

**Aus dem Institut für
experimentelle und klinische Pharmakologie
und Toxikologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Markus Schwaninger**

**Prävention einer Leptinresistenz durch
Blockade der Angiotensin II (AT₁)-Rezeptoren
im Rahmen einer Diät induzierten Adipositas
bei Ratten**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Margot Lau, geb. Thermann
aus Lübeck

Lübeck 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Walter Raasch
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. D. Ludwig
3. Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. Gohlke

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2012

zum Druck genehmigt: Lübeck, den 12.12.2012

Promotionskommission der Sektion Medizin

- Für meine lieben Eltern-

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1 Einleitung.....	4
1.1 Insulinresistenz	4
1.2 Adipositas	6
1.3 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)	10
2 Material und Methoden	17
2.1 Versuchsprotokolle.....	17
2.1.1 Versuchstiere	17
2.1.2 Untersuchung der Leptinsensitivität unter Telmisartan	18
2.1.3 Untersuchung der Glukosetoleranz unter Langzeit-Fütterung mit Cafeteria-Diät	21
2.2 Herstellung von Lösungen	22
2.2.1 Insulinlösung	22
2.2.2 Leptinlösung.....	22
2.2.3 Telmisartan-Lösung	22
2.3 Applikation von Medikamenten bzw. Substanzen	23
2.3.1 Intraperitoneale Applikation	23
2.3.2 Orale Applikation.....	23
2.3.3 Subcutane Applikation	23
2.4 Materialgewinnung	23
2.4.1 Gerinnungshemmer und Stabilisatoren.....	23
2.4.2 Blutabnahme aus dem Schwanz.....	24
2.4.3 Tötung und Organentnahme.....	24
2.5 Funktionstests.....	25
2.5.1 Pletysmographische Blutdruckmessung	25
2.5.2 Aktivitätsmessung	26
2.5.3 Leptinresistenztest	26
2.5.4 Orale Glukose Toleranz Test (OGTT).....	28

2.5.5	Insulin Toleranz Test (ITT).....	28
2.6	Biochemische Analysen.....	29
2.6.1	Radioimmunoassay (RIA).....	29
2.6.2	Präparation der Hypothalami.....	30
2.6.3	Extraktion der mRNA.....	30
2.6.4	mRNA-Quantifizierung.....	31
2.6.5	cDNA-Synthese.....	31
2.6.6	Quantitative Real-Time-PCR.....	32
2.6.7	Western Blot.....	34
2.7	Berechnungen und statistische Methoden.....	37
3	Ergebnisse.....	39
3.1	Etablierung des Leptinresistenztests.....	39
3.1.1	Leptinkinetik nach einmaliger subcutaner Applikation.....	39
3.1.2	Leptinresistenztest (LRT).....	40
3.2	Einfluss von Telmisartan auf die Leptinsensitivität.....	41
3.2.1	Einfluss der Telmisartan-Behandlung auf das Körpergewicht und die Energieaufnahme.....	41
3.2.2	Einfluss der Telmisartan-Behandlung auf das Plasmaleptin.....	43
3.2.3	Einfluss der Telmisartan-Behandlung auf den Energieverbrauch ...	44
3.2.4	Einfluss der Telmisartan-Behandlung auf die Hämodynamik.....	44
3.2.5	Hypothalamische Nahrungspeptide unter Telmisartan.....	46
3.2.6	Leptinresistenztest (LRT) unter Telmisartan.....	47
3.3	Untersuchung der Glukosetoleranz unter Langzeit-Fütterung mit Cafeteria-Diät.....	50
3.3.1	Einfluss der Cafeteria-Diät auf das Körpergewicht.....	50
3.3.2	Futter- und Wasseraufnahme unter Cafeteria-Diät.....	51
3.3.3	Einfluss der Cafeteria-Diät auf die körperliche Aktivität.....	53
3.3.4	Einfluss der Cafeteria-Diät auf die Hämodynamik.....	54
3.3.5	Einfluss der Cafeteria-Diät auf basale Stoffwechselfparameter.....	55
3.3.6	Oraler Glukose Toleranz Test (OGTT).....	56
3.3.7	Insulin Toleranz Test (ITT).....	58
3.3.8	Einfluss der Cafeteria-Diät auf das Überleben.....	60

4	Diskussion	61
4.1	Einfluss der AT ₁ -Blockade mit Telmisartan auf die Leptinsensitivität	61
4.2	Energieaufnahme und –verbrauch unter CD.....	72
4.3	Einfluss der CD auf die Entwicklung einer Insulinresistenz.....	76
4.4	Einfluss der CD auf die Mortalität von SHR	78
4.5	Ausblick.....	79
5	Zusammenfassung	83
6	Literaturverzeichnis	84
7	Anhang	99
7.1	Abbildungsverzeichnis	99
7.2	Tabellenverzeichnis	100
7.3	Substanzen und erworbene Lösungen.....	101
7.4	Rezepturen von Lösungen	103
7.5	Erworbene Versuchskits	104
7.5.1	RIA-Kits.....	104
7.5.2	Kits zur Bestimmung der Gen-Expression	104
7.6	Verbrauchsmaterialien	104
7.7	Geräte	105
7.8	Abkürzungsverzeichnis	107
8	Danksagung	113
9	Curriculum vitae	114
10	Veröffentlichungen	116
10.1	Poster.....	116
10.2	Publikationen	116
10.3	Preise und Auszeichnungen	117

1 Einleitung

Das Metabolische Syndrom (MetS) mit seinen assoziierten Erkrankungen Adipositas, arterielle Hypertonie, Insulin- und Leptinresistenz gewinnt aufgrund seiner erheblichen kardiovaskulären Morbidität und Mortalität weltweit an Bedeutung (Day 2007; Kahn et al. 2005). Die Prävalenz des Metabolischen Syndroms ist mit einem Viertel der US-amerikanischen und einem Fünftel der deutschen Bevölkerung sehr hoch (Ford et al. 2002; Scholze et al. 2010). Dabei existieren verschiedene Definitionen des Metabolischen Syndroms (Kim und Reaven 2004), die auf einer unterschiedlichen Gewichtung der einzelnen Komponenten beruhen. So wird beispielsweise mit der Bezeichnung „Insulinresistenz-Syndrom“ die Bedeutung der Insulinresistenz betont, während die Namensgeber des „Syndrom X“ oder des „tödlichen Quartetts“ die Faktoren eher als gleichwertig betrachten (Chisholm et al. 1997).

1.1 Insulinresistenz

Die Pathogenese des Metabolischen Syndroms ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Sicher ist, dass eine multifaktorielle Genese vorliegt (Teran-Garcia und Bouchard 2007). Dabei spielt die viszerale Adipositas eine grundlegende Rolle (Bouchard et al. 1988), welche mit einer Leptinresistenz, einer Dyslipidämie und der Ausbildung eines Adipositas-bedingten Hypertonus assoziiert ist. Weiterhin ist die viszerale Adipositas an der Entstehung einer Insulinresistenz und eines Diabetes mellitus Typ II beteiligt (Chisholm et al. 1997). Daher wird von einigen Autoren auch die Insulinresistenz ins Zentrum der Pathogenese des Metabolischen Syndroms gesetzt (Gogia und Agarwal 2006). Die Insulinresistenz ist durch ein vermindertes Ansprechen der Zellen auf Insulin gekennzeichnet. In hypertrophen Adipozyten ist die physiologische Translokation der GLUT 4- Rezeptoren gestört und damit die Glukoseaufnahme in die Zelle herabgesetzt (Weyer et al. 2000). Beim manifesten Diabetes mellitus Typ II tritt addierend eine β -Zell-Dysfunktion hinzu (Kahn 2003). Ätiologisch wird der Diabetes mellitus Typ II

ebenso wie das Metabolische Syndrom als Folge einer hyperkalorischen Nahrung und einer zu geringen physischen Aktivität gesehen. Die meisten der heute gebräuchlichen Tiermodelle zur Charakterisierung des Metabolischen Syndroms basieren auf genetischen Modifikationen und Mutationen (z.B. ob-ob, db-db, Zucker-Ratte) (Coleman 1978; Zucker und Zucker 1963). Sowohl für die Spontan Hypertensive Ratte (SHR) als auch für die Sprague-Dawley (SD) -Ratte konnten Studien unserer Arbeitsgruppe die Eignung als patientennahes Modell des Metabolischen Syndroms zeigen (Miesel et al. 2010). Die SD-Ratten zeichnen sich durch die Ausbildung einer Hyperphagie und einer Diät induzierten Adipositas (diet-induced obesity, DIO) aus (Keenan et al. 2005; Miesel et al. 2010). Zudem sind sie normotensiv und die Entwicklung eines Adipositas induzierten Hypertonus ist für sie nicht gezeigt (Miesel et al. 2010). Die SHR hingegen sind primär hyperten. Dem Hypertonus liegen polygenetische Ursachen zugrunde, die bis heute nicht vollständig aufgeklärt sind. Der erhöhte Blutdruck lässt sich aber sehr gut mit Antihypertensiva senken, die zur Behandlung des essentiellen Hypertonus beim Menschen Verwendung finden. Die SHR eignen sich daher hervorragend als Modell für den menschlichen Hypertonus (Pinto et al. 1998; Tofovic und Jackson 2003). Außerdem zeichnen sich SHR durch eine leichte Insulinresistenz aus (Pravenec et al. 2002; Shimamoto und Ura 2006; Swislocki und Tsuzuki 1993; Vera et al. 2002). Sie bilden zwar eine Hyperphagie und eine Diät induzierte Adipositas (DIO) aus, diese ist jedoch deutlich geringer ausgeprägt als bei den SD-Ratten (Oron-Herman et al. 2008). Bewährt hat sich zur Induktion der DIO die so genannte Cafeteria-Diät (CD), welche eine Mischung aus handelsüblichen Schokoladen- und Kekspunkten darstellt (Miesel et al. 2010). Unter der Cafeteria-Diät nimmt die vorbestehende Insulinresistenz der SHR zu (Miesel et al. 2010). So wurde in der Studie von Miesel et al. nach drei Monaten unter CD eine Zunahme des Körpergewichts sowie eine gestörte Glukosetoleranz beobachtet (Miesel et al. 2010).

Zusammenfassend konnte bisher für SHR unter Cafeteria-Diät die Entwicklung von Übergewicht, einer Hyperphagie und darunter das Entstehen einer gestörten Glukosetoleranz gezeigt werden. Das Ziel der hier vorgestellten Studie (siehe Protokoll 4) war nun die Untersuchung der metabolischen Funktionen über die gesamte Lebenszeit der Tiere mit der Fragestellung:

- Entwickeln die SHR unter Cafeteria-Diät, über ihre Lebenszeit gesehen, einen Diabetes mellitus Typ II?
- Ist die Lebenserwartung der SHR unter Cafeteria-Diät verkürzt?

1.2 Adipositas

Die Adipositas als zentrales Element des Metabolischen Syndroms stellt ein weit verbreitetes gesundheitliches Problem dar: Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) waren im Jahre 2005 1,6 Milliarden der über 15-Jährigen übergewichtig und wenigstens 400 Millionen Menschen waren adipös. Die International Obesity Task Force definiert Übergewicht als einen Body-Mass-Index (BMI) von über 25 kg/m^2 und Adipositas als einen BMI von über 30 kg/m^2 (Bjorntorp 1997). Dabei ist die Fettverteilung von mindestens ebenso großer Bedeutung wie der BMI, wobei vor allem die viszerale Adipositas hervorzuheben ist (Bjorntorp 1992; 1993). Um dieser Einteilung gerecht zu werden, wurde die Empfehlung gegeben, die Waist-to-Hip-Ratio (WHR) zu bestimmen (Bjorntorp 1992; Lean et al. 1995), die ab einer WHR von >1 bei Männern und $>0,85$ bei Frauen als Grenze zum erhöhten kardiovaskulären Risiko definiert ist.

Die WHO rechnet bis zum Jahr 2015 fast mit einer Verdoppelung der Betroffenen. Diese Entwicklung weist uns auf ein bedeutendes sozioökonomisches Problem hin. Laut einer amerikanischen Studie (Finkelstein et al. 2009) betragen die Ausgaben für die Adipositas-assoziierten Krankheiten 147 Milliarden US-Dollar (103 Milliarden Euro) pro Jahr. Neben den gesundheitlichen und volkswirtschaftlichen Folgen der Adipositas aggravieren die begrenzten therapeutischen Möglichkeiten die Situation (Bjorntorp 1997; Roth et al. 2004). Ursächlich für eine Adipositas steht an erster Stelle das Ungleichgewicht zwischen Energieaufnahme und -verbrauch. Entsprechend lässt sich die Genese der Adipositas in den Industrienationen vornehmlich auf ein unbegrenztes Angebot an hochkalorischer Nahrung mit gleichzeitiger Reduktion an körperlicher Aktivität zurückführen (Astrup 1999; Despres und Lamarche 1993; Scheurink et al. 1999; Schrauwen und Westerterp 2000). Die Nahrungsaufnahme ist neben äußeren Faktoren wie familiären, kulturellen und psychosozialen Einflüssen durch endogene Signale gesteuert (Woods et al. 2000), wie z.B. Leptin, Insulin, Glukose und Cortisol (Baskin et al. 2001;

Jequier 2002). Eine genetische Komponente trägt zu der multifaktoriellen Genese der Adipositas ebenfalls bei. In Mäusen konnte eine Reihe von Gendefekten, welche zu Adipositas führen, identifiziert werden. Dazu zählen ein Defekt des Leptin-Gens (ob-ob) (Zhang et al. 1994) oder des Leptin-Rezeptors (db-db) (Tartaglia et al. 1995). Eine singuläre genetische Grundlage für eine Adipositas konnte jedoch bisher nicht identifiziert werden.

Die Pathogenese der Adipositas basiert zudem auf metabolischen und endokrinen (Fehl-) Funktionen des Fettgewebes, wozu auch die Leptinresistenz zählt (Enriori et al. 2006; Roth et al. 2004). Leptin (von griechisch leptos = schlank) ist ein von Adipozyten exprimiertes Fettgewebshormon (Maffei et al. 1995b) und das Produkt des ob- (obese-) Gens (Campfield et al. 1995; Halaas et al. 1995; Zhang et al. 1994), das zur Reduktion der Nahrungsaufnahme führt. Es wird proportional zur Masse des Fettgewebes ins Plasma freigesetzt (Maffei et al. 1995b). Hierbei ist die Verteilung der Fettmasse entscheidend. Es wird überwiegend aus dem subcutanen und weniger aus dem viszeralen Fettgewebe freigesetzt (Mantzoros und Moschos 1998). Zirkulierendes Leptin gelangt proportional zur Plasmakonzentration über die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn, bevor es zum komplexen Netzwerk der Nahrungsregulation gehörige Rezeptoren stimuliert. Entgegen der zunächst angenommenen niedrigen Konzentration im Blut adipöser Personen, ist es im Gegenteil bei den Betroffenen stark erhöht (Considine et al. 1996). Die Behandlung mit extern zugeführtem Leptin brachte bei einem Großteil der adipösen Patienten nicht die gewünschte Gewichtsreduktion (Mantzoros 1999). Dieser Befund lässt auf eine Leptinresistenz adipöser Individuen schließen.

Als Ursache der Leptinresistenz wird die herabgesetzte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke diskutiert (Banks et al. 1999; Banks und Farrell 2003). Zusätzlich unterscheiden einige Autoren zwischen „zentraler“ und „peripherer“ Resistenz. So wurde beschrieben, dass eine Wirksamkeit des Leptins unter Umgehung der Blut-Hirn-Schranke bei direkter zentraler Applikation (i.c.v.) auch bei leptinresistenten Ratten nachweisbar ist (Dryden et al. 1999). Im Gegensatz dazu zeigte sich kein Effekt in Folge einer intraperitonealen, d.h. peripheren Applikation (El-Haschimi et al. 2000).

Leptin hat eine Schlüsselposition in der Regulation von Energieaufnahme und -verbrauch inne (Schwartz und Gelling 2002; Schwartz et al. 2000). Physiologi-

scherweise hält das Leptin das Körpergewicht konstant, indem es die Nahrungsaufnahme drosselt (Flier 1998; Friedman und Halaas 1998; Spiegelman und Flier 1996) und den Energieverbrauch in Form von Thermogenese über die direkte Stimulation der mitochondrialen Uncoupling Proteine 1 bis 3 (UCP) steigert (Boss et al. 1997; Collins et al. 1996; Fleury et al. 1997; Gimeno et al. 1997; Gong et al. 1997). Andersherum stellen niedrige Leptinspiegel ein Signal für ein Energiedefizit bei leeren Fettdepots dar (Boden et al. 1996; Flier 1998; Frederich et al. 1995). Die Tatsache, dass Leptin nicht nach einer Mahlzeit erhöht ist und auch nicht zum Abbruch der Mahlzeit führt (Considine et al. 1996; Maffei et al. 1995b), bestätigt seine Zugehörigkeit zum langwirksamen System der Nahrungsregulation. Dementsprechend führt auch erst die chronische Leptinzufuhr bei adipösen Mäusen zu einer Gewichtsabnahme (Halaas et al. 1997), die ausschließlich auf einen niedrigeren Fettanteil zurückzuführen ist (Halaas et al. 1995). Hierbei ist vor allem das viszerale Fettgewebe reduziert. Ein möglicher Mechanismus für die Reduktion des viszeralen Fettgewebes durch das Leptin ist die Aktivierung des Sympathikus (Barzilai et al. 1997; Mantzoros et al. 1996), wobei insbesondere der β_3 -Rezeptor eine Rolle spielt (Haynes et al. 1997).

Neben den peripheren Auswirkungen auf den Energiehaushalt entfaltet das Leptin seine zentrale Wirkung im Hypothalamus an Leptinrezeptoren (Ob-R) (Tartaglia et al. 1995). Durch positional cloning wurde gezeigt, dass das zum Ob-R gehörige db-Gen in fünf bis jetzt identifizierten Splice-Varianten vorliegt (Lee et al. 1996; Tartaglia et al. 1995). Die wichtigste Variante stellt der Ob-Rb-Rezeptor dar. Außerdem ist im Bereich der Blut-Hirn-Schranke der Ob-Ra-Rezeptor identifiziert worden (Banks et al. 1996). Mittels In-situ-Hybridisierung wurden Ob-Rb-Rezeptoren im Nucleus arcuatus (ARC), im dorsomedialen Hypothalamus (DMH), im Nucleus paraventricularis (PVN), im ventromedialen Hypothalamus (VMH) und im lateralen Hypothalamus (LHA) identifiziert (Elmqvist et al. 1999; Fei et al. 1997; Hetherington 1983; Mercer et al. 1996b). Die genannten hypothalamischen Kerngebiete sind in besonderem Maße an der Regulation der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichts beteiligt. Studien an Ratten und Mäusen mit hypothalamischen Läsionen konnten den Hypothalamus als Hauptwirkort des Leptins bestätigen (Maffei et al. 1995a; Satoh et al. 1997). Vom lateralen und ventromedialen Kerngebiet ziehen außerdem modulierende Projektionen zu sympathischen und

parasympathischen Präganglien (Friedman und Halaas 1998). Seine Wirkung auf den Energiehaushalt übt das Leptin hauptsächlich über die Auf- und Abregulation von hypothalamischen Nahrungspeptiden aus. Im Allgemeinen werden orexigene und anorexigene Peptide unterschieden (Tab. 1.1).

Table 1-1: Hypothalamische Nahrungspeptide

Orexigene Nahrungspeptide	Anorexigene Nahrungspeptide
Neuropeptid Y (NPY)	Cocaine Amphetamine Regulated Transcript (CART)
Agouti-Related Peptide (AgRP)	[Melanozyten-stimulierendes Hormon (α -MSH)]
Melanin Concentrating Hormone (MCH)	Proopiomelanocortin (POMC)
PreProOrexin (PPO)	Corticotropin Releasing Hormone (CRH)

[]: Im Rahmen der Dissertation nicht untersuchte Peptide.

Der potenteste orexigene Vertreter ist das Neuropeptid Y (NPY) (Friedman und Halaas 1998). NPY-exprimierende Neurone befinden sich im lateralen Hypothalamus sowie im Nucleus arcuatus (Schwartz et al. 1996; Stephens et al. 1995). Die Neurone koexprimieren Leptinrezeptoren (Mercer et al. 1996a) und der NPY-Rezeptor reagiert auf niedrige Leptinspiegel mit einer vermehrten Transkription (Marks et al. 1992). Das anorexigene Cocaine Amphetamine Regulated Transcript (CART) wirkt antagonistisch zum NPY. Das Melanozyten-stimulierende Hormon (α -MSH) und das Agouti-Related Peptide (AgRP) reagieren über den Melanocortin 4-Rezeptor auf erhöhte Leptinspiegel im Plasma (Friedman 1997). α -MSH wird aus dem ebenfalls anorexigen wirksamen Proopiomelanocortin (POMC) abgespalten (Hakansson et al. 1998). AgRP fungiert als Antagonist des Melanocortin-Rezeptors und wirkt damit orexigen. Das Proopiomelanocortin (POMC) wird mit dem Ob-Rb-Rezeptor koexprimiert (Elias et al. 1999; Spiegelman und Flier 1996). Das anorexigene Corticotropin Releasing Hormone (CRH) wird im Nucleus paraventricularis freigesetzt (Schwartz et al. 2000). Im lateralen Hypothalamus befinden sich Neurone, die das orexigene Hormon Melanin Concentrating Hormone (MCH) ex-

primieren (Elias et al. 1999). MCH führt zu Appetitsteigerung und Gewichtszunahme (Qu et al. 1996). Das intakte Melanocortin-exprimierende System ist zudem Voraussetzung für die Entstehung eines Adipositas induzierten Hypertonus (da Silva et al. 2008). Das Leptin entfaltet einen Teil seiner Wirkung über Orexine (Hypocretine) wie das PreProOrexin (PPO) (Louis et al. 2010), die zu einer gesteigerten Energieaufnahme führen (Broberger et al. 1998; de Lecea 2010; Peyron et al. 1998).

1.3 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

An der Regulation von Körpergewicht und Nahrungsaufnahme ist neben den hypothalamischen Nahrungspeptiden in entscheidendem Ausmaß das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) beteiligt (Müller et al. 2007; Raasch et al. 2006). Das RAAS bildet eine Hormonkaskade, deren Startpunkt die im juxtaglomerulären Apparat produzierte Protease Renin bildet. Renin spaltet aus dem im Fettgewebe bzw. in der Leber produzierten Angiotensinogen das inaktive Angiotensin I ab. Die Überführung in das aktive Octapeptid Angiotensin II wird durch das Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) ausgeführt (Weber 2001; Zaman et al. 2002). Im Mittelpunkt steht das Angiotensin II, welches sowohl einen Vasokonstriktor als auch einen Mediator für die Flüssigkeits- und Natrium-Rückresorption darstellt (Weber 2001; Zaman et al. 2002). Entsprechend ist das Angiotensin II in die Blutdruckregulation involviert. Darüber hinaus führt das Angiotensin II zu einer Hypertrophie des Fettgewebes (Saint-Marc et al. 2001) und damit zu einer Gewichtszunahme sowie einer verschlechterten Glukoseutilisation (Scheen 2004). Das Angiotensin II entfaltet seine Wirkung hauptsächlich über den Angiotensin 1 (AT_1)-Rezeptor (Crandall et al. 1994). Die AT_1 -Rezeptoren sind G-Protein gekoppelt mit je sieben hydrophoben transmembranären Domänen, einigen N-Glykosilierungs- sowie einer potentiellen G-Bindungsstelle (Regitz-Zagrosek et al. 1996). Im Gegensatz zum Menschen sind in Nagern zwei Unterformen des AT_1 -Rezeptors identifiziert worden (AT_{1A} - und AT_{1B} -Rezeptor), die sich pharmakologisch durch die AT_1 -Blocker nicht diskriminieren lassen (Elton et al. 1992; Iwai und Inagami 1992; Kakar et al. 1992a; Kakar et al. 1992b; Sasamura et al. 1992). AT_1 -Rezeptoren sind in den verschiedensten Geweben und Organen

nachgewiesen worden, u.a. im Gehirn und im Fettgewebe (Allen et al. 2000). Im Gehirn wurden AT_1 -Rezeptoren im Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT), im subfornikalen Organ (SFO), im Nucleus paraventricularis (PNV), im medianen Nucleus preopticus, im Cortex und im Hippocampus nachgewiesen (Bunnemann et al. 1992; Jöhren et al. 1995). Über den AT_1 -Rezeptor werden u.a. die Vasokonstriktion und darüber der Blutdruck sowie die trophische Wirkung auf das weiße Fettgewebe vermittelt (Darimont et al. 1994; Regitz-Zagrosek et al. 1996; Saint-Marc et al. 2001; Zorad et al. 2006). Neben dem AT_1 -Rezeptor existiert der AT_2 -Rezeptor, für den eine antagonistische Funktion zum AT_1 -Rezeptor beschrieben worden ist (Regitz-Zagrosek et al. 1996; Unger und Sandmann 2000). Der AT_2 -Rezeptor ist überwiegend im Gehirn im Nucleus geniculatus, in der inferioren Olive und im Nebennierenmark exprimiert (Jöhren et al. 1996). Entsprechend ist der AT_2 -Rezeptor an motorischen und sensorischen Vorgängen beteiligt. Zudem wird die Triglyzeridsynthese über AT_2 -Rezeptoren stimuliert (Jones et al. 1997). Dies steht im Gegensatz zu der Annahme von Burson und Crandall, die von einer Regulation über den AT_1 -Rezeptor ausgegangen sind (Burson et al. 1994; Crandall et al. 1994). Neben dem AT_1 - und dem AT_2 -Rezeptor ist der AT_4 -Rezeptor beschrieben worden. Der AT_4 -Rezeptor ist im Gehirn mit cholinergen und sensorischen Neuronen assoziiert. Somit ist er an kognitiven Prozessen beteiligt und reguliert den Blutfluss (Allen et al. 1998; de Gasparo et al. 2000; Handa 2000). Der AT_4 -Rezeptor wurde außerdem im Fettgewebe nachgewiesen, was von Bedeutung für den Metabolismus sein könnte (Weiland und Verspohl 2008). Der Hauptligand des AT_4 -Rezeptors ist das Angiotensin IV (Ang (3-8)) (Watanabe et al. 2005).

Zu den Auswirkungen einer medikamentösen Blockade der Angiotensin-Rezeptoren zählen die Senkung des Blutdrucks und des Plasmainsulins (Müller et al. 2010), woraus sich die therapeutische Implikation der AT_1 -Rezeptor-Blocker ergibt. AT_1 -Blocker sind bereits gut etabliert in der Therapie des Bluthochdrucks, der Herzinsuffizienz sowie der diabetischen Nephro- und Retinopathie (Culman et al. 2002; Kamari et al. 2008; Kurihara et al. 2008; Seltzer et al. 2004). Darüber hinaus reduzieren sie die Inzidenz des Typ II-Diabetes (Grassi et al. 2003; Katovich und Pachori 2000; Pavlatou et al. 2008; Scheen 2004; Torlone et al. 1993). Unter chronischer Therapie mit AT_1 -Blockern ist die Insulinsensitivität ver-

bessert, da die Expression von GLUT 4-Rezeptoren in der Skelettmuskulatur erhöht ist (Henriksen und Jacob 2003) und die Differenzierung und Rekrutierung der Adipozyten gehemmt wird (Engeli et al. 2000). Zudem ist die Durchblutung der Skelettmuskulatur durch den vasodilatierenden Effekt der AT₁-Blocker verbessert (Scheen 2004). Eine weitere Theorie bezieht den Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPAR_γ) in die Pathogenese des Diabetes mit ein. Die PPAR_γ-Aktivität wird über AT₁-Blocker, allen voran das Telmisartan, induziert und trägt über einen Glitazon- (Thiazolidinedione-) ähnlichen Mechanismus zur verbesserten Insulinwirksamkeit bei (Schupp et al. 2005; Schupp et al. 2004). Allerdings ist ein alleiniger Mechanismus über das PPAR_γ als unwahrscheinlich anzusehen, da klinisch hierüber nicht alle positiven Effekte erklärt werden können (Müller-Fielitz et al. 2012). Das RAAS und damit auch die AT₁-Blocker greifen darüber hinaus in den Regelkreis der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse) ein. Nachweislich besteht bei Adipositas, Leptinresistenz und Diabetes eine Hyperaktivität der HPA-Achse, woraus eine erhöhte Stresssensitivität resultiert (Boustany et al. 2004; Brühl et al. 2007; Dallman et al. 2007; Miesel et al. 2011; Müller et al. 2007; Pavlatou et al. 2008; Raasch et al. 2006; Roy et al. 1990; 1991; Uresin et al. 2004). Gleichzeitig werden bei adipösen Individuen höhere Konzentrationen an Glukokortikoiden im Plasma gemessen (Chrousos 2000; Cunningham et al. 1986; Guillaume-Gentil et al. 1990). Die Glukokortikoide stehen als Effektormoleküle am Ende der HPA-Achse. Im Nucleus paraventricularis des Hypothalamus wird das Corticotropin Releasing Hormone (CRH) freigesetzt, welches in der Adenohypophyse die Abspaltung des Adrenocortikotropen Hormons (ACTH) aus dem Proopiomelanocortin (POMC) stimuliert (Aguilera et al. 2004). Das ACTH führt wiederum in der Zona fasciculata der Nebennieren zu einer Ausschüttung der Glukokortikoide, Cortisol beim Menschen und Corticosteron beim Nagetier (Harmer und Bicknell 2005). Eine chronische Hyperaktivität der HPA-Achse führt, ähnlich der Glukokortikoid-Dauertherapie, zu einer Stammfettsucht, Hyperglykämie, Hypertriglyzeridämie und Hypertonie (Chrousos 2000). Außerdem ist die Aufnahme an hochkalorischer Nahrung unter Stressbedingungen gesteigert (Miesel et al. 2011; Pecoraro et al. 2004). Die Übereinstimmungen mit den Symptomen des Metabolischen Syndroms legen einen Zusammenhang in der Pathogenese nahe. In der Vergangenheit konnte von

unserer Arbeitsgruppe wiederholt eine Reduktion der HPA-Achsen-Aktivität durch eine Blockade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) nachgewiesen werden (Miesel et al. 2011; Müller-Fielitz et al. 2012; Müller et al. 2007; Raasch et al. 2006). Die beschriebenen positiven Effekte der AT₁-Blockade führen sogar nachweislich zu einer Verlängerung der Lebenszeit (LIFE, SCOPE und VALUE-Studie) (Dahlof et al. 2002; Julius et al. 2004; Lithell et al. 2003). Dabei ist der zugrunde liegende Mechanismus der metabolisch- und kardioprotektiven Wirkung weiterhin Gegenstand der Forschung (Kintscher et al. 2008; Kintscher und Unger 2005). Es verdichten sich zunehmend die Hinweise, dass die AT₁-Blocker neben ihren positiven Auswirkungen auf den Bluthochdruck und die Glukosetoleranz zu einer Abnahme des Körpergewichts führen, was einen vielversprechenden neuen Therapieansatz für das Metabolische Syndrom darstellt (de Kloet et al. 2010; Müller-Fielitz et al. 2011). Kürzlich gewonnene Erkenntnisse unserer Arbeitsgruppe belegen jedoch, dass es sich bei der Gewichtsabnahme nicht um eine generelle Eigenschaft der AT₁-Blocker handelt, da sie weder unter der normalen noch unter der hochnormalen, sondern erst unter der höchsten Dosierung beobachtet werden konnte (Müller-Fielitz et al. 2011). Dabei wird kontrovers diskutiert, ob der AT₁-Blocker-induzierte Gewichtsverlust von einer Reduktion der Nahrungsaufnahme begleitet wird (Miesel et al. 2011; Müller-Fielitz et al. 2012; Müller-Fielitz et al. 2011; Zorad et al. 2006) oder nicht (Benson et al. 2004; He et al. 2010; Schupp et al. 2005; Sugimoto et al. 2006; Zanchi et al. 2007). Die Berichte über eine fehlende Reduktion der Nahrungsaufnahme basieren allerdings überwiegend auf der Messung einer kumulativen Nahrungsaufnahme über die gesamte Behandlungszeit oder der letzten Nahrungsaufnahme vor Studienende. Betrachtet man die Nahrungsaufnahme dagegen im Detail, war die Nahrungsaufnahme in der ersten Woche zunächst reduziert, um das Kontrollniveau bis zum Ende der Studie zu erreichen oder gar zu übersteigen (Miesel et al. 2011; Müller-Fielitz et al. 2012; Müller-Fielitz et al. 2011; Zorad et al. 2006). Die zeitliche Abhängigkeit der AT₁-Blockade bezüglich der Nahrungsaufnahme wirft nun die Frage nach dem zugrunde liegenden Mechanismus auf. Da die antiadipösen Effekte der AT₁-Blocker hauptsächlich nach einer hohen Dosis zu beobachten sind, könnte ein relevanter Abfall des Blutdrucks ursächlich für die Hypophagie sein. Die Arbeitsgruppe Raasch konnte aber in Übereinstimmung mit anderen

Literaturangaben belegen, dass es sich um einen blutdruckunabhängigen Effekt auf das Körpergewicht handelt (Müller-Fielitz et al. 2011; Zorad et al. 2006). In diesem Zusammenhang wurde überdies gezeigt, dass die hypophage und antiadipöse Wirkung der AT₁-Blocker auf einem intakten Leptinsignalweg beruht und dass die orexigenen Peptide MCH und Orexin A supprimiert waren (Müller-Fielitz et al. 2011). In Übereinstimmung hiermit, wurde für das Telmisartan eine supprimierende Wirkung auf die Nahrungsaufnahme von Mäusen via den Melanocortin-Signalweg nachgewiesen (Noma 2011).

Die folgende Abbildung illustriert den potenziellen Einfluss von AT₁-Blockern (z.B. Telmisartan) auf Leptin bzw. Insulin und im weiteren auf die neuronale Regulation von Nahrungspeptiden und infolge dessen der Nahrungsaufnahme:

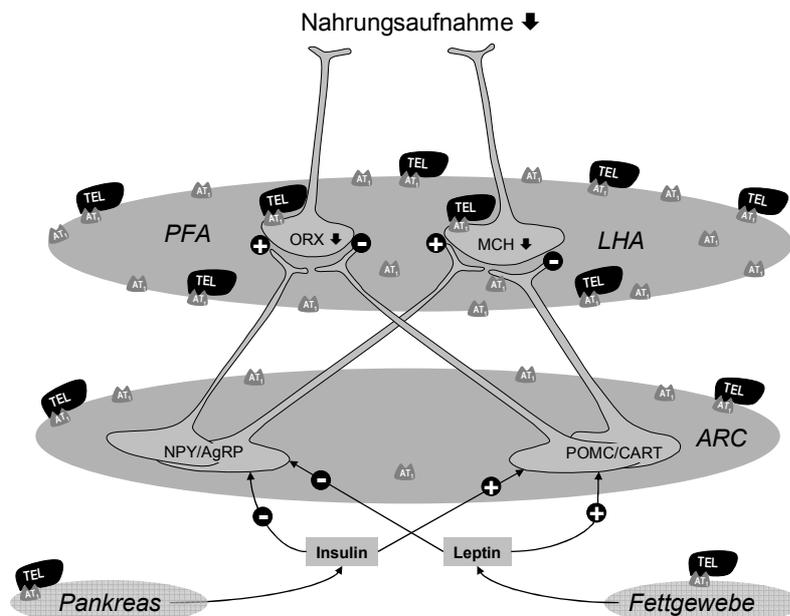


Abb. 1: Regelkreis der Nahrungsaufnahme, bestehend aus Hypothalamus und Peripherie. Insulin und Leptin gelangen über die Blut-Hirn-Schranke und beeinflussen die hypothalamischen Nahrungspeptide. Die orexigenen Peptide ORX, MCH, NPY und AgRP werden durch Leptin und Insulin herunter, die anorexigenen Peptide POMC und CART herauf reguliert. In den Kerngebieten PFA, LHA und ARC werden neben Leptin- auch AT₁-Rezeptoren exprimiert, sodass der AT₁-Blocker Telmisartan in den genannten Gebieten und im Fettgewebe einen Angriffspunkt findet. Diese Abbildung wurde entnommen aus (Müller-Fielitz et al. 2011).

Insbesondere die Beziehungen zwischen den AT₁-Rezeptoren und Leptin sind bisher kaum untersucht. Basierend auf den Daten von Miesel et al. zeigte sich unter

der Behandlung mit Telmisartan eine reduzierte Nahrungsaufnahme und ein erniedrigtes Plasmaleptin im Vergleich zu den Kontrollen (Miesel et al. 2011; Müller-Fielitz et al. 2012), was auf eine höhere Leptinsensitivität hindeutet. Dieser Effekt war nach zwei Wochen am stärksten ausgeprägt, was die folgende Abbildung veranschaulicht:

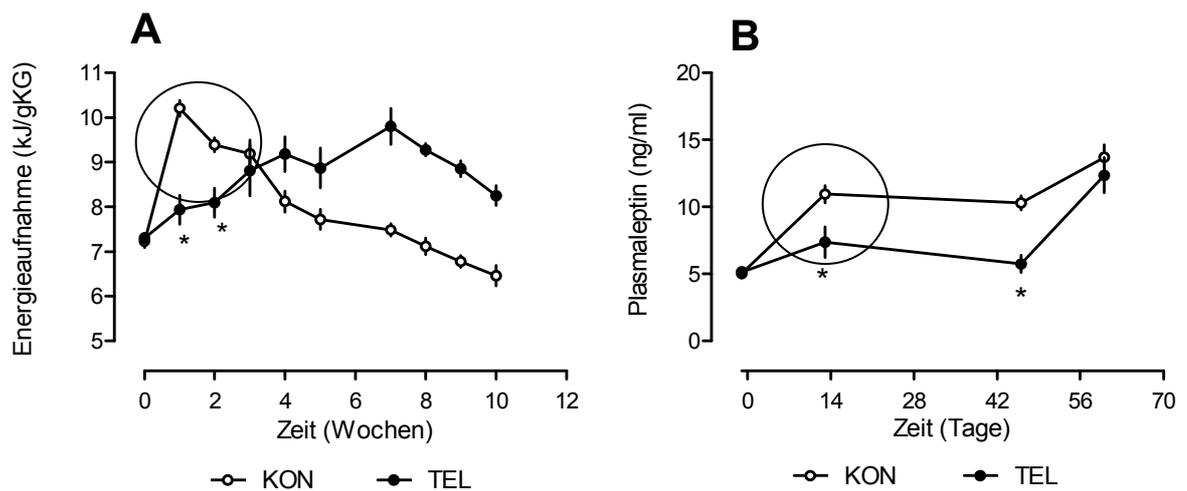


Abb. 2: Körpergewichtsbezogene Energieaufnahme (A) und Plasmaleptin (B) über 12 Wochen. Nach 2 Wochen zeigt sich unter Telmisartan (TEL) eine reduzierte Nahrungsaufnahme und ein niedrigeres Plasmaleptin als bei den Kontrollen (KON), markiert durch die Kreise. *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle. MW \pm SEM, $n=14$. Diese Abbildung wurde entnommen aus (Miesel et al. 2011).

Über die restlichen zehn Behandlungswochen waren die genannten Effekte weniger ausgeprägt, weshalb sich unsere Arbeitsgruppe auf einen Behandlungszeitraum von zwei Wochen konzentrierte. Das Entstehen einer Leptinresistenz bei DIO-Ratten ließ sich nach vierwöchiger Cafeteria-Diät annehmen (Miesel et al. 2010). Daher sollte im Rahmen der vorliegenden Dissertation der Beweis für das Vorliegen einer Leptinresistenz erbracht und die Auswirkungen des Telmisartans auf die Leptinresistenz untersucht werden. Hierzu wurde das Augenmerk auf die Wirksamkeit des Leptins nach subcutaner Applikation, gemessen an der Nahrungsaufnahme, gerichtet. Die Wirksamkeit der AT_1 -Blockade auf die Leptinsensitivität wurde unter Verwendung einer Hochdosis verifiziert, da nur für die höchste Dosierung eine Gewichtsabnahme nachgewiesen werden konnte (Müller-Fielitz et al. 2011). Um einen blutdruckabhängigen Effekt auf das Körpergewicht auszuschließen, verwendeten wir die normotensiven SD-Ratten anstatt der SHR wie in

vorhergehenden Studien (Miesel et al. 2011; Müller-Fielitz 2011; Müller-Fielitz et al. 2012).

Zusammenfassend ist bereits bekannt, dass SD-Ratten unter CD eine Diät induzierte Adipositas entwickeln. Im Rahmen der Adipositas kommt es vermutlich zu einer Leptinresistenz. Unter Behandlung mit RAAS-Inhibitoren (AT₁-Blockern) sind die Gewichtszunahme und der Anstieg der Plasmaleptinspiegel reduziert.

Daraus folgend war die Zielsetzung der vorliegenden Dissertationsschrift, den Einfluss der AT₁-Blockade auf die Leptinsensitivität nach zweiwöchiger Behandlung zu untersuchen. Hierzu sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Führt die Fütterung mit Cafeteria-Diät bereits nach zwei Wochen zu einer Leptinresistenz?
- Kann die Applikation des AT₁-Blockers Telmisartan die Leptinsensitivität beeinflussen?
- Werden Nahrungsaufnahme, Energieverbrauch und Körpergewicht durch das Telmisartan beeinflusst?
- Sind die genannten Aspekte unter AT₁-Blockade mit der Regulation (an-)orexigener Peptide im Hypothalamus assoziiert?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsprotokolle

2.1.1 Versuchstiere

Die Tierversuche wurden den Richtlinien der NIH folgend, mit Genehmigung des Ministeriums für Natur und Umwelt des Landes Schleswig-Holstein (Tab. 2-1) durchgeführt.

Tabelle 2-1: Antragsnummern der Tierversuche und Datum der Genehmigung

Tierversuchsantrag	Genehmigungsdatum
9/1m/04	10.05.2004
9/1x/09	11.09.2009

Die Ratten vom Stamm SHR/NCrl und vom Stamm SD Crl:CD wurden durch die Firma Charles River, Sulzfeld geliefert. Alle Versuchstiere (SHR und SD) kamen ca. zwei Wochen vor Studienbeginn im Labor an, um sich zu akklimatisieren. Die Ratten wurden bei einer Raumtemperatur von 20°C und einer Luftfeuchtigkeit von ca. 50% in eingestreuten Makrolon® Käfigen (Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeissenberg, Deutschland) gehalten. Je nach Studiendesign saßen die Tiere alleine (Käfig-Größe 3) oder zu dritt (Käfig-Größe 4) in einem gesonderten, ruhigen Raum. Der Raum unterlag einem 12 Stunden Tag-Nacht-Zyklus (Dunkelheit zwischen 2 und 14 Uhr). Als Standarddiät erhielten alle Tiere das Haltungsfutter der Firma Altromin®, Lage („Haltungsdiet 1324“; Inhaltsstoffe der Pellets: 19% Rohprotein, 4% Rohfett, 6% Rohfaser, 7% Rohasche und 53% NfE Stickstoff freie Extraktstoffe; umsetzbare Energie 11,7 kJ/g). Je die Hälfte der Tiere hatte die Auswahl zwischen der Standarddiät und der hochkalorischen Cafeteria-Diät, welche sich aus zehn verschiedenen keks- und schokoladenhaltigen Süßwaren zusam-

mensetzt ($60,1 \pm 3\%$ Kohlenhydrate, $24,9 \pm 2,2\%$ Fett, $65 \pm 0,7\%$ Protein, $2,1 \pm 0,4\%$ Ballaststoffe, Energiegehalt: $20,3 \pm 0,5$ kJ/g). Die Tiere erhielten täglich wechselnd eine Sorte an Keksen oder Schokoladenriegeln. Die Kontrollgruppe erhielt jeweils nur die Standarddiät (Miesel et al. 2010).

Futter und Leitungswasser stand den Tieren ad libitum zur Verfügung.

2.1.2 Untersuchung der Leptinsensitivität unter Telmisartan

Im genannten Studienteil sollte die Frage beantwortet werden, ob die Behandlung mit dem AT_1 -Blocker Telmisartan die Leptinsensitivität unter Cafeteria-Diät (CD) verbessert.

Protokoll 1: Etablierung des Leptinresistenztests

Vor Beantwortung der eigentlichen Fragestellung musste ein Leptinresistenztest (LRT) etabliert werden. Mit dessen Hilfe sollte die physiologische und pathologische Reaktion auf eine externe Leptinzufuhr gezeigt werden.

Hierzu wurden fünf Wochen alte SD-Ratten ($n = 10$) über eine Woche an die Versuchsumgebung habituiert und mit Standard-Diät gefüttert. Im Crossover-Versuch wurde über zwei Tage ein Leptinresistenztest durchgeführt (siehe 2.5.3). Dabei wurde den Tieren über einen Zeitraum von 34 Stunden wiederholt Leptin (Lep) und zur Kontrolle NaCl subcutan (s.c.) appliziert. Am ersten Tag wurde im Abstand von je drei Stunden vier mal Leptin der Dosierung $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ bzw. NaCl und einmalig am Abend $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ Leptin verabreicht. Am zweiten Tag erfolgten zwei Gaben à $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ und eine dritte à $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ Leptin bzw. NaCl (siehe Tag 1 und 2 in Abb. 5). Durch Schwanzpunktion wurde Blut zur Kontrolle der Plasma-leptinkonzentration entnommen (siehe 2.4.2). Futteraufnahme und Körpergewicht wurden parallel untersucht.

Protokoll 2: Untersuchung der Leptinsensitivität unter Telmisartan

Zur Beantwortung der eingangs gestellten Frage, ob Telmisartan die Leptinsensitivität unter gleichzeitiger Fütterung mit CD verbessert, wurden fünf Wochen alte SD-Ratten ($n = 40$) über 17 Tage mit Telmisartan (TEL) (Firma Boehringer, Ingel-

heim, 8 mg/kg/d) bzw. Wasser (H₂O) als Kontrolle behandelt. Alle Ratten konnten zwischen der Cafeteria-Diät und der Standarddiät auswählen. Nach einer zehntägigen Eingewöhnungsphase wurden die Ratten jeweils in vier Gruppen randomisiert (n = 10):

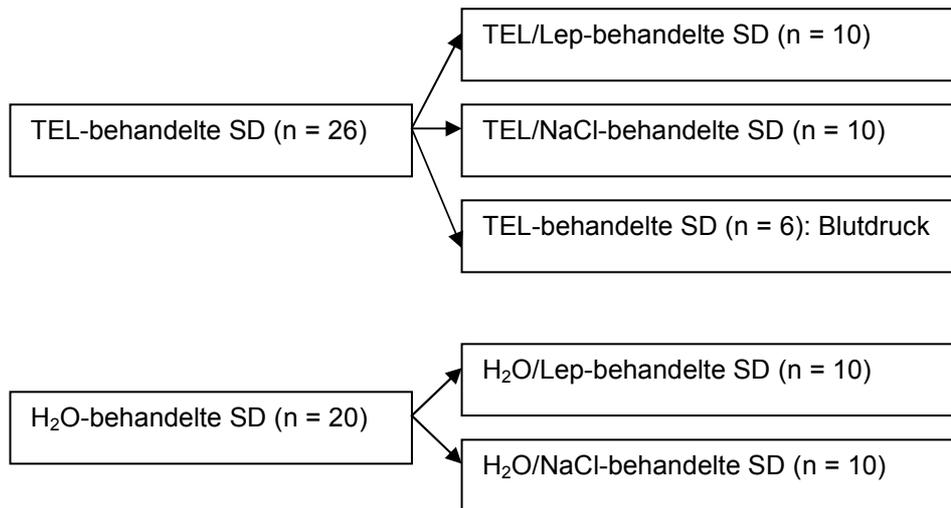


Abb. 3: Behandlungsregime zur Ermittlung der Leptinsensitivität unter Telmisartan (TEL) bzw. Kontrolle (H₂O) bei gleichzeitiger Fütterung mit Cafeteria-Diät. Im abschließenden Leptinresistenztest erhielten die Sprague-Dawley-Ratten (SD) entweder Leptin (Lep) oder physiologische Kochsalzlösung (NaCl) subcutan injiziert.

Aufgrund des aufwendigen Leptinresistenztests am Ende der Studie wurden die Tiere um eine Woche versetzt geliefert, sodass nur jeweils 20 Tiere in die vier Gruppen randomisiert wurden (n = 5) und das Versuchsprotokoll analog um eine Woche versetzt durchgeführt werden konnte (Abb. 4).



Abb. 4: Zeitlicher Ablauf des Behandlungsregimes zur Ermittlung der Leptinsensitivität unter Telmisartan bzw. Kontrolle unter gleichzeitiger Fütterung mit Cafeteria-Diät (CD) und Standarddiät (chow) bis zur Durchführung des Leptinresistenztests. Die Sprague-Dawley-Ratten (SD) wurden täglich gewogen und ihre Futteraufnahme bestimmt (Tag 1 bis 14). An den Tagen 0, 5 und 12 des Behandlungsprotokolls wurde eine Blutentnahme zur Bestimmung der Plasmaleptinkonzentration durchgeführt. An den Tagen 15 bis 17 fand ein Leptinresistenztest statt (siehe Abb. 5).

Sechs weitere Ratten wurden parallel mit Telmisartan behandelt. Bei ihnen wurde der Blutdruck vor und nach dreiwöchiger Behandlung gemessen. Die übrigen Versuchstiere sollten nicht dem möglichen Stress durch die Blutdruckmessung ausgesetzt werden. Die Art der Schokoladenriegel wechselte täglich. Die Futter- und Wasseraufnahme sowie das Körpergewicht wurden täglich dokumentiert. Telmisartan bzw. Wasser wurde täglich oral über eine Schlundsonde verabreicht. Telmisartan wurde entsprechend Absatz 2.2.3 gelöst und auf die Konzentration von 8 mg/ml gebracht. Den Ratten wurde ein ihrem Körpergewicht entsprechendes Volumen der Lösung in μl verabreicht. Die Kontrollen erhielten ein analoges Volumen an Wasser. Über eine Schwanzpunktion wurde Blut zur Bestimmung des Plasmaleptins vor Beginn sowie nach fünf und 12 Tagen abgenommen. Von Tag 15 bis einschließlich 17 fand der Leptinresistenztest statt (Abb. 5, siehe 2.5.3). Am Nachmittag des 17. Tages wurden die Ratten per Dekapitation getötet (siehe 2.4.3). Es wurden das Gehirn, Plasma und braunes Fettgewebe entnommen und bis zur weiteren Untersuchung bei -80°C gelagert.

Protokoll 3: Analyse der hypothalamischen Nahrungspeptide

Zur Analyse der hypothalamischen Nahrungspeptide wurden weitere SD-Ratten ($n = 20$) über 19 Tage mit Telmisartan der Dosierung 8 mg/kg/d bzw. Wasser behandelt. Im abschließenden LRT wurde allen Tieren dem Protokoll gemäß Leptin injiziert. Die Hypothalami wurden entnommen und hinsichtlich der Nahrungspeptid-expression untersucht (siehe 2.6.2 bis 2.6.6). Die Blutentnahmen sowie die

Messung von Futteraufnahme und Körpergewicht entfielen in diesem Versuchsansatz.

2.1.3 Untersuchung der Glukosetoleranz unter Langzeit-Fütterung mit Cafeteria-Diät

Protokoll 4:

Durch die im Protokoll 4 dargestellten Experimente sollte die Frage beantwortet werden, ob eine Langzeit-Fütterung mit der Cafeteria-Diät (CD) zur Induktion eines manifesten Diabetes beiträgt und ob sich die Diät auf das Überleben der Tiere auswirkt. Hierzu wurden acht Wochen alte männliche SHR (n = 18) bis zu ihrem natürlichen Tod beobachtet.

Die Ratten kamen ca. zehn Tage vor Studienbeginn im Labor an, um sich einzugewöhnen. Vor Versuchsbeginn wurden die SHR nach Blutdruck und Körpergewicht in zwei Gruppen randomisiert. Eine Hälfte der Tiere (n = 9) hatte die Cafeteria- und die Standarddiät zur Auswahl, die Kontrollgruppe erhielt nur Standarddiät. Die Ratten wurden zu dritt in Käfigen der Größe 4 gehalten. Die Art der Schokoladenriegel wechselte täglich, die Futter- und Wasseraufnahme sowie die Körpergewichtsentwicklung wurden wöchentlich dokumentiert. Im Abstand von drei Monaten wurde der Blutdruck pletysmographisch gemessen (siehe 2.5.1). Ebenso wurde venöses Blut über einen Schnitt im Schwanz entnommen (siehe 2.4.2) und zur Untersuchung der basalen Blutparameter Blutzucker, Leptin, Insulin, C-Peptid, Corticosteron, Adiponectin und Glukagon herangezogen. Die Insulinsensitivität wurde mit regelmäßig durchgeführten Oralen Glukose Toleranz Tests (OGTT) und Insulin Toleranz Tests (ITT) (siehe 2.5.4 und 2.5.5) überprüft. Für die Funktionstests wurden die Tiere für 18 Stunden nüchtern gesetzt. Für die Dauer des Versuchs wurden sie in Einzelkäfige verbracht. Eine Messung der körperlichen Aktivität erfolgte über je eine Woche nach fünf-, acht- und zehnmonatiger Diät mittels dem InfraMot-System (siehe 2.5.2). Die Ratten wurden bis zu ihrem natürlichen Tod beobachtet. Abschließend wurde eine Überlebensstatistik mit der Frage nach früherer Mortalität der Tiere unter CD angefertigt.

2.2 Herstellung von Lösungen

2.2.1 Insulinlösung

Humanes Insulin (Insuman[®] Rapid) der Dosierung 40 I.E./ml wurde mit 0,9%igem NaCl 1:80 verdünnt, sodass 0,5 I.E./ml als 0,5 I.E./kg KG intraperitoneal injiziert werden konnten.

2.2.2 Leptinlösung

Leptin (R&D Systems, rekombinantes Rattenleptin, Reinheit >97%) wurde in 20 mM TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)-Puffer, pH 8 gelöst und zu einer Konzentration von 100 bzw. 200 µg/ml verdünnt.

Hierzu wurde zunächst der Tris-Puffer angesetzt. Die entsprechende Menge Tris wurde abgewogen und in Aqua dest. gelöst, mit 5 N NaOH auf den gewünschten pH-Wert gepuffert und auf das benötigte Volumen mit Aqua dest. aufgefüllt. Die fertige Lösung wurde steril filtriert.

2.2.3 Telmisartan-Lösung

Die Telmisartan-Lösung (Firma Boehringer, Ingelheim) wurde in der Konzentration 8 mg/ml angesetzt. Die Angaben gelten für 10 ml Stammlösung.

Das Telmisartan-Pulver wurde in der entsprechenden Menge ausgewogen und in 2 ml 0,1 N NaOH Lösung vollständig gelöst. 6 ml Aqua dest. wurden hinzu pipettiert und mit 0,1 N HCl in einen pH-Bereich zwischen 8,8 und 9,2 titriert. Abschließend wurde mit Aqua dest. auf 10 ml aufgefüllt.

2.3 Applikation von Medikamenten bzw. Substanzen

2.3.1 Intraperitoneale Applikation

Über eine intraperitoneale Injektion wurde (Kanüle 0,4 x 13 mm, BD Microlance[®]) das Insulin in der Dosierung 0,5 I.E./kg appliziert.

2.3.2 Orale Applikation

Die orale Applikation von Flüssigkeiten erfolgte über eine Schlundsonde, die nach Habituation der Tiere in den Ösophagus eingeführt wurde. 50%ige Glukose und Telmisartan in der Dosierung 8 mg/kg wurden oral verabreicht.

2.3.3 Subcutane Applikation

Das Leptin wurde in der Dosierung 100 und 200 µg/kg ins subcutane Fettgewebe medial der Skapula in eine dafür aufgestellte Hautfalte injiziert (Kanüle 0,4 x 13 mm, BD Microlance[®]).

2.4 Materialgewinnung

2.4.1 Gerinnungshemmer und Stabilisatoren

Aus Plasma in K-EDTA beschichteten Microvetten (Sarstedt) wurden die Parameter Leptin, Insulin, C-Peptid, Glukagon, Adiponectin und Corticosteron bestimmt. Das Schlachtblut wurde mit Na-EDTA Lösung der Endkonzentration 12,1 mM zur Untersuchung von Leptin im Plasma versetzt.

Zur Angiotensin-II-Stabilisierung im Schlachtblut wurden 40 µl des kompetitiven Aminopeptidase-Inhibitors Bestatin (Endkonzentration der Bestatin-Lösung: 20 µM), mit 100 µl EDTA (Endkonzentration des EDTA: 12,1 mM) vermischt und zum Schlachtblut gegeben.

2.4.2 Blutabnahme aus dem Schwanz

Die Blutentnahme aus dem Schwanz ist eine etablierte Methode, dem Tier schonend kleinere Mengen Blut zu entnehmen (Fluttert et al. 2000). Zudem ist der Zeitbedarf gering, was eine zeitgerechte Blutgewinnung in den Funktionstests ermöglicht.

Die Ratte wurde von einer zweiten Person mit einem Handtuch abgedeckt und festgehalten. Mit einer handelsüblichen Rasierklinge wurde ca. 1 cm proximal des Schwanzendes ein quer verlaufender Schnitt gesetzt. Unter Ausstreichen des Schwanzes wurde bis zu 300 µl Blut in eine bereit gehaltene Microvette (Sarstedt) gesogen. Alle Proben wurden auf Eis gelegt und nach Versuchsende zentrifugiert (4°C; 14.000 U/min; 5 min), das Plasma abpipettiert und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

2.4.3 Tötung und Organentnahme

Das Töten der Tiere erfolgte per Dekapitation durch die Guillotine. Das Blut wurde aufgefangen, zur Gewinnung von 4 bzw. 2 ml Plasma mit EDTA bzw. mit Bestatin/EDTA versetzt und bei -80°C eingefroren.

Zur Entnahme des Gehirns wurde zunächst das Nackenfell entfernt. Der Schädel wurde mit Hilfe einer Schere den Suturen folgend eröffnet und das Gehirn unter Abtrennung der Medulla oblongata und der Hirnnerven entnommen. Das Gehirn wurde im Ganzen erst in 2-Methylbutan auf Trockeneis und nachfolgend bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

Zur Gewinnung des braunen Fettgewebes wurde die Nackenhaut eröffnet. Das Fettgewebe wurde, nachdem es in flüssigem Stickstoff schockgefroren worden war, bis zu den Analysen bei -80°C eingefroren.

2.5 Funktionstests

2.5.1 Pletysmographische Blutdruckmessung

Als eine schonende, nicht-invasive Methode zur Blutdruckmessung am wachen Tier kam die Schwanz-Pletysmographie zur Anwendung (Raasch et al. 2002). Es wurde ein 2-Kanal Blutdruck-Monitor 8002 (Blood-pressure Monitor 8002 Dual Channel, TSE Bad Homburg) mit Piezoelement (Größe 7-10) benutzt. An den Verstärker war ein Zweiphasenschreiber zur Registrierung der Drucksignale angeschlossen. Sowohl die Puls- als auch die Drucksignale wurden mit Hilfe eines EKG-Schreibers aufgezeichnet und der Blutdruck graphisch ermittelt. Dazu wurde aus dem Punkt, an dem kein Pulssignal mehr messbar war, ein Lot auf die Grundlinie gefällt. Hierbei entsprach 1 cm einem Druck von 63,33 mmHg. Eine externe Kalibrierung erfolgte unter Anwendung des Gauche Manometers (Bereich 0-300 mmHg). Die Herzfrequenz ergab sich aus der Auszählung der Ausschlagrate über 5 s. Jede Messung wurde zur höheren Messgenauigkeit fünfmal in Folge wiederholt. Zur Beruhigung wurden die Ratten in einer Metallröhre immobilisiert, wobei sie ein 80/20 Vol% Gemisch aus 2 l/min Lachgas (N_2O) und 0,5 l/min Sauerstoff (O_2) ventilierten. Eine Blutdruckmanschette und das Piezoelement wurden von kaudal auf den Schwanz geschoben. Eine Rotlichtlampe (100 W) sowie eine beheizbare Platte förderten die Schwanzperfusion. Nachdem sich eine gleichmäßige Herzfrequenz eingestellt hatte, wurde die Manschette auf bis zu 320 mmHg aufgepumpt.

2.5.2 Aktivitätsmessung

Die physische Aktivität der SHR wurde mittels des InfraMot Systems (TSE, Bad Homburg, Deutschland) überwacht. Das System beruht auf der Registrierung der Körperwärme per passiver Infrarot-Sensoren, die auf dem Käfig platziert wurden. Der Käfig wurde durch den Sensor in 10 Segmente eingeteilt. Das Wärmebild veränderte sich bei Bewegung der Ratte von einem Segment in ein anderes. Jede Überschreitung der Infrarot-Linien wurde als ein Count gezählt. Die Counts wurden mit Hilfe des dazugehörigen Computerprogramms InfraMot gespeichert.

2.5.3 Leptinresistenztest

Vor Etablierung des Leptinresistenztests führten wir eine Reihe von Versuchen durch. Eine singuläre Leptinapplikation zeigte, im Widerspruch zur Literatur, auch nach Variation von Dosierung und Applikationsweise keine Auswirkungen auf die Nahrungsaufnahme (Dryden et al. 1999; Lin et al. 2001; McAlister und Van Vugt 2004; Proulx et al. 2002; Wang et al. 1999; Wetzler et al. 2004). Dabei blieb der erwartete Effekt unabhängig von der Applikationsweise (intraperitoneal (i.p.), intravenös (i.v.) und subcutan (s.c.)) aus (Ruffin et al. 2004). Nach repetitiver subcutaner Gabe zeigte sich eine Reduktion der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichts (Campfield et al. 1995; Halaas et al. 1997; Halaas et al. 1995; Stephens et al. 1995). Den Spritzabstand von drei Stunden wählten wir unter Berücksichtigung der Pharmakokinetik nach subcutaner Injektion. Vor und nach Leptingabe (100 µg/kg) wurde stündlich über sieben Stunden Blut entnommen.

Das Leptin (zur Lösung siehe 2.2.2) bzw. das 0,9%ige NaCl wurde subcutan (zur Applikationsweise siehe 2.3.3) nach folgendem Versuchsprotokoll appliziert (siehe Abb. 5):

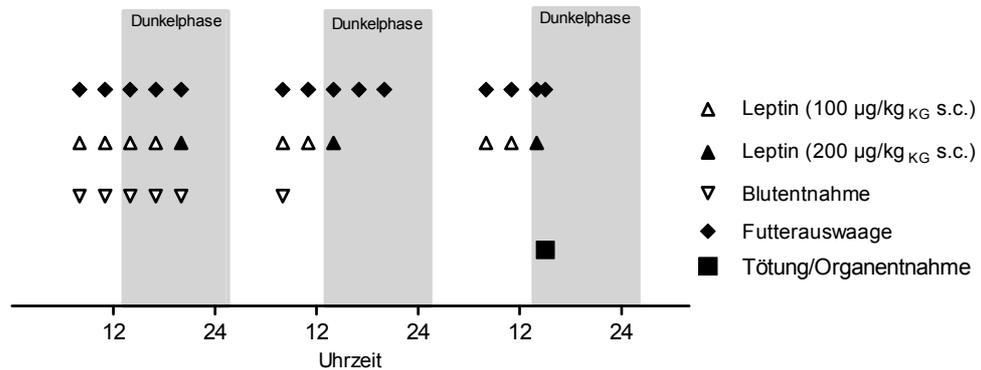


Abb. 5: Untersuchung der Leptinsensitivität im Leptinresistenztest nach 14-tägiger Behandlung mit Telmisartan (Ablauf im Protokoll 2). Im Abstand von 3 Stunden wurde ab 8 Uhr morgens Leptin der Dosierung 100 µg/kg bzw. NaCl subcutan (s.c.) injiziert. Die jeweils letzte Gabe am Tag erfolgte in der Dosierung 200 µg/kg. Parallel wurde die Futteraufnahme gemessen und Blut zur Bestimmung der Plasmaleptinkonzentration abgenommen. Das Körpergewicht wurde jeweils am Morgen gewogen. Nach der letzten Leptinapplikation wurden die Tiere getötet.

1. Tag:

Am ersten Tag wurden ab 8 Uhr alle drei Stunden Leptin bzw. NaCl s.c. injiziert sowie jeweils eine Microvette Blut zur Bestimmung des Plasmaleptins entnommen (siehe 2.4.2 und 2.6.1). Die ersten vier Male wurde die Dosierung 100 µg/kg gewählt. Die letzte Dosis des Tages (um 20 Uhr und um 14 Uhr am zweiten und dritten Tag) betrug 200 µg/kg Leptin.

Parallel wurde die Futteraufnahme an Standard-Diät und Cafeteria-Diät gemessen.

2. Tag:

Um 8 Uhr am zweiten Tag fand die letzte Blutentnahme statt. Um 8 und um 11 Uhr wurden 100 µg/kg s.c. appliziert, um 14 Uhr 200 µg/kg. Das Wiegen des Futters wurde im Dreistudentakt bis 12 Stunden fortgeführt.

3.Tag:

Es fanden drei Leptingaben wie am zweiten Tag statt und das Futter wurde bis zur Tötung um 15 Uhr gewogen (siehe 2.4.3).

2.5.4 Oraler Glukose Toleranz Test (OGTT)

Der orale Glukose Toleranz Test wurde wie in unserer Arbeitsgruppe etabliert durchgeführt (Miesel et al. 2011; Miesel et al. 2010; Müller-Fielitz 2011; Müller et al. 2007; Raasch et al. 2006). 18 Stunden vor Glukoseapplikation wurden die Tiere nüchtern gesetzt. Wasser stand ihnen während der Nüchternphase ad libitum zur Verfügung und wurde nur über die Dauer des Versuchs entzogen. Am Morgen des Tests wurden die Tiere gewogen. Es fand eine basale Blutabnahme sowie eine basale Blutzuckerbestimmung statt. Der Blutzucker wurde in venösem Vollblut gemessen (Glucometer[®] Elite, Bayer HealthCare; Teststreifen: Ascensia[®] Elite XL, Bayer, Leverkusen, Deutschland). Zu Beginn des Versuchs wurde den Ratten 1 g/kg Körpergewicht Glukoselösung (Delta Select) oral per Schlundsonde verabreicht. Nach 12, 24, 36, 48, 60, 90, 120, 180 und 240 Minuten wurde der Blutzucker kontrolliert und jeweils eine Microvette Blut zur Bestimmung der Insulinkonzentration abgenommen.

2.5.5 Insulin Toleranz Test (ITT)

Vor Insulingabe wurden die Tiere für 18 Stunden nüchtern gesetzt, wobei Wasser ad libitum zur Verfügung stand. Für die Dauer des Versuchs blieben die Ratten einzeln in Plexiglaskäfigen, nüchtern und ohne Wasser.

Nach einer basalen Blutabnahme (Fluttart et al. 2000) sowie einer basalen Blutzuckerbestimmung wurde den Ratten 0,5 I.E./kg Körpergewicht humanes Insulin (Insuman[®] Rapid) intraperitoneal (i.p.) injiziert (zur Applikationsweise siehe 2.3.1). Im Abstand von 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 60, 90, 120, 180 und 240 Minuten wurde der Blutzucker gemessen. Nach 15 und 60 Minuten wurde Blut zur Insulinbestimmung entnommen.

2.6 Biochemische Analysen

2.6.1 Radioimmunoassay (RIA)

Das Funktionsprinzip des Radioimmunoassays (RIA) beruht auf einer immunologischen Methode, die es erlaubt, kleinste Substanzmengen im Plasma zu quantifizieren. Hierzu wird eine fest vorgegebene Konzentration eines spezifischen Antikörpers zu dem zu bestimmenden Plasma gegeben. Im nächsten Schritt wird die Lösung mit einem radioaktiv markierten Antigen (Tracer) inkubiert. Es wird Tracer im Überschuss hinzugegeben. Die beiden in der Lösung vorhandenen Antigene (gesuchte Substanz und markiertes Antigen) konkurrieren um die Bindungsstellen am Antikörper. Dementsprechend sinkt bei steigender Plasmakonzentration des gesuchten Moleküls proportional die Zahl der gebundenen Tracer. Ein spezifischer Antikörper, der sich an die Antigen-Antikörper-Komplexe bindet, wird hinzugefügt. Die Anzahl der radioaktiven Antigen-Antikörper-Komplexe lässt sich messtechnisch erfassen und entsprechend die Menge der gesuchten Substanz errechnen. Zur Durchführung der RIAs wurden handelsübliche RIA-Kits verwendet. Es wurde mit halbiertem Konzentration gearbeitet, wobei die angewendeten Verdünnungen zuvor auf ihre Validität überprüft wurden. Entsprechend der beiliegenden Gebrauchsanweisung wurden die Proben mit Assay Buffer verdünnt. Es wurde der entsprechende Antikörper hinzupipettiert und nach einer festgelegten Inkubationszeit das dazugehörige ^{125}I -markierte Antigen. Nach erneuter Inkubation wurde ein Präzipitations-Agens ergänzt, inkubiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Membranpumpe (Eppendorff, 4151) abgesaugt und das Pellet zur Messung der Radioaktivität in den Gammacounter (1282 Compugamma CS von LKB, Wallac) gebracht. Anhand der gemessenen Strahlung konnte die enthaltene Konzentration des gesuchten Antigens ermittelt werden.

Mittels RIA wurden die Peptidhormone Leptin, Adiponectin, Glucagon, Angiotensin II, Insulin und seine Vorstufe, das C-Peptid, quantitativ nachgewiesen (Firma Linco, St. Charles, Missouri, USA, Euro-Diagnostica, MP Biomedicals).

2.6.2 Präparation der Hypothalami

Das Heraustrennen der Hypothalami erfolgte nach der Methode von Palkovits und Brownstein und unter Verwendung einer stereotaktischen Datenbank für Rattengehirne (Paxinos G, Watson C: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego, Academic Press, 1998.)

Der erste Schnitt wurde 1 cm rostral durch das Chiasma opticum gesetzt. Im zweiten Schnitt wurden die Corpora mamillaria abgeschnitten. Das dabei entstandene etwa 5 mm dicke Scheibchen wurde auf die Dorsalseite gelegt und die ventral liegenden Anteile, einschließlich der Commissura anterior, entfernt. Abschließend wurden die umliegenden Bereiche der Amygdala abgetrennt. Die präparierten Hypothalami wurden bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

2.6.3 Extraktion der mRNA

Ein Lysispuffer (Nucleid Acid Purification Lysis Solution, Applied Biosystems UK) wurde 1:2 mit PBS (= phosphate-buffered saline) -Puffer, pH 7,4 verdünnt und zum Hypothalamus gegeben. Pro Hypothalamus wurde 1 ml Lösung angesetzt.

Das Homogenisieren erfolgte mit Hilfe eines Dispergiergerätes (Ultra Tourax 78, IKA-Werke). Nach jeder Probe wurde das Gerät mit DEPC (Diethylpytocolon)-Wasser gespült. 500 µl des Homogenisats wurden umgefüllt und mit 5 µl Proteinase k (Apilt Biosystem) verdaut. Anschließend wurde die Lösung zentrifugiert (14.000 U/min, 1 min). 450 µl des Überstandes wurden zur mRNA-Extraktion verwendet. Die Reste wurden jeweils bei -80°C eingefroren.

Die RNA-Extraktion wurde an der ABI PRISM 6100 Nucleid Acid PrepStation (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) nach dem beiliegenden Protokoll durchgeführt. Die benötigten Wells der Versuchsplatte wurden mit 50 µl Waschlösung 1 (RNA Purification Wash Solution-1) benetzt. Vom Lysat wurden 450 µl in die Wells pipettiert. Mittels Vakuum wurde das Lysat durch den Membranfilter gesogen und mit Waschlösung 1 gewaschen. Anschließend wurde das Lysat drei Mal mit Waschlösung 2 gewaschen (RNA Purification Wash Solution-2). Eluiert

wurde die RNA durch Zugabe von Elutionspuffer (Nucleic Acid Purification Elution Solution). Das Eluat wurde bei -80°C eingefroren.

2.6.4 mRNA-Quantifizierung

Mit einem handelsüblichen Quant-iT™-RiboGreen®-RNA-Assay-Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wurde die mRNA quantifiziert. Die Messung wurde nach dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt.

Ein hochspezifischer fluoreszierender Farbstoff (RiboGreen®) lagert sich an die Nucleinsäuren der RNA. Die RNA-Konzentration lässt sich mit Hilfe einer Eichkurve aus fünf Punkten (1 ng/ml bis 50 ng/ml) ermitteln. Die Messwerte sollten auf einer Standardkurve liegen. Die Proben wurden entsprechend verdünnt. Nach Bindung an Nucleinsäuren weist RiboGreen® ein Absorptionsmaximum von 500 nm und ein Emissionsmaximum von 525 nm auf. Die RNA wurde mit einem „Fluometric-imaging-plate-reader“ (FLUOstarOPTIMA) bei einer Anregungs-Wellenlänge von 480 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm gemessen. Die Messwerte wurden mittels Subtraktion des Blankwertes und die Konzentration der mRNA mit dem Verdünnungsfaktor korrigiert (Bustin 2002).

2.6.5 cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese wurde ein kommerziell erhältliches Kit (Cloned AMV First-Strand Kit, Invitrogen) verwendet. Die Durchführung entspricht dem beiliegenden Versuchsprotokoll. Die mRNA wurde durch die AMV (**A**vian **M**yeloblastosis **V**irus)-Reverse-Transkriptase) in cDNA umgeschrieben. Den Startpunkt der Reversen Transkriptase (RT) bildete ein Oligo(dT) Primer (20 bp). Dem Protokoll entsprechend wurden 9 µl der extrahierten mRNA mit jeweils 2 µl dNTP (2,5 mM dNTP mix) und 1 µl Oligo(dT) Primer (10 mM) in einem Cycler (Biometra® TGradient, Whatman) für 5 Minuten auf 65°C erhitzt. Hierbei fand die Anlagerung des Primers an die RNA statt. Nach dem Abkühlen auf 2°C wurden 8 µl des Reverse Transkriptase-Pools (RT-Pool; Zusammensetzung: 4 µl 5 x DNA-Synthesepuffer, 5 mM

DTT (Dithiothreitol), 40 units/ μ l RNaseOUT, 15 units/ μ l Cloned AMV RT und DEPC Wasser) dazugegeben, kurz zentrifugiert (10 sec., 1000 g) und für 60 Minuten auf 50°C aufgeheizt. In dieser Phase initiierte die RT die Transkription der RNA in die cDNA, sodass ein Hybrid aus RNA und cDNA entstand. Durch weiteres Erhitzen auf 85°C für 5 Minuten löste sich unter Einwirkung der RNase die cDNA von der RNA ab. Dabei wurde die DNA-Polymerase inaktiviert. 20 μ l der cDNA wurden 1:2 mit nucleasefreiem Wasser verdünnt und bis zum Beginn der PCR bei -20°C eingefroren.

2.6.6 Quantitative Real-Time-PCR

Funktionsprinzip

Mit der Methode der „Real-time-PCR“ ist eine direkte Quantifizierung der cDNA und damit indirekt der mRNA möglich. Das Verfahren beruht auf der 1984 von Kary Mullis etablierten Polymerase-Kettenreaktion zur Vervielfältigung ausgewählter DNA-Sequenzen (Deepak et al. 2007; Kubista et al. 2006). Voraussetzung für die Durchführung einer PCR ist die Kenntnis über die der Zielsequenz benachbarten Sequenzen. Im ersten Schritt wird die DNA im Reaktionsgemisch auf 95°C erhitzt. Hierunter werden die Doppel- in zwei Einzelstränge gespalten. Im zweiten Schritt kühlen die entstandenen Templates auf 54°C ab, sodass ein sense und ein antisense Primer je vom 3'-Ende Hybride mit den DNA-Strängen bilden können. Bei einer optimalen Temperatur von 72°C verlängert die hitzestabile Taq-Polymerase beide Primer komplementär in Richtung der Zielsequenz. Hierzu müssen die vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) im Versuchsansatz enthalten sein. Bei der PCR werden zahlreiche Amplifikationszyklen durchlaufen, wodurch sich die DNA exponentiell vervielfältigt.

Mit dem Verfahren der „Real-Time-PCR“, das Higuchi et al. 1993 einführte, ist eine Quantifizierung der dsDNA nach jedem Amplifikationszyklus möglich. Dies wird durch die Verwendung von fluoreszierendem Farbstoff (SYBR[®] GREEN I), welcher sich an die neu entstehende doppelsträngige DNA anlagert, verwirklicht (Higuchi et al. 1993). Die Fluoreszenz wird mittels einer CCD-Kamera unter UV-Licht auf einem Foto erfasst. Die gemessene Emission dient der Quantifizierung

über die Schwellenwert-Methode. Dabei wird gemessen, nach wie vielen Zyklen eine bestimmte Fluoreszenz überschritten wird (CT-Wert). Die Ausgangskonzentration an cDNA kann aus einer mitgeführten Standardreihe errechnet werden. Der Standard ist ein Produkt der verwendeten Primer mit bekannter Kopienzahl. Die dsDNA nimmt exponentiell zu, sodass die gemessenen CT-Werte gegen den Logarithmus der cDNA-Konzentration aufgetragen werden müssen. Aus der entstehenden Geraden kann die Ausgangskonzentration der eingebrachten cDNA ermittelt werden.

Durchführung

Zur Durchführung der PCR wurde das Kit „Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR Super Mix-UDG mit ROX“ (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet (Müller et al. 2007).

Dem beiliegenden Protokoll gehören folgende Materialien an:

1. Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG mit ROX: 12,5 µl

- Platinum[®] Taq DNA-Polymerase
- UDG (= Uracil DNA Glykosylase; entfernt Uracil-Residuen aus DNA) und dUTP (sorgt dafür, dass jede amplifizierte DNA Uracil enthält)
- SYBR[®] Green I: fluoreszierender Farbstoff
- ROX: Farbstoff bestehend aus Glycin-Konjugat von 5-carboxy-X-rhodamin und Succinimidylester

2. Magnesiumchlorid 3,5 mM

3. DEPC-Wasser: 9,5 µl

3. Sense und Antisense Primer, jeweils 0,5 µl in der Konzentration 10 pmol/µl (Tab. 2-2).

Die Mischung wurde bis zur Verwendung auf Eis gekühlt und vor Licht geschützt.

Tabelle 2-2: Nukleotidsequenzen der Primer für die „Real-time“-PCR

Peptid	Sense-Primer	Antisense-Primer
AgRP	5'-GCA GAC CGA GCA GAA GAT GT-3'	5'-CTT GAA GAA GCG GCA GTA GC-3'
CART	5'-ACT GTC CCC GAG GAA CTT CT-3'	5'-ATT TTG AAG CAG CAG GGA AA-3'
MCH	5'-CAT TTT ACT TTC GGC CTC CA-3'	5'-TGG AGC CTG TGT TCT TTG TG-3'
NPY	5'-TAA CAA ACG AAT GGG GCT GT-3'	5'-TGT CTC AGG GCT GGA TCT CT-3'
POMC	5'-GAA GGT GTA CCC CAA TGT CG -3'	5'-CTT CTC GGA GGT CAT GAA GC -3'
PPO	5'-GCC GTC TCT ACG AAC TGT TG-3'	5'-CGA GGA GAG GGG AAA GTT AG-3'

Nukleotidsequenzen der Primer für AgRP, CART, MCH, NPY, POMC und PPO (Miesel et al. 2010; Müller-Fielitz et al. 2011). Die Sequenzen der Primer ermittelte das Programm „Primerexpress“ mit einem anschließenden „Blast“ (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Es erfolgte eine Anpassung der Primer auf das PCR-Kit und eine Überprüfung mittels Gelelektrophorese.

Nach dem Pipettieren der oben genannten Bestandteile wurde die PCR-Platte verschlossen und vorsichtig geschwenkt. Die Proben wurden in das vorgeheizte Analysengerät gestellt. In die vorgefertigten Wells einer 96-Wells-Platte wurden je 23 µl „Supermix“ und 2 µl Probe bzw. Standard pipettiert. Zur Ausführung wurde das ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) genutzt. Das weitere Vorgehen richtete sich nach dem dem Kit beiliegenden Protokoll. Insgesamt wurden 40 Zyklen durchlaufen. Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 520 nm.

2.6.7 Western Blot

Funktionsprinzip

Der Western Blot ist eine im Jahre 1979 von Stark entwickelte und von Towbin et al. modifizierte Methode zum quantitativen und qualitativen Nachweis von Proteinen (Towbin et al. 1992).

Im ersten Schritt müssen die Proteine zunächst einmal nach ihrer Größe und Ladung aufgetrennt werden. Wir haben hierzu die SDS-Gelelektrophorese gewählt. Das Proteingemisch wird auf ein Gel (Bis-Tris-Gel) aufgetragen. Das Gel befindet sich in ionischer Pufferlösung und wirkt wie ein Netz, das die Moleküle in ihrer Wanderung je nach Größe behindert. An das Gel wird ein elektrisches Feld angelegt, wodurch die Proteinmoleküle abhängig von der Größe und Ladung wandern.

Durch die Wanderung und das unterschiedliche Halten im Gel entstehen Proteinbanden.

Im Anschluss werden die Proteine „geblottet“, d.h. mittels eines gerichteten elektrischen Feldes übertragen. Die Übertragung erfolgt von dem Gel auf eine Membran (Polyvinylidenfluorid, PVDF). Das Gel und die Membran stehen dabei senkrecht und parallel zueinander in einem Bad mit Transferpuffer. Die Proteinbanden wandern im elektrischen Feld und bleiben unverändert auf der Membran haften. Sichtbar gemacht werden können die Banden mit einer Chemilumineszenzreaktion. Unspezifische Bindungsstellen werden zunächst geblockt (z.B. mit Skim-Milk) und ausgewaschen. Ein spezifischer Antikörper erkennt das gesuchte Protein und lagert sich an die entsprechenden Bindungsstellen. Zwischendurch werden überschüssige Antikörper ausgewaschen. Im Anschluss wird ein zweiter Antikörper hinzugegeben, welcher den ersten Antikörper bindet. Der zweite Antikörper ist mit einem Enzym versehen (Horse Radish Polymerase, HRP). Die HRP katalysiert die Oxidation des Luminols oder seiner Derivate, wobei eine detektierbare Lumineszenz entsteht. Das Gemisch wird mit einem Detektionsreagens (Femto) versetzt. Die Proteinbanden werden über das Belichten mit einer CCD-Kamera detektierbar. Die gemessenen Intensitäten können mit einer entsprechenden Software berechnet und ausgewertet werden.

Durchführung

Zur Bestimmung des Gehalts an UCP-1 im braunen Fettgewebe der SD-Ratten führten wir einen Western Blot durch.

Im ersten Schritt wurde das braune Fettgewebe in Zell-Lysis-Puffer (CLB) mit dem Dispergiergerät (Ultra Tourax 78, IKA-Werke) homogenisiert. Das Homogenisat wurde zentrifugiert (5 min; 14.000 U/min bei 4°C) und der Überstand bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C eingefroren. Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry (Lowry et al. 1951). Alle Proben wurden mit CLB-Puffer auf dieselbe Konzentration an Protein verdünnt. Zur Denaturierung der Proteine wurde LDS (Lithiumdodecylsulfat; Invitrogen, Karlsruhe) in der Konzentration 1:4 hinzugegeben. Anschließend wurde die Lösung 1:10 mit Sample Reduce Buffer versetzt. Daraus ergab sich eine Konzentration von 2 µg/µl Protein pro Probe. Das Gemisch wurde für 10 min auf 70°C erhitzt.

Für die SDS-Gelelektrophorese kam 4- bis 12-%iges Bis-Tris-Gel (Invitrogen) zum Einsatz. Der eingesetzte Puffer war MES-Puffer (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid; Invitrogen, Karlsruhe). In die Taschen des Gels wurden je 10 µl der Proteinlösung überführt. Die Auftrennung der Proteine in der Elektrophorese erfolgte über zwei Stunden bei 140 V, 110 mA und 25 W. Das Blotting der Proteinbanden auf die PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid; Milipore, Schwalbach) erfolgte mit dem XCell II Blot Modul (Invitrogen, Karlsruhe). Der Vorgang wurde bei 30 V, 170 mA, 10 W über 90 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Der Transferpuffer (Invitrogen, Karlsruhe) wurde zuvor 1:20 mit Aqua dest. verdünnt. Nach Abschluss des Transfers fand eine Blockung der unspezifischen Bindungsstellen am Protein statt. Dazu wurde der Blot mit Blockpuffer für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der Blockpuffer ist ein zu 5% mit Skim-Milk (Skim Milk Powder; Fluka, Steinheim, Deutschland) versetzter Waschpuffer (PBS-Tween-Puffer). Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Anti-UCP-1-Antikörper (Santa Cruz C-17) 1:250 mit Blockpuffer verdünnt und zum Versuchsansatz hinzugefügt. Über Nacht erfolgte die Inkubation bei 4°C. Am nächsten Tag wurde vier Mal für 10 min bei Raumtemperatur mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde der antikörperbindende Rabbit-Anti-Goat-Antikörper (Dako, Hamburg) 1:5000 mit Blockpuffer verdünnt und hinzugefügt. Der Antikörper war mit der Horse Radish Polymerase (HRP) „gelabelled“. Während der 90-minütigen Inkubationszeit banden die zweiten Antikörper an die ersten. Es erfolgte das viermalige Waschen mit Waschlösung für 10 min bei Raumtemperatur. Zum Sichtbarmachen der Antikörper-Antikörper-Bindung wurde das Gemisch mit einem Detektionsreagens (Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrat, Thermo scientific, Karlsruhe) versetzt und 1:5 mit Aqua dest. verdünnt. Die Belichtung des Reaktionsgemisches erfolgte für ca. 40 sec. Mit Hilfe einer CCD-Kamera (Bio Rad, Köln) konnte in der Dunkelkammer die Chemilumineszenz detektiert werden. Die Intensitäten wurden mit der Software Quantity One (Bio Rad, Köln) ausgewertet. Bei jeder Bestimmung wurde je eine Referenzprobe mitgeführt.

2.7 Berechnungen und statistische Methoden

Die Daten werden im Folgenden als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) dargestellt. Die statistischen Berechnungen wurden alle mit dem Programm Graph Pad Prism, Version 5.0 durchgeführt. Für alle Untersuchungen galt das 95%-Konfidenzintervall. Ein Unterschied wurde als signifikant bezeichnet, wenn das Signifikanzniveau $<0,05$ betrug. Das heißt, dass die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% verworfen werden konnte.

Ausreißer fielen aus den statistischen Analysen, wenn sie außerhalb der vierten Standardabweichung lagen. Die Testung auf Ausreißer erfolgte mit dem „Grubb's Outliner Test“ (www.graphpad.com). Zur Ermittlung der Mittelwerte, z.B. zur Darstellung der Ergebnisse im Balkendiagramm, wurde die Analyse „Row means/totals“ durchgeführt. Zur Abbildung des zeitlichen Verlaufs einer Plasmakonzentration wurde die Fläche unter der Kurve (AUC) angegeben. So konnte z.B. die Antwort auf die Leptininjektionen in Bezug auf Änderungen der Plasmaleptinkonzentration während des Beobachtungszeitraums für jedes einzelne Tier quantifiziert werden. Zur Berechnung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen Gruppen mit zwei oder mehr Variablen wurde der „Two-Way-Anova“-Test mit dem Bonferroni-Test als post-hoc-Test herangezogen. War nur eine Variable zu vergleichen, fand der „One-Way-Anova“ oder der „t-Test“ Anwendung. Lagen unterschiedliche Varianzen vor, wurde stattdessen der „Wilcoxon-Test“ zur Testung auf Signifikanz verwendet. Durch Berechnung der linearen Regression ließ sich die Steigung einer Geraden ermitteln. Ein Korrelationsverhältnis wurde mit dem zweiseitigen „Pearson-Test“ ermittelt.

Aus den Nüchtern-Werten des Blutzuckers sowie des Insulins lässt sich der HOMA-Index (**H**omeostasis **M**odel **A**ssessment) als Ausdruck der Insulinresistenz berechnen:

$$\text{HOMA-Index} = \text{Insulin (nüchtern, } \mu\text{U/ml)} \times \text{Blutzucker (nüchtern, mg/dl)} / 405$$

Die Bewertung des HOMA-Index' erfolgt folgendermaßen: HOMA-Index ≤ 1 : keine Insulinresistenz, >2 : Hinweis auf Insulinresistenz, $>2,5$: Insulinresistenz wahrscheinlich, ≥ 5 : Diabetes mellitus Typ II.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung des Leptinresistenztests

Als Grundlage für die Untersuchung der Leptinsensitivität unter Telmisartan etablierten wir einen Leptinresistenztest (LRT). Der LRT sollte die Wirksamkeit einer Leptinapplikation auf Nahrungsaufnahme und Körpergewicht bei normalgewichtigen SD-Ratten zeigen.

3.1.1 Leptinkinetik nach einmaliger subcutaner Applikation

Die Kinetik nach subcutaner (s.c.) Applikation von 100 µg/kg Leptin wurde über einen Zeitraum von sieben Stunden untersucht (Abb. 6).

Dabei war das Maximum im Plasma nach einer Stunde erreicht. Nach sieben Stunden war das Leptin noch signifikant über den Ausgangswert erhöht.

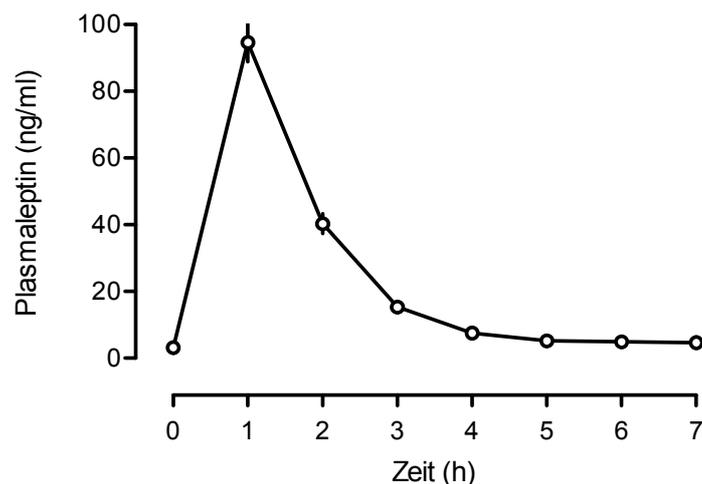


Abb. 6: Pharmakokinetische Untersuchung der Plasmaleptinkonzentration über 7 h nach subcutaner Applikation von 100 µg/kg Leptin; MW ± SEM, n= 10.

3.1.2 Leptinresistenztest (LRT)

Wir etablierten den LRT nach dem im Methodenteil beschriebenen Protokoll (siehe 2.5.3) mit insgesamt 10 SD-Ratten. Das Leptin im Plasma war nach wiederholter subcutaner Gabe deutlich im Vergleich zu den Kontrollen erhöht (Abb. 7 A). Die kumulative Futtermittelaufnahme über 48 Stunden war reduziert (Abb. 7 B). Das Körpergewicht war vor Beginn des LRTs in beiden Gruppen identisch (Abb. 7 C). Unter Leptin nahmen die Ratten über 48 h nur halb so viel zu wie die Kontrollen (Abb. 7 D).

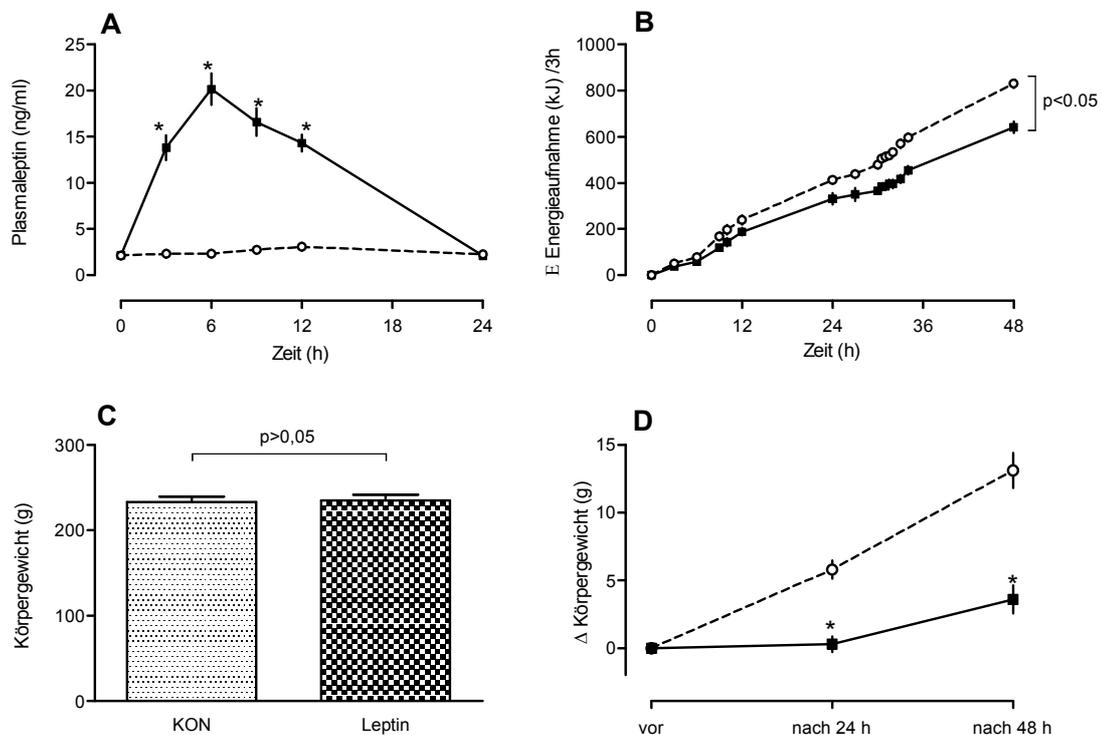


Abb. 7: Etablierung des Leptinresistenztests (LRT). Leptin wurde ab 8 Uhr morgens im Abstand von drei Stunden subcutan in der Dosierung 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ appliziert. Nach 12 Stunden wurde einmalig Leptin der Dosierung 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ injiziert. Als Kontrolle (KON) wurde NaCl verabreicht. Darstellung der Plasmaleptinkonzentration über 24 h (A), der kumulativen Energieaufnahme über 48 h (B), des Körpergewichts vor LRT (C) und der Gewichtsänderung nach subcutaner Leptin- (-■-; gefüllter Balken) bzw. NaCl- (-○-; offener Balken) Gabe nach Protokoll 1 (D); MW \pm SEM, n=10; * $p < 0,05$ vs. KON (NaCl).

3.2 Einfluss von Telmisartan auf die Leptinsensitivität

Im Protokoll 2 beschäftigten wir uns mit dem Einfluss des AT₁-Blockers Telmisartan (TEL) auf die Leptinsensitivität von SD-Ratten unter Cafeteria-Diät. Im Leptinresistenztest (LRT) wurden die Futteraufnahme, das Körpergewicht und das Plasmaleptin bestimmt. Darüber hinaus war es Ziel, den Einfluss des Telmisartans auf die Regulation hypothalamischer Nahrungspeptide zu untersuchen.

3.2.1 Einfluss der Telmisartan-Behandlung auf das Körpergewicht und die Energieaufnahme

Zu Beginn der Therapie wurden die Tiere randomisiert, sodass das Körpergewicht in der Telmisartan- und der Kontrollgruppe (KON = Wasser) identisch war. Bis einschließlich zum vierten Tag der Behandlung nahmen alle Tiere gleichermaßen zu. Danach zeigte sich eine verminderte Gewichtszunahme unter Telmisartan, wobei ab Tag neun ein signifikanter Unterschied bestand (Abb. 8).

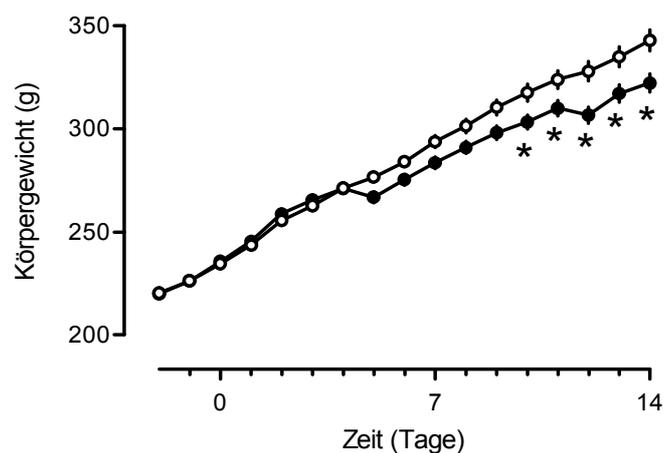


Abb. 8: Körpergewichtsentwicklung über 14 Tage unter Behandlung mit Telmisartan (TEL, -●-) bzw. Wasser (KON, -○-); MW ± SEM, n=20; *: p<0,05 vs. KON (Wasser).

Unter der vor Studienbeginn verabreichten Standarddiät unterschied sich die tägliche Energieaufnahme beider Gruppen nicht voneinander. Während der 14-tägigen Fütterung nahmen die Tiere unter Telmisartan bis zu 20% weniger Energie zu sich als die Kontrolle. Dabei fraßen sie 11% mehr Standarddiät und 20% weniger Cafeteria-Diät (Abb. 9).

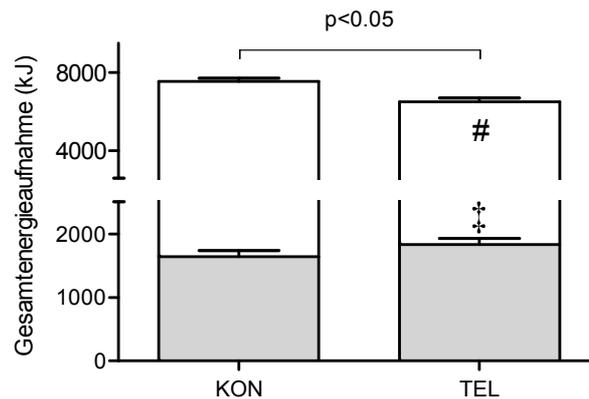


Abb. 9: Darstellung der gesamten Energieaufnahme (ganzer Balken) und der Zusammensetzung des Futters aus Cafeteria-Diät (CD) (offener Balken) und Standarddiät (Chow) (grauer Balken) über 14 Tage unter Behandlung mit Telmisartan (TEL) bzw. Wasser (KON); $MW \pm SEM$, $n=20$; #: $p < 0,05$ vs. KON (Aufnahme an CD), ‡: $p < 0,05$ vs. KON (Aufnahme an Chow-Diät).

Die auf das Körpergewicht bezogene Energieaufnahme war vor Beginn der Therapie gleich. Unter Telmisartan war die körpergewichtsadaptierte Energieaufnahme um 18% geringer als bei den Kontrollen (KON = Wasser) (Abb. 10 A).

Nach 14-tägiger Behandlung war eine Linksverschiebung der Geraden, die sich aus der auf den Körpergewichtsanstieg bezogenen kumulativen Energieaufnahme ergibt, erkennbar. Es bestand eine positive Korrelation mit einem Pearson-Korrelationskoeffizienten von $r=0,7694$ (Telmisartan) und $0,7422$ (Kontrolle) zwischen der kumulativen Energieaufnahme und der Zunahme des Körpergewichts (Abb. 10 B).

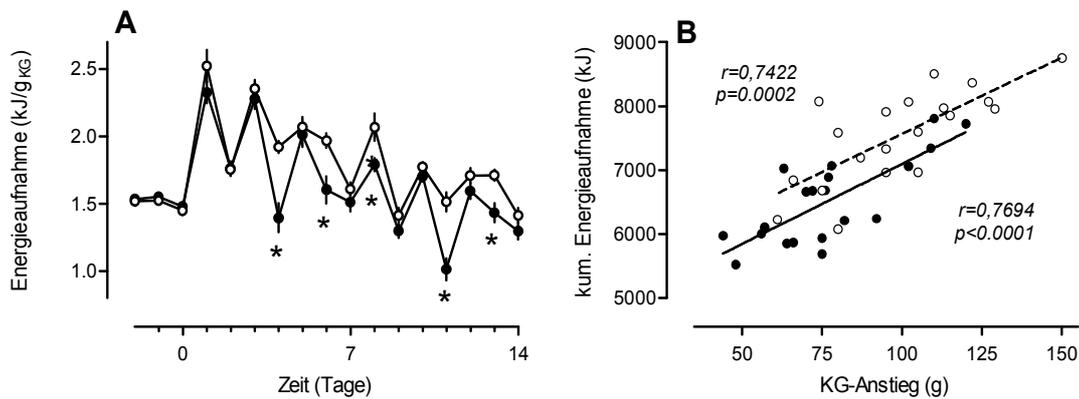


Abb. 10: Körpergewichtsbezogene Energieaufnahme (A) und Korrelation zwischen kumulativer Energieaufnahme und Änderung des Körpergewichts (B) über 14 Tage unter Behandlung mit Telmisartan (TEL, -●-) bzw. Wasser (KON, -○-). MW \pm SEM, $n=20$; *: $p<0,05$ gesamt vs. KON.

3.2.2 Einfluss der Telmisartan-Behandlung auf das Plasmaleptin

Die basalen Leptinspiegel aller SD-Ratten stiegen im Laufe der Behandlung im Vergleich zu vorher an. Nach 14 Tagen war die Leptinkonzentration unter Telmisartan um 37% niedriger (Abb. 11 A).

Das Plasmaleptin der Kontrolltiere korrelierte positiv mit dem Körpergewicht mit einem Pearson-Korrelationskoeffizienten von $r = 0,847$. Bei den Telmisartan-behandelten Tieren zeigte sich keine signifikante Korrelation (Abb. 11 B).

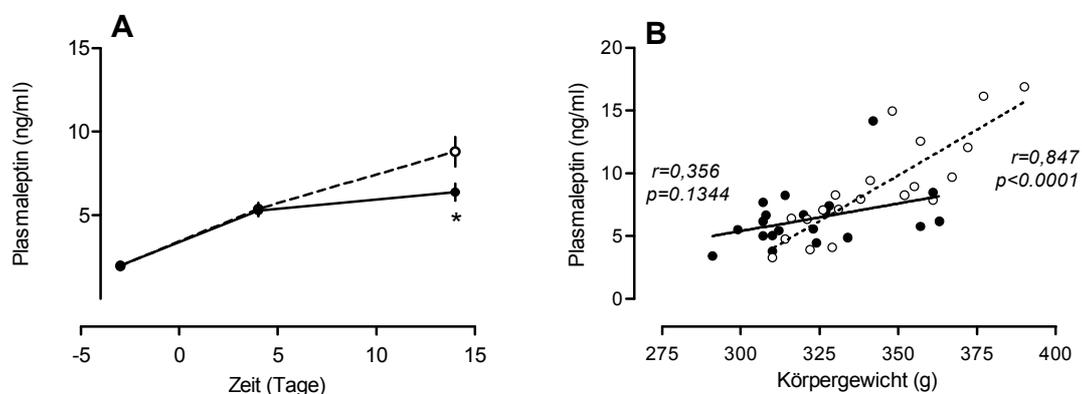


Abb. 11: Basales Plasmaleptin vor und während der Behandlung (A), Korrelation zwischen Plasmaleptinkonzentration und Körpergewicht (B) nach 14-tägiger Behandlung mit Telmisartan (TEL, -●-) bzw. Wasser (KON, -○-); MW \pm SEM, $n=20$; *: $p<0,05$ vs. KON.

3.2.3 Einfluss der Telmisartan-Behandlung auf den Energieverbrauch

Die Behandlung mit Telmisartan bewirkte keinen Unterschied in der Expression von Uncoupling Protein 1 im braunen Fettgewebe. Die Applikation von Leptin im Rahmen des LRT zeigte ebenfalls keine Auswirkungen auf das UCP-1 (Abb. 12).

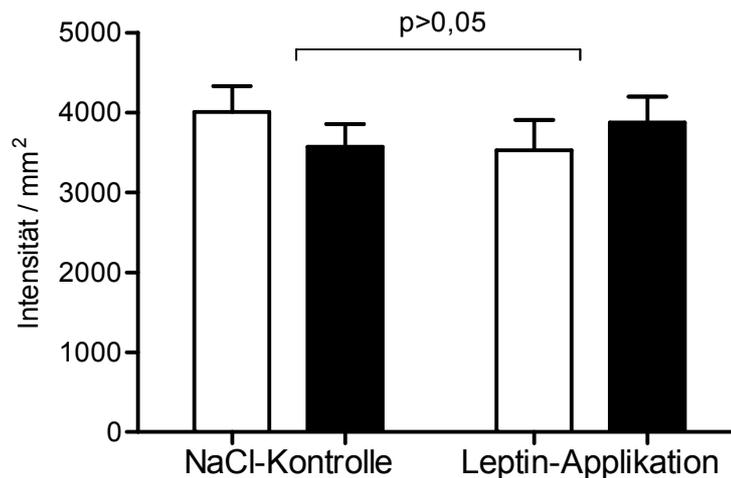


Abb. 12: Expression des Uncoupling Proteins (UCP-1) im braunen Fettgewebe nach 17-tägiger Behandlung mit Telmisartan (TEL, geschlossener Balken) bzw. Wasser (KON, offener Balken) nach Leptin- bzw. NaCl-Gabe. MW \pm SEM, n=10.

3.2.4 Einfluss der Telmisartan-Behandlung auf die Hämodynamik

Der Blutdruck und die Herzfrequenz von fünf SD-Ratten waren vor Beginn der Therapie mit Telmisartan und der Fütterung mit Cafeteria-Diät normwertig (Abb. 13 A und B). Nach 18-tägiger Behandlung mit Telmisartan zeigten sich Blutdruck und Herzfrequenz unverändert.

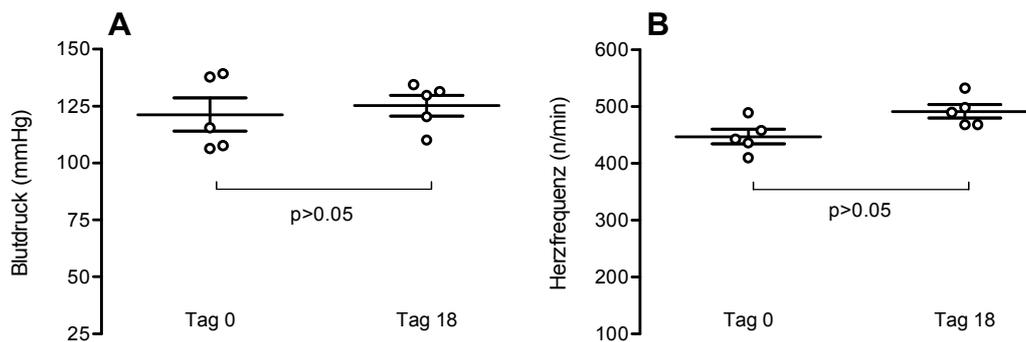


Abb. 13: Blutdruck (A) und Herzfrequenz (B) von 5 normotensiven Sprague-Dawley-Ratten (SD) vor und nach Behandlung mit Telmisartan bzw. Wasser; $MW \pm SEM$, $n=5$.

Das Angiotensin II im Plasma war nach 17 Tagen unter Telmisartan-Behandlung um das 8-fache erhöht (Abb. 14).

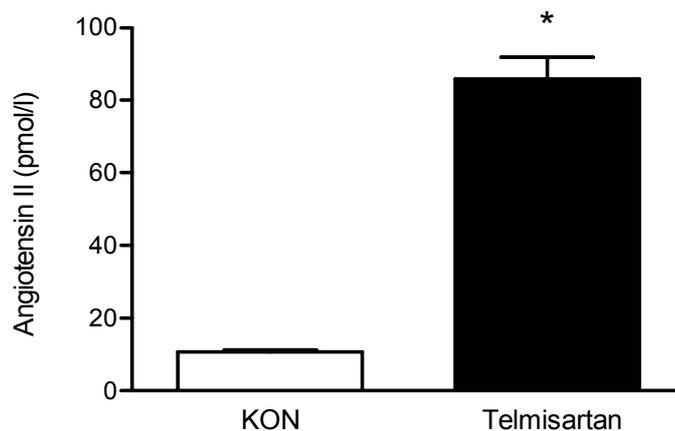


Abb. 14: Angiotensin II im Plasma nach 17-tägiger Behandlung mit Telmisartan (TEL, geschlossener Balken) bzw. Wasser (KON, offener Balken); $MW \pm SEM$, $n=26$, *: $p < 0,05$ vs. KON.

Mit Beginn der Behandlung tranken alle Tiere gleich viel. Währenddessen tranken die Ratten unter Telmisartan bis zu 20% mehr als die Kontrollen (Abb. 15).

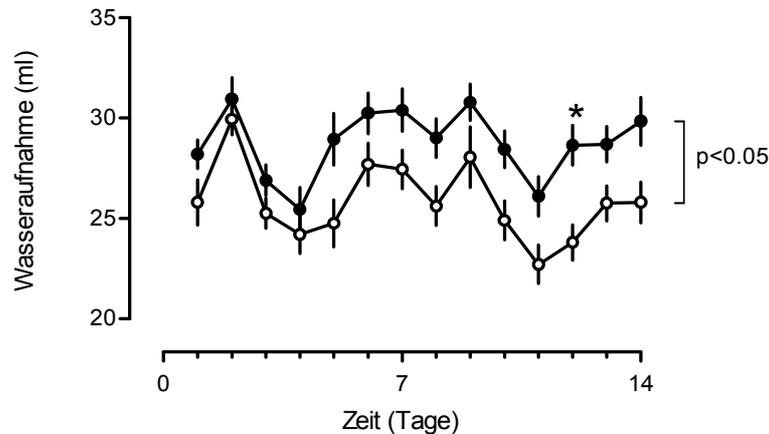


Abb. 15: Wasseraufnahme über 14 Tage unter Behandlung mit Telmisartan (TEL, ●) bzw. Wasser (KON, ○); $MW \pm SEM$, $n=20$; *: $p < 0,05$ vs. KON.

3.2.5 Hypothalamische Nahrungspeptide unter Telmisartan

Nach Durchführung des Leptinresistenztests waren die mRNA Levels der orexigenen Peptide MCH und PPO unter Telmisartan reduziert. Auf die Expression der orexigenen Peptide NPY und AgRP sowie der anorexigenen Peptide CART, CRH und POMC hatte die Behandlung keinen Einfluss (Abb. 16).

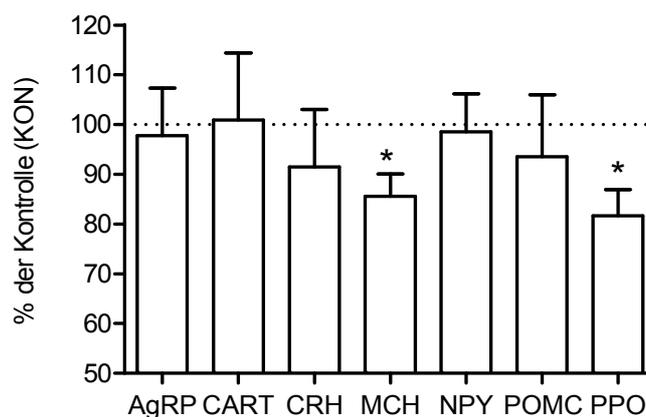


Abb. 16: mRNA Levels der hypothalamischen Nahrungspeptide AgRP, CART, CRH, MCH, NPY, POMC und PPO nach Durchführung des Leptinresistenztests nach 17-tägiger Behandlung mit Telmisartan (TEL) in Bezug auf die mRNA-Levels der Kontrolltiere (Wasser (KON)). Alle Tiere erhielten Leptin. $MW \pm SEM$, $n=10$, *: $p < 0,05$ vs. KON.

3.2.6 Leptinresistenztest (LRT) unter Telmisartan

Der LRT wurde nach dem unter 2.5.3 vorgestellten Protokoll 2 durchgeführt. Nach Leptinapplikation war das Plasmaleptin im Vergleich zur NaCl-Kontrolle maximal etwa um das 4-fache erhöht. Unter Telmisartan-Behandlung war das Plasmaleptin nach exogener Leptinzufuhr niedriger (Abb. 17). Dies ist auf die körperrgewichtsadaptierte Dosierung von exogen appliziertem Leptin zurückzuführen.

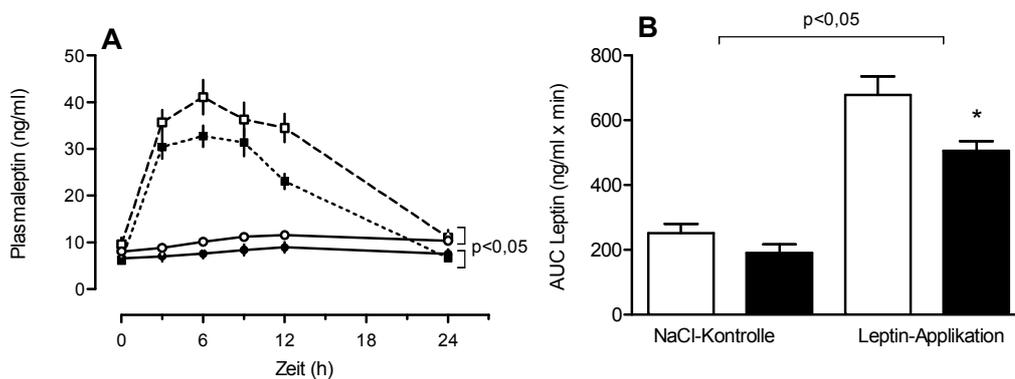


Abb. 17: Plasmaleptinkonzentration nach exogener Zufuhr von Leptin (LEP) bzw. NaCl (A) und AUC des Plasmaleptins (B) über 24 h im Leptinresistenztest nach 17-tägiger Behandlung mit Telmisartan (TEL (-■-, geschlossener Balken)), bzw. Wasser (KON (-□-, offener Balken)), MW ± SEM, n=10; *: p<0,05 vs. KON.

Eine exogene Leptinzufuhr hatte bei den mit Wasser vorbehandelten Kontrolltieren keine Auswirkungen auf die Futteraufnahme. Sie fraßen ebenso viel wie die Tiere, denen nur NaCl appliziert wurde. Nach Vorbehandlung mit Telmisartan bewirkte die Leptinzufuhr eine Reduktion der Futteraufnahme. Ein ähnlicher, jedoch nicht signifikanter Effekt war bei den Telmisartan-behandelten Tieren, die NaCl im LRT erhielten, zu beobachten (Abb. 18).

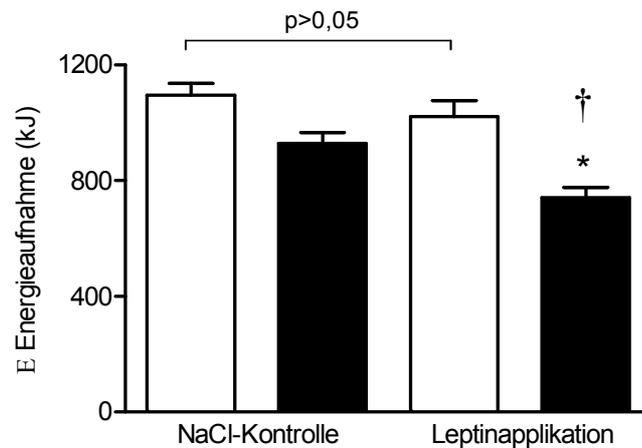


Abb. 18: Gesamte Energieaufnahme über 55 h während des Leptinresistenztests mit subcutaner Applikation von Leptin bzw. NaCl als Kontrolle nach 17-tägiger Behandlung mit Telmisartan (geschlossener Balken) bzw. Wasser (KON; offener Balken). MW \pm SEM, n=10; *: $p < 0,05$ vs. KON, †: $p < 0,05$ vs. NaCl.

Darüber hinaus hatte die Therapie mit Telmisartan eine gesteigerte Aufnahme an Standard- und eine verringerte Aufnahme an Cafeteria-Diät zur Folge. Dieser Effekt wurde durch die Leptingabe noch verstärkt. Nach der Kontrollbehandlung mit Wasser hingegen waren Zusammensetzung und Gesamtmenge des Futters mit und ohne Leptingabe identisch (Abb. 19 A und B).

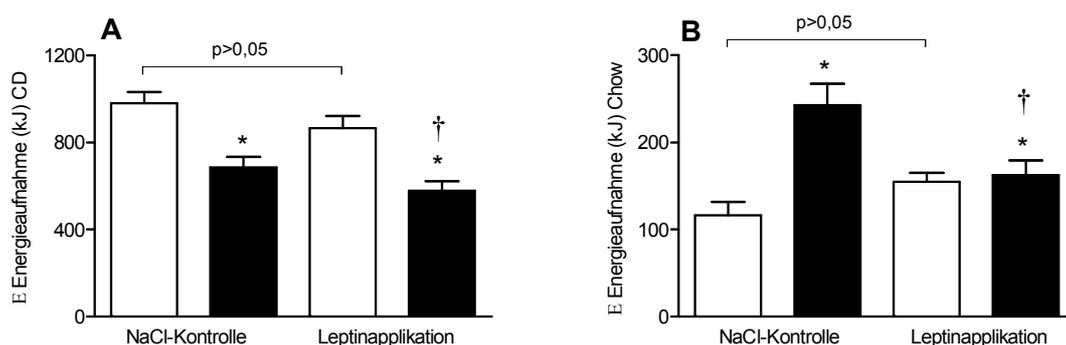


Abb. 19: Energieaufnahme an Cafeteria-Diät (CD) (A) und an Standarddiät (Chow) (B) über 55 h während des Leptinresistenztests mit subcutaner Applikation von Leptin bzw. NaCl als Kontrolle nach 17-tägiger Behandlung mit Telmisartan (geschlossener Balken) bzw. Wasser (KON; offener Balken). MW \pm SEM, n=10; *: $p < 0,05$ vs. KON, †: $p < 0,05$ vs. NaCl.

Die AUC des Plasmaleptins der mit Wasser vorbehandelten Tiere (KON) korrelierte positiv mit der Energieaufnahme, unabhängig davon, ob die Ratten Leptin (\circ , $r=0,8697$, $p<0,05$) oder NaCl (\square , $r=0,7541$, $p<0,05$) erhielten. Nach Behandlung mit Telmisartan war die Korrelation tendenziell negativ sowohl nach Leptingabe (\bullet , $r=0,4415$, $p>0,05$) als auch nach NaCl-Injektionen (\blacksquare , $r=0,4915$, $p>0,05$) (Abb. 20).

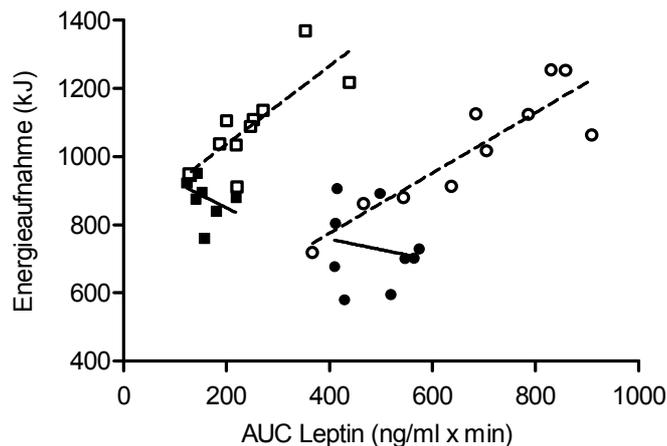


Abb. 20: Darstellung der Korrelation zwischen der AUC des Plasmaleptins und der gesamten Energieaufnahme über 24 h während des Leptinresistenztests mit subcutaner Applikation von Leptin (Kreis) bzw. NaCl (Quadrat) als Kontrolle nach 17-tägiger Behandlung mit Telmisartan (geschlossenes Symbol) bzw. Wasser (KON; offenes Symbol) unter Angabe des Pearson-Korrelationskoeffizienten r . Es zeigte sich unter KON-Vorbehandlung sowohl nach Leptin- (\circ , $r=0,8697$, $p<0,05$) als auch nach NaCl-Applikation (\square , $r=0,7541$, $p<0,05$) eine positive Korrelation. Unter Telmisartan war die Korrelation sowohl nach Leptin- (\bullet , $r=0,4415$, $p>0,05$) als auch nach NaCl-Applikation (\blacksquare , $r=0,4915$, $p>0,05$) nicht signifikant negativ. $MW \pm SEM$, $n=10$.

Die mit Telmisartan behandelten Tiere nahmen über 48 Stunden nach Leptingabe bis zu 70% weniger an Gewicht zu als die Kontrollen (Wasser) (Abb. 21).

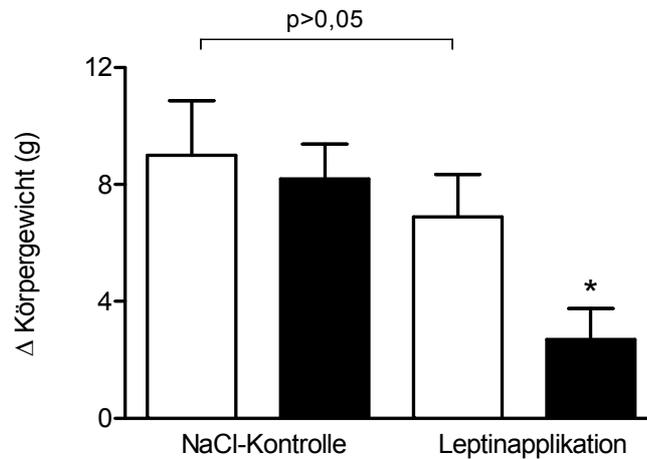


Abb. 21: Änderung des Körpergewichts über 55 h während des Leptinresistenztests mit subcutaner Applikation von Leptin bzw. NaCl als Kontrolle nach 17-tägiger Behandlung mit Telemisartan (geschlossener Balken) bzw. Wasser (KON; offener Balken). MW ± SEM, n=10; *: p<0,05 vs. KON.

3.3 Untersuchung der Glukosetoleranz unter Langzeit-Fütterung mit Cafeteria-Diät

Im Protokoll 4 sollten die Langzeitauswirkungen einer Cafeteria-Diät auf die Glukosetoleranz und die Lebenserwartung von SHR im Vergleich zu mit einer Standarddiät ernährten SHR untersucht werden. Die Ratten wurden über ihre gesamte Lebenszeit bis maximal zum Tag 630 beobachtet. Da der Großteil der Tiere zu diesem Zeitpunkt bereits verstorben war, war keine zuverlässige Auswertung aller Parameter über den gesamten Zeitraum möglich.

3.3.1 Einfluss der Cafeteria-Diät auf das Körpergewicht

Die SHR wurden vor Behandlungsbeginn randomisiert, sodass sich das mittlere Körpergewicht nicht unterschied. Ab dem 21. Tag der Diät wogen die Tiere unter Cafeteria-Diät (CD) signifikant mehr als die Kontrollen (Abb. 22). Bis zum Ende der Studie war das Körpergewicht der Cafeteria-Tiere konstant um 19% höher als

das der Kontrollen. Die in Abb. 22 mit einem Pfeil markierten Einbrüche des Körpergewichts sind damit zu erklären, dass die Tiere zu den Funktionstests (OGTT und ITT) nüchtern gesetzt wurden.

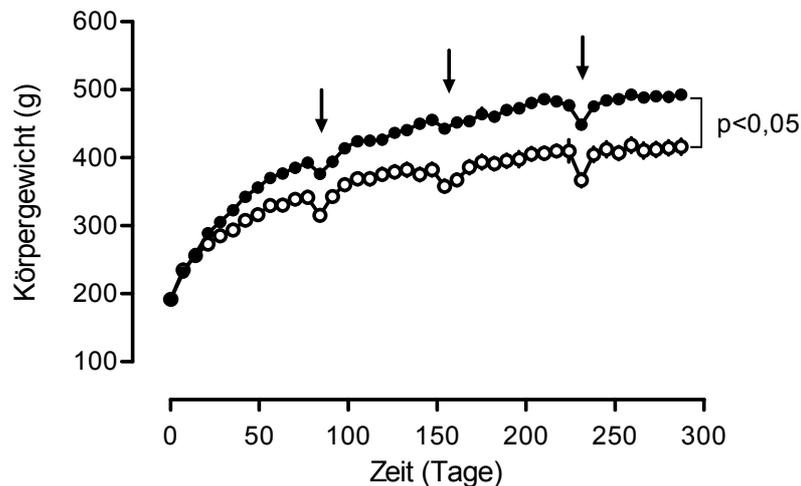


Abb. 22: Körpergewichtsentwicklung von SHR bis zu Tag 287 unter Cafeteria- (-●-) bzw. Chow-Diät (-○-). Mit einem Pfeil sind die Zeitpunkte der Funktionstests (OGTT und ITT) markiert, die zu einem Einbruch des Körpergewichts geführt haben. $MW \pm SEM$, $n=7-9$. $p < 0,05$ vs. Chow.

3.3.2 Futter- und Wasseraufnahme unter Cafeteria-Diät

Ab Diätbeginn nahmen die Ratten unter der Cafeteria-Diät pro Woche etwa 35% mehr Energie zu sich als unter Chow-Diät (Abb. 23 A). Verglichen mit der Standarddiät fraßen die SHR mehr als viermal so viel von der hochkalorischen Diät (Abb. 23 B). Das Fressverhalten blieb über die gesamte Dauer der Studie konstant.

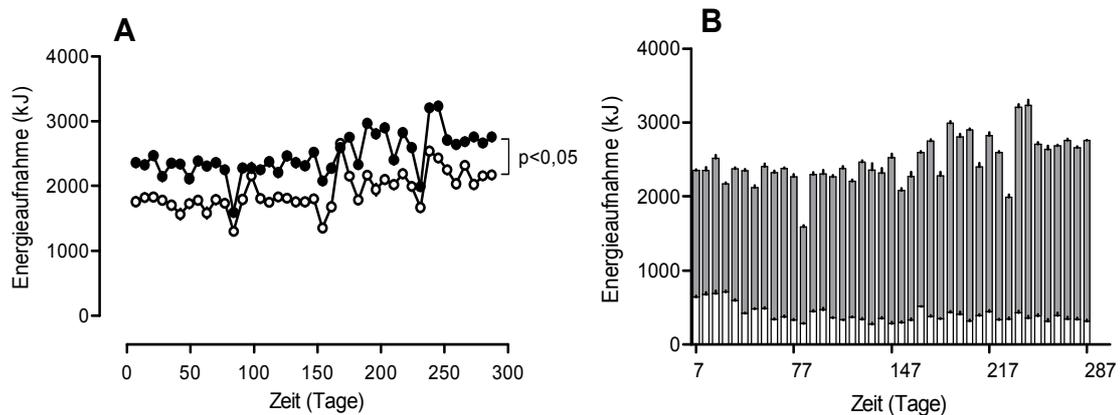


Abb. 23: Wöchentliche Energieaufnahme bis zu Tag 287 unter Cafeteria- (-●-) bzw. Chow-Diät (-○-) (A) und Aufgliederung der gesamten Energieaufnahme der Cafeteria-Gruppe an CD (geschlossener Balken) bzw. Chow-Futter (offener Balken) bis zu Tag 287 (B); MW ± SEM, n=7-9. $p < 0,05$ vs. Chow.

Auf das Körpergewicht bezogen nahmen die Tiere unter Cafeteria-Diät insbesondere zu Beginn der Studie mehr Energie zu sich als die Kontrollen. Im Verlauf gleichen sich beide Gruppen an (Abb. 24).

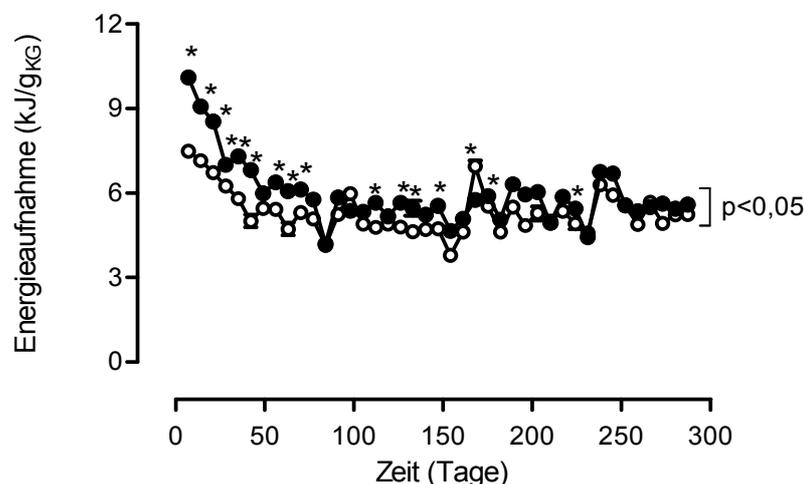


Abb. 24: Körpergewichtsbezogene Energieaufnahme bis zu Tag 287, Cafeteria- (-●-) bzw. Chow-Diät (-○-); MW ± SEM, n=7-9; *: $p < 0,05$ vs. Chow.

Von Beginn der Diät an tranken die hochkalorisch gefütterten Tiere ca. 35% weniger Wasser als die Kontrollen (Abb. 25). Die Wasseraufnahme blieb im Verlauf der Studie weitestgehend konstant.

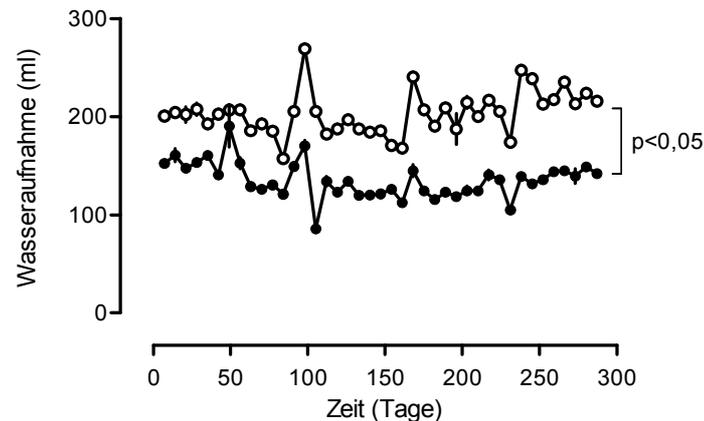


Abb. 25: Wasseraufnahme bis zu Tag 287 unter Cafeteria- (-●-) bzw. Chow-Diät (-○-); $MW \pm SEM$, $n=7-9$; $p < 0,05$ vs. Chow.

3.3.3 Einfluss der Cafeteria-Diät auf die körperliche Aktivität

Die körperliche Aktivität (dargestellt als Counts/10min) ist hier beispielhaft anhand der Messung nach 131 Tagen (5 Monaten) unter der Cafeteria- bzw. Chow-Diät gezeigt. Dargestellt ist die Anzahl der Counts/10 min (Abb. 26 A), sowie die kumulative Anzahl der Counts über eine Woche (Abb. 26 B). Der Tag-Nacht-Rhythmus bestand aus einer 12-stündigen Dunkelphase ab 2 Uhr und einer 12-stündigen Hellphase ab 14 Uhr.

Die Ergebnisse der übrigen Aktivitätsmessungen sind Abb. 27 zu entnehmen.

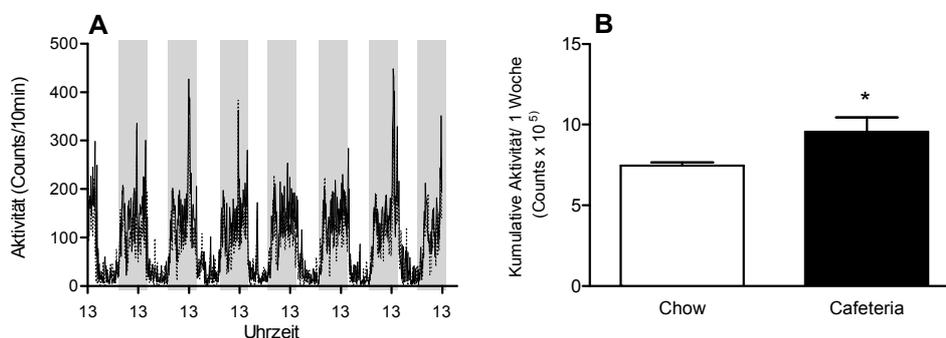


Abb. 26: Darstellung der körperlichen Aktivität als Counts/10 min (A) und als kumulative Anzahl der Counts $\times 10^5$ /Woche (B) ab Tag 131 nach 5 Monaten unter Cafeteria (durchgezogene Linie; geschlossener Balken) oder Chow-Diät (gestrichelte Linie; offener Balken); $MW \pm SEM$, $n=5-9$, *: $p < 0,05$ vs. Chow. Grau unterlegte Felder: Dunkelphasen (2 bis 14 Uhr).

Die körperliche Aktivität (jeweils angegeben als kumulative Anzahl der Counts über eine Woche) war unter der Cafeteria-Diät über die gesamte Zeit der Studie im Vergleich zur Kontrolle um ca. 30% gesteigert (Abb. 27). Die Messungen begannen jeweils an den Tagen 131, 202 und 302.

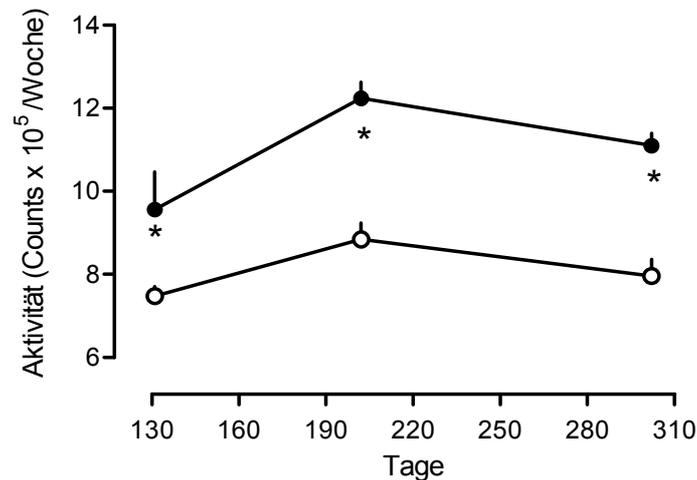


Abb. 27: Kumulation der Gesamtaktivität (dargestellt als kumulative counts/ Woche x 10⁵) über je 1 Woche nach 131, 202 und 302 Tagen unter Cafeteria- (-●-) bzw. Chow-Diät (-○-) MW ± SEM, n=6-9; *: p<0,05 vs. Chow.

3.3.4 Einfluss der Cafeteria-Diät auf die Hämodynamik

Zu Beginn der Studie unterschieden sich Blutdruck und Herzfrequenz der CD-gefütterten Tiere nicht von der Kontrolle (Abb. 28 A und B). Im Verlauf der Studie stiegen Blutdruck und Herzfrequenz bei beiden Gruppen an. Intermittierend war bei den Tieren unter CD ein signifikant höherer Blutdruck und Puls als bei der Kontrolle feststellbar: z.B. Tag 140 (Abb. 28 A und B).

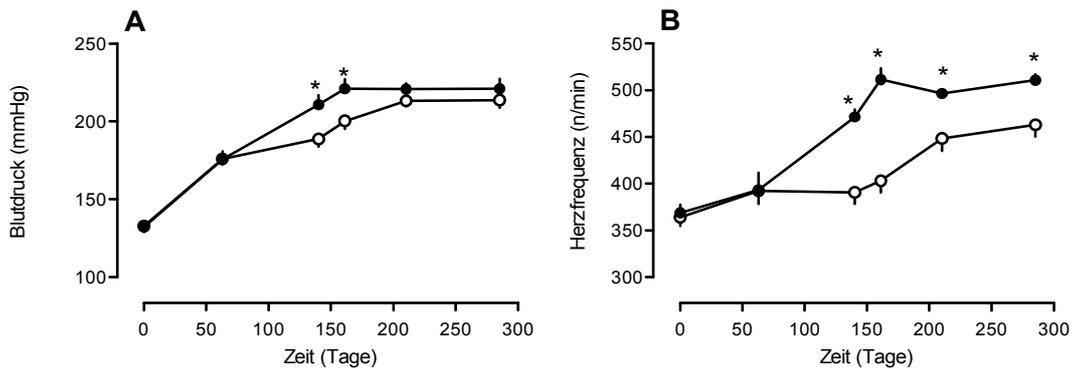


Abb. 28: Blutdruck (A) und Herzfrequenz (B) bis zu Tag 285 unter Cafeteria- (-●-) bzw. Chow-Diät (-○-); MW ± SEM, n=7-9; *: $p < 0,05$ vs. Chow.

3.3.5 Einfluss der Cafeteria-Diät auf basale Stoffwechselfparameter

Zu Beginn der Cafeteria-Diät waren die Basalwerte Blutzucker, Insulin und Leptin in beiden Gruppen identisch (Abb. 29 A, C, E). Ab Tag 112 war die ungefastete Blutglukose der hochkalorisch gefütterten Ratten erhöht. Der Glukagonspiegel an Tag 188 war im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt (Abb. 29 B). Das Plasmainsulin der CD-gefütterten Tiere war über den Gesamtverlauf gegenüber der Kontrolle nicht gesteigert (Abb. 29 C). Intermittierend zeigte sich jedoch ein Unterschied (an Tag 112). Das C-Peptid an Tag 188 wies keine Gruppendifferenz auf (Abb. 29 D). Ab Tag 112 war das Plasmaleptin unter CD höher (Abb. 29 E). Die basale Adiponectin-Konzentration wies bei großer Standardabweichung keinen signifikanten Effekt der CD auf (Abb. 29 F).

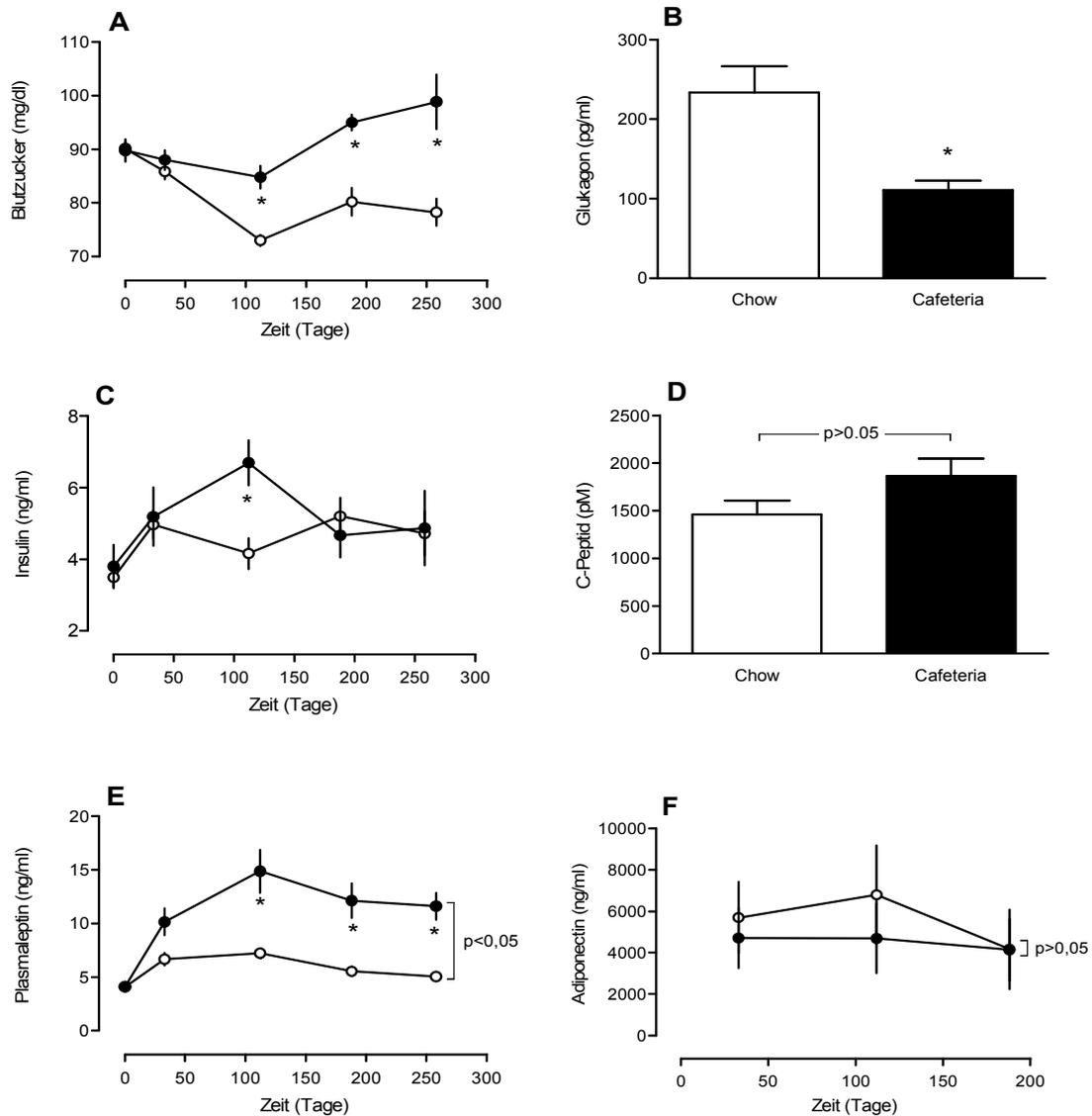


Abb. 29 A-F: Darstellung der basalen Stoffwechselformerparameter Glukose, Leptin, Insulin und Adiponectin im Verlauf der Cafeteria- (●, geschlossener Balken) bzw. Chow-Diät (○, offener Balken); Glukagon und C-Peptid wurden einmalig an Tag 188 bestimmt; MW ± SEM, n=6-9; *: p<0,05 vs. Chow.

3.3.6 Oraler Glukose Toleranz Test (OGTT)

Hier sind exemplarisch für den Tag 151 (nach 5 Monaten) die Kurvenverläufe für Insulin und Glukose im OGTT dargestellt.

Nach oraler Glukosezufuhr im OGTT stiegen Blutzucker und Insulin unter Cafeteria-Diät stärker an (Abb. 30 A und C). Dies zeigt sich auch anhand der AUC des Blutzuckers und des Insulins (Abb. 30 B und D).

Der Blutzucker war 48 min nach der oralen Glukosegabe maximal erhöht. Hierbei zeigte sich kein Unterschied zur Kontrollgruppe (Abb. 30 A). Das Plasmainsulin erreichte bei beiden Gruppen sein Maximum nach 24 min, wobei sich ebenfalls kein Unterschied zeigte (Abb. 30 C). Unter CD stieg das Insulin nach der Glukosebelastung jedoch nach 48 min erneut an. Der zweite Insulinpeak lag hierbei signifikant über dem Kontrollniveau (Abb. 30 C).

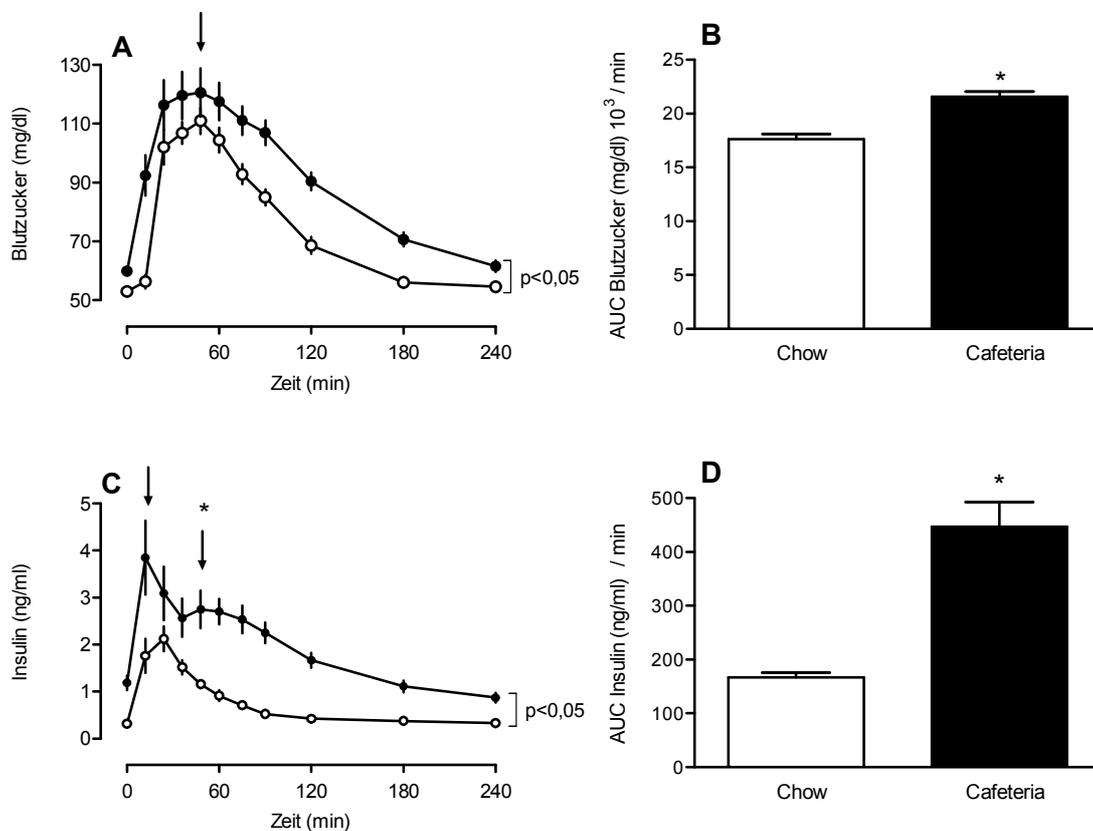


Abb. 30: OGTT nach 151 Tagen (5 Monaten) Cafeteria- (-●-) bzw. Chow-Diät (-○-): Blutzucker (A) und Insulin (C) im Plasma nach oraler Glukosegabe, dargestellt als AUC unter Cafeteria- (geschlossener Balken) bzw. Chow-Diät (offener Balken) (B und D); MW \pm SEM, n=9; *: $p < 0,05$ vs. Chow, ↓: Cmax Glukose bzw. Insulin.

Die weiteren OGTTs fanden nach 82, 181, 223 und 292 Tagen statt. Die Ergebnisse sind als AUC des Insulins und der Glukose tabellarisch dargestellt:

Tabelle 3-1: Tabellarischer Überblick über die durchgeführten OGTTs

Tag	AUC Blutzucker (mg/dl) / min		AUC Insulin (ng/ml) / min	
	Chow	CD	Chow	CD
82	18159 ± 263,5	20935,3 ± 444,6*	192,9 ± 6,8	398,2 ± 42,2*
151	17635,5 ± 460,8	21566,9 ± 508,1*	167,2 ± 8,3	447,3 ± 45,4*
181	17129,2 ± 732,1	20376,7 ± 246*	186,1 ± 23,4	310,7 ± 39,4*
223	18152,7 ± 347,8	21480,9 ± 298,5*	177,8 ± 9,2	322,4 ± 29,1*
292	17305,5 ± 262,9	21351 ± 621*	162,8 ± 9,5	342,5 ± 29,2*

Darstellung der Ergebnisse der OGTTs nach 82, 151, 181, 223 und 292 Tagen als AUC des Blutzuckers und des Insulins unter Cafeteria-Diät (CD) bzw. Standard-Diät (Chow). MW ± SEM, n=9; *: p<0,05 vs. Chow.

Der HOMA-Index (zur Berechnung siehe 2.7) betrug unter Cafeteria-Diät über den gesamten Verlauf der Studie einen Wert >2 (maximal $4,2 \pm 0,7$ an Tag 151), unter Standarddiät < 2 (maximal $1,1 \pm 0,1$ an Tag 82) (Abb. 31).

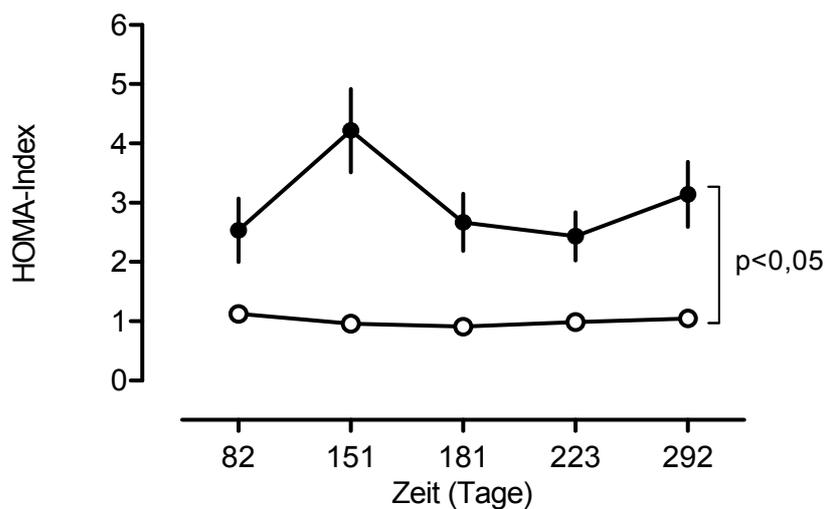


Abb. 31: HOMA-Index (berechnet aus Nüchtern-Blutzucker und Insulin vor OGTT) im Verlauf unter Cafeteria- (●) bzw. Chow-Diät (○); MW ± SEM, n=7-9; *: p<0,05 vs. Chow.

3.3.7 Insulin Toleranz Test (ITT)

Hier sind exemplarisch für den Tag 153 (nach 5 Monaten) die Kurvenverläufe für Insulin und Glukose im ITT dargestellt.

Nach intraperitonealer Insulingabe fiel der Blutzucker in beiden Gruppen ab, wobei sich kein Unterschied hinsichtlich der Diät zeigte. Der minimale Blutzuckerspiegel war nach 90 min erreicht (Cmin Glukose) (Abb. 32 A). Unter CD stieg der Blutzucker jedoch schneller wieder an als unter Standarddiät, was sich anhand der AUC zeigt (Abb. 32 B). Dies ist als Zeichen einer Insulinresistenz zu werten. Die Insulinkonzentration unterschied sich vor und nach Applikation nicht signifikant (Abb. 32 C).

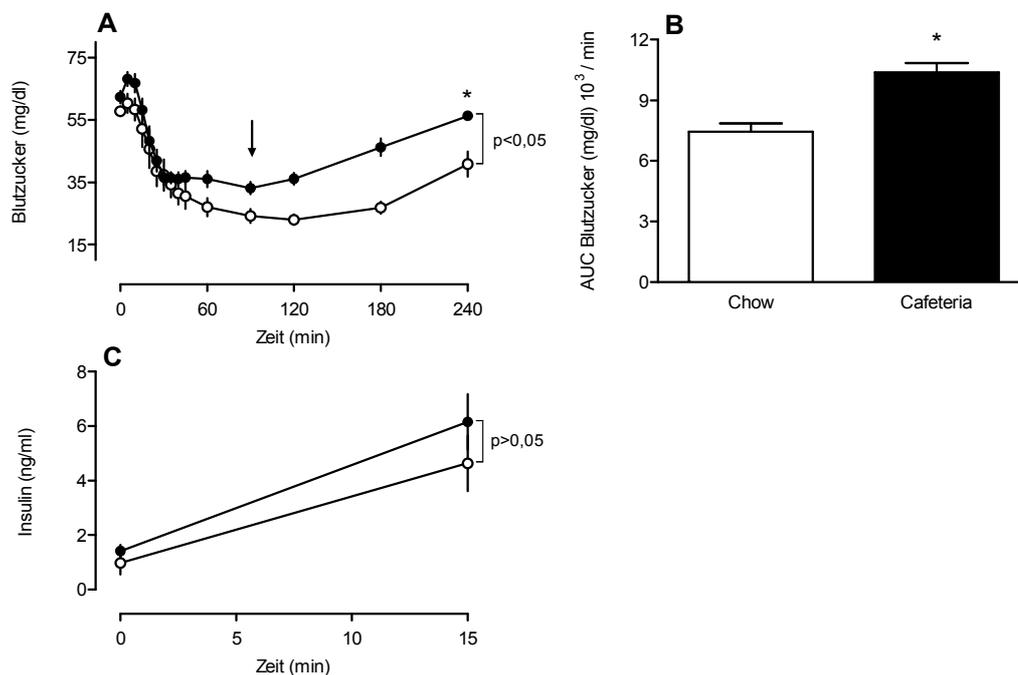


Abb. 32: ITT nach 153 Tagen (5 Monaten) unter Cafeteria- (●, geschlossener Balken) bzw. Chow-Diät (-○-, offener Balken): Blutzucker (A) und Insulin (C) im Plasma nach intraperitonealer Insulingabe; Blutzucker, dargestellt als AUC (B); MW \pm SEM, $n=9$; *: $p < 0,05$ vs. Chow; ↓: Cmin Glukose.

Die weiteren ITTs fanden nach 84, 153, 229 und 294 Tagen statt. Die Ergebnisse sind als AUC des Insulins und der Glukose tabellarisch dargestellt:

Tabelle 3-2: Tabellarischer Überblick über die durchgeführten ITTs

Tag	AUC Blutzucker (mg/dl) / min		AUC Insulin (ng/ml) / min	
	Chow	CD	Chow	CD
84	7684,4 ± 345,9	9853,9 ± 326,7*	29,7 ± 5,96	36,5 ± 4,5
153	7442,3 ± 414,4	10373,8 ± 456,4*	42,03 ± 8,7	56,8 ± 7,5
229	7431,7 ± 706,8	9466,7 ± 234,8*	151,9 ± 30,1	170,1 ± 25
294	6075,5 ± 326,97	8524 ± 470*	174,2 ± 37,4	239,96 ± 43,1

Darstellung der Ergebnisse der ITTs nach 84, 153, 229 und 294 Tagen als AUC des Blutzuckers und des Insulins unter Cafeteria-Diät (CD) bzw. Standard-Diät (Chow). MW ± SEM, n=9; *: p<0,05 vs. Chow.

3.3.8 Einfluss der Cafeteria-Diät auf das Überleben

Unter Cafeteria-Diät zeigte sich eine Rechtsverschiebung der Kaplan-Meier Kurve. Die Ratten verstarben unter Cafeteria-Diät früher als die Kontrolltiere (Abb. 33): Eine Signifikanz ergab sich aufgrund der geringen n-Zahl nicht. An Tag 528, nachdem alle Tiere unter CD verstorben waren, lebten noch 12,5% der Kontrollen.

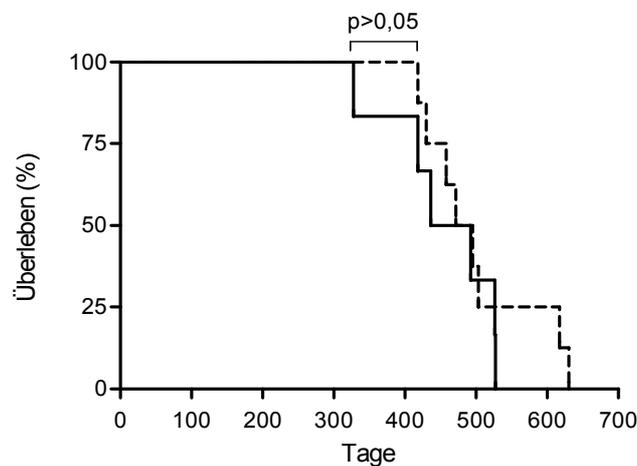


Abb. 33: Darstellung des Überlebens als Kaplan-Meier-Kurve in % unter Cafeteria- (—) bzw. Chow-Diät (- - -) über den Gesamtzeitraum der Studie; MW ± SEM, n=9.

4 Diskussion

Ein Ziel unserer Studien war die Charakterisierung der Leptinsensitivität unter Telmisartan im Rahmen einer Diät induzierten Adipositas.

Wir können hier erstmalig zeigen, dass Telmisartan die Leptinsensitivität erhält, während die unbehandelten SD-Ratten unter Cafeteria-Diät eine Adipositas und eine Leptinresistenz entwickeln. Als Ausdruck der intakten Leptinwirksamkeit waren Körpergewicht und Nahrungsaufnahme im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Hierbei handelt es sich um einen zentralen Einfluss des Telmisartans, was sich an der verminderten Expression der orexigenen Peptide MCH und PPO zeigt. Die Auswirkungen auf den Energiehaushalt der SD-Ratten waren dabei nachweislich blutdruckunabhängig.

Das zweite Ziel war die Untersuchung einer Insulinresistenz unter Cafeteria-Diät. Wir konnten zeigen, dass sich die Insulinresistenz im Laufe des Rattenlebens nicht wesentlich verändert, insbesondere entsteht kein Diabetes mellitus Typ II. Nebenbefundlich war die Tendenz zu einer kürzeren Lebenserwartung bei Adipositas erkennbar.

Beide Hauptbefunde werden im Folgenden getrennt diskutiert.

4.1 Einfluss der AT₁-Blockade mit Telmisartan auf die Leptinsensitivität

Das von Adipozyten exprimierte Leptin reduziert die Nahrungsaufnahme und steigert den Energieverbrauch, indem es im Zentralen Nervensystem (ZNS) in den Energiehaushalt eingreift. Fällt dieser Einfluss partiell oder total aus, wird von einer Leptinresistenz gesprochen.

Die für die Etablierung des Leptinresistenztests (LRT) verwendeten SD-Ratten waren schlank und unbehandelt, sodass bei diesen Tieren von einer nativen Leptinsensitivität ausgegangen werden kann. Bei den SD-Ratten zeigte sich als physiologische Reaktion auf die exogene Leptinzufuhr eine verminderte kumulative Nah-

rungsaufnahme im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 7 B) sowie konsekutiv eine geringere Gewichtszunahme (Abb. 7 D). Diese Ergebnisse dienten als Grundlage für die Definition einer bestehenden Leptinsensitivität und ebenso für die Definition einer Leptinresistenz. Eine Leptinresistenz liegt dann vor, wenn es trotz erhöhter Leptinspiegel im Plasma zu einer Hyperphagie und Gewichtszunahme kommt. Bei leptinresistenten Individuen führt eine periphere Zufuhr von Leptin nicht zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme. Eine Leptinresistenz ließ sich bei den SD-Ratten bereits nach zweiwöchiger Fütterung mit Cafeteria-Diät nachweisen. Die Schlussfolgerung, dass eine periphere Leptinresistenz besteht, basiert auf dem Vorliegen einer Hyperleptinämie, welche positiv mit dem Körpergewicht und damit mit der Fettmasse korreliert ist (Abb. 11 B). Aus einer erhöhten Fettmasse wird also eine größere Menge an Leptin freigesetzt. Neben der vermehrten Leptinsekretion im Rahmen einer Adipositas erklärt das Vorliegen einer peripheren Leptinresistenz die erhöhten Plasmaspiegel (Abb. 11 A). Die Behandlung mit Telmisartan wirkte der Entstehung einer Leptinresistenz entgegen. Dies zeigte sich an geringerer Nahrungsaufnahme und reduziertem Körpergewicht trotz niedrigeren Plasmaleptins. Unterstützt wird diese Theorie durch die Tatsache, dass eine ähnliche Korrelation zwischen Plasmaleptin und Körpergewicht wie bei den Kontrollen vorlag (Abb. 11 B).

Als Hauptursache für die periphere Leptinresistenz wird in der Literatur ein verminderter Transport des Leptins über die Blut-Hirn-Schranke angenommen (Banks et al. 1999; Banks und Farrell 2003). Als Ursachen werden die Sättigbarkeit selektiver Leptintransporter, wobei es sich vermutlich um Splice-Varianten des Leptin-(Ob-Rb)-Rezeptors handelt (Banks et al. 1996), als auch eine verminderte Transportrate bei Hyperleptinämie zugrunde gelegt. Das bedeutet vermutlich, dass leptinresistente Individuen einen Defekt des Leptintransporters aufweisen. Dieser Defekt scheint am ehesten durch eine Gewichtszunahme erworben zu sein, da Banks et al. zeigen konnten, dass er durch eine Gewichtsabnahme reversibel ist (Banks und Farrell 2003). Verantwortlich für die verminderte Transportrate über die Blut-Hirn-Schranke im Rahmen einer Adipositas ist unter anderem eine Hypertriglyzeridämie, die auch unsere Arbeitsgruppe bei den Versuchstieren beobachten konnte (Banks et al. 2004; Miesel et al. 2010).

Von der beschriebenen peripheren Leptinresistenz ist die zentrale Leptinresistenz abzugrenzen, die auf Störungen im Signalweg des Leptins zurückzuführen ist. Dabei werden als mögliche Gründe eine verminderte Anzahl bzw. ein Defekt der Leptinrezeptoren im Hypothalamus oder auch eine defekte Signaltransduktion, beispielsweise über den JAK-2/STAT-3/SOCS-3- (Janus Kinase 2/ Signal Transducer and Activator of Transcription-3/ Suppressor of Cytokine Signalling-3) oder den PI-3K/PDE 3B/ cAMP-Signalweg angenommen (Phosphatidylinositol 3-Kinase/ Phosphodiesterase 3B/ cyclisches Adenosin-Monophosphat) (Sahu 2003; Sahu und Metlakunta 2005; Scarpace et al. 2001).

Ein weiterer möglicher Mechanismus der zentralen Leptinresistenz wäre die so genannte „zelluläre“ Leptinresistenz (Münzberg 2009). Hierbei wird vor allem die selektiv herabgesetzte Sensitivität in einzelnen hypothalamischen Subpopulationen von Leptinrezeptor (Ob-R)- tragenden Neuronen hervorgehoben. Ebenso wird eine schlechtere neuronale Vernetzung innerhalb des Leptinsignalweges beschrieben. So kann z.B. eine Störung innerhalb der leptinsensitiven Regelkreise eintreten, die vom Hypothalamus zu Neuronengruppen im kaudalen Hirnstamm projizieren, welche für die Integration des Sättigungsgefühls zuständig sind (Baskin et al. 2001).

Eine neuronale Vernetzung scheint zwischen peripherer und zentraler Wirkweise des Leptins zu bestehen, denn einige Ob-Rb- positive Neurone projizieren zur Eminentia mediana, wo sie vermutlich Kontakt zur Blut-Hirn-Schranke aufnehmen (Hakansson et al. 1998). Die Eminentia mediana gehört zu den zirkumventrikulären Organen, die fenestrierte Kapillaren zum Austausch über die Blut-Hirn-Schranke besitzen. Auch Levin sieht einen Zusammenhang zwischen der peripheren und der zentralen Leptinresistenz. Levin beschreibt einen defekten Signalweg zu Beginn einer Diät induzierten Adipositas (DIO). Die Downregulation der Leptin-Rezeptoren geht dabei einer verminderten Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke voraus (Levin et al. 2004).

Aufgrund der Hyperleptinämie ist aber am ehesten von einer peripheren Leptinresistenz auszugehen. Entsprechend ist die von uns gewählte periphere Applikation (s.c.) des Leptins zur Überprüfung der Leptinsensitivität unter Telmisartan gerechtfertigt und die zentrale intracerebroventrikuläre (i.c.v.) Gabe verzichtbar. Eine singuläre Leptinapplikation zeigte auch nach Variation von Dosierung und

Applikationsweise (i.p., i.v., s.c.) keine Auswirkung auf die Nahrungsaufnahme. Die in der Literatur beschriebene Reduktion der Nahrungsaufnahme infolge einer singulären Leptininjektion konnten wir nicht reproduzieren (Dryden et al. 1999; McAlister und Van Vugt 2004; Niimi et al. 1999; Proulx et al. 2002; Ruffin et al. 2004; Shapiro et al. 2008; Wetzler et al. 2004). Die Ergebnisse nach singulärer i.p., i.v. und s.c.-Applikation wurden in der Dissertationsschrift aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Erfolgreicher war die kontinuierliche Applikation über osmotische Minipumpen oder die wiederholte subcutane Injektion (Halaas et al. 1997; McAlister und Van Vugt 2004; Nishiyama et al. 1999; Pelleymounter et al. 1995; Wang et al. 1999; Wetzler et al. 2004). Gegen die Verwendung der Pumpen sprach für uns, dass die Ratten für die Implantation einer OP mit den assoziierten Risiken ausgesetzt gewesen wären. Auch setzt die Leptinfreisetzung direkt nach Implantation der Pumpe ein, also noch bevor die Tiere sich von der Operation erholt haben. Ein weiterer Nachteil ist, dass mit der Pumpe keinerlei tageszeitliche Spiegelschwankungen nachstellbar sind, denn nachts sinken die Leptinspiegel physiologischerweise um ca. 30% ab (Considine et al. 1996). Außerdem wird für die Füllung der Minipumpe sehr viel mehr Leptin benötigt, als es für das Spritzen notwendig war, was einen nicht unbedeutenden Kostenfaktor darstellt. Daher haben wir uns für die wiederholte subcutane Leptinapplikation entschieden. Als Grundlage für die Durchführung des LRT diente die Untersuchung der Leptin-Pharmakokinetik (Abb. 6). Nach subcutaner Applikation war der maximale Plasmaspiegel nach einer Stunde erreicht und blieb bis sieben Stunden post injectionem signifikant erhöht. Auf dieser Erkenntnis basierend wählten wir den Abstand von drei Stunden zwischen den einzelnen Injektionen. Das Leptin flutet also schnell an, wird dann zunächst rasch und im Verlauf langsamer wieder abgebaut. Die Wirksamkeit bleibt jedoch deutlich länger erhalten, wie sich anhand der über einen Zeitraum von 20 Stunden post injectionem reduzierten Nahrungsaufnahme nachweisen ließ (Abb. 7 B).

Im Leptinresistenztest (LRT) bestätigte sich die initial geäußerte Hypothese, dass Telmisartan die Entwicklung einer Leptinresistenz aufhalten kann. Insbesondere ließ sich die verbesserte Leptinsensitivität anhand der negativen Korrelation zwischen Plasmaleptin und Energieaufnahme nachweisen, während bei den Kontroll-

tieren eine positive Korrelation bestand (Abb. 20). In der Folge waren Energieaufnahme und Körpergewicht unter Telmisartan reduziert (Abb. 18 und 21). Die Leptinapplikation verstärkte diesen Effekt noch weiter. Aus der verminderten Expression der hypothalamischen Peptide MCH und PPO (Abb. 16) lässt sich schließen, dass der Transport des Leptins über die Blut-Hirn-Schranke intakt ist und bestärkt die Annahme, dass die AT_1 -Blockade in den zentralnervösen Regelkreis der Nahrungsaufnahme eingreift.

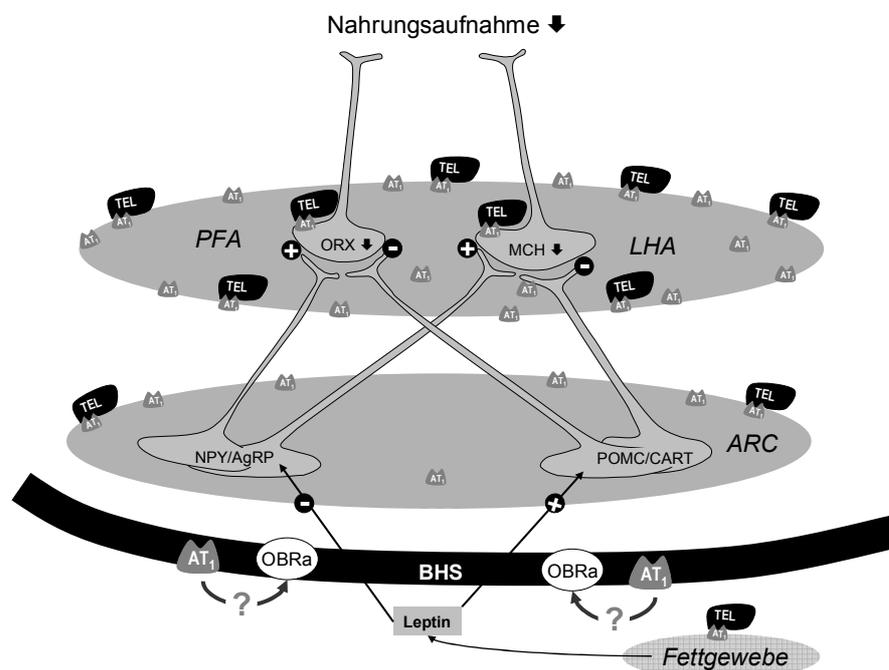


Abb. 34: Einflussnahme der AT_1 -Blocker auf den Regelkreis der Nahrungsaufnahme, bestehend aus Hypothalamus und Peripherie. Insulin und Leptin gelangen über die Blut-Hirn-Schranke und beeinflussen die hypothalamischen Nahrungspeptide. Die orexigenen Peptide ORX, MCH, NPY und AgRP werden durch Leptin und Insulin herunter, die anorexigenen Peptide POMC und CART herauf reguliert. In den Kerngebieten PFA, LHA und ARC werden neben Leptin- auch AT_1 -Rezeptoren exprimiert, sodass der AT_1 -Blocker Telmisartan in den genannten Gebieten und im Fettgewebe einen Angriffspunkt findet. Darüber hinaus werden AT_1 -Rezeptoren an der Blut-Hirn-Schranke (BHS) exprimiert, sodass hier ebenfalls eine Einflussnahme des Telmisartans denkbar ist. Diese Abbildung wurde modifiziert entnommen aus (Müller-Fielitz et al. 2011).

Neben der reduzierten Energieaufnahme als Ursache der Gewichtsabnahme war es ein Ziel, den Einfluss des Telmisartans auf den Energieverbrauch zu untersuchen. Die Thermogenese im braunen Fettgewebe hängt vornehmlich von der Aktivität des mitochondrialen Uncoupling Protein 1 (UCP-1) ab, das über oxidative

Phosphorylierung die Körpertemperatur der Ratten konstant hält (Palou et al. 1998; Ricquier und Bouillaud 2000). Das Leptin stimuliert die Aktivität der Uncoupling Proteine (Boss et al. 1997; Fleury et al. 1997; Gimeno et al. 1997; Gong et al. 1997). Unter Telmisartan-Therapie sowie bei genetisch bedingtem Fehlen des AT₁-Rezeptors wurden eine erhöhte rektale Körpertemperatur und ein erhöhter Sauerstoffverbrauch gemessen (Araki et al. 2006; Kouyama et al. 2005; Leite et al. 2006). Nach zentraler Applikation des Losartans wurde außerdem ein erhöhter Energieverbrauch registriert (Leite et al. 2007). Das erhöhte UCP-1 im braunen Fettgewebe als Marker für den gesteigerten Energieverbrauch konnten wir allerdings nicht nachweisen (Abb. 12). Demnach unterstützen unsere Daten nicht die Annahme eines erhöhten Energieverbrauchs unter Telmisartan. Am ehesten sind die Diskrepanzen auf ein unterschiedliches Studiendesign zurückzuführen, wie etwa die Verwendung von Ratten anstelle von Mäusen, kurzfristige vs. langfristige Behandlung mit Telmisartan oder die Bestimmung des Proteins im Western Blot anstelle der mRNA-Messung in der PCR. Allerdings ist auch zu betonen, dass die zitierten Studien keine reduzierte, sondern eher eine gesteigerte Energieaufnahme unter Telmisartan aufweisen (Araki et al. 2006; Kouyama et al. 2005). In der hier präsentierten Studie war die tägliche Energieaufnahme dagegen sowohl über den Behandlungszeitraum wie auch im LRT deutlich reduziert. Aus den teils widersprüchlichen Ergebnissen unserer und anderer Studien lässt sich schließen, dass die AT₁-Blockade je nach Spezies bzw. Studiendesign variabel in den Energiehaushalt eingreifen kann.

In weiterführenden Projekten wurde sich aber insbesondere der Frage nach einem veränderten Energieverbrauch zugewandt. So konnten Hübel et al. durch indirekte Kalorimetrie nachweisen, dass der respiratorische Quotient (RQ; respiratory exchange rate = RER) durch Telmisartan reduziert war, was auf einen gesteigerten Fettabbau hindeutet (Hübel et al. 2011).

Wir konnten nachweisen, dass die Leptinsensitivität durch Telmisartan verbessert ist; der zugrunde liegende Mechanismus bleibt dabei jedoch noch unklar. Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich zeigen, dass die anorektische Wirkung der AT₁-Blocker von einem intakten Leptinsignalweg abhängig ist (Müller-Fielitz et al. 2011). Im Rahmen einer DIO wird der Signalweg durch eine Störung des Leptin-

transports über die Blut-Hirn-Schranke unterbrochen (Levin et al. 2004). Hierbei handelt es sich um einen altersabhängigen Prozess (Levin et al. 2004), der entscheidend durch das Angiotensin II getriggert zu sein scheint (Wosik et al. 2007). Angiotensin II verhindert mittels Threonin-Phosphorylierung des tight-junction-Proteins Okkludin den Übertritt von im Blut zirkulierender Moleküle durch die Blut-Hirn-Schranke. Der Nachweis von AT₁-Rezeptoren in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke impliziert, dass es sich hierbei um einen AT₁-Rezeptor-vermittelten Mechanismus handelt. Entsprechend liegt die Vermutung nahe, dass eine verbesserte zentrale Wirksamkeit des Leptins unter AT₁-Blockade auf eine gesteigerte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke zurückzuführen sein könnte.

Es liegen allerdings inkonsistente Daten zur Wirkweise des Angiotensin II an der Blut-Hirn-Schranke vor. Eine Angiotensin II-Infusion verursacht eine verstärkte Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke sowie eine AT₁-Rezeptor-vermittelte Leckage aus cerebralen Mikrogefäßen, welches durch das Olmesartan reduziert wird (Pelisch et al. 2011; Vital et al. 2010). In Übereinstimmung damit, erhöht Epinephrin bei diabetischen Ratten die Durchlässigkeit der Gefäße in der Blut-Hirn-Schranke, dargestellt als Efflux von Evans-Blau-Albumin, während Candesartan dem entgegenwirkt (Awad 2006). Anhand dieser Daten erscheint es unwahrscheinlich, dass eine AT₁-Blockade zu einer verstärkten Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke beiträgt. Für das Angiotensin II ist aber eine Festigung der interzellularen Integrität der Blut-Hirn-Schranke über ein Rearrangement der tight junctions beschrieben (Wosik et al. 2007). Außerdem gelangt das Leptin über spezifische Transporter, die sich unter anderem im Plexus choroideus befinden, ins Gehirn (Chodobski und Szmydynger-Chodobska 2001). Im Plexus choroideus sind AT₁-Rezeptoren nachgewiesen worden (Jöhren und Saavedra 1996) und das Angiotensin II inhibiert in Kooperation mit dem sympathischen Nervensystem den Blutfluss in den choroidalen Mikrogefäßen (Chodobski und Szmydynger-Chodobska 2001). Eine Blockade der AT₁-Rezeptoren in dieser Lokalisation könnte also zu einer Zunahme des Blutflusses in den Kapillaren des Plexus choroideus und damit zu einem verstärkten Vordringen des Leptins zu seinem Hauptwirkort im Hypothalamus führen.

Es ist nicht bekannt, ob das Angiotensin II die Expression der Leptintransporter oder den Fluss über die Blut-Hirn-Schranke direkt beeinflusst. Genauso wenig ist

die genaue Interaktion der Signalwege des Leptins mit dem Angiotensin II bekannt.

Eine Interaktion zwischen den intrazellulären Signalwegen der AT₁-Blocker und des Leptins trägt vermutlich nicht zu einer Verbesserung der Leptinsensitivität bei. Der Leptinsignalweg umfasst die Aktivierung einer Janus Kinase 2-assoziierten Tyrosinkinase, die wiederum die ERK (Extrazelluläre Faktor-regulierte Kinase) und das STAT-3 stimuliert. Das phosphorylierte STAT-3 transloziert in den Zellkern, wo es die Transkription des SOCS-3 vermittelt. Über diesen Signalweg greift das Leptin inhibierend und aktivierend in die Expression des orexigenen NPY und MCH sowie des anorexigenen POMC ein. NPY-exprimierende Neurone befinden sich im lateralen Hypothalamus sowie im Nucleus arcuatus (Schwartz et al. 1996; Stephens et al. 1995). Die Neurone koexprimieren Leptinrezeptoren, sodass eine direkte Einflussnahme denkbar wäre (Mercer et al. 1996a). Ähnliches gilt für das POMC, welches ebenfalls mit dem Ob-Rb-Rezeptor koexprimiert wird (Elias et al. 1999; Spiegelman und Flier 1996). Es waren jedoch weder das NPY noch das POMC unter Telmisartan-Therapie verändert. Das Angiotensin II stimuliert ebenfalls die Expression von SOCS-3 (Torsoni et al. 2004; Velloso et al. 2006). Somit wäre zu erwarten, dass eine AT₁-Blockade eher zu einem Anstieg des MCH führt. Unsere Ergebnisse widerlegen diese Annahme jedoch eindeutig (Abb. 16). Auch in vorhergehenden Studien unserer Arbeitsgruppe konnte unter Verwendung von Candesartan ein Abfall des MCH beobachtet werden (Müller-Fielitz et al. 2011).

Möglicherweise ist die verbesserte Leptinsensitivität unter Telmisartan also nicht auf indirekte Effekte, sondern eher auf eine direkte Blockade der AT₁-Rezeptoren im Hypothalamus zurückzuführen. Diese Vermutung stützt sich auf die Beobachtung, dass nur eine Hochdosis der AT₁-Blocker über die Blut-Hirn-Schranke zum Hypothalamus gelangt (Culman et al. 1999; Seltzer et al. 2004).

AT₁-Rezeptoren sind unter anderem in dem zu den zirkumventrikulären Organen gehörigen Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT) und dem Subfornikalen Organ (SFO) nachgewiesen worden (Allen et al. 1998; Bunnemann et al. 1992; Jöhren et al. 1995). Am OVLT und SFO ist die Blut-Hirn-Schranke fenestriert. Somit ist hier ein Substanzübertritt erleichtert (Hartle und Brody 1984; Simpson 1981; Speth et al. 1985). Die Leptinrezeptoren wurden im Nucleus arcuatus (ARC), im dorsomedialen Hypothalamus (DMH), im Nucleus paraventricularis

(PVN), im ventromedialen Hypothalamus (VMH) und im lateralen Hypothalamus (LHA) identifiziert (Elmquist et al. 1999; Fei et al. 1997; Hetherington 1983; Mercer et al. 1996b). Zu den Regionen im Hypothalamus, die für die Regulation des Energiehaushalts zuständig sind, gehören vornehmlich der Nucleus arcuatus (ARC) und der laterale Hypothalamus (LHA) (Funahashi et al. 2003; Maffei et al. 1995a; Satoh et al. 1997). Genau genommen werden die AT₁-Rezeptoren aber weniger im Nucleus arcuatus als im lateralen Hypothalamus und perifornikal exprimiert (Lenkei et al. 1997). Im lateralen Hypothalamus befinden sich Neurone, die das orexigene Hormon Melanin Concentrating Hormone (MCH) exprimieren (Elias et al. 1999). Für das MCH wurde gezeigt, dass sowohl die Verabreichung als auch die Überexpression zu einer Hyperphagie und Gewichtszunahme führt. In Korrelation dazu sind MCH-defiziente Mäuse schlank und hypophag (Ludwig et al. 2001; Morens et al. 2005; Qu et al. 1996; Shimada et al. 1998).

Für eine Interaktion zwischen AT₁-Blocker und dem MCH bzw. dem PPO in den genannten Bereichen des Hypothalamus spricht die Involvierung des Melanocortin-Systems. Das Melanocortin-System umfasst neben dem MCH das anorexigene α -MSH, dessen Vorläufermolekül POMC und den im LHA lokalisierten Melanocortin 4-Rezeptor, an welchem beide Peptide wirken (Kawano et al. 2002). Die Bedeutung des Melanocortin-Systems für den Energiestoffwechsel zeigt sich anhand eines genetischen Defekts des Melanocortin 4-Rezeptors, der zu Adipositas führt (Huszar et al. 1997). Neben dem MCH konnten wir auch für das PPO eine reduzierte Expression unter Telmisartan nachweisen (Abb. 16). Leptin-Rezeptoren werden zwar mit Orexin-, nicht aber mit MCH-Rezeptoren im lateralen Hypothalamus koexprimiert (Funahashi et al. 2003; Louis et al. 2010), was dafür sprechen könnte, dass die MCH-Sekretion durch das Orexin stimuliert wird (van Dijk et al. 2011). α -MSH immunoreaktive Neurone projizieren zu MCH- und Orexin-positiven Neuronen (Nahon 2006). Trotz alledem wurde für den ACE-Hemmer Captopril eine Blockade der akuten α -MSH-Effekte auf die Aldosteron-Freisetzung in den Nebennieren, nicht aber im Hypothalamus gezeigt (Nussdorfer et al. 1986). Eine sichere Evidenz für eine klare Interaktion zwischen Angiotensin II und der MCH-Expression im Hypothalamus besteht jedenfalls bislang nicht.

Hingegen könnte der inhibitorische Effekt der Glukokortikoide auf das Leptin eine Rolle in der beobachteten Verbesserung der Leptinsensitivität unter Telmisartan spielen (Bornstein et al. 1997; Ishida-Takahashi et al. 2004; Jang et al. 2000). Die zentrale Applikation von Glukokortikoiden induziert sowohl eine Adipositas als auch eine Hyperleptinämie (Zakrzewska et al. 1999). Dabei wirken Glukokortikoide sowohl zentral als auch peripher hemmend auf das Leptin und seinen Signalweg (Madiehe et al. 2001). Diese Annahme unterstützend, führt eine Adrenalektomie zu einer Abnahme des zirkulierenden Leptins. Eine Zufuhr an Corticosteron führt dann wieder zu einem Anstieg der Plasmaspiegel auf das Kontrollniveau der Sham-operierten Tiere (Spinedi und Gaillard 1998). Gleichzeitig ist die Wirksamkeit von appliziertem Leptin erhöht (Gemmill et al. 2003). Eine Adrenalektomie hatte außerdem eine schnellere Reaktion der hypothalamischen Peptide (z.B. NPY) nach Leptinapplikation zur Folge (Jang et al. 2000).

Für Nagetiere wurde gezeigt, dass eine Adipositas regelhaft mit Hypercortisolismus, einer Hyperreaktivität der HPA-Achse und einer erhöhten Cortison-Ausscheidung über 24 Stunden einhergeht (Cunningham et al. 1986; Guillaume-Gentil et al. 1990). Ob eine Regulation durch das Telmisartan erfolgt, muss in weiteren Studien untersucht werden. Eine Leptinresistenz führt aber zu einer HPA-Achsen-Hyperreaktivität, wie es für die genetisch leptinresistenten Zuckerratten gezeigt worden ist (Bornstein et al. 1997; Boustany et al. 2004; Chen et al. 1996; Miesel et al. 2011; Müller et al. 2007; Raasch et al. 2006). Die Hemmung der HPA-Achsen-Aktivität mittels AT₁-Blockade könnte also einen günstigen Einfluss auf das Ansprechen der Peptide ausüben und somit zu einer verbesserten Leptinwirksamkeit beitragen.

Angiotensin II steigert die Reaktivität der HPA-Achse und eine AT₁-Blockade reduziert sie nachgewiesenermaßen (Miesel et al. 2011; Müller-Fielitz et al. 2011; Pavlatou et al. 2008; Raasch et al. 2006). Im Hinblick auf die genannten Erkenntnisse sowie der Tatsache, dass AT₁-Rezeptoren im Hypothalamus, in der Hypophyse und in den Nebennieren lokalisiert sind, ist es wahrscheinlich, dass die verminderte Reaktivität der HPA-Achse zu der verbesserten Leptinsensitivität unter Telmisartan beiträgt. Allerdings haben wir im Rahmen unserer Untersuchungen keine Befunde erhoben, die eine derartige These verifizieren oder widerlegen.

Neben der zentralen AT₁-Blockade tragen vermutlich auch die peripher gehemmten Angiotensin II-Aktionen zu einer verbesserten Leptinsensitivität bei. Dafür spricht, dass Angiotensin II die Freisetzung des Leptins aus den Adipozyten induziert (Cassis et al. 2004; Kim et al. 2002; Zorad et al. 2006) und Telmisartan das Plasmaleptin signifikant senkt (Abb. 11 A). Außerdem existiert neben dem systemischen RAAS noch ein so genanntes lokales RAAS im Fettgewebe, welches in den genannten Vorgängen eine Rolle spielen könnte (Engeli et al. 2000; Giacchetti et al. 2000). Denn nachgewiesenermaßen ist das Angiotensin II bei Adipösen im Plasma und im Gewebe erhöht (Müller et al. 2007; Van Harmelen et al. 2000), was durch eine Gewichtsabnahme reversibel ist (Engeli et al. 2005). Unter AT₁-Blockade sind die Angiotensin II-Spiegel dahingehend nicht verwertbar, da sie kompensatorisch ansteigen. Die auf ca. das 10-fache angestiegene Angiotensin II-Konzentration unter Telmisartan signalisiert die effektive Blockade des AT₁-Rezeptors (Abb. 14).

Angiotensin II wirkt darüber hinaus trophisch auf das weiße Fettgewebe, indem es die Differenzierung der Adipozyten stimuliert (Darimont et al. 1994; Saint-Marc et al. 2001; Zorad et al. 2006). Eine Blockade der AT₁-Rezeptoren führt in der Konsequenz zu einer verminderten Fettmasse (Miesel et al. 2011; Müller-Fielitz et al. 2011; Van Harmelen et al. 2000; Zorad et al. 2006). Damit einhergehend ist die Menge der Adipozyten zur Leptinproduktion verringert, was sowohl das niedrigere Plasmaleptin als auch die geringere Gewichtszunahme der Tiere unter Telmisartan erklärt (Müller-Fielitz et al. 2011; Zorad et al. 2006). Es gibt aber auch gegenteilige Angaben in der Literatur (Janke et al. 2002; Massiera et al. 2001). Janke postuliert, dass das Angiotensin II die Differenzierung der Adipozyten unterdrückt. Die Arbeitsgruppe geht hierbei von einer negativen Rückkopplung der maturen Adipozyten auf die Differenzierung von Präadipozyten aus. Die hierbei zu erwartende Gewichtszunahme widerspricht jedoch unseren Ergebnissen. Im Gegenteil nahmen die SD-Ratten unter Telmisartan weniger an Gewicht zu (Abb. 8). Für die AT₁-Antagonisten wurde eine Reduktion der sympathischen Aktivität gezeigt, was über die Blutdrucksenkung Auswirkungen auf das Körpergewicht haben könnte (Sasaki et al. 1999). Dies ist jedoch nicht der Fall, sondern die metabolischen Effekte des Telmisartans sind trotz hoher Dosierung blutdruckunabhängig. Als Beweis dieser Aussage fand sich unter Telmisartan keine Veränderung des

Blutdrucks (Abb. 13 A), mit Candesartan erhobene Daten bestätigen diese Aussage (Müller-Fielitz et al. 2011).

4.2 Energieaufnahme und -verbrauch unter CD

Unter CD zeigte sich im Vergleich zur Standarddiät eine Hyperphagie, dargestellt als gesteigerte körpergewichtsbezogene Nahrungsaufnahme (Abb. 10 A und 24). Ebenso korreliert die geringere Gewichtszunahme unter Telmisartan mit der reduzierten Nahrungsaufnahme (Abb. 10 B).

Hierbei war nicht nur die Menge, sondern auch die Präferenz in der Zusammensetzung der Nahrung verändert. Die unbehandelten Tiere zogen die Cafeteria-Diät eindeutig der Standarddiät vor (Abb. 9 und 23 B). Unter Telmisartan war die Präferenz hingegen eher in Richtung der Standarddiät verschoben (Abb. 9). An der gesteigerten Kalorienzufuhr im Vergleich zur ausschließlich mit Standarddiät gefütterten Gruppe (Abb. 23 A und B) trug entscheidend die Tatsache bei, dass alle Versuchstiere zwischen CD und Standarddiät wählen konnten. Dies entspricht eher der Alltagssituation beim Menschen als das reine Angebot an hochkalorischer Nahrung (Kral et al. 2004; Rolls et al. 2002). In anderen Studien wurden andere hochkalorische, dabei aber weniger schmackhafte Diäten oder ausschließlich eine Cafeteria-Diät angeboten (Bayol et al. 2005; Chaves et al. 2006; Chen et al. 2008; Garcia-Diaz et al. 2007; Groubet et al. 2003; Zorrilla et al. 2004).

Die Cafeteria-Diät löst vermutlich eine Gier auf das hochkalorische Futter aus. Vom Nucleus accumbens aus werden über die Gammaaminobuttersäure (GABA) Motivation und Hedonie vermittelt. Diese Gefühle zeigen möglicherweise Auswirkungen auf das Fressverhalten von Ratten (Faure et al. 2010). Die Expression der AT₁-Rezeptoren im Hippocampus (Haas et al. 1980; Jöhren et al. 1995; Palovcik und Phillips 1984) lässt eine Beteiligung an emotionalen Vorgängen im limbischen System, wozu auch das Belohnungszentrum zählt, vermuten (von Bohlen und Halbach und Albrecht 2006). Außerdem wirkt Angiotensin II am Hippocampus überwiegend erregend (Palovcik und Phillips 1984). Das Verlangen, sofern es quantifizierbar ist, scheint im Vergleich zur Kontrollbehandlung deutlich reduziert

zu sein. Denkbar ist ein leptingesteuerter Mechanismus über Serotonin- (5-HT) Rezeptoren (Clark et al. 2006; Elmquist et al. 1997; Spiegelman und Flier 1996) und andere über das Angiotensin II stimulierte Neurotransmitter wie das Noradrenalin (Camacho und Phillips 1981; Severs und Daniels-Severs 1973). Eine Assoziation mit der HPA-Achse wird u.a. bei Miesel et al. bestätigt (Dallman et al. 2007; Miesel et al. 2011), in der vorliegenden Dissertationsschrift liegen jedoch weder Beweise für noch wider diese Theorie vor.

Energieverbrauch

Die Gewichtszunahme ist eng mit dem Energieverbrauch verknüpft, den wir anhand der physischen Aktivität gemessen haben. Dabei waren die hochkalorisch gefütterten SHR über den gesamten Untersuchungszeitraum aktiver als die Kontrollen (Abb. 26 und 27). Die verstärkte Aktivität der dicken Tiere widerspricht zunächst einmal den Beobachtungen an adipösen Menschen, bei denen von einem Bewegungsmangel ausgegangen wird. Für übergewichtige Kinder ist allerdings zum Teil sogar eine Hyperaktivität beschrieben, die sich meist als Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Syndrom (ADHS) äußert (Braet et al. 2007; Davis 2010; Holtkamp et al. 2004). Bei ausgeprägtem Übergewicht ist jedoch die eingeschränkte Beweglichkeit durch die Fettmasse sowie die höhere Belastung durch das eigene Körpergewicht in Betracht zu ziehen. Die Hypoaktivität adipöser Menschen wird neben der Diät induzierten Adipositas durch den physiologischen Alterungsprozess hervorgerufen (Tou und Wade 2002). In Bezug auf das Alter haben wir keinen Unterschied im Aktivitätslevel erkennen können. Die letzte Aktivitätsmessung ist allerdings im Alter von ca. einem Jahr, d.h. vor Erreichen des Höchstalters, durchgeführt worden. Insgesamt liegen bisher noch weitgehend ungeklärte Zusammenhänge zwischen den einzelnen die Aktivität betreffenden Faktoren vor. Es wird aber diskutiert, dass das Gewicht einen kritischen Wert über- oder unterschreiten muss, um die Aktivität zu beeinflussen (Tou und Wade 2002). Tou schließt daraus, dass die physische Aktivität eher als eine Folge des Körpergewichts und weniger als mitwirkender Faktor zu bewerten ist. Die SHR neigen nicht zu einer ausgeprägten Gewichtszunahme. Somit kann angenommen werden, dass die SHR, ähnlich den übergewichtigen Kindern, aufgrund des höheren Energieangebots eher zu einer gesteigerten Aktivität tendieren.

Darüber hinaus führt die bei den übergewichtigen Ratten nachgewiesene Hyperleptinämie (Abb. 29 E) möglicherweise zu einem vermehrten Energieverbrauch, da Leptin einen erhöhten Sauerstoffverbrauch sowie die Steigerung der körperlichen Aktivität bewirkt (Pellemounter et al. 1995). Dem widersprechend wurde jedoch anderweitig eine inverse Beziehung zwischen Leptin und physischer Aktivität postuliert (Tou und Wade 2002). Für andere Rattenstämme, wie etwa die SD-Ratten, wurde keine Veränderung der körperlichen Aktivität durch eine Hyperleptinämie gesehen (Brownlow et al. 1996; Miesel et al. 2010; Roberts et al. 2002). Die Hyperaktivität der übergewichtigen SHR konnte allerdings bereits wiederholt in den Studien der Arbeitsgruppe demonstriert werden (Miesel et al. 2010). Die für die SHR gezeigte Hyperphagie trotz Hyperleptinämie lässt auf eine Leptinresistenz schließen. Da Leptin die körperliche Aktivität nach Passage der Blut-Hirn-Schranke im Hypothalamus beeinflusst (Choi et al. 2008), bleibt unklar, ob die Hyperaktivität tatsächlich als Folge der Hyperleptinämie gesehen werden kann.

Eine Hyperleptinämie beeinflusst außerdem den Blutdruck. So hat eine chronische Leptininfusion einen Anstieg des Blutdrucks und der Herzfrequenz zur Folge (Aizawa-Abe et al. 2000; Shek et al. 1998). In Übereinstimmung mit klinischen Erfahrungen (Masuo et al. 2000), konnten wir parallel zur Gewichtszunahme unter CD einen Anstieg des Blutdrucks bei den hyperleptinämischen SHR beobachten (Abb. 28 A). Im Unterschied zu den SD ist für SHR eine Sympathikushyperaktivität beschrieben (Cabassi et al. 1998; Herring et al. 2011), worauf die verstärkte körperliche Aktivität möglicherweise zurückzuführen ist. Da die renale Sympathikusaktivität (SNA) nachgewiesenermaßen von der Leptinresistenz unbeeinflusst bleibt (Rahmouni et al. 2005), trägt die Hyperleptinämie zur Genese des Adipositas induzierten Hypertonus bei (Aneja et al. 2004). Es handelt sich also offenbar um eine selektive Leptinresistenz, da die SNA lumbal und im braunen Fettgewebe herabgesetzt ist (Rahmouni et al. 2005). Der Blutdruckanstieg könnte auf erhöhtes Angiotensin II im Plasma (Miesel et al. 2010) oder auch auf Aldosteron zurückzuführen sein, für das eine starke Assoziation mit der Adipositas induzierten Hypertonie gezeigt worden ist (Lamounier-Zepter et al. 2004; Müller-Fielitz 2011). Schließlich kommt auch eine verminderte vaskuläre Relaxation als Ursache der Hypertonie in Betracht, die für hochkalorisch gefütterte Zucker-, SH- und Wistar-

Ratten nachgewiesen wurde (Bourgoin et al. 2008; Fatani et al. 2007; Knight et al. 2008; Oltman et al. 2005).

Trinkverhalten

Das Angiotensin II ist neben den bereits genannten Aspekten auch für die Regulation des Trinkverhaltens verantwortlich. Es stimuliert zentral die Ausschüttung von Vasopressin und führt so peripher zu einer Wasser- und Natriumretention sowie zu Durst (Fitzsimons 1980; Ribeiro-Oliveira et al. 2008; Severs und Daniels-Severs 1973). Die AT₁-Blockade müsste demnach eigentlich die Wasseraufnahme reduzieren. Dazu passend hat die Arbeitsgruppe um Gohlke das komplette Einstellen des Angiotensin II getriggerten Trinkens nach Telmisartan-Applikation beobachtet (Gohlke et al. 2001). Diese Daten widersprechen unseren Beobachtungen, denn bei den SD-Ratten war das Gegenteil der Fall (Abb. 15). Die zentrale Applikation von Angiotensin II führt aber zu einer Natriurese und damit auch zu einer Diurese (Avrith und Fitzsimons 1980; Brooks und Malvin 1982). Der diuretische Effekt könnte somit eine kompensatorische Wasseraufnahme zur Folge haben.

Über die Telmisartan induzierte Reduktion der MCH-Expression könnte möglicherweise der Flüssigkeitshaushalt beeinflusst werden, da MCH an der Aufrechterhaltung der Flüssigkeitshomöostase beteiligt ist (van Dijk et al. 2011).

Am ehesten ist die Wasseraufnahme der Ratten aber offenbar von der Zusammensetzung der Nahrung abhängig. Eine überwiegende Aufnahme von Standarddiät, sei es als Kontrolldiät oder unter Telmisartan, führte zu einer verstärkten Wasseraufnahme (Abb. 15 und 25). Dieser Umstand lässt sich am ehesten auf den geringeren Wasseranteil des Standardfutters im Vergleich zur CD zurückführen.

4.3 Einfluss der CD auf die Entwicklung einer Insulinresistenz

Unter CD nahm neben der arteriellen Hypertonie (Abb. 28 A) auch die Insulinresistenz weiter zu, die sich anhand des leicht erhöhten Blutzuckers und des verdoppelten Insulins zeigt (Abb. 29 A und C). Unsere Ergebnisse stimmen hier mit anderen Studien überein, die ebenfalls einen marginalen oder auch gar keinen Anstieg des Blutzuckers bei gleichzeitig verdoppeltem Plasmainsulin in Folge von verschiedenen hochkalorischen Diäten beschreiben (Chaves et al. 2006; Chen et al. 2008; Garcia-Diaz et al. 2007; Oron-Herman et al. 2008; Shapiro et al. 2008). Unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass Bluthochdruck und Insulinresistenz sich gegenseitig bedingen. So lässt sich die Insulinresistenz in besonderem Maße auf eine veränderte hämodynamische Situation im peripheren Gefäßbett zurückführen (Baron et al. 1993; Wiernsperger 1994), wobei vor allem die verminderte Durchblutung der Muskulatur im Rahmen einer Hypertonie eine Rolle spielt. Eine Hyperinsulinämie begünstigt wiederum in genetisch prädisponierten Individuen die Entstehung einer Hypertonie (Bursztyń 1996). Die Hyperinsulinämie ist hier als Ausdruck einer Insulinresistenz zu werten. Die Gewichtszunahme unter CD (Abb. 22) ist neben anderen Faktoren auf die Hyperinsulinämie zurückzuführen, da das Insulin physiologischerweise ein anabol wirkendes Hormon ist (Bereket et al. 1999). Übergewicht beeinflusst wiederum definitiv die Insulintoleranz im peripheren Gewebe. Hieran ist unter anderem das Leptin beteiligt, unabhängig von den Effekten auf die Nahrungsaufnahme. Die mit einer Adipositas assoziierte Leptinresistenz trägt umgekehrt auch zu der Entstehung einer Insulinresistenz bei. Hinzu kommt eine Hypertriglyzeridämie, die auch für SHR unter CD beschrieben worden ist (Miesel et al. 2010). Die unter Leptinresistenz auftretende Lipotoxizität könnte die pathogenetische Grundlage für die Entstehung eines Diabetes mellitus Typ II im Rahmen des Metabolischen Syndroms bilden (Correia und Rahmouni 2006). Einen manifesten Diabetes mellitus Typ II entwickelten die SHR über ihre Lebenszeit nicht. Die diagnostische Grenze für einen Diabetes wurde nicht überschritten, obwohl der Blutzucker bis maximal 20 mg/dl über das Kontrollniveau erhöht war (Abb. 29 A). Gegenregulatorisch war das Glukagon unter CD signifikant niedriger

(Abb. 29 B) (Kanazawa et al. 1997). Ein Diabetes mellitus ist definiert als ein Nüchtern-Blutzucker >126 mg/dl oder einen Zwei-Stunden-Wert im OGTT von >200 mg/dl. Bei Gesunden sollte der HOMA-Index ≤ 1 liegen, ein Wert >2 deutet auf eine Insulinresistenz hin, ab $>2,5$ ist sie wahrscheinlich und ein Typ II-Diabetiker weist einen Index von ≥ 5 auf.

In Übereinstimmung mit den vorhergehenden Studien unserer Arbeitsgruppe (Miesel et al. 2010) konnten wir bereits nach drei Monaten eine gestörte Glukosetoleranz unter CD nachweisen (Abb. 30-32). Die gestörte Glukosetoleranz machte sich über eine verstärkte Insulinantwort infolge einer Glukosebelastung und eine reduzierte Glukoseutilisation nach Insulinapplikation bemerkbar (Abb. 30 und 32). Die Glukoseutilisation war nach der Insulingabe im ITT bis zu 40 min post injectionem (p.i.) unverändert, danach jedoch über mindestens drei Stunden reduziert (Abb. 32 A). Passend hierzu erfolgte bei den CD-gefütterten SHR nach oraler Glukoseapplikation im OGTT zusätzlich zu der Primärantwort des Insulins ein zweiter Anstieg nach 40 min p.i.. Das Vorliegen einer Insulinresistenz konnte zudem durch den im Schnitt >2 erhöhten HOMA-Index bestätigt werden (Abb. 31).

Die genannten Veränderungen der Glukoseutilisation sind vermutlich auf folgende Mechanismen zurückzuführen:

Als erstes spielt die verstärkte Insulinsynthese eine Rolle, die anhand des tendenziell, wenn auch nicht signifikant, erhöhten C-Peptids (Abb. 29 D) erkennbar ist. Das C-Peptid stellt dabei einen validen Marker für die Pankreasfunktion dar (Horwitz et al. 1977; Moran et al. 1991). Die verstärkte und wiederholte Insulinantwort auf die Glukosebelastung ist hingegen als Ausdruck einer gestörten β -Zell-Funktion zu werten. Außerdem spricht die reduzierte Glukoseutilisation, trotz ähnlicher Insulinspiegel 15 min p.i. für eine veränderte Insulinbindung oder -signalgebung. Eine herabgesetzte Bindung an den Insulinrezeptor wurde zwar beschrieben (Kwok et al. 1989), aber bei SHR unter CD war die Insulinrezeptor-Expression im Fettgewebe und in der Skelettmuskulatur unverändert (Miesel et al. 2010), sodass eine Störung in der Insulinsignalgebung wahrscheinlicher erscheint (Musi und Goodyear 2006). Bewegung verbessert die Insulinwirkung am Rezeptor und somit auch die Glukoseaufnahme ins Gewebe (LaPier et al. 2001). Die bei den übergewichtigen SHR beobachtete Hyperaktivität stellt also möglicherweise eine wirksame Prävention vor einem Diabetes dar. Diesen Umstand unterstützend

war das Adiponectin unter CD nicht signifikant erniedrigt (Abb. 29 F). Da Adiponectin insulinsensitivierend ist und eine protektive Funktion auf das kardiovaskuläre System ausübt (Diez und Iglesias 2003), könnte das Adiponectin also dazu beigetragen haben, dass sich kein Diabetes entwickelt hat.

Die Glukosetoleranz veränderte sich im Laufe des Lebens der Versuchstiere nicht grundlegend. Über einen Zeitraum von insgesamt 10 Monaten blieb es bei einem prädiabetischen Stadium. Sicherlich spielt dabei die Lebenszeit der Tiere eine Rolle. Für den Menschen ist es gezeigt, dass dem manifesten Diabetes ein jahre-, manchmal jahrzehntelanges prädiabetisches Stadium vorausgeht (Nguyen et al. 2010). Entsprechend ist es vorstellbar, dass die SHR nicht alt genug werden, um dieses Stadium zu erreichen. Dem widerspricht aber das Vorkommen eines „Altersdiabetes“ bei Kindern (Adams und Lammon 2007). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit findet sich in dem Rattenmodell SHR. Für die SHR ist der Nicht-Insulin-abhängige Diabetes mellitus (NIDDM) bisher nicht beschrieben. Für junge SHR wird sogar eine β -Zell-Überfunktion und damit eine überzogene Insulinantwort auf eine Glukosebelastung postuliert (Iwase et al. 1994). Zu erwarten wäre die Erschöpfung der β -Zellen im Laufe des Rattenlebens. Offensichtlich normalisiert sich die Pankreasfunktion jedoch und hält dann ein konstantes Leistungsniveau. Dazu passend wurde für normalgewichtige SHR gezeigt, dass die Glukosetoleranz im Alter nicht wesentlich abnimmt, während der Hypertonus bestehen bleibt (Iwase et al. 1994; Natalucci et al. 2003). Unsere Daten bestätigen diese Beobachtung auch für übergewichtige SHR.

4.4 Einfluss der CD auf die Mortalität von SHR

Die mit der Insulinresistenz und der Hypertonie einhergehenden metabolischen Veränderungen beeinflussen die Lebenserwartung der SHR.

Die höhere Morbidität und Mortalität des Metabolischen Syndroms ist im Wesentlichen auf eine viszerale Adipositas zurückzuführen (Bjorntorp 1993; Chrousos

2000). Die Symptome des Metabolischen Syndroms, wie die Leptinresistenz und die Hypertriglyzeridämie stellen die wichtigsten kardiovaskulären Risikofaktoren dar, weil sie an der Genese der Arteriosklerose beteiligt sind (Munro und Cotran 1988). Als entscheidender Risikofaktor kommt die unter CD ausgeprägtere arterielle Hypertonie hinzu (Abb. 28 A). Die Hypertonie sowie die erhöhte Herzfrequenz der übergewichtigen Tiere (Abb. 28 B) sind Zeichen eines erhöhten Stressniveaus bei HPA-Achsen-Hyperaktivität (Boustany et al. 2004).

Die höhere Mortalität unter CD lässt sich auf die arteriosklerotisch bedingten kardiovaskulären Erkrankungen zurückführen (Chrousos 2000). Hierzu gehören im Wesentlichen der Myokardinfarkt und der ischämische Hirninfarkt, wobei es sich auch um die wahrscheinlichsten Todesursachen der SHR handelt. SHR sind durch ihre massive Hypertonie sehr viel stärker als andere Rattenstämme gefährdet, an einer kardiovaskulären Ursache zu versterben, denn eine relevante Folge des chronisch erhöhten Blutdrucks ist eine myokardiale Hypertrophie (Miesel et al. 2010), die letztendlich zum Herztod führt (Harzheim et al. 2010). Die schlanken SHR weisen offenbar trotz des ebenfalls sehr hohen Blutdrucks ein geringeres kardiovaskuläres Risiko auf. Welche der genannten Risikofaktoren letztendlich eine prädiktive Bedeutung hinsichtlich der Mortalität besitzen, ist bislang noch umstritten (Barr et al. 2010). Sicher ist jedoch, dass die Risikofaktoren sich mit zunehmender Anzahl potenzieren, wobei dem Übergewicht eine zentrale Stellung zukommt (Alkerwi et al. 2010; Franks et al. 2010).

Die Studie war zunächst nicht auf die Lebenserwartung als primärem Endpunkt ausgerichtet. Entsprechend war die Anzahl der Tiere zum Ende der Studie zu gering, um signifikante Ergebnisse zu erzielen. Dennoch war die Tendenz zu einem früheren Tod unter CD zu erkennen: So lebten noch 12,5% der Kontrolltiere (n=2) zum Zeitpunkt, an dem alle Tiere unter CD tot waren (Abb. 33).

4.5 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsschrift unterstreichen die Bedeutung des RAAS in der Genese des Metabolischen Syndroms.

Von entscheidender Bedeutung ist die Erkenntnis, dass die Inhibition von AT₁-Rezeptoren zu einer verbesserten Leptinsensitivität führt. Damit eröffnet sich eine neue Therapiemöglichkeit im Behandlungskonzept des Metabolischen Syndroms. Insbesondere, da für die AT₁-Blocker (hier das Valsartan) bereits antiinflammatorische und lipidsenkende Effekte zusätzlich zu der bekannten antihypertensiven Wirkung gezeigt werden konnten (Kintscher et al. 2010).

Zusammenfassend lassen sich unsere Beobachtungen auf eine verbesserte Leptinsensitivität zurückführen: Die verringerte Nahrungsaufnahme, das niedrigere Körpergewicht und der reduzierte Anstieg des Plasmaleptins. Beweisen konnten wir die verbesserte Leptinsensitivität im Leptinresistenztest. Unsere Ergebnisse erwecken die Hoffnung, dass die AT₁-Inhibitoren einen wesentlichen Beitrag zu einem umfassenden Therapiekonzept des Metabolischen Syndroms leisten können. Die blutdrucksenkenden, insulinsensitivierenden, antiinflammatorischen, gewichtsreduzierenden und stoffwechselbalancierenden Auswirkungen des Telmisartans sind bereits gezeigt worden (Culman et al. 2002; Kamari et al. 2008; Kintscher et al. 2010; Pavlatou et al. 2008; Zorad et al. 2006). Wir bestätigen die gewichtsreduzierenden Eigenschaften und zeigen nun die verbesserte Leptinsensitivität unter Telmisartan.

Bei der hier vorgestellten Leptinresistenz handelt es sich um eine Diät induzierte, was uns dem Patientenmodell einen entscheidenden Schritt näher bringt als es bisher anhand der genetisch leptinresistenten Zucker-Ratte möglich war (Müller-Fielitz et al. 2011). Sowohl die SHR als auch die SD-Ratten stellen ein geeignetes Tiermodell zur Verkörperung des Metabolischen Syndroms dar. Allerdings erfüllen beide nicht alle Anforderungen perfekt. Die SHR entwickeln eine Diät induzierte Adipositas und eine Insulinresistenz. Die Adipositas nahm aber unter dauerhaftem Angebot von CD nicht massiv zu und es entstand kein Diabetes mellitus Typ II. Daher entschieden wir uns erst während der laufenden Studie zur Untersuchung der Lebenserwartung, weswegen zum Ende der Studie keine signifikant erhöhte Mortalität unter Cafeteria-Diät nachweisbar war. Die Tendenz zum früheren Tod zeigte sich jedoch deutlich. Wir konnten außerdem Erkenntnisse hinsichtlich des metabolischen Alterungsprozesses der SHR gewinnen. Für die Zukunft wäre es interessant, eine ähnliche Studie unter Verwendung der SD-Ratte durchzuführen.

SD neigen weitaus eher zur Ausbildung einer massiven Adipositas und gegebenenfalls auch zu einem Diabetes. Dafür exprimieren SD keinen Adipositas induzierten Hypertonus. Durch die Verwendung unterschiedlicher Tiermodelle lassen sich also insgesamt neue Erkenntnisse zur Pathogenese des Metabolischen Syndroms gewinnen.

Kritisch anzumerken ist, dass wir die Therapie mit dem AT₁-Inhibitor parallel mit der hochkalorischen Diät begonnen haben, was nicht der Situation am Patienten entspricht. Wir haben bisher also nur präventiv gearbeitet und einer entstehenden Adipositas und Leptinresistenz entgegengewirkt. In der Zukunft muss gezeigt werden, ob die AT₁-Blockade zur Reduktion eines bestehenden Übergewichts und zur Besserung einer manifesten Leptinresistenz geeignet ist. Auch die Dauerhaftigkeit der positiven Auswirkungen einer AT₁-Blockade muss in weiteren Studien untersucht werden. Derzeit wird in unserer Arbeitsgruppe eine Studie durchgeführt, die folgende Fragen beantworten soll:

- Führt die AT₁-Blockade zur Reduktion eines bereits bestehenden Übergewichts?
- Ist die Auswirkung auf das Körpergewicht und die Nahrungsaufnahme von längerfristiger Dauer?
- Wird die bereits bestehende Leptinresistenz verbessert?
- Wie äußern sich die metabolischen Auswirkungen des Telmisartans hinsichtlich des Energieverbrauchs, wenn nicht durch Regulation der UCP?
- Hat die Applikation von Leptin einen Einfluss auf die Regulation der Nahrungspeptide?

Um die klinische Relevanz unserer Ergebnisse besser beurteilen zu können, müssen die bislang noch nicht fertig gestellten Ergebnisse abgewartet werden. Es zeigte sich jedoch bereits ein positiver Effekt auf ein bestehendes Übergewicht, der über Monate nachweisbar blieb (Hübel et al. 2011). In Zusammenschau mit den Ergebnissen von Kintscher et al. ist vor allem ein positiver Effekt für kardiovaskuläre Hochrisikopatienten zu erwarten (Kintscher et al. 2010).

Darüber hinaus wird es nötig sein, mechanistische Untersuchungen durchzuführen. Viele Signalwege und Mechanismen unterliegen bislang lediglich Vermutungen. Beispielsweise sind die Cortisonspiegel unter Telmisartan von Interesse, um die Relevanz der HPA-Achse in der Genese der Leptinresistenz zu untersuchen. Ebenso könnten die Triglyzeride im Plasma Aufschluss über die Okklusion der Blut-Hirn-Schranke geben. Entsprechend bleiben im Bereich der zentralen Regulation des Körpergewichts und der Nahrungsaufnahme bis jetzt noch viele Fragen offen.

5 Zusammenfassung

Das Metabolische Syndrom (MetS) mit seinen Symptomen Adipositas, Bluthochdruck, Insulin- und Leptinsensitivität ist mit einem hyperreaktiven Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) vergesellschaftet. Die Adipositas steht hierbei im Zentrum des Symptomkomplexes. So galt es zu untersuchen, ob eine hochkalorische Diät zur Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ II sowie zu einer reduzierten Lebenserwartung führt und ob eine AT₁-Rezeptorblockade die Leptinsensitivität beeinflusst. Für die erste Fragestellung wurden Spontan Hypertensive Ratten (SHR) mit der hochkalorischen Cafeteria-Diät (CD) behandelt. Unter der CD kam es zu einer Hyperphagie, einer Gewichtszunahme und einer Insulinresistenz, erkennbar anhand erhöhter Blutzucker- und Insulinspiegel im Oralen Glukose Toleranz Test (OGTT) und Insulin Toleranz Test (ITT) sowie anhand eines pathologischen HOMA-Index'. Ein manifester Diabetes mellitus Typ II entwickelte sich nicht. Trotz erkennbarer Tendenz zu einem früheren Tod unter CD war der Unterschied nicht signifikant. Für die zweite Fragestellung wurden normotensive Sprague-Dawley (SD)-Ratten unter CD mit dem AT₁-Antagonisten Telmisartan behandelt. Die unbehandelten Ratten entwickelten bereits nach zwei Wochen eine Leptinresistenz. Unter Telmisartan zeigten sich ein erniedrigtes Plasmaleptin, eine reduzierte Nahrungsaufnahme und ein verringertes Körpergewicht. All diese Aspekte lassen auf eine verbesserte Leptinsensitivität schließen. Bestätigen konnten wir die Leptinresistenz sowie die verbesserte Leptinsensitivität im Leptinresistenztest. Die verringerte Nahrungsaufnahme ist auf die Downregulation der orexigenen Peptide Melanin Concentrating Hormone (MCH) und PreProOrexin (PPO) zurückzuführen. Der gesteigerte Energieverbrauch war dabei nicht durch eine erhöhte Expression von Uncoupling Protein 1 (UCP-1) bedingt.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit folgern wir, dass das RAAS eine entscheidende Rolle in der Genese des MetS, insbesondere der Leptinresistenz, spielt. Die RAAS-Blockade eröffnet so die Hoffnung auf eine ganzheitliche Therapieoption für das Metabolische Syndrom.

6 Literaturverzeichnis

- Adams, M. H. und Lammon, C. A. 2007. The presence of family history and the development of type 2 diabetes mellitus risk factors in rural children. *J Sch Nurs* 23 259-66.
- Aguilera, G., et al. 2004. Corticotropin releasing hormone receptors: two decades later. *Peptides* 25 319-29.
- Aizawa-Abe, M., et al. 2000. Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension. *J Clin Invest* 105 1243-52.
- Alkerwi, A., et al. 2010. First nationwide survey on cardiovascular risk factors in Grand-Duchy of Luxembourg (ORISCAV-LUX). *BMC Public Health* 10 468.
- Allen, A. M., et al. 1998. Angiotensin receptors in the nervous system. *Brain Res Bull* 47 17-28.
- Allen, A. M., et al. 2000. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am J Hypertens* 13 31S-38S.
- Aneja, A., et al. 2004. Hypertension and obesity. *Recent Prog Horm Res* 59 169-205.
- Araki, K., et al. 2006. Telmisartan prevents obesity and increases the expression of uncoupling protein 1 in diet-induced obese mice. *Hypertension* 48 51-7.
- Astrup, A. 1999. Macronutrient balances and obesity: the role of diet and physical activity. *Public Health Nutr* 2 341-7.
- Avrith, D. B. und Fitzsimons, J. T. 1980. Increased sodium appetite in the rat induced by intracranial administration of components of the renin-angiotensin system. *J Physiol* 301 349-64.
- Awad, A. S. 2006. Role of AT1 receptors in permeability of the blood-brain barrier in diabetic hypertensive rats. *Vascul Pharmacol* 45 141-7.
- Banks, W. A., et al. 2004. Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier. *Diabetes* 53 1253-60.
- Banks, W. A., et al. 1999. Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity. *Peptides* 20 1341-5.
- Banks, W. A. und Farrell, C. L. 2003. Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity is acquired and reversible. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285 E10-5.
- Banks, W. A., et al. 1996. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 17 305-11.
- Baron, A. D., et al. 1993. Skeletal muscle blood flow. A possible link between insulin resistance and blood pressure. *Hypertension* 21 129-35.
- Barr, E. L., et al. 2010. HOMA insulin sensitivity index and the risk of all-cause mortality and cardiovascular disease events in the general population: the Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study (AusDiab) study. *Diabetologia* 53 79-88.
- Barzilai, N., et al. 1997. Leptin selectively decreases visceral adiposity and enhances insulin action. *J Clin Invest* 100 3105-10.
- Baskin, D. G., et al. 2001. How the brain regulates food intake and body weight: the role of leptin. *J Pediatr Endocrinol Metab* 14 Suppl 6 1417-29.
- Bayol, S. A., et al. 2005. A maternal cafeteria diet during gestation and lactation promotes adiposity and impairs skeletal muscle development and metabolism in rat offspring at weaning. *J Physiol* 567 951-61.

- Benson, S. C., et al. 2004. Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPAR γ -modulating activity. *Hypertension* 43 993-1002.
- Bereket, A., et al. 1999. Alterations in the growth hormone-insulin-like growth factor axis in insulin dependent diabetes mellitus. *Horm Metab Res* 31 172-81.
- Bjorntorp, P. 1992. Abdominal fat distribution and disease: an overview of epidemiological data. *Ann Med* 24 15-8.
- Bjorntorp, P. 1993. Visceral obesity: a "civilization syndrome". *Obes Res* 1 206-22.
- Bjorntorp, P. 1997. Obesity. *Lancet* 350 423-6.
- Boden, G., et al. 1996. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 81 3419-23.
- Bornstein, S. R., et al. 1997. Evidence for a novel peripheral action of leptin as a metabolic signal to the adrenal gland: leptin inhibits cortisol release directly. *Diabetes* 46 1235-8.
- Boss, O., et al. 1997. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett* 408 39-42.
- Bouchard, C., et al. 1988. Inheritance of the amount and distribution of human body fat. *Int J Obes* 12 205-15.
- Bourgoin, F., et al. 2008. Endothelial and vascular dysfunctions and insulin resistance in rats fed a high-fat, high-sucrose diet. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295 H1044-H1055.
- Boustany, C. M., et al. 2004. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287 R943-9.
- Brät, C., et al. 2007. Impulsivity in overweight children. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 16 473-83.
- Broberger, C., et al. 1998. Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol* 402 460-74.
- Brooks, V. L. und Malvin, R. L. 1982. Intracerebroventricular infusions of angiotensin II increases sodium excretion. *Proc Soc Exp Biol Med* 169 532-7.
- Brownlow, B. S., et al. 1996. The role of motor activity in diet-induced obesity in C57BL/6J mice. *Physiol Behav* 60 37-41.
- Brühl, H., et al. 2007. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and memory impairments in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 92 2439-45.
- Bunnemann, B., et al. 1992. The distribution of angiotensin II AT1 receptor subtype mRNA in the rat brain. *Neurosci Lett* 142 155-8.
- Burson, J. M., et al. 1994. Differential expression of angiotensin receptor 1A and 1B in mouse. *Am J Physiol* 267 E260-7.
- Burszty, M. 1996. Does insulin have a role in hypertension? *Blood Press Suppl* 1 64-6.
- Bustin, S. A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29 23-39.
- Cabassi, A., et al. 1998. Regional sympathetic activity in pre-hypertensive phase of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 62 1111-8.

-
- Camacho, A. und Phillips, M. I. 1981. Separation of drinking and pressor responses to central angiotensin by monoamines. *Am J Physiol* 240 R106-13.
- Campfield, L. A., et al. 1995. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269 546-9.
- Cassis, L. A., et al. 2004. Differential effects of local versus systemic angiotensin II in the regulation of leptin release from adipocytes. *Endocrinology* 145 169-74.
- Chaves, V. E., et al. 2006. Glyceroneogenesis is reduced and glucose uptake is increased in adipose tissue from cafeteria diet-fed rats independently of tissue sympathetic innervation. *J Nutr* 136 2475-80.
- Chen, G., et al. 1996. Disappearance of body fat in normal rats induced by adenovirus-mediated leptin gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 14795-9.
- Chen, H., et al. 2008. Maternal and postnatal overnutrition differentially impact appetite regulators and fuel metabolism. *Endocrinology* 149 5348-56.
- Chisholm, D. J., et al. 1997. Pathogenesis of the insulin resistance syndrome (syndrome X). *Clin Exp Pharmacol Physiol* 24 782-4.
- Chodobski, A. und Szmydynger-Chodobska, J. 2001. Choroid plexus: target for polypeptides and site of their synthesis. *Microsc Res Tech* 52 65-82.
- Choi, Y. H., et al. 2008. ICV leptin effects on spontaneous physical activity and feeding behavior in rats. *Behav Brain Res* 188 100-8.
- Chrousos, G. P. 2000. The role of stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuro-endocrine and target tissue-related causes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 2 S50-5.
- Clark, K. A., et al. 2006. Effects of central and systemic administration of leptin on neurotransmitter concentrations in specific areas of the hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290 R306-12.
- Coleman, D. L. 1978. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia* 14 141-8.
- Collins, S., et al. 1996. Role of leptin in fat regulation. *Nature* 380 677.
- Considine, R. V., et al. 1996. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334 292-5.
- Correia, M. L. und Rahmouni, K. 2006. Role of leptin in the cardiovascular and endocrine complications of metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab* 8 603-10.
- Crandall, D. L., et al. 1994. Distribution of angiotensin II receptors in rat and human adipocytes. *J Lipid Res* 35 1378-85.
- Culman, J., et al. 2002. The renin-angiotensin system in the brain: possible therapeutic implications for AT(1)-receptor blockers. *J Hum Hypertens* 16 Suppl 3 S64-70.
- Culman, J., et al. 1999. Effects of systemic treatment with irbesartan and losartan on central responses to angiotensin II in conscious, normotensive rats. *Eur J Pharmacol* 367 255-65.
- Cunningham, J. J., et al. 1986. Hypercorticosteronuria and diminished pituitary responsiveness to corticotropin-releasing factor in obese Zucker rats. *Endocrinology* 118 98-101.

-
- da Silva, A. A., et al. 2008. Endogenous melanocortin system activity contributes to the elevated arterial pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 51 884-90.
- Dahlof, B., et al. 2002. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 359 995-1003.
- Dallman, M. F., et al. 2007. Glucocorticoids, the etiology of obesity and the metabolic syndrome. *Curr Alzheimer Res* 4 199-204.
- Darimont, C., et al. 1994. Differentiation of preadipose cells: paracrine role of prostacyclin upon stimulation of adipose cells by angiotensin-II. *Endocrinology* 135 2030-6.
- Davis, C. 2010. Attention-deficit/Hyperactivity Disorder: Associations with Overeating and Obesity. *Curr Psychiatry Rep* 50 144-52.
- Day, C. 2007. Metabolic syndrome, or What you will: definitions and epidemiology. *Diab Vasc Dis Res* 4 32-8.
- de Gasparo, M., et al. 2000. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52 415-72.
- de Kloet, A. D., et al. 2010. The renin angiotensin system and the metabolic syndrome. *Physiol Behav* 100 525-34.
- de Lecea, L. 2010. A decade of hypocretins: past, present and future of the neurobiology of arousal. *Acta Physiol (Oxf)* 198 203-8.
- Deepak, S., et al. 2007. Real-time PCR: Revolutionizing detection and expression analysis of genes. *Curr Genomics* 8 234-51.
- Despres, J. P. und Lamarche, B. 1993. Effects of diet and physical activity on adiposity and body fat distribution: implications for the prevention of cardiovascular disease. *Nutr Res Rev* 6 137-59.
- Diez, J. J. und Iglesias, P. 2003. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol* 148 293-300.
- Dryden, S., et al. 1999. Divergent effects of intracerebroventricular and peripheral leptin administration on feeding and hypothalamic neuropeptide Y in lean and obese (fa/fa) Zucker rats. *Clin Sci (Lond)* 96 307-12.
- El-Haschimi, K., et al. 2000. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Clin Invest* 105 1827-32.
- Elias, C. F., et al. 1999. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 23 775-86.
- Elmquist, J. K., et al. 1997. Leptin activates neurons in ventrobasal hypothalamus and brainstem. *Endocrinology* 138 839-42.
- Elmquist, J. K., et al. 1999. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22 221-32.
- Elton, T. S., et al. 1992. Isolation of two distinct type I angiotensin II receptor genes. *Biochem Biophys Res Commun* 184 1067-73.
- Engeli, S., et al. 2005. Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Hypertension* 45 356-62.
- Engeli, S., et al. 2000. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension* 35 1270-7.
- Enriori, P. J., et al. 2006. Leptin resistance and obesity. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 5 254S-258S.

-
- Fatani, S., et al. 2007. Differential vascular dysfunction in response to diets of differing macronutrient composition: a phenomenological study. *Nutr Metab (Lond)* 4 15.
- Faure, A., et al. 2010. Desire and dread from the nucleus accumbens: cortical glutamate and subcortical GABA differentially generate motivation and hedonic impact in the rat. *PLoS One* 5 e11223.
- Fei, H., et al. 1997. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 7001-5.
- Finkelstein, E. A., et al. 2009. Annual medical spending attributable to obesity: payer-and service-specific estimates. *Health Aff (Millwood)* 28 w822-31.
- Fitzsimons, J. T. 1980. Angiotensin stimulation of the central nervous system. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 87 117-67.
- Fleury, C., et al. 1997. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* 15 269-72.
- Flier, J. S. 1998. Clinical review 94: What's in a name? In search of leptin's physiologic role. *J Clin Endocrinol Metab* 83 1407-13.
- Fluttert, M., et al. 2000. A refined method for sequential blood sampling by tail incision in rats. *Lab Anim* 34 372-8.
- Ford, E. S., et al. 2002. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Jama* 287 356-9.
- Franks, P. W., et al. 2010. Childhood obesity, other cardiovascular risk factors, and premature death. *N Engl J Med* 362 485-93.
- Frederich, R. C., et al. 1995. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med* 1 1311-4.
- Friedman, J. M. 1997. The alphabet of weight control. *Nature* 385 119-20.
- Friedman, J. M. und Halaas, J. L. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395 763-70.
- Funahashi, H., et al. 2003. Co-existence of leptin- and orexin-receptors in feeding-regulating neurons in the hypothalamic arcuate nucleus-a triple labeling study. *Peptides* 24 687-94.
- Garcia-Diaz, D., et al. 2007. Adiposity dependent apelin gene expression: relationships with oxidative and inflammation markers. *Mol Cell Biochem* 305 87-94.
- Gemmill, M. E., et al. 2003. Leptin suppresses food intake and body weight in corticosterone-replaced adrenalectomized rats. *J Nutr* 133 504-9.
- Giacchetti, G., et al. 2000. Gene expression of angiotensinogen in adipose tissue of obese patients. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 2 S142-3.
- Gimeno, R. E., et al. 1997. Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: a potential molecular mediator of human thermogenesis. *Diabetes* 46 900-6.
- Gogia, A. und Agarwal, P. K. 2006. Metabolic syndrome. *Indian J Med Sci* 60 72-81.
- Gohlke, P., et al. 2001. AT1 receptor antagonist telmisartan administered peripherally inhibits central responses to angiotensin II in conscious rats. *J Pharmacol Exp Ther* 298 62-70.

- Gong, D. W., et al. 1997. Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3-adrenergic agonists, and leptin. *J Biol Chem* 272 24129-32.
- Grassi, G., et al. 2003. Comparative effects of candesartan and hydrochlorothiazide on blood pressure, insulin sensitivity, and sympathetic drive in obese hypertensive individuals: results of the CROSS study. *J Hypertens* 21 1761-9.
- Groubet, R., et al. 2003. Hyperlipidic diets induce early alterations of the vitamin A signalling pathway in rat colonic mucosa. *Endocr Regul* 37 137-44.
- Guillaume-Gentil, C., et al. 1990. Abnormal regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the genetically obese fa/fa rat. *Endocrinology* 126 1873-9.
- Haas, H. L., et al. 1980. Angiotensin II in the hippocampus. A histochemical and electrophysiological study. *Experientia* 36 1394-5.
- Hakansson, M. L., et al. 1998. Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *J Neurosci* 18 559-72.
- Halaas, J. L., et al. 1997. Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 8878-83.
- Halaas, J. L., et al. 1995. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269 543-6.
- Handa, R. K. 2000. Binding and signaling of angiotensin-(1-7) in bovine kidney epithelial cells involves the AT(4) receptor. *Peptides* 21 729-36.
- Harmer, S. C. und Bicknell, A. B. 2005. Role of gamma-MSH peptides in the regulation of adrenal steroidogenesis. *Peptides* 26 1944-51.
- Hartle, D. K. und Brody, M. J. 1984. The angiotensin II pressor system of the rat forebrain. *Circ Res* 54 355-66.
- Harzheim, D., et al. 2010. Elevated InsP3R expression underlies enhanced calcium fluxes and spontaneous extra-systolic calcium release events in hypertrophic cardiac myocytes. *Channels (Austin)* 4 67-71.
- Haynes, W. G., et al. 1997. Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *J Clin Invest* 100 270-8.
- He, H., et al. 2010. Telmisartan prevents weight gain and obesity through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-delta-dependent pathways. *Hypertension* 55 869-79.
- Henriksen, E. J. und Jacob, S. 2003. Angiotensin converting enzyme inhibitors and modulation of skeletal muscle insulin resistance. *Diabetes Obes Metab* 5 214-22.
- Herring, N., et al. 2011. Pravastatin normalises peripheral cardiac sympathetic hyperactivity in the spontaneously hypertensive rat. *J Mol Cell Cardiol* 50 99-106.
- Hetherington 1983. Nutrition Classics. The Anatomical Record, Volume 78, 1940: Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Nutr Rev* 41 124-7.
- Higuchi, R., et al. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11 1026-30.
- Holtkamp, K., et al. 2004. Overweight and obesity in children with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28 685-9.
- Horwitz, D. L., et al. 1977. Quantitation of human pancreatic beta-cell function by immunoassay of C-peptide in urine. *Diabetes* 26 30-5.

- Hübel, N., et al. (2011). Jahrestagung der Deutschen Hochdruckliga 24.-26.11.2011. Köln, Deutschland.
- Huszar, D., et al. 1997. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88 131-41.
- Ishida-Takahashi, R., et al. 2004. Rapid inhibition of leptin signaling by glucocorticoids in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 279 19658-64.
- Iwai, N. und Inagami, T. 1992. Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS Lett* 298 257-60.
- Iwase, M., et al. 1994. Effect of aging on glucose tolerance in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 16 67-76.
- Jang, M., et al. 2000. Leptin rapidly inhibits hypothalamic neuropeptide Y secretion and stimulates corticotropin-releasing hormone secretion in adrenalectomized mice. *J Nutr* 130 2813-20.
- Janke, J., et al. 2002. Mature adipocytes inhibit in vitro differentiation of human preadipocytes via angiotensin type 1 receptors. *Diabetes* 51 1699-707.
- Jequier, E. 2002. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci* 967 379-88.
- Jöhren, O., et al. 1995. AT1A, AT1B, and AT2 angiotensin II receptor subtype gene expression in rat brain. *Neuroreport* 6 2549-52.
- Jöhren, O., et al. 1996. Localization of AT2 angiotensin II receptor gene expression in rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Brain Res Mol Brain Res* 37 192-200.
- Jöhren, O. und Saavedra, J. M. 1996. Expression of AT1A and AT1B angiotensin II receptor messenger RNA in forebrain of 2-wk-old rats. *Am J Physiol* 271 E104-12.
- Jones, B. H., et al. 1997. Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology* 138 1512-9.
- Julius, S., et al. 2004. Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated with regimens based on valsartan or amlodipine: the VALUE randomised trial. *Lancet* 363 2022-31.
- Kahn, R., et al. 2005. The metabolic syndrome. *Lancet* 366 1921-2; author reply 1923-4.
- Kahn, S. E. 2003. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 46 3-19.
- Kakar, S. S., et al. 1992a. Differential expression of angiotensin II receptor subtype mRNAs (AT-1A and AT-1B) in the brain. *Biochem Biophys Res Commun* 185 688-92.
- Kakar, S. S., et al. 1992b. Angiotensin II type-1 receptor subtype cDNAs: differential tissue expression and hormonal regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 183 1090-6.
- Kamari, Y., et al. 2008. Effect of telmisartan, angiotensin II receptor antagonist, on metabolic profile in fructose-induced hypertensive, hyperinsulinemic, hyperlipidemic rats. *Hypertens Res* 31 135-40.
- Kanazawa, M., et al. 1997. Alterations of insulin and glucagon secretion from the perfused pancreas before, at the onset and after the development of diabetes in male Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Diabetes Res Clin Pract* 38 161-7.

-
- Katovich, M. J. und Pachori, A. 2000. Effects of inhibition of the renin-angiotensin system on the cardiovascular actions of insulin. *Diabetes Obes Metab* 2 3-14.
- Kawano, H., et al. 2002. Melanin-concentrating hormone neuron system: the Wide Web that controls the feeding. *Anat Sci Int* 77 149-60.
- Keenan, K. P., et al. 2005. Diabesity: a polygenic model of dietary-induced obesity from ad libitum overfeeding of Sprague-Dawley rats and its modulation by moderate and marked dietary restriction. *Toxicol Pathol* 33 650-74.
- Kim, S., et al. 2002. Angiotensin II increases leptin secretion by 3T3-L1 and human adipocytes via a prostaglandin-independent mechanism. *J Nutr* 132 1135-40.
- Kim, S. H. und Reaven, G. M. 2004. The metabolic syndrome: one step forward, two steps back. *Diab Vasc Dis Res* 1 68-75.
- Kintscher, U., et al. 2008. Inhibiting angiotensin type 1 receptors as a target for diabetes. *Expert Opin Ther Targets* 12 1257-63.
- Kintscher, U., et al. 2010. Effect of high-dose valsartan on inflammatory and lipid parameters in patients with Type 2 diabetes and hypertension. *Diabetes Res Clin Pract* 89 209-15.
- Kintscher, U. und Unger, T. 2005. Vascular protection in diabetes: a pharmacological view of angiotensin II type 1 receptor blockers. *Acta Diabetol* 42 Suppl 1 S26-32.
- Knight, S. F., et al. 2008. Endothelial dysfunction and the development of renal injury in spontaneously hypertensive rats fed a high-fat diet. *Hypertension* 51 352-9.
- Kouyama, R., et al. 2005. Attenuation of diet-induced weight gain and adiposity through increased energy expenditure in mice lacking angiotensin II type 1a receptor. *Endocrinology* 146 3481-9.
- Kral, T. V., et al. 2004. Combined effects of energy density and portion size on energy intake in women. *Am J Clin Nutr* 79 962-8.
- Kubista, M., et al. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27 95-125.
- Kurihara, T., et al. 2008. Angiotensin II type 1 receptor signaling contributes to synaptophysin degradation and neuronal dysfunction in the diabetic retina. *Diabetes* 57 2191-8.
- Kwok, C. F., et al. 1989. Identification of persistent defects in insulin receptor structure and function capillary endothelial cells from diabetic rats. *J Clin Invest* 83 127-36.
- Lamounier-Zepter, V., et al. 2004. Mechanisms of obesity-related hypertension. *Horm Metab Res* 36 376-80.
- LaPier, T. L., et al. 2001. Voluntary running improves glucose tolerance and insulin resistance in female spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 14 708-15.
- Lean, M. E., et al. 1995. Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. *Bmj* 311 158-61.
- Lee, G. H., et al. 1996. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379 632-5.
- Leite, L. H., et al. 2007. Central AT(1) receptor blockade increases metabolic cost during exercise reducing mechanical efficiency and running performance in rats. *Neuropeptides* 41 189-94.

-
- Leite, L. H., et al. 2006. Central angiotensin AT1-receptor blockade affects thermoregulation and running performance in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291 R603-7.
- Lenkei, Z., et al. 1997. Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. *Front Neuroendocrinol* 18 383-439.
- Levin, B. E., et al. 2004. Obesity-prone rats have normal blood-brain barrier transport but defective central leptin signaling before obesity onset. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286 R143-50.
- Lin, L., et al. 2001. Acute changes in the response to peripheral leptin with alteration in the diet composition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280 R504-9.
- Lithell, H., et al. 2003. The Study on Cognition and Prognosis in the Elderly (SCOPE): principal results of a randomized double-blind intervention trial. *J Hypertens* 21 875-86.
- Louis, G. W., et al. 2010. Direct innervation and modulation of orexin neurons by lateral hypothalamic LepRb neurons. *J Neurosci* 30 11278-87.
- Lowry, O. H., et al. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 265-75.
- Ludwig, D. S., et al. 2001. Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 107 379-86.
- Madiehe, A. M., et al. 2001. Constitutive activation of STAT-3 and downregulation of SOCS-3 expression induced by adrenalectomy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281 R2048-58.
- Maffei, M., et al. 1995a. Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 6957-60.
- Maffei, M., et al. 1995b. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1 1155-61.
- Mantzoros, C. S. 1999. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Med* 130 671-80.
- Mantzoros, C. S. und Moschos, S. J. 1998. Leptin: in search of role(s) in human physiology and pathophysiology. *Clin Endocrinol (Oxf)* 49 551-67.
- Mantzoros, C. S., et al. 1996. Activation of beta(3) adrenergic receptors suppresses leptin expression and mediates a leptin-independent inhibition of food intake in mice. *Diabetes* 45 909-14.
- Marks, J. L., et al. 1992. Effect of fasting on regional levels of neuropeptide Y mRNA and insulin receptors in the rat hypothalamus: An autoradiographic study. *Mol Cell Neurosci* 3 199-205.
- Massiera, F., et al. 2001. Angiotensinogen-deficient mice exhibit impairment of diet-induced weight gain with alteration in adipose tissue development and increased locomotor activity. *Endocrinology* 142 5220-5.
- Masuo, K., et al. 2000. Weight gain-induced blood pressure elevation. *Hypertension* 35 1135-40.
- McAlister, E. D. und Van Vugt, D. A. 2004. Effect of leptin administration versus re-feeding on hypothalamic neuropeptide gene expression in fasted male rats. *Can J Physiol Pharmacol* 82 1128-34.

- Mercer, J. G., et al. 1996a. Coexpression of leptin receptor and preproneurotrophin Y mRNA in arcuate nucleus of mouse hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 8 733-5.
- Mercer, J. G., et al. 1996b. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett* 387 113-6.
- Miesel, A., et al. 2011. Double blockade of angiotensin II (AT(1))-receptors and ACE does not improve weight gain and glucose homeostasis better than single-drug treatments in obese rats. *Br J Pharmacol* 165 2721-35.
- Miesel, A., et al. 2010. Overfeeding-induced obesity in spontaneously hypertensive rats: an animal model of the human metabolic syndrome. *Ann Nutr Metab* 56 127-42.
- Moran, A., et al. 1991. Pancreatic endocrine function in cystic fibrosis. *J Pediatr* 118 715-23.
- Morens, C., et al. 2005. Effects of MCH and a MCH1-receptor antagonist on (palatable) food and water intake. *Brain Res* 1062 32-8.
- Müller-Fielitz, H., et al. 2012. Improved insulin sensitivity after long-term treatment with AT1 blockers is not associated with PPARgamma target gene regulation. *Endocrinology* 153 1103-15.
- Müller-Fielitz, H., et al. 2011. Weight loss and hypophagia after high-dose AT(1)-blockade is only observed after high dosing and depends on regular leptin signalling but not blood pressure. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 383 373-84.
- Müller-Fielitz, H., Raasch, W. 2011. Blood pressure response to angiotensin II is enhanced in obese Zucker rats and is attributed to an aldosterone-dependant mechanism. *BJP*, accepted.
- Müller, H., et al. 2010. Stress sensitivity is increased in transgenic rats with low brain angiotensinogen. *J Endocrinol* 204 85-92.
- Müller, H., et al. 2007. Angiotensin II stimulates the reactivity of the pituitary-adrenal axis in leptin-resistant Zucker rats, thereby influencing the glucose utilization. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293 E802-10.
- Munro, J. M. und Cotran, R. S. 1988. The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Lab Invest* 58 249-61.
- Münzberg, H. 2009. Leptin-signaling pathways and leptin resistance. *Forum Nutr* 63 123-132.
- Musi, N. und Goodyear, L. J. 2006. Insulin resistance and improvements in signal transduction. *Endocrine* 29 73-80.
- Nahon, J. L. 2006. The melanocortins and melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behavior and energy homeostasis. *C R Biol* 329 623-38; discussion 653-5.
- Natalucci, S., et al. 2003. Age-related analysis of glucose metabolism in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Exp Physiol* 88 399-404.
- Nguyen, Q. M., et al. 2010. Utility of childhood glucose homeostasis variables in predicting adult diabetes and related cardiometabolic risk factors: the Bogalusa Heart Study. *Diabetes Care* 33 670-5.
- Niimi, M., et al. 1999. Effects of central and peripheral injection of leptin on food intake and on brain Fos expression in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat with hyperleptinaemia. *J Neuroendocrinol* 11 605-11.

- Nishiyama, M., et al. 1999. Leptin effects on the expression of type-2 CRH receptor mRNA in the ventromedial hypothalamus in the rat. *J Neuroendocrinol* 11 307-14.
- Noma, T. K., Koshinaka K, Nakazato M. 2011. Telmisartan suppresses food intake in mice via the melanocortin pathway. *Obes Res Clin Pract* 5:e93-e100
- Nussdorfer, G. G., et al. 1986. Acute effects of alpha-MSH on the rat zona glomerulosa in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 141 1279-84.
- Oltman, C. L., et al. 2005. Progression of vascular and neural dysfunction in sciatic nerves of Zucker diabetic fatty and Zucker rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289 E113-22.
- Oron-Herman, M., et al. 2008. Metabolic syndrome: comparison of the two commonly used animal models. *Am J Hypertens* 21 1018-22.
- Palou, A., et al. 1998. The uncoupling protein, thermogenin. *Int J Biochem Cell Biol* 30 7-11.
- Palovcik, R. A. und Phillips, M. I. 1984. Saralasin increases activity of hippocampal neurons inhibited by angiotensin II. *Brain Res* 323 345-8.
- Pavlatou, M. G., et al. 2008. Chronic administration of an angiotensin II receptor antagonist resets the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and improves the affect of patients with diabetes mellitus type 2: preliminary results. *Stress* 11 62-72.
- Pecoraro, N., et al. 2004. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology* 145 3754-62.
- Pelisch, N., et al. 2011. Blockade of AT1 receptors protects the blood-brain barrier and improves cognition in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Am J Hypertens* 24 362-8.
- Pelleymounter, M. A., et al. 1995. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269 540-3.
- Peyron, C., et al. 1998. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18 9996-10015.
- Pinto, Y. M., et al. 1998. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc Res* 39 77-88.
- Pravenec, M., et al. 2002. Genetic analysis of metabolic defects in the spontaneously hypertensive rat. *Mamm Genome* 13 253-8.
- Proulx, K., et al. 2002. Leptin regulates appetite-related neuropeptides in the hypothalamus of developing rats without affecting food intake. *Endocrinology* 143 4683-92.
- Qu, D., et al. 1996. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380 243-7.
- Raasch, W., et al. 2002. Regression of ventricular and vascular hypertrophy: are there differences between structurally different angiotensin-converting enzyme inhibitors? *J Hypertens* 20 2495-504.
- Raasch, W., et al. 2006. Angiotensin II inhibition reduces stress sensitivity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis in spontaneously hypertensive rats. *Endocrinology* 147 3539-46.
- Rahmouni, K., et al. 2005. Role of selective leptin resistance in diet-induced obesity hypertension. *Diabetes* 54 2012-8.
- Regitz-Zagrosek, V., et al. 1996. Molecular biology of angiotensin receptors and their role in human cardiovascular disease. *J Mol Med* 74 233-51.

- Ribeiro-Oliveira, A., Jr., et al. 2008. The renin-angiotensin system and diabetes: an update. *Vasc Health Risk Manag* 4 787-803.
- Ricquier, D. und Bouillaud, F. 2000. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J* 345 Pt 2 161-79.
- Roberts, C. K., et al. 2002. Long-term effects of diet on leptin, energy intake, and activity in a model of diet-induced obesity. *J Appl Physiol* 93 887-93.
- Rolls, B. J., et al. 2002. Portion size of food affects energy intake in normal-weight and overweight men and women. *Am J Clin Nutr* 76 1207-13.
- Roth, J., et al. 2004. The obesity pandemic: where have we been and where are we going? *Obes Res* 12 Suppl 2 88S-101S.
- Roy, M., et al. 1990. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation among diabetic outpatients. *Psychiatry Res* 31 31-7.
- Roy, M., et al. 1991. Dysregulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and duration of diabetes. *J Diabet Complications* 5 218-20.
- Ruffin, M. P., et al. 2004. Feeding and temperature responses to intravenous leptin infusion are differential predictors of obesity in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286 R756-63.
- Sahu, A. 2003. Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Front Neuroendocrinol* 24 225-53.
- Sahu, A. und Metlakunta, A. S. 2005. Hypothalamic phosphatidylinositol 3-kinase-phosphodiesterase 3B-cyclic AMP pathway of leptin signalling is impaired following chronic central leptin infusion. *J Neuroendocrinol* 17 720-6.
- Saint-Marc, P., et al. 2001. Angiotensin II as a trophic factor of white adipose tissue: stimulation of adipose cell formation. *Endocrinology* 142 487-92.
- Sasaki, K., et al. 1999. Effects of angiotensin II receptor antagonist on insulin sensitivity and sympathetic activity in spontaneously hypertensive rats. *Nippon Jinzo Gakkai Shi* 41 692-6.
- Sasamura, H., et al. 1992. Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome. *Biochem Biophys Res Commun* 185 253-9.
- Satoh, N., et al. 1997. Pathophysiological significance of the obese gene product, leptin, in ventromedial hypothalamus (VMH)-lesioned rats: evidence for loss of its satiety effect in VMH-lesioned rats. *Endocrinology* 138 947-54.
- Scarpace, P. J., et al. 2001. Hypothalamic leptin resistance is associated with impaired leptin signal transduction in aged obese rats. *Neuroscience* 104 1111-7.
- Scheen, A. J. 2004. Renin-angiotensin system inhibition prevents type 2 diabetes mellitus. Part 2. Overview of physiological and biochemical mechanisms. *Diabetes Metab* 30 498-505.
- Scheurink, A. J., et al. 1999. Exercise and the regulation of energy intake. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23 Suppl 3 S1-6.
- Scholze, J., et al. 2010. Epidemiological and economic burden of metabolic syndrome and its consequences in patients with hypertension in Germany, Spain and Italy; a prevalence-based model. *BMC Public Health* 10 529.
- Schrauwen, P. und Westerterp, K. R. 2000. The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight. *Br J Nutr* 84 417-27.
- Schupp, M., et al. 2005. Molecular characterization of new selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulators with angiotensin receptor blocking activity. *Diabetes* 54 3442-52.

- Schupp, M., et al. 2004. Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity. *Circulation* 109 2054-7.
- Schwartz, M. W. und Gelling, R. W. 2002. Rats lighten up with MCH antagonist. *Nat Med* 8 779-81.
- Schwartz, M. W., et al. 1996. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 98 1101-6.
- Schwartz, M. W., et al. 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature* 404 661-71.
- Seltzer, A., et al. 2004. Oral administration of an AT1 receptor antagonist prevents the central effects of angiotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res* 1028 9-18.
- Severs, W. B. und Daniels-Severs, A. E. 1973. Effects of angiotensin on the central nervous system. *Pharmacol Rev* 25 415-49.
- Shapiro, A., et al. 2008. Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295 R1370-5.
- Shek, E. W., et al. 1998. Chronic leptin infusion increases arterial pressure. *Hypertension* 31 409-14.
- Shimada, M., et al. 1998. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature* 396 670-4.
- Shimamoto, K. und Ura, N. 2006. Mechanisms of insulin resistance in hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 28 543-52.
- Simpson, J. B. 1981. The circumventricular organs and the central actions of angiotensin. *Neuroendocrinology* 32 248-56.
- Speth, R. C., et al. 1985. Angiotensin II receptor localization in the canine CNS. *Brain Res* 326 137-43.
- Spiegelman, B. M. und Flier, J. S. 1996. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell* 87 377-89.
- Spinedi, E. und Gaillard, R. C. 1998. A regulatory loop between the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis and circulating leptin: a physiological role of ACTH. *Endocrinology* 139 4016-20.
- Stephens, T. W., et al. 1995. The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 377 530-2.
- Sugimoto, K., et al. 2006. Telmisartan but not valsartan increases caloric expenditure and protects against weight gain and hepatic steatosis. *Hypertension* 47 1003-9.
- Swislocki, A. und Tsuzuki, A. 1993. Insulin resistance and hypertension: glucose intolerance, hyperinsulinemia, and elevated free fatty acids in the lean spontaneously hypertensive rat. *Am J Med Sci* 306 282-6.
- Tartaglia, L. A., et al. 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83 1263-71.
- Teran-Garcia, M. und Bouchard, C. 2007. Genetics of the metabolic syndrome. *Appl Physiol Nutr Metab* 32 89-114.
- Tofovic, S. P. und Jackson, E. K. 2003. Rat models of the metabolic syndrome. *Methods Mol Med* 86 29-46.
- Torlone, E., et al. 1993. Improved insulin action and glycemic control after long-term angiotensin-converting enzyme inhibition in subjects with arterial hypertension and type II diabetes. *Diabetes Care* 16 1347-55.

- Torsoni, M. A., et al. 2004. Angiotensin II (AngII) induces the expression of suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 in rat hypothalamus - a mechanism for desensitization of AngII signaling. *J Endocrinol* 181 117-28.
- Tou, J. C. und Wade, C. E. 2002. Determinants affecting physical activity levels in animal models. *Exp Biol Med (Maywood)* 227 587-600.
- Towbin, H., et al. 1992. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 24 145-9.
- Unger, T. und Sandmann, S. 2000. Angiotensin receptor blocker selectivity at the AT1- and AT2-receptors: conceptual and clinical effects. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 1 S6-9.
- Uresin, Y., et al. 2004. Losartan may prevent the elevation of plasma glucose, corticosterone and catecholamine levels induced by chronic stress. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 5 93-6.
- van Dijk, G., et al. 2011. The lateral hypothalamus: A site for integration of nutrient and fluid balance. *Behav Brain Res* 221 481-7.
- Van Harmelen, V., et al. 2000. Increased adipose angiotensinogen gene expression in human obesity. *Obes Res* 8 337-41.
- Velloso, L. A., et al. 2006. The multi-faceted cross-talk between the insulin and angiotensin II signaling systems. *Diabetes Metab Res Rev* 22 98-107.
- Vera, E. R., et al. 2002. Effects of age and anesthetic on plasma glucose and insulin levels and insulin sensitivity in spontaneously hypertensive and Wistar rats. *Can J Physiol Pharmacol* 80 962-70.
- Vital, S. A., et al. 2010. Mechanisms underlying the cerebral microvascular responses to angiotensin II-induced hypertension. *Microcirculation* 17 641-9.
- von Bohlen und Halbach, O. und Albrecht, D. 2006. The CNS renin-angiotensin system. *Cell Tissue Res* 326 599-616.
- Wang, J. L., et al. 1999. Differential effects of leptin in regulation of tissue glucose utilization in vivo. *Endocrinology* 140 2117-24.
- Watanabe, T., et al. 2005. Angiotensin II and the endothelium: diverse signals and effects. *Hypertension* 45 163-9.
- Weber, K. T. 2001. Aldosterone in congestive heart failure. *N Engl J Med* 345 1689-97.
- Weiland, F. und Verspohl, E. J. 2008. Variety of angiotensin receptors in 3T3-L1 preadipose cells and differentiated adipocytes. *Horm Metab Res* 40 760-6.
- Wetzler, S., et al. 2004. Intraperitoneal leptin modifies macronutrient choice in self-selecting rats. *Physiol Behav* 83 65-72.
- Weyer, C., et al. 2000. Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. *Diabetologia* 43 1498-506.
- Wiernsperger, N. 1994. Vascular defects in the aetiology of peripheral insulin resistance in diabetes. A critical review of hypotheses and facts. *Diabetes Metab Res* 10 287-307.
- Woods, S. C., et al. 2000. Food intake and the regulation of body weight. *Annu Rev Psychol* 51 255-77.
- Wosik, K., et al. 2007. Angiotensin II controls occludin function and is required for blood brain barrier maintenance: relevance to multiple sclerosis. *J Neurosci* 27 9032-42.

- Zakrzewska, K. E., et al. 1999. Induction of obesity and hyperleptinemia by central glucocorticoid infusion in the rat. *Diabetes* 48 365-70.
- Zaman, M. A., et al. 2002. Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. *Nat Rev Drug Discov* 1 621-36.
- Zanchi, A., et al. 2007. Telmisartan prevents the glitazone-induced weight gain without interfering with its insulin-sensitizing properties. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293 E91-5.
- Zhang, Y., et al. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372 425-32.
- Zorad, S., et al. 2006. Long-term angiotensin II AT1 receptor inhibition produces adipose tissue hypotrophy accompanied by increased expression of adiponectin and PPARgamma. *Eur J Pharmacol* 552 112-22.
- Zorrilla, E. P., et al. 2004. Human urocortin 2, a corticotropin-releasing factor (CRF)2 agonist, and ovine CRF, a CRF1 agonist, differentially alter feeding and motor activity. *J Pharmacol Exp Ther* 310 1027-34.
- Zucker, T. F. und Zucker, L. M. 1963. Fat accretion and growth in the rat. *J Nutr* 80 6-1.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Regelkreis Nahrungsaufnahme aus Hypothalamus und Peripherie.....	14
Abb. 2: Körpergewicht und Energieaufnahme bei Miesel et al 2011.....	15
Abb. 3: Behandlungsregime zur Ermittlung der Leptinsensitivität unter TEL.....	19
Abb. 4: Zeitlicher Ablauf des Behandlungsregimes mit TEL.....	20
Abb. 5: Untersuchung der Leptinsensitivität.....	27
Abb. 6: Pharmakokinetische Untersuchung der Plasmaleptinkonzentration.....	39
Abb. 7: Etablierung des Leptinresistenztests (LRT).....	40
Abb. 8: Körpergewichtsentwicklung unter TEL.....	41
Abb. 9: Gesamte Energieaufnahme und Futterzusammensetzung unter TEL....	42
Abb. 10: Körpergewichtsbezogene Energieaufnahme unter TEL.....	43
Abb. 11: Basales Plasmaleptin (A), Korrelation (B) unter TEL.....	43
Abb. 12: Expression des Uncoupling Proteins (UCP-1) unter TEL.....	44
Abb. 13: Blutdruck (A) und Herzfrequenz (B) unter TEL.....	45
Abb. 14: Angiotensin II im Plasma im TEL.....	45
Abb. 15: Wasseraufnahme unter Behandlung mit Telmisartan.....	46
Abb. 16: mRNA Levels der hypothalamischen Nahrungspetide unter TEL.....	46
Abb. 17: Plasmaleptinkonzentration im LRT.....	47
Abb. 18: Gesamte Energieaufnahme im LRT.....	48
Abb. 19: Energieaufnahme an CD (A) und an Chow (B) im LRT.....	48
Abb. 20: Korrelation zwischen Plasmaleptin und Energieaufnahme im LRT.....	49

Abb. 21: Änderung des Körpergewichts im LRT.....	50
Abb. 22: Körpergewichtsentwicklung von SHR unter CD	51
Abb. 23: Energieaufnahme und Zusammensetzung der Nahrung unter CD	52
Abb. 24: Körpergewichtsbezogene Energieaufnahme unter CD	52
Abb. 25: Wasseraufnahme unter CD.....	53
Abb. 26: Körperliche Aktivität nach 5 Monaten unter CD.	53
Abb. 27: Kumulation der Gesamtaktivität unter CD	54
Abb. 28: Blutdruck (A) und Herzfrequenz (B) unter CD	55
Abb. 29: Stoffwechselfparameter unter CD	56
Abb. 30: OGTT nach 5 Monaten unter CD	57
Abb. 31: HOMA-Index bei OGTTs unter CD.....	58
Abb. 32: ITT nach 5 Monaten unter CD.....	59
Abb. 33: Überleben als Kaplan-Meier-Kurve unter CD.....	60
Abb. 34: Einfluss der AT ₁ -Blocker auf Regelkreis der Nahrungsaufnahme	65

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Hypothalamische Nahrungspeptide.....	9
Tabelle 2-1: Antragsnummern der Tierversuche, Datum der Genehmigung.....	17
Tabelle 2-2: Nukleotidsequenzen der Primer für die „Real-time“-PCR.....	34
Tabelle 3-1: Tabellarischer Überblick über die durchgeführten OGTTs.....	58
Tabelle 3-2: Tabellarischer Überblick über die durchgeführten ITTs.....	60

7.3 Substanzen und erworbene Lösungen

10 X TAE-Puffer	Invitrogen (Kanada)
1-Octanesulfonic Säure	Sigma (Deutschland)
Methylbutan	Sigma (Deutschland)
3,4-Dihydroxybenzylamin	Sigma (Deutschland)
3-Hydroxythyramin	Sigma (Deutschland)
Abz-Gly-OH	Bachem Biochemica, Heidelberg (Deutschland)
Abz-Gly-p-nitro-Phe-Pro-OH	Bachem Biochemica, Heidelberg (Deutschland)
Agarose NEE0	Carl Roth (Deutschland)
Aluminiumoxid	Sigma (Deutschland)
Anti-UCP-1 (C-17)	Santa Cruz (Deutschland)
Bestatin	Sigma (Deutschland)
Betaisodona-Lösung [®]	Mundipharma (Deutschland)
Cell Lysis Buffer (CLB)	cell signalling (Deutschland)
Citronensäure Monohydrat	Merck (Deutschland)
Diethylether	Carl Roth (Deutschland); J. T. Baker (Holland)
Diethylpyrocarbinat (DEPC)	Sigma (Deutschland)
Di-Stickstoffoxid (in Flaschen)	Lokaler Gas-Lieferant
EDTA	Merck (Deutschland)
Elutions-Puffer	Applied Biosystems (UK)
Ethanol p.A. 98%	J. T. Baker (Holland)
Ethidiumbromid	BioRad Laboratories (Kanada)
Ethylacetat	J. T. Baker (Holland)
Flüssiger Stickstoff	Lokaler Lieferant
Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz	Merck (Deutschland)
Gel-Marker DNA Molekular Weight	Roche (Schweiz)
Leptin (Ratte) 97%	R&D Systems
	Biovision
	Biotrend
Glukose-Lösung 50%; 100ml	Delta Select (Deutschland)
Glycerol	Gibco BRL (Deutschland)
Heparin-Lösung (Liquemin [®] N; 25000 I.E./5ml)	Hoffmann-La Roche (Schweiz)
Hexan	Sigma (Deutschland)

Immobilon Transfer Membranes	Milipore (Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck (Deutschland)
Kalium-Natrium-Tartrat-Tetrahydrat (40 mM)	Merck (Deutschland)
Kochsalz-Lösung 0,9%; steril	Berlin-Chemie (Deutschland)
Kochsalz-Lösung zum Spülen	Delta Select (Deutschland)
Kupfer (II)-Sulfat-Pentahydrat (100 mM)	Merck (Deutschland)
L-Glutation (GSH)	Serva (Deutschland)
Methanol	J. T. Baker (Holland)
Na-Acetat	Merck (Deutschland)
Na-EDTA-Lösung (0,5 M; pH 8,0)	Invitrogen (Kanada)
Natriumcarbonat (2% in NaOH)	Fluka (Deutschland)
Natriumchlorid	Merck (Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck (Deutschland)
Natriumhydroxid	Merck (Deutschland)
Nucleic Acid Purification Lysis Solution	Applied Biosystems (UK)
NuPage Antioxidant	Invitrogen (Deutschland)
NuPage 4-12% Bis-Tris-Gel	Invitrogen (Deutschland)
NuPage LDS Sample Buffer	Invitrogen (Deutschland)
NuPage MES SDS Running Buffer	Invitrogen (Deutschland)
NuPage Transfer Buffer	Invitrogen (Deutschland)
PBS Puffer	UK-SH Campus Apotheke, Lübeck (Deutschland)
PBS-Tween Puffer	Merck (Deutschland)
PCR-Primer	Invitrogen (Deutschland)
Pentobarbital-Na-Lösung (98 mg/1,8 ml)	UK-SH Campus Apotheke, Lübeck (Deutschland)
Perchlorsäure	Merck (Deutschland)
Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkohol	Invitrogen (Kanada)
Precision Plus Protein Standard	BioRad (Deutschland)
Proteinase K	Applied Biosystems (UK)
Rabbit-Anti-Goat-Antikörper, HRP labelled	Dako (Deutschland)
RNA Purification Wash Solution I	Applied Biosystems (UK)
RNA Purification Wash Solution II	Applied Biosystems (UK)
Salzsäure; HCl (konzentriert)	Merck (Deutschland)
Sauerstoff (in Flaschen)	Lokaler Gas-Lieferant
Skim milk powder (5%)	Fluka (Deutschland)
Stickstoffstrom	Hausleitung
Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrat	Thermo scientific (Deutschland)

Telmisartan	Boehringer-Ingelheim (Deutschland)
Tris-Lösung (1 M; pH 7,4)	Invitrogen (Kanada)
Trockeneis	UK-SH Campus Apotheke, Lübeck (Deutschland)
Xylen-Cyanol	BioRad Laboratories (Kanada)

7.4 Rezepturen von Lösungen

Bestatin-Lösung (1 mM)	0,2 ml Bestatin-Lösung (5 mg/ml) ad 2,9 ml Aqua dest.
Bestatin-Lösung (5 mg/ml)	5 mg Bestatin ad 1 ml Aqua dest.
DEPC-Wasser	500 µl DEPC ad 500 ml Aqua dest. nach 24 h sterilisiert
EDTA-Lösung pH 6-7	900 mg Na-EDTA ad 10 ml Aqua dest. NaOH zur pH-Wert-Einstellung
Heparin Lösung (250 I.E./ml)	5 ml Heparin-Lösung (25000 I.E./ 5ml) ad 100 ml NaCl-Lösung injectabilia
Lysis-Puffer	5 ml Nucleic Acid Purification Lysis Solution ad 10 ml DEPC-Wasser
PBC-Puffer Tween	di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (65 mM), Natriumdihydrogenphos- phat-Mono-hydrat (22 mM), Natrium- chlorid (10 mM), Tween-20 (1%)
Puffer A	8,9 g di-Natriumhydrogen-Phosphat ad 100 ml Aqua dest. pH 7,4
Puffer B	0,953 g Kaliumdihydrogen-q phosphat, 1,246 g di-Natrium- hydrogenphosphat, 1,753 g Natriumchlorid, pH 7
TAE-Puffer	100 ml 10 X TAE-Puffer ad 1000 ml Aqua dest.
TE-Puffer pH 7,4	100 µl 1M Tris-Puffer pH 7,4 20 µl 0,5M EDTA-Lösung pH ad 10 ml DEPC-Wasser
Tris-Puffer pH 8	20 mM Tris ad Aqua injectabile 5N NaOH zum Puffern

7.5 Erworbene Versuchskits

7.5.1 RIA-Kits

Adiponectin	Linco Cat.	# MADP 60HK
Angiotensin II	Euro-Diagnostica	Kat.Nr.: RB 320
Corticosteron	MP Biomedicals	Kat.Nr. 07120102
C-Peptid	Linco Cat.	RCP-21K
Glukagon	Linco Cat.	# GL 32K
Insulin	Linco Cat.	# RI 13K
Leptin	Linco Cal.	# RL 83K

7.5.2 Kits zur Bestimmung der Gen-Expression

Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit	Invitrogen (Kanada)
Platinum [®] SYBR [®] Green qPCR SuperMix- UDG with ROX	Invitrogen (Kanada)
Quant-iT [™] TM-RiboGreen [®] -RNA-Assay-Kit	Invitrogen (Kanada)
Scybr Green I Reaction System	Eurogentec SA (Deutschland)

7.6 Verbrauchsmaterialien

2/0 Faden Dagrofil [®]	B/Braun (Deutschland)
5-0 Faden Mopyten [®] monofil blau	Resorba (Deutschland)
6-0 Faden Mopyten [®] monofil blau	Resorba (Deutschland)
96-Well Optical Reaction Plate	Applied Biosystems (UK)
Baumwoll Geschirrhandtuch	Wäscherei UK-SH (Deutschland)
Disposable Scalpel Gr: 10 und 11	Feather (Japan)
Drahtstifte 0,8 x 11 mm	Stabilit (Deutschland)
Durapora [™] 3M	Health Care (Deutschland)
Einmalspritzen Discardit [™] II 1 ml und 2 ml	BD (Deutschland)

Filter tips 10,100,1000	Greiner bio one (Deutschland)
Filtersysteme für die Nucleic Acid Prep Station	
ABI PRISM 6100	Applied Biosystems (UK)
Glukoseteststreifen für Ascensia	Bayer (Deutschland)
Haltungsfutter für Ratten und Mäuse	Altromin (Deutschland)
Isolierband (rot und blau)	Bauhaus (Deutschland)
Kanülen BD Microlance™ 3	
20Gx1½"-Nr1 0,9x40	BD (Deutschland)
Kanülen BD Microlance™ 3	
23Gx1"-Nr16 0,6x25	BD (Deutschland)
Kanülen BD Microlance™ 3	
26Gx½" 0,45x13	BD (Deutschland)
Kapillarspitzen	Biozym (Deutschland)
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt (Deutschland)
Klingen Microtome blades	Leica (Deutschland)
Mikrovetten CB 300	Sarstedt (Deutschland)
Multiply PCR Plate 96 Well	Sarstedt (Deutschland)
Nitril-Handschuhe	Nitra Tex Ansell (Deutschland)
PE-Schlauch ID: 0,28 mm; AD: 0,61 mm	
Polyethylene Tubing REF 800/100/100	Portex Fine Bore (UK)
PE-Schlauch ID: 0,58 mm; AD: 0,96 mm	
Polyethylene Tubing REF 800/100/200	Portex Fine Bore (UK)
PP-test tubes 15 ml, 50 ml Cellstar®	Greiner bio one (Deutschland)
Rasierklingen	Wilkinson Sword (Deutschland)
Röhrchen	Greiner (Deutschland)
Save Lock Tubes (2; 1,5; 0,5 und 0,2 ml)	Eppendorf (Deutschland)
Tupfer Pure-Zellin	Paul Hartmann AG (Deutschland)
Vinyl-Einmalhandschuhe	Meditrade (Deutschland)
Wägebapier	Neolab
Watteträger	NOBA Verbandmittel Danz GmbH u. Co KG (Deutschland)

7.7 Geräte

Laborgeräte:

Adsorbex SPU Sample Preparation Unit	Merck (Deutschland)
--------------------------------------	---------------------

Autoklav	Dargatz (Deutschland)
Blutzuckermessgerät Ascensia ELITE XL	Bayer (Deutschland)
Eismaschine Scotsman AF 10	Scotsman (Deutschland)
Gefriermikrotom CM 3050	Leica (Deutschland)
Gefrierschrank (-80°C)	Colora (Deutschland)
Gefriertruhen (-20°C)	Bosch (Deutschland)
Guillotine	Harvard Apparatus CO. Inc. Millis. Mass (USA)
Kühlschränke (2-8°C)	Bosch (Deutschland)
Magnetrührer IKA-Combimag RCT	Janke & Kunkel GmbH & Co.KG (Deutschland)
pH-Meter WTW ph 531	WTW Weilheim (Deutschland)
Plexiglas-Käfige (25 x 20 x 22 cm)	Werkstatt UK-SH (Deutschland)
Rasierer Moser Styling II	TSE (Deutschland)
Rührfische	Bohlende, Lauda-Königshofen (Deutschland)
Schüttel/Schwenkgerät REAX 2	Heidolph (Deutschland)
Stoppuhr	Junghans (Deutschland)
Ultra-Tourax 78	IKA-Werke (Deutschland)
verschiedene Laborglasgeräte	
Vortex REAX 2000	Heidolph (Deutschland)
Waagen:	
Feinwaage BP 210 D	Sartorius (Deutschland)
Tierwaage	Sartorius (Deutschland)
Waage MC1 Laboratory LC220S	Sartorius (Deutschland)
Zentrifugen:	
Tischzentrifuge MIKRO 200R	Hettich (Deutschland)
Tischzentrifuge PCR-Labor	Eppendorf (Deutschland)
Zentrifuge PCR-Labor	Jouan (Deutschland)
Geräte zur Blutdruckmessung über den Schwanz:	
Blood pressure monitor 8002 dual	TSE (Deutschland)
Piezoelemente	TSE (Deutschland)
Registrierteil 130 T mit Thermopapier	Recomed (Deutschland)

Geräte zur Bestimmung der Gen-Expression:

RNA-Isolierung: 6100 Nucleic Acid Prep Station	Applied Biosystems (USA)
PCR-Gerät: ABI PRISM 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems (USA)
FLUOstar OPTIMA Basisgerät 2003-8143	BMG LABTECH
Cycler für cDNA-Herstellung	Biometra (USA)

Geräte für die Proteinbestimmung:

Power Ease 500	Invitrogen (Deutschland)
XCell II Blot Modul	Invitrogen (Deutschland)
XCell II SureLock Mini Cell	Invitrogen (Deutschland)
Gel Dokumentation System: Gel Doc 2000 Chemi Doc	Bio Rad

Geräte für RIA-Versuche:

Gamma-Counter: Compugamma 1282 CS	Wallac (USA)
Membranpumpe UVS 400 A	Savant (Deutschland)
Minifuge RF	Heraeus sepatech (Deutschland)

Software:

Graph Pad Prism Version 5.0	Graph Pad Prism [®]
Quantity one	Bio Rad (Deutschland)

7.8 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent; Teile von 100
®	„Registered in U.S. Patent and Trademark Office“; geschützter Warenname
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung

ACE	Angiotensin-Converting Enzyme
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AD	Außendurchmesser
Ag/AgCl	Silber/Silberchlorid
AgRP	Agouti-Related Peptide
α -MSH	α -Melanozyten-stimulierendes Hormon
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
Ang	Angiotensin II
ARC	Nucleus arcuatus
AT ₁ -Rezeptor	Typ-1-Angiotensin-II-Rezeptor
AT ₂ -Rezeptor	Typ-2-Angiotensin-II-Rezeptor
AT ₄ -Rezeptor	Typ-4-Angiotensin-II-Rezeptor
AUC	Fläche unter der Kurve; „Area under the curve“
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaare
BZ	Blutzucker
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca	Calcium
cafe	Cafeteria-Gruppe/Diät
cAMP	cyclisches Adenosin-Monophosphat
CART	Cocaine Amphetamine Regulated Transcript
CCD	monochromic charged coupled Device Kamera
CD	Cafeteria-Diät
cDNA	complementäre Desoxyribonukleinsäure
Chow	Standarddiät
CLB	Cell Lysis Buffer
cm	Zentimeter
Cmax	maximale Konzentration
CRH	Corticotropin Releasing Hormone
CT	Schwellenwertzyklus
d	Tag; „day“
Δ	delta; Abweichung vom Ausgangswert

db	Gendefekt des Leptinrezeptors
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DIO	Diät induzierte Adipositas
	diet-induced obesity
dl	dezi-Liter
DMH	dorsomedialer Hypothalamus; dorsomedial hypothalamic nucleus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Extrazelluläre Faktor-regulierte Kinase
g	Gramm
g (im Zusammenhang mit Zentrifugationen)	Erdbeschleunigung
GABA	Gammaaminobuttersäure
GLUT-4	Glukose-Rezeptor in Muskulatur und Fett
G-Protein	Guanin-Nukleotid bindendes Protein
h	Stunde; „hour“
HCl	Salzsäure
HF	Herzfrequenz
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen- Nebennieren-Achse
HRP	Horse Radish Peroxidase
5-HT	Serotonin
I.E.	Internationale Einheiten
i.p.	intraperitoneal
ITT	Insulin Toleranz Test
i.v.	intravenös
i.c.v.	intracerebroventrikulär
ID	Innendurchmesser
JAK 2	Janus Kinase 2
K	Kalium

Kb	Kilo base
Kcal	Kilo Kalorien
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kJ	Kilo Joule
KON	Kontrolle
LDS	Lithiumdodecylsulfat
Lep	Leptin
l	Liter
LHA	lateraler Hypothalamus
LRT	Leptinresistenztest
Lsg.	Lösung
M	Molar
mA	milli Ampère
MCH	Melanin Concentrating Hormone
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
Mon	Monat
mRNA	messenger RNA
MetS	Metabolisches Syndrom
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Stichproben
N	Normalität
n/min	Schläge pro Minute
n.s.	nicht signifikant
Na	Natrium
NaH ₂ PO ₄	Natrium-Dihydrogen-Phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NO	Stickstoffmonoxid
N ₂ O	Lachgas

NPY	Neuropeptid Y
Ob-Rb	Leptinrezeptor
Ob/ob	Mutation des Leptingens
OGTT	Oraler Glukose Toleranz Test
OVLT	Organum vasculosum laminae terminalis
OXA	Orexin A
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS-Puffer	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion; „Polymerase chain reaction“
PDE 3B	Phosphodiesterase 3B
PE	Polyethylen
p.i.	post injectionem
PI 3-K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
pmol	Picomol
p.o.	per os
POMC	Proopiomelanocortin
PP	Polypropylen
PPAR γ	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma
PPO	PreProOrexin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVN	Nucleus paraventricularis
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RER	respiratory exchange rate
RT	Reverse Transkriptase
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROX	Farbstoff bestehend aus Glycin-Konjugat von 5-carboxy X-rhodamin und Succinimidyl-ester
s.	siehe
sec.	Sekunden
s.c.	subcutan
SBP	systolischer Blutdruck
SD	Sprague-Dawley-Ratte
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate

SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SFO	subfornikales Organ
SHR	Spontan hypertensive Ratte
SNA	Sympathische Nervenaktivität
SOCS-3	Suppressor of Cytokine Signalling-3
STAT 3	Signal Transducer and Acitvator of Transcription 3
Tab.	Tabelle
Tris	Trishydroxymethylamonium-Methan
u.a.	unter anderem
UDG	Uracil DNA Glykosylase
U/min	Umdrehungen in der Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
VMH	ventromedialer Hypothalamus; ventromedial hypothalamic nucleus
vs.	versus
W	Watt
WHO	Welt-Gesundheits-Organisation

8 Danksagung

Ich danke dem ehemaligen Instituts-Direktor Herrn Prof. Dr. med. P. Dominiak und dem jetzigen Instituts-Direktor Herrn Prof. Dr. med. M. Schwaninger für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes am Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie der Universität zu Lübeck.

Ich möchte mich ganz besonders herzlich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. W. Raasch für die Bereitstellung des ergebnisträchtigen und erfolgreichen Themas sowie die hervorragende und zuverlässige Betreuung und Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit, für seine stets gewährten Ratschläge und für die konstruktive Kritik bedanken.

Herrn PD Dr. O. Jöhren gilt mein Dank für die Bereitstellung der PCR-Vorrichtungen.

Bei Herrn Dr. H. Müller-Fielitz möchte ich mich besonders für die große Unterstützung bei der Vorbereitung und Durchführung der experimentellen und wissenschaftlichen Arbeit sowie dafür, dass er mir stets freundschaftlich zur Seite gestanden hat, bedanken.

Frau A. Kaiser danke ich für die Einarbeitung in die Labor- und Analysetechniken und auch Frau I. Stölting für ihre tatkräftige Unterstützung bei deren Durchführung. Allen im Institut beschäftigten Mitarbeitern, Doktoranden und Studenten des Instituts gilt mein Dank für die kollegiale und freundliche Zusammenarbeit.

Den Doktoranden Frau A. Miesel, Herrn N. Hübel und Herrn S. Werth, für die angenehme Zusammenarbeit und die konstruktiven Gespräche.

Ich danke meinen Eltern, die mich in jeder Lebenslage unterstützen und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stehen. Ganz besonders danke ich meinem Ehemann Dany Lau für seine liebevolle Unterstützung.

9 Curriculum vitae



Persönliche Daten

Vorname und Name	Margot Lau, geb. Thermann
Geburtsdatum und -ort	8. September 1986, Lübeck
Nationalität	deutsch
Familienstand	verheiratet mit Herrn Dany Lau

Schulbildung:

1993 – 1996	Vorstadt Grundschule, Ratzeburg
1996 – 2005	Lauenburgische Gelehrtenschule, Ratzeburg
Schulabschluss	Allgemeine Hochschulreife 2005

Studium:

Medizinstudium	seit Oktober 2005 an der Universität zu Lübeck
1. Staatsexamen	September 2007

Famulaturen

Innere Medizin am Ratzeburger DRK-Krankenhaus 2008
 Neurologie an der Universität zu Lübeck 2008
 Pädiatrie in 2 Kinderarztpraxen in Groß Grönau und Lübeck 2009

Innere Medizin am Universitätsklinikum Nîmes, Frankreich 2009

Pädiatrie an der Universität zu Lübeck 2010

Praktisches Jahr 2010/2011

Pädiatrie an der Universität zu Lübeck

Kinderchirurgie an der Universität zu Lübeck

Chirurgie am DRK-Krankenhaus Ratzeburg

Innere Medizin am DRK-Krankenhaus Ratzeburg

2. Staatsexamen

November 2011

Promotion:

Promotion am Institut für experimentelle und

klinische Pharmakologie und Toxikologie

unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Walter Raasch

Feb. 2008 bis Feb. 2011

10 Veröffentlichungen

10.1 Poster

M. Thermann, W. Raasch (2010). Neuer Therapieansatz im Metabolischen Syndrom – Telmisartan verbessert die Leptinsensitivität;
Poster für die Veranstaltung „Uni im Dialog“ der Universität zu Lübeck am 09.06.2010

M. Thermann, H. Müller-Fielitz, W. Raasch (2010). Prevention of leptin resistance by AT₁-blockade;
Posterpräsentation im Rahmen des 34. Wissenschaftlichen Kongresses der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL[®] - Deutschen Hypertonie Gesellschaft vom 09. - 11. Dezember 2010 in Berlin

M. Thermann, H. Müller-Fielitz, W. Raasch (2011). Prevention of leptin resistance by AT₁-blockade. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 383 (Suppl. 1), 33; Posterpräsentation im Rahmen der 77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, vom 30. März - 1. April 2011 in Frankfurt a.M.

10.2 Publikationen

Miesel A, Müller H, **Thermann M**, Heidbreder M, Dominiak P, Raasch W (2010). Overfeeding-induced obesity in spontaneously hypertensive rats: An animal model of the human Metabolic Syndrome. Ann Nutr Metab, 56:127-142.

Müller-Fielitz H, **Lau M**, Jöhren O, Stellmacher F, Schwaninger M, Raasch W (2012). Blood pressure response to Angiotensin II is enhanced in obese Zucker rats and is attributed to an aldosterone-dependent mechanism. Brit J Pharmacol, accepted

Müller-Fielitz H*, **Lau M***, Heidbreder M, Jöhren O, Raasch W (2012). Preventing leptin resistance by blocking Angiotensin II AT₁-receptors in diet-induced obese rats. Hypertension, submitted *) both authors contributed equally

Lau M, Raasch W (2012). Das Renin-Angiotensin II-Aldosteron-System und dessen Einflussnahme auf Nahrungsaufnahme und Körpergewicht. Adipositas 02/2012, accepted.

10.3 Preise und Auszeichnungen

- Promotionsstipendium „Experimentelle Medizin“ im Rahmen der Initiative „Exzellenzmedizin“ der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck über den Zeitraum vom 01.09.2009 bis zum 28.02.2010.
- Posterpreis 2010 im Rahmen des 34. Wissenschaftlichen Kongresses der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL[®] - Deutschen Hypertonie Gesellschaft vom 09. - 11. Dezember 2010 in Berlin. Ausgezeichnet wurde das Poster mit dem Titel „Prevention of leptin resistance by AT₁-blockade“.