

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. J. Dötsch

Intrauterine Wachstumsrestriktion und frühe postnatale Ernährung beeinflussen den Kollagen- gehalt in den Nieren weiblicher adoleszenter Ratten

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Magdalena Caroline Zelck
aus Altena (Westf.)

promoviert am 26. August 2025

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

Druckjahr 2025

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. J. W. Dötsch

2. Gutachter: Privatdozent Dr. med. L. Völker

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Dr. med. Eva Nüsken, Dr. med. Kai-Dietrich Nüsken, Dr. nat. med. Jenny Voggel

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die meinem Projekt zugrundeliegenden Tierversuche inklusive der Operation und Tötung der Versuchstiere sowie nachfolgender Organentnahme wurden ohne meine Mitarbeit durch die Arbeitsgruppe „Renale Programmierung“ der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln, insbesondere durch Herrn Dr. med. Kai-Dietrich Nüsken, Frau Dr. nat. med. Jenny Voggel, Frau Maria Wohlfahrt und Herrn Gregor Fink, durchgeführt.

Folgende Arbeiten habe ich im Rahmen dieser Dissertationsschrift selbstständig durchgeführt:

- Anfertigung histologischer Schnitte unter Anleitung der medizinisch-technischen Assistenten Maria Wohlfahrt
- Färbung und Auswertung der histologischen Schnitte unter Anleitung von Frau Dr. nat. med. Jenny Voggel und der medizinisch-technischen Assistenten Frau Maria Wohlfahrt und Herrn Gregor Fink
- Isolation von Proteinen unter Anleitung von Frau Dr. nat. med. Jenny Voggel und der biologisch-technischen Assistentin Frau Maria Wohlfahrt
- Anfertigung der Western Blots (mit Ausnahme der Expressionsbestimmung des Proteins Cyclin D1, welche durch Herrn Lukas Gmachl erfolgte) unter Anleitung von Frau Dr. nat. med. Jenny Voggel und der biologisch-technischen Assistentin Frau Maria Wohlfahrt
- Statistische Auswertung der histologischen und Western-Blot-Ergebnisse unter Anleitung von Frau Dr. med. Eva Nüsken, Herrn Dr. med. Kai-Dietrich Nüsken und Frau Dr. nat. med. Jenny Voggel
- Interpretation der Ergebnisse der Matrisom-Analyse unter Anleitung von Frau Dr. nat. med. Jenny Voggel

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 12.03.2025

Danksagung

Zunächst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Jörg Dötsch für die Möglichkeit, an Ihrer Klinik promovieren zu dürfen, und die vermittelte Begeisterung für das Fach Pädiatrie.

Großen Dank möchte ich meiner Betreuerin Frau Dr. med. Eva Nüsken und meinem Betreuer Herrn Dr. med. Kai-Dietrich Nüsken aussprechen. Ich konnte mich stets mit meinen Fragen an beide wenden, hatte große Freude am wissenschaftlichen Austausch mit ihnen und habe viel auf dem Gebiet der Forschung von ihnen lernen können.

Darüber hinaus möchte ich herzlich Frau Dr. nat. med. Jenny Voggel danken für Ihre tägliche Begleitung, Unterstützung und Motivation während aber auch nach meiner Zeit im Labor.

Mein Dank gilt auch allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere Frau Maria Wohlfahrt und Herrn Gregor Fink, für die ausführliche methodische Anleitung, aber auch für die schöne Atmosphäre.

Abschließend bin ich unendlich dankbar für die große Unterstützung meiner Eltern, meiner Freunde und meines Partners. Danke fürs Lesen, Ermutigen und Dasein.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	9
1 Zusammenfassung	12
2 Einleitung	15
2.1 Perinatale Programmierung der Niere	15
2.2 Intrauterine Wachstumsrestriktion und Versuchsmodell	15
2.3 Folgen der IUGR auf die Niere	16
2.4 Einfluss Omega-3-Fettsäure- und Cholin-reicher Nahrung	17
2.5 Fragestellung	20
3 Material und Methoden	21
3.1 Versuchsaufbau und Tiermodelle	21
3.2 Histologische Untersuchungen	22
3.2.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	22
3.2.1.2 Bestimmung der Glomeruluszahl und der glomerulären Fläche	23
3.2.2.1 Pikro-Sirius-Rot-Färbung	24
3.2.2.2 Bestimmung der kollagenhaltigen Areale	24
3.2.3.1 Immunhistochemische Färbungen	25
3.2.3.2 Zählung der positiven Zellen	26
3.2.3.3 Bestimmung der positiven Fläche	27
3.2.4.1 Immunfluoreszenzfärbungen	27
3.2.4.2 Darstellung der positiven Zellen	28
3.3 Western Blot	28
3.3.1 Proteinisolation und Messung der Proteinkonzentration	28
3.3.2 Gelelektrophorese	29
3.3.3 Proteintransfer	30
3.3.4 Proteindetektion	30
3.3.5 Auswertung	31

3.4 Matrisomanalyse	31
3.4.1 Proteinisolation und Probenaufbereitung	31
3.4.2 Massenspektrometrie	32
3.4.3 Auswertung	33
3.5 Statistische Auswertung	33
4 Ergebnisse	35
4.1 Inflammation	35
4.1.1 Immunhistochemische CD68-Färbung: Die N3PUFA-Nahrungsintervention vermindert bei Tieren nach intrauterinem Stress die Infiltration des Nierengewebes mit Makrophagen.	35
4.1.2 Immunhistochemische NF- κ B p65-Färbung: Weder IUGR noch N3PUFA verändern signifikant die Transkription proinflammatorischer Gene.	38
4.2 Zellproliferation	40
4.2.1 Immunhistochemische Ki-67-Färbung: Histologisch zeigen sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Anzahl proliferierender Zellen.	40
4.2.2 Proliferationsmarker im Western Blot: Auf Proteinebene lässt sich bei Tieren nach intrauterinem Stress eine verstärkte Proliferation im Nierenkortex nachweisen.	43
4.2.3 Immunfluoreszenzfärbung PDGFR β & PCNA: Eine Zuordnung der Proliferation zu einer spezifischen PDGFR β -exprimierenden Zellart war in der Gruppe nach intrauteriner Wachstumsrestriktion ausgelöst durch intrauterinen Stress nicht möglich.	44
4.2.4 Immunfluoreszenzfärbung CD68 & Ki-67: Es zeigt sich eine Koexpression von Makrophagen- sowie Proliferationsmarkern in Nierenrinde und -mark nach intrauteriner Wachstumsrestriktion ausgelöst durch intrauterinen Stress.	46
4.2.5 Signalwege der Proliferation im Western Blot: Die gesteigerte Expression von Proliferationsmarkern bei Tieren nach intrauterinem Stress lässt sich eventuell auf eine Aktivierung der Kinasen ERK1/2 zurückführen.	49
4.3 Extrazelluläre Matrix	53
4.3.1 Piko-Sirius-Rot-Färbung: Bei Tieren mit intrauteriner Wachstumsrestriktion durch LIG zeigt sich eine verminderte Kollagenanreicherung in der Niere.	53
4.3.2 Fibrosemarker im Western Blot: Nach IUGR ergibt sich eine vermehrte TGF β 1-Expression, die nach IUS stärker als nach LIG zu beobachten ist.	55
4.3.3 Matrisomanalyse: Bei LIG-Tieren mit N3PUFA-Intervention zeigen sich 12 Proteine des Matrisoms herabreguliert, welche bei LIG-Tieren mit Standardnahrung im Vergleich zu den Kontrolltieren hochreguliert waren.	56

4.4 Glomeruläre Morphologie	60
4.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung: Die Glomeruluszahl und die glomeruläre Fläche zeigen sich unbeeinflusst von IUGR oder N3PUFA bei weiblichen Ratten im jungen Erwachsenenalter.	60
4.2.2 Immunhistochemische WT-1-Färbung: Ein veränderte Podozytenzahl nach IUGR oder N3PUFA lässt sich bei weiblichen Ratten nicht nachweisen.	61
4.5 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse	63
5 Diskussion	64
5.1 Inflammation	64
5.2 Zellproliferation	65
5.3 Extrazelluläre Matrix	67
5.4 Glomeruläre Morphologie	69
5.5 Limitationen der Arbeit	71
5.6 Fazit	72
6 Literaturverzeichnis	73
7 Anhang	83
7.1 Tabellenverzeichnis	83
7.2 Abbildungsverzeichnis	98
8 Vorabveröffentlichung von Ergebnissen	100

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
20-HETE	20-Hydroxyeicosatetraensäure
AA	Arachidonsäure
Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	bovines Serumalbumin
CD68	cluster of differentiation 68
CECAD	Exzellenzcluster Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases
CKD	chronische Nierenerkrankung
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CONTR	Kontrollnahrung
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DHA	Docosahexaensäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	embryonaler Tag
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPA	Eicosapentaensäure
ERK1/2	extracellular signal regulated kinases 1/2
EZM	extrazelluläre Matrix
FDR	Falscherkennungsrate
g	Gramm
GA	Gestationsalter
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GO	Gene Ontology
GSI	Glomeruloskleroseindex
HCl	Salzsäure
HRP	Meerrettichperoxidase

IF	Immunfluoreszenzfärbung
IHC	immunhistochemische Färbung
IUGR	intrauterine Wachstumsrestriktion
IUS	intrauteriner Stress
kg	Kilogramm
l	Liter
LBW	geringes Geburtsgewicht
LC-MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie
LFQ	markierungsfreie massenspektrometrische Quantifizierung
LIG	Ligatur der Arteriae und Venae uterinae
LRP6	low-density lipoprotein receptor-related protein 6
m	Meter
M	Molar
m/v	Masse pro Volumen
mA	Milliampere
MAPK	mitogen-activated protein kinases
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mm ²	Quadratmillimeter
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
N3PUFA	Interventionsnahrung
NF-κB p65	nukleärer Faktor κB p65
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
p	phosphoryliert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1
PAS	Periodsäure-Schiff-Reaktion
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PDGF	platelet-derived growth factor

PDGFR β	platelet-derived growth factor receptor beta
PND	postnataler Tag
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
rcf	relative Zentrifugenbeschleunigung
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
rpm	rounds per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGA	small for gestational age
STRING	Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins
SSW	Schwangerschaftswoche
TBST	Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween® 20
TGF β 1	transforming growth factor beta 1
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VE-Wasser	deionisiertes Wasser
WNT2b	Wingless/Int-1 2b
WNT3a	Wingless/Int-1 3a
WT-1	Wilms-Tumor-Protein 1
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer

1 Zusammenfassung

Epidemiologische Studien weisen auf einen negativen Einfluss einer intrauterinen Wachstumsrestriktion (IUGR) auf die Nierenentwicklung und die spätere Nierenfunktion hin. Die vorliegende Arbeit entstammt einem Projekt zur Analyse der renalen Folgen einer IUGR im Rattenmodell sowie der Untersuchung möglicher protektiver Effekte durch Erhöhung der n3:n6 Ratio der in der Nahrung enthaltenen Fettsäuren während der Nierenentwicklung. In der vorliegenden Doktorarbeit wurden etablierte Inflammations- und Proliferationsmarker sowie Parameter der extrazellulären Matrix der Niere bei weiblichen Nachkommen im jungen Erwachsenenalter untersucht. Zudem wurden allgemeine Parameter der Nierenmorphologie erhoben. Die IUGR wurde am embryonalen Tag 18 durch 1.) eine beidseitige Ligatur der Arteriae und Venae uterinae (LIG) (als Simulationsmodell einer Plazentainsuffizienz) und 2.) eine Scheinoperation (als Modell für intrauterinen Stress (IUS)) induziert. Als Kontrollgruppe dienten die Nachkommen unoperierter Weibchen ohne Wachstumsrestriktion (C). Nach der Geburt wurden alle Nachkommen von unoperierten Ammenmüttern großgezogen. Innerhalb der Gruppen wurde ab dem zweiten postnatalen Tag jeweils der Hälfte der Nachkommen die Interventionsnahrung (N3PUFA) und der anderen Hälfte eine Kontrollnahrung (CONTR) zugeführt, woraus insgesamt sechs Versuchsgruppen resultieren. Die Interventionsnahrung zeichnete sich durch einen erhöhten Anteil der Omega-3-Fettsäure Docosahexaensäure (docosahexaenoic acid, DHA) und Cholin aus. Am postnatalen Tag 39 wurden die weiblichen Nachkommen aus allen Gruppen getötet und die Nieren entnommen. Diese wurden histologisch sowie molekularbiologisch untersucht.

Im Hinblick auf Inflammationsmarker zeigte nur die IUS-Gruppe eine knapp nicht signifikante Erhöhung der Gewebsinfiltration mit CD68-positiven Zellen, die Nahrungsintervention führte zu einer signifikanten Senkung dieser Zellzahl (p -Wert $< 0,05$). Die IUS-Gruppe zeigte im Western Blot außerdem signifikant erhöhte PCNA- sowie Cyclin D1-Expressionen, welche für eine gesteigerte Proliferationsrate im Nierenkortex sprechen. Mechanistisch könnte dies auf die Aktivierung der Kinase ERK1/2 zurückzuführen sein, welche nach IUS ebenfalls signifikant vermehrt exprimiert wurde. Gegen eine gesteigerte Proliferation nach IUS spricht allerdings die unveränderte Zahl Ki-67-positiver Zellen in der Histologie. Bezüglich der Analysen zur extrazellulären Matrix zeigte sich in der Picro-Sirius-Rot-Färbung eine verringerte Kollagenexpression im Kortex sowie in der gesamten Niere nach LIG. Eine Matrisomanalyse des Nierenkortex wies außerdem auf zwölf Proteine hin, welche im Vergleich LIG-CONTR/C-CONTR hoch- und zwischen LIG-N3PUFA/LIG-CONTR wieder herabreguliert waren. Dazu zählten einerseits Glykoproteine, die dem Terminus „fibrinogen complex“ zugeordnet wurden, und andererseits Serinproteaseinhibitoren, welche über eine Trypsin- und Plasminhemmung eventuell eine fibrosemindernde Wirkung haben könnten. In der Analyse von Standardparametern

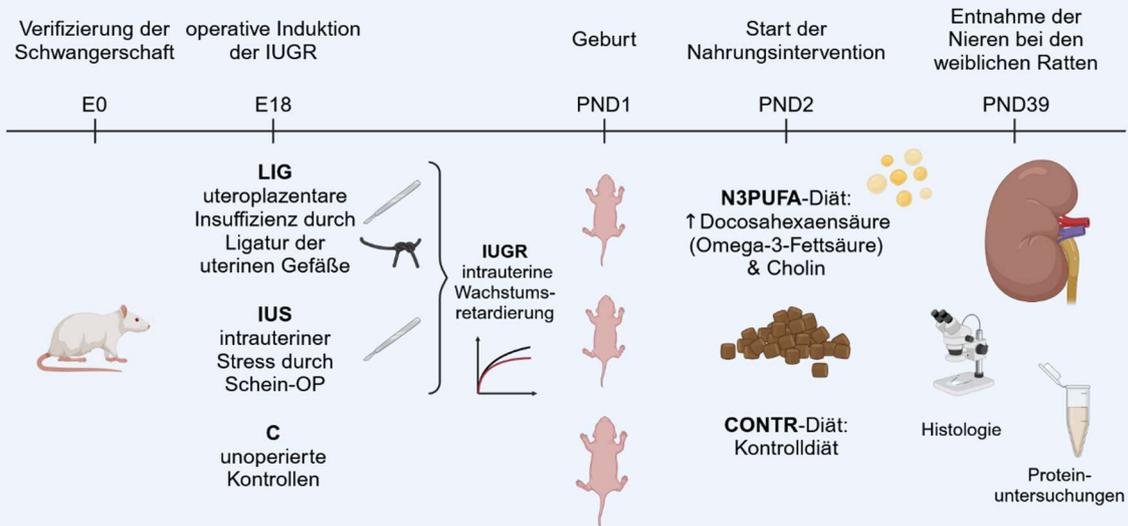
der Nierenmorphologie konnte in keiner der IUGR-Gruppen eine Beeinflussung der Glomerulusanzahl pro Schnitt, der glomerulären Fläche oder der Podozytenzahl im Verhältnis zur glomerulären Fläche anhand der histologischen Auswertungen gezeigt werden.

Zusammenfassend wirkte sich die IUGR in der IUS-Gruppe insbesondere auf die Gewebsinfiltration mit CD68-positiven Immunzellen sowie auf Proliferationsmarker aus, während sich Folgen auf Parameter der extrazellulären Matrix in der LIG-Gruppe zeigten. Diese Ergebnisse unterstreichen, wie wichtig die Berücksichtigung der IUGR-Ursache für mögliche gesundheitliche Folgen ist. Die Nahrungsintervention mit Omega-3-Fettsäuren und Cholin hatte einen gegenregulativen Effekt auf die Expression von EZM-Proteinen innerhalb der LIG-Gruppe und bewirkte eine Reduktion der Makrophagenzahl in der IUS-Gruppe. Weitere Untersuchungen zur antiinflammatorischen Wirkung von Omega-3-Fettsäuren während des vulnerablen Zeitraums der Nierenentwicklung lassen sich hier anschließen.

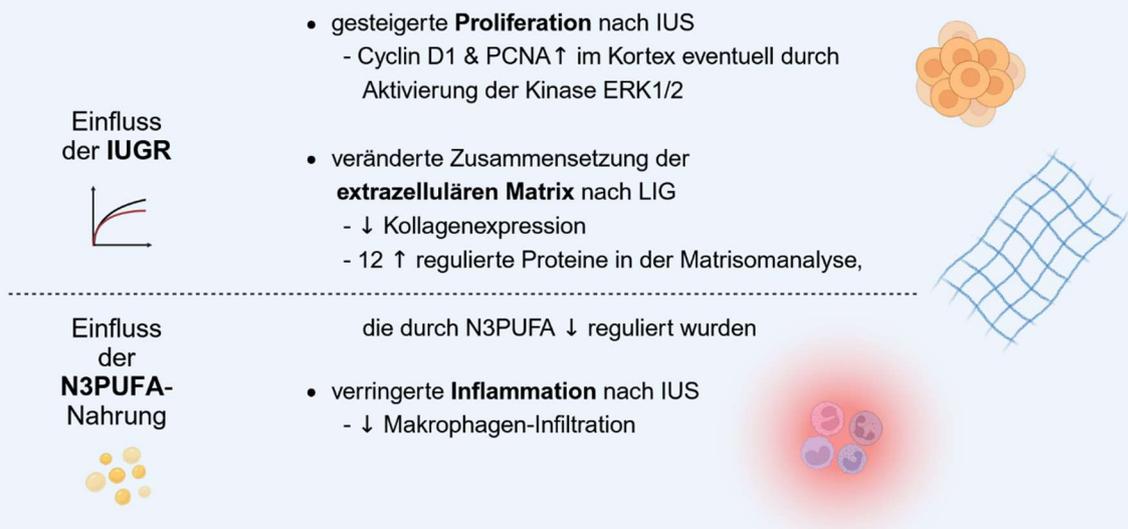
Entgegen unseren Erwartungen zeigten sich keine Auswirkungen des IUGR-Modells auf Standardparameter der glomerulären Morphologie im jungen Erwachsenenalter. Ursächlich könnten das Säugen durch unoperierte Ammenweibchen oder ein protektiver Effekt des weiblichen Geschlechts sein. Zukünftige Arbeiten, die einen direkten Vergleich zwischen weiblichen und männlichen Tieren ermöglichen, können weitere Erkenntnisse liefern.

Intrauterine Wachstumsrestriktion und frühe postnatale Ernährung beeinflussen den Kollagengehalt in den Nieren weiblicher adoleszenter Ratten

Methodik



Ergebnisse



Fazit

Während eine IUGR nach IUS zu einer gesteigerten Proliferation in den Nieren von Rattenweibchen im frühen Erwachsenenalter führt, verändert eine IUGR durch IUGR die Zusammensetzung der renalen extrazellulären Matrix. Die Daten unterstreichen die Wichtigkeit der Unterscheidung verschiedener IUGR-Ursachen.

Eine Nahrungsintervention mit erhöhtem Omega-3-Fettsäure-Anteil spielt insbesondere hinsichtlich der renalen Inflammation eine protektive Rolle.

Abb. 1 Graphische Darstellung der vorliegenden Arbeit. Erstellt mit BioRender.com.

2 Einleitung

2.1 Perinatale Programmierung der Niere

Der Begriff der perinatalen Programmierung beschreibt den Einfluss diverser Faktoren während der Perinatalperiode, welche den Organismus auf Zell- und Organebene langfristig verändern. Jene Prozesse können ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Erkrankungen im späteren Lebensalter zur Folge haben.¹

Die menschliche Nephrogenese (ausführlich beschrieben in der Arbeit von Reidy und Rosenblum²) beginnt im ersten Trimenon und ist nach 36 Schwangerschaftswochen (SSW) post conceptionem abgeschlossen.³ Postnatal zeigt sich die Ausreifung der renalen Strukturen etwa an der glomerulären Filtrationsrate, welche sich bereits innerhalb der ersten zwei Lebenswochen verdoppelt.⁴ Im Vergleich dazu dauert die Nephrogenese der Ratte bis zum postnatalen Tag 8 (postnatal day 8, PND 8) an.⁵ Morphologische Reifungsprozesse der Rattenniere zeigen sich im Kortex bis zum PND 12 und in der Medulla bis zum PND 21.⁶ Kommt es innerhalb dieser besonders vulnerablen Zeiträume zu einer akuten Nierenschädigung, erhöht sich das Risiko für die spätere Entwicklung einer chronischen Nierenerkrankung (chronic kidney disease, CKD).⁷ Dabei sind die Entstehungsfaktoren für eine akute Nierenschädigung vielfältig und können hier nur beispielhaft genannt werden. Eine verminderte Nierenfunktion tritt vermehrt bei Frühgeborenen und Kindern mit einer genetischen Prädisposition, wie beispielsweise einer kongenitalen Anomalie der Nieren und ableitenden Harnwege, auf.⁸ Auf maternalen Seite sind Erkrankungen, die bereits vor der Schwangerschaft bestanden, ebenso wie erst während der Schwangerschaft aufgetretene Erkrankungen, wie arterielle Hypertonie⁹, Adipositas¹⁰ oder Gestationsdiabetes¹¹, assoziiert mit einer Schädigung der kindlichen Niere. Einflussnehmend sind außerdem perinatale Infektionen¹², eine plazentare Insuffizienz¹³ sowie die Einnahme bestimmter Medikamente¹⁴.

2.2 Intrauterine Wachstumsrestriktion und Versuchsmodell

Barker et al. konnten in den 1980er und 1990er Jahren anhand retrospektiver Untersuchungen bei Personen mit einem niedrigen Geburtsgewicht ein vermehrtes Auftreten von kardiovaskulären und metabolischen Erkrankungen, wie der koronaren Herzerkrankung¹⁵, arteriellen Hypertonie¹⁶ oder gestörten Glukosetoleranz, im Erwachsenenalter feststellen.¹⁷ Ihre Vermutung eines kausalen Zusammenhangs wurde als „Barker-Hypothese“ bekannt.¹⁸ Auch im Kontext nephrologischer Erkrankungen konnten weiterführende Studien ein erhöhtes CKD-Risiko bei Kindern mit einem geringen Geburtsgewicht (low birth weight, LBW) von unter 2500 g¹⁹ beobachten.^{20, 21} Ursächlich dafür kann neben einer Frühgeburtlichkeit auch eine intrauterine Wachstumsrestriktion (IUGR) sein.¹⁹ Eine IUGR beschreibt das verlangsamte intrauterine Wachstum ohne Ausschöpfung des vollen Wachstumspotentials mit einer Kreuzung der

Perzentilenkurven. Davon abzugrenzen ist der Begriff small for gestational age (SGA), welcher eine einmalig intrauterin oder postnatal gemessene Größe (Gewicht oder Länge) meint, die entweder unterhalb der zehnten Perzentile oder zwei Standardabweichungen unterhalb der Referenznorm des jeweiligen Gestationsalters (GA) liegt.²²

Die Ursache einer IUGR kann maternal, plazentar oder fetal bedingt sein. Den größten Anteil unter Feten ohne Anomalien macht ein reduzierter uteroplazentarer Blutfluss aus, der zu einem gestörten feto-maternalen Stoffaustausch führt.²³ Im Tiermodell lässt sich diese Form der IUGR durch eine bilaterale Ligatur der plazentaren Gefäße (LIG) erreichen.²⁴⁻²⁶ Als Kontrollgruppe wurden in der Vergangenheit häufig scheinoperierte Tiere ohne Durchführung der Ligatur genutzt.²⁷⁻²⁹ Diese zeigen allerdings nachweislich ebenfalls eine IUGR,^{25, 30} welche auf intrauterin erlebten Stress (IUS) aufgrund des operativen Eingriffs zurückzuführen ist. Im vorliegenden Projekt wurden daher Ratten mit sowohl durch LIG als auch durch IUS ausgelöster IUGR jeweils mit unoperierten Kontrolltieren verglichen.

2.3 Folgen der IUGR auf die Niere

LBW korreliert mit einer renalen Dysfunktion im Erwachsenenalter. Ein erhöhter Albumin-Kreatinin-Quotient, ein erhöhtes Risiko für eine Mikroalbuminurie und eine verminderte glomeruläre Filtrationsrate (GFR) sowie das Auftreten von fortschreitenden Nierenerkrankungen sind dokumentiert.^{21, 31, 32} Ehemalig SGA-geborene Erwachsene zwischen 20 und 30 Jahren zeigten eine verringerte Kreatinin-Clearance. Die Korrelation zwischen Geburtsgewicht und Nierenfunktion war in der weiblichen Kohorte jedoch weniger stark ausgeprägt als in der männlichen.³³ Auch im Kindesalter werden bereits renale Veränderungen deutlich: Im Alter von 18 Monaten zeigen Kinder mit einem verringerten fetalen Gewicht und einem intrauterin pathologischen Dopplersignal der Umbilikalarterien eine erhöhte Albuminausscheidung.³⁴ Die GFR von SGA-Kindern im Alter von elf Jahren ist signifikant verringert im Vergleich zu Kindern mit adäquatem Geburtsgewicht.³⁵

Betrachtet man die Morphologie der kindlichen Niere, zeigen histologische Untersuchungen des Nierengewebes wachstumsretardierter Feten eine geringere Nephronenzahl³⁶ Bei LBW-Kindern konnte eine verringerte Glomeruluszahl und ein erhöhtes glomeruläres Volumen festgestellt werden.³⁷ Brenner et al. sehen darin das erhöhte Risiko für die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie begründet,³⁸ welche sich statistisch vermehrt bei Erwachsenen mit LBW zeigt.³⁹ Die verringerte Nephronenzahl führe zu einer Hyperfiltration und einer Hypertrophie der verbliebenden Glomeruli, um die Nierenfunktion aufrechterhalten zu können. Dabei entstünden Schäden an den Glomeruli, welche wiederum eine Reduktion der Filtrationsfläche zur Folge hätten, die unter anderem eine verminderte Natriumausscheidung bedinge.^{38, 40} Inzwi-

schen werden durch die Ergebnisse tierexperimenteller Studien für die Entwicklung einer arteriellen Hypertension nach IUGR auch weitere Einflussfaktoren, wie beispielsweise das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) oder vermehrter oxidativer Stress, diskutiert.^{41, 42} Neben der arteriellen Hypertension ist auch eine CKD im Erwachsenenalter mit einer verminderten Glomeruluszahl assoziiert.⁴³

Im Falle einer glomerulären Nierenerkrankung als „second hit“ scheint eine zuvor bestandene IUGR den Krankheitsverlauf negativ zu beeinflussen. Bei Kindern nach IUGR mit einer Minimal-Change-Glomerulopathie, die mit einer Podozytenschädigung einhergeht,⁴⁴ kam es vermehrt zu Rezidiven und einer Steroidabhängigkeit.^{45, 46} Eine vermehrte Anzahl sklerotischer Glomeruli und eine erhöhte Inzidenz einer arteriellen Hypertonie konnte im Rahmen einer IgA-Glomerulonephritis bei IUGR-Kindern festgestellt werden.⁴⁷

Das renale Inflammationsgeschehen nach IUGR wurde im Rahmen tierexperimenteller Vorarbeiten untersucht. Eine vermehrte Genexpression proinflammatorischer Marker konnte bei IUGR-Ratten mittels einer Transkriptomanalyse nachgewiesen werden.⁴⁸ Nach Induktion einer mesangioproliferativen Glomerulonephritis, die mit einer IgA-Nephritis vergleichbar ist, zeigte sich ebenfalls eine Erhöhung inflammatorischer Marker bei Ratten mit IUGR, außerdem wurden eine verstärkte Glomerulosklerose und vermehrte glomeruläre Kollagen I- und IV-Ablagerungen dokumentiert.^{49, 50}

2.4 Einfluss Omega-3-Fettsäure- und Cholin-reicher Nahrung

Omega-3-Fettsäuren, wie Docosahexaensäure (docosahexaenoic acid, DHA) und Eicosapentaensäure (eicosapentaenoic acid, EPA), zählen zu den mehrfach ungesättigten Fettsäuren.⁵¹ Eine mit Omega-3-Fettsäuren angereicherte Nahrung scheint einen positiven Effekt auf den Verlauf inflammatorischer Erkrankungen zu haben. Bei Patienten mit rheumatischer Arthritis beispielsweise waren nach Omega-3-Fettsäuren-Supplementation eine verminderte Ausschüttung inflammatorischer Zytokine,^{52, 53} eine geringere Symptombelastung^{53, 54} sowie ein geringerer Analgetikaverbrauch⁵⁵ zu verzeichnen. Studien weisen außerdem darauf hin, dass Omega-3-Fettsäuren bei einer bestehenden IgA-Nephritis deren Progression verlangsamen oder die Wirkung eines Renin-Angiotensin-Aldosteron-System-Inhibitors verstärken können.⁵⁶⁻⁵⁸ Bei Jugendlichen mit einer diabetischen Nephropathie im Rahmen eines Diabetes mellitus Typ 1 konnten im Anschluss an eine Nahrungsintervention mit DHA und EPA unter anderem ein verbesserter Albumin-Kreatinin-Quotient gemessen werden.⁵⁹ Im Bereich kardiovaskulärer Erkrankungen konnten Arbeiten eine verbesserte Statin-Wirkung durch Kombination mit Omega-3-Fettsäuren⁶⁰ sowie einen niedrigeren systolischen und diastolischen Blutdruck bei normo- und hypertensiven Patienten⁶¹ feststellen. Dabei scheint DHA einen stärkeren Effekt auf den Blutdruck zu haben als EPA.⁶²

DHA kann vom menschlichen Körper selbst aus der essentiellen Fettsäure α -Linolensäure synthetisiert werden. Aufgrund der geringen Konversionsrate wird der größte Anteil allerdings direkt über die Nahrung, beispielsweise über stark fetthaltigen Fisch oder Fisch- bzw. Algenöl, aufgenommen.⁶³ Bei der körpereigenen Synthese werden dieselben Enzyme (Desaturasen und Elongasen) genutzt, die auch bei der Synthese der Omega-6-Fettsäure Arachidonsäure (arachidonic acid, AA) aus Linolsäure benötigt werden.⁶⁴ Somit konkurrieren die Fettsäuren gewissenmaßen um diese Enzyme. DHA und AA werden unter anderem in Phospholipide eingebaut, die einen Hauptbestandteil von Membranen darstellen.^{65,66} Nach Freisetzung der Fettsäuren können aus ihnen sogenannte Eicosanoide gebildet werden.

Diese dienen als Gewebsmediatoren und haben unterschiedliche Funktionen. Die aus AA synthetisierten Serie-2-Prostaglandine und Serie-4-Leukotriene führen zu einer proinflammatorischen Zellantwort in der Niere.^{67,68} Arbeiten mit verschiedenen Glomerulonephritis-Modellen an Ratten konnten beispielsweise eine vermehrte Leukotrien B₄-Synthese in den eingewanderten Leukozyten sowie eine gesteigerte Bildung der ebenfalls aus AA synthetisierten 12-Hydroxyeicosatetraensäure in den glomerulären Zellen nachweisen.^{69,70} Der AA-Metabolit 20-Hydroxyeicosatetraensäure (20-HETE) scheint sowohl über das RAAS einen prohypertensiven Einfluss zu haben^{71,72} als auch durch natriuretische Effekte antihypertensiv zu wirken⁷³. Im Bereich der diabetischen Nephropathie deuten sich profibrotische Eigenschaften der 20-HETE an.⁷⁴ Auf der anderen Seite haben die Eicosanoide Serie-3-Prostaglandine, Serie-5-Leukotriene, sowie Resolvine, Protektine und Docosanoide, die aus Omega-3-Fettsäuren hergestellt werden, eine antiinflammatorische Wirkung.⁶⁴ Eine Studie an Mäusen mit akutem Nierenversagen konnte durch den therapeutischen Einsatz von Serie-D-Resolvinen und Protektin D1, welche aus DHA synthetisiert werden, den Serum-Kreatinin-Wert verbessern, interstitielle Fibrose vermindern und die Zahl der infiltrierenden Makrophagen in der Niere reduzieren.⁷⁵ Studien zeigen, dass durch Omega-3-Fettsäure-reiche Ernährung der EPA- und DHA-Anteil im Nierengewebe von Ratten signifikant erhöht und der AA-Anteil reduziert werden können.⁷⁶ ⁷⁷ Der positive Effekt einer Intervention mit Omega-3-Fettsäure-reicher Nahrung soll somit nicht nur durch die Metaboliten der Omega-3-Fettsäuren selbst, sondern auch durch die verminderte Bildung von AA-Metaboliten vermittelt werden.

Um den Zeitraum der Nierenentwicklung im Sinne der renalen Programmierung mit einer Nahrungsintervention abzudecken, sind besonders humane Studien vor Beginn der 37. SSW bzw. Studien an Ratten vor dem PND 8 zu betrachten. Grundvoraussetzung für die tierexperimentellen Studien ist die Übertragung der Omega-3-Fettsäuren über die Muttermilch zu den Nachkommen. Dies konnten Studien anhand eines erhöhten DHA-Anteils in der Muttermilch sowie eines erhöhten Omega-3-Fettsäure-Anteils in neonatalem Gewebe nach der vermehrten Einnahme von Omega-3-Fettsäuren durch die Mutter zeigen.^{78,79}

Es finden sich jedoch nur wenige Daten, die die Auswirkungen einer frühen Nahrungsintervention mit Omega-3-Fettsäuren auf die Entwicklung renaler Langzeitschäden untersuchen. Shamseldeen et al. untersuchten die Folgen einer fettreichen Diät mit und ohne zusätzlicher Omega-3-Fettsäure bei den Ratten-Muttertieren während der Schwangerschaft und Stillzeit. Der Serum-Kreatinin-Wert, die Aktivität der proinflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor α und Interleukin 1β sowie die Renin-Aktivität im Nierengewebe der Jungtiere konnten durch die Intervention mit Omega-3-Fettsäuren im Vergleich zur ausschließlich fettreichen Ernährung gesenkt werden.⁸⁰ Eine weitere Arbeit untersuchte den Unterschied zwischen einer postnatalen Normaldiät und einer Omega-3-Fettsäure-haltigen Diät bei Ratten mit einem durch Dexamethason-Gabe in der Schwangerschaft induzierten LBW. Zunächst erhielten die säugenden Muttertiere die Nahrung, anschließend wurde sie an die Nachkommen direkt verfüttert. Die Erhöhung des systolischen Blutdrucks bei den LBW-Tieren mit Standarddiät konnte bei den Tieren mit der Omega-3-Nahrung auf den Normaldruck der Kontrolltiere gesenkt werden.⁸¹ Bei einer Studie mit frühgeborenen Kindern (GA <35. SSW post menstruationem) mit einem Geburtsgewicht unter 2000 g, die ab der Geburt bis zum neunten Lebensmonat eine Omega-3-Fettsäure-reiche Formula-Nahrung erhielten, zeigten die weiblichen Studienteilnehmerinnen nach Omega-3-Substitution im Alter von zehn Jahren allerdings erhöhte Blutdruckwerte im Vergleich zur Kontrollgruppe.⁸²

Der Nährstoff Cholin ist Bestandteil der Phospholipide, vorwiegend Phosphatidylcholin, das aus Glycerophosphocholin und zwei Fettsäuren, wie beispielsweise DHA, besteht.⁸³ West et al. konnten zeigen, dass bei einer Nahrungsintervention mit DHA mit steigender zusätzlicher Cholin-Gabe auch der Anteil des Phosphatidylcholins mit DHA im Plasma und in den Erythrozyten nicht-schwangerer Frauen ansteigt.⁸⁴ Ähnliche Ergebnisse liefern die Untersuchungen des Plasmas von Frühgeborenen, die über zehn Tage hinweg DHA- oder DHA- und Cholin-reiche Nahrung erhielten.⁸⁵ Eine Kombination aus DHA und Cholin im Rahmen einer Nahrungsintervention könnte dementsprechend auch den Einbau von DHA in den Membranen des Nierengewebes erhöhen.

2.5 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zu der Frage leisten, ob eine Nahrungsergänzung mit DHA und Cholin geeignet ist, um renalen Langzeitschäden nach IUGR entgegenzuwirken. Untersucht wurden dazu weibliche Ratten im frühen Erwachsenenalter (PND 39), welche nach Induktion einer IUGR durch LIG oder IUS eine postnatale Nahrungsergänzung mit DHA und Cholin erhielten. Folgende Fragestellungen wurden im Einzelnen betrachtet:

1. Führt eine experimentelle IUGR bereits im frühen Erwachsenenalter zu einer Veränderung der glomerulären Morphologie?
2. Induziert eine IUGR eine renale Inflammationsneigung im jungen Erwachsenenalter?
3. Ist nach einer experimentelle IUGR im frühen Erwachsenenalter eine veränderte Proliferationsrate renaler Zellen zu beobachten?
4. Führt eine experimentelle IUGR bereits im frühen Erwachsenenalter zu fibrotischen Veränderungen/Veränderungen von Komponenten der extrazellulären Matrix in der Niere?

Als übergeordnete Frage wird untersucht, ob eine früh postnatale Nahrungsintervention mit DHA und Cholin die unter 1.–4. untersuchten Folgen einer IUGR auf die Niere beeinflusst.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsaufbau und Tiermodelle

Die IUGR wurde im vorliegenden Projekt anhand zweier Modelle untersucht: Zum einen wurde eine Plazentainsuffizienz durch eine bilaterale Ligatur der Arteriae und Venae uterinae (LIG) simuliert. Zum anderen wurde eine Scheinoperation durchgeführt, die im Ablauf dem Ligatureingriff glich, eine Gefäßunterbindung wurde hier jedoch nicht durchgeführt. Auf diese Weise wurde intrauteriner Stress (IUS) induziert. In der Kontrollgruppe (control, C) wurde von einer operativen Intervention abgesehen, sodass die Nachkommen nicht von einer Wachstumsrestriktion betroffen waren. Um den Einfluss einer Nahrungsintervention mit Docosahexaensäure (DHA) und Cholin untersuchen zu können, wurden die drei Gruppen daraufhin jeweils in zwei Untergruppen unterteilt. Die eine Hälfte wurde fortlaufend mit der Kontrollnahrung (control diet, CONTR) gefüttert, während die andere eine mit DHA und Cholin versetzte Interventionsnahrung (N3PUFA) erhielt. Die Standardnahrung C1000 der Firma Altromin wurde insofern modifiziert, als die Kontrolldiät 30 mg/kg DHA und 1012 mg/kg Cholin enthielt. Das Verhältnis von Omega-6- zu Omega-3-Fettsäuren betrug 20:1. Die Interventionsnahrung beinhaltete nach Modifikation 5000 mg/kg DHA und 5002 mg/kg Cholin und wies ein Omega-6-/Omega-3-Fettsäure-Verhältnis von 1:1 auf (vgl. Tabelle 1).

Die im Folgenden beschriebenen Tierversuche waren zu Beginn meiner Arbeit vollständig abgeschlossen. Sie wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt (LANUV NRW AZ 81-02.04.2018.A052) und im Institut für Experimentelle Medizin der Universität zu Köln durchgeführt. Dort handelte es sich um klimatisierte Räume mit einem Temperaturbereich zwischen 20 °C und 24 °C und einem automatisierten Lichtzyklus von 12/12 Stunden. Die Tiere wurden in individuell belüfteten Käfigen des Typs Green Line Doppeldecker der Firma Tecniplast gehalten und hatten ad libitum Zugang zu Futter und angesäuertem Wasser.

Die bereits trächtigen Wistar-Rattenweibchen wurden von der Firma Janvier Labs (Frankreich) bezogen. Der Tag der Trächtigkeitsverifizierung wurde als embryonaler Tag 0 (E 0) festgelegt. Alle Versuchsgruppen erhielten während der Trächtigkeitsdauer die Kontrollnahrung. Am Tag E 18 fanden die Operationen der LIG- und der IUS-Gruppe statt. Dazu wurden die Tiere mit Isofluran (fünfprozentig für eine Minute) narkotisiert und durch eine subkutane Metamizol-Injektion (100 mg/kg Körpergewicht) analgesiert. Das Abdomen wurde eröffnet, die Cornua uteri aus dem Situs gehoben und in der LIG-Gruppe die besagte Ligatur vorgenommen. Anschließend erhielten die Tiere zur Schmerzstillung für zwei Tage mit Tramal angereichertes Wasser (fünf mg/ml). Die Nachkommen wurden spontan am Tag E 22,5, der dem PND 1 entspricht, geboren. Bei den in diesem Projekt betrachteten Nachkommen handelte es sich ausschließlich

um Weibchen, da die männlichen Tiere für weitere Teilprojekte verwendet wurden. Die Unterteilung in die Subgruppen C-CONTR, C-N3PUFA, LIG-CONTR, LIG-N3PUFA, IUS-CONTR und IUS-N3PUFA erfolgte am PND 2. Je sechs männliche und zwei weibliche Nachkommen wurden auf ein Ammenweibchen verteilt. Bei den Ammenweibchen handelte es sich ausschließlich um unoperierte Tiere, um postnatalen Effekten einer Operation auf die Nachkommen vorzubeugen. Während der Stillperiode wurde den Ammenmüttern die für die jeweilige Versuchsgruppe entsprechende Nahrung zugeführt. Nach der Entwöhnung am PND 21 erhielten die Nachkommen selbst die Kontroll- oder Interventionsnahrung. Am PND 21 fand zudem eine Blutentnahme im narkotisierten Zustand statt. Die Organentnahme wurde am PND 39 durchgeführt. Die Tiere wurden dazu mit Isofluran narkotisiert und erhielten zwischenzeitlich eine intraperitoneale Ketamin-Xylazin-Injektion (100 mg/kg, 20 mg/kg Körpergewicht). Das Abdomen wurde eröffnet, das Herz punktiert und das Tier mit phosphatgepufferter Salzlösung (phosphate-buffered saline, PBS) perfundiert. Anschließend wurden die Nieren entnommen. Für die histologischen Untersuchungen wurde eine Mittelscheibe der linken Niere entnommen, die zunächst für 24 Stunden in vierprozentigem Paraformaldehyd und anschließend in 20-prozentiger Sukrose inkubiert wurde. Im Folgeschritt wurde das Gewebe entwässert und in Paraffin eingebettet. Die seitlich der Mittelscheibe noch verbliebenen Anteile wurden für die spätere Proteinisolation genutzt. Nach der Präparation der Nierenkortizes wurden diese in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C gelagert.

3.2 Histologische Untersuchungen

Die im Folgenden beschriebenen Färbungen entsprechen den etablierten Protokollen des Labors Dötsch und orientieren sich an histologischen Standardmethoden.⁸⁶

Aus den in Paraffinblöcke eingebetteten Nierenmittelscheiben wurden mit einem Mikrotom 3 µm dicke Längsschnitte angefertigt. Nach dem Strecken der Schnitte in einem 40 °C warmen Wasserbad wurden sie auf Adhäsionsobjektträger aufgebracht. Zur Trocknung wurden die Schnitte 24 Stunden im Wärmeschrank bei 37 °C gelagert. Vor den Färbungen wurden Schnitte ausgewählt, welche frei von Beschädigungen im Gewebe waren.

3.2.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Beurteilung der Nierenmorphologie wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine Mischfärbung. Hämatoxylin ist eine natürliche Verbindung, die aus dem Blauholzbaum gewonnen wird. Durch dessen Oxidation entsteht das Produkt Hämatein, welches basophile Strukturen, insbesondere die in den Zellkernen befindliche Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid, DNA), blau anfärbt. Eosinophile Strukturen hingegen,

wie Zytoplasma und Kollagenfasern, stellen sich durch den synthetischen Farbstoff Eosin hingegen in Rot dar.⁸⁷ Die Schnitte wurden im ersten Schritt im Lösungsmittel Neo-Clear® für je dreimal fünf Minuten entparaffiniert und durch die Inkubation in einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 96 %, 80 %, 70 % EtOH) für je eine Minute in wässrige Lösung gebracht. Nach dem einminütigen Waschen in deionisiertem Wasser (vollentsalztes Wasser, VE-Wasser) wurden die Präparate für vier Minuten in die zuvor filtrierte Hämalaunlösung (sauer nach Mayer) eingebracht. Nach erneutem Spülen in VE-Wasser für eine Minute wurden die Schnitte in einer Küvette für fünf Minuten unter fließendem Leitungswasser belassen, welches eine pH-Wert-Verschiebung ins neutrale Milieu bewirkte, und wurden dadurch gebläut. Kurz wurde nochmalig mit VE-Wasser gespült, sodass anschließend für zwei Minuten mit Eosin G (0,5 % wässrig) gefärbt werden konnte. Dieses wurde beim Ansetzen mit einem Tropfen 100-prozentiger Essigsäure versetzt und vor dem Färbeprozess ebenfalls filtriert. Zweimal wurde daraufhin mit VE-Wasser gewaschen, um dann die Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %, 100 % EtOH für je eine Minute) zu entwässern. Nach abschließender Klärung im Neo-Clear® für zweimal fünf Minuten wurden die Gewebeschnitte mit Neo-Mount® eingedeckelt.

3.2.1.2 Bestimmung der Glomeruluszahl und der glomerulären Fläche

Die Schnitte wurden mit dem Mikroskop Slidescanner Leica SCN400 (Exzellenzcluster Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases, CECAD, Universität zu Köln) in 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Die histologische Auswertung erfolgte daraufhin mit dem Programm QuPath 0.2.2. Dazu wurde über die Schnitte zunächst ein Raster mit einer Größe von 500 µm auf 500 µm gelegt. Zur Bestimmung der glomerulären Fläche wurden alle Glomeruli betrachtet, die vom Raster angeschnitten wurden. Mit dem Tool „Polygon“ wurden diese Glomeruli entlang der Bowman-Kapsel umrandet und die glomeruläre Fläche in µm² ermittelt. Die glomeruläre Durchschnittsfläche wurde dann anhand der Anzahl der angeschnittenen Glomeruli berechnet. Die restlichen Glomeruli des Schnitts wurden zur Bestimmung der Gesamtzahl händisch ausgezählt.

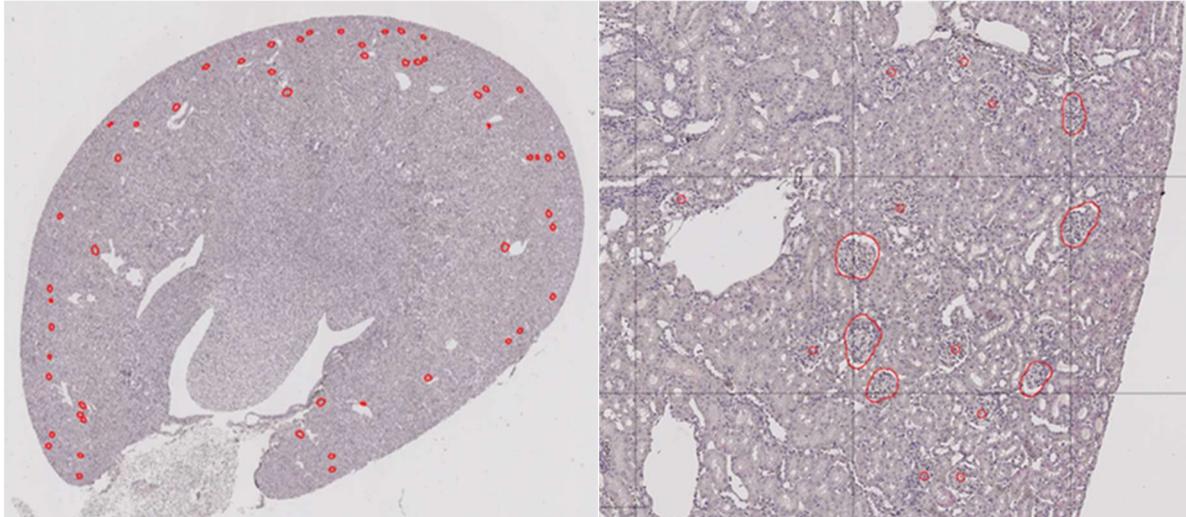


Abb. 2 Methodische Darstellungen zur Erhebung der Nephronenzahl und Glomerulusgröße. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Repräsentativer Nierenlängsschnitt in 20-facher Vergrößerung.

3.2.2.1 Pikro-Sirius-Rot-Färbung

Die Pikro-Sirius-Rot-Färbung wurde zur Identifikation fibrotischer Veränderungen durchgeführt. Bei der Betrachtung der Schnitte unter dem Lichtmikroskop sorgt diese für eine Rotfärbung des fibrillären Kollagens vor einem gelben Hintergrund.⁸⁸ Auch im Rahmen dieses Protokolls wurden die Präparate zunächst dreimal für je zehn Minuten durch Neo-Clear® entparaffiniert und durch die absteigende Alkoholreihe und das VE-Wasser hydratisiert. Die Schnitte wurden für drei Minuten in der Phosphormolybdänsäure-Lösung (0,2 %) und anschließend für eine Stunde in der Pikro-Sirius-Rot-Lösung inkubiert. Daraufhin wurden sie zweimal kurz mit einer dem Kit beigelegten Essigsäure-Lösung (0,5 %) gespült. Zur Entwässerung und Klärung wurde zweimal für je 30 Sekunden mit 100-prozentigem Ethanol und zweimal für ebenfalls 30 Sekunden mit Neo-Clear® gespült. Abschließend wurden die Gewebeschnitte mit Neo-Mount® gedeckelt.

3.2.2.2 Bestimmung der kollagenhaltigen Areale

Die Präparate wurden mit dem Slidescanner aufgenommen und mit dem Programm QuPath 0.2.2 ausgewertet. Es wurde zunächst die Fläche des Nierengewebes mit dem Werkzeug „Simple tissue detection“ genau umrandet. Anschließend wurden die Farbvektoreinstellungen vorgenommen. Im Schnitt wurden repräsentative Areale für die kollagenhaltigen Flächen und den unspezifischen Hintergrund ausgewählt und diese als Vektor für den jeweiligen Farbkanal gespeichert. Mit dem Tool „Positive pixel count“ konnte nachfolgend die Fläche der positiven, kollagenhaltigen Areale bestimmt werden. Hier wurden zunächst die Parameter für die Auswertung festgelegt: Standardmäßig betragen der „Downsample factor“ und die „Hematoxylin threshold“ 1 und das „Gaussian sigma“ 2. Der „Sirius red threshold“ wurde manuell an jeden

Schnitt angepasst. So konnte der Anteil der kollagenhaltigen Fläche auf die Gesamtfläche bezogen berechnet werden. Im zweiten Schritt wurde der Kortex mit dem Werkzeug „Polygon“ markiert, erneut die positive Fläche bestimmt und so ausschließlich der Anteil positiver Areale an der Kortexfläche ermittelt.

3.2.3.1 Immunhistochemische Färbungen

Die immunhistochemische Färbung (IHC) nutzt die Affinität von Antikörpern (AK) zu bestimmten Gewebeeigenschaften (Epitopen), um spezifisch einzelne Strukturen mit deren Verteilung und Lage darstellen zu können. Dabei gehen Antikörper und Epitop eine Bindung ein. Im Rahmen des Projekts wurde die indirekte Methode genutzt, bei der ein primärer Antikörper das entsprechende Epitop erkennt und wiederum von einem sekundären Antikörper, welcher einen detektierbaren Marker trägt, gebunden wird. Das Detektionssystem mit dem Marker sorgt dementsprechend letztlich für die Darstellbarkeit des Epitops. Die genutzte Indikatorsubstanz 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) führt zu einem roten Farbsignal unter dem Lichtmikroskop.⁸⁹ Angewandt wurde die Methode, um Aufschlüsse über die zelluläre Zusammensetzung zu erhalten. Das Entparaffinieren erfolgte dreimalig für je zehn Minuten mit Neo-Clear®. Anschließend wurden die Nierenschnitte durch die absteigende Alkoholreihe (100 %, 96 %, 80 %, 70 % EtOH für je eine Minute) und das einminütige Spülen mit VE-Wasser hydratisiert. Im frisch verdünnten Citratpuffer wurden die Schnitte für 30 Minuten im Dampfgerar zur Antigendemaskierung inkubiert. Eine Ausnahme bildete die Färbung mit dem WT-1-Antikörper: Anstelle des Citratpuffers wurde ein Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Ethylendiamintetraacetat-Puffer (Tris-EDTA-Puffer) mit einem pH-Wert von 9 verwendet. Abgekühlt wurden die Schnitte erneut für 30 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend kurzzeitig mit VE-Wasser gespült. Daraufhin wurde auf jedem der Objektträger mit einem Fettstift eine Umrandung um das Gewebe gezogen, die das Abfließen der Reagenzien verhinderte. Danach konnte der im lichtgeschützten Falcon angesetzten Peroxidase-Block für zehn Minuten aufgetragen werden, der unter anderem für die Entfernung noch vorhandener Erythrozyten sorgt. Die Präparate wurden mit frischer PBS-Lösung kurz gespült und nachfolgend der SEA BLOCK Blocking Buffer zur Hintergrund-Reduktion für eine Stunde, bzw. bei der WT-1-Antikörper-Färbung für eineinhalb Stunden, auf die Schnitte gegeben. Währenddessen wurde der Primärantikörper mit dem Antibody Diluent entsprechend der gewünschten Konzentration verdünnt und auf Eis gelagert. Abschließend wurde er auf die Schnitte aufgebracht und in einer feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am zweiten Tag wurde der überschüssige Anteil des Antikörpers dreimal für jeweils fünf Minuten mit PBS heruntergewaschen. Im Anschluss konnte der Sekundärantikörper HRP One-Step Polymer für 30 Minuten binden. Auch hier wurden mit dreimaligem Wa-

schen mit PBS für je fünf Minuten die ungebundenen Antikörper entfernt. Anschließend wurden die Schnitte mit AEC gefärbt. Dafür wurde aus den Bestandteilen des Permanent AEC Kits die AEC-Lösung angesetzt. Die Inkubationszeit variierte je nach Primärantikörper: Sie lag bei dem CD68-Antikörper bei sieben Minuten, bei der Ki-67-Färbung bei achteinhalb Minuten, bei dem NF- κ B-Antikörper bei 110 Sekunden sowie bei der WT-1-Färbung bei viereinhalb Minuten. Die Reaktion wurde mit kurzem Spülen mit VE-Wasser gestoppt. Abschließend wurden die Zellkerne mit Hämalaun blau gefärbt. Dazu wurden die Präparate zunächst für eine Minute erneut mit VE-Wasser gespült und dann für vier Minuten mit der Hämalaunlösung (sauer nach Mayer) angefärbt. Für fünf Minuten wurden die Schnitte mit Leitungswasser gebläut und eine Minute lang mit VE-Wasser gespült. Da der WT-1-Antikörper ebenso wie das Hämatein im Zellkern gelegene Strukturen anfärbt und so die Blaufärbung den AEC-Farbstoff überlagert, wurden in diesem Fall die Inkubationszeiten im Hämalaun auf zwei Minuten und während des Bläuens auf drei Minuten reduziert. Um den AEC-Farbstoff nicht auszuwaschen, wurden die Präparate nur kurz durch die aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 % EtOH) geführt und für eineinhalb Minuten in 100-prozentigem Alkohol inkubiert. Es folgte zweimal das Klären mit Neo-Clear® für je fünf Minuten sowie das Eindeckeln mit Neo-Mount®.

3.2.3.2 Zählung der positiven Zellen

Bei der Auswertung der Färbungen mit den Antikörpern CD68, Ki-67 und WT-1 wurde als Parameter die Anzahl positiver Zellen pro Flächeneinheit gewählt, da sie entweder im Zellkern exprimiert sind (Ki-67, WT-1) oder einzelnen Zellen zugeordnet werden können (CD68). Alle immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden ebenfalls mit dem Slidescanner aufgenommen und mit QuPath 0.2.2 ausgewertet. Im Falle der CD68-Färbung wurde das Nierengewebe, wie bei der Pikro-Sirius-Rot-Färbung beschrieben, automatisch erkannt. Bei der Ki-67-Färbung wurden manuell Kortex und Medulla sowie die Fläche der Sammelrohre mit dem Werkzeug „Polygon“ markiert. Zusätzlich wurde für die Auswertung der Ki-67-Färbung, ebenso wie für die der WT-1-Färbung, ein Raster mit der Größe 500 μ m auf 500 μ m über den Schnitt gelegt und alle angeschnittenen Glomeruli umrandet. Darauf folgte die Flächenberechnung. Die Vektoren für die mit Hämatoxylin angefärbten Zellkerne („Hematoxylin“), die AEC-Antikörperfärbung („AEC“) und den unspezifischen Hintergrund („Residual“) wurden festgelegt. Das Tool „Fast cell counts“ markiert im Rahmen des „Hematoxylin + AEC“-Kanals die positiven (AEC) und negativen (Hämatoxylin) Zellen. Voreingestellt waren die Parameter „Background radius“ (15 μ m), „Detection object diameter“ (25 Pixel), das „Gaussian sigma“ (CD68-Färbung, 1,3 μ m), der „Cell detection threshold“ (Ki-67-Färbung, 0,2; WT-1-Färbung, 0,1). Die weiteren Größen („AEC threshold“, Ki-67; WT-1: „Gaussian sigma“, CD68; WT-1: „Cell detection threshold“) wurden für jeden Schnitt individuell gewählt. Da die automatische, glomeruläre

Auswertung der Ki-67-positiven Zellen unbefriedigend war, wurden die Zellen manuell ausgezählt. Die Anzahl der positiven Zellen wurde auf die Fläche der gesamten Niere (CD68), auf die Kortex-Medulla-Fläche und die Fläche der Sammelrohre (Ki-67) beziehungsweise auf die glomeruläre Fläche (Ki-67, WT-1) in mm² bezogen.

3.2.3.3 Bestimmung der positiven Fläche

Bei der NF-κB-Färbung waren die positiven Zellen unzureichend voneinander abgrenzbar, sodass der Anteil der positiven Fläche bestimmt wurde. Der Kortex mit dem äußeren Mark wurde manuell umrandet und die Fläche bestimmt. Alle weiteren Schritte siehe 2.2.2.2.

3.2.4.1 Immunfluoreszenzfärbungen

Die Immunfluoreszenzfärbung (IF) ähnelt in ihrer Funktionsweise stark der oben beschriebenen indirekten immunhistochemischen Färbung, mit dem Unterschied, dass der sekundäre Antikörper einen fluoreszierenden Marker trägt, der unter einem Epifluoreszenzmikroskop mittels der Lichtquelle angeregt und anhand eines speziellen Filtersystems dargestellt werden kann.⁸⁹ Die Methode diente der gleichzeitigen Darstellung verschiedener Marker (CD68 & Ki-67, PDGFRβ & PCNA) hinsichtlich des Proliferationsverhaltens innerhalb der IUS-Gruppe sowie im Vergleich zur C-CONTR-Gruppe. Details der mit der IHC-Methode identischen Arbeitsschritte sind unter Punkt 2.2.3.1 dokumentiert. Im ersten Schritt wurde das Paraffin für eine Stunde bei 60 °C im Trockenschrank durch die Wärme aus den Schnitten gelöst. Auf das vollständige Entparaffinieren mit Neo-Clear® folgte die Hydratisierung in der absteigenden Alkoholreihe und dem VE-Wasser für jeweils drei Minuten. Nach dreimaligem Waschen für jeweils fünf Minuten in PBS-Lösung wurden die Schnitte im Citratpuffer zunächst für 30 Minuten bei 90 °C im Dampfgerar inkubiert und danach für weitere 20 Minuten zur ersten Abkühlung im bereits ausgeschalteten Gerät stehen gelassen. Vollständig abgekühlt wurden die Schnitte für 20 Minuten im 4 °C-warmen Wasserbad. Die Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte dreimal für jeweils fünf Minuten in PBS-Lösung, welche je nach später angewendetem Antikörper mit 0,1-prozentigem Tween® 20 (bei CD68) oder Octylphenoxy-Poly(ethylenoxy)ethanol (bei Ki-67 und PCNA), bekannt unter dem Handelsnamen Triton™ X-100, versetzt war. Bei dem auf der Zellmembran aufsitzenden Rezeptor PDGFRβ war eine Permeabilisierung nicht nötig, sodass ausschließlich mit reiner PBS-Lösung gewaschen wurde. Zur Blockierung für eineinhalb Stunden wurde fünfprozentiges Ziegen Serum verwandt, welches in 300 mM Glycin enthaltendem PBS gelöst war. Im Anschluss wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper, welcher mit dem Antibody Diluent verdünnt worden war, über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie dreimal für je fünf Minuten mit PBS-Lösung gewaschen. An-

schließlich wurde der sekundäre Antikörper, der mit dem Farbstoff Cy3 (anti-Mouse, anti-Rabbit), DyLight488 (anti-Mouse) oder AF488 (anti-Rat) markiert war, für zwei Stunden auf die Schnitte gegeben. Nach dem erneuten dreimaligen Waschen für jeweils fünf Minuten wurden die Zellkerne mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) in der Verdünnung 1:1000 für 15 Minuten gegengefärbt. Die Schnitte wurden mit PBS (dreimal für je fünf Minuten) und VE-Wasser gewaschen und konnten anschließend mit Fluoromount™ eingedeckelt werden.

3.2.4.2 Darstellung der positiven Zellen

Die Schnitte wurden mit dem Mikroskop BX43 mit der Kamera DP80 der Firma Olympus Life Science und deren Software cellSense in 20- sowie 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Zur farblichen Darstellung wurde die Software ImageJ Fiji 1.8.0 genutzt. Anschließend erfolgte eine orientierende Einschätzung ohne quantitative und statistische Auswertung hinsichtlich der Koexpression beider Marker sowie der Lokalisation und Menge der positiven Zellen.

3.3 Western Blot

Es wurden Western Blots durchgeführt, um die Nieren auf Proteinebene untersuchen zu können. Die Durchführung erfolgte nach Standardprotokoll⁹⁰ mit etwaigen Modifikationen, die im Labor Dötsch erprobt und im Folgenden beschrieben sind. Die Untersuchung des Proteins Cyclin D1 wurde von Herrn Lukas Gmachl vorgenommen.

Aufgrund der Heterogenität des Nierengewebes wurde nach Organentnahme der Nierenkortex vom restlichen Gewebe abgetrennt, sodass ausschließlich die darin enthaltenen Proteine isoliert werden konnten.

3.3.1 Proteinisolation und Messung der Proteinkonzentration

Zur Isolation der Proteine aus dem Nierenkortex wurden ca. 200 mg Gewebe abgetrennt und in Reaktionsgefäßen auf Trockeneis gelagert. Nach Ansetzen des modifizierten Radioimmunoprecipitation Assay-Puffers (RIPA-Puffers) wurden je 300–500 µl des Puffers abhängig von der Gewebegröße dem Gewebe beigefügt. Daraufhin wurden die Proben zunächst mechanisch mit Pistillen homogenisiert und anschließend für 30 Sekunden bei mittlerer Energie (50 %) in drei zehnpromtigen Zyklen mithilfe des Ultraschall-Homogenisators sonifiziert. Nach einer einstündigen Inkubation auf Eis wurden die Proben für fünf Minuten bei 4 °C mit einer relativen Zentrifugenbeschleunigung (relative centrifugal force, rcf) von 18407 zentrifugiert, um den die Proteine enthaltenen Überstand anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführen zu können. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proben im Verhältnis 1:10 mit dem modifizierten RIPA-Puffer verdünnt. Ein BCA-Reagenz wurde mithilfe des BCA Protein Assay Kits

hergestellt, indem die Komponenten A und B im Verhältnis 50:1 vermischt wurden. Jeweils 10 µl der verdünnten Proben wurden mit 200 µl des BCA-Reagenz in ein Well einer 96-Mikrotiterplatte gegeben (vgl. Tabelle 7). Jede Probe wurde doppelt bestimmt. Zum Vergleich wurden eine Standardreihe mit verschiedenen Verdünnungen aus Bovinem Serumalbumin (BSA) und dem modifizierten RIPA-Puffer, reines BSA (2 mg/ml) sowie der modifizierte RIPA-Puffer als Blank verwendet, und ebenso mit dem BCA-Reagenz versetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C konnte bei einer Wellenlänge von 562 nm die optische Dichte mittels des Platten-Readers Infinite® M200 Pro Nano unter Verwendung der Softwares iControl™ 2.0 bestimmt werden. Die Proteinkonzentration der Proben wurde anhand der BSA-Standardreihe mithilfe von Excel bestimmt.

3.3.2 Gelelektrophorese

Um die Proteine anhand ihres Molekulargewichts auftrennen zu können, ist eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) durchgeführt worden. Im ersten Schritt wurden die Proteingemische aufgetaut und soweit mit Reinstwasser Typ I (Milli-Q®) verdünnt, dass 15 µg Protein in jeder Probe enthalten war. Jede Probe wurde mit 4,5 µl des fünffachen Probenpuffers versetzt und anschließend für zehn Minuten bei 70 °C inkubiert. Während das im Probenpuffer enthaltene β-Mercaptoethanol und die hohe Temperatur zur Denaturierung der Proteine führten, sorgte das SDS aus dem Puffer für die negative Ladung der Proteine.

Das Gel, bestehend aus Trenn- und Sammelgel, wurde einen Tag zuvor in ein breites Kammer-System gegossen, wobei sich die dem Acrylamidgehalt entsprechende Prozentigkeit des Trenngels nach der molekularen Größe der zu untersuchenden Proteine richtete (vgl. Tabelle 9). Während des Erhärtens wurde das Gel mit zehnpromutigem Ethanol überschichtet. In das Sammelgel wurde zuletzt der 36-zinkige Kamm eingebracht, um die Probentaschen zu formen. Am Tag der Elektrophorese wurde der einfache Laemmli-Puffer in das System gefüllt und die Taschen des Sammelgels mit diesem durchgespült, um etwaige Gelreste zu entfernen. Anschließend wurden die Proben nach Gruppen geordnet in die Taschen eingebracht und zusätzlich der PageRuler™ Prestained Protein Ladder und gegebenenfalls bei großen Proteinen zusätzlich der Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder als Größenmarkierung in die außen liegenden Taschen pipettiert. Daraufhin wurde an die Kammer ein elektrisches Feld angelegt, sodass sich die negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode bewegten. Bei einer Spannung von 80 V formierten sie sich im Sammelgel zunächst zu einer Lauffront. Die Spannung wurde bei Erreichen des Trenngels auf 120 V erhöht. Dort wurden nun die größeren Moleküle durch die Vernetzungen des Acrylamids im Gel stärker ausgebremst als die kleineren, was eine Auftrennung der Proteine zur Folge hatte.

3.3.3 Proteintransfer

Um die Proteine aus dem Gel darstellen zu können, wurden sie im Rahmen eines Semi-Dry-Blot-Verfahrens auf eine Nitrozellulosemembran mit einer Porengröße von 0,45 µm übertragen. Die Membran wurde im VE-Wasser aktiviert und anschließend mit dem Filterpapier für 30 Minuten bei 4 °C im Blotting-Puffer aufgeweicht. Dieser wurde frisch mit zehnfachem Towbin-Puffer, der Tris und Glycin enthält, sowie Methanol angesetzt. Nach Abschluss der Proteinauftrennung konnte die Blotting-Kammer beladen werden. Auf zwei Whatman®-Filterpapiere wurde die Membran und darauf das ebenso in Pufferlösung getränkte Gel mit Vermeidung von Lufteinschlüssen positioniert. Abschließend folgten zwei weitere Schichten Filterpapier. Nach Einfüllen des restlichen Puffers konnte der Deckel befestigt und die zweistündige Übertragung bei einer Stromstärke von 1,3 mA pro cm² gestartet werden. Das senkrecht zum Gel angeordnete elektrische Feld sorgt auch in diesem Fall für eine Bewegung der negativ geladenen Proteine in Richtung der im Boden der Kammer befindlichen Anode, sodass sich die Proteine an der Nitrozellulose-Membran über ionische und polare Wechselwirkungen anheften können. Zur Überprüfung des Transfers wurde anschließend für zwei Minuten der Ponceau-Farbstoff, welcher alle Proteine gleichermaßen anfärbt, auf die Membran gegeben. Wie auch bei allen folgenden Inkubationsschritten erfolgte dies auf einem Wipp- oder Taumelschüttler. Dreimaliges Waschen mit VE-Wasser sorgte für die Sichtbarkeit der Proteinbanden und wusch überschüssigen Farbstoff wieder herunter.

3.3.4 Proteindetektion

Um einzelne Proteine auf dem Trägermedium sichtbar zu machen, werden spezifisch an einzelne Epitope des Proteins bindende Primärantikörper eingesetzt, an die sich wiederum Sekundärantikörper heften können, die mit einem chemilumineszenzsignalbildenden Molekül gekoppelt sind. Auf der Membran existieren jedoch auch von den Proteinen unabhängige Bindungsstellen, an die der Primärantikörper binden könnte. Daher wurden diese zunächst für 45 Minuten mit einer Blocking-Lösung blockiert, die aus in TBST gelöster, fünfprozentiger Milch und zweiprozentigem BSA besteht. Daraufhin konnte der Primärantikörper je nach Herstellerangaben mit fünfprozentigem BSA oder fünfprozentiger Milch, welche jeweils in Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween® 20 (Tris-buffered saline with Tween® 20, TBST) gelöst waren, verdünnt werden (vgl. Tabelle 10). Die Membran wurde mit dem Erstantikörper schüttelnd über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen folgte eine halbstündige Inkubation bei Raumtemperatur. Um unspezifische Antikörperbindungen wieder zu lösen, wurde die Membran dreimal für zehn Minuten mit TBST gewaschen. Der der Spezies des Erstantikörpers entsprechende Sekundärantikörper wurde in Milch gelöst und konnte daraufhin innerhalb einer Stunde an die Fc-Region des Primärantikörpers binden. Erneut wurde dreimalig für je zehn Minuten

mit TBST gewaschen. Abschließend wurde die Membran mit dem Reagenz ECL benetzt. Das darin enthaltene Luminol oxidiert in Anwesenheit der an den Zweitantikörper gebundenen Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP), sodass eine Chemilumineszenz-Reaktion abläuft. Nach einer Minute konnte das emittierte Licht mittels des Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+ Imaging System und der Software Image Lab™ 5.2.1 detektiert werden.

Sollten weitere Proteine auf der Membran dargestellt werden, mussten die zuvor gebundenen Antikörper entfernt werden. Dazu erfolgte ein sogenanntes Membranstripping. Zunächst wurde das ECL dreimal für drei Minuten mit TBST abgewaschen. Dem Stripping-Puffer wurde 100 mM β -Mercaptoethanol hinzugefügt und damit die Membran 20 Minuten lang im 56 °C warmen Wasserbad inkubiert. Die Wärme sowie das β -Mercaptoethanol sorgten für die Auflösung der Antigen-Antikörper-Bindungen. Nachfolgendes Waschen und Blockieren ermöglichten eine nochmalige Primärantikörperanheftung.

3.3.5 Auswertung

Um die Intensität der entstandenen Banden quantifizieren zu können, wurde diese mittels der Software Image Lab™ densitometrisch ausgewertet. Nachdem anhand der Markerhöhe überprüft wurde, ob es sich bei der Bande um das gesuchte Protein handelte, wurde jeweils die Aufnahme mit der längsten Belichtungszeit ausgewählt, bei der es noch nicht zu einer Überbelichtung gekommen war. Das Volumen der jeweiligen Bandenintensität einer Probe wurde auf das zugehörige Volumen des Kontrollproteins Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bezogen. Eine Ausnahme bildeten die Phospho-Antikörper, die eine Phosphorylierung des Proteins erfassen. Dabei handelt es sich in der Regel um die aktivierte Form des Proteins. Ihr Volumen wurde nicht auf das des Kontrollproteins, sondern auf das Volumen des totalen Proteins bezogen, welches sowohl die phosphorylierte als auch die nicht-phosphorylierte Form umfasst.

3.4 Matrisomanalyse

3.4.1 Proteinisolation und Probenaufbereitung

5 mg des gefrorenen, kortikalen Nierengewebes wurden abgetrennt und in ein Reaktionsgefäß gegeben. Nach Hinzufügen von 150 μ l Harnstoff-Lyse-Puffer wurde das Gemisch homogenisiert (Precellys Homogenisator) und für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und zehn Minuten lang auf 95 °C erhitzt. Mithilfe eines Bioruptors® wurde das Chromatin in Zyklen (30 s ON, 30 s OFF) innerhalb von zehn Minuten abgebaut. Die Proteinbestimmung erfolgte anschließend nach Bradford⁹¹.

Die Proben wurden zur Proteindenaturierung mit 100 mM Dithiothreitol gemischt und für eine Stunde bei 25 °C inkubiert. 400 mM Chloroacetamid wurden hinzugeben und eine weitere

Inkubation erfolgte für 30 Minuten im Dunkeln. Nach Zugabe der Lysyl-Endopeptidase (Enzym-Substrat-Verhältnis 1:75) wurden die Proben zur Anverdauung der Proteine zwei Stunden lang bei 25 °C inkubiert. Es erfolgte mit 50 mM Triethylammoniumbicarbonat eine Verdünnung der Proben auf eine Endkonzentration von ≤ 2 M Harnstoff. Über Nacht wurden sie mit Trypsin (Enzym-Substrat-Verhältnis 1:75) bei 25 °C inkubiert. Einprozentige Ameisensäure wurde am nächsten Tag hinzugefügt. Die StageTips-Aufreinigung wurde mit der Equilibrierung der StageTips mit Methanol und 0,1-prozentiger Ameisensäure entweder in Wasser (Puffer A) oder in 80-prozentigem Acetonitril (Puffer B) begonnen. Die Proben wurden zentrifugiert (2600 rounds per minute, rpm), auf die StageTips geladen und erneut fünf Minuten lang zentrifugiert. Daraufhin wurden die StageTips einmal mit Puffer A gewaschen, für drei Minuten zentrifugiert (2600 rpm) und abschließend zweimal mit Puffer B gewaschen. Die Trocknung erfolgte mit einer Spritze und die Proben wurden bis zur Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) bei -4 °C gelagert.

3.4.2 Massenspektrometrie

Die LC-MS wurde in der Proteomics Facility des CECADs durchgeführt. Genutzt wurden dafür das Massenspektrometer Q Exactive Plus Orbitrap in Kombination mit dem Chromatographen EASY nLC 1000. Dieser verfügt zur Peptidauftrennung über eine analytische C18-Kapillarsäule (innerer Durchmesser 50–75 μm , gefüllt mit 2,7 μm Poroshell EC120 C18), die mit den Proben und Lösungsmittel A (0,1-prozentiger Ameisensäure in Wasser) beladen wurde. Die Flussrate betrug 250 nl pro Minute mit folgendem Gradienten: drei- bis fünfprozentiges Lösungsmittel B (0,1-prozentige Ameisensäure in 80-prozentigem Acetonitril) innerhalb von einer Minute, fünf- bis 30-prozentiges Lösungsmittel B innerhalb von 119 Minuten, 30- bis 50-prozentiges Lösungsmittel B innerhalb von 19 Minuten und 50- bis 95-prozentiges Lösungsmittel B innerhalb von einer Minute. Die aufgetrennten Peptide wurden daraufhin vom Massenspektrometer im datenabhängigen Erfassungsmodus analysiert. Der orientierende MS1-Scan erfolgte mit einem Masse-zu-Ladung-Verhältnis von 300–1750 bei einer Auflösung von 70000. Darauf folgte die Isolation der zehn häufigsten Peptide innerhalb eines 2,1 Th-Fensters, die mittels der higher-energy collisional dissociation mit einer normalisierten Kollisionsenergie von 27 % weiter fragmentiert wurden. Die maximale Injektionszeit wurde auf 60 ms und die automatic gain control auf 5×10^5 festgelegt. Die Produktionen wurden mit einer Auflösung von 17500 detektiert und die Ausschlusszeit zum dynamischen Ausschluss von Vorläuferionen wurde auf 25 Sekunden eingestellt.

3.4.3 Auswertung

Der Datensatz der Massenspektrometrie wurde mit der frei zugänglichen Software MaxQuant 1.5.3.8 analysiert. Dazu wurde die Datenbank UniProt RAT.fasta genutzt, die den Datensatz auf häufige Kontaminationen überprüft. Die Falscherkennungsrate (false discovery rate, FDR) bei Protein- und Peptidspektrumübereinstimmungen wurde mittels des target-decoy approach jeweils auf ein Prozent angesetzt. Die minimale Peptidlänge betrug sieben Aminosäuren und Carbamidomethylierungen an Cysteinresten galten als feste Modifikation. Es wurden die Standardeinstellungen für die markierungsfreie massenspektrometrische Quantifizierung (label-free quantification, LFQ) und die Option match-between runs genutzt. Eine Hauptkomponentenanalyse wurde verwendet, um das Clustering der Proben innerhalb der einzelnen Gruppen zu analysieren. Zur weiteren statistischen Auswertung wurde die Software Perseus 1.5.5.3 genutzt. Folgende Gruppenvergleiche wurden durchgeführt: LIG-CONTR/C-CONTR, IUS-CONTR/C-CONTR, LIG-CONTR/IUS-CONTR, C-N3PUFA/C-CONTR, LIG-N3PUFA/LIG-CONTR und IUS-N3PUFA/IUS-CONTR. Die LFQ-Werte wurden logarithmiert (\log_2). Ein Zweistichproben-t-Test mit einem Signifikanzniveau $p < 0,05$ wurde angewendet. Signifikant veränderte Proteine mit einem \log_2 fold change von $\geq |0,58|$ wurden für die weitere Datenanalyse verwendet. Die Datenbank Matrixome 2.0 diente der Identifikation und Klassifikation matrixasoziiierter Proteine. Das Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) 11.0 analysierte daraufhin deren Interaktionen. Dafür wurden die Einstellungen „full network“, „mean confidence of the network edges“ und „database as the active interaction score“ ausgewählt. Der minimale Interaktionsscore wurde auf 0,7 (high confidence) festgelegt. Von STRING zugeordnete Termini der Datenbank Gene Ontology (GO) mit einer $-\log_{10}$ -FDR von $> 1,3$ wurden innerhalb jeder Kategorie mit Hilfe des Benjamini-Hochberg-Verfahrens für multiples Testen korrigiert.

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism 7. Da die sechs Gruppen voneinander unabhängig sind und aufgrund der geringen Stichprobengröße nicht von einer Normalverteilung der Messwerte ausgegangen werden konnte, wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-Test ausgewählt. Dieser vergleicht jeweils zwei Gruppen untereinander und ermittelt die Teststatistik anhand einer Rangierung der Daten.⁹² Betrachtet wurden die Paarungen C-CONTR/C-N3PUFA, LIG-CONTR/LIG-N3PUFA, IUS-CONTR/IUS-N3PUFA, C-CONTR/LIG-CONTR und C-CONTR/IUS-CONTR. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt, sodass Ergebnisse mit einem p-Wert $< 0,05$ als signifikant und in den Grafiken mit einem Stern (*) markiert wurden.

Im Falle der densitometrisch erhobenen Daten wurde vor der statistischen Analyse eine Normalisierung durchgeführt. Die Mittelwerte der C-CONTR-Gruppe wurden auf 1 normalisiert. Die statistische Auswertung der Matrisomanalyse ist unter 2.4.3 nachzulesen.

4 Ergebnisse

4.1 Inflammation

4.1.1 Immunhistochemische CD68-Färbung: Die N3PUFA-Nahrungsintervention vermindert bei Tieren nach intrauterinem Stress die Infiltration des Nierengewebes mit Makrophagen.

Nachdem eine IHC-Färbung mit einem Antikörper gegen das Protein cluster of differentiation 68 (CD68) durchgeführt worden war, wurde die Anzahl der CD68-positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtfläche des Nierenschnitts ermittelt. Die CD68-exprimierenden Monozyten bzw. Makrophagen traten häufig gruppiert im Bereich des Marks und der Sammelrohre auf (Abb. 3). Es lässt sich eine leichte ($p > 0,05$) Erhöhung der CD68-positiven Zellen in der IUS-CONTR- im Vergleich zur C-CONTR-Gruppe feststellen. Innerhalb der IUS-Gruppe führte die Nahrungsintervention zu einer signifikanten Reduktion ($p = 0,0087$) der CD68-positiven Zellen. (Abb. 4).

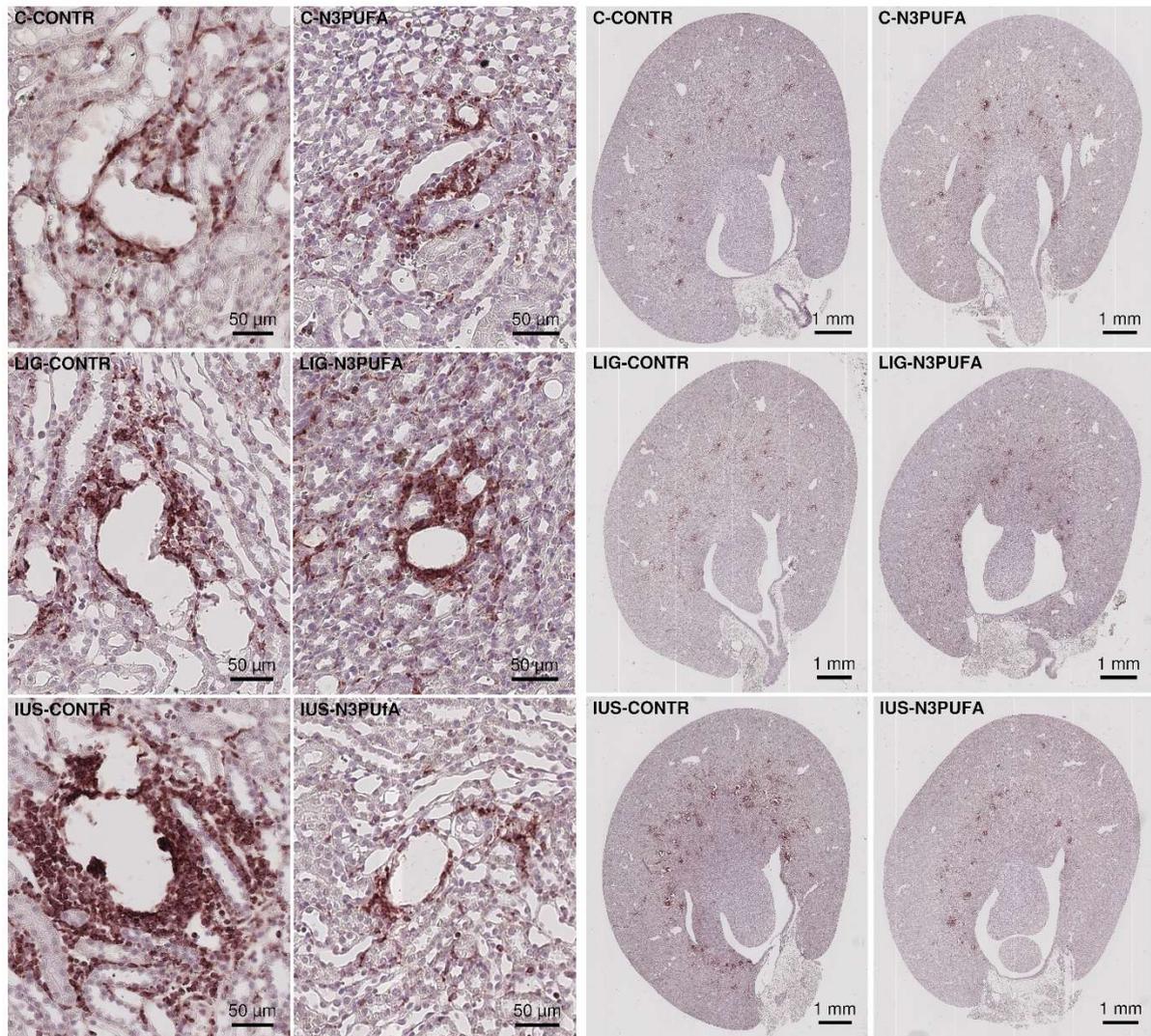


Abb. 3 Immunhistochemische Färbung mit CD68-Antikörper (ab31630, 1:500). Repräsentative Ausschnitte aus dem Nierenlängsschnitt in 20-facher Vergrößerung.

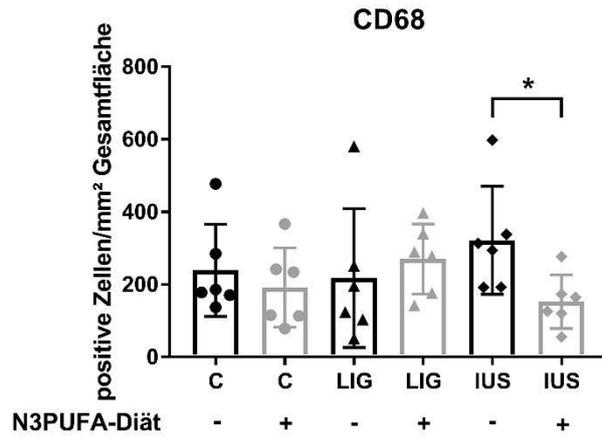


Abb. 4 Anzahl CD68-positiver Zellen pro Quadratmillimeter Gesamtfläche. Immunhistochemische Färbung. C-CONTR = 6, C-N3PUFA = 6, LIG-CONTR = 6, LIG-N3PUFA = 6, IUS-CONTR = 6, IUS-N3PUFA = 6 Tiere pro Gruppe. Mittelwert \pm Standardabweichung. Mann-Whitney * $p < 0,05$.

4.1.2 Immunhistochemische NF- κ B p65-Färbung: Weder IUGR noch N3PUFA verändern signifikant die Transkription proinflammatorischer Gene.

Für die Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit einem Antikörper gegen den nukleären Faktor κ B p65 (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells, NF- κ B p65) wurde die positive Pixel-Fläche im Verhältnis zur Kortex-Medulla-Fläche bestimmt (Abb. 5), da das Signal nicht einzelnen Zellen zugeordnet werden konnte. Es konnten keine signifikanten Unterschiede vermerkt werden (Abb. 6). Allerdings lässt sich eine dem Ergebnis der CD68-Färbung ähnliche statistische Verteilung erkennen.

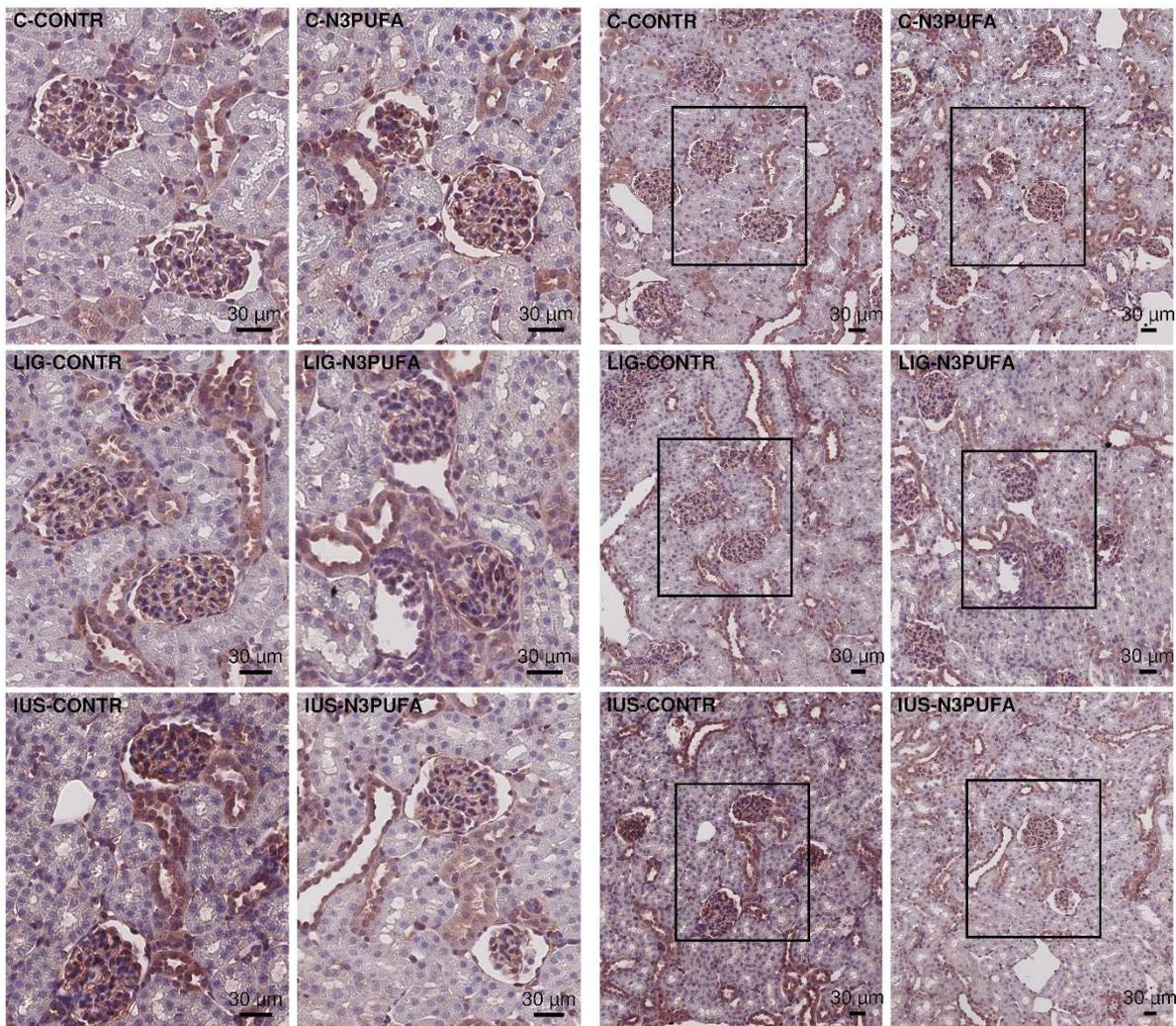


Abb. 5 Immunhistochemische Färbung mit NF- κ B p65-Antikörper (cs#8242, 1:1500). Repräsentative Ausschnitte aus dem Nierenkortex in 20-facher Vergrößerung.

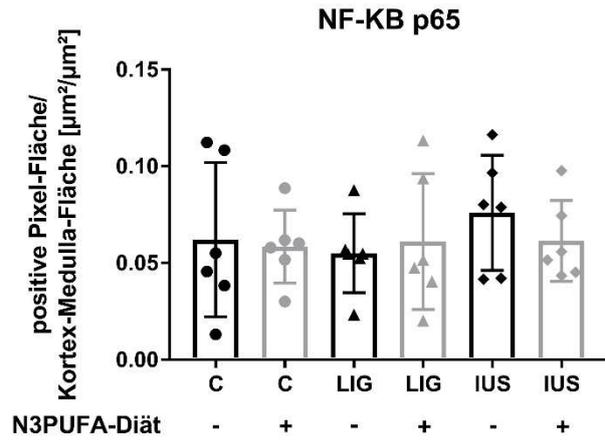


Abb. 6 Anteil NF- κ B p65-positiver Fläche an der Kortex-Medulla-Fläche. Immunhistochemische Färbung. C-CONTR = 6, C-N3PUFA = 6, LIG-CONTR = 6, LIG-N3PUFA = 6, IUS-CONTR = 6, IUS-N3PUFA = 6 Tiere pro Gruppe. Mittelwert \pm Standardabweichung. Mann-Whitney * $p < 0,05$.

4.2 Zellproliferation

4.2.1 Immunhistochemische Ki-67-Färbung: Histologisch zeigen sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Anzahl proliferierender Zellen.

Um die Anzahl der proliferierenden Zellen bestimmen zu können, wurden diese immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen Ki-67 markiert (Abb. 7). Die Anzahl positiver Zellen wurde jeweils auf die glomeruläre Fläche (Abb. 8), auf die Kortex-Medulla-Fläche (Abb. 9) und auf die Fläche der Sammelrohre (Abb. 10) bezogen. Die Auswertung ergab keine signifikanten Ergebnisse. Insbesondere im Falle der Kortex-Medulla-Fläche lässt sich jedoch eine leichte Verringerung ($p > 0,05$) der proliferierenden Zellen durch die Nahrungsintervention erkennen.

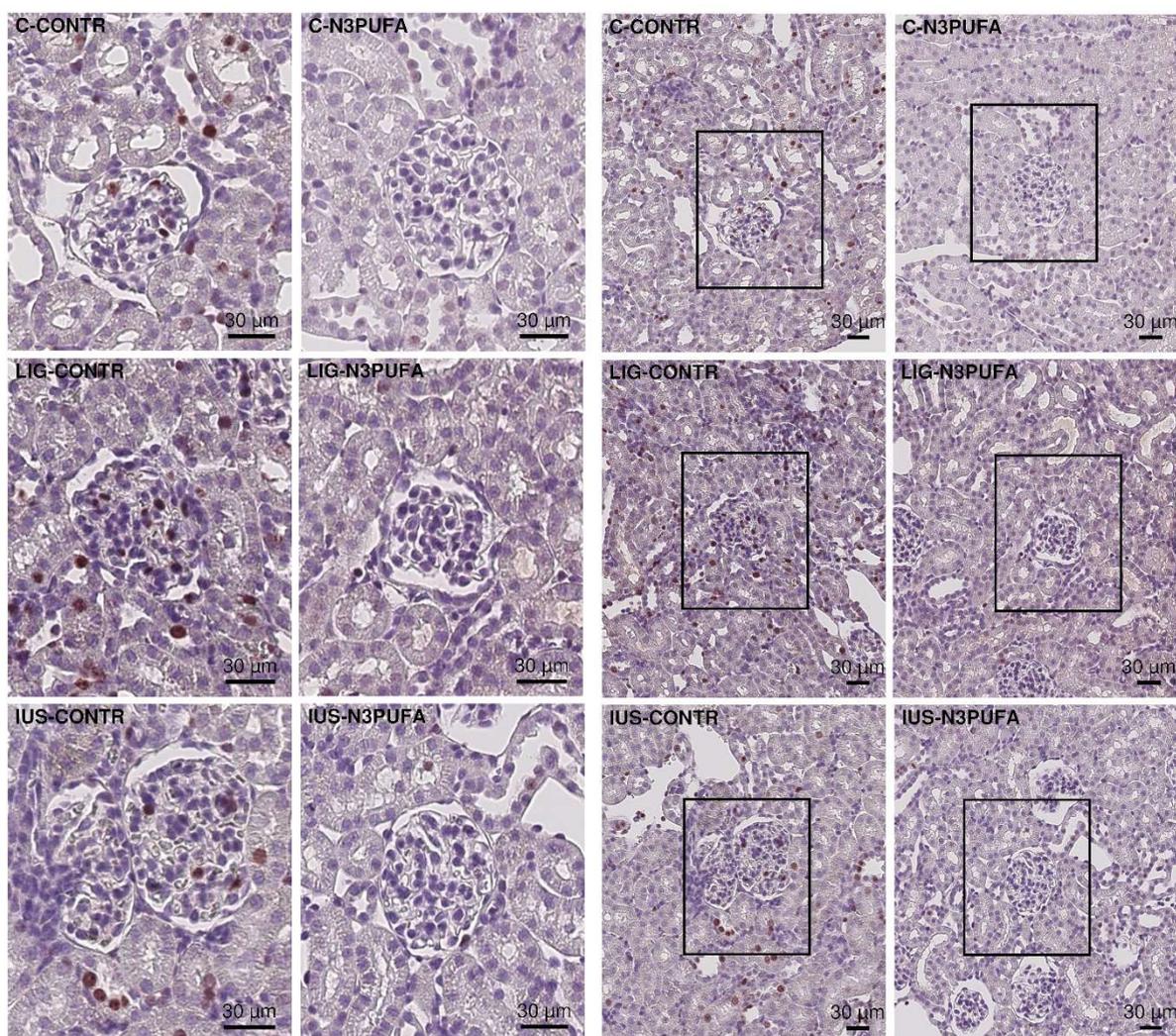


Abb. 7 Immunhistochemische Färbung mit Ki-67-Antikörper (14-5698-82, 1:400). Repräsentative Ausschnitte aus dem Nierenkortex in 20-facher Vergrößerung.

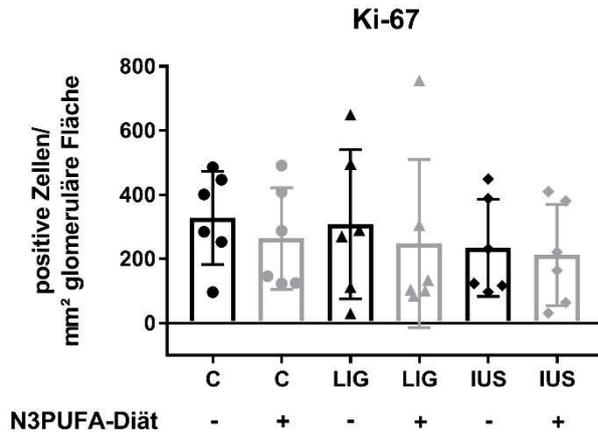


Abb. 8 Anzahl Ki-67-positiver Zellen pro Quadratmillimeter glomeruläre Fläche. Immunhistochemische Färbung. C-CONTR = 6, C-N3PUFA = 6, LIG-CONTR = 6, LIG-N3PUFA = 6, IUS-CONTR = 6, IUS-N3PUFA = 6 Tiere pro Gruppe. Mittelwert \pm Standardabweichung. Mann-Whitney * $p < 0,05$.

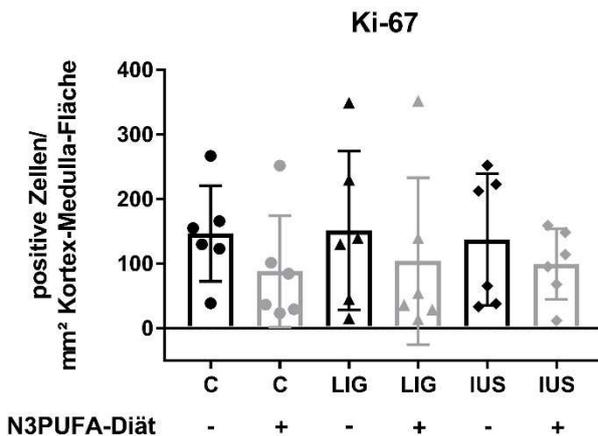


Abb. 9 Anzahl Ki-67-positiver Zellen pro Quadratmillimeter Kortex-Medulla-Fläche. Immunhistochemische Färbung. C-CONTR = 6, C-N3PUFA = 6, LIG-CONTR = 6, LIG-N3PUFA = 6, IUS-CONTR = 6, IUS-N3PUFA = 6 Tiere pro Gruppe. Mittelwert \pm Standardabweichung. Mann-Whitney * $p < 0,05$.

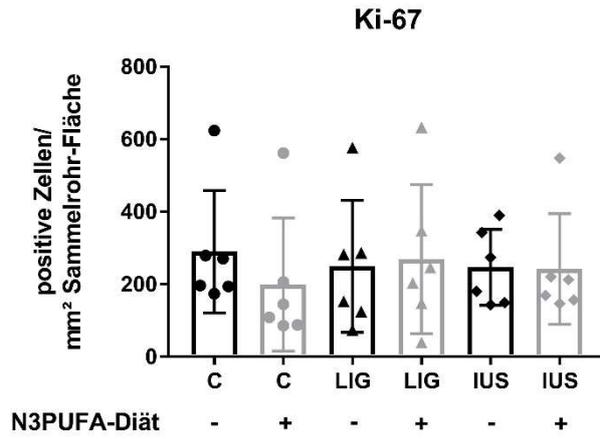


Abb. 10 Anzahl Ki-67-positiver Zellen pro Quadratmillimeter Sammelrohr-Fläche. Immunhistochemische Färbung. C-CONTR = 6, C-N3PUFA = 6, LIG-CONTR = 6, LIG-N3PUFA = 6, IUS-CONTR = 6, IUS-N3PUFA = 6 Tiere pro Gruppe. Mittelwert \pm Standardabweichung. Mann-Whitney * $p < 0,05$.

4.2.2 Proliferationsmarker im Western Blot: Auf Proteinebene lässt sich bei Tieren nach intrauterinem Stress eine verstärkte Proliferation im Nierenkortex nachweisen.

Ergänzend zu den histologischen Untersuchungen wurden Western Blots mit Gewebe aus dem Nierenkortex durchgeführt. Dazu wurden zunächst die im Rahmen der Zellproliferation als Effektorproteine dienenden Marker Cyclin D1 und das proliferating cell nuclear antigen (PCNA) betrachtet.

PCNA ($p = 0,0079$) ebenso wie Cyclin D1 ($p = 0,0159$) wurden signifikant verstärkt in der IUS-CONTR-Gruppe im Vergleich zur C-CONTR-Gruppe exprimiert (Abb. 11).

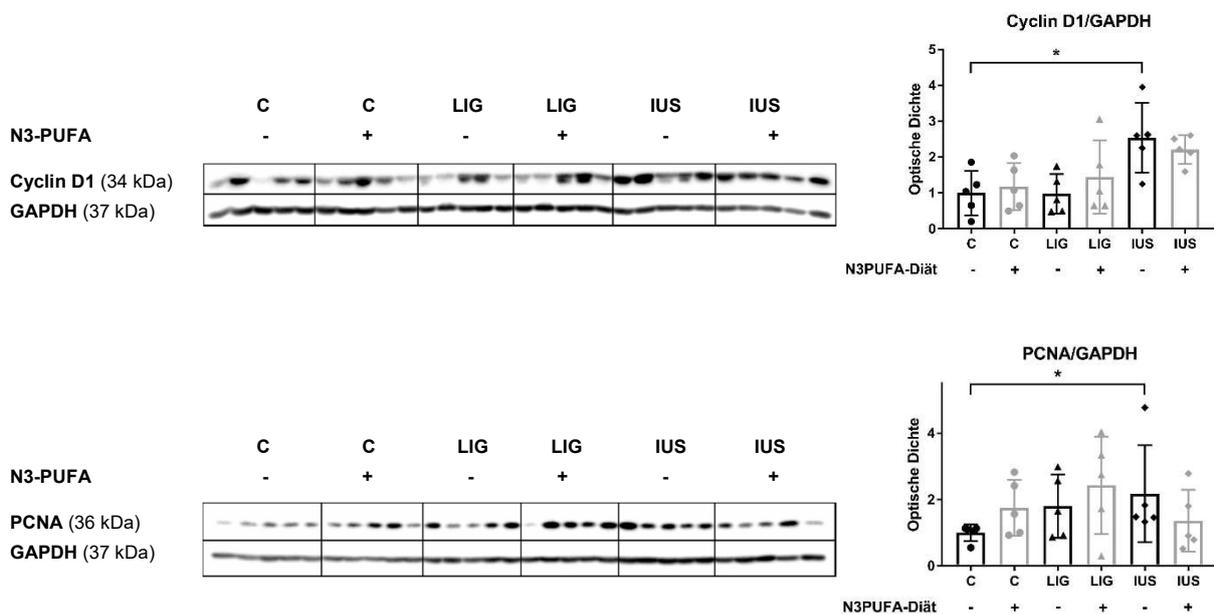


Abb. 11 Western Blots und Densitometrie Cyclin D1 zu GAPDH und PCNA zu GAPDH des Nierenkortex. C-CONTR = 5, C-N3PUFA = 5, LIG-CONTR = 5, LIG-N3PUFA = 5, IUS-CONTR = 5, IUS-N3PUFA = 5 Tiere pro Gruppe. Mittelwert \pm Standardabweichung. Mann-Whitney * $p < 0,05$.

4.2.3 Immunfluoreszenzfärbung PDGFR β & PCNA: Eine Zuordnung der Proliferation zu einer spezifischen PDGFR β -exprimierenden Zellart war in der Gruppe nach intrauteriner Wachstumsrestriktion ausgelöst durch intrauterinen Stress nicht möglich.

Um die gesteigerte PCNA-Expression der IUS-CONTR-Gruppe innerhalb des Kortex genauer lokalisieren zu können, wurde deren Verteilung zusätzlich mittels Immunfluoreszenz dargestellt. Es erfolgte eine Kofärbung mit einem Antikörper gegen den platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR β) (Abb. 12), welcher insbesondere von Mesangialzellen, aber auch von Perizyten und Fibroblasten exprimiert wird. Eine quantitative Auswertung der Mesangialzellzahl war aufgrund der nur exemplarisch durchgeführten Färbungen nicht möglich, dennoch scheinen sich in der IUS-CONTR-Gruppe im Vergleich zur C-CONTR- und IUS-N3PUFA-Gruppe vermehrt PDGFR β -positive Zellen zu zeigen. Diese exprimieren allerdings weder intra- noch extraglomerulär PCNA, sodass nicht von einer aktuell stattfindenden Proliferation auszugehen ist.

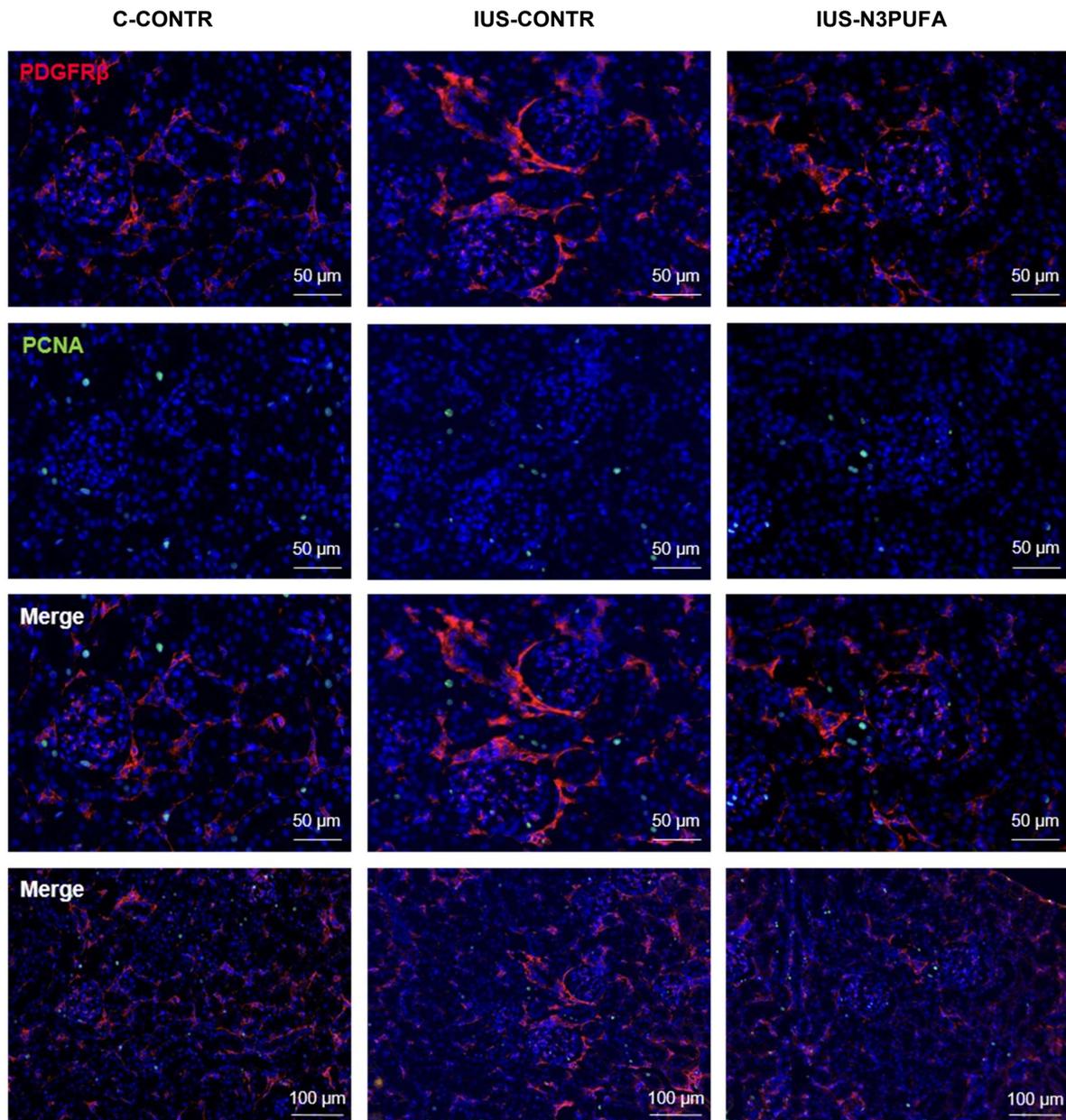


Abb. 12 Beispielhafte Immunfluoreszenzfärbung mit PDGFR β -Antikörper (#4564, 1:500) und PCNA-Antikörper (M0879, 1:300) des Nierenkortex. Repräsentative Ausschnitte in 40-facher sowie 20-facher Vergrößerung.

4.2.4 Immunfluoreszenzfärbung CD68 & Ki-67: Es zeigt sich eine Koexpression von Makrophagen- sowie Proliferationsmarkern in Nierenrinde und -mark nach intrauteriner Wachstumsrestriktion ausgelöst durch intrauterinen Stress.

Zur spezifischen Beurteilung des Proliferationsverhaltens der CD68-positiven Zellen wurde beispielhaft eine immunfluoreszierende Kofärbung mit einem Antikörper gegen den Proliferationsmarker Ki-67 in den Gruppen C-CONTR, IUS-CONTR und IUS-N3PUFA durchgeführt. Dazu wurden Ausschnitte aus dem Mark gewählt (Abb. 13), die die bereits in der IHC-Färbung sichtbaren Zellkonglomerate zeigen (Abb. 3), sowie Ausschnitte aus dem Kortex (Abb. 14). Es erfolgten nur exemplarische Färbungen, welche nicht quantitativ ausgewertet wurden. In beiden Fällen scheinen in der IUS-CONTR-Gruppe sowohl vermehrt Monozyten und Makrophagen als auch proliferierende Zellen aufzutreten. Grundsätzlich konnte ein Teil der CD68-positiven Zellen mit dem Ki-67-Antikörper angefärbt werden, was für eine Proliferation der Monozyten bzw. Makrophagen spricht.

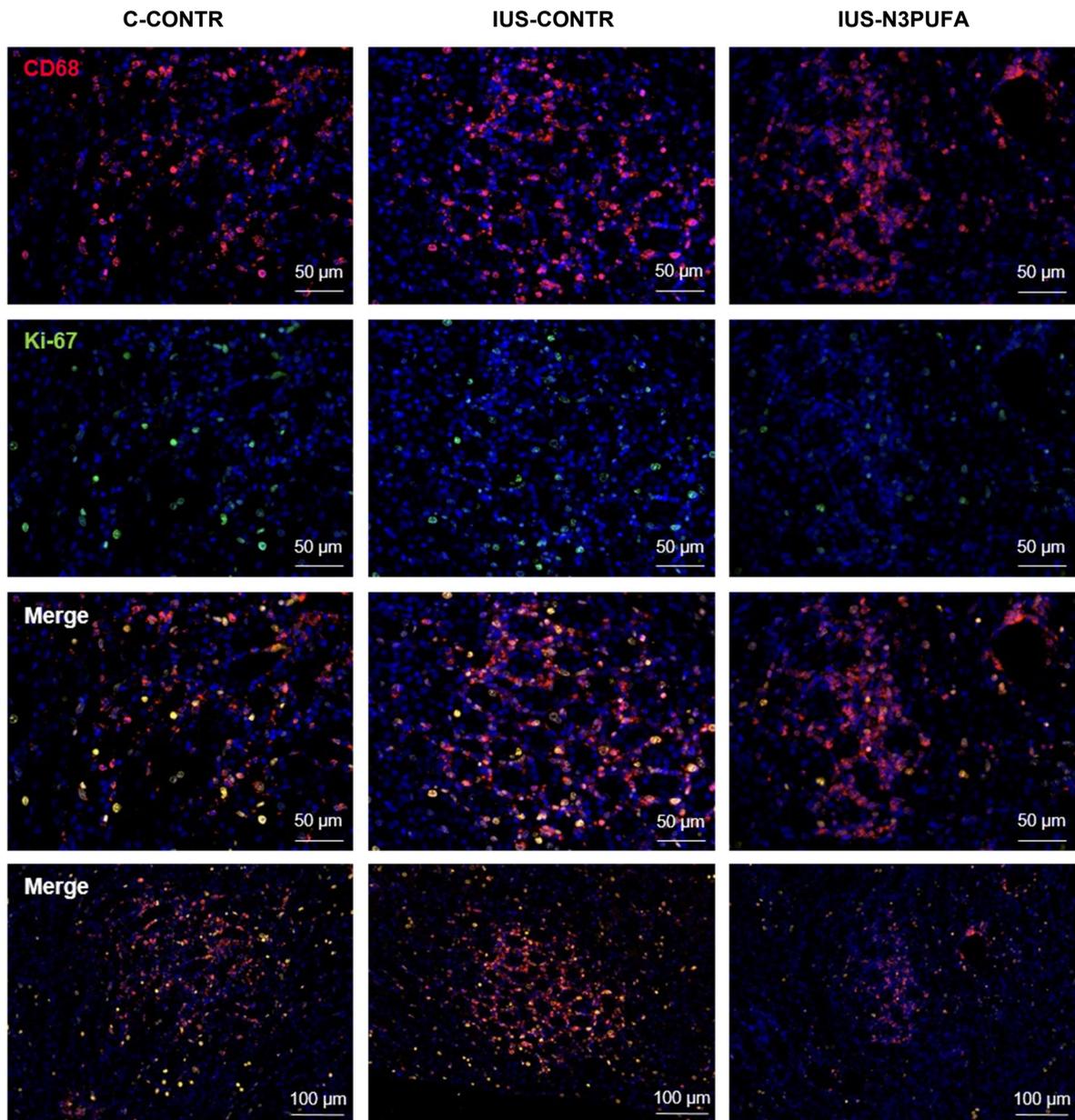


Abb. 13 Beispielhafte Immunfluoreszenzfärbung mit CD68-Antikörper (ab31630, 1:500) und Ki-67-Antikörper (14-5698-82, 1:800) der Zellkonglomerate im Bereich des Nierenmarks. Repräsentative Ausschnitte in 40-facher sowie 20-facher Vergrößerung.

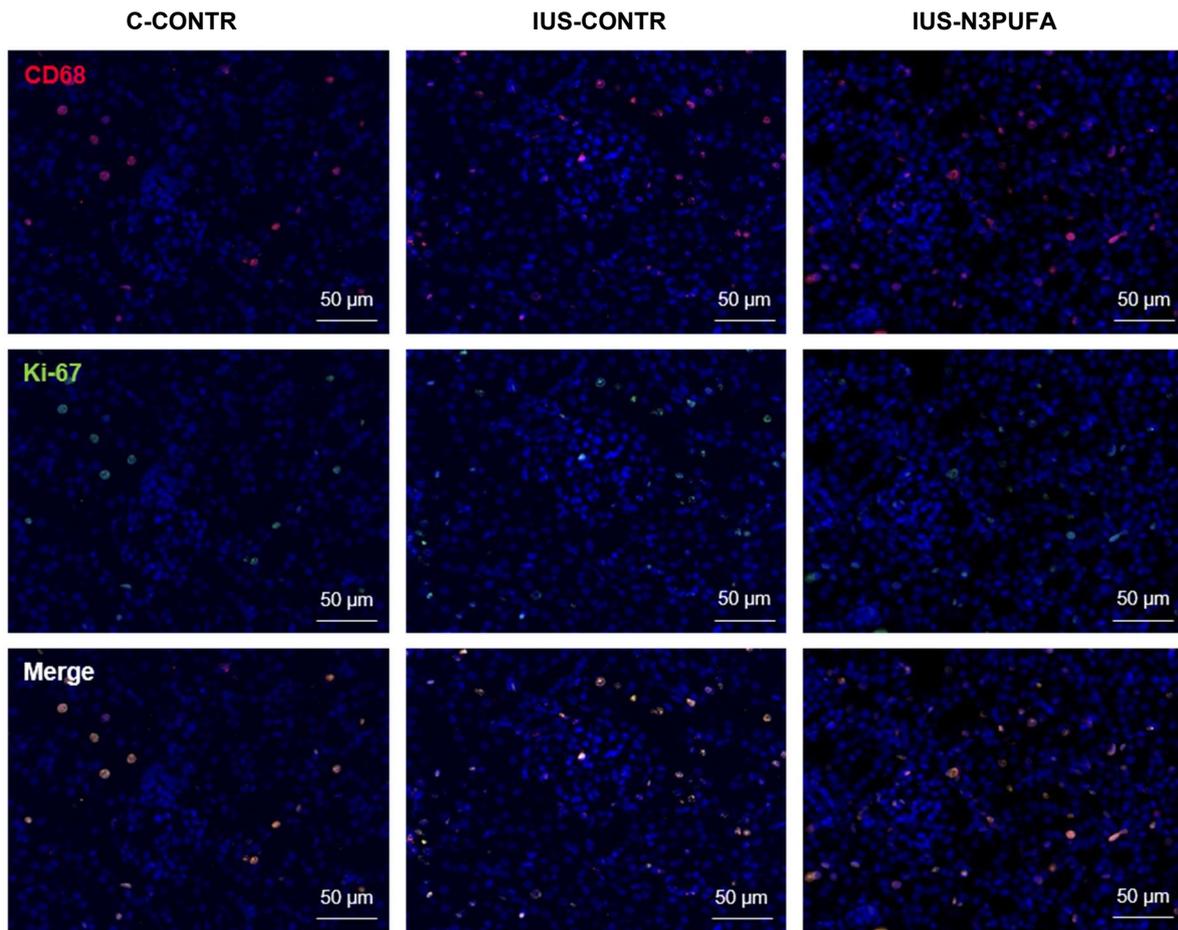


Abb. 14 Beispielhafte Immunfluoreszenzfärbung mit CD68-Antikörper (ab31630, 1:500) und Ki-67-Antikörper (14-5698-82, 1:800) des Nierenkortex. Repräsentative Ausschnitte in 40-facher Vergrößerung.

4.2.5 Signalwege der Proliferation im Western Blot: Die gesteigerte Expression von Proliferationsmarkern bei Tieren nach intrauterinem Stress lässt sich eventuell auf eine Aktivierung der Kinasen ERK1/2 zurückführen.

Zum tieferen Verständnis wurden außerdem die Proteinexpressionen von Komponenten der Rezeptor- und Signaltransduktionsebene untersucht, die im Zusammenhang mit Cyclin D1 und PCNA stehen.

Die nachfolgende Abbildung 15 zeigt den Wnt/ β -Catenin-Signalweg. Die Expression der Proteine Wingless/Int-1 2b (WNT2b), Wingless/Int-1 3a (WNT3a), low-density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6) und active β -Catenin wies bei großer Streuung innerhalb der einzelnen Gruppen keine signifikanten Gruppenunterschiede auf.

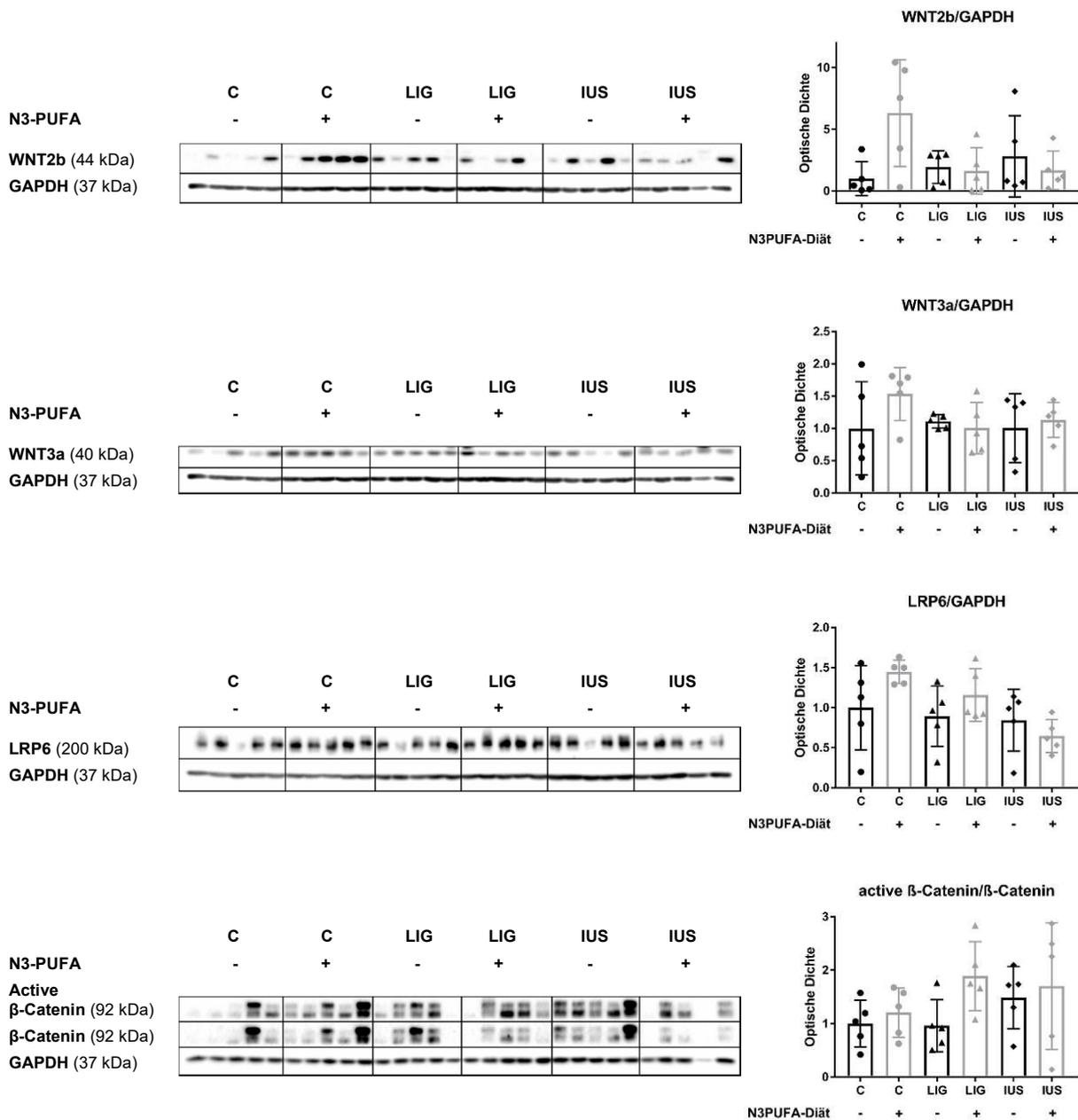


Abb. 15 Western Blots und Densitometrie WNT2b zu GAPDH, WNT3a zu GAPDH, LRP6 zu GAPDH und active β -Catenin zu β -Catenin des Nierenkortex. C-CONTR = 5, C-N3PUFA = 5, LIG-CONTR = 5, LIG-N3PUFA = 5, IUS-CONTR = 5, IUS-N3PUFA = 5 Tiere pro Gruppe. Mittelwert \pm Standardabweichung. Mann-Whitney * p < 0,05.

Bei der Expression des PDGFR β (Abb. 16), der in diesem Rahmen nicht als Zellmarker diente, sondern hinsichtlich seiner Funktion innerhalb der Signalkaskade untersucht wurde, war eine signifikante Erhöhung der Proteinexpression in der Gruppe C-N3PUFA im Vergleich zur C-CONTR-Gruppe festzustellen ($p = 0,0317$). Innerhalb der IUS-Gruppe war die Expression in der Interventionsgruppe signifikant verringert im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p = 0,0317$).

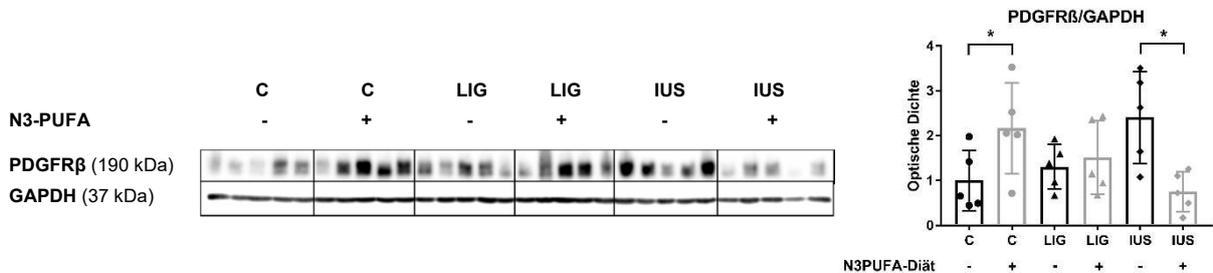


Abb. 16 Western Blots und Densitometrie PDGFR β zu GAPDH des Nierenkortex. C-CONTR = 5, C-N3PUFA = 5, LIG-CONTR = 5, LIG-N3PUFA = 5, IUS-CONTR = 5, IUS-N3PUFA = 5 Tiere pro Gruppe. Mittelwert \pm Standardabweichung. Mann-Whitney * $p < 0,05$.

Die Proteinexpression der phosphorylierten (p) bezogen auf die totalen extracellulär signal regulated kinases 1/2 (ERK1/2) (Abb. 17) war in den Gruppen LIG-CONTR ($p = 0,0079$) und IUS-CONTR ($p = 0,0317$) im Vergleich zu C-CONTR signifikant erhöht. Zudem zeigte sich eine erhöhte Expression in der Gruppe C-N3PUFA im Vergleich zu C-CONTR ($p = 0,0317$). Die Expression wurde durch die Interventionsnahrung innerhalb der LIG- und IUS-Gruppe nicht beeinflusst.

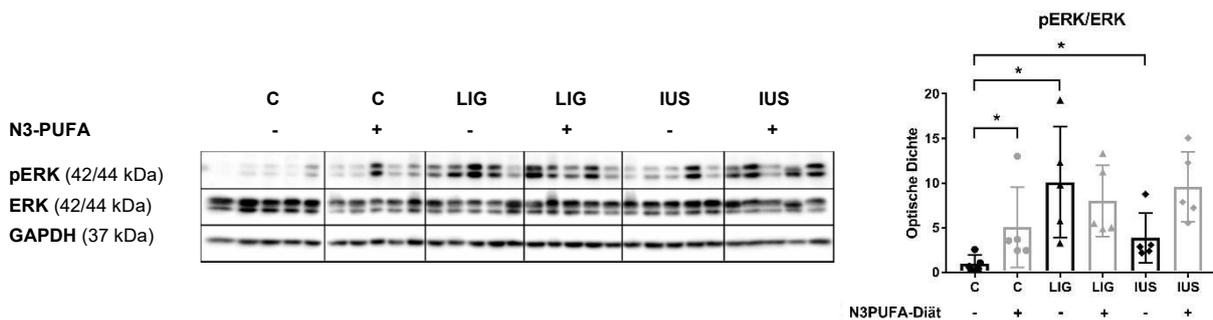


Abb. 17 Western Blots und Densitometrie pERK zu ERK des Nierenkortex. C-CONTR = 5, C-N3PUFA = 5, LIG-CONTR = 5, LIG-N3PUFA = 5, IUS-CONTR = 5, IUS-N3PUFA = 5 Tiere pro Gruppe. Mittelwert \pm Standardabweichung. Mann-Whitney * $p < 0,05$.

Die Expression der pP38 mitogen-activated protein kinases (MAPK) bezogen auf P38 MAPK (Abb. 18) zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede.

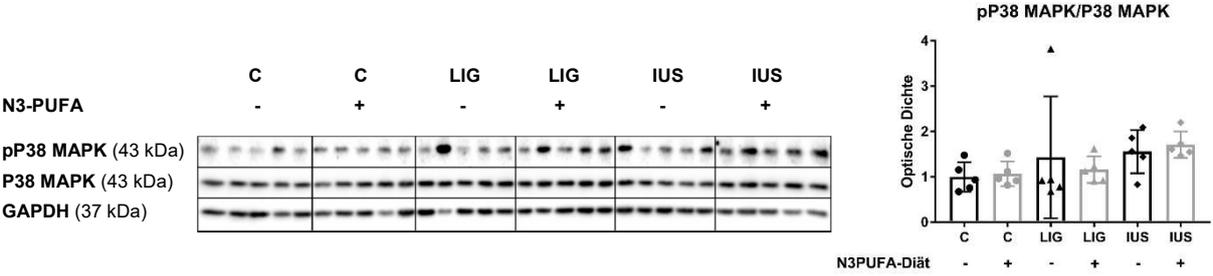


Abb. 18 Western Blots und Densitometrie pP38 MAPK zu P38 MAPK des Nierenkortex. C-CONTR = 5, C-N3PUFA = 5, LIG-CONTR = 5, LIG-N3PUFA = 5, IUS-CONTR = 5, IUS-N3PUFA = 5 Tiere pro Gruppe. Mittelwert \pm Standardabweichung. Mann-Whitney * $p < 0,05$.

4.3 Extrazelluläre Matrix

4.3.1 Piko-Sirius-Rot-Färbung: Bei Tieren mit intrauteriner Wachstumsrestriktion durch LIG zeigt sich eine verminderte Kollagenanreicherung in der Niere.

Die Bestimmung der kollagenhaltigen Flächenanteile an der Gesamtfläche (Abb. 20) und an der Kortexfläche (Abb. 21) erfolgte anhand einer Piko-Sirius-Rot-Färbung (Abb. 19). In beiden Fällen zeigte die LIG-CONTR-Gruppe im Vergleich zur C-CONTR-Gruppe einen signifikant verringerten Anteil kollagenhaltiger Fläche ($p = 0,0411$).

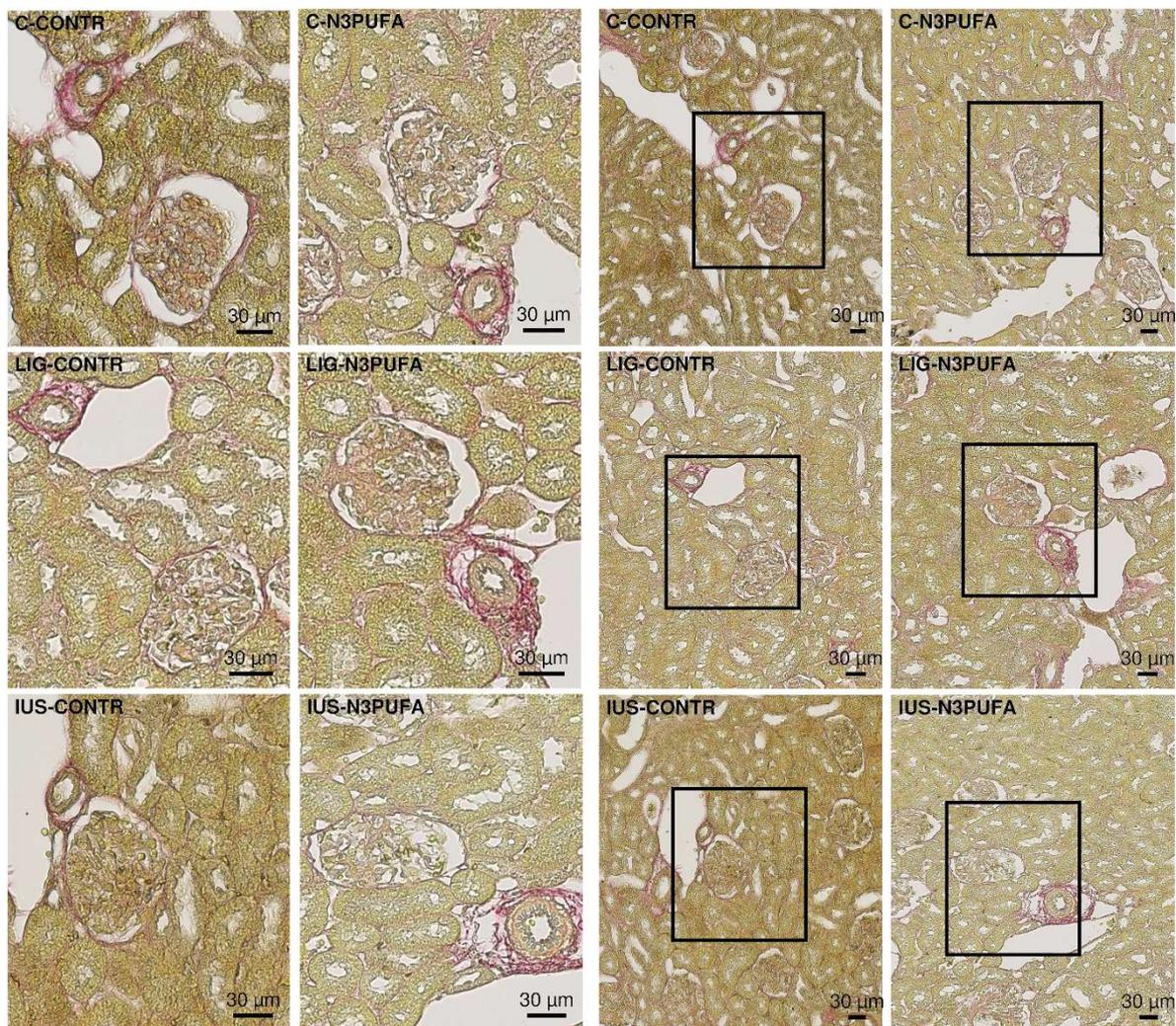


Abb. 19 Piko-Sirius-Rot-Färbung. Repräsentative Ausschnitte aus dem Nierenkortex in 20-facher Vergrößerung.

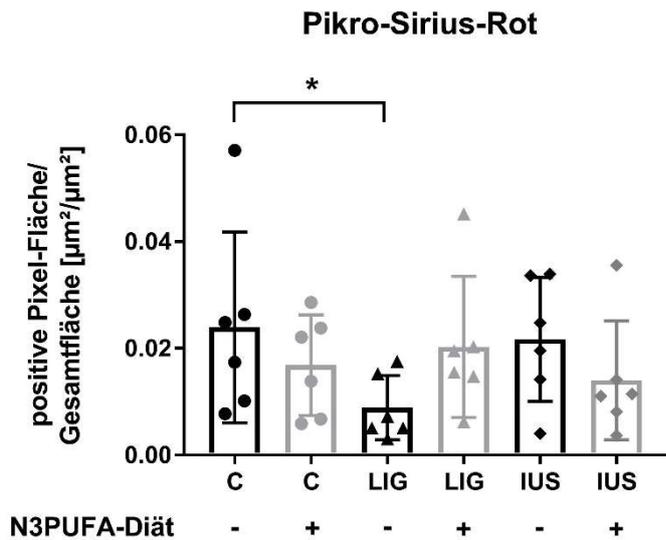


Abb. 20 Anteil kollagenhaltiger Fläche an der Gesamtfläche. Pikro-Sirius-Rot-Färbung. C-CONTR = 6, C-N3PUFA = 6, LIG-CONTR = 6, LIG-N3PUFA = 6, IUS-CONTR = 6, IUS-N3PUFA = 6 Tiere pro Gruppe. Mittelwert \pm Standardabweichung. Mann-Whitney * $p < 0,05$.

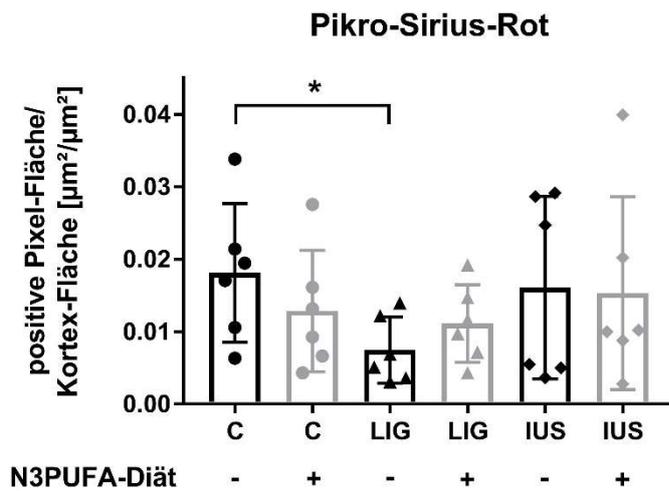


Abb. 21 Anteil kollagenhaltiger Fläche an der Kortexfläche. Pikro-Sirius-Rot-Färbung. C-CONTR = 6, C-N3PUFA = 6, LIG-CONTR = 6, LIG-N3PUFA = 6, IUS-CONTR = 6, IUS-N3PUFA = 6 Tiere pro Gruppe. Mittelwert \pm Standardabweichung. Mann-Whitney * $p < 0,05$.

4.3.2 Fibrosemarker im Western Blot: Nach IUGR ergibt sich eine vermehrte TGFβ1-Expression, die nach IUS stärker als nach LIG zu beobachten ist.

Abbildung 22 stellt den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1) und den transforming growth factor beta 1 (TGFβ1) dar. Die Proteinexpression von PAI-1 wies keine statistisch relevanten Unterschiede auf. Die Expression von TGFβ1 war signifikant erhöht in den Gruppen C-N3PUFA ($p = 0,0159$) und IUS-CONTR ($p = 0,0317$) im Vergleich zu C-CONTR.

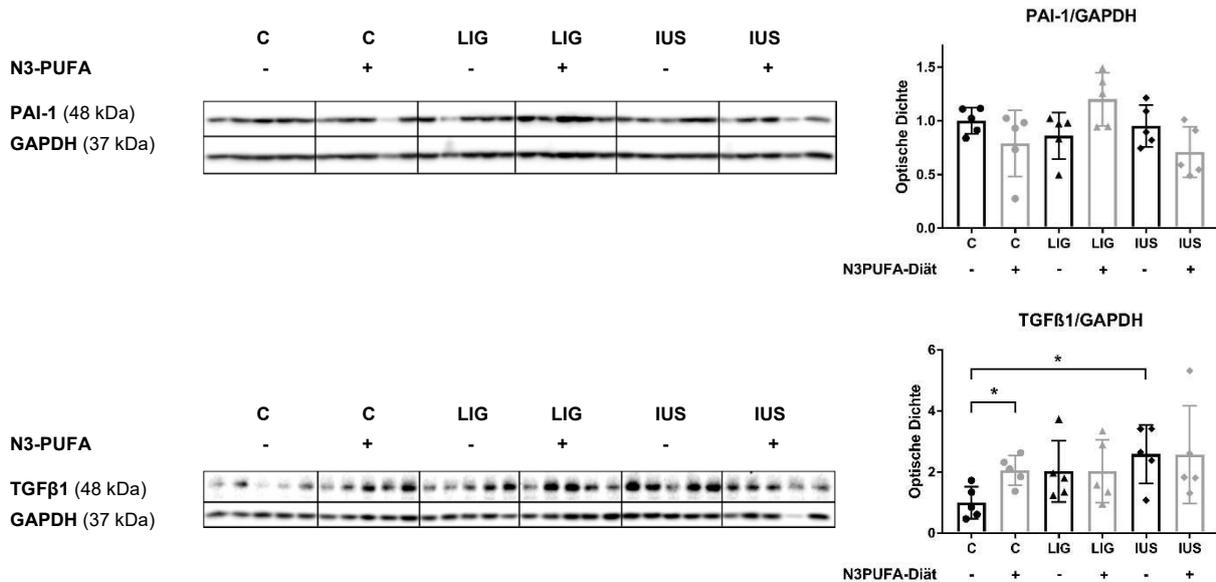
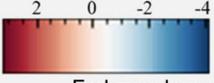


Abb. 22 Western Blots und Densitometrie PAI-1 zu GAPDH und TGFβ1 zu GAPDH des Nierenkortex. C-CONTR = 5, C-N3PUFA = 5, LIG-CONTR = 5, LIG-N3PUFA = 5, IUS-CONTR = 5, IUS-N3PUFA = 5 Tiere pro Gruppe. Mittelwert ± Standardabweichung. Mann-Whitney * $p < 0,05$.

4.3.3 Matrisomanalyse: Bei LIG-Tieren mit N3PUFA-Intervention zeigen sich 12 Proteine des Matrisoms herabreguliert, welche bei LIG-Tieren mit Standardnahrung im Vergleich zu den Kontrolltieren hochreguliert waren.

Zur Einordnung der bisherigen Ergebnisse wurden Daten aus der primär von Frau Dr. nat. med. Jenny Voggel durchgeführten Matrisomanalyse hinzugezogen. Die Analyse durch die Datenbank Matrisome 2.0 zeigte 34 Proteine auf, die in mindestens einem Gruppenvergleich einen signifikanten Unterschied aufwiesen. Zum „core matrisome“ zählten die fünf „extracellular matrix glycoproteins“ fibrinogen alpha chain (FGA), - beta chain (FGB), - gamma chain (FGG), Fibrillin-2 (FBN2) und insulin-like growth factor-binding protein 6 (IGFBP-6) sowie ein Kollagen (Collagen type XIV alpha 1 chain, COL14A1). Die restlichen Proteine waren „Matrisome-associated“ und setzten sich aus 14 „extracellular matrix regulators“, acht „extracellular matrix -affiliated proteins“ und sechs „secreted factors“ zusammen. 13 Proteine wiesen eine Gegenregulation zwischen LIG-CONTR/C-CONTR und LIG-N3PUFA/LIG-CONTR auf, bei denen es mit Ausnahme des Ccl9-like protein (CCL9) stets zu einer Hochregulation nach LIG und zu einer Herabregulation durch N3PUFA kam (Abb. 23).

Matrisomanalyse des renalen Kortex			Statistik		Heatmap, fold change  Farbzuordnung					
Protein	Gen	Protein- beschreibung	p- Wert	Log2 fold chang e	LIG- CONTR/ C- CONTR ¹	IUS- CONTR/ C- CONTR ²	LIG- CONTR/ IUS- CONTR ³	C- N3PUFA/ C- CONTR ⁴	LIG- N3PUFA/ LIG- CONTR ⁵	IUS- N3PUFA/ IUS- CONTR ⁶
Core Matrisome, ECM Glycoproteins										
FIBB	<i>Fgb</i>	Fibrinogen beta chain	0.0123 ₁ 0.0188	1.09 ¹ -1.05 ⁵	*				*	
FIBG	<i>Fgg</i>	Fibrinogen gamma chain	0.0100 ₁ 0.0062 ₅	1.03 ¹ -1.04 ⁵	**				**	
FIBA	<i>Fga</i>	Fibrinogen alpha chain	0.0150 ₁ 0.0206 ₅	0.86 ¹ -0.86 ⁵	*				*	
Q9WUH9	<i>Fbn2</i>	Fibrillin-2	0.0112 ₃	0.72 ³			*			
IBP6	<i>Igfbp6</i>	Insulin-like growth factor-binding protein 6	0.0057 ₂ 0.0344 ₁ 0.0343 ₅	-0.90 ² 0.34 ³ 0.44 ⁵		**	*		*	
Core Matrisome, Collagen										
D3ZT9	<i>Col14a1</i>	Collagen type XIV alpha 1 chain	0.0291 ₄	0.42 ⁴				*		
Matrisome-associated, ECM Regulators										
CBG	<i>Ser-pina6</i>	Corticosteroid-binding globulin	0.0131 ₁	1.51 ¹	*					
SPA3K	<i>Ser-pina3k</i>	Serine protease inhibitor A3K	0.0226 ₁ 0.0039 ₅	0.98 ¹ -0.91 ⁵	*				**	
SPA3M	<i>Ser-pina3m</i>	Serine protease inhibitor A3M	0.0039 ₅	-1.46 ⁵					*	
ITIH3	<i>Itih3</i>	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	0.0262 0.0170 ₅	0.97 ¹ -0.20 ⁵	*				**	
HEP2	<i>Ser-pind1</i>	Heparin cofactor 2	0.0315 ₁ 0.0058 ₅	0.78 ¹ -0.65 ⁵	*				**	
D3ZFC6	<i>Itih4</i>	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4	0.0254 ₁ 0.0170 ₅	0.75 ¹ -0.99 ⁵	*				*	
D3ZFH5	<i>Itih2</i>	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2	0.0067 0.0458	0.72 ¹ -0.78 ⁵	**				*	
FA12	<i>F12</i>	Coagulation factor XII	0.0496 0.0228 ₅	0.70 ¹ -0.89 ⁵	*				*	
HRG	<i>Hrg</i>	Histidine-rich glycoprotein	0.0343 ₁	0.67 ¹	*					
THRB	<i>F2</i>	Prothrombin	0.0272 ₁ 0.0231 ₅	0.67 ¹ -0.69 ⁵	*				*	
Q9JJI7	<i>St14</i>	Suppressor of tumorigenicity 14 protein homolog	0.0402 ₅	-0.40 ⁵					*	
FA9	<i>F9</i>	Coagulation factor IX	0.0112 ₆	-0.80 ⁶						*
Q5FWS5	<i>Lox1</i>	Lysyl oxidase homolog	0.0226 ₅	0.96 ⁵					*	
ADA17	<i>Adam17</i>	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17	0.0129 ₂	-0.33 ²		*				

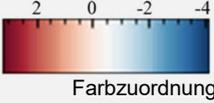
Matrisomanalyse des renalen Kortex			Statistik		Heatmap, fold change 					
Protein	Gen	Protein-beschreibung	p-Wert	Log2 fold change	LIG-CONTR/ C-CONTR ¹	IUS-CONTR/ C-CONTR ²	LIG-CONTR/ IUS-CONTR ³	C-N3PUFA/ C-CONTR ⁴	LIG-N3PUFA/ LIG-CONTR ⁵	IUS-N3PUFA/ IUS-CONTR ⁶
Matrisome-associated, ECM-affiliated Proteins										
SDC4	<i>Sdc4</i>	Syndecan-4	0.0284 ₁ 0.0243 ₂ 0.0461 ₄	1.33 ¹ 1.28 ² 1.07 ⁴	*	*		*		
HEMO	<i>Hpx</i>	Hemopexin	0.0039 0.0242 ₂ 0.0251 ₅	0.73 ¹ 0.63 ² -0.76 ⁵	**	*			*	
D3ZG74	<i>Frem2</i>	FRAS1-related extracellular matrix 2	0.0408 ₂ 0.0032 ₄	0.66 ² 0.82 ⁴		*		**		
CLC11	<i>Clec11a</i>	C-type lectin domain family 11 member A	0.0122 ₆	-0.86 ⁶						*
LEG8	<i>Lgals8</i>	Galectin-8	0.0304 ₅	-0.92 ⁵					*	
Q642B0	<i>Gpc4</i>	Glypican 4	0.0090 ₂ 0.0388 ₄	-0.67 ² -0.52 ⁴		**		*		
LEG2	<i>Lgals2</i>	Galectin-2	0.0343 ₃ 0.0254	-0.68 ³ 0.38 ⁶			*			*
PSPB	<i>Sftpb</i>	Pulmonary surfactant-associated protein B	0.0372 ₄ 0.0299 ₆	1.69 ⁴ 1.84 ⁶				*		*
Matrisome-associated, Secreted Factors										
F7FMS0	<i>Mst1</i>	Macrophage-stimulating 1	0.0277 ₁	0.76 ¹	*					
S10A4	<i>S100a4</i>	Protein S100-A4	0.0408 ₁ 0.0032 ₅	0.63 ¹ -0.59 ⁵	*				*	
S100G	<i>S100g</i>	Protein S100-G	0.0277 ₆	0.66 ⁶						*
S10A9	<i>S100a9</i>	Protein S100-A9	0.0351 ₃ 0.0178 ₆	-0.67 ³ -0.53 ⁶			*			*
IGF1	<i>Igf1</i>	Insulin-like growth factor I	0.0226 0.0008 ₂	-0.60 ¹ -1.03 ²	*	***				
Q5FVN3	<i>Ccl9</i>	Ccl9-like protein	0.0088 ₁ 0.0006 ₂ 0.0293 ₅	-1.06 ¹ -1.14 ² 0.66 ⁵	**	***			*	

Abb. 23 Heatmap der veränderten Proteine nach Matrisomanalyse im renalen Kortex. C-CONTR = 6, C-N3PUFA = 6, LIG-CONTR = 6, LIG-N3PUFA = 6, IUS-CONTR = 6, IUS-N3PUFA = 6 Tiere pro Gruppe. Protein, Gen und Proteinbeschreibung entsprechend der UniProt-Datenbank angegeben. Gruppierung durch die Datenbank Matrisome 2.0. Zweistichproben-t-Test * p < 0.05 bis ≥ 0,01, ** p < 0.01 bis ≥ 0,001, *** p < 0.001; log2 fold change ≥ |0.58| (rot für Hochregulation, blau für Herabregulation).

Die gegenregulierten Proteine wurden mittels einer STRING-Analyse auf Interaktionen geprüft. Sieben (CCL9; FGA; FGB; FGG; heparin cofactor 2, SERPIND1; inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain, ITIH2; prothrombin, F2) und zwei weitere Proteine (inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3, ITIH3; inter alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4, ITIH4) wurden jeweils in einen Zusammenhang miteinander gestellt. Ihnen konnten teilweise die GO-Termini „extracellular region“ und „fibrinogen complex“ zugrunde gelegt werden (Abb. 24).

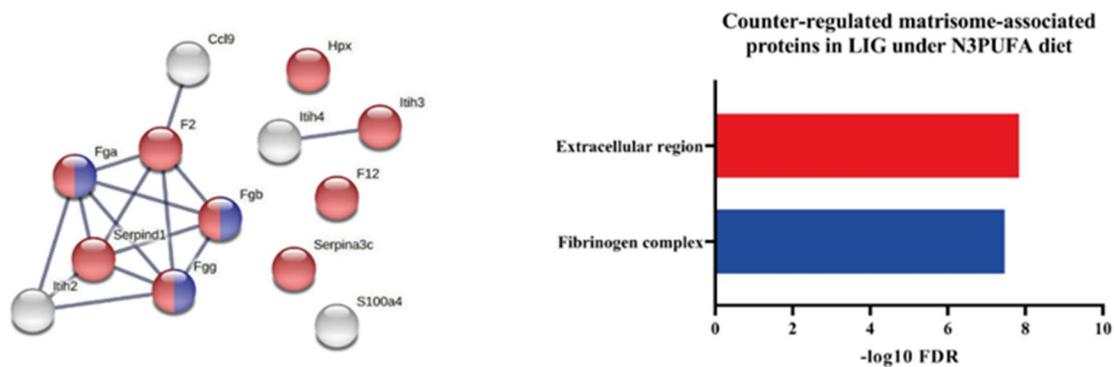


Abb. 24 STRING-Analyse der zwischen LIG-CONTR/C-CONTR und LIG-N3PUFA/LIG-CONTR gegenregulierten Proteine der Matrisomanalyse des renalen Kortex. Kategorie „database“, minimaler Interaktionsscore „high confidence (0.7)“. Rot für GO:0005576, „extracellular region“, blau für GO:0005577, „fibrinogen complex“. $-\log_{10}$ Falscherkennungsrate (FDR) > 1.3 (Benjamini–Hochberg-Korrektur).

4.4 Glomeruläre Morphologie

4.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung: Die Glomeruluszahl und die glomeruläre Fläche zeigen sich unbeeinflusst von IUGR oder N3PUFA bei weiblichen Ratten im jungen Erwachsenenalter.

Eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde durchgeführt, um die Zahl der Glomeruli pro Schnitt (Abb. 25) und die durchschnittliche Fläche eines Glomerulus (Abb. 26) bestimmen zu können. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

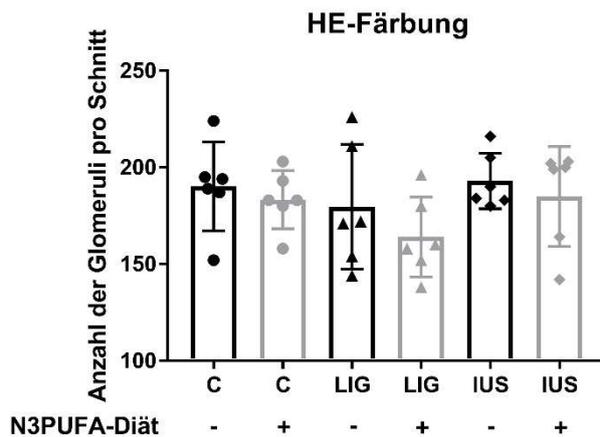


Abb. 25 Glomeruluszahl pro Schnitt. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. C-CONTR = 6, C-N3PUFA = 6, LIG-CONTR = 6, LIG-N3PUFA = 6, IUS-CONTR = 6, IUS-N3PUFA = 6 Tiere pro Gruppe. Mittelwert \pm Standardabweichung. Mann-Whitney * $p < 0,05$.

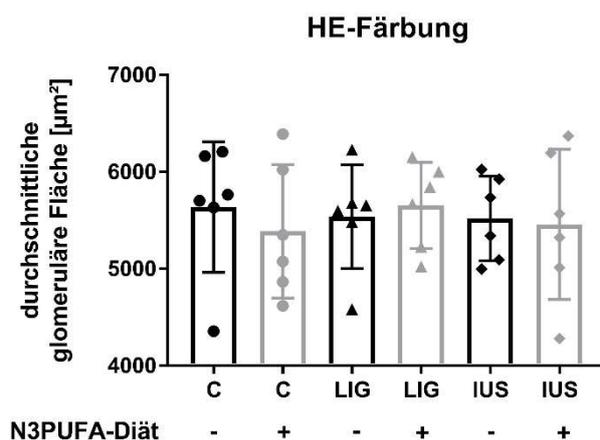


Abb. 26 Durchschnittliche Fläche eines Glomerulus. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. C-CONTR = 6, C-N3PUFA = 6, LIG-CONTR = 6, LIG-N3PUFA = 6, IUS-CONTR = 6, IUS-N3PUFA = 6 Tiere pro Gruppe. Mittelwert \pm Standardabweichung. Mann-Whitney * $p < 0,05$.

4.2.2 Immunhistochemische WT-1-Färbung: Ein veränderte Podozytenzahl nach IUGR oder N3PUFA lässt sich bei weiblichen Ratten nicht nachweisen.

Zur Bestimmung der Podozytenzahl erfolgte eine IHC-Färbung mit einem Antikörper gegen das Wilms-Tumor-Protein 1 (WT-1) (Abb. 27). Die Anzahl positiver Zellen wurde auf die glomeruläre Fläche bezogen. Hierbei zeigte sich keine signifikante Veränderung der Podozytenzahl bezogen auf die Glomerulusfläche (Abb. 28).

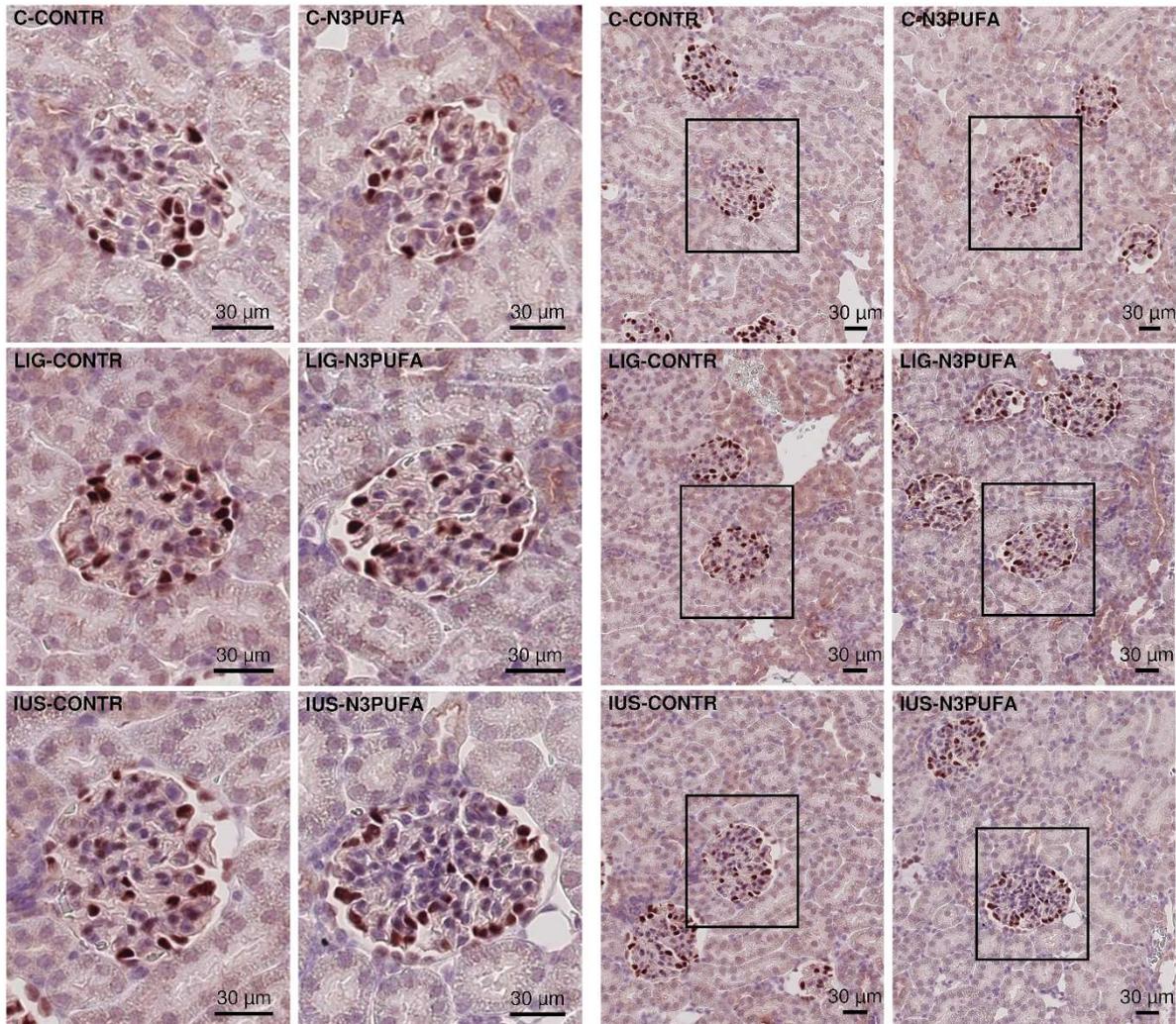


Abb. 27 Immunhistochemische Färbung mit WT-1-Antikörper (ab212951, 1:1000). Repräsentative Ausschnitte aus dem Nierenkortex in 20-facher Vergrößerung.

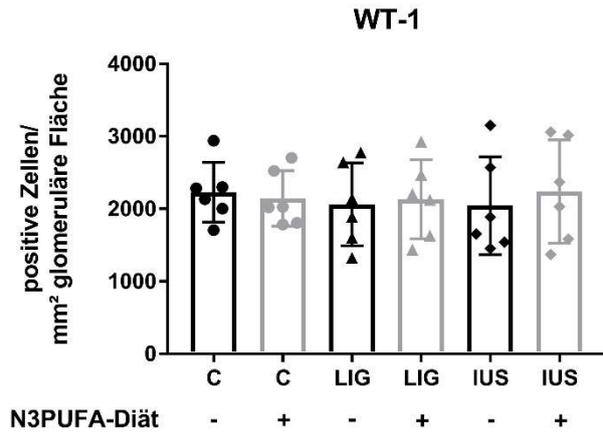


Abb. 28 Anzahl WT-1-positiver Zellen pro Quadratmillimeter glomeruläre Fläche. Immunhistochemische Färbung. C-CONTR = 6, C-N3PUFA = 6, LIG-CONTR = 6, LIG-N3PUFA = 6, IUS-CONTR = 6, IUS-N3PUFA = 6 Tiere pro Gruppe. Mittelwert \pm Standardabweichung. Mann-Whitney * $p < 0,05$.

4.5 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

	LIG-CONTR/ C-CONTR	IUS-CONTR/ C-CONTR	LIG-N3PUFA/ LIG-CONTR	IUS-N3PUFA/ IUS-CONTR	C-N3PUFA/ C-CONTR
Anzahl CD68-positiver Zellen (Gesamtfläche)				*↓	
Anteil NF-κB p65-positiver Fläche (Kortex-Medulla-Fläche)					
Anzahl Ki-67-positiver Zellen (glomeruläre Fläche)					
Anzahl Ki-67-positiver Zellen (Kortex-Medulla-Fläche)					
Anzahl Ki-67-positiver Zellen (Sammelrohr-Fläche)					
Western Blots Cyclin D1 zu GAPDH (Kortex)		*↑			
Western Blots PCNA zu GAPDH (Kortex)		*↑			
Western Blots WNT2b zu GAPDH (Kortex)					
Western Blots WNT3a zu GAPDH (Kortex)					
Western Blots LRP6 zu GAPDH (Kortex)					
Western Blots active β-Catenin zu β-Catenin (Kortex)					
Western Blots PDGFRβ zu GAPDH (Kortex)				*↓	*↑
Western Blots pERK zu ERK (Kortex)	*↑	*↑			*↑
Western Blots pP38 MAPK zu P38 MAPK (Kortex)					
Anteil kollagenhaltiger Fläche (Gesamtfläche)	*↓				
Anteil kollagenhaltiger Fläche (Kortexfläche)	*↓				
Western Blots PAI-1 zu GAPDH (Kortex)					
Western Blots TGFβ1 zu GAPDH (Kortex)		*↑			*↑

Tabelle 1: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse. *↑: signifikant erhöht. *↓: signifikant erniedrigt.

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss einer Omega-3-Fettsäure- und -Cholin-reichen Nahrung auf die Nieren wachstumsretardierter Ratten im frühen Erwachsenenalter, deren IUGR durch eine Ligatur der uterinen Gefäße oder durch intrauterinen Stress verursacht wurde. Der Fokus liegt auf den Themen Inflammation, Proliferation, extrazelluläre Matrix sowie glomeruläre Morphologie, deren Ergebnisse bereits vorgestellt wurden und im Folgenden diskutiert werden.

5.1 Inflammation

Wie in der Einleitung erläutert, scheint eine IUGR den Verlauf von entzündlichen Erkrankungen der Niere zu verschlechtern. Um zu prüfen, inwieweit die IUGR bereits vor einem „second hit“ Einfluss auf inflammatorische Prozesse nimmt, wurden hier die Anzahl der CD68-positiven Zellen und die Expression von NF- κ B p65 histologisch untersucht. CD68 ist ein Transmembranprotein, welches hauptsächlich von Monozyten und den von ihnen abstammenden Zellen, wie beispielsweise Makrophagen, exprimiert wird.^{93, 94} Letztere spielen eine wichtige Rolle im Rahmen der inflammatorischen Gewebsschädigung und der nachfolgenden Reparatur in der Niere.⁹⁵⁻⁹⁷ Bei NF- κ B p65 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der die Transkription proinflammatorischer Gene induziert.^{98, 99}

Die immunhistologische Färbung zeigte CD68-positive Zellen, die geballt nahe größerer Gefäße (Abb. 3) auftraten. Monozyten werden durch Chemokine und andere Signale aus dem Blutkreislauf ins Gewebe rekrutiert und differenzieren dort zu Makrophagen.¹⁰⁰ Die Akkumulation der CD68-positiven Zellen im Bereich der Gefäße könnte dementsprechend diesen Migrationsprozess darstellen. Statistisch zeigte die CD68-Färbung eine verringerte Anzahl CD68-positiver Zellen in der IUS-Gruppe nach der Nahrungsintervention. Obwohl es scheint, als träten CD68-positive Zellen vermehrt nach einer IUGR durch IUS auf, war dieser Vergleich (IUS-CONTR/C-CONTR) statistisch nicht signifikant. Schwierigkeiten im Rahmen der statistischen Auswertung in der Fläche ergaben sich allerdings durch die starke Ballung der Zellen. In der LIG-Gruppe ließen sich keine Effekte der Nahrungsintervention oder der IUGR beobachten. Daher zeigt das Ergebnis, dass das Erzeugen von intrauterinem Stress als IUGR-Modell seinen eigenen Stellenwert hat und nicht als Kontrolle dienen sollte. Keine signifikanten Unterschiede traten bei der Färbung mit einem Antikörper gegen NF- κ B p65 auf. Das statistische Verteilungsmuster ähnelt jedoch dem der CD68-Färbung.

Eine Vorarbeit unserer Arbeitsgruppe konnte anhand einer Immunfluoreszenzfärbung am PND 1 und PND 7 keine Veränderungen der Anzahl CD68-positiver Zellen nach einer IUGR, ausgelöst durch LIG oder IUS, feststellen.⁴⁸ Plank et al. verglichen elf Wochen alte LIG- mit IUS-

Ratten hinsichtlich der glomerulären und tubulointerstitiellen Infiltration mit CD68-positiven Zellen und beobachteten keinen Unterschied.⁵⁰ Da zelluläre Infiltration mit CD-68-positiven Zellen ein dynamischer Prozess ist, können bereits kleine Unterschiede im Modell oder dem Untersuchungszeitpunkt die fehlende Vergleichbarkeit der Ergebnisse bedingen. Ursächlich können die Vorarbeiten trotzdem Hinweise auf die molekularen Zusammenhänge liefern, die für die vermehrte Infiltration verantwortlich sein könnten.

Eine gene set enrichment analysis anhand der STRING-Datenbank deutete im Rahmen der Vorarbeit in der LIG-Gruppe am PND 1 auf eine verstärkte Bindung von Arachidonsäure (AA) hin. In der IUS-Gruppe war am PND 7 die Transkription des Leukotrien-B4-Rezeptors 2 (Ltb4r2) erhöht,⁴⁸ welcher durch AA-Metaboliten aktiviert wird¹⁰¹ und zur Chemotaxis im Kontext inflammatorischer Prozesse beiträgt¹⁰².

Eine AA-abhängige Rekrutierung von CD68-positiven Zellen würde dazu passen, dass DHA und Cholin die Makrophageninfiltration in der Niere nach einer stressinduzierten IUGR zu verringern scheinen. Wie bereits publiziert¹⁰³, kann durch eine Nahrungsintervention mit DHA und Cholin der AA-Gehalt der Membranen verringert werden.

5.2 Zellproliferation

Zur Bestimmung des Proliferationsverhaltens renaler Zellen wurde eine immunhistochemische Färbung mit einem Ki-67-Antikörper durchgeführt. Das Protein Ki-67 fungiert als Proliferationsmarker, da es in ruhenden Zellen nicht nachweisbar ist, aber bei proliferierenden Zellen in den aktiven Zellzyklusphasen detektiert werden kann.¹⁰⁴ Die Anzahl der Zellen wurde auf die glomeruläre Fläche, die Kortex-Medulla-Fläche und die Fläche der Sammelrohre bezogen. Hier zeigten sich jedoch keine statistisch relevanten Gruppenunterschiede.

Trotz fehlender statistischer Signifikanz der Ergebnisse fiel allerdings auf, dass die Anzahl proliferierender Zellen in Kortex und Medulla in den Interventionsgruppen kleiner wirkte als in den dazugehörigen Kontrollgruppen. Daher wurden weitere Untersuchungen des Nierenkortex mittels Western-Blot-Analysen durchgeführt.

Untersucht wurden die Proliferationsmarker Cyclin D1 und PCNA. Cyclin D1 reguliert den Zellzyklus, indem es für den Übergang von der G1- in die S-Phase sorgt.¹⁰⁵ PCNA spielt bei der DNA-Replikation eine Rolle¹⁰⁶ und ist somit ebenfalls in der späten G1- und in der S-Phase nachweisbar¹⁰⁷. Grundsätzlich zeigten beide Proteine ein ähnliches Expressionsverhalten, welches schlüssig ist, da sie zum selben Zeitpunkt im Zellzyklus aktiv sind. Die Ligatur und die Nahrungsintervention wirkten sich nicht auf die Proliferationsmarker aus. Nach IUS jedoch war die Proteinexpression von PCNA und Cyclin D1 signifikant erhöht.

Um die gesteigerte kortikale Proliferation einem Zelltypus zuordnen zu können, erfolgte eine immunfluoreszierende Kofärbung des Nierenkortex mittels Antikörpern gegen PCNA und

PDGFR β . Intraglomerulär wird der PDGFR β insbesondere von Mesangialzellen, aber auch von Perizyten und Fibroblasten exprimiert.¹⁰⁸ Diese zeigten sich allerdings in den ausschließlich qualitativ ausgewerteten Aufnahmen der Gruppen C-CONTR, IUS-CONTR und IUS-N3PUFA PCNA-negativ, sodass jene Zellen vermutlich nicht zu einem veränderten Proliferationsverhalten nach IUS geführt haben.

Zur weiteren Differenzierung wurde außerdem eine Kofärbung mittels Immunfluoreszenz gegen CD68- und Ki-67-positive Zellen durchgeführt. Trotz fehlender quantitativer Auswertung scheinen entsprechend der immunhistochemischen Färbung insbesondere im Mark in der IUS-CONTR-Gruppe vermehrt CD68-positive Zellen im Vergleich zur C-CONTR-Gruppe aufzutreten, welche nach Nahrungsintervention verringert wirken. Ein Teil der CD68-positiven Zellen zeigte sich aufgrund der gleichzeitigen Anfärbung mit dem Ki-67-Antikörper sowohl im Kortex als auch im Mark proliferierend. Es lässt sich dementsprechend vermuten, dass die veränderte Anzahl an Makrophagen innerhalb der IUS-Gruppen durch eine gesteigerte Proliferationsrate nach IUGR sowie durch eine verringerte Proliferation nach erfolgter Nahrungsintervention verursacht wurde. Die verstärkt exprimierten Proliferationsmarker nach IUS im Nierenkortex lassen sich allerdings vermutlich nicht ausschließlich auf eine gesteigerte Proliferation der CD-68-positiven Zellen zurückführen, da diese primär im Nierenmark gehäuft auftreten.

Um abschließend zugrundeliegende Mechanismen für die erhöhte Proliferation in der IUS-Gruppe zu untersuchen, wurden Signalwege der beiden Proliferationsmarker betrachtet. Hier sei zunächst der Wnt/ β -Catenin-Signalweg aufgeführt. Das Protein WNT aktiviert den Signalweg, indem es an den Frizzled- und den LRP6-Rezeptor bindet^{109, 110} und beide Rezeptoren dimerisieren¹¹¹. Dies löst die Aktivierung des Dishevelled-Proteins aus¹¹², welches einen intrazellulären Proteinkomplex inhibiert¹¹³, der im inaktiven Zustand für den proteolytischen Abbau des phosphorylierten β -Catenins sorgt^{114, 115}. Dadurch kann das aktive β -Catenin dephosphoryliert in den Zellkern gelangen und dort als Koaktivator von Transkriptionsfaktoren wirken.^{116, 117} So werden Zielgene wie Cyclin D1 verstärkt transkribiert.^{118, 119} In der vorliegenden Arbeit wurden die Signalproteine WNT2B (während der embryonalen Nierenentwicklung von Mäusen exprimiert¹²⁰), WNT3A (nachweisbar in den Nieren adulter Ratten¹²¹), der Rezeptor LRP6 und das aktive β -Catenin im Verhältnis zum totalen β -Catenin betrachtet. Auf keiner Ebene des Signalwegs konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden. Daher scheinen weder die IUGR noch die Nahrungsintervention die Kaskade maßgeblich zu beeinflussen und die tendenziell erhöhte Cyclin D1-Expression kann vermutlich nicht auf ihre Aktivierung zurückgeführt werden.

Cyclin D1 und PCNA werden zudem von den Kinasen ERK1/2 (P44/42 MAPK) und P38 MAPK reguliert.¹²²⁻¹²⁶ Da beide im aktiven Zustand phosphoryliert (p) vorliegen^{127, 128}, wurde hier die

Expression des phosphorylierten im Verhältnis zur Expression des totalen Proteins untersucht. Es konnte keine signifikante P38 MAPK-Aktivierung (im Sinne einer Mehrexpression der phosphorylierten Form) festgestellt werden, sodass der beobachtete Expressionsanstieg der Proliferationsmarker innerhalb der IUS-Gruppe nicht auf deren Aktivierung zurückgeführt werden. pERK1/2 wurde jedoch nach IUS signifikant vermehrt exprimiert. Da ERK1/2 die Expression von Cyclin D1 und PCNA verstärkt¹²²⁻¹²⁴, könnte es die gesteigerte Transkription der beiden Mediatoren mitbedingt haben. ERK1/2 kann durch den Rezeptor PDGFR β aktiviert werden.¹²⁹ PDGFR β bzw. sein aktivierender Ligand platelet-derived growth factor (PDGF)¹³⁰ können die Cyclin D1- und PCNA-Expression steigern.^{131, 132} Da die IUS-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe allerdings keine statistisch relevante Steigerung der PDGFR β -Expression aufwies, kann die erhöhte Cyclin D1- und PCNA-Expression über die Aktivierung von ERK1/2 nicht eindeutig auf den PDGFR β zurückgeführt werden. Dies lässt auch die Immunfluoreszenzfärbung des Kortex der IUS-Gruppe vermuten, welche keine Hinweise auf eine gleichzeitige Expression von PCNA und PDGFR β einzelner Zellen gibt. Die Nahrungsintervention hatte im Western Blot nach IUS eine signifikant schwächere PDGFR β -Expression und in der Kontrollgruppe eine Expressionssteigerung von PDGFR β und pERK1/2 zur Folge. Die Einordnung dieser Ergebnisse fällt zum jetzigen Zeitpunkt aufgrund dünner Datenlage schwer. Zusammenfassend zeigt die Ki-67-Färbung zwar keine Proliferationsneigung nach intrauterinem Stress auf, allerdings weisen die Untersuchungen auf Proteinebene auf eine gesteigerte Proliferation nach IUS hin, welche auf die Aktivierung von ERK1/2 zurückgehen könnte.

5.3 Extrazelluläre Matrix

Tierexperimentelle Arbeiten deuten darauf hin, dass Nieren nach IUGR im Verlauf auf eine zweite Schädigung verstärkt fibrotisch reagieren. Nach Induktion einer Anti-Thy1.1-Glomerulonephritis zeigten elf Wochen alte LIG-Ratten einen erhöhten Glomeruloskleroseindex (GSI), der anhand von mit der Periodsäure-Schiff-Reaktion (periodic acid-Schiff, PAS) angefärbten Paraffinschnitten und mittels eines systematisierten Punktesystems erhoben wurde. Zudem konnten verstärkt glomeruläre Einlagerungen von Kollagen I und IV im Vergleich zu IUS-Tieren festgestellt werden.⁵⁰

Zur Beurteilung der EZM wurde im vorliegenden Projekt eine Picro-Sirius-Rot-Färbung durchgeführt, welche insbesondere Kollagen I und III markiert.¹³³ Die Untersuchung ergab keine fibrotischen Veränderungen bei IUGR-Tieren, sondern wies dagegen eine signifikant verringerte Kollagenexpression im Kortex sowie in der gesamten Niere nach LIG auf. Einschränkend muss hier erwähnt werden, dass die perivaskulären Kollageneinlagerungen einen großen Teil der positiven Fläche ausmachen und somit die Anzahl der Gefäße pro Schnitt mitbeeinflussend ist. In der Literatur findet sich keine Arbeit mit derselben Methode, immunhistologische

Färbungen bei LIG-Ratten ergaben jedoch eine unveränderte Kollagen I-Expression im Vergleich zu C- und IUS-Tieren. Es handelte sich in diesem Fall allerdings um zehn bzw. elf Wochen alte Männchen und Kollagen III wurde nicht untersucht.^{50, 134} Schreuder et al. stellten einen höheren GSI bei LIG-Männchen im Vergleich zu LIG-Weibchen fest.²⁹ Weiblichen Ratten nach LIG könnte folglich durch verringerte Kollageneinlagerungen ein präventiver Vorteil hinsichtlich fibrotischer Veränderungen in der Niere zuteilwerden.

Zur weiteren Analyse von Fibrose-fördernden Faktoren erfolgten Untersuchungen auf Proteinebene. Dazu wurden TGF β 1 und PAI-1 im Western Blot betrachtet. PAI-1 inhibiert das Plasminogen/Plasmin-System, welches fibrinolytisch wirkt¹³⁵ und Bestandteile der EZM abbaut^{136, 137}. Erhöhte PAI-1-Expressionen treten im Kontext von chronischen Nierenerkrankungen und renaler Fibrose auf.¹³⁸⁻¹⁴⁰ Die hier erhobenen Daten weisen jedoch nicht auf einen ähnlichen Effekt der IUGR auf die PAI-1-Expression hin, da sich keine Gruppenunterschiede ergaben. Dies deckt sich mit Ergebnissen auf mRNA-Ebene, bei denen LIG- und IUS-Ratten das für PAI-1 codierende Gen gleich stark exprimierten.⁵⁰ Diätetische Interventionen mit Omega-3-Fettsäuren können zuvor erhöhte, renale PAI-1-Proteinexpressionen im Rattenmodell vermindern.¹⁴¹ Da die IUGR jedoch nicht zu einer verstärkten Expression führte, ist es konsekutiv schlüssig, dass die Nahrungsintervention ebenso keinen Einfluss hatte.

Das außerdem untersuchte Zytokin TGF β 1 wirkt profibrotisch auf die Niere, indem es den Aufbau der EZM fördert sowie deren Abbau inhibiert^{142, 143} und die Transdifferenzierung zu Fibroblasten auszulösen scheint.¹⁴⁴ Bei weiblichen LIG-Tieren, die jedoch anders als in der vorliegenden Arbeit von LIG-Ammen gesäugt wurden, war die mRNA-Expression im Vergleich zu den IUS-Tieren erhöht.¹⁴⁵ Die hier erhobenen Daten ergaben eine erhöhte TGF β 1-Expression der IUS-Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren. Zudem lag der Mittelwert der IUS-Gruppe über dem der LIG-Gruppe, was sich mit dem Ergebnis einer Studie auf mRNA-Ebene deckt.⁵⁰ Zusammenfassend deutet sich also eine Neigung zu einer vermehrten TGF β 1-Expression nach IUGR an, die nach IUS stärker als nach LIG zu beobachten ist. Zu vermerken ist außerdem die erhöhte Expression des Fibrosemarkers nach N3PUFA innerhalb der Kontrollgruppe. Nahrungsinterventionen mit Omega-3-Fettsäuren führen in vorgeschädigten Rattennieren eher zu einer Reduktion von TGF β 1.^{141, 146} Auch in gesunden Mäusenierren zeigte sich auf mRNA-Ebene eine Reduktion.¹⁴⁷ Die Stimulation von Mesangialzellen mit Omega-3-Fettsäuren zeigte jedoch eine verstärkte Proteinexpression von TGF β 1.^{148, 149} Da allerdings die zuvor diskutierte Pikro-Sirius-Rot-Färbung keinen Hinweis auf fibrotische Veränderungen nach N3PUFA ergab, sollte dem Ergebnis keine pathologische Relevanz zugesprochen werden.

Im Rahmen einer Proteomanalyse wurde abschließend das Matrisom betrachtet. Die verringerte Kollagenexpression nach LIG spiegelte sich darin nicht wider, da zu den 34 veränderten

matrixassoziierten Proteinen nur ein Kollagen (COL14A1) zählte, obwohl in der Datenbank zahlreiche Kollagene enthalten waren. Kollagen III wurde jedoch nicht betrachtet. Zudem gestaltet sich die Untersuchung von Kollagenen in Proteomics methodisch gesehen teilweise schwierig. Einige Arbeiten empfehlen daher beispielsweise die Probenanreicherung mit Kollagen durch die Trennung der EZM- von den zellulären Bestandteilen.^{150, 151} Das fehlende Auftreten der Kollagene könnte somit auf die technischen Gegebenheiten zurückgeführt werden. Interessanterweise kam es in der LIG-Gruppe jedoch bei zwölf Proteinen zu folgender Gegenregulation. Im Vergleich LIG-CONTR/C-CONTR waren sie hoch- und zwischen LIG-N3PUFA/LIG-CONTR wieder herabreguliert. In der Gruppe der EZM-Glykoproteine handelte es sich dabei um FGA, FGB und FGG, denen der GO-Terminus „fibrinogen complex“ zugeordnet wurde. Fibrinogen spielt eine zentrale Rolle im Rahmen der Koagulation¹⁵² und ist in Prozesse der Wundheilung involviert¹⁵³. Auf der anderen Seite zählten zu den gegenregulierten Proteinen Serinproteaseinhibitoren, von denen ITIH3 und ITIH4 durch die STRING-Analyse geclustert wurden. Inter-Alpha-Trypsin-Inhibitoren, die sich unter anderem aus den nach LIG hochregulierten Ketten ITIH2, ITIH3 und ITIH4 zusammensetzen,^{154, 155} hemmen Trypsin und Plasmin,¹⁵⁶ ebenso wie der synthetische Serinproteaseinhibitor Camostatmesilat¹⁵⁷. Dieser reduziert renale Fibrosemarker bei acht Wochen alten Ratten, deren Nieren zuvor durch eine unilaterale Ureterobstruktion geschädigt worden waren. Dies galt auch für die mittels einer Picro-Sirius-Rot-Färbung untersuchte Kollagenexpression und die Transkriptionslevel von Kollagen I und III auf mRNA-Ebene.¹⁵⁸ Die erhöhte Expression von ITIH2, ITIH3 und ITIH4 nach LIG könnte dementsprechend zur tendenziell verringerten Kollagenexpression beigetragen haben.

Schlussendlich löst eine durch LIG oder IUS experimentell induzierte IUGR alleine keine fibrotischen Veränderungen in der Niere aus. Die gezeigten Ergebnisse deuten eher auf eine verminderte Fibroseneigung nach LIG hin. Diese können auf Grundlage der Proteomanalyse am ehesten auf die verstärkte Expression der Serinproteaseinhibitoren ITIH2, ITIH3 und ITIH4 zurückgeführt werden.

5.4 Glomeruläre Morphologie

Entgegen den nach den Barker- und Brenner-Hypothesen zu erwartenden Veränderungen wurde die Anzahl der Glomeruli in unseren IUGR-Modellen weder von der IUGR selbst noch von der Nahrungsintervention beeinflusst, da die Glomeruluszahl pro Schnitt in allen Gruppen unverändert blieb. Zahlreiche Studien am Rattenmodell verzeichnen jedoch eine verringerte Anzahl der Glomeruli nach IUGR durch LIG.^{28, 29, 159} Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem PND 39 das junge Erwachsenenalter nach Abschluss der Bildung neuer Glomeruli⁵

gewählt, während sich einige der genannten Studien entweder für einen früheren²⁸ oder deutlich späteren Zeitpunkt²⁹ entschieden. Die verringerte Glomeruluszahl könnte in diesen Fällen entweder durch die noch nicht abgeschlossene Nephrogenese oder bereits durch den erneuten Verlust von Glomeruli im höheren Alter bedingt sein.^{29, 134}

Ursache für die unveränderte Glomeruluszahl könnte auch das Säugen durch unoperierte Ammenmütter sein. Wlodek et al. und Moritz et al. konnten zeigen, dass der Einsatz unterschiedlicher Ammenmütter Einfluss auf die Anzahl der Glomeruli hat. Nur die von LIG-Muttertieren gesäugten LIG-Nachkommen wiesen nach sechs Monaten eine signifikant verringerte Glomeruluszahl auf, während die der von Kontrolltieren (hier jedoch scheinoperierte Ammen) gesäugten LIG-Tiere unverändert war.^{145, 160} Unterstützt wird diese These von Vordaten unserer Arbeitsgruppe, die anhand eines mit dieser Arbeit übereinstimmenden Tiermodells und mittels derselben Auswertungsmethoden männliche LIG-Nachkommen am PND 70 untersuchte und ebenfalls eine unveränderte Glomerulusanzahl feststellte.¹³⁴ Einschränkend muss jedoch hinzugefügt werden, dass bei der hier verwendeten Methode ausschließlich die Glomeruli eines Nierenschnitts gezählt wurden. Goldstandard zur Bestimmung der Glomeruluszahl ist inzwischen eine stereologische Zählung, die den Vergleich mehrerer aufeinanderfolgender Schnitte untereinander ermöglicht.¹⁶¹

Interessanterweise zeigte sich auch die durchschnittliche Fläche eines Glomerulus unbeeinflusst von der IUGR und der Nahrungsintervention. In früheren tierexperimentellen Studien an Ratten zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde berichtet, dass eine verringerte Glomeruluszahl nach IUGR mit einem erhöhten glomerulären Volumen^{29, 159} oder einer vergrößerten glomerulären Fläche¹⁶² einhergehen kann. Laut Lane et al. ist die glomeruläre Größe, die wie in der vorliegenden Arbeit ausschließlich anhand der glomerulären Fläche bestimmt wurde, mit komplexeren Berechnungen des glomerulären Volumens vergleichbar.¹⁶³ In Zusammenschau mit der ausbleibenden numerischen Reduktion glomerulärer Strukturen ist die fehlende Hypertrophie jedoch plausibel, sodass die hier vorgestellten Ergebnisse im Einklang zueinander stehen. Dies beobachtete auch die Arbeitsgruppe um Wlodek und Moritz in den oben bereits genannten Studien. Das glomeruläre Volumen wie auch die Glomerulusanzahl blieb bei männlichen und weiblichen LIG-Tieren nach sechs Monaten unverändert im Vergleich zur Kontrollgruppe.^{145, 160}

Auch das Geschlecht scheint Einfluss auf die glomeruläre Morphologie zu nehmen. Schreuder et al. verzeichneten zwar eine ähnlich stark verringerte Glomeruluszahl bei IUGR-Tieren beider Geschlechter, jedoch eine schwächer ausgeprägte glomeruläre Hypertrophie bei den Weibchen als bei den Männchen.²⁹ Dies bestätigte sich auch in einer Studie von Baserga et al. mit 120 Tage alten Ratten.¹⁶² Das weibliche Geschlecht könnte demnach einen protektiven Wert haben und bei den hier untersuchten Tieren die unveränderte Glomeruluszahl und -fläche

mitbedingen. Dies lässt sich jedoch aufgrund mangelnder männlicher Vergleichstiere nicht überprüfen.

Abschließend soll noch auf die Bedeutung einer postnatalen Überernährung für die glomeruläre Morphologie eingegangen werden. Kommt es im Rahmen des Versuchsaufbaus zu einer künstlichen Reduktion der Anzahl an Nachkommen, die von einem Ammenweibchen gesäugt werden, steht dem einzelnen Jungtier vergleichsweise mehr Muttermilch zu Verfügung. Dies führt zu einer Überfütterung sowie zu einem konsekutiven Aufholwachstum, welche eine veränderte Glomerulusanzahl, ein verändertes glomeruläres Volumen sowie einen erhöhten systolischen Blutdruck bei weiblichen Ratten zur Folge haben.¹⁶⁴ Im speziellen Fall einer IUGR mit einer postnatalen Überernährung zeigen weibliche Ratten ein höheres glomeruläres Volumen und einen höheren systolischen Blutdruck als IUGR-Ratten ohne Aufholwachstum.¹⁶⁵ Dieser zusätzliche Einflussfaktor erschwert dementsprechend die Vergleichbarkeit tierexperimenteller Studien und könnte eine Erklärung für unsere von der allgemeinen Datenlage abweichenden Ergebnisse sein.

Als wichtiger Bestandteil des glomerulären Filters¹⁶⁶ wurde abschließend die Anzahl der Podozyten pro Quadratmillimeter glomerulärer Fläche bestimmt. Dazu wurde eine Färbung mit einem Antikörper gegen das Protein WT-1 durchgeführt, welches als spezifischer Podozytenmarker dient.¹⁶⁷ Es zeigte sich keine Veränderung der Podozytenzahl nach IUGR oder Nahrungsintervention. Grund dafür mag der zeitliche Verlauf der Podozytenentwicklung sein. Kikuchi et al. beobachteten an humanen Nieren eine Steigerung der Podozytenzahl pro Glomerulus nur bis zum Stadium der „capillary loops“. Anschließend blieb die Zahl konstant.¹⁶⁸ Jenes Stadium findet sich in der Ratte zum Zeitpunkt des E 16.¹⁶⁹ Da im vorliegenden Projekt die operativen Eingriffe allerdings erst am E 18 durchgeführt wurden, konnte die Anzahl der Podozyten dadurch nicht mehr beeinflusst werden. Zudem handelt es sich bei ausdifferenzierten Podozyten um postmitotische Zellen, die dementsprechend nicht mehr proliferieren können.¹⁷⁰ Ein gesteigerter Podozytenverlust nach IUGR oder N3PUFA wird durch diesen Erklärungsansatz jedoch nicht ausgeschlossen. Neben der Podozytenzahl wäre noch eine strukturelle Untersuchung der Podozytenfußfortsätze interessant gewesen, welche zwar im Rahmen der Doktorarbeit nicht durchgeführt wurde, aber im Rahmen des übergeordneten DFG-Projekts geplant ist.

5.5 Limitationen der Arbeit

Die untersuchten Tiere waren ausschließlich weiblich. Damit dürfen die erzielten Ergebnisse nicht direkt auf das männliche Geschlecht übertragen werden, da sich beispielsweise für die Glomerulusgröße geschlechtsspezifische Unterschiede ergeben können.^{29, 162} Weitere Untersuchungen an männlichen Tieren wären dementsprechend wünschenswert gewesen. Die

Gruppengröße war mit fünf beziehungsweise sechs Tieren zudem deutlich begrenzt. Eine Erhöhung der Tierzahl hätte eventuell eindeutiger Gruppenunterschiede besser zu Tage treten lassen oder falsch positive Ergebnisse enttarnt. Abschließend wurden die Gruppen LIG-CONTR und IUS-CONTR nicht miteinander verglichen. Dies hätte jedoch zu einer höheren Vergleichbarkeit mit älteren Studien geführt, die die IUS-Gruppe als Kontrollgruppe nutzten.

5.6 Fazit

Die vorliegende Arbeit unterstreicht zunächst die Wichtigkeit der Unterscheidung zwischen den verschiedenen IUGR-Ursachen im Kontext der Nierenentwicklung. Insbesondere die Bedeutung des intrauterinen Stresses nach Durchführung eines chirurgischen Eingriffs sollte nicht unterschätzt werden. Sowohl im Bereich der Proliferation als auch im Bereich der Inflammation deutet sich ein Einfluss dessen an. Daten aus Taiwan zeigen, dass nicht-gynäkologische Operationen während der Schwangerschaft auch beim Menschen mit einem verringerten Geburtsgewicht sowie mit einem geringeren Apgar-Score und einer erhöhten kindlichen Mortalitätsrate assoziiert sind.¹⁷¹ Die Notwendigkeit einer chirurgischen Intervention während der Schwangerschaft sollte dementsprechend immer kritisch hinterfragt werden.

In der LIG-Gruppe fielen zudem besonders die Tendenz zur verringerten Fibrose und die veränderte Expression von Matrixproteinen in der Matrisomanalyse auf, welche durch die Nahrungsintervention gegenreguliert wurden. Weitere Untersuchungen hinsichtlich der zugrundeliegenden Mechanismen könnten einen Beitrag zur Entwicklung antifibrotischer Pharmaka leisten.

Darüber hinaus zeigte sich der Einfluss der Nahrungsintervention mit DHA und Cholin deutlich anhand einer verringerten Makrophagenzahl in den Nieren der IUS-Gruppe. Dieses Ergebnis unterstreicht die antiinflammatorische Wirkung von Omega-3-Fettsäuren auf die Niere und bietet einen Anhaltspunkt für weitere Forschung.

Abschließend gibt die Arbeit Hinweise auf die Bedeutsamkeit des Geschlechts im Bereich der Nierenentwicklung nach IUGR. Im Kontext der Studienlage scheint das Ausbleiben einiger zuvor erwarteter Ergebnisse, wie einer Veränderung der glomerulären Morphologie oder einer erhöhten Fibroseneigung, auf einen protektiven Einfluss des weiblichen Geschlechts hinzuweisen. In zukünftige Studien sollten daher sowohl weibliche als auch männliche Tiere eingeschlossen werden, um diese Hypothese genauer untersuchen und einen geschlechtsbasierten Bias ausschließen zu können.

6 Literaturverzeichnis

1. Barker DJ. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)* 1998; **95**(2): 115-128.
2. Reidy KJ, Rosenblum ND. Cell and molecular biology of kidney development. *Semin Nephrol* 2009; **29**(4): 321-337.
3. Hinchliffe SA, Sargent PH, Howard CV, Chan YF, van Velzen D. Human intrauterine renal growth expressed in absolute number of glomeruli assessed by the disector method and Cavalieri principle. *Lab Invest* 1991; **64**(6): 777-784.
4. Guignard JP, Torrado A, Da Cunha O, Gautier E. Glomerular filtration rate in the first three weeks of life. *J Pediatr* 1975; **87**(2): 268-272.
5. Nyengaard JR. The quantitative development of glomerular capillaries in rats with special reference to unbiased stereological estimates of their number and sizes. *Microvasc Res* 1993; **45**(3): 243-261.
6. Neiss WF, Klehn KL. The postnatal development of the rat kidney, with special reference to the chemodifferentiation of the proximal tubule. *Histochemistry* 1981; **73**(2): 251-268.
7. Mammen C, Al Abbas A, Skippen P, Nadel H, Levine D, Collet JP, Matsell DG. Long-term risk of CKD in children surviving episodes of acute kidney injury in the intensive care unit: a prospective cohort study. *Am J Kidney Dis* 2012; **59**(4): 523-530.
8. Cleper R, Shavit I, Blumenthal D, Reisman L, Pomeranz G, Haham A, Friedman S, Goldiner I, Mandel D. Neonatal acute kidney injury: recording rate, course, and outcome: one center experience. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2019; **32**(20): 3379-3385.
9. DeFreitas MJ, Griffin R, Sanderson K, Nada A, Charlton JR, Jetton JG, Kent AL, Guillet R, Askenazi D, Abitbol CL. Maternal Hypertension Disorders and Neonatal Acute Kidney Injury: Results from the AWAKEN Study. *Am J Perinatol* 2022.
10. Macumber I, Schwartz S, Leca N. Maternal obesity is associated with congenital anomalies of the kidney and urinary tract in offspring. *Pediatr Nephrol* 2017; **32**(4): 635-642.
11. Aisa MC, Cappuccini B, Barbati A, Clerici G, Torlone E, Gerli S, Di Renzo GC. Renal Consequences of Gestational Diabetes Mellitus in Term Neonates: A Multidisciplinary Approach to the DOHaD Perspective in the Prevention and Early Recognition of Neonates of GDM Mothers at Risk of Hypertension and Chronic Renal Diseases in Later Life. *J Clin Med* 2019; **8**(4).
12. Youssef D, Abd-Elrahman H, Shehab MM, Abd-Elrheem M. Incidence of acute kidney injury in the neonatal intensive care unit. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2015; **26**(1): 67-72.
13. Arcinue R, Kantak A, Elkhwad M. Acute kidney injury in ELBW infants (< 750 grams) and its associated risk factors. *J Neonatal Perinatal Med* 2015; **8**(4): 349-357.
14. Hui-Stickle S, Brewer ED, Goldstein SL. Pediatric ARF epidemiology at a tertiary care center from 1999 to 2001. *Am J Kidney Dis* 2005; **45**(1): 96-101.
15. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 1989; **2**(8663): 577-580.
16. Barker DJ, Bull AR, Osmond C, Simmonds SJ. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *Bmj* 1990; **301**(6746): 259-262.
17. Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, Winter PD. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *Bmj* 1991; **303**(6809): 1019-1022.
18. Paneth N, Susser M. Early origin of coronary heart disease (the "Barker hypothesis"). *Bmj* 1995; **310**(6977): 411-412.
19. Blencowe H, Krusevec J, de Onis M, Black RE, An X, Stevens GA, Borghi E, Hayashi C, Estevez D, Cegolon L, Shiekh S, Ponce Hardy V, Lawn JE, Cousens S. National, regional, and worldwide estimates of low birthweight in 2015, with trends from 2000: a systematic analysis. *Lancet Glob Health* 2019; **7**(7): e849-e860.
20. Hsu CW, Yamamoto KT, Henry RK, De Roos AJ, Flynn JT. Prenatal risk factors for childhood CKD. *J Am Soc Nephrol* 2014; **25**(9): 2105-2111.

21. Senra JC, Carvalho MA, Rodrigues AS, Krebs VLJ, Gibelli M, Francisco RPV, Bernardes LS. An unfavorable intrauterine environment may determine renal functional capacity in adulthood: a meta-analysis. *Clinics (Sao Paulo)* 2018; **73**: e401.
22. Damhuis SE, Ganzevoort W, Gordijn SJ. Abnormal Fetal Growth: Small for Gestational Age, Fetal Growth Restriction, Large for Gestational Age: Definitions and Epidemiology. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2021; **48**(2): 267-279.
23. Salafia CM, Minior VK, Pezzullo JC, Popek EJ, Rosenkrantz TS, Vintzileos AM. Intrauterine growth restriction in infants of less than thirty-two weeks' gestation: associated placental pathologic features. *Am J Obstet Gynecol* 1995; **173**(4): 1049-1057.
24. Alexander BT. Placental insufficiency leads to development of hypertension in growth-restricted offspring. *Hypertension* 2003; **41**(3): 457-462.
25. Nüsken E, Wohlfarth M, Lippach G, Rauh M, Schneider H, Dötsch J, Nüsken KD. Reduced Perinatal Leptin Availability May Contribute to Adverse Metabolic Programming in a Rat Model of Uteroplacental Insufficiency. *Endocrinology* 2016; **157**(5): 1813-1825.
26. Pascoe KC, Wlodek ME, Jones GT. Increased elastic tissue defect formation in the growth restricted Brown Norway rat: a potential link between in utero condition and cardiovascular disease. *Pediatr Res* 2008; **64**(2): 125-130.
27. Huizinga CT, Engelbregt MJ, Rekers-Mombarg LT, Vaessen SF, Delemarre-van de Waal HA, Fodor M. Ligation of the uterine artery and early postnatal food restriction - animal models for growth retardation. *Horm Res* 2004; **62**(5): 233-240.
28. Pham TD, MacLennan NK, Chiu CT, Laksana GS, Hsu JL, Lane RH. Uteroplacental insufficiency increases apoptosis and alters p53 gene methylation in the full-term IUGR rat kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; **285**(5): R962-970.
29. Schreuder MF, Nyengaard JR, Fodor M, van Wijk JA, Delemarre-van de Waal HA. Glomerular number and function are influenced by spontaneous and induced low birth weight in rats. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16**(10): 2913-2919.
30. Nüsken KD, Schneider H, Plank C, Trollmann R, Nüsken E, Rascher W, Dötsch J. Fetal programming of gene expression in growth-restricted rats depends on the cause of low birth weight. *Endocrinology* 2011; **152**(4): 1327-1335.
31. Das SK, Mannan M, Faruque AS, Ahmed T, McIntyre HD, Al Mamun A. Effect of birth weight on adulthood renal function: A bias-adjusted meta-analytic approach. *Nephrology (Carlton)* 2016; **21**(7): 547-565.
32. Vikse BE, Irgens LM, Leivestad T, Hallan S, Iversen BM. Low birth weight increases risk for end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**(1): 151-157.
33. Hallan S, Euser AM, Irgens LM, Finken MJ, Holmen J, Dekker FW. Effect of intrauterine growth restriction on kidney function at young adult age: the Nord Trøndelag Health (HUNT 2) Study. *Am J Kidney Dis* 2008; **51**(1): 10-20.
34. Zanardo V, Fanelli T, Weiner G, Fanos V, Zaninotto M, Visentin S, Cavallin F, Trevisanuto D, Cosmi E. Intrauterine growth restriction is associated with persistent aortic wall thickening and glomerular proteinuria during infancy. *Kidney Int* 2011; **80**(1): 119-123.
35. Simonetti GD, Raio L, Surbek D, Nelle M, Frey FJ, Mohaupt MG. Salt sensitivity of children with low birth weight. *Hypertension* 2008; **52**(4): 625-630.
36. Hinchliffe SA, Lynch MR, Sargent PH, Howard CV, Van Velzen D. The effect of intrauterine growth retardation on the development of renal nephrons. *Br J Obstet Gynaecol* 1992; **99**(4): 296-301.
37. Mañalich R, Reyes L, Herrera M, Melendi C, Fundora I. Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: a histomorphometric study. *Kidney Int* 2000; **58**(2): 770-773.
38. Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens* 1988; **1**(4 Pt 1): 335-347.
39. Knop MR, Geng TT, Gorny AW, Ding R, Li C, Ley SH, Huang T. Birth Weight and Risk of Type 2 Diabetes Mellitus, Cardiovascular Disease, and Hypertension in Adults: A Meta-Analysis of 7 646 267 Participants From 135 Studies. *J Am Heart Assoc* 2018; **7**(23): e008870.

40. Luyckx VA, Brenner BM. Low birth weight, nephron number, and kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2005; **68**(97): S68-77.
41. Grigore D, Ojeda NB, Robertson EB, Dawson AS, Huffman CA, Bourassa EA, Speth RC, Brosnihan KB, Alexander BT. Placental insufficiency results in temporal alterations in the renin angiotensin system in male hypertensive growth restricted offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; **293**(2): R804-811.
42. Ojeda NB, Hennington BS, Williamson DT, Hill ML, Betson NE, Sartori-Valinotti JC, Reckelhoff JF, Royals TP, Alexander BT. Oxidative stress contributes to sex differences in blood pressure in adult growth-restricted offspring. *Hypertension* 2012; **60**(1): 114-122.
43. Kanzaki G, Puelles VG, Cullen-McEwen LA, Hoy WE, Okabayashi Y, Tsuboi N, Shimizu A, Denton KM, Hughson MD, Yokoo T, Bertram JF. New insights on glomerular hyperfiltration: a Japanese autopsy study. *JCI Insight* 2017; **2**(19).
44. Farquhar MG, Vernier RL, Good RA. An electron microscope study of the glomerulus in nephrosis, glomerulonephritis, and lupus erythematosus. *J Exp Med* 1957; **106**(5): 649-660.
45. Sheu JN, Chen JH. Minimal change nephrotic syndrome in children with intrauterine growth retardation. *Am J Kidney Dis* 2001; **37**(5): 909-914.
46. Zidar N, Avgustin Cavić M, Kenda RB, Ferluga D. Unfavorable course of minimal change nephrotic syndrome in children with intrauterine growth retardation. *Kidney Int* 1998; **54**(4): 1320-1323.
47. Zidar N, Cavić MA, Kenda RB, Koselj M, Ferluga D. Effect of intrauterine growth retardation on the clinical course and prognosis of IgA glomerulonephritis in children. *Nephron* 1998; **79**(1): 28-32.
48. Nüsken E, Fink G, Lechner F, Voggel J, Wohlfarth M, Sprenger L, Mehdiani N, Weber LT, Liebau MC, Brachvogel B, Dötsch J, Nüsken KD. Altered molecular signatures during kidney development after intrauterine growth restriction of different origins. *J Mol Med (Berl)* 2020; **98**(3): 395-407.
49. Plank C, Ostreicher I, Hartner A, Marek I, Struwe FG, Amann K, Hilgers KF, Rascher W, Dötsch J. Intrauterine growth retardation aggravates the course of acute mesangioproliferative glomerulonephritis in the rat. *Kidney Int* 2006; **70**(11): 1974-1982.
50. Plank C, Nüsken KD, Menendez-Castro C, Hartner A, Ostreicher I, Amann K, Baumann P, Peters H, Rascher W, Dötsch J. Intrauterine growth restriction following ligation of the uterine arteries leads to more severe glomerulosclerosis after mesangioproliferative glomerulonephritis in the offspring. *Am J Nephrol* 2010; **32**(4): 287-295.
51. Deckelbaum RJ, Worgall TS, Seo T. n-3 fatty acids and gene expression. *Am J Clin Nutr* 2006; **83**(6 Suppl): 1520s-1525s.
52. Espersen GT, Grunnet N, Lervang HH, Nielsen GL, Thomsen BS, Faarvang KL, Dyerberg J, Ernst E. Decreased interleukin-1 beta levels in plasma from rheumatoid arthritis patients after dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Clin Rheumatol* 1992; **11**(3): 393-395.
53. Kremer JM, Lawrence DA, Jubiz W, DiGiacomo R, Rynes R, Bartholomew LE, Sherman M. Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis. Clinical and immunologic effects. *Arthritis Rheum* 1990; **33**(6): 810-820.
54. Fortin PR, Lew RA, Liang MH, Wright EA, Beckett LA, Chalmers TC, Sperling RI. Validation of a meta-analysis: the effects of fish oil in rheumatoid arthritis. *J Clin Epidemiol* 1995; **48**(11): 1379-1390.
55. Goldberg RJ, Katz J. A meta-analysis of the analgesic effects of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation for inflammatory joint pain. *Pain* 2007; **129**(1-2): 210-223.
56. Donadio JV, Jr., Grande JP, Bergstralh EJ, Dart RA, Larson TS, Spencer DC. The long-term outcome of patients with IgA nephropathy treated with fish oil in a controlled trial. Mayo Nephrology Collaborative Group. *J Am Soc Nephrol* 1999; **10**(8): 1772-1777.

57. Ferraro PM, Ferraccioli GF, Gambaro G, Fulignati P, Costanzi S. Combined treatment with renin-angiotensin system blockers and polyunsaturated fatty acids in proteinuric IgA nephropathy: a randomized controlled trial. *Nephrol Dial Transplant* 2009; **24**(1): 156-160.
58. Hamazaki T, Tateno S, Shishido H. Eicosapentaenoic acid and IgA nephropathy. *Lancet* 1984; **1**(8384): 1017-1018.
59. Elbarbary NS, Ismail EAR, Mohamed SA. Omega-3 fatty acids supplementation improves early-stage diabetic nephropathy and subclinical atherosclerosis in pediatric patients with type 1 diabetes: A randomized controlled trial. *Clin Nutr* 2023; **42**(12): 2372-2380.
60. Irfan A, Haider SH, Nasir A, Larik MO, Naz T. Assessing the Efficacy of Omega-3 Fatty Acids + Statins vs. Statins Only on Cardiovascular Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis of 40,991 Patients. *Curr Probl Cardiol* 2024; **49**(2): 102245.
61. Miller PE, Van Elswyk M, Alexander DD. Long-chain omega-3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid and blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Hypertens* 2014; **27**(7): 885-896.
62. Mori TA, Bao DQ, Burke V, Puddey IB, Beilin LJ. Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid lowers ambulatory blood pressure and heart rate in humans. *Hypertension* 1999; **34**(2): 253-260.
63. Calder PC. Docosahexaenoic Acid. *Ann Nutr Metab* 2016; **69**(Suppl 1): 7-21.
64. Calder PC. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochem Soc Trans* 2017; **45**(5): 1105-1115.
65. Hishikawa D, Valentine WJ, Iizuka-Hishikawa Y, Shindou H, Shimizu T. Metabolism and functions of docosahexaenoic acid-containing membrane glycerophospholipids. *FEBS Lett* 2017; **591**(18): 2730-2744.
66. Hammarström S. Leukotrienes. *Annu Rev Biochem* 1983; **52**: 355-377.
67. Needleman P, Turk J, Jakschik BA, Morrison AR, Lefkowitz JB. Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem* 1986; **55**: 69-102.
68. Wang T, Fu X, Chen Q, Patra JK, Wang D, Wang Z, Gai Z. Arachidonic Acid Metabolism and Kidney Inflammation. *Int J Mol Sci* 2019; **20**(15).
69. Lianos EA, Rahman MA, Dunn MJ. Glomerular arachidonate lipoxygenation in rat nephrotoxic serum nephritis. *J Clin Invest* 1985; **76**(4): 1355-1359.
70. Rahman MA, Nakazawa M, Emancipator SN, Dunn MJ. Increased leukotriene B₄ synthesis in immune injured rat glomeruli. *J Clin Invest* 1988; **81**(6): 1945-1952.
71. Cheng J, Garcia V, Ding Y, Wu CC, Thakar K, Falck JR, Ramu E, Schwartzman ML. Induction of angiotensin-converting enzyme and activation of the renin-angiotensin system contribute to 20-hydroxyeicosatetraenoic acid-mediated endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; **32**(8): 1917-1924.
72. Garcia V, Shkolnik B, Milhau L, Falck JR, Schwartzman ML. 20-HETE Activates the Transcription of Angiotensin-Converting Enzyme via Nuclear Factor- κ B Translocation and Promoter Binding. *J Pharmacol Exp Ther* 2016; **356**(3): 525-533.
73. Yu M, Lopez B, Dos Santos EA, Falck JR, Roman RJ. Effects of 20-HETE on Na⁺ transport and Na⁺-K⁺-ATPase activity in the thick ascending loop of Henle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; **292**(6): R2400-2405.
74. Gangadhariah MH, Luther JM, Garcia V, Paueksakon P, Zhang MZ, Hayward SW, Love HD, Falck JR, Manthathi VL, Imig JD, Schwartzman ML, Zent R, Capdevila JH, Pozzi A. Hypertension is a major contributor to 20-hydroxyeicosatetraenoic acid-mediated kidney injury in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2015; **26**(3): 597-610.
75. Duffield JS, Hong S, Vaidya VS, Lu Y, Fredman G, Serhan CN, Bonventre JV. Resolvin D series and protectin D1 mitigate acute kidney injury. *J Immunol* 2006; **177**(9): 5902-5911.
76. Codde JP, Croft KD, Barden A, Mathews E, Vandongen R, Beilin LJ. An inhibitory effect of dietary polyunsaturated fatty acids on renin secretion in the isolated perfused rat kidney. *J Hypertens* 1984; **2**(3): 265-270.

77. Arnold C, Markovic M, Blossey K, Wallukat G, Fischer R, Dechend R, Konkel A, von Schacky C, Luft FC, Muller DN, Rothe M, Schunck WH. Arachidonic acid-metabolizing cytochrome P450 enzymes are targets of {omega}-3 fatty acids. *J Biol Chem* 2010; **285**(43): 32720-32733.
78. Huang YS, Wainwright PE, Redden PR, Mills DE, Bulman-Fleming B, Horrobin DF. Effect of maternal dietary fats with variable n-3/n-6 ratios on tissue fatty acid composition in suckling mice. *Lipids* 1992; **27**(2): 104-110.
79. Zambrano E, Rodríguez-González GL, Reyes-Castro LA, Bautista CJ, Castro-Rodríguez DC, Juárez-Pilares G, Ibáñez CA, Hernández-Rojas A, Nathanielsz PW, Montaña S, Arredondo A, Huang F, Bolaños-Jiménez F. DHA Supplementation of Obese Rats throughout Pregnancy and Lactation Modifies Milk Composition and Anxiety Behavior of Offspring. *Nutrients* 2021; **13**(12).
80. Shamseldeen AM, Ali Eshra M, Ahmed Rashed L, Fathy Amer M, Elham Fares A, Samir Kamar S. Omega-3 attenuates high fat diet-induced kidney injury of female rats and renal programming of their offsprings. *Arch Physiol Biochem* 2019; **125**(4): 367-377.
81. Wyrwoll CS, Mark PJ, Mori TA, Puddey IB, Waddell BJ. Prevention of programmed hyperleptinemia and hypertension by postnatal dietary omega-3 fatty acids. *Endocrinology* 2006; **147**(1): 599-606.
82. Kennedy K, Ross S, Isaacs EB, Weaver LT, Singhal A, Lucas A, Fewtrell MS. The 10-year follow-up of a randomised trial of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation in preterm infants: effects on growth and blood pressure. *Arch Dis Child* 2010; **95**(8): 588-595.
83. Zeisel SH. Dietary choline: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Annu Rev Nutr* 1981; **1**: 95-121.
84. West AA, Yan J, Jiang X, Perry CA, Innis SM, Caudill MA. Choline intake influences phosphatidylcholine DHA enrichment in nonpregnant women but not in pregnant women in the third trimester. *Am J Clin Nutr* 2013; **97**(4): 718-727.
85. Bernhard W, Böckmann K, Maas C, Mathes M, Hövelmann J, Shunova A, Hund V, Schleicher E, Poets CF, Franz AR. Combined choline and DHA supplementation: a randomized controlled trial. *Eur J Nutr* 2020; **59**(2): 729-739.
86. Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 8 ed: Elsevier; 2019.
87. Bancroft JD, Layton C. The hematoxylin and eosin. In: Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD, editors. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 8 ed: Elsevier; 2019. p. 126-138.
88. Gilbertson JA. Amyloid. In: Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD, editors. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 8 ed: Elsevier; 2019. p. 231-253.
89. Sanderson T, Wild G, Cull AM, Marston J, Zardin G. Immunohistochemical and immunofluorescent techniques. In: Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD, editors. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 8 ed: Elsevier; 2019. p. 337-394.
90. Hirano S. Western blot analysis. *Methods Mol Biol* 2012; **926**: 87-97.
91. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248-254.
92. Mann HB, Whitney DR. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *The Annals of Mathematical Statistics* 1947; **18**(1): 50-60.
93. Micklem K, Rigney E, Cordell J, Simmons D, Stross P, Turley H, Seed B, Mason D. A human macrophage-associated antigen (CD68) detected by six different monoclonal antibodies. *Br J Haematol* 1989; **73**(1): 6-11.
94. Parwaresch MR, Radzun HJ, Kreipe H, Hansmann ML, Barth J. Monocyte/macrophage-reactive monoclonal antibody Ki-M6 recognizes an intracytoplasmic antigen. *Am J Pathol* 1986; **125**(1): 141-151.

95. Holdsworth SR, Neale TJ, Wilson CB. Abrogation of macrophage-dependent injury in experimental glomerulonephritis in the rabbit. Use of an antimacrophage serum. *J Clin Invest* 1981; **68**(3): 686-698.
96. Isume M, Fujinaka H, Adhikary LP, Kovalenko P, El-Shemi AG, Yoshida Y, Yaoita E, Takeishi T, Takeya M, Naito M, Suzuki H, Yamamoto T. Important role for macrophages in induction of crescentic anti-GBM glomerulonephritis in WKY rats. *Nephrol Dial Transplant* 2004; **19**(12): 2997-3004.
97. Wise AF, Williams TM, Kiewiet MB, Payne NL, Siatskas C, Samuel CS, Ricardo SD. Human mesenchymal stem cells alter macrophage phenotype and promote regeneration via homing to the kidney following ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014; **306**(10): F1222-1235.
98. Duque N, Gómez-Guerrero C, Egido J. Interaction of IgA with Fc alpha receptors of human mesangial cells activates transcription factor nuclear factor-kappa B and induces expression and synthesis of monocyte chemoattractant protein-1, IL-8, and IFN-inducible protein 10. *J Immunol* 1997; **159**(7): 3474-3482.
99. Khachigian LM, Collins T, Fries JW. Nuclear factor-kappa B mediates induction of vascular cell adhesion molecule-1 in glomerular mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **206**(2): 462-467.
100. Braga TT, Correa-Costa M, Silva RC, Cruz MC, Hiyane MI, da Silva JS, Perez KR, Cuccovia IM, Camara NOS. CCR2 contributes to the recruitment of monocytes and leads to kidney inflammation and fibrosis development. *Inflammopharmacology* 2018; **26**(2): 403-411.
101. Yokomizo T, Kato K, Hagiya H, Izumi T, Shimizu T. Hydroxyeicosanoids bind to and activate the low affinity leukotriene B4 receptor, BLT2. *J Biol Chem* 2001; **276**(15): 12454-12459.
102. Shin EH, Lee HY, Bae YS. Leukotriene B4 stimulates human monocyte-derived dendritic cell chemotaxis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **348**(2): 606-611.
103. Voggel J, Fink G, Zelck M, Wohlfarth M, Post JM, Bindila L, Rauh M, Amann K, Alejandre Alcázar MA, Dötsch J, Nüsken KD, Nüsken E. Elevated n-3/n-6 PUFA ratio in early life diet reverses adverse intrauterine kidney programming in female rats. *J Lipid Res* 2022; **63**(11): 100283.
104. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; **31**(1): 13-20.
105. Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* 1993; **7**(5): 812-821.
106. Prelich G, Kostura M, Marshak DR, Mathews MB, Stillman B. The cell-cycle regulated proliferating cell nuclear antigen is required for SV40 DNA replication in vitro. *Nature* 1987; **326**(6112): 471-475.
107. Takahashi T, Caviness VS, Jr. PCNA-binding to DNA at the G1/S transition in proliferating cells of the developing cerebral wall. *J Neurocytol* 1993; **22**(12): 1096-1102.
108. Humphreys BD, Lin SL, Kobayashi A, Hudson TE, Nowlin BT, Bonventre JV, Valerius MT, McMahon AP, Duffield JS. Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol* 2010; **176**(1): 85-97.
109. Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R. A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature* 1996; **382**(6588): 225-230.
110. Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 2000; **407**(6803): 535-538.
111. Janda CY, Dang LT, You C, Chang J, de Lau W, Zhong ZA, Yan KS, Marecic O, Siepe D, Li X, Moody JD, Williams BO, Clevers H, Piehler J, Baker D, Kuo CJ, Garcia KC. Surrogate Wnt agonists that phenocopy canonical Wnt and β -catenin signalling. *Nature* 2017; **545**(7653): 234-237.

112. Chen W, ten Berge D, Brown J, Ahn S, Hu LA, Miller WE, Caron MG, Barak LS, Nusse R, Lefkowitz RJ. Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4. *Science* 2003; **301**(5638): 1391-1394.
113. Fiedler M, Mendoza-Topaz C, Rutherford TJ, Mieszczanek J, Bienz M. Dishevelled interacts with the DIX domain polymerization interface of Axin to interfere with its function in down-regulating β -catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; **108**(5): 1937-1942.
114. Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 2002; **108**(6): 837-847.
115. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo j* 1997; **16**(13): 3797-3804.
116. Behrens J, von Kries JP, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 1996; **382**(6592): 638-642.
117. Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destree O, Clevers H. XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 1996; **86**(3): 391-399.
118. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**(10): 5522-5527.
119. Cuevas CA, Tapia-Rojas C, Cespedes C, Inestrosa NC, Vio CP. β -Catenin-Dependent Signaling Pathway Contributes to Renal Fibrosis in Hypertensive Rats. *Biomed Res Int* 2015; **2015**: 726012.
120. Lin Y, Liu A, Zhang S, Ruusunen T, Kreidberg JA, Peltoketo H, Drummond I, Vainio S. Induction of ureter branching as a response to Wnt-2b signaling during early kidney organogenesis. *Dev Dyn* 2001; **222**(1): 26-39.
121. Shati AA, Alfaifi MY. Salidroside protects against diabetes mellitus-induced kidney injury and renal fibrosis by attenuating TGF- β 1 and Wnt1/3a/ β -catenin signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2020; **47**(10): 1692-1704.
122. Chen CA, Chang JM, Yang YL, Chang EE, Chen HC. Macrophage migration inhibitory factor regulates integrin- β 1 and cyclin D1 expression via ERK pathway in podocytes. *Biomed Pharmacother* 2020; **124**: 109892.
123. Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Müller R, Pouyssegur J. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem* 1996; **271**(34): 20608-20616.
124. Ingram AJ, James L, Ly H, Thai K, Cai L, Scholey JW. Nitric oxide modulates stretch activation of mitogen-activated protein kinases in mesangial cells. *Kidney Int* 2000; **58**(3): 1067-1077.
125. Hida M, Omori S, Awazu M. ERK and p38 MAP kinase are required for rat renal development. *Kidney Int* 2002; **61**(4): 1252-1262.
126. Yim HE, Yoo KH, Bae IS, Jang GY, Hong YS, Lee JW. Aldosterone regulates cellular turnover and mitogen-activated protein kinase family expression in the neonatal rat kidney. *J Cell Physiol* 2009; **219**(3): 724-733.
127. Anderson NG, Maller JL, Tonks NK, Sturgill TW. Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature* 1990; **343**(6259): 651-653.
128. Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 1995; **270**(13): 7420-7426.
129. Huang LL, Nikolic-Paterson DJ, Ma FY, Tesch GH. Aldosterone induces kidney fibroblast proliferation via activation of growth factor receptors and PI3K/MAPK signalling. *Nephron Exp Nephrol* 2012; **120**(4): e115-122.

130. Kazlauskas A, Durden DL, Cooper JA. Functions of the major tyrosine phosphorylation site of the PDGF receptor beta subunit. *Cell Regul* 1991; **2**(6): 413-425.
131. Winston JT, Pledger WJ. Growth factor regulation of cyclin D1 mRNA expression through protein synthesis-dependent and -independent mechanisms. *Mol Biol Cell* 1993; **4**(11): 1133-1144.
132. Takikita-Suzuki M, Haneda M, Sasahara M, Owada MK, Nakagawa T, Isono M, Takikita S, Koya D, Ogasawara K, Kikkawa R. Activation of Src kinase in platelet-derived growth factor-B-dependent tubular regeneration after acute ischemic renal injury. *Am J Pathol* 2003; **163**(1): 277-286.
133. Junqueira LC, Cossermelli W, Brentani R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn* 1978; **41**(3): 267-274.
134. Voggel J, Lubomirov L, Lechner F, Fink G, Nüsken E, Wohlfarth M, Pfitzer G, Shah-Hosseini K, Hellmich M, Alejandre Alcázar MA, Dötsch J, Nüsken KD. Vascular tone regulation in renal interlobar arteries of male rats is dysfunctional after intrauterine growth restriction. *Am J Physiol Renal Physiol* 2021; **321**(1): F93-f105.
135. Wun TC, Capuano A. Spontaneous fibrinolysis in whole human plasma. Identification of tissue activator-related protein as the major plasminogen activator causing spontaneous activity in vitro. *J Biol Chem* 1985; **260**(8): 5061-5066.
136. Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Baes M, Lemaître V, Tipping P, Drew A, Eeckhout Y, Shapiro S, Lupu F, Collen D. Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. *Nat Genet* 1997; **17**(4): 439-444.
137. Mazziere R, Masiero L, Zanetta L, Monea S, Onisto M, Garbisa S, Mignatti P. Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell-bound reactants. *Embo j* 1997; **16**(9): 2319-2332.
138. Hamano K, Iwano M, Akai Y, Sato H, Kubo A, Nishitani Y, Uyama H, Yoshida Y, Miyazaki M, Shiiki H, Kohno S, Dohi K. Expression of glomerular plasminogen activator inhibitor type 1 in glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* 2002; **39**(4): 695-705.
139. Paueksakon P, Revelo MP, Ma LJ, Marcantoni C, Fogo AB. Microangiopathic injury and augmented PAI-1 in human diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2002; **61**(6): 2142-2148.
140. Revelo MP, Federspiel C, Helderman H, Fogo AB. Chronic allograft nephropathy: expression and localization of PAI-1 and PPAR-gamma. *Nephrol Dial Transplant* 2005; **20**(12): 2812-2819.
141. An WS, Kim HJ, Cho KH, Vaziri ND. Omega-3 fatty acid supplementation attenuates oxidative stress, inflammation, and tubulointerstitial fibrosis in the remnant kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; **297**(4): F895-903.
142. Okuda S, Languino LR, Ruoslahti E, Border WA. Elevated expression of transforming growth factor-beta and proteoglycan production in experimental glomerulonephritis. Possible role in expansion of the mesangial extracellular matrix. *J Clin Invest* 1990; **86**(2): 453-462.
143. Tomooka S, Border WA, Marshall BC, Noble NA. Glomerular matrix accumulation is linked to inhibition of the plasmin protease system. *Kidney Int* 1992; **42**(6): 1462-1469.
144. Wu CF, Chiang WC, Lai CF, Chang FC, Chen YT, Chou YH, Wu TH, Linn GR, Ling H, Wu KD, Tsai TJ, Chen YM, Duffield JS, Lin SL. Transforming growth factor β -1 stimulates profibrotic epithelial signaling to activate pericyte-myofibroblast transition in obstructive kidney fibrosis. *Am J Pathol* 2013; **182**(1): 118-131.
145. Moritz KM, Mazzuca MQ, Siebel AL, Mibus A, Arena D, Tare M, Owens JA, Wlodek ME. Uteroplacental insufficiency causes a nephron deficit, modest renal insufficiency but no hypertension with ageing in female rats. *J Physiol* 2009; **587**(Pt 11): 2635-2646.
146. Garman JH, Mulrone S, Manigrasso M, Flynn E, Maric C. Omega-3 fatty acid rich diet prevents diabetic renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; **296**(2): F306-316.
147. Fernandes G, Chandrasekar B, Luan X, Troyer DA. Modulation of antioxidant enzymes and programmed cell death by n-3 fatty acids. *Lipids* 1996; **31** Suppl: S91-96.
148. Priante G, Musacchio E, Valvason C, Baggio B. EPA and DHA suppress AngII- and arachidonic acid-induced expression of profibrotic genes in human mesangial cells. *J Nephrol* 2009; **22**(1): 137-143.

149. Hida M, Fujita H, Ishikura K, Omori S, Hoshiya M, Awazu M. Eicosapentaenoic acid inhibits PDGF-induced mitogenesis and cyclin D1 expression via TGF-beta in mesangial cells. *J Cell Physiol* 2003; **196**(2): 293-300.
150. Gilpin SE, Guyette JP, Gonzalez G, Ren X, Asara JM, Mathisen DJ, Vacanti JP, Ott HC. Perfusion decellularization of human and porcine lungs: bringing the matrix to clinical scale. *J Heart Lung Transplant* 2014; **33**(3): 298-308.
151. Naba A, Clauser KR, Hoersch S, Liu H, Carr SA, Hynes RO. The matrisome: in silico definition and in vivo characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices. *Mol Cell Proteomics* 2012; **11**(4): M111.014647.
152. Laki K, Mommaerts WF. Transition of fibrinogen to fibrin as a two-step reaction. *Nature* 1945; **156**: 664.
153. Makogonenko E, Tsurupa G, Ingham K, Medved L. Interaction of fibrin(ogen) with fibronectin: further characterization and localization of the fibronectin-binding site. *Biochemistry* 2002; **41**(25): 7907-7913.
154. Diarra-Mehrpour M, Bourguignon J, Sesboué R, Matteï MG, Passage E, Salier JP, Martin JP. Human plasma inter-alpha-trypsin inhibitor is encoded by four genes on three chromosomes. *Eur J Biochem* 1989; **179**(1): 147-154.
155. Tobe T, Saguchi K, Hashimoto K, Miura NH, Tomita M, Li F, Wang Y, Minoshima S, Shimizu N. Mapping of human inter-alpha-trypsin inhibitor family heavy chain-related protein gene (ITIH1) to human chromosome 3p21-->p14. *Cytogenet Cell Genet* 1995; **71**(3): 296-298.
156. Dietl T, Dobrinski W, Hochstrasser K. Human inter-alpha-trypsin inhibitor. Limited proteolysis by trypsin, plasmin, kallikrein and granulocytic elastase and inhibitory properties of the cleavage products. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1979; **360**(9): 1313-1318.
157. Tamura Y, Hirado M, Okamura K, Minato Y, Fujii S. Synthetic inhibitors of trypsin, plasmin, kallikrein, thrombin, C1r-, and C1 esterase. *Biochim Biophys Acta* 1977; **484**(2): 417-422.
158. Morinaga J, Kakizoe Y, Miyoshi T, Onoue T, Ueda M, Mizumoto T, Yamazoe R, Uchimura K, Hayata M, Shiraishi N, Adachi M, Sakai Y, Tomita K, Kitamura K. The antifibrotic effect of a serine protease inhibitor in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013; **305**(2): F173-181.
159. Merlet-Bénichou C, Gilbert T, Muffat-Joly M, Lelièvre-Pégorier M, Leroy B. Intrauterine growth retardation leads to a permanent nephron deficit in the rat. *Pediatr Nephrol* 1994; **8**(2): 175-180.
160. Wlodek ME, Mibus A, Tan A, Siebel AL, Owens JA, Moritz KM. Normal lactational environment restores nephron endowment and prevents hypertension after placental restriction in the rat. *J Am Soc Nephrol* 2007; **18**(6): 1688-1696.
161. Sutherland MR, Vojisavljevic D, Black MJ. A practical guide to the stereological assessment of glomerular number, size, and cellular composition. *Anat Rec (Hoboken)* 2020; **303**(10): 2679-2692.
162. Baserga M, Bares AL, Hale MA, Callaway CW, McKnight RA, Lane PH, Lane RH. Uteroplacental insufficiency affects kidney VEGF expression in a model of IUGR with compensatory glomerular hypertrophy and hypertension. *Early Hum Dev* 2009; **85**(6): 361-367.
163. Lane PH, Steffes MW, Mauer SM. Estimation of glomerular volume: a comparison of four methods. *Kidney Int* 1992; **41**(4): 1085-1089.
164. Boubred F, Buffat C, Feuerstein JM, Daniel L, Tsimaratos M, Oliver C, Lelièvre-Pégorier M, Simeoni U. 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): F1944-1949.
165. Boubred F, Daniel L, Buffat C, Feuerstein JM, Tsimaratos M, Oliver C, Dignat-George F, Lelièvre-Pégorier M, Simeoni U. Early postnatal overfeeding induces early chronic renal dysfunction in adult male rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; **297**(4): F943-951.

166. Pozzi A, Jarad G, Moeckel GW, Coffa S, Zhang X, Gewin L, Eremina V, Hudson BG, Borza DB, Harris RC, Holzman LB, Phillips CL, Fassler R, Quaggin SE, Miner JH, Zent R. Beta1 integrin expression by podocytes is required to maintain glomerular structural integrity. *Dev Biol* 2008; **316**(2): 288-301.
167. Mundel P, Reiser J, Kriz W. Induction of differentiation in cultured rat and human podocytes. *J Am Soc Nephrol* 1997; **8**(5): 697-705.
168. Kikuchi M, Wickman L, Rabah R, Wiggins RC. Podocyte number and density changes during early human life. *Pediatr Nephrol* 2017; **32**(5): 823-834.
169. El-Dahr SS, Dipp S, Meleg-Smith S, Pinna-Parpaglia P, Madeddu P. Fetal ontogeny and role of metanephric bradykinin B2 receptors. *Pediatr Nephrol* 2000; **14**(4): 288-296.
170. Kriz W, Hähnel B, Rösener S, Elger M. Long-term treatment of rats with FGF-2 results in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 1995; **48**(5): 1435-1450.
171. Fu PH, Yu CH, Chen YC, Chu CC, Chen JY, Liang FW. Risk of adverse fetal outcomes following nonobstetric surgery during gestation: a nationwide population-based analysis. *BMC Pregnancy Childbirth* 2022; **22**(1): 406.

7 Anhang

7.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2 Zusammensetzung der Nahrung der Firma Altromin

Bestandteil (mg/kg, ^Δ kcal/kg, *I.E./kg)	Kontrollnahrung (CONTR) C1000 modified #100228	Interventionsnahrung (N3PUFA) C1000 modified #100230
Rohprotein	172850	172614
Rohfett	49829	52940
Rohfaser	30970	30948
Disaccharide	98105	98105
Polysaccharide	471727	465292
Umsetzbare Energie ^Δ	3506	3501
Lysin	17401	17400
Methionin	7223	7222
Cystin	3196	3195
Threonin	7154	7153
Tryptophan	1977	1977
Arginin	9829	9827
Histidin	5276	5275
Isoleucin	7223	7221
Leucin	14763	14758
Phenylalanin	7172	7170
Valin	3296	3294
Alanin	2528	2525
Asparaginsäure	3583	3581
Glutaminsäure	23675	23668
Glycin	3136	3135
Prolin	12763	12760
Serin	5268	5266
Tyrosin	9285	9283
Vitamin A*	15000	15000
Vitamin D3*	500	500
Vitamin E	163	160
Vitamin K3 (Menadion)	10	10
Vitamin B1	20	20
Vitamin B2	20	20
Vitamin B6	15	15
Vitamin B12	0,04	0,04
Nicotinsäure	50	50
Pantothensäure	50	50
Folsäure	10	10
Biotin	0,2	0,2

Vitamin C	20	20
Calcium	9311	9305
Verdauliches Phosphor	7200	7199
Magnesium	684	683
Natrium	2488	2487
Kalium	7089	7088
Schwefel	2792	2790
Chlor	3630	3630
Eisen	179	179
Mangan	101	101
Zink	29	29
Kupfer	6	6
Iod	0,5	0,5
Molybdän	0,2	0,2
Fluor	4	4
Selen	0,3	0,3
Cobalt	0,1	0,1
Aluminium	4	4
Cholinchlorid	1012	5002
Caprinsäure C-10:0	30	0
Laurinsäure C-12:0	30	35
Myristoleinsäure C-14:0	30	2323
Pentadecansäure C-15:0	30	141
Palmitinsäure C-16:0	8662	6229
Palmitoleinsäure C-16:1	30	3238
Margarinsäure C-17:0	30	0
Stearinsäure C-18:0	7326	1407
Oleinsäure C-18:1	13732	6120
Linolensäure C-18:2	17000	10995
Linolensäure C-18:3	809	633
Arachinsäure C-20:0	270	429
Eicosensäure C-20:1	360	739
Eicosadiensäure C-20:2	270	35
Arachidonsäure C-20:4	30	551
Eicosapentaensäure C-20:5	30	7562
Behensäure C-22:0	180	35
Erucasäure C-22:1	0	986
Docosapentaensäure n-3 C-22:5	0	186
Docosapentaensäure n-6 C-22:5	0	373
Docosahexaensäure C-22:6	30	5000
Nervensäure C-24:1	30	0
n-6/n-3-Fettsäure-Verhältnis	20:1	1:1

Tabelle 3 Verwendete Materialien

Material	Artikelname	Hersteller, Artikelnummer	Methode
96-Mikrotiterplatte	96 MicroWell™ Plates Non-treated - Pinchbar Design	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA), 269620	Western Blot
Aluminiumfolie	Rotilabo®-Aluminiumfolie 3µm	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, 2596.1	Histologie
C18-Kapillarsäule		Agilent, Santa Clara (USA)	Matrisomanalyse
Deckgläser	Cover Glass 20x20 mm Thickness No. 1	VWR International bvbd, Leuven (Belgien), 631-0122	Histologie
Einwegpistill	Pestles for Round-Bottom micro Tube	WATSON Bio Lab, Kobe (Japan), 173-02Y	Western Blot
Falcon	Röhre 15ml 120x17mm	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, 62.554.502	Histologie, Western Blot
Falcon	Röhre 50 ml 114x28mm	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, 62.547.254	Western Blot
Filterpapier	Rotilabo Faltenfilter Typ 113b	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, CA 13.1	Histologie
Folientüte	Gefrierbeutel transparent 200x300mm	677412	Western Blot
Frischhaltefolie	CLING-FLIM	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, 1255.1	Western Blot
Glasbehältnis	Borosilicate 3.3. 500ml	VWR International bvbd, Leuven (Belgien), 215-1594	Histologie, Western Blot
Glasbehältnis	Borosilicate 3.3. 1000ml	VWR International bvbd, Leuven (Belgien), 215-1595	Histologie, Western Blot
Kapillarspitzen	Kapillarspitzen 200 µl	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, 729011	Western Blot
Klingen	Microtome Blades R35 Stainless Steel	Feather Safety Razor Co., Osaka (Japan), 02.075.00.005	Histologie
Kosmetiktuch	dissolve tech	Papernet, Sofidel S.p.A., Porcari (Italien)	Histologie
Mehrkanalpipette	Reasearch plus 30–300 µl 8-Kanal	Eppendorf AG, Hamburg, 237380Z	Western Blot
Nitrozellulosemembran	Nitrocellulose Blotting Membrane Protran 0,45 µm NC	GE Healthcare UK, Little Chalfont (UK), 10600002	Western Blot
Objekträger	Superfrost Plus Menzel-Gläser Thermo scientific 25x75x1mm	Gerhard Menzel B. V. & Co. KG, Braunschweig, J1800AMNZ	Histologie
Pasteurpipette	Transferpipette 3,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, 86.1171	Histologie
Pinsel	Nova Synthetics	da Vinci Künstlerpinselfabrik DETEF GmbH, Nürnberg, 5235	Histologie

Pinsel	Fino 2/0, Fino 0	Marabu GmbH & Co. KG, Tamm, 01910 000 200, 0190 00 000	Histologie
Pinzette	Deckglaspinzette, gebogen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, 232- 0111	Histologie, Wes- tern Blot
Pipette	Research 100–1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, 264172	Histologie, Mat- risomanalyse, Western Blot
Pipette	Research plus 10–100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, 278075A	Histologie, Mat- risomanalyse, Western Blot
Pipette	Reference 0,1–2,5 µl	Eppendorf AG, Hamburg, 142946Z	Matrisomana- lyse, Western Blot
Pipette	Reference 2–20 µl	Eppendorf AG, Hamburg, 264812	Western Blot
Pipettenspitze	blau 1000 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, 70.762.010	Histologie, Mat- risomanalyse, Western Blot
Pipettenspitze	gelb 200 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, 70.760.012	Histologie, Mat- risomanalyse, Western Blot
Pipettenspitze	farblos 20 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, 70.1114	Matrisomana- lyse, Western Blot
Pipettenspitze	gelb 300 µl	Eppendorf AG, Hamburg, 0030 000.897	Western Blot
Plastikküvette	Standküvette	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, H550.1	Histologie
Präparatebox	Slidebox 100 Place Cork Red Ea	Heathrow Scientific, Vernon Hills (USA), HS15994C	Histologie
Reagenzreser- voire	Reagenzreservoir steril klar 60 ml	VWR International bvbd, Leuven (Belgien), 618487	Western Blot
Reagiergefäß	Safe-Lock Tubes 2ml	Eppendorf AG, Hamburg, 0030120094	Matrisomana- lyse
Reagiergefäß	Reagiergefäß 0,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, 72.699	Western Blot
Reagiergefäß	SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, 72.706	Matrisomana- lyse, Western Blot
Reagiergefäß	SafeSeal Reagiergefäß 2 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, 72.695.500	Western Blot
Skalpell	Einmalskalpell	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, T998.1	Histologie, Mat- risomanalyse, Western Blot
Stabpipette	Serologische Pipette 5ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, 86.1253.011	Histologie, Wes- tern Blot
Stabpipette	Serologische Pipette 10ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, 86.1254.011	Histologie, Wes- tern Blot
Stabpipette	Serologische Pipette 25ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, 86.1254.011	Histologie, Wes- tern Blot

Trockeneis	ICEBITZZZ® Nuggets klein 6,5kg	Linde GmbH, Pullach, 633846	Matrisomana- lyse, Western Blot
Plastikdose	Toppits Dose	Melitta Unternehmens- gruppe Bentz KG	Western Blot
Verschlussfolie	Parafilm "M" laboratory film	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, H666.1	Western Blot
Wägeschale	Wägeschälchen 8,5 x 8,5cm	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, 1884.1	Histologie, Wes- tern Blot
Whatman®-Pa- pier	Gel Blotting Paper GB 005	GE Healthcare UK, Little Chalfont (UK), 10426994	Western Blot

Tabelle 4 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Artikelname	Hersteller, Artikelnummer	Methode
Acetonitril	Acetonitril	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	Matrisomana- lyse
Acrylamidmix	Acrylamide Mix Gel 30 (Ro- tiphorese)	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karsruhe, 3029_1	Western Blot
AEC Kit	Permanent AEC Kit 2.000 Tests	Zytomed Systems GmbH, Berlin, ZUC054-200	Histologie
Ameisensäure	Ameisensäure ≥99.5%, Pierce™ für die LC-MS	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	Matrisomana- lyse
Antikörper-Di- luent	Antibody Diluent	Dako Denmark A/S, Glostrup (Dänemark), S0809	Histologie
Aprotinin	Aprotinin aus Rinderlunge	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, A1153- 1MG	Western Blot
APS	Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, A3678- 25G	Western Blot
BCA	BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA), 23225	Western Blot
Bromphenolblau	Bromphenolblau Natrium-Salz	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karsruhe, A512.1	Western Blot
BSA	Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karsruhe, 8076.3	Western Blot
Chloroacetamid	Chloroacetamid	AppliChem GmbH, Darmstadt	Matrisomana- lyse
Citratpuffer	Target Retrieval Solution Cit- rate pH6 (x10)	Dako Denmark A/S, Glostrup (Dänemark), S2369	Histologie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, 10236276001	Histologie
Dithiothreitol	Dithiothreitol (DTT, Cleland's Reagenz) ≥99,5%	AppliChem GmbH, Darmstadt	Matrisomana- lyse

ECL	Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare UK, Little Chalfont (UK), RPN2232	Western Blot
EDTA Solution	Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, E6635-500G	Histologie, Western Blot
Eindeckmittel	Neo-Mount®	Merck KGaA, Darmstadt, 1.09016.0100	Histologie
Eindeckmittel	Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, F4680	Histologie
Eisessig	Essigsäure ROTIPURAN 100%, p.a.	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, 3738.4	Histologie
Eosin	Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, X883.2	Histologie
Ethanol	Ethanol vergällt ≥ 99,8%	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, K928.4	Histologie, Western Blot
Fettstift	PAP pen for immunostaining	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Z377821-1EA	Histologie
Glycerol	Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, G5516	Western Blot
Glycin	Glycin, Elphograde	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, 3908.3	Western Blot
Hämalaun	Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, T865.2	Histologie
HCl	Salzsäure 32%	Merck KGaA, Darmstadt, 1.00319.1000	Western Blot
High Range Marker	Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA), 26625	Western Blot
Isopropanol	2-Propanol	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, 6752.4	Western Blot
Leitungswasser			Histologie
Leupeptin	Leupeptin -hemisulfat (Salz)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, L2884-1MG	Western Blot
Marker	PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA), 26616	Western Blot
Methanol	Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, 1.06008.2500	Matrisomanalyse, Western Blot
Milchpulver	Milchpulver, blotting grade	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, T145.3	Western Blot
Natriumchlorid	Natriumchlorid	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, 9265.2	Western Blot
Natriumdesoxycholat	Desoxycholsäure Natriumsalz	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, 3484.1	Western Blot
Natriumfluorid	Natriumfluorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, S6776-100G	Western Blot

Natriumorthovanadat	Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, S6508-10G	Western Blot
Octylphenoxy-Poly(ethylenoxy)ethanol	Nonidet P40 (IGEPAL® CA-630)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, 56741-250ML-F	Western Blot
Octylphenoxy-Poly(ethylenoxy)ethanol	Triton™ X-100	Merck KGaA, Darmstadt, 1.086.031.000	Histologie
PBS	PBS buffer (1X, Dulbecco's) - Powder	AppliChem GmbH, Darmstadt, A0964,9050	Histologie, Western Blot
Pepstatin	Pepstatin A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, P4265-5MG	Western Blot
Peroxidaseblock	Harnstoff-Wasserstoffperoxid in Tablettenform	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, 7641.1	Histologie
Phenylmethylsulfonylfluorid	Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, P7626-5G	Western Blot
Phosphormolybdänsäure-Lösung	Phosphomolybdic Acid Solution (0,2%)	ScyTek Laboratories, Utah (USA), PQA250	Histologie
Pikro-Sirius-Rot-Lösung	Picro-Sirius Red Solution	ScyTek Laboratories, Utah (USA), SRS250	Histologie
Ponceau S	Ponceau S (C.I. 27195)	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, 5938.2	Western Blot
Proteaseinhibitor	50x Complete Protease Inhibitor Cocktail	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel (Schweiz)	Matrisomanalyse
Protein Kit	Direct Detect® Protein Quantification Kit	Merck KGaA, Darmstadt	Matrisomanalyse
Reinstwasser Typ I	Milli-Q®	Merck Millipore, USA	Matrisomanalyse, Western Blot
SDS	Natriumdodecylsulfat	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, 2326.2	Western Blot
SEA-Block	SEA BLOCK Blocking Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA), 37527	Histologie
TEMED	Temed	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, T9281	Western Blot
Trichloressigsäure	Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, 8789.1	Western Blot
Tris Base	Tris PUFFERAN > 99,9%	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, 5429_3	Histologie, Western Blot
Tween® 20	Tween® 20 / Polyethylensorbitmonolaurate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, P1379	Histologie, Western Blot
VE-Wasser		Merck Millipore, USA	Histologie, Western Blot
Xylol-Ersatz	Neo-Clear®	Merck KGaA, Darmstadt, 1.09843.5000	Histologie

β -Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karsruhe, 4227.3	Western Blot
--------------------------	-------------------	--	--------------

Tabelle 5 Verwendete Geräte und Software

Gerät/Software	Artikelname	Hersteller, Artikelnummer	Methode
Abzug	AIRFLOW-CONTROL	Caspar & Co LABORA GmbH, Aachen, EN 14175	Histologie
Blotting-Kammer	PerfectBlue Semi-Dry Elektroblotter Sedec M	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, 700-1220DE	Western Blot
Dampfgarer	Type 3216	Braun GmbH, Kronberg	Histologie
Flüssigchromatograph	EASY nLC 1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	Matrisomanalyse
Folienschweißgerät		Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, FS 3604	Western Blot
Gelelektrophorese-Kammer	PerfectBlue™ Breitformat-Doppelgelsystem Twin ExWS	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, 45-2010	Western Blot
Heizblock	ThermoMixer® comfort	Eppendorf AG, Hamburg, 5355ZL047891	Matrisomanalyse, Western Blot
Homogenisator	Precellys®	Bertin Technologies SAS, Montigny-le-Bretonneux (Frankreich)	Matrisomanalyse
Imager	Molecular Imager Chemi-Doc™ XRS+ Imaging System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA), 721BR02933	Western Blot
Kreisschüttler	IKA Vortex 1 V1 S000	IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, 6156302	Matrisomanalyse, Western Blot
Massenspektrometer	Q Exactive Plus Orbitrap	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	Matrisomanalyse
Mikroskop	BX43 mit DP80-Kamera mit CCD-Dualsensoren	Olympus Life Science, Waltham (USA)	Histologie
Mikroskop	DIALUX 20 EB	Leica Instruments GmbH, Nussloch, 950 021	Histologie
Mikroskop	Slidescanner Leica SCN400	Leica Microsystems, Wetzlar, 11045032, 321416	Histologie
Mikrotom	2035 Biocut	Leica Instruments GmbH, Nussloch, 11760239	Histologie
Pipettierhilfe	pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, 9907200	Western Blot
Pipettierhilfe	ROTA-Filler 300	Heathrow Scientific, Vernon Hills (USA)	Histologie
Platten-Reader	Infinite® M200 Pro Nano	Tecan Group AG, Männedorf (Schweiz), 1010003100	Western Blot

Schüttelapparat	TYP 3005	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, 10509211 E	Histologie
Software	cellSens Dimension	Olympus Life Science, Waltham (USA)	Histologie
Software	GraphPad Prism 7	GraphPad Software, San Diego (USA), Version 7.04	Histologie, Western Blot
Software	iControl™ 2.0	Tecan Austria GmbH, Grödig (Österreich), Version: 3.9.1.0	Western Blot
Software	ImageJ Fiji	National Institutes of Health, Bethesda (USA), Version 1.8.0	Histologie
Software	Image Lab™	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA), Version: 5.2.1 build 11	Western Blot
Software	MaxQuant	Max-Planck-Institute of Biochemistry - Computational Systems Biochemistry, Martinsried, Version: 1.5.3.8	Matrisomanalyse
Software	Matrisome 2.0	Massachusetts Institute of Technology - Koch Institute for Integrative Cancer Research - Hynes Lab, Cambridge (USA), Version: 2.0	Matrisomanalyse
Software	Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond (USA), Version: 16.0.5026.1000	Histologie
Software	Perseus	Max-Planck-Institute of Biochemistry - Computational Systems Biochemistry, Martinsried, Version: 1.5.5.3	Matrisomanalyse
Software	QuPath	The Queen's University of Belfast, Belfast (Nordirland), Version 0.2.2.	Histologie
Software	SCN400 Client	Leica Microsystems, Wetzlar, Version: 2.2.0.3789	Histologie
Software	STRING	European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg/Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne (Schweiz), Version: 11.0	Matrisomanalyse
Sonifikations-system	Bioruptor®	Diagenode SA, Seraing (Belgien)	Matrisomanalyse
Thermocycler	Thermal Cycler 4000	Pioneer Scientific, Natick, MA, USA	Matrisomanalyse
Transformator	Electrophoresis Power Supply EV202	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, 106075	Western Blot
Trockenschrank	UM 100	Memmert GmbH+Co. KG, Schwabach, 901136	Histologie

Ultraschall-Homogenisator	Sonoplus HD 2070	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, 517.00001672.012	Western Blot
Waage	321 LS Typ 220A	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon (Schweiz)	Histologie
Wasserbad	Tissue Flotation Bath TFB 55	Medite GmbH, Burgdorf, 901 211 0811	Histologie
Wasserbad	WNB 14	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, WNB 14	Western Blot
Zentrifuge	Benchtop Centrifuge	Eppendorf AG, Hamburg	Matrisomanalyse
Zentrifuge	5424R	Eppendorf AG, Hamburg, 5404ZK604091	Western Blot
Zentrifuge	Micro Centrifuge Model SD	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, 058367	Western Blot

Tabelle 6 Im Rahmen der Histologie verwendete Puffer (Standardmedium: VE-Wasser)

Puffer	pH-Wert	Konzentration	Reagenz
Citratpuffer	6	10 % (v/v)	Target Retrieval Solution Citrate pH6 (x10)
PBS-Lösung	7,2–7,8	3,21 mM	di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat
		2,68 mM	Kaliumchlorid
		1,47 mM	Kaliumdihydrogenphosphat
		136,89 mM	Natriumchlorid
PBS-T100-Lösung		3,21 mM	di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat
		2,68 mM	Kaliumchlorid
		1,47 mM	Kaliumdihydrogenphosphat
		136,89 mM	Natriumchlorid
		0,1 % (v/v)	Octylphenoxy-Poly(ethylenoxy)ethanol
PBS-T20-Lösung		3,21 mM	di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat
		2,68 mM	Kaliumchlorid
		1,47 mM	Kaliumdihydrogenphosphat
		136,89 mM	Natriumchlorid
		0,1 % (v/v)	Tween® 20 Polyethylensorbitmonolaurate
Peroxidase-Puffer		2126,08 mM	Harnstoff-Wasserstoffperoxid
Tris-EDTA-Puffer	9	10 mM	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
		1 mM	EDTA
		0,05 % (v/v)	Tween® 20 Polyethylensorbitmonolaurate

Tabelle 7 Im Rahmen der Histologie verwendete Antikörper

Antikörper		Hersteller, Artikelnummer	Charge	Verdünnung
1. AK	CD68	abcam, Cambridge (UK), ab31630 (anti-Mouse)	GR278101-8	1:500
1. AK	Ki-67	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA), 14-5698-82 eBioscience (anti-Rat)	2196796	1:400 (IHC) 1:800 (IF)
1. AK	NF-κB p65	Cell Signaling Technology inc., USA, cs#8242 (anti-Rat)	13	1:1500
1. AK	PCNA	Dako Denmark A/S, Glostrup (Dänemark), M0879 (anti-Mouse)	59333	1:300
1. AK	PDGFRβ	Cell Signaling Technology inc., USA, cs#4564 (anti-Rab- bit)	2	1:500
1. AK	WT-1	abcam, Cambridge (UK), ab212951 (anti-Rat)	GR3226913- 3	1:1000
2. AK	Goat anti-Mouse IgG H+L (Cy3)	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Cambridge (UK), 115-165-003		1:300
2. AK	Goat anti-Mouse IgG H+L (DyLight488)	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Cambridge (UK), 115-485-003		1:300
2. AK	Goat anti-Rabbit IgG H+L (Cy3)	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Cambridge (UK), 111-165-003		1:300
2. AK	Goat anti-Rat IgG H+L (AF488)	abcam, Cambridge (UK), ab150157		1:300
2. AK	HRP One-Step Pol- ymer anti-Mouse/- Rabbit/-Rat	Zytomed Systems GmbH, Ber- lin, ZUC053-100	Z267	-

Tabelle 8 Probenverteilung auf der Mikrotiterplatte während der Proteinbestimmung

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	Blank	Blank	Probe 1	Probe 1	Probe 9	Probe 9	Probe 17	Probe 17	Probe 25	Probe 25
B	1:32	1:32	Probe 2	Probe 2	Probe 10	Probe 10	Probe 18	Probe 18	Probe 26	Probe 26
C	1:16	1:16	Probe 3	Probe 3	Probe 11	Probe 11	Probe 19	Probe 19	Probe 27	Probe 27
D	1:8	1:8	Probe 4	Probe 4	Probe 12	Probe 12	Probe 20	Probe 20	Probe 28	Probe 28
E	1:4	1:4	Probe 5	Probe 5	Probe 13	Probe 13	Probe 21	Probe 21	Probe 29	Probe 29
F	1:2	1:2	Probe 6	Probe 6	Probe 14	Probe 14	Probe 22	Probe 22	Probe 30	Probe 30
G	BSA	BSA	Probe 7	Probe 7	Probe 15	Probe 15	Probe 23	Probe 23		
H	Blank	Blank	Probe 8	Probe 8	Probe 16	Probe 16	Probe 24	Probe 24		

Tabelle 9 Im Rahmen der Western Blots verwendete Puffer (Standardmedium: VE-Wasser)

Puffer	pH	Konzentration	Reagenz
Blocking-Lösung (Medium: TBST)		5 % (m/v)	Milchpulver
		2 % (m/v)	Bovines Serumalbumin
Blotting-Puffer (Reinstwasser Typ I)		10 % (v/v)	Towbin-Puffer 10x
		10 % (v/v)	Methanol
BSA (Medium: TBST)		2 % (m/v)	Bovines Serumalbumin
Laemmli-Puffer 10x		250 mM	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
		1920 mM	Glycin
		0,05 % (m/v)	Acrylamidcylsulfat
Milch (Medium: TBST)		5 % (m/v)	Milchpulver
Mild Stripping Puffer	2,2	200 mM	Glycin
		3,5 mM	Natriumdodecylsulfat
		1 % (v/v)	Tween® 20 Polyethylensorbitmonolaurate
Ponceau		0,2 % (v/v)	Ponceau S
		3 % (v/v)	Trichloressigsäure
Probenpuffer 5x		0,5 M	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
		2,06 % (m/v)	Natriumdodecylsulfat
		0,0026 % (v/v)	Bromphenolblau
		10 % (v/v)	Glycerin
		25 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
RIPA-Puffer (modifiziert)	7,4 (HCl)	50 mM	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
		150 mM	Natriumchlorid
		1 % (v/v)	Octylphenoxy-Poly(ethylenoxy)ethanol
		0,25 % (m/v)	Natriumdesoxycholat
		1 mM	EDTA
		0,0001 % (m/v)	Aprotinin (in VE-Wasser gelöst)
		0,0001 % (m/v)	Pepstatin A (in Methanol gelöst)
		0,0001 % (m/v)	Leupeptin (in VE-Wasser gelöst)
		1 mM	Natriumorthovanadat
		1 mM	Natriumfluorid
		1 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid (in Isopropanol gelöst)
Sammelgelpuffer	6,8 (HCl)	0,5 M	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Stripping-Puffer	6,7 (HCl)	50 mM	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
		2 % (m/v)	Natriumdodecylsulfat
TBST	7,5	100 mM	Natriumchlorid
		10 mM	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
		0,1 % (v/v)	Tween® 20 Polyethylensorbitmonolaurate
Towbin-Puffer 10x		250 mM	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
		1920 mM	Glycin
Trenngelpuffer	8,8 (HCl)	1,5 M	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Tabelle 10 Gele der Western Blots

Gel	Finale Konzentration	Reagenz
Sammelgel	5,1 % (m/v)	Acrylamidmix
	0,065 M	Sammelgelpuffer (Tris, pH 6,8)
	0,1 % (m/v)	Natriumdodecylsulfat
	0,1 % (m/v)	Ammoniumpersulfat
	0,1 % (v/v)	TEMED
Trenngel 6 %	6 % (m/v)	Acrylamidmix
	0,375 M	Trenngelpuffer (Tris, pH 8,8)
	0,1 % (m/v)	Natriumdodecylsulfat
	0,1 % (m/v)	Ammoniumpersulfat
	0,08 % (v/v)	TEMED
Trenngel 8 %	8,1 % (m/v)	Acrylamidmix
	0,375 M	Trenngelpuffer (Tris, pH 8,8)
	0,1 % (m/v)	Natriumdodecylsulfat
	0,1 % (m/v)	Ammoniumpersulfat
	0,06 % (v/v)	TEMED
Trenngel 10 %	9,9 % (m/v)	Acrylamidmix
	0,375 M	Trenngelpuffer (Tris, pH 8,8)
	0,1 % (m/v)	Natriumdodecylsulfat
	0,1 % (m/v)	Ammoniumpersulfat
	0,04 % (v/v)	TEMED

Tabelle 11 Im Rahmen der Western Blots verwendete Antikörper

Antikörper		Hersteller, Artikelnummer	Charge	Verdünnung	Medium
1. AK	active β -Catenin	Cell Signaling Technology inc., USA, cs#8814	7	1:1000	5 % BSA/TBST
2. AK	Anti-Rabbit	Cell Signaling Technology inc., USA, cs#7074	29	1:1000	5 % Milch/TBST
1. AK	β -Catenin	Cell Signaling Technology inc., USA, cs#8480	5	1:1000	5 % Milch/TBST
2. AK	Anti-Rabbit	Cell Signaling Technology inc., USA, cs#7074	29	1:1000	5 % Milch/TBST
1. AK	Cylin D1	abcam, Cambridge (UK), ab134175	GR255380-7	1:5000	5 % BSA/TBST
2. AK	Anti-Rabbit	Cell Signaling Technology inc., USA, cs#7074	29	1:3000	5 % Milch/TBST
1. AK	ERK	Cell Signaling Technology inc., USA, cs#9102	27	1:800	5 % BSA/TBST
2. AK	Anti-Rabbit	Cell Signaling Technology inc., USA, cs#7074	29	1:2000	5 % Milch/TBST

1. AK	GAPDH	Cell Signaling Technology inc., USA, cs#2118	10	1:3500	5 % Milch/TBST
2. AK	Anti-Rabbit	Cell Signaling Technology inc., USA, cs#7074	29	1:3000	5 % Milch/TBST
1. AK	LRP6	Merck Millipore, USA, MABS341	3102440	1:800	5 % Milch/TBST
2. AK	Anti-Mouse	Cell Signaling Technology inc., USA, cs#7076		1:1000	5 % Milch/TBST
1. AK	P38 MAPK	Cell Signaling Technology inc., USA, cs#9212	23	1:2000	5 % BSA/TBST
2. AK	Anti-Rabbit	Cell Signaling Technology inc., USA, cs#7074	29	1:2000	5 % Milch/TBST
1. AK	PAI-1	Cell Signaling Technology inc., USA, cs#11907	2	1:1000	5 % Milch/TBST
2. AK	Anti-Rabbit	Cell Signaling Technology inc., USA, cs#7074	29	1:1000	5 % Milch/TBST
1. AK	PCNA	Dako Denmark A/S, Glostrup (Dänemark), M0879	59333	1:5000	5 % Milch/TBST
2. AK	Anti-Mouse	Cell Signaling Technology inc., USA, cs#7076	34	1:5000	5 % Milch/TBST
1. AK	PDGFR β	Cell Signaling Technology inc., USA, cs#4564	2	1:1000	5 % BSA/TBST
2. AK	Anti-Rabbit	Cell Signaling Technology inc., USA, cs#7074	29	1:1000	5 % Milch/TBST
1. AK	pERK	Cell Signaling Technology inc., USA, cs#4370	24	1:2000	5 % BSA/TBST
2. AK	Anti-Rabbit	Cell Signaling Technology inc., USA, cs#7074	29	1:2000	5 % Milch/TBST
1. AK	pP38 MAPK	Cell Signaling Technology inc., USA, cs#4511	13	1:800	5 % BSA/TBST
2. AK	Anti-Rabbit	Cell Signaling Technology inc., USA, cs#7074	29	1:1000	5 % Milch/TBST
1. AK	TGF β 1	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA), MA5-15065	VF3011727	1:1000	5 % BSA/TBST
2. AK	Anti-Rabbit	Cell Signaling Technology inc., USA, cs#7074	29	1:1000	5 % Milch/TBST
1. AK	WNT2b	abcam, Cambridge (UK), ab178418	GR163263-1	1:1000	5 % BSA/TBST
2. AK	Anti-Rabbit	Cell Signaling Technology inc., USA, cs#7074	29	1:2000	5 % Milch/TBST
1. AK	WNT3a	Merck Millipore, USA, 09-162	2464578	1:1000	5 % BSA/TBST
2. AK	Anti-Rabbit	Cell Signaling Technology inc., USA, cs#7074	29	1:2000	5 % Milch/TBST

Tabelle 12 Im Rahmen der Matrisomanalyse verwendeter Puffer

Puffer	pH	Konzentra- tion	Reagenz
Harnstoff-Lyse-Puffer		8 M	Harnstoff
		50 mM	Triethylammoniumbicarbonat
		2 % (v/v)	Proteaseinhibitor 50x

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Graphische Darstellung der vorliegenden Arbeit	S. 14
Abb. 2	Methodische Darstellungen zur Erhebung der Nephronenzahl und Glomerulusgröße	S. 24
Abb. 3	Immunhistochemische Färbung mit CD68-Antikörper	S. 36
Abb. 4	Anzahl CD68-positiver Zellen pro Quadratmillimeter Gesamtfläche	S. 37
Abb. 5	Immunhistochemische Färbung mit NF- κ B p65-Antikörper	S. 38
Abb. 6	Anteil NF- κ B p65-positiver Fläche an der Kortex-Medulla-Fläche	S. 39
Abb. 7	Immunhistochemische Färbung mit Ki-67-Antikörper	S. 40
Abb. 8	Anzahl Ki-67-positiver Zellen pro Quadratmillimeter glomeruläre Fläche	S. 41
Abb. 9	Anzahl Ki-67-positiver Zellen pro Quadratmillimeter Kortex-Medulla-Fläche	S. 41
Abb. 10	Anzahl Ki-67-positiver Zellen pro Quadratmillimeter Sammelrohr-Fläche	S. 42
Abb. 11	Western Blots und Densitometrie Cyclin D1 zu GAPDH und PCNA zu GAPDH des Nierenkortex.	S. 43
Abb. 12	Beispielhafte Immunfluoreszenzfärbung mit PDGFR β -Antikörper und PCNA-Antikörper des Nierenkortex	S. 45
Abb. 13	Beispielhafte Immunfluoreszenzfärbung mit CD68-Antikörper und Ki-67-Antikörper der Zellkonglomerate im Bereich des Nierenmarks	S. 47
Abb. 14	Beispielhafte Immunfluoreszenzfärbung mit CD68-Antikörper und Ki-67-Antikörper des Nierenkortex.	S. 48
Abb. 15	Western Blots und Densitometrie WNT2b zu GAPDH, WNT3a zu GAPDH, LRP6 zu GAPDH und active β -Catenin zu β -Catenin des Nierenkortex	S. 50
Abb. 16	Western Blots und Densitometrie PDGFR β zu GAPDH des Nierenkortex	S. 51
Abb. 17	Western Blots und Densitometrie pERK zu ERK des Nierenkortex	S. 51
Abb. 18	Western Blots und Densitometrie pP38 MAPK zu P38 MAPK des Nierenkortex	S. 52
Abb. 19	Pikro-Sirius-Rot-Färbung.	S. 53
Abb. 20	Anteil kollagenhaltiger Fläche an der Gesamtfläche	S. 54
Abb. 21	Anteil kollagenhaltiger Fläche an der Kortexfläche	S. 54
Abb. 22	Western Blots und Densitometrie PAI-1 zu GAPDH und TGF β 1 zu GAPDH des Nierenkortex	S. 55

Abb. 23	Heatmap der veränderten Proteine nach Matrisomanalyse im renalen Kortex	S. 58
Abb. 24	STRING-Analyse der zwischen LIG-CONTR/C-CONTR und LIG-N3PUFA/LIG-CONTR gegenregulierten Proteine der Matrisomanalyse des renalen Kortex	S. 59
Abb. 25	Glomeruluszahl pro Schnitt	S. 60
Abb. 26	Durchschnittliche Fläche eines Glomerulus	S. 60
Abb. 27	Immunhistochemische Färbung mit WT-1-Antikörper	S. 61
Abb. 28	Anzahl WT-1-positiver Zellen pro Quadratmillimeter glomeruläre Fläche	S. 62

8 Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

- Posterpräsentation im Rahmen der 52. Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Nephrologie 30.9.–2.10.2021.
Zelck M, Voggel J, Fink G, Wohlfarth M, Dötsch J, Nüsken E, Nüsken KD. Eine frühe postnatale Nahrungsintervention mit Omega-3-Fettsäuren reduziert die Gewebsinfiltration der Niere mit CD-68 positiven Zellen bei weiblichen Ratten nach intrauterinem Stress.
- Voggel J, Fink G, Zelck M, Wohlfarth M, Post JM, Bindila L, Rauh M, Amann K, Alejandre Alcázar MA, Dötsch J, Nüsken KD, Nüsken E. Elevated n-3/n-6 PUFA ratio in early life diet reverses adverse intrauterine kidney programming in female rats. *J Lipid Res* 2022; **63**(11): 100283.