

Aus der
Kinder- und Jugendklinik
der
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Wolfgang Rascher

Metabolische Programmierung des renal-intrinsischen Leptin-Neuropeptid Y-Systems
mit renalem Funktionsverlust nach postnataler Hyperalimentation

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von

Eva Katharina Jobst

aus

Pegnitz



**Gedruckt mit Erlaubnis der
Medizinischen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg**

Dekan:	Prof. Dr. Dr. h.c. J. Schüttler
Referent:	Prof. Dr. J. Dötsch
Korreferent:	Prof. Dr. Dr. h.c. W. Rascher
Tag der mündlichen Prüfung:	26. Februar 2013

„Dass ich erkenne, was die Welt / Im Innersten zusammenhält.“ (Faust I, 382-383)

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	7
1) Hintergrund und Ziele der Studie.....	7
2) Methoden.....	7
3) Ergebnisse und Beobachtungen	7
4) Praktische Schlußfolgerungen.....	8
SUMMARY	9
1) Background	9
2) Methods.....	9
3) Results	9
4) Conclusions	10
1 EINLEITUNG	11
1.1 Adipositas und deren Konsequenzen	11
1.2 Neuropeptid Y	11
1.3 Neuropeptid Y und Nierenerkrankungen	15
1.4 Fetale Programmierung.....	16
1.5 Hyperalimentation.....	17
1.5.1 Hyperalimentation im Tiermodell.....	17
1.5.2 Hyperalimentation beim Menschen	17
1.5.3 Molekulare Mechanismen der Hyperalimentation.....	19
1.5.4 Einfluss der postnatalen Hyperalimentation auf die Niere	21
1.6 Auswahl eines geeigneten Versuchstieres	21
1.7 Fragestellung der Arbeit.....	23
2 MATERIAL UND METHODEN.....	24
2.1 Materialien	24
2.1.1 Kleinmaterial.....	24
2.1.2 Geräte	24
2.1.3 Reagenzien	25
2.1.4 Lösungen	28
2.1.5 Primer für Reverse Transkription und TaqMan PCR	30
2.1.6 Antikörper	30
2.1.7 Tiermaterial und Tierhaltung	30
2.2 Methoden.....	30
2.2.1 Experimentalansatz	30
2.2.2 Bestimmung von Körperlänge und Körpergewicht	31
2.2.3 Ermittlung von <i>Clearance</i> und Proteinurie	31
2.2.4 Narkose, Tötung und Organentnahme	31
2.2.5 Bestimmung des Serumleptins.....	32
2.2.6 Isolation von Ribonukleinsäure aus Nierengewebe	32
2.2.7 Synthese von <i>copy</i> Desoxyribonukleinsäure.....	33
2.2.7.1 <i>Desoxyribonukleinsäure-ase Reaktion</i>	33

2.2.7.2	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	34
2.2.8	TaqMan Real-time Polymerase-Kettenreaktion.....	35
2.2.8.1	Prinzipien der Polymerase-Kettenreaktion	35
2.2.8.2	Durchführung der TaqMan PCR	37
2.2.8.3	Relative Quantifizierung mit der Delta-Delta-Ct-Methode	37
2.2.9	Western Blot.....	39
2.2.9.1	Prinzipien des Western Blots	39
2.2.9.2	Proteinextraktion	39
2.2.9.3	Messen der Proteinkonzentration	40
2.2.9.4	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
2.2.9.5	Blotvorgang	42
2.2.9.6	Blockierung.....	42
2.2.9.7	Antikörperinkubation und Entwicklung	43
2.2.9.8	Aufhebung der Antikörperbindung (Strippen)	43
2.2.10	Fixation, Paraffineinbettung und Anfertigung der immunhistologischen Schnitte.....	43
2.2.11	Immunhistologische Kollagen I Färbung	44
2.2.12	Statistik und Auswertung.....	45
3	ERGEBNISSE	46
3.1	Phänotyp postnatal hyperalimentierter Ratten	46
3.2	Nierenfunktion postnatal hyperalimentierter Ratten.....	48
3.3	Veränderung der renalen Zytokinexpression durch postnatale Hyperalimentation.....	49
3.4	Veränderung der extrazellulären Matrix durch postnatale Hyperalimentation.....	51
3.5	Veränderung der Leptin-, NPY-, Y ₁ - und Y ₂ -Rezeptor-Expression durch postnatale Hyperalimentation.....	52
3.6	Veränderung der Leptin-Signalkaskade über STAT-3 durch postnatale Hyperalimentation.....	55
4	DISKUSSION.....	59
4.1	Phänotyp postnatal hyperalimentierter Ratten	59
4.2	Eingeschränkte glomeruläre Nierenfunktion in postnatal hyperalimentierten Ratten	60
4.3	Verstärkung der Expression proinflammatorischer Zytokine in postnatal hyperalimentierten Ratten	61
4.4	Modifikation der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix in postnatal hyperalimentierten Ratten	62
4.5	Modifikation der Y-Rezeptor Expression durch postnatale Hyperalimentation.....	63
4.6	Modifikation des renalen Systems zwischen Leptin und Neuropeptid Y in postnatal hyperalimentierten Ratten.....	64
4.7	Resistenzmechanismen der renalen Leptin-Signalkaskade postnatal hyperalimentierter Ratten.....	65

4.8	Klinische Schlussfolgerungen und Überlegungen zu weiteren Untersuchungen.....	66
	LITERATURVERZEICHNIS	67
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	78
	VERZEICHNIS DER VORVERÖFFENTLICHUNGEN.....	81
	ANHANG	82
	DANKSAGUNG.....	85

Zusammenfassung

1) Hintergrund und Ziele der Studie

Sowohl in tierexperimentellen als auch in humanen Studien ist gezeigt worden, dass Adipositas zu einem erhöhten Risiko für eine chronische Niereninsuffizienz führt [20, 28, 47]. Es finden histologische Veränderungen im Sinne einer *Obesity Related Glomerulopathy* (ORG) [106] und eine niederschwellige systemische Inflammation statt [106, 125]. Dennoch ist es noch weitgehend ungeklärt, ob postnatale Hyperalimentation zu einem Funktionsverlust der Niere führt. Daher ist es das Ziel dieser Arbeit letzteres und eine sich eventuell entwickelnde profibrotische Neigung mit Inflammation sowie eine Veränderung von Signalwegen des Systems zwischen Leptin und dem sympathischen Ko-Transmitter Neuropeptid Y (NPY), zu untersuchen.

2) Methoden

Die postnatale Hyperalimentation wurde durch eine Reduktion der primären Wurfgröße am postnatalen Lebenstag (P) 1 erreicht. Nach 24-stündiger Haltung in metabolischen Käfigen wurden die Tiere am Tag P70 getötet. Aus entnommenem Nierengewebe wurden Polymerase-Kettenreaktionen durchgeführt, um die Genregulation von NPY, seinen Rezeptoren, verschiedenen Adipozytokinen wie Leptin und Interleukin 6 zu untersuchen. Weiter wurden Western Blots von Interleukin-6, *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT-3) und *Suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS-3) durchgeführt. Auch wurde eine Immunhistologie von Kollagen I angefertigt.

3) Ergebnisse und Beobachtungen

Veränderungen betrafen nicht nur den Phänotyp der hyperalimentierten Tiere mit erhöhtem Körpergewicht, sondern sie manifestierten darüber hinaus eine eingeschränkte glomeruläre Nierenfunktion mit Veränderung der extrazellulären Matrix durch verstärkte Kollagen I Bildung, erhöhter Expression lokaler proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und des ebenso proinflammatorischen Peptidhormons Leptin. Im Gegensatz dazu war antiinflammatorisch wirkendes IL-10 vermindert. In hyperalimentierten Würfen kam es weiter zu einer verstärkten NPY-Expression mit einer Modifikation der Leptinsignalkaskade über STAT-3, da sowohl der Anteil an phosphoryliertem, also aktiven STAT-3 geringer und der Anteil des unphosphorylierten STAT-3 erhöht waren. Zusätzlich war mehr SOCS-3 messbar.

4) Praktische Schlußfolgerungen

Zusammenfassend zeigt die vorgelegte Studie, dass postnatale Hyperalimentation vor allem bei einer Wurfreduktion auf sechs Tiere Veränderungen im renalen Leptin-NPY-System hervorruft, die am postnatalen Lebenstag P70 persistieren. Damit hat eine Programmierung des renalen Leptin-NPY-Systems stattgefunden. Wahrscheinlich kommt es im Rahmen der lokalen Leptinvermehrung zu einer Sympathikusaktivierung mit NPY-Freisetzung, das wiederum als Stimulus für eine IL-6-Sekretion aus zirkulierenden Makrophagen in Frage kommt. Die mögliche Sympathikusaktivierung könnte zur Modifikation der extrazellulären Matrix mit erhöhter Kollagen I Bildung in den Glomeruli beitragen, da Leptin profibrotisch wirkt. Die renale STAT-3/JAK-2 Signaltransduktion ist beeinträchtigt, erkennbar an einer verminderten Phosphorylierung von STAT-3 und erhöhter Messbarkeit von SOCS-3, einem Inhibitor des STAT-3/JAK-2 Weges. Dies deutet auf eine lokale Postrezeptor-Leptinresistenz hin. Alles in allem entsteht so das Bild einer ORG, die durch frühe postnatale Hyperalimentation getriggert wird. Adipositas ist eine Epidemie, die ein erhöhtes Risiko für chronische Niereninsuffizienz birgt. Daher sind diese Ergebnisse von großer Relevanz.

Summary

1) Background

It has been shown that obesity leads to an increased risk for chronic kidney disease in animals as well as in humans [20, 28, 47]. Histological changes that are characteristic of an obesity related glomerulopathy (ORG) [106] and a low grade systemic inflammation occur [106, 125]. Still it is unknown whether postnatal hyperalimentation leads to a reduction of kidney function. The aim of this study was to determine if postnatal hyperalimentation by litter size reduction has an influence on kidney function, local inflammation and renal fibrosis. Moreover changes in the signal transduction in the interaction of leptin and neuropeptide Y (NPY) should be analysed.

2) Methods

Postnatal hyperalimentation was induced by litter size reduction (LSR) on postnatal day (P) 1. After keeping the rats in a metabolic cage for 24 hours they were sacrificed on day P70. Kidney material was used to perform polymerase chain reactions to evaluate gene regulation of NPY and its' receptors, different adipocytokines like leptin and interleukin-6 (IL-6). Furthermore, western blots of IL-6, signal transducer and activator of transcription 3 (STAT-3) and Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS-3) and an immunohistologic staining of collagen I were done.

3) Results

Rats that were affected from LSR were heavier than animals from the control group. They also showed reduced glomerular kidney function and changes of the extracellular matrix with increased production of collagen I, increased production of proinflammatory cytokines like IL-6 and leptin, whereas anti-inflammatory IL-10 was reduced. In LSR rats NPY-expression was increased together with a modification of leptin signalling via STAT-3: phosphorylated, active STAT-3 was decreased, while unphosphorylated STAT-2 was elevated. Also SOCS-3 levels were higher in LSR animals.

4) Conclusions

All in all, this study shows that postnatal hyperalimentation leads to changes in the leptin-NPY-system, especially in litters that were reduced to six animals. These changes persist until P70 which could be due to metabolic programming of the renal leptin-NPY-system. Probably

local increase of leptin expression causes activation of the sympathetic nervous system and NPY secretion. NPY may stimulate IL-6 secretion in circulating macrophages. Consistent with leptin's profibrotic function the activation of the sympathetic nervous system could then change glomerular extracellular matrix composition by increasing collagen I production. The renal STAT-3/JAK-2 pathway is impaired as phosphorylated STAT-3 levels are decreased and SOCS-3 levels are increased. SOCS-3 is a potent inhibitor of STAT-3/JAK-2 signalling. This indicates a local postceptor leptin resistance. Altogether early postnatal hyperalimentation creates an ORG. Obesity is a worldwide epidemic that involves a high risk of chronic renal failure. Because of that the results from this study are highly relevant and further work on this topic is necessary.

1 Einleitung

1.1 Adipositas und deren Konsequenzen

In den letzten Jahrzehnten ist sowohl in den Industrie- als auch Entwicklungsländern der Trend zu einer globalen Epidemie der Adipositas im Kindesalter festzustellen [116]. Adipositas ist nicht nur mit kardiovaskulären Erkrankungen [42] sowie mit einer Entzündungsneigung verbunden, sondern zunehmend auch mit chronischem Nierenversagen [125]. Verschiedene humane sowie tierexperimentelle Studien zeigen, dass Adipositas unabhängig von Diabetes und Hypertension die Gefahr der Entwicklung eines chronischen Nierenversagens mit sich bringt [20, 28, 47]. Die Prävalenz der terminalen Niereninsuffizienz nimmt zu und schon im Kindes- und Jugendalter konnte eine Assoziation zwischen Adipositas und einem erhöhten Risiko für Nierenerkrankungen gezeigt werden [116]. Gerade Frühgeborene oder Kinder, die für ihr Alter zu klein sind (engl. *small for gestational age*; SGA) sind sowohl für die Entwicklung einer Adipositas, als auch für die Progredienz einer Nierenerkrankung bis zur Niereninsuffizienz prädisponiert [90]. Leptin und Neuropeptid Y (NPY) sind beide Regulatoren des Appetits und der Nahrungsaufnahme [49]. Je mehr Fettgewebe ein Organismus besitzt, umso mehr wird dort produziertes Leptin in die Zirkulation ausgeschüttet [34]. Dieses reguliert als anorexigenes Peptidhormon die Nahrungsaufnahme und steht mit dem orexigenen NPY in einem negativen *Feedback*-Mechanismus, welcher sich im Hypothalamus befindet [49]. Außerdem besitzt Leptin eine sympathikus-aktivierende [46] und eine profibrotische Wirkung [119-120]. Hingegen ist NPY ein Ko-Transmitter des sympathischen Nervensystems und wird bei seiner Aktivierung sezerniert [45, 103].

Eine Hyperleptinämie wie sie bei Adipositas vorkommt, kann zu einer Nierenschädigung beitragen [124] und auch die Plasmakonzentration von Neuropeptid Y wird zum Beispiel bei diabetischer Nephropathie verändert [89]. In diesem Kontext ist es sinnvoll, diese beiden Peptide näher zu untersuchen, um eventuelle Präventivstrategien oder therapeutische Ansätze entwickeln zu können.

1.2 Neuropeptid Y

Neuropeptid Y wurde zum ersten Mal 1982 von Tatemoto aus einem Schweinegehirn isoliert [107]. Das Peptid aus 36 Aminosäuren, dessen Primärstruktur evolutionär stark konserviert ist [114], führt bei intraventrikulärer Injektion zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme in Ratten, weshalb man es als orexigen bezeichnet [18, 99]. Der Sitz

der Appetitregulation wird im zentralen Nervensystem in einer NPYergen neuronalen Achse zwischen *Nucleus arcuatus* und *Nucleus paraventricularis* des Hypothalamus gesehen. Dort wird die episodische Ausschüttung von NPY durch das vom Fettgewebe produzierte, anorexigene Leptin reguliert (vgl. Abb. 1 [49]), dessen Plasmakonzentration bei Tier und Mensch proportional zu der Fettgewebsmasse ist [19, 34].

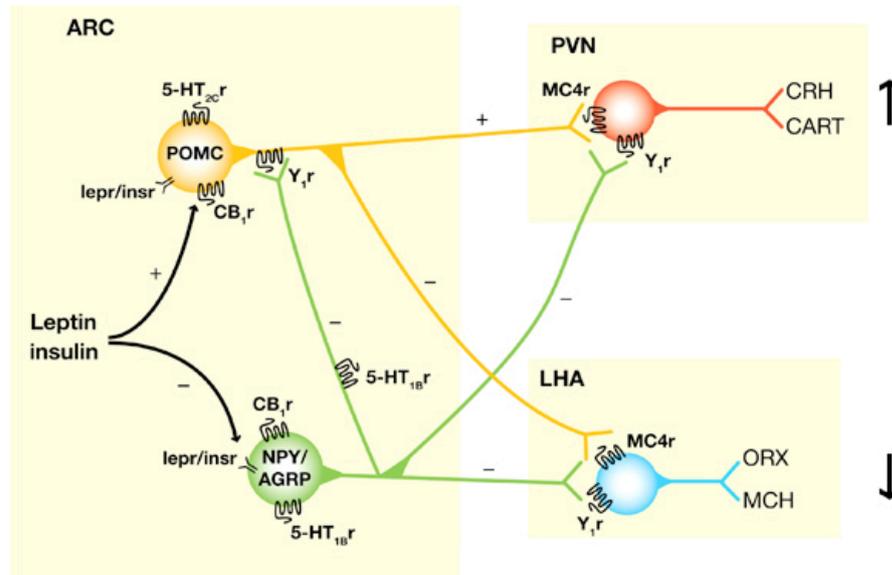


Abb. 1: Im *Nucleus arcuatus* (ARC) des Hypothalamus regulieren Leptin und Insulin das Neuropeptid Y-System der Nahrungsaufnahme. Über ihre Rezeptoren (lepr bzw. insr) stimulieren sie Proopiomelanocortin-produzierende Neurone (POMC). Diese begünstigen zum einen die Freisetzung der anorexigenen Peptide *Corticotropin-releasing hormone* (CRH) und *Cocaine- and amphetamine-regulated transcript* (CART) im *Nucleus paraventricularis* (PVN), zum anderen hemmen sie die Freisetzung der orexigenen Peptide Orexin (ORX) und *Melanin-concentrating hormone* (MCH) im lateralen Hypothalamus (LHA). NPY- und *Agouti-related peptide*- (AgRP) produzierende Neurone hemmen die Sekretion der anorexigenen Peptide wie CRH und CART im PVN und unterstützen die Freigabe der orexigenen Stoffe wie Orexin and MCH im LHA. Außerdem hemmen sie die Aktivität der POMC-produzierenden Neurone. Leptin und Insulin hemmen die NPY- und AgRP-produzierenden Neurone, wodurch wiederum deren Inhibition der POMC Neurone nachlässt. Dies wiederum führt zur Steigerung der Freisetzung von CRH und CART im PVN. Endocannabinoide (EC) stimulieren die Aktivität der NPY Neurone und hemmen die der POMC Neurone. Auch Leptin beeinflusst EC. Serotonin (5-Hydroxytryptamin; 5-HT) aktiviert POMC Neurone über den 5-Hydroxytryptamin Rezeptor 2C (5-HT_{2c}r) und hemmt die Sekretion von AgRP über den 5-Hydroxytryptamin Rezeptor 1B (5-HT_{1B}r) auch auf POMC hemmenden Neuronen, die AgRP enthalten. Insgesamt senken Leptin und Insulin die Nahrungsaufnahme. Cannabinoid-1 Rezeptor (CB₁r); Melanocortin 4 Rezeptor (MC4r). Reproduziert mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd. aus *Clinical Pharmacology Therapy*; Aronne, L. J. and Z. D. Thornton-Jones (2007): "New targets for obesity pharmacotherapy." 81(5): 748-752 [5].

Seine Funktionen übt NPY über G-Protein gekoppelte Rezeptoren aus, wobei fünf davon beim Menschen vorkommen, hier jedoch nur der NPY-Rezeptor 1 (Y₁-Rezeptor) sowie der Y₂-Rezeptor ins Auge gefasst werden, da beide eine Wirkung an renalen Tubuli entfalten [11]. Der Y₁-Rezeptor kommt bei Nagetieren und Menschen vor und ist vor allem im frontoparietalen Cortex und an der glatten Gefäßmuskulatur lokalisiert, wo er für Vasokonstriktion und Blutdruckregulation, Steigerung der Nahrungsaufnahme sowie Anxiolyse zuständig ist. Im Gegensatz hierzu hemmt der Y₂-Rezeptor, welcher ebenso bei Ratten und Menschen in Hippocampus, sympathischen Endköpfchen und proximalen Nierentubuli zu finden ist, die präsynaptische Transmitterfreisetzung (vgl. Tabelle 1 [64, 114-115]).

Tabelle 1: Einteilung der NPY Rezeptoren anhand von Rezeptorvorkommen und -funktionen [11, 38, 53, 64, 114-115]

Rezeptor	Speziesspezifisches Vorkommen	Organspezifisches Vorkommen	Wirkung
Y ₁	Ratte, Maus, Mensch	Frontoparietaler Cortex, glatte Gefäßmuskulatur, Sammelrohr, juxtaglomerulärer Apparat	Vasokonstriktion, Blutdruck↑, Reninfreisetzung↓, Nahrungsaufnahme↑, Anxiolyse
Y ₂	Hase, Ratte, Mensch	Hippocampus, Endköpfchen sympathischer Nerven, proximale Nierentubuli	Präsynaptische Hemmung der Transmitterfreisetzung, Stimulation der Na ⁺ /K ⁺ -ATPase
Y ₃ (nicht kloniert)	Rind, Ratte	Hirnstamm, Adrenale chromaffine Zellen, Kolon	Unterdrückung exzitatorischer, inhibitorischer Ströme im <i>Nucleus tractus solitarii</i>
Y ₄	Maus, Ratte, Huhn, Mensch	ZNS, Kolon, Dünndarm, Prostata, Lunge	Appetit↓
Y ₅ (Y ₁ like)	Maus, Ratte, Frosch, Huhn, Mensch	ZNS	Appetit↑
y ₆	Maus, Hase, Mensch (Pseudogen, nicht funktionsfähig)	Hypothalamus, Hippocampus, Dünndarm, Nebennieren, Herz, Skelettmuskel	

Es ist weiterhin bekannt, dass NPY im peripheren Nervensystem mit Katecholaminen kolokalisiert ist [29] und deren vasokonstriktorisches Effekt potenzieren kann [27]. Auch in der Niere wird NPY in perivaskulären Nervenendigungen gespeichert [6, 51, 71]. Überdies besitzt NPY mit seinem Y₁-Rezeptor innerhalb des adaptiven Immunsystems regulatorische Funktionen. Zum einen supprimiert NPY über den Y₁-Rezeptor die T-Zell Antwort, zum anderen benötigen Antigen-präsentierende Zellen den Y₁-Rezeptor für ihre Aktivierung [117]. Zusätzlich fördert NPY die Interaktion des sympathischen Nervensystems mit Zellen des Immunsystems wie Makrophagen, Lymphozyten und Granulozyten in primären und sekundären lymphatischen Organen [10]. Dies geschieht durch die gleichzeitige Sekretion der Katecholamine und des NPY in synapsenähnliche Strukturen, wie sie Felten und Olschowka in der weißen Milzpulpa zwischen sympathischen Endköpfchen und T- sowie B-Lymphozyten finden konnten [32]. Bei der neuroimmunen Modulation der Makrophagen über den Y₁-Rezeptor ist die Stimulation oder Inhibition der Interleukin (IL) 6 Sekretion abhängig vom aktivierten Adrenozeptor, was wiederum abhängig ist von der neuronalen Aktivität (Abb. 2).

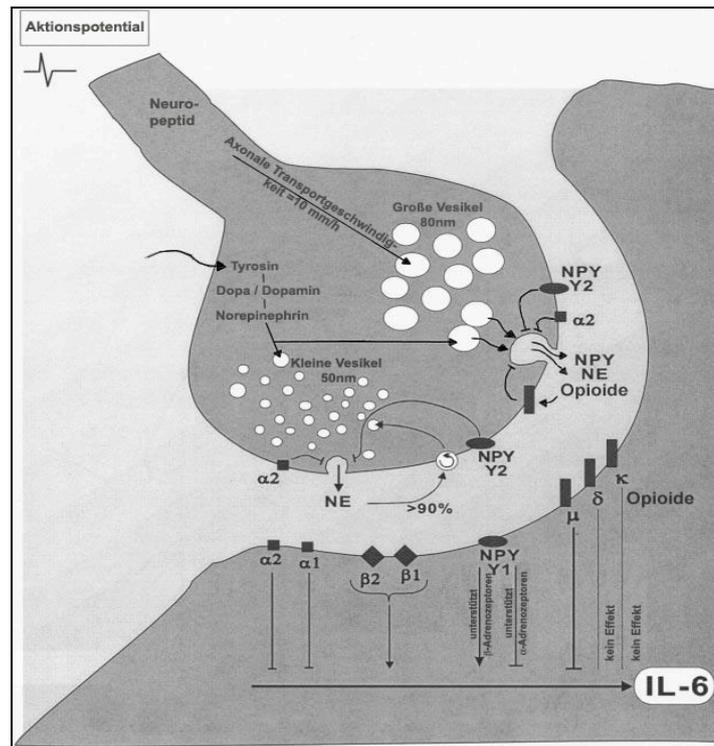


Abb. 2: Neuronale Steuerung der IL-6 Produktion der Makrophage über Adrenozeptoren, Opioidrezeptoren und den NPY Rezeptor 1 (Y₁). Bei niedriger Feuerrate des Axons wird vor allem Norepinephrin (NE) in geringer Konzentration frei und bindet an α-Adrenozeptoren, was zu einer Senkung der IL-6 Sekretion führt und von Neuropeptid Y (NPY) gefördert wird. Bei hoher Feuerrate werden NE, NPY und Opioidrezeptoren frei, wobei NE an α- und β-Adrenozeptoren bindet, was die IL-6 Sekretion steigert. NPY verstärkt diese Sekretion. Opioidrezeptoren hingegen hemmen die IL-6 Sekretion über μ-Rezeptoren. Über präsynaptische Rezeptoren [α₂-Adrenozeptor, NPY Rezeptor 2 (Y₂)] hemmen die Neurotransmitter ihre Freisetzung selbst. Reproduziert und modifiziert mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons Ltd., nach Straub, R.H., T. Schaller, L.E. Miller, S. von Horsten, D.S. Jessop, W. Falk, and J. Scholmerich, „Neuropeptide Y cotransmission with norepinephrine in the sympathetic nerve-macrophage interplay.“ *Journal of Neurochemistry*, 2000. 75(6): S. 2464-71 [103].

IL-6 ist ein Zytokin, das als Parameter für die Anwesenheit von Makrophagen und T-Helfer Zellen vom Typ 2 dienen kann [22, 103] und für die akute als auch chronische Inflammation in der Niere Bedeutung hat [39, 95].

1.3 Neuropeptid Y und Nierenerkrankungen

Erkrankungen der Nieren scheinen zu Veränderungen im NPY System zu führen. Im Hypothalamus von Ratten mit experimentell induziertem chronischen Nierenversagen war eine signifikant höhere NPY Genexpression als in dem von Kontrolltieren gemessen worden. Daher wird angenommen, dass die bei chronischem Nierenversagen vorkommende Kachexie eventuell durch eine Urämietoxin-induzierte Veränderung der

Y Rezeptorsensitivität hervorgerufen wird [104]. Es gibt Belege für eine Beteiligung von NPY an Inflammationsprozessen, die im Rahmen von Autoimmunerkrankungen an der Niere auftreten können. So zum Beispiel, war die NPY Konzentration in den Nieren von fünf und acht Monate alten Mäusen in einem Modell des Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) im Vergleich zu gesunden Elterntieren signifikant erhöht; diese Daten weisen somit auf eine potentiell direkte Beteiligung des Peptids an der lokalen Entzündung hin. Auch in den Lymphorganen war NPY als einziges Peptid vermehrt vorhanden. Dies lässt auf eine zentrale Rolle von NPY in der Entwicklung der Autoimmunität schließen [14]. Des Weiteren zeigten Patienten mit SLE im Vergleich zu Gesunden erhöhte Serum NPY-Spiegel [45]. Andere Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoide Arthritis sowie das Sjögren Syndrom, die mit einer Nierenbeteiligung einhergehen können, sind mit Änderungen der NPY Konzentration assoziiert [54, 88]. Es sollte weiter angemerkt werden, dass Patienten mit fortgeschrittener diabetischer Nephropathie sowohl höhere NPY Plasma- als auch Urinkonzentrationen aufweisen [89]. Gleiches gilt für das chronische Nierenversagen [105], daher ist es sinnvoll, die Rolle von NPY im Zusammenhang mit Nierenerkrankungen näher zu untersuchen.

1.4 Fetale Programmierung

Hales und Barker entdeckten den Zusammenhang zwischen einem verminderten fetalen Wachstum und der Entwicklung eines *Diabetes mellitus* Typ 2 sowie eines metabolischen Syndroms im Erwachsenenalter und formulierten daraufhin die *thrifty phenotype hypothesis*. In dieser gehen sie davon aus, dass eine fetale Mangelernährung zu persistierender Veränderung im Glukosemetabolismus führt [40-41]. Die fetale Programmierung, wie Barker die pränatale Anpassung des fetalen Blutflusses, des Metabolismus und der Hormone nennt, könne weiterhin die Entstehung von Hypertension, sowie das Risiko für einen Schlaganfall fördern [7]. Der Zusammenhang zwischen einer Störung des intrauterinen Wachstums (engl. *intrauterine growth restriction*; IUGR) mit der Konsequenz eines niedrigen Geburtsgewichts und des nachfolgenden, schnellen postnatalen Aufholwachstums und der Entstehung von Folgeerkrankungen wird in der sogenannten dauerhaften fetalen Programmierung von Körperfunktionen durch fetale und perinatale Umwelteinflüsse gesehen. Barker und seine Kollegen lenkten damit die Aufmerksamkeit auf Vorgänge, die während der Entwicklung des fetalen Organsystems seine Funktion nachhaltig beeinflussen. Demnach gibt es prä- als auch postnatal kritische Phasen der Organogenese, in denen

unreife Körperstrukturen, regulatorische Mechanismen und Systeme empfindlich auf Faktoren, wie beispielsweise die Ernährung reagieren [58, 76]. Die Modifikation des intrauterinen und frühen postnatalen Stoffwechsels, Nährstoff- oder Hormonhaushalts kann laut Plagemann et al. zur Entwicklung einer Krankheitsprädisposition im Erwachsenenleben führen [80]. Dieser Vorgang wird in der Literatur als perinatale [80] oder metabolische Programmierung bezeichnet [76].

1.5 Hyperalimentation

1.5.1 Hyperalimentation im Tiermodell

Die postnatale Hyperalimentation wird neben der IUGR als einer der Stimuli der metabolischen Programmierung angesehen. Verschiedene Arbeiten, die eine Programmierung im Tiermodell untersuchen, belegen, dass die Hyperalimentation zu einem bestimmten Zeitpunkt - nämlich in der Stillperiode - entscheidend ist um im Erwachsenenalter ein metabolisches Syndrom zu entwickeln. Wie induziert man eine Hyperalimentation in der Stillperiode? Die Hyperalimentation kann erreicht werden, indem (1) den Neonaten eine fetthaltige Diät zugeführt wird [50], (2) beim Muttertier ein Gestationsdiabetes induziert wird [78] oder (3) Würfe verkleinert werden und dadurch eine subsequente Hyperphagie erreicht wird, da dem einzelnen Neonat mehr Milch zur Verfügung steht. Dieses Modell der kleinen Würfe (engl. *small litters*; SL) ruft ein metabolisches Syndrom in der Stillzeit hervor, das sich aufgrund seiner Irreversibilität ebenso in adulten Ratten beobachten lässt [81]. Das passiert auch dann wenn die Nachkommen nach dem Abstillen eine normale Diät erhalten [50, 80, 92].

1.5.2 Hyperalimentation beim Menschen

In der Versorgung von Neugeborenen ist eine Hyperalimentation häufig unerlässlich. Beispielsweise haben Reifgeborene gegenüber Älteren grundsätzlich einen höheren Energie-, Flüssigkeits- und Nährstoffbedarf, welcher insbesondere in der postnatalen Anpassungsphase an die individuellen Anforderungen des Kindes adaptiert werden muss. Dennoch soll eine metabolische Programmierung durch Fehlernährung möglichst vermieden werden. Frühgeborene wiederum besitzen gegenüber Reifgeborenen weniger Subkutanfett und weniger Glykogenreserven, weswegen das Hypoglykämierisiko bei ihnen als erhöht betrachtet werden muss. Da es lange Zeit als Ziel gesehen wurde, dass Frühgeborene in etwa ein Wachstum erreichen, das intrauterinen Perzentilen entspricht, musste bei ihnen eine ausreichende Nährstoffversorgung gewährleistet werden [36].

Aminosäuren werden von ihnen wegen der hohen Proteinsyntheserate in größerer Menge benötigt (Tabelle 2). Des Weiteren beobachtete eine Studie an 1187 Frühgeborenen, die zwischen der 23. und 27. Woche geboren wurden, trotz Versorgung mit 3,5 g Protein/kg Körpergewicht ab dem 4. Lebenstag bei 75% der beobachteten Kinder am 28. Tag eine extrauterine Wachstumsrestriktion [63]. Sowohl für Frühgeborene als auch für Kinder, die für ihr Alter zu klein sind (engl. *small for gestational age*; SGA) ist die Gabe von kalorienreicherer Frühgeborenennahrung vorteilhaft für die neurologische Entwicklung [57].

Tabelle 2: Referenzwerte für die Proteinaufnahme [36, 63]

Alter (in Monaten)	Proteinaufnahme in g/kg Körpergewicht pro Tag
Frühgeborene	Erste 24 h: 1,5 – 3,0 Tägliche Steigerung um: 0,5 – 1,0 Ziel: 3,5 – 4,0
0-<1	2,7 (enteral)
1-<2	2,0 (enteral)

Dennoch konnte für den Menschen festgestellt werden, dass gerade das Aufholwachstum von Frühgeborenen, das durch Füttern einer kalorienreicheren Formelnahrung erreicht wird, in der Jugend zu einer Beeinträchtigung des kardiovaskulären Systems sowie des Stoffwechsels führt [96]. Darüber hinaus legte eine Arbeit an SGA Kindern aus Großbritannien dar, dass die Fütterung einer kalorienreicheren Formelnahrung mit 301 kJ/100 ml, anstatt der Standard-nahrung mit 284 kJ/100 ml, zu einer Blutdrucksteigerung von 3,5mmHg führt [97]. In Kohorten aus den USA wurde gezeigt, dass eine Überfütterung und eine schnelle Gewichtszunahme in der ersten Lebenswoche durch Formeldiät häufig Adipositas im Erwachsenenalter nach sich zieht [100-101]. Diese Resultate zeigen eine Assoziation zwischen Daten aus tierexperimentellen Studien mit epidemiologisch-klinischen Daten. Sie geben Anlass zu der Frage, wie die Ernährung bei Frühgeborenen oder SGA Kindern gestaltet werden soll, um sie vor einer metabolischen Programmierung zu schützen.

1.5.3 Molekulare Mechanismen der Hyperalimentation

Wenn es um die Evaluation der Mechanismen der fetalen Programmierung durch Hyperalimentation geht, ist es naheliegend NPY wegen seines Effekts auf den Appetit zu untersuchen. Plagemann et al. konnten zeigen, dass Ratten aus *small litter* (SL) Würfen trotz Hyperinsulinämie, Hyperleptinämie und Übergewicht, eine höhere Zahl an NPY enthaltenden Neuronen im *Nucleus arcuatus* aufwiesen [81]. Laut dem Regulationskreislauf zwischen NPY und Leptin hätten die hohen Leptinspiegel bei den Tieren eine Herunterregulation der NPY exprimierenden Neurone bewirken müssen (vgl. 1.2, Abb. 1). Daher wird davon ausgegangen, dass im Rahmen der frühen postnatalen Hyperalimentation eine Fehlprogrammierung des NPY Systems im ZNS stattfindet, welche lebenslang persistiert, da Neurone aus dem ARC adulter Tiere fast nicht auf Leptin reagierten [81]. Ein weiterer häufig diskutierter Mechanismus der metabolischen Programmierung ist die epigenetische „Stilllegung“, im Englischen auch „*silencing*“ genannt, der Desoxyribonukleinsäure (DNA) durch deren Methylierung [75]. So war es möglich, in Hypothalami hyperalimentierter SL Ratten eine signifikante Hypermethylierung von CpG Dinukleotiden im anorexigenen Proopiomelanocortin (POMC) Promotor zu finden. Es waren vor allem Promotorsequenzen betroffen, an denen aktivierende Transkriptionsfaktoren wie *Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells* (NF-kappaB) binden, die durch Leptin oder Insulin getriggert die Expression von POMC hochregulieren. Trotz Hyperinsulin- und Hyperleptinämie in SL Tieren fehlte jedoch eine Hochregulation von POMC, was eine neonatal erworbene Leptinresistenz implizierte [82]. Für eine Signal-übertragung in die Zelle bindet Leptin an seinen aktiven Rezeptor [engl. *obesity receptor* (OB-R) b]. Dieser OB-Rb ist die längste der fünf Isoformen, die durch alternatives *Splicen* entstehen und er ermöglicht durch intrazelluläre Anteile eine transmembrane Signalübertragung. Nach der Leptinbindung findet eine Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors durch die Januskinase (JAK) 2 statt und es wird der Transkriptionsfaktor *Signal transducer and activator of transcription* (STAT) 3 gebunden, welcher phosphoryliert wird und dann dimerisiert, um in den Nukleus zu translozieren und dort die Genexpression seiner Zielgene wie *Suppressor of cytokine signaling* (SOCS) 3 und POMC zu fördern (Abb. 3). SOCS-3 stellt einen negativen *Feedback-loop* der Leptinsignalkaskade dar und wirkt somit als ein Inhibitor der Phosphorylierung von JAK-2 sowie des STAT-3-Signalweges [35]. Interessanterweise konnte eine kürzlich veröffentlichte Studie an SL Ratten zeigen, dass adulte Tiere sowohl eine geringere Expression von JAK-2 als auch des phosphorylierten STAT-3 (*phospho-STAT-3*)

manifestierten. Dieselben Tiere hatten eine höhere SOCS-3 Expression im Hypothalamus, was eine zentrale Leptinresistenz bewirkt [87]. SOCS-3 kann folglich als eine mögliche Ursache für eine Leptinresistenz in Betracht gezogen werden, die intrazellulär lokalisiert ist.

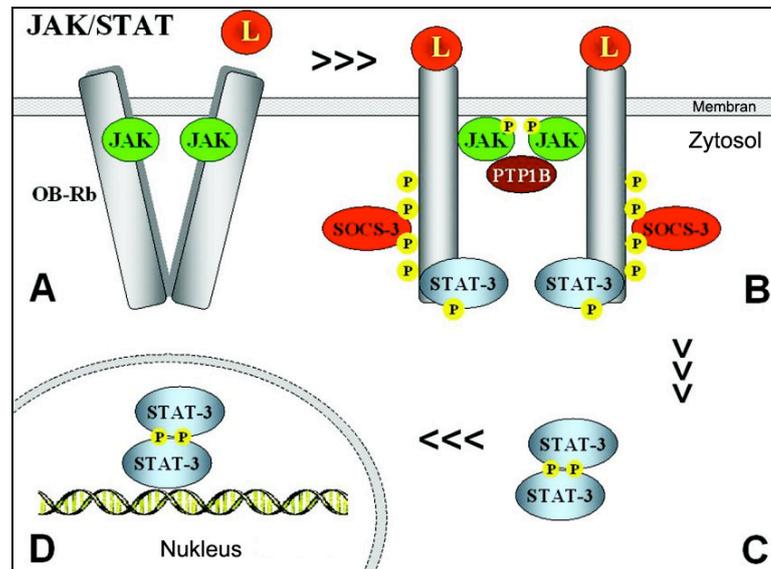


Abb. 3: Aktivierung der JAK/STAT Signalkaskade durch Leptinbindung am *Obesity receptor* (OB-R) b. A: Die Bindung des Leptins (L) führt zu einer Konformations-änderung der Januskinasen (JAK). B: Dadurch werden diese aktiviert und phosphorylieren Tyrosinreste am Rezeptor, was eine *Signal transducer and activator of transcription* (STAT) 3 Bindung hervorruft. STAT-3 wird durch die rezeptorgebundene JAK phosphoryliert. C: Durch die STAT Phosphorylierung dissoziieren diese vom Rezeptor und bilden aktive Dimere. D: Die Dimere translozieren in den Zellkern und regulieren dort die Genexpression indem sie an Promotorregionen ihrer Zielgene binden. Leptin induziert die *Suppressor of cytokine signalling* (SOCS) 3 Bildung und damit die Hemmung seiner eigenen Signalkaskade. Protein Tyrosin Phosphatase (PTP) 1B ist ebenso ein negativer Regulator des Leptinsignalling, da es JAK-2 dephosphorylieren kann. Reproduziert und modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Portland Press Ltd., Frühbeck, G., „Intracellular signalling pathways activated by leptin“, *Biochemical Journal*, 2006. 393(Pt 1): S. 7-20, © the Biochemical Society [35].

Einerseits sind Leptin und NPY beide an der Appetitregulation beteiligt, andererseits sind sie zugleich Regulatoren der T-Zell Funktion [31, 117] und nicht nur NPY besitzt daneben eine Reihe anderer Aufgaben im Immunsystem (vgl. 1.2). So stimuliert Leptin die proinflammatorischen T-Helfer-Zellen vom Typ 1 und fördert die Produktion von Zytokinen wie IFN- γ [106].

Eine Modulation der dargestellten molekularbiologischen Signalwege sowie immunologischer Funktionen findet durch Hyperalimentation als Folge einer

Wurfreduktion statt. Weil das NPY System Stoffwechsel, Nerven- und Immunsystem miteinander verknüpft, könnte also eine Alteration im Stoffwechsel eine Dysregulation in einer der beiden anderen Systeme bewirken.

1.5.4 Einfluss der postnatalen Hyperalimentation auf die Niere

Hyperalimentierte männliche Ratten aus SL Würfen hatten eine um 20% höhere Anzahl an Glomeruli, jedoch einen um durchschnittlich 18mmHg höheren systolischen Blutdruck mit 12 Monaten sowie eine 2,6fach höhere Proteinurie und Glomerulosklerose mit 18 Monaten. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass bei Ratten die Anzahl der Glomeruli nach der Geburt durch Hyperalimentation beeinflusst werden kann [12]. Ebenso wichtig ist die Tatsache, dass IUGR in einer Studie zur Untersuchung der Nierenfunktion in adulten männlichen Ratten vor allem dann zu einer Reduktion der Glomerulären Filtrationsrate (GFR) führte, wenn die Tiere zusätzlich postnatal überfüttert wurden, was für eine „*second hit*“ Funktion durch die Hyperalimentation spricht [13]. Hyperalimentation führt also langfristig zu metabolischen Störungen und Adipositas als einem Zustand niedriggradiger chronischer Inflammation, welcher wiederum den Grundstein legt für die *Obesity related glomerulopathy* (ORG), einem eigenen Krankheitsbild welches histologisch zu fokal segmentaler Glomerulosklerose und terminaler Niereninsuffizienz führt. Die ORG wird unter anderem durch Leptin mit seinen profibrotischen und proinflammatorischen Effekten gefördert [106]. Wenn man, ähnlich wie bei einer Hyperalimentation, durch Leptininfusion eine Hyperleptinämie bei Ratten simuliert, führt dies nach dreiwöchiger Infusion zu gesteigerter *Transforming growth factor beta* (TGF- β) 1 und Kollagen IV Synthese in glomerulären Endothelzellen [119]. Als Ursache für diese profibrotischen Effekte kommt eine Stimulation des renalen Sympathikus durch Leptin in Frage [121].

1.6 Auswahl eines geeigneten Versuchstieres

Rattennieren sind zum Zeitpunkt der Geburt unreif [59, 98]. Anders als beim Menschen beginnt die Nephrogenese bei ihnen *circa* am elften Tag und ist etwa am siebten bis zehnten postnatalen Tag abgeschlossen ([12, 62], s. Abb. 4).

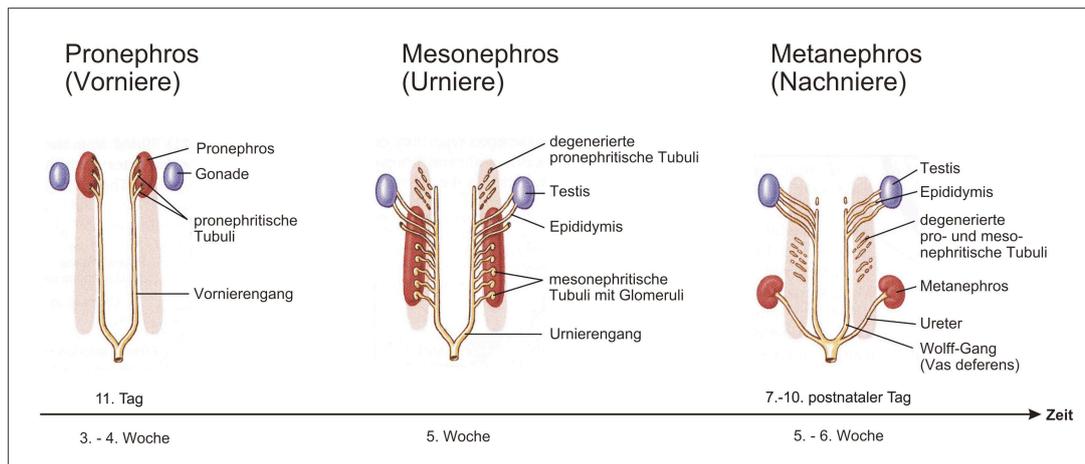


Abb. 4: Die Nephrogenese bei Säugetieren verläuft in drei Stadien: Vorniere (Pronephros), Urnieren (Mesonephros) und Nachniere (Metanephros). Oberhalb der Zeitachse sind die Daten für die Nephrogenese der Ratte [12, 62], unterhalb die Daten für die Nephrogenese beim Menschen aufgetragen [111]. Reproduziert und modifiziert mit freundlicher Genehmigung von McGraw-Hill. Nach Hickman, J., C.P., L.S. Roberts, A. Larson, H. L'Anson, and D.J. Eisenhour: „Integrated Principles of Zoology“, 13. Ausgabe, 2006, New York: McGraw-Hill Companies Inc. S. 655 [48].

Allerdings wird angenommen, dass die Differenzierung der Nephrone erst in der Zeit des Abstillens beendet ist [70]. Damit sind Ratten besonders gut geeignet, um eine frühe Programmierung der Niere durch ein verändertes postnatales Management zu untersuchen. Obwohl es große speziesspezifische Unterschiede gibt, können mit diesem Modell wichtige Rückschlüsse auf die Gestaltung der Ernährung von Frühgeborenen gezogen werden.

1.7 Fragestellung der Arbeit

Eine frühe Hyperalimentation hat Einfluss auf die Organentwicklung und Krankheitsentstehung im späteren Leben. Mit dem Modell der postnatalen Hyperalimentation durch Reduktion der Wurfgröße, soll der Einfluss einer frühen transienten postnatalen Hyperalimentation auf die Nieren und die Rolle des intrinsischen renal-assoziierten NPY Systems untersucht werden. Dieses Tiermodell erlaubt somit Rückschlüsse auf die Bedeutung der proteinreichen, nahezu Überfütterung von Früh- oder SGA-Geborenen. Die drei zentralen Fragen dieser Studie lassen sich wie folgend zusammenfassen:

1. Wie wird die Nierenfunktion durch die Wurfreduktion beeinflusst?
2. Geht dies mit Zeichen einer Inflammation oder profibrotischen Neigung des Nierengewebes einher?
3. Haben eine Wurfreduktion und die folgende Induktion einer Hyperalimentation Veränderungen in der NPY-Leptin-Achse der Niere zur Folge? Welche Signalwege werden verändert?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Kleinmaterial

Material	Hersteller
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München, Deutschland
Becherglas 150 ml	Schott, Mainz, Deutschland
Becherglas 50 ml	Schott, Mainz, Deutschland
Cryo Tubes Freistehend mit Innengewinde 2 ml	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
High-Clarity Polypropylene Conical Tube 15 ml	BD, Heidelberg, Deutschland
Meßzylinder 250 ml	Schott, Mainz, Deutschland
OP Besteck	Eickemeyer, Tuttlingen, Deutschland
Orthex HS 440 Filmkassette 18x24	Siemens, München, Deutschland
96 Well Mikrottestplatte	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96' Well PCR Plate (Standard)	PeQLab, Erlangen, Deutschland
Whatman GB005 Gel Blotting Paper	Whatman, Dassel, Deutschland
Whatman Protran BA 85 Nitrocellulose	Whatman, Dassel, Deutschland

2.1.2 Geräte

Gerät	Hersteller
7500 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Analysewaage LC421	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Badthermostat Julabo U37A	Julabo, Seelbach, Deutschland
Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Bio Vortex V1	PeQLab, Erlangen, Deutschland
Elektrophoresekammer 45-1010-i	PeQLab, Erlangen, Deutschland
Integra 800	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
iQ 5 Multicolor Real-Time PCR Detection System	BioRad, München, Deutschland
Metabolischer Käfig für Ratten	Tecniplast, Hohenpeissenberg, Deutschland

Gerät	Hersteller
Mikrotom SM2000R Nr. 1072/03.1997	Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland
Micro Amp Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Mikroskop Leitz Aristoplan Seriennr.: 091271	Leica, Wetzlar, Deutschland
Original Multiskan Ex	Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Deutschland
Schwingmühle MM 300	Retsch, Haan, Deutschland
Sonotrode UW 2070	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Tischzentrifuge Micro Centrifuge	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trans-Blot SD semi-dry Transfer Cell	BioRad, München, Deutschland
TRIO-Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
UV-Leuchttisch ECX-20.M	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Vakuumpumpe MP86	Biometra, Göttingen, Deutschland
Varioklav Dampfsterilisator 400 EP-Z	H+P Labortechnik, Oberschleisheim, Deutschland
Vortex	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Vortex MS1 Minishaker	IKA-Works, Staufen, Deutschland
Zentrifuge EBA 12	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Rotanta 96R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Universal 16R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

2.1.3 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Acrylamid 30 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, München, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Antibody Diluent with Background Reducing Components	Dako, Hamburg, Deutschland

Reagenz	Hersteller
Aprotinin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Bovine Serum Albumine	PAA, Cölbe, Deutschland
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
Diaminobenzidine Substrate Kit for Peroxidase SK-4100	Vector Laboratories, Peterborough, UK
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
dNTP Mix 10 mM each	Finnzymes, Espoo, Finnland
dNTP Mix with dUTP 5 mM	Eurogentec, Köln, Deutschland
DouSet ELISA Development System Mouse Leptin DY498	R&D Systems, Abingdon, UK
Ethanol 99,5 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol vergällt 96 % mit ca. 1 % Methylethylketon (MEK)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol vergällt 99,8 % mit ca. 1 % MEK	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Eukitt quick-hardening mounting medium	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hot GoldStar 5 U/μl	Eurogentec, Köln, Deutschland
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Isobutanol 99 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol 99,8 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ketamin-ratiopharm 50 mg O.K. Injektionslösung	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Leupeptin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid 2,5 mM (MgCl)	Eurogentec, Köln, Deutschland
Mayers Hämalaulösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Reagenz	Hersteller
Methanol 99,5 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Midazolam-ratiopharm 50 mg/50 ml Injektionslösung	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Milli Q Wasser	Elga Labwater, Celle, Deutschland
M-MLV 200 U/ μ l	Promega, Mannheim, Deutschland
M-MLV RT 5x Buffer	Promega, Mannheim, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdesoxycholat (DOC)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecylsulfate, SDS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Nonidet P 40	Sigma,-Aldrich, München, Deutschland
Paraformaldehyd (4 %) (PAF)	Honeywell Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland
Passive reference RT-PARE 03 (1:50)	Eurogentec, Köln, Deutschland
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
PeQGold Marker IV (11-170kDa)	PeQLab, Erlangen, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Pierce Western Blot Signal Enhancer	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Protein Block Serum-Free Ready-To- Use	Dako, Hamburg, Deutschland
REAL Peroxidase-Blocking Solution	Dako, Hamburg, Deutschland
Real-time PCR Buffer 10x (No MgCl ₂) –No Rox	Eurogentec, Köln, Deutschland
Roentogen liquid	Tetenal, Norderstedt, Deutschland
Roentogen Superfix	Tetenal, Norderstedt, Deutschland

Reagenz	Hersteller
RQ1 Dnase 10x Reaction Buffer	Promega, Mannheim, Deutschland
RQ1 Dnase Stop Solution (EDTA)	Promega, Mannheim, Deutschland
RQ1 Rnase-Free DNase 1 U/ μ l	Promega, Mannheim, Deutschland
rRNasin RNase Inhibitor 40 U/ μ l	Promega, Mannheim, Deutschland
Salzsäure rauchend 37 % (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Target Retrieval Solution, Citrat pH 6	Dako, Hamburg, Deutschland
Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tri-Natriumcitrat Dihydrat (C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃ *2 H ₂ O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIzol	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Uracil N-Glycosylase 1 U/ μ l	Eurogentec, Köln, Deutschland
Vectastain Elite ABC Kit PK-6100 Standard	Vector Laboratories, Peterborough, UK
Wasserstoffperoxid 30 % (H ₂ O ₂)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol 98 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.4 Lösungen

Bezeichnung der Lösung	Zusammensetzung
Lämmler Puffer 10x	Tris 29 g Glycin 144 g SDS 10 g Aqua dest. 1 Liter
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) 1x (0,05 M)	Na ₂ HPO ₄ 1,48 g KH ₂ PO ₄ 0,43 g NaCl 7,2 g Aqua dest. 1 Liter. pH 7,2 mit HCl titrieren.

Bezeichnung der Lösung	Zusammensetzung
Probenpuffer für Western Blot 5x	Tris-HCl 7,57 g (pH 6,8) SDS 10 g β-Mercaptoethanol 25 ml Bromphenolblau 0,005 g Glycerin 50 ml Auf 100ml auffüllen.
Modifizierter Radioimmunopräzipitations Assay Puffer (engl. <i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i> ; RIPA)	Tris-HCl 790 mg Aqua dest. 75 ml NaCl 900 mg Nonidet P 40 (10 %) 10 ml DOC (10 %) 2,5ml EDTA (500 mM in H ₂ O) 400µl Auf 100 ml auffüllen. pH 7,4 mit HCl titrieren.
Sammelgelpuffer	Tris 6 g Aqua dest. 100 ml pH 6,8 mit HCl titrieren.
Stripping Puffer	Tris-HCl 3,79 g (pH 6,7) SDS 10 g Aqua dest. 500 ml β-Mercaptoethanol 70 µl/10 ml direkt vor Gebrauch zugeben.
Substratlösung für Leptin-ELISA	TMB 1 Tablette DMSO 1 ml Natriumcitratpuffer 9 ml H ₂ O ₂ 30 % 2 µl
TN Puffer 10x	NaCl 58,44 g Tris 12.11 g Aqua dest. 1 Liter pH 7,5 mit HCl titrieren.

Bezeichnung der Lösung	Zusammensetzung
Towbin Puffer 10x	Tris 30,3 g Glycin 144 g Aqua dest. 1 Liter
Trenngelpuffer	Tris 54,45 g Aqua dest. 300 ml pH 8,8 mit HCl titrieren.
TTN Puffer 1x (0,05% Tween)	TN Puffer 10x 100 ml Aqua dest. 900 ml Tween 20 500 µl

2.1.5 Primer für Reverse Transkription und TaqMan PCR

Eine Übersicht über verwendete Primer befindet sich im Anhang (S. 82).

2.1.6 Antikörper

Eine Zusammenfassung der eingesetzten Antikörper ist ebenfalls im Anhang (S. 82) zu finden.

2.1.7 Tiermaterial und Tierhaltung

Es wurden Ratten des Stammes Wistar verwendet. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen in einem inversen Lichtrhythmus (12:12h; Dunkelperiode von 6 bis 18h) und bei einer klimatisierten Raumtemperatur von 22-26° C gehalten. Freier Zugang zu Trinkwasser und Standardpelletdiät (Haltungsdiet, Altromin, 2,84 kcal/g) war gewährleistet. Alle Tierversuche wurden durch die zuständige Landesbehörde (Regierung Mittelfranken; Aktenzeichen: 621.2531.31-14/05) genehmigt.

2.2 Methoden

2.2.1 Experimentalansatz

Um eine frühe postnatale Überernährung zu induzieren, wurde die primäre Wurfgröße am postnatalen Lebenstag (P) 1 bei je 4 Muttertieren auf 10 Tiere (Wurfreduktion auf 10; WR 10; n=10) und bei weiteren 3 Muttertieren auf 6 Tiere reduziert (Wurfreduktion auf 6; WR 6; n=8). Am Lebenstag P21 wurden die Nachkommen abgestillt. Als

Kontrollgruppe dienten männliche Tiere aus Würfen von je drei Muttertieren mit nicht reduzierter Wurfgröße (n=5; keine Wurfreduktion; KWR).

2.2.2 Bestimmung von Körperlänge und Körpergewicht

Die Messung der Körperlänge erfolgte durch die Ermittlung des Nasoanalabstandes, das Wiegen der Tiere wurde mit einer elektrischen Präzisionswaage (Sartorius) durchgeführt, wobei beide Parameter bei Geburt, in der postnatalen Woche 1, 2, 3 und 10 gemessen wurden.

2.2.3 Ermittlung von Clearance und Proteinurie

Um die genannten Parameter zu ermitteln, wurden die Tiere 24h vor der Tötung einzeln in einem metabolischen Käfig gehalten. So konnten Einfuhr und Ausfuhr exakt ermittelt werden und eine stuhlfreie Sammlung des Urins war möglich. Die Urinproben wurden mit dem Gerät Integra 800 ausgewertet.

2.2.4 Narkose, Tötung und Organentnahme

Am postnatalen Lebenstag P70 erfolgte die Organentnahme aller drei Gruppen. Die Narkose der Tiere erfolgte mit Ketamin (100mg/kg) und Midazolam (5mg/kg), um eine streßfreie Tötung zu ermöglichen. Zunächst wurde das Abdomen eröffnet und die *Aorta abdominalis* sowie *Vena cava inferior* präpariert. Die *Aorta* wurde punktiert um 2ml Blut zu gewinnen. Im Anschluss wurde die Perfusion mit eiskalter Hydroxyethylstärke Lösung (%) durchgeführt und die *Vena cava inferior* durchtrennt, bevor weiter mit eiskaltem Natriumchlorid (NaCl 0,9 %) gespült wurde bis es zum Herzstillstand kam. Die Nieren wurde nach Entnahme in einem 2 ml-Cryo Röhrchen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt und anschließend bei -80° C gelagert. Eine andere Portion des Nierengewebes wurde in 4% Paraformaldehyd in Phosphatgepufferter Kochsalzlösung (s. 2.1.4, S. 28) fixiert.

2.2.5 Bestimmung des Serumleptins

Die Messung des Serumleptinspiegels wurde als *Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Sandwich-ELISA)* durchgeführt. Der *Capture* Leptin-Antikörper wurde in PBS verdünnt (2 µg/ml), bevor je 100 µl in eine 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert wurden. Die Platte wurde anschließend über Nacht inkubiert. Danach wurde der *Capture* Antikörper aspiriert und jedes Well mit 0,05% Tween 20 in PBS dreimal gewaschen. Es folgte die Blockierung mit jeweils 300 µl *Blocking* Puffer (5% Tween 20 in PBS mit 0,05% NaN₃) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nachdem ein erneuter Waschschrift erfolgte, wurden 100 µl Serum jeder Probe sowie 100 µl der Standards in die *Wells* gegeben. Als Standard diente rekombinantes Maus Leptin, welches in folgender Reihe mit 5% Tween 20 in PBS verdünnt wurde: 8000 pg/ml; 4000 pg/ml; 2000 pg/ml; 1000 pg/ml; 500 pg/ml; 250 pg/ml; 125 pg/ml. Nach einer zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur und wiederholtem Waschen mit PBS wurden je 100 µl des *Detection* Leptin-Antikörpers (200 ng/ml in 5% Tween 20 in PBS) in die *Wells* pipettiert, welcher ebenfalls für zwei Stunden mit der Platte inkubierte. Daraufhin wurde die Platte gewaschen und 100 µl *Streptavidin-Horseradish-Peroxidase (HRP)* Konjugat hinzugefügt, welches für zwanzig Minuten bei Raumtemperatur inkubierte, bevor die Platte wieder gewaschen wurde. Je Well wurden dann 100 µl Substratlösung hinzu pipettiert (s. 2.1.4, S. 29). Diese Reaktion wurde nach zwanzig Minuten mittels 50 µl einer Stopplösung (2N H₂SO₄) beendet. Daraufhin wurde die optische Dichte bei 450 nm in einem Original Multiskan Ex gemessen und die Serumleptinkonzentration in pg/ml anhand der erhaltenen Standardkurve errechnet. Hierfür wurde Ascent Software (s. Anhang, S. 83) benutzt.

2.2.6 Isolation von Ribonukleinsäure aus Nierengewebe

Zur Gewinnung von Ribonukleinsäure (RNA) wurde eine Isolation mit Trizol durchgeführt [17]. Hierzu wurden 100 mg des bei -80° C gelagerten Gewebes abgewogen und mit 1 ml Trizol versetzt. Danach erfolgte eine Homogenisierung bei 30 Hz für 2 Minuten in einer Gewebemühle und eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten. Es folgte die Chloroformzugabe von 200 µl auf 1 ml Trizol. Die Proben wurden gemischt und erneut 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie bei 4° C und 12000 Umdrehungen pro Minute für 15 Minuten zentrifugiert wurden. Die durch die Zentrifugation entstandene obere Phase konnte nun von der unteren, RNA enthaltenden Phase, abgetrennt und verworfen werden. Es wurden 500 µl Isopropanol

auf 1 ml Trizol zugegeben. Wieder wurden die Proben gemischt, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 15000 Umdrehungen pro Minute und 4° C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand aus Isopropanol wurde verworfen und eventuelle Reste mit einer Vakuumpumpe abgesaugt. Das verbliebene *Pellet* wurde mit 1 ml Ethanol (75%) gewaschen und erneut für fünf Minuten bei 15000 Umdrehungen pro Minute und 4° C zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes und einer kurzen Trockenphase konnten die Ethanolreste abgesaugt werden. Anschließend wurde das *Pellet* in 50 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC) Wasser gelöst und bei -80° C gelagert.

2.2.7 Synthese von *copy* Desoxyribonukleinsäure

Die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-*Polymerase chain reaction*; RT-PCR) ermöglicht die Umschreibung von RNA in *copy* Desoxyribonukleinsäure (cDNA). Das Enzym Reverse Transkriptase aus dem *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MLV) ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Es nutzt Desoxyribonukleotide (dNTPs) als Bausteine um an einen *Template* Strang aus RNA einen komplementären Strang aus DNA zu synthetisieren.

2.2.7.1 Desoxyribonukleinsäure-ase Reaktion

Die Desoxyribonukleinsäure-ase Reaktion (DNase) Reaktion soll sicherstellen, dass die eventuell noch mit DNA kontaminierten RNA Proben am Ende nur die erwünschte cDNA enthalten. Nach der photometrischen Bestimmung des RNA Gehaltes mittels Spektralphotometer, wurde je 1 µg RNA in Diethylpyrocarbonat (DEPC) Wasser verdünnt, so dass sich ein Volumen von 8 µl ergab. Der DNase Mix wurde wie folgend hinzupipettiert:

Tabelle 3: Reaktionsansatz für die DNase Reaktion

RNase-Freie DNase 1 U/µl	1 µl
DNase Reaktionspuffer 10x	1 µl

Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden je 1 µl Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) hinzugefügt um die Reaktion abzustoppen. Dies wurde durch das Erhitzen auf 65° C für 15 Minuten im Thermoblock induziert.

2.2.7.2 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Für die eigentliche Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurde eine *Random-Priming*-Technik gewählt. Zu obigem Reaktionsansatz wurden unter anderem M-MLV, dNTPs und Hexanukleotidmischungen (*Random Primer*) gegeben, deren Nukleotidkonstellation zufällig erstellt wurde und alle theoretisch denkbaren Sequenzabfolgen enthielt. Diese *Primer* können an den zu kopierenden RNA Strang hybridisieren und an mehreren Positionen gleichzeitig den Initiationspunkt für die RT bilden. Die Oligonukleotid *Primer* (Oligo-dT *Primer*) fungieren am Poly-A⁺-Schwanz der RNA als Startpunkte, da sie aus mehreren Thyminbasen bestehen. Der Vorteil des Verfahrens besteht in der Umschreibung der gesamten RNA in DNA.

Die *Primer* wurden nach der DNase Reaktion wie folgend hinzugefügt:

Tabelle 4: *Primer*-Reaktionsansatz für die RT-Reaktion

<i>Randomprimer</i> (1:4 verdünnt)	0,6 µl
Oligo-dT <i>Primer</i> (100 µM)	0,4 µl
DEPC	4 µl

Dieser Schritt fand bei 70° C für 5 Minuten statt, damit die Sekundärstruktur des Templates gelöst werden konnte. Danach folgte eine sofortige Kühlung der Proben auf 4° C, um zu unterbinden, dass sich die Sekundärstruktur zurückbildet. Weiterhin wurden folgenden Komponenten hinzu pipettiert:

Tabelle 5: Enzym-Ansatz für die RT-Reaktion

M-MLV 200 U/µl	1 µl
M-MLV RT Puffer 5x	5 µl
dNTP Mix 10 mM each	1,25 µl
DEPC	2,25 µl
Ribonuclease-Inhibitor 40 U/µl	0,5 µl

Das Gesamtvolumen betrug 26 µl. Da das Temperaturoptimum für die M-MLV bei 37° C liegt, wurden die Ansätze schließlich für eine Stunde auf 37° C erhitzt und danach 1 Minute auf Eis gekühlt, um die Enzymarbeit zu beenden. Danach wurde die cDNA bei -20° C aufbewahrt.

2.2.8 TaqMan Real-time Polymerase-Kettenreaktion

2.2.8.1 Prinzipien der Polymerase-Kettenreaktion

Die cDNA kann nun verwendet werden, um eine spezifische DNA Sequenz in der Polymerase-Kettenreaktion (engl. *Polymerase chain reaction*; PCR) zu amplifizieren. Grundsätzlich läuft die PCR in drei Schritten ab: (1) Denaturierung, (2) Primerhybridisierung (engl. *Annealing*) und (3) Extension. Die Denaturierung der DNA findet bei 94° C statt, wobei die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA gelöst werden und sie als *single strand* DNA vorliegt. Beim *Annealing* können die spezifischen *Primer* bei 60° C mit der DNA hybridisieren und die DNA-abhängige Polymerase kann in der Extensionsphase den komplementären Strang synthetisieren, indem sie die *Primer* verlängert (Abb. 5).

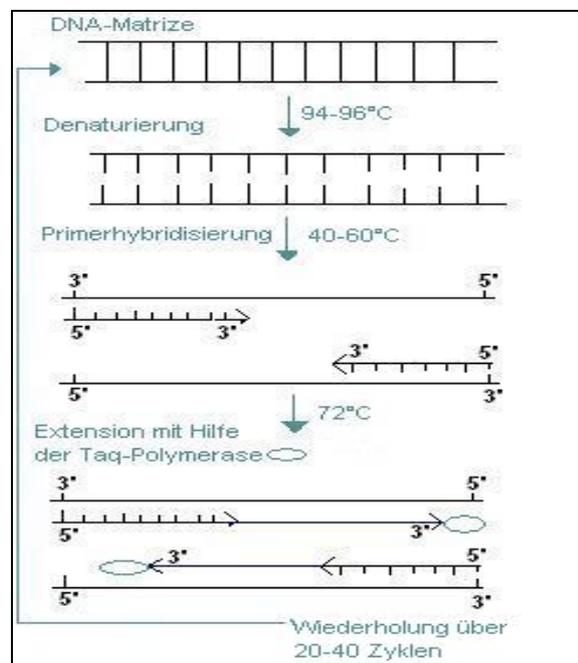


Abb. 5: Schritte der Polymerase Ketten Reaktion. Reproduziert und modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Nach Wink, M., A. Mohr, H. Weiher, I. Herr, and R. Zwacka: „Molekulare Biotechnologie: Konzepte, Methoden und Anwendungen“, 2. Auflage, Hrsg: M. Wink, 2011, Weinheim: Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. S. 150 [118].

Als DNA-abhängige Polymerase wird ein hitzestabiles Enzym aus *Thermophilus aquaticus* (Taq) verwendet. Dies ist nötig, um die DNA bei 94° C denaturieren zu können ohne eine Zerstörung des Enzyms zu bewirken. Der Vorteil der quantitativen *Real-time* PCR wie der TaqMan PCR liegt in der gleichzeitigen Quantifizierung der amplifizierten DNA in der exponentiellen Phase der Reaktion mittels der Aufzeichnung eines Fluoreszenzsignals. Dies geschieht in der TaqMan PCR mit der von Lee et al.

entwickelten Methode [55]. Dafür werden ein *Forward Primer* und ein *Reverse Primer* benötigt, die am jeweiligen Ende des *Template* Stranges hybridisieren sowie die TaqMan Sonde. Die TaqMan Sonde ist ein Oligonukleotid, welches spezifisch an einer zu amplifizierenden Zielsequenz zwischen den beiden *Primern* bindet und ein „Reporter-“ (5') als auch ein „Quencher-“ (3') Fluorochrom an den Enden trägt. Solange die räumliche Nähe der beiden Fluorochrome in der Sonde gegeben ist, führt das Fluoreszenzlicht des *Quenchers* zur Suppression des Lichts, welches vom *Reporter* ausgeht. Dies basiert auf dem Fluoreszenz- (oder Förster) Resonanz-Energie-Transfer (FRET) [33]. Verlängert jedoch die Taq Polymerase den komplementären Strang, führt ihre 5'-3' Exonuclease Aktivität zur Trennung des *Reporters* von der Sonde und es kommt zur Emission seines Lichts (Abb. 6).

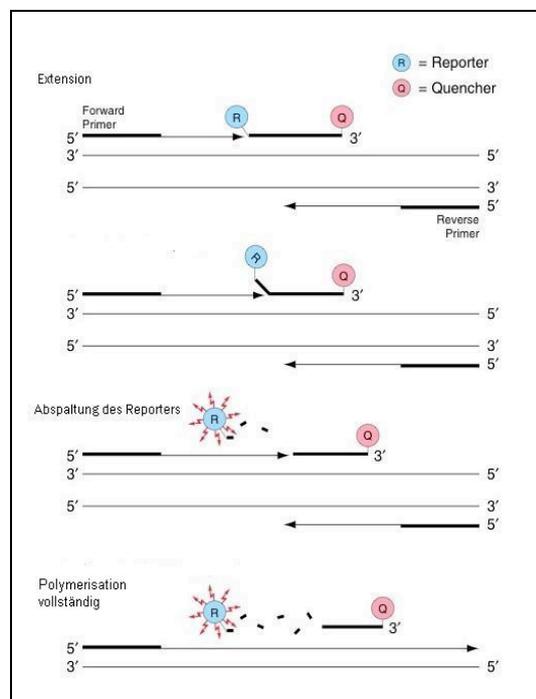


Abb. 6: Schema zum Ablauf der TaqMan PCR. Reproduziert und modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Life Technologies nach Applied Biosystems: „TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol 2010“, Foster City. Copyright © 2012 Life Technologies Corporation. S. 9 [2].

Die Intensität des detektierten Fluoreszenzsignals des *Reporters* wird somit, je nach Konzentration der cDNA mit der spezifischen Zielsequenz, entsprechend ansteigen. Deshalb kann auf den Gehalt an cDNA im Ansatz und daher auch auf eine Hoch- oder Herunterregulation der Transkription von Genen geschlossen werden.

2.2.8.2 Durchführung der TaqMan PCR

Es wurde ein Mastermix von Eurogentec verwendet dessen Reagenzien nach Herstellerangaben verdünnt und wie nachfolgend zu einem Gesamtvolumen von 25 μl pipettiert wurden:

Tabelle 6: Reaktionsansatz für die TaqMan PCR

Material	Volumen
Real-time PCR Puffer 10x	2,50 μl
ROX 1:50	1,75 μl
dNTP Mix 5 mM	1 μl
MgCl ₂ 2,5 mM	1,25 μl
HPLC	8,12 μl
Hot GoldStar 5 U/ μl	0,13 μl
Uracil N-Glycosylase (UNG) 1 U/ μl	0,25 μl
Forward Primer	2,50 μl
Reverse Primer	2,50 μl
Taq Primer (2 μM)	2,50 μl
Template	2,50 μl

Je nach verwendeter Taq Sonde wurde die Magnesiumchlorid Konzentration angepasst. Die Amplifikation lief in einer zuvor zentrifugierten 96 *Well* Platte ab. Zum Ausschluss von Kontaminationen wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, welche anstatt cDNA *High performance liquid chromatography* (HPLC) Wasser enthielt. Für alle PCRs wurde das 7500 Real-Time PCR System von Applied Biosystems verwendet. Übersichtstabellen zum Temperatur- und Zeitschema sowie zu den Primersequenzen befinden sich im Anhang (S. 82 und S. 84).

2.2.8.3 Relative Quantifizierung mit der Delta-Delta-Ct-Methode

Für die relative Quantifizierung wurde die Delta-Delta-Ct-Methode ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode) verwendet. Der Ct Wert einer Probe ist der PCR Zyklus, in dem deren Fluoreszenz signifikant über der Hintergrundfluoreszenz liegt, das heißt einen bestimmten Schwellenwert (engl. *Threshold*) überschreitet (Abb. 7).

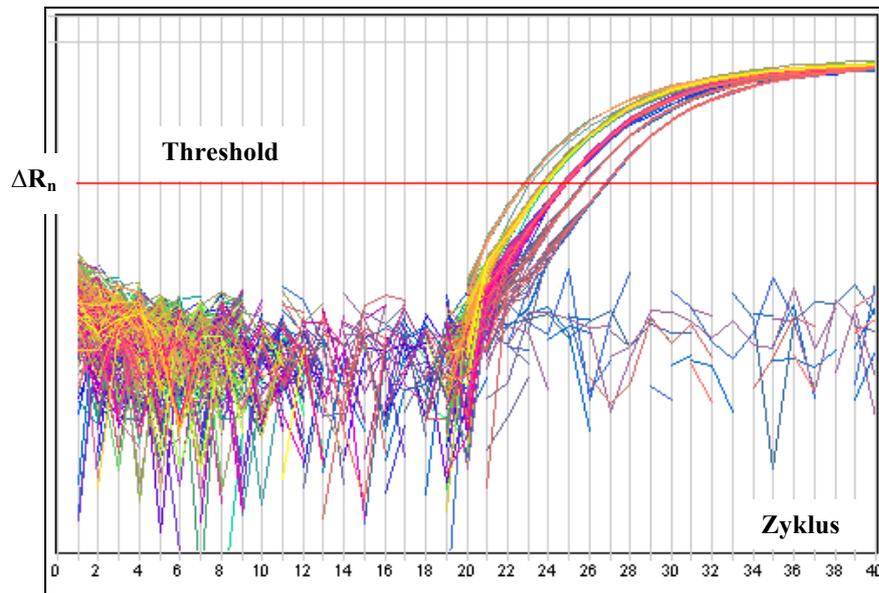


Abb. 7: Verlaufskurve einer TaqMan PCR mit korrekt positioniertem Threshold. Reproduziert und modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Life Technologies nach Applied Biosystems: „Relative Quantitation using comparative C_T Getting Started Guide 2010“, Foster City. Copyright © 2012 Life Technologies Corporation. S. 72 [1].

Dieser *Threshold* wird in die exponentielle Phase der gemessenen Fluoreszenzkurve gelegt, da die Amplifikation zu diesem Zeitpunkt am effektivsten ist. Die C_t Werte der einzelnen Proben der Versuchsgruppe (VG) werden über eine endogene Kontrolle, ein *Housekeeping Gen*, normalisiert:

$$\Delta C_{tVG} = C_{tZielgen} - C_{tHousekeeping\ Gen}$$

Gleiches gilt für die C_t Mittelwerte (\bar{X}) der Kontrollgruppe (KG) für die entsprechenden Gene:

$$\Delta C_{tKG} = \bar{X}(C_{tZielgen}) - \bar{X}(C_{tHousekeeping\ Gen})$$

Nun wird aus beiden Differenzen der $\Delta\Delta C_t$ Wert gebildet, indem die ΔC_t Werte beider Gruppen von einander abgezogen werden:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{tVG} - \Delta C_{tKG}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Danach wird durch den Expressionsmittelwert der Kontrollgruppe dividiert und es ergibt sich die n-fache Expression des Zielgens in der Versuchsgruppe in Relation zur Kontrollgruppe.

2.2.9 Western Blot

2.2.9.1 Prinzipien des Western Blots

Beim Western Blot findet ein Proteintransfer aus einem Polyacrylamidgel auf ein Nitrocellulosepapier statt [112], wobei das Gesamtprotein der Zelle durch Elektrophorese aufgetrennt wird [52]. Die Proteine werden durch eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrer Molekularmasse getrennt. Durch die Verwendung von SDS wird die Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine gelöst. Zudem überlagert das negativ geladene SDS die Eigenladung der Proteine. Für die diskontinuierliche SDS-PAGE werden ein Trenngel und ein Sammelgel benötigt [60]. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass Acrylamid durch das Vorhandensein freier Radikale Polymere bildet, wobei Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalbildner und Tetramethylethylendiamin (TEMED) als Katalysator dienen. Die Größe der Poren der Acrylamidmatrix ist umgekehrt proportional zur Gesamtkonzentration der Monomere im Gel [25]. Da das Sammelgel eine geringere Konzentration an Acrylamid aufweist und damit große Poren besitzt, können die Proteine dieses schnell durchwandern, das Trenngel hingegen hat kleine Poren wodurch eine langsamere Laufgeschwindigkeit erreicht wird [43]. Indem anschließend ein elektrisches Feld senkrecht zum Polyacrylamidgel angelegt wird, wandern die Proteine aus dem Gel auf eine spezielle Trägermembran aus Nitrocellulose (NC). Durch Benetzen der NC mit spezifischen Antikörperlösungen können auf der NC befindliche Proteine detektiert und auf einem Film sichtbar gemacht werden [112]. Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermindern, wird jedoch vorher ein entsprechender Blockierschritt mittels Magermilch- oder Bovinem-Serum-Albumin-Lösungen (BSA) durchgeführt [77].

2.2.9.2 Proteinextraktion

Für die Isolation der Proteine wurden verschiedenen Enzyminhibitoren verwendet, deren Funktion in Tabelle 7 zusammengefasst ist.

Tabelle 7: Verwendete Enzyminhibitoren und deren Funktion

Aprotinin	Hemmung von Serinproteasen
Leupeptin	Hemmung von Serin- und Cysteinproteasen
Natriumfluorid	Hemmung von sauren Phosphatasen
Natriumorthovanadat	Hemmung von Tyrosin- und alkalischen Phosphatasen
Pepstatin A	Hemmung von Aspartatproteasen
Phenylmethylsulfonylflourid	Hemmung von Serinproteasen

Die bei -80°C gelagerten Gewebeproben wurden gewogen und in Stickstoff gekühlt. Direkt vor Gebrauch wurde ein Lysispuffer nach folgendem Reaktionsansatz hergestellt:

Tabelle 8: Reaktionsansatz für den Lysispuffer

Material	Volumen
Modifizierter RIPA Puffer (S. 29)	100 ml
Aprotinin 5 mg/ml in H_2O	20 μl
Pepstatin A 1,5 mg/ml in Methanol	67 μl
Leupeptin 1 mg/ml in H_2O	100 μl
Phenylmethylsulfonylflourid 200 mM in Isopropanol	500 μl
Natriumorthovanadat	500 μl
Natriumfluorid	500 μl

Je Gewebeprobe wurden 200 μl Lysispuffer hinzugegeben. Das Gewebe wurde dann mit einem Pistill leicht zerdrückt und anschließend mit einer Sonotrode zerkleinert. Danach wurde es für eine Stunde auf Eis lysiert und bei 14.000 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten zentrifugiert. Der Protein enthaltende Überstand wurde in ein frisches Eppendorf *Cup* überführt und bei -80°C eingefroren.

2.2.9.3 Messen der Proteinkonzentration

Zur Konzentrationsbestimmung wurde ein BCATM Protein Assay Kit von Thermo Scientific verwendet. Dabei wurden für jede Probe 200 μl der nach Herstellerangaben verdünnten *Work Solution* benutzt. BSA diente als Standard und wurde in der folgenden

Standardreihe ebenfalls mit *Radioimmunoprecipitation assay buffer* (RIPA) Puffer verdünnt: 2mg/ml; 1mg/ml; 0,5mg/ml; 0,25mg/ml; 0,125mg/ml; 0,0625mg/ml. Pro *Well* der Sarstedt Platte wurden jeweils 10µl Probe mit der *Work Solution* versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37° C wurde die Absorption bei 550 nm in einem Original Multiskan Ex gemessen. Anhand der Standardkurve wurden die Proteinkonzentrationen in µg/ml bestimmt. Für die Konzentrationsmessung wurde Ascent Software (S. 83) verwendet.

2.2.9.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zuerst wurde ein Trenngel hergestellt, das zwischen die Glasplatten der Elektrophoresekammer gefüllt und mit Isobutanol überschichtet wurde.

Tabelle 9: Herstellung von 15ml Trenngel

Geldichte	12%	15%
	Volumen in ml	Volumen in ml
Milli Q	4,9	3,4
Acrylamid 30%	6,0	7,5
Trenngelpuffer (pH 8,8)	3,8	3,8
SDS 10%	0,15	0,15
APS 10%	0,15	0,15
TEMED	0,006	0,006

Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde das Isobutanol verworfen und ein Sammelgel mit nachfolgendem Rezept hergestellt. Direkt nach dem Eingießen in die Glasplatten wurden die Kämme hinein gesteckt.

Tabelle 10: Herstellung von 10ml Sammelgel

Material	Volumen in ml
Milli Q	6,8
Acrylamid 30%	1,7
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	1,25
SDS 10%	0,1
APS 10%	0,1
TEMED	0,01

Für die Gelelektrophorese wurden jeweils 20 µg Protein pro Tasche aufgetragen. Die Proteine wurden vorher mit vollentsalztem Wasser verdünnt und mit 10 µl 5x Probenpuffer (Rezept S. 29) versetzt, welcher mit dem enthaltenen β-Mercaptoethanol dazu dient, Disulfidbrücken der Proteine zu Thiolen zu reduzieren. Nach Erhitzen der Proben für fünf Minuten auf 95° C sowie kurzem Zentrifugieren konnten die Taschen des Sammelgels beladen werden. Als Marker für die Proteingröße diente der peQGold Marker IV, wovon 10 µl aufgetragen wurden. Das Pufferreservoir der Elektrophoresekammer wurde mit 1x Lämmli Puffer befüllt (Rezept S. 28), welcher unter anderem Glycin enthält. Da dieses bei pH 6,8 des Sammelgels als Zwitterion vorliegt, welches langsam wandert, kann es mit den schnell wandernden Chloridionen im Sammelgel eine Lücke von Ladungsträgern aufbauen, was zur schnellen Migration der Proteine in diese Zone und ihrem Sammeln führt. Sobald diese ins Trenngel wandern, liegt Glycin bei pH 8,8 als Anion vor und der Ladungsträgermangel wird beseitigt. Nun werden die Proteine nach ihrer Masse separiert [60]. Die Elektrophorese wurde in einer Kammer von peQLab bei 120 Volt für zwei Stunden durchgeführt.

2.2.9.5 Blotvorgang

Als nächstes konnten die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Dies ist der eigentliche Blotvorgang, der in einer Transferkammer von BioRad stattfand. Auch hierfür wurde ein Blotpuffer benötigt (Tabelle 11), mit dem die Filterpapiere und die Nitrocellulosemembran befeuchtet wurden.

Tabelle 11: Rezept für 250 ml Blotpuffer

Material	Volumen
Towbin 10x (S. 30)	25 ml
Methanol	50 ml
Milli Q	175 ml

Der Proteintransfer erfolgte bei einem Strom von 1 mA pro cm² Membrangröße für zwei Stunden.

2.2.9.6 Blockierung

Um unspezifische Banden bei der nachträglichen Antikörperbindung zu vermeiden, wurde die Membran in einer Blockierungsmilch aus 5% Magermilchpulver und 2%

Bovines Serumalbumin (BSA) in TN Puffer 1x mit 0,05% Tween 20 (Rezept s. 2.1.4, S. 30) für 90 bis 120 Minuten geblockt.

2.2.9.7 Antikörperinkubation und Entwicklung

Die verwendeten Antikörper wurden jeweils nach Empfehlung des Herstellers verdünnt und haben über Nacht bei 4° C auf der Membran inkubiert (zu den Antikörpern s. Anhang, S. 82). Nach Abschluss der Inkubation wurde die Membran dreimal für jeweils zehn Minuten in TN Puffer 1x mit 0,05% Tween 20 gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (Verdünnung 1:1500 in 5% Magermilchpulver in TN Puffer 1x mit 0,05% Tween 20) für eine Stunde inkubiert. Es folgte erneutes Waschen für dreimal fünf Minuten in TN Puffer 1x mit 0,05% Tween 20 und die Benetzung der Membran mit ECL Lösung für fünf Minuten. Das in der ECL enthaltene Lumigen PS-3 reagiert mit der an den Zweitantikörper gebundenen *Horseradish Peroxidase* mit einer Konformationsänderung, die zu einer Lichtemission führt. Diese Lichtemission kann somit als Proteinbande auf dem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

In einer Filmkassette wurde danach ein Hyperfilm auf die in Folie gewickelte Membran gepresst. Die Expositionszeit variierte je nach Antikörper und Qualität der erhaltenen Filme von 1s bis 20 Minuten. Die Filme wurden mit Roentogen liquid entwickelt und in Roentogen Superfix fixiert.

2.2.9.8 Aufhebung der Antikörperbindung (Strippen)

Zum Strippen wurden 10 ml Stripping Puffer (Rezept s. Tab. 2.1.4, S. 29) mit 70 µl β-Mercaptoethanol versetzt und die Membran damit für 30 Minuten bei 55° C inkubiert. Im Anschluß wurde die Membran für dreimal fünf Minuten in 1x TN mit 0,05% Tween 20 gewaschen und konnte dann wie bereits beschrieben geblockt und mit neuem Antikörper inkubiert werden.

2.2.10 Fixation, Paraffineinbettung und Anfertigung der immunhistologischen Schnitte

Das Nierengewebe wurde für die Immunhistologische Färbung in Paraformaldehyd (PFA, 4 %) über Nacht fixiert. Danach erfolgte die Entwässerung des Gewebes in der aufsteigenden Alkoholreihe mit Isopropanol für je 40 Minuten bei Raumtemperatur, wobei das Gewebe über Nacht in frischem Isopropanol (100 %) verblieb. Am nächsten Tag wurden die Gewebestücke noch einmal bei 58° C für 40 Minuten in Isopropanol

(100 %) belassen. Im Anschluss wurde das Gewebe bei 58° C für eine Stunde in ein 1:1 Isopropanol-Paraffin Gemisch eingebracht. Schließlich blieb das Gewebe für dreimal zwei Stunden in heißem Paraffin. Es folgte die direkte Einbettung des Gewebes in heißem Paraffin in Blöcken. Für die Anfertigung der Schnitte wurde ein Microtom benutzt. Die Paraffinblöcke wurden zuerst für zwei Stunden auf -20° C gekühlt bevor 2 µm dicke Schnitte hergestellt wurden, welche dann im Kaltwasserbad aufgefangen wurden. Nachdem sie im Heißwasserbad gestreckt und auf Objektträger gezogen wurden, trockneten die Schnitte über Nacht bei 37° C.

2.2.11 Immunhistologische Kollagen I Färbung

Die verwendeten Schnitte wurden zunächst für eine Viertelstunde bei 60° C abgeschmolzen. Danach wurden sie dreimal für fünf Minuten in Xylol entparaffiniert. Es folgte die Hydratisierung in der absteigenden Alkoholreihe für je zweimal zwei Minuten. Nach maximal fünf Minuten in Phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, s. 2.1.4, S. 28) wurden die Schnitte für 20 Minuten im Dampfgerar in Citratpuffer (1:10) aufgeheizt und danach 20 Minuten auf Eis abgekühlt. Die Schnitte wurden erneut für maximal fünf Minuten in PBS eingebracht und anschließend mit einem Fettstift umrandet. Nachdem circa 150 µl der Peroxidaselösung pro Schnitt aufgetragen wurden, inkubierte diese für 20 Minuten unter einer Schutzabdeckung. Anschließend wurden die Schnitte mit *Protein Blocking Solution* für fünf Minuten benetzt. Der Kollagen I Primärantikörper (S. 82) wurde 1:50 mit *Antibody Diluent* verdünnt und konnte über Nacht bei 4° C in einer feuchten Kammer inkubieren.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal für je fünf Minuten in PBS gewaschen. Nachfolgend wurde der Zweitantikörper (*Anti-rabbit*, s. Anhang, S. 82) aufgebracht, der 1:500 in *Antibody Diluent* verdünnt worden war. Nach einer Stunde wurden die Schnitte erneut dreimal in PBS gewaschen und danach mit der Avidin-Biotin Lösung für 30 Minuten benetzt. Die Zubereitung dieser Lösung erfolgte nach Herstellerangaben des Vectastain Elite ABC Kits (S. 28). Wieder wurden die Schnitte in PBS gewaschen bevor sie mit Diaminobencidin für maximal zehn Minuten inkubierten. Die Intensität der Färbung wurde am Mikroskop kontrolliert. Nachdem die Schnitte in PBS gewaschen wurden, wurden sie für circa 20 Sekunden in Mayers Hämalaun getaucht und dann in Leitungswasser für zehn Minuten gebläut. Im Anschluß wurden die Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydratisiert. Nochmals wurden die Schnitte dreimal in Xylol getaucht und zum Schluß mit Eukitt eingedeckt. Die Auswertung der Färbung fand am Leitz Aristoplan Mikroskop statt. Um möglichst

verschiedene Bereiche der Niere zu erfassen, wurden die Schnitte für die Auswertung mit der Mikroskop Kamera meanderförmig abgefahren. Pro Schnitt wurden bei der Auswertung 20 Bereiche aufgenommen und vermessen. Hierfür wurde das Meta Vue™ Imaging System (s. Anhang, S. 83) verwendet. Das Kollagen positive Areal in einem definierten Bereich von 3,2mm² wurde in Prozent angegeben.

2.2.12 Statistik und Auswertung

Für die Analyse der PCRs, des Phänotyps der Ratten sowie der Immunhistologischen Färbung wurde das Programm Graph Pad Prism 4 (s. Anhang, S. 83) verwendet. Die Auswertung der Western Blot Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programms Quantity One (s. Anhang, S. 83). Hierfür wurden die Blots mit β -Actin durch Densitometrie verglichen. Wenn nicht anders bezeichnet, werden alle Werte als Mittelwerte mit Standardabweichung vom Mittelwert (engl. *standard error of the mean*; SEM) gezeigt. Für Auswertungen aller drei Gruppen wurde der Kruskal-Wallis mit Dunn's Test verwendet, bei der Auswertung der Körpergewichte und Körperlängen der Two way Anova mit Bonferroni-Vergleichstest. Als Höchstgrenze der Irrtumswahrscheinlichkeit für signifikante Unterschiede wurde 5% ($p < 0,05$) gewählt.

3 Ergebnisse

3.1 Phänotyp postnatal hyperalimentierter Ratten

Verglichen mit der Kontrollgruppe waren Tiere aus wurfreduzierten Gruppen während der Stillperiode als auch am postnatalen Lebenstag (P) 70 (Lebenswoche 10) signifikant schwerer (Abb. 8a).

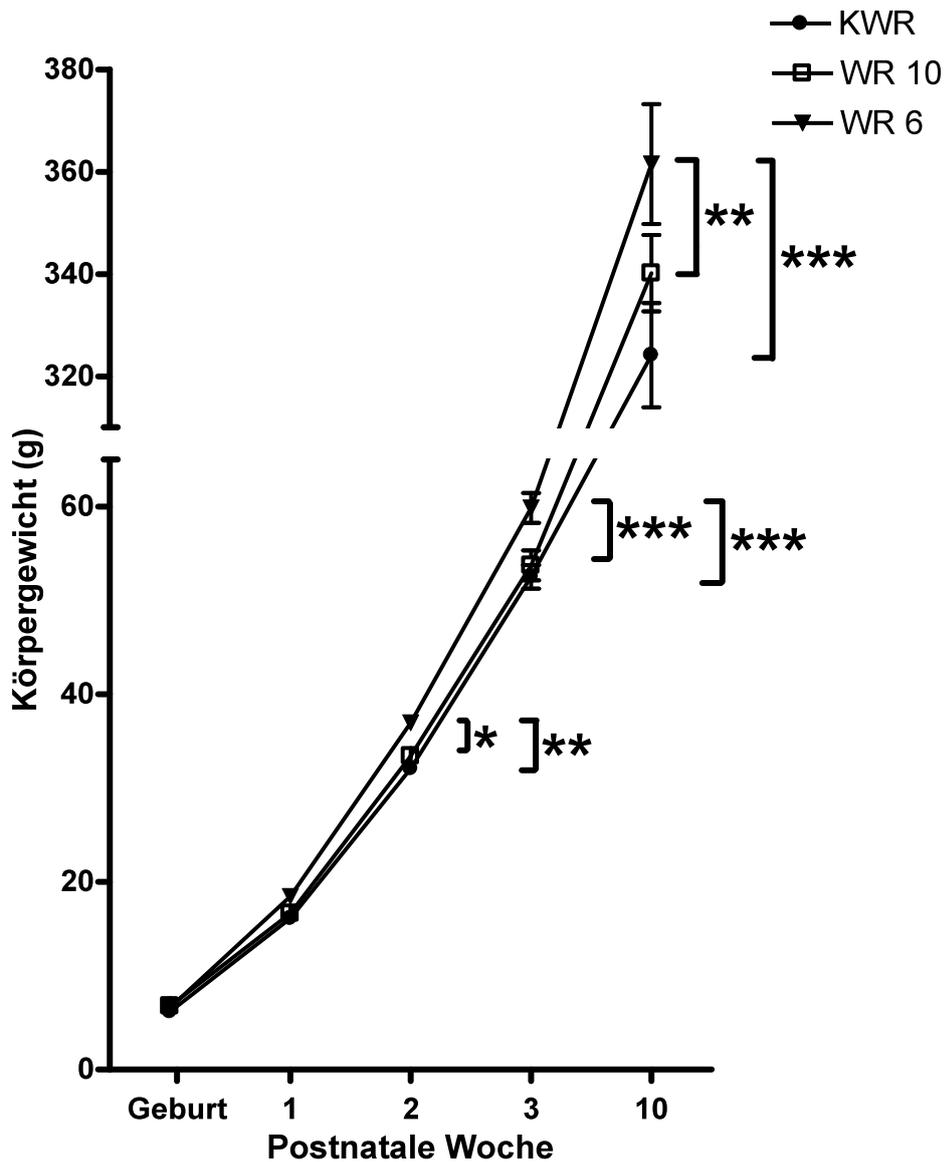


Abb. 8a: Gewichtsverlauf des normalen Wurfs (KWR; n=5), der wurfreduzierten Gruppe aus zehn (WR 10; n=10) und der Gruppe aus sechs (WR 6; n=8) Tieren bis zum Tag P70. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ im Anova mit Bonferroni-Vergleichstest. Werte als MW \pm SEM.

Die Tiere aller drei unterschieden sich nicht nennenswert in der Körperlänge (Abb. 8b).

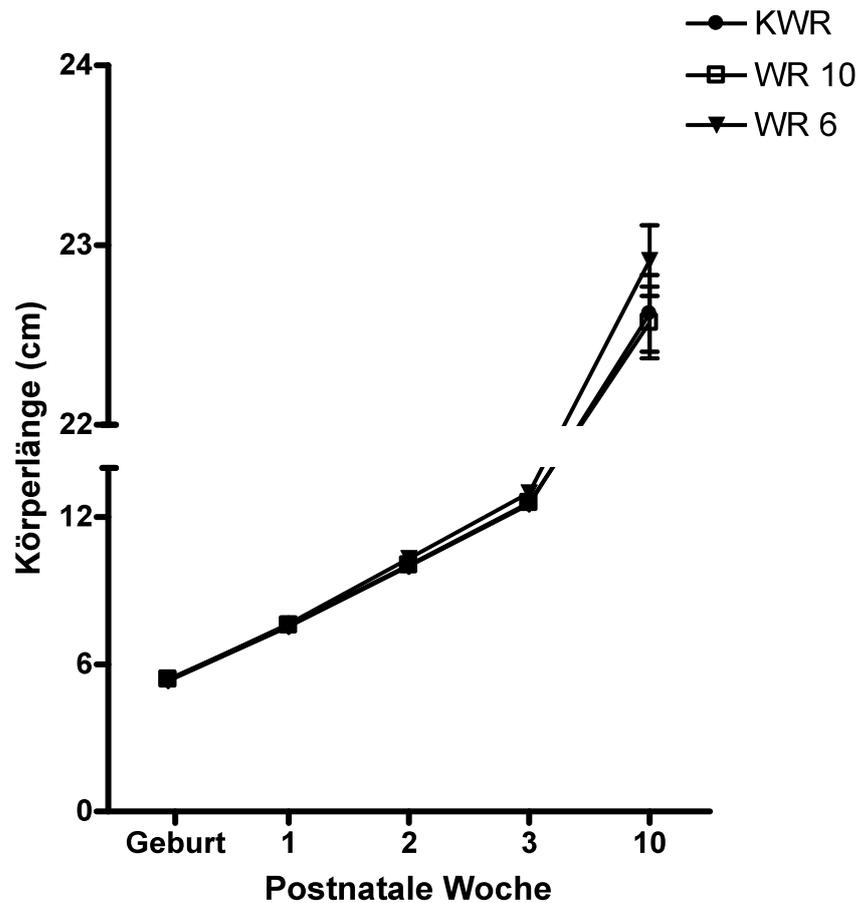


Abb. 8b: Körperlängen von Tieren der Kontrollgruppe (KWR; n=5), wurfreduzierten Gruppe aus zehn (WR 10; n=10) und der Gruppe aus sechs (WR 6; n=8) Tieren bis zum Tag P70.

Das Plasmaleptin war in beiden wurfreduzierten Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe erhöht, jedoch wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht (Abb. 9). Eine Glukosurie wurde in keiner der drei Gruppen beobachtet (Abb. 10).

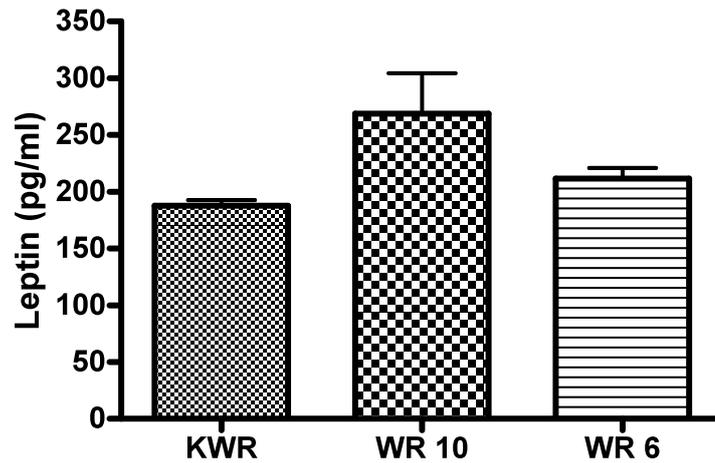


Abb. 9: Plasmaleptin von Tieren des normalen Wurfes (KWR; n=5), der wurfreduzierten Gruppe aus zehn (WR 10; n=10) und der Gruppe aus sechs (WR 6; n=8) Tieren am Tag P70. Kruskal-Wallis mit Dunn's Test. Werte als MW \pm SEM.

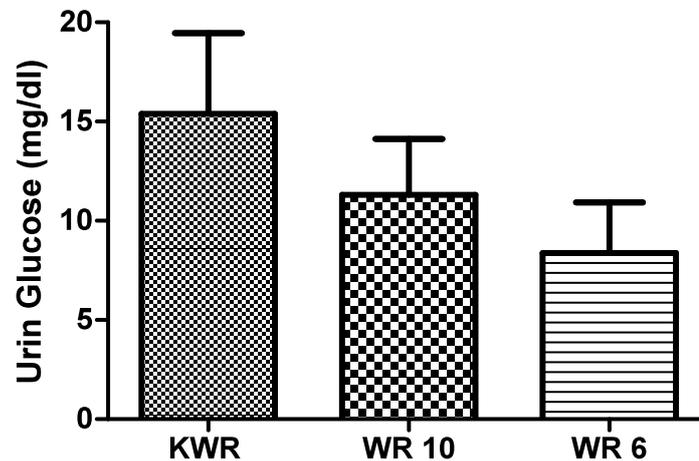


Abb. 10: Urin-Glukose von Tieren des normalen Wurfes (KWR; n=5), der wurfreduzierten Gruppe aus zehn (WR 10; n=10) und der Gruppe aus sechs (WR 6; n=8) Tieren am Tag P70. Kruskal-Wallis mit Dunn's Test. Werte als MW \pm SEM.

3.2 Nierenfunktion postnatal hyperalimentierter Ratten

Zur Beurteilung der Nierenfunktion wurden am Tag P70 die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) sowie der Protein/Kreatinin-Quotient gemessen. Die GFR der Tiere in der WR 6 Gruppe war signifikant vermindert (Abb. 11), hingegen wiesen hyperalimentierte Tiere (WR 6) signifikant höhere kalkulierte Protein/Kreatinin-Quotienten im Urin auf, als die Tiere der Kontrollgruppe (Abb. 12).

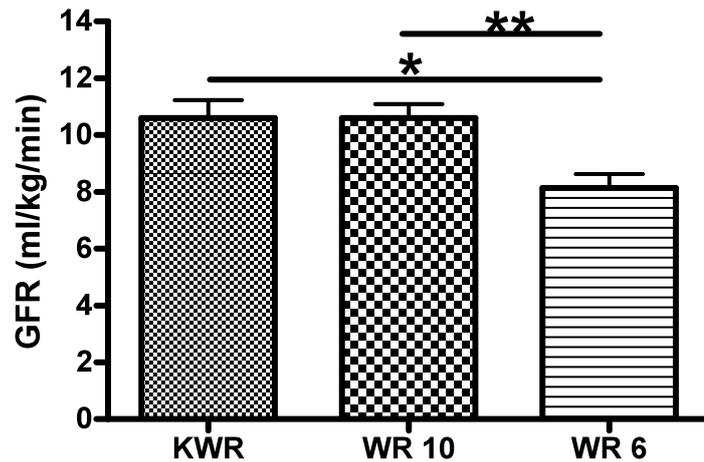


Abb. 11: GFR von Tieren des normalen Wurfs (KWR; n=5), der wurfreduzierten Gruppe aus zehn (WR 10; n=10) und der Gruppe aus sechs (WR 6; n=8) Tieren am Tag P70. * $p < 0,05$ bzw. ** $p < 0,01$ im Kruskal-Wallis mit Dunn's Test (KWR vs. WR 6; WR 10 vs. WR 6). Werte als MW \pm SEM.

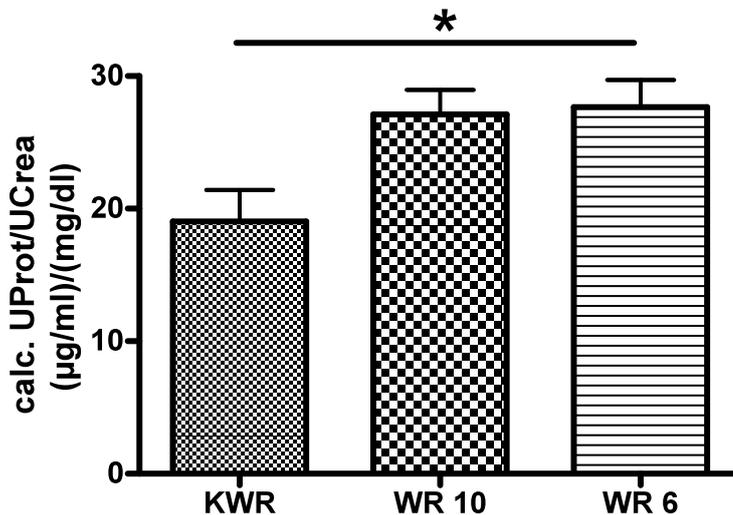


Abb. 12: Kalkulierter Protein/Kreatinin-Quotient im Urin von Tieren des normalen Wurfs (KWR; n=5), der wurfreduzierten Gruppe aus zehn (WR 10; n=10) und der Gruppe aus sechs (WR 6; n=8) Tieren am Tag P70. * $p < 0,05$ im Kruskal-Wallis mit Dunn's Test (KWR vs. WR 6). Werte als MW \pm SEM.

3.3 Veränderung der renalen Zytokinexpression durch postnatale Hyperalimentation

Um zu überprüfen, ob frühe postnatale Hyperalimentation zu einer Entzündungsneigung führt, wurde die renale Zytokinexpression von IL-6 und IL-10 gemessen. Die mRNA Expression von IL-6 war in beiden wurfreduzierten Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe hochreguliert. Die renale IL-6 Expression im WR 6 Wurf war signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (Abb. 13). Hingegen ließ sich im Gruppenvergleich des antiinflammatorischen IL-10 eine statistisch signifikante

Herunterregulation in der WR 6 Gruppe nachweisen (Abb. 14). Die mRNA Expression wurde auf das *Housekeeping*-Gen β -Actin bezogen.

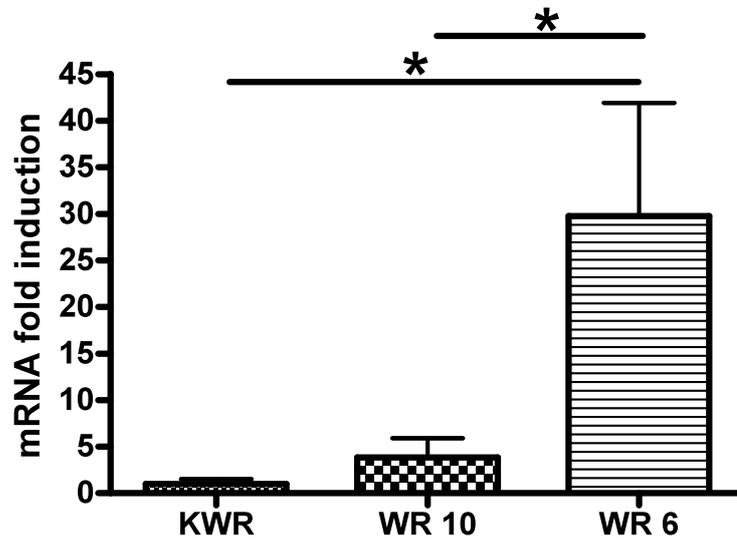


Abb. 13: Interleukin-6-mRNA Expression im Nierengewebe des normalen Wurfes (KWR; n=5), der wurfreduzierten Gruppe aus zehn (WR 10; n=10) und der Gruppe aus sechs (WR 6; n=8) Tieren am Tag P70. * $p < 0,05$ im Kruskal-Wallis mit Dunn's Test (KWR vs. WR 6; WR 10 vs. WR 6). Werte als MW \pm SEM.

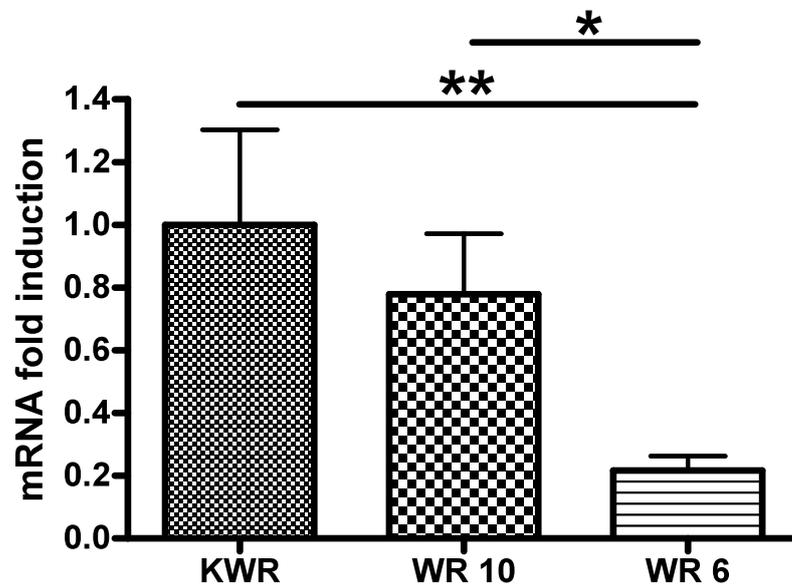


Abb. 14: IL-10-mRNA Expression im Nierengewebe des normalen Wurfes (KWR; n=5), der wurfreduzierten Gruppe aus zehn (WR 10; n=10) und der Gruppe aus sechs (WR 6; n=8) Tieren am Tag P70. ** $p < 0,01$ im Kruskal-Wallis mit Dunn's Test (KWR vs. WR 6). * $p < 0,05$ im Kruskal-Wallis mit Dunn's Test (WR 10 vs. WR 6). Werte als MW \pm SEM.

Die Analyse der Expression von IL-6 auf Proteinebene zeigte eine Hochregulation in den wurfreduzierten Gruppen. Die WR 6 Gruppe erreichte die höchste Proteinkonzentration, welche signifikant von der Kontrollgruppe differierte (Abb. 15a und b).

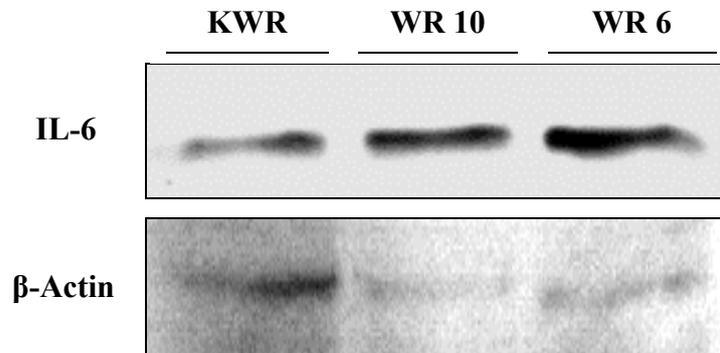


Abb. 15a: Interleukin-6 Western Blot aus Nierengewebe der Kontrollgruppe (KWR; n=1), der wurfreduzierten Gruppe aus zehn Tieren (WR 10; n=1) und der wurfreduzierten Gruppe aus sechs Tieren (WR 6; n=1) am Tag P70. Der WR 6 Wurf weist verstärkte Bandenintensität auf.

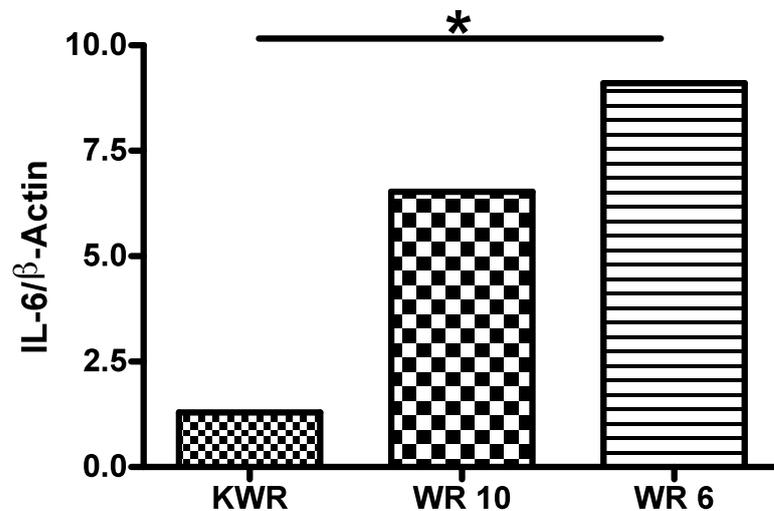


Abb. 15b: Relation von Interleukin-6 zu β-Actin im Western Blot des normalen Wurfs (KWR; n=1), der wurfreduzierten Gruppe aus zehn (WR 10; n=1) und der wurfreduzierten Gruppe aus sechs (WR 6; n=1) Tieren. *p<0,05 im Kruskal-Wallis mit Dunn's Test (KWR vs. WR 6). Werte als MW.

3.4 Veränderung der extrazellulären Matrix durch postnatale Hyperalimentation

Es wurde eine semi-quantitative Messung von Kollagen I in den Glomeruli durchgeführt, damit ein möglicher Einfluss auf die extrazelluläre Matrixkomposition durch die Inflammation in hyperalimentierten Würfen untersucht werden konnte.

Verglichen mit der Kontrollgruppe wurde in den Glomeruli von Tieren der WR 6 Gruppe signifikant mehr Kollagen I gemessen. Dabei nahm der Anteil an Kollagen I mit zunehmender Wurfreduktion zu (Abb. 16a und b).

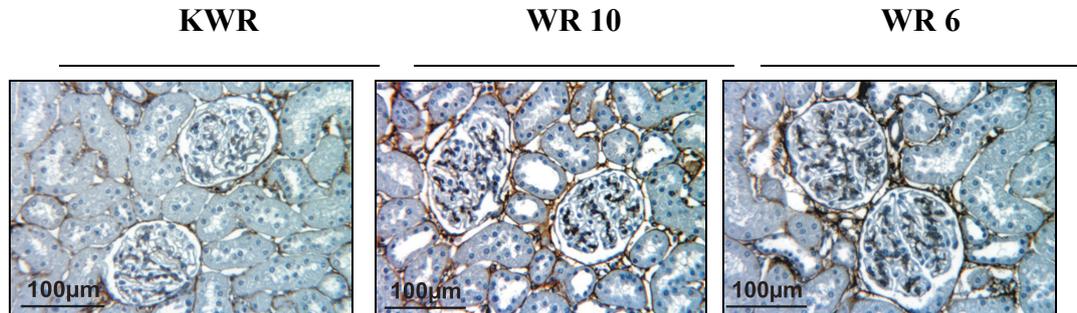


Abb. 16a: Immunhistologische Färbung von Kollagen I in den Glomeruli von Tieren des normalen Wurfs (KWR; n=5), der wurfreduzierten Gruppe aus zehn (WR 10; n=10) und der wurfreduzierten Gruppe aus sechs Tieren am Tag P70 (WR 6; n=8).

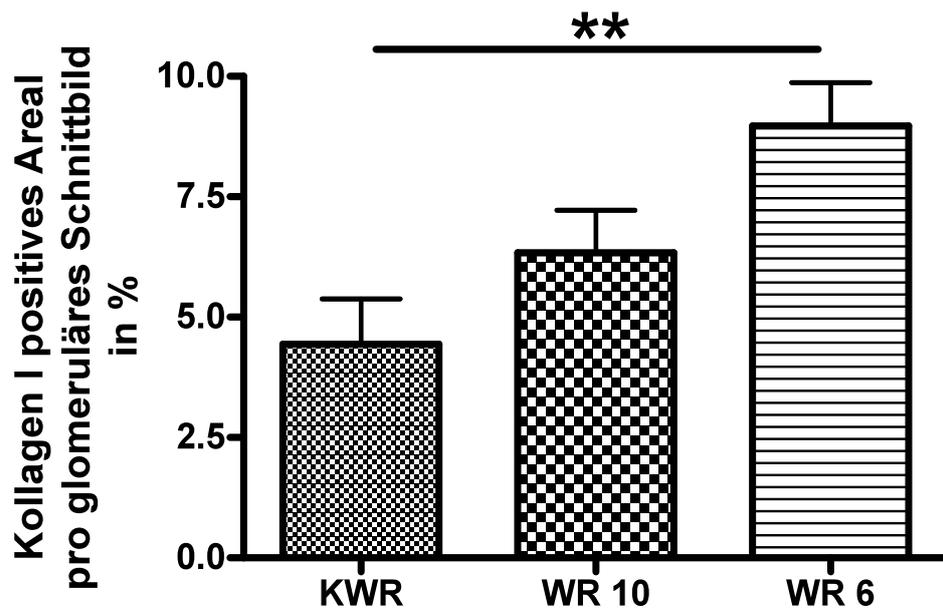


Abb. 16b: Anteil an Kollagen I in den Glomeruli von Tieren des normalen Wurfs (KWR; n=5), der wurfreduzierten Gruppe aus zehn (WR 10; n=10) und der wurfreduzierten Gruppe aus sechs Tieren am Tag P70 (WR 6; n=8). **p<0,01 im Kruskal-Wallis mit Dunn's Test (KWR vs. WR 6). Werte als MW ± SEM.

3.5 Veränderung der Leptin-, NPY-, Y₁- und Y₂-Rezeptor-Expression durch postnatale Hyperalimentation

Damit überprüft werden konnte, ob die Hyperalimentation zur Veränderung im NPY System der Niere führt, wurde die mRNA Expression von NPY, Leptin und einem Teil der Y-Rezeptoren gemessen. In der WR 6 Gruppe war die NPY Expression verglichen

mit dem WR 10 Wurf als auch der Kontrollgruppe signifikant hochreguliert (Abb. 17). Die Expression der NPY-mRNA wurde auf das *Housekeeping*-Gen β -Actin bezogen.

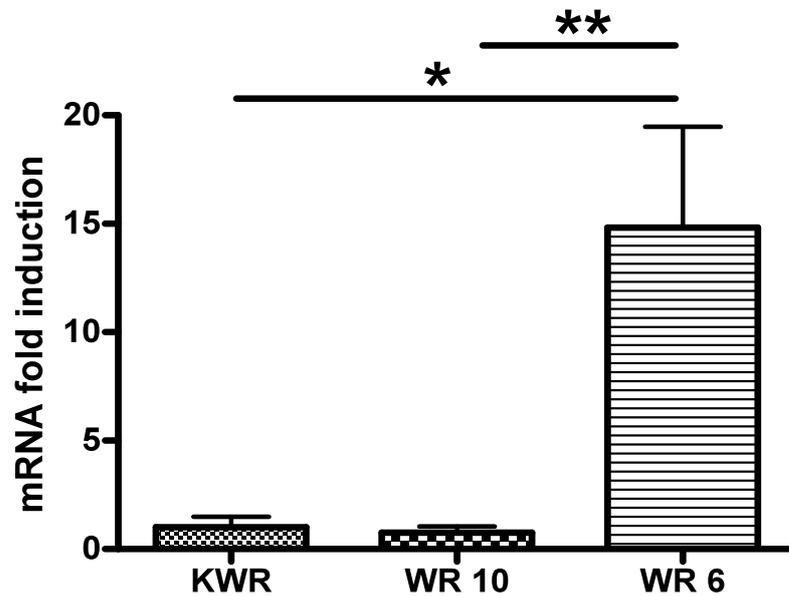


Abb. 17: Neuropeptid Y-mRNA Expression im Nierengewebe des normalen Wurfs (KWR; n=5), der wurfreduzierten Gruppe aus zehn (WR 10; n=10) und der Gruppe aus sechs (WR 6; n=8) Tieren. * $p < 0,05$ im Kruskal-Wallis mit Dunn's Test (KWR vs. WR 6). ** $p < 0,01$ im Kruskal-Wallis mit Dunn's Test (WR 10 vs. WR 6). Werte als $MW \pm SEM$.

In der WR 6 Gruppe Wurf nahm die Y_1 Rezeptor Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ab (Abb. 18). Genauso war die Y_2 Rezeptor Expression in dieser Gruppe signifikant verringert (Abb. 19).

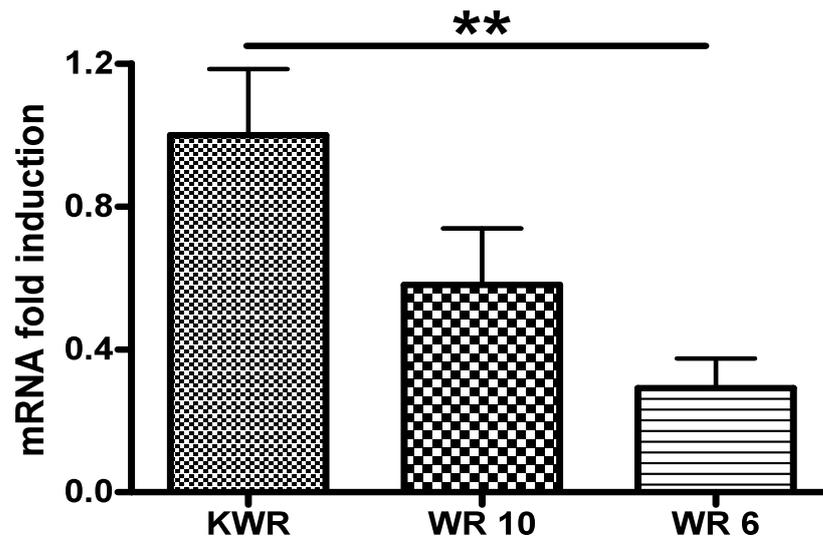


Abb. 18: Neuropeptid Y_1 -mRNA Expression im Nierengewebe des normalen Wurfs (KWR; n=5), der wurfreduzierten Gruppe aus zehn (WR 10; n=10) und der Gruppe aus sechs (WR 6; n=8) Tieren. ** $p < 0,01$ im Kruskal-Wallis mit Dunn's Test (KWR vs. WR 6). Werte als MW \pm SEM.

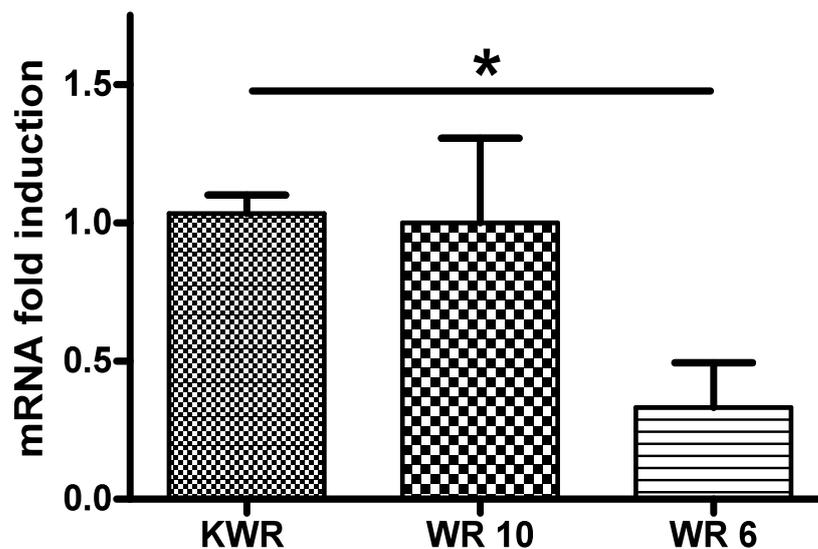


Abb. 19: Neuropeptid Y_2 -mRNA Expression im Nierengewebe des normalen Wurfs (KWR; n=5), der wurfreduzierten Gruppe aus zehn (WR 10; n=10) und der Gruppe aus sechs (WR 6; n=8) Tieren. * $p < 0,05$ im Kruskal-Wallis mit Dunn's Test (KWR vs. WR 6). Werte als MW \pm SEM

Im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur WR 10 Gruppe war die Leptinexpression in der WR 6 Gruppe signifikant erhöht, wobei β -Actin als *Housekeeper* diente. Im Gruppenvergleich zwischen WR 10 und Kontrollgruppe gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied (Abb. 20).

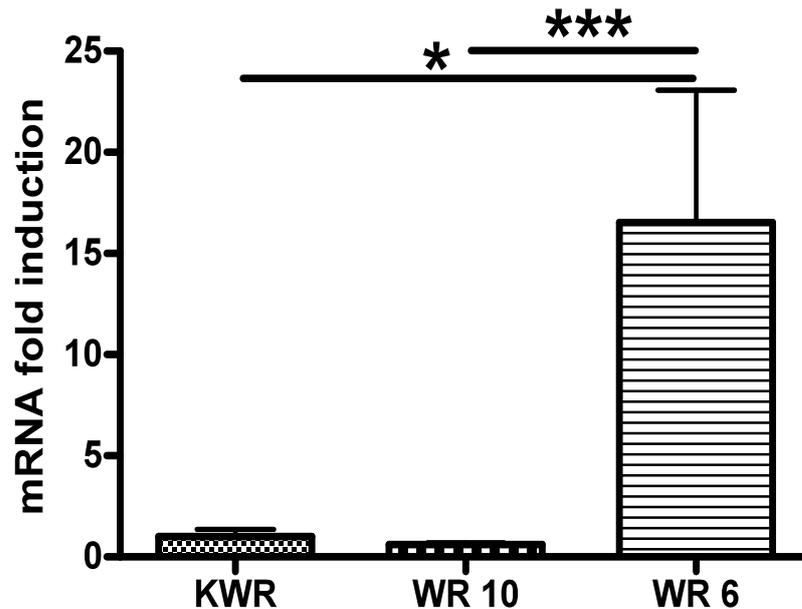


Abb. 20: Leptin-mRNA Expression im Nierengewebe des normalen Wurfs (KWR; n=5), der wurfreduzierten Gruppe aus zehn (WR 10; n=10) und der Gruppe aus sechs (WR 6; n=8) Tieren. *** $p < 0,001$ im Kruskal-Wallis mit Dunn's Test (WR 10 vs. WR 6). * $p < 0,05$ im Kruskal-Wallis mit Dunn's Test (KWR vs. WR 6). Werte als MW \pm SEM.

3.6 Veränderung der Leptin-Signalkaskade über STAT-3 durch postnatale Hyperalimentation

Physiologisch führt eine Leptinbindung am ObR zu einer STAT-3 Aktivierung durch Phosphorylierung. Um diese Aktivierung zu überprüfen, wurden phosphoryliertes (Phospho-STAT-3; pSTAT3) und unphosphoryliertes STAT-3 (Total-STAT-3; STAT3) im Western Blot detektiert. Hier zeigten Tiere der hyperalimentierten Gruppen im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine mit zunehmender Wurfreduktion deutlichere Verminderung an phosphoryliertem STAT-3 (Abb. 21a und b).

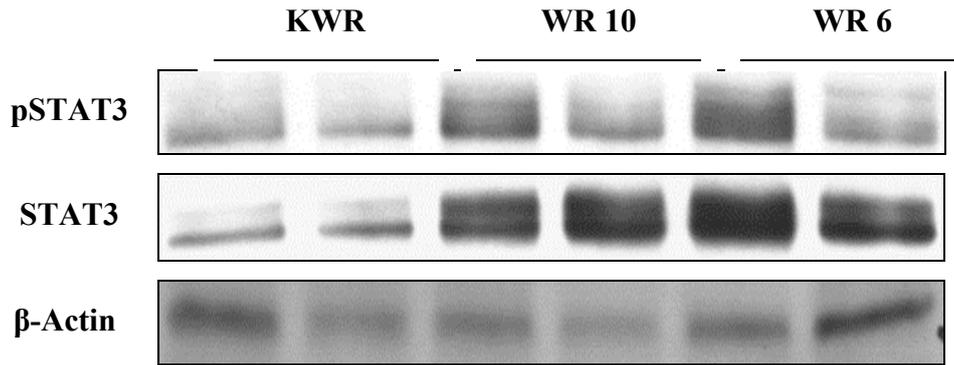


Abb. 21a: Phosphoryliertes (pSTAT3) und unphosphoryliertes STAT-3 (STAT3) im Western Blot aus Nierengewebe der Kontrollgruppe (n=3), der wurfreduzierten Gruppe aus zehn Tieren (n=3) und der wurfreduzierten Gruppe aus sechs Tieren (n=3).

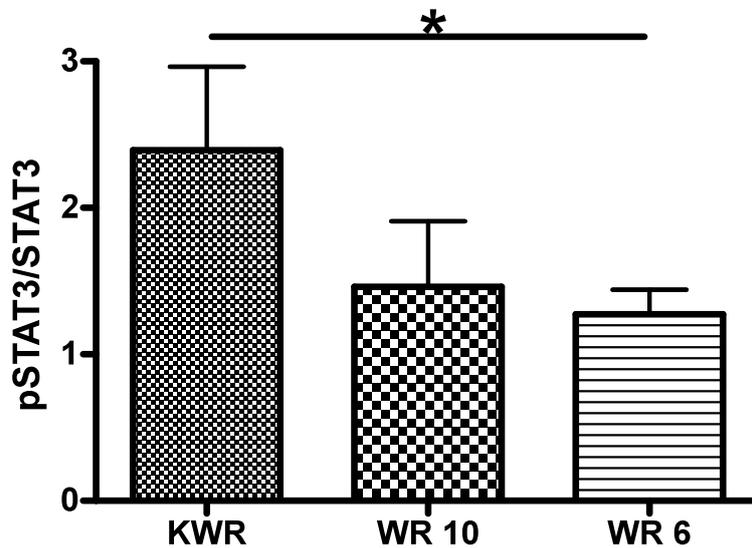


Abb. 21b: Relation von phosphoryliertem (pSTAT3) zu unphosphoryliertem STAT-3 (STAT3) des normalen Wurfs (KWR; n=3), der wurfreduzierten Gruppe aus zehn (WR 10; n=3) und der wurfreduzierten Gruppe aus sechs (WR 6; n=3) Tieren. *p<0,05 im Kruskal-Wallis mit Dunn's Test (KWR vs.WR 6). Werte als MW ± SEM.

Weiterhin ließ sich in der WR 6 Gruppe die höchste Menge an unphosphoryliertem STAT-3 nachweisen (Abb. 21c).

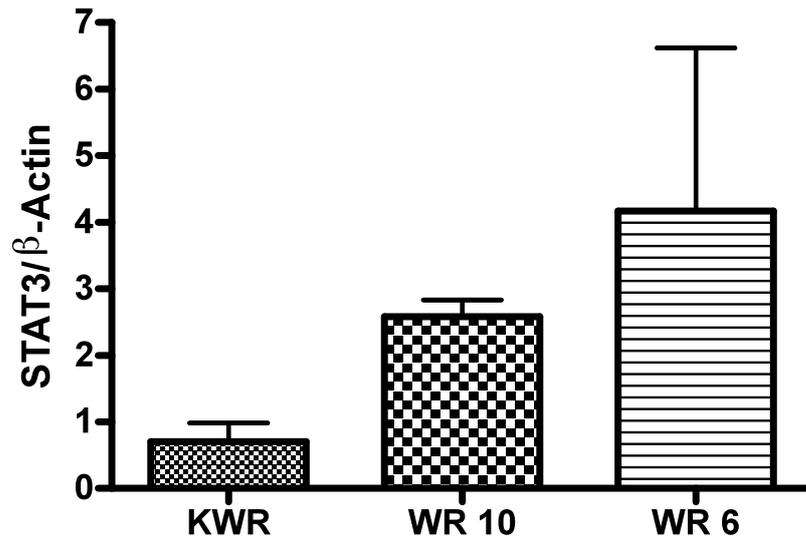


Abb. 21c: Relation von unphosphoryliertem STAT-3 (STAT3) zu β -Actin des normalen Wurfs (KWR; n=3), der wurfreduzierten Gruppe aus zehn (WR 10; n=3) und der wurfreduzierten Gruppe aus sechs (WR 6; n=3) Tieren. Werte als MW \pm SEM.

Da phosphoryliertes STAT-3 im Nukleus die Transkription seiner Zielgene wie IL-10 induziert und die von NPY hemmt, wurde die mRNA Expression beider Gene gemessen (Abb. 14 und 17, S. 50 bzw. 53). In hyperalimentierten Gruppen war die IL-10 Expression reduziert, die Expression von NPY jedoch gesteigert. Dies stimmt mit den Gruppen, welche eine verminderte STAT-3 Phosphorylierung aufwiesen, überein.

Daraufhin wurde SOCS-3 als Inhibitor der STAT-3 Phosphorylierung im Western Blot gemessen. Dabei konnte eine Hochregulation von SOCS-3 in beiden hyperalimentierten Gruppen ermittelt werden. Hierbei exprimierte die WR 6 Gruppe den höchsten Anteil an SOCS-3 und unterschied sich signifikant von der Kontrollgruppe (Abb. 22a und b).

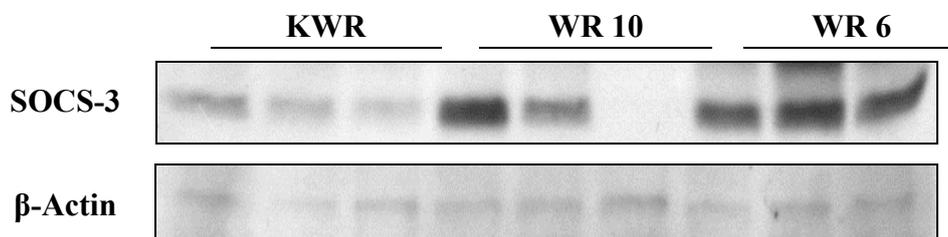


Abb. 22a: *Suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS-3) Western Blot aus Nierengewebe der Kontrollgruppe (n=3), der wurfreduzierten Gruppe aus zehn Tieren (n=3) und der wurfreduzierten Gruppe aus sechs Tieren (n=3). Auffallend ist die verstärkte Bandenintensität in der Gruppe aus sechs Tieren (WR 6).

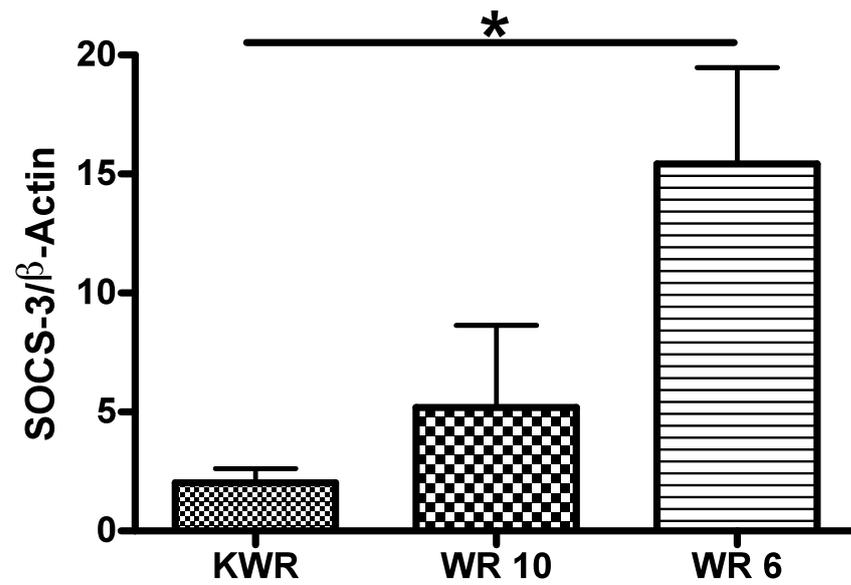


Abb. 22b: Relation von *Suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS-3) zu β -Actin des normalen Wurfs (KWR; n=3), der wurfreduzierten Gruppe aus zehn (WR 10; n=3) und der wurfreduzierten Gruppe aus sechs (WR 6; n=3) Tieren. *p<0,05 im Kruskal-Wallis mit Dunn's Test (KWR vs. WR 6). Werte als MW \pm SEM.

4 Diskussion

4.1 Phänotyp postnatal hyperalimentierter Ratten

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, (1) ob postnatale Hyperalimentation die Nierenfunktion von Ratten langfristig beeinflusst, (2) ob Inflammation sowie profibrotische Effekte im Nierengewebe als zugrunde liegende Pathomechanismen damit einhergehen und (3) inwiefern die Leptin-NPY Interaktion durch postnatale Hyperalimentation reguliert wird. Es ist sowohl in tierexperimentellen als auch in humanen Studien gezeigt worden, dass Überernährung zu einem erhöhten Risiko für eine chronische Niereninsuffizienz führt [20, 28, 47]. Es finden histologische Veränderungen im Sinne einer *Obesity Related Glomerulopathy* (ORG) [106] und eine niederschwellige systemische Inflammation statt [106, 126]. In der vorliegenden Studie konnte dies bestätigt werden: die postnatale Hyperalimentation wurde durch eine Reduktion der primären Wurfgröße am Lebenstag (P) 1 erreicht und führte zu erhöhtem Körpergewicht in hyperalimentierten Würfen, einer Verminderung der GFR mit Veränderung der extrazellulären Matrix und zu einer lokalen Zytokin- und Leptinexpression mit Modifikation im NPY System.

Während der Stillperiode sowie am postnatalen Lebenstag P70 waren Tiere aus der WR 6 Gruppe signifikant schwerer als die der Kontrollgruppe (Abb. 8a). Die Wurfreduktion führte zu einer größeren verfügbaren Milchmenge pro Nachkommen und somit letztlich zu einer postnatalen Hyperalimentation mit gesteigerter Gewichtszunahme verglichen mit der nicht wurfreduzierten Kontrollgruppe. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen konnten andere Arbeitsgruppen, die mit einem vergleichbaren Tiermodell arbeiten, ebenso eine Erhöhung des Körpergewichts in kleinen Würfen zeigen [12, 83, 86]. Allerdings beobachteten Velkoska et al. nach 16 Wochen, also zu einem späteren Zeitpunkt als in dieser Studie, dass Ratten aus SL Würfen mit je drei Tieren pro Wurf nur noch *circa* 5% schwerer waren [113].

Entgegen der Resultate anderer Arbeiten [83, 113] manifestierten die überfütterten Ratten in dieser Arbeit keine oder noch keine signifikante Hyperleptinämie sowie keine Glukosurie, auch eine arterielle Hypertension wurde in einer Untersuchung durch einen Kollegen nicht beobachtet [3]. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die Wurfreduktion in Modellen anderer Arbeiten massiver war, zum anderen daran, dass die Untersuchungszeitpunkte anderer Studien nach dem Lebenstag P70 stattfanden und bereits Folgeerkrankungen wie arterielle Hypertonie beobachtet wurden. Meistens wird

in der Literatur eine Reduktion auf drei Tiere pro Wurf [12, 66, 87] beschrieben. Somit ist die Ausbildung eines Metabolischen Syndroms, wie es sich in Folge einer massiven Wurfreduktion häufig entwickelt [83] durch die abgeschwächte Wurfreduktion auf sechs Tiere in der vorliegenden Arbeit nicht gegeben. Darüber hinaus kann in dieser Studie keine Feststellung über die Körperzusammensetzung, d.h. den Anteil an Fett- und Muskelmasse gemacht werden, was nachfolgende Untersuchungen nötig macht.

4.2 Eingeschränkte glomeruläre Nierenfunktion in postnatal hyperalimentierten Ratten

Die GFR der Tiere in der WR 6 Gruppe war signifikant vermindert, der kalkulierte Protein/Kreatinin Quotient erreichte bei den selben Tieren signifikant höhere Werte als in der Kontrollgruppe (Abb. 11 und 12). Letzterer korreliert gut mit der Gesamtproteinurie [94] und seine Erhöhung impliziert eine Beeinträchtigung der glomerulären Funktion nach früher postnataler Hyperalimentation. Hierbei wäre es wichtig, mit einer Elektrophorese zu eruieren, ob die Proteinurie glomerulär oder tubulär ist, also vor allem Albumin (Marker für glomeruläre Störung) oder α_1 - bzw. β_2 -Mikroglobulin (tubuläre Störung) verloren gehen. Dies ist Ziel der bereits initiierten nachfolgenden tierexperimentellen Studien.

Es könnte an dieser Stelle eingewandt werden, dass die Proteinurie die Folge einer diabetischen Nephropathie darstellt, die im Rahmen der Hyperalimentation auftritt. Um die Entwicklung einer solchen zu verhindern, ist nur eine moderate Wurfreduktion vorgenommen worden, zumal die Tiere aus hyperalimentierten Würfen weder eine Glukosurie noch eine Hyperleptinämie aufwiesen.

Außerdem gibt es aus anderen Studien Hinweise darauf, dass Adipositas schon früh zu einer Veränderung der glomerulären Struktur sowie Funktionalität führt und eine Gewichtsreduktion bei verschiedenen Nephropathien mit einer Abnahme der Proteinurie verbunden ist [47, 65], folglich Übergewicht als eigener Risikofaktor zur Entstehung einer ORG beiträgt [106]. Es ist aber bislang noch nicht geklärt, welche die zugrunde liegenden Mechanismen der ORG sind. Da Adipositas (1) zu einer Zytokinexpression [37] und (2) Hyperleptinämie mit der Folge einer (3) Sympathikusaktivierung führt [46, 124], könnten diese Faktoren kausal für die eingeschränkte Nierenfunktion sein.

4.3 Verstärkung der Expression proinflammatorischer Zytokine in postnatal hyperalimentierten Ratten

Mit der postnatalen Hyperalimentation kam es zu einer signifikant höheren renal-intrinsischen proinflammatorischen Zytokinexpression von IL-6 (Abb. 13 und 15) und einer signifikanten Abnahme des antiinflammatorischen IL-10 (Abb. 14). In einer nachfolgenden Untersuchung durch Alejandro Alcázar et al. war auch die Expression von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) in den hyperalimentierten Würfen verändert (Ergebnis nicht gezeigt [3]). Angesichts dieser Ergebnisse kann eine Entzündungsreaktion als Ursache für die eingeschränkte Nierenfunktion in der WR 6 Gruppe in Betracht gezogen werden. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen fanden Stofkova et al. im Hypothalamus acht Wochen alter Lewis Ratten ein ähnliches Resultat: die einer Wurfreduktion und einer fettreichen Diät unterzogenen Tiere zeigten erhöhte Expressionsraten für NPY und IL-6 [102]. Da bei Adipositas unter anderem Adipozytokine wie IL-6 und PAI-1 im weißen Fettgewebe produziert werden, was eine systemische Inflammation zur Folge hat [37], wäre die größere Fettgewebsmasse in hyperalimentierten Tieren eine mögliche Erklärung für die proinflammatorische Zytokinexpression und diese wiederum für die strukturellen renalen Veränderungen sowie für die eingeschränkte Nierenleistung. Klinische Studien, die erhöhte Entzündungsparameter im Serum übergewichtiger Kinder und in dem von Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen beweisen [69, 109], stützen diese These ebenso. Dennoch muss man bedenken, dass in dieser Studie die renal-intrinsische Expression gemessen wurde und daher eine alleinige Zytokinproduktion in Adipozyten unwahrscheinlich ist. Darüber hinaus kommen zum Beispiel Makrophagen, die in der Niere zirkulieren, als Produzenten für IL-6 in Frage, wie man es in einer Immunhistologie überprüfen müsste. Dies macht vor allem vor dem Hintergrund des proinflammatorischen Leptineffekts Sinn, dessen lokale Expression im WR 6 Wurf erhöht war, denn er fördert die Monozytenproliferation, die Differenzierung in Makrophagen und ebenso die Bildung von IL-6 [23].

Angesichts des hohen NPY Niveaus im WR 6 Wurf, wäre die unter 1.2 beschriebene neuroimmune Modulation eine andere Erklärung für den gemessenen Anstieg an IL-6: In der Niere befindet sich NPY in präsynaptischen Vesikeln, in denen es zusammen mit Norepinephrin gespeichert ist [72]. Die enthaltenden sympathischen Nerven befinden sich überwiegend perivaskulär [51]. Neuropeptid Y wirkt in Kooperation mit Katecholaminen auf Makrophagen, Neutrophile oder Lymphozyten [10] wobei es je

nach neuronaler Feuerrate und Konzentration des Norepinephrins im „synaptischen Spalt“, in Anwesenheit von NPY zur Aktivierung von α - oder α - und β - Rezeptoren kommt. Je nachdem, welche Rezeptoren aktiviert werden, kommt es zur Intensivierung oder Inhibition der IL-6 Sekretion [103]. Eine renale Sympathikusaktivierung könnte in gleicher Weise verbunden sein mit einer Freisetzung von Katecholaminen und NPY, woraufhin IL-6 sezerniert wird. Woher könnte nun die notwendige renale Sympathikusaktivierung herrühren? Es ist bekannt, dass Kortisol zum einen in der Nebennierenrinde die Adrenalinproduktion induziert [123] und zum anderen die β -Adrenozeptorexpression auf Zellen hochregulieren kann [68, 93]. Da eine Studie an natürlichen Long-Evans Rattenwürfen eine negative Korrelation zwischen der Wurfgröße und dem Serumkortisol ermitteln konnte [85], wäre zumindest in der WR 6 Gruppe ein höherer Kortisolspiegel denkbar, der mit einer Sympathikusaktivierung einher ginge. Hingegen Rödel et al. konnten den Zusammenhang nach dem Abstillen nur noch beweisen, wenn die Tiere vorher einer Testung unterzogen wurden, bei der die Ratten für zehn Minuten auf eine zum Teil offene Polyvinylchlorid (PVC) Fläche gesetzt wurden, welche sich in 80cm Höhe befand [85]. An dieser Stelle bedarf es daher ebenfalls weiterer Untersuchungen.

Ein anderer Mechanismus ist die Erhöhung der renalen Sympathikusaktivität durch das Peptidhormon Leptin [46]. Wie erwähnt, hatten hyperalimentierte Tiere keine Hyperleptinämie jedoch war ihre renale mRNA Expression an Leptin in der WR 6 Gruppe signifikant hochreguliert (Abb. 20). Möglicherweise existiert ein auto- oder parakriner Leptineffekt, welcher unter Umständen unabhängig vom Leptin aus Adipozyten funktioniert [3]. Interessanterweise ist eine Zunahme des Sympathotonus mit einer Progression renaler Erkrankungen verbunden [73]. Eine sympathische Überaktivität fördert die Bildung einer Glomerulosklerose und eventuell liegt hier die Erklärung für den profibrotischen Effekt von Leptin [121].

4.4 Modifikation der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix in postnatal hyperalimentierten Ratten

Nach postnataler Hyperalimentation zeigte sich eine vermehrte Anfärbbarkeit von Kollagen I in den Glomeruli, in der WR 6 Gruppe war diese signifikant (Abb. 16). Die in dieser Untersuchung festgestellte Steigerung der lokalen Leptin- und Kollagenexpression in hyperalimentierten Würfen erscheint in diesem Zusammenhang stimmig, da Leptin vermutlich über die Stimulation von *Transforming growth factor beta* (TGF- β) die Bildung von Bestandteilen der extrazellulären Matrix fördert [44, 119-

120]. Auch konnte ein Zusammenhang zwischen Adipositas und der frühen Entwicklung einer Glomerulosklerose noch vor der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie demonstriert werden [47, 106].

Yim et al. allerdings konnten nach früher postnataler Hyperalimentation mit drei Tieren pro Wurf zwar erhöhte Leptinspiegel jedoch eine Verminderung der PAI-1 Expression und keine Zeichen einer Glomerulosklerose finden [122]. Die Messungen in der Studie von Yim et al. fanden am Tag P28 statt, d.h. die Tiere waren zum Messzeitpunkt deutlich jünger als in der hier präsentierten Arbeit. Eventuell könnte es länger dauern bis nach dem Abstillen der programmierte Effekt der Inflammation und Leptinbildung mit Veränderung der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix eintritt. Dafür spricht auch die niedrige PAI-1 Expression bei Yim et al. da es ein profibrotischer Faktor bei diabetischer Glomerulosklerose und bei proliferativer Glomerulonephritis ist [26, 110].

4.5 Modifikation der Y-Rezeptor Expression durch postnatale Hyperalimentation

Die Genexpression des Y_1 - und auch des Y_2 -Rezeptor in der WR 6 Versuchsgruppe waren signifikant gegenüber der Kontrollgruppe vermindert (Abb. 18 und 19). In der WR 10 Gruppe zeigten sie sich die gleichen Tendenzen. Dies könnte ein kompensatorischer Mechanismus als Folge der hohen NPY Expression sein. Eine derartige Beobachtung wurde schon in Stromazellen des Knochenmarks von Mäusen gemacht, die sich in Osteoblasten differenzierten. Unter Stimulation mit NPY wurde die Y_1 -Rezeptor-mRNA signifikant herunter reguliert [108]. Darüber hinaus wurden in Zucker Ratten, die Adipositas als autosomal rezessives Merkmal vererben (fa/fa), Steigerungen der hypothalamischen NPY-mRNA mit gleichzeitiger Reduktion der Y_1 - und Y_5 -Rezeptor Expression um 25% bzw. 50% festgestellt [9, 16]. In einer anderen Untersuchung wurde den Nachkommen fettreich ernährter Muttertiere postnatal weiterhin eine fettreiche Diät zugeführt. Auch bei ihnen wurden unter anderem eine verstärkte NPY- und eine verminderte Y_1 -Rezeptor Expression gefunden [74]. Die Resultate dieser und oben genannter Studien zur Y_1 -Expression zeigen dementsprechend Ähnlichkeiten und bekräftigen die in der hier vorgelegten Studie gemachten Ergebnisse.

Im Gegensatz könnte die geringe Expression an Y_1 -Rezeptoren jedoch zu einer kompensatorischen Steigerung der NPY Expression führen. Die Signaltransduktion des Y_1 -Rezeptors findet über die Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK) 42/44 statt,

deren Phosphorylierung wahrscheinlich aufgrund der geringen Rezeptorexpression verringert war, wie Alejandro Alcázar et al. nachweisen konnten (Ergebnis nicht gezeigt [4]). Da die MAP-Kinasen an der Regulation der Aktivität der Na⁺/K⁺-ATPase und damit an der Natriuresis und Kaliuresis teilnehmen, erfüllen sie eine wichtige Funktion für die Niere und eine kompensatorische Hochregulation der NPY Expression liegt somit nahe [4].

Bezüglich der in dieser Arbeit beobachteten Entzündungsreaktion in der Niere sollte bedacht werden, dass die Expression bzw. Funktion des Y₁-Rezeptors auf Zellen des Immunsystems wie Makrophagen, die in der Niere zirkulieren, möglicherweise unverändert ist. Dies könnte die These von Makrophagen als Produzenten des IL-6 erneut untermauern.

4.6 Modifikation des renalen Systems zwischen Leptin und Neuropeptid Y in postnatal hyperalimentierten Ratten

Die Leptin-mRNA Expression in der WR 6 Versuchsgruppe war signifikant stärker als in der Kontrollgruppe und als in der WR 10 Gruppe (Abb. 20). Es ist bekannt, dass STAT3 die Genexpression von IL-10 fördert [15] und Leptin die von NPY hemmt [8]. Jedoch wies in dieser Untersuchung die WR 6 Gruppe einen signifikant höheren NPY-mRNA Gehalt auf als die Kontrollgruppe (Abb. 17), bei gleichzeitig signifikanter Abnahme des antiinflammatorischen IL-10 (Abb. 14). Diese Resultate deuten auf eine periphere Dysfunktion der Leptin Signalkaskade der Niere durch die postnatale Hyperalimentation hin. Tatsächlich zeigte die Messung von STAT3 im Western Blot eine verminderte Phosphorylierung desselben im WR 6 Wurf (Abb. 21), was eine geringere Leptinsignalgebung in den Zellkern zur Folge hat. Dies weist auf eine metabolische Programmierung der intrazellulären Leptin-NPY Achse durch postnatale Hyperalimentation in der Stillzeit hin, da die Steigerung der NPY Expression in der WR 6 Gruppe noch am Lebenstag P70, also lange nach dem Abstillen, beobachtbar war.

Lopez et al. demonstrierten einen Anstieg der NPY-mRNA im *Nucleus arcuatus* von Ratten aus SL Würfen trotz Hyperleptinämie [56]. Eine weitere Arbeitsgruppe konnte, obwohl in SL Würfen Adipositas und erhöhte Serumleptinwerte messbar waren, keinen Unterschied im Anteil NPY-immunopositiver Neurone zwischen SL Tieren und Kontrollgruppe nachweisen [79].

Demgemäß zeigen sich eindeutige Übereinstimmungen zwischen den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen – die sich allerdings auf den Hypothalamus beziehen – und dieser Studie. Außerdem lässt sich folgern, dass eine Wurfreduktion auf sechs anstatt

auf drei Tiere genügt, um die Leptinsignaltransduktion und damit die Balance zwischen NPY und Leptin zu stören. Es sollte aber bemerkt werden, dass die Wurfreduktion in der WR 10 Gruppe Wurf wohl nicht ausreichend war, um eine solche Veränderung hervorzurufen. So ließen sich Effekte wie der intrinsische renale Leptinanstieg auch nur in der WR 6 Gruppe nachweisen. Wie könnte nun ohne Hyperleptinämie ein auto- oder parakriner Effekt von Leptin zu erhöhter Sympathikusaktivität und damit zu einer Inflammation führen, obwohl die Signaltransduktion über aktives, phosphoryliertes STAT3 nach Hyperalimentation vermindert ist? Interessanterweise scheint unabhängig von einer metabolischen Postrezeptor-Leptinresistenz die renale Sympathikusaktivierung selektiv weiter zu funktionieren [84]. Somit besteht die Möglichkeit, dass Leptin über den Sympathikus zwar eine Entzündung mit Sekretion von IL-6 hervorruft aber parallel ein Teil seiner Zielgene wie IL-10 und NPY durch mangelnde Phosphorylierung von STAT3 nicht reguliert werden können.

Bates et al. räumen wiederum ein, dass eine gezielte Störung der STAT3 Signalgebung nicht zu einer Zunahme der NPY Expression im Hypothalamus führt [8], die NPY Genexpression demnach über einen anderen Mechanismus gehemmt werden müsste. Hierfür kommt die Signalgebung über die Phosphatidylinositolkinase 3 in Frage [67]. Um dies für das renale Leptin-NPY System zu verifizieren, könnten weitere Studien an Knock-out Mäusen eventuell Aufschluss geben.

4.7 Resistenzmechanismen der renalen Leptin-Signalkaskade postnatal hyperalimentierter Ratten

Die oben beschriebenen Resultate lassen die Entwicklung einer peripheren Leptinresistenz durch postnatale Hyperalimentation vermuten, die sich intrazellulär durch verminderte STAT3 Phosphorylierung darstellt. Da der Leptin-Rezeptor (OB-Rb) in seiner Expression hochreguliert war (Ergebnis nicht gezeigt [3]), konnte eine verringerte Rezeptordichte als Grund für die Leptinresistenz ausgeschlossen werden.

Weil SOCS3 die Phosphorylierung von STAT3 hemmt und ein entsprechender Anstieg dieses Inhibitors innerhalb der WR 6 Gruppe beobachtbar war (Abb. 22) ist dies als Ursprung der Leptinresistenz sehr wahrscheinlich. Rodrigues et al. fanden den gleichen Mechanismus im Hypothalamus aus SL Tieren [87], was diese These unterstützt. Daneben käme auch eine Resistenzbildung durch eine Dephosphorylierung von JAK-2 durch Protein Tyrosin Phosphatase (PTP) 1B in Betracht [35]. Dementsprechend wäre es möglich, dass eine Postrezeptor-Leptinresistenz an der Niere auch ohne die Entwicklung einer Hyperleptinämie manifestiert werden kann [3].

Für eine möglicherweise intakte Leptinsignalkaskade am Glomerulus spricht die Tatsache, dass SOCS-3 immunhistologisch jedoch dort kaum nachweisbar war. Somit würde dieses Ergebnis die profibrotische Wirksamkeit von Leptin noch unterstreichen [3].

4.8 Klinische Schlussfolgerungen und Überlegungen zu weiteren Untersuchungen

Es wird deutlich, welchen Stellenwert die Prophylaxe von postnataler Hyperalimentation einnimmt. Es konnte in klinischen Studien gezeigt werden, dass ein postnatales Aufholwachstum infolge Frühgeburtlichkeit oder bei SGA-Kindern mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Adipositas, *Diabetes mellitus* Typ II, kardiovaskulären Erkrankungen und Niereninsuffizienz einhergeht [24, 90]. Dennoch sollte durch adäquate Versorgung mit Nährstoffen vor allem auch bei SGA-Kindern eine verbesserte Entwicklung des kindlichen Zentralnervensystems erreicht werden [57]. Neben computerisierten Systemen für die parenterale Ernährung, welche zu signifikanter Verbesserung des Wachstums und der Lungenentwicklung führen [30], gibt es Therapiekonzepte, die bei früher hoher parenteraler Proteinaufnahme eine Reduktion insulinpflichtiger Hyperglykämien herbei führen können [61]. Vielleicht können diese neuen Konzepte die Inzidenz späterer Nierenerkrankungen bei jenen Risikogruppen senken. Neben weiteren tierexperimentellen Untersuchungen ist es von Bedeutung, dass vor allem humane prospektive Studien zur genaueren Bestimmung der Grenzwerte der postnatalen Proteinzufuhr durchgeführt werden, da nur sie das Kriterium der evidenzbasierten Medizin erfüllen. Vielleicht könnte eine Leptinresistenz auch beim Menschen schon vor der Entwicklung einer Adipositas als Marker für metabolische Programmierung nach IUGR dienen [21]. Im Anschluss könnte versucht werden, gezielt in den Metabolismus zwischen Leptin und NPY einzugreifen, zum Beispiel mit NPY- Antagonisten oder Leptin-Antikörpern.

Insgesamt bleibt zu unterstreichen, dass die Ernährung mit Muttermilch die bisher beste Alternative darstellt [91].

Literaturverzeichnis

1. Applied Biosystems, (2010) *Relative Quantitation using comparative C_T Getting Started Guide* Foster City. Copyright © 2012 Life Technologies Corporation. Used under permission. 05/2012. Part Number 4347824 Rev. F. p. 72.
2. Applied Biosystems, (2010) *TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol* Foster City. Copyright © 2012 Life Technologies Corporation. Used under permission. 05/2012. Part Number 4304449 Rev. D. p. 9.
3. Alejandro Alcázar, M.A., E. Boehler, E. Rother, K. Amann, C. Vohlen, S. von Horsten, C. Plank, and J. Dotsch, *Early Postnatal Hyperalimantation Impairs Renal Function via SOCS-3 Mediated Renal Postreceptor Leptin Resistance*. *Endocrinology*, 2012. **153**(3): p. 1397-410.
4. Alejandro Alcázar, M.A., E. Boehler, K. Amann, D. Klaffenbach, A. Hartner, I. Allabauer, L. Wagner, S. von Horsten, C. Plank, and J. Dotsch, *Persistent changes within the intrinsic kidney-associated NPY system and tubular function by litter size reduction*. *Nephrol Dial Transplant*, 2011. **26**(8): p. 2453-65.
5. Aronne, L.J. and Z.D. Thornton-Jones, *New targets for obesity pharmacotherapy*. *Clin Pharmacol Ther*, 2007. **81**(5): p. 748-52.
6. Ballesta, J., J.M. Polak, J.M. Allen, and S.R. Bloom, *The nerves of the juxtaglomerular apparatus of man and other mammals contain the potent peptide NPY*. *Histochemistry*, 1984. **80**(5): p. 483-5.
7. Barker, D.J., *In utero programming of chronic disease*. *Clin Sci (Lond)*, 1998. **95**(2): p. 115-28.
8. Bates, S.H., W.H. Stearns, T.A. Dundon, M. Schubert, A.W. Tso, Y. Wang, A.S. Banks, H.J. Lavery, A.K. Haq, E. Maratos-Flier, B.G. Neel, M.W. Schwartz, and M.G. Myers, Jr., *STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction*. *Nature*, 2003. **421**(6925): p. 856-9.
9. Beck, B., S. Richy, T. Dimitrov, and A. Stricker-Krongrad, *Opposite regulation of hypothalamic orexin and neuropeptide Y receptors and peptide expressions in obese Zucker rats*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **286**(3): p. 518-23.
10. Bedoui, S., N. Kawamura, R.H. Straub, R. Pabst, T. Yamamura, and S. von Horsten, *Relevance of neuropeptide Y for the neuroimmune crosstalk*. *J Neuroimmunol*, 2003. **134**(1-2): p. 1-11.
11. Bischoff, A. and M.C. Michel, *Renal effects of neuropeptide Y*. *Pflugers Arch*, 1998. **435**(4): p. 443-53.
12. Boubred, F., C. Buffat, J.M. Feuerstein, L. Daniel, M. Tsimaratos, C. Oliver, M. Lelievre-Pegorier, and U. Simeoni, *Effects of early postnatal hypernutrition on nephron number and long-term renal function and structure in rats*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007. **293**(6): p. F1944-9.

13. Boubred, F., L. Daniel, C. Buffat, J.M. Feuerstein, M. Tsimaratos, C. Oliver, F. Dignat-George, M. Lelievre-Pegorier, and U. Simeoni, *Early postnatal overfeeding induces early chronic renal dysfunction in adult male rats*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **297**(4): p. F943-51.
14. Bracci-Laudiero, L., L. Aloe, C. Stenfors, E. Theodorsson, and T. Lundeberg, *Development of systemic lupus erythematosus in mice is associated with alteration of neuropeptide concentrations in inflamed kidneys and immunoregulatory organs*. Neurosci Lett, 1998. **248**(2): p. 97-100.
15. Braunschweig, A., T.G. Poehlmann, S. Busch, E. Schleussner, and U.R. Markert, *Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS3) balance controls cytotoxicity and IL-10 expression in decidual-like natural killer cell line NK-92*. Am J Reprod Immunol, 2011. **66**(4): p. 329-35.
16. Bray, G.A., *The Zucker-fatty rat: a review*. Fed Proc, 1977. **36**(2): p. 148-53.
17. Chomczynski, P. and K. Mackey, *Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources*. Biotechniques, 1995. **19**(6): p. 942-5.
18. Clark, J.T., P.S. Kalra, W.R. Crowley, and S.P. Kalra, *Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats*. Endocrinology, 1984. **115**(1): p. 427-9.
19. Considine, R.V., M.K. Sinha, M.L. Heiman, A. Kriauciunas, T.W. Stephens, M.R. Nyce, J.P. Ohannesian, C.C. Marco, L.J. McKee, T.L. Bauer, and et al., *Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans*. N Engl J Med, 1996. **334**(5): p. 292-5.
20. Coresh, J., E. Selvin, L.A. Stevens, J. Manzi, J.W. Kusek, P. Eggers, F. Van Lente, and A.S. Levey, *Prevalence of chronic kidney disease in the United States*. JAMA, 2007. **298**(17): p. 2038-47.
21. Coupe, B., I. Grit, P. Hulin, G. Randuineau, and P. Parnet, *Postnatal growth after intrauterine growth restriction alters central leptin signal and energy homeostasis*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e30616.
22. Curfs, J.H., J.F. Meis, and J.A. Hoogkamp-Korstanje, *A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers*. Clin Microbiol Rev, 1997. **10**(4): p. 742-80.
23. de Heredia, F.P., S. Gomez-Martinez, and A. Marcos, *Obesity, inflammation and the immune system*. Proc Nutr Soc, 2012. **71**(2): p. 332-8.
24. Dulloo, A.G., J. Jacquet, J. Seydoux, and J.P. Montani, *The thrifty 'catch-up fat' phenotype: its impact on insulin sensitivity during growth trajectories to obesity and metabolic syndrome*. Int J Obes (Lond), 2006. **30 Suppl 4**: p. S23-35.

25. Eckert, W.A. and J. Kartenbeck, *Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie*. 1 ed. 1997, Berlin; Heidelberg; New York: Springer Verlag. 275. 69.
26. Eddy, A.A., *Plasminogen activator inhibitor-1 and the kidney*. Am J Physiol Renal Physiol, 2002. **283**(2): p. F209-20.
27. Edvinsson, L., E. Ekblad, R. Hakanson, and C. Wahlestedt, *Neuropeptide Y potentiates the effect of various vasoconstrictor agents on rabbit blood vessels*. Br J Pharmacol, 1984. **83**(2): p. 519-25.
28. Ejerblad, E., C.M. Fored, P. Lindblad, J. Fryzek, J.K. McLaughlin, and O. Nyren, *Obesity and risk for chronic renal failure*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(6): p. 1695-702.
29. Ekblad, E., L. Edvinsson, C. Wahlestedt, R. Uddman, R. Hakanson, and F. Sundler, *Neuropeptide Y co-exists and co-operates with noradrenaline in perivascular nerve fibers*. Regul Pept, 1984. **8**(3): p. 225-35.
30. Eleni-dit-Trolli, S., E. Kermorvant-Duchemin, C. Huon, M. Mokthari, K. Hussein, M.L. Brunet, C. Dupont, and A. Lapillonne, *Early individualised parenteral nutrition for preterm infants*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2009. **94**(2): p. F152-3.
31. Farooqi, I.S., G. Matarese, G.M. Lord, J.M. Keogh, E. Lawrence, C. Agwu, V. Sanna, S.A. Jebb, F. Perna, S. Fontana, R.I. Lechler, A.M. DePaoli, and S. O'Rahilly, *Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency*. J Clin Invest, 2002. **110**(8): p. 1093-103.
32. Felten, S.Y. and J. Olschowka, *Noradrenergic sympathetic innervation of the spleen: II. Tyrosine hydroxylase (TH)-positive nerve terminals form synapticalike contacts on lymphocytes in the splenic white pulp*. J Neurosci Res, 1987. **18**(1): p. 37-48.
33. Förster, V.T., *Zwischenmolekulare Energie-Wanderung und Fluoreszenz*. Anals of Physics, 1948. **2**: p. 55-75.
34. Frederich, R.C., A. Hamann, S. Anderson, B. Lollmann, B.B. Lowell, and J.S. Flier, *Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action*. Nat Med, 1995. **1**(12): p. 1311-4.
35. Fruhbeck, G., *Intracellular signalling pathways activated by leptin*. Biochem J, 2006. **393**(Pt 1): p. 7-20.
36. Fusch, C., K. Bauer, H.J. Bohles, F. Jochum, B. Koletzko, M. Krawinkel, K. Krohn, and S. Muhlebach, *Neonatology/Paediatrics - Guidelines on Parenteral Nutrition, Chapter 13*. Ger Med Sci, 2009. **7**: p. Doc15.
37. Gil, A., C. Maria Aguilera, M. Gil-Campos, and R. Canete, *Altered signalling and gene expression associated with the immune system and the inflammatory response in obesity*. Br J Nutr, 2007. **98 Suppl 1**: p. S121-6.

38. Glaum, S.R., R.J. Miller, H. Rhim, D. Maclean, L.M. Georgic, R.G. MacKenzie, and L. Grundemar, *Characterization of Y3 receptor-mediated synaptic inhibition by chimeric neuropeptide Y-peptide YY peptides in the rat brainstem*. Br J Pharmacol, 1997. **120**(3): p. 481-7.
39. Goldstein, S.L., J.C. Leung, and D.M. Silverstein, *Pro- and anti-inflammatory cytokines in chronic pediatric dialysis patients: effect of aspirin*. Clin J Am Soc Nephrol, 2006. **1**(5): p. 979-86.
40. Hales, C.N. and D.J. Barker, *Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis*. Diabetologia, 1992. **35**(7): p. 595-601.
41. Hales, C.N. and D.J. Barker, *The thrifty phenotype hypothesis*. Br Med Bull, 2001. **60**: p. 5-20.
42. Hall, J.E., E.D. Crook, D.W. Jones, M.R. Wofford, and P.M. Dubbert, *Mechanisms of obesity-associated cardiovascular and renal disease*. Am J Med Sci, 2002. **324**(3): p. 127-37.
43. Hallbach, J., *Klinische Chemie und Hämatologie für den Einstieg*. 2. Auflage ed. 2006, Stuttgart; New York: Thieme. 495. 32.
44. Han, D.C., M. Isono, S. Chen, A. Casaretto, S.W. Hong, G. Wolf, and F.N. Ziyadeh, *Leptin stimulates type I collagen production in db/db mesangial cells: glucose uptake and TGF-beta type II receptor expression*. Kidney Int, 2001. **59**(4): p. 1315-23.
45. Harle, P., R.H. Straub, R. Wiest, A. Mayer, J. Scholmerich, F. Atzeni, M. Carrabba, M. Cutolo, and P. Sarzi-Puttini, *Increase of sympathetic outflow measured by neuropeptide Y and decrease of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis tone in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: another example of uncoupling of response systems*. Ann Rheum Dis, 2006. **65**(1): p. 51-6.
46. Haynes, W.G., W.I. Sivitz, D.A. Morgan, S.A. Walsh, and A.L. Mark, *Sympathetic and cardiorenal actions of leptin*. Hypertension, 1997. **30**(3 Pt 2): p. 619-23.
47. Henegar, J.R., S.A. Bigler, L.K. Henegar, S.C. Tyagi, and J.E. Hall, *Functional and structural changes in the kidney in the early stages of obesity*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(6): p. 1211-7.
48. Hickman, J., C.P. , L.S. Roberts, A. Larson, H. L'Anson, and D.J. Eisenhour, *Integrated Principles of Zoology*. 13 ed. 2006, New York: McGraw-Hill. 896. 655.
49. Kalra, S.P. and P.S. Kalra, *Neuropeptide Y: a physiological orexigen modulated by the feedback action of ghrelin and leptin*. Endocrine, 2003. **22**(1): p. 49-56.
50. Khan, I.Y., V. Dekou, G. Douglas, R. Jensen, M.A. Hanson, L. Poston, and P.D. Taylor, *A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular*

- dysfunction in adult offspring*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **288**(1): p. R127-33.
51. Knight, D.S., R.D. Fabre, and J.A. Beal, *Identification of noradrenergic nerve terminals immunoreactive for neuropeptide Y and vasoactive intestinal peptide in the rat kidney*. Am J Anat, 1989. **184**(3): p. 190-204.
52. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
53. Larhammar, D. and E. Salaneck, *Molecular evolution of NPY receptor subtypes*. Neuropeptides, 2004. **38**(4): p. 141-51.
54. Larsson, J., A. Ekblom, K. Henriksson, T. Lundeberg, and E. Theodorsson, *Concentration of substance P, neurokinin A, calcitonin gene-related peptide, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide in synovial fluid from knee joints in patients suffering from rheumatoid arthritis*. Scand J Rheumatol, 1991. **20**(5): p. 326-35.
55. Lee, L.G., C.R. Connell, and W. Bloch, *Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(16): p. 3761-6.
56. Lopez, M., L.M. Seoane, S. Tovar, M.C. Garcia, R. Nogueiras, C. Dieguez, and R.M. Senaris, *A possible role of neuropeptide Y, agouti-related protein and leptin receptor isoforms in hypothalamic programming by perinatal feeding in the rat*. Diabetologia, 2005. **48**(1): p. 140-8.
57. Lucas, A., R. Morley, T.J. Cole, S.M. Gore, P.J. Lucas, P. Crowle, R. Pearse, A.J. Boon, and R. Powell, *Early diet in preterm babies and developmental status at 18 months*. Lancet, 1990. **335**(8704): p. 1477-81.
58. Lucas, A., *Programming by early nutrition in man*. Ciba Found Symp, 1991. **156**: p. 38-50; discussion 50-5.
59. Lumbers, E.R., *Development of renal function in the fetus: a review*. Reprod Fertil Dev, 1995. **7**(3): p. 415-26.
60. Luttmann, W., K. Bratke, M. Küpper, and D. Myrtek, *Immunology*. The experimenter series. 2006, Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press. 243. 113.
61. Mahaveer, A., C. Grime, and C. Morgan, *Increasing early protein intake is associated with a reduction in insulin-treated hyperglycemia in very preterm infants*. Nutr Clin Pract, 2012. **27**(3): p. 399-405.
62. Marquez, M.G., I. Cabrera, D.J. Serrano, and N. Sterin-Speziale, *Cell proliferation and morphometric changes in the rat kidney during postnatal development*. Anat Embryol (Berl), 2002. **205**(5-6): p. 431-40.
63. Martin, C.R., Y.F. Brown, R.A. Ehrenkranz, T.M. O'Shea, E.N. Allred, M.B. Belfort, M.C. McCormick, and A. Leviton, *Nutritional practices and growth*

- velocity in the first month of life in extremely premature infants*. Pediatrics, 2009. **124**(2): p. 649-57.
64. Michel, M.C., A. Beck-Sickinger, H. Cox, H.N. Doods, H. Herzog, D. Larhammar, R. Quirion, T. Schwartz, and T. Westfall, XVI. *International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors*. Pharmacol Rev, 1998. **50**(1): p. 143-50.
65. Morales, E., M.A. Valero, M. Leon, E. Hernandez, and M. Praga, *Beneficial effects of weight loss in overweight patients with chronic proteinuric nephropathies*. Am J Kidney Dis, 2003. **41**(2): p. 319-27.
66. Morris, M.J., E. Velkoska, and T.J. Cole, *Central and peripheral contributions to obesity-associated hypertension: impact of early overnourishment*. Exp Physiol, 2005. **90**(5): p. 697-702.
67. Morrison, C.D., G.J. Morton, K.D. Niswender, R.W. Gelling, and M.W. Schwartz, *Leptin inhibits hypothalamic Npy and Agrp gene expression via a mechanism that requires phosphatidylinositol 3-OH-kinase signaling*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **289**(6): p. E1051-7.
68. Nakada, M.T., J.M. Stadel, K.S. Poksay, and S.T. Crooke, *Glucocorticoid regulation of beta-adrenergic receptors in 3T3-L1 preadipocytes*. Mol Pharmacol, 1987. **31**(4): p. 377-84.
69. Neuman, G., R. Sagi, S. Shalitin, and S. Reif, *Serum inflammatory markers in overweight children and adolescents with non-alcoholic fatty liver disease*. Isr Med Assoc J, 2010. **12**(7): p. 410-5.
70. Nigam, S.K., A. Aperia, and B.M. Brenner, *Development and Maturation of the kidney*, in *In Brenner and Rector's: The kidney*, B.M. Brenner, Editor. 1996, W.B. Saunders: Philadelphia. p. 72-98.
71. Norvell, J.E. and R.G. MacBride, *Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactive nerve fibers in the human and monkey (Macaca fascicularis) kidney*. Neurosci Lett, 1989. **105**(1-2): p. 63-7.
72. Ohtomo, Y., B. Meister, T. Hokfelt, and A. Aperia, *Coexisting NPY and NE synergistically regulate renal tubular Na⁺, K(+)-ATPase activity*. Kidney Int, 1994. **45**(6): p. 1606-13.
73. Orth, S.R., K. Amann, K. Strojek, and E. Ritz, *Sympathetic overactivity and arterial hypertension in renal failure*. Nephrol Dial Transplant, 2001. **16 Suppl 1**: p. 67-9.
74. Page, K.C., R.E. Malik, J.A. Ripple, and E.K. Anday, *Maternal and postweaning diet interaction alters hypothalamic gene expression and modulates response to a high-fat diet in male offspring*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2009. **297**(4): p. R1049-57.

75. Park, J.H., D.A. Stoffers, R.D. Nicholls, and R.A. Simmons, *Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1*. J Clin Invest, 2008. **118**(6): p. 2316-24.
76. Patel, M.S., M. Srinivasan, and S.G. Laychock, *Metabolic programming: Role of nutrition in the immediate postnatal life*. J Inherit Metab Dis, 2009. **32**(2): p. 218-28.
77. Pingoud, A. and C. Urbanke, *Arbeitsmethoden der Biochemie*. 1 ed. 1997, Berlin; New York: Walter de Gruyter 304. 224.
78. Plagemann, A., T. Harder, K. Melchior, A. Rake, W. Rohde, and G. Dorner, *Elevation of hypothalamic neuropeptide Y-neurons in adult offspring of diabetic mother rats*. Neuroreport, 1999. **10**(15): p. 3211-6.
79. Plagemann, A., T. Harder, A. Rake, T. Waas, K. Melchior, T. Ziska, W. Rohde, and G. Dorner, *Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y-system in neonatally overfed weanling rats*. J Neuroendocrinol, 1999. **11**(7): p. 541-6.
80. Plagemann, A., *Perinatal programming and functional teratogenesis: impact on body weight regulation and obesity*. Physiol Behav, 2005. **86**(5): p. 661-8.
81. Plagemann, A., *Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake*. Horm Res, 2006. **65 Suppl 3**: p. 83-9.
82. Plagemann, A., T. Harder, M. Brunn, A. Harder, K. Roepke, M. Wittrock-Staar, T. Ziska, K. Schellong, E. Rodekamp, K. Melchior, and J.W. Dudenhausen, *Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 20): p. 4963-76.
83. Plagemann, A., K. Roepke, T. Harder, M. Brunn, A. Harder, M. Wittrock-Staar, T. Ziska, K. Schellong, E. Rodekamp, K. Melchior, and J.W. Dudenhausen, *Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding*. J Perinat Med, 2010.
84. Rahmouni, K., D.A. Morgan, G.M. Morgan, A.L. Mark, and W.G. Haynes, *Role of selective leptin resistance in diet-induced obesity hypertension*. Diabetes, 2005. **54**(7): p. 2012-8.
85. Rödel, H.G., S. Meyer, G. Prager, V. Stefanski, and R. Hudson, *Litter size is negatively correlated with corticosterone levels in weanling and juvenile laboratory rats*. Physiol Behav, 2010. **99**(5): p. 644-50.
86. Rodrigues, A.L., E.G. de Moura, M.C. Passos, S.C. Dutra, and P.C. Lisboa, *Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 11): p. 2647-61.

87. Rodrigues, A.L., E.G. de Moura, M.C. Passos, I.H. Trevenzoli, E.P. da Conceicao, I.T. Bonono, J.F. Neto, and P.C. Lisboa, *Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats*. J Nutr Biochem, 2011. **22**(2): p. 109-17.
88. Santavirta, N., Y.T. Konttinen, J. Tornwall, M. Segerberg, S. Santavirta, M. Matucci-Cerinic, and H. Bjorvell, *Neuropeptides of the autonomic nervous system in Sjogren's syndrome*. Ann Rheum Dis, 1997. **56**(12): p. 737-40.
89. Satoh, C., F. Satoh, K. Takahashi, O. Murakami, M. Sone, K. Totsune, T. Yabe, M. Ohneda, M. Fukuda, K. Sugimura, S. Ogawa, H. Nagakubo, T. Sato, and T. Mouri, *Elevated plasma immunoreactive neuropeptide Y concentrations and its increased urinary excretion in patients with advanced diabetic nephropathy*. Endocr J, 1999. **46**(1): p. 139-46.
90. Savino, A., P. Pelliccia, F. Chiarelli, and A. Mohn, *Obesity-related renal injury in childhood*. Horm Res Paediatr, 2010. **73**(5): p. 303-11.
91. Schanler, R.J., *Mother's own milk, donor human milk, and preterm formulas in the feeding of extremely premature infants*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2007. **45 Suppl 3**: p. S175-7.
92. Schmidt, I., A. Fritz, C. Scholch, D. Schneider, E. Simon, and A. Plagemann, *The effect of leptin treatment on the development of obesity in overfed suckling Wistar rats*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2001. **25**(8): p. 1168-74.
93. Schramm, C.M., *beta-adrenergic relaxation of rabbit tracheal smooth muscle: a receptor deficit that improves with corticosteroid administration*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. **292**(1): p. 280-7.
94. Serdaroglu, E. and S. Mir, *Protein-osmolality ratio for quantification of proteinuria in children*. Clin Exp Nephrol, 2008. **12**(5): p. 354-7.
95. Sheu, J.N., M.C. Chen, S.M. Chen, S.L. Chen, S.Y. Chiou, and K.H. Lue, *Relationship between serum and urine interleukin-6 elevations and renal scarring in children with acute pyelonephritis*. Scand J Urol Nephrol, 2009. **43**(2): p. 133-7.
96. Singhal, A., *Early nutrition and long-term cardiovascular health*. Nutr Rev, 2006. **64**(5 Pt 2): p. S44-9; discussion S72-91.
97. Singhal, A., T.J. Cole, M. Fewtrell, K. Kennedy, T. Stephenson, A. Elias-Jones, and A. Lucas, *Promotion of faster weight gain in infants born small for gestational age: is there an adverse effect on later blood pressure?* Circulation, 2007. **115**(2): p. 213-20.
98. Speller, A.M. and D.B. Moffat, *Tubulo-vascular relationships in the developing kidney*. J Anat, 1977. **123**(Pt 2): p. 487-500.
99. Stanley, B.G. and S.F. Leibowitz, *Neuropeptide Y: stimulation of feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus*. Life Sci, 1984. **35**(26): p. 2635-42.

100. Stettler, N., S.K. Kumanyika, S.H. Katz, B.S. Zemel, and V.A. Stallings, *Rapid weight gain during infancy and obesity in young adulthood in a cohort of African Americans*. Am J Clin Nutr, 2003. **77**(6): p. 1374-8.
101. Stettler, N., V.A. Stallings, A.B. Troxel, J. Zhao, R. Schinnar, S.E. Nelson, E.E. Ziegler, and B.L. Strom, *Weight gain in the first week of life and overweight in adulthood: a cohort study of European American subjects fed infant formula*. Circulation, 2005. **111**(15): p. 1897-903.
102. Stofkova, A., M. Skurlova, A. Kiss, B. Zelezna, S. Zorad, and J. Jurcovicova, *Activation of hypothalamic NPY, AgRP, MC4R, AND IL-6 mRNA levels in young Lewis rats with early-life diet-induced obesity*. Endocr Regul, 2009. **43**(3): p. 99-106.
103. Straub, R.H., T. Schaller, L.E. Miller, S. von Horsten, D.S. Jessop, W. Falk, and J. Scholmerich, *Neuropeptide Y cotransmission with norepinephrine in the sympathetic nerve-macrophage interplay*. J Neurochem, 2000. **75**(6): p. 2464-71.
104. Sucajtyś-Szulc, E., J. Karbowska, Z. Kochan, W. Wolyniec, M. Chmielewski, B. Rutkowski, and J. Swierczynski, *Up-regulation of NPY gene expression in hypothalamus of rats with experimental chronic renal failure*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1772**(1): p. 26-31.
105. Takahashi, K., T. Mouri, K. Itoi, M. Sone, M. Ohneda, O. Murakami, M. Nozuki, Y. Tachibana, and K. Yoshinaga, *Increased plasma immunoreactive neuropeptide Y concentrations in pheochromocytoma and chronic renal failure*. J Hypertens, 1987. **5**(6): p. 749-53.
106. Tang, J., H. Yan, and S. Zhuang, *Inflammation and oxidative stress in obesity-related glomerulopathy*. Int J Nephrol, 2012. **2012**: p. 608397.
107. Tatemoto, K., M. Carlquist, and V. Mutt, *Neuropeptide Y--a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide*. Nature, 1982. **296**(5858): p. 659-60.
108. Teixeira, L., D.M. Sousa, A.F. Nunes, M.M. Sousa, H. Herzog, and M. Lamghari, *NPY revealed as a critical modulator of osteoblast function in vitro: new insights into the role of Y1 and Y2 receptors*. J Cell Biochem, 2009. **107**(5): p. 908-16.
109. Teplan, V., Jr., F. Vyhnanek, R. Gurlich, M. Haluzik, J. Racek, I. Vyhnankova, M. Stollova, and V. Teplan, *Increased proinflammatory cytokine production in adipose tissue of obese patients with chronic kidney disease*. Wien Klin Wochenschr, 2010. **122**(15-16): p. 466-73.
110. Tesch, G.H. and A.K. Lim, *Recent insights into diabetic renal injury from the db/db mouse model of type 2 diabetic nephropathy*. Am J Physiol Renal Physiol, 2011. **300**(2): p. F301-10.
111. Thüroff, J.W., R. Beetz, R. Stein, and A. Schröder, *Kinderurologie in Klinik und Praxis*. 3 ed. 2011, Stuttgart: Thieme. 776. 5.

112. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
113. Velkoska, E., T.J. Cole, R.G. Dean, L.M. Burrell, and M.J. Morris, *Early undernutrition leads to long-lasting reductions in body weight and adiposity whereas increased intake increases cardiac fibrosis in male rats*. J Nutr, 2008. **138**(9): p. 1622-7.
114. Wahlestedt, C. and D.J. Reis, *Neuropeptide Y-related peptides and their receptors--are the receptors potential therapeutic drug targets?* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1993. **33**: p. 309-52.
115. Wan, C.P. and B.H. Lau, *Neuropeptide Y receptor subtypes*. Life Sci, 1995. **56**(13): p. 1055-64.
116. Wang, Y., X. Chen, M.J. Klag, and B. Caballero, *Epidemic of childhood obesity: implications for kidney disease*. Adv Chronic Kidney Dis, 2006. **13**(4): p. 336-51.
117. Wheway, J., H. Herzog, and F. Mackay, *The Y1 receptor for NPY: a key modulator of the adaptive immune system*. Peptides, 2007. **28**(2): p. 453-8.
118. Wink, M., A. Mohr, H. Weiher, I. Herr, and R. Zwacka, *Molekulare Biotechnologie: Konzepte, Methoden und Anwendungen*. 2 ed, ed. M. Wink. 2011, Weinheim: Wiley-VCH. 688. 150.
119. Wolf, G., A. Hamann, D.C. Han, U. Helmchen, F. Thaiss, F.N. Ziyadeh, and R.A. Stahl, *Leptin stimulates proliferation and TGF-beta expression in renal glomerular endothelial cells: potential role in glomerulosclerosis [see comments]*. Kidney Int, 1999. **56**(3): p. 860-72.
120. Wolf, G., S. Chen, D.C. Han, and F.N. Ziyadeh, *Leptin and renal disease*. Am J Kidney Dis, 2002. **39**(1): p. 1-11.
121. Wolf, G. and F.N. Ziyadeh, *Leptin and renal fibrosis*. Contrib Nephrol, 2006. **151**: p. 175-83.
122. Yim, H.E., K.S. Ha, I.S. Bae, K.H. Yoo, Y.S. Hong, and J.W. Lee, *Postnatal early overnutrition dysregulates the intrarenal renin-angiotensin system and extracellular matrix-linked molecules in juvenile male rats*. J Nutr Biochem, 2011.
123. Zachariassen, R.D. and W.S. Newcomer, *Influence of corticosterone on the stress-induced elevation of phenylethanolamine-N-methyl transferase activity in the avian adrenal*. Gen Comp Endocrinol, 1975. **25**(3): p. 332-8.
124. Zoccali, C. and F. Mallamaci, *Adiponectin and leptin in chronic kidney disease: causal factors or mere risk markers?* J Ren Nutr, 2011. **21**(1): p. 87-91.
125. Zoccali, C. and F. Mallamaci, *Does adipose tissue have a key role in inflammation in CKD?* J Intern Med, 2011. **269**(4): p. 407-9.

126. Zoccali, C. and F. Mallamaci, *Does adipose tissue have a key role in inflammation in CKD?* J Intern Med, 2011.

Abkürzungsverzeichnis

$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode	Delta-Delta-Ct-Methode
5-HT	5-Hydroxytryptamin; Serotonin
5-HT _{1B} r	5-Hydroxytryptamin Rezeptor 1B
5-HT _{2C} r	5-Hydroxytryptamin Rezeptor 2C
AgRP	Agouti-related protein
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovinem-Serum-Albumin
CART	<i>Cocaine-and-amphetamine-regulated transcript</i>
CB ₁ r	Cannabinoid-1 Rezeptor
cDNA	<i>copy</i> Desoxyribonukleinsäure
CRH	<i>Corticotropin-releasing hormone</i>
DANN	Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNase	Desoxyribonukleinsäure-ase Reaktion
dNTPs	Desoxyribonukleotide
EC	Endocannabinoide
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FRET	Fluoreszenz- (oder Förster) Resonanz-Energie-Transfer
GABA	Gamma-aminobuttersäure (<i>engl. Gamma-aminobutyric acid</i>)
GFR	Glomerulären Filtrationsrate
HLPC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>Streptavidin-Horseradish-Peroxidase</i>
IFN- γ	Interferon γ
IL-10	Interleukin 10
IL-6	Interleukin 6
insr	Insulin Rezeptor
IUGR	<i>intrauterine growth restriction</i>
JAK-2	Januskinase 2
KG	Kontrollgruppe
KWR	Wurf ohne Wurfreduktion
P	postnataler Lebenstag

lepr	Leptin Rezeptor
LHA	Lateraler Hypothalamus
MAPK 42/44	Mitogen-aktivierte Protein Kinasen 42/44
MC4r	
MCH	<i>Melanin-concentrating hormone</i>
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NC	Nitrocellulose
NE	Norepinephrin
NF-kappaB	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
NPY	Neuropeptid Y
OB-R b	<i>Obesity receptor b</i>
Oligo-dT <i>Primer</i>	Oligonukleotid <i>Primer</i>
ORG	<i>Obesity related glomerulopathy</i>
ORX	Orexin
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>Polymerase chain reaction</i>)
Phospho-STAT-3; pSTAT3	Phosphoryliertes STAT-3
POMC	Proopiomelanocortin
PTP 1B	Protein Tyrosin Phosphatase 1B
PVC	Polyvinylchlorid
PVN	<i>Nucleus paraventricularis</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (<i>RT-PCR</i>)
<i>Sandwich-ELISA</i>	<i>Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	<i>Standard error of the mean</i>

SGA	<i>small for gestational age</i>
SL	<i>small litters</i>
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SOCS-3	<i>Suppressor of cytokine signaling 3</i>
STAT-3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- β 1	<i>Transforming growth factor beta 1</i>
Total-STAT-3; STAT3	unphosphoryliertes STAT-3
VG	Versuchsgruppe
WR 10	Wurfreduktion auf 10 Tiere
WR 6	Wurfreduktion auf 6 Tiere
Y ₁ -Rezeptor	NPY-Rezeptor 1
Y ₂ -Rezeptor	NPY-Rezeptor 2
α -MSH	α -Melanozyten-stimulierendes Hormon

Verzeichnis der Vorveröffentlichungen

Alejandro Alcázar, M.A., E. Boehler, K. Amann, D. Klaffenbach, A. Hartner, I. Allabauer, L. Wagner, S. von Horsten, C. Plank, and J. Dotsch, *Persistent changes within the intrinsic kidney-associated NPY system and tubular function by litter size reduction*. Nephrol Dial Transplant, 2011. **26**(8): p. 2453-65.

Alejandro Alcázar, M.A., E. Boehler, E. Rother, K. Amann, C. Vohlen, S. von Horsten, C. Plank, and J. Dotsch, *Early Postnatal Hyperalimentation Impairs Renal Function via SOCS-3 Mediated Renal Postreceptor Leptin Resistance*. Endocrinology, 2012. **153**(3): p. 1397-4.

Anhang

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Actin: Goat Polyclonal Anti-rat Antibody Lot: B1209	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland	1:1500
Collagen I: Rabbit Anti-rat Antibody Lot: 230807	AbD Serotec, Düsseldorf, Deutschland	1:50
Goat Anti-rabbit Antibody #7074	Cell Signaling, Frankfurt, Deutschland	1:1500
Goat Anti-rabbit Antibody Lot: U1001	Vector Laboratories, Peterborough, UK	1:500
Horse Anti-Mouse Antibody #7076	Cell Signaling, Frankfurt, Deutschland	1:1000-1:3000
IL-6: Rabbit Anti-rat Antibody (ab 6672)	Abcam, Cambridge, UK	1:400
Phospho-Stat 3 (Tyr 705): Rabbit Anti-rat Antibody #9131	Cell Signaling, Frankfurt, Deutschland	1:1000
Rabbit Anti-Goat Antibody	Dianova, Hamburg, Deutschland	1:1500
SOCS3: Rabbit Anti-rat Antibody #2923	Cell Signaling, Frankfurt, Deutschland	1:1000
Stat 3: Mouse Anti-rat Antibody (124H6) #9139	Cell Signaling, Frankfurt, Deutschland	1:1000

Primer für Reverse Transkription und TaqMan Polymerase-Kettenreaktion

Primer	Hersteller
Oligo_dt_1 0,5µg/µl	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
Primer random p(dN) ₆ 2µg/µl	Roche, Basel, Schweiz

Alle folgenden Primer wurden von Eurofins MWG Operon bezogen.

Bezeichnung	Sequenz	Basenpaare
GAPDH	Taq TTC CAG GAG CGA GAT CCC GTC AAG	24
	For ACG GGA AAC CCA TCA CCA T	19
	Rev CCA GCA TCA CCC CAT TTG A	19
beta-Actin	Taq CAC TAT CGG CAA TGA GCG GTT CCG	24
	For TGA GCT GCC TGA CGG TCA G	19
	Rev TGC CAC AGG ATT CCA TAC CC	20
NPY	Taq CAA TCT CAT CAC CAG ACA GAG ATA TGG CAA GA	32
	for AGC AGA GGA CAT GGC CAG ATA C	22
	rev TGA AAT CAG TGT CTC AGG GCT G	22

NPY-R1	taq	TCC ACC TGC GTC AAC CCC ATC TTT TA	26
	for	CCA CCT CAC GGC CAT GAT	18
	rev	TGG AAA TTT TTG TTC AGG AAT CC	23
NPY-R2	taq	AGC CGG AGC TCA TAG ACA GCA CCA A	25
	for	GGT GAG TTG CCC CCT GAT C	19
	rev	ACC ACC TGC ACC TCA ACC A	19
IL-10	taq	CGC TGT CAT CGA TTT CTC CCC TGT GA	26
	for	GAA GCT GAA GAC CCT CTG GAT ACA	24
	rev	CCT TTG TCT TGG AGC TTA TTA AAA TCA	27
IL-6	taq	AAT CTG CTC TGG TCT TCT GGA GTT CCG TTT CTA	33
	for	TCC AAA CTG GAT ATA ACC AGG AAA T	25
	rev	TTG TCT TTC TTG TTA TCT TGT AAG TTG TTC TT	32
TGFB1	taq	ACC GCA ACA ACG CAA TCT ATG ACA	24
	for	CAC CCG CGT GCT AAT GGT	18
	rev	GGC ACT GCT TCC CGA ATG	18
MCP1	taq	TCA CGC TTC TGG GCC TGT TGT TCA	24
	for	CCT CCA CCA CTA TGC AGG TCT C	22
	rev	GCA CGT GGA TGC TAC AGG C	19
PAI-1	taq	CCG CCT CCT CAT CCT GCC TAA GTT CTC T	28
	for	TCC GCC ATC ACC AAC ATT TT	20
	rev	GTC AGT CAT GCC CAG CTT CTC	21
Leptin	taq	TCA ATG ACA TTT CAC ACA CGC AGT CGG	27
	for	ATG ACA CCA AAA CCC TCA TCA AG	23
	rev	TGA AGT CCA AAC CGG TGA CC	20
OBRIk	taq	TCA CAT ACA GAA ATT CCC AGT GTA ACA AAA CC	32
	for	CAG GTG TCT ATC TCT GAA GTA AG	23
	rev	GAT AGG CCA GGT TAA GTG CAG	21
OBRIa	taq	TCA GAG TCA ACC CTC AGT TAA ATA TGC AAC GCT	33
	for	TCA GAG CAC CCA GGG AAC C	19
	rev	ATA GCC CCT TGC TCT TCA TCA G	22

Verwendete Software

Ascent Software Version 2.6	Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Deutschland
Meta Vue Imaging System Version 7.0r3	Molecular Devices, Downingtown, USA
Prism 4 Version 4.03	Graph Pad Software, San Diego, USA
Quantity One AD Analysis Software Version 4.6.3	Biorad, München, Deutschland

Temperatur- und Zeitschema für die TaqMan Polymerase-Kettenreaktion

Temperatur	Zeit	Wiederholungen	Funktion
50° C	2:00 min	1	UNG Aktivierung
95° C	10:00 min	1	Denaturierung
95° C	15 sec	40	Denaturierung
60° C	1 min		Annealing und Extension

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Jörg Dötsch für die Überlassung des Themas und seine steten Bemühungen, den Studierenden die Pädiatrie näher zu bringen. Er begegnete mir und meinen Kommilitonen, sei es während der Visite, im Labor oder in Besprechungen immer mit Freundlichkeit, Geduld und großem Engagement.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. Miguel A. Alcázar bedanken, der mich während meiner Arbeit im Labor und der Verfassung meiner Dissertation tatkräftig unterstützt hat, sei es mit seinem Fachwissen und seiner Begeisterung für die Wissenschaft, seiner Geduld oder seiner fröhlichen Art. Vielen Dank auch für die geduldige Korrektur und die inhaltlichen Anregungen.

Außerdem möchte ich mich natürlich bei der gesamten ehemaligen Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dötsch bedanken, allen voran Frau Julia Dobner und Frau Ida Allabauer, sowie dem sonstigen Laborteam des C-Baus, die stets mit Rat und Tat zur Seite standen, auch ungeachtet der Tageszeit.

Zum Schluß bedanke ich mich bei meiner Familie, meinen Freunden und meinem Partner für die große Unterstützung während der Zeit der Promotion sowie für das Korrekturlesen.