil des Pankreas von Bedeutung war und die Inselzellorgane ihre höchste Dichte im Pankreasschwanz haben, war dieses Vorgehen vertretbar. Zur Fixierung wurden die Organe bzw. Gewebeproben in Einbettkassetten überführt und für 24 Stunden in 4%iger Formalin-PBS-Lösung fixiert und anschließend in 70%igem Ethanol bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Das Formaldehyd diente nicht nur zur Aufhaltung von Autolyse und Fäulnisprozessen, sondern ist auch für die Aushärtung der Organe wichtig und verhindert deren Schrumpfung. Ein Teil der Organe wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C für spätere molekularbiologische Analysen aufbewahrt.

3.5.2 Einbettung

Die Paraffineinbettung der Organe dient dem Erreichen einer ausreichenden Festigkeit des Gewebes und macht das Anfertigen der Gewebedünnschnitte erst möglich. Bevor die Organe in Paraffin eingebettet werden konnten mussten sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96% und 3mal 100%igem Ethanol) für jeweils eine Stunde entwässert werden. Um den Alkohol wieder aus dem Gewebe zu lösen, wurden die Gewebeproben für 30 Minuten in Aceton überführt. Anschließend wurden die Organe mit 56°C warmen Paraffin umgossen. Die Proben verblieben nun für zwei Stunden in

Paraffin sechs und bis zur Entnahme in Paraffin neun. Für diesen Einbettvorgang wurde der Einbettautomat der Firma Shandon Citadel 1000 verwendet (vgl. Tabelle 4). Anschließend mussten die Proben noch von den Einbettkassetten in die Histokassetten überführt und erneut mit Paraffin neun aufgefüllt werden, um dann auf einer Kühlplatte auszuhärten. Dieser Vorgang wurde an der Ausbettstation EC 350 bewerkstelligt. Nach dem Aushärten konnten die Paraffinblöcke aus den Histokassetten entfernt und bis zur Weiterverarbeitung bei Zimmertemperatur gelagert werden.

Lösungsmittel	Dauer
70% Ethanol	1 Stunde
96% Ethanol	1 Stunde
3x100% Ethanol	Je 1 Stunde
Aceton	30 Minuten
Paraffin 6	2 Stunden
Paraffin 9	Bis zur Entnahme

Tabelle 4: Einbettprogramm

3.5.3 Anfertigung der Gewebeschnitte

Die 3 µm dicken Gewebeschnitte wurden am Mikrotom angefertigt und zur besseren Haftung der Gewebeschnitte auf silanisierte Objektträger aufgetragen. Unmittelbar vor der Auftragung auf den Objektträger kamen die Gewebeschnitte zur Glättung noch in ein bis zu 50°C warmes Wasserbad. Zur Silanisierung wurden die Objektträger 5 Minuten in Aceton und darauf folgend 5 Minuten in 2%iger 3-Aminopropyltriethoxysilan-Aceton-Lösung getaucht, anschließend mit Wasser abgespült und über Nacht im Wärmeschrank getrocknet. Die Silanisierung dient hierbei als Haftvermittler zwischen Objektträger und Gewebe. Nach dem Auftragen der Gewebeschnitte auf den Objektträger kamen die Schnitte für 30 min zum Trocknen in einen Wärmeschrank.

3.5.4 Hämatoxylin-Eosin Färbung der Pankreas

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung) ist eine weit verbreitete Färbemethode, die häufig als Übersichtsfärbung dient. Sie besteht aus zwei Farbstoffen, dem natürlichen, basischen Farbstoff Hämatoxylin und dem synthetisch hergestellten Farbstoff Eosin. Hämatoxylin färbt Strukturen die sauer bzw. basophil sind blau (z.B. DNA, Zellkerne, Ribosomen oder das endoplasmatische Retikulum). Eosin dagegen

färbt basische bzw. acidophile Strukturen rot (z.B. Proteine, Zytoplasma oder Mitochondrien). Da das Zytoplasma der exokrinen Pankreaszellen weniger basophil ist und sich somit weniger stark mit Eosin anfärbt als das Zytoplasma der endokrinen Zellen, erscheinen die Inselorgane in der HE-Färbung als dunklere Inseln inmitten des schwächer gefärbten exokrinen Gewebes. Zudem ist die Zellkerndichte in den Inselorganen sichtbar höher und die Nähe zum Gefäßsystem, für das Inselorgan als endokrines Gewebe, charakteristisch. Die Inselorgane lassen sich somit, durch die HE-Färbung, gut vom umliegenden exokrinen Pankreasgewebe abgrenzen (vgl. Abbildung 6).

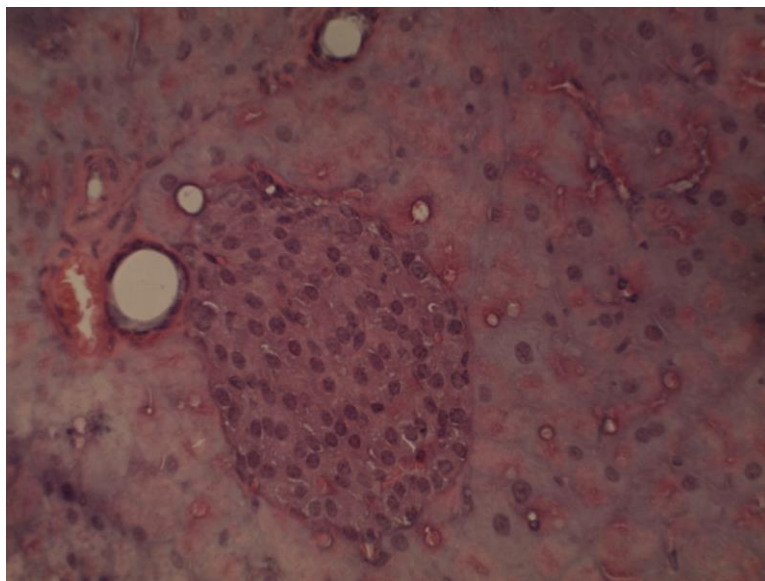


Abbildung 6: HE-Färbung Langerhansinsel (200 fache Vergrößerung)

Vor der eigentlichen HE-Färbung müssen die Gewebeschnitte noch vorbereitet werden. Zuerst kamen die Schnitte zur Entparaffinisierung für 10 min in Xylol und anschließend für jeweils zwei Minuten in eine absteigende Alkoholreihe (100%-95%-80% und 70%igem Ethanol). Daraufhin wurden sie für vier Minuten in Hämalaunlösung getaucht und unter fließendem Wasser gebläut. Zur besseren Differenzierung wurden die Schnitte noch kurz in 1%-ige HCL-Ethanol-Lösung getaucht und anschließend unter fließendem Wasser abgespült. Nun wurde das Zytoplasma durch vierminütiges Eintauchen in Eosin gefärbt und überschüssige Farbe mit Aqua dest. abgespült. Zur abschließenden Entwässerung wurden die Präparate noch für jeweils zwei Minuten in eine aufsteigende Alkoholreihe gebracht (70%-80%-95%-100%igem Ethanol), daraufhin

erneutes 10-minütiges Xylol-Bad, um anschließend mittels Depex luftblasenfrei eingedeckt zu werden.

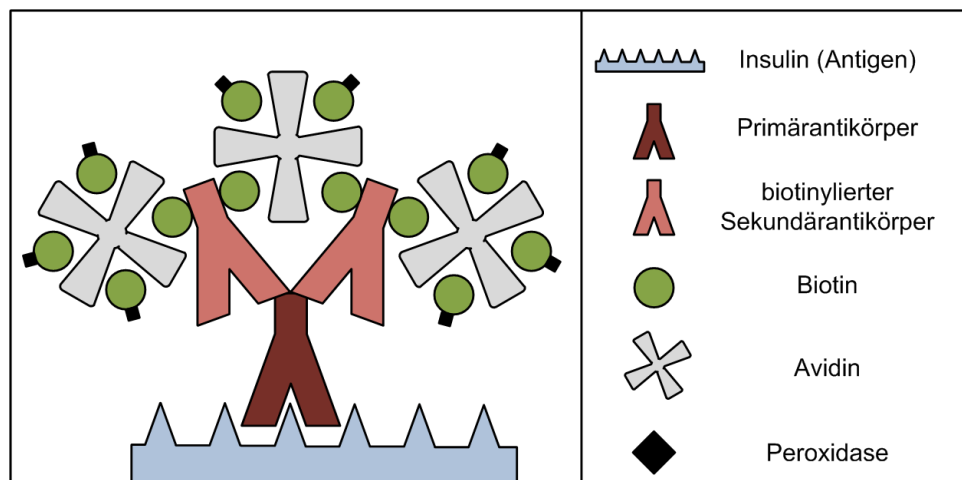


Abbildung 7. Avidin-Biotin-Methode

3.5.5 Immunhistochemische Färbung der β -Zellen

Soll in einem Zellverband nur eine spezielle Zellpopulation sichtbar gemacht werden, kann hierzu eine immunhistologische Färbung angewendet werden. Diese Methode beruht auf einer zielgerichteten Antigen-Antikörper-Reaktion. Als Antigen bei dieser β -Zellfärbung diente das Insulin der β -Zellen. Da Insulin β -Zell-spezifisch ist, kann mit dieser Methode deren Anteil am Inselorgan farblich sichtbar gemacht werden. Nach Bindung des Primärantikörpers am Insulin wird der Primärantikörper durch einen modifizierten Sekundärantikörper erkannt und gebunden. Der Primärantikörper stammt in der Regel aus dem Serum eines mit diesem Antigen immunisierten Tieres (polyklonaler AK), in diesem konkreten Fall vom Meerschwein. Der verwendete sekundäre Antikörper, welcher von einer Ziege stammt, ist mit dem Molekül Biotin konjugiert. Biotin entspricht dem Vitamin B7. Durch die Biotinylierung des sekundären Antikörpers kann der Peroxidase-konjugierte Avidin-Biotin-Komplex an den sekundären Antikörper binden. Avidin auch Streptavidin genannt (aus *Streptomyces avidinii* gewonnenes Avidin) ist ein Protein, das vier Bindungsstellen für Biotin besitzt. Die beschriebene immunhistochemische Methode ist eine indirekte Methode, bei der letztlich die Peroxidase als indirektes Antigen fungiert und mit Hilfe einer chromogenen Substratlösung farblich sichtbar gemacht werden kann. Hierbei handelt es sich um eine etablierte immunhistochemische Färbung nach der Avidin-Biotin-Methode (vgl.

Abbildung 7). Als Primärantikörper wurde der anti-Insulin ab7842 Antikörper vom Meerschwein und als Sekundärantikörper der anti-IgG ab6907 einer Ziege verwendet.

Vorbereitung der Gewebeschnitte und Demaskierung des Antigens

Wie bei der HE-Färbung mussten die Gewebeschnitte zuerst entparaffinisiert werden. Hierzu kamen die Schnitte für 10 min in Xylol und anschließend zur schrittweisen Bewässerung für jeweils 2 Minuten in eine absteigende Alkoholreihe (100%-96%-80% und 70%igem Ethanol). Anschließend wurden die Präparate mit Aqua dest. gespült. Durch die Formaldehydfixierung der Organe können sich Proteinstrukturen verändern, welche demzufolge vom Antikörper nicht mehr als Zielantigene erkannt werden können. Man spricht in einem solchen Fall auch von einer Maskierung der Antigene oder Epitope. Mit verschiedenen Verfahren kann die Immunreaktivität wieder hergestellt werden. Hier kommen enzymatische oder hitzeinduzierende Verfahren zum Tragen. In diesem Färbeverfahren wurde die Antigenität mittels Hitze wiederhergestellt. Hierzu wurden die Präparate in Plastikküvetten mit erhitztem Tris-EDTA-Puffer, bei einem pH-Wert von 9, in einem mit Aqua dest. gefüllten Dampfkocher für 20 Minuten gegart. Nach 30 minütigem Abkühlen der Schnitte auf Raumtemperatur wurden diese mit TBS-Puffer gespült.

Blockierung der endogenen Peroxidase und Blockieren mit BSA

Ein Problem, das einer gezielten Auswertung der Immunreaktion im Weg steht, sind die endogenen Peroxidasen. Wenn die Visualisierung der gebundenen Antikörper über eine Peroxidase-Reaktion erfolgt, müssen zunächst die endogenen Peroxidasen blockiert werden, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden. Die Endogenen Peroxidasen kommen in Granulozyten, Erythrozyten, Mastzellen und Leukozyten vor. Die Blockierung der endogenen Peroxidasen erfolgte im vorliegenden Fall durch Inkubation der Gewebeschnitte für 10 Minuten in 3%-igem Wasserstoffperoxid. Anschließend wurden die Schnitte für 3 x 3 Minuten in Waschpuffer (TBS) gespült.

Ein weiteres Problem, das der Immunreaktion im Weg steht, ist die unspezifische Bindung der Antikörper an hydrophobe Strukturen wie zum Beispiel Proteine, Membranen oder Kunststoffoberflächen. Um dem entgegen zu wirken und somit

unspezifische Hintergrundanfärbungen zu minimieren, wurden die Präparate vor der Inkubation mit den Antikörpern für 30 Minuten in eine TBS-BSA-Lösung (200ml TBS und 2g BSA) getaucht. BSA ist Rinderalbumin (*bovine serum albumine*) und konkurriert mit den Antikörpern um die unspezifischen Bindungsstellen. Da BSA im Verhältnis zu den Antikörpern im Überfluss vorlag und die unspezifischen Bindungsstellen besetzte, verhinderte es eine spätere unspezifische Bindung der Antikörper

Inkubation des Primärantikörpers

Vor der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Objektträger um den Gewebeschnitt herum abgetrocknet und der Gewebeschnitt mit einem Dako-Pen umfahren. Hierbei handelt es sich um einen Fettstift der zur hydrophoben Abgrenzung des Gewebeschnitts, zum Rest des Objektträgers, dient damit sich die aufgebrauchte Antikörperlösung nur auf dem Gewebeschnitt verteilen kann. Der Antikörper wurde im Verhältnis 1:100 mit dem *Antibody Diluent* von Dako verdünnt. Aus dieser Verdünnung wurde jeweils ein Tropfen (65µl) pro Schnitt aufgetragen und eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Die Feuchtkammer ist eine mit feuchten Tüchern ausgelegte, abgedichtete Kammer, die das Austrocknen der Präparate verhindern soll. Nach der Inkubation des Primärantikörpers erfolgte eine erneute Spülung mit TBS-Puffer um die überschüssigen Rückstände der Antikörperlösung zu entfernen.

Inkubation des Sekundärantikörpers und Visualisierung

Als biotinylierter Brückenantikörper oder Sekundärantikörper diente der polyklonale IgG Antikörper einer Ziege, welcher im Verhältnis 1:200 in AK-diluent von Dako verdünnt auf die Gewebeschnitte aufgetragen wurde um anschließend bei Raumtemperatur für 30 Minuten in der Feuchtkammer inkubiert zu werden. Die Antikörperrückstände wurden erneut mit TBS-Waschpuffer entfernt. Nun konnte die, als Markerenzym verwendete, Meerrettichperoxidase und das Chromogen unter Verwendung eines ABC-Färbesystems (sc2023 Santa Cruz) aufgetragen werden. Für diesen Teil der Färbung mussten zwei Lösungen angesetzt werden. Für die sogenannte AB-Lösung vermischte man 50µl Reagenz A (Avidin) mit 50µl Reagenz B (biotinylierte Meerrettichperoxidase) und 2,5 ml PBS-Puffer. Bei der Zweiten Lösung handelt es sich um das Chromogen, also um das Substrat, welches von der Peroxidase umgesetzt wird und letztlich zur

Farbgebung führt. Für diese sogenannte C-Lösung wurden 1,6 ml H₂O mit fünf Tropfen Substratpuffer und einen Tropfen DAB Chromogen und ein Tropfen Peroxidasesubstrat vermengt. Anschließend wurden die Schnitte mit AB-Lösung benetzt und für 30 Minuten in der Feuchtkammer inkubiert. Daraufhin wurden sie mit PBS-Puffer gespült und danach Lösung C aufgetragen. Nach 10 minütiger Inkubation in der Feuchtkammer und anschließender Spülung mit Aqua dest. war die immunhistochemische Färbung abgeschlossen. Nun folgt nur noch die Kernfärbung mit Hämalaun für sieben Minuten 1:1 verdünnt mit Aqua dest. Zur Refixierung und Dehydrierung wurden die Präparate noch für jeweils eine Minute in eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 100%igem Ethanol) getaucht und anschließend zur besseren Differenzierung für eine Minute in einer 1%igen HCL-Ethanol-Lösung. Nach fünf minütiger Spülung der Schnitte unter fließend Wasser werden sie mit Aquamount luftfrei eingedeckt.

Um sicher zu gehen, dass die Färbung ausschließlich durch die Antigen-Antikörperreaktion verursacht wurde, liefen bei dem Verfahren drei Negativ-Kontrollen mit.

1. Ein Schnitt ohne Primärantikörper
2. Ein Schnitt ohne Primär- und Sekundärantikörper
3. Ein nicht aus dem Pankreas stammender Gewebeschnitt (Niere) welcher nicht insulinhaltig ist.

3.6 Auswertung der histologischen Färbungen

3.6.1 Auswertung der HE-Färbung der Pankreas

Von den 134 am Versuch beteiligten Mäusen gingen noch 115 Mäuse, in die pankreashistologische Auswertung ein, da bei 19 Mäusen kein oder kein qualitativ ausreichendes Pankreasgewebe bei der Organentnahme erfasst wurde. Die 115 HE-gefärbten Schnitte wurden mikroskopisch mit einem Olympus BH2 Mikroskop ausgewertet. Zunächst wurde die Gesamtgröße des angefertigten Schnittes eingestellt und mit einer CFW-1310C Farbkamera der Firma Scion Corporation und dem dazugehörigen Programm Scion Visicapture fotografiert, gespeichert und später mit Hilfe des Bildauswertungs-Programms Image J 1.37v vermessen. Hierzu wurde der Gewebeschnitt mit dem Cursor umfahren. Da in der Übersichtsaufnahme die Inselorgane gut erkennbar waren, wurden sie schon in dieser Einstellung gezählt, um

später bei höherer Vergrößerung keine Inselorgane zu verfehlen. Anschließend wurde das Präparat bei 200-facher Vergrößerung nach den Langerhans-Inselzellen, von links oben nach rechts unten, durchsucht und fotografiert. Im Anschluss wurden die erfassten Inselorgane einzeln in Image J mit dem Cursor umfahren und deren Fläche ($\text{Fläche}_{\text{Inselorgan}}$) bestimmt. Es wurden zwischen 1 und 32 Inselorgane pro Schnitt gezählt und vermessen. Die endokrine Fläche ergab sich aus der Summe der einzelnen Inselflächen pro Schnitt ($\sum \text{Fläche}_{\text{Inselorgan}}$). Die Summe der einzelnen Inselflächen wurde mit der Anzahl der Inselzellorgane desselben Schnitts ins Verhältnis gesetzt und ging als normierte Inselorganfläche in die Statistik ein:

$$\text{normierte Inselorganfläche} = \frac{\sum \text{Fläche}_{\text{Inselorgan}}}{\text{Anzahl der Inselorgane}}$$

Der Quotient aus der Anzahl der Inselorgane und der Gesamtfläche der Gewebeprobe ergab die Inseldichte:

$$\text{Inseldichte} = \frac{\text{Anzahl der Inselorgane}}{\text{Fläche}_{\text{Gewebeprobe}}}$$

3.6.2 Auswertung der Insulinfärbung

Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden an dem Olympus BH2 Mikroskop bei 200-facher Vergrößerung ausgewertet. Die Inselorgane setzten sich im Vergleich zum umliegenden Gewebe durch die Immunfarbreaktion tief rot ab und waren von nicht gefärbten rundlichen Arealen durchsetzt (vgl. Abbildung 8). Zunächst wurden alle Inselorgane des Schnittes mit der CFW-1310C Digitalkamera (Scion Corporation) und dem dazugehörigen Programm bei konstant gehaltenen Lichtverhältnissen fotografiert und mit Image J weiterverarbeitet. Daraufhin wurden die Inselorgane mit dem Cursor umrandet um deren Fläche zu bestimmen. Anschließend wurden über eine spezielle Funktion von Image J (*clear outside*), die Areale außerhalb der umrandeten Fläche ausgeblendet (vgl. Abbildung 9), da für die folgenden Messungen nur noch die Inselorgane von Bedeutung waren. Das Ausblenden der umliegenden Fläche, wobei es sich in diesem Fall um den exokrinen Anteil der Pankreas handelte, minimierte die Artefaktwahrscheinlichkeit für die folgenden Messungen. Nun wurde eine Hell-Dunkel-Grenze festgelegt (*threshold*), wobei sich die insulinhaltigen Flächen (β -Zellen) als dunkelroter Kontrast abhoben (vgl. Abbildung 10). Die Festlegung der Hell-

Dunkelgrenze wurde für jeden Schnitt wiederholt. Das Bildverarbeitungsprogramm ermittelte nun die Gesamtfläche des Inselorgans sowie die durch den Antikörper angefärbte Fläche und setzte sie zueinander ins Verhältnis. Für den Vergleich zwischen den drei Versuchstiergruppen gingen nicht die absoluten Werte, sondern der relative β -Zellanteil in die statistische Auswertung ein.

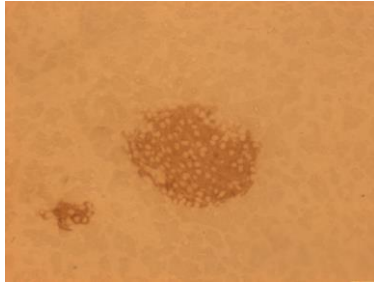


Abbildung 8.
Antiinsulinantikörper
Färbung



Abbildung 9. Abbildung in
***Clear outside* Funktion**

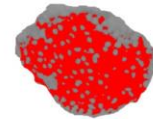


Abbildung 10. *Threshold*

3.6.3 Statistik

Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS Version 21.0. Mit dem Kruskal-Wallis-Test wurden die Daten, bei mehr als zwei Gruppen, auf Signifikanz untersucht. Lagen signifikante Unterschiede zwischen den Daten vor wurden, zur genaueren Differenzierung, die Gruppen untereinander mittels Man-Whitney-U-Test auf Signifikanz hin getestet. Bei beiden Testverfahren handelt es sich um nichtparametrische Tests und es wird bei beiden Testverfahren keine Normalverteilung der Messwerte vorausgesetzt. War die Irrtumswahrscheinlichkeit größer als 0,05 ($p > 0,05$), so wurde die Nullhypothese angenommen und die Unterschiede als nicht signifikant gewertet. Die Daten wurden für alle Messreihen geschlechtlich aufgeteilt und nicht geschlechtlich aufgeteilt, als Mittelwerte mit Angabe des Standardfehlers dargestellt.

4 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die erhobenen Daten nach ihrer statistischen Auswertung, als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM), dargestellt. Die Versuchstiere wurden aufgrund des Genotyps ihrer Eltern in drei Versuchsgruppen eingeteilt. Bei den Versuchstieren handelt es sich ausschließlich um eNOS-Wildtypmäuse.

Gruppe: 1: (WT) Vater WT / Mutter WT (Kontrollgruppe)

Gruppe : 2: (WT) Mutter eNOS-KO/Vater WT

Gruppe: 3: (WT) Mutter WT/Vater eNOS-KO

In die statistische Auswertung gingen auch allgemein erhobene Daten wie die Körpergewichte, Organgewichte, Wachstumsverhalten, systolischen Blutdrücke und die Glukosestoffwechselfdaten ein. Diese Daten wurden von Mitarbeitern der AG-Hocher erhoben, sind jedoch für den Kontext dieser Arbeit unverzichtbar. Des Weiteren werden die Ergebnisse der endokrinen Pankreasmorphologie vorgestellt. Diese Daten wurden von mir erhoben und ausgewertet.

4.1 Geburtsgewicht

Zwischen der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) zeigten sich keine signifikanten Geburtsgewichtsunterschiede.

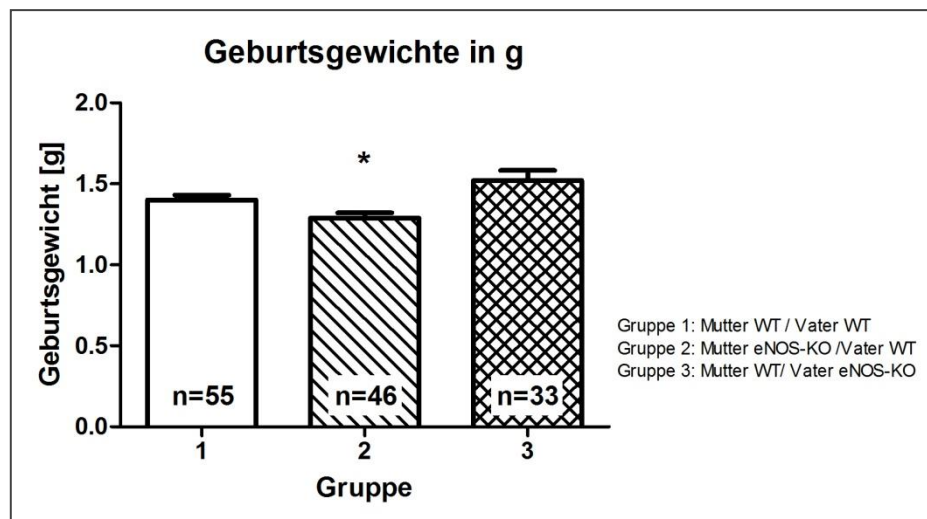


Abbildung 11: Geburtsgewichte: * $p < 0,05$ Gruppe 2 vs. Gruppe 1 (Kontrollgruppe)

Lediglich die Tiere der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) waren signifikant leichter ($p < 0,05$) als die Tiere der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe

drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO)(vgl. Abbildung 11). Bei der geschlechtsspezifischen Betrachtung innerhalb der Versuchsgruppen waren nur die Männchen der Gruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) signifikant leichter im Vergleich zu den Männchen der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO). Unter den weiblichen Tieren gab es keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Geburtsgewichte (vgl. Abbildung 12).

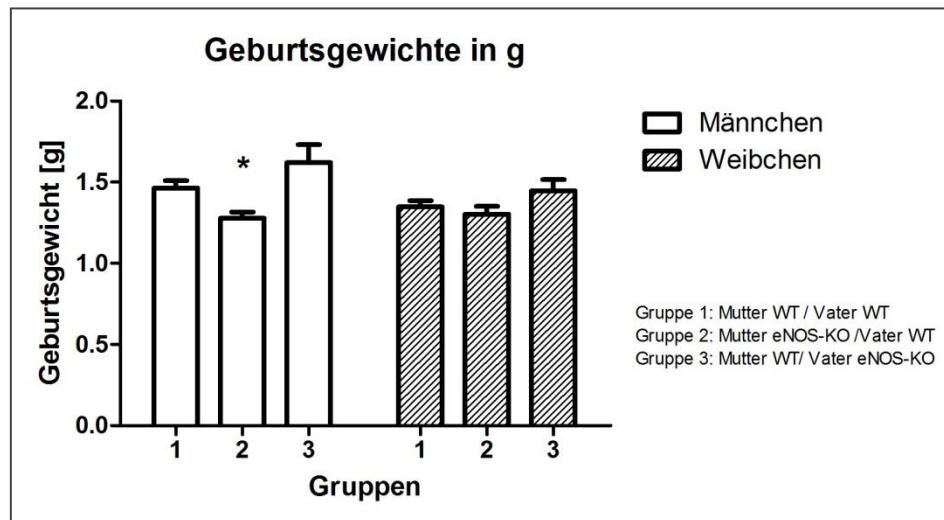


Abbildung 12: Geschlechtsspezifische Geburtsgewichte: * $p < 0,05$ Gruppe 2 vs. Gruppe 1 und 3

4.2 Wachstumsverlauf

Die folgenden Wachstumskurven zeigen den Gewichtsverlauf, das Längenwachstum und den daraus errechnete *Body Mass Index* (BMI) der Tiere. Die Tiere wurden bis zu ihrem 40. Lebenstag täglich gewogen, anschließend vom 40. Lebenstag bis zum 140. Lebenstag wöchentlich. Die Körperlänge wurde bis zum 13. Lebenstag täglich bestimmt. Aus diesen Messdaten konnte der BMI der ersten 13 Tage errechnet werden (vgl. Kap. 3.3).

Das Wachstum der Tiere stagniert in der dritten und vierten Lebenswoche in allen drei Gruppen. Dieses Phänomen ist geschlechtsunabhängig und fällt zeitlich mit dem Abstillen der Tiere zusammen („weaning“) und verliert sich im weiteren Verlauf (vgl. Abbildung 14).

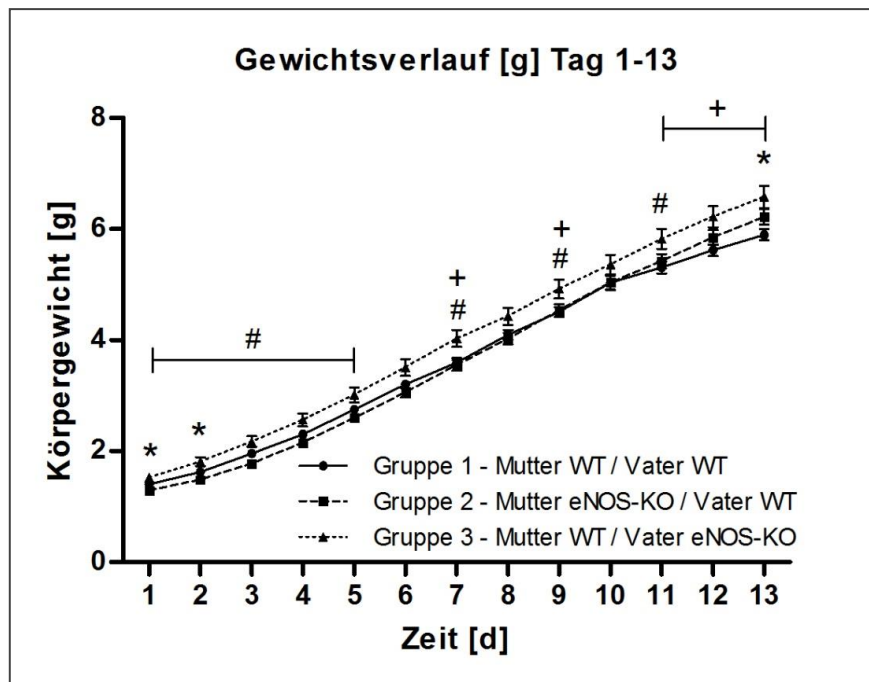


Abbildung 13: Gewichtsverlauf von Tag 1-13: * $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 2, + $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 3, # $p < 0,05$ Gruppe 2 vs. Gruppe 3.

Durch postnatales Wachstum verloren die Gewichtunterschiede ($p < 0,05$) zwischen der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) und der Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) am dritten Tag ihre Signifikanz. Die Gewichtunterschiede zwischen der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) und der Kontrollgruppe verloren am fünften Tag ihre Signifikanz. Im weiteren Verlauf näherten sich die Körpergewichte der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) an die der Kontrollgruppe an. Dabei kreuzten sich die Gewichtskurven der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) zwischen dem siebten und zehnten Versuchstag. Ab dem 13. Versuchstag war die Versuchstiergruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) sogar signifikant schwerer als die Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Diese Signifikanz blieb fast durchgängig (Ausnahme Versuchstag 33) bis zum 37. Versuchstag bestehen (vgl. Abbildung 14).

Die Tiere der Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) waren an Tag sieben, neun, 11-31 signifikant schwerer als die Tiere der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Im weiteren Verlauf näherten sich die Gewichte der Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) den Gewichten der Kontrollgruppe an. Zwischen Woche 14 und 18 kreuzten sich deren Wachstumskurven. Zu wesentlichen Gewichtunterschieden zwischen diesen

beiden Versuchsgruppen kam es ab diesem Zeitpunkt nicht mehr (vgl. Abbildung 13, Abbildung 14).

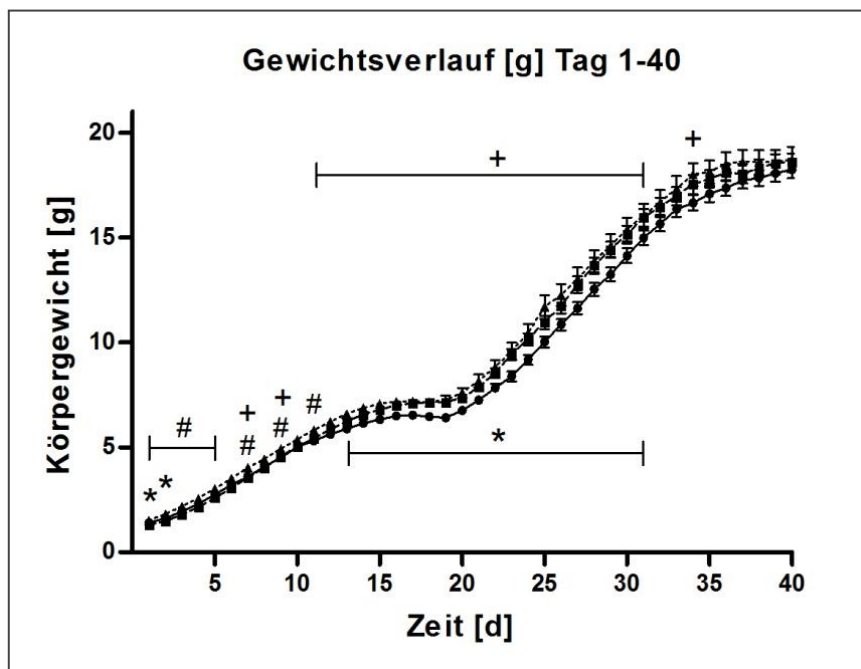


Abbildung 14: Gewichtsverlauf von Tag 1-40: * $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 2, + $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 3, # $p < 0,05$ Gruppe 2 vs. Gruppe 3.

Bei der geschlechtsspezifischen Betrachtung zeigten sich ebenfalls einige signifikante Wachstumsunterschiede (vgl. Abbildung 16, Abbildung 17). Bei alleiniger Betrachtung der männlichen Tiere waren die Tiere der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) bis zum sechsten Tag signifikant leichter als die männlichen Tiere der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Vergleicht man diese Tiere mit den männlichen Tieren der Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO), so stellt man fest, dass diese bis zum siebten Tag signifikant leichter waren ($p < 0,05$). Im weiteren Verlauf verloren sich diese deutlichen Gewichtsunterschiede. Ab dem 11. Tag nähert sich die Wachstumskurve der Kontrollgruppe der Wachstumskurve der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) an und kreuzt diese am 12. und 13. Tag. Über den siebten Tag hinaus zeigten sich keine signifikanten Gewichtsunterschiede zwischen den männlichen Tieren. Auch die deutliche postnatale Gewichtszunahme der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT), die bei der geschlechtsunspezifischen Analyse noch zu beobachten waren, zeigte sich bei der

geschlechtsspezifischen Betrachtung der Männchen nicht mehr (vgl. Abbildung 16, Abbildung 16, Abbildung 18).

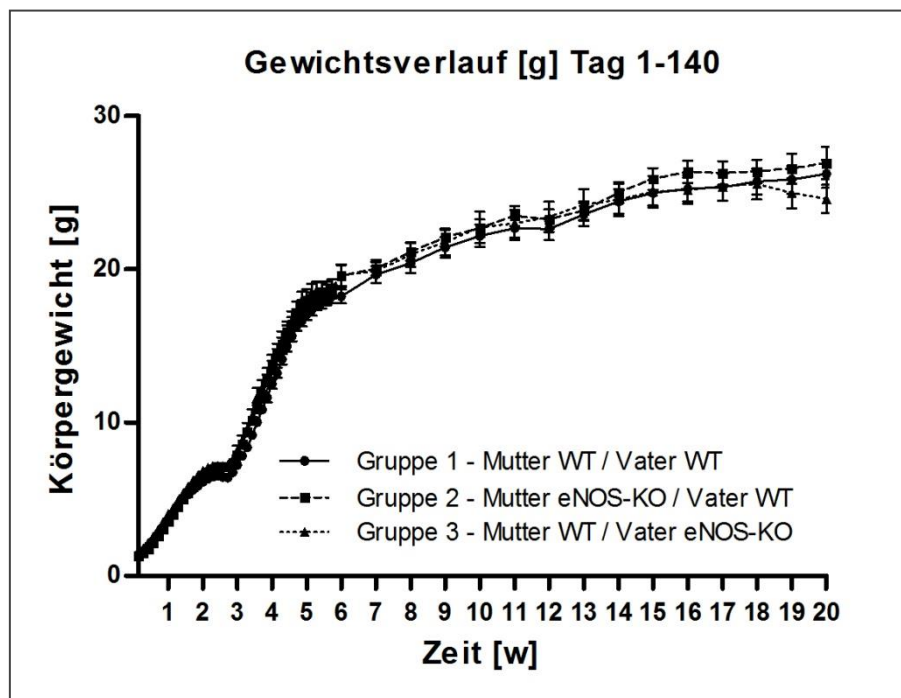


Abbildung 15: Gewichtsverlauf von Tag 1-140.

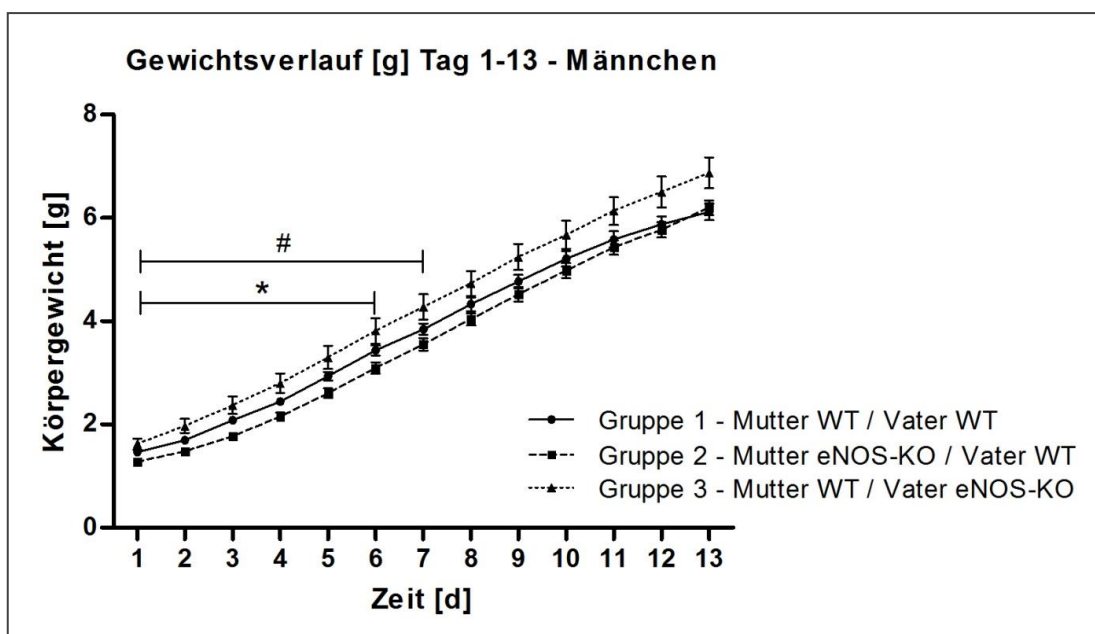


Abbildung 16: Gewichtsverlauf der männlichen Tiere von Tag 1-13: * $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 2, # $p < 0,05$ Gruppe 2 vs. Gruppe 3.

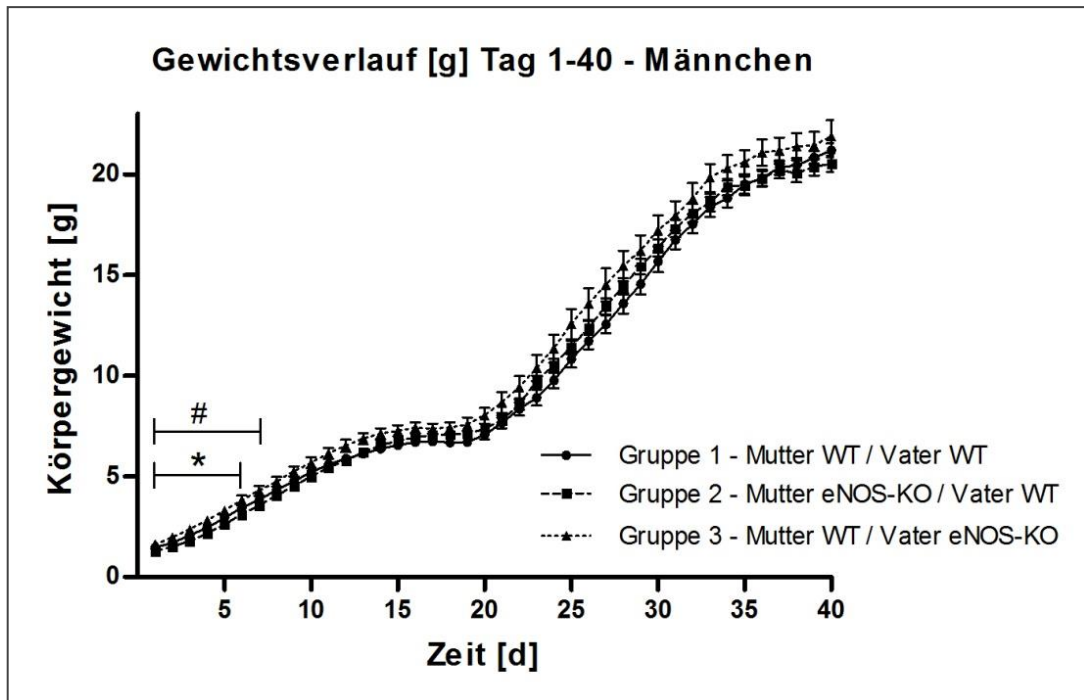


Abbildung 17: Gewichtsverlauf der männlichen Tiere von Tag 1-40: * $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 2, # $p < 0,05$ Gruppe 2 vs. Gruppe 3.

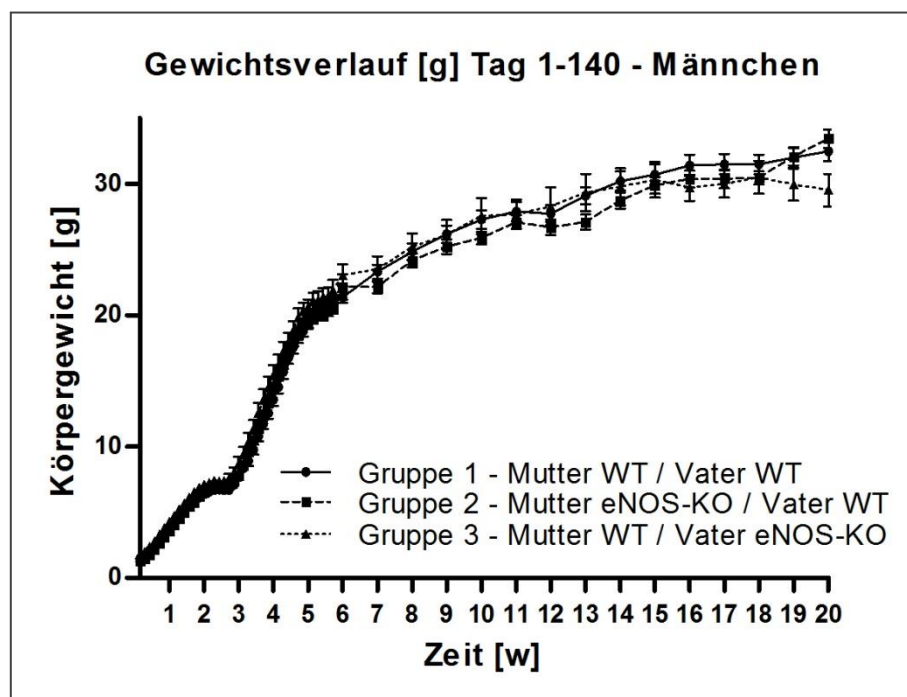


Abbildung 18: Gewichtsverlauf von Tag 1-140 Männchen.

Bei der alleinigen Betrachtung der weiblichen Tiere zeigte der frühere postnatale Wachstumsverlauf keine signifikanten Gewichtsunterschiede zwischen den drei

experimentellen Gruppen. Auch ein postnatales Aufholwachstum zeigte sich nicht. Am Tag sieben und vom 11. Tag bis zum 40. Tag waren die Weibchen der Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) signifikant schwerer als die Weibchen der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Nur am Tag 39 lag keine Signifikanz vor. In der achten Woche, der 11. bis 13. Woche und in der 16. Woche waren die Weibchen der Versuchsgruppe drei ebenfalls signifikant schwerer als die Weibchen der Kontrollgruppe ($p < 0,05$) (vgl. Abbildung 19, Abbildung 20, Abbildung 21).

Auch die weiblichen Tiere der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) waren vom 12. bis zum 37. Tag, mit Ausnahme des 33. Tages, signifikant schwerer als die weiblichen Tiere der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Im weiteren Verlauf verloren diese Gewichtsunterschiede ihre Signifikanz. Erst von der achten Woche bis zur 17. Woche waren die Tiere der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) wieder signifikant schwerer als die Tiere der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Am Ende des Beobachtungszeitraumes zeigten die drei Versuchsgruppen keine signifikanten Gewichtsunterschiede mehr (vgl. Abbildung 19, Abbildung 20, Abbildung 21).

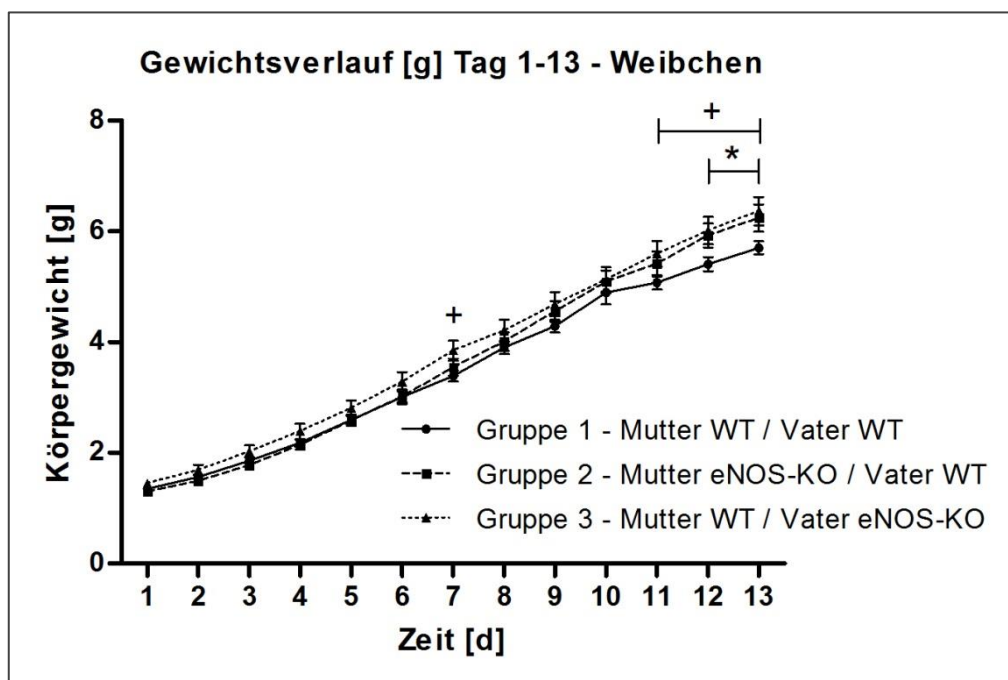


Abbildung 19: Gewichtsverlauf der weiblichen Tiere Tag 1-13: * $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 2, + $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 3.

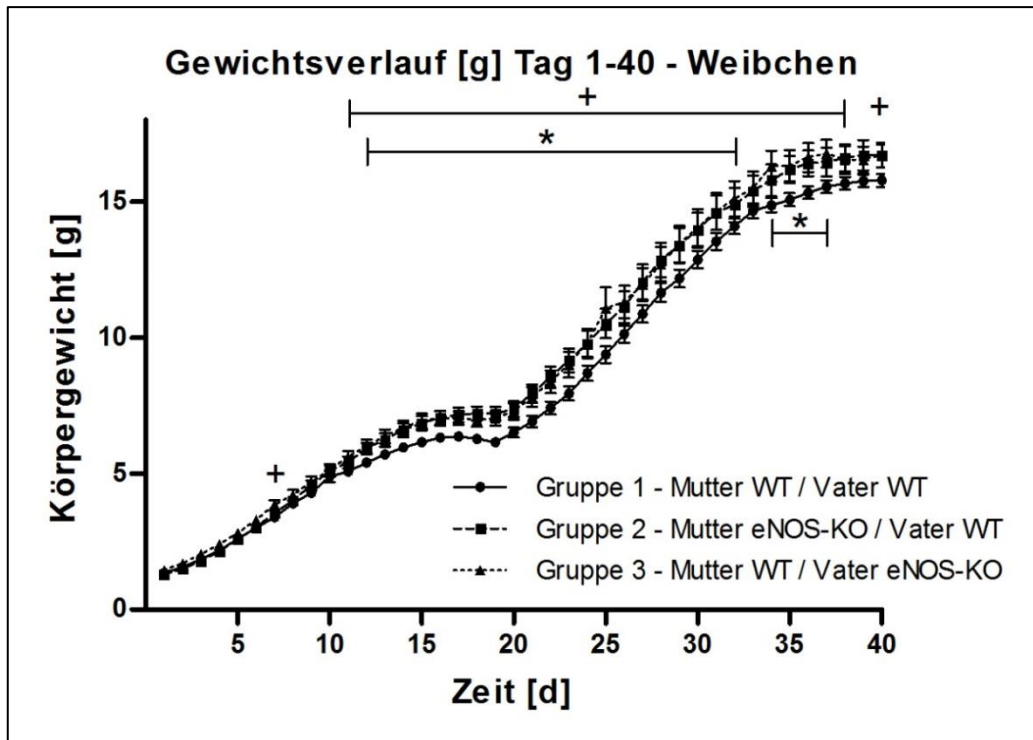


Abbildung 20: Gewichtsverlauf der weiblichen Tiere Tag 1-40: * $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 2, + $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 3.

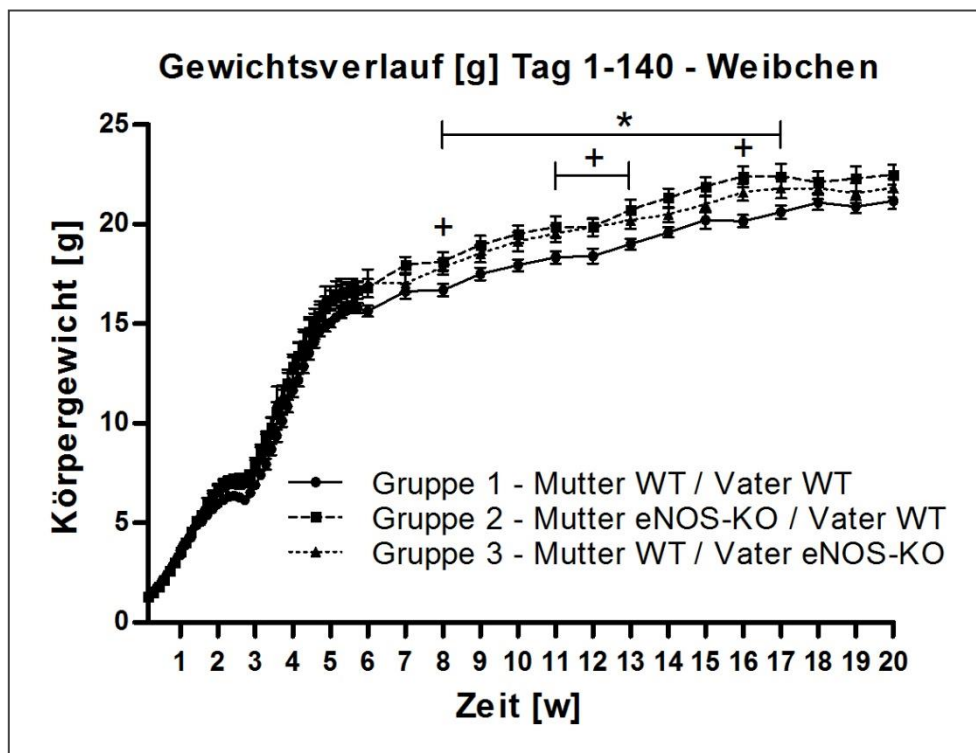


Abbildung 21: Gewichtsverlauf der weiblichen Tiere von Tag 1-140: * $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 2, + $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 3.

4.3 Längenwachstum

Die Körperlänge wurde von der Geburt bis zum 13. Lebenstag täglich bestimmt (vgl. Kap. 3.3.). Die Mäuse der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) waren am ersten und dritten Lebenstag signifikant kürzer als die Tiere der Kontrollgruppe und bis zum vierten Lebenstag auch kürzer als die Tiere der Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) ($p < 0,05$). Im weiteren Verlauf näherten sich die Körperlängen der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) den Körperlängen der Kontrollgruppe an. Mit Ausnahme des siebenten Tages gingen die signifikanten Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen verloren. Zwischen den Versuchsgruppen zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) und drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) kam es von Tag sechs bis neun und an Tag 11 erneut zu deutlichen Längenunterschieden, wobei die Tiere der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) signifikant kürzer waren als die Tiere der Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) ($p < 0,05$). Über den 11. Versuchstag hinaus kam es zu keinen weiteren signifikanten Längenunterschieden, die Körperlängen der Versuchstiere aller drei experimentellen Gruppen näherten sich einander an (vgl. Abbildung 21).

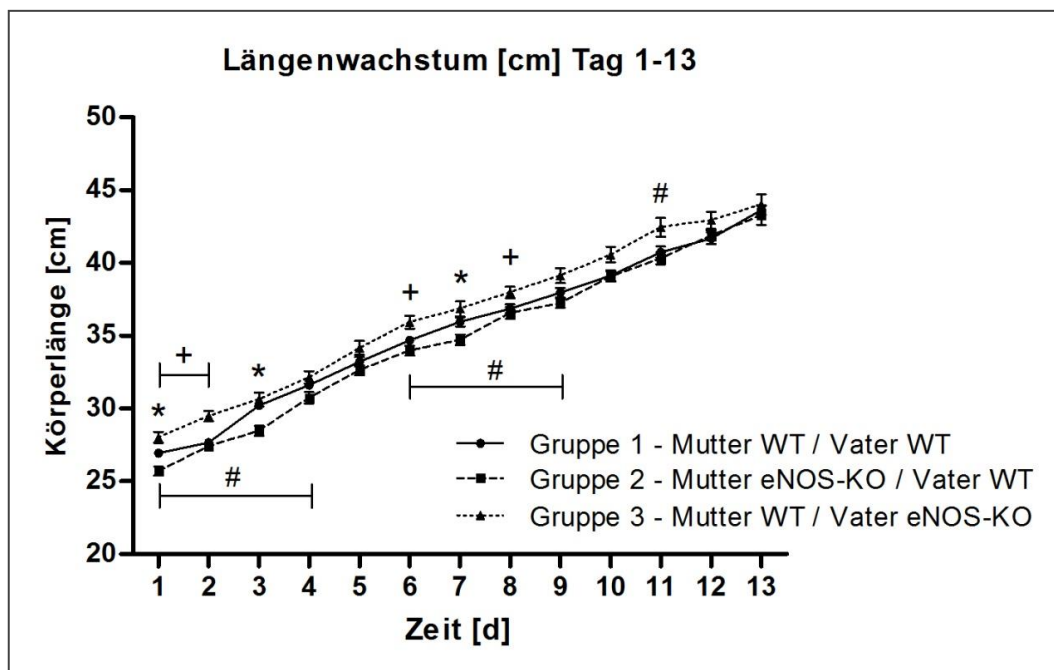


Abbildung 22: Längenwachstum von Tag 1-13: * $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 2, + $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 3, # $p < 0,05$ Gruppe 2 vs. Gruppe 3.

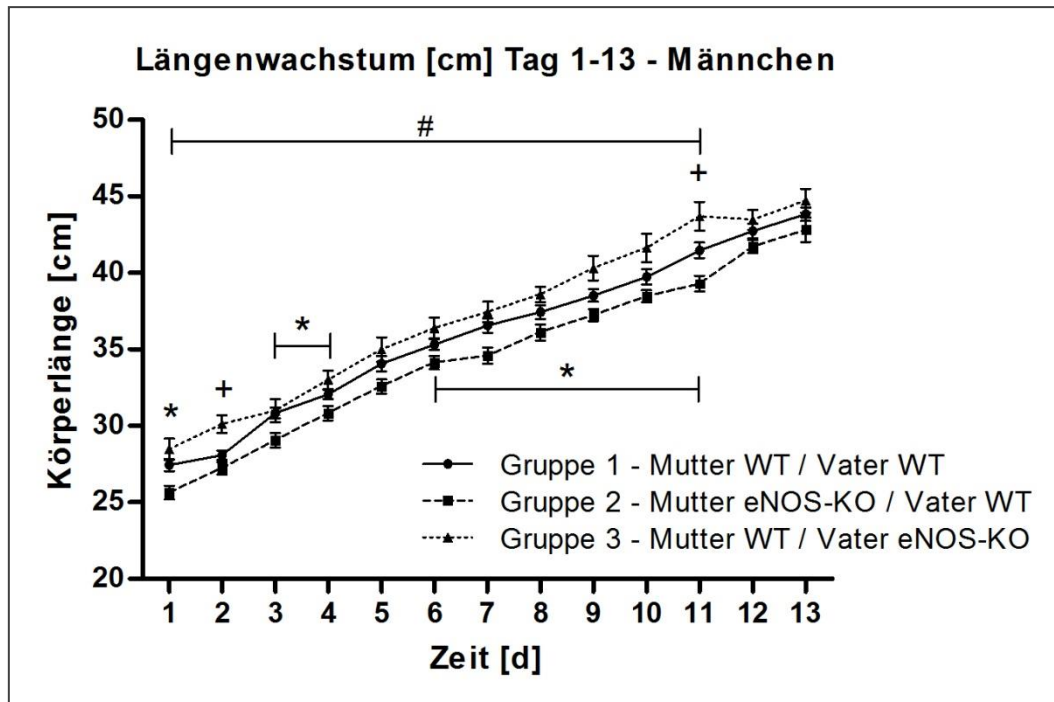


Abbildung 23: Längenwachstum der männlichen Tiere von Tag 1-13: * $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 2, + $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 3, # $p < 0,05$ Gruppe 2 vs. Gruppe 3.

Bei der alleinigen Betrachtung der männlichen Tiere zeigte der frühere postnatale Verlauf, dass die Tiere der Versuchsgruppe zwei vom ersten bis zum 11. Lebenstag, mit Ausnahme von Tag drei und fünf, signifikant kürzer waren als die Männchen der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Ausnahmslos waren die Männchen der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) vom ersten bis zum 11. Lebenstag signifikant kürzer als die Männchen der Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) ($p < 0,05$). Nur am zweiten und 11. Lebenstag waren die Männchen der Gruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) signifikant länger als die Männchen der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Auch bei der geschlechtsspezifischen Betrachtung näherten sich die Körperlängen an den letzten drei Beobachtungstagen aneinander an (vgl. Abbildung 23).

Bei der alleinigen Betrachtung der weiblichen Tiere waren die Weibchen der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) nur am dritten Lebenstag signifikant kürzer als die Weibchen der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Im Vergleich mit den Weibchen der Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) waren die Weibchen der Versuchsgruppe zwei an den ersten drei Lebenstagen und am sechsten Lebenstag signifikant kürzer ($p < 0,05$). Am Tag eins, zwei und sechs waren die Weibchen der Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) signifikant länger als die Weibchen

der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Im weiteren Verlauf zeigten sich keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den drei experimentellen Gruppen (vgl. Abbildung 24).

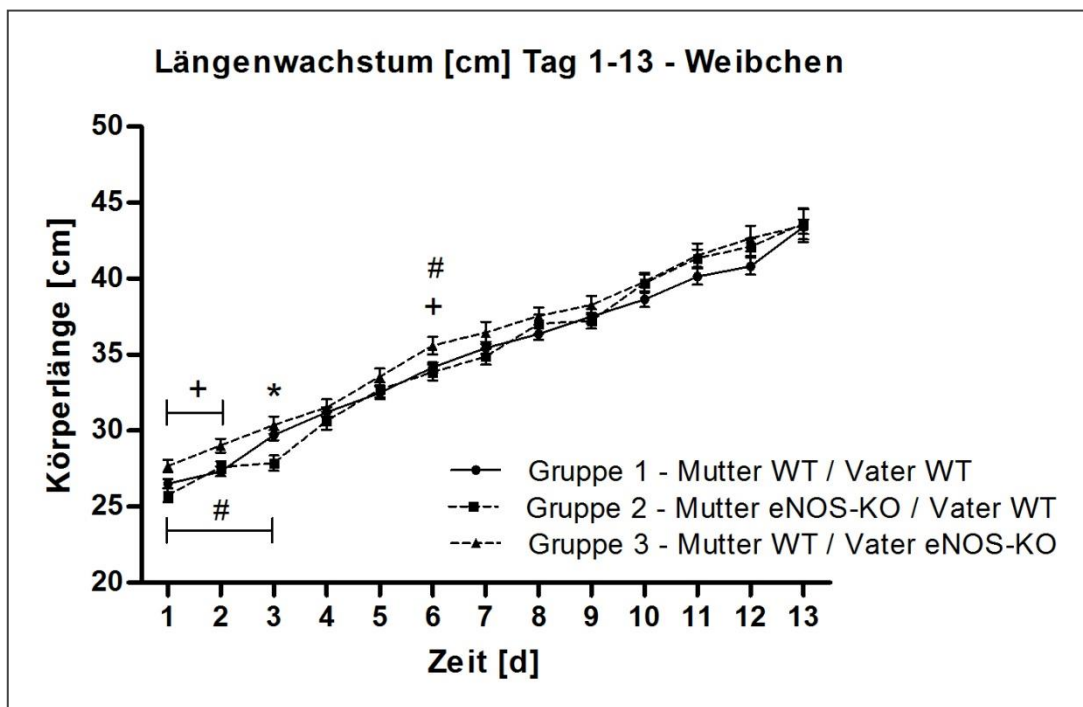


Abbildung 24: Längenwachstum der weiblichen Tiere von Tag 1-13: * $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 2, + $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 3, # $p < 0,05$ Gruppe 2 vs. Gruppe 3.

4.4 Organgewichte

In der 25. Lebenswoche wurden die Versuchstiere getötet und die Organe entnommen und gewogen. Im Folgenden werden die relativen Organgewichte im Verhältnis zum Körpergewicht in Prozent angegeben.

	Gruppe 1 N = 48-50	Gruppe 2 N = 37-40	Gruppe 3 N = 28
Tiere			
Herz	0,5069 ± 0,01011	0,5464 ± 0,01113 #	0,4908 ± 0,01312
Lunge	0,5653 ± 0,01345	0,5710 ± 0,01779	0,5857 ± 0,02393
Leber	4,307 ± 0,06265	4,440 ± 0,05962	4,320 ± 0,09651
Niere rechts	0,6033 ± 0,01103	0,6375 ± 0,01729	0,6178 ± 0,01393
Niere links	0,5754 ± 0,01074	0,6358 ± 0,02274 *	0,5947 ± 0,01398
Milz	0,3564 ± 0,01763	0,3273 ± 0,01450	0,3563 ± 0,02408

Tabelle 5: Relative Organgewichte in Prozent: # $p < 0,01$ Gruppe 2 vs. Gruppe 1/3, * $p < 0,018$ Gruppe 2 vs. Gruppe 1.

Die relativen Organgewichte zeigten innerhalb der drei Versuchsgruppen signifikante Unterschiede. Die relativen Herzgewichte der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vatter WT) waren signifikant höher verglichen mit den relativen Herzgewichten der anderen beiden experimentellen Versuchsgruppen ($p < 0,01$). Des Weiteren waren die relativen Organgewichte der linken Nieren in der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vatter WT) signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p < 0,018$) (vgl. Tabelle 5).

Bei der geschlechtsspezifischen Betrachtung der relativen Organgewichte zeigten sich bei den Weibchen keine signifikanten Unterschiede. Bei den Männchen der Gruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vatter WT) waren die relativen Herzgewichte in der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vatter WT) signifikant höher als bei den Männchen der anderen beiden experimentellen Versuchsgruppen ($p < 0,016$) (vgl. Tabelle 6).

	Männchen			Weibchen		
	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Tiere	N = 21-22	N = 19-21	N = 11	N = 27-28	N = 18-19	N = 17
Herz	0,5032 ± 0,01463	0,5634 ± 0,01605	0,4901 ± 0,02157	0,5098 ± 0,01413	0,5275 ± 0,01452	0,4913 ± 0,01704
Lunge	0,5067 ± 0,01720	0,5201 ± 0,01800	0,5228 ± 0,02767	0,6131 ± 0,01470	0,6273 ± 0,02667	0,6265 ± 0,03191
Leber	4,5553 ± 0,07297	4,5911 ± 0,08809	4,4402 ± 0,09008	4,1141 ± 0,07843	4,2734 ± 0,06117	4,2424 ± 0,14712
Niere rechts	0,6194 ± 0,01762	0,6892 ± 0,02712	0,6533 ± 0,02167	0,5907 ± 0,01382	0,5830 ± 0,01254	0,5949 ± 0,01629
Niere links	0,6005 ± 0,01554	0,6537 ± 0,02396	0,6351 ± 0,01477	0,5560 ± 0,01390	0,6169 ± 0,03954	0,5685 ± 0,01860
Milz	0,3029 ± 0,01625	0,3004 ± 0,02425	0,3081 ± 0,05529	0,3985 ± 0,02639	0,3556 ± 0,01285	0,3875 ± 0,01483

Tabelle 6: Geschlechtsspezifische relative Organgewichte in Prozent: # $p < 0,016$ Gruppe 2 vs. Gruppe 1 und 3.

4.5 Systolischer Blutdruck

Die systolischen Blutdrücke der Tiere wurden in der 10, 19 und 24 Versuchswoche gemessen (vgl. Kap. 3.4.2). Innerhalb der drei Versuchsgruppen zeigten sich keine wesentlichen Druckunterschiede (vgl. Abbildung 25).

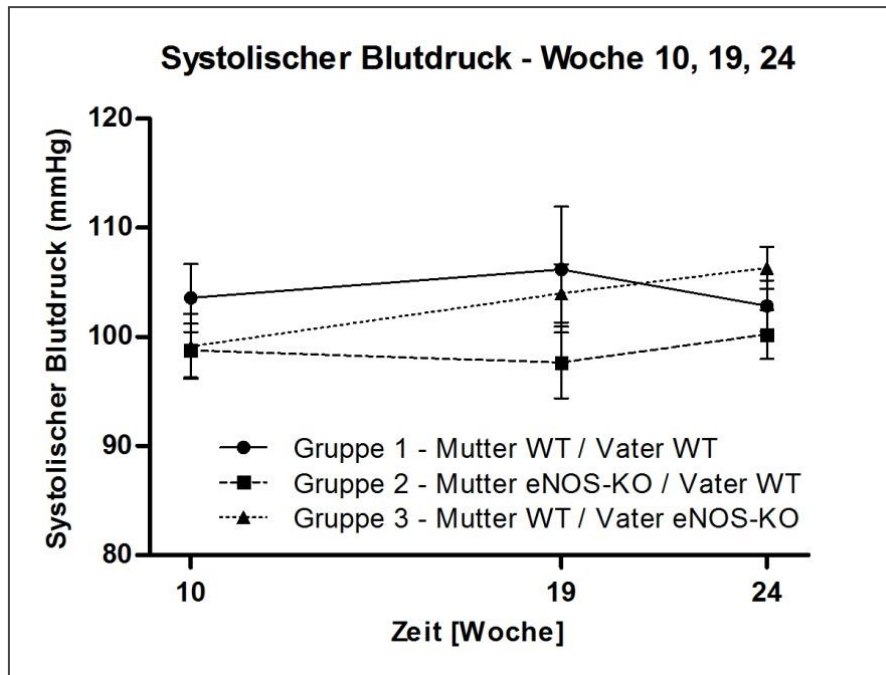


Abbildung 25: Systolischer Blutdruck Woche 10, 19, 24.

Bei der alleinigen Betrachtung der männlichen Tiere zeigten sich ebenfalls keine wesentlichen Druckunterschiede (vgl. Abbildung 26).

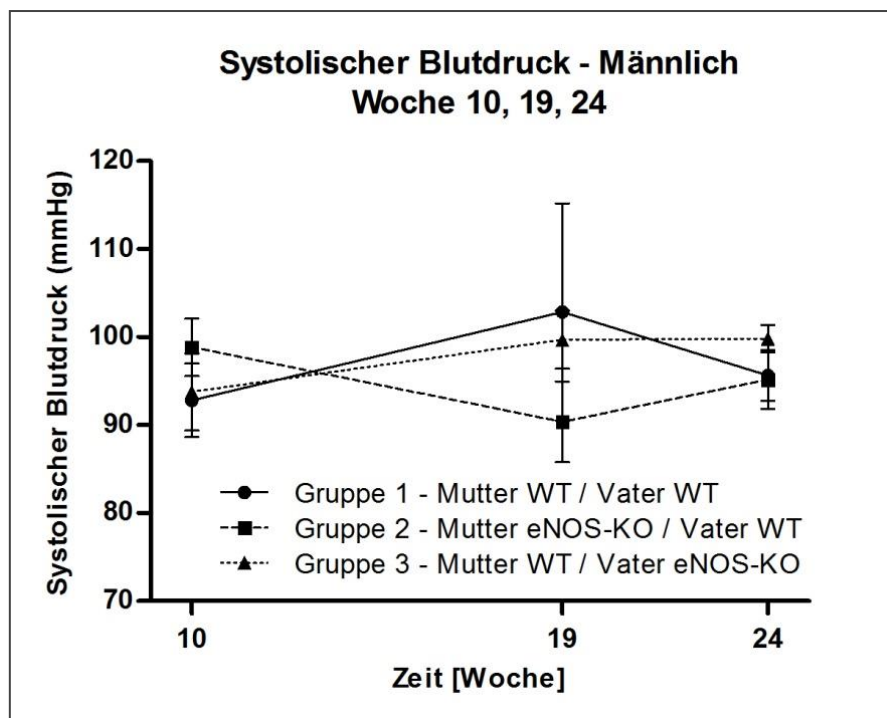


Abbildung 26: Systolischer Blutdruck der Männchen Woche 10, 19, 24.

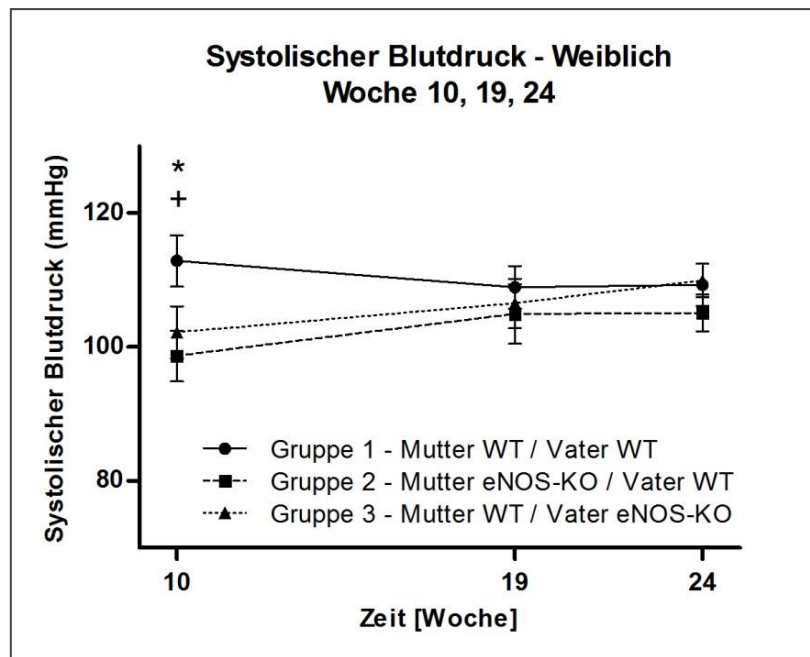


Abbildung 27: Systolischer Blutdruck der Weibchen Woche 10, 19, 24: * $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 2, + $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 3.

Bei der alleinigen Betrachtung der weiblichen Tiere zeigten sich signifikant niedrigere systolische Blutdrücke der Versuchsgruppe zwei im Vergleich mit den weiblichen Kontrolltieren ($p < 0,05$). Auch die weiblichen Tiere der Versuchsgruppe drei zeigten signifikant niedrigere systolische Blutdrücke im Vergleich mit den weiblichen Kontrolltieren ($p < 0,05$). Diese signifikanten Unterschiede zeigten sich lediglich in der 10. Versuchswoche (vgl. Abbildung 27).

4.6 Glukosestoffwechselfparameter

4.6.1 Nüchternglukosekonzentration

Die Messung der Nüchternglukosewerte erfolgte aus dem Plasma der Tiere in Woche 13, 17 und 21 (vgl. Kap. 3.4.4). In der Woche 13 und 17 ergaben sich weder bei der geschlechtsunspezifischen Betrachtung noch bei der geschlechtsspezifischen Betrachtung signifikante Unterschiede innerhalb der drei experimentellen Versuchsgruppen (vgl. Abbildung 28). In der Woche 21 hatten die Tiere der Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) signifikant höhere Nüchternglukosewerte im Vergleich zur Kontrollgruppe und Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) ($p < 0,05$). Die Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-

KO/Vater WT) hatte zum gleichen Zeitpunkt signifikant niedrigere Nüchtern-glukosewerte im Vergleich mit der Kontrollgruppe ($p < 0,05$) (vgl. Abbildung 28).

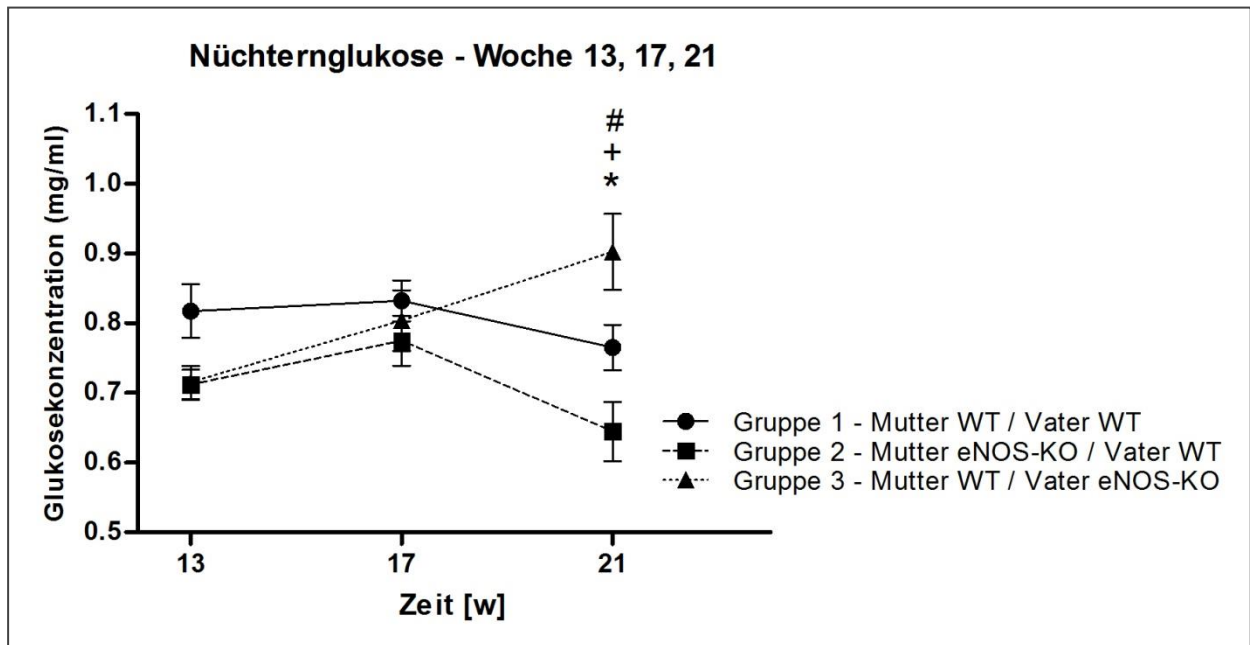


Abbildung 28: Nüchtern-glukose Woche 13, 17, 21: * $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 2, + $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 3, # $p < 0,05$ Gruppe 2 vs. Gruppe 3.

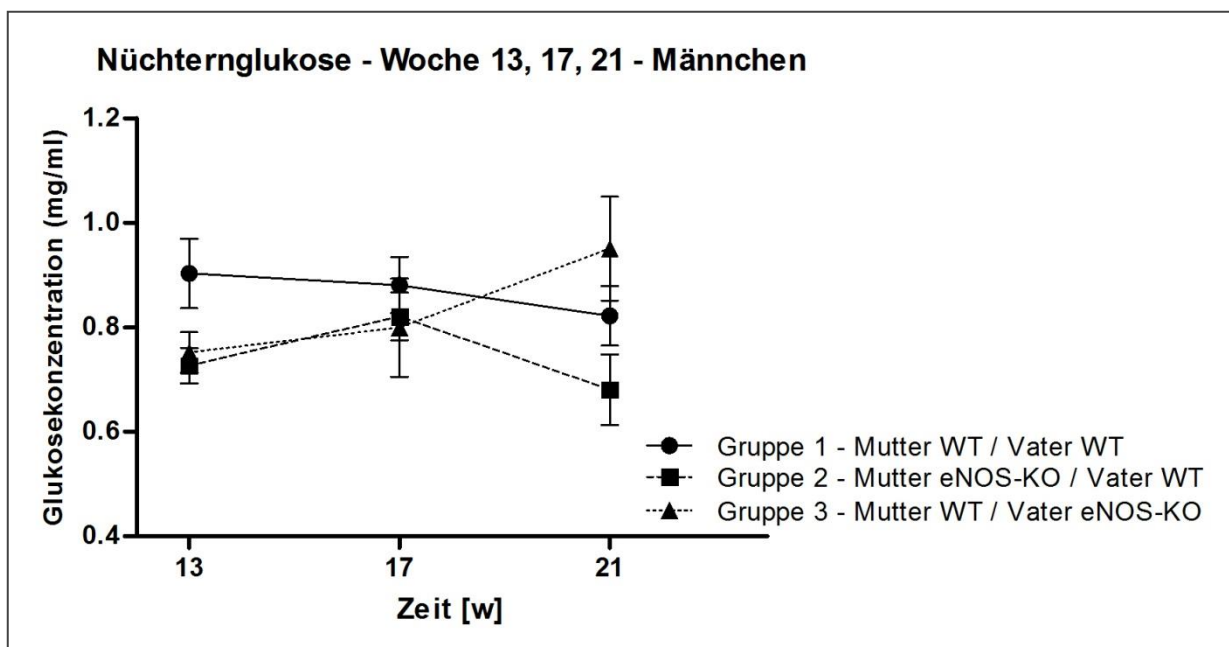


Abbildung 29: Nüchtern-glukose der männlichen Tiere Woche 13, 17, 21.

Bei der geschlechtsspezifischen Betrachtung der Männchen konnten innerhalb der Gruppen zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede bezüglich der Nüchternglukosewerte gemessen werden (vgl. Abbildung 29).

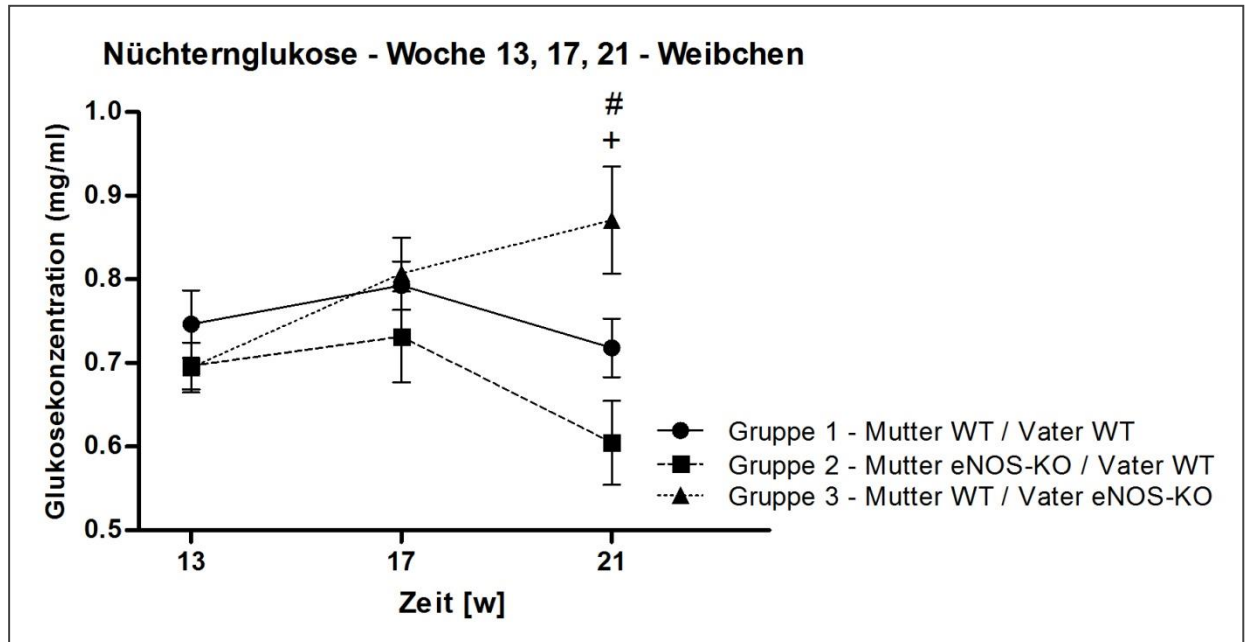


Abbildung 30: Nüchternglukose der weiblichen Tiere in Woche 13, 17, 21: + $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 3, # $p < 0,05$ Gruppe 2 vs. Gruppe 3.

Bei der geschlechtsspezifischen Betrachtung der Weibchen waren in der Versuchswoche 21 die Nüchternglukosewerte der Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) signifikant höher im Vergleich mit den anderen beiden experimentellen Versuchsgruppen ($p < 0,05$) (vgl. Abbildung 30).

4.6.2 Nüchterninsulinkonzentration

Die Messung der Nüchterninsulinwerte erfolgte ebenfalls aus dem Plasma der Tiere in Versuchswoche 17 und 21 (vgl. 3.4.4.). Es kam lediglich bei der geschlechtsspezifischen Betrachtung der Männchen der Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) in der 17. Versuchswoche zu signifikant höheren Insulinkonzentrationen im Vergleich mit den Männchen der Kontrollgruppe ($p < 0,05$) (vgl. Abbildung 31).

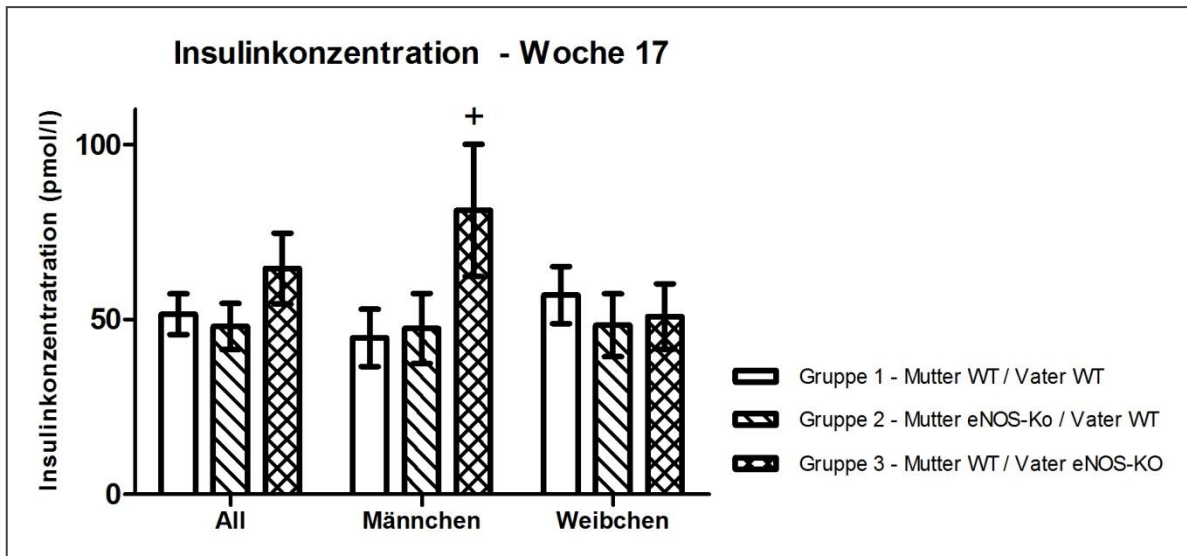


Abbildung 31: Insulinkonzentration Woche 17: + $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 3.

In der Woche 21 zeigten die Tiere der Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) signifikant höhere Insulinkonzentrationen im Vergleich zur Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) ($p < 0,05$). Bei der geschlechtsspezifischen Betrachtung konnten keine signifikanten Konzentrationsunterschiede festgestellt werden (vgl. Abbildung 32).

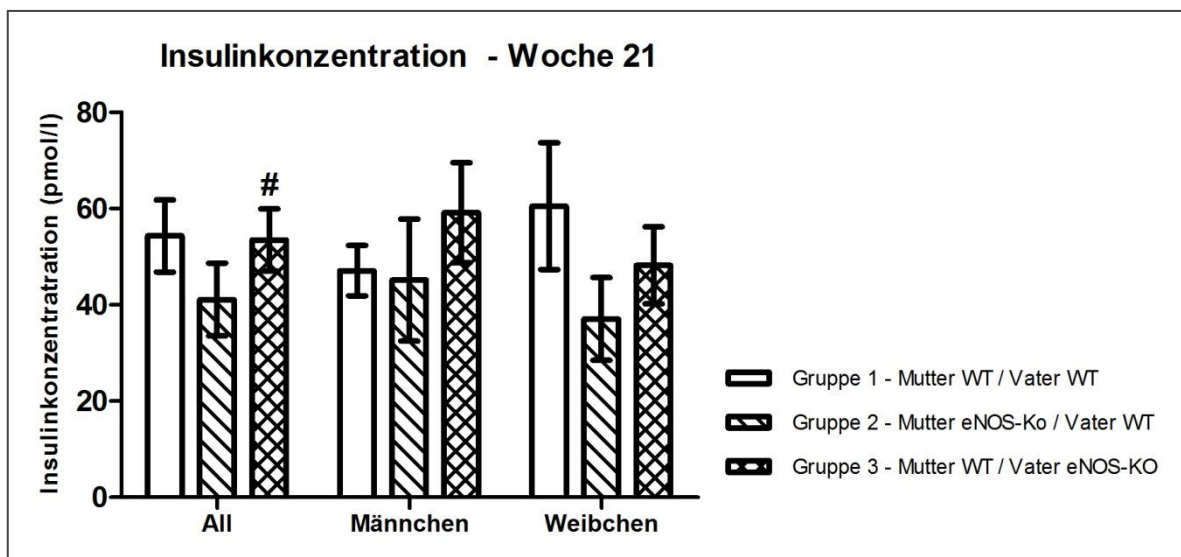


Abbildung 32: Insulinkonzentration Woche 21: # $p < 0,05$ Gruppe 2 vs. Gruppe 3.

4.6.3 HOMA- und QUICKI-Index

Der HOMA- und QUICKI-Index wurde in der 17. und 21. Versuchswoche aus dem Plasma der nüchternen Tiere bestimmt. Um diese Indices zu berechnen benötigt man die Nüchtern glukose- und Nüchterninsulinkonzentration (vgl. Kap. 3.4.4). Lediglich in der 21. Woche zeigte sich in der Versuchsgruppe drei gegenüber der Versuchsgruppe zwei ein signifikant höherer HOMA-Index ($p < 0,01$). Dem entsprechend zeigte der QUICKI-Index in der 21. Versuchswoche signifikant niedrigere Werte in der Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) im Vergleich zur Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) ($p < 0,01$). Bei der geschlechtsspezifischen Analyse zeigten sich jedoch keine wesentlichen Unterschiede bezüglich dieser beiden Indices (vgl. Tabelle 7).

		HOMA Woche 17	HOMA Woche 21	QUICKI Woche 17	QUICKI Woche 21
Mutter WT	Alle (N=47-52)	1,455±0,186	1,540±0,243	0,392±0,013	0,417±0,020
Vater WT	M (N=21-24)	1,374±0,317	1,433±0,240	0,411±0,027	0,389±0,012
	W (N=26-28)	1,521±0,224	1,632±0,405	0,377±0,009	0,441±0,036
Mutter eNOS +/-	Alle (N=30-33)	1,325±0,186	1,069±0,285 #	0,397±0,011	0,478±0,037 #
	M (N=15)	1,293±0,233	1,349±0,540	0,388±0,014	0,495±0,062
Vater WT	W (N=15-18)	1,351±0,287	0,789±0,183	0,405±0,017	0,461±0,042
Mutter WT	Alle (N=27-31)	2,047±0,530	1,751±0,300	0,384±0,014	0,374±0,009
Vater eNOS +/-	M (N=13-14)	2,761±1,098	2,092±0,560	0,361±0,013	0,367±0,014
	W (N=14-17)	1,460±0,325	1,434±0,251	0,403±0,022	0,381±0,012

Tabelle 7: HOMA- und QUICKI-Index Woche 12 und 17: # $p < 0,01$ Gruppe 2 vs. Gruppe 3.

4.6.4 Intrapertonealer Glukosetoleranztest

4.6.4.1 Glukosekonzentration

In der 24. Versuchswoche wurde ein intraperitonealer Glukosetoleranztest (ipGTT) durchgeführt (vgl. 3.4.5). Zum Messzeitpunkt null waren keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Glukosekonzentration innerhalb der drei Gruppen messbar. Nach 15 Minuten zeigten die Tiere der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) eine signifikant höhere Glukosekonzentration im Vergleich mit den anderen beiden experimentellen Gruppen ($p < 0,05$). 30 Minuten beziehungsweise 60 Minuten nach der Glukosebelastung konnten keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Glukosekonzentration innerhalb der drei Gruppen festgestellt werden (vgl. Abbildung 33).

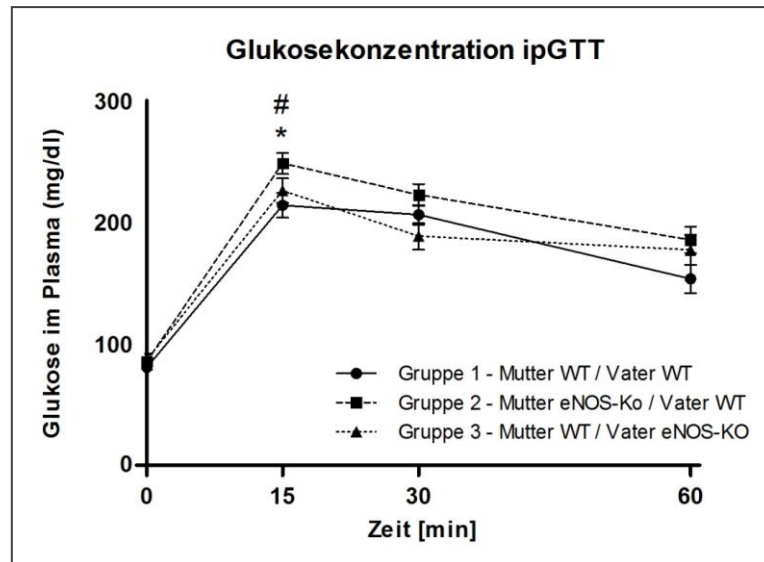


Abbildung 33: Glukosekonzentration während des intraperitonealen Glukosetoleranztest:
 * $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 2, # $p < 0,05$ Gruppe 2 vs. Gruppe 3.

Bei der alleinigen Betrachtung der männlichen Tiere zeigte die Versuchsgruppe zwei ebenfalls ausschließlich 15 Minuten nach der Glukosebelastung eine signifikant höhere Glukosekonzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,05$) (vgl. Abbildung 34).

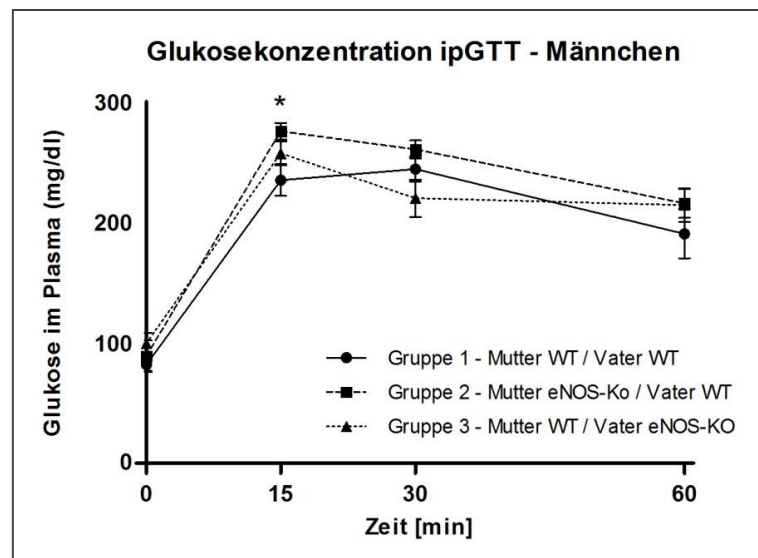


Abbildung 34: Glukosekonzentration der Männchen während des intraperitonealen Glukosetoleranztest: * $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 2.

Bei der alleinigen Betrachtung der weiblichen Tiere wurden keine wesentlichen Konzentrationsunterschiede während des intraperitonealen Glukosetoleranztests zwischen den Versuchsgruppen gemessen (vgl. Abbildung 35).

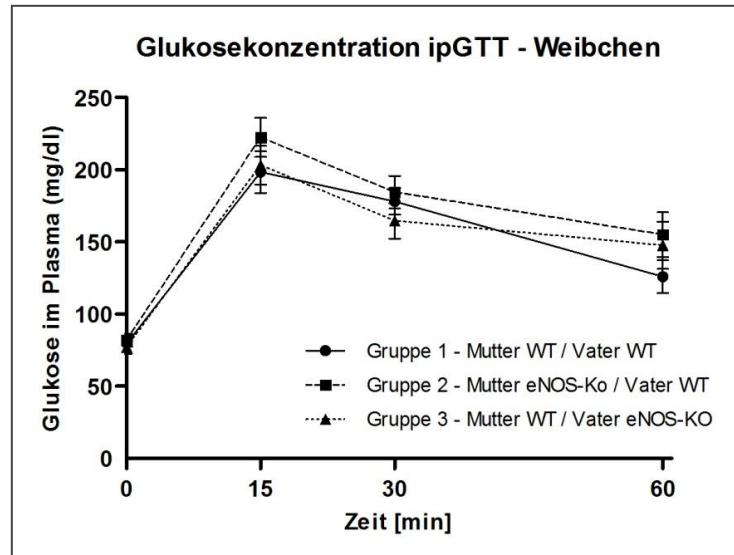


Abbildung 35: Glukosekonzentration der Weibchen während des intraperitonealen Glukosetoleranztest.

4.6.4.2 *Insulinkonzentration*

Die Insulinkonzentration während des ipGTT zeigte lediglich zum Messzeitpunkt null einen signifikant höhere Konzentration bei den Tieren der Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) im Vergleich mit den Tieren der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) ($p < 0,05$). 15 beziehungsweise 60 Minuten nach der Glukosebelastung kam es zu keinen wesentlichen Konzentrationsunterschieden zwischen den drei experimentellen Gruppen (vgl. Abbildung 36).

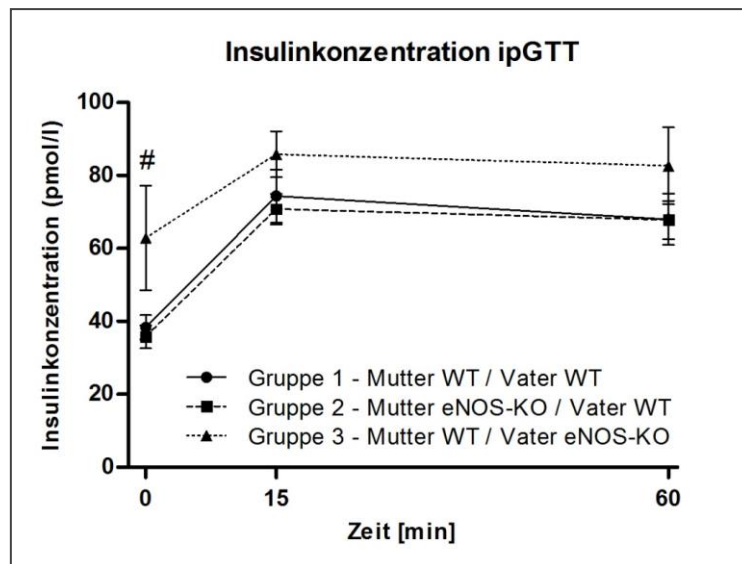


Abbildung 36: Insulinkonzentration während des intraperitonealen Glukosetoleranztests: # $p < 0,05$ Gruppe 2 vs. Gruppe 3.

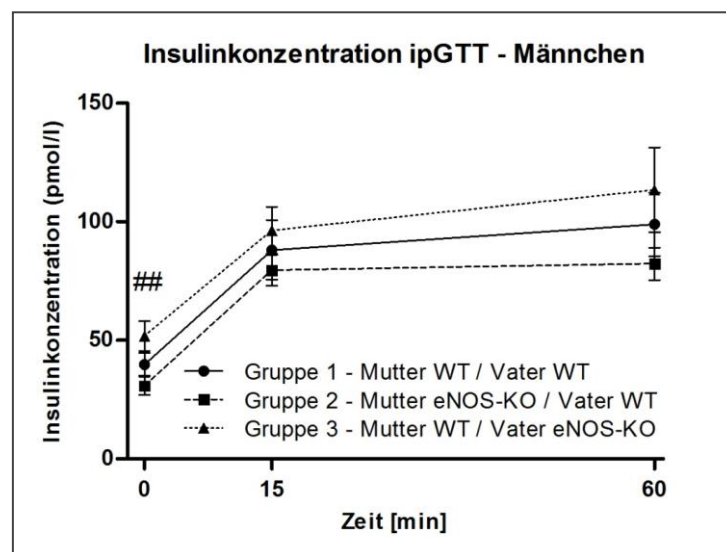


Abbildung 37: Insulinkonzentration der Männchen während des intraperitonealen Glukosetoleranztests. ## $p < 0,01$ Gruppe 2 vs. Gruppe 3.

Bei der alleinigen Betrachtung der Männchen zeigten die Tiere der Gruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) zum Messzeitpunkt null eine signifikant höhere Insulinkonzentration im Vergleich zu den Tieren der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) ($p < 0,01$) (vgl. Abbildung 37).

Bei der alleinigen Betrachtung der Weibchen zeigten die Tiere der Gruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) ebenfalls, jedoch erst 15 Minuten nach der Glukosebelastung,

signifikant höhere Insulinkonzentrationen im Vergleich zu den Tieren der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) ($p < 0,05$) (vgl. Abbildung 38).

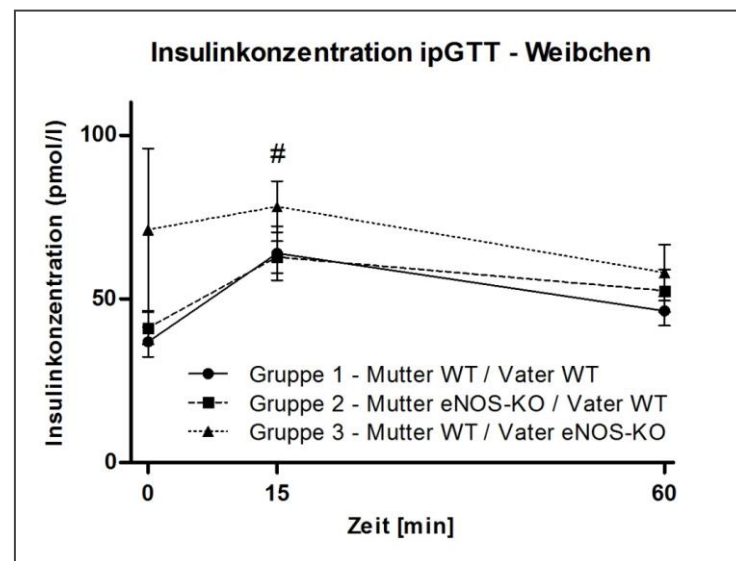


Abbildung 38: Insulinkonzentration der Weibchen während des intraperitonealen Glukosetoleranztests: # $p < 0,05$ Gruppe 2 vs. Gruppe 3.

4.7 Histologie der Pankreas

Mittels einer HE-Färbung wurden die Inselorgandichte und die Inselorgangröße bestimmt (vgl. Kap 3.6.1.) Weder im Vergleich der drei experimentellen Versuchsgruppen, noch bei der geschlechtsspezifischen Betrachtung zeigten sich signifikante Unterschiede bezüglich der Inselorgandichte (vgl. Abbildung 39, Abbildung 40) beziehungsweise der Inselorgangröße (vgl. Abbildung 41, Abbildung 42).

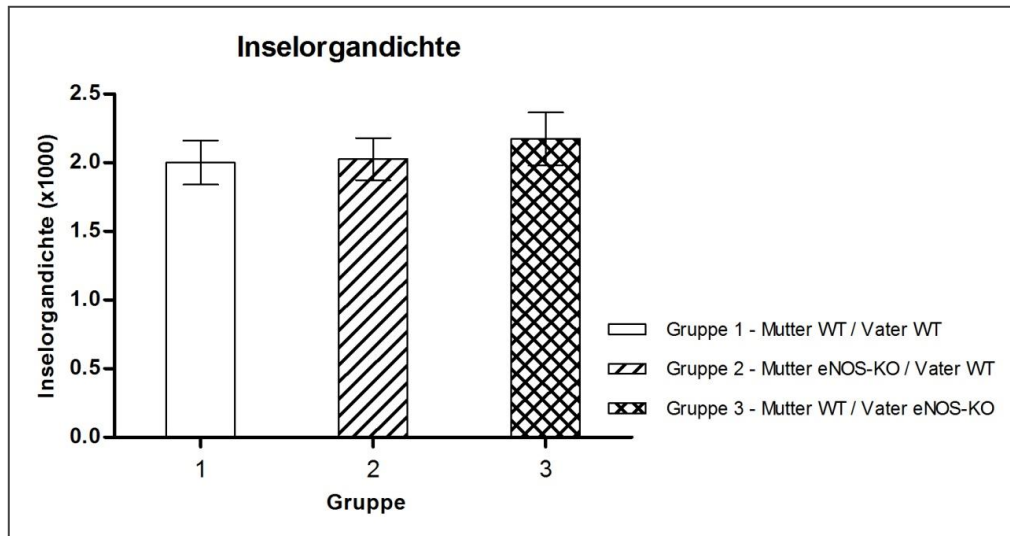


Abbildung 39: Inselorgandichte.

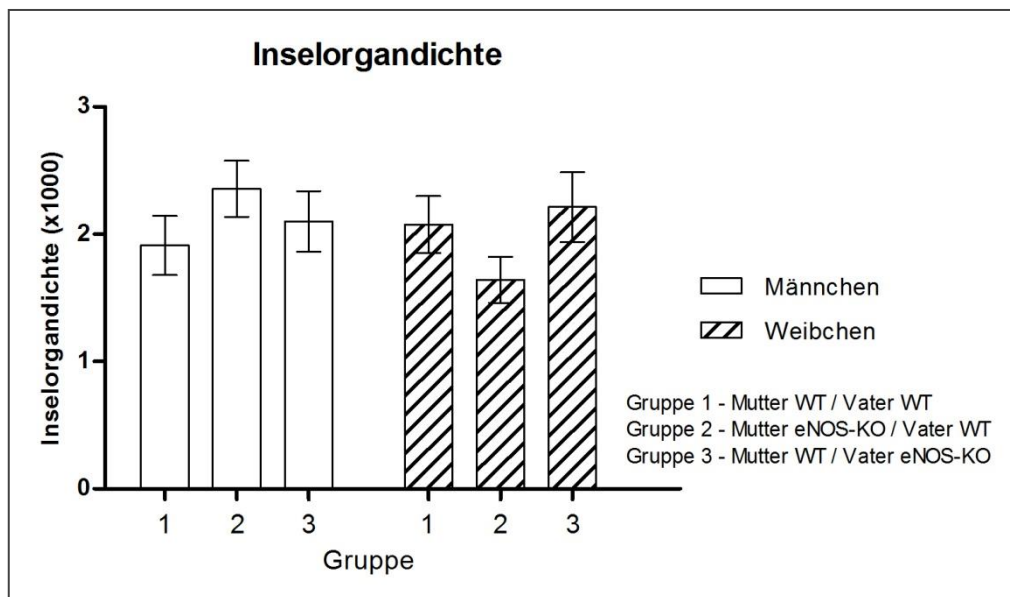


Abbildung 40: Geschlechtsspezifische Inselorgandichte.

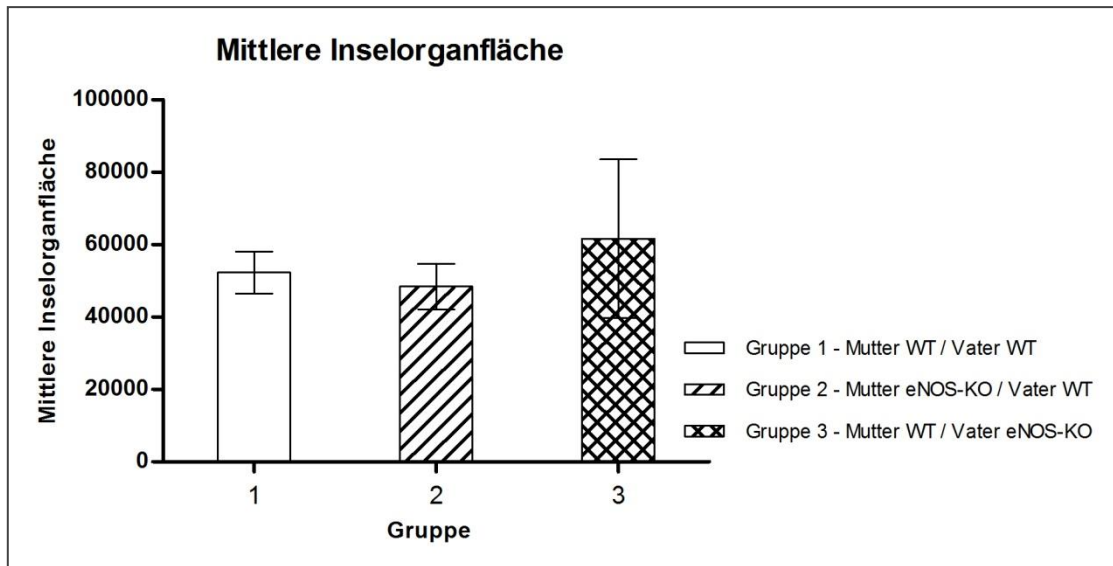


Abbildung 41: Mittlere Inselorganfläche.

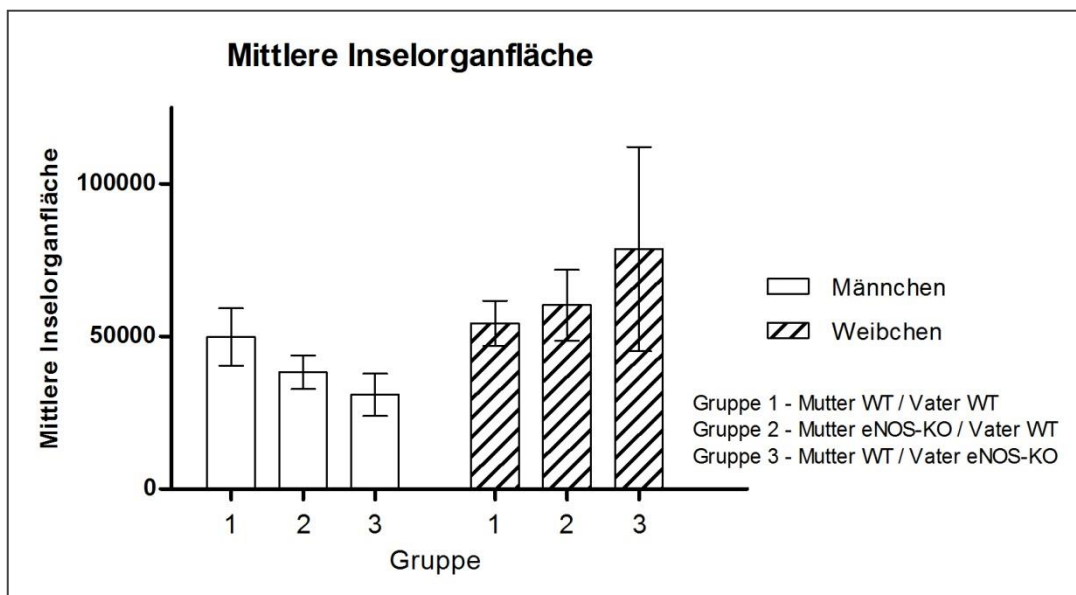


Abbildung 42: Geschlechtsspezifische Inselorganfläche.

Mittels der immunhistochemischen Färbung wurde der Beta-Zellanteil der Inselorgane bestimmt (vgl. Kap. 3.6.2). Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Beta-Zellanteile weder bei geschlechtsunspezifischer, noch bei geschlechtsspezifischer Betrachtung der drei experimentellen Versuchsgruppen. (vgl. Abbildung 43, Abbildung 44).

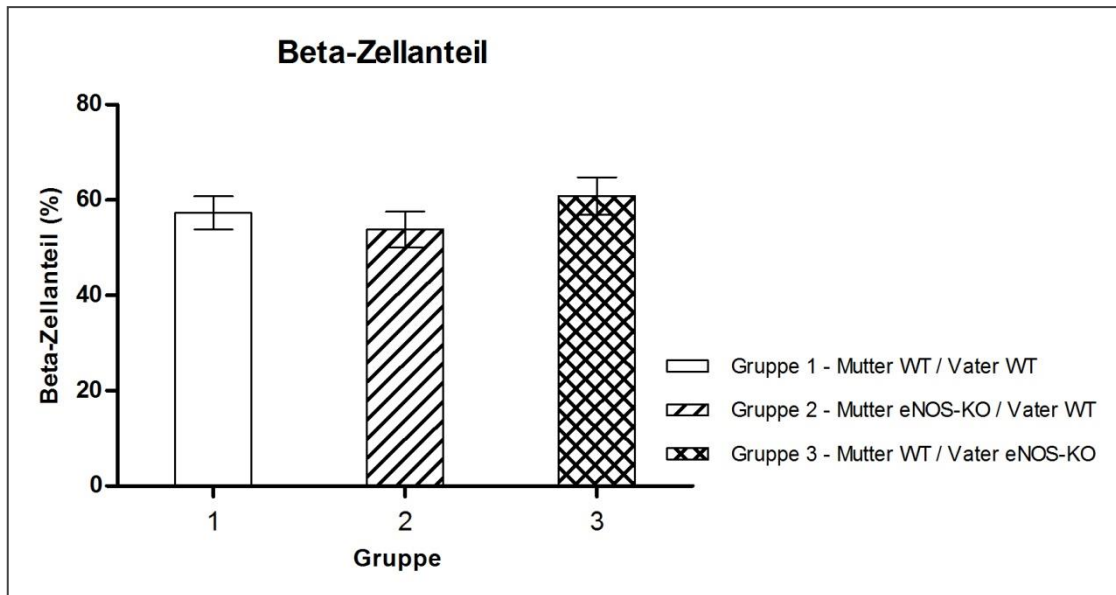


Abbildung 43: Beta-Zellanteil der Inselorgane.

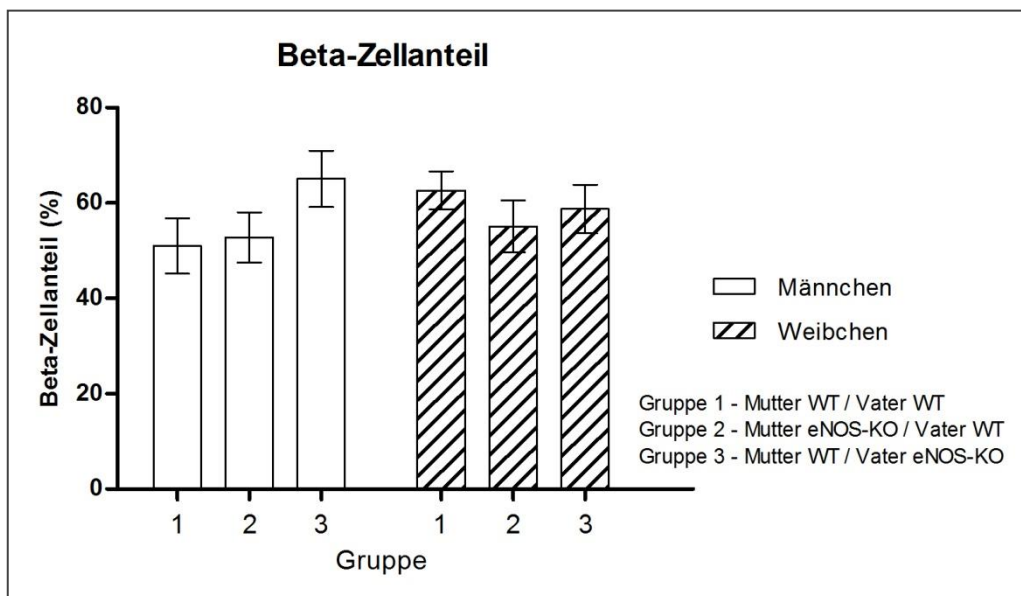


Abbildung 44: Geschlechtsspezifischer Beta-Zellanteil der Inselorgane.

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Geburtsgewichte und Wachstum

- Der maternale eNOS-KO führte bei den männlichen Wildtypnachkommen zu einem signifikant niedrigeren Geburtsgewicht und einer signifikant niedrigeren Körperlänge.
- Die männlichen Wildtypnachkommen der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) zeigten postnatales Aufholwachstum. Dies führte im Wachstumsverlauf dazu, dass sie kurzzeitig sogar signifikant schwerer waren als die Tiere der Kontrollgruppe. Eine Tendenz zu einem höheren Körpergewicht im Vergleich zu den anderen beiden experimentellen Gruppen blieb bis zum Versuchsende bestehen jedoch bei fehlender Signifikanz.
- Der paternale eNOS-KO nahm keinen signifikanten Einfluss auf die Geburtsgewichte der Wildtypnachkommen. Im Wachstumsverlauf waren jedoch die Nachkommen fast durchgehend signifikant schwerer im Vergleich zu den anderen beiden experimentellen Gruppen.

Glukosestoffwechsel

- Der maternale eNOS-KO führte bei den Wildtypnachkommen zu einer signifikant höheren Insulinsensitivität in der 21. Versuchswoche.
- Der paternale eNOS-KO führte bei den Wildtypnachkommen zu einer signifikant erhöhten Insulinresistenz in der 21. Versuchswoche.
- Die Morphologie und Funktion des endokrinen Pankreas wurden weder durch den maternalen noch durch den paternalen eNOS-KO signifikant verändert.

5.2 Geburtsgewichte und Wachstumsverlauf

5.2.1 Maternale Programmierungseffekte

Bei Betrachtung der Geburtsgewichte waren die Nachkommen der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) signifikant leichter als die Nachkommen der Kontrollgruppe bei vergleichbarer Wurfgröße (vgl. Abbildung 11). Bei der geschlechtsspezifischen Betrachtung waren lediglich die männlichen Nachkommen der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) signifikant leichter als ihre männlichen Artgenossen der Kontrollgruppe (vgl. Abbildung 12). Vor dem Hintergrund, dass ihre Muttertiere einen heterozygoten eNOS-KO hatten und der Vasodilatator Stickstoffmonoxid an der Regulation der Plazentadurchblutung sowie der Entwicklung des Plazentagefäßbettes beteiligt ist, (87) (88) könnten die niedrigeren Geburtsgewichte durch Veränderungen des uteroplazentaren Blutflusses verursacht worden sein (89) (90). Des Weiteren konnte im Rahmen eines Mausmodells eine veränderte meiotische Reifung der Eizellen bei eNOS-KO Mäusen dargestellt werden (126). Demzufolge könnten die signifikant niedrigeren Geburtsgewichte der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) auch aus einer gestörten Eizellreifung resultieren. Da im Rahmen dieses Versuchs weder die Plazentafunktion bzw. -morphologie noch die meiotische Eizellreifung untersucht wurden, bleiben solche Annahmen jedoch rein hypothetisch. Zumal die besagten Studien ausschließlich an homozygoten eNOS-KO Muttertieren oder mittels NOS-Inhibitoren durchgeführt wurden und somit nicht ohne weiteres auf das vorliegende Mausmodell übertragen werden können (87) (88) (89) (90) (126). Laut aktueller Studienlage verursacht ein heterozygoter Knockout im Tiermodell unter basalen Bedingungen keine wesentliche Beeinträchtigung der Körperphysiologie (Blutdruck, Gefäßreagibilität) (85). Nur für die Aufrechterhaltung eines normalen Lungendrucks scheinen auch unter basalen Bedingungen mehr als 50% der eNOS-Expression von Nöten zu sein (86). Die Annahme, dass ein intaktes eNOS-Gen ausreicht, um die Funktion von eNOS auch unter körperlicher Belastung zu gewährleisten, ist jedoch mehrfach widerlegt. In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass bei einem heterozygoten eNOS-KO die NO-Verfügbarkeit unter körperlicher Belastung nicht ausreichend gesteigert werden kann (86) (85). Geht man bei einer Schwangerschaft von einer körperlichen Belastungssituation aus kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein heterozygoter mütterlicher eNOS-KO die Plazentadurchblutung ausreichend stark reduziert um eine Wachstumseinschränkung,

welche Ausdruck in einem reduzierten Geburtsgewicht findet, zu bewirken. Mittels dreidimensionalen MRT Aufnahmen verglichen Pallares et al. das intrauterine Wachstum von Wildtypnachkommen heterozygoten eNOS-KO, homozygoten eNOS-KO und Wildtypelterntieren am 13. Tag der Schwangerschaft. Dabei waren lediglich die WT Nachkommen der homozygoten eNOS-KO Elterntiere in ihren Wachstum signifikant eingeschränkt im Vergleich zur Kontrollgruppe (127). Jedoch kann anhand dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden, dass die mangelnde NO Verfügbarkeit der werdenden Mutter während der Spätschwangerschaft eine Wachstumsretardierung der Feten verursacht. Vor allem nicht wenn man bedenkt, dass mit zunehmender Schwangerschaftsdauer die Ansprüche an die Plazenta steigen. Hinsichtlich des Zeitfensters, währenddessen mangelnde NO-Verfügbarkeit eine intrauterine Wachstumsretardierung verursacht, herrscht weiterhin Uneinigkeit. In *post mortem* Untersuchungen wird einerseits die Implantationsphase und die frühe embryonale Phase als kritisches Zeitfenster für eine intrauterine Wachstumsretardierung unter mütterlichem NO Mangel beschrieben (128), auf der anderen Seite die Spätschwangerschaft (58) (92). Zusammenfassend kann man sagen, dass anhand der aktuellen Studienlage nicht davon ausgegangen werden kann, dass ein heterozygoter eNOS-KO der Muttertiere eine ausreichende Plazentafunktion über den gesamten Schwangerschaftsverlauf gewährleisten kann.

Geschlechtsabhängige Programmierungseffekte wie im vorliegenden Tierversuch die signifikante Reduktion des Geburtsgewichts ausschließlich bei den männlichen Versuchstieren, sind in der Literatur hinreichend beschrieben (48) (129). Die Erklärungsansätze für solche geschlechtsabhängigen Unterschiede sind vielfältig und teils auch widersprüchlich. Eine große chinesische Studie, welche Daten der *Great Leap Forward* Hungersnot 1959-1961 auswertete konnte zeigen, dass in hungernden humanen Populationen langfristig signifikant häufiger Mädchen geboren werden (130). Andere Hungerskatastrophen, wie zum Beispiel der holländische Hungerwinter 1944-1945 oder die Belagerung Leningrads 1942, veränderten die Geschlechterverhältnisse der nachfolgenden Generationen nicht (131) (132). Allerdings war die Dauer dieser Hungerskatastrophen im Vergleich zur *Great Leap Forward* Hungersnot deutlich kürzer und die untersuchte Stichprobe kleiner. Der holländische Hungerwinter hielt sieben Monate und die Belagerung Leningrads nur sechs Monate an. Die *Great Leap Forward*-Hungersnot hielt von 1959-1961 an und betraf 300000 Menschen. Auch die zeitliche

Erfassung der Daten aus China war im Vergleich wesentlich umfangreicher, da die Studie den Zeitraum von 1929-1982 erfasste. Dabei veränderten sich die Geschlechterverhältnisse erst 1960 zu Gunsten der Mädchen und normalisierten sich 1964 wieder. Demzufolge kann angenommen werden, dass der holländische Hungerwinter und die Belagerung Leningrads zu kurz waren, um das Geschlechterverhältnis signifikant zu verändern. Solche Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass der männliche Genotyp eine höhere Vulnerabilität gegenüber einem reduzierten mütterlichen Allgemeinzustand aufweist und der weibliche Genotyp diesbezüglich über eine bessere Kompensationsmöglichkeit verfügt.

Die Muttertiere in dem zugrunde liegendem Versuch waren zu keinem Zeitpunkt einer Nahrungsmittelknappheit ausgesetzt. Vielmehr ist anzunehmen, dass durch die möglicherweise vorliegende Störung der plazentaren Durchblutung eine gewisse intrauterine Minderversorgung vorlag. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Wachstum der männlichen Feten durch eine reduzierte Plazentadurchblutung (vgl. Kap. 1.5, 1.4) stärker beeinträchtigt wurde als das Wachstum der weiblichen Feten. Interessanterweise haben männliche Neugeborene im Verhältnis zu ihrem Geburtsgewicht kleinere Plazenten als weibliche Neugeborene (133). Somit arbeitet die Plazenta eines männlichen Feten effizienter. Derzeit wird diskutiert, ob diese Effizienz auf Kosten der Reservekapazität geht. Diese eingeschränkte Reservekapazität könnte die höhere Vulnerabilität der männlichen Nachkommen gegenüber einer suboptimalen intrauterinen Nährstoffversorgung erklären (134). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass während der Präimplantationsphase (in dieser Phase sind geschlechtsabhängige hormonelle Einflüsse ausgeschlossen) männliche Embryonen schneller wachsen und eine höhere Stoffwechselrate aufweisen als weibliche Embryonen (135). Vor dem Hintergrund, dass mangelnde NO-Verfügbarkeit in dieser Entwicklungsphase die Trophoblasteninvasion und Apoptose negativ beeinflusst, könnte dies ein weiterer Erklärungsansatz für die höhere Vulnerabilität männlicher Tiere sein (87) (88).

Zudem gibt es erste Hinweise, dass der kindliche Genotyp die Physiologie der werdenden Mutter beeinflussen kann (28) (29) (136) (137). Dieses Phänomen wurde sehr eindrucksvoll bei Müttern dargestellt die ein Kind mit Beckwith Widemann Syndrom erwarteten. Denn diese werdenden Mütter zeigten ein deutlich höheres Risiko an einem Gestationsdiabetes (GDM) und/oder einem Schwangerschaftshypertonus (PIH) zu

erkranken im Vergleich zu Schwangerschaften mit nicht betroffenen Geschwisterkindern (28) (vgl. Kap.1.1). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch ein heterozygoter eNOS-KO des Feten die Physiologie der werdenden Mutter verändert. Bei Mehrlingsgeburten, wie bei dem zugrunde liegenden Mausmodell, könnte dies bedeuten, dass die bloße intrauterine Anwesenheit eines oder mehrerer heterozygoter eNOS-KO Feten die Reifungsbedingungen aller Feten eines Wurfs beeinflusst. So ein „Geschwister-Effekt“ könnte dann auch paternale Programmierungseffekte erklären. Denn auch wenn postnatal nur die Wildtypen berücksichtigt werden, reifen intrauterin auch heterozygote eNOS-KO Mäuse heran, die den Genpolymorphismus bezüglich des eNOS-Gens von ihren Vätern geerbt haben. Diese Annahme ist jedoch rein hypothetisch und nicht belegt.

Eindrucksvoll ist zudem die postnatale Gewichtsentwicklung der männlichen Nachkommen der Gruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) sie entspricht dem sogenannten postnatalen Aufholwachstum. Dieses Wachstumsmuster führte im Verlauf dazu, dass die Tiere mit dem niedrigsten Geburtsgewicht kurzzeitig signifikant schwerer waren als die Tiere der Kontrollgruppe. Jedoch zeigte sich diese Umkehr der Gewichtsverhältnisse nur bei geschlechtsunspezifischer Betrachtung und verlor sich im weiteren Verlauf (vgl. Kap. 4.2). Neben den Körpergewichten wurde auch die Körperlänge der Tiere erfasst. Das Erheben der Körperlängen erwies sich jedoch bei nicht sedierten Tieren als äußerst schwierig und wurde am Tag 13 aufgrund ungenauer Messwerte eingestellt. Somit basiert das Wachstum der Tiere ab Tag 13 allein auf dem Körpergewicht. Von Tag eins bis Tag 13 zeigte die Entwicklung der Körperlängen zwischen den drei experimentellen Gruppen einen ähnlichen Verlauf wie die Entwicklung der Körpergewichte. Die Tiere der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater-KO) waren in der frühen postnatalen Phase nicht nur signifikant leichter, sondern auch signifikant kürzer als die Tiere der anderen beiden experimentellen Gruppen. Allerdings waren die Tiere der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) zu keinem Zeitpunkt länger als die Tiere der anderen beiden experimentellen Gruppen (vgl. Kap. 4.3). Zusammenfassend kann man sagen, dass die Tiere der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) nicht nur ein aufholendes Wachstum, sondern kurzfristig auch ein einholendes Wachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten. Bei dem Längenwachstum der Versuchsgruppe zwei zeigte sich ausschließlich ein aufholendes Wachstum. Das postnatale Aufholwachstum ist ein

wichtiger Parameter, der mit dem Auftreten von Krankheitsrisiken im Erwachsenenalter korreliert. Anhand von Tiermodellen und epidemiologischen Humanstudien konnte mehrfach gezeigt werden, dass Aufholwachstum nach IUGR mit einem erhöhten Risiko für Erkrankungen aus dem Formenkreis des metabolischen Syndroms einhergeht (21) (44). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die disproportionale Fettakkumulation für das postnatale Aufholwachstum charakteristisch ist. Dabei kommt es vornehmlich zur Zunahme des Körperfettes und weniger zur Zunahme der Muskel- oder Organmasse. Dieses Phänomen wird auch „*catch-up fat*“ genannt (44), wobei die Fettspeicherung vor allem in den viszeralen und weniger in den subkutanen Fettdepots erfolgt (45). Die viszeralen Fettdepots dienen als Produzent diverser proinflammatorischer Mediatoren (Interleukine, Tumornekrosefaktor Alpha etc.). Diese Mediatoren sind an der Entstehung von Arteriosklerose und Diabetes maßgeblich beteiligt (46) und könnten damit das Bindeglied zwischen dem postnatalen Aufholwachstum und der erhöhten Krankheitsveranlagung im Erwachsenenalter darstellen. Dies würde auch erklären, weshalb die Diabetes mellitus Inzidenz der zeitlebens BMI schwachen indischen Landbevölkerung derart hoch ist, denn sie werden mit einem persistierenden hohem Körperfettanteil geboren (7).

Beim Menschen findet das postnatale Aufholwachstum größtenteils in den ersten 6-12 Lebensmonaten statt. Im Alter von zwei Jahren haben fast 90% der „*small for gestational age*“ (SGA) Kinder ein Körpergewicht im Normalbereich. Die Kompensation der verringerten Körpergröße erfolgt eher schrittweise und dauert bis zum zweiten bzw. dritten Lebensjahr (138). Im vorliegenden Mausmodell ist die Zeitspanne bis zur Kompensation der Körperlänge sogar kürzer als die Zeitspanne bis zur Kompensation der Körpergewichte. Bezüglich des Längenwachstums nähern sich die drei experimentellen Gruppen bis zum 13. Lebenstag einander an. Die Körpergewichte der drei experimentellen Gruppen näherten sich mit geschlechtsspezifischen Unterschieden bis zur 17. Versuchswoche aneinander an (vgl. Kap. 4.2 und Kap. 4.3). Laut aktueller Studienlage wird das kurzfristige und langfristige *Outcome* der SGA durch das Aufholwachstum verschlechtert (21). Im vorliegenden Tierversuch konnte das langfristige *Outcome* der Tiere bedauerlicherweise nicht berücksichtigt werden. Soto et al. zeigten, dass die Ausprägung der Glukosestoffwechselstörung auch durch die Art des postnatalen Wachstumsmusters moduliert wird. In einer Humanstudie zeigten sie, dass die Nüchterninsulinwerte zum Zeitpunkt der Geburt und im Alter von einem Jahr

signifikant erhöht waren, wenn sich das sogenannte postnatale Aufholwachstum auf das Körpergewicht bezog. Bezog sich das Aufholwachstum hingegen auf die Körperlänge, war die postprandiale Insulinsekretion erhöht (43). In dem zugrunde liegenden Tierexperiment bezog sich das Aufholwachstum zu gleichen Teilen auf die Körperlänge und das Körpergewicht. Eine Festlegung des dominierenden Wachstumsmusters ist demzufolge nicht möglich. Ebenso wurden der Körperfettanteil und dessen Speicherung nicht gemessen. Es bleibt auch unklar, ob die männlichen Tiere der Gruppe zwei (Mutter eNOS-KO / Vater WT), welche bei Geburt signifikant leichter waren ($p < 0,05$) als die Tiere der anderen beiden experimentellen Gruppen (vgl. Kap. 4.1) und ein postnatales Aufholwachstum zeigten (vgl. Kap. 4.2 Kap. 4.3), eine Neigung zum metabolischen Syndrom entwickelt hätten. Die Ergebnisse der Glukosestoffwechselfparameter deuten zumindest darauf hin (vgl. Kap. 4.6). Im Wachstumsverlauf (vom 120.-140. Lebenstag) zeigt sich ebenfalls eine Tendenz dieser Tiere zu einem höheren Körpergewicht im Vergleich zu den anderen beiden experimentellen Gruppen, jedoch bei fehlender Signifikanz (vgl. Kap. 4.2). Unter Laborbedingungen beträgt die Lebenszeit einer C57/BL6-Maus circa 120 Wochen (139). Dementsprechend erreichten die Mäuse bei einem Versuchsaufbau von 25 Wochen gerade das frühe Erwachsenenalter. Programmierungseffekte, die sich im Erwachsenenalter manifestieren, konnten somit nicht vollständig erfasst werden.

5.2.2 Paternale Programmierung des Wachstumsverlaufs

Bei Betrachtung der Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) kommt es interessanterweise ebenfalls zu signifikanten Unterschieden im Wachstumsverlauf. Im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) waren die Tiere der Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) fast durchgehend signifikant schwerer. Die Gewichtsverläufe (vgl. Kap. 4.2) der Versuchsgruppe drei (Mutter WT/ Vater eNOS-KO) sind insofern interessant, da die Tiere dieser Versuchsgruppe selbst und deren Mütter genotypisch Wildtypen waren. Somit kann weder eine Störung des utero-plazentaren Blutflusses noch eine veränderte meiotische Reifung der Eizellen für dieses Phänomen verantwortlich sein. Hier muss von paternalen Programmierungseffekt, verursacht durch den heterozygoten eNOS-KO der Vätertiere und dem homozygoten eNOS-KO der Großväter ausgegangen werden (vgl. Abbildung 3). Bei solchen Phänomenen steht vor allem die Epigenetik im Zentrum der Erklärungsansätze. Um Wiederholungen bei der Einordnung solcher paternalen

Programmierungseffekte hinsichtlich des aktuellen Forschungsstands zu vermeiden, verweise ich an dieser Stelle auf das Kapitel der paternalen Programmierung des Glukosestoffwechsels (vgl. Kap.5.3.2).

5.3 Glukosestoffwechsel

Um beurteilen zu können, ob ein mütterlicher oder väterlicher eNOS-KO Einfluss auf den Glukosestoffwechsel der Versuchstiere nimmt, wurden die Nüchternglukosewerte und die Nüchterninsulinkonzentration bestimmt (vgl. Kap. 3.4.4). Aus diesen Daten wurde der HOMA- und QUICKI-Index berechnet (vgl. Kap. 3.4.4). Auch wurden im intraperitonealen Glukosetoleranztest die Glukose- und Insulinkonzentrationen der Versuchstiere nach einer Glukosebelastung erfasst (vgl. Kap. 3.4.5). Der endokrine Pankreasanteil macht nur 2% der Organmasse aus und liegt in Form von Langerhans-Inseln (Inselorgane) verstreut im exokrinen Gewebe mit der höchsten Dichte im Pankreasschwanz. Da das endokrine Pankreas unter anderem die Hormone Insulin und Glukagon, welche antagonistisch den Blutzuckerspiegel beeinflussen, sezerniert wurde die Inselorgandichte und die Inselorgangröße mit Hilfe der HE-Färbung bestimmt (vgl. 3.5.4) (140). Mit dieser Methode können morphologische Veränderungen des endokrinen Pankreas erfasst werden. Zusätzlich wurde mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung der insulinproduzierende β -Zellanteil der Inselorgane dargestellt.

5.3.1 Maternale Programmierung des Glukosestoffwechsels

Bei den Nachkommen der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) zeichnete sich bezüglich der HOMA- und QUICKI-Indices lediglich eine erhöhte Insulinsensitivität im Vergleich zur Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) ab (vgl. Tabelle 7). Dieses Ergebnis wiederum entspricht den signifikant niedrigeren Nüchternglukosewerten dieser Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO)(Woche 21). An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass der HOMA und QUICKI-Index bisher nur an Menschen gegen den euglykämisch-hyperinsulinämische Clamp-Test verglichen wurde und somit der Aussagewert an Tiermodellen derzeit nicht ausreichend belegt ist (124)(vgl. Kap. 3.4.4). Die signifikant niedrigeren Nüchternglukosekonzentrationen der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) in der Versuchswoche 21. (vs. Kontrollgruppe), gepaart mit den signifikant niedrigeren HOMA-Index und signifikant höheren QUICKI Index in

der 21. Versuchswoche im Vergleich zur Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) deuten auf eine erhöhte Insulinsensitivität hin (vgl. Tabelle 7, Abbildung 28). Langley et al. und Ozanne et al. beschrieben unabhängig voneinander eine verbesserte Insulinsensitivität bei den Nachkommen proteinmangel ernährter Ratten (141) (142). Ozanne et al. konnten weiterführend darstellen, dass die anfänglich erhöhte Insulinsensitivität bei den Nachkommen im Alter von 15 Monaten in einer gestörten Glukosetoleranz der Skelettmuskulatur gipfelte (142). Vor diesem Hintergrund und dem Umstand, dass sich bei den Nachkommen der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) in der 24. Versuchswoche ein signifikant höherer *Area under the curve* (AUC) für Glukose ergab, könnte die erhöhte Insulinsensitivität ein früher Hinweis auf eine sich entwickelnde Störung der Glukosehomöostase auch im vorliegenden Modell sein (143).

Weder die Inselorgandichte, die Inselorgangröße noch der β -Zellanteil des Inselorgans zeigte im Vergleich der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) mit den anderen beiden experimentellen Gruppen, noch bei der geschlechtsspezifischen Betrachtung signifikante Unterschiede (vgl. Abbildung 43, Abbildung 44). Es wurden die Pankreasmorphologie und der β -Zellanteil der Inselorgane der Wildtypnachkommen durch den maternalen eNOS-KO nicht beeinflusst. Somit spiegeln sich auch die Veränderungen des Glukosestoffwechsels innerhalb der drei experimentellen Gruppen nicht in der Morphologie und dem β -Zellanteil der Inselorgane wieder.

Zahlreiche Nagermodelle zeigten, dass eine intrauterine Nährstoffreduktion zu einer veränderten Pankreasmorphologie der Nachkommen führt. Unter einem intrauterinen Proteinmangel reduzierte sich die β -Zellmasse, die Insulinkonzentration der β -Zellen und die Inselorgandichte der Nachkommen signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe (100). Bei einer globalen intrauterinen Nährstoffreduktion zeigen die Nachkommen zusätzlich eine Reduktion des gesamten Pankreasgewebes. Solche nachteiligen Auswirkungen einer intrauterinen Mangelversorgung auf die Pankreasmorphologie und -funktion der Nachkommen konnte trotz adäquater postnataler Ernährung nicht vollständig kompensiert werden und führte zu einer diabetischen Stoffwechsellage im Erwachsenenalter (99). Das signifikant geringere Geburtsgewicht der männlichen Nachkommen der eNOS-KO Mütter, in dem vorliegendem Tierversuch, deutet auf das Vorliegen einer intrauterinen Wachstumseinschränkung hin (vgl. Abbildung 11). Vor

diesem wissenschaftlichen Hintergrund hätte mit einer Veränderung der Pankreasmorphologie bzw. der Pankreasfunktion im vorliegenden Modell gerechnet werden können. Auch wenn derzeit keine Studien vorliegen, die die endokrine Pankreasmorphologie von WT-Nachkommen heterozygoter eNOS-KO Eltern im Tiermodell untersucht haben. Allerdings gilt es zu bedenken, dass die beschriebenen Veränderungen der Pankreasmorphologie und -funktion sich lediglich bei einer ausgeprägten Proteinmangeldiät (10-20%) der trächtigen Tiere nachweisen lies. Solche Effekte konnten bei ausschließlich kalorienreduzierter Ernährung der trächtigen Tiere schon nicht mehr beobachtet werden (105). Vordergründig wird derzeit vor allem ein Mangel der Aminosäure Taurin diskutiert. Taurin ist die am häufigsten vorkommende freie Aminosäure im Körper und wird über mehrere Zwischenschritte durch die Cysteinsulfinsäure-Decarboxylase synthetisiert (102). Die Bedeutung der Aminosäure Taurin ist vielseitig, unter anderem beeinflusst sie die β -Zellfunktion. Einige Arbeiten belegen die apoptoseverhindernde Wirkung von Taurin (103) (104). In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass sich unter prä- und postnataler Proteinmangelernährung die β -Zellsensitivität gegenüber NO und IL-1 beta erhöht. Man vermutet, dass diese Sensitivitätssteigerung der Grund für die verringerte β -Zellmasse ist, da NO und IL-1 beta die Apoptose dieser Zellen begünstigt. Taurin wiederum reduziert die apoptosesteigernde Wirkung von NO und IL-1 beta. Wurde das Trinkwasser der trächtigen Ratte mit Taurin angereichert, war die β -Zellreduktion der Nachkommen trotz prä- und postnataler Proteinmangelernährung weniger stark ausgeprägt (37).

Allerdings geht eine Glukosestoffwechselstörung, wie sie bei den Versuchstieren des vorliegenden Experiments vorliegt, nicht zwangsläufig mit einer Veränderung der endokrinen Pankreasmorphologie einher. Anhand tierexperimenteller Studien konnte gezeigt werden, dass elterliche Glukosestoffwechselstörungen bei den Nachkommen eine Veränderung der pankreasrelevanten Neuroregulation bewirkte und demzufolge die Insulinsekretion beeinträchtigt war. Die endokrine Pankreasmorphologie zeigte sich in diesen Modellen nicht verändert (144). Unter einer veränderten Neuroregulation versteht man in dem beschriebenen Fall eine verstärkte Aktivität des sympathischen Nervensystems, welches an der Regulation der Insulinsekretion des Pankreas beteiligt ist. Bei den Nachkommen wurde im Alter von ein bis 20 Monaten wiederholt ein GTT in Gegenwart eines α 2 Blockers durchgeführt. Dabei normalisierte sich die Insulinsekretion der β -Zellen deutlich. Dieser Versuch deutet daraufhin, dass eine

Beeinträchtigung des Glukosestoffwechsels auch aus einer erhöhten Aktivität der sympathischen Neuroregulation der Insulinsekretion resultieren kann. Jüngste Studien konnten auch darstellen, dass Fehlregulationen der Proopiomelanocortin (POMC) und Neuropeptid Y Genexpression (NPY) im Hypothalamus als mögliche Angriffspunkte für die Entstehung von Stoffwechselstörungen in Frage kommen (145). Entsprechende Untersuchungen wurden im vorliegenden Modell nicht durchgeführt, so dass hinsichtlich einer solchen Beeinflussung keine Aussage getroffen werden kann. Dennoch deuten in dem zugrunde liegenden Tierversuch die Glukosestoffwechselfparameter der Nachkommen heterozygoter eNOS-KO Eltern auf eine sich entwickelnde Störung der Glukosehomöostase hin, ohne dass die Pankreasmorphologie verändert wurde. Nicht außer Acht lassen sollte man die Tatsache, dass ein Großteil der Daten ausschließlich aus Tiermodellen stammt. In Humanstudien konnten eine Veränderungen der Pankreasmorphologie bei IUGR bisher nicht so eindeutig und umfassend dargestellt werden. Eine französische Studie an wachstumsretardierten Feten bzw. Neugeborenen, die innerhalb der 32.-42. Schwangerschaftswoche oder während der Geburt verstorben sind konnten ebenfalls keine morphologischen Veränderungen des endokrinen Pankreas festgestellt werden (146) (147) (148).

5.3.2 Paternale Programmierung des Glukosestoffwechsels

Die Nüchterninsulinkonzentrationen bei den männlichen Tieren der Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) zeigten in der 17. Versuchswoche signifikant erhöhte Insulinkonzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe (vgl. Abbildung 31). In der 21. Versuchswoche war die Nüchterninsulinkonzentration der Gruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) signifikant höher als die Nüchterninsulinkonzentration der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT)(vgl. Abbildung 31, Abbildung 32). Auch die Nüchternglukosekonzentrationen der Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) waren in der 21. Versuchswoche signifikant höher als die Nüchternglukosekonzentrationen der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/ Vater WT)(vgl. Abbildung 28). Dementsprechend würde man das Vorliegen einer Insulinresistenz der Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) vermuten. Erstaunlicherweise konnte eine Insulinresistenz der Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) weder über den QUICKI noch über den HOMA-Index verifiziert werden. Auch die Ergebnisse des ipGTT bezüglich der Evaluation einer bestehenden Insulinresistenz waren nicht aussagekräftig (vgl. Abbildung 33, Abbildung

34, Abbildung 35, Abbildung 36, Abbildung 37), obwohl die Glukosekonzentration und die Insulinkonzentration auf Basis eines GTT nützliche Parameter zur Abschätzung einer bestehenden Insulinresistenz sind. Auch wenn die Daten der Insulinresistenz-Indices und die Daten des intraperitonealen Glukosetoleranztests nicht auf eine bestehende Insulinresistenz hindeuten. Kann dennoch von einer diabetogenen Stoffwechsellage der Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) ausgegangen werden. Unterstützt wird diese Annahme nicht nur durch die Daten der signifikant erhöhten Nüchternglukosewerte und der Nüchterninsulinwerte der Tiere der Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) sondern auch durch Ergebnisse der Lebermorphologie, welche im Rahmen des gleichen Experiment im Zuge einer anderen Dissertation erhoben wurden. Hier zeigten männliche Nachkommen der Gruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) eine signifikant erhöhte hepatische Glykogeneinlagerung und weibliche Tiere derselben Gruppe eine signifikant erhöhte Lipideinlagerung der Leber. Eine erhöhte hepatische Glykogeneinlagerung und das Auftreten einer Steatose sind mit einer Insulinresistenz assoziiert (143).

Da die in Richtung Insulinresistenz veränderten Glukosestoffwechselfparameter vor allem bei den Nachkommen der eNOS-KO Väter zu beobachten waren, kann die Verschlechterung der intrauterinen Versorgung durch eine Einschränkung des plazentalen Blutflusses ebenfalls nicht als Erklärungsmodell herangezogen werden. Daher müssen diese Daten, wie die Veränderungen im Wachstumsverlauf auch, vor dem Hintergrund der sogenannten paternalen Programmierung diskutiert werden. So konnte bereits bei männlichen Mäusen nach diätischer Manipulation eine Veränderung des RNA-Gehalts und der Chromatin-Konfiguration der Spermien nachgewiesen werden auch wenn eine Veränderung der Methylierungsmuster ausblieb. Bei deren Nachkommen wiederum fand man eine veränderte Expression hepatischer Cholesterinbiosynthese relevanter Gene (41). Auch Ng. et al. zeigten, dass eine väterliche fettreiche, präkonzeptionellen Diät im Mausmodell zu metabolischen Folgeerkrankungen singulär bei weiblichen Nachkommen führt. Die erwachsenen weiblichen Nachkommen neigten zu einem signifikant höheren Körpergewicht und einer gestörten Glukosetoleranz. Zusätzlich wiesen sie eine periphere Insulinresistenz auf und eine reduzierte relative Inselorganfläche des endokrinen Pankreas, die jedoch durch eine Zunahme der Inselorgane kompensiert wurde (40). Im Rahmen dieser Studie konnte auch eine verminderte Methylierung des Promotors eines bestimmten

Gens (Il13ra2) dargestellt werden. Dieses Gen codiert ein Molekül des Jak-Stat-Signalweges (40). Der Würzburger Wissenschaftler Seufert zeigte, dass Wachstumshormone, Leptin und Prolaktin in den insulinproduzierenden Zellen der Bauchspeicheldrüse den gemeinsamen JAK-STAT-Signalweg benutzen, dabei aber unterschiedliche Effekte erzeugen: Wachstumshormone und Prolaktin stimulieren die Insulinproduktion, Leptin hemmt diese (149). Solche Ergebnisse liefern einen eindeutigen Beleg dafür, dass der väterliche Lebensstil die Funktion der Gene seiner Nachkommen beeinflusst und die Epigenetik somit ein Bindeglied zwischen Umwelt und Genregulation darstellt. Nach heutigem Kenntnisstand können beschriebene epigenetische Markierungen an die nächste Generation vererbt werden bzw. die epigenetische Markierungsprozesse der Nachkommen modulieren (64).

Auch wiederholt beschriebene geschlechtsspezifische, transgenerationale Programmierungseffekte können bei dem zugrunde liegenden Tierversuch nicht ausgeschlossen werden (26). Anhand des Kreuzungsschemas wird deutlich, dass die Großväter der Nachkommen des Tierversuchs einen homozygoten eNOS-KO hatten (vgl. Abbildung 3). Mäuse mit homozygoten Defizit im eNOS-Gen sind in der Regel hyperten (72) (73). Darüber hinaus ist eine mangelnde NO-Verfügbarkeit ein einflussreicher Pathomechanismus bei der Entstehung der Arteriosklerose, thromboembolischer Ereignisse und der pulmonalen Hypertonie (69) (75) (76). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass NO auch maßgeblich an der Regulation des Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsels beteiligt ist. Beispielhaft zeigten eNOS defiziente Mäuse neben einer arteriellen Hypertonie eine erhöhte Insulinresistenz (79) (80) (81). NO erhöht den Glukosestoffwechsel der insulinempfindlichen Organe (Leber, Muskel, Fett) unter anderem über das Hochregulieren der GLUT-Transporter (82). Ebenfalls beispielhaft für die Bedeutung von NO bezüglich des Glukosestoffwechsels sind Mäuse mit einer erhöhten Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase Aktivität (DDAH). DDAH verstoffwechselt asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA), welches wie N γ -Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) im Organismus physiologisch vorkommt. Bei beiden handelt es sich um Inhibitoren der NO-Synthese. Demzufolge weisen Mäuse mit einer erhöhten DDAH-Aktivität einen höheren NO-Spiegel auf (83). Interessanterweise zeigen die Mäuse mit einem erhöhten NO-Spiegel auch eine erhöhte Insulinempfindlichkeit (84). Verschiedene Studien belegen, dass veränderte Glukosestoffwechselfparameter sich nicht auf eine Generation

beschränken. Trotz adäquater, an die Kontrollgruppe angepasster Umweltbedingungen, waren die Glukosestoffwechselfparameter der F2- und F3-Generation ebenfalls pathologisch verändert (25) (27) (40). Vor diesem Hintergrund könnte der homozygote eNOS-KO der F0-Generation und der heterozygote eNOS-KO der F1-Generation auf molekularbiochemischer Ebene Programmierungseffekte im Sinne einer Epigenom Modifikation begünstigt haben (vgl. Kap. 1.7). Derzeit wird davon ausgegangen, dass epigenetische Markierungen an die nächsten Generationen weitergegeben werden können. Diese Weitergabe epigenetischer Muster erfolgt nach heutigem Kenntnisstand generationsübergreifend, geschlechtsspezifisch und ist abhängig davon von welchem Elternteil eine epigenetische Modellierung weitergegeben wurde (64). Beispielhaft konnten auch Grasemann und Kollegen anhand eines autosomal dominanten Diabetesmausmodells darstellen, dass mütterlicher und väterlicher Diabetes phänotypische, geschlechtsspezifische Veränderungen in Wildtyp-Nachkommen induziert. Sowohl mütterlicher und väterlicher Diabetes führte zur Entwicklung metabolischer und skelettaler Veränderungen bei den Wildtyp Nachkommen mit einer größeren Wirkung des mütterlichen Diabetes auf metabolische Parameter und des väterlichen Diabetes auf die Entwicklung des Skeletts (150). Diese Ergebnisse sind in besonderem Maße interessant, da die Nachkommen wie im vorliegenden Tierexperiment ausschließlich Wildtypen waren.

Weder die Inselorgandichte, die Inselorgangröße noch der β -Zellanteil des Inselorgans zeigte im Vergleich der Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) mit den anderen beiden experimentellen Gruppen, noch bei der geschlechtsspezifischen Betrachtung signifikante Unterschiede (vgl. Abbildung 43, Abbildung 44). Somit wurden die Pankreasmorphologie und der β -Zellanteil der Inselorgane der Wildtypnachkommen durch den paternalen eNOS-KO nicht verändert.

Zusammenfassend kann man sagen, dass lediglich die Daten der Nüchternglukosewerte und der Nüchterninsulinwerte der Gruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) eine bestehende Insulinresistenz vermuten lassen. Die Daten der Insulinresistenz-Indices und die Daten des intraperitonealen Glukosetoleranztests deuten nicht auf eine bestehende Insulinresistenz hin. Dennoch kann von einer diabetogenen Stoffwechsellage der Versuchsgruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) ausgegangen werden. Unterstützt wird diese Annahme durch Ergebnisse aus dem

gleichen Experiment, welche im Rahmen einer anderen Dissertation erhoben wurden. Männliche Nachkommen der Gruppe drei (Mutter WT/Vater eNOS-KO) zeigten hier eine signifikant erhöhte hepatische Glykogeneinlagerung und weibliche Tiere derselben Gruppe eine signifikant erhöhte Lipideinlagerung der Leber (143). Die signifikant erhöhte Insulinsensitivität der Versuchsgruppe zwei (Mutter eNOS-KO/Vater WT) kann im Einklang mit der aktuellen Studienlage und den Ergebnissen des ipGTT als früher Hinweis auf eine sich entwickelnde Glukosehomöostasestörung interpretiert werden. Weiterhin deuten die Daten des vorliegenden Tierexperiments daraufhin, dass epigenetische Effekte mit Einfluss auf die Keimbahnen der Großeltern- und Elterngeneration aufgetreten sind. Es gibt Belege, dass solche Epimutationen transgenerational weitergegeben werden können und die Gesundheit der nächsten Generationen beeinflussen (26) (41) (64). Da im Vorfeld des Tierversuchs Pathologien der F0- und F1-Generation nicht erfasst wurden und keine Erbgutanalyse stattgefunden hat, bleibt diese Annahme im Bezug auf das vorliegende Mausmodell rein spekulativ. Nicht minder spekulativ, aber möglich ist auch in diesem Fall der bereits beschriebene Geschwistereffekt.

Advanced Fetal Programming Hypothese

Anhand des vorliegenden Tierexperiments, sollte der Einfluss eines mütterlichen beziehungsweise väterlichen heterozygoten eNOS-KO auf den Phänotyp der Wildtyp Nachkommen untersucht werden. Daher wurden ausschließlich Wildtyp Mäuse miteinander verglichen, so dass die Tiere sich lediglich hinsichtlich des Genotyps ihrer Eltern unterschieden. Es wurde vermutet, dass der elterliche eNOS-KO die intrauterinen Reifungsprozesse beeinträchtigt, auch wenn dieser nicht an die Nachkommen vererbt wird. Die Ausgangshypothese konnte in vielerlei Hinsicht bestätigt werden. In Abhängigkeit davon, welches Elternteil vom eNOS-KO betroffen war und vom kindlichen Geschlecht, wurden die Geburtsgewichte, die Organgewichte, und der Glukosestoffwechsel der Wildtyp Nachkommen vom elterlichen Genotyp beeinflusst. Vor allem ein niedriges Geburtsgewicht gilt als Surrogat-Parameter für eine intrauterine Wachstumsretardierung. Zahlreiche Studien konnten zuvor die negative Korrelation zwischen dem Geburtsgewicht und den adipogenen, diabetogenen und kardiovaskulären Krankheitsveranlagungen im Erwachsenenalter darstellen (2) (3) (4). Es wird davon ausgegangen, dass die Organe während des fetalen Lebens sogenannte

kritische Zeitfenster durchlaufen, welche oft nur einige Tage bis Wochen lang sind und sich durch schnelle Zellteilung charakterisieren (32). *Programming* bezeichnet nun eine Entwicklung, bei der es durch suboptimale Bedingungen während dieser sensiblen Phase zu irreversiblen morphologischen und funktionellen Veränderungen der Organe kommt (33). In vorausgegangenen Studien konnte die Arbeitsgruppe um Prof. Hocher zeigen, dass nicht nur die vorgeburtliche Nährstoffverfügbarkeit, sondern auch das mütterliche Genom eine wesentliche Determinante des kindlichen Geburtsgewichtes darstellt und somit die fetalen Reifungsbedingungen beeinflusst (23) (22). Die Ergebnisse des vorliegenden Tierexperiments machen deutlich, dass nicht nur der mütterliche, sondern auch der väterliche Genotyp unabhängig von der Genweitergabe den kindlichen Phänotyp determiniert. Um den Einfluss des elterlichen Genoms auf die vorgeburtlichen Reifungsbedingungen deutlich zu machen, wurde die *Advanced Fetal Programming* Hypothese aufgestellt (23). Anhand des vorliegenden Mausmodells (vgl. 3.2.2) konnte die *Advanced Fetal Programming* Hypothese bekräftigt werden.

6 *Fazit und Ausblick*

Derzeit gilt als weitestgehend allgemein anerkannt, dass suboptimale intrauterine Bedingungen die langfristige Gesundheit und damit die Lebensdauer eines Individuums beeinflussen. Anhand dieser Arbeit wird deutlich, dass der mütterliche und väterliche Genotyp, unabhängig von der klassischen mendelschen Vererbung, zu phänotypischen Veränderungen in der Nachkommenschaft führt. Über welche Mechanismen suboptimale Bedingungen während einer sensiblen Lebensphase zu irreversiblen morphologischen und funktionellen Veränderungen der Organe führen, ist bisher nicht vollständig verstanden wobei die Epigenetik eine zentrale Rolle unter den Erklärungsmodellen einnimmt. Sensible Phasen in der Organogenese könnten somit Phasen sein, in denen ein ausgeprägter Chromatinumbau oder eine ausgeprägte Methylgruppenanlagerung an den spezifischen Genen des jeweiligen Organs stattfinden. Dies würde auch erklären, warum der Zeitpunkt des Mangels einen entscheidenden Einfluss auf die Krankheitsentstehung nimmt. Auf zellulärer Ebene stellen vor allem Rezeptoren, Enzyme, Wachstumsfaktoren, Hormone und Ionenkanäle Angriffspunkte für Programmierungseffekte dar (151) (152). Die epigenetische Weichenstellung in den frühen Phasen der Entwicklung scheint nicht nur für eine optimale Umweltanpassung wichtig zu sein, sondern scheint auch einflussreicher und

hartnäckiger als spätere epigenetische Veränderungen zu sein (7). Derzeit wird davon ausgegangen, dass epigenetische Veränderungen an die nächsten Generationen vererbt werden können. Diese Weitergabe epigenetischer Muster erfolgt nach heutigem Kenntnisstand generationsübergreifend, geschlechtsspezifisch und ist davon abhängig von welchem Elternteil eine epigenetische Modifikation weitergegeben wurde (64). Endgültig bewiesen ist dies jedoch nicht. Es fehlt derzeit der kausale molekularbiologische Mechanismus, um lückenlos darzustellen, dass die Ablesefähigkeit der Gene vererbt werden kann. Zumal unmittelbar nach der Befruchtung die Keimzellen demethyliert werden, um deren Totipotenz wieder herzustellen (62). Einige Forscher versuchen derzeit zu beweisen, dass Umwelteinflüsse über die Veränderung des Epigenoms generationsübergreifend den genetischen Code verändern. Sollte dies gelingen, würde das bedeuten, dass der genetische Code unabhängig einer zufälligen genetischen Mutation und eines Selektionsdrucks veränderbar ist. Untersuchungen an menschlichen Kohorten, Tiermodellen und Zellsystemen tragen weiterhin zur Erkenntnisgewinnung bei. Eine der größten Herausforderungen wird es sein, dieses Wissen für die öffentliche Gesundheit zu nutzen und entsprechende Empfehlungen zu formulieren. Denn das praktische Umsetzen dieses Wissens hat das Potential die Ausbreitung komplexer chronischer Krankheiten zu verhindern. Dies ist mit Sicherheit eine der größten Herausforderungen der Gesundheitsversorgung des 21. Jahrhunderts.

7 *Limitationen der Arbeit*

Das Studien-Design entsprach der Zielsetzung die *Advanced Fetal Programming* Hypothese zu beweisen und zu zeigen, dass mütterliche Gene wichtige Determinanten der fetalen Entwicklung sind. Dies konnte durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt werden. Interessant ist, dass auch paternale Programmierungseffekte beobachtet werden konnten. Diesbezüglich spielt die Epigenetik eine entscheidende Rolle unter den Erklärungsansätzen. Dieses Tierexperiment war ursprünglich nicht konzipiert, um transgenerationale epigenetische Vererbungsmuster darzustellen und demzufolge liegen entsprechende Analysen zum gegebenen Zeitpunkt nicht vor. Zukünftige tierexperimentelle Versuche werden nicht nur das Epigenom der Nachkommen, sondern auch das der vorausgegangenen Generationen berücksichtigen müssen.

Die folgenden Studiengenerationen werden auch darüber aufklären müssen, ob und inwiefern ein mütterlicher heterozygoter eNOS-KO die Plazentafunktion beeinflusst. Daten zur plazentaren Morphologie oder funktionelle Untersuchungen der Plazenta liegen aus dem untersuchten Modell nicht vor.

Des Weiteren sei angemerkt, dass unter Laborbedingungen die Lebenszeit einer C57/BL6-Maus circa 120 Wochen beträgt (139). Dementsprechend erreichten die Mäuse bei einem Versuchsaufbau von 25 Wochen gerade das frühe Erwachsenenalter. Programmierungseffekte, die sich im Erwachsenenalter manifestieren, konnten somit im vorliegenden Modell nicht erfasst werden.

In dem vorliegenden Experiment konnte der BMI nur bis zum 13. Lebenstag berechnet werden. Über den 13. Lebenstag hinaus wurde die Körperlänge der Tiere nicht mehr bestimmt, da die Ergebnisse der Längenmessung stark schwankten und man die Genauigkeit der Messmethode anzweifelte. Aus diesem Grund wurde der BMI in dieser Arbeit nicht dargestellt. Der BMI bezieht das Körpergewicht auf die Körpergröße und ist ein grober Richtwert um die Ausprägung eines Über- bzw. Untergewichts darzustellen. Der BMI sollte sicherlich über den gesamten Wachstumszeitraum erhoben werden, um das Körperwachstum zu beurteilen. Der Verzicht auf eine durchgängige BMI-Bestimmung ist in diesem Versuch durchaus gerechtfertigt, da um die Ursprungshypothese zu beweisen der Gewichtsvergleich zwischen den Gruppen ausreichend ist. Um Aussagen über die individuelle Zusammensetzung der Körpermasse machen zu können, wäre eine Bestimmung des Körperfettanteils beziehungsweise der Muskelmasse hilfreich.

Die Bestimmung des β -Zellanteils des Inselorgans erfolgte mittels einer immunhistochemischen Insulinfärbung. Dabei handelt es sich um eine häufig angewendete und etablierte Methode (vgl. 3.5.5). Die Auswertung der Insulinfärbung erfolgte digital mit Hilfe eines Schwellwertverfahrens. Die Nutzung von Schwellwertverfahren zur Segmentierung digitaler Bilder ist allerdings fehleranfällig. In erster Linie sind Schwellwertverfahren anfällig für Helligkeitsveränderungen des digital abgebildeten Bildes. Um dem vorzubeugen, wurde trotz des größeren Aufwandes der Schwellwert für jedes Bild neu eingestellt. Anschließend wurde jedes Bild vom Betrachter beurteilt und entweder akzeptiert oder durch Schwellwertveränderungen nachkorrigiert. Alternative Cursorverfahren kommen aufgrund der unregelmäßigen

Verteilung der β -Zellen innerhalb eines Inselorgans jedoch nicht in Betracht. Somit stehen derzeit keine alternativen Verfahren zum Erreichen einer höheren Präzision zur Verfügung.

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

Literaturverzeichnis

1. **Dörner, G., Stahl, F. and Baumgarten, G.** Significant differences in testosterone and 11-OHCS levels of the amniotic fluid between male and female fetuses. *Endokrinologie*. Okt. 1972, Vol. 60, pp. 285-288.
2. **Barker, DJ. and Osmond, C.** Infant mortality, childhood nutrition, and ischemic heart disease in England and Wales. *Lancet*. Mai 1986 , Vol. 1, pp. 1077-1081.
3. **Barker, DJ., Osmond, C. and Law, CM.** The intrauterine and early postnatal origins of cardiovascular disease and chronic bronchitis. *J Epidemiol Community Health*. 1989, Vol. 43, pp. 237-240.
4. **Barker, DJ., et al.** Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ*. 1989, Vol. 298, pp. 564-567.
5. **Osmond, C., et al.** Early growth and death from cardiovascular disease in women. *BMJ*. 1993, Vol. 307, pp. 1519-1524.
6. **W. Rich-Edwards, JW., et al.** Birth weight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976. *BMJ*. 1997, Vol. 315, pp. 396-400.
7. **Yajnik, CS. and Ganpule-Rao, AV.** The obesity-diabetes association: what is different in indians? *Int J Low Extrem Wounds*. Sep 2010, Vol. 9, pp. 113-115.
8. **Bryan, SM. and Hindmarsh, PC.** Normal and abnormal fetal growth. *Horm Res*. 2006, Vol. 3, pp. 19-27.
9. **Gluckmann, PD. and Hanson, MA.** The fetal matrix: evolution, development and disease. *Cambridge University Press*. 2005, Vol. 20, pp. 54-56.
10. **Langley-Evans, SC.** Fetal programming of CVD and renal disease: animal models and mechanistic considerations. *Proc Nutr Soc*. Jan 2013, Vol. 14, pp. 1-9.
11. **Bale, TL., et al.** Early life programming and neurodevelopmental disorders. *Biol Psychiatry*. Aug 2010, Vol. 68 (4), pp. 314-319.
12. **Vohr, BR., et al.** Neurodevelopmental and functional outcomes of extremely low birth weight infants in the national institute of child health and human development neonatal research network. *Pediatrics*. 2000, Vol. 105, pp. 1216-1226.

13. **Fernandez-Twinn, DS. and Ozanne, SE.** Mechanisms by which poor early growth programs type-2 diabetes, obesity and the metabolic syndrome. *Physiology & Behavior*. 2006, Vol. 8, pp. 234-243.
14. **Hales, N. and Barker, DJ.** The thrifty phenotype hypothesis. *Br.Med.Bull.* 2001, Vol. 60, pp. 5-20.
15. **Neel, JV.** Diabetes mellitus: a thrifty genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet.* 1962, Vol. 14, pp. 353-362.
16. **Hattersley, AT. and Tooke, JE.** The fetal insulin hypothesis: an alternative explanation of the association of low birthweight with diabetes and vascular disease. *Lancet.* 1999, Vol. 353, pp. 1789-1792.
17. **Shu, XO., et al.** Identification of New Genetic Risk Variants for Type 2 Diabetes. *PLoS Genet.* Sep. 2010, Vol. 16, pp. 9.
18. **Hattersley, T., et al.** Mutations in the glucokinase gene of the fetus result in reduced birth weight. *Nat.Genet.* 1998, Vol. 19, pp. 268-270.
19. **Ahlqvist, E., Ahluwalia, TS. and Groop, L.** Genetics of type 2 diabetes. *Clin Chem.* Feb. 2011, Vol. 57(2), pp. 241-254.
20. **Gluckmann, PD., Hanson, MA. and Spencer, HG.** Predictive adaptive responses and human evolution. *Trends Ecol Evol.* 2005, Vol. 20, pp. 527-533.
21. **Claris, O., Beltrand, J. and Levy-Marchal, C.** Consequences of intrauterine growth and early neonatal catch-up growth. *Semin Perinatol.* Jun 2010, Vol. 34, pp. 207-210.
22. **Hochoer, B., et al.** Association of maternal G protein beta3 subunit 825T allele with low birthweight. *Lancet.* 2009, Vol. 355, pp. 1241-1242.
23. **Hochoer, B., et al.** The advanced fetal programming hypothesis. *Nephrol Dial Transplant.* Jun Jun 2001, Vol. 16 (6) pp. 1298-1299.
24. **Wang, X., et al.** Maternal cigarette smoking, metabolic gene polymorphism, and infant birth weight. *JAMA.* Jan 2002, Vol. 287, pp. 195-202.
25. **Kaati, G., Bygren, LO. and Edvinsson, S.** Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. *Eur J Hum Genet.* Nov 2002, Vol. 10, pp. 682-688.

26. **Pembrey, ME., et al.** Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. *Eur J Hum Genet.* Feb 2006, Vol. 14 (2) pp. 159-166.
27. **ALSPAC-Study, The.** ALSPAC–The Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Paediatric and Perinatal Epidemiology.* Jan 2001, pp. 74–87.
28. **Petry, CJ., Ong, KK. and Dunger, DB.** Does the fetal genotype affect maternal physiology during pregnancy? *Trends Mol Med.* Okt. 2007, Vol. 13, pp. 414-421.
29. **Wangler, MF.** Factors associated with preterm delivery in mothers of children with Beckwith-Wiedemann syndrome: a case cohort study from the BWS registry. *Am. J. Med. Genet. A.* 2005, Vol. 134, pp. 187–191.
30. **Naeye, RL.** Maternal blood pressure and fetal growth. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1981, Vol. 141, pp. 780–787.
31. **Canavan, JP. and Goldspink, DF.** Maternal diabetes in rats. II.Effects on fetal growth and protein turnover. *Diabetes.* 1988, Vol. 37, pp. 1671–1677.
32. **Widdowson, EM. and McCance, RA.** A review: new thoughts on growth. *Pediatr Res.* Mar 1975, Vol. 9 (3) pp. 154-156.
33. **Lucas, A.** Role of nutritional programming in determining adult morbidity. *Arch Dis Child.* Okt. 1994, Vol. 71, pp. 288-290.
34. **Bertram, CE. and Hanson, MA.** Animal models and programming of the metabolic syndrome. *Br Med Bull.* 2001, Vol. 60, 103-121.
35. **Pfab, T., et al.** Low birth weight, a risk factor for cardiovascular diseases in later life, is already associated with elevated fetal glycosylated hemoglobin at birth. *Circulation.* 2006, Vol. 114, pp. 1687-1692.
36. **Armitage, JA., et al.** Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? *J Physiol.* Dez 2004, Vol. 561, pp. 355-77.
37. **Merezak, S., et al.** Intrauterine low protein diet increases fetal beta-cell sensitivity to NO and IL-1 beta: the protective role of taurine. *J Endocrinol.* 2001, Vol. 171, pp. 299–308.
38. **Lillycrop, KA., et al.** Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a protein-restricted diet during pregnancy

suggests that reduced DNA methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation. *Br J Nutr.* . June 2007, Vol. 97(6) pp. 1064–1073.

39. **Burdge, GC., et al.** Epigenetic regulation of transcription: A mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? *Br J Nutr.* Jun. 2007, Vol. 97 (6) pp. 1036–1046 .

40. **Ng, SF., et al.** Chronic high-fat diet in fathers programs β -cell dysfunction in female rat offspring. *Nature.* Okt. 2010, Vol. 467, pp. 963-966.

41. **Carone, BR., et al.** Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell.* Dez: 2010, Vol. 143, pp. 1084-1096.

42. **McCance, DR., et al.** Birth weight and non-insulin dependent diabetes: a thrifty genotype, thrifty phenotype, or surviving small baby genotype? *Bone Miner J.* 1994, Vol. 308, pp. 942–945.

43. **Soto, A., Bazaes, RA. and Pena, V.** Insulin sensitivity and secretion are related to catch up growth in small-for-gestational- age infants at age 1 year: results from a protective cohort. *Clin Endocrinol Metab.* 2003, Vol. 88 (8) pp. 3645-3650.

44. **Jou, MY., Lönnerdal, B. and Griffin, IJ.** Effects of early postnatal growth restriction and subsequent catch-up growth on body composition, insulin sensitivity, and behavior in neonatal rats. *Pediatr Res.* März 2013, Vol. 76, p. 10.

45. **Harrington, TA., et al.** Distribution of Adipose Tissue in the Newborn. *Pediatric Research.* 2004, Vol. 55, pp. 437-441.

46. **Powell, K.** Obesity: the two faces of fat. *Nature.* Mai 2007, Vol. 31, pp. 525-527.

47. **Ravelli, GP., Stein, ZA. and Susser, MW.** Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med.* 1976, Vol. 295, pp. 349-353.

48. **Jackson, AA., Langley-Evans, SC. and McCarthy, HD.** Nutritional influences in early life upon obesity and body proportions. *Ciba Found Symp. 2009* Vol. 201, pp. 118-129.

49. **Holemans, K., Aerts, L., and van Assche, FA.** Evidence for an insulin resistance in the adult offspring of pregnant STZ diabetic rats. *Diabetologia.* 1991, Vol. 34, pp. 80–85.

50. **Goland, RS., et al.** Concentrations of corticotropin-releasing hormone in the umbilical-cord blood of pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Reprod Fertil Dev* . 1995, Vol. 7, pp. 1227–1230.
51. **Bjorntorp, P., Holm, G. and Rosmond, R.** Hypothalamic arousal, insulin resistance and Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med*. 1999, Vol. 16, pp. 373–383.
52. **Phillips, DIW., et al.** Elevated plasma cortisol concentrations: a link between low birthweight and the insulin resistance syndrome? *J Clin Endocrinol Metab*. 1998, Vol. 83, pp. 757–760.
53. **Langley-Evans, SC.** Intrauterine programming of hypertension by glucocorticoids. *Life Sci*. 1997, Vol. 60, pp. 1213–1221.
54. **Nyirenda, MJ., et al.** JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION. *Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring*. *Am J Physiol*. 1998, Vol. 275, pp. 2174–2181 .
55. **Beale, EG., Harvey, BJ. and Forest, C.** PCK1 and PCK2 as candidate diabetes and obesity genes. *Cell Biochem Biophys*. 2007, Vol. 48, pp. 89-95.
56. **Cadoudal, T., et al.** Retinoids upregulate phosphoenolpyruvate carboxykinase and glyceroneogenesis in human and rodent adipocytes. *J.Nutr*. Jun 2008, Vol. 138, pp. 1004–1009.
57. **Langenveld, J., et al.** In utero programming of adult vascular function in transgenic mice lacking low-density lipoprotein receptor. *Am J Obstet Gynecol*. Aug 2008, Vol. 199 (2) pp. 1-5.
58. **van der Heijden, OW., et al.** Uterine artery remodeling and reproductive performance are impaired in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Biol Reprod*. Mai 2005, Vol. 72, pp. 1161-1168.
59. **Longo, M., et al.** Fetal origins of adult vascular dysfunction in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol* . 2005, Vol. 288, pp. 1114-1121.
60. **Van der Maarel, SM.** Epigenetic mechanisms in health and disease. *Ann Rheum*. 2008, Vol. 67 (3) pp. 97–100.
61. **Li, E.** Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet*. 2002, Vol. 3, pp. 662–673.

62. **Reik, W., Dean, W. and Walter, J.** Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*. 2001, Vol. 293, pp. 1089–1093.
63. **George, L.** Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in *Avy/a* mice. *The FASEB Journal*. 949-957 , 1998, Vol. 12.
64. **Waterland, RA. and Jirtle, RL.** Transportable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol*. 2003, Vol. 23, pp. 5293–5300.
65. **Michel, T. and Feron, O.** Nitric Oxide and Nitric Oxide Synthases. Nitric Oxide Synthases: Which, Where, How, and Why? *J Clin Invest* 100. 1997, pp. 2146-2152.
66. **Finocchietto, PV., et al.** Mitochondrial Nitric Oxide Synthase: A Masterpiece of Metabolic Adaptation, Cell Growth, Transformation, and Death. *Exp Biol Med*. Sep. 2009, Vol. 234, pp. 1020-1028 .
67. **Davis, ME., et al.** Shear Stress Regulates Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression Through c-Src by Divergent Signaling Pathways. *Circ Res* . 2001, Vol. 89, pp. 1073-1080.
68. **Fleming, I. and Busse, R.** Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol* . 2003, Vol. 284, pp. 1-12.
69. **Lefer, DJ., et al.** Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol*. 1999, Vol. 276, pp. 1943–1950.
70. **Rossmann, WG., et al.** Expression and functional analysis of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in human placenta. *Mol Hum Reprod*. 1999, Vol. 5, pp. 487–494.
71. **Suzuki, T.** Gestational changes in production of NO and expression of NOS mRNA isoforms in the rat placenta. *J. Vet. Med Sci.*, 2009, Vol. 7, pp. 495-498.
72. **Huang, PL., et al.** Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*. Sep. 1995, Vol. 377, pp. 239-42.
73. **Bubikat, A., et al.** Local atrial natriuretic peptide signaling prevents hypertensive cardiac hypertrophy in endothelial nitric-oxide synthase-deficient mice. *J Biol Chem*. Jun 2005, Vol. 280 (22) pp. 21594-21599.
74. **Rudic, RD., et al.** Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest*. Feb. 1998, Vol. 101 (4) pp. 731-736.

75. **Freedman, JE., et al.** Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene. *Circ Res.* 1999, Vol. 84, pp. 1416–1421.
76. **Steudel, W., et al.** Sustained pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy after chronic hypoxia in mice with congenital deficiency of nitric oxide synthase 3. *J Clin Invest.* 1998, Vol. 101, pp. 2468–2477.
77. **Giordano, A., et al.** Evidence for a functional nitric oxide synthase system in brown adipocyte nucleus. *FEBS Lett.* 2002, Vol. 514, pp. 135–140.
78. **Atochin, DN., et al.** The phosphorylation state of eNOS modulates vascular reactivity and outcome of cerebral ischemia in vivo. *J Clin Invest.* 2007, Vol. 117, pp. 1961–1967.
79. **Andersson, K., et al.** A nitric oxide-mediated mechanism regulates lipolysis in human adipose tissue in vivo. *Br J Pharmacol.* 1999, Vol. 126, pp. 1639–1645.
80. **Sartori, C. and Scherrer, U.** Insulin, nitric oxide and the sympathetic nervous system: at the crossroads of metabolic and cardiovascular system. *J Hypertens.* 1999, Vol. 17, pp. 1517-1525.
81. **Duplain, H., et al.** Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2001, Vol. 104, pp. 342-345.
82. **McConell, G. and Wadley, G.** Potential role of nitric oxide in contraction-stimulated glucose uptake and mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008, Vol. 35, pp. 1488-1492.
83. **Tanaka, M., et al.** Dimethylarginine dimethylaminohydrolase overexpression suppresses graft coronary artery disease. *Circulation.* 1999, Vol. 99, pp. 3092-3095.
84. **Sydow, K., et al.** Dimethylarginine dimethylaminohydrolase overexpression enhances insulin sensitivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008, Vol. 28, pp. 692-697.
85. **Kojda, G., Cheng, YC. and Bruchfield, J. et al.** Dysfunctional regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in response to exercise in mice lacking one eNOS gene. *Circulation.* 2001, Vol. 103, pp. 2839-2844.
86. **Fagan, KA., et al.** The pulmonary Circulation of homozygous or heterozygous eNOS-null mice is hyperresponsive to mild hypoxia. *J Clin Invest.* 1999, Vol. 103, pp. 291-299.

87. **Reynolds, L.P., et al.** Uteroplacental vascular development and placental function: an update. *Int. J. Dev. Biol.* 2010, Vol. 54, pp. 355–366.
88. **Krause, B.J., Hanson, M.A. and Casanello, P.** Role of nitric oxide in placental vascular development and function. *Placenta.* 2011, Vol. 32, pp. 797–805.
89. **Reynolds, L.P., et al.** Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. *J. Physiol.* 2006, Vol. 572, pp. 51–58.
90. **Shizukuda, Y., et al.** Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration and proliferation depend on a nitric oxide-mediated decrease in protein kinase C activity. *Circ. Res.* 1999, Vol. 85, pp. 247–256.
91. **Van Vliet, B.N. and Chafe, L.L.** Maternal endothelial nitric oxide synthase genotype influences offspring blood pressure and activity in mice. *Hypertension.* März 2007, Vol. 49, pp. 556-562.
92. **Hefler, L.A., et al.** Perinatal development of endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Biol. Reprod.* 2001, Vol. 64, pp. 666-673.
93. **Vosatka, R.J., Hassoun, P.M. and Harvey-Wilkes, K.B.** Dietary L-arginine prevents fetal growth restriction in rats. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1998, Vol. 178, pp. 242-246.
94. **Kaung, H.L.** Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat. *Dev Dyn.* 1994, Vol. 200, pp. 163–175.
95. **Finegood, D.T., Scaglia, L. and Bonner-Weir, S.** Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. *Diabetes.* 1995, Vol. 44, pp. 249–256.
96. **Scaglia, L., Smith, F.E. and Bonner-Weir, S.** Apoptosis contributes to the involution of beta cell mass in the post partum rat pancreas. *Endocrinology.* 1995, Vol. 136, pp. 5461–5468.
97. **Ravelli, A.C., et al.** Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet.* Jan 1998, Vol. 9097, pp. 173-177.
98. **Hill, D.J. and Duvillie, B.** Pancreatic development and adult diabetes. *Pediatr Res.* 2000, Vol. 48, pp. 269–274.
99. **Garofano, A., Czernichow, P. and Breant, B.** In utero undernutrition impairs rat beta-cell development. *Diabetologia.* 1997, Vol. 40, pp. 1231–1234.

100. **Berney, DM., et al.** The effects of maternal protein deprivation on the fetal rat pancreas: major structural changes and their recuperation. *J Pathol.* 1997, Vol. 183, pp. 109–115.
101. **Cherif, H., et al.** A protein-restricted diet during pregnancy alters in vitro insulin secretion from islets of fetal wistar rats. *J Nutr.* 2001, Vol. 131, pp. 1555–1559.
102. **Kaisaki, PJ., et al.** Cloning and characterization of rat cysteine sulfinic acid decarboxylase. *Biochim Biophys Acta.* Mai 1995, Vol. 1262 (1) pp. 79-82.
103. **Ribeiro, RA., et al., et al.** Taurine supplementation prevents morpho-physiological alterations in high-fat diet mice pancreatic β -cells. *Amino Acids.* Okt. 2012, Vol. 43 (4) pp. 1791-801.
104. **Schuller-Levis, GB. and Park, E.** Taurine: new implications for an old amino acid. *FEMS Microbiol Lett.* Sep 2003, Vol. 226 (2) pp. 195-202.
105. **Bertin, E., et al.** Glucose metabolism and β -cell mass in adult offspring of rats protein and/or energy restricted during the last week of pregnancy. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1999, Vol. 277, pp. 11–17.
106. **Garofano, A., Czernichow, P. and Breant, B.** Postnatal somatic growth and insulin contents in moderate or severe intrauterine growth retardation in the rat. *Biol Neonate.* 1998, Vol. 73, pp. 89–98.
107. **Petrik, J., et al.** A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II. *Endocrinology.* 1999, Vol. 140, pp. 4861–4873.
108. **Iglesias-Barreira, V., et al.** Pre- and postnatal low protein diet affect pancreatic islet blood flow and insulin release in adult rats. *Endocrinology.* 1996, Vol. 137, pp. 3797–3801.
109. **Rasschaert, J., et al.** Impaired activity of rat pancreatic islet mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase in protein malnutrition. *Endocrinology.* 1995, Vol. 136, pp. 2631–2634.
110. **Horn, F.** Biochemie des Menschen. Georg Thieme Verlag KG, 2003.
111. **Hunziker, E. and Stein, M.** Nestin-expressing cells in the pancreatic islets of Langerhans. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000, Vol. 271, pp. 116–119.

112. **Hill, DJ. and Duvillie, B.** Pancreatic development and adult diabetes. *Pediatr Res.* 2000, Vol. 48, pp. 269–274.
113. **Petrik, J., et al.** A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II. *Endocrinology.* 1999, Vol. 140, pp. 4861–4873.
114. **Boujendar S, Reusens B, Merezak S, Ahn MT, Arany E, Hill D, and Remacle C.** Taurine supplementation to a low protein diet during foetal and early postnatal life restores a normal proliferation and apoptosis of rat pancreatic islets. *Diabetologia* . 2002, Vol. 45, pp. 856–866.
115. **Boujendar, S., et al.** Taurine supplementation of a low protein diet fed to rat dams normalizes the vascularization of the fetal endocrine pancreas. *J Nutr.* 2003, Vol. 133, pp. 2820–2825.
116. **Blondeau, B., et al.** Glucocorticoids impair fetal β -cell development in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001, Vol. 281, pp. 592–599.
117. **Shen, CN., et al.** Glucocorticoids suppress beta-cell development and induce hepatic metaplasia in embryonic pancreas. *Biochem J.* 2003, Vol. 375, pp. 41–50.
118. **Blondeau, B., et al.** Endocrine pancreas development is altered in foetuses from rats previously showing intra-uterine growth retardation in response to malnutrition. *Diabetologia* . 2002, Vol. 45, pp. 394–401.
119. **Capra, L., et al.** The origins of health and disease: the influence of maternal diseases and lifestyle during gestation. *Ital J Pediatr.* Jan 2013, Vol. 39 (1) p. 7.
120. **Buttery, LD., et al.** Endothelial nitric oxide synthase in the human placenta: regional distribution and proposed regulatory role at the feto-maternal interface. *Placenta.* 1994, Vol. 15, pp. 257-265.
121. **Fatinia, C., et al.** Endothelial nitric oxide synthase gene influences the risk of pre-eclampsia, the recurrence of negative pregnancy events, and the maternal fetal flow. *Am J Hypertens.* 2006, Vol. 24, pp. 1823-1829.
122. **Gödecke A., Decking UK, Ding Z. et al.** Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circ Res* 1998, Vol. 98, pp. 186-194.

123. **Schmid, E.** Charakterisierung des kardialen Phänotyps bei transgenen Mausmodellen mit Mutationen in kardialen kontraktilen Proteinen und dessen Veränderung durch arterielle Hypertonie. Sep 2010.
124. **Katz, A., et al.** Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 2000, Vol. 85, pp. 2402-2410.
125. **Rudenski, A.S., et al.** Understanding insulin resistance: Both glucose resistance and insulin resistance are required to model human diabetes. *Metabolism.* Sep 1991, Vol. 13, pp. 908-917.
126. **Jablonka-Shariff, A. and Olson, LM.** The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. *Endocrinology.* 1998, Vol. 139, pp. 2944-2954.
127. **Pallares, P., et al.** Phenotypic Characterization by High-Resolution Three-Dimensional Magnetic Resonance Imaging Evidences Differential Effects of Embryo Genotype on Intrauterine Growth Retardation in NOS3-Deficient Mice. *Biol Reprod.* 2011, Vol. 84, pp. 866-871.
128. **Gagiotti, S., Scavone, C. and Bevilacqua, E.** Participation of the mouse implanting trophoblast in nitric oxide production during pregnancy. *Biol Reprod.* 2000, Vol. 62, pp. 260-266.
129. **Voigt, M., et al.** Sex- specific differences in birth weight due to maternal smoking during pregnancy. *Eur J Pediatr.* 2006, Vol. 165, pp. 757- 761.
130. **Shige, S. and et al.** Does famine influence sex ratio at birth? Evidence from the 1959–1961 Great Leap Forward Famine in China. *Proc Biol Sci.* Jul 2012, Vol. 279, pp. 2883-2890.
131. **Stein, AD., Zybert, PA. and Lumey, L.** Acute undernutrition is not associated with excess of females at birth in humans: the Dutch Hunger Winter. *Proc. R. Soc. Lond.* 2004, Vol. 54, pp. 138–141.
132. **Antonov, A.** Children born during the siege of Leningrad in 1942. *J. Pediatr.* 1947, Vol. 30, pp. 250-259.
133. **Eriksson, JG., et al.** Boys Live Dangerously in the Womb. *AMERICAN JOURNAL OF HUMAN BIOLOGY.* 2010, Vol. 22, pp. 330-335.

134. **Forsen, T., et al.** Growth in utero and during childhood among women who develop coronary heart disease: longitudinal study. *BMJ*. 1999, Vol. 319, pp. 1403-1407.
135. **Gutiérrez-Adán, A., et al.** Developmental Consequences of Sexual Dimorphism During Pre-implantation Embryonic Development. *Reprod Domest Anim*. 2006, Vol. 41, pp. 54-62.
136. **Hocher, B., et al.** Fetal sex determines the impact of maternal PROGINS progesterone receptor polymorphism on maternal physiology during pregnancy. *Pharmacogenet Genomics*. Sep. 2009, Vol. 19, pp. 710-718.
137. **Hocher, B., et al.** Offspring sex determines the impact of the maternal ACE I/D polymorphism on maternal glycaemic control during the last weeks of pregnancy. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* . Sep. 2011, Vol. 12 (3) pp. 254-261.
138. **Ezzahir, N., et al.** Time course of catch-up in adiposity influences adult anthropometry in individuals who were born small for gestational age. *Pediatr Res*. Aug 2005, Vol. 58 (2) pp. 243-247.
139. **David, E.** Baseline life span data: twelve strains of commonly used laboratory mice. *Harrison faculty research, the Jackson laboratory*. 2008, p. http://research.jax.org/faculty/harrison/ger1vi_LifeStudy1.html.
140. **Cabrera, O., et al.** The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103, Feb. 2006, Vol. 65, pp. 2334-2339.
141. **Langley, SC., Browne, RF. and Jackson, AA.** Altered glucose tolerance in rats exposed to maternal low protein diets in utero. *Comp Biochem Physiol Physiol*. 1994, Vol. 109, pp. 223-229.
142. **Ozanne, SE., et al.** Altered muscle insulin sensitivity in the male offspring of protein-malnourished rats. *Am J Physiol*. 1996, Vol. 271, pp. 128-134.
143. **Haumann, HM.** *Der hepato-metabolische Phänotyp genetisch gesunder Nachkommen heterozygoter eNOS knock out Elterntiere vor dem Hintergrund des Konzepts der fetalen Programmierung im Mausmodell*. Aus dem Institut für Pharmakologie der Medizinischen Fakultät Charite-Universitätsmedizin Berlin. 2011. Dissertation.

144. **Gauguier, D., Bihoreau, MT. and Picon, L., Ktorza, A.** Insulin secretion in adult rats after intrauterine exposure to mild hyperglycemia during late gestation. *Diabetes*. 1991, Vol. 2, pp. 109-114.

145. **Lau, SM., et al.** Synergistic effects of genetic beta cell dysfunction and maternal glucose intolerance on offspring metabolic phenotype in mice. *Diabetologia*. 2011, Vol. 54, pp. 910-921.

146. **Béringue, F., et al.** Endocrine Pancreas Development in Growth-Retarded Human Fetuses. *Diabetes*., 2002, Vol. 51, pp. 2385-239.

147. **Dorsche, H., Reiher, H. and Hahn, H-J.** Phases in the early development of the human islet organ. *Anat Anz*. 1988, Vol. 166, pp. 69-76.

148. **Bouwens, L., Lu, WG. and De Krijger, R.** Proliferation and differentiation in the human fetal endocrine pancreas. *Diabetologia*. 1997, Vol. 40, pp. 398-404.

149. **Seufert, J.** Cell therapy and gene therapy in diabetes mellitus. *MMW Fortschr Med*. 2004, Vol. 46 (20), pp. 39-40.

150. **Grasemann, C., et al.** Parental diabetes: the Akita mouse as a model of the effects of maternal and paternal hyperglycemia in wildtype offspring. *PLoS One*. 2012, Vol. 7, pp. 13-14.

151. **Fowden, AL. and Forhead, AJ.** Endocrine mechanism of intrauterine programming. *Reproduction*. 2004, Vol. 127, pp. 515-526.

152. **Millen, I. and Robinson, JS.** Developmental origins of the metabolic syndrom prediction, plasticity and programming. *Physiol Rev*. 2005, Vol. 85, pp. 571-633.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADMA	asymetrisches Dimethylarginin
APES	3-Amino-Propyl-Triethoxysilan
Aqua dest.	Aqua destillata
Aqua bidest.	Aqua destillata (zweifach)
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area Under the curve
ACTH	<u>A</u> drenocortico <u>t</u> ropes <u>H</u> ormon
BMI	Body-Mass-Index
CBX	Carbenoxolon
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
CUG	Catch-Up-Growth
DDAH	Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase Aktivität
DEX	Dexamethason
DMT2	Diabetes mellitus Typ II
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDRF	Endothelium-derived Relaxing Factor
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
eNOS-KO	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase- Knockout
eNOS -/-	Homozygoter eNOS Knockout
eNOS +/-	Heterozygoter eNOS Knockout
GDM	Gestationsdiabetes
GLUT	Glukosetransporter
GPD	Glycerophosphat-Dehydrogenase
HCL	Salzsäure
HOMA	Homeostasis Assesment Model
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IGF	Insulin like Growth Factor
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
IUGR	Intrauterine Growth Retriktion
Kap.	Kapitel
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low Density Lipoprotein
MODY	Maturity-onset Diabetes oft the young
mtNOS	Mitochondriale Stickstoffmonoxid-Synthase
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphophat
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthasen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEPCK	Phosphoenol-Carboxykinase
QUICKI	Quantitative Insulin Sensitivity Check Index
SGA	small for gestational age
STO	Streptozocin
Tab.	Tabelle
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die „ <i>Thrifty Phenotype</i> “ Hypothese (13)	8
Abbildung 2: Darstellung der Advanced Fetal Programming Hypothesis nach Hocher	10
Abbildung 3: Keuzungsschema	32
Abbildung 4: Versuchsablauf	34
Abbildung 5: Tail-Cuff-Methode (123)	37
Abbildung 6: HE-Färbung Langerhans-Insel (200 fache Vergrößerung)	42
Abbildung 7. Avidin-Biotin-Methode	43
Abbildung 8. Antiinsulinanti-körper Färbung	48
Abbildung 9. Abbildung in <i>Clear outside</i> Funktion	48
Abbildung 10. <i>Threshold</i>	48
Abbildung 11: Geburtsgewichte: * $p < 0,05$ Gruppe 2 vs. Gruppe 1 (Kontrollgruppe)	49
Abbildung 12: Geschlechtsspezifische Geburtsgewichte: * $p < 0,05$ Gruppe 2 vs. Gruppe 1 und 3	50
Abbildung 13: Gewichtsverlauf von Tag 1-13: * $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 2, + $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 3, # $p < 0,05$ Gruppe 2 vs. Gruppe 3.	51
Abbildung 14: Gewichtsverlauf von Tag 1-40: * $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 2, + $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 3, # $p < 0,05$ Gruppe 2 vs. Gruppe 3.	52
Abbildung 15: Gewichtsverlauf von Tag 1-140	53
Abbildung 16: Gewichtsverlauf der männlichen Tiere von Tag 1-13: * $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 2, # $p < 0,05$ Gruppe 2 vs. Gruppe 3.	53
Abbildung 17: Gewichtsverlauf der männlichen Tiere von Tag 1-40: * $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 2, # $p < 0,05$ Gruppe 2 vs. Gruppe 3.	54
Abbildung 18: Gewichtsverlauf von Tag 1-140 Männchen.	54
Abbildung 19: Gewichtsverlauf der weiblichen Tiere Tag 1-13: * $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 2, + $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 3.	55
Abbildung 20: Gewichtsverlauf der weiblichen Tiere Tag 1-40: * $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 2, + $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 3.	56
Abbildung 21: Gewichtsverlauf der weiblichen Tiere von Tag 1-140: * $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 2, + $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 3.	56
Abbildung 22: Längenwachstum von Tag 1-13: * $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 2, + $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 3, # $p < 0,05$ Gruppe 2 vs. Gruppe 3.	57
Abbildung 23: Längenwachstum der männlichen Tiere von Tag 1-13: * $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 2, + $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 3, # $p < 0,05$ Gruppe 2 vs. Gruppe 3.	58
Abbildung 24: Längenwachstum der weiblichen Tiere von Tag 1-13: * $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 2, + $p < 0,05$ Gruppe 1 vs. Gruppe 3, # $p < 0,05$ Gruppe 2 vs. Gruppe 3.	59

Abbildung 25: Systolischer Blutdruck Woche 10, 19, 24.	61
Abbildung 26: Systolischer Blutdruck der Männchen Woche 10, 19, 24.....	61
Abbildung 27: Systolischer Blutdruck der Weibchen Woche 10, 19, 24: * p<0,05 Gruppe 1 vs. Gruppe 2, + p<0,05 Gruppe 1 vs. Gruppe 3.	62
Abbildung 28: Nüchtern glukose Woche 13, 17, 21: * p<0,05 Gruppe 1 vs. Gruppe 2, + p<0,05 Gruppe 1 vs. Gruppe 3, # p<0,05 Gruppe 2 vs. Gruppe 3.	63
Abbildung 29: Nüchtern glukose der männlichen Tiere Woche 13, 17, 21.	63
Abbildung 30: Nüchtern glukose der weiblichen Tiere in Woche 13, 17, 21: + p<0,05 Gruppe 1 vs. Gruppe 3, # p<0,05 Gruppe 2 vs. Gruppe 3.	64
Abbildung 31: Insulinkonzentration Woche 17: + p<0,05 Gruppe 1 vs. Gruppe 3.....	65
Abbildung 32: Insulinkonzentration Woche 21: # p<0,05 Gruppe 2 vs. Gruppe 3.....	65
Abbildung 33: Glukosekonzentration während des intraperitonealen Glukosetoleranztest: * p<0,05 Gruppe 1 vs. Gruppe 2, # p<0,05 Gruppe 2 vs. Gruppe 3.	67
Abbildung 34: Glukosekonzentration der Männchen während des intraperitonealen Glukosetoleranztest: * p<0,05 Gruppe 1 vs. Gruppe 2.....	67
Abbildung 35: Glukosekonzentration der Weibchen während des intraperitonealen Glukosetoleranztest.....	68
Abbildung 36: Insulinkonzentration während des intraperitonealen Glukosetoleranztests: # p<0,05 Gruppe 2 vs. Gruppe 3.	69
Abbildung 37: Insulinkonzentration der Männchen während des intraperitonealen Glukosetoleranztests. ## p<0,01 Gruppe 2 vs. Gruppe 3.	69
Abbildung 38: Insulinkonzentration der Weibchen während des intraperitonealen Glukosetoleranztests: # p<0,05 Gruppe 2 vs. Gruppe 3.	70
Abbildung 39: Inselorgandichte.....	71
Abbildung 40: Geschlechtsspezifische Inselorgandichte.....	71
Abbildung 41: Mittlere Inselorganfläche.....	72
Abbildung 42: Geschlechtsspezifische Inselorganfläche.....	72
Abbildung 43: Beta-Zellanteil der Inselorgane.	73
Abbildung 44: Geschlechtsspezifischer Beta-Zellanteil der Inselorgane.	73

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Silke Runge, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Fetale Programmierung von Wildtyp-Nachkommen heterozygoter eNOS-Knockout Mäusen - Morphologische und funktionelle Veränderungen des endokrinen Pankreas –“, 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 kenntlich gemacht.“

Berlin, den 14.10. 2013

Unterschrift:

Lebenslauf

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