

Aus der Abteilung für Nephrologie und Hypertensiologie der Franz-Volhard-Klinik,
Medizinische Fakultät Charité, Campus Berlin-Buch,
Humboldt-Universität zu Berlin

Dissertation

Expression der Gene des Renin-Angiotensin Systems humaner Adipocyten bei adipositas-assoziiierter Hypertonie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Biol. Stefan Engeli
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. J. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Arya M. Sharma
 2. Prof. Dr. med. Hans Hauner
 3. Prof. Dr. rer. nat. Susanne Klaus

eingereicht: 20. August 2001

Datum der Promotion: 18. März 2002

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	5
Verzeichnis der Abbildungen	5
Verzeichnis der Tabellen	7
1 Einleitung	8
1.1 ADIPOSITAS ALS KARDIOVASKULÄRER RISIKOFAKTOR	8
1.2 PATHOPHYSIOLOGIE DER ADIPOSITAS-ASSOZIIERTEN HYPERTONIE	9
1.2.1 Natriumretention.....	9
1.2.2 Sympathikus-Aktivität und vaskuläre Reaktivität	10
1.2.3 Spezifische Rolle des Fettgewebes	11
1.3 DAS RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERON SYSTEM.....	12
1.3.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron System bei Adipositas	12
1.3.2 Das lokale RAS im Fettgewebe	13
1.3.3 Das adipocytäre RAS bei Adipositas und Hypertonie	14
1.4 ZIELE DER ARBEIT	15
2 Material und Methoden	16
2.1 PROBANDENREKRUTIERUNG UND STUDIENABLAUF	16
2.1.1 Probandenrekrutierung; Votum der Ethikkommission	16
2.1.2 Studienablauf	16
2.1.3 Ein- und Ausschlußkriterien	16
2.2 ANTHROPOMETRISCHE MESSUNGEN	18
2.3 24 Stunden-BLUTDRUCKMESSUNG	18
2.4 BLUTUNTERSUCHUNGEN	20
2.4.1 Materialien.....	20
2.4.2 Blutentnahmen	21
2.4.3 Triglyceride, Gesamtcholesterin und Leptin im Serum	21
2.4.4 Messungen von Parametern des RAS	22
2.4.5 Bestimmung der Insulinresistenz	23
2.5 GEWINNUNG SUBKUTANER ADIPOCYTEN	23
2.5.1 Materialien.....	23
2.5.2 Durchführung der Fettgewebebiopsie.....	24
2.5.3 Isolierung subkutaner Adipocyten.....	25
2.6 RNA-EXTRAKTION UND CDNA-SYNTHESE.....	26
2.6.1 Materialien.....	26
2.6.2 RNA-Extraktion und DNase-Verdau	27

2.6.3	Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle der RNA	29
2.6.4	cDNA-Synthese.....	29
2.7	QUANTITATIVE <i>TAQMAN</i> RT-PCR	30
2.7.1	Quantifizierung der Genexpression mittels RT-PCR	30
2.7.2	Durchführung der <i>TaqMan</i> RT-PCR.....	31
2.7.3	Materialien.....	32
2.7.4	Auswertung der <i>TaqMan</i> RT-PCR.....	33
2.8	DATENVERARBEITUNG UND STATISTIK.....	34
3	Ergebnisse	35
3.1	PROBANDENREKRUTIERUNG	35
3.2	FETTGEWEBEBIOPSIE UND ADIPOCYTENGEWINNUNG	36
3.3	CHARAKTERISTIKA DER PROBANDENGRUPPEN	38
3.4	GENEXPRESSIONSUNTERSUCHUNGEN.....	43
3.4.1	Auswertung der <i>TaqMan</i> -RT-PCR.....	43
3.4.2	Differentielle Expression der RAS-Gene	44
3.4.3	Weitergehende statistische Analyse der Genexpressionsergebnisse.....	46
4	Diskussion.....	48
4.1	DAS RAS BEI ADIPOSITAS-ASSOZIIERTER HYPERTONIE.....	48
4.1.1	Angiotensinogen	48
4.1.2	Renin und Angiotensin-Converting Enzyme	50
4.1.3	Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor	52
4.1.4	Synopsis der Bedeutung der Genexpressionsergebnisse.....	53
4.1.5	Systemische Parameter des RAS und Leptin.....	54
4.2	METHODISCHE DISKUSSION	55
4.2.1	Studiendesign	55
4.2.2	Fettgewebibiopsie und Adipocytenisolierung	56
4.2.3	Spezielle Überlegungen zum Untersuchungsmaterial.....	57
4.2.4	RNA-Extraktion und <i>TaqMan</i> -RT-PCR	58
4.3	SCHLUßBEMERKUNGEN.....	59
5	Zusammenfassung.....	60
6	Literatur.....	62
	Anhang: Lebenslauf, Publikationsliste, Eidesstattliche Erklärung, Danksagung.....	73

Verzeichnis der Abkürzungen

ABDM	-	ambulante 24h-Blutdruckmessung
ACE	-	engl. angiotensin converting enzyme
AGT	-	Angiotensinogen
AGTR1	-	Gen des Angiotensin II Typ 1-Rezeptors (AT ₁)
Ang	-	Angiotensin
ANOVA	-	engl. analysis of variance
ANP	-	atriales natriuretisches Peptid
AT ₁	-	Angiotensin II Typ 1-Rezeptor
BIA	-	bioelektrische Impedanzanalyse
BMI	-	engl. body mass index
CAMP	-	zyklisches Adenosinmonophosphat
CDNA	-	engl. complementary desoxyribonucleic acid
C _T	-	engl. threshold cycle
GAPDH	-	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
HOMA	-	engl. homeostasis model assessment
MONICA	-	Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease
NHANES III	-	Third National Health and Nutrition Examination Survey
NO	-	Stickstoffmonoxid
OD	-	optische Dichte
RAAS	-	Renin-Angiotensin-Aldosteron System
RAS	-	Renin-Angiotensin System
REN	-	Renin
RNA	-	engl. ribonucleic acid
RT-PCR	-	engl. reverse transcriptase - polymerase chain reaction
SNS	-	sympathisches Nervensystem
<i>Taq</i>	-	<i>Thermus aquaticus</i> (gemeint ist die DNA-Polymerase)
WHO	-	World Health Organization

Die kursiv gesetzten Abkürzungen *AGT*, *REN* und *ACE* bezeichnen das Gen in Unterscheidung zum jeweiligen Protein/Enzym.

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1:	Rechtsverschiebung der Drucknatriuresekurve bei Adipositas.	10
Abbildung 2:	Freie Fettsäuren und Blutdruck.....	11
Abbildung 3:	Kardiovaskulo-renale Effekte von Leptin.....	12
Abbildung 4:	Aufbau und Funktion des RAAS.....	13
Abbildung 5:	Durchführung anthropometrischer Messungen	19
Abbildung 6:	Durchführung von BIA und ABDM.....	19
Abbildung 7:	Schema des <i>TaqMan</i> -Amplifikationsplots	34
Abbildung 8:	Fettgewebebiopsie und Adipocytisolierung	36
Abbildung 9:	Methylenblaufärbung isolierter humaner Adipocyten.....	37
Abbildung 10:	Adipositas-assoziierte Variablen der Probandengruppen.....	40
Abbildung 11:	Ergebnisse der ABDM für die Probandengruppen	41
Abbildung 12:	Stoffwechselfparameter der Probandengruppen	42
Abbildung 13:	<i>TaqMan</i> -Standardkurven für <i>AGT</i> und <i>GAPDH</i>	43
Abbildung 14:	Differentielle Expression der RAS-Gene in humanen Adipocyten	45

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Einteilung der Adipositas laut WHO.	8
Tabelle 2: Regulation des RAS im Fettgewebe bei Adipositas und Hypertonie	15
Tabelle 3: Einteilung der Studienpopulation.	38
Tabelle 4: Körperzusammensetzung der Probandengruppen.....	38
Tabelle 5: Parameter des systemischen RAS der Probandengruppen.....	39
Tabelle 6: Interassay-Variationskoeffizienten der <i>TaqMan</i> -RT-PCRs.....	44
Tabelle 7: Bestimmung der RAS-Genexpression.	47
Tabelle 8: Einfluß der RAS-Gene auf Adipositas und Hypertonie.....	47
Tabelle 9: Regulation des adipocytären <i>AGT</i> -Gens bei der Maus.	49
Tabelle 10: Regulation des adipocytären <i>AGT</i> -Gens bei der Ratte	49
Tabelle 11: Regulation des adipocytären <i>AGT</i> -Gens beim Menschen.	50

1 Einleitung

1.1 ADIPOSITAS ALS KARDIOVASKULÄRER RISIKOFAKTOR

Die Definition der Adipositas durch die WHO basiert auf dem "body mass index" (BMI), dem Quotient aus Körpergewicht [kg] und Körpergröße [m²] (Tabelle 1).¹ Neben dem BMI bestimmt die Akkumulation des viszeralen Fettgewebes das Risiko adipositas-assoziiierter Erkrankungen.² Entsprechend der WHO-Empfehlungen eignet sich der Taillenumfang als anthropometrische Meßgröße, da dieser einfach zu bestimmen ist und eng mit dem BMI, der viszeralen Fettmasse und dem kardiovaskulären Risiko korreliert.^{1,3,4} Ein Taillenumfang > 88 cm (Frauen) bzw. > 102 cm (Männer) definiert den „viszeralen Fettverteilungstyp“.¹

Tabelle 1: Alters- und geschlechtsunabhängige Einteilung der Adipositas laut WHO.

Grad der Adipositas	BMI [kg/m²]	Risiko für Folgeerkrankungen
Normalgewicht	18,5 – 24,9	durchschnittlich
Übergewicht	25,0 – 29,9	leicht erhöht
Adipositas Grad I	30,0 – 34,9	erhöht
Adipositas Grad II	35,0 – 39,9	stark erhöht
Adipositas Grad III	> 40,0	sehr stark erhöht

Die MONICA-Studie der WHO untersuchte Männer und Frauen (25 bis 69 Jahre) und fand einen BMI > 30 kg/m² bei 18 % bis 24 % der deutschen Bevölkerung.¹ Der Bundes-Gesundheitssurvey 1998 beschreibt 20 % der deutschen Männer und Frauen (18 bis 79 Jahre) als adipös und fand bei 20 % der adipösen Frauen und 12 % der adipösen Männer (> 60 Jahren) zusätzlich die Akkumulation viszeralen Fettgewebes.⁵ Daten zu den USA stammen aus dem "Third National Health and Nutrition Examination Survey" (NHANES III, 1988-1994), der 63 % der Männer und 55 % der Frauen älter als 18 Jahren als übergewichtig/adipös beschreibt.⁶

Adipositas-assoziierte Erkrankungen sind von großer klinischer und ökonomischer Bedeutung.⁶⁻¹⁰ Bei Adipositas Grad I (NHANES III, Männer und Frauen) steigt das Risiko für Diabetes mellitus Typ 2 um das fünffache im Vergleich zum Normalgewicht, die Häufigkeit der Hypercholesterinämie steigt von 26 % auf 39 %.⁶ Das Risiko für das Auftreten der koronaren Herzerkrankung ist insgesamt verdoppelt, damit wird die Häufigkeit kardiovaskulärer Risikofaktoren und Erkrankungen wesentlich vom BMI

bestimmt.⁶ Adipositas und adipositas-assoziierte Erkrankungen führen zu Ausgaben von etwa 7 % im amerikanischen und 5,4 % im deutschen Gesundheitswesen.^{9,10}

Weitere Folgen der Adipositas sind die adipositas-assoziierte Nephropathie,¹¹⁻¹³ Kardiomyopathie¹⁴⁻¹⁶ und Hepathopathie.^{17,18} Zusätzlich muß die Insulinresistenz berücksichtigt werden, die als eine der grundlegenden Stoffwechselstörungen für eine Reihe von Folgeerkrankungen der Adipositas verantwortlich ist.¹⁹⁻²¹

Die Häufigkeit der essentiellen Hypertonie (Ruheblutdruck > 140/90 mm Hg bei drei unabhängigen Messungen) steigt in NHANES III von 23 % bei Normalgewicht über 48 % bei Adipositas Grad I auf 60 % bei Adipositas Grad II.⁶ In Finnland wiesen Hypertoniker während einer 20-jährigen Studie stets einen größeren BMI auf als die Normotoniker.²² Der Bundes-Gesundheitssurvey 1998 fand bei 48 % der Männer und Frauen (18 bis 79 Jahren) die Kombination Adipositas und Hypertonie.⁵ Gewichtsreduktion zur Verringerung des Schweregrades adipositas-assoziiierter Erkrankungen (auch der Hypertonie) wird in Leitlinien häufig genannt.^{10,23-26}

1.2 PATHOPHYSIOLOGIE DER ADIPOSITAS-ASSOZIIERTEN HYPERTONIE

1.2.1 Natriumretention

Adipositas führt zur Rechtsverschiebung der Drucknatriuresekurve. Zur Ausscheidung gleicher Natriummengen benötigen Adipöse daher höhere Blutdruckwerte als Normalgewichtige (Abbildung 1).²⁷⁻²⁹ Entsprechend führt Kochsalzbelastung bei Adipositas zur Natriumretention und, daraus resultierend, zur Volumenretention.³⁰⁻³² Adipositas ist die Hauptursache der salzsensitiven Hypertonie^{33,34} und kochsalzreiche Ernährung wurde kürzlich als Prädiktor der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität von Adipösen identifiziert.³⁵ Die adipositas-assoziierte Natriumretention beruht auf der gesteigerten tubulären Natriumresorption.^{29,37,38} Diese wird u.a. durch das sympathische Nervensystem (SNS), Angiotensin II (Ang II) und Aldosteron verstärkt. Die Bedeutung der renalen Aktivität des SNS³⁹ zeigt sich in tierexperimentellen Studien, in denen bilaterale renale Deafferentation die Entwicklung der adipositas-assoziierten Hypertonie verhindert.⁴⁰ Als weiteres Indiz für die Rolle des renalen SNS kann die Verdopplung der renalen Ausscheidung von Noradrenalin bei Adipösen gewertet

werden.⁴¹ Die meisten der an der Natriumregulation beteiligten Hormone sind bei Adipositas im Sinne der Natriumretention verändert.³⁶ Das gilt für das atriale natriuretische Peptid (ANP)^{32,42-44} ebenso wie für das kochsalzkonservierende Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS, s.1.3.1).

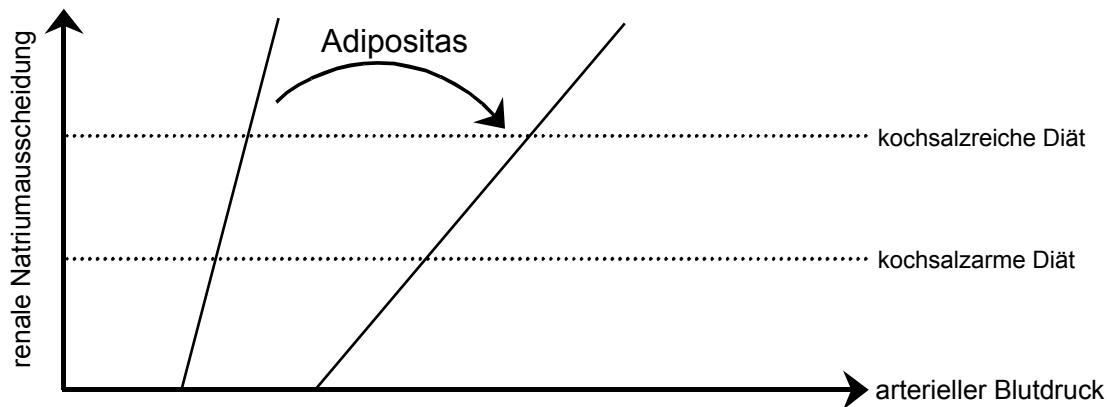


Abbildung 1: Rechtsverschiebung der Drucknatriuresekurve bei Adipositas.³⁶

1.2.2 Sympathikus-Aktivität und vaskuläre Reaktivität

Die SNS-Aktivität ist bei Adipositas gesteigert⁴⁵⁻⁴⁸ und kann durch Gewichtsreduktion verringert werden.^{49,50} Adipöse Hypertoniker sind durch höhere Katecholamin-Plasmaspiegel als adipöse Normotoniker gekennzeichnet.⁵¹ Zeichen der gesteigerten SNS-Aktivität bei Adipositas sind erhöhtes Schlagvolumen und größere Herzfrequenz⁵². Eine häufig diskutierte Ursache der Steigerung der SNS-Aktivität ist die Hyperinsulinämie,⁵⁴⁻⁵⁶ jedoch zeigen tierexperimentelle Studien, daß chronische Hyperinsulinämie allein nicht den Blutdruck steigert.⁵⁷⁻⁵⁹ Vielmehr ist die Kombination aus Hyperinsulinämie und Insulinresistenz entscheidend.^{21,60}

Dem gefäßverengenden SNS steht beim Gesunden die insulin-induzierte Vasodilatation durch Stickstoffmonoxid (NO) gegenüber.^{61,63} Adipositas führt zur endothelialen Dysfunktion mit verminderter NO-Bildung.⁶⁴ Damit liegt in den späten Phasen der adipositas-assoziierten Hypertonie eine gesteigerte Gefäßreaktivität vor.⁶⁵⁻⁶⁷ Diese wird auch durch freie Fettsäuren begünstigt (Abbildung 2),⁶⁸⁻⁷¹ deren Plasmaspiegel bei adipösen Hypertonikern höher sind als bei Normotonikern.^{69,72}

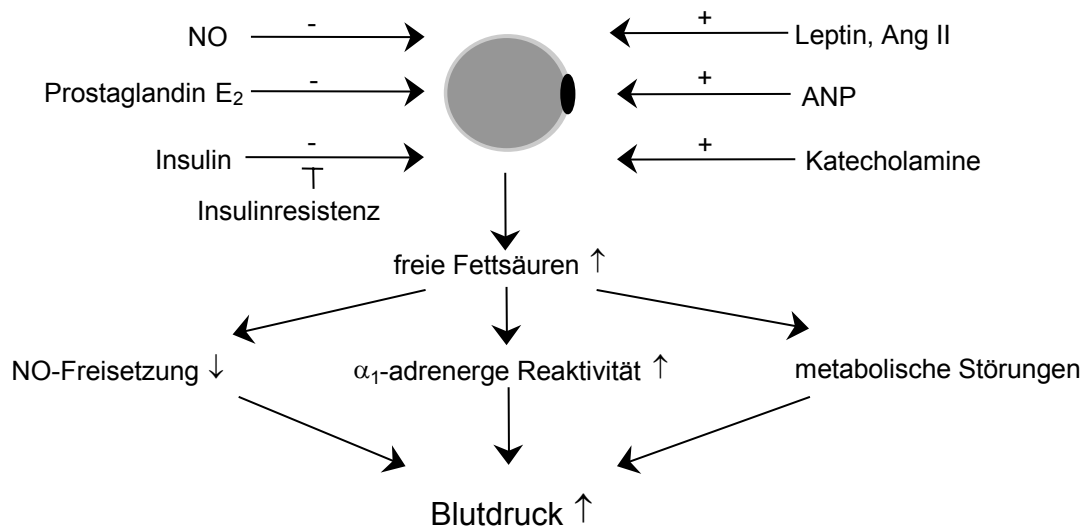


Abbildung 2: Freie Fettsäuren und Blutdruck.⁷³ Hemmung der Lipolyse: -. Steigerung der Lipolyse: +.

1.2.3 Spezifische Rolle des Fettgewebes

Adipocyten sezernieren das Peptid Leptin in enger Korrelation zur Fettzellmasse.⁷⁴ Exogenes Leptin steigert bei Ratten die Aktivität des SNS in Niere und braunem Fettgewebe und erhöht den Blutdruck.⁷⁵⁻⁷⁹ Mäuse mit einem genetisch bedingtem Leptin-Mangel haben trotz verdoppelten Körpergewichts einen niedrigeren Blutdruck als normalgewichtige Tiere, hyperleptinämische Tiere dagegen sind hyperten.^{80,81} Menschen mit genetisch bedingtem Leptin-Mangel zeigen einen normalen Ruheblutdruck, jedoch einen verminderten Blutdruckanstieg bei Stimulationstests.⁸² Umgekehrt führen hohe Leptin-Plasmaspiegel beim Menschen zu einer gesteigerten SNS-Aktivität.⁸³ Hypertoniker weisen, nach statistischer Korrektur für den BMI, erhöhte Leptin-Plasmaspiegel auf.⁸⁴⁻⁸⁷ Abbildung 3 faßt die vielseitigen kardiovaskulären Effekte von Leptin zusammen.

Hypersekretion von Fettsäuren (Abbildung 2) und Leptin (Abbildung 3), sowie der Einfluß des Fettgewebes auf die ANP-Plasmaspiegel³⁶ scheinen zur Pathophysiologie der adipositas-assoziierten Hypertonie beizutragen. Damit spielt Fettgewebe eine wichtigere Rolle als bislang vermutet, und es ist in diesem Zusammenhang von großer Bedeutung, daß auch Beziehungen zwischen dem bereits erwähnten RAAS und Fettgewebe bestehen.

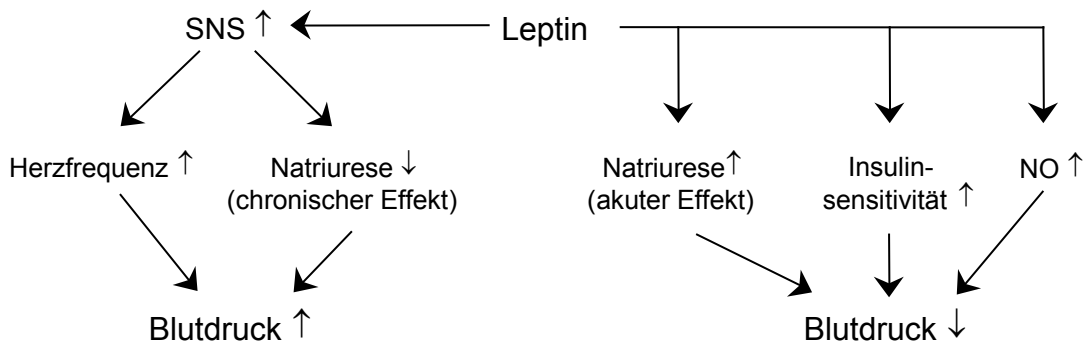


Abbildung 3: Kardiovaskuläre und renale Effekte von Leptin.⁷³ Die Balance zwischen blutdrucksteigernden und blutdrucksenkenden Mechanismen ist individuell unterschiedlich, jedoch scheinen die hypertensiven, SNS-abhängigen Effekte zu überwiegen.

1.3 DAS RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERON SYSTEM

1.3.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron System bei Adipositas

Ang II übt über den Angiotensin II Typ 1- (AT₁-) Rezeptor akute und langfristige Einflüsse auf die Blutdruckregulation aus.^{88,89} Die Aktivität des systemischen RAS (Abbildung 4, Enzyme der linken Seite) kann im Plasma bestimmt werden. Beteiligte Organe sind die Leber (Sekretion von Angiotensinogen, AGT) und die Niere (Freisetzung von Renin). Verschiedenen Organen und Geweben enthalten einige oder alle RAS-Komponenten, lokal existieren optionale alternative Wege der Ang II-Bildung (Abbildung 4, Enzyme der rechten Seite). Die lokale Bildung von Ang II in Niere, Gefäßwand und Herz ist an pathophysiologischen Prozessen wie Proliferation, Fibrose und Apoptose beteiligt,⁹⁰ das systemische RAS hingegen ist für die kardiovaskuläre Regulation unter physiologischen Bedingungen von Bedeutung.⁹¹

Obwohl Adipositas zur Natriumretention führt (s. 1.2.1), beschreiben etliche Autoren eine Aktivierung der Komponenten des natriumkonservierenden systemischen RAAS beim Menschen und im Tiermodell.⁹²⁻⁹⁸ Außerdem besteht eine positive Korrelation von AGT, Plasma-Renin-Aktivität und Aldosteron mit Leptin-Plasmaspiegeln.^{99,100} Damit muß ein Einfluß des Körpergewichts auf die Hauptorgane der AGT- und Renin-Bildung (Leber und Niere) oder ein Beitrag des Fettgewebes selbst zu den systemischen Parametern des RAAS angenommen werden.

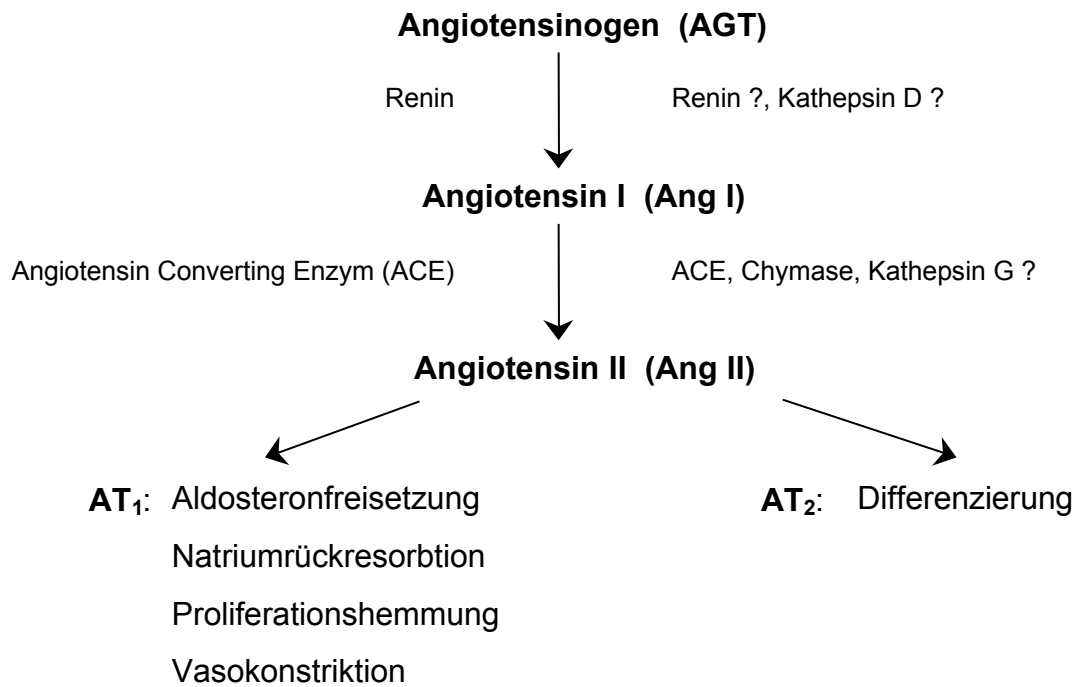


Abbildung 4: Aufbau und Funktion des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems.

Langfristige Gewichtsabnahme hat keinen eindeutigen Einfluß auf Aldosteron und Plasma-Renin-Aktivität,¹⁰¹⁻¹⁰⁵ kurzzeitiges Fasten hingegen führt aufgrund der fasten-assoziierten Natriurese zu einem Anstieg beider Parameter.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ Die Aktivierung des systemischen RAAS bei Adipositas unter Berücksichtigung möglicher genetische Mechanismen wurden von Engeli und Sharma³⁶ diskutiert.

1.3.2 Das lokale RAS im Fettgewebe

Adipocyten und Präadipocyten bilden alle Komponenten des RAS, sezernieren AGT und bilden *in vitro* und *in vivo* Ang II. Diese Befunde gelten ohne Einschränkungen auch für Adipocyten und Präadipocyten des Menschen.¹⁰⁸⁻¹¹³ Zusätzlich sind humane Adipocyten und Präadipocyten durch Bildung des AT₁-Rezeptors auch das Ziel des lokal gebildeten Ang II.¹¹⁴

Kürzlich wurde gezeigt, daß im Fettgewebe gebildetes AGT in die Blutzirkulation gelangt.¹¹⁵ Die transgene Übertragung des *AGT*-Gens unter Kontrolle eines adipocyten-spezifischen Promoters (adipocyte specific fatty acid binding protein, *aP2*) in hypotensive *AGT*-knock-out Mäuse¹¹⁶ steigerte die *AGT*-Plasmaspiegel von nicht

meßbar auf 10 % der Werte von Wildtyp-Mäusen und normalisierte den Blutdruck.¹¹⁵ Dies sagt nichts über die Situation bei Adipositas aus, erhärtet aber die Hypothese, daß Fettgewebe zu den erhöhten AGT-Plasmaspiegeln bei Adipositas beiträgt.

Mit Blick auf die adipositas-assoziierte Hypertonie ist der Einfluß von Ang II auf den Noradrenalinumsatz im Fettgewebe von großer Bedeutung. Von braunem Fettgewebe der Ratte gebildetes Ang II steigert die Freisetzung und verringert die Wiederaufnahme von Noradrenalin,¹¹⁷ ein Effekt, der von Bedeutung für die Thermoregulation zu sein scheint.¹¹⁸ Weiterhin wurde gezeigt, daß lokal im perivaskulären Fettgewebe gebildetes Ang II die Gefäßreaktivität beeinflusst, indem es auch hier die Freisetzung von Noradrenalin steigert, so daß das *in vitro*-Verhalten von Gefäßringen davon abhängt, ob das perivaskuläre Fettgewebe vorhanden ist oder nicht.¹¹⁹

Aus diesen Befunden läßt sich folgern, daß perivaskulär gebildetes Ang II durch seinen Einfluß auf Noradrenalin den Blutfluß im Fettgewebe und den Stoffwechsel der Fettzellen beeinflusst, da beide Funktionen unter adrenerger Regulation stehen.¹²⁰ Vorläufige Daten hierzu deuten eine Verringerung der β -adrenerg vermittelten Vasodilatation im Fettgewebe durch Ang II an,¹²¹ die Rolle von Ang II im adipocytären Stoffwechsel (insbesondere Lipolyse) wird kontrovers diskutiert.¹²¹⁻¹²⁵

1.3.3 Das adipocytäre RAS bei Adipositas und Hypertonie

Die AGT-Expression im weißen Fettgewebe der Ratte wird durch Fütterung nach mehrtägigem Fasten verdoppelt.¹²⁶ Obwohl weder die AGT-Expression in der Leber noch die AGT-Plasmaspiegel unter Fasten oder anschließender Nahrungsaufnahme verändert waren, wurde während der Fütterungsphase ein deutlicher Blutdruckanstieg beobachtet, der durch die adipocytäre AGT-Expression erklärt werden könnte.¹²⁶

Zusammen mit diesen Daten ergeben die nachstehend aufgeführten Studien, in denen die Regulation des RAS im Fettgewebe bei Adipositas und Hypertonie untersucht wurde, keine eindeutigen Ergebnisse. Untersuchungen am Menschen konzentrierten sich bislang auf die Adipositas. Blutdruckwerte wurden nach persönlicher Auskunft der jeweiligen Autorinnen nicht zuverlässig erhoben.¹²⁷⁻¹²⁹

Tabelle 2: Regulation des RAS im Fettgewebe bei Adipositas und Hypertonie (keine Angaben: k.A.; Steigerung: +; Verringerung: -; kein Einfluß: 0).

	<i>AGT</i>	<i>ACE</i>	<i>AGTR1</i>	Literatur
Mensch (BMI, Fettverteilung)	+ / 0	0	+	[110,127-130]
<i>Sprague Dawley</i> Ratte (refeeding, Adipositas)	+/0	-	-	[126,131,132]
<i>Spontan hypertensive</i> Ratte	-	k. A.	k. A.	[133,134]
<i>Wistar fatty</i> Ratte (Adipositas & Hypertonie)	-	k. A.	k. A.	[135]
<i>Zucker obese</i> Ratte (Adipositas)	- / +	k. A.	-	[110,136,137]
<i>viable yellow</i> Maus (Adipositas)	-	k. A.	k. A.	[110]
<i>obese und diabetes</i> Maus (Adipositas)	+	k. A.	k. A.	[126]

1.4 ZIELE DER ARBEIT

Eine Reihe von Studien deuten auf einen Beitrag des Fettgewebes zur Entstehung der adipositas-assoziierten Hypertonie hin (s. 1.2.3 und die Übersicht von Engeli und Sharma⁷³). Insbesondere ist vorstellbar, daß von Adipocyten sezernierte vasoaktive Substanzen hierbei eine Rolle spielen. Diese vasoaktiven Substanzen könnten direkt im Fettgewebe an Blutgefäßen wirken und den Blutfluß des Fettgewebes beeinflussen. Zudem ist eine Wirkung ubiquitär im Körper an kleinen, von perivaskulären Adipocyten umgebenen, Widerstandsgefäßen denkbar.⁷³ Das RAS als eines der bedeutendsten vasoaktiven Systeme ist ein Kandidat für dieses Modell, und damit lautete die gestellte Aufgabe, die Expression der Gene des RAS im Fettgewebe bei Adipositas und Hypertonie zu untersuchen. Dadurch sollte ein erster Eindruck erhalten werden, ob Adipositas und insbesondere Hypertonie mit Veränderungen des adipocytären RAS assoziiert sind, denn zum Zeitpunkt des Studienbeginns lagen die in **Tabelle 2** genannten Daten noch nicht vor.

Die Aufgaben lauteten im Einzelnen: Rekrutierung und Charakterisierung normalgewichtiger Normotoniker, adipöser Normotoniker und adipöser Hypertoniker im Rahmen einer klinischen Studie. Etablierung einer Methode zur subkutanen Fettgewebebiopsie. Etablierung von Methoden zur Aufarbeitung kleiner Fettgewebemengen (Isolierung von Adipocyten und Adipocyten-RNA). Vergleich der quantitativen Expression der Gene *AGT*, *Renin*, *ACE* und *AGTR1* in isolierten Adipocyten zwischen den drei genannten Gruppen.

2 Material und Methoden

2.1 PROBANDENREKRUTIERUNG UND STUDIENABLAUF

2.1.1 Probandenrekrutierung; Votum der Ethikkommission

Der klinische Teil dieser Arbeit wurde 1999 am Universitätsklinikum Benjamin Franklin unter Mithilfe einer Studienschwester durchgeführt. Nach Erarbeitung der für die Studie notwendigen Materialien (Studienablauf, Fragebögen, Datenbögen, schriftliche Aufklärung und Einwilligung, Datenbank etc.) erfolgte im Frühjahr 1999 eine Pilotstudie zur Etablierung der Fettgewebebiopsie und der Probenverarbeitung an 12 freiwilligen Medizinstudenten. Die Rekrutierung der Probanden erfolgte durch Inserate in der Berliner Tagespresse. In einem Telefongespräch wurde den Interessenten Zweck und Ablauf der Studie und Durchführung der Fettgewebebiopsie erläutert. Bei Interesse erfolgte mittels Check-Liste das Erfragen von Ausschlußkriterien. Jeder Proband erhielt eine Aufwandsentschädigung von DM 100 und einen Abschlußbrief mit Angaben zu BMI, Taillenumfang, Blutdruck und wichtigen Laborwerten wie Blutzucker, Blutbild, Leber- und Pankreasenzyme.

Die Durchführung des hier beschriebenen Studienprotokolls (insbesondere die subkutane Fettgewebebiopsie) wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der FU Berlin genehmigt.

2.1.2 Studienablauf

- Tag 1:
- Zwischen 8 und 9 Uhr mündliche Aufklärung
 - Aushändigung der schriftlichen Aufklärung und Einwilligung
 - Beginn der 24h-Blutdruckmessung
- Tag 2:
- Probanden kommen morgens nüchtern
 - Abgabe der unterschriebenen Einwilligung
 - Abgabe des 24h-Blutdruckgeräts
 - anthropometrische Messungen
 - Blutentnahmen
 - Fettgewebebiopsie

2.1.3 Ein- und Ausschlußkriterien

Einschlußkriterien:

- BMI > 30 kg/m² oder BMI < 25 kg/m²
- Alter zwischen 35 und 65 Jahren
- mindestens siebentägiges medikamentenfreies Intervall vor der Biopsie
- Verständnis der mündlichen und schriftlichen Aufklärungen
- schriftliche Einwilligung

Ausschlußkriterien:

- sekundäre Hypertonie (inkl. Schlafapnoe-Syndrom)
- symptomatische Herzinsuffizienz
- symptomatische koronare Herzkrankheit
- Einnahme von Antikoagulanzen, bekannte Blutungsneigung
- Gewichtsreduktion > 5 kg in den 3 Monaten vor Probenentnahme
- Diät mit < 1500 kcal/d oder Fasten während des Monats vor Probenentnahme
- chronische Nieren-, Leber- und Lungenerkrankungen
- chronische hämatologische und gastrointestinale Erkrankungen
- endokrinologische Erkrankungen
- mit Insulin oder oralen Antidiabetika behandelter Diabetes mellitus
- Autoimmunerkrankungen oder Zustand nach Organtransplantation
- psychiatrische und neurologische Erkrankungen
- Schwangerschaft und Stillzeit
- akute Infektion
- Neoplasien
- Wundheilungsstörung, Neigung zur Keloidbildung
- bekannte Allergie gegen Lokalanästhetika

2.2 ANTHROPOMETRISCHE MESSUNGEN

Körpergröße und Körpergewicht wurden an bis auf die Unterwäsche entkleideten und stehenden Probanden mittels geeichtem Personenlängenmeßgerät 5001 (Abbildung 5, links) und geeichter Waage S20-7720 (beide Geräte von Soehnle-Waagen, Murrhardt, Deutschland) bestimmt. Die Messung des Taillenumfanges (Abbildung 5, rechts) erfolgte in leichter Expiration zwischen Rippenbogen und Beckenkamm.

Die Messung der Körperzusammensetzung mittels bioelektrischer Impedanzanalyse (BIA, AKERN-RJL BIA 101/S, Data Input, Frankfurt a.M., Deutschland) erfolgt durch Messung des elektrischen Widerstandes (Impedanz), den ein Wechselstrom (0,8 mA, 50 kHz) im Körper erfährt. Hierbei werden Resistenz (Ohmscher Widerstand, bestimmt durch den Wassergehalt der Gewebe) und Reaktanz (kapazitiver Widerstand der Zellmembranen) bestimmt.¹³⁸ Die Messung erfolgte an der dominanten Körperseite (Abbildung 5, links), die Oberschenkel sollen sich nicht berühren und die Arme müssen vom Körper abgewinkelt werden; Metallkontakt ist zu vermeiden. Die Berechnung der Kompartimente Wasser, Fett und fettfreie Masse erfolgte mit dem Programm BIAWIN (Prolog GmbH, Frechen, Deutschland) unter Berücksichtigung von Alter, Geschlecht, Größe und Gewicht. Die BIA wird von Veränderung des Körperwassergehalts beeinflusst,¹³⁸ sodaß der direkte Vergleich von Schlanken und Übergewichtigen nicht zulässig ist (s.1.2.1).

2.3 24 STUNDEN-BLUTDRUCKMESSUNG

Bei der ambulanten 24h-Blutdruck-Messung (ABDM; Abbildung 6, rechts; SPACELABS 90207, Spacelabs, Kaarst, Deutschland) wird der Blutdruck der Probanden unter Alltagsbedingungen am nicht-dominanten Arm. Bei einem Oberarmumfang bis 32 cm wurde eine 14 cm breite Manschette, bei einem Oberarmumfang > 32 cm eine 16 cm breite Manschette verwendet. Unter Berücksichtigung des vom Probanden geführten Aktivitätsprotokolls wurde das Blutdruckprofil ausgewertet, wenn mindestens 48 erfolgreiche Messungen aufgezeichnet waren. Fühlten sich Probanden durch die ABDM in ihrem Nachtschlaf beeinträchtigt, wurden statt der 24 h-Mittelwerte die Tagesmittelwerte ausgewertet.

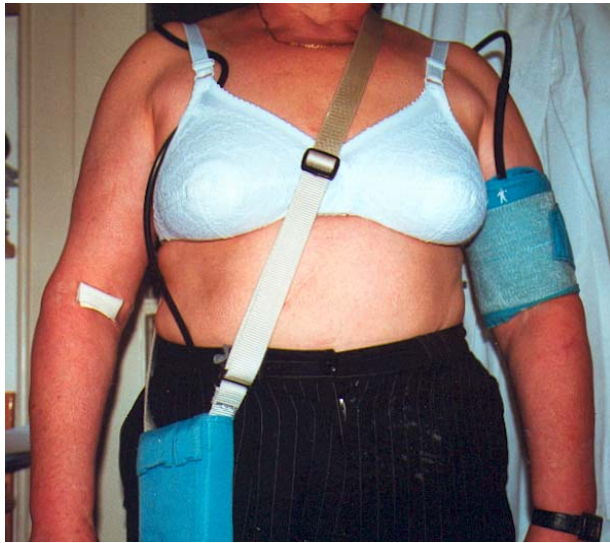


Abbildung 5: Bestimmung der Körpergröße und des Taillenumfanges.

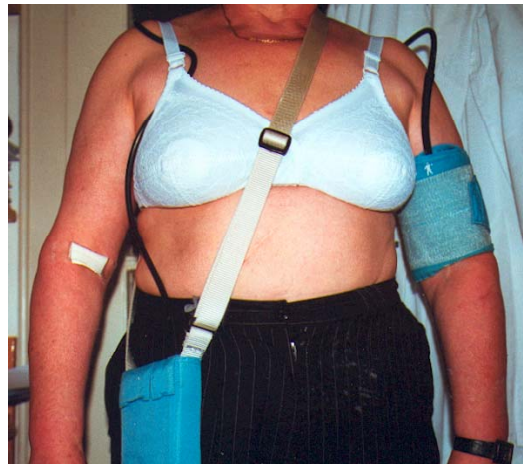


Abbildung 6: Elektrodenlage bei der Bioimpedanzanalyse (links). Manschette und Meßgerät der 24h Blutdruckmessung (rechts).

2.4 BLUTUNTERSUCHUNGEN

2.4.1 Materialien

ACE-Reagenz (# 305-UV)	Sigma, Deisenhofen
Aldosteron RIA Kit	DPC Biermann, Bad Nauheim
Ang I RIA Kit (# NEA 104)	NEN Life Science, Köln
Butterfly-Kanülen, Vacutainer-System	Becton Dickinson, New Jersey, USA
Centrifuge 5810 R mit Ausschwingrotor	Eppendorf, Hamburg
Cholesterin CHOD-PAP Kit (# 144 2341)	Roche Diagnostics, Mannheim
DPC Immunoassay Kontrolle CON 6	DPC Biermann, Bad Nauheim
γ -Counter 1470 Wizard	Wallac, Deutschland
Glukose-Analysator 2	Beckmann, München
Glucose-Kit	Beckmann, München
Insulin RIA Kit	DPC Biermann, Bad Nauheim
Kalibrator für ACE-Aktivität (# 305-50)	Sigma, Deisenhofen,
Kontrollplasma für die AGT-Bestimmung	Plasmapool von Arbeitsgruppenmitgliedern
Leptin RIA Kit (# RIA-1624)	DRG Instruments, Marburg
NaCl (0,9 %) ad iniectionem	Braun, Melsungen
Precinorm U (# 144 6061)	Roche Diagnostics, Mannheim
Salzsäure (# 113386)	Merck, Berlin
Spectrophotometer Uvikon 610 CL	Kontron, Eching
Triglyceride GPO-PAP Kit (# 701 912)	Roche Diagnostics, Mannheim

Herstellung des Phosphatpuffers für die Ang I-Bestimmung:

BSA Fraktion V (# A 9418)	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydrogenphosphat (# 106559)	Merck, Berlin
Phosphorsäure (# 100573)	Merck, Berlin
Aqua Spüllösung (steril)	Delta Pharma, Deutschland

17,8 g Natriumhydrogenphosphat und 10 g BSA in 1000 ml dest. Wasser lösen und mit Phosphorsäure auf pH 7,4 einstellen.

2.4.2 Blutentnahmen

- Blutentnahme aus einer Kubitalvene nach 20 min Liegen in Ruhe.
- Nach der Venenpunktion wurden zuerst Insulin 1 (Serumröhrchen) und Glucose 1 (gekühltes Glucose-Röhrchen, auf Eis gelagert) abgenommen, in den folgenden 5 min alle weiteren Röhrchen (EDTA-Röhrchen für Blutbild für das Zentrallabor, 4x gekühlte EDTA-Röhrchen für AGT, Aldosteron und andere Hormone, auf Eis gelagert, Serum-Röhrchen für Elektrolyte, Kreatinin, GOT, γ GT, alkalische Phosphatase, Amylase für das Zentrallabor, 3x Serum-Röhrchen für Triglyceride, Cholesterin, Leptin, ACE-Aktivität und andere Messungen) und dann Insulin 2 und Glucose 2.
- Das Blutabnahme-System wurde dann zur Überbrückung mit Kochsalzlg. gefüllt.
- Nach 5 min Wartezeit wurden mit der gleichen Spritze Kochsalzlg. und 5 ml Blut aspiriert, dann Insulin 3 und Glucose 3 abgenommen.
- Serum und Plasma wurden durch Zentrifugation bei 1700 x g bei 4° C gewonnen. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20° C.

2.4.3 Triglyceride, Gesamtcholesterin und Leptin im Serum

Triglyceride: 0,02 ml Serum; "Triglyceride Kit" (Endpunktbestimmung). Bei 546 nm Messung des Reaktionsproduktes 4-(p-Benzochinon-monoimino)-phenazon, das im 1:1-Verhältnis zu den Triglycerid-Molekülen entsteht. Kontrollserum: Precinorm U.

Gesamtcholesterin: 0,02 ml Serum; "Cholesterin-Kit"; Meßprinzip und Kontrolle entsprachen der Triglycerid-Bestimmung.

Leptin: 0,1 ml Serum; Radioimmunoassay. Inkubation des Serums mit ¹²⁵I-markiertem Leptin und einem Antikörper (Kaninchen) gegen Leptin für 24 h bei 4° C, dann Präzipitation der Immunkomplexe durch einen zweiten Antikörper (Ziege) und Zentrifugation (20 min, 4° C, 2500 g), dann Messung der Aktivität des Pellets im γ -Counter. Aufgrund des kompetitiven Ansatzes stammen die Pellets mit der größten Aktivität aus den Serumproben mit der kleinsten Leptinmengen. Die Berechnung der Leptin-Konzentration der Proben in ng/ml erfolgte anhand einer im Kit enthaltenen Standardreihe.

2.4.4 Messungen von Parametern des RAS

AGT: 0,05 ml Plasma mit 0,45 ml Phosphatpuffer verdünnen, davon 0,01 ml mit rekombinantem humanen Renin (überlassen von Dr. Fischli, Hoffman La Roche, Basel, Schweiz) in Phosphatpuffer bei 37° C für 3 h inkubieren (vollständige Umwandlung von AGT zu Ang I im Verhältnis 1:1). Der Abbau von Ang I wurde durch ein Proteaseinhibitoren-Mix verhindert (Dimercaprol und 8-Hydroxychinolon, im Ang I RIA Kit enthalten). Zugabe von ¹²⁵I-markiertem Ang I und Ang I-Antikörper (Kaninchen), Inkubation für 18 h bei 4°C. Zugabe eines anti-Kaninchen IgG-Antikörpers und Zentrifugation (2500 g, 20 min) präzipitieren die Immunkomplexe, Messung des Pellets im γ -Counter. Berechnung der AGT-Konzentration der Proben in ng Ang I/ml anhand einer im Kit mitgelieferten Standardreihe. Kontrolle mit einem arbeitsgruppeneigenem Plasma.

ACE-Aktivität: 0,1 ml Serum und ACE-Reagenz für 30 s inkubieren; die Abnahme des Reaktionsproduktes Furylacryloyl-Phenylalanin (340 nm, 37° C) wurde über 1 min gemessen (5 Meßwerte). Die Berechnung der ACE-Aktivität erfolgte durch Vergleich eines Kalibrators bekannter ACE-Aktivität mit der Differenz aus Anfangs- und Endextinktion der Proben.

Aldosteron-Konzentration: 0,2 ml Plasma mit ¹²⁵I-markiertem Aldosteron in einem Reaktionsgefäß des Kits inkubieren (18 h, Raumtemperatur), dessen Wände mit einem Antikörper (Kaninchen) gegen Aldosteron beschichtet sind. Absaugen des Gemisches und Messen der Reaktionsgefäße im γ -Counter. Umrechnung der Meßwerte anhand einer im Kit enthaltenen Standardreihe in die Aldosteron-Konzentration in pg/ml. Aufgrund des kompetitiven Ansatzes war die Aktivität in den Röhrchen am größten, in denen die die Proben mit den kleinsten Aldosteron-Plasmaspiegeln gemessen wurden. Kontrolle mit einem kommerziell erhältlichen Plasma.

2.4.5 Bestimmung der Insulinresistenz

Bei der Methode des homeostasis model assessments (HOMA) werden Meßwerte für nüchtern-Glucose und -Insulin mit Hilfe eines mathematischen Modells in Beziehung gesetzt. Obwohl der direkte Vergleich verschiedener Studienpopulationen aufgrund der variierenden Modelle nicht ohne weiteres möglich ist, eignet sich HOMA zur Anwendung innerhalb einer Studienpopulation aufgrund der einfachen Durchführung.¹³⁹ Mittelwerte für Insulin und Glucose aus drei im Abstand von 5 min gesammelten Blutproben wurden verwendet, da insbesondere Insulin einer schnellen Fluktuation mit etwa 14-minütigen Zyklen unterliegt.¹⁴⁰ Der Index der Insulinresistenz wurde anhand von Werte-Paaren aus nüchtern-Insulin [mU/l] und nüchtern-Glucose [mmol/l] mittels der Formel $(\text{Insulin} \times \text{Glucose})/22,5$ berechnet.¹⁴⁰ Die Glucose-Konzentration wurde bestimmt, indem die Glucose oxidiert und der Sauerstoffverbrauch im polarographischen Sauerstoffsensoren gemessen wurde (Kontrolle mit Precinorm U). Die Insulin-Konzentration wurde in 0,2 ml Serum mittels Radioimmunoassay gemessen.

2.5 GEWINNUNG SUBKUTANER ADIPOCYTEN

2.5.1 Materialien

Heparin-Natrium 2.500 IE	Braun, Melsungen, Deutschland
Kanülen Sterican 26 G, 0,45 x 25 mm (braun) und 20 G, 0,90 x 70 mm (gelb)	Braun, Melsungen, Deutschland
Lidocain (1 %, ohne Adrenalin)	Braun, Melsungen, Deutschland
Methylene Blue Solution (# 66F-6109)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Mullkompressen Gazin (7,5 x 7,5 cm)	Lohmann-Rauscher, Deutschland
NaCl (0,9 %) ad iniectionem	Braun, Melsungen, Deutschland
Siebgewebe (250 µm, Polyamid)	Willi Kaldenbach, Berlin, Deutschland
Skalpell Gr. 11 (Einmalskalpell, Feather)	Produkte für die Medizin (pfm), Köln
Steri-Strips (6 x 100 mm)	3M Health Care, Borken, Deutschland
Strauss-Kanüle (2,0 x 43 mm)	Dispomed Witt, Gelnhausen
Zentrifugenröhrchen (Falcon, 14 und 50 ml)	Becton Dickinson, New Jersey, USA
<u>NaCl-Heparin-Lsg.:</u> 2500 IE Heparin mit 0,9 % NaCl auf 50 ml auffüllen (50 IE/ml).	

Herstellung des Adipocytenpuffers:

Hank's Balanced Salt Solution HBSS (# L 2015)	
mit Natriumbicarbonat und Phenolrot	Biochrom, Berlin, Deutschland
HEPES (# L 1615)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Bovines Serum Albumin BSA (# A 9418)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Natronlauge (# 109136)	Merck, Berlin, Deutschland
Sterilfilter (0,22 µm, GP Express Membran)	Millipore, Eschborn, Deutschland

Zusätze in HBSS lösen, so daß Endkonzentrationen von 25 mM HEPES und 4 % BSA vorliegen. Mit 1 N Natronlauge auf pH 7,5 einstellen, dann sterilfiltrieren.

Herstellung der Kollagenase-Lsg.:

1 g Kollagenase Typ I CLS (# C1-22, Biochrom, Berlin, Deutschland) in 10 ml Adipocytenpuffer unter der Sterilbank lösen. Diese Stammlösung (100 mg/ml Kollagenase) bei -20°C lagern. 5 ml der Kollagenase-Stammlösung in 495 ml Adipocytenpuffer lösen (1 mg/ml), in 30 ml Portionen bei -20° C für maximal 3 Wochen aufbewahren.

2.5.2 Durchführung der Fettgewebebiopsie

Die hier beschriebene Methode der Fettgewebebiopsie wurde in einer Pilotstudie optimiert und basiert auf Literaturangaben.¹⁴¹ Die Biopsien wurden aus dem subkutanen Fettgewebe der Bauchhaut entnommen. Der Eingriff dauert ca. 15 min.

- Hautdesinfektion, Abdeckung der Bauchhaut mit einem sterilen Lochtuch.
- Lokalanästhesie seitlich unterhalb des Bauchnabels mit 3 ml 1 % Lidocain eines 1 cm x 1 cm großen Hautareals (26 G Kanüle). Aspiration vor der Injektion vermeidet intravasale Injektionen.
- 2-3 mm lange Stichinzision; Auffangen von Blut mit sterilen Tupfern.
- Strauss-Kanüle durch den Schnitt einführen, 10 ml Spritze mit 5 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung anschließen.

- Durch Bewegung der Kanüle sowie Einspritzen und Aspiration der Kochsalzlösung werden kleine Fettgewebestückchen gewonnen. Schnelle Spritzenwechsel verhindern die Blutgerinnung in der Spritze.
- Unmittelbar nach Spritzenwechsel den Inhalt in Zentrifugenröhrchen (14 ml) überführen, mit NaCl-Heparin-Lösung auf 13 ml auffüllen und ins Labor bringen.
- Kochsalzreste durch Druck aus dem Gewebe entfernen. Inzisionsstelle desinfizieren, trocknen, mit Steri-Strips verschließen, mit großem Pflaster bedecken. Pflasterwechsel bei Bedarf; Steri-Strips nach 5 Tagen entfernen.

Bei der Anwendung von Lidocain zur Lokalanästhesie ist zu beachten:

- Wirkungseintritt nach 2 bis 4 min.
- Lidocain ist ein Aminoamid ohne allergisch wirksame Metabolite. Der Zusatz des allergisch wirksamen Konservierungsmittels Methyl-4-hydroxybenzoat ist zu vermeiden. Das in dieser Studie verwendete Lidocain ist frei von Konservierungsmitteln.
- Maximal 50 ml der 1 % Lidocain-Lösung dürfen subkutan injiziert werden. Hinweise auf unerwünschte zentrale Wirkungen wären Taubheit der Zunge und der perioralen Region. Unerwünschte kardiovaskuläre Wirkungen sind bei diesen Mengen nicht zu erwarten.

2.5.3 Isolierung subkutaner Adipocyten

Die hier beschriebene Methode zur Isolierung humaner Adipocyten direkt nach subkutaner Fettgewebebiopsie mittels enzymatischem Verdau mit Kollagenase wurde in Abwandlung von Literaturbeschreibungen in unserem Labor optimiert.^{142,143}

- Waschen der Fettgewebestückchen: Absaugen der Flüssigkeit (lange G 20 Kanülen, 5 ml Spritzen), Auffüllen mit Adipocytenpuffer, Schwenken der Röhrchen und erneutes Absaugen der Flüssigkeit.
- Überführen aller Proben eines Probanden in ein gewogenes 50 ml Zentrifugenröhrchen.
- Gewicht des Fettgewebes nach Absaugen der Flüssigkeit bestimmen.

- Mindestens 4 ml Kollagenase-Lsg. pro g Fettgewebe zugeben. Röhrchen verschließen und für 45 min bei 37° C in einem Schüttelwasserbad inkubieren.
- Inhalt eines Zentrifugenröhrchens über Siebgewebe (250 µm Maschenweite) geben und das Filtrat in einem frischen 50 ml Röhrchen auffangen.
- Filtrat mit Adipocytenpuffer bis etwa 48 ml auffüllen und ungekühlt bei 200 g für 2 min zentrifugieren. Die oben schwimmenden Adipocyten in ein gewogenes 14 ml Röhrchen dekantieren, dabei bleibt die pelletierte Stromavaskularfraktion (Fibroblasten, Präadipocyten, Blutgefäße, Blutzellen) im Röhrchen zurück. Adipocyten mit Adipocytenpuffer auffüllen und bei 200 g für 2 min zentrifugieren.
- Wenn noch Blutreste im Röhrchen sind: Umschütten der Adipocytenschicht in ein gewogenes 14 ml Röhrchen, auffüllen und zentrifugieren wie vorher. Sonst möglichst vollständiges Absaugen der Flüssigkeit, um das Gewicht der isolierten Adipocyten näherungsweise zu bestimmen.
- Einfrieren der Adipocyten in flüssigem Stickstoff; Lagerung bei -80° C.

Die Kontrolle der Adipocytenisolierung erfolgte während der Optimierungsphase und später stichprobenartig durch Anfärbung der Adipocyten mit Methyleneblau. Dazu wurden die isolierten Adipocyten im Adipocytenpuffer resuspendiert und ein 100 µl Aliquot mit 25 µl einer 1,4%igen Methyleneblaulösung vorsichtig gemischt. Unter dem Mikroskop erkennt man dann randständige dunkelblaue Zellkerne in den großen Adipocyten. Eventuell kontaminierende Zellen könnten dementsprechend an ihren Zellkernen und der vollständig anderen Zellform und -größe erkannt werden.

2.6 RNA-EXTRAKTION UND CDNA-SYNTHESE

2.6.1 Materialien

Agarose (# A 9539)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
β-Mercaptoethanol (# M 6250)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Concentrator 5301("Speed Vac")	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
DNA Thermal Cycler	Perkin Elmer, Neuried, Deutschland
dNTP Mix (jeweils 10 mM, # 18427-013)	Life Technologies, Karlsruhe
Ethanol (# 1.009.831.000, unvergällt)	Merck, Berlin, Deutschland

Lysepuffer RLT (# 79 216)	Qiagen, Hildesheim, Deutschland
MUPID-2 Mini-Gel Elektrophoresis Unit	Cosmo Bio Co., Ltd.
Random Primer Mix 3 μ M (# 48190-011)	Life Technologies, Karlsruhe
Rnase free DNase Set (# 79 254)	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit (# 74 106)	Qiagen, Hilden, Deutschland
SuperSkript Rnase H ⁻ Kit (# 18053-017)	Life Technologies, Karlsruhe
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
UV Spectrometer Ultra-Spec 2000	Pharmacia Biotec
UV Transluminator	UVP, Inc.

50 x TAE-Elektrophoresepuffer enthält:

242 g/l	Trishydroxymethylaminomethan (# 108382)	Merck, Berlin, Deutschland
57,1 ml/l	Eisessig (# 100063)	Merck, Berlin, Deutschland
100 ml/l	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, 0,5 M, pH 8, # 819040)	Merck, Berlin, Deutschland

Elektrophoreseladepuffer enthält:

0,1 % Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, Deutschland
50 % Glycerin (# 104092)	Merck, Berlin, Deutschland
in RNase-freiem Wasser aus dem RNeasy Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.6.2 RNA-Extraktion und DNase-Verdau

In unserem Labor wurden mehrere Methoden zur RNA-Extraktion aus Adipocyten getestet und schließlich eine Methode ausgewählt, bei der die Adipocyten in einem Guanidiniumisothiocyanatpuffer lysiert werden, die freigesetzte RNA mit Ethanol präzipitiert und durch Zentrifugation reversibel an eine Silikatmembran gebunden wird. Der enzymatische Abbau eventueller DNA-Kontaminationen erfolgt direkt auf der Silikatmembran. Zuletzt wird die RNA mit RNase-freiem Wasser eluiert. Mit dieser Methode werden RNA-Moleküle > 200 Nukleotide isoliert, transfer- und 5S ribosomale RNAs gehen verloren. Da diese 15-20 % der Gesamt-RNA ausmachen, ist die mit diesem Kit extrahierte RNA-Menge kleiner als bei anderen Methoden. Aufgrund des

großen Volumens der Adipocyten und des Lipidgehalts von 95 % mußte das vom Hersteller empfohlene Protokoll stark modifiziert werden.¹⁴⁴

- 1 Volumen Adipocyten nach Entnahme aus -80°C mit 3 Volumen Lysepuffer RLT mischen, bei 37°C erwärmen und vortexen (bezogen auf die Zellzahl wird etwa 10x mehr Lysepuffer eingesetzt als empfohlen; die Erwärmung dient der Verflüssigung der Lipide zur besseren Durchmischung des Lysats).
- Wenn sich das Lysat gut mischt und die Lipide ölige Konsistenz aufweisen: Zentrifugation (5 min bei 2500 g und 25°C) zur Abtrennung der Lipide.
- Mit 5 ml Spritze und langer G 20 Kanüle durch die Lipidschicht stechen und das wäßrige Lysat aspirieren, in ein 14 ml Röhrchen überführen und 10 x durch eine frische G 20 Kanüle aufziehen und ausspritzen (DNA-Scherung).
- Zum wäßrigen Lysat das gleiche Volumen 70 % Ethanol geben, kurz vortexen.
- Das Lysat-Ethanol-Gemisch in 700 μl Portionen auf eine RNeasy Mini Säule geben und 15 s bei 10 000 x g zentrifugieren, den Unterstand jeweils verwerfen.
- Diesen Schritt mit dem restlichen Gemisch und der gleichen Säule wiederholen.
- Waschschritt 1: 350 μl Puffer RW1, wie unter (5) zentrifugieren.
- DNase-Verdau: 10 μl DNase mit 70 μl DNase-Puffer mischen, nicht vortexen ! Direkt auf die Membran pipettieren, 15 min bei Raumtemperatur stehen lassen.
- Waschschritt 2: Direkt im Anschluß an den DNase-Verdau wie (7).
- Waschschritt 3: 700 μl Puffer RPE auf die Säule pipettieren, wie unter (5) zentrifugieren und dann das Sammelröhrchen wechseln.
- Waschschritt 4: 300 μl Puffer RPE auf die Säule pipettieren, 2 min bei max. Geschwindigkeit zentrifugieren, bis die Membran wirklich trocken ist.
- Säule in RNase-freies Reaktionsgefäß (1,5 ml) stellen und 30 μl RNase-freies Wasser aus dem RNeasy Mini Kit direkt auf die Membran pipettieren. 1 min bei Raumtemperatur stehen lassen und dann 1 min bei 10.000 x g zentrifugieren.
- 6 μl RNA + 86 μl Aqua ad iniectabilia für die photometrische Messung und 3 μl RNA + 1 μl Elektrophorespuffer + 6 μl Aqua ad iniectabilia für die Elektrophorese aliquotieren. RNA-Lösung bei -80°C einfrieren.

2.6.3 Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle der RNA

Die Konzentrationsbestimmung der verdünnten RNA-Lösung erfolgt bei 260 nm in einer Quarzküvette. Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht 40 µg/ml RNA. Unter Berücksichtigung der Verdünnung (6 µl RNA-Lsg. in 86 µl Wasser: 15,33) wurde die Konzentration der isolierten RNA wie folgt berechnet:

$$\text{OD}_{260\text{nm}} \times 40 \text{ µg/ml} \times 15,33 / 1000 = \text{µg RNA/µl.}$$

Zur Reinheitsbestimmung wurde der Quotient $\text{OD}_{260\text{nm}} / \text{OD}_{280\text{nm}}$ berechnet. Quotienten < 1,8 weisen auf die Anwesenheit von Proteinen oder Phenol hin, Quotienten > 2,0 zeigen Verunreinigungen durch Salze oder Nukleotide an, wie sie bei fortschreitender Degradation auftreten. Zur Überprüfung der Integrität der isolierten RNA wurde das Gemisch aus 3 µl RNA + 1 µl Elektrophoresepuffer + 6 µl Wasser in einem nicht-denaturierenden 1,5 % TAE-Agarose-Gel (mit 0,07 µg / ml Ethidiumbromid) aufgetrennt. Die Qualität der RNA ist unter UV-Licht (250 – 310 nm) an den Banden der ribosomalen RNAs abzuschätzen. Im Idealfall ist die Intensität der 28S ribosomalen RNA-Bande doppelt so groß wie die der 18S ribosomalen RNA. Eine Färbung in den Ladetaschen weist auf genomische DNA-Kontamination hin.

2.6.4 cDNA-Synthese

Reverse Transkriptasen (RT) verwenden RNA als Matrize und synthetisieren an das 3'-Ende eines Primers die komplementäre DNA (cDNA).

- 2 µg eingetrocknete RNA werden mit 1,8 µl Random Primer (3 µM, Endkonzentration: 2,7 nM) und 10,2 µl RNase-freiem Wasser (aus dem RNeasy Mini Kit) gemischt und 10 min bei 65° C erhitzt, dann sofort auf Eis gestellt.
- 4,0 µl 5x First Strand Buffer (mitgeliefert mit SuperSkript), 1,0 µl dNTP (Endkonzentration 500 µM), 2,0 µl DTT (100 mM, Endkonzentration 10 mM, mitgeliefert mit Enzym) und 1,0 µl SuperSkript RNase H⁻ (200 U/µl, Endkonzentration 5 U/µl) werden zu jeder Probe gegeben, das Gemisch 1 h bei 37°C inkubiert und dann 10 min auf 96°C erhitzen
- cDNA 1:10 verdünnen (20 µl cDNA + 180 µl Aqua ad iniectabilia). Damit hat die cDNA-Lösung eine Konzentration von 10 ng RNA-Äquivalent/µl.

2.7 QUANTITATIVE *TAQMAN* RT-PCR

2.7.1 Quantifizierung der Genexpression mittels RT-PCR

Bei der quantitativen RT-PCR wird anstelle der RNA die cDNA amplifiziert und anhand der Zyklenzahl, bei der eine definierte Menge des Amplifikats aus der Ziel-cDNA entstanden ist, quantifiziert. Bei der *TaqMan* RT-PCR wird eine Oligonukleotid-Sonde eingesetzt, die zwischen den beiden PCR-Primern an die Ziel-cDNA hybridisiert. Diese Sonde trägt am 5'-Ende einen Reporter (Fluoreszein) und am 3'-Ende einen Quencher (Rhodamin). Die Anregung der intakten Sonde mit 488 nm führt zum Energietransfer zwischen Reporter und Quencher, und nur der Quencher fluoresziert. Während der PCR hydrolysiert die *Taq*-Polymerase die Sonde, damit fluoreszieren Reporter und Quencher bei verschiedenen Wellenlängen. Dabei steigt die Fluoreszenzintensität des Reporters in der exponentiellen Phase der PCR proportional zur Akkumulation des PCR-Produktes an (Abbildung 7).

Effizienz der cDNA-Synthese: Die cDNA-Synthese aus verschiedenen RNA-Proben erfolgt nie mit gleicher Effizienz, daher müssen die zu vergleichenden Proben vor der Quantifizierung "normalisiert" werden. Die Normalisierung geschieht durch Amplifikation eines Kontroll-Gens ("endogene Kontrolle") aus jeder Probe. Endogene Kontroll-Gene werden unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht transkriptionell reguliert, und damit ist zumindest theoretisch die Quantität der mRNA des Kontroll-Gens in allen Proben identisch. Es wird angenommen, daß die Synthese von Ziel- und endogener Kontroll-cDNA in einer RNA-Probe mit gleicher Effizienz erfolgt. Unterschiedliche Effizienzen der cDNA-Synthese zwischen verschiedenen RNA-Proben können daher durch Division der Meßwerte (s.u.) von Ziel-Gen und endogener Kontrolle in jeder Probe ausgeglichen werden.

Effizienz der cDNA-Amplifikation: Bei der o.g. Normalisierung muß berücksichtigt werden, daß verschiedene Gene mit unterschiedlicher Effizienz amplifiziert werden. Wenn also die Amplifikationseffizienzen von Ziel-Gen und Kontrolle deutlich voneinander abweichen (Abbildung 13), ergeben sich je nach Zyklenzahl unterschiedliche Quotienten durch die Normalisierung. Dieses Problem wird beseitigt, indem in jedem *TaqMan*-Lauf Verdünnungsreihen einer Standard-cDNA für Ziel-Gen und Kontroll-Gen amplifiziert werden. Vor der Normalisierung einer Probe wird das Ergebnis von Ziel- und endogenem Kontroll-Gen zunächst auf die jeweilige

Standardkurve bezogen und die cDNA-Ausgangsmenge (in ng RNA-Äquivalenten) ermittelt (s. 2.7.4). Für die Standardreihe stehen in unserem Labor eine große Anzahl identischer Aliquots einer humanen Adipocyten-cDNA zur Verfügung.

PCR-Plateau: Die exponentielle Vermehrung der cDNA geht nach einer variablen Zyklenzahl in ein Plateau über (Abbildung 7). Der Vergleich der Genexpression zweier Proben kann nur während der exponentiellen Phase der PCR erfolgen. Das GenAmp® 5700 Sequence Detection System mißt die Reporter-Fluoreszenz mehrmals pro Zyklus und stellt den Verlauf in einem Amplifikationsplot dar (Abbildung 7). Bei der Auswertung kann dann eine Zyklenzahl ausgewählt werden, zu der sich alle zu messenden Proben in der exponentiellen Phase befinden.

D. Pipettierfehler: Konzentrationsschwankungen der Substanzen, wie sie schon durch geringe Pipettierfehler auftreten können, verfälschen die Ergebnisse und damit die Quantifizierung. Daher wird in jeder TaqMan RT-PCR der Referenzfarbstoff ROX (6-Carboxy-X-rhodamin) eingesetzt. Die Messung der Fluoreszenzintensität des Referenzfarbstoffes zu Beginn der PCR ermöglicht es dem System, Schwankungen der Reporterfluoreszenzintensität aufgrund von Konzentrationsschwankungen auszugleichen. Dieser Ausgleich erfolgt intern durch die Software und kann durch den Anwender nicht beeinflußt werden.

E. Erfäßbarer Mengenbereich: Die TaqMan-Methode deckt einen Mengenbereich von 1 bis 10^4 Molekülen ab, so daß im Regelfall keine Probenverdünnung notwendig ist, sondern alle cDNAs auf die Standard-Konzentration 10 ng RNA-Äquivalent/ μ l gebracht werden können. Je nach Expressionsstärke eines Gens werden zwischen 10 und 40 ng RNA-Äquivalent zur Quantifizierung eingesetzt.

2.7.2 Durchführung der TaqMan RT-PCR

Der TaqMan Universal PCR Master Mix enthält außer Primern, Sonde und cDNA alle notwendigen Substanzen. Als endogene Kontrolle wurde das Human-GAPDH-Kit verwendet (Glycerolaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase), dessen Sequenzen vom Hersteller nicht bekannt gegeben werden, aber nach Tests in unserem Labor amplifiziert dieser Kit keine genomische DNA. Für eine große Zahl von *in vitro* Manipulationen konnten wir zeigen, daß sich die GAPDH besser als andere

gebräuchliche Kontroll-Gene zur Arbeit mit humanen Adipocyten eignet, da keine transkriptionelle Regulation unter den getesteten Bedingungen nachweisbar war.¹⁴⁵

Pro *TaqMan*-Lauf werden in einer 96-well Platte Vierfachbestimmungen der Proben und Dreifachbestimmungen der Standardreihen für Ziel-Gen und *GAPDH* angesetzt. Negativkontrollen erfolgen mit Wasser statt cDNA. Alle Substanzen und die Standard-cDNA wurden zu Beginn in ausreichenden Mengen bereitgestellt, um für die Messungen aller Gene die gleichen Materialien einsetzen zu können.

Die *TaqMan* RT-PCR wird als 2-Schritt-PCR über 40 Zyklen mit einem für alle hier untersuchten Gene identischen Temperaturprofil durchgeführt:

10 min	95° C	Initiale Aktivierung der DNA-Polymerase
15 s	95° C	Denaturierung
1 min	60° C	Annealing und Amplifikation (für alle Gene gleich)

2.7.3 Materialien

Das *TaqMan*-System von PE Biosystems (Weiterstadt, Deutschland) besteht aus:

- GenAmp[®] 5700 Sequence Detection System mit SDS Software Version 1.3
- MicroAmp Optical 96 Well Reaction Plates (N8010560) und Caps (N8010935)
- *TaqMan* Universal PCR Master Mix (4310884 E)
- Human-GAPDH-Kit (4310884 E)
- ABIPRISM Primer Express Software zur Auswahl von Primern und Sonden

Die Primer wurden von Life Technologies (Karlsruhe) bezogen, die Sonden von BioTez (Berlin-Buch). Alle Sonden waren 5' mit FAM (6-Carboxy-Fluorescein, 518 nm) und 3' mit TAMRA (6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin, 582 nm) markiert. Angegeben sind die Endkonzentrationen für Primer und Sonden sowie die eingesetzten cDNA-Mengen.

AGT (73 bp Amplifikatgröße; 10 ng cDNA Ausgangsmenge)

Forward Primer:	5' CTT CAC TgA gAg CgC CTg C 3'	900 nM
Reverse Primer:	5' gAg ACC CTC CAC CTT gTC CA 3'	900 nM
Sonde:	5' CTg ATC CAg CCT CaC TAT gCC TCT gAC C 3'	130 nM

Renin (66 bp Amplifikatgröße; 30 ng cDNA Ausgangsmenge)

Forward Primer:	5' TTg gAg Agg TCA Cgg AgA TgC 3'	50 nM
Reverse Primer:	5' TgC CCA CAA CCC CAT CAA AC 3'	900 nM
Sonde:	5'CGC CTT ACC CTT CAT GCT GGC CG 3'	100 nM

ACE (88 bp Amplifikatgröße; 10 ng cDNA Ausgangsmenge)

Forward Primer:	5' CAC CCA ggC CAg gAA gTT T 3'	900 nM
Reverse Primer:	5' TgC CCg TTC TAg gTC CTg AA 3'	900 nM
Sonde:	5' CCA gTT gCA gAA CAC CAC TAT CAA gCg g 3'	120 nM

AGTR1 (70 bp Amplifikatgröße; 10 ng cDNA Ausgangsmenge)

Forward Primer:	5' ACC CAA TgA AgT CCC gCC T 3'	300 nM
Reverse Primer:	5' AgC AgC CAA ATg ATg ATg CAg 3'	900 nM
Sonde:	5' CgA CgC ACA ATg CTT gTA GCC AAA gTC A 3'	180 nM

2.7.4 Auswertung der TaqMan RT-PCR

Die Quantifizierung der Genexpression erfolgt über den C_T -Wert (threshold cycle, Abbildung 7). Das ist die Zyklenzahl, bei der die Reporter-Fluoreszenz erstmals einen Schwellenwert überschreitet. Dieser wird so gewählt, daß die Kurven aller zu vergleichenden Proben in der exponentiellen Phase geschnitten werden. Je größer die Ausgangsmenge der Zielsequenz, desto kleiner ist der C_T -Wert. In der exponentiellen Phase entspricht eine Halbierung der cDNA-Ausgangsmenge einem Anstieg des C_T -Werts um einen Zyklus.

Zur Erstellung der Standardkurven aus den Verdünnungsreihen wird der C_T -Wert über den Logarithmus der Ausgangsmenge der cDNA (log ng RNA-Äquivalent) aufgetragen (Abbildung 13). Für die Standardkurve gilt die Geradengleichung $y = mx + b$ mit m : Steigung der Geraden und b : Schnittpunkt mit der y -Achse. Die Ausgangsmenge von Zielsequenz und endogener Kontrolle wird entsprechend berechnet:

$$\log ng_{(\text{Probe})} = \frac{(C_{T(\text{Probe})} - b)}{m} \quad \Rightarrow \quad ng_{(\text{Probe})} = 10^{\log ng_{(\text{Probe})}}$$

Aus den Vierfachbestimmungen von Ziel-Gen und endogener Kontrolle pro Probe werden die Mittelwerte gebildet und diese dann dividiert (ng Probe/ng Kontrolle). Auf diese Weise erhält man normalisierte, einheitenlose Werte der relativen quantitativen Expression des Ziel-Gens (ausgedrückt als "Zielgen / GAPDH").

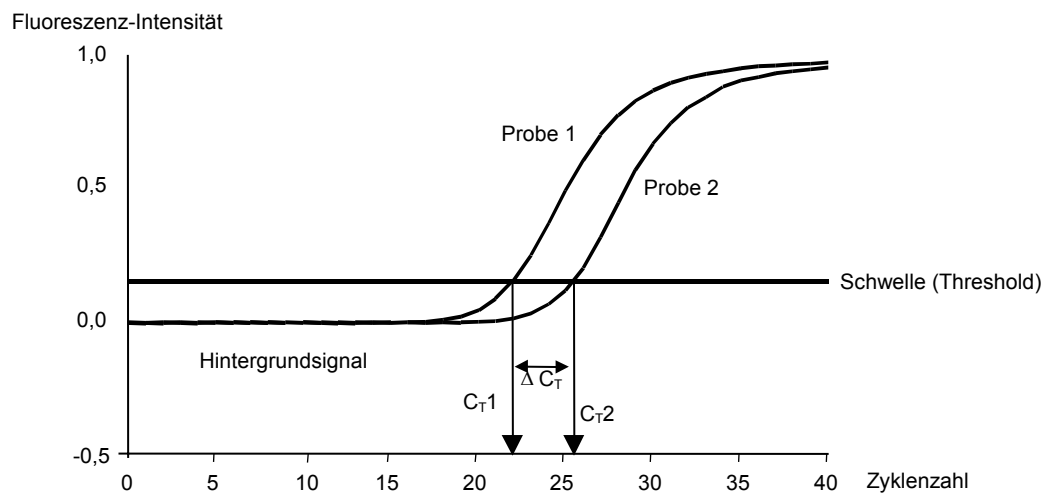


Abbildung 7: Schema des TaqMan-Amplifikationsplots.

2.8 DATENVERARBEITUNG UND STATISTIK

Alle Daten wurden anonymisiert in einer ACCESS 2.0 (Microsoft) Datenbank gesammelt. Die Auswertung der TaqMan-RT-PCRs erfolgten in EXCEL 7.0 (Microsoft). Die statistische Auswertung von Stichproben aus der Datenbank erfolgte mit dem Softwarepaket SPSS-PC+ für Windows, Version 9.0. Alle in die Auswertung einbezogenen Variablen waren entsprechend des Kolmogorov-Smirnov-Tests normalverteilt, damit erfolgt die Darstellung aller Variablen in Tabellen und Abbildungen als Mittelwert \pm Standardabweichung. Intergruppenvergleiche erfolgten mittels einfaktorieller ANOVA und anschließendem multiplem t-Test für mehr als zwei unabhängige Stichproben nach Bonferroni. Der Einfluß einer Auswahl von Variablen auf die Genexpression wurde mittels schrittweiser multipler linearer Regression analysiert. Der Einfluß der RAS-Gene auf Adipositas und Hypertonie wurde mit einer multivariaten Varianzanalyse überprüft. Als signifikant wurde ein $p < 0,05$ angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 PROBANDENREKRUTIERUNG

Von den ca. 120 Interessenten, die sich auf Zeitungsannoncen oder Aushänge meldeten, nahmen fünfzig an der Studie teil und wurden biopsiert. Von diesen fünfzig Probanden wurden aus den unten genannten Gründen nur dreißig in die Auswertung einbezogen. Gründe waren:

- Abbruch der Biopsie auf Verlangen eines Probanden.
- Nichtauswertbare ABDM bei einer Probandin wegen Herzrhythmusstörungen.
- Medikamenteneinnahme bei zwei Probanden (Metformin bzw. Thiamazol), nachdem beim Aufklärungsgespräch die Einnahme von Medikamenten noch verneint wurde.
- Hinweise auf Leberschäden bzw. eingeschränkte Nierenfunktion bei drei Probanden durch Laborwerte, ohne daß anamnestische Hinweise bestanden.
- Bei zwei Probanden lag der BMI nicht in den erwünschten Bereichen.
- Eine Probandin erwähnte beim Aufklärungsgespräch nicht ihre länger zurückliegende Mamma-Karzinomerkrankung.
- Eine Probandin teilte kurz nach dem Biopsietermin mit, daß bei ihr ein Kolon-Tumor diagnostiziert worden sei.
- Bei sieben Probanden gelang es nicht, ausreichend RNA für die Analyse der Genexpression zu erhalten, da entweder die Menge der isolierten Adipocyten minimal war, oder aber Probleme bei der RNA-Isolierung auftraten.

Auf diese Weise reduzierte sich die Zahl der auswertbaren Probanden auf dreißig Frauen und zwei Männer. Um die Auswertung zu erleichtern und die Aussagekraft der Studie nicht zu verringern, wurde auf den Einschluß der beiden Männer verzichtet. Ausgewertet werden im folgenden daher die Daten von dreißig Frauen, die in die drei Gruppen "schlanke Normotoniker", "adipöse Normotoniker" und "adipöse Hypertoniker" eingeteilt wurden. Die Charakteristika dieser drei Gruppen werden unter 3.3 ausführlich dargestellt.

3.2 FETTGEWEBEBIOPSIE UND ADIPOCYTENGEWINNUNG

Die hier beschriebene Methode der Fettgewebebiopsie dauert etwa 15 min. Der Eingriff war leicht erlernbar und ist ohne größere Beeinträchtigung der Probanden durchführbar (Abbildung 8, links). Nur eine der fünfzig durchgeführten Biopsien mußte auf Verlangen des Probanden abgebrochen werden. Aufgrund des sonstigen Verhaltens des betreffenden Probanden lag der Verdacht nahe, daß die Biopsie als solche nicht der Hauptgrund für den Wunsch nach Abbruch war. Zwischen 1 g bei schlanken und bis zu 10 g Fettgewebe bei adipösen Personen konnten entnommen werden, jedoch bestand kein enger Zusammenhang zwischen BMI und Ausbeute.

Als Begleiterscheinungen der Biopsie zeigten sich ein brennender Schmerz zu Beginn der Injektion von Lidocain, der nach wenigen Minuten durch die Wirkung der Lokalanästhesie verschwand. Die Biopsiestelle ist nach Abklingen der Betäubung und am nächsten Tag druckempfindlich. Ein bis zu 8 x 8 cm großen Hämatom kann entstehen, das innerhalb von drei bis vier Wochen verschwindet. In einem Fall erfolgte im Anschluß an die Biopsie eine telefonische Rückfrage. Diese Probandin stellte sich noch einmal bei uns vor, da sich ein großes, tastbares Hämatom im subkutanen Fettgewebe entwickelt hatte. Im Verlauf verkleinerte sich das Hämatom ohne weitere Komplikationen.

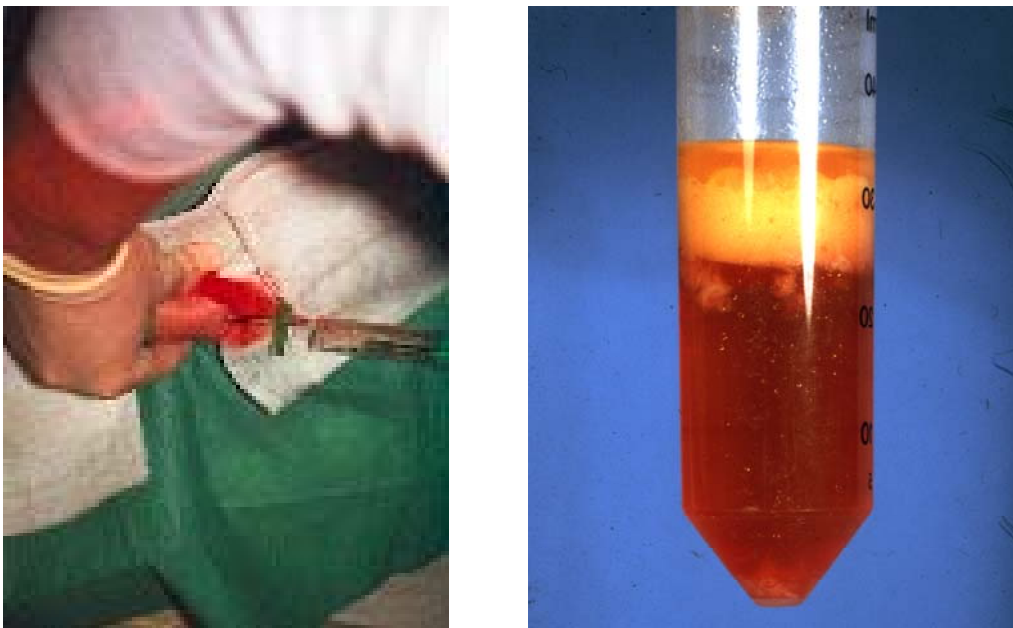


Abbildung 8: Fettgewebebiopsie (links) und Adipocytenisolierung (rechts).

Die Verletzung subkutaner Venen ist unvermeidlich. Auch wenn dies nur selten von Bedeutung für die Probanden ist, stellt die Blutgerinnung im Gewebe und in der Biopsiespritze ein Problem dar, weil die Fettgewebestückchen schnell verklumpen und für die weitere Verarbeitung unbrauchbar werden. Daher wurde die Spülung des Biopsiematerials mit Heparin eingeführt, die zusammen mit den schnellen Spritzenwechseln helfen, die Ausbeuten an Biopsiematerial zu verbessern.

Die beschriebene Methode zur Isolierung der Adipocyten ist einfach zu handhaben. Die Ausbeute an isolierten Adipocyten beträgt etwa 40 % des Gewichts des Biopsiematerials. Die Reinheit der isolierten Adipocyten ist durch Methylenblaufärbung einer typischen Präparation in Abbildung 9 gezeigt. Ganz vereinzelt finden sich kleine runde Zellen mit zentralem Kern, die in unserem Labor als Monocyten identifiziert wurden (Dr. Jürgen Janke, persönliche Auskunft). Wie im nächsten Abschnitt beschrieben, mißlang bei einigen Probanden die Isolierung der RNA. In den meisten dieser Fälle lag zu wenig Biopsiematerial vor. Die Untergrenze lag bei etwa 250 mg Adipocyten, aus denen weniger als 1 µg Gesamt-RNA isoliert wurde.

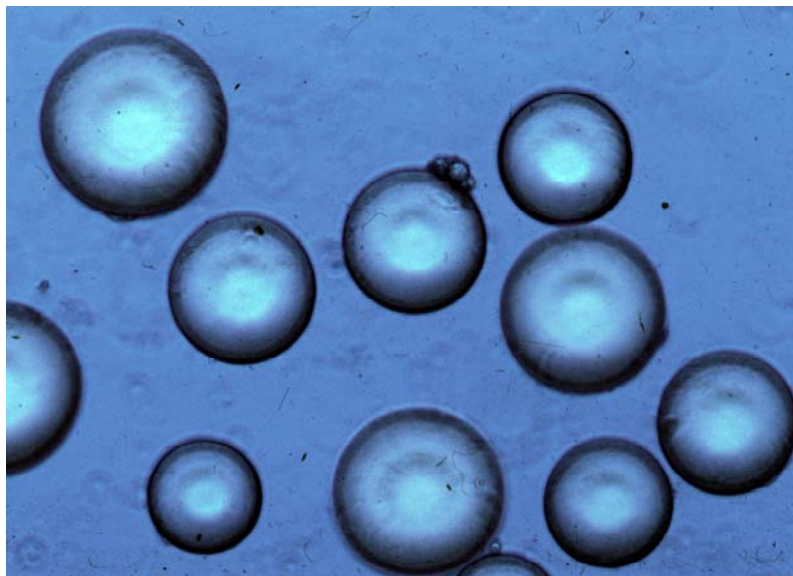


Abbildung 9: Methylenblaufärbung isolierter humaner Adipocyten (200x).

3.3 CHARAKTERISTIKA DER PROBANDENGRUPPEN

Die Probandinnen wurden anhand der Daten für BMI und ABDM in drei Gruppen eingeteilt. Entsprechend der WHO-Kriterien¹ galt ein BMI < 25 kg/m² als „schlank“ und ein BMI > 30 kg/m² als „adipös“. Eine arterielle Hypertonie lag vor, wenn die 24 h-Gesamtmittelwerte der ABDM > 130/80 mm Hg oder die Tagesmittelwerte der ABDM > 135/85 mm Hg lagen.¹⁴⁶ Aus den Aktivitätsprotokollen und den Schilderungen zur Verträglichkeit der ABDM ergab sich bei den eingeschlossenen Probandinnen kein Hinweis darauf, daß der Tag-Nacht-Rhythmus während der Messung beeinträchtigt war (s. 2.3). Die Gruppenzusammensetzung (**Tabelle 3**) war unabhängig davon, ob die Gesamt- oder die Tagesmittelwerte der ABDM herangezogen wurden.

Tabelle 3: Einteilung der Studienpopulation. Alter: Mittelwerte ± Standardabweichung.

	schlanke Normotoniker	adipöse Normotoniker	adipöse Hypertoniker
Anzahl [n]	12	8	10
Alter [Jahre]	45 ± 9	52 ± 8	60 ± 7 **
Menopause ja / nein	2 / 10	5 / 3	8 / 2

** : p < 0,001 vs. schlanke Normotoniker (post-hoc Bonferroni-Test nach einfaktorieller ANOVA)

Da die BIA einen Vergleich schlanker und übergewichtiger Gruppen nicht zuläßt (s. 2.2), werden zur Kenntlichmachung der Körperzusammensetzung der einzelnen Gruppen zwar die Daten in **Tabelle 4** dargestellt, auf die Durchführung der ANOVA für diese Meßwerte aber verzichtet.

Tabelle 4: Körperzusammensetzung der Probandengruppen, gemessen mit bioelektrischer Impedanzanalyse (BIA). Alle Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

	schlanke Normotoniker	adipöse Normotoniker	adipöse Hypertoniker
Körperwasser nach BIA [%]	53 ± 3	43 ± 4	44 ± 5
Körperfett nach BIA [%]	27 ± 4	37 ± 5	37 ± 6
Fettfreier Anteil nach BIA [%]	33 ± 8	28 ± 2	29 ± 4

Ungewollt war der Altersunterschied zwischen den adipösen Hypertonikerinnen und den schlanken Normotonikerinnen. Dagegen sind die Merkmale BMI und Blutdruck deutlich unterschiedlich, wo es die Gruppeneinteilung vorsah, aber nur wenig unterschiedlich, wo die Gruppen gleich sein sollten (Abbildung 10 und Abbildung 11). Die deutlichen Unterschiede zwischen schlanken und adipösen Probanden sind an den in Abbildung 12 wiedergegebenen metabolischen Parametern erkennbar. Diese spiegeln die aus der Literatur bekannte schlechte Stoffwechselsituation der adipösen Hypertoniker wieder (hohe Triglyceride und ausgeprägte Insulinresistenz). Keine Unterschiede wurden für die systemischen Parameter des RAS festgestellt (**Tabelle 5**).

Tabelle 5: Parameter des systemischen RAS der Probandengruppen. Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Es lagen keine signifikanten Gruppenunterschiede vor.

	schlanke Normotoniker	adipöse Normotoniker	adipöse Hypertoniker
AGT [ng Ang I/ml]	2534 \pm 546	2574 \pm 719	2659 \pm 736
ACE Aktivität [U/l]	33,9 \pm 13,1	36,8 \pm 9,8	45,0 \pm 18,4
Aldosteron [pg/ml]	135,5 \pm 90,5	124,3 \pm 70,5	97,8 \pm 48,4

Gruppenvergleich durch post-hoc Bonferroni-Test nach einfaktorieller ANOVA.

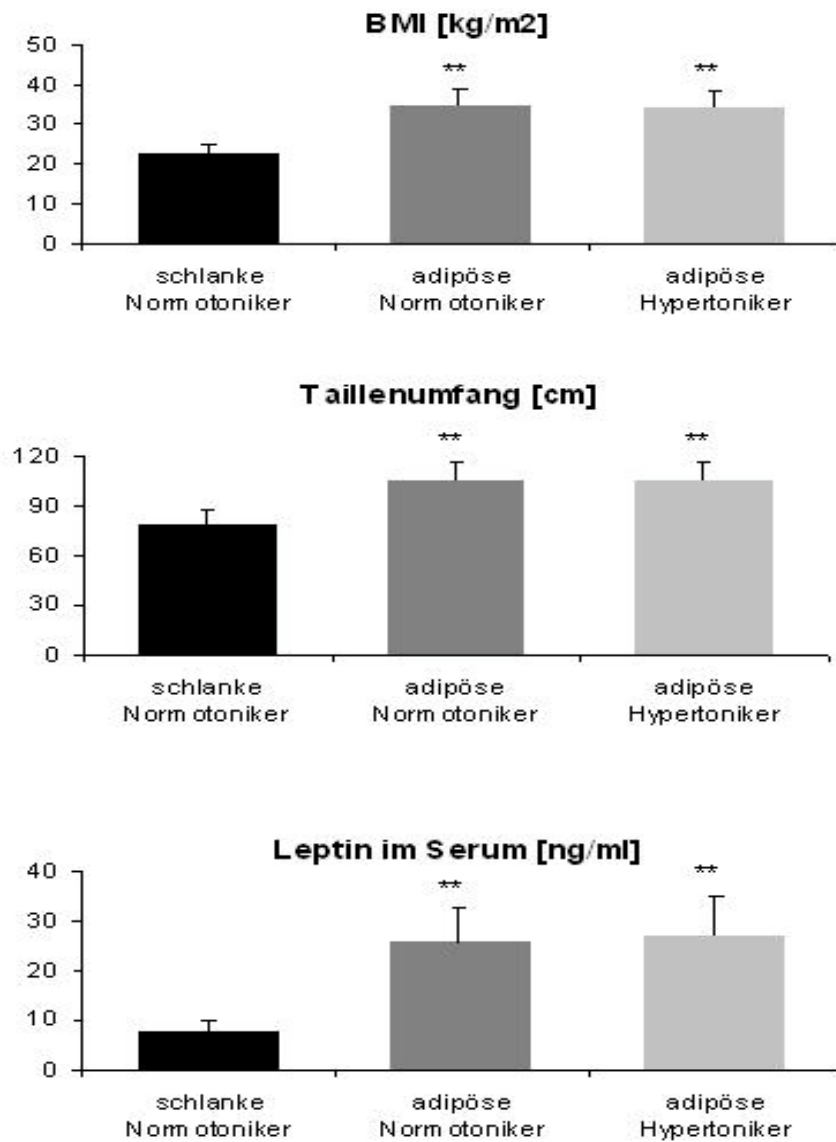


Abbildung 10: Adipositas-assoziierte Variablen der Probandengruppen. Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. **: $p < 0,001$ vs. schlanke Normotoniker (post-hoc Bonferroni-Test nach einfaktorieller ANOVA).

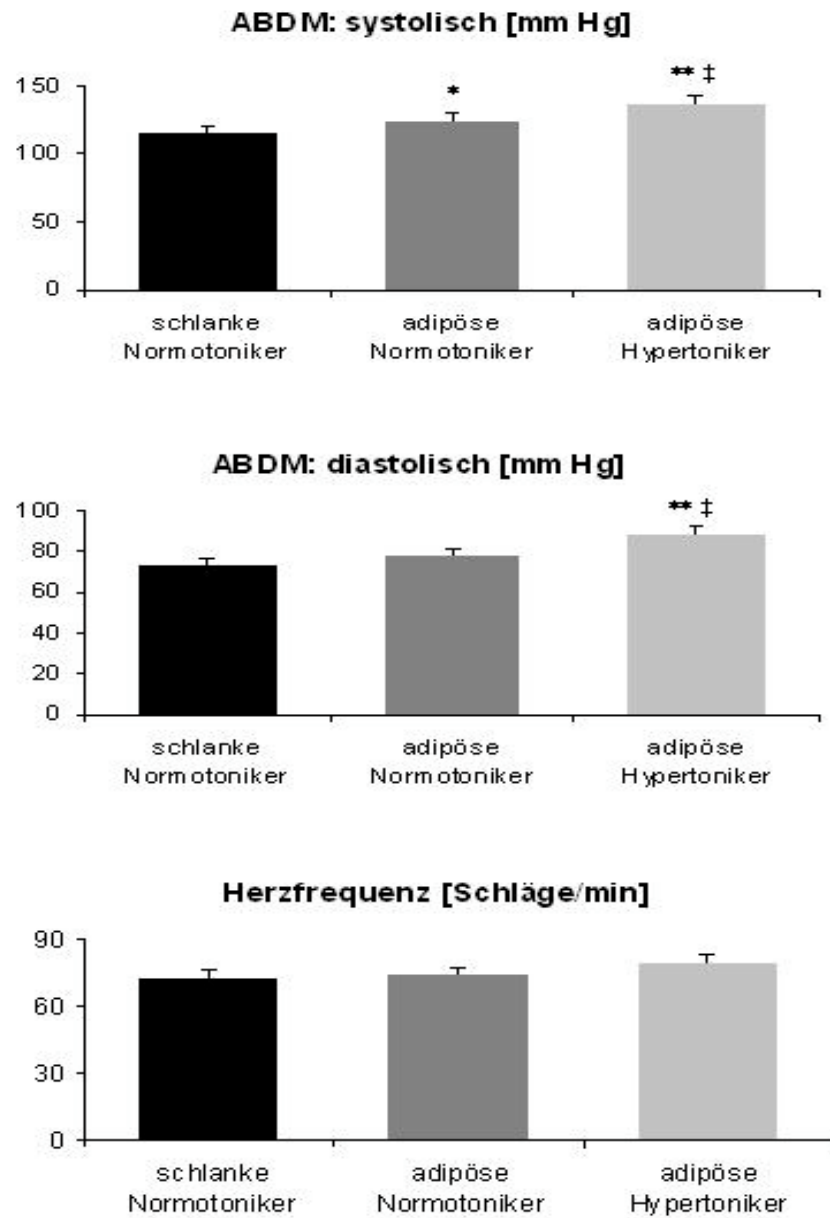


Abbildung 11: Gesamtmittelwerte der ABDM der Probandengruppen. Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. *: $p < 0,05$ vs. schlanke Normotoniker, **: $p < 0,001$ vs. schlanke Normotoniker, ‡: $p < 0,001$ vs. adipöse Normotoniker (post-hoc Bonferroni-Test nach einfaktorieller ANOVA).

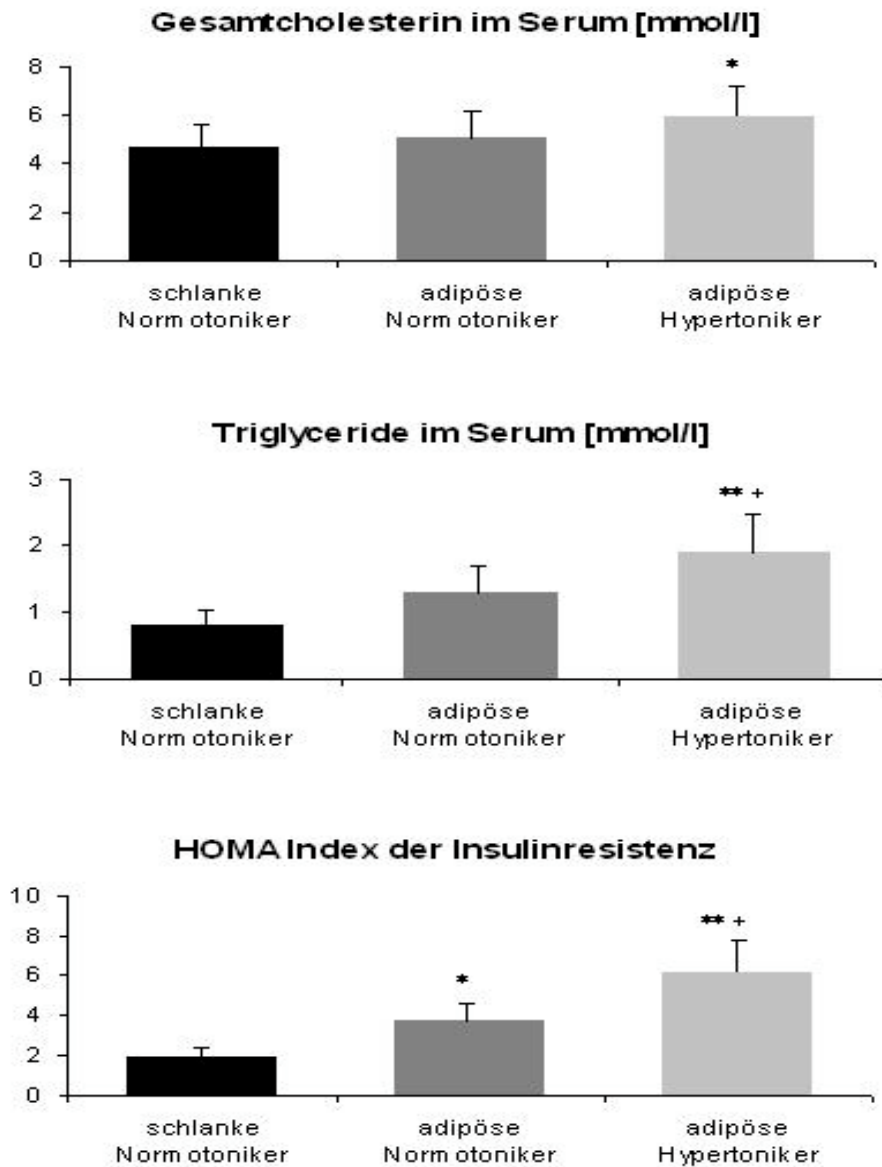


Abbildung 12: Stoffwechselfparameter der Probandengruppen. Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. *: $p < 0,05$ vs. schlanke Normotoniker, **: $p < 0,001$ vs. schlanke Normotoniker, +: $p < 0,05$ vs. adipöse Normotoniker (post-hoc Bonferroni-Test nach einfaktorieller ANOVA).

3.4 GENEXPRESSIONSUNTERSUCHUNGEN

3.4.1 Auswertung der TaqMan-RT-PCR

Unter 2.7.2 wurde beschrieben, daß die Verwendung von Verdünnungsreihen einer Standard-cDNA eine der Voraussetzungen zur Quantifizierung der Genexpression mittels TaqMan-RT-PCR ist. Einer der Gründe hierfür ist die unterschiedliche Effizienz der Amplifikation verschiedener Gene selbst unter identischen PCR-Bedingungen. Zur Illustration dieser unterschiedlichen Amplifikationseffizienzen zeigt Abbildung 13 beispielhaft die Standardkurven für *AGT* und *GAPDH*, wie sie bei der Auswertung einer der TaqMan-PCRs berechnet wurden. An den Steigungen der Geraden (3,68 für *AGT* vs. 3,03 für *GAPDH*) zeigt sich die unterschiedliche Amplifikationseffizienz.

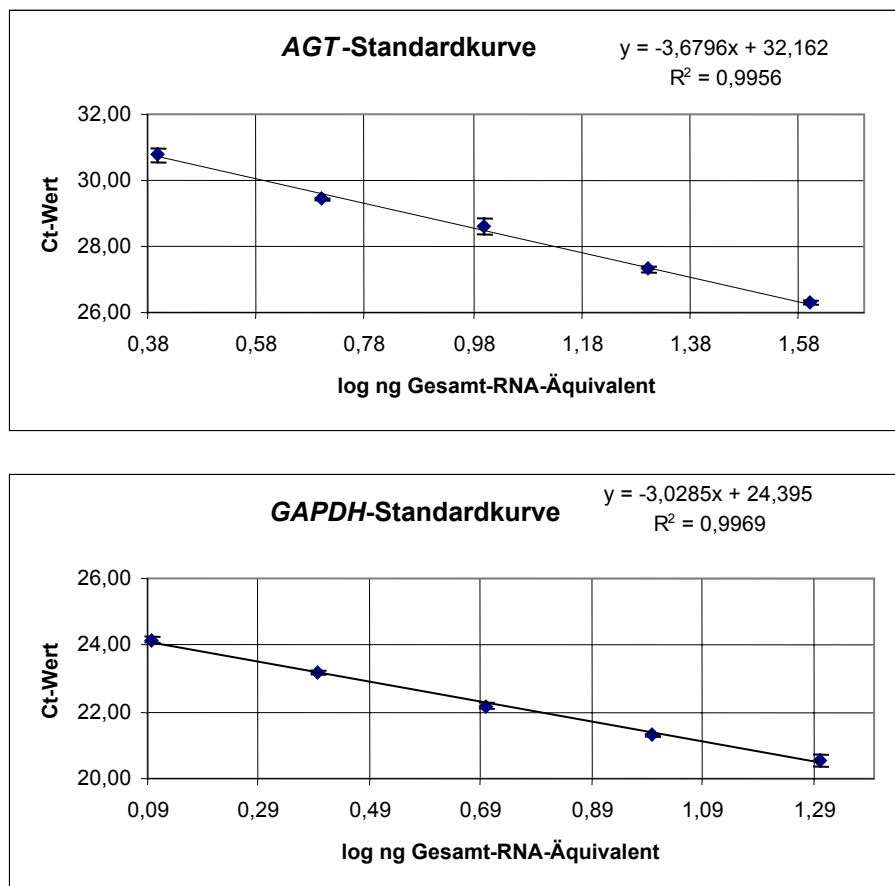


Abbildung 13: Exemplarische TaqMan-Standardkurven für *AGT* und *GAPDH*. Berechnung der Geraden durch lineare Regression nach Pearson.

Da für die Quantifizierung jedes Gens mehrere *TaqMan*-Platten gemessen werden mußten, ist die Bestimmung der Interassayvariabilität von großer Bedeutung, denn nur bei kleiner Variabilität ist der Vergleich der Genexpression von Proben möglich, die auf unterschiedlichen *TaqMan*-Platten gemessen wurden. Zur Ermittlung der Interassayvariabilität wurde die Standardreihe genutzt, indem alle C_T -Werte der Verdünnungsstufe 10 ng RNA-Äquivalent für Ziel- und Kontrollgen als Mittelwert \pm Standardabweichung zusammengefaßt werden. Es ergibt sich $n = 3 \times 4$ Platten = 12, da jede Verdünnungsstufe dreifach bestimmt wurde. Zur Berechnung des Interassay-Variationskoeffizienten wird der Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert berechnet (s. **Tabelle 6**).

Tabelle 6: Mittelwert \pm Standardabweichung der C_T -Werte und die sich daraus ergebenden Interassay-Variationskoeffizienten für die 10 ng RNA-Äquivalent-Verdünnungsstufe aller 16 ausgewerteten *TaqMan*-RT-PCRs.

	Mittelwert \pm Standardabweichung und Interassay- Variationskoeffizient der <i>Zielgene</i>	Mittelwert \pm Standardabweichung und Interassay-Variationskoeffizient der <i>GAPDH</i>
<i>AGT</i> (n = 12)	29,1 \pm 0,6 \Rightarrow 2,0 %	21,5 \pm 0,2 \Rightarrow 0,9 %
<i>REN</i> (n = 12)	32,6 \pm 0,6 \Rightarrow 1,9 %	21,8 \pm 0,2 \Rightarrow 0,9 %
<i>ACE</i> (n = 12)	29,1 \pm 0,3 \Rightarrow 0,9 %	22,1 \pm 0,3 \Rightarrow 1,3 %
<i>AGTR1</i> (n = 12)	31,4 \pm 0,5 \Rightarrow 1,5 %	22,1 \pm 0,3 \Rightarrow 1,3 %

3.4.2 Differentielle Expression der RAS-Gene

Bei der Auswertung der *TaqMan*-RT-PCR erhält man normalisierte, einheitenlose Werte der relativen quantitativen Expression des Ziel-Gens ("*Zielgen/GAPDH*", s. 2.7.4 und 3.4.1). Zum besseren Orientierung wurden die Ergebnisse der "adipösen Normotoniker" und "adipösen Hypertoniker" auf das Ergebnis der "schlanken Normotoniker" bezogen (und deren Ergebnis gleich 1 gesetzt). Damit sind in Abbildung 14 die relativen Unterschiede zwischen den adipösen Gruppen und der Kontrollgruppe zu erkennen.

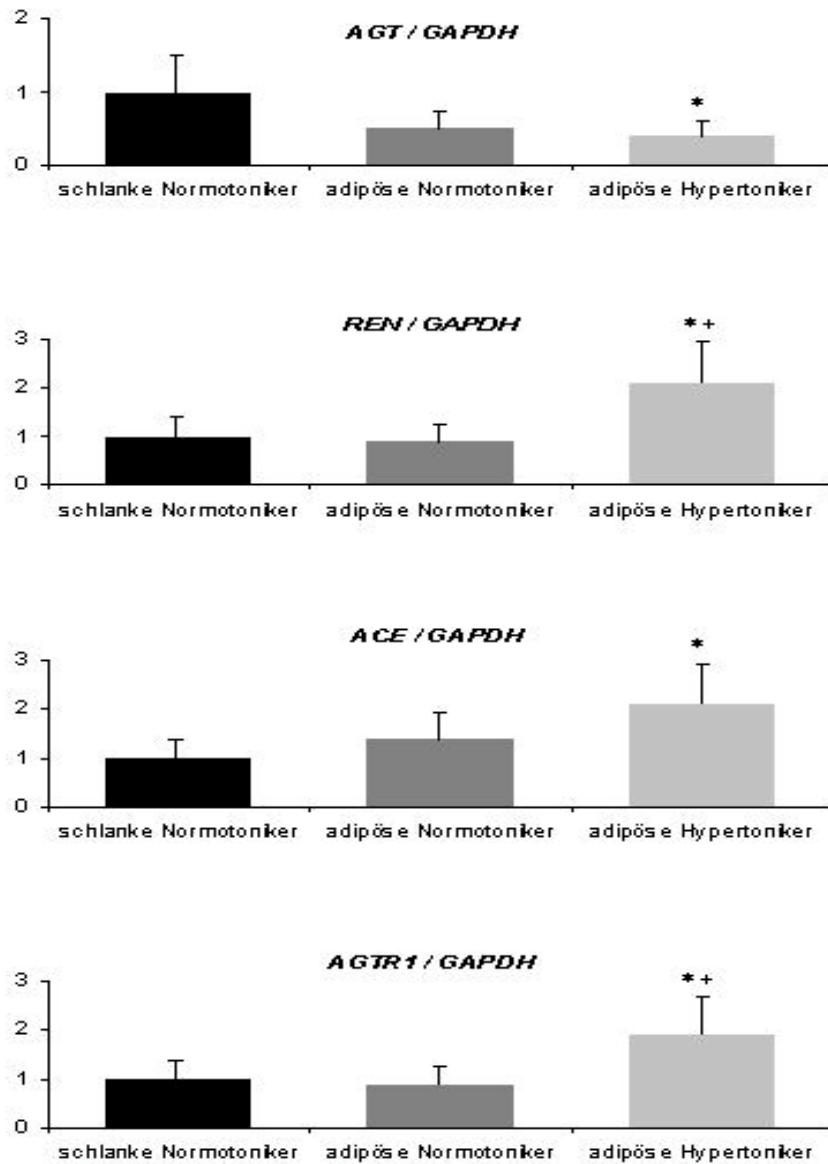


Abbildung 14: Genexpression der Gene für AGT, REN, ACE und AT1 bei den drei Gruppen. Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. *: $p < 0,05$ vs. schlanke Normotoniker, +: $p < 0,05$ vs. adipöse Normotoniker (post-hoc Bonferroni-Test nach einfaktorieller ANOVA).

3.4.3 Weitergehende statistische Analyse der Genexpressionsergebnisse

Wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, wurde eine differentielle Expression der adipocytären RAS-Gene in den drei Probandengruppen nachgewiesen. Ungeklärt ist aber die gegenseitige Beeinflussung von adipositas- bzw. hypertonie-assoziierten Variablen und Expression der RAS-Gene. Da die beschriebenen Ergebnisse auf einer künstlichen Einteilung der kontinuierlichen und gleichverteilten Variablen BMI und Blutdruck beruhen, sollte auch der Zusammenhang zwischen Genexpression, BMI und Blutdruck in der gesamten Studienpopulation untersucht werden.

Zur Klärung der Bedeutung von Adipositas und Hypertonie für die adipocytäre Expression der RAS-Gene wurde die Expression jedes der vier untersuchten RAS-Gene mittels schrittweiser multipler linearer Regressionsanalyse untersucht. Als unabhängige Variablen wurden Alter, BMI und Taillenumfang, systolischer und diastolischer Gesamtmittelwert der ABDM, sowie Menopause, Insulin-Serumspiegel und Insulinresistenz-Index (HOMA) getestet. **Tabelle 7** zeigt die jeweils stärksten Einflüsse dieser Variablen auf die Expression der RAS-Gene. Demnach erklärt der BMI allein 45 % der Expressionsvarianz von *AGT*, die Insulinresistenz erklärt mehr als 60 % der Expressionsvarianz von *Renin* und die systolischen bzw. diastolischen Blutdruckwerte erklären jeweils bereits 33 bis 38 % der Expressionsvarianz von *ACE* und *AGTR1*. Alter und Menopause-Status haben dagegen keinen wesentlichen Einfluß auf die Expression der vier untersuchten RAS-Gene.

Zur Annäherung an die Frage, ob die differentielle Expression der adipocytären RAS-Gene eine pathophysiologische Bedeutung für die adipositas-assoziierte Hypertonie hat, wurde in einer multivariaten Varianzanalyse der Einfluß der Genexpression von *AGT*, *Renin*, *ACE* und *AGTR1* auf die Kombination der abhängigen Variablen BMI und Blutdruck berechnet. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der multivariaten Varianzanalyse findet sich in **Tabelle 8**. Für den systolischen Gesamtmittelwert der ABDM ergibt sich mit $p = 0,041$ ein gerade signifikanter Einfluß der Expression der RAS-Gene, der lediglich durch das *ACE*-Gen erklärt werden kann. Die gleiche Aussage trifft für den diastolischen Gesamtmittelwert zu. Für den BMI dagegen ergibt die multivariate Varianzanalyse keinen signifikanten Einfluß der RAS-Gene.

Tabelle 7: Schrittweise multiple lineare Regression zur Ermittlung des stärksten und des zweitstärksten Einflusses unabhängiger Variablen auf die Expressionsstärke der RAS-Gene. ns: nicht signifikant, p: Signifikanzniveau, R: Korrelationskoeffizient, R²: Bestimmtheitsmaß.

	<i>AGT</i>	<i>Renin</i>	<i>ACE</i>	<i>AGTR1</i>
Alter	ns	ns	ns	ns
Menopause	ns	ns	ns	ns
Taillenumfang	ns	ns	R = 0,54 R ² = 0,29 p = 0,022	ns
BMI	R = 0,67 R ² = 0,45 p = 0,002	ns	ns	ns
ABDM_{systolisch} Gesamtmittelwert	ns	ns	R = 0,55 R ² = 0,33 p = 0,027	ns
ABDM_{diastolisch} Gesamtmittelwert	ns	ns	ns	R = 0,62 R ² = 0,38 p = 0,019
Insulin-Serumspiegel	ns	R = 0,60 R ² = 0,36 p = 0,014	ns	R = 0,57 R ² = 0,33 p = 0,032
HOMA-Index	R = 0,61 R ² = 0,37 p = 0,007	R = 0,55 R ² = 0,31 p = 0,027	ns	ns

Tabelle 8: Multivariate Varianzanalyse zum Einfluß der RAS-Gene auf Adipositas und Hypertonie.

Abhängige Variable		Varianzquotient F	Signifikanzniveau p
Gesamtes Modell	BMI	2,99	0,09
	ABDM _{systolisch} Gesamtmittelwert	4,17	0,04
AGT	BMI	1,98	0,20
	ABDM _{systolisch} Gesamtmittelwert	0,09	0,77
REN	BMI	0,19	0,67
	ABDM _{systolisch} Gesamtmittelwert	1,02	0,34
ACE	BMI	1,12	0,32
	ABDM _{systolisch} Gesamtmittelwert	6,58	0,03
AGTR1	BMI	0,25	0,63
	ABDM _{systolisch} Gesamtmittelwert	4,73	0,06

4 Diskussion

4.1 DAS RAS BEI ADIPOSITAS-ASSOZIIERTER HYPERTONIE

4.1.1 Angiotensinogen

In dieser Studie liegt eine statistisch signifikante negative Korrelation zwischen *AGT*-Expression und BMI vor (Abbildung 14 und **Tabelle 7**), d. h. Übergewichtige zeigen eine verringerte Expression des *AGT*-Gens in Adipocyten, unabhängig vom Blutdruck. Obwohl Literaturdaten dies nahelegen, haben auch die Variablen Alter und menopausaler Status keinen bedeutsamen Einfluß auf die *AGT*-Expression in humanen Adipocyten.

Im Gegensatz zu unseren Befunden fanden van Harmelen et al.¹²⁸ und Giacchetti et al.¹²⁹ jeweils eine positive Korrelation zwischen *AGT*-Expression und BMI, jedoch unterschied sich deren Untersuchungsmaterial (subkutanes bzw. viszerales Fettgewebe) im Vergleich zur vorliegenden Studie. Da bekannt ist, daß eine Vielzahl der im Fettgewebe vorkommenden Zelltypen *AGT* exprimieren, könnte das vorliegende Ergebnis, im Gegensatz zu den Ergebnissen der anderen Gruppen, die die *AGT*-Expression im gesamten Fettgewebe beschrieben, fettzellspezifisch sein.

Zur Klärung der Mechanismen, die die *AGT*-Expression bei Adipositas und Hypertonie des Menschen bestimmen, ist die Kenntnis des *AGT*-Promoters notwendig. Dieser enthält cis-regulatorische Elemente, die eine Steigerung der *AGT*-Expression durch Glucocorticoide, Östrogene, Trijodthyronin, Insulin und TNF- α und Ang II vermitteln können.^{147,148} Diese Substanzen spielen bei der Adipositas des Menschen auch lokal im Fettgewebe eine Rolle und könnten daher zumindest theoretisch die adipocytäre *AGT*-Expression beeinflussen.^{114,149,152} Wie aus **Tabelle 9**, **Tabelle 10** und **Tabelle 11** erkennbar ist, wurde der Einfluß aller dieser Substanzen auf die *AGT*-Expression in Adipocyten zwar untersucht, ein einheitliches Bild ergibt sich jedoch nicht (diese Tabellen sind eine Zusammenfassung aller verfügbaren Daten zur *AGT*-Expression im Fettgewebe, in Kombination mit **Tabelle 2** ergeben diese einen vollständigen Literaturüberblick mit Stand August 2001).

Tabelle 9: Regulation des adipocytären *AGT*-Gens bei der Maus (+ Steigerung, - Verminderung, 0 kein Einfluß, k.A. keine Angaben erhältlich, E₂ Östradiol, T₃ Trijodthyronin, GH Wachstumshormon, TNF α Tumor-Nekrosefaktor α , 3T3 und OB : klonale Zelllinien).

	<i>Wildtyp</i>	<i>3T3-L1</i>	<i>3T3-F442A</i>	<i>OB 1771</i>	Literatur
Differenzierung	k.A.	+	+	+	[153-155]
Dexamethason	k.A.	k.A.	k.A.	+	[156]
E₂, T₃, GH, Ang II	k.A.	k.A.	k.A.	0	[156]
Forskolin	k.A.	k.A.	k.A.	0	[156]
Insulin	k.A.	+	-	-	[110,0]
Glucose	k.A.	0	k.A.	k.A.	[110]
Fettsäuren	k.A.	k.A.	k.A.	+	[155]
Fasten	-	k.A.	k.A.	k.A.	[158]
αMethyl-<i>p</i>-Thyrosin	+	k.A.	k.A.	k.A.	[158]
Isoproterenol	k.A.	-	k.A.	k.A.	[110]

Tabelle 10: Regulation des adipocytären *AGT*-Gens bei der Ratte (Abkürzungen wie in **Tabelle 9**, visc viszerales Fettgewebe, sc subkutanes Fettgewebe, SHR spontan hypertensive Ratten).

	<i>Sprague-Dawley</i>	<i>SHR</i>	<i>Wistar Kyoto</i>	<i>Obese Zucker</i>	Literatur
Alter	+	+	0 / -	+	[133-136,159]
Fett-Depot	visc > sc	k.A.	k.A.	visc > sc	[136,160]
Bilaterale Nephrektomie	+	k.A.	k.A.	k.A.	[161]
Enalapril	+ / 0	k.A.	k.A.	k.A.	[161]
Natriumrestriktion	k.A.	k.A.	0	k.A.	[162]
DEX + E₂ + T₃ oder DEX	+	k.A.	+	k.A.	[156,163]
Testosteron	+	k.A.	k.A.	k.A.	[160]
Insulin	+	k.A.	k.A.	0	[151,164]
Lipopolysaccharide	k.A.	+	0	k.A.	[134]

Tabelle 11: Regulation des adipocytären *AGT*-Gens beim Menschen (+ Steigerung, - Verminderung, 0 kein Einfluß, k.A. keine Angaben erhältlich, visc viszerales Fettgewebedepot, sc subkutanes Depot).

	Fettgewebe	Adipocyten	Prädipocyten	Literatur
Differenzierung	k.A.	k.A.	+	[112,165]
Alter	- / 0	0	k.A.	[110,113,127,129]
Fett-Depot	visc > sc	k.A.	k.A.	[127,129,166]
Rosiglitazon	k.A.	0	k.A.	[167]

Gezielte Untersuchungen zum adipocytären *AGT*-Promoter beschränkten sich bisher auf dessen regulatorische Funktion bei der adipogenen Differenzierung von *3T3-L1* Prädipocyten.¹⁶⁸ Auf der Basis der in den Tabellen 2 und 9-11 zusammengefaßten Literaturdaten aus einer Vielzahl von Modellen kann damit zur Zeit keine endgültige Deutung der in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse zur Regulation der adipocytären *AGT*-Expression bei Adipositas und Hypertonie des Menschen gegeben werden. Jedoch darf erwähnt werden, daß in einer parallel angefertigten Dissertation in unserer Arbeitsgruppe weder für Glucocorticoide, noch für Estradiol, Trijodthyronin, Insulin oder Angiotensin II ein Einfluß auf die *AGT*-Expression in primärkultivierten humanen Adipocyten nachgewiesen werden konnte.¹⁶⁹

4.1.2 Renin und Angiotensin-Converting Enzyme

Für die *REN*- und *ACE*-Gene zeigt sich ein Trend zur Expressionssteigerung mit dem BMI und der Hypertonie. Für *ACE* ist der Expressionsunterschied nur zwischen den adipösen Hypertonikern und der Kontrollgruppe statistisch signifikant, für *REN* jedoch auch zwischen den adipösen Gruppen. Die wichtigste Determinante der *REN*-Expression in der vorliegenden Untersuchung ist die Insulinresistenz, die wichtigsten Determinanten der *ACE*-Expression sind Taillenumfang und Blutdruck (s. **Tabelle 7**).

Aus der verfügbaren Literatur zur Regulation dieser beiden Gene kann das vorliegende Ergebnis nicht abgeleitet werden, da keine Daten für das Fettgewebe existieren. Auch zur Expression bei Adipositas und Hypertonie liegen für *REN* keine Literaturdaten zum Vergleich vor. Für *ACE* beschreibt ein Kongreßbeitrag¹²⁹ keine Unterschiede zwischen

schlanken und adipösen Normotonikern, entsprechend den hier präsentierten Daten (Abbildung 14). Das Fehlen von Daten zum *REN* könnte auf der schwierigeren Nachweisbarkeit dieses schwach exprimierten Gens beruhen, hier zeigt sich die Überlegenheit der fluoreszenz-basierten *TaqMan*-Technik im Vergleich zu herkömmlichen PCR-basierten RNA-Nachweismethoden.^{113, 170}

Die Bildung von Renin im juxtaglomerulären Apparat der Niere wird durch kochsalzarme Ernährung, Volumendepletion, Orthostase (β -adrenerg vermittelt) und verminderten renalen Perfusionsdruck stimuliert.¹⁷¹⁻¹⁷³ In anderen Organen ist die Relevanz der lokalen Renin-Bildung im Vergleich zur Renin-Aufnahme aus dem Blut umstritten.^{90,174} Für Fettgewebe existieren nur indirekte Hinweise auf die funktionelle Bedeutung von Renin,^{165,170} zumindest die Expression des *REN*-Gens in differenzierten Präadipocyten des Menschen wurde bereits von einer anderen Gruppe berichtet.¹¹² Diese wie auch unsere Gruppe fand einen Einfluß der adipogenen Differenzierung auf die Expression des *REN*-Gens.^{112,165} Unklar ist, ob die genannten Stimulatoren der *REN*-Bildung auch im Fettgewebe wirksam sind, für Salz und Volumen ist dies vermutlich mangels Sensoren unwahrscheinlich. Die cAMP-vermittelte β -adrenerge Stimulation der *REN*-Expression^{175,176} könnte aber eine Rolle spielen, da Fettzellen reich mit β -Adrenorezeptoren ausgestattet sind.¹²⁰

Für ACE liegen ebenfalls keine Daten zur molekularen Regulation der Transkription in Fettzellen vor. In der bereits erwähnten Dissertation in unserer Arbeitsgruppe wurde kein Einfluß der bei Adipositas für das Fettgewebe wichtigen Hormone Hydrocortison, Insulin oder Ang II nachgewiesen.¹⁶⁹ Aus der Untersuchung eines diätetischen Adipositas-Modells der Maus¹⁷⁷ gibt es den Hinweis auf eine gesteigerte ACE-Aktivität in der Niere, ohne daß die *ACE*-Expression beeinflusst wäre. Dies wurde durch einen spezifischen Inhibitor des Endothelin-Rezeptors Typ A supprimiert, ein Hinweis darauf, daß die Rolle des Endothelin-Systems bei Adipositas möglicherweise bislang unterschätzt wird¹⁷⁸⁻¹⁸⁰.

4.1.3 Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor

Die Expression des *AGTR1*-Gens ist in der Gruppe der adipösen Hypertoniker am größten und im Vergleich den beiden anderen Gruppen statistisch signifikant erhöht. Blutdruck und Insulinresistenz sind wichtige Prädiktoren der *AGTR1*-Expression, Alter und menopausaler Status dagegen nicht (**Tabelle 7**). Dieses Ergebnis stimmt mit einem Kongreßbericht überein¹²⁹ (**Tabelle 2**). Wie auch für die anderen RAS-Gene gibt es aber Diskrepanzen zu Daten aus Tiermodellen, wo kein Einfluß der Adipositas auf die Genexpression im Fettgewebe (*obese Zucker Ratten*¹³⁷) bzw. eine Verringerung der AT₁-Rezeptordichte im Fettgewebe bei der altersassoziierten Gewichtszunahme (*Sprague Dawley Ratten*¹³¹) beschrieben wurde.

In unserer Arbeitsgruppe wurde bislang nur der expressionssteigernde Effekt von Hydrocortison auf das *AGTR1*-Gen identifiziert,¹⁶⁹ ein Befund der von Interesse für Adipositas und adipositas-assoziierte Hypertonie sein könnte, da Störungen der physiologischen Regulation der Cortisolfreisetzung bei Adipositas vorliegen¹⁴⁹ und eine verstärkte Cortisolwirkung im viszeralen Fettgewebe aufgrund der veränderten Aktivität der 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase postuliert werden kann.¹⁵²

Wie von Engeli und Sharma¹¹⁴ beschrieben, ist die physiologische Bedeutung des AT₁-Rezeptors der humanen Adipocyten kaum untersucht. Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen einen AT₁-vermittelten inhibitorischen Einfluß von Ang II auf die Adipogenese und eine Zunahme der *AGTR1*-Expression während der Differenzierung.¹⁶⁵ Weiterhin fanden wir *in vivo*, gemessen mit der Mikrodialysetechnik, lipolytische Wirkungen von Ang II.¹²⁶ Die lipolytische Wirkung von Ang II wurde *in vitro* auch von einer anderen Gruppe gefunden und auf einem Kongreß vorgestellt.¹²⁴ Wie Abbildung 2 zeigt, ist die gesteigerte Sekretion freier Fettsäuren aus dem Fettgewebe nicht nur von Bedeutung für den gestörten Stoffwechsel des Adipösen, sondern spielt auch eine Rolle für die vaskuläre Reaktivität gegenüber vasokonstriktorischen Stimuli (s. 1.2.2). Damit könnten die vorgestellten Befunde zur gesteigerten *AGTR1*-Expression bei adipösen Hypertonikern und die mögliche lipolytische Aktivität von Ang II von indirekter pathophysiologischer Bedeutung für adipositas-assoziierte Stoffwechselstörungen und kardiovaskuläre Erkrankungen sein.

4.1.4 Synopsis der Bedeutung der Genexpressionsergebnisse

Die Konzentration des zirkulierenden AGT beim Menschen ist kleiner als der K_M -Wert des Renins, damit könnte, allgemeinen enzymkinetischen Überlegungen folgend, ein Anstieg der AGT-Konzentration zu vermehrter Bildung von Ang I führen. Klinische Untersuchungen zeigen, daß große AGT-Plasmakonzentrationen (verursacht durch Einnahme oraler Kontrazeptiva oder in der Schwangerschaft) zusätzlich auch die Plasma-Reninaktivität steigern.¹⁸¹ Bohlender et al.¹⁸¹ klärten diesen Befund kürzlich auf, indem sie zeigten, daß die Bindung von AGT an das Reninmolekül zur Verringerung der Renin-Clearance und zur Verlängerung der Renin-Halbwertszeit führt. Basierend auf diesen Überlegungen und Befunden ergibt sich, daß die prinzipielle Voraussetzung für eine gesteigerte Bildung von Ang I die Erhöhung der verfügbaren AGT-Menge ist.

Unklar ist jedoch, ob diese Befunde aus der Zirkulation auf die Situation im Fettgewebe übertragen werden können. Wir fanden bei dem direkten Vergleich der Expression der RAS-Gene in isolierten primärkultivierten humanen Adipocyten eine 3-fach größere AGT-Expression im Vergleich zur *REN*-Expression.¹⁶⁹ Daraus könnte gefolgert werden, daß AGT von den Adipocyten im Überschuß gebildet wird, und daß Anstiege der AGT-Expression möglicherweise keine so große Bedeutung hätten wie Steigerungen der *REN*-Expression.

Folgt man diesen Überlegungen, würden die vorliegenden Ergebnisse zur Expression der RAS-Gene in isolierten Adipocyten in Richtung einer gesteigerten Bildung von Ang I/Ang II im Fettgewebe adipöser Hypertoniker weisen. Angesichts von Berichten über die Expression der Gene für Kathepsin D und G¹¹¹ und Chymase¹¹³ in humanem Fettgewebe besteht zusätzlich Unklarheit über die Aktivität alternativer Angiotensinbildender Enzyme im Fettgewebe. Damit werden theoretische Überlegungen zur Bildung von Angiotensin-Peptiden im Fettgewebe des Menschen durch fehlende experimentelle Daten erschwert. Eine Reihe von weiteren Untersuchungen sind daher notwendig, um die hier erhobenen Befunde beurteilen zu können.

4.1.5 Systemische Parameter des RAS und Leptin

In der vorliegenden Untersuchung unterscheiden sich die zirkulierenden Parameter des RAS nicht zwischen den drei untersuchten Gruppen. Dabei hätte entsprechend der verfügbaren Literatur erwartet werden können, daß adipöse Menschen höhere AGT- und zumindest auch höhere Aldosteron-Plasmaspiegel haben als schlanke Menschen (s. 1.3.1). Bezüglich der AGT-Plasmaspiegel ist wahrscheinlich, daß Unterschiede zwischen den Studienpopulationen zu den abweichenden Befunden beitragen, denn in den Studien, die erhöhte AGT-Plasmaspiegel bei Adipositas zeigten, überwiegen jüngere und zum Teil auch ausschließlich männliche Probanden^{96,99} in nicht-kaukasischen Populationen.⁹⁴⁻⁹⁷ Für die ACE-Aktivität im Serum gibt es nur eine Studie an einer jamaikanischen Population.⁹⁴

Was die Aldosteron-Plasmaspiegel betrifft, so liegt ein, statistisch nicht signifikanter, Trend zu niedrigeren Plasmaspiegeln bei den adipösen Hypertonikern vor. Dieses Ergebnis entspricht nicht der erhältlichen Literatur. Eine mögliche Erklärung könnte sein, daß die Blutabnahmen zwar standardisiert durchgeführt wurden (zwischen 8:30 und 10:00 vormittags; alle Probanden lagen vor der Abnahme 20 min und waren zum Zeitpunkt der Abnahme nüchtern), jedoch erfolgte in den Tagen vor der Untersuchung keine standardisierte diätetische Kochsalzaufnahme, wie es in anderen Studien beachtet wurde.^{92,98} Da die Aldosteron-Plasmaspiegel insbesondere von der aktuellen Kochsalzaufnahme abhängen,¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ könnte hier die Erklärung für das unerwartete Ergebnis der vorliegenden Arbeit liegen.

In der vorliegenden Arbeit wurden keine Unterschiede zwischen den Leptin-Serumspiegeln der adipösen Normotoniker und Hypertoniker gefunden, obwohl eine Vielzahl von Studien nahelegen, daß Hypertonie mit höheren Leptin-Spiegeln assoziiert ist. Allerdings berücksichtigten die meisten Studien nicht speziell adipöse Hypertoniker, sondern allgemeiner "essentielle" Hypertoniker, deren BMI im Mittel deutlich unter 30 kg/m² lag.^{84,182,183} Eine weitere mögliche Ursache könnte in der hier vorliegenden speziellen Studienpopulation liegen (Frauen mittleren Alters), da für Leptin eine ausgeprägte Geschlechtsabhängigkeit mit höheren Serumspiegeln bei Frauen bekannt ist^{184,185} und in den Studien zum Zusammenhang von Serum-Leptin und Hypertonie zum Teil nur Männer untersucht wurden, bzw. positive Ergebnisse nur für Männer gefunden wurden.^{85,87}

4.2 METHODISCHE DISKUSSION

4.2.1 Studiendesign

Für den Einschluß der Probanden waren der BMI und das Fehlen von Ausschlußkriterien entscheidend (s. 3.3), die Blutdruckwerte wurden erst bei der Auswertung berücksichtigt. Hypertoniker wurden nicht gezielt rekrutiert, um das Problem des medikamentenfreien Intervalls vor der Biopsie zu vermeiden; bei sieben der eingeschlossenen Hypertoniker ergab sich die Diagnose aufgrund der ABDM. Dieses Vorgehen führte dazu, daß die Blutdruckwerte der Hypertoniker zwar über den Grenzwerten liegen, insgesamt aber nicht besonders hoch sind. Eine Alternative wäre die Durchführung der ABDM vor Studieneinschluß, um den Preis der erschwerten Probandenrekrutierung.

Eine Stärke der vorliegenden Studie ist aber die Verwendung der ABDM zur Bestimmung des Blutdruckes. Diese Methode ist der häufig verwendeten Gelegenheitsmessung überlegen, da ein Blutdruckprofil der Probanden erstellt wird.¹⁴⁶ Somit bilden die hier verwendeten Blutdruckwerte die Realität besser ab, als dies in vergleichbaren Studien der Fall ist.⁴² Ohnehin ist diese Studie die erste, die bei der Untersuchung des adipocytären RAS des Menschen neben anthropometrischen Variablen auch Blutdruckdaten erhoben hat.¹²⁷⁻¹²⁹ Dies ist bemerkenswert, denn eine Verbindung zwischen RAS und Adipositas kann bis heute nicht postuliert werden, zwischen RAS und (adipositas-assoziiertes) Hypertonie dagegen schon.

Die Probanden hatten zum Untersuchungstermin mindestens sieben Tage lang keine Medikamente genommen. Insbesondere bedeutete dies, daß häufig verordnete Präparate wie Schilddrüsenhormone, Östrogene bzw. Östrogen/Gestagen-Kombinationen, Schmerzmittel, Vitamin/Mineralstoff-Präparate und - für diese Untersuchung wesentlich - Blutdruckmedikamente keinen akuten Einfluß auf die Untersuchungsergebnisse haben. Diese konsequente Haltung ist nur bei wenigen Studien zur Genexpression in humanen Fettgewebeproben zu finden,^{42,128} meist wird diese Problematik bei der Beschreibung der Probanden nicht ausdrücklich erwähnt,^{108,110,111,166,189-190} oder die Ergebnisse beruhen auf der Zusammenfassung behandelter und unbehandelter Probanden in einer Gruppe.¹²⁷

4.2.2 Fettgewebebiopsie und Adipocytenuisolierung

Die Methode der subkutanen Fettgewebebiopsie basiert auf Literaturangaben und persönlichen Gesprächen mit den Arbeitsgruppen von Rappelli aus Ancona⁴² und Després aus Québec.¹⁹¹ Feinnadelbiopsien (mit Federmechanismus) sind wegen der kleinen Durchmesser gängiger Nadeln (im Bereich von 1 mm) ungeeignet, und die Gewährleistung der Sterilität der Nadel bei multiplen Entnahmen, wie sie zur Steigerung der Ausbeute notwendig sind, stellen große Ansprüche an den ausführenden Arzt und das Hilfspersonal, da hierbei die Nadel mehrfach in das Fettgewebe eingeführt werden und das Biopsat jedesmal von der Nadel abgenommen werden muß. Die Schnittbiopsie mittels Hautschnitt und Exzision von Fettgewebe verlangt chirurgische Vorkenntnisse, da der Schnitt bei Entnahme größerer Gewebemengen mittels Intrakutannaht genäht werden muß. Weitere Nachteile sind die Abhängigkeit der Ausbeute von der Länge des Hautschnittes und die aufwendigere Wundversorgung. Dauer des Eingriffs und Traumatisierung der Subkutis unterscheiden sich bei den drei genannten Methoden nicht. Die Ausbeute scheint mit der hier ausführlich beschriebenen Nadelbiopsie am größten zu sein.

Damit kann zusammengefaßt werden, daß es sich bei der beschriebenen subkutanen Nadelbiopsie von Fettgewebe um eine leicht erlernbare Technik handelt, die in der Durchführung nur selten Probleme verursacht, vom Probanden in der Regel gut toleriert wird und mit geringem finanziellen und personellen Aufwand durchführbar ist. Trotz allem führt diese Methode gelegentlich zu der Situation, daß das biopsierte Material nicht zur RNA-Extraktion ausreicht.

Bei der Adipocytenuisolierung wird das Biopsiematerial um etwa 60 % reduziert, damit liegt bei weniger als 1 g Gewebe sehr wenig Material zur RNA-Extraktion vor. Unabhängig davon, wie dick die Adipocytenschicht oberhalb des Waschpuffers ist, das verbleibende Puffervolumen ist immer etwa gleich groß (s. 2.5.3), und damit nimmt bei kleinen Adipocytenuismengen der Anteil des Waschpuffers zu. Da sich das Volumen des Lysepuffers für die RNA-Extraktion aber am Gesamtvolumen orientiert, führt die relative Zunahme des Waschpuffers im Probenvolumen zu einem relativen Lysepuffermangel, der die RNA-Extraktion mittels Qiagen-Säulen stört.

4.2.3 Spezielle Überlegungen zum Untersuchungsmaterial

Die meisten der bereits zitierten Publikationen zur Genexpression untersuchten Fettgewebe und nicht Adipocyten.^{42,108,110,111,127,128,166,189,190} Biopsiertes Fettgewebe enthält eine Vielzahl von Zelltypen (Endothelzellen, glatte Muskelzellen, sympathische Nervenendigungen, Lymphocyten, Fibroblasten und Präadipocyten),¹⁹² die durch Kollagenaseverdau, Filtration und Zentrifugation von den Adipocyten abgetrennt werden (s. 3.2 und Abbildung 8). Die Untersuchung der isolierten Adipocyten ermöglicht daher eine Zuordnung der Expression von Genen wie denen des RAS, die auch in den anderen Zelltypen exprimiert werden. Dagegen könnte argumentiert werden, daß es nicht entscheidend ist, in welchem Zelltyp des Fettgewebes die Bildung vasoaktiver Substanzen gesteigert oder verringert ist, da dies den lokalen Blutfluß und adipocytären Stoffwechsel kaum beeinflussen dürfte.

Es kann experimentell nicht geklärt werden, inwieweit die Adipocytenisolierung als solche, die etwa 70 Minuten länger dauert als das Waschen und Einfrieren von biopsiertem Fettgewebe, die Expression der untersuchten Gene beeinflusst. Es gibt also gute Argumente für und gegen die Isolierung von Adipocyten aus Fettgewebebiopsien. Da keines der hier untersuchten Gene zu den "early response genes" gehört, die bei Verletzung oder Manipulation von Geweben innerhalb kurzer Zeit aktiviert werden, wurden für diese Arbeit die Argumente für die Isolierung der Adipocyten als ausschlaggebend erachtet.

Ein grundsätzliche Einschränkung der Aussagekraft dieser Arbeit liegt in der Untersuchung des subkutanen Fettgewebes, da die Assoziation von Adipositas und Hypertonie (und allgemeiner: der kardiovaskulären Morbidität) vor allem durch das viszerale Fettgewebe bestimmt wird.² Allerdings ist es schwierig, eine Studie dieser Art durchzuführen, bei der die Probanden klinisch gut charakterisiert werden und bei der viszerales Fettgewebe gesammelt wird, da es sich dabei immer um chirurgische Patienten handelt. Damit beschränkten wir uns auf die Untersuchung des subkutanen Fettgewebes, wohl wissend, daß die Ergebnisse in erster Linie modellhaften Charakter haben. Allerdings zeigen aktuelle Befunde, daß auch die tiefen subkutanen Fettgewebeschichten des Abdomens mit metabolischen und kardiovaskulären Komplikationen der Adipositas vergesellschaftet sind.¹⁹³

4.2.4 RNA-Extraktion und *TaqMan*-RT-PCR

Die beschriebene Methode zur RNA-Extraktion (s. 2.6.2) ist gut geeignet, kleine Probenvolumina erfolgreich zu bearbeiten. Die früher von uns eingesetzte Phenol-Chloroform-Methode^{113,144} wäre aufgrund der schwierigeren Handhabung weniger erfolgreich. Da die *TaqMan*-RT-PCR aufgrund ihrer Sensitivität die Arbeit mit kleinsten RNA-Mengen erlaubt, ist nicht die Quantifizierung der Genexpression das methodische Problem, sondern die Quantifizierung und Beurteilung der RNA.

Die folgende Rechnung für 1 µg isolierte RNA soll dies verdeutlichen. Für die Elution der RNA von der Qiagen-Säule wurde das minimal mögliche Volumen (30 µl) eingesetzt, damit läge die RNA-Konzentration bei 0,033 µg/µl. Die photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration bedarf einer Extinktion zwischen 0,1 und 1,0, damit müßte die RNA-Konzentration in der Küvette mindestens 0,004 µg/µl betragen, entsprechend 12 µl RNA-Lsg. Bei der Elektrophorese wurden laut Protokoll 3 µl RNA-Lsg. aufgetragen, entsprechend 0,1 µg RNA. Da diese Menge auf dem Gel nicht beurteilbar wäre, müßte die doppelte bis dreifache Menge eingesetzt werden, um die RNA-Banden sichtbar zu machen. Damit blieben von den ursprünglich 30 µl RNA-Lsg. 10 µl für Genexpressionsuntersuchungen übrig, entsprechend 330 ng RNA. Diese Menge wäre für die Quantifizierung der RAS-Gene nicht ausreichend gewesen. Damit wird klar, warum von einigen Probanden trotz Biopsie keine RNA zur Verfügung stand. Insgesamt also ist der RNA-Verbrauch bei Untersuchungen kleiner Biopsiemengen mit den hier vorgestellten Methoden zu groß.

Die *TaqMan*-RT-PCR zur Quantifizierung der Genexpression liefert mit Interassay-Variationskoeffizienten von 1 bis 2 % hervorragend vergleichbare Werte. Eine Reihe von Besonderheiten dieser Methode im Vergleich zu konventionellen Methoden der Quantifizierung der Genexpression wurden bereits unter 2.7 beschrieben. Eine Unbequemlichkeit dieser Methode ist die Notwendigkeit der Anwendung von Standardreihen, denn damit steigen Materialverbrauch und Kosten und sinkt die Zahl der gleichzeitig meßbaren Proben. Theoretisch könnte auf die Standardreihen verzichtet werden, wenn die Standardreihen eines Gens stets gleiche Ergebnisse lieferten, jedoch beraubte man sich durch den Verzicht auf die Standardreihen der Kontrollmöglichkeiten bspw. von technischen Problemen.

Der größte Vorteil dieser Methode ist die auf der Fluoreszenzdetektion beruhende Sensitivität, die es erlaubt, schwach exprimierte Gene und mehrerer Gene aus einer RNA-Probe zu untersuchen. Für die Untersuchung von stark (*GAPDH*) bis mittelstark (*AGT*, *ACE*, *AGTR1*) exprimierten Genen reichen 10 ng Gesamt-RNA-Äquivalent pro Reaktion aus, entsprechend liegt der Bedarf bei 80 ng pro Gen (40 ng für das Zielgen und 40 ng für das Kontrollgen). Für die Untersuchung schwach exprimierter Gene wie *REN* dagegen muß mehr Ausgangsmaterial eingesetzt werden, um auch gut reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Für *REN* lag daher der Bedarf an Material bei insgesamt 240 ng Gesamt-RNA-Äquivalent.

Vom Hersteller wird angegeben, daß nur solche Ergebnisse als "signifikant", weil zuverlässig reproduzierbar, angesehen werden sollten, die eine Verdopplungen bzw. Halbierungen der Transkriptmengen anzeigen, entsprechend einem Unterschied von mindestens einem C_T -Wert zwischen zwei Proben (Abbildung 7). Die Genexpressionsunterschiede zwischen den Gruppen bleiben hiervon unberührt, denn bei den signifikanten Ergebnissen liegen Verdopplungen der Expression von *REN*, *ACE* und *AGTR1* und eine Halbierung der Expression von *AGT* vor.

4.3 SCHLUßBEMERKUNGEN

Die Ergebnisse dieser Arbeit führen zu der Schlußfolgerung, daß es im Fettgewebe adipöser Hypertoniker zu einer vermehrten Bildung von Ang II kommt. Ang II könnte durch metabolische Wirkungen über den AT_1 -Rezeptor zur gesteigerten Lipolyse führen. Zusätzlich wäre ein Einfluß von Ang II auf die lokale Blutflußregulation im Fettgewebe denkbar. Zumindest die gesteigerte Freisetzung von Fettsäuren aus dem Fettgewebe steht in einem engen Zusammenhang zur Pathophysiologie der adipositas-assoziierten Hypertonie und der Insulinresistenz. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten somit helfen, den positiven Einfluß von ACE-Hemmern auf die Insulinresistenz¹⁹⁴ und die Verringerung der Neuerkrankungsrate an Diabetes mellitus Typ 2, wie sie in den großen klinischen Studien CAPPP¹⁹⁵ und HOPE¹⁹⁶ gezeigt wurde, zu erklären.

5 Zusammenfassung

Übergewichtige und adipöse Menschen entwickeln zu etwa 50 % erhöhte Blutdruckwerte. Damit ist die Hypertonie die häufigste adipositas-assoziierte Erkrankung. Es ist bislang nur teilweise geklärt, wie Gewichtssteigerung zur Erhöhung des Blutdruckes führt. Neben der renalen Natriumretention scheinen Insulinresistenz und gesteigerte Sympathikusaktivität hier eine pathophysiologische Rolle zu spielen. Neuere Daten aus der Literatur weisen darauf hin, daß auch das vermehrt vorhandene Fettgewebe von Bedeutung sein könnte, indem es eine Reihe von Substanzen sezerniert, die sowohl die renale Natriumhomöostase als auch die Insulinresistenz und die Sympathikusaktivität beeinflussen. Außerdem sezernieren humane Adipocyten vasoaktive Substanzen, deren physiologische und pathophysiologische Bedeutung noch nicht geklärt ist (Angiotensin II, NO, Endothelin-1, Prostacyclin). Das lokale Renin-Angiotensin System gehört zu den am besten untersuchten „kardiovaskulären“ Systemen im Fettgewebe. Hinweise auf eine mögliche Beteiligung des adipocytären Renin-Angiotensin Systems in der Pathophysiologie der adipositas-assoziierten Hypertonie ergeben sich aus tierexperimentellen Befunden und aus klinischen Studien, die eine Assoziation von Adipositas und gesteigerten systemischen Parametern des Renin-Angiotensin Systems zeigten und nachwiesen, daß adipocytär gebildetes Angiotensinogen in die systemische Blutzirkulation gelangt.

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, Probanden anhand von anthropometrischen und 24 h-Blutdruckdaten in drei Gruppen („schlank-normotensiv“, „adipös-normotensiv“ und „adipös-hypertensiv“) einzuteilen und zwischen diesen Gruppen die Expression der Gene für Angiotensinogen (*AGT*), Renin (*REN*), Angiotensin Converting Enzyme (*ACE*) und den Angiotensin II Typ 1-Rezeptor (*AGTR1*) in isolierten Adipocyten zu vergleichen. Hierfür wurde die Technik der Nadelbiopsie zur Gewinnung subkutanen Fettgewebes etabliert und die Aufarbeitung der Biopsien optimiert. Die Ausarbeitung des Studiendesigns und aller notwendigen Materialien zur Durchführung der Studie (Anzeigen, Plakate, Fragebögen, Datenbögen, Datenbank) stellte neben Probandenrekrutierung und Probenaufarbeitung einen wichtigen Teil der vorliegenden Arbeit dar.

Von fünfzig biopsierten Probanden wurden dreißig Frauen in die genannten drei Gruppen eingeteilt und in die Auswertung aufgenommen. Von den anderen Probanden stand entweder nicht genug Material zur Untersuchung der Genexpression zur Verfügung, oder eine Auswertung kam aus anderen Gründen (nachträgliche Ermittlung von Ausschlußkriterien) nicht in Frage. Die Gruppen bestanden aus 12 schlanken Normotonikerinnen (45 Jahre, BMI 22,4 kg/m², Gesamtmittelwerte der 24h-Blutdruckmessung 112/69 mm Hg), acht adipösen Normotonikerinnen (52 Jahre, BMI 34,7 kg/m², 120/74 mm Hg) und zehn adipösen Hypertonikerinnen (60 Jahre, BMI 34,3 kg/m², 137/85 mm Hg). Stoffwechselfparameter und verschiedene Hormone weisen auf die ungünstige Stoffwechselsituation der adipösen Hypertonikerinnen hin.

Der Vergleich der Genexpression zwischen den drei Gruppen zeigt, daß Adipositas mit einer Reduktion der *AGT*-Expression einhergeht, die adipositas-assoziierte Hypertonie hingegen mit einer gesteigerten Expression von *Renin*, *ACE* und *AGTR1*. Weitergehende statistische Analysen zeigen für das *ACE*-Gen einen gerade signifikanten Einfluß auf die Höhe der 24-Blutdruckwerte, umgekehrt werden die einzelnen Gene teilweise durch Blutdruckvariablen (*ACE* und *AGTR1*) und teilweise durch adipositas-assoziierte Variablen wie BMI, Serum-Insulin und Insulinresistenz-Index (*AGT* und *Renin*) beeinflusst.

Die Ergebnisse dieser Arbeit führen zu der Hypothese, daß es im Fettgewebe adipöser Hypertoniker zu einer vermehrten Bildung von Ang II kommt. Ang II könnte durch metabolische Wirkungen über den AT₁-Rezeptor zur gesteigerten Lipolyse führen. Zusätzlich wäre ein Einfluß von Ang II auf die lokale Blutflußregulation im Fettgewebe denkbar. Zumindest die gesteigerte Freisetzung von Fettsäuren aus dem Fettgewebe steht in einem engen Zusammenhang zur Pathophysiologie der adipositas-assoziierten Hypertonie und der Insulinresistenz. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten somit helfen, den positiven Einfluß von ACE-Hemmern auf die Insulinresistenz und die Verringerung der Neuerkrankungsrate an Diabetes mellitus Typ 2, wie sie in den großen klinischen Studien CAPPP und HOPE gezeigt wurde, zu erklären.

6 Literatur

- 1 Preventing and managing the global epidemic. Hrsg.: WHO Consultation on Obesity: Geneva, 3-5 June 1997. S1-276.
- 2 Kissebah AH, Krakower GR: Regional adiposity and morbidity. *Physiol Rev* 1994; 74: S761-811.
- 3 Kamel EG et al.: Measurement of abdominal fat by magnetic resonance imaging, DEXA and anthropometry in non-obese men and women. *Int J Obes* 1999; 23: S686-692.
- 4 Han TS et al.: Waist circumference as a screening tool for cardiovascular risk factors: evaluation of receiver operating characteristics (ROC). *Obes Res* 1996; 4: S533-547.
- 5 Thefeld W: Verbreitung der Herz-Kreislauf-Risikofaktoren Hypercholesterinämie, Übergewicht, Hypertonie und Rauchen in der Bevölkerung. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz* 2000; 43: S415-423.
- 6 Must A et al.: The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA* 1999; 282: S1523-1529.
- 7 Allison DB et al.: Annual deaths attributable to obesity in the United States. *JAMA* 1999; 282: S1530-1538.
- 8 Calle EE et al.: Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 1999; 341: S1097-1105.
- 9 Wolf AM, Colditz GA: Current estimates of the economic cost of obesity in the United States. *Obes Res* 1998; 6: S97-106.
- 10 Adipositas-Leitlinien der Deutschen Adipositas-Gesellschaft, erhältlich unter <http://www.adipositas-gesellschaft.de/>.
- 11 Cohen AH: Massive obesity and the kidney. A morphologic and statistical study. *Am J Pathol* 1975; 81: S117-130.
- 12 Jennette JC, Charles L, Grubb W: Glomerulomegaly and focal segmental glomerulosclerosis associated with obesity and sleep-apnea syndrome. *Am J Kidney Dis* 1987; 10: S470-472.
- 13 Dwyer TM et al.: The altered structure of renal papillary outflow tracts in obesity. *Ultrastruct Pathol* 2000; 24: S251-257.
- 14 Kortelainen ML: Association between cardiac pathology and fat tissue distribution in an autopsy series of men without premortem evidence of cardiovascular disease. *Int J Obes* 1996; 20: S245-252.
- 15 Zhou YT et al.: Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: S1784-1789.
- 16 Wirth A, Sharma AM, Schunkert H: Kardiomyopathie bei Adipositas – eine Krankheitsentität? *Dtsch Med Wschr* 2000; 125: S944-949.

- 17 Ratziu V et al.: Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology* 2000; 118: S1117-1123.
- 18 Luyckx FH, Lefebvre PJ, Scheen AJ: Non-alcoholic steatohepatitis: association with obesity and insulin resistance, and influence of weight loss. *Diabetes Metab* 2000; 26: S98-106.
- 19 Reaven GM: Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37: S1595-1607.
- 20 Kahn BB, Flier JS: Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106: S473-481.
- 21 Ginsberg HN: Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest* 2000; 106: S453-458.
- 22 Kastarinen MJ et al.: Blood pressure levels and obesity trends in hypertensive and normotensive Finnish population from 1982 to 1997. *J Hypertens* 2000; 18: S255-262.
- 23 The 6th report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Arch Intern Med* 1997; 157: S2413-2446.
- 24 1999 WHO - ISH Guidelines for the Management of Hypertension. *J Hypertens* 1999; 17: S151-183.
- 25 Executive summary of the clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults. *Arch Intern Med* 1998; 158: S1855-1867.
- 26 Deutsche Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdrucks: Arterielle Hypertonie. http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/III/II_ihypt.htm.
- 27 Granger JP, West D, Scott J: Abnormal pressure natriuresis in the dog model of obesity-induced hypertension. *Hypertension* 1994; 23: S18-111.
- 28 Fujiwara K et al.: Altered pressure-natriuresis in obese Zucker rats. *Hypertension* 1999; 33: S1470-1475.
- 29 Hall JE, Brands MW, Henegar JR: Mechanisms of hypertension and kidney disease in obesity. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 892: S91-107.
- 30 Reisin E: Sodium and obesity in the pathogenesis of hypertension. *Am J Hypertens* 1990; 3: S164-167.
- 31 West DB et al.: Blunted natriuretic response to an acute sodium load in obese hypertensive dogs. *Hypertension* 1992; 19: S196-1100.
- 32 Licata G et al.: Salt-regulating hormones in young normotensive obese subjects: Effects of saline load. *Hypertension* 1994; 23: S120-124.
- 33 Dahl LK, Silver L, Christie RW: The role of salt in the fall of blood pressure accompanying reduction in obesity. *N Engl J Med* 1958; 258: S1186-1192.
- 34 Rocchini AP: The effect of weight loss on the sensitivity of blood pressure to sodium in obese adolescents. *N Engl J Med* 1989; 321: S580-585.

-
- 35 He J et al.: Dietary sodium intake and subsequent risk of cardiovascular disease in overweight adults. *JAMA* 1999; 282: S2027-2034.
- 36 Engeli S, Sharma AM: The renin-angiotensin system and natriuretic peptides in obesity-associated hypertension. *J Mol Med* 2001; 79: S21-29.
- 37 Hall JE et al.: Obesity-induced hypertension: Renal function and systemic hemodynamics. *Hypertension* 1993; 22: S292-299.
- 38 Porter LE, Hollenberg NK: Obesity, salt intake, and renal perfusion in healthy humans. *Hypertension* 1998; 32: S144-148.
- 39 Carlson SH et al.: Elevated sympathetic activity contributes to hypertension and salt sensitivity in diabetic obese Zucker rats. *Hypertension* 2000; 35: S403-408.
- 40 Kassab S et al.: Renal denervation attenuates the sodium retention and hypertension associated with obesity. *Hypertension* 1995; 25: S893-897.
- 41 Rumantir MS et al.: Neural mechanisms in human obesity-related hypertension. *J Hypertens* 1999; 17: S1125-1133.
- 42 Dessì-Fulgheri P et al.: Plasma atrial natriuretic peptide and natriuretic peptide receptor gene expression in adipose tissue of normotensive and hypertensive obese patients. *J Hypertens* 1997; 15: S1695-1699.
- 43 Dessi-Fulgheri P et al.: Low calorie diet enhances renal, hemodynamic, and humoral effects of exogenous atrial natriuretic peptide in obese hypertensives. *Hypertension* 1999; 33: S658-662.
- 44 Crandall DL, Ferraro GD, Cervoni P: Effect of experimental obesity and subsequent weight reduction upon circulating atrial natriuretic peptide. *Proc Soc Exp Biol Med* 1989; 191: S352-356.
- 45 Grassi G et al.: Sympathetic activation in obese normotensive subjects. *Hypertension* 1995; 25: S560-563.
- 46 Mikhail N, Golub MS, Tuck ML: Obesity and hypertension. *Prog Cardiovasc Dis* 1999; 42: S39-58.
- 47 Antic V et al.: Role of the sympathetic nervous system during the development of obesity-induced hypertension in rabbits. *Am J Hypertens* 2000; 13: S556-559.
- 48 Masuo K et al.: Weight gain-induced blood pressure elevation. *Hypertension* 2000; 35: S1135-1140.
- 49 Grassi G et al.: Body weight reduction, sympathetic nerve traffic, and arterial baroreflex in obese normotensive humans. *Circulation* 1998; 97: S2037-2042.
- 50 Emdin M et al.: Hyperinsulinemia and autonomic nervous system dysfunction in obesity: effects of weight loss. *Circulation* 2001; 103: S513-519.
- 51 Kunz I et al.: Resting metabolic rate and substrate use in obesity hypertension. *Hypertension* 2000; 36: S26-32.
- 52 Rocchini AP: Cardiovascular regulation in obesity-induced hypertension. *Hypertension* 1992; 19: S156-160.
- 53 Ferrannini E: The haemodynamics of obesity: a theoretical analysis. *J Hypertens*

- 1992; 10: S1417-1423.
- 54 Moreau P et al.: Chronic hyperinsulinaemia and hypertension: The role of the sympathetic nervous system. *J Hypertens* 1995; 13: S333-340.
- 55 Berne C et al.: The sympathetic response to euglycaemic hyperinsulinaemia. Evidence from microelectrode nerve recordings in healthy subjects. *Diabetologia* 1992; 35: S873-879.
- 56 Muscelli E et al.: Autonomic and hemodynamic responses to insulin in lean and obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: S2084-2090.
- 57 Hall JE et al.: Chronic hyperinsulinemia and blood pressure regulation. *Am J Physiol* 1990; 258: SF722-F731.
- 58 Hall JE et al.: Chronic intrarenal hyperinsulinemia does not cause hypertension. *Am J Physiol* 1991; 260: SF663-F669.
- 59 Tsutsu N et al.: Lack of association between blood pressure and insulin in patients with insulinoma. *J Hypertens* 1990; 8: S479-482.
- 60 Hall JE et al.: Resistance to metabolic actions of insulin and its role in hypertension. *Am J Hypertens* 1994; 7: S772-788.
- 61 Hsueh WA, Law RE: Insulin signaling in the arterial wall. *Am J Cardiol* 1999; 84: S21J-24J.
- 62 Baron AD: Vascular reactivity. *Am J Cardiol* 1999; 84: S25J-27J.
- 63 Aljada A, Dandona P: Effect of insulin on human aortic endothelial nitric oxide synthase. *Metabolism* 2000; 49: S147-150.
- 64 Cleland SJ et al.: Insulin action is associated with endothelial function in hypertension and type 2 diabetes. *Hypertension* 2000; 35: S507-511.
- 65 Jern S et al.: Relation of central hemodynamics to obesity and body fat distribution. *Hypertension* 1992; 19: S520-527.
- 66 Barnes VA et al.: Central adiposity and hemodynamic functioning at rest and during stress in adolescents. *Int J Obes* 1998; 22: S1079-1083.
- 67 Sung BH et al.: Moderately obese, insulin-resistant women exhibit abnormal vascular reactivity to stress. *Hypertension* 1997; 30: S848-853.
- 68 Large V, Arner P: Regulation of lipolysis in humans. Pathophysiological modulation in obesity, diabetes, and hyperlipidaemia. *Diabetes Metab* 1998; 24: S409-418.
- 69 Davda RK et al.: Oleic acid inhibits endothelial nitric oxide synthase by a protein kinase C-independent mechanism. *Hypertension* 1995; 26: S764-770.
- 70 Steinberg HO et al.: Free fatty acid elevation impairs insulin-mediated vasodilation and nitric oxide production. *Diabetes* 2000; 49: S1231-1238.
- 71 Haastrup AT et al.: Intralipid enhances alpha1-adrenergic receptor mediated pressor sensitivity. *Hypertension* 1998; 32: S693-698.
- 72 Hennes MMI et al.: Insulin-resistant lipolysis in abdominally obese hypertensive

- individuals - Role of the renin-angiotensin system. *Hypertension* 1996; 28: S120-126.
- 73 Engeli S, Sharma AM: Role of adipose tissue for cardiovascular-renal regulation in health and disease. *Horm Metab Res* 2001; 32: S485-499.
- 74 Considine RV et al.: Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996; 334: S292-295.
- 75 Dunbar JC, Hu Y, Lu H: Intracerebroventricular leptin increases lumbar and renal sympathetic nerve activity and blood pressure in normal rats. *Diabetes* 1997; 46: S2040-2043.
- 76 Haynes WG et al.: Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *J Clin Invest* 1997; 100: S270-278.
- 77 Shek EW, Brands MW, Hall JE: Chronic leptin infusion increases arterial pressure. *Hypertension* 1998; 31: S409-414.
- 78 Correia ML et al.: Leptin acts in the central nervous system to produce dose-dependent changes in arterial pressure. *Hypertension* 2001; 37: S936-942.
- 79 Kuo JJ, Jones OB, Hall JE: Inhibition of NO synthesis enhances chronic cardiovascular and renal actions of leptin. *Hypertension* 2001; 37: S670-676.
- 80 Mark AL et al.: Contrasting blood pressure effects of obesity in leptin-deficient ob/ob mice and agouti yellow obese mice. *J Hypertens* 1999; 17: S1949-1953.
- 81 Aizawa-Abe M et al.: Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension. *J Clin Invest* 2000; 105: S1243-1252.
- 82 Ozata M, Ozdemir IC, Licinio J: Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: S3686-3695.
- 83 Paolisso G et al.: Plasma leptin concentrations and cardiac autonomic nervous system in healthy subjects with different body weights. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: S1810-1814.
- 84 Suter PM et al.: Is there a role for the ob gene product leptin in essential hypertension? *Am J Hypertens* 1998; 11: S1305-1311.
- 85 Sheu WH, Lee WJ, Chen YT: High plasma leptin concentrations in hypertensive men but not in hypertensive women. *J Hypertens* 1999; 17: S1289-1295.
- 86 Kazumi T et al.: Fasting insulin and leptin serum levels are associated with systolic blood pressure independent of percentage body fat and body mass index. *J Hypertens* 1999; 17: S1451-1455.
- 87 Hirose H et al.: The obese gene product, leptin: possible role in obesity-related hypertension in adolescents. *J Hypertens* 1998; 16: S2007-2012.
- 88 Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW: Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation* 1993; 87: S1816-1828.

-
- 89 Lee MA et al.: Tissue renin-angiotensin systems. Their role in cardiovascular disease. *Circulation* 1993; 87: SIV7-IV13.
- 90 Bader M et al.: Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med* 2001; 79: S76-102.
- 91 Corvol P et al.: The role of the renin-angiotensin system in blood pressure regulation in normotensive animals and man. *J Hypertens Suppl* 1984; 2: SS25-S30.
- 92 Egan BM, Stepniakowski K, Goodfriend TL: Renin and aldosterone are higher and the hyperinsulinemic effect of salt restriction greater in subjects with risk factors clustering. *Am J Hypertens* 1994; 7: S886-893.
- 93 Goodfriend TL, Egan BM, Kelley DE: Aldosterone in obesity. *Endocr Res* 1998; 24: S789-796.
- 94 Cooper R et al.: ACE, angiotensinogen and obesity: a potential pathway leading to hypertension. *J Hum Hypertens* 1997; 11: S107-111.
- 95 Cooper R et al.: Angiotensinogen levels and obesity in four black populations. ICISHB Investigators. *J Hypertens* 1998; 16: S571-575.
- 96 Bloem LJ et al.: The serum angiotensinogen concentration and variants of the angiotensinogen gene in white and black children. *J Clin Invest* 1995; 95: S948-953.
- 97 Umemura S et al.: Plasma angiotensinogen concentrations in obese patients. *Am J Hypertens* 1997; 10: S629-633.
- 98 Licata G et al.: Central obesity and hypertension: Relationship between fasting serum insulin, plasma renin activity, and diastolic blood pressure in young obese subjects. *Am J Hypertens* 1994; 7: S314-320.
- 99 Schorr U et al.: Relationship between angiotensinogen, leptin and blood pressure levels in young normotensive men. *J Hypertens* 1998; 16: S1475-1480.
- 100 Uckaya G et al.: Plasma leptin levels strongly correlate with plasma renin activity in patients with essential hypertension. *Horm Metab Res* 1999; 31: S435-438.
- 101 Sowers JR et al.: Blood pressure and hormone changes associated with weight reduction in the obese. *Hypertension* 1982; 4: S686-691.
- 102 Tuck ML et al.: The effect of weight reduction on blood pressure, plasma renin activity, and plasma aldosterone levels in obese patients. *N Engl J Med* 1981; 304: S930-933.
- 103 Marks P, Wilson B, Delassalle A: Aldosterone studies in obese patients with hypertension. *Am J Med Sci* 1985; 289: S224-228.
- 104 Vaswani AN: Effect of weight reduction on the renin-aldosterone axis. *J Am Coll Nutr* 1985; 4: S225-231.
- 105 Van de Borne P et al.: Ambulatory blood pressure and neuroendocrine control after diet-assisted gastric restrictive surgery. *J Hypertens* 2000; 18: S301-306.
- 106 Spark RF et al.: Renin, aldosterone and glucagon in the natriuresis of fasting. *N*

- Engl J Med* 1975; 292: S1335-1340.
- 107 Donckier JE et al.: Relationship between natriuresis and changes in plasma atrial natriuretic factor, renin activity and aldosterone levels in fasting obese subjects. *Diabete Metab* 1990; 16: S278-283.
- 108 Jonsson JR et al.: The expression and localisation of the angiotensin-converting enzyme mRNA in human adipose tissue. *Blood Press* 1994; 3: S72-75.
- 109 Crandall DL et al.: Distribution of angiotensin II receptors in rat and human adipocytes. *J Lipid Res* 1994; 35: S1378-1385.
- 110 Jones BH et al.: Angiotensinogen gene expression in adipose tissue: Analysis of obese models and hormonal and nutritional control. *Am J Physiol* 1997; 273: SR236-R242.
- 111 Karlsson C et al.: Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: S3925-3929.
- 112 Schling P et al.: Evidence for a local renin angiotensin system in primary cultured human preadipocytes. *Int J Obes* 1999; 23: S336-341.
- 113 Engeli S et al.: Co-expression of renin-angiotensin system genes in human adipose tissue. *J Hypertens* 1999; 17: S555-560.
- 114 Engeli S, Negrel R, Sharma AM: Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension* 2000; 35: S1270-1277.
- 115 Massiéra F et al.: Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *FASEB J* 2001; 15: S2727-2729.
- 116 Tanimoto K et al.: Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *J Biol Chem* 1994; 269: S31334-31337.
- 117 English V, Cassis L: Facilitation of sympathetic neurotransmission contributes to angiotensin regulation of body weight. *J Neural Transm* 1999; 106: S631-644.
- 118 Cassis LA: Role of angiotensin II in brown adipose thermogenesis during cold acclimation. *Am J Physiol* 1993; 265: SE860-E865.
- 119 Soltis EE, Cassis LA: Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. *Clin Exp Hypertens [A]* 1991; 13: S277-296.
- 120 Barbe P et al.: In situ assessment of the role of the beta 1-, beta 2- and beta 3-adrenoceptors in the control of lipolysis and nutritive blood flow in human subcutaneous adipose tissue. *Br J Pharmacol* 1996; 117: S907-913.
- 121 Adams F, Klaus S, Boschmann M: Metabolic and hemodynamic response to angiotensin II in rat adipose tissue (Abstract). *Int J Obes* 2000; 24 (Supplement 1): SS74.
- 122 Jones BH, Standridge MK, Moustaid N: Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology* 1997; 138: S1512-1519.
- 123 Skurk T, Röhrig K, Hauner H: Angiotensin II stimuliert die Lipolyse in primärkultivierten humanen Adipozyten (Abstract). *Aktuel Ernähr Med* 2000; 25:

- S248.
- 124 Townsend RR: The effects of angiotensin-II on lipolysis in humans. *Metabolism* 2001; 50: S468-472.
 - 125 Jordan J et al.: Tissue specific interaction of angiotensin II and nitric oxide on perfusion and metabolism (Abstract). *J Hypertens* 2001; 19 (Supplement 2): SS132.
 - 126 Frederich RCJ et al.: Tissue-specific nutritional regulation of angiotensinogen in adipose tissue. *Hypertension* 1992; 19: S339-344.
 - 127 Van Harmelen V et al.: The association of human adipose angiotensinogen gene expression with abdominal fat distribution in obesity. *Int J Obes* 2000; 24: S673-678.
 - 128 Van Harmelen V et al.: Increased adipose angiotensinogen gene expression in human obesity. *Obes Res* 2000; 8: S337-341.
 - 129 Giacchetti G et al.: Different gene expression of the RAS in human subcutaneous and visceral adipose tissue (Abstract). *Int J Obesity* 1999; 23 (Supplement 5): SS71.
 - 130 Hainault I et al.: Evidence of AGT and TNF- α secretion by human adipocytes from obese patients (Abstract). *Eating Weight Dis* 1999; 4: S31.
 - 131 Crandall DL et al.: Developmental aspects of the adipose tissue renin-angiotensin system: Therapeutic implications. *Drug Dev Res* 1994; 32: S117-125.
 - 132 Gabriely I et al.: Hyperglycemia modulates angiotensinogen gene expression. *Am J Physiol* 2001; 281: SR795-R802.
 - 133 Tamura K et al.: Tissue-specific regulation of angiotensinogen gene expression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1996; 27: S1216-1223.
 - 134 Nyui N et al.: Tissue angiotensinogen gene expression induced by lipopolysaccharide in hypertensive rats. *Hypertension* 1997; 30: S859-867.
 - 135 Tamura K et al.: Modulation of tissue angiotensinogen gene expression in genetically obese hypertensive rats. *Am J Physiol* 1997; 272: SR1704-R1711.
 - 136 Hainault I et al.: Developmental changes in angiotensinogen expression and its secretion in the Zucker rat: adipose tissue-specific effect of fa genotype. *Int J Obesity* 1998; 22 (Supplement 3): SS103.
 - 137 Cassis LA et al.: Characterization and regulation of angiotensin II receptors in rat adipose tissue - Angiotensin receptors in adipose tissue. *Adv Exp Med Biol* 1996; 396: S39-47.
 - 138 Ellis KJ: Human body composition: in vivo methods. *Physiol Rev* 2000; 80: S649-680.
 - 139 Ferrannini E, Mari A: How to measure insulin sensitivity. *J Hypertens* 1998; 16: S895-906.
 - 140 Matthews DR et al.: Homeostasis model assessment: insulin resistance and

- beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: S412-419.
- 141 Kolaczynski JW et al.: A new technique for biopsy of human abdominal fat under local anaesthesia with Lidocaine. *Int J Obes* 1994; 18: S161-166.
- 142 Rodbell M: Metabolism of Isolated Fat Cells 1. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis. *J Biol Chem* 1964; 239: S375-380.
- 143 Gorzelniak K, Engeli S, Sharma AM: Standardizing the counting of adipocytes in cell culture. *Biotechniques* 1998; 24: S536-538.
- 144 Janke J et al.: Extraction of total RNA from adipocytes. *Horm Metab Res* 2001; 33: S213-215.
- 145 Gorzelniak K et al.: Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes. *Horm Metab Res* 2001 33: S625-627.
- 146 O'Brien E, Beevers G, Lip GY: ABC of hypertension. Blood pressure measurement. Part III-automated sphygmomanometry: ambulatory blood pressure measurement. *BMJ* 2001; 322: S1110-1114.
- 147 Brasier AR, Li J, Copland A: Transcription factors modulating angiotensinogen gene expression in hepatocytes. *Kidney Int* 1994; 46: S1564-1566.
- 148 Klett C et al.: Modulation of tissue angiotensinogen gene expression by glucocorticoids, estrogens, and androgens in SHR and WKY rats. *Clin Exp Hypertens* 1993; 15: S683-708.
- 149 Björntorp P, Rosmond R: Neuroendocrine abnormalities in visceral obesity. *Int J Obes* 2000; 24 (Supplement 2): S80-S85.
- 150 Zhao Y et al.: Tumor necrosis factor-alpha stimulates aromatase gene expression in human adipose stromal cells through use of an AP-1 binding site upstream of promoter 1.4. *Mol Endocrinol* 1996; 10: S1350-1357.
- 151 Cassis LA: Downregulation of the renin-angiotensin system in streptozotocin-diabetic rats. *Am J Physiol* 1992; 262: SE105-E109.
- 152 Bujalska IJ, Kumar S, Stewart PM: Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"? *Lancet* 1997; 349: S1210-1213.
- 153 Saye JA et al.: Angiotensinogen gene expression in 3T3-L1 cells. *Am J Physiol* 1989; 256: SC448-C451.
- 154 Saye J, Lynch KR, Peach MJ: Changes in angiotensinogen messenger RNA in differentiating 3T3-F442A adipocytes. *Hypertension* 1990; 15: S867-871.
- 155 Safonova I et al.: Regulation by fatty acids of angiotensinogen gene expression in preadipose cells. *Biochem J* 1997; 322: S235-239.
- 156 Aubert J et al.: Regulation by glucocorticoids of angiotensinogen gene expression and secretion in adipose cells. *Biochem J* 1997; 328: S701-706.
- 157 Aubert J et al.: Insulin down-regulates angiotensinogen gene expression and angiotensinogen secretion in cultured adipose cells. *Biochem Biophys Res*

- Commun* 1998; 250: S77-82.
- 158 Ardévol A et al.: Sympathetic blockade with α -MPT counteracts the inhibitory effects of fasting on leptin production (Abstract). *Int J Obesity* 1999; 23 (Supplement 5): SS23.
- 159 Harp JB, DiGirolamo M: Components of the renin-angiotensin system in adipose tissue: changes with maturation and adipose mass enlargement. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1995; 50: SB270-B276.
- 160 Serazin-Leroy V et al.: Androgen regulation and site specificity of angiotensinogen gene expression and secretion in rat adipocytes. *Am J Physiol* 2000; 279: SE1398-E1405.
- 161 Cassis LA, Saye J, Peach MJ: Location and regulation of rat angiotensinogen messenger RNA. *Hypertension* 1988; 11: S591-596.
- 162 Naftilan AJ et al.: Localization and differential regulation of angiotensinogen mRNA expression in the vessel wall. *J Clin Invest* 1991; 87: S1300-1311.
- 163 Campbell DJ, Habener JF: Cellular localization of angiotensinogen gene expression in brown adipose tissue and mesentery: quantification of messenger ribonucleic acid abundance using hybridization in situ. *Endocrinology* 1987; 121: S1616-1626.
- 164 Turban S et al.: Differential regulation of leptin and AGT secretion in rat adipose cells (Abstract). *Eating Weight Dis* 1999; 4: S34.
- 165 Janke J et al.: Mature adipocytes inhibit in vitro differentiation of human preadipocytes via angiotensin type 1 receptors. *Diabetes* 2002; 51: S1699-707.
- 166 Dusserre E, Moulin P, Vidal H: Differences in mRNA expression of the proteins secreted by the adipocytes in human subcutaneous and visceral adipose tissues. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1500: S88-96.
- 167 Rieusset J, Auwerx J, Vidal H: Regulation of gene expression by activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma with rosiglitazone (BRL 49653) in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 265: S265-271.
- 168 McGehee REJ et al.: Differentiation-specific element: a cis-acting developmental switch required for the sustained transcriptional expression of the angiotensinogen gene during hormonal-induced differentiation of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes. *Mol Endocrinol* 1993; 7: S551-560.
- 169 Gorzelniak K et al.: Hormonal regulation of the human adipose-tissue renin-angiotensin system: relationship to obesity and hypertension. *J Hypertens* 2002; 20: S965-973.
- 170 Shenoy U, Cassis L: Characterization of renin activity in brown adipose tissue. *Am J Physiol* 1997; 272: SC989-C999.
- 171 Morris BJ: Molecular biology of renin. I: Gene and protein structure, synthesis and processing. *J Hypertens* 1992; 10: S209-214.
- 172 Morris BJ: Molecular biology of renin. II: Gene control by messenger RNA, transfection and transgenic studies. *J Hypertens* 1992; 10: S337-342.

-
- 173 King JA, Lush DJ, Fray JC: Regulation of renin processing and secretion: chemiosmotic control and novel secretory pathway. *Am J Physiol* 1993; 265: SC305-C320.
- 174 De Mello WC, Danser AH: Angiotensin II and the heart : on the intracrine renin-angiotensin system. *Hypertension* 2000; 35: S1183-1188.
- 175 Holmer SR et al.: Beta-adrenergic stimulation of renin expression in vivo. *J Hypertens* 1997; 15: S1471-1479.
- 176 Tamura K et al.: Mechanism of cAMP regulation of renin gene transcription by proximal promoter. *J Clin Invest* 1994; 94: S1959-1967.
- 177 Barton M et al.: Obesity is associated with tissue-specific activation of renal angiotensin-converting enzyme in vivo: evidence for a regulatory role of endothelin. *Hypertension* 2000; 35: S329-336.
- 178 Engeli S et al.: Expression of endothelin-system genes and secretion of endothelin-1 by human adipocytes (Abstract). *Int J Obes* 2001; 25 (Supplement 2): SS75.
- 179 Hauner H, Petruschke T, Gries FA: Endothelin-1 inhibits the adipose differentiation of cultured human adipocyte precursor cells. *Metabolism* 1994; 43: S227-232.
- 180 Ferri et al.: Plasma endothelin-1 levels in obese hypertensive and normotensive men. *Diabetes* 1995; 44: S431-436.
- 181 Bohlender J et al.: Angiotensinogen concentrations and renin clearance: implications for blood pressure regulation. *Hypertension* 2000; 35: S780-786.
- 182 Agata J et al.: High plasma immunoreactive leptin level in essential hypertension. *Am J Hypertens* 1997; 10: S1171-1174.
- 183 Makris TK et al.: Elevated plasma immunoreactive leptin levels preexist in healthy offspring of patients with essential hypertension. *Am Heart J* 1999; 138: S922-925.
- 184 Wabitsch M et al.: Contribution of androgens to the gender difference in leptin production in obese children and adolescents. *J Clin Invest* 1997; 100: S808-813.
- 185 Hellstrom L et al.: Mechanisms behind gender differences in circulating leptin levels. *J Intern Med* 2000; 247: S457-462.
- 186 Menachery A et al.: Dissociation in plasma renin and adrenal ANG II and aldosterone responses to sodium restriction in rats. *Am J Physiol* 1991; 261: SE487-E494.
- 187 Goodfriend TL et al.: Relationships among plasma aldosterone, high-density lipoprotein cholesterol, and insulin in humans. *Hypertension* 1995; 25: S30-36.
- 188 Donovan DS et al.: Effect of sodium intake on insulin sensitivity. *Am J Physiol* 1993; 264: SE730-E734.
- 189 Elizalde M et al.: Expression of nitric oxide synthases in subcutaneous adipose tissue of nonobese and obese humans. *J Lipid Res* 2000; 41: S1244-1251.

-
- 190 Lefebvre AM et al.: Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. *Diabetes* 1998; 47: S98-103.
- 191 Couillard C et al.: Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia. *Int J Obes* 2000; 24: S782-788.
- 192 Cinti S: The adipose organ. 1. Auflage *Editrice Kurtis* 2000
- 193 Smith SR et al.: Contributions of total body fat, abdominal subcutaneous adipose tissue compartments, and visceral adipose tissue to the metabolic complications of obesity. *Metabolism* 2001; 50: S425-435.
- 194 Katovich MJ, Pachori A: Effects of inhibition of the renin-angiotensin system on the cardiovascular actions of insulin. *Diab Obesity Metab* 2000; 2: S3-14.
- 195 Hansson L et al.: Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomised trial. *Lancet* 1999; 353: S611-616.
- 196 Yusuf S et al.: Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000; 342: S145-153.

Lebenslauf

Name: Stefan Engeli, geb. Heidinger, Diplom-Biologe

Geboren: 16. Februar 1968 in Berlin; Nationalität: deutsch

Eltern: Dr. med. Frank-Peter Heidinger und Christa Heidinger, geb. Merten

Familienstand: Verheiratet seit dem 9. September 1994 mit Maja Engeli
2 Kinder, Sören (* 4. Juni 1998) und Nora (* 20. September 2000)

Schulbildung

09/1974 – 07/1980 Grundschule in Berlin-Spandau und Berlin-Steglitz

09/1980 – 06/1987 Goethe-Oberschule in Berlin-Lichterfelde

Hochschulbildung

10/1987 - 10/1997 Studium der Biologie an der Freien Universität Berlin. Abschluß als Diplom-Biologe. Titel der Diplomarbeit: „Co-Expression von Genen des Renin-Angiotensin Systems im Fettgewebe des Menschen“, angefertigt unter der Leitung von Prof. A.M. Sharma.

04/1992 - 11/1998 Studium der Humanmedizin am Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin; Abschluß mit Staatsexamen

Klinische Ausbildung

1992 8 Wochen Krankenpflegepraktikum im Rittberg-Krankenhaus in Berlin

1994 - 1997 Famulaturen in Innerer Medizin in Berlin und Salt Lake City, Utah, USA

10/1997 – 09/1998 Praktisches Jahr im Universitätsklinikum Benjamin Franklin in Berlin in Innerer Medizin, Chirurgie und Anästhesie

07/1999 - 12/2000 AiP in der Poliklinik der Abteilung für Endokrinologie und Nephrologie des Universitätsklinikums Benjamin Franklin

01/2001 Approbation als Arzt

Beruf

Seit 01/2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Franz-Volhard-Klinik, Campus Berlin-Buch, Universitätsklinikums Charité, Humboldt-Universität zu Berlin

Wissenschaftliche Ausbildung; Kurse

- 08/1990 4 Wochen meeresbiologisches Praktikum am Harbor Branch Oceanographic Institute in Fort Pierce, Florida, USA
- 1990 - 1991 Studentischer Tutor im Institut für Genetik des Fachbereichs Biologie der Freien Universität Berlin
- seit 1995 Mitglied der Arbeitsgruppe von Prof. A.M. Sharma am Universitätsklinikum Benjamin Franklin und an der Franz-Volhard-Klinik in Berlin
- 10/1998 5 Tage "Hypertension Summer School" der European Society of Hypertension auf Schloß Salzau bei Kiel

Stipendien und Preise

- 03/1998 Reisestipendium der Deutschen Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdruckes für das "Turkish - German – Italian Joint Meeting on Hypertension and Atherosclerosis" vom 18.-22. März 1998 in Antalya, Türkei
- 10/1998 Stipendium der Deutschen Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdruckes für die "Hypertension Summer School" 1998 vom 4.-9. Oktober 1998
- 1999 Einjähriges Promotionsstipendium der Sonnenfeld-Stiftung in Berlin
- 06/1999 Reisestipendium der Deutschen Adipositas-Gesellschaft für den "9th European Congress on Obesity" vom 3.-6. Juni 1999 in Mailand
- 05/2000 Reisestipendium der Deutschen Adipositas-Gesellschaft für den "10th European Congress on Obesity" vom 24.-27. Mai 2000 in Antwerpen
- 11/2000 Forschungspreis „Adipositas und Hypertonie“ (DM 5000), verliehen von der Arbeitsgemeinschaft „Adipositas und Hypertonie“ der Deutschen Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdruckes und der Deutschen Adipositas-Gesellschaft
- 06/2001 Reisestipendium der European Society of Hypertension für das "11th European Meeting on Hypertension" vom 15.-19. Juni 2001 in Mailand

Publikationsliste

1. S. Engeli, M. Feldpausch, K. Gorzelniak, F. Hartwig, U. Heintze, J. Janke, F.C. Luft, A.M. Sharma: Adiponectin, insulin sensitivity, and inflammatory markers in obese women (im Druck *Diabetes* 2003).
2. M. Wellner, F. Herse, J. Janke, K. Gorzelniak, S. Engeli, D. Bechart, P. Lasalle, F.C. Luft, A.M. Sharma: Endothelial Cell Specific Molecule 1 – a newly identified protein in adipocytes (im Druck *Horm Metab Res* 2003).
3. S. Engeli, P. Schling, K. Gorzelniak, M. Boschmann, J. Janke, G. Ailhaud, M. Teboul, F. Massiéra, A.M. Sharma: The adipose-tissue RAAS: role in the metabolic syndrome ? (im Druck *Int J Biochem Cell Biol* 2003).
4. F. Adams, P. Wiedmer, K. Gorzelniak, S. Engeli, S. Klaus, M. Boschmann: Age-related changes of renin-angiotensin system genes in white adipose tissue of rats (im Druck *Horm Metab Res* 2003).
5. A.M. Sharma, J. Janke, K. Gorzelniak, S. Engeli, F.C. Luft: Angiotensin blockade prevents diabetes by formation of fat cells. *Hypertension* (2002) 40: 609-611.
6. S. Engeli, A.M. Sharma: Emerging concepts in the pathophysiology and treatment of obesity-associated hypertension. *Curr Opin Cardiol* (2002) 17:355-359.
7. J. Janke, S. Engeli, K. Gorzelniak, F.C. Luft, A.M. Sharma: Mature adipocytes inhibit in vitro differentiation of human preadipocytes via angiotensin type 1 receptors. *Diabetes* (2002) 51:1699-1707.
8. K. Gorzelniak, S. Engeli, J. Janke, F.C. Luft, A.M. Sharma: Hormonal regulation of the human adipose-tissue renin-angiotensin system: relationship to obesity and hypertension. *J Hypertens* (2002) 20:965-973.
9. A.M. Sharma, S. Engeli: Managing big issues on lean evidence: treating obesity hypertension. *Nephrol Dial Transplant* (2002) 17:353-355.
10. J. Janke, S. Engeli, K. Gorzelniak, F.C. Luft, A.M. Sharma: Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance. *Obes Res* (2002) 10:1-5.
11. K. Gorzelniak, J. Janke, S. Engeli, A.M. Sharma: Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes. *Horm Metab Res* (2001) 33:625-627.
12. S. Engeli, A.M. Sharma: The renin-angiotensin system and natriuretic peptides in obesity-associated hypertension. *J Mol Med* (2001) 79: 21-29.
13. J. Janke, S. Engeli, K. Gorzelniak, A.M. Sharma: Extraction of total RNA from adipocytes. *Horm Metab Res* (2001) 33: 213-215.
14. A.M. Sharma, S. Engeli, T. Pischon: New developments in mechanisms of obesity-induced hypertension: role of adipose tissue. *Curr Hypertens Rep* (2001) 3: 152-156.
15. A.M. Sharma, T. Pischon, S. Engeli, J. Scholze: Choice of drug treatment for obesity-related hypertension: where is the evidence ? *J Hypertens* (2001) 19: 667-674.
16. A.M. Sharma, S. Engeli: The renin-angiotensin system in obesity hypertension. *JRAAS* (2001) 2 (Suppl 1): S114-S119.

17. S. Engeli, A.M. Sharma: Role of adipose tissue for cardiovascular-renal regulation in health and disease. *Horm Metab Res* (2000) 32: 485-499.
18. S. Engeli, R. Negrel, A.M. Sharma: Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension* (2000) 35: 1270-1277.
19. S. Engeli, K. Gorzelniak, R. Kreutz, N. Runkel, A. Distler, A.M. Sharma: Co-expression of renin-angiotensin system genes in human adipose tissue. *J Hypertens* (1999) 17: 555-560.
20. J. Beige, S. Engeli, J. Ringel, G. Offermann, A. Distler, A.M. Sharma: Donor G Protein $\beta 3$ subunit 825TT genotype is associated with reduced kidney allograft survival. *J Am Soc Nephrol* (1999) 10: 1717-1721.
21. J. Ringel, S. Engeli, A. Distler, A.M. Sharma: Pro12Ala missense mutation of the peroxisome proliferator activated receptor γ and diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun* (1999) 254: 450-453.
22. A.M. Sharma, T. Moeller, S. Engeli: Hypertonie bei Adipositas: Epidemiologie, Pathophysiologie und Behandlungsansätze. *DMW* (1999) 124: 1337-1341.
23. K. Gorzelniak, S. Engeli, A.M. Sharma: Standardising the counting of adipocytes in cell culture. *Biotechniques* (1998) 24: 536-538.
24. J. Beige, S. Scherer, A. Weber, S. Engeli, G. Offermann, G. Opelz, A. Distler, A.M. Sharma: Angiotensin-converting enzyme genotype and renal allograft survival. *J Am Soc Nephrol* (1997) 8: 1319-1323.
25. J. Beige, A. Weber, S. Engeli, G. Offermann, A. Distler, A.M. Sharma: Angiotensinogen-M235T genotype and post-transplant hypertension. *Nephrol Dial Transplant* (1996) 11: 1538-1541.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Die verwendete Literatur ist vollständig angegeben. Die vorliegende Arbeit wurde von mir selbst ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt und stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar.

Berlin, den 20. August 2001

Dipl.Biol. Stefan Engeli

Danksagung

Herrn Prof. A.M. Sharma danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, das große Vertrauen und die stete Unterstützung, die mir während der letzten Jahre zuteil wurden.

Der Sonnenfeld-Stiftung in Berlin danke ich für die finanzielle Unterstützung während des Jahres 1999.

Hervorheben unter den vielen hilfreichen Mitgliedern der Arbeitsgruppen von Prof. Sharma am Universitätsklinikum Benjamin Franklin und an der Franz-Volhard-Klinik und besonders herzlich danken möchte ich Kerstin Gorzelniak und Jürgen Janke, die durch ihre unverzichtbare Hilfe im Labor wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ich hoffe, ich konnte mich stets revanchieren.

Mein Dank gebührt ebenfalls Bärbel Girresch für die Hilfe bei der Bestimmung der Serum- und Plasmawerte und Monika Hantschke-Brüggemann für die Hilfe bei der Durchführung des klinischen Teils der vorliegenden Studie.

Bei der Ausarbeitung des Textes gaben mir Ute Heintze, Kerstin Gorzelniak und Jürgen Janke wertvolle Hinweise und Tips.

Meiner Familie danke ich für die freien Sonnabend- und Sonntagnachmittage, die ich zum Auswerten und Schreiben brauchte.

Nicht zuletzt danke ich allen Probanden, die sich im Vertrauen auf unsere Ernsthaftigkeit zur Studienteilnahme entschlossen. Ich hoffe, dieses Vertrauen nicht enttäuscht zu haben.