

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Untersuchungen zur genetischen Grundlage des metabolischen
Phänotyps von Nachkommen hyperglykämischer Elterntiere im
Mausmodell

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Mila Gertsen

aus
Stepnoje
2019

Diese Dissertation wird über DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/70706

URN: urn:nbn:de:hbz:464-20191119-104111-6

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan:	Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter:	Frau Priv.-Doz. Dr. med. C. Grasemann
2. Gutachter:	Herr Univ.-Prof. Dr. rer.nat. B. Horsthemke

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Oktober 2019

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 EINLEITUNG	7
1.1 Fetale Programmierung und ihre Mechanismen	7
1.2 Die Barker Hypothese	9
1.3 Epigenetik.....	10
1.4 DNA-Methylierung	11
1.5 Einfluss der mütterlichen Ernährung auf Nachkommen	12
1.6 Stickstoffmonoxid (NO) und NO-Synthasen	12
1.7 Das Akita Mausmodell.....	15
2 ZIELSETZUNG.....	16
3 MATERIAL UND METHODEN	17
3.1 Tiere und Tierhaltung	17
3.1.1 Versuchstiere.....	17
3.1.2 Zucht und Verpaarung.....	17
3.1.3 Tierhaltung.....	18
3.1.4 Diäten	19
3.2 Versuchsverlauf.....	19
3.2.1 Organentnahme und Probenasservation.....	19
3.3 Messmethoden	20
3.3.1 Genotypisierung	20
3.3.2 Messung der Glukosekonzentration (nüchtern) der trächtigen Tiere ..	21
3.3.3 Intraperitonealer Glukosetoleranztest (ipGTT)	22
3.3.4 Bestimmung der NOx-Konzentration im Serum der Maus	22
3.4 RNA - und DNA- Analysen	23
3.4.1 RNA-Extraktion.....	23
3.4.2 Bestimmung der RNA-Konzentration und Reinheit	24
3.4.3 DNase I- Behandlung.....	24

3.4.4	cDNA-Synthese	25
3.4.5	Durchführung der quantitativen real-time PCR.....	26
3.4.6	Auswertungsmethode nach Livak et al. ($2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode)	27
3.5	Methylierungsanalysen.....	27
3.5.1	DNA-Isolierung	27
3.5.2	Bisulfitbehandlung	28
3.5.3	Identifizierungsmethode von CpG-Islands von dem murinen nNOS Gen	29
3.5.4	Methylierungsspezifische PCR (MSP).....	30
3.5.5	Primersynthese für MCP	30
3.5.6	Aufreinigung der PCR-Produkte	32
3.5.7	Gelelektrophorese	32
3.5.8	DNA-Extraktion aus dem Gel	33
3.5.9	Sequenzierung	33
3.6	Statistische Analysen	34
4	ERGEBNISSE	35
4.1	Versuchsaufbau.....	35
4.2	Körpergewicht.....	35
4.2.1	Entwicklung des Körpergewichts in Abhängigkeit von mütterlicher oder väterlicher Hyperglykämie.....	35
4.2.2	Gewichtsentwicklung in Abhängigkeit von diabetogenem mütterlichem Futter	36
4.2.3	Zusammenhang zwischen dem Körpergewicht der Versuchstiere und der mütterlichen Nüchtern glukose	37
4.3	Intraperitonealer Glukosetoleranztest.....	38
4.3.1	Glukoseverwertung bei männlichen und weiblichen Nachkommen	38
4.3.2	Verlauf der Glukosetoleranzteste in Abhängigkeit vom diabetogenem Futter der Mütter	39
4.4	Untersuchung des Arginin/NO-Metabolismus im stoffwechselaktiven Gewebe.....	40
4.4.1	NOx im Serum	40
4.4.2	Analyse der Genexpression im stoffwechselaktiven Gewebe	42
4.4.3	Expression von nNOS im Skelettmuskel	43
4.4.4	Expression von PRMT1 im Skelettmuskel.....	44
4.4.5	Expression von PRMT1 im Fettgewebe	45

4.4.6	Expression von PRMT10 im Fettgewebe	45
4.4.7	Genexpression von eNOS im Fettgewebe	46
4.4.8	Expression von eNOS in der Leber	47
4.4.9	Expression von PRMT1 im Lebergewebe	48
4.5	Korrelationsanalyse	49
4.5.1	Korrelation zwischen dem Expressionsniveau von nNOS im Skelettmuskel und dem Glukosespiegel der Nachkommen.....	49
4.5.2	Korrelation zwischen dem Expressionsniveau von nNOS im Skelettmuskel und der mütterlichen Glukosekonzentration	51
4.5.3	Korrelation zwischen den Genexpressionsniveaus von nNOS und PRMT1 im Skelettmuskel der Nachkommen	51
4.6	DNA-Methylierungsanalysen nNOS im Skelettmuskel.....	52
4.6.1	Identifizierung von CPG-Islands im nNOS Gen im Skelettmuskel der Nachkommen	53
4.6.2	Sequenzierungsergebnisse der Methylierungs-PCR	54
4.6.3	Methylierungsuntersuchung von nNOS im Skelettmuskel bei Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK) und Kontrolltieren (ECO) ..	54
5	DISKUSSION	57
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	67
7	LITERATURVERZEICHNIS	68
8	ANHANG	74
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	76
10	TABELLENVERZEICHNIS	77
11	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	78

12 DANKSAGUNG..... 79

13 LEBENSLAUF 80

1 EINLEITUNG

In den letzten Jahren nimmt die Inzidenz für metabolische Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2 und Adipositas im Erwachsenenalter stets zu. Einerseits spielen hier die Veränderungen des Lebensstils, körperliche Aktivität und Ernährungsgewohnheiten eine große Rolle, andererseits weisen zahlreiche humane und tierexperimentelle Studien (vgl. Kap. 1.1 - 1.5) auf Ereignisse während der fetalen und postnatalen Entwicklung als Ursache für spätere metabolische Störungen hin.

1.1 Fetale Programmierung und ihre Mechanismen

Mehrere epidemiologische Studien haben bereits Ende der 80er und Anfang der 90er Jahre demonstriert, dass eine durch die mütterliche Mangelernährung verursachte intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR) und ein daraus resultierendes niedriges Geburtsgewicht mit einem erhöhten Risiko für metabolische und kardiovaskuläre Erkrankungen im Erwachsenenalter wie koronare Herzkrankheit, arterielle Hypertonie, Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2, assoziiert sind (Barker und Osmond 1986). Die ungünstigen intrauterinen Bedingungen in der sensiblen Entwicklungsphase führen zu einer Anpassung des fetalen Organismus, die möglicherweise den Stoffwechsel und die Organfunktion dauerhaft verändern (Barker et al. 1993).

Auch auf der zellulären Ebene kann es zu irreversiblen Veränderungen der hormonellen und enzymatischen Funktionen kommen sowie zur Veränderung der Expression und von Methylierungsmustern spezifischer Gene (Ozanne und Hales 2002). So kann es zu einer langfristigen Beeinflussung des kindlichen Phänotyps kommen. Diese Veränderungen können eine Insulinresistenz, eine Störung der Glukosetoleranz und eine erhöhte Nahrungsaufnahme mit resultierendem Übergewicht im Erwachsenenalter zur Folge haben (Ravelli et al. 1998).

Ravelli et al. betonen in ihren Forschungen, dass vor allem der Zeitpunkt während der fetalen Entwicklung, in welchem der schädigende Einfluss stattfindet, für die spätere Manifestation der metabolischen Störungen entscheidend ist: Kinder, die während des holländischen Hungerwinters 1944-1945 gezeugt wurden, hatten ein im Gegensatz zu ihren Geschwistern erhöhtes Risiko für das Auftreten von

Diabetes, koronarer Herzkrankheit und Schizophrenie. Allerdings wurden die Kinder, die dem intrauterinen Nahrungsmangel im ersten oder zweiten Trimenon der Schwangerschaft ausgesetzt waren, häufiger im späteren Erwachsenenalter übergewichtig als die Kinder, die erst im dritten Trimenon von dem Nahrungsmangel betroffen waren. (Ravelli et al. 1998).

Vieles deutet auf einen Zusammenhang zwischen der nutritiven Versorgung während der Schwangerschaft und einer fetalen Programmierung hin. (Burdge et al. 2007b; Samuelsson et al. 2013).

So ist auch ein hohes Geburtsgewicht, z. B. verursacht durch Diabetes oder Adipositas der Mutter, mit einem erhöhten Risiko der Nachkommen für die Entwicklung von Übergewicht und der Entstehung des metabolischen Syndroms später im Leben assoziiert (Hales und Barker 2001).

Dabei scheint nicht nur der Zeitpunkt, sondern auch die Zeitdauer des maternalen diabetischen Zustandes eine wichtige Rolle für die fetalen Veränderungen zu spielen. In Tierversuchen mit Ratten etwa bewirkte ein mütterlicher Diabetes, der bereits vor der Schwangerschaft bestand und vaskuläre beziehungsweise nephropathische Komplikationen aufwies, eine fetale intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR), die mit einer Störung der plazentaren Blutzirkulation assoziiert war (Van Assche et al. 1992). Zudem war die fetale Bauchspeicheldrüse von morphologischen und funktionalen Veränderungen betroffen. Das Organgewicht war reduziert, die β -Zellen degranuliert und in ihrer Zellzahl erhöht. Die Überstimulation der β -Zellen führte letztlich zu einer Hypoinsulinämie und Hyperglykämie bei den Nachkommen (Van Assche et al. 1977).

Ein Gestationsdiabetes mit einer moderaten Hyperglykämie hingegen führt bei Menschen durch ein Überangebot an Glukose zu einer fetalen Makrosomie, einer erhöhten Aktivität der fetalen β -Zellen des Pankreas und einer Steigerung der Insulinproduktion. Nach dem Wegfall des hyperglykämischen Stimulus nach der Geburt zeigt sich eine Normalisierung der Pankreasmorphologie bei den Nachkommen, allerdings mit zunächst unzureichender Insulinsekretion (Aerts et al. 1990). Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass die intrauterine Exposition zu mütterlicher Hyperglykämie eine sich entwickelnde Glukoseverwertungsstörung im Nachwuchs auslösen kann, ohne dabei die Morphologie des Pankreas zu verändern.

Die Programmierungseffekte der fetalen Umgebung wurden in den frühen 1990er Jahren von Barker und Hales als „The Thrifty Phenotype“-Hypothese beschrieben. Barker konnte in seinen Studien einen Zusammenhang zwischen niedrigem Geburtsgewicht und einer erhöhten Säuglingssterblichkeitsrate sowie dem Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen und Diabetes Typ 2 im späteren Leben beobachten (Barker und Osmond 1986).

1.2 Die Barker Hypothese

Die „Thrifty Phenotype Hypothesis“ besagt, dass eine Mangelversorgung, der ein Fetus in einer vulnerablen Phase seiner Entwicklung intrauterin ausgesetzt ist, anhaltende metabolische Auswirkungen für das Kind im späteren Leben hat.

Durch die steigende Nahrungszufuhr nach der Geburt und während der Kindheit kommt es zu einem relativen Überangebot an Nährstoffen für den auf einen Mangelzustand programmierten Organismus. Stoffwechselaktive Organe wie Muskel, Leber, Fettgewebe und Pankreas sind dabei ebenso betroffen wie die hypothalamische Appetit-Kontrolle. Entsprechend finden sich bei Menschen nach intrauteriner Mangelversorgung Veränderungen im Stoffwechsel, im kardiovaskulären System und in der Appetitregulation bis hin zur Entwicklung eines metabolischen Syndroms und Adipositas (Pettitt et al. 1988; Hales und Barker 2001).

Im Folgenden konnte in epidemiologischen Studien die Hypothese bestätigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen dem Geburtsgewicht und der Entwicklung von chronischen Erkrankungen besteht (Vaag et al. 2012). Die genauen molekularen Mechanismen der fetalen Programmierung sind bisher aber nicht geklärt.

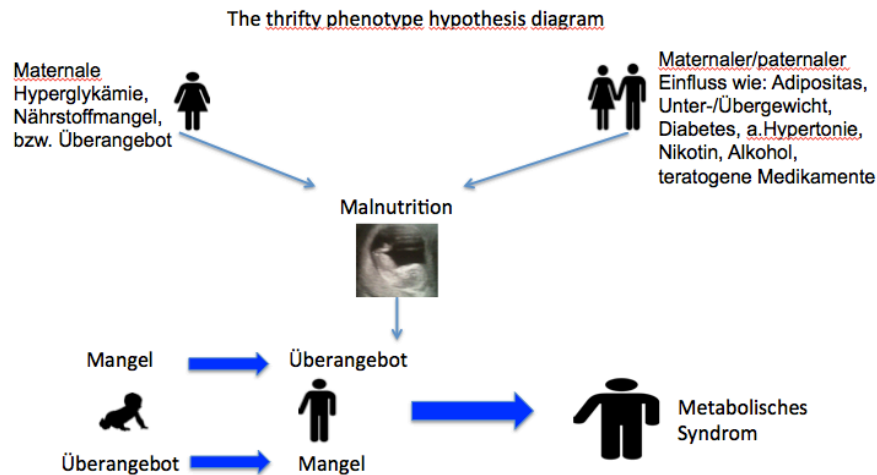


Abbildung 1: The Thrifty Phenotype -Hypothese, modifiziert nach (Barker et al. 1993)

1.3 Epigenetik

In vorausgegangenen Studien, die sich mit den Auswirkungen der intrauterinen Umgebung auf die postnatale Entwicklung beschäftigten, konnte gezeigt werden, dass epigenetische Veränderungen in den Nachkommen eine zentrale Rolle bei der Entstehung der metabolischen Störungen im Erwachsenenalter spielen. Durch die Veränderungen der DNA-Struktur wird eine den Umwelteinflüssen entsprechende Modifikation der Genexpression ermöglicht (Whitelaw und Whitelaw 2006).

Durch Veränderungen von Genexpression und Methylierungsmuster kann es einerseits zu Veränderungen der fetalen Zellfunktion und -proliferation und somit zu morphologischen und funktionellen Veränderungen der Organe kommen, andererseits kann auf diese Weise die Regulation der Proteinsynthesen, Hormone und Enzyme beeinflusst werden (Ozanne und Hales 2002; Holemans et al. 2003). Van Assche et al. beobachteten in den Nachkommen von hyperglykämischen Müttern eine Hypertrophie der langerhanschen Inselzellen des Pankreas, die mit Glukoseaufnahme in den Skelettmuskel und mit Insulinresistenz im Erwachsenenalter assoziiert sind (Van Assche et al. 1977). Die Plastizität des Epigenoms erlaubt somit dem Fötus, auf die Einflüsse der intrauterinen Umwelt und der mütterlichen Ernährung mit Genexpressionsveränderungen zu reagieren und sich so an das postnatale Leben anzupassen.

1.4 DNA-Methylierung

Epigenetische Veränderungen können z. B. durch DNA-Methylierung, Histon-posttranslationale Modifikationen und Prozessierung von mi-RNAs hervorgerufen werden (Nistala et al. 2011). So kann durch die Addition einer Methyl-Gruppe an der C5-Position des Cytosinringes innerhalb von CpG-Dinukleotiden die Genexpression des entsprechenden Gens vermindert werden.

Als CpG wird eine Cytosin-phosphatidyl-Guanosin Nukleotidfolge in der DNA-Sequenz bezeichnet. Das p steht zur Unterscheidung einer GC (Guanosin-Cytosin) Nukleotidfolge von einer CG Nukleotidfolge von 5'- in 3'-Richtung des DNA-Stranges. Die CpG-Bindestellen sind nicht gleichmäßig im Genom verteilt. Einen hohen CpG-Anteil findet man beispielweise im 5'-regulatorischem Bereich der Gene. Ein DNA-Abschnitt mit einem CpG-Anteil von mindestens 55% und einer Länge der CpG haltigen Abschnitte von 500 Basenpaaren oder mehr wurde als CpG-Insel definiert (Takai und Jones 2002). Die Hypomethylierung der CpG-Inseln ist mit einer Steigerung der transkriptionalen Aktivität assoziiert, wohingegen die Hypermethylierung der CpGs-Inseln zur Verminderung der Genexpression führt (Bird 2002).

Eine Stilllegung (Silencing) von Genen kann beispielweise durch Hypermethylierung der CpG-Bindestellen an der proximalen Promoter Region erfolgen. (Bird 2002). Die DNA-Methylierung ist der bekannteste Mechanismus der Genregulation und spielt eine wichtige Rolle bei Langzeitveränderungen des Stoffwechsels durch An- und Ausschalten von spezifischen Genexpressionen während der Entwicklung und Differenzierung von Organen (Van den Veyver 2002).

So haben Heijmans et al. nachgewiesen, dass bei Menschen, die während des sogenannten holländischen Hungerwinters 1944-1945 intrauterin einer Mangelernährung ausgesetzt waren, eine Hypomethylierung des IGF-2 Gens (Insulin-like Growth Factor II), verglichen mit dem Methylierungsstatus bei ihren Geschwistern vorliegt. Das IGF-2 Gen zählt zu einem der am besten charakterisierten epigenetisch-regulierten Loci. Durch die Produktion eines an der Embryonalentwicklung beteiligten Proteins reguliert das IGF-2 Gen das menschliche Wachstum. (Heijmans et al. 2008).

1.5 Einfluss der mütterlichen Ernährung auf Nachkommen

Der Einfluss der mütterlichen Ernährung auf den metabolischen Phänotyp der Nachkommen sowie auf die DNA-Methylierung wurde in mehreren humanen Studien und tierexperimentellen Modellen mit Anwendung von Spezialdiäten während der Schwangerschaft demonstriert.

Beispielweise führte eine an Methylendonatoren reiche Diät bei trächtigen *Avi/a*-Mäusen zu einer Hypermethylierung und Überexpression des *Agouti*-Gens im Lebergewebe der Nachkommen (Wolff et al. 1998). Andere diätetische Manipulationen bei Mäusen während der Schwangerschaft konnten die Fellfarbe, Glukosetoleranz und Tumoranfälligkeit der betroffenen Nachkommen beeinflussen (Morgan et al. 1999).

Andere Studien zeigen, dass nicht nur eine vitaminarme Ernährung mit Störung der Methioninsynthese, sondern auch eine fettreiche oder proteinarme Ernährung zu verändertem DNA-Methylierungsstatus führen kann (Burdge et al. 2007a; Masuyama und Hiramatsu 2012). Masuyama et al. konnten im Tiermodell zeigen, dass eine fettreiche Diät während der Schwangerschaft zur Hypermethylierung des *Leptin*-Gens bei den Nachkommen führt.

Burdge et al. demonstrierten in ihrer Studie an Ratten, dass eine nicht ausbalancierte Ernährung mit niedrigem Proteingehalt während der Schwangerschaft zu einem veränderten Methylierungsstatus von hepatischem $PPAR_{\alpha}$ (peroxisomal proliferator activated receptor) und $GR1_{10}$ (glucocorticoid receptor) bei den Nachkommen der F1 und der F2 Generationen führt. Dies deutet auf einen generationsübergreifenden Programmierungseffekt der mütterlichen Ernährung während der Schwangerschaft hin.

1.6 Stickstoffmonoxid (NO) und NO-Synthasen

Stickstoffmonoxid, NO, ist ein wichtiger biologischer Botenstoff, der im Endothel zu einer starken Vasodilatation führt (Knowles und Moncada 1994). Nach der Diffusion des NO-Moleküls in die Zelle kommt es zur Aktivierung der zytosolischen Guanylatzyklase (cGMP), was zu einer Relaxation der glatten Muskelzellen, einer Hemmung der Thrombozytenaggregation und zur Förderung der Signalübertragung an Synapsen des Gehirns führt (Rassow 2008). NO wird durch die NO-Synthasen aus L-Arginin gebildet. Dabei wird die Guanidingruppe des Arginins NADPH-abhängig oxidiert, woraus in einem weiteren oxidativen Schritt

Citrullin und NO entstehen. Die NO-Funktion ist von der NOS-Isoform und ihrer Lokalisation abhängig. Bis heute konnten drei Isoformen der NO-Synthase identifiziert werden: die induzierbare NOS (iNOS), die endotheliale NOS (eNOS) und die neuronale NOS (nNOS). Als typische Expressionsorte für nNOS gelten Neuronen, für eNOS Endothel und für iNOS Makrophagen. Inzwischen ist bekannt, dass diese NOS-Isoformen auch in anderen Geweben zu finden sind und von verschiedenen Zelltypen exprimiert werden (Alderton et al. 2001).

Die neuronale NO-Synthase (nNOS/NOSI) wurde erstmalig in neuronalen Geweben entdeckt und synthetisiert das Stickstoffmonoxid, das beispielweise im peripheren Nervensystem als klassischer Neurotransmitter bei der Regulation der gastrointestinalen Motilität und der neuroendokrinen Funktion agiert (Christopherson und Bredt 1997). Christopherson und Bredt konnten in ihrer Studie demonstrieren, dass NO als Neuromodulator im zentralen Nervensystem wirkt und bei der Kontrolle der Verhaltensaktivität sowie bei der Gedächtnisbildung eine Rolle spielt. In einer anderen Studie gelang es, eine hohe nNOS mRNA Expression in Skelettmuskel zu identifizieren. Das von ihr synthetisierte NO ist an Stoffwechsel und Muskelkontraktivität beteiligt (Kobzik et al. 1994).

Die induzierbare NO-Synthase (iNOS/NOSII) kommt in den murinen Makrophagen, aber auch in Endothel-, Mesangium-, Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten vor (Balligand et al. 1995) und spielt eine wichtige Rolle bei der Abwehr bakterieller Infektionen. Zytokine und bakterielle Lipopolysaccharide stimulieren eine Induktion der iNOS-Transkription und Freisetzung des NO. Im Vergleich zur murinen iNOS ist die humane Form sehr robust und schwer induzierbar (Chan et al. 2005).

Die endotheliale NO-Synthase (eNOS/NOSIII) wird primär von den Zellen des Gefäßendothels exprimiert und synthetisiert NO, welches über die Aktivierung der Guanylatzyklase und cGMP-Anstieg die Relaxation der glatten Muskeln der Gefäße und somit eine Vasodilatation bewirkt. Neben der gefäßerweiternden Funktion hemmt das Stickstoffmonoxid auch die Thrombozytenaggregation und –adhäsion (Radomski et al. 1990). Außer im Endothel wurde eine eNOS-Aktivität in Pyramidalzellen des Hippocampus beobachtet (Dinerman et al. 1994). Mehrere tierexperimentelle Studien demonstrieren, dass die eNOS unter bestimmten Lebensbedingungen (wie zum Beispiel sportlicher Aktivität oder Schwangerschaft) induzierbar ist (Sessa et al. 1994; Weiner et al. 1994).

Wie in Kap. 1.1 bereits erwähnt, konnten einige Studien ein vermehrtes Auftreten einer vaskulären Funktionsstörung bei den Nachkommen von Ratten mit Diabetes mellitus zeigen (Van Assche et al. 1992). Kleine Mesenterialarterien bei den Nachkommen zeigten eine gestörte Relaxation des Endothels auf Acetylcholin und Bradykinin. Diese endotheliale Dysfunktion ist auf eine reduzierte Aktivität der NO-Synthase zurückzuführen und stellt eine Prädisposition für die Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen im Erwachsenenalter dar (Holemans et al. 1999).

Die NO-Synthase im Skelettmuskel ist für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse, weil sie eine Rolle für den Glukosestoffwechsel bei Diabetikern zu spielen scheint. In mehreren Studien wird eine veränderte NOS-Aktivität bei diabetischen Patienten gezeigt (Bradley et al. 2007; Toda et al. 2010; Hinchee-Rodriguez et al. 2013; Mezghenna et al. 2014).

So wurde beispielweise eine Assoziation zwischen geminderter NOS-Aktivität und der Insulinresistenz bei Patienten mit Diabetes Mellitus Typ 2 (DMT2) beobachtet (Kashyap et al. 2005). Hier scheint NO eine wichtige Rolle bei der Stimulation des Glukosetransporters und der insulinabhängigen Glukoseaufnahme in die Skelettmuskelzellen bei DMT2-Patienten zu spielen. Die Insulinresistenz bei Diabetes oder Adipositas ist durch verminderte insulin-vermittelte Vasodilatation charakterisiert (Steinberg et al. 1994).

In früheren Studien wurde beobachtet, dass eine erhöhte Plasmakonzentration des asymmetrischen Dimethylarginins (ADMA), dem Inhibitor der NO-Synthase, und damit verbundener NO-Mangel mit Diabetes Mellitus und seinen Komplikationen assoziiert sind (Xia et al. 2012; Jawalekar et al. 2013; Abd El Dayem et al. 2014). Die Protein-Arginin-N-Methyltransferase 1 (PRMT1) ist durch die Markierung des Arginins mit 2 Methylgruppen an der Entstehung der ADMA beteiligt (Nicholson et al. 2009). Die Funktion von PRMT10 ist noch nicht eindeutig geklärt, sie scheint aber der von PRMT1 zu ähneln.

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt daher in der Untersuchung der am Arginin/NO-Stoffwechsel beteiligten Gene im stoffwechselaktiven Gewebe. Es wurde untersucht, ob die Expression der am NO-Stoffwechsel beteiligten Gene auch im frühen Lebensstadium, im Alter von 6 Wochen, beeinträchtigt ist. Um Programmierungseffekte der intrauterinen Exposition zu Hyperglykämie, und damit

assoziierte Veränderungen im NO-Stoffwechsel darzustellen, wurden zum einen die mRNA-Expressionen von NO-Synthasen (nNOS und eNOS), zum anderen die Genexpression von PRMT1 und 10 in Skelettmuskeln, Fettgewebe und Leber der 6 Wochen alten weiblichen und männlichen Tiere untersucht.

Diese Arbeit soll einen Beitrag für das Verstehen der Programmierungseffekte auf die Krankheitsentstehung leisten.

1.7 Das Akita Mausmodell

Für dieses Experiment wurde mit dem Akita-Stamm (C57BL6-*Ins2*^{AKITA} /J) ein autosomal-dominantes diabetisches Mausmodell gewählt. Akita-Mäuse tragen eine Mutation im Insulin2-Gen auf dem Chromosom 7. Diese Mutation führt zu einer falschen Proteinfaltung des Insulins. Heterozygote Mäuse sind lebensfähig, fertil und neigen nicht zu Übergewicht. Im Alter von 4-7 Wochen entwickeln heterozygote Tiere eine messbare Hyperglykämie und Hypoinsulinämie mit resultierender Polyurie (Yoshioka et al. 1997). Bei männlichen Tieren ist der diabetische Phänotyp stärker ausgeprägt als bei weiblichen Tieren. Die Lebensdauer der heterozygoten, männlichen Mäuse ist daher verkürzt. (Yoshioka et al. 1997).

Am Akita-Mausmodell lässt sich der intrauterine Einfluss der mütterlichen und väterlichen Hyperglykämie auf den Nachwuchs gut untersuchen. Die Elterntiere, die heterozygot bezüglich der krankheitsauslösenden Mutation im Insulin 2 Gen sind, werden mit Wildtypmäusen verpaart. Alle Nachkommen von hyperglykämischen, heterozygoten Müttern sind der mütterlichen Hyperglykämie ausgesetzt, aber nur 50% der Nachkommen sind heterozygot für die krankheitsauslösende Mutation C57BL6-*Ins2*^{AKITA} /J, die anderen 50% sind Wildtyp-Nachkommen. Somit kann der elterliche Effekt der Hyperglykämie auf die Wildtyp-Nachkommen, unabhängig von der Mutation, untersucht werden.

2 ZIELSETZUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde im Mausmodell untersucht, ob eine mütterliche oder väterliche Hyperglykämie, beziehungsweise ein diabetogenes Futter der Mütter während der Tragzeit, den metabolischen Phänotyp und/oder die Regulation der Genexpression im Arginin-NO-Stoffwechselweg bei Wildtyp-Nachkommen beeinflusst.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Tiere und Tierhaltung

Alle Tierexperimente im Rahmen dieser Dissertation wurden durch die zuständige Bezirksregierung Düsseldorf (Tierversuchsgenehmigung Nr.: G1307/12) genehmigt.

3.1.1 Versuchstiere

Im Rahmen des Versuchs wurden weibliche heterozygote C57BL6-*Ins2*^{AKITA} /J Mäuse (Akita) verwendet. Der Mausstamm C57BL6-*Ins2*^{AKITA} /J wurde vom The Jackson Laboratory (Stock Number: 003548, Charles River UK Limited, Margate, UK) erworben und im Tierlabor des Medizinischen Forschungszentrums des Universitätsklinikum Essen gehalten und gezüchtet. Diese Mäuse tragen eine Spontanmutation im Insulin-2 Gen auf einem C57BL6/J Hintergrund. Im heterozygoten Zustand entwickeln die Tiere eine hypoinsulinämische Hyperglykämie sowie Polydipsie und Polyurie im Alter von 4-6 Wochen. Als Verpaarungstiere dienten die Wildtypmäuse des C57BL/6J-Stammes (Stock Number: 000664, The Jackson Laboratory, Charles River UK Limited, Margate, UK).

3.1.2 Zucht und Verpaarung

Um die Einflüsse und Folgen der elterlichen Hyperglykämie auf die Entwicklung der Nachkommen vom Wildtyp zu erforschen, wurden 3 verschiedene Verpaarungen gewählt:

Für die 1. Gruppe wurden weibliche und männliche Wildtypen vom C57BL/6J Stamm miteinander verpaart. Die Nachkommen dieser Verpaarung dienten als Kontrolltiere und werden im Weiteren als ECO bezeichnet.

Für die 2. Gruppe wurden weibliche heterozygote, hyperglykämische C57BL6-*Ins2*^{AKITA} /J Mäuse mit männlichen Wildtypen vom C57BL/6J Stamm verpaart. Daraus hervorgegangene weibliche und männliche Wildtyp-Nachkommen werden im Weiteren als EBAK bezeichnet. Am 14. Schwangerschaftstag wurde eine Kontrolle der Glukosekonzentration im Blut der trächtigen Akita-Weibchen durchgeführt.

Für die 3. Gruppe wurden männliche heterozygote, hyperglykämische C57BL6-*Ins2^{AKITA}* /J Mäuse mit weiblichen Wildtypen vom C57BL/6J Stamm verpaart. Die Wildtyp-Nachkommen dieser Verpaarung werden als ECON2 bezeichnet.

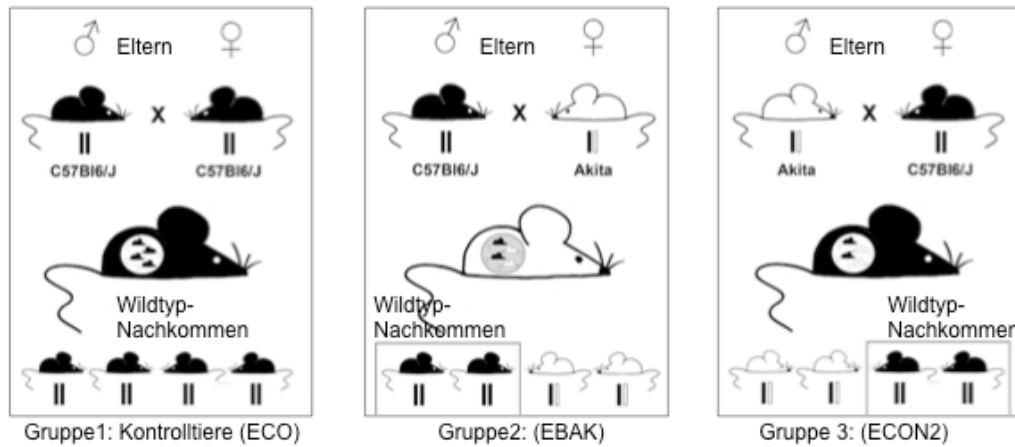


Abbildung 2: Zuchtschema (modifiziert nach (Grasemann et al. 2012))

Gruppen:	1: ECO (Kontrolltiere):	WT Mutter / WT Vater
	2: EBAK (Hyperglykämie der Mutter):	Akita Mutter / WT Vater
	3: ECON2 (Hyperglykämie des Vaters):	WT Mutter / Akita Vater

Für die Verpaarung wurden weibliche Tiere im Alter von 6-12 Wochen mit männlichen Tieren im Verhältnis 2:1 zusammengesetzt. Männliche Tiere wurden am 3. Tag der Verpaarungen aus den Käfigen genommen. Trächtige weibliche Tiere wurden erst paarweise für die folgenden 14 Tage und später separat für die Aufzucht der Jungtiere in Einzelkäfige gesetzt. Jungtiere wurden im Alter von 28 Tagen in Käfige mit 4-5 Tieren abgesetzt.

3.1.3 Tierhaltung

Die Tiere wurden im zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen im Medizinischen Forschungszentrum unter standardisierten und kontrollierten Umgebungsbedingungen bei 25°C im 12-Stunden Tag/Nachtrhythmus gehalten. Alle Tiere befanden sich in den gleichen individuell ventilierten Käfigen und erhielten Trinkwasser ad libitum.

3.1.4 Diäten

Die Tiere bekamen ein normiertes, autoklavierbares M-Z Futtermittel für die Zucht von Mäusen mit folgenden Rohnährstoffen: Rohprotein 22%, Rohfett 4,5%, Rohfaser 3,9%, Rohasche 6,8%, N-freie Extraktstoffe 50,8%, Stärke 34%, Zucker 5%. (Diät-Nr: V 1124-3, Ssniff-Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland.)

Um die intrauterine hyperglykämische Umgebung zu modifizieren, bekam ein Teil der Akita-Weibchen sowie die Weibchen der entsprechenden Kontrollgruppe eine spezielle kohlenhydratreiche Diät mit Rohprotein 17%, Rohfett 5%, Rohfaser 1,5%, Rohasche 4,2%, Monosaccharide 6,65%, Disaccharide 44,1%, Polysaccharide 13,35% (Diät-Nr: C1010, Altromin Spezialfutter GmbH & Co KG, Lage, Deutschland).

3.2 Versuchsverlauf

Die weiblichen Tiere wurden im Alter von 6-12 Wochen mit männlichen Tieren verpaart. Die aus diesen Verpaarungen gezeugten Nachkommen (n = 83) wurden am 20. Lebenstag genotypisiert. In den Tierversuch wurden insgesamt 83 Wildtypnachkommen aller drei Verpaarungsgruppen eingeschlossen. Im Versuchsverlauf kam es zum Ausschluss von 2 Tieren der 2. Gruppe (EBAK) aufgrund eines unterentwickelten und krankhaften Zustandes nach der Geburt.

Bei einzelnen Akita-Müttern zeigten sich nur geringfügig erhöhte Glukosewerte. Um die mütterliche Hyperglykämie zu verstärken und den Einfluss auf den Phänotyp der Nachkommen sicher untersuchen zu können, wurde bei einigen weiblichen Akita-Tieren und weiblichen Kontrolltieren eine Diätmodifizierung (vgl. Kap. 3.1.4) durchgeführt.

Im Alter von 6 Wochen wurde bei allen Nachkommen ein intraperitonealer Glukosetoleranztest (vgl. Kap. 3.3.3). durchgeführt. Vor der Tötung wurden alle Tiere gewogen.

Nach der Tötung wurden stoffwechselaktive Organe zu weiteren molekulargenetischen Untersuchungen (vgl. Kap. 3.4) entnommen.

3.2.1 Organentnahme und Probenasservation

Die Tötung der Tiere wurde im Alter von 6 Wochen entsprechend §4 TSCHG (Tierschutzgesetz) durch eine CO₂-Überdosis unter Vermeidung von Schmerzen durchgeführt.

Die Blutentnahme wurde mittels einer direkten Herzpunktion an toten Tieren durchgeführt. Die Organentnahmen erfolgten unmittelbar nach der Tötung. Nach Öffnung der Bauchdecke erfolgte die Entnahme von Pankreas, perigonadalem Fettgewebe, Leber und rechter Niere. Des Weiteren wurde ein Teil des rechten Musculus quadriceps femoris entnommen.

Alle Proben wurden unmittelbar in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Die Blutproben wurden nach der Entnahme auf Eis gelegt und anschließend für 20 Minuten bei 9000 x g zentrifugiert. Das gewonnene Serum sowie die Organproben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

3.3 Messmethoden

3.3.1 Genotypisierung

Die für die Genotypisierung benötigte DNA wurde aus den Ohrgewebebiopsaten im Rahmen der Mausekennung nach der Ohrlochmethode (gemäß §6 TSCHG) gewonnen.

Die Genotypisierung der Akita-Nachkommen wurde zur Unterscheidung zwischen Wildtyp- und Akita-Genotypen am 20. Lebenstag entsprechend dem von „The Jackson Laboratory“ empfohlenen Protokoll wie folgt durchgeführt:

Zwei sequenzspezifische Primer (vgl. Tab. 1) wurden so gewählt, dass sie den Amplifikationsbereich mit dem zu bestimmenden Polymorphismus flankieren.

Heterozygote Akita-Mäuse weisen eine G (Guanosin) zu A (Adenosin) Transition im Exon 3 des *Insulin2*- Gens auf Chromosom 7 auf. Diese Mutation führt zu einem Aminosäuren-Austausch von Cystein (TGC) zu Tyrosin (TAC) in der Nukleinsäuresequenz (Wang et al. 1999).

Zur Detektion der Allele wurden zwei allelspezifische Oligonukleotid-Sonden eingesetzt, die mit zwei unterschiedlich Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind (vgl. Tab. 1). Die blaue 6-FAM-Sonde (FAM steht für Fluorescein, einen gelben Farbstoff, der blaues Licht absorbiert und blaugrünes Licht abstrahlt) identifiziert die Akita-Mutation, und die grüne JOE NHS Ester-Sonde (6-carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxyfluorescein- als N-Hydroxysuccinimid-Ester) bestimmt den Wildtyp.

Die Unterscheidung beider Genotypen erfolgt über die Bestimmung der Menge von Fluoreszenzfarbstoff am Ende der PCR. Die Bindung beider Sonden zeigt

eine Heterozygotie an. Das lässt eine Alleldiskriminierung von Wildtyp und Akita zu. In der Tabelle 2 sind die Angaben zum Reaktionssatz sind verzeichnet.

Tabelle 1: Primerprotokoll für die Genotypisierung des Akita-WTs (The Jackson Laboratory)

PRIMER	5' LABEL	SEQUENZ 5' --> 3'	3' LABEL	PRIMERTYP
Akita-F		GCA GAA GCG TGG CAT TGT AG		Forward
Akita -R		AGC TGG TAG AGG GAG CAG AT		Reverse
Akita-S-	JOE NHS Ester	TCA GTG CTG CAC CAG C – BHQ1	Black Hole Quencher 1	Probe
Akita-S-	6-FAM (blau)	ATC AGT GCT ACA CCA GC – BHQ1	Black Hole Quencher 1	Probe

Tabelle 2: Reaktionssatz für die Genotypisierung (Applied Biosystems, Darmstadt)

REAKTIONSKOMPONENTEN	VOLUMEN (µl)	ENDKONZENTRATION
2 X TaqMan Fast Universal Master Mix	10	1.00 X
ddH2O	2	-
18 µM Akita-F	1	900 nM
18 µM Akita-R	1	900 nM
5 uM Akita-S-JOE NHS Ester	1	250 nM
5 uM Akita-S-6-FAM	1	250 nM
dna	4	-

Für die Durchführung der quantitative real-time PCR (qPCR)-Amplifizierung wurde folgendes Programm (vgl. Tab. 3) im Thermocycler (StepOne Plus, Applied Biosystem, Darmstadt) verwendet:

Tabelle 3: PCR-Reaktionsablauf (StepOne, Applied Biosystems, Darmstadt)

SCHRITT	TEMPERATUR	DAUER	ZYKLEN
Aktivierung	95°C		
Denaturierung	95°C	3 min	
Annealing	95°C	5 s	X 40
Elongation	60°C	15 s	

3.3.2 Messung der Glukosekonzentration (nüchtern) der trächtigen Tiere

Die Blutentnahme zur Bestimmung der Glukosekonzentration im Blut erfolgte am 14. Schwangerschaftstag bei allen Müttern der 2. Gruppe vor der Verpaarung durch das Anritzen der Schwanzvenen. Die Glukosekonzentration im Blut wurde mit Hilfe eines Glukosemessgerätes (Contour, Bayer Vital GmbH, Diabetes Care, Deutschland) bestimmt.

3.3.3 Intraperitonealer Glukosetoleranztest (ipGTT)

Um die Glukoseverwertung bei den Wildtyp-Nachkommen beurteilen zu können, wurde bei Tieren aller 3 Gruppen ($n = 81$) im Alter von 6 Wochen ein intraperitonealer Glukosetoleranztest durchgeführt. Vor der Testdurchführung wurden die Tiere 6 Stunden nüchtern gehalten. Nach der Bestimmung der Nüchternglukose zum Zeitpunkt 0 Minuten (vgl. Kap. 3.3.2) wurde jedem Tier eine sterile Glukoselösung gewichtsadaptiert in einer Dosis von 2g Glukose/kg KG intraperitoneal injiziert. Weitere Messungen der Glukosekonzentration wurden zu dem Zeitpunkt 30, 60 und 120 Minuten nach der Injektion durchgeführt. Da durch eine Fehlinjektion (in den Intestinaltrakt oder Leber) falsch niedrige beziehungsweise erst spät erhöhte Werte entstehen, wurde der Test nur gewertet, wenn sich eine mindestens 50%ige Steigerung der Glukosekonzentration nach 30 Minuten nachweisen ließ.

Für die weitere Auswertung wurden aus den Glukosemessungen zum Zeitpunkt 0, 30, 60 und 120 Minuten die Area under the curve (AUC)-Werte wie folgt berechnet: $AUC = \frac{1}{2} \sum (t_{i+1} - t_i)(y_i + y_{i+1})$, mit t – Messzeit und y – Messwert (Matthews et al. 1990).

3.3.4 Bestimmung der NO_x-Konzentration im Serum der Maus

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein freies Radikal mit einer Halbwertszeit von wenigen Sekunden. Aus diesem Grund wird die kumulative Konzentration seiner Metabolite, Nitrit und Nitrat als Maß für die NO-Synthese bestimmt. Die Nitrat-/Nitritbestimmung erfolgt basierend auf der Griess-Reaktion, einer Reduktion von Nitrit zu Nitrat (Green et al. 1981). Für die Nitrit-/Nitratbestimmung wurden folgende Reagenzien zuerst vorbereitet: Aus einem Nitrat-Test-Kit (Roche Custom Biotech, Nr. 10905658035) wurde Nitratreduktase (20U) mit 1600µl Aqua bidest gelöst und portioniert bei -20°C eingefroren und ein Imidazolpuffer (600µM NADPH/ml und 1 Tablette Imidazol 32mM) verwendet. Das Griess-Reagenz wurde im Verhältnis 1:1 aus folgenden Lösungen (A und B) angesetzt: Lösung A: 0,1% Naphtylethylendiamin (Sigma Aldrich, Nr. N-9125-10G, Darmstadt) in Aqua bidest 100mg/100ml gelöst und Lösung B: 1% Sulfanilamid (Sigma Aldrich, Nr. S-9251-100G) in 5%iger Phosphorsäure 1g/100ml (5,8ml 85%ige H₂PO₄ in 94,2ml Aqua bidest, Firma Roth, Nr. 9079.1) gelöst. Ein Phosphatpuffer (50mM, pH 7,5) wurde wie folgt zubereitet: Zu K₂HPO₄ – 3H₂O – 11,411g/l-Lösung (Sigma, P-

9666-100G) wurden so viel KH_2PO_4 – 1,701g/250ml Lösung (Sigma, P-9791-100G) gegeben, bis der pH auf 7,5 eingestellt war. Aus 10mM Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe (Nitrit und Nitrat) angesetzt. Für die Nitrat-Testdurchführung wurden vorbereitete Reagenzien und Substrate wie folgt eingesetzt: 10 μl Probe wurden mit 40 μl Phosphatpuffer, 20 μl Imidazolpuffer und 2 μl Nitratreduktase-Lösung zusammengemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden eine Mischung aus 1 μl Pyruvat (24mg/ml Aqua bidest, Sigma, Nr. 2256-5G) und 1 μl einer LDH-Suspension (Roche, Nr. 10107085001, 1:5 mit Phosphatpuffer verdünnt) dazugegeben und bei Raumtemperatur für weitere 20 Minuten inkubiert. Im weiteren Schritt wurden 150 μl Griess-Reagenz zugefügt. Die entstandene Mischung wurde in einer ELISA-Platte überführt und bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte eine Messung der Extinktion bei 550nm (Mithras LB940 Multimode Microplate Reader, Berthold Technologies, USA). Der Nitrit-Test erfolgte wie oben beschrieben, wobei zu 10 μl Probe 50 μl Phosphatpuffer und 150 μl Griess-Reagenz zugemischt wurden. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die photometrische Messung der Extinktion bei 550nm.

3.4 RNA - und DNA- Analysen

3.4.1 RNA-Extraktion

Die Gesamt-RNA wurde aus dem jeweiligen Gewebe mit Hilfe des miRNeasy-Mini Kits (Cat NO. 217004, Qiagen, Hilden) isoliert. Die Isolierung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Gewebeproben für die RNA-Extraktion wurden auf Eis aufgetaut und stets auf Eis gehandhabt.

Im ersten Schritt wurde das im flüssigen Stickstoff, bei -80°C gelagerte Gewebe in Stücke von 20-30 mg zerkleinert und unter Gabe von 700 μl QIAzol[®]-Reagenzlösung im TissueLyser (Qiagen) bei 50Hz 4 Minuten lang homogenisiert.

Die homogenisierten Proben wurden anschließend bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Im zweiten Schritt wurde 140 μl Chloroform zu den Proben zugefügt und für 15 Sekunden stark geschüttelt. Anschließend wurden die Proben für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und bei 4°C und 12000 x g für 15 Minuten zentrifugiert (Megafuge 16R, Thermo Scientific, Wilmington, USA). Alle folgenden Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Nach dem Zentrifugieren wurde die wässrige Phase mit 1,5 ml 100%igen Ethanol extrahiert und 700 μl der Probe,

inklusive möglichen Fällungspartikeln, in eine sogenannte RNeasy[®]- Mini-Säule, pipettiert und bei >8000 x g für 15 s zentrifugiert. Nach der Zugabe von 700µl des RWT-Puffers auf die RNeasy[®]- Mini-Säule wurden die Proben erneut bei >8000 x g für 15 s zentrifugiert.

Zur Reinigung wurde zweimal mit jeweils 500µl RPE-Puffer gewaschen und jeweils bei >8000 x g einmal für 15 s und einmal für 2 min zentrifugiert. Am Ende der Reinigungsschritte wurde die RNeasy[®]- Mini-Säule in ein neues 1,5 ml großes Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 50µl RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation eluiert.

3.4.2 Bestimmung der RNA-Konzentration und Reinheit

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch (NanoDrop 1000, Thermo Scientific, Wilmington, USA). Dafür wurden Absorptionsmessungen bei einer Wellenlänge von 260nm durchgeführt. Um den RNA-Reinheits-, bzw. Kontaminationsgrad zu berechnen, wurde als Kontrolle die Absorption bei einer Wellenlänge von 280nm gemessen. Daraus konnte das Verhältnis der RNA-Absorption zu Proteinabsorption für die RNA-Reinheitsqualität bestimmt werden. Nach der Konzentrationsbestimmung wurden RNA-Proben zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.4.3 DNase I- Behandlung

Im Anschluss auf die RNA-Isolierung wurde eine Deoxyribonukläinsäure-Verdau-Reaktion nach Angaben des Herstellers (DNase I Reaktion, Kat.Nr.: 18068, Invitrogen, Darmstadt) durchgeführt. Dieser Schritt erfolgte vor der cDNA-Synthese und RT-PCR und ermöglichte eine RNA-Purifikation durch die DNA-Elimination. Eine RNA-Gebrauchslösung mit Konzentration von 1µg/µl wurde unter Zugabe des RNase-freien Wassers zu den RNA-Proben auf Eis hergestellt. Der Reaktionssatz für DNase-Reaktion (vgl. Tab. 4) wurde zusammen pipettiert und die RNA hinzugegeben.

Tabelle 4: Reaktionssatz für die DNase I Reaktion (Invitrogen, Darmstadt)

REAKTIONSKOMPONENTE	VOLUMEN (µL)
10 X DNase I Reaktionspuffer	1
ddH ₂ O	6
DNase I Amp Grade (1U/µl)	1
RNA (1µg/µl)	2

Nach Zentrifugation (Tischzentrifuge EBA 20, Andreas Hettig GmbH & Co. KG, Tuttlingen) erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur für 15 Minuten. Anschließend wurde die DNase I unter der Gabe von 1 µl EDTA in Konzentration von 25 mM inaktiviert und in Veriti[®] Thermocycler (Applied Biosystems, Darmstadt) bei 65°C 10 min inkubiert.

3.4.4 cDNA-Synthese

Aus der isolierten RNA (vgl. Kap. 3.4.1) wurde im folgenden Schritt die komplementäre DNA (cDNA) mittels der Reversen Transkription synthetisiert. Für die cDNA-Synthese wurden das SuperScript[™] II Reverse Transkriptase – Kit, inklusive Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Kat. Nr.: 18418) der Firma Invitrogen, Darmstadt und Random Hexamere der Firma Carl Roth GmbH, Karlsruhe verwendet.

Zuerst wurde der zusammengestellte Reaktionssatz 1 (vgl. Tab. 5) zur RNA-Probe mit Konzentration von 500ng/µl hinzugefügt.

Tabelle 5: Reaktionssatz 1 für die cDNA-Synthese

REAKTIONSKOMPONENTE	VOLUMEN (µL)
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ 500ng/µl	2
ddH ₂ O	2
Random primer 250ng/µl	2
10mM dNTP	1
RNA 500ng/µl	5
Endvolumen pro Reaktion	10

Die daraus entstandenen Proben wurden im Veriti-Thermocycler (Applied Biosystems, Darmstadt) bei 65°C für 5 Minuten denaturiert und anschließend sofort auf Eis gelegt. Im zweiten 2. Schritt wurde der Reaktionssatz 2 aus der Tabelle 6 zubereitet den Proben hinzugegeben und zentrifugiert. Anschließend wurde die Amplifikation des Ansatzes im Veriti-Thermocycler durchgeführt:

Tabelle 6: Reaktionssatz 2 für die cDNA-Synthese (Invotrogen, Darmstadt)

REAKTIONSKOMPONENTE	VOLUMEN (µL)
5x First Strand Puffer	4
ddH ₂ O	3
0,1 M DTT	2
SuperScript II (200U/µl)	1
Endvolumen pro Reaktion	10

Tabelle 7. Reaktionsablauf (Veriti-Thermocycler, Applied Biosystems, Darmstadt)

SCHRITT	TEMPERATUR	DAUER
Inkubation	42°C	50 min
Inaktivierung der Reaktion	70°C	15 min
Stand by	4°C	

Die synthetisierten cDNA-Proben wurden bei -20°C gelagert.

3.4.5 Durchführung der quantitativen real-time PCR

Für eine zuverlässige Quantifizierung einer spezifischen RNA wurde die quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) angewendet. Die quantitative Bestimmung erfolgte mithilfe eines unspezifischen Fluoreszenzfarbstoffes, SYBR Green I (asymmetrischer Cyanin-Farbstoff), der den Einsatz von unmodifizierten Primerpaaren erlaubt.

SYBR Green I ist ein DNA-bindender Farbstoff, der nicht-sequenzspezifisch in die doppelsträngige DNA interkaliert und somit ihrem Nachweis dient. Die Fluoreszenz des amplifizierten PCR-Produkts wurde in jedem einzelnen Reaktionszyklus gemessen. Da die Fluoreszenzintensität direkt proportional zu Menge des gebildeten Produkts ist, wird eine quantitative Bestimmung der Menge eingesetzter DNA ermöglicht (Jansohn und Rothhämel 2012). Die Produktspezifität wurde mittels einer Schmelzpunktanalyse im Thermocycler überprüft.

Die quantitative real-time PCR wurde mit den genspezifischen Primern sowie mit den Primern des Housekeeping-Gens Actin und dem SYBR Green PCR Master-Mix der Firma Applied Biosystem durchgeführt. Ein Ansatz erhielt die 4µl cDNA, 1µl Primer, 10µl SYBR Green I und 5µl RNase-freies Wasser mit Gesamtvolumen von 20µl. Es erfolgte eine Doppelbestimmung jeder cDNA-Probe für jedes Gen.

Folgendes qPCR-Programm wurde zur Amplifizierung im Thermocycler durchgeführt:

Tabelle 8: qPCR-Reaktionsablauf (StepOne, Applied Biosystems, Darmstadt)

SCHRITT	TEMPERATUR	DAUER	ZYKLEN
Aktivierung	95°C		
Denaturierung	95°C	2 min	
Annealing	95°C	3 s	X 40
Elongation	60°C	3 min	

Die Amplifikationsergebnisse der qPCR wurden mit Hilfe der StepOne v2.1 Software bildlich dargestellt und analysiert (Applied Biosystems). Die Primer wurden mit dem Primer Express Programm der Firma Applied Biosystems designt und sind in der Tabelle 9 verzeichnet:

Tabelle 9: verwendete Oligonukleotide für qPCR mit SYBR Green I

PRIMER	SEQUENZ (5' → 3')	PRIMERTYP
ACTB-mu-558	AGA CTA CCT CAT GAA GAT CCT GAC C	Forward (Referenzgen)
ACTB-mu-662	AGA GCA ACA TAG CAC AGC TTC TCT T	Reverse (Referenzgen)
nNOS-mu-42	CTC AGG TTC CTG TGG GAG TCG TCT T	Forward
nNOS-mu-150	CAG AAA TGA CGT TGG GTT GGA TCT G	Reverse
PRMT10-mu-747	GCG CAC AAT CAG TAT ATG CCT GTG AAT	Forward
PRMT10-mu-834	CAT TTT CCA TCT TGT TTG CAG CCA CT	Reverse
eNOS-mu-3711	AAT GCC TAC AGC ATT GTT TGC AAG G	Forward
eNOS-mu-3820	GCC GGA GGA ACC TTC AAG ATT TAG G	Reverse
PRMT1-1-mu-1087	GAG GAG ATC TTT GGC ACC ATT GGA A	Forward
PRMT1-1-mu-1189	AGA GCT CAC ACA GCT GAC CCT TGA A	Reverse

3.4.6 Auswertungsmethode nach Livak et al. ($2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode)

Für die Auswertung der PCR-Ergebnisse wurde die Methode der relativen Quantifizierung, auch als komparative threshold- $2^{-\Delta\Delta Ct}$ - Methode bekannt, verwendet (Livak und Schmittgen 2001).

3.5 Methylierungsanalysen

Um das Vorhandensein der DNA-Methylierungen zu untersuchen, wird eine Reihe der Methoden benötigt, die in den unteren Abschnitten ausführlich beschrieben werden.

3.5.1 DNA-Isolierung

Die DNA wurde aus dem Muskelgewebe mit dem DNeasy Blood & Tissue-Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers wie folgt isoliert und gereinigt: das Muskelgewebe (max. 25mg) wurde in kleine Stücke geschnitten und mit 380µL ATL Puffer versetzt. Die homogenisierten Proben wurden anschließend mit 20µl Stammlösung Proteinase K versetzt und bei Temperatur von 56°C auf einem Rotationschüttler über Nacht zum Erreichen der vollständigen Lyse inkubiert. Nach der Inkubation von 1 Minute bei Raumtemperatur und Zentrifugation bei 6000 x g

wurde die isolierte DNA mit 100µl DNase-freiem Wasser eluiert. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte, wie vorher beschrieben (vgl. Kap. 3.4.2) photometrisch (NanoDrop 1000, Thermo Scientific, Wilmington, USA). Die eluierte DNA wurde entweder anschließend direkt für weitere Analysen eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

3.5.2 Bisulfitbehandlung

Die Methode der Bisulfitsequenzierung dient im Rahmen der epigenetischen Untersuchungen der Detektion von DNA-Methylierungen und basiert auf der Desaminierung von Cytosin in Einzelstrang-DNA durch Inkubation mit Natriumbisulfit bei niedrigem pH und hoher Temperatur. Das dadurch entstandene Uracilsulphonat wird zu Uracil desulfonyliert. Da bei dieser Reaktion keine Konvertierung von Hydroxymethylcytosin und Methylcytosin stattfindet, erlaubt die anschließende Sequenzierung, das Methylierungsmuster der CpG-Inseln der konvertierten DNA zu bestimmen. Die DNA-Sequenz wird mit methylierungsspezifischen Primern in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Nach einer Sequenzierung des PCR-Produktes erfolgte die Bestimmung des Methylierungsgrades.

Die Bisulfitbehandlung erfolgte mit der Hilfe des EZ-DNA Methylation-Gold™ Kits (Zymo Research, Freiburg) nach Angaben des Herstellers. Im ersten Schritt der Bisulfitbehandlung wurden 900µl Wasser mit 300µl M-Verdünnungspuffer und 50µl M-Lösungspuffer zu einer CT-Konversionsreagenz zusammengesetzt und für 10 Minuten unter Raumtemperatur durchmischt. Nach Beigabe von 130µl des CT-Konversionsmixes zu 20µl DNA wurde folgendes Programm im Veriti-Thermocycler (vgl. Tab. 10) durchgeführt:

Tabelle 10: PCR-Reaktionsablauf (Veriti-Thermocycler, Applied Biosystems, Darmstadt)

SCHRITT	TEMPERATUR	DAUER
Desaminierung	98°C	10 min
Bisulfit-Reaktion	64°C	150 min
Stand by	4°C	

In einem weiteren Schritt wurden 600µl M-Bindungspuffer und DNA-Proben auf die ZymoSpin™ - IC-Säule gegeben und durchmischt. Nach dem Zentrifugieren

bei >6000 x g für 30 Sekunden wurde 100µl M-Waschpuffer auf die Säule gegeben und 30 Sekunden lang zentrifugiert.

In dem nächsten Schritt wurde 200µl M-Desulfonierungspuffer hinzugefügt, für 20 Minuten inkubiert und anschließend mit voller Geschwindigkeit für 30 Sekunden zentrifugiert. Nach der zweimaligen Wiederholung des Reinigungsschrittes mit 200µl M-Waschpuffer wurde 10µl M-Elutionspuffer direkt auf die Säulenmembran zur DNA dazugegeben.

3.5.3 Identifizierungsmethode von CpG-Islands von dem murinen nNOS Gen

Mit Hilfe des Genome Browsers der Universität von Kalifornien, Santa Cruz, konnte auf dem Chromosom 5 im Bereich 117841794-117842411 (GRCm38/mm10) ein CpG-Island (CpG-49) identifiziert werden (vgl. Abb. 3).

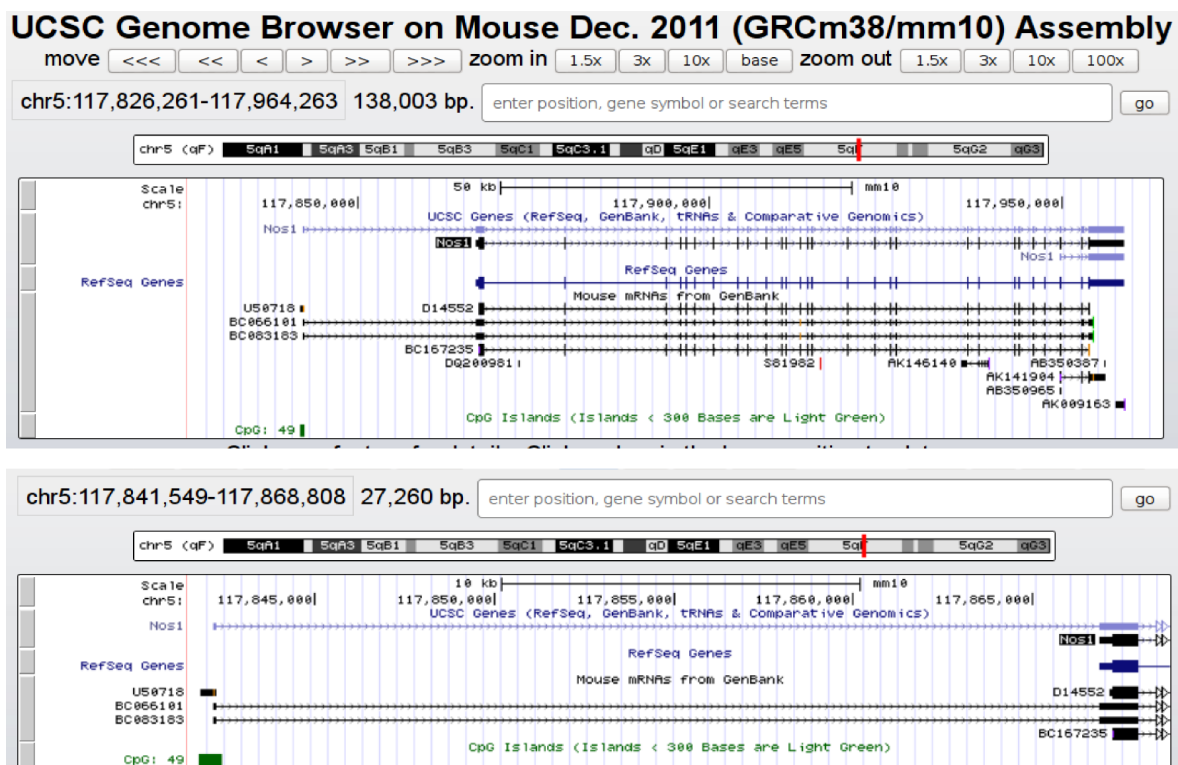


Abbildung 3: Übersicht über das NOS1 Gen in Skelettmuskel und einem CpG-Island im 5'-untranslatierten Bereich vor exon 1. Das CpG Island (CpG-49) im Detail im Vergleich mit der genomischen Sequenz (NC_000071) und markierten CpGs

Im ersten Analyseschritt wurde die zum Untersuchungsbeginn noch unbekannte 5'-Sequenz des murinen nNOS-Gens im Skelettmuskel bestimmt. Um Veränderungen in der DN-Methylierung zu untersuchen, wurde im weiteren Schritt

die Häufung der CpG-Stellen analysiert. Es konnten 47 CpGs als potentielle Methylierungsstellen in diesem Bereich identifiziert werden.

3.5.4 Methylierungsspezifische PCR (MSP)

Im Anschluss an die Bisulfitbehandlung wurde die Amplifikation mittels der methylierungsspezifischen PCR durchgeführt. Während des PCR-Vorganges paaren sich die Bisulfit-Uracile mit komplementärem Adenin, sodass in weiterfolgenden Zyklen an diese Stelle im komplementären DNA-Strang Thymin eingebaut wird. Auf der DNA-Sequenz und an den Stellen, wo sich ursprünglich 5-Methylcytosine befunden haben, findet dieser Austausch nicht statt. Die PCR-Ansätze wurden nach dem in der Tabelle 11 aufgeführten Schema auf Eis pipettiert:

Tabelle 11: Reaktionssatz für die MSP (Applied Biosystems, Darmstadt)

REAKTIONSKOMPONENTE	VOLUMEN (µL)
10x PCR Puffer	2.5
ddH ₂ O	12.5
2mM dNTP	2.5
2.5mM MgCl ₂	2.5
1.5U-Taq-Polymerase (AmpliTaqGold)	0.5
0.2µM Primer (Tab Xf)	2.5
DNA-Probe	2
Endvolumen pro Reaktion	25

3.5.5 Primersynthese für MCP

Die, wie im Kapitel 3.5.3. dargestellt, identifizierte Sequenz von CpG-49 wurde in das MethPrimer-Programm (Li und Dahiya 2002) eingegeben. Dort wurden die vorgeschlagenen Primer synthetisiert (vgl. Tab. 12) und mit Bisulfit-behandelter DNA ausgetestet. Die erwarteten Produktgrößen wurden ohne störende Zusatzbanden gefunden. Das Primerpaar N2 war in wiederholten Experimenten nicht zuverlässig zu sequenzieren, daher wurden die nachfolgenden Sequenzierungen mit N1 und N3 durchgeführt:

Tabelle 12: für die MSP benutze Primer (N1, N2, N3)

PRIMERPAARE	SEQUENZ (5' → 3')
N1 NOS1-mu-M2-81F	CTTGCTTCCTGGCAGAGGGGATATTAAGAAATAAATTTTTTTT
N1 NOS1-mu-M2-252R	CAGGAAACAGCTATGACCTAAAACTACCAACTCCCTTAC
N2 NOS1-mu-M2-81F	CTTGCTTCCTGGCAGAGGGGATATTAAGAAATAAATTTTTTTT
N2 NOS1-mu-M2-346R	CAGGAAACAGCTATGACCCACAAAATAAAAACTTCCAAAAC
N3 NOS1-mu-M2-327F	CTTGCTTCCTGGCAGAGTTGGAAGTTTTTATTTTGTGG
N3 NOS1-mu-M2-531R	CAGGAAACAGCTATGACCTAAAAAATACATAAAATACCTTAAATCC

Die Amplifikation von Bisulfit-behandelten DNA erfolgte im Veriti-Thermocycler nach einem Touchdown-Protokoll (Don et al. 1991), modifiziert nach M. Zeschigk, Institut der Humangenetik, Universitätsklinikum Essen:

Tabelle 13: MCP-Reaktionsablauf (Veriti-Thermocycler, Applied Biosystems, Darmstadt)

SCHRITT	TEMPERATUR	DAUER	ZYKLEN
Denaturierung	95°C	5 min	1
Annealing	95°C	20 s	X 14
-0,5°C pro Zyklus bis auf 56°C	63°C	1 min	
Extension	72°C	1 min	
Annealing	95°C	20 s	X 35
-0,5°C pro Zyklus bis auf 56°C	63°C	1 min	
Extension	72°C	1 min	
	72°C	5 min	

Die verschiedenen PCR Produkte (N1 und N3) wurden hergestellt (vgl. Abb. 4).

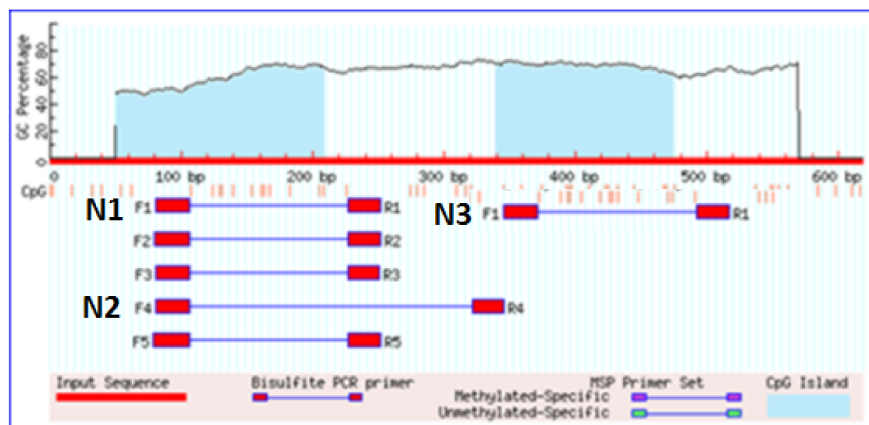


Abbildung 4: Output Methprimer für das CpG islands CpG-49. Blaue Region zeigt CpG-Inseln und kurze Striche stellen einzelne CpG Dinukleotide dar.

3.5.6 Aufreinigung der PCR-Produkte

Für die Durchführung einer effizienten Sequenzierung müssen PCR-Produkte von den restlichen Nukleotiden, Primern und Polymerasen befreit werden. Dafür wurde ein QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) eingesetzt.

Folgende Schritte wurden vor dem Beginn der Reinigung durchgeführt: PE-Puffer wurde mit 100%igem Ethanol verdünnt. Ein gelber pH-Indikator I (pH \leq 7,5) wurde im Volumenverhältnis 1:250 dem PB-Puffer zugegeben. Alle Schritte fanden bei Raumtemperatur statt. Die Zentrifugation der Reagenzien erfolgte mit 17900 x g. Das 25 μ l PCR-Produkt wurde mit 25 μ l Wasser und 250 μ l PB versetzt und auf die Säule gegeben. Nach einem kurzen Zentrifugieren wurden 750 μ l PE-Puffer hinzugefügt und erneut für 60 Sekunden zentrifugiert. Die Säule wurde in ein sauberes Auffanggefäß gestellt und zentrifugiert. Im letzten Schritt konnte die DNA durch eine direkte Gabe von 30 μ l Wasser auf die Säulenmembran eluiert werden. Die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte, wie vorher bereits beschrieben (vgl. Kap 3.4.2.) mit NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA).

3.5.7 Gelelektrophorese

Im weiteren Schritt wurden die Ergebnisse der PCR-Amplifikation mittels Gelelektrophorese kontrolliert. (1,5%ige Agarose) Dabei wurden die PCR-Produkte anhand ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert.

Das 1,5%ige-Agarosegel wurde wie folgt zusammengesetzt:

Wasser	100ml	
Agarose	1,5g	(Agarose High Resolution, Roth, Karlsruhe)
TAE(50x)	2ml	(Tris Acetate-EDTA Puffer, Sigma, St.Louis, USA)

Die Agarosesuspension wurde in einem Mikrowellengerät aufgeköcht und unter Rühren bei Raumtemperatur auf 60°C abgekühlt. Die Agaroselösung wurde im Weiteren in die Gelkammer gegossen und bei Raumtemperatur zum Erstarren gebracht. Anschließend wurde das Gel mit TAE-Puffer überschichtet. 20 μ l DNA-Probe wurde mit 3,2 μ l Ladepuffer (6xTAE) versetzt und in die Probetasche eingebracht. Nach dem Probeauftrag wurde ein Lauf bei 80-100 Volt durchgeführt.

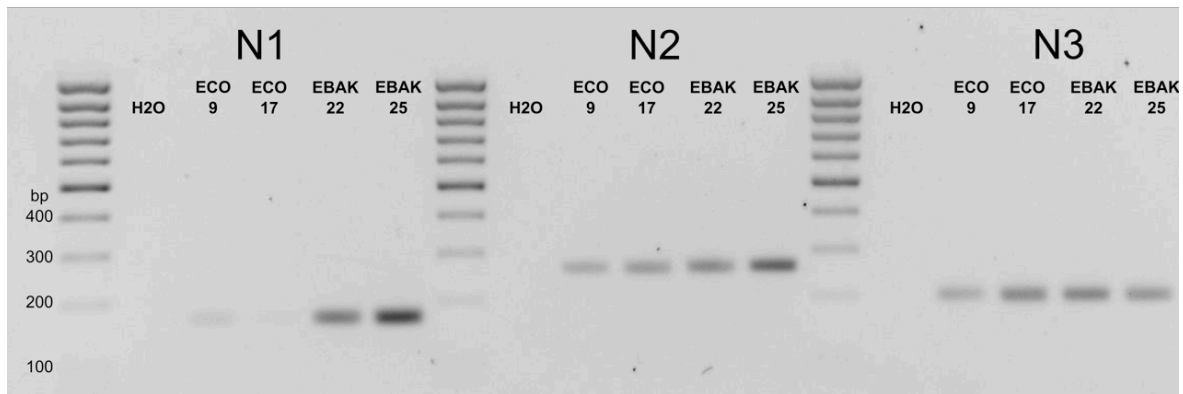


Abbildung 5: Agarosegel (1,5%) als Kontrolle der PCR Reaktion. Jeweils 20µl wurden aufgetragen. Marker DNA Mass ruler low (Fermentas) 10µl.

3.5.8 DNA-Extraktion aus dem Gel

Ließen sich mehrere Produkte im Gel darstellen, so erfolgte anschließend eine DNA-Elution aus dem Gel mittels Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, Freiburg). Im ersten Schritt wurden die DNA-Fragmente aus dem Gel herausgeschnitten und mit einem ADB-Puffer im 1:3 Verhältnis in ein 1,5ml-Gefäß gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37-55°C für 10 Minuten. Nach dem vollständigen Auflösen des Gels wurde die DNA-Gellösung auf die Zymo Spin™-Säule gegeben und für 1 Minute bei 16000 x g zentrifugiert. 6ml DNA-Waschpufferkonzentrat wurden mit 24ml 100%igem Ethanol und anschließend 24 ml DNA-Waschpuffer mit 96ml 100%igem Ethanol versetzt. Im nächsten Schritt wurde 200µl DNA-Waschpuffer auf die Säule gegeben und für 30 Sekunden zentrifugiert. Nach einer Wiederholung dieses Reinigungsschrittes wurden 30µl DNA-Elutionspuffer direkt auf die Säulenmembran gegeben. Die Säule wurde anschließend in ein sauberes 1,5ml-Auffanggefäß gestellt und nach dem Zentrifugieren für eine Minute die DNA eluiert.

3.5.9 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden im Institut der Humangenetik des Universitätsklinikums Essen mit dem ABI PRISM®3100 Genetic Analyzer durchgeführt (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt und elektronisch (Clustal Omega) miteinander verglichen (Alignments).

3.6 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit der Statistiksoftware GraphPad PRISM Inc., Version 7.0. (La Jolla, USA). Die Daten wurden nach Geschlecht und Gruppe aufgeteilt und als Median dargestellt. Alle Messreihen wurden auf Normalverteilung untersucht. Es lag keine Normalverteilung der Messwerte vor, so wurden nichtparametrische Testverfahren verwendet. Zur Analyse der Unterschiede in zentralen Tendenzen von 2 Gruppen wurden der Mann-Whitney-Test und bei mehr als 2 Gruppen der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Die Korrelationsanalyse erfolgte nach Spearman.

Die Mittelwerte der Serumglukose im Glukosetoleranztest wurden mit Standardfehlern dargestellt und nach Tukey (bei mehr als 2 Gruppen) bzw. nach Sidak (bei 2 Gruppen) auf das Vorliegen einer Signifikanz untersucht. Ergab die Irrtumswahrscheinlichkeit p einen Wert kleiner als 0,05, so wurde ein Ergebnis als signifikant gewertet ($***p < 0,001$, $**p < 0,01$, $*p < 0,05$).

4 ERGEBNISSE

4.1 Versuchsaufbau

Die folgenden Ergebnisse beziehen sich auf die Untersuchungen an Wildtyp-Nachkommen aus den drei Verpaarungsgruppen (s.u.) im Alter von 6 Wochen. Die Einteilung der Versuchstiere in die Gruppen erfolgte aufgrund des Genotyps der Elterntiere:

Gruppe 1, ECO (Kontrolltiere):	WT Mutter / WT Vater
Gruppe 2, EBAK (Hyperglykämie der Mutter):	Akita Mutter / WT Vater
Gruppe 3, ECON2 (Hyperglykämie des Vaters):	WT Mutter / Akita Vater

Insgesamt wurden 81 Nachkommen charakterisiert. 63 Tiere wurden gewogen, 62 Tiere mittels des intraperitonealen Glukosetoleranztests (ipGT) getestet, Gewebeproben aller 81 Tiere wurden bezüglich der Genexpression untersucht und DNA-Proben von 7 Tieren wurden bezüglich des Methylierungsmusters in nNOS untersucht.

In früheren Studien wurde bereits gezeigt, dass es große Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Nachkommen innerhalb der Gruppen gibt, sodass alle Daten nach Geschlecht aufgeteilt wurden.

4.2 Körpergewicht

4.2.1 Entwicklung des Körpergewichts in Abhängigkeit von mütterlicher oder väterlicher Hyperglykämie

Im Alter von 6 Wochen zeigten sich bei den männlichen Tieren keine Unterschiede zwischen Nachkommen der Kontrolltiere (ECO) und Nachkommen aus mütterlicher Hyperglykämie (EBAK). Die Nachkommen aus väterlicher Hyperglykämie (ECON2) waren hingegen signifikant schwerer im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,005$) und im Vergleich zu den EBAKs ($p < 0,0003$). Bei den weiblichen Tieren gab es keine Gewichtsunterschiede (vgl. Abb. 6).

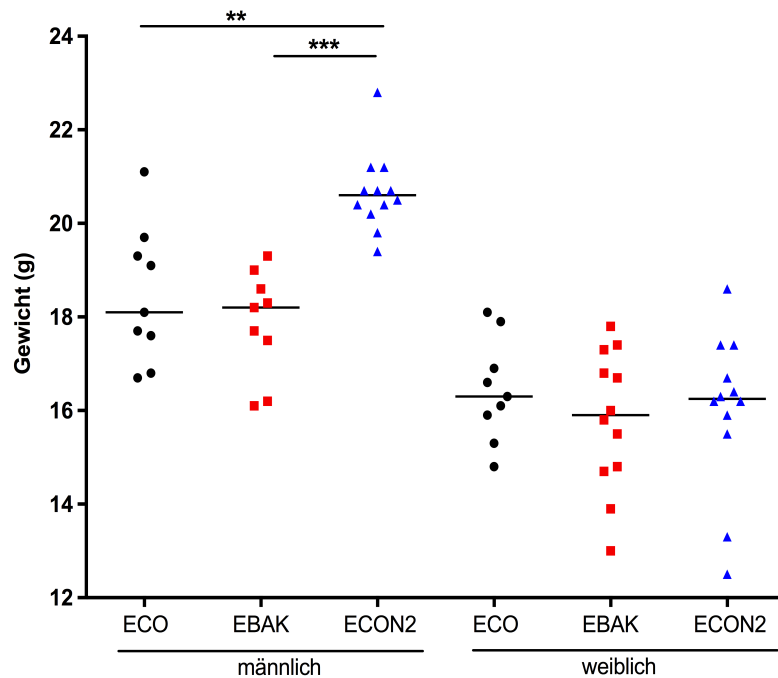


Abbildung 6: Gruppen- und geschlechtsspezifische Gewichtsverteilung der Nachkommen: Männliche Nachkommen (linke Seite) hyperglykämischer Väter (ECON2s, blaue Dreiecke) sind signifikant schwerer als Nachkommen von Kontrolltieren (ECOs, schwarze Kreise) ** $p < 0,005$ und Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK, rote Quadrate) *** $p < 0,0003$. Bei weiblichen Tieren (rechte Seite) zeigt sich kein Unterschied. Linie = Median, männlich (n 9-12), weiblich (n 9-12)

4.2.2 Gewichtsentwicklung in Abhängigkeit von diabetogenem mütterlichem Futter

Die Wildtypnachkommen (Kontrolltiere (ECO) und Tiere aus mütterlicher Hyperglykämie (EBAK)) derjenigen Mütter, die ein diabetogenes Futter bekamen, werden im folgenden als „ECO diab“ und „EBAK diab“ bezeichnet. Männliche und weibliche Nachkommen der Tiere mit diabetogenem Futter waren im Trend leichter als die Nachkommen, deren Mütter keine Diätmodifizierung erhalten hatten (vgl. Tab. 14 und Abb. 7). Für die männlichen Nachkommen der Kontrollgruppe „ECO diab“ ergab sich ein signifikant ($p < 0,05$) geringeres Körpergewicht als für ECO-Nachkommen von Müttern mit Normalfutter.

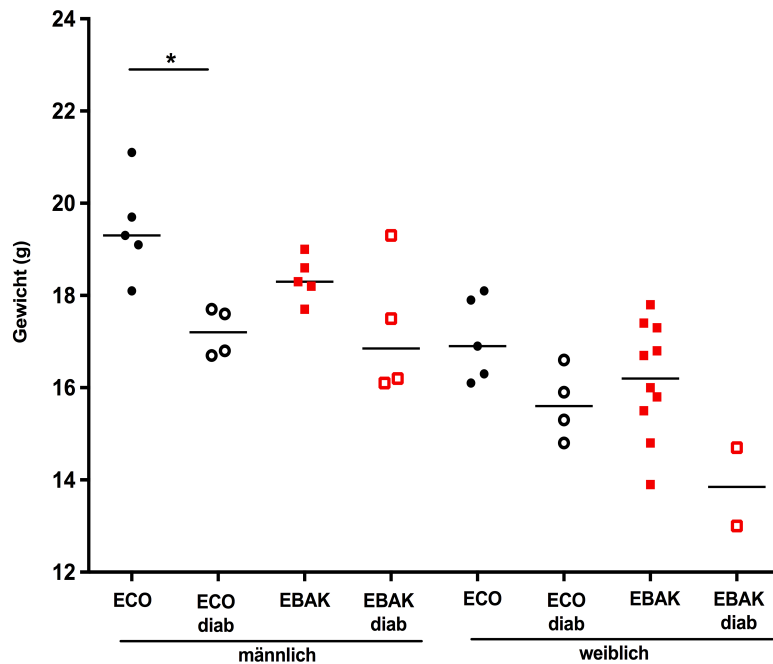


Abbildung 7: Gruppen- und geschlechtsspezifische Gewichtsverteilung der Nachkommen. Männliche Kontrolltiere mit mütterlichem diabetogenem Futter (ECO diab, offene schwarze Kreise) sind signifikant leichter als Kontrolltiere mit mütterlichem Normalfutter (ECO, schwarze Kreise) * $p < 0,04$. Linie = Median, männlich (n 4-12), weiblich (n 2-12)

Tabelle 14: Zusammenfassung der Körpergewichte (g) männlichen und weiblichen Nachkommen mit und ohne mütterliches diabetogenes Futter. (Legende: ECOm/w- männliche/weibliche Kontrolltiere, EBAKm/w- männliche/weibliche Nachkommen von hyperglykämischen Müttern, NF – Normalfutter, diab – diabetogenes Futter, IQR-Quartilsabstand Q75-Q25, STD-Standardabweichung, MW-Mittelwert)

Gruppen	ECOm		EBAKm		ECOw		EBAKw	
	NF (n = 5)	Diab (n = 4)	NF (n = 5)	Diab (n = 4)	NF (n = 5)	Diab (n = 4)	NF (n = 10)	Diab (n = 2)
Ernährung der Mütter	NF (n = 5)	Diab (n = 4)	NF (n = 5)	Diab (n = 4)	NF (n = 5)	Diab (n = 4)	NF (n = 10)	Diab (n = 2)
Median (g)	19,3	17,2	18,3	16,8	16,9	15,6	16,3	13,8
IQR (g)	1,8	1,0	0,9	2,7	1,8	1,5	2,0	1,7
MW(g)	19,5	17,2	18,4	17,3	17,0	15,6	16,2	13,8
STD (g)	1,1	0,5	0,5	1,5	0,9	0,8	1,2	1,2

4.2.3 Zusammenhang zwischen dem Körpergewicht der Versuchstiere und der mütterlichen Nüchtern glukose

Es fand sich kein Zusammenhang zwischen dem Körpergewicht der weiblichen oder männlichen Nachkommen von Müttern mit Hyperglykämie (EBAK) und der Höhe der mütterlichen Glukosekonzentration im Blut am 14. Schwangerschaftstag (vgl. Abb. 8).

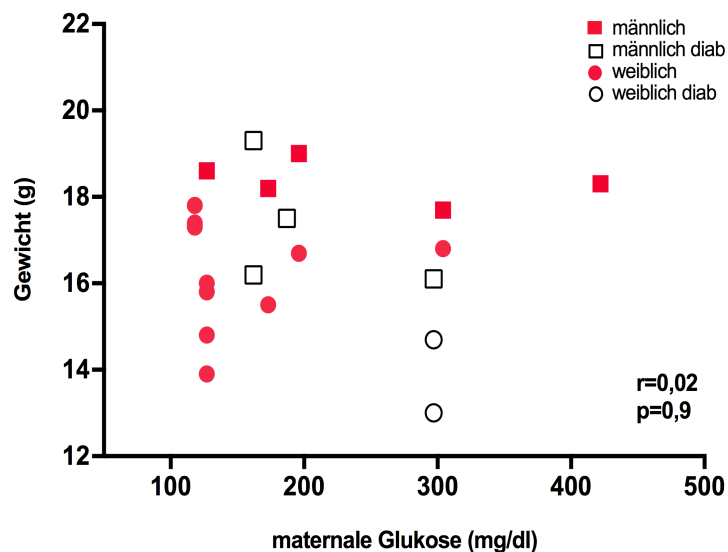


Abbildung 8: Es besteht keine Korrelation der mütterlichen Nüchternglukose (mg/dl) mit dem Körpergewicht (g) bei männlichen (Quadrat) und weiblichen (Kreis) Nachkommen (EBAK) im Alter von 6 Wochen. Abgebildet ist auch ein diabetogenes Futter der Mütter (offene Symbole) und Normalfutter (rote Symbole). Männlich (n 4-5), weiblich (n 2-11)

4.3 Intraperitonealer Glukosetoleranztest

4.3.1 Glukoseverwertung bei männlichen und weiblichen Nachkommen

Bei der geschlechtsspezifischen Betrachtung der Gruppen ergaben sich deutliche Unterschiede in der Verwertung der Glukose zwischen den männlichen und weiblichen Tieren (vgl. Abb. 9 A und B). Während sich bei den weiblichen Nachkommen hyperglykämischer Elterntiere keine Unterschiede in der Glukosetoleranz zeigten, fanden sich signifikant höhere Glukosespiegel bei den männlichen Nachkommen von hyperglykämischen Müttern (EBAKs) zum Zeitpunkt $t = 30$ Minuten im Vergleich zu Kontrolltieren (ECO) (** $p < 0,002$) sowie im Vergleich zu den Nachkommen von hyperglykämischen Vätern (ECON2s) (* $p < 0,02$).

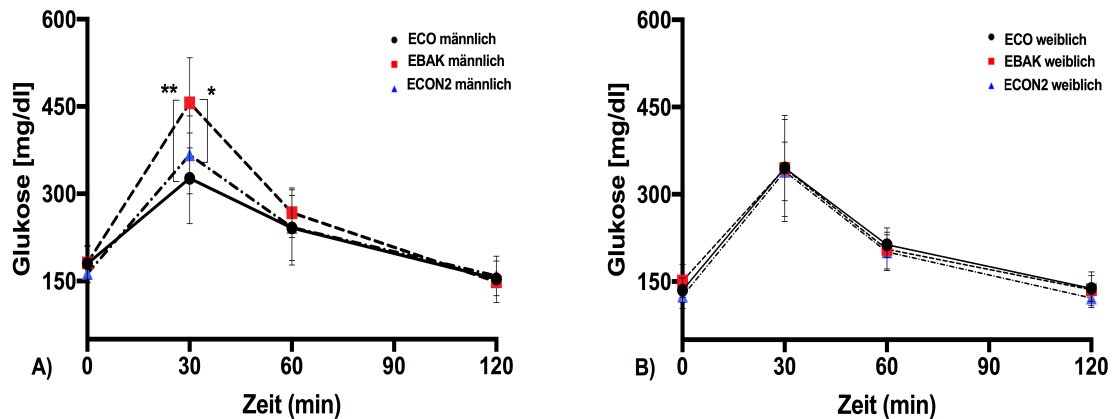


Abbildung 9: Glukose bei intraperitonealem Glukosetoleranztest (ipGTT) im Alter von 6 Wochen. Glukosekonzentration im Blut nach Applikation des Glukosebolus (2g/kg, i.p.) bei (A) männlichen (n = 29) und (B) weiblichen (n = 33) Kontrolltieren (ECO), Tieren mit mütterlicher (EBAK) sowie väterlicher (ECON2) Hyperglykämie. Der Glukoseanstieg der männlichen Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK, rote Quadrate) zum Zeitpunkt t = 30 min ist signifikant höher $**p < 0,002$ als der der Kontrolltiere (ECO, schwarze Punkte) und der Nachkommen hyperglykämischer Väter (ECON2, blaue Dreiecke) $*p < 0,02$. (Mittelwerte \pm SD, 2-way-Anova nach Tukey).

4.3.2 Verlauf der Glukosetoleranzteste in Abhängigkeit vom diabetogenem Futter der Mütter

Tabelle 15: Mittelwerte der Serumglukose in mg/dl im Verlauf des ipGTT bei männlichen Nachkommen hyperglykämischer Mütter mit und ohne diabetogenes Futter. (Legende: ECOM- männliche Kontrolltiere, EBAKm- männliche Wildtypnachkommen der hyperglykämischer Mütter, NF- Normalfutter, diab- diabetogenes Futter. MW- Mittelwert, STD-Standardabweichung)

Gruppen	ECOM		EBAKm	
	NF (n = 4)	Diab (n = 4)	NF (n = 4)	Diab (n = 3)
Ernährung der Mütter				
ipGTT der Nachkommen Zeitpunkt = 0 Min	179,7 (\pm 31,8)	134,2 (\pm 14,1)	181,5 (\pm 27,9)	133,0 (\pm 19,1)
ipGTT der Nachkommen Zeitpunkt = 30 Min	326,7 (\pm 78,3)	409,2 (\pm 46,5)	456,5 (\pm 77,4)	317,0 (\pm 13,5)
ipGTT der Nachkommen Zeitpunkt = 60 Min	241,5 (\pm 56,1)	175,5 (\pm 40,7)	267,2 (\pm 42,9)	245,0 (\pm 30,7)
ipGTT der Nachkommen Zeitpunkt = 120 Min	153,7 (\pm 8,5)	115,7 (\pm 5,2)	148,7 (\pm 35,7)	128,7 (\pm 17,9)

Der Glukoseverlauf im ipGTT wurde durch ein mütterliches diabetogenes Futter nur bei den männlichen, nicht aber den weiblichen Tieren signifikant beeinflusst. (vgl. Abb. 10). Der Anstieg des Glukosespiegels von männlichen Nachkommen aus mütterlicher Hyperglykämie (EBAK) zum Zeitpunkt t = 30 Minuten wurde durch Verabreichung eines diabetogenen Futters nicht verstärkt (vgl. Abb. 10). Bei den männlichen Tieren nach einer maternalen Diätmanipulation zeigte sich ein geringer Anstieg der Glukosekonzentration zum Zeitpunkt t = 30 Minuten

(** $p < 0,002$) und ein geringer Abfall des Glukosespiegels zum Zeitpunkt $t = 60$ Minuten (* $p < 0,02$) im Vergleich zu Kontrollgruppe. Die Veränderungen im Glukoseverlauf der Tiere mit und ohne maternale Diätmanipulation sind in der Tabelle 15 zusammengestellt.

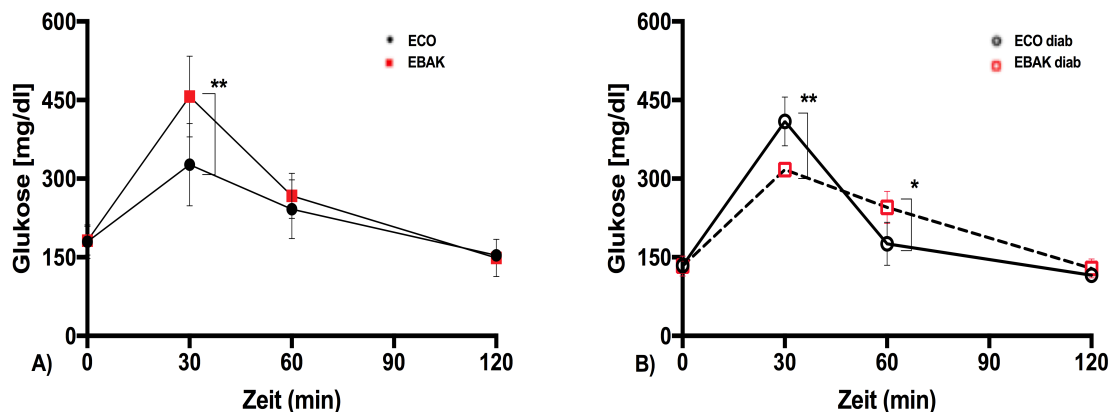


Abbildung 10: Verlauf der Serumglukose bei intraperitonealem Glukosetoleranztest (ipGTT) der männlichen Tiere im Alter von 6 Wochen. (A) bei Normalfutter (n=8) und (B) mit diabetogenem (diab) Futter der Mütter (n = 7). (A): Der Glukoseanstieg der Nachkommen hyperglykämischer Mütter mit Normalfutter (EBAK, rote Quadrate) ist zum Zeitpunkt von $t = 30$ min signifikant höher als der der Kontrolltiere ** $p < 0,006$. (B): Die Glukosekonzentration der Nachkommen hyperglykämischer Mütter mit diabetogenem Futter (EBAK diab, leere Quadrate) ist zum Zeitpunkt $t = 30$ min signifikant niedriger ** $p < 0,002$ und zum Zeitpunkt $t = 60$ min signifikant höher * $p < 0,02$ als die der Kontrolltiere mit diabetogenem Futter der Mütter (ECO diab, leere Kreise) (Mittelwerte \pm SD, 2-way-Anova nach Tukey).

Individuelle Verläufe der ipGT-Tests sind im Anhang abgebildet. (vgl. Abb. 27-28).

4.4 Untersuchung des Arginin/NO-Metabolismus im stoffwechselaktiven Gewebe

4.4.1 NO_x im Serum

Die Konzentration der stabilen NO Metaboliten: Nitrat (NO₃) und Nitrit (NO₂) wurden im Serum (vgl. Kap. 3.3.4) gemessen.

Bei weiblichen Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK) fand sich eine signifikant niedrigere NO_x-Konzentration im Serum als bei Tieren mit väterlicher Hyperglykämie (ECON2), $p < 0,05$ (vgl. Abb. 11). Eine ähnliche, aber nicht signifikante Tendenz zeigte sich auch bei den männlichen Nachkommen.

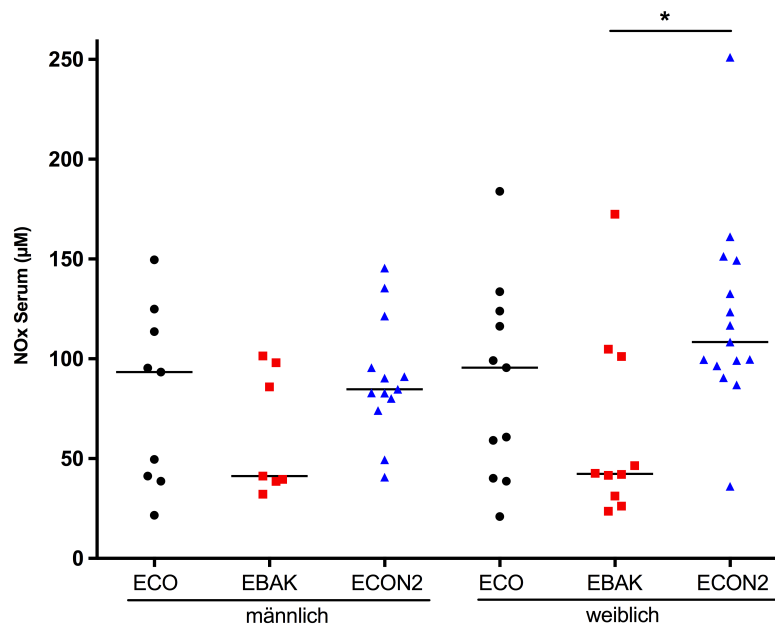


Abbildung 11: NOx-Konzentration im Serum der Nachkommen. Die NOx-Konzentration der weiblichen Nachkommen (rechte Seite) mit mütterlicher Hyperglykämie (EBAKs, rote Quadrate) sind signifikant (* $p < 0,05$) niedriger gegenüber Nachkommen mit väterlicher Hyperglykämie (ECON2s, blaue Dreiecke). Gleicher Trend bei männlichen (linke Seite) Nachkommen mit mütterlicher Hyperglykämie (EBAK, rote Quadrate) im Vergleich zu Kontrolltieren (ECO, schwarze Punkte) Linie = Median, männlich (n 7-12), weiblich (n10-15)

Tabelle 16: Übersichtstabelle der NOx-Konzentration in Serum (μM) der Nachkommen nach Geschlecht und mütterlichem Futter: (Legende: ECOM/w- männliche/weibliche Kontrolltiere, EBAKm/w- männliche/weibliche Nachkommen von hyperglykämischen Müttern, NOx-Stickstoffmonoxid, diab = diabetogenes Futter, NF = Normalfutter, IQR-iQuartilsabstand Q75-Q25, STD-Standardabweichung, MW-Mittelwert)

Gruppen	ECOM		EBAKm		ECOW		EBAKw	
	NF (n = 5)	Diab (n = 4)	NF (n = 4)	Diab (n = 3)	NF (n = 8)	Diab (n = 3)	NF (n = 8)	Diab (n = 2)
NOx (μM) Median	113,6	39,9	92,0	38,6	107,7	38,7	44,5	32,8
IQR	42,9	21,6	48,2	7,4	61,7	19,1	70,0	18,5
NOx (μM) MW	115,4	37,8	81,6	36,8	109,0	33,2	70,8	32,8
STD	23,2	11,8	27,8	4,0	40,7	10,6	51,0	13,1

Die Nachkommen der Mütter, die eine diabetogene Nahrung bekommen hatten, wiesen eine niedrigere NOx-Konzentration im Serum im Vergleich zu den Nachkommen von Müttern auf Normalfutter auf (vgl. Tab. 16, Abb. 12).

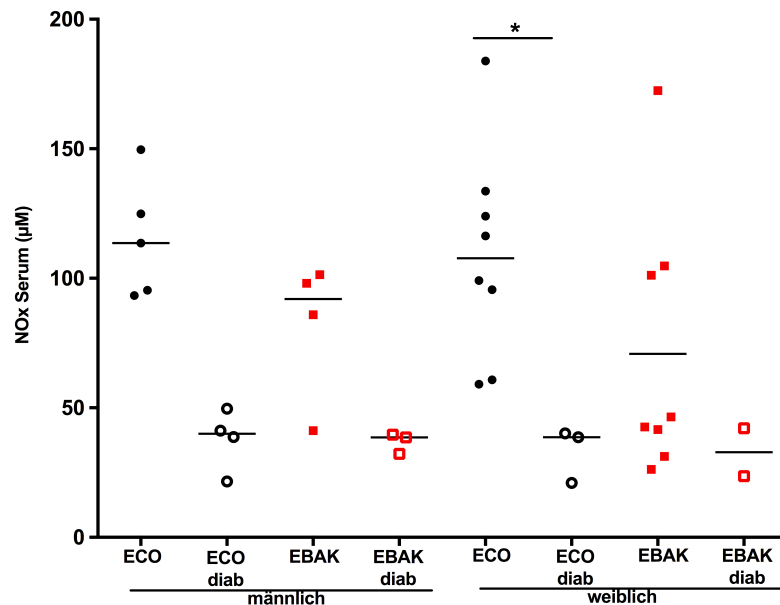


Abbildung 12: NO_x-Konzentration im Serum der Nachkommen der jeweiligen Gruppen im Alter von 6 Wochen. Weibliche (linke Seite) Kontrolltiere mit mütterlichem diabetogenem Futter (ECO diab, offene schwarze Kreise) haben signifikant niedrigere NO_x-Konzentration in Serum als Kontrolltiere mit mütterlichem Normalfutter (ECO, schwarze Kreise) * $p < 0,03$. Gleicher Trend zur niedrigen NO_x-Konzentration weisen männliche Kontrolltiere (ECO diab, offene Kreise) und männliche und weiblichen Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK diab, offene Quadrate) auf sowie weibliche Nachkommen hyperglykämischer Mütter mit diabetogenem Futter (EBAK diab, offene Quadrate) im Vergleich zu Nachkommen der mit Normalfutter ernährten Mütter (Linie = Median, männlich n 4-5, weiblich n 2-8)

4.4.2 Analyse der Genexpression im stoffwechselaktiven Gewebe

Im nächsten Schritt wurde die Expression einiger, am NO/ADMA- Metabolismus beteiligter Gene untersucht. Die Bestimmung der Genexpression der NO-Synthasen und PRMT-Isoformen im Skelettmuskel, Leber- und Fettgewebe erfolgte, wie in den Kapiteln 3.4.1 - 3.4.6 erläutert, mittels quantitativer real-time PCR. Eine Übersicht der Veränderungen der Genexpression in den Gruppen ist in Tabelle 17 dargestellt.

Bei männlichen Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK) wurde eine signifikante Erhöhung der nNOS-Genexpression im Skelettmuskel im Vergleich zu Nachkommen hyperglykämischer Väter (ECON2) und zu Kontrolltieren (ECO) beobachtet. Die Genexpression anderer stoffwechselaktiver Gene bei den Wildtypnachkommen hyperglykämischer Eltern war hingegen niedriger als bei den entsprechenden Kontrollgruppen.

Tabelle 17: Veränderungen der Genexpression der für NO-/ADMA-Stoffwechsel wichtigen Gene *nNOS*, *eNOS*, *PRMT1*, *PRMT10* im Skelettmuskel, Fett- und Lebergewebe innerhalb der Gruppen im Vergleich zu Kontrolltieren. (Legende: m – männlich, w – weiblich, ↓/↑ – signifikant verändert)

Gene Gruppen	nNOS Muskel	PRMT1 Muskel	PRMT1 Fett	PRMT10 Fett	eNOS Fett	eNOS Leber	PRMT1 Leber
EBAK m	↑						
ECON2 m		↓	↓	↓			
EBAK w							
ECON2 w		↓		↓	↓		↓

4.4.3 Expression von nNOS im Skelettmuskel

Die in der qPCR bestimmte Genexpression der nNOS im Muskelgewebe der männlichen Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK) im Alter von 6 Wochen zeigte einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Nachkommen hyperglykämischer Väter (ECON2) ($p < 0,005$). Es fand sich eine starke Streuung der Genexpression bei den männlichen EBAKs im Vergleich zu den Ergebnissen in allen anderen Gruppen, die auch bei wiederholten Messungen bestehen blieb. Bei den weiblichen Tieren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression von nNOS im Gruppenvergleich (vgl. Abb. 13).

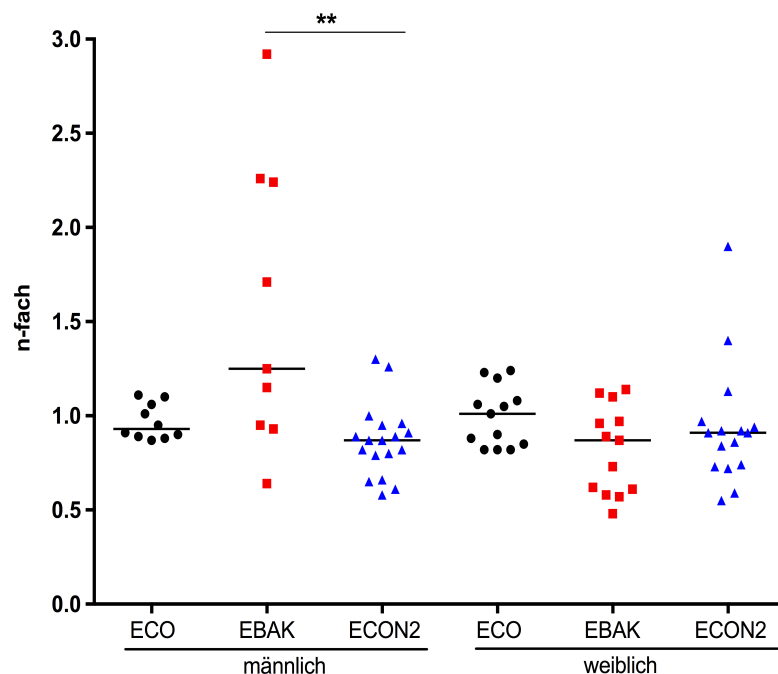


Abbildung 13: Genexpression von nNOS im Skelettmuskel bei den Nachkommen im Alter von 6 Wochen. Die Genexpression von nNOS im Muskelgewebe bei männlichen Nachkommen (linke Seite) hyperglykämischer Mütter (EBAK, rote Quadrate) und hyperglykämischer Väter (ECON2, blaue Dreiecke) (** $p < 0,005$) nicht signifikant höher als bei Kontrolltieren (schwarze Punkte). (Linie = Median. männlich n 8-18, weiblich n 13-16). (n-fach) = Genexpressionen in verschiedenen Gruppen wurden in Relation zu den auf 1 gesetzten Kontrollen gesetzt.

Es fand sich kein Unterschied in der Genexpression von nNOS in Abhängigkeit von diabetogenem Futter der Mütter.

4.4.4 Expression von PRMT1 im Skelettmuskel

Die Genexpression von PRMT1 im Muskelgewebe der weiblichen Nachkommen hyperglykämischer Väter (ECON2) war signifikant geringer als die der Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK) ($p < 0,001$) und die der Kontrolltiere ($p < 0,05$) (vgl. Abb.14).

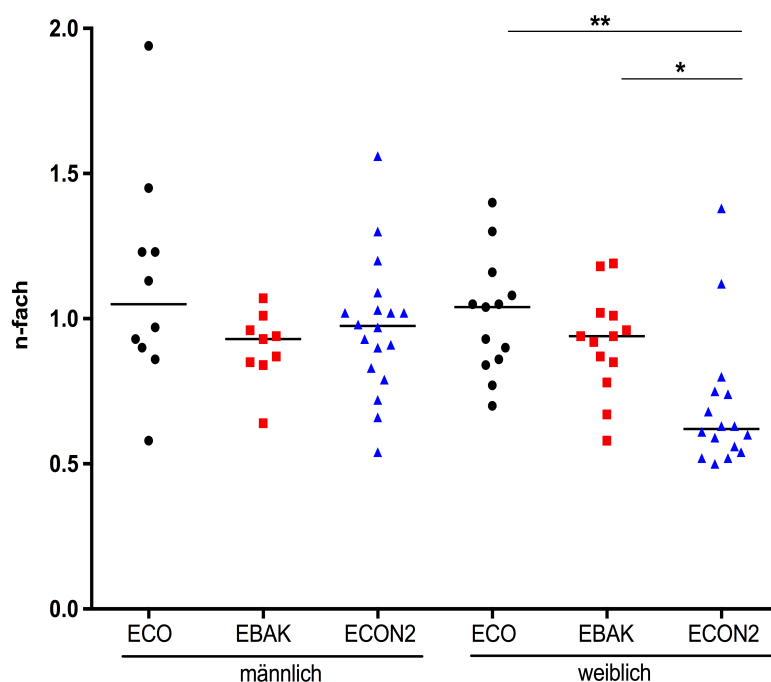


Abbildung 14: Genexpression von PRMT1 im Skelettmuskel der Nachkommen im Alter von 6 Wochen. Die Genexpression von PRMT1 der weiblichen Nachkommen (rechte Seite) hyperglykämischer Väter (ECON2, blaue Dreiecke) ist geringer als die der Kontrolltiere (ECO, schwarze Punkte) (** $p < 0,001$) und die der Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK, rote Quadrate) (* $p < 0,02$). (Linie = Median. Männlich n 9-18, weiblich n 13-16) (n-fach) = Genexpressionen in verschiedenen Gruppen wurden in Relation zu den auf 1 gesetzten Kontrollen gesetzt.

Das diabetogene Futter der Mütter führte zu keinen signifikanten Veränderungen in PRMT1-Expression im Muskelgewebe.

4.4.5 Expression von PRMT1 im Fettgewebe

Die Genexpression von PRMT1 im Fettgewebe der männlichen Nachkommen hyperglykämischer Väter (ECON2) war signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ($p < 0,0007$) und bei den Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK) ($p < 0,04$). Im Gruppenvergleich fanden sich bei weiblichen Tieren keine signifikanten Unterschiede der Genexpression (vgl. Abb. 15).

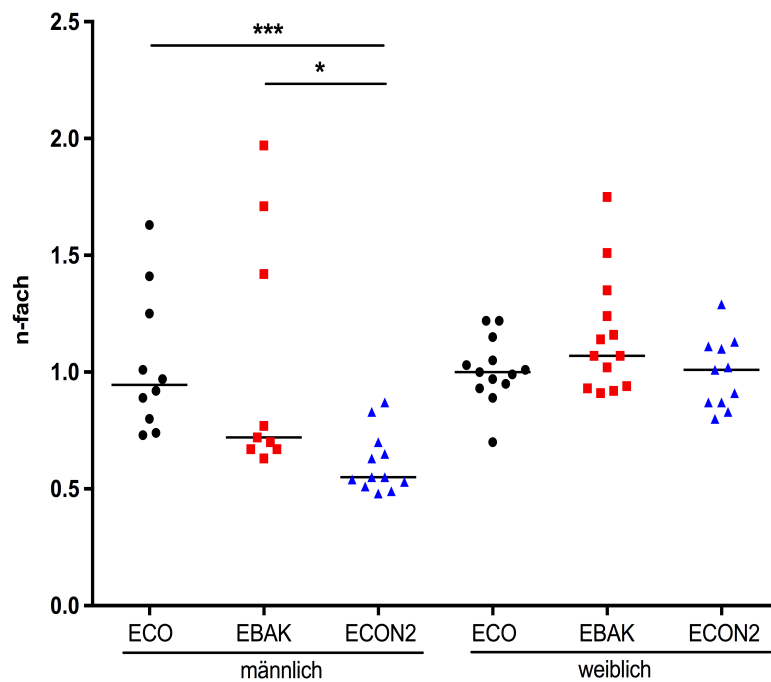


Abbildung 15: Genexpression von PRMT1 im Fettgewebe der Nachkommen im Alter von 6 Wochen. Die Genexpression von PRMT1 der männlichen Nachkommen hyperglykämischer Väter (ECON2, blaue Dreiecke) ist signifikant niedriger als die der Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK, rote Quadrate) ($*p < 0,04$) und die der Kontrolltiere (ECO, schwarze Punkte) ($***p < 0,0007$). (Linie = Median. Männlich n 9-12, weiblich n 11-13) (n-fach) = Genexpressionen in verschiedenen Gruppen wurden in Relation zu den auf 1 gesetzten Kontrollen gesetzt.

4.4.6 Expression von PRMT10 im Fettgewebe

Im untersuchten Fettgewebe fand sich eine niedrigere Genexpression von PRMT 10 bei den männlichen ($p < 0,0002$) und weiblichen ($p < 0,02$) Nachkommen hyperglykämischer Väter (ECON2) im Vergleich zu den Kontrolltieren (ECO) (vgl. Abb. 16) und zu den Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK) ($p < 0,02$).

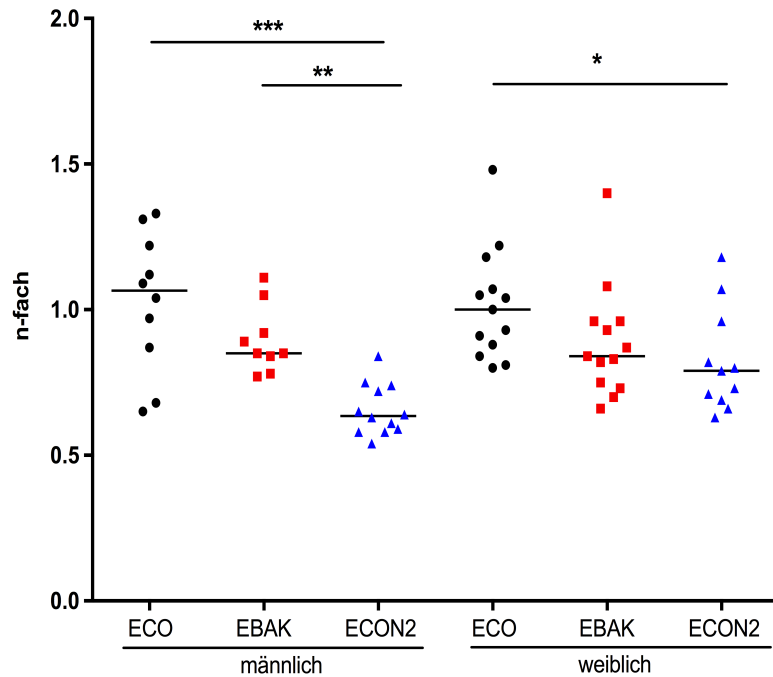


Abbildung 16: Genexpression von PRMT10 im Fettgewebe der Nachkommen im Alter von 6 Wochen. Die Genexpression von PRMT10 der männlichen (linke Seite) und weiblichen (rechte Seite) Nachkommen hyperglykämischer Väter (ECON2, blaue Dreiecke) ist signifikant niedriger als die der Kontrolltiere (ECO, schwarze Punkte) ($***p < 0,0002$ männl. und $*p < 0,02$ weibl) und als die der männlichen Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK, rote Quadrate) ($**p < 0,01$) (Linie = Median. Männlich n 9-12, weiblich n 11-13). (n-fach) = Genexpressionen in verschiedenen Gruppen wurden in Relation zu den auf 1 gesetzten Kontrollen gesetzt.

4.4.7 Genexpression von eNOS im Fettgewebe

Die Genexpression der endothelialen NO-Synthase (eNOS) im Fettgewebe der Nachkommen war bei weiblichen Nachkommen hyperglykämischer Väter (ECON2) signifikant niedriger als bei den Kontrolltieren ($p < 0,009$). Bei den männlichen Tieren zeigten sich keine Veränderungen der Genexpression von eNOS im Fettgewebe (vgl. Abb. 17).

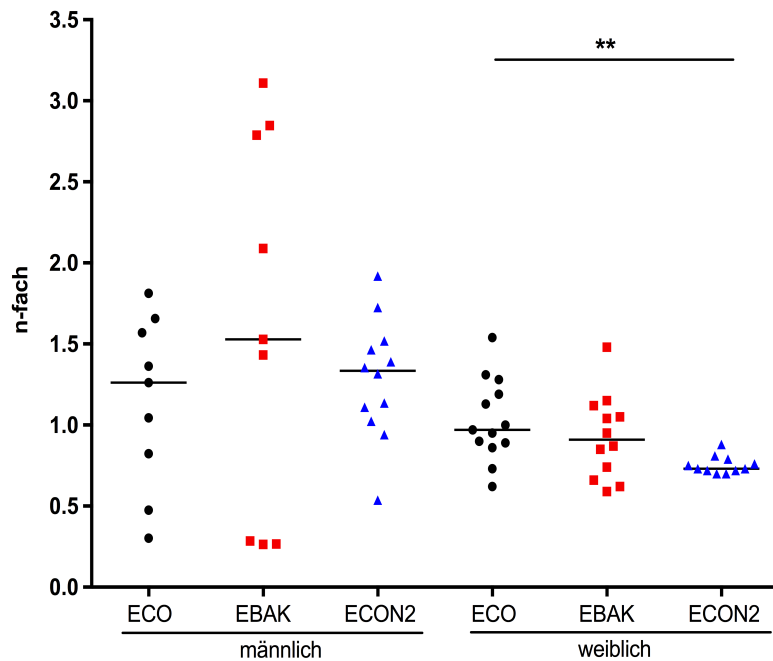


Abbildung 17: Genexpression von eNOS im Fettgewebe der Nachkommen im Alter von 6 Wochen. Die Genexpression von eNOS der weiblichen (rechte Seite) Nachkommen hyperglykämischer Väter (ECON2, blaue Dreiecke) ist niedriger als die der Kontrolltiere (ECO, schwarze Punkte) (** $p < 0,009$), (Linie = Median. Männlich n 9-12, weiblich n 11-13)

4.4.8 Expression von eNOS in der Leber

Die Genexpression der endothelialen NO-Synthase im Lebergewebe im Alter von 6 Wochen war bei männlichen Nachkommen hyperglykämischer Väter (ECON2) signifikant niedriger als die der Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK) ($p < 0,02$). Bei den weiblichen Tieren hingegen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Genexpression von eNOS in der Leber. (vgl. Abb. 18A).

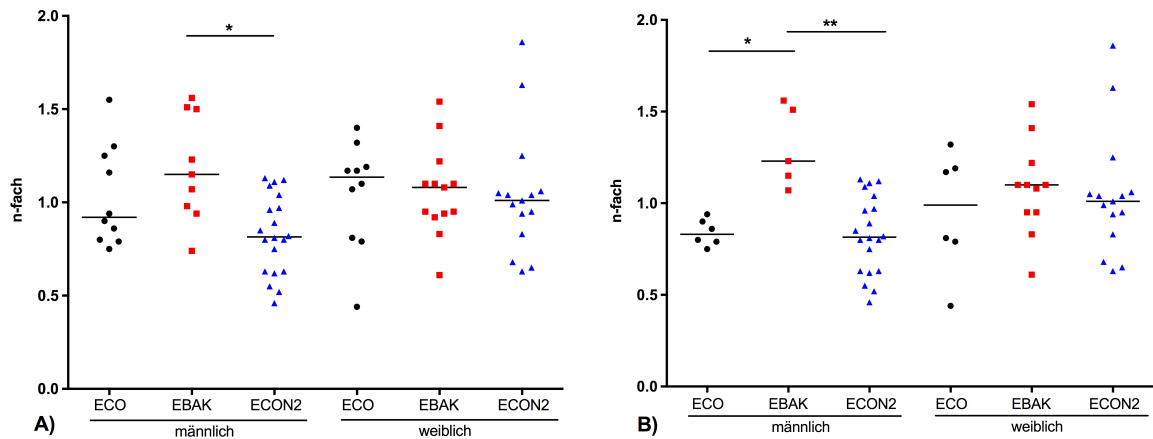


Abbildung 18: Genexpression von eNOS im Lebergewebe der Nachkommen im Alter von 6 Wochen. (A) Alle Tiere im Vergleich. Die Genexpression von eNOS im Lebergewebe ist bei männlichen Nachkommen hyperglykämischer Väter (ECON2, blaue Dreiecke) ($*p < 0,02$) ist niedriger als die der Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK, rote Quadrate). **(B)** Darstellung aller Gruppen mit mütterlichem Normalfutter: Die Genexpression von eNOS bei männlichen Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK, rote Quadrate) mit mütterlichem Normalfutter ist höher als die der Nachkommen hyperglykämischer Väter (ECON2, blaue Dreiecke) ($**p < 0,004$) und die der Kontrolltiere (ECO, schwarze Punkte) ($*p < 0,02$). (Linie = Median. Männlich n 5-20, weiblich n 6-15)

4.4.9 Expression von PRMT1 im Lebergewebe

Die weiblichen Nachkommen hyperglykämischer Väter (ECON2) zeigten eine signifikant niedrigere PRMT1-Expression ($p < 0,02$) im hepatischen Gewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe (ECO) (vgl. Abb.19). Bei den männlichen Gruppen hingegen zeigten sich keine Veränderungen in PRMT1 Expression in der Leber.

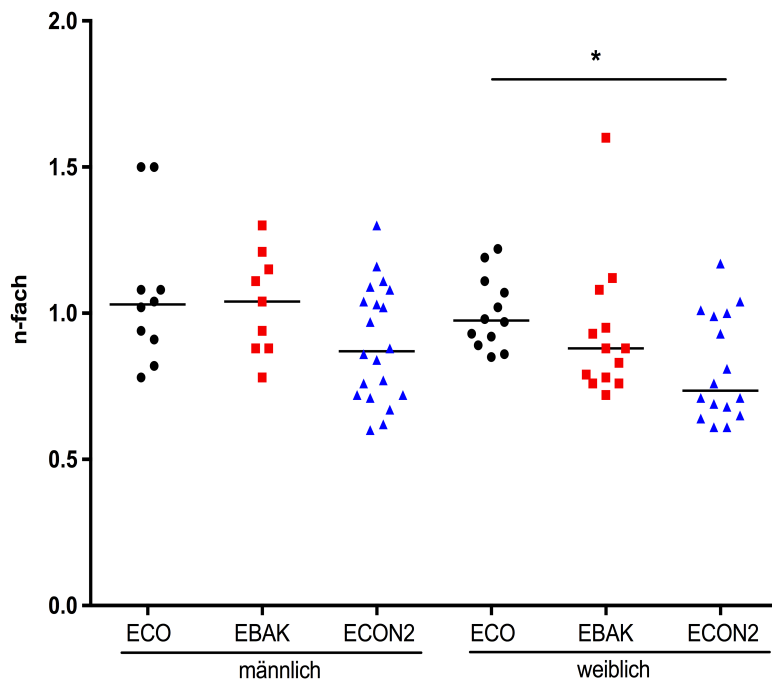


Abbildung 19: Genexpression von PRMT1 im Lebergewebe der Nachkommen im Alter von 6. Die Genexpression von PRMT1 in der Leber ist bei weiblichen (rechte Seite) Nachkommen hyperglykämischer Väter (ECON2, blaue Dreiecke) ist niedriger als die der Kontrolltiere (ECO, schwarze Punkte) (* $p < 0,02$) (Linie = Median. Männlich: n 9-20, weiblich: n 12-16)

4.5 Korrelationsanalyse

Da die erhobenen Daten nicht normal verteilt sind, wurde eine Korrelationsanalyse nach Spearman mit der Fragestellung nach einem Zusammenhang zwischen den bestimmten Parametern durchgeführt.

4.5.1 Korrelation zwischen dem Expressionsniveau von nNOS im Skelettmuskel und dem Glukosespiegel der Nachkommen

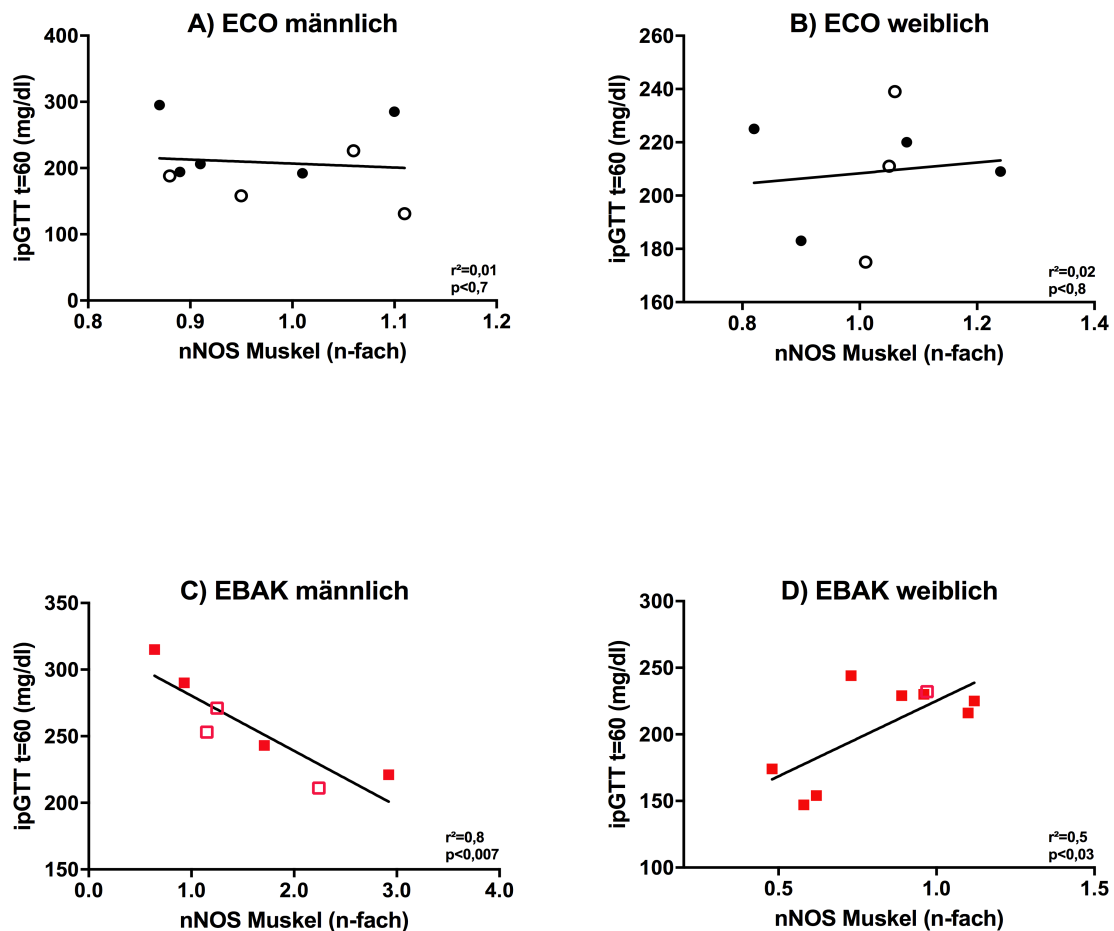


Abbildung 20: lineare Regressionsanalyse der Glukosekonzentration im Rahmen des ipGTTs zum Zeitpunkt t = 60 Min. und der nNOS-Expressionen im Muskelgewebe der männlichen und weiblichen Nachkommen hyperglykämischer Mütter und der Kontrolltiere. (Legende: Kontrolltiere: ECO, schwarze Punkte, Kontrolltiere mit mütterlichem diabetogenem Futter: ECO diab, offene schwarze Kreise, Nachkommen hyperglykämischer Mütter: EBAK, rote Quadrate, Nachkommen hyperglykämischer Mütter und diabetogenem Futter: EBAK diab, offene rote Quadrate. Männlich: n 4-5, weiblich: n 2-11)

Bei männlichen Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK) fand sich ein signifikanter negativer Zusammenhang zwischen der nNOS Expression im Muskel und dem Verlauf der Glukosekonzentration zum Zeitpunkt t=60 Min. (r^2 0,8, $**p<0,007$). Bei den weiblichen Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK) standen diese beiden Parameter hingegen in positivem Zusammenhang (r^2 0,5, $*p<0,03$) entsprechend einer geschlechtsspezifischen Veränderung durch elterliche Hyperglykämie. Bei den Nachkommen hyperglykämischer Väter (ECON2) fanden sich keine Zusammenhänge zwischen der Genexpression von

nNOS im Muskelgewebe und dem Verlauf der Glukosekonzentration im intraperitonealen Glukosetoleranztest.

4.5.2 Korrelation zwischen dem Expressionsniveau von nNOS im Skelettmuskel und der mütterlichen Glukosekonzentration

Ein Zusammenhang mit der Blutglukosekonzentration der Mütter und der Genexpression von nNOS im Muskelgewebe der männlichen Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK) (vgl. Abb. 21) fand sich nicht.

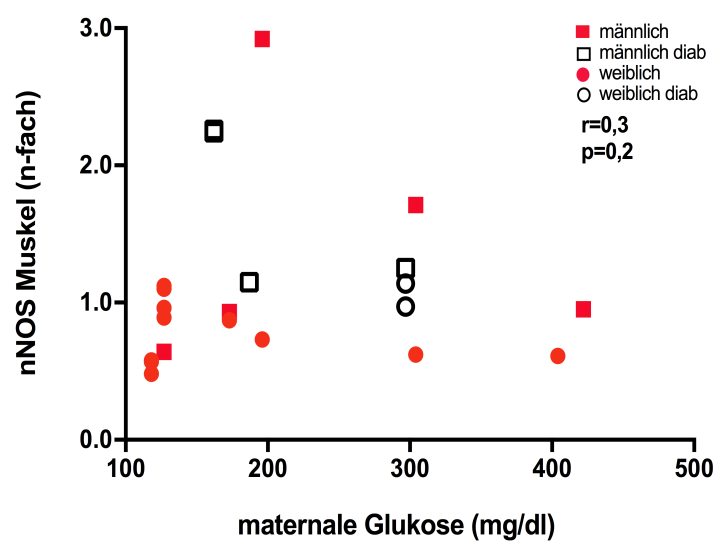


Abbildung 21: Es besteht keine Korrelation der mütterlichen Nüchternglukose (mg/dl) mit der Genexpression von nNOS im Skelettmuskel bei männlichen (Quadrat) und weiblichen (Kreis) Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK) im Alter von 6 Wochen. Abgebildet ist auch diabetogenes Futter (offene Symbole) und Normalfutter der Mütter (rote Symbole). Männlich (n 4-5), weiblich (n 2-11)

4.5.3 Korrelation zwischen den Genexpressionsniveaus von nNOS und PRMT1 im Skelettmuskel der Nachkommen

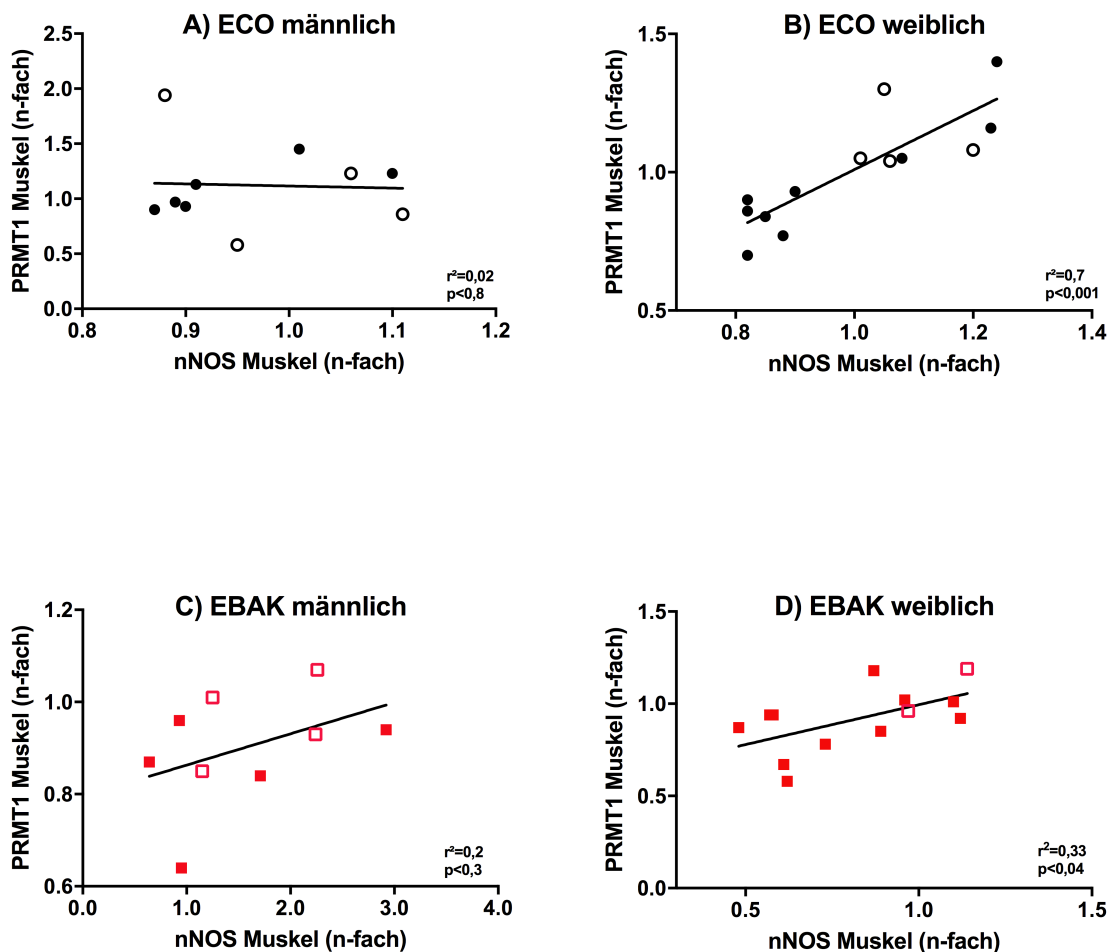


Abbildung 22: lineare Regressionsanalyse von Genexpression von nNOS- und PRMT1 im Muskelgewebe der Versuchstiere im Alter von 6 Wochen. Die weiblichen Kontrolltiere (ECO) zeigen einen signifikanten positiven Zusammenhang (r^2 0,7, $***p<0,001$) zwischen nNOS- und der PRMT1- Expression im Muskelgewebe (Legende: Kontrolltiere: ECO, schwarze Punkte, Kontrolltiere mit mütterlichem diabetogenem Futter: ECO diab, offene schwarze Kreise, Nachkommen hyperglykämischer Mütter: EBAK, rote Quadrate, Nachkommen hyperglykämischer Mütter und diabetogenem Futter: EBAK diab, offene rote Quadrate. Männlich: n 4-17, weiblich: n 2-16)

Es wurde eine signifikante positive Korrelation der Genexpressionen von nNOS und PRMT1 im Skelettmuskel bei weiblichen Nachkommen aller Gruppen (ECOs, EBAKs, ECON2s) beobachtet.

4.6 DNA-Methylierungsanalysen nNOS im Skelettmuskel

Ausgehend von der veränderten Genexpression von nNOS im Muskelgewebe der männlichen Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAKs) wurde eine Methylierungsanalyse, die als epigenetischer Mechanismus der Genregulation gilt,

durchgeführt. Dafür wurde die isolierte genomische DNA aus dem Skelettmuskel der männlichen Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK) und der Kontrolltiere (ECO) untersucht (vgl. Kap. 3.5.2).

4.6.1 Identifizierung von CPG-Islands im nNOS Gen im Skelettmuskel der Nachkommen

NOS1genomisch CpG49	GTTGATTTTTTTTTTCTGATAGAAAAAATGGAAATTAGGTTACATAAAAGATGTATGC 60780 -----
NOS1genomisch CpG49	TTCCAAGCCCAGAGCGGCCCTTTTAATGAGGGTTGCGACGTCTCCCTCCCCACGCCATA 60840 -----CGA CG TCTCCCTCCCA CG CCATA 25 *****
NOS1genomisch CpG49	AACCAGCCGGTTGGACGTACCACTAATTCGTTTCAGCGGTGATAGGATAAAGCAGGGAC 60900 AACCAGC CG GTTGGA CG TCACCACTAATTCGTTTCAG CG GTGATAGGATAAAGCAGGGAC 85 *****
NOS1genomisch CpG49	ATTAAGAAATAAATTTCCCTCACGACCTCACTGAGCTCGCTGCGCGGTCCCTGCGTAT 60960 ATTAAGAAATAAATTTCCCTCAC CG ACCTCACTGAGCT CG CTG CGCG GTCCTG CG TAT 145 *****
NOS1genomisch CpG49	TGATGCAGCCGCAGGGCGCGAGCGGCTACTTAGCACAGCGGCTGCTACTAGGGGCAGCTG 61020 TGATGCAGC CG CAGGG CGCGAG CG GCTACTTAGCACAG CG GCTGCTACTAGGGGCAGCTG 205 *****
NOS1genomisch CpG49	CGGCCGGGGTGAGCCAGGTTGCGCAAGGGGAAGCTGGCAGCTTCCAGTCTGAACTTGGC 61080 CG GC CG GGGTGAGCCAGGTTG CG CAAGGGGAAGCTGGCAGCTTCCAGTCTGAACTTGGC 265 *****
NOS1genomisch CpG49	TAGGCTAGAGCGGAGCGAGGGCGGAGCAAGAGGCTGGGAGGGGGCGGGGAGCGCTCGCT 61140 TAGGCTAGAG CG GAG CG AGG CG GGAGCAAGAGGCTGGGAGGGGG CG GGGAG CG CT CG CT 325 *****
NOS1genomisch CpG49	CTGGAAGCTCCTACCCTGTGGCGCTGTTGGAGCCCGGAGCATCCTGCCCGGAGCAAGGC 61200 CTGGAAGCTCCTACCCTGTGG CG CTGTTGGAGCC CG GAGCATCCTGCC CG GAGCAAGGC 385 *****
NOS1genomisch CpG49	TCTGGATCCGCGCGCTCAGCAGCTGCGGGAGGAGGAGCGCGGAAGACGGGGTGAACAGC 61260 TCTGGATC CGCGCG CTCAGCAGCT CG GGAGGAGGAG CGCG GAAGA CG GGGTGAACAG CG 445 *****
NOS1genomisch CpG49	GTGATCCACAGCCCTGGAAGTGCAGCGGCTCGGCAGCAGGTGAGTTCTCAGCCTTGACC 61320 G TGATCCACAGCCCTGGAAGTGCAGCGGCTCGGCAGCAGGTGAGTTCTCAGCCTTGACC 505 *****
NOS1genomisch CpG49	CAAGGTATCCCATGTACCTTCTCAGGGACCTGCGCTCCAGCTCCGGCGGGCGGTGTGCGC 61380 CAAGGTATCCCATGTACCTTCTCAGGGACCTG CG CTCCAGCTC CGCG GG CG GTGTG CGC 565 *****
NOS1genomisch CpG49	CCCAACTTGGCTCTCCTTGGCGGCTGCTCTCCGGCAATGGGGCGTACCCGAGTCCAG 61440 CCCAACTTGGCTCTCCTTGG CG CTGCTCTC CG GGCAATGGGG CG TACC CG ----- 618 *****
NOS1genomisch CpG49	GCTGTGAGCTCCTGGAAAGGTGGTCTGCCTCCTCGCTCCAACCTTTACAAGGGCAAGGG 61500 -----

Abbildung 23: CPG-Stellen im 5'- Sequenzbereich des murinen nNOS-Gens (60780 bis 61500). Output vom Programm mit Methylfinder. Zur Orientierung sind die CpGs gelb markiert.

4.6.2 Sequenzierungsergebnisse der Methylierungs-PCR

In der Abbildung 24 sind Sequenzierungsergebnisse der mPCR von 4 männlichen Tieren (2 Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK) und 2 Kontrolltiere (ECO) dargestellt.

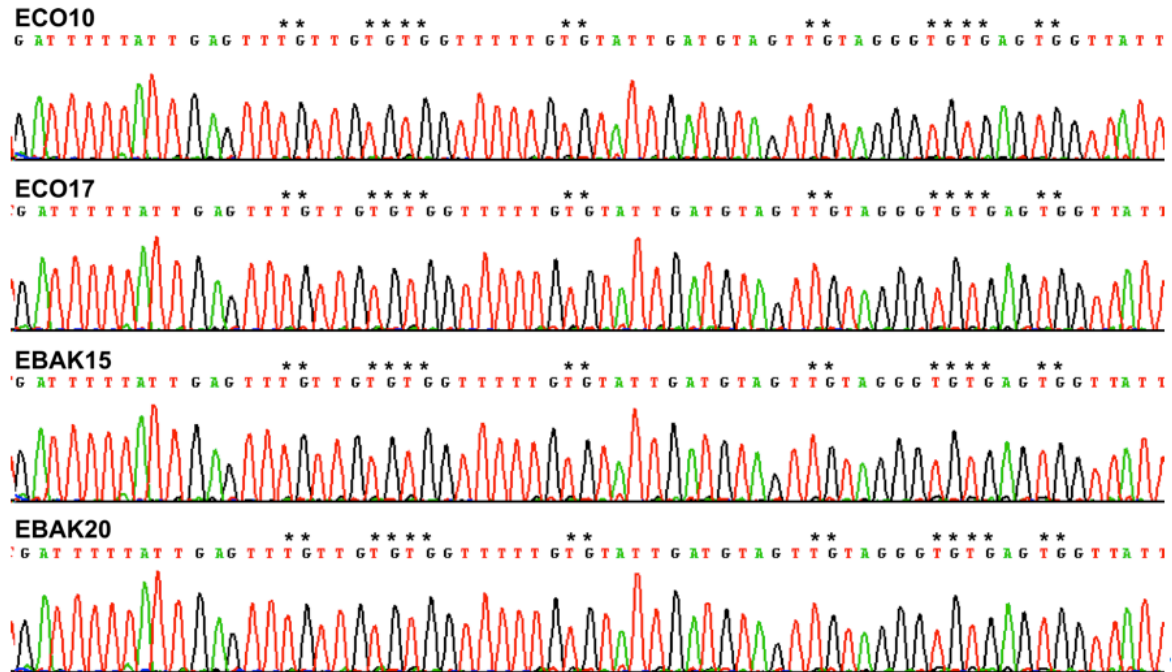


Abbildung 24: Bisulfitsequenzierungsergebnisse des nNOS-Gens im Skelettmuskel. Chromatogramme von 2 männlichen Kontrolltieren (ECO) und 2 männlichen Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK) im Bereich N1. CpGs sind mit Sternchen markiert. Das G an der ersten Position entspricht Base 60925 (NC_000071).

4.6.3 Methylierungsuntersuchung von nNOS im Skelettmuskel bei Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK) und Kontrolltieren (ECO)

Die im Bereich der Primer N1 und N2 erfassten CpGs waren ausnahmslos unmethyliert (vgl. Abb. 25 und 26). Es fand sich kein Unterschied im Methylierungsstatus von nNOS im Skelettmuskel bei den untersuchten Tieren. Auch bei den Nachkommen, deren Mütter ein diabetogenes Futter erhalten hatten, zeigten sich keine Veränderungen auf der Methylierung.

CpG49	AGCGGTGATAGGATAAAGCAGGGACATTAAGAAATAAATCCCCCTCACCGACCTCACTG	120
N2-81F	-----GGGATATTAAGAAATAAATTTTTTTT-----	26
EC09-N1	-----TTTTTTTWTGATTTTTCTTG	21
EC010-N1	-----TTTTTTTATGATTTTTATG	21
EC017-N1	-----TTTTTTTWTATTTTTWATG	21
EC019-N1	-----TTTTTTTATGATTTTTATG	21
EC025-N1	-----TTTTTTTATRATTTTTATG	22
EC030-N1	-----TTTTTTTATGATTTTTATG	22
EC031-N1	-----TTTTTTTATGATTTTTATG	21
EC033-N1	-----TTTTTTTATGATTTTTATG	21
EBAK15-N1	-----TTTTTTTATGATTTTTATG	21
EBAK16-N1	-----TTTTTTTATGATTTTTCTTG	21
EBAK17-N1	-----TTTTTTTATGATTTTTATG	21
EBAK20-N1	-----TTTTTTTATGATTTTTATG	21
EBAK22-N1	-----TTTTTTTATGATTTTTATG	21
EBAK25-N1	-----TTTTTTTATGATTTTTATG	21
EBAK28-N1	-----TTTTTTTATGATTTTTATG	21
	* *	
CpG49	AGCTCGCTGCGCGTCCCTGCGTATTGATGCAGCCGCAGGGCGCGAGCGGCTACTTAGCA	180
N2-81F	-----	26
EC09-N1	AGTTTGTGTGTGGTTTTTGTGCTTGATGTAGTTGTAGGGTGTGAGTGGTTATTTAGTA	81
EC010-N1	AGTTTGTGTGTGGTTTTTGTGATTGATGTAGTTGTAGGGTGTGAGTGGTTATTTAGTA	81
EC017-N1	AGTTTGTGTGTGGTTTTTGTGTMTTGATGTAGTTGTAGGGTGTGAGTGGTTATTTAGTA	81
EC019-N1	AGTTTGTGTGTGGTTTTTGTGATTGATGTAGTTGTAGGGTGTGAGTGGTTATTTAGTA	81
EC025-N1	AGTTTGTGTGTGGTTTTTGTGATTGATGTAGTTGTAGGGTGTGAGTGGTTATTTAGTA	82
EC030-N1	AGTTTGTGTGTGGTTTTTGTGATTGATGTAGTTGTAGGGTGTGAGTGGTTATTTAGTA	82
EC031-N1	AGTTTGTGTGTGGTTTTTGTGATTGATGTAGTTGTAGGGTGTGAGTGGTTATTTAGTA	81
EC033-N1	AGTTTGTGTGTGGTTTTTGTGATTGATGTAGTTGTAGGGTGTGAGTGGTTATTTAGTA	81
EBAK15-N1	AGTTTGTGTGTGGTTTTTGTGATTGATGTAGTTGTAGGGTGTGAGTGGTTATTTAGTA	81
EBAK16-N1	AGTTTGTGTGTGGTTTTTGTGATTGATGTAGTTGTAGGGTGTGAGTGGTTATTTAGTA	81
EBAK17-N1	AGTTTGTGTGTGGTTTTTGTGATTGATGTAGTTGTAGGGTGTGAGTGGTTATTTAGTA	81
EBAK20-N1	AGTTTGTGTGTGGTTTTTGTGATTGATGTAGTTGTAGGGTGTGAGTGGTTATTTAGTA	81
EBAK22-N1	AGTTTGTGTGTGGTTTTTGTGATTGATGTAGTTGTAGGGTGTGAGTGGTTATTTAGTA	81
EBAK25-N1	AGTTTGTGTGTGGTTTTTGTGATTGATGTAGTTGTAGGGTGTGAGTGGTTATTTAGTA	81
EBAK28-N1	AGTTTGTGTGTGGTTTTTGTGCTTGATGTAGTTGTAG-----	60
CpG49	CAGCGGCTGCTACTAGGGCAGCTGCGGCCGGGGTGAGCCAGGTTGCCAAGGGGAAGCT	240
N2-81F	-----	26
EC09-N1	TAG-----	84
EC010-N1	TAGTGGTTGTTATTAGG-----	98
EC017-N1	TA-----	83
EC019-N1	TAGTGGTTGTTATTAGGGG-----	101
EC025-N1	TAGTGGTT-----	90
EC030-N1	TAGTG-----	87
EC031-N1	TAGTGGTTGTTATTAGGGG-----	100
EC033-N1	TAGTGGTTGTTATTAGGGG-----	100
EBAK15-N1	TAGTGGTTG-----	90
EBAK16-N1	TAGTGGTTGTTATTA-----	96
EBAK17-N1	TAGTGGTTG-----	90
EBAK20-N1	TAGTGGTTGTTATTAGGGGTAG-----	103
EBAK22-N1	TAGTGGTTGTTATTAGGGGTA-----	102
EBAK25-N1	TAGTGGTTGTTATTAGGGG-----	100
EBAK28-N1	-----	60

Abbildung 25: Übersicht des Methylierungsstatus der im Bereich des Primers N1 erfassten CpGs im nNOS Gen im Skelettmuskel der Kontrolltiere und Nachkommen hyperglykämischer Mütter

CpG49	GGGAGGGGGGCGGGGAGCGCTCGCTCTGGAAGCTCCTACCCGTGGCGCTGTTGGAGCC	360
N3-327F	-----TT	2
ECO19-N3	-----GTGGTGTGTTGGAGTTT	18
ECO31-N3	-----GTTTTAAGSGGTTTA	17
EBAK5-N3	-----TTTTTTTTTGT----GGTWTTRWWG	22
EBAK20-N3	-----TTTTTATTTGTGGTGTGTTGGAYCTT	27
EBAK22-N3	-----TTTTTWTGTTGGTGTGTTGGAGTTT	27
EBAK25-N3	-----GTGGTGTGTTGGAGTTT	18
EBAK28-N3	-----TTTTTWTTKTGGTGTGTTGGAGTTT	27
CpG49	GGAGCATCCTGCCC CGGAGCAAGGCTCTGGATCCGCGCGCTCAGCAGCTGCGGGAGGAGG	420
N3-327F	GGAGTATTTTATTTTGTGG-----	21
ECO19-N3	GGAGTATTTTGTGTTTGGAGTAAGGTTTGGATTTGTGTGTTTAGTAGTTGTGGGAGGAGG	78
ECO31-N3	TGTGTATTTTGTGTTTGGAGTAAGGTTTGGATTTGTGTGTTTAGTAGTTGTGGGAGGAGG	77
EBAK5-N3	RWKTATTTTGWKTSRWRTMAGGTTTTYSGGATTTGTGTGTTTAGTAGTTGTGGGAGGAGG	82
EBAK20-N3	GGAGTCCTTTGTGTTTGGAGTAAGGTTTGGACTTGTGTGTTTAGTAGTTGTGGGAGGAGG	87
EBAK22-N3	GGAGTATTTTGTGTTTGGAGTAAGGTTTGGATTTGTGTGTTTAGTAGTTGTGGGAGGAGG	87
EBAK25-N3	KGAGTATTTTGTGTTTGGAGTAAGGTTTGGATTTGTGTGTTTAGTAGTTGTGGGAGGAGG	78
EBAK28-N3	GGAGTATTTTGTGTTTGGAGTAAGGTTTGGATTTGTGTGTTTAGTAGTTGTGGGAGGAGG	87
CpG49	AGGCGCGGAAGA CGGGGTGAACAGCGTGATCCACAGCCCTGGAAGTGC GCGGGCTCGCA	480
N3-327F	-----	21
ECO19-N3	AGGTGTG-----	85
ECO31-N3	AGGTGTGGAAGATGGGGTG-----	96
EBAK5-N3	AGGTGTGG-----	90
EBAK20-N3	AGGTGTGGAAGATGG-----	102
EBAK22-N3	AGGTGTGGAAGATGGGG-----	104
EBAK25-N3	AGGTG-----	83
EBAK28-N3	AGGTGTGGAAGATGGGGTG-----	106

Abbildung 26: Übersicht des Methylierungsstatus der im Bereich des Primers N3 erfassten CpGs im nNOS Gen im Skelettmuskel der Kontrolltiere und Nachkommen hyperglykämischer Mütter.

5 DISKUSSION

Anhand der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss einer mütterlichen beziehungsweise väterlichen Hyperglykämie und einer mütterlichen Modifikation der Ernährung auf den Phänotyp der Wildtyp-Nachkommen untersucht werden. Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Nachkommen hyperglykämischer Tiere im Alter von 6 Wochen metabolische Veränderungen in Abhängigkeit von dem betroffenen Elternteil und dem eigenen Geschlecht aufwiesen. Hierbei wurde das Körpergewicht, der Glukosestoffwechsel, die NO Metabolite im Serum und die Expression von Genen mit Funktion im NO-Arginin-Stoffwechsel in stoffwechselaktiven Geweben durch die elterliche Hyperglykämie beeinflusst.

Insgesamt wurde ein stärkerer Effekt der mütterlichen Hyperglykämie auf den metabolischen Phänotyp der männlichen Wildtypnachkommen beobachtet.

Bei Betrachtung der Körpergewichte waren männliche Nachkommen hyperglykämischer Mütter im Trend leichter als die Kontrolltiere oder Nachkommen hyperglykämischer Väter. Vor allem die Nachkommen, deren hyperglykämischen Mütter ein diabetogenes Futter erhalten hatten, zeigten niedrigere Körpergewichte als die Nachkommen, deren Mütter ein Normalfutter bekommen hatten.

Eine mütterliche Hyperglykämie könnte im Tiermodell zu einer intrauterinen Wachstumsrestriktion führen, allerdings hat dies vermutlich im Alter von 6 Wochen keinen ausgeprägten programmierenden Effekt mehr. Andererseits könnte das Körpergewicht zum Zeitpunkt der Messung durch die Nahrung bereits ausgeglichen worden sein. Eine humane Studie zeigt zum Beispiel, dass ein niedriges Geburtsgewicht mit dem Fortschreiten des Kindesalters sich normalisiert, und erst im jungen Erwachsenenalter deutlich zunimmt, was dann ein erhöhtes Risiko für ein metabolisches Syndrom darstellt (Bhargava et al. 2004).

Unabhängig davon, ob die Nachkommen diabetischer und adipöser Mütter eine Mikro- oder Makrosomie entwickeln, sind sie von den gleichartigen Stoffwechselstörungen im späteren Leben betroffen (Remmers und Delemarre-van de Waal 2011).

Einen kritischen Punkt bei der Interpretation der Körpergewichtsveränderungen sollte man nicht außer Acht lassen. Obwohl alle Nachkommen im gleichen Alter

und unter Standardbedingungen gewogen wurden, sollten die Körpergewichte nur relativ betrachtet werden. Durch eine Messung des Körpergewichtes, beziehungsweise eine BMI-Berechnung ist es nicht möglich darauf zu schließen, ob das niedrige Körpergewicht im Wesentlichen durch den reduzierten Fettanteil oder durch Muskelmasse zustande kommt. Ob die Versuchstiere mehr Fettanteil oder Muskelmasse einlagern, kann sich durchaus je nach Gruppenzugehörigkeit und hyperglykämischem Elternteil unterscheiden. Für die Fragestellung unseres Experiments war die Messung des Körpergewichtes allerdings für den Gruppenvergleich ausreichend.

In verschiedenen Tierexperimenten finden sich bei Nachkommen hyperglykämischer Mütter eine fetale Hyperglykämie, ein perinatal erhöhter Insulinspiegel und beginnende Glukoseverwertungsstörung, die in einigen Tiermodellen zu Veränderungen des Körpergewichtes mit hohem Fettanteil führen. Im späteren Leben entwickeln diese Nachkommen ein Übergewicht, das auf eine Programmierung der Adipogenese in der fetalen Entwicklung hindeutet (Steculorum und Bouret 2011).

Leptin als ein möglicher Mediator für die Entwicklung des Übergewichts im späteren Leben wurde in der Studie von Briffa und Kollegen diskutiert. Leptin reguliert Appetit, wird aus dem Fettgewebe sezerniert und intrauterin mit dem Blut der Mutter für die fetale ZNS-Entwicklung zur Verfügung gestellt (Briffa et al. 2015). In einer Rattenstudie zum Beispiel zeigen männliche Nachkommen mit mütterlicher Hyperglykämie und dem fettreichen Futter einen deutlich höheren Leptinspiegel als die Kontrolltiere, was einen Zusammenhang zwischen dem intrauterinen Einfluss und metabolischen Störungen von Nachkommen darstellt (Blue et al. 2015). Die weiblichen Nachkommen der Studie von Blue und Kollegen hingegen zeigen nur moderate Veränderungen des Leptinspiegels, was auf einen geschlechtsspezifischen Effekt hindeutet.

Bei der Auswertung der ipGTT-Ergebnisse wurde bei männlichen Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK) ein signifikant höherer Anstieg der Glukosekonzentration zum Zeitpunkt $t=30$ Minuten im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet. Trotz der Normalisierung der Blutglukosekonzentration zum Zeitpunkt $t=120$ Minuten zeigten die männlichen Nachkommen

hyperglykämischer Mütter (EBAK) bereits im Alter von 6 Wochen pathologische Veränderungen in der Glukoseverwertung.

Im selben Tiermodell wurden bereits metabolische Veränderungen im Verlauf der Zeit bei den Nachkommen hyperglykämischer Elterntiere nachgewiesen (Grasemann et al. 2012). Hierbei wurde die Entwicklung einer gestörten Glukoseverwertung in den männlichen Wildtypnachkommen hyperglykämischer Akita-Mäusen beobachtet, die mit dem Alter fortschritt und im Alter von 26 Wochen viel deutlicher ausgeprägt war als bei den jüngeren Tieren. Der NO-Arginin-Stoffwechsel dieser Versuchstiere im Alter von 14 und 26 Wochen war beeinträchtigt. In der vorliegenden Arbeit konnte bei 6 Wochen alten männlichen Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK) bereits eine beginnende diabetogene Stoffwechsellage nachgewiesen werden und somit die Arbeitshypothese bekräftigt werden. Auch in humanen Studien wurden bei Nachkommen diabetischer Mütter häufiger eine gestörte Glukosetoleranz beziehungsweise ein früheres Auftreten von Diabetes Mellitus vom Typ 2 beschrieben (Clausen et al. 2008).

Häufig besteht ein Zusammenhang zwischen einer gestörten Glukosetoleranz der Nachkommen und mütterlichen diabetogenen Auffälligkeiten während der Schwangerschaft (Hales und Barker 2001; El Hajj et al. 2014).

Unsere Ausgangshypothese, dass diabetogenes Futter der Mütter den Glukosestoffwechsel der Nachkommen beeinflusst, ließ sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigen. Ein mütterliches Futter mit hohem Zuckeranteil führte bei männlichen Nachkommen hyperglykämischer Mütter zu einem signifikant schwächerem Anstieg der Glukosekonzentration zum Zeitpunkt $t=30$ Minuten sowie zu einer verlangsamten Erholungsphase, dem Abfall der Glukosekonzentration, zum Zeitpunkt $t=60$ Minuten im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Auch bei den männlichen Kontrolltieren (ECO) wurden Veränderungen im Glukosestoffwechsel wie zum Beispiel eine Steigerung der Glukosekonzentration im Blut zum Zeitpunkt $t=30$ Minuten beobachtet. Der Glukoseverlauf dieser Tiere ähnelt sich somit dem der männlichen Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK) mit Normalfutter. Diese Ergebnisse könnten erste Hinweise auf eine sich entwickelnde Störung der Glukoseverwertung sein.

Es gibt viele epigenetische Studien zum Thema des intrauterinen Einflusses auf Nachkommen und fetaler Programmierung, basierend auf Tiermodellen, in denen eine fettreiche Diätmanipulation eine diabetogene und adipogene Stoffwechsellage der Tiere hervorrufen sollte (Masuyama und Hiramatsu 2012; Williams et al. 2014; Blue et al. 2015). In der vorliegenden Arbeit haben wir uns für ein zuckerreiches diabetogenes Futter entschieden, um den Ernährungsstil der modernen Gesellschaft zu untersuchen.

Samuelson und Kollegen haben den Einfluss eines zuckerreichen Futters während der Schwangerschaft und Laktationsperiode auf Nachkommen in einem Mausmodell untersucht. Neben einer Hypertension bei allen Nachkommen mit einem maternalen zuckerreichen Futter wurden bei weiblichen Nachkommen eine Hyperinsulinämie, Übergewicht und verminderte Glukosetoleranz im Alter von 12 Wochen beobachtet (Samuelsson et al. 2013). Im Vergleich zu unseren Beobachtungen zeigten sich in dieser Studie keine signifikanten metabolischen Veränderungen bei den männlichen Nachkommen. Das könnte einerseits dadurch erklärt werden, dass diese Nachkommen zwar einem mütterlichen diabetogenen Futter, allerdings keiner mütterlichen Hyperglykämie ausgesetzt waren. Andererseits könnte das unterschiedliche Alter der untersuchten Tiere (Samuelson: 12 Wochen, hier: 6 Wochen) entscheidend sein. Außerdem könnte hier eine bereits demonstrierte (Gilbert und Nijland 2008), geschlechtsspezifische Auswirkung der intrauterinen Umgebung, in Abhängigkeit von ihrem Eintrittspunkt und ihrem Schweregrad, auf männliche und weibliche Nachkommen eine Rolle spielen. Auch die unterschiedliche Zusammensetzung des diabetogenen Futters mit 55% vom einfachen Zucker, 10% Fett, 15% Protein versus unserem Futter mit 50,7% vom einfachen Zucker, 5% Fett und 17% Protein, muss berücksichtigt werden.

Wie in Tierexperimenten bereits gezeigt (Grasemann et al. 2012; Blue et al. 2015), waren auch in der vorliegenden Studie die männlichen Nachkommen deutlicher von metabolischen Veränderungen betroffen als weibliche Nachkommen. So wurden in der vorliegenden Arbeit bei den weiblichen Nachkommen hyperglykämischer Elterntiere keine relevanten Gewichtsveränderungen festgestellt. Die weiblichen Nachkommen scheinen im Bezug auf eine Störung des

Glukosestoffwechsels weniger von elterlicher Hyperglykämie betroffen zu sein als männliche Tiere.

Bei diesen geschlechtsspezifischen Unterschieden können die weiblichen hormonregulatorischen Mechanismen und Sexualdimorphismus eine Rolle gespielt haben (Samuelsson et al. 2008; Hochoy 2014; Blue et al. 2015). Eine Rattenmodellstudie zeigt beispielweise, dass ein mütterliches fruktosereiches Futter zu erhöhtem Fruktose- und Leptinspiegel im Blut der weiblichen Feten führt. Männliche Feten waren hingegen davon nicht betroffen (Vickers et al. 2011).

Die Autoren vermuten, dass es geschlechtsspezifische Einflüsse auf die plazentare Sensitivität zu Fruktose oder ihren Transportern geben kann, oder dass Fruktose das Plazentawachstum beziehungsweise die Plazentafunktion durch den Einfluss auf Wachstumsfaktoren wie IGF beeinträchtigen kann. Ein genauer Mechanismus der geschlechtsspezifischen Programmierung ist allerdings bisher nicht eindeutig geklärt. Einerseits wird eine Wechselwirkung zwischen den Sexualhormonen und Nährstoffen in den Geweben des Fetus vermutet (Aiken und Ozanne 2013). Andererseits gibt es in humanen Studien Hinweise darauf, dass Plazentawachstum und -funktion vom fetalen Geschlecht abhängig sind (Clifton 2005). Clifton und Kollegen gehen davon aus, dass sich die Plazentafunktion unter ungünstigen maternalen Bedingungen (mütterliches Asthma) bei männlichen Feten anpasst, um das Überleben zu gewährleisten, während weibliche Feten ihr Wachstum reduzieren, um sich den ungünstigen Bedingungen besser anpassen zu können.

In einem Mausmodell wurde außerdem gezeigt, dass ein fettreiches Futter während der Schwangerschaft mit DNA-Hypomethylierung verschiedener Gene in der Plazenta von weiblichen Feten assoziiert ist (Gallou-Kabani et al. 2010). Die Empfindlichkeit der fetoplazentaren Einheiten auf ungünstige maternale Umwelt könnte hierbei eine Rolle spielen. Es wurden in der vorliegenden Arbeit weder Leptinmessungen noch Untersuchungen der Plazentafunktion durchgeführt. So sind die Annahmen bezüglich der Ursache für geschlechtsspezifische Veränderungen rein hypothetisch.

Um beurteilen zu können, ob maternale Hyperglykämie während der Schwangerschaft zu langanhaltenden Veränderungen im NO-Stoffwechsel von

Wildtyp-Nachkommen führt und welche Prozesse diesen zugrunde liegen können, wurde die Konzentration von NO-Metaboliten (NO_x) im Serum der Nachkommen bestimmt.

Ähnlich wie in der vorherigen Studie von C. Grasemann zeigten die Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK) in der vorliegenden Arbeit einen Trend zu niedrigeren NO_x-Serumkonzentrationen im Vergleich zu den Kontrolltieren, was mit einem veränderten NO-Stoffwechsel durch die mütterliche Hyperglykämie zu tun haben kann.

Die unterstützende Rolle des NO bei der insulin-vermittelten Vasodilatation und insulin-stimulierenden Glukoseaufnahme im Skelettmuskel ist in der Literatur hinreichend beschrieben (Steinberg et al. 1994). Eine verminderte NO-Bildung durch NO-Synthasen kann eine Störung in insulin-vermittelten Vasodilatation hervorrufen. Kashyap und Kollegen haben beobachtet, dass Patienten mit Diabetes Mellitus Typ 2 eine verminderte NO-Produktion im Skelettmuskel haben, die durch die Insulingabe verbessert werden kann. Die Störung in der insulin-vermittelten Vasodilatation bei Typ 2 Diabetes kann die Veränderung von NOS im Skelettmuskel erklären (Kashyap et al. 2005).

Des Weiteren wurde untersucht, ob die mütterliche Aufnahme einer diabetogenen Nahrung während der Schwangerschaft, im Vergleich zum Normalfutter, mit Veränderungen im NO-Stoffwechsel der Nachkommen assoziiert ist. Ein diabetogenes Futter der Mütter könnte der Grund für eine niedrige NO_x Konzentration im Serum der 6 Wochen alten Tiere (sowohl bei den Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK), als auch in den Kontrollgruppen (ECO) beider Geschlechter) gewesen sein und somit den NO-Stoffwechsel der Nachkommen beeinflusst haben. Aufgrund der geringen Tierzahlen in den einzelnen Gruppen wurde bei den Nachkommen hyperglykämischer Mütter keine Signifikanz festgestellt. Allerdings zeigten alle Nachkommen mit einem diabetogenen Futter der Mütter einen deutlichen Abfall der NO_x-Konzentration im Serum im Vergleich zu den Gruppen mit mütterlichem Normalfutter.

In den weiteren Untersuchungen wurde eine Veränderung der nNOS-Genexpression im Muskelgewebe (Skelettmuskel) der männlichen Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK) festgestellt.

Die Expression von nNOS im Muskelgewebe war deutlich erhöht. Trotz mehrfacher Messwiederholung zeigte sich eine starke Streuung der Expressionswerte bei männlichen EBAKs. Es erscheint möglich, dass das Ausmaß der mütterlichen Hyperglykämie hierfür eine Ursache sein kann.

nNOS im Skelettmuskel ist an der Modulation der Insulinfreisetzung und damit dem Glukosetransport sowohl beim Menschen, als auch beim Tier beteiligt (Kashyap et al. 2005; Bradley et al. 2007). Bradley und Kollegen können beispielweise zeigen, dass sowohl Patienten mit Insulinresistenz als auch Patienten mit manifestem Diabetes Mellitus Typ 2 eine verminderte nNOS-Protein Expression im Skelettmuskel aufweisen. Das deutet darauf hin, dass eine Insulinresistenz zu einer Reduktion der nNOS-Expression führen kann. Die Studie konnte darüber hinaus zeigen, dass regelmäßige moderate Trainingseinheiten zur Verbesserung der Glukosetoleranz führen, allerdings ohne die nNOS-Protein Expression im Skelettmuskel zu beeinflussen.

Die Studie von Perreault et al. (Perreault et al. 2000) zeigt eine Reduktion der nNOS-Enzymaktivität im Skelettmuskelgewebe bei Ratten mit mittels Streptozotocin-Injektion (65mg/kg, i.v.) induziertem Diabetes Mellitus. Die Genexpression von nNOS hingegen war nicht verändert, was auf eine Rolle von post-transkriptionellen Mechanismen für die Aktivität des Enzyms hinweist. In einer Studie mit NOS-knockout Mäusen konnte bei diesen Tieren eine Insulinresistenz gezeigt werden (Shankar et al. 2000).

Die Diskrepanz bezüglich verminderter nNOS Expression im Skelettmuskel bei Tieren mit Diabetes mellitus und unserer Ergebnisse (Hochregulation der nNOS-Expression bei männlichen Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK)) weist auf einen Programmierungseffekt durch die hyperglykämische intrauterine Umgebung hin. Die NO Konzentrationen waren auch bei den in der vorliegenden Studie untersuchten Tieren tendenziell vermindert.

Es ist möglich, dass Veränderungen in NO-Arginin-Stoffwechsel von Krankheitsstadien beziehungsweise von dem Alter der Tiere abhängig sind.

Diese Annahmen sind jedoch rein hypothetisch.

Beim weiteren Analysieren der am NO-Stoffwechsel beteiligten Gene wie PRMT und eNOS im Muskel-, Leber-, und Fettgewebe wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den männlichen Nachkommen hyperglykämischer Mütter

(EBAK) und Kontrolltieren (ECO) beobachtet. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die untersuchten, am NO-Metabolismus beteiligten Gene, nicht alleinig für die NOS-Expressionsveränderung zuständig sind und die Beteiligung anderer metabolischen oder molekularen Prozesse anzunehmen ist.

Der Einfluss von väterlicher Hyperglykämie mit Veränderungen des Körpergewichtes, des Glukosestoffwechsels und der Expression der im NO-Arginin-Stoffwechsel aktiven Gene wurde bei beiden Geschlechtern beobachtet.

Die Wildtyp-Nachkommen hyperglykämischer Väter (ECON2) sollten ursprünglich als zweite Kontrollgruppe im Experiment geführt werden, da diese Tiere keiner intrauterinen Hyperglykämie ausgesetzt waren. Interessanterweise zeigten sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit im metabolischen Phänotyp zum Teil gegenläufige Veränderungen im Vergleich zu Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK). Die väterliche Hyperglykämie führte bei männlichen Nachkommen (ECON2) zu einem signifikant höheren Körpergewicht im Alter von 6 Wochen im Vergleich zu den Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK) sowie den Kontrolltieren. Die Nachkommen hyperglykämischer Väter (ECON2) wiesen auch einen höheren Anstieg der Glukosekonzentration zum Zeitpunkt $t=30$ Minuten im Vergleich zu Kontrolltieren auf, allerdings war dieser schwächer ausgeprägt als bei den Nachkommen hyperglykämischer Mütter.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass der väterliche Genotyp und Phänotyp einen Einfluss auf die Nachkommen nimmt, ohne dass die krankheitsauslösende Mutation vererbt wird. Entsprechend führt eine väterliche Hyperglykämie zu metabolischen und skelettalen Veränderungen in Wildtypnachkommen von Akita-Mäusen (Grasemann et al. 2012). Die Studie von Ng, Lin und Kollegen zeigt, dass ein fettreiches Futter auch bei männlichen Ratten zu metabolischen Veränderungen bei den Nachkommen führt (Ng et al. 2010). Die väterliche Ernährung kann zu epigenetischen Veränderungen der Spermien führen und an die nächste Generation weitergegeben werden (Hochoer 2014).

Entsprechend dieser Hypothese, konnte bei den männlichen Nachkommen der hyperglykämischen Väter (ECON2) eine signifikante Reduktion der Genexpression der im NO-Stoffwechsel beteiligten Gene der PRMT-Familie und der eNOS im Fett- und Lebergewebe beobachtet werden.

Da eine mütterliche Hyperglykämie (Gestationsdiabetes) zu einer Zunahme des Körpergewichtes der Neugeborenen führt, wurde hier untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der mütterlichen Blutglukosekonzentration und dem Körpergewicht der Nachkommen im Mausmodell gab. Anders als erwartet, zeigte sich kein Zusammenhang zwischen Körpergewicht der Nachkommen und der Höhe der Glukosekonzentration der Mutter. Allerdings war es uns nicht möglich, Geburtsgewichte der Mäuse zu erheben, sondern die Tiere wurden erstmalig im Alter von 5 Tagen gewogen. Es ist deshalb denkbar, dass mögliche Unterschiede im Körpergewicht zu diesem Zeitpunkt bereits ausgeglichen waren.

Da nur die Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK) eine Veränderung der nNOS Genexpression im Skelettmuskel aufwiesen, wurde auch hier ein Einfluss der maternalen Blutglukosekonzentration als Ursache vermutet. Die Höhe der mütterlichen Blutglukosekonzentration korrelierte jedoch nicht mit dem Expressionslevel der nNOS im Skelettmuskel der EBAK-Tiere.

Je höher die Genexpression von nNOS im Skelettmuskel der männlichen Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK) war, desto niedriger war der Glukosespiegel zum Zeitpunkt $t=60$ Minuten im ipGT-Test. Aus anderen Studien wissen wir, dass hohe nNOS-Aktivität im Skelettmuskel eine bessere Glukoseaufnahme bewirkt (Kashyap et al. 2005). Da unsere männlichen Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK) einen signifikant höheren Glukosespiegel zum Zeitpunkt $t=60$ Minuten und somit eine langsamere Glukoseverwertung beziehungsweise eine schlechtere Glukoseaufnahme in den Skelettmuskel hatten vermuten wir, dass die nNOS Expression im Skelettmuskel bei diesen Tieren kompensatorisch erhöht sein könnte.

Aufgrund der auffälligen Veränderungen der Genexpression im Skelettmuskelgewebe wurde im nächsten Schritt der Methylierungsstatus von nNOS untersucht, um festzustellen, ob eine veränderte Methylierung eine mögliche epigenetische Ursache für den beobachteten Phänotyp sein kann. Die im vorliegenden Versuch gefundenen Veränderungen der Genexpression von nNOS im Skelettmuskel der männlichen Nachkommen hyperglykämischer Mütter stehen allerdings nicht im Zusammenhang mit der DNA-Methylierung. Der Einfluss

von Methylierungsveränderungen anderer, modulierender Gene, mit einer Wirkung auf die Genexpression von nNOS, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Die Anzahl der untersuchten Wildtyp-Mäuse in diesem Experiment war mit 83 Tieren ausreichend. Durch eine geschlechts- und nahrungsspezifische Gruppenbildung kam es allerdings zur Bildung relativ kleiner Gruppen, was eine Vergleichsanalyse erschwerte und das Signifikanzniveau reduzierte. Da die Versuchstiere innerhalb der Gruppen gleiche Tendenzen aufwiesen, können bei einer größeren Untersuchungsgruppe größere Unterschiede bestehen.

Es ist wichtig, die Rolle der Ernährung in der perinatalen Entwicklungsperiode und den Mechanismus der generationsübergreifenden epigenetischen Vererbung zu verstehen und weiter zu untersuchen. Das Wissen darüber ermöglicht eine individuelle Anpassung der therapeutischen und präventiven Strategien in Form von kontrollierter Zufuhr von Nährstoffen/Nahrung während der Schwangerschaft oder postnatal. Möglicherweise könnten auf diese Weise epigenetische Veränderungen korrigiert werden und somit die Behandlung nicht nur der erkrankten Erwachsenen, sondern auch ihrer Nachkommen optimiert werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass ungünstige intrauterine Bedingungen, zum Beispiel durch das Auftreten eines maternalen Diabetes oder einer Adipositas während der Schwangerschaft, mit der Entwicklung von zahlreichen Stoffwechselstörungen in Nachkommen wie Insulinresistenz, verminderter Glukosetoleranz und sogar Diabetes Mellitus Typ 2 vergesellschaftet sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde an einem Mausmodell mit autosomal dominant bedingtem elterlichem hypoinsulinämischem Diabetes untersucht, ob eine mütterliche beziehungsweise väterliche Hyperglykämie und eine Modifikation der mütterlichen Ernährung während der Schwangerschaft den metabolischen Phänotyp und Arginin-NO Stoffwechsel der Wildtyp-Nachkommen verändern. Darüber hinaus wurde untersucht, ob eine veränderte DNA-Methylierung von NO-Stoffwechsel-aktiven Genen die Ursache der phänotypischen Veränderungen bilden könnte.

Das Mausmodell mit elterlicher Hyperglykämie sowie die modifizierende zuckerreiche maternale Nahrung wurden so gewählt, dass sie eine der häufig vorkommenden Stoffwechsellagen und den modernen Ernährungsstil bei Menschen widerspiegeln.

Bei den Nachkommen fanden sich geschlechtsspezifische Veränderungen von Körpergewicht, Glukosespiegel, NO-Metaboliten und eine veränderte Genexpression mancher NO-metabolisierender Gene.

Die exemplarische Überprüfung des DNA-Methylierungsstatus von CpG Inseln im Gen der neuronalen NO Synthase (nNOS) im Skelettmuskel erbrachte keine Unterschiede in der Methylierung bei den Nachkommen hyperglykämischer Mütter. Eine Veränderung des Methylierungsstatus in nNOS im Skelettmuskel als molekulare Ursache der gefundenen Veränderungen im NO-Argininstoffwechsel ist damit unwahrscheinlich.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abd El Dayem SM, Battah AA, El-Shehaby A, El Bohy AEM (2014): Asymmetric dimethyl L-arginine, nitric oxide and cardiovascular disease in adolescent type 1 diabetics. *J Pediatr Endocrinol Metab JPEM* 27, 437–444
2. Aerts L, Holemans K, Van Assche FA (1990): Maternal diabetes during pregnancy: consequences for the offspring. *Diabetes Metab Rev* 6, 147–167
3. Aiken CE, Ozanne SE (2013): Sex differences in developmental programming models. *Reprod Camb Engl* 145, R1-13
4. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001): Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357, 593–615
5. Balligand JL, Ungureanu-Longrois D, Simmons WW, Kobzik L, Lowenstein CJ, Lamas S, Kelly RA, Smith TW, Michel T (1995): Induction of NO synthase in rat cardiac microvascular endothelial cells by IL-1 beta and IFN-gamma. *Am J Physiol* 268, H1293-1303
6. Barker DJ, Osmond C (1986): Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet Lond Engl* 1, 1077–1081
7. Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM (1993): Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 36, 62–67
8. Bhargava SK, Sachdev HS, Fall CHD, Osmond C, Lakshmy R, Barker DJP, Biswas SKD, Ramji S, Prabhakaran D, Reddy KS (2004): Relation of Serial Changes in Childhood Body-Mass Index to Impaired Glucose Tolerance in Young Adulthood. *N Engl J Med* 350, 865–875
9. Bird A (2002): DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16, 6–21
10. Blue EK, Ballman K, Boyle F, Oh E, Kono T, Quinney SK, Thurmond DC, Evans-Molina C, Haneline LS (2015): Fetal hyperglycemia and a high fat diet contribute to aberrant glucose tolerance and hematopoiesis in adulthood. *Pediatr Res* 77, 316–325
11. Bradley SJ, Kingwell BA, Canny BJ, McConell GK (2007): Skeletal muscle neuronal nitric oxide synthase micro protein is reduced in people with impaired glucose homeostasis and is not normalized by exercise training. *Metabolism* 56, 1405–1411

12. Briffa JF, McAinch AJ, Romano T, Wlodek ME, Hryciw DH (2015): Leptin in pregnancy and development: a contributor to adulthood disease? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 308, E335-350
13. Burdge GC, Slater-Jefferies J, Torrens C, Phillips ES, Hanson MA, Lillycrop KA (2007a): Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. *Br J Nutr* 97, 435–439
14. Burdge GC, Hanson MA, Slater-Jefferies JL, Lillycrop KA (2007b): Epigenetic regulation of transcription: A mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? *Br J Nutr* 97, 1036–1046
15. Chan GC, Fish JE, Mawji IA, Leung DD, Rachlis AC, Marsden PA (2005): Epigenetic basis for the transcriptional hyporesponsiveness of the human inducible nitric oxide synthase gene in vascular endothelial cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 175, 3846–3861
16. Christopherson KS, Bredt DS (1997): Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. *J Clin Invest* 100, 2424–2429
17. Clausen TD, Mathiesen ER, Hansen T, Pedersen O, Jensen DM, Lauenborg J, Damm P (2008): High prevalence of type 2 diabetes and pre-diabetes in adult offspring of women with gestational diabetes mellitus or type 1 diabetes: the role of intrauterine hyperglycemia. *Diabetes Care* 31, 340–346
18. Clifton VL (2005): Sexually dimorphic effects of maternal asthma during pregnancy on placental glucocorticoid metabolism and fetal growth. *Cell Tissue Res* 322, 63–71
19. Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A, Snyder SH (1994): Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4214–4218
20. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS (1991): „Touchdown“ PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 19, 4008
21. El Hajj N, Schneider E, Lehnen H, Haaf T (2014): Epigenetics and life-long consequences of an adverse nutritional and diabetic intrauterine environment. *Reprod Camb Engl* 148, R111-120
22. Gallou-Kabani C, Gabory A, Tost J, Karimi M, Mayeur S, Lesage J, Boudadi E, Gross M-S, Taurelle J, Vigé A, et al. (2010): Sex- and Diet-Specific Changes of Imprinted Gene Expression and DNA Methylation in Mouse Placenta under a High-Fat Diet. *PLOS ONE* 5, e14398
23. Gilbert JS, Nijland MJ (2008): Sex differences in the developmental origins of hypertension and cardiorenal disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295, R1941-1952

24. Grasmann C, Devlin MJ, Rzczkowska PA, Herrmann R, Horsthemke B, Hauffa BP, Grynypas M, Alm C, Bouxsein ML, Palmert MR (2012): Parental diabetes: the Akita mouse as a model of the effects of maternal and paternal hyperglycemia in wildtype offspring. *PLoS One* 7, e50210
25. Green LC, Ruiz de Luzuriaga K, Wagner DA, Rand W, Istfan N, Young VR, Tannenbaum SR (1981): Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7764–7768
26. Hales CN, Barker DJ (2001): The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 60, 5–20
27. Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, Slagboom PE, Lumey LH (2008): Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 17046–17049
28. Hinchee-Rodriguez K, Garg N, Venkatakrisnan P, Roman MG, Adamo ML, Masters BS, Roman LJ (2013): Neuronal nitric oxide synthase is phosphorylated in response to insulin stimulation in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 435, 501–505
29. Hoche B (2014): More than genes: the advanced fetal programming hypothesis. *J Reprod Immunol* 104–105, 8–11
30. Holemans K, Gerber RT, Meurrens K, De Clerck F, Poston L, Van Assche FA (1999): Streptozotocin diabetes in the pregnant rat induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Diabetologia* 42, 81–89
31. Holemans K, Aerts L, Van Assche FA (2003): Lifetime consequences of abnormal fetal pancreatic development. *J Physiol* 547, 11–20
32. Jansohn M, Rothhämel S: *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. 5. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2012
33. Jawalekar SL, Karnik A, Bhutey A (2013): Risk of cardiovascular diseases in diabetes mellitus and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Biochem Res Int* 2013, 189430
34. Kashyap SR, Roman LJ, Lamont J, Masters BSS, Bajaj M, Suraamornkul S, Belfort R, Berria R, Kellogg DL, Liu Y, DeFronzo RA (2005): Insulin resistance is associated with impaired nitric oxide synthase activity in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 1100–1105
35. Knowles RG, Moncada S (1994): Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298, 249–258
36. Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS (1994): Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 372, 546–548

37. Li L-C, Dahiya R (2002): MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinforma Oxf Engl* 18, 1427–1431
38. Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 25, 402–408
39. Masuyama H, Hiramatsu Y (2012): Effects of a high-fat diet exposure in utero on the metabolic syndrome-like phenomenon in mouse offspring through epigenetic changes in adipocytokine gene expression. *Endocrinology* 153, 2823–2830
40. Matthews JN, Altman DG, Campbell MJ, Royston P (1990): Analysis of serial measurements in medical research. *BMJ* 300, 230–235
41. Mezghenna K, Leroy J, Azay-Milhau J, Tusch D, Castex F, Gervais S, Delgado-Betancourt V, Gross R, Lajoix A-D (2014): Counteracting neuronal nitric oxide synthase proteasomal degradation improves glucose transport in insulin-resistant skeletal muscle from Zucker fa/fa rats. *Diabetologia* 57, 177–186
42. Morgan HD, Sutherland HG, Martin DI, Whitelaw E (1999): Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat Genet* 23, 314–318
43. Ng S-F, Lin RCY, Laybutt DR, Barres R, Owens JA, Morris MJ (2010): Chronic high-fat diet in fathers programs β -cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* 467, 963–966
44. Nicholson TB, Chen T, Richard S (2009): The physiological and pathophysiological role of PRMT1-mediated protein arginine methylation. *Pharmacol Res* 60, 466–474
45. Nistala R, Hayden MR, Demarco VG, Henriksen EJ, Lackland DT, Sowers JR (2011): Prenatal Programming and Epigenetics in the Genesis of the Cardiorenal Syndrome. *Cardiorenal Med* 1, 243–254
46. Ozanne SE, Hales CN (2002): Early programming of glucose-insulin metabolism. *Trends Endocrinol Metab TEM* 13, 368–373
47. Perreault M, Dombrowski L, Marette A (2000): Mechanism of impaired nitric oxide synthase activity in skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia* 43, 427–437
48. Pettitt DJ, Aleck KA, Baird HR, Carraher MJ, Bennett PH, Knowler WC (1988): Congenital susceptibility to NIDDM. Role of intrauterine environment. *Diabetes* 37, 622–628
50. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S (1990): An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5193–5197

51. Rasso J (Hrsg.): Biochemie: 50 Tabellen. (Duale Reihe), 2., aktualisierte Aufl; Thieme, Stuttgart 2008
52. Ravelli AC, van der Meulen JH, Michels RP, Osmond C, Barker DJ, Hales CN, Bleker OP (1998): Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet Lond Engl* 351, 173–177
53. Remmers F, Delemarre-van de Waal HA (2011): Developmental Programming of Energy Balance and Its Hypothalamic Regulation. *Endocr Rev* 32, 272–311
54. Samuelsson A-M, Matthews PA, Argenton M, Christie MR, McConnell JM, Jansen EHJM, Piersma AH, Ozanne SE, Twinn DF, Remacle C, et al. (2008): Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension* 51, 383–392
55. Samuelsson A-M, Matthews PA, Jansen E, Taylor PD, Poston L (2013): Sucrose feeding in mouse pregnancy leads to hypertension, and sex-linked obesity and insulin resistance in female offspring. *Front Physiol* 4, 14
56. Sessa WC, Pritchard K, Seyedi N, Wang J, Hintze TH (1994): Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res* 74, 349–353
57. Shankar RR, Wu Y, Shen HQ, Zhu JS, Baron AD (2000): Mice with gene disruption of both endothelial and neuronal nitric oxide synthase exhibit insulin resistance. *Diabetes* 49, 684–687
58. Steculorum SM, Bouret SG (2011): Maternal diabetes compromises the organization of hypothalamic feeding circuits and impairs leptin sensitivity in offspring. *Endocrinology* 152, 4171–4179
59. Steinberg HO, Brechtel G, Johnson A, Fineberg N, Baron AD (1994): Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Invest* 94, 1172–1179
60. Takai D, Jones PA (2002): Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3740–3745
61. Toda N, Imamura T, Okamura T (2010): Alteration of nitric oxide-mediated blood flow regulation in diabetes mellitus. *Pharmacol Ther* 127, 189–209
62. Vaag AA, Grunnet LG, Arora GP, Brøns C (2012): The thrifty phenotype hypothesis revisited. *Diabetologia* 55, 2085–2088
63. Van Assche FA, De Prins F, Aerts L, Verjans M (1977): The endocrine pancreas in small-for-dates infants. *Br J Obstet Gynaecol* 84, 751–753

64. Van Assche FA, Aerts L, Holemans K (1992): Maternal diabetes and the effect for the offspring. *Verh - K Acad Voor Geneeskd Van Belg* 54, 95-106-108
65. Van den Veyver IB (2002): Genetic effects of methylation diets. *Annu Rev Nutr* 22, 255–282
66. Vickers MH, Clayton ZE, Yap C, Sloboda DM (2011): Maternal Fructose Intake during Pregnancy and Lactation Alters Placental Growth and Leads to Sex-Specific Changes in Fetal and Neonatal Endocrine Function. *Endocrinology* 152, 1378–1387
67. Wang J, Takeuchi T, Tanaka S, Kubo SK, Kayo T, Lu D, Takata K, Koizumi A, Izumi T (1999): A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic beta-cell dysfunction in the Mody mouse. *J Clin Invest* 103, 27–37
68. Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S (1994): Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5212–5216
69. Whitelaw NC, Whitelaw E (2006): How lifetimes shape epigenotype within and across generations. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 2, R131-137
70. Williams L, Seki Y, Vuguin PM, Charron MJ (2014): Animal models of in utero exposure to a high fat diet: a review. *Biochim Biophys Acta* 1842, 507–519
71. Wolff GL, Kodell RL, Moore SR, Cooney CA (1998): Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 12, 949–957
72. Xia W, Shao Y, Wang Y, Wang X, Chi Y (2012): Asymmetric dimethylarginine and carotid atherosclerosis in Type 2 diabetes mellitus. *J Endocrinol Invest* 35, 824–827
73. Yoshioka M, Kayo T, Ikeda T, Koizumi A (1997): A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice. *Diabetes* 46, 887–894

8 ANHANG

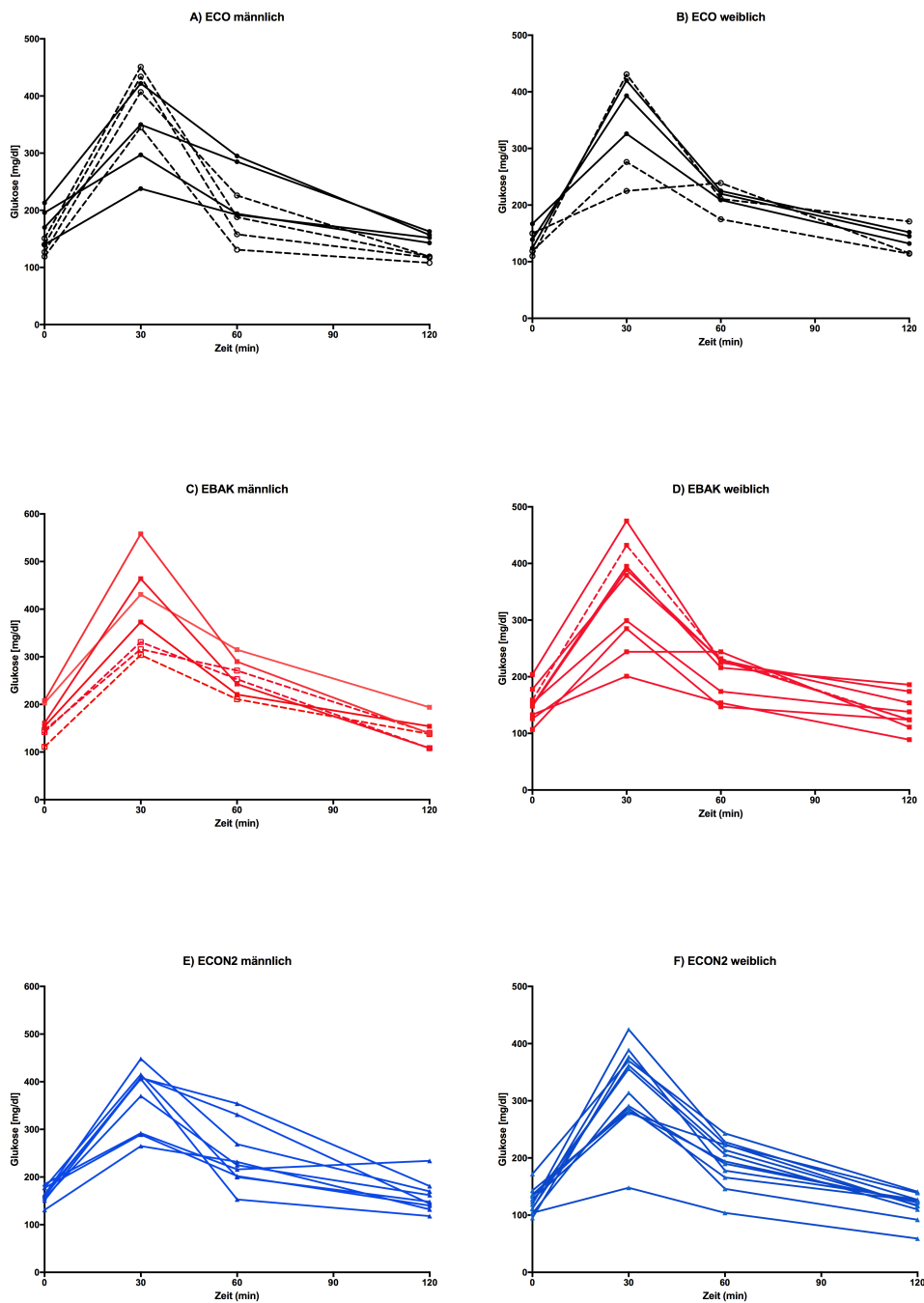


Abbildung 27: Verlauf der Serumglukose im intraperitonealem Glukosetoleranztest (ipGTT) der männlichen und weiblichen Tiere im Alter von 6 Wochen (männliche Nachkommen – linke Spalte, weibliche Nachkommen – rechte Spalte. EBAK = Nachkommen hyperglykämischer Mütter, ECON2 = Nachkommen hyperglykämischer Väter. Durchgezogene Linie = Tiere mit mütterlichem Normalfutter, gestrichelte Linie = Tiere mit mütterlichem diabetogenen Futter. N-Zahl: männlich: ECO-4, ECO diab-4, EBAK-4, EBAK diab-3, ECON2-9, weiblich: ECO-3, ECO diab-3 EBAK-7, EBAK diab-1, ECON2-11)

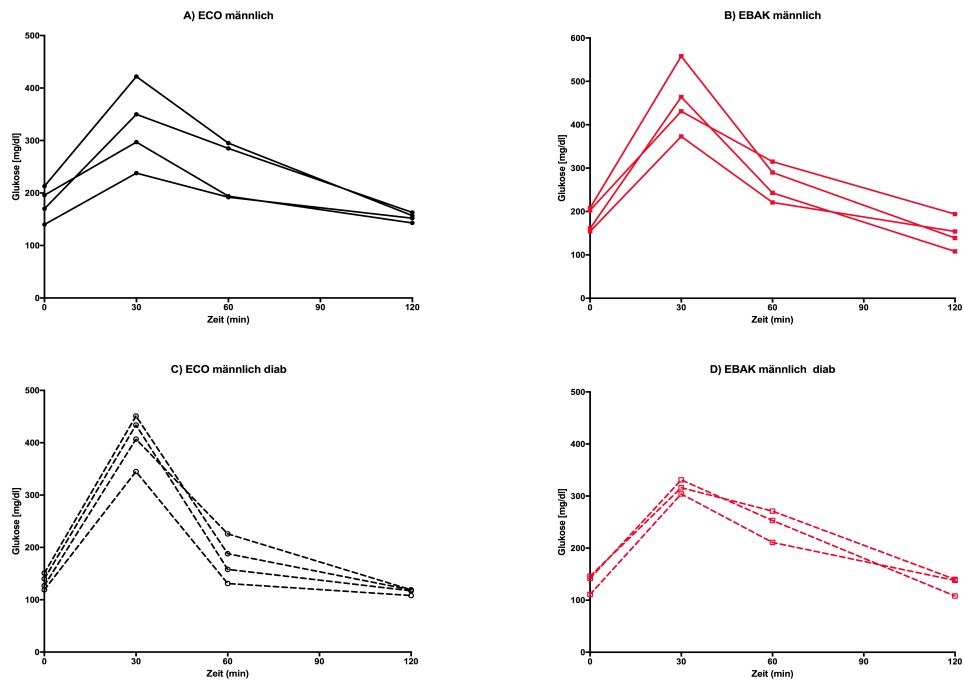


Abbildung 28: Einfluss des diabetogenen Futters auf den Verlauf der Serumglukose im intraperitonealem Glukosetoleranztest (ipGTT) der männlichen Tiere im Alter von 6 Wochen (Kontrolltiere – linke Spalte, Nachkommen der hyperglykämischer Mütter – rechte Spalte. EBAK = Nachkommen hyperglykämischer Mütter, . Durchgezogene Linie = Tiere mit mütterlichem Normalfutter, gestrichelte Linie = Tiere mit mütterlichem diabetogenen Futter. N-Zahl: ECO-4, ECO diab-4, EBAK-4, EBAK diab-3). Glukoseanstiegskurve der Nachkommen der hyperglykämischen Mütter mit diabetogenem Futter verläuft ähnlich der der Kontrolltiere mit mütterlichem diabetogenem Futter.

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 2: Zuchtschema (modifiziert nach (Grasemann et al. 2012))	18
Abbildung 3: Übersicht über das NOS1 Gen in Skelettmuskel und einem CpG-Island im 5'-untranslatierten Bereich vor exon 1. Das CpG Island (CpG-49) im Detail im Vergleich mit der genomischen Sequenz (NC_000071) und markierten CpGs.....	29
Abbildung 5: Agarosegel (1,5%) als Kontrolle der PCR Reaktion. Jeweils 20µl wurden aufgetragen. Marker DNA Mass ruler low (Fermentas) 10µl.	33
Abbildung 9: Glukose bei intraperitonealem Glukosetoleranztest (ipGTT) im Alter von 6 Wochen. Glukosekonzentration im Blut nach Applikation des Glukosebolus (2g/kg, i.p.) bei (A) männlichen (n = 29) und (B) weiblichen (n = 33) Kontrolltieren (ECO), Tieren mit mütterlicher (EBAK) sowie väterlicher (ECON2) Hyperglykämie. Der Glukoseanstieg der männlichen Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK, rote Quadrate) zum Zeitpunkt t = 30 min ist signifikant höher $**p < 0,002$ als der der Kontrolltiere (ECO, schwarze Punkte) und der Nachkommen hyperglykämischer Väter (ECON2, blaue Dreiecke) $*p < 0,02$. (Mittelwerte \pm SD, 2-way-Anova nach Tukey).....	39
Abbildung 10: Verlauf der Serumglukose bei intraperitonealem Glukosetoleranztest (ipGTT) der männlichen Tiere im Alter von 6 Wochen. (A) bei Normalfutter (n=8) und (B) mit diabetogenem (diab) Futter der Mütter (n = 7). (A): Der Glukoseanstieg der Nachkommen hyperglykämischer Mütter mit Normalfutter (EBAK, rote Quadrate) ist zum Zeitpunkt von t = 30 min signifikant höher als der der Kontrolltiere $**p < 0,006$. (B): Die Glukosekonzentration der Nachkommen hyperglykämischer Mütter mit diabetogenem Futter (EBAK diab, leere Quadrate) ist zum Zeitpunkt t = 30 min signifikant niedriger $**p < 0,002$ und zum Zeitpunkt t = 60 min signifikant höher $*p < 0,02$ als die der Kontrolltiere mit diabetogenem Futter der Mütter (ECO diab, leere Kreise) (Mittelwerte \pm SD, 2-way-Anova nach Tukey).....	40
Abbildung 20: lineare Regressionsanalyse der Glukosekonzentration im Rahmen des ipGTTs zum Zeitpunkt t = 60 Min. und der nNOS-Expressionen im Muskelgewebe der männlichen und weiblichen Nachkommen hyperglykämischer Mütter und der Kontrolltiere. (Legende: Kontrolltiere: ECO, schwarze Punkte, Kontrolltiere mit mütterlichem diabetogenem Futter: ECO diab, offene schwarze Kreise, Nachkommen hyperglykämischer Mütter: EBAK, rote Quadrate, Nachkommen hyperglykämischer Mütter und diabetogenem Futter: EBAK diab, offene rote Quadrate. Männlich: n 4-5, weiblich: n 2-11)	50
Abbildung 22: lineare Regressionsanalyse von Genexpression von nNOS- und PRMT1 im Muskelgewebe der Versuchstiere im Alter von 6 Wochen. Die weiblichen Kontrolltiere (ECO) zeigen einen signifikanten positiven Zusammenhang (r^2 0,7, $***p < 0,001$) zwischen nNOS- und der PRMT1- Expression im Muskelgewebe (Legende: Kontrolltiere: ECO, schwarze Punkte, Kontrolltiere mit mütterlichem diabetogenem Futter: ECO diab, offene schwarze Kreise, Nachkommen hyperglykämischer Mütter: EBAK, rote Quadrate, Nachkommen hyperglykämischer Mütter und diabetogenem Futter: EBAK diab, offene rote Quadrate. Männlich: n 4-17, weiblich: n 2-16)	52
Abbildung 23: CPG-Stellen im 5'- Sequenzbereich des murinen nNOS-Gens (60780 bis 61500). Output vom Programm mit Methylfinder. Zur Orientierung sind die CpGs gelb markiert.	53
Abbildung 24: Bisulfidsequenzierungsergebnisse des nNOS-Gens im Skelettmuskel. Chromatogramme von 2 männlichen Kontrolltieren (ECO) und 2 männlichen Nachkommen hyperglykämischer Mütter (EBAK) im Bereich N1. CpGs sind mit Sternchen markiert. Das G an der ersten Position entspricht Base 60925 (NC_000071).....	54
Abbildung 25: Übersicht des Methylierungsstatus der im Bereich des Primers N1 erfassten CpGs im nNOS Gen im Skelettmuskel der Kontrolltiere und Nachkommen hyperglykämischer Mütter.....	55
Abbildung 26: Übersicht des Methylierungsstatus der im Bereich des Primers N3 erfassten CpGs im nNOS Gen im Skelettmuskel der Kontrolltiere und Nachkommen hyperglykämischer Mütter.....	56

10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Primerprotokoll für die Genotypisierung des Akita-WTs (The Jackson Laboratory)	21
Tabelle 2: Reaktionssatz für die Genotypisierung (Applied Biosystems, Darmstadt)	21
Tabelle 3: PCR-Reaktionsablauf (StepOne, Applied Biosystems, Darmstadt)	21
Tabelle 4: Reaktionssatz für die DNase I Reaktion (Invitrogen, Darmstadt)	24
Tabelle 5: Reaktionssatz 1 für die cDNA-Synthese	25
Tabelle 6: Reaktionssatz 2 für die cDNA-Synthese (Invotrogen, Darmstadt)	25
Tabelle 7. Reaktionsablauf (Veriti-Thermocycler, Applied Bio¹systems, Darmstadt)	26
Tabelle 8: qPCR-Reaktionsablauf (StepOne, Applied Biosystems, Darmstadt)	26
Tabelle 9: verwendete Oligonukleotide für qPCR mit SYBR Green I	27
Tabelle 10: PCR-Reaktionsablauf (Veriti-Thermocycler, Applied Biosystems, Darmstadt)	28
Tabelle 11: Reaktionssatz für die MSP (Applied Biosystems, Darmstadt)	30
Tabelle 12: für die MSP benutze Primer (N1, N2, N3)	31
Tabelle 13: MCP-Reaktionsablauf (Veriti-Thermocycler, Applied Biosystems, Darmstadt)	31
Tabelle 14: Zusammenfassung der Körpergewichte (g) männlichen und weiblichen Nachkommen mit und ohne mütterliches diabetogenes Futter. (Legende: ECom/w- männliche/weibliche Kontrolltiere, EBAKm/w- männliche/weibliche Nachkommen von hyperglykämischen Müttern, NF – Normalfutter, diab – diabetogenes Futter, IQR-Quartilsabstand Q75-Q25, STD-Standardabweichung, MW-Mittelwert)	37
Tabelle 15: Mittelwerte der Serumglukose in mg/dl im Verlauf des ipGTT bei männlichen Nachkommen hyperglykämischer Mütter mit und ohne diabetogenes Futter. (Legende: ECom- männliche Kontrolltiere, EBAKm- männliche Wildtypnachkommen der hyperglykämischer Mütter, NF- Normalfutter, diab- diabetogenes Futter. MW- Mittelwert, STD- Standardabweichung)	39
Tabelle 16: Übersichtstabelle der NO_x-Konzentration in Serum (µM) der Nachkommen nach Geschlecht und mütterlichem Futter: (Legende: ECom/w- männliche/weibliche Kontrolltiere, EBAKm/w- männliche/weibliche Nachkommen von hyperglykämischen Müttern, NO _x - Stickstoffmonoxid, diab = diabetogenes Futter, NF = Normalfutter, IQR-iQuartilsabstand Q75- Q25, STD-Standardabweichung, MW-Mittelwert)	41
Tabelle 17: Veränderungen der Genexpression der für NO-/ADMA-Stoffwechsel wichtigen Gene <i>nNOS</i>, <i>eNOS</i>, <i>PRMT1</i>, <i>PRMT10</i> im Skelettmuskel, Fett- und Lebergewebe innerhalb der Gruppen im Vergleich zu Kontrolltieren. (Legende: m – männlich, w – weiblich, ↓/↑- signifikant verändert)	43

11 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
AKITA	hyperglykämische Maus mit Ins2-Mutation
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
BMI	Body-Mass-Index
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CpG	Desoxycytidin-phosphat-Desoxyguanosin
diab	Mütterliches zuckerreiches diabetogenes Futter
DMT2	Diabetes mellitus Typ 2
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBAK	Nachkommen der hyperglykämischer Mütter
ECO	Kontrolltiere
ECO diab	Kontrolltiere mit mütterlichem diabetogenem Futter
ECON2	Nachkommen der hyperglykämischer Väter
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
Et al	und andere
h	Stunden
IGF	Insulin like Growth Factor
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
ipGTT	Intraperitonealer Glukosetoleranztest
IUGR	Intrauterine Growth Restriction
MCP	Methylierungsspezifische PCR
min	Minuten
n	Anzahl der Tiere
NF	Normalfutter
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO ₂	Nitrit
NO ₃	Nitrat
NO	Stickstoffmonoxid
NO _x	(Nitrat+Nitrit)
p	Signifikanzkoeffizient
PCR	Polymerase chain reaction
PRMT	Protein arginine methyltransferase
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunden
SD	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
Vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp

12 DANKSAGUNG

An erster Stelle danke ich sehr herzlich Frau PD Dr.med Corinna Grasemann für die interessante Themenstellung, die wissenschaftliche Betreuung und die hilfreichen Anregungen bei den Korrekturen meiner Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Wiebke Diesner und Herrn Ralf Herrmann für die freundliche Aufnahme im Labor des MFZs sowie Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und für ihre Diskussionsbereitschaft bedanken.

Ganz besonders danke ich meinem lieben Ehemann Akmal und meinem bezaubernden Sohn David William für die Unterstützung während des Studiums, für ihre unendliche Geduld, ständige Motivation, Liebe und den Glauben an mich sowie für die schöne Zeit außerhalb der Universität.

Ich möchte meinen Schwiegereltern für den familiären Rückhalt danken.

Ebenso danke ich meiner Freundin Julia Starschinova für ihre ständige Hilfsbereitschaft, langjährige Freundschaft, die die Zeit meines Studiums spannender und leichter gemacht hat.

13 LEBENS LAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.