

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie an der
Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Schwaninger

**Die antiadipösen Effekte unter AT1-Rezeptorblockade korrelieren mit einer
spezifischen Veränderung des Darmmikrobioms**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

– Aus der Sektion Medizin –



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

vorgelegt von

Laura Beckmann, geb. Festas Rodrigues

aus Gütersloh

Lübeck 2020

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat Walter Raasch

2. Berichterstatterin/ Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jürgen Büning

Tag der mündlichen Prüfung: 01.12.2021

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 01.12.2021

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Für Ana Julie Beckmann

Inhalt	
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung und Fragestellung	1
1.1. Übergewicht und Adipositas	1
1.2. Leptin und Leptinresistenz.....	2
1.3. Diabetes mellitus Typ 2	3
1.4. Arterielle Hypertonie.....	3
1.5. Protektive metabolische Effekte der AT1-Blockade	4
1.6. Das Mikrobiom des Darms	7
1.7. Zusammenhang zwischen Darmmikrobiom und Übergewicht.....	8
1.8. Diätinduzierte Veränderungen des Darmmikrobioms.....	9
1.8.1. Einfluss des Darmmikrobioms auf Energieaufnahme und -ausbeute	11
1.8.2. Einfluss des Darmmikrobioms auf die Fettspeicherung	12
1.8.3. Verbindung zwischen diätinduzierter Adipositas und metabolischer Endotoxämie.....	13
1.8.4. Zusammenhang zwischen Darmmikrobiom und endogenem Cannabinoid- System	15
1.9. Darmmikrobiom als Basis und Angriffspunkt für therapeutische Interventionen.	17
1.10. Fragestellung	18
2. Material und Methoden.....	19
2.1. Studienprotokolle.....	19
2.1.1. Versuchstiere	19
2.1.2. Versuchsgruppen und Futterregime	20
2.1.3. Therapie durch orale Applikation von Telmisartan und Vehikel.....	21
2.1.4. Herstellung der Telmisartan- und Vehikel-Lösung	22
2.1.5. Herstellung der Insulin-Lösung	22
2.1.6. Subkutane Applikation von Insulin.....	22
2.1.7. Intraperitoneale Applikation von Pentobarbital.....	22
2.2. Blutabnahme und Stuhlprobengewinnung	23
2.2.1. Blutabnahme über eine Schwanzvene	23
2.2.2. Sammlung der Stuhlproben.....	23
2.3. Funktionstests	23
2.3.1. Unblutige Blutdruckmessung und Herzfrequenzbestimmung mittels Plethysmographie.....	23
2.3.2. Indirekte Kalorimetrie und Aktivität	24
2.3.3. Insulintoleranztest und Blutzuckerbestimmung.....	25
2.3.4. Bestimmung der subkutanen und viszeralen Fettmasse mittels MRT	26

2.3.5	Bestimmung von Körperlänge und Bauchumfang.....	26
2.4.	Tötung und Organgewinnung	27
2.4.1.	Dekapitationsverfahren und finale Blutgewinnung	27
2.4.2.	Organpräparation	27
2.5.	Laborchemische Analysen	27
2.5.1.	Bestimmung von Insulin und Glukagon durch Radioimmunoassay.....	27
2.5.2.	Bestimmung von Leptin durch Enzymimmunoassay.....	28
2.5.3.	Bestimmung des Lipidprofils.....	28
2.5.4.	Bestimmung von Peptiden und Adipokinen durch Multiplex-Assays.....	28
2.6.	Molekulargenetische Untersuchungen der Darmmikrobiom-Analyse	28
2.6.1.	DNA-Extraktion aus Rattenkot.....	29
2.6.2.	16S ribosomale RNA Polymerase-Chain-Reaction (PCR).....	30
2.6.3.	Die erste Gel-Elektrophorese und Subpooling.....	33
2.6.3.1.	Anfertigung des Gels für die Gel-Elektrophorese.....	33
2.6.3.2.	Aufreinigung der PCR-Produkte in der Gel-Elektrophorese	33
2.6.3.3.	Quantifikation der 450 bp DNA-Banden des PCR-Produktes.....	34
2.6.3.4.	Anfertigung der Subpools	34
2.6.4.	Die zweite Gel-Elektrophorese und Anfertigung der Library	34
2.6.4.1.	Aufreinigung der Subpools in der Gel-Elektrophorese	34
2.6.4.2.	DNA-Extraktion aus dem Subpool-Gel.....	35
2.6.4.3.	Quantifikation der 450 bp DNA-Banden der Subpools.....	35
2.6.5.	Aufreinigung der Library	36
2.6.6.	Quantifikation der Library via qPCR	36
2.6.7.	Sequenzierung.....	39
2.7.	Auswertung und Statistische Methoden.....	41
2.7.1.	Statistische Analysen der Phänotypisierung.....	41
2.7.2.	Prozessierung der Rohdaten der indirekten Kalorimetrie.....	42
2.7.3.	Bioinformatische Auswertung der Sequenzierungsdaten.....	43
2.7.4.	Statistische Analysen der DNA-Sequenzierungs-Ergebnisse	44
3.	Ergebnisse.....	48
3.1.	Ausbildung des Phänotyps	48
3.1.1.	Körpergewichtsentwicklung.....	48
3.1.2.	Futteraufnahme und Fressverhalten.....	49
3.1.3.	Subkutane und viszerale Fettmasse.....	50
3.1.4.	Energieverbrauch.....	51
3.1.5.	Aktivität	52

3.1.6.	Blutdruck und Herzfrequenz.....	53
3.1.7.	Glukose-, Insulin- und Glukagon-Spiegel	53
3.1.8.	Insulinsensitivität	54
3.1.9.	Leptinsensitivität.....	56
3.1.10.	Lipidprofil im Plasma	56
3.1.11.	Plasma-Spiegel der gastrointestinalen Peptide und Adipokine	57
3.2.	Ausprägung des Darmmikrobioms	58
3.2.1.	Phylogentische Analyse	58
3.2.2.	Firmicutes-Bacteroidetes-Ratio	60
3.2.3.	Enterotype like Analysis	61
3.2.4.	Alpha-Diversität.....	62
3.2.5.	Beta-Diversität.....	63
3.2.6.	BORAL.....	64
3.2.7.	Random Forest Algorithmus.....	65
3.2.8.	Differential Abundant Species	67
3.2.9.	“Co-occurrence Network” Analysis	68
4.	Diskussion	70
4.1.	Der Einfluss von Diät und Therapie auf die Körpergewichtsentwicklung, Energieaufnahme und die metabolischen Parameter	70
4.2.	Der Einfluss von Diät und Therapie auf das Darmmikrobiom.....	74
4.2.1.	Telmisartan beeinflusst spezifisch und nahrungsmittelunabhängig das Darmmikrobiom	75
4.2.2.	Mechanismen einer Telmisartan-spezifischen Regulation des Darm- mikrobioms.....	81
4.2.3.	Spekulationen über die Regulation der Energiehomöostase in Abhängig- keit eines TEL-spezifischen Darmmikrobioms	82
4.3.	Limitationen.....	86
4.4.	Ausblick.....	88
5.	Zusammenfassung.....	90
6.	Literaturverzeichnis	91
7.	Anlagen	104
7.1.	Anhang.....	104
7.2.	Abbildungsverzeichnis.....	106
7.3.	Tabellenverzeichnis.....	107
7.4.	Geräte	107
7.4.1.	Laborgeräte.....	107
7.4.2.	Waagen und Zentrifugen.....	108

7.4.3.	Geräte zur Blutdruckmessung und indirekten Kalorimetrie	108
7.4.4.	Geräte für RIA- und ELISA-Versuche	108
7.4.5.	Geräte für DNA-Extraktion.....	108
7.4.6.	Geräte für PCR und Gelelektrophorese.....	108
7.4.7.	Geräte für Subpool-Quantifikation	109
7.4.8.	Geräte für Ampurebead Purification der Library	109
7.4.9.	Geräte für qPCR und Sequenzierung.....	109
7.5.	Materialliste	109
7.5.1.	Gebrauchsmaterialien	109
7.5.2.	Kits.....	110
7.5.3.	Erworbene Reagenzien, Substanzen und Lösungen.....	110
7.5.4.	Rezepturen von Lösungen	111
7.6.	Software.....	111
8.	Danksagung.....	113
9.	Lebenslauf	115
10.	Publikationen.....	116

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent, Teile von Hundert	bzw.	beziehungsweise
®	„registered trade mark“	ca.	circa
°C	Grad Celsius	CART	„Cocaine- and amphetamine-regulated transcript“
ABC	„ATP-binding cassette“	CB1-Rezeptor	Cannabinoid-Rezeptor-Typ-1
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme	CB2-Rezeptor	Cannabinoid-Rezeptor-Typ-2
ACE-2	Angiotensin-Converting-Enzyme-2	CD	CD-gefütterte SD-Ratten, adipöse Kontrollgruppe
ACE-Hemmer	Angiotensin-Converting-Enzym-Inhibitoren	CD14	Glykoprotein CD14, „CD“ Cluster of differentiation
ADH	Antidiuretisches Hormon	Chow	Standarddiät
AG	Arbeitsgruppe	cm	Zentimeter
AgRP	„agouti-related-protein“	CO ₂	Kohlenstoffdioxid
AngI	Angiotensin I	CON	Chow-gefütterte SD-Ratten, normgewichtige Kontrollgruppe
AngII	Angiotensin II	CRP	C-reaktives Protein
Ang(1-7)	Angiotensin(1-7)	CSV	„Comma-separated values“
ANOVA	Analysis of variance	d	„day“, Tag
Aogen	Angiotensinogen	dest.	destilliert
ApoE	Apolipoprotein E	DESeq2	„Differential gene expression analysis based on the negative binomial distribution“
ARB	Ang-II-Rezeptor-Typ-AT1-Blocker	d.h.	das heißt
AT1-R	Typ-1-AngII-Rezeptoren	DICOM	„Digital Imaging and Communications in Medicine“
AT2-R	Typ-2-AngII-Rezeptoren	dl	Deziliter
ATP	Adenosintriphosphat	DMT2	Diabetes mellitus Typ 2
AUC	„Area under the curve“	DNA	Desoxyribonukleinsäure
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool“	dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
BMI	„Body-Mass-Index“	dsDNA	Doppelstrang-DNA
BORAL	„Bayesian Ordination and Regression Analysis of Multivariate Abundance Data“	eCB-System	endogenes Cannabinoid-System
bp	Basenpaar	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
bpm	„beats per minute“		
BZ	Blutzucker		

EE	„Energy Expenditure“, Energieverbrauch	IL-1 β	Interleukin-1 β
ELISA	„Enzym-linked-Immunsorbent- assay“	IL-5	Interleukin-5
ESC	European Society of Cardiology	IL-6	Interleukin-6
ESH	European Society of Hyperten- sion	IL-7	Interleukin-7
ET	Enterotyp	IL-10	Interleukin-10
et al.	„et alii, et aliae“, und andere	IL-12	Interleukin-12
F/B-Ratio	Firmicutes-Bacteroidetes-Ratio	IL-13	Interleukin-13
FMT	Fäkale Mikrobiom Transplanta- tion	IL-17A	Interleukin-17
FIAF	„fasting-induced-adipose-factor“	ITT	Insulintoleranztest
g	Erdbeschleunigung (Zentrifuge)	KC	Keratinocyten-Chemoattraktant
g	Gramm	kcal	Kilokalorien
GIP	Glukose-abhängiges insulinotro- pes Polypeptid	kg	Kilogramm
GLP-1	Glukagon-like Peptid 1	KG	Körpergewicht
GLP-2	Glukagon-like Peptid 2	kJ	Kilojoule
GLUT4	Glukosetransporter Typ 4	k.o.	„knock out“
G-Protein	Guanin-Nukleotid bindendes- Protein	l	Liter
GPCR	G-Protein-gekoppelter-Rezeptor	LDL	„Low Density Lipoprotein“
h	„hour“, Stunde	LIED	Lübecker Institut für Experimen- telle Dermatologie
H ₂ O	Wasser	LIX	Lipopolysaccharid-induziertes CXC-Chemokin
HBMECs	„Human brain microvascular endothelial cells“	LPL	Lipoproteinlipase
HDL	„High Density Lipoprotein“	LPS	Lipopolysaccharide
HF	Herzfrequenz	Lsg.	Lösung
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen- Nebennieren-Achse	mA	Milliampère
HWZ	Halbwertszeit	MCT	Monocarboxylat-Transproter
ID	„Identifizier“	MCT-1	Monocarboxylat-Transproter 1
I.E.	Internationale Einheiten	mg	Milligramm
i.p.	intraperitoneal	MID	Barcode der Primer; „Molecular Identifier“
IL-1 α	Interleukin-1 α	min	Minute
		mind.	mindestens
		MJ	Megajoule
		ml	Milliliter

mm	Millimeter	POMC	Proopiomelanocortin
mM	Millimolar	PNS	Parasympathisches Nervensystem
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule	PP	Pankreas-Polypeptid
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure	PPAR-gamma	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma
MRT	Magnetresonanztomographie	pM	Pikomolar
ms	Millisekunde(n)	p.o.	per os
MW	Mittelwert	PRRs	„Pattern Recognition Receptors“, Mustererkennungszepatoren
n	Anzahl der Stichproben	PYY	Peptid-Tyrosin-Tyrosin
ng	Nanogramm	P/B-Ratio	Prevotella-Bacteriodes-Ratio
nM	Nanomolar	qPCR	quantitative PCR
n.s.	nicht signifikant	RAS	Renin-Angiotensin-System
N ₂ O	Lachgas	RER	„respiratory exchange rate“, Respiratorische Austauschrate
NaCl	Natriumchlorid	RIA	„Radioimmunoassay“
NaOH	Natriumhydroxid	RNA	Ribonukleinsäure
NCBI	National Center for Biotechnology Information	RR	Blutdruck
Ncl.	Nucleus	rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
nm	Nanometer	rpm	„revolutions per minute“, Umdrehungen pro Minute“
NPY	Neuropeptid Y	s	Sekunde(n)
O ₂	Sauerstoff	s.	siehe
Ob	„Obese gen“	s.c.	subkutan
Ob-Rb	Lange Form des transmembranösen Leptin-Rezeptors	s.o.	siehe oben
Occ	Occludin, „tight junction“ Protein	SCFAs	short-chain-fatty-acids (kurzkettige Fettsäuren)
OGTT	Oraler Glukosetoleranztest	SD	Sprague Dawley
OTU	„Operational taxonomic unit“	SD	Standardabweichung (Statistik)
p	Irrtumswahrscheinlichkeit	SEM	Standardfehler
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Typ-1	SHR	spontan hypertensive Ratten
PCR	„Polymerase Chain Reaction“	SNS	sympathisches Nervensystem
PCoA	„Principal Coordinates Analysis“	SPC	„Single-Pill-Combination“
PF	„pair-feed“-gefütterte SD-Ratten, Versuchsgruppe 2	spp.	Spezies
pH	potentia hydrogenii		

TEL	Telmisartan-therapierte SD-Ratten, Versuchsgruppe 1	u.a.	unter anderem, unter anderen
		V	Volt
TGR	Transgene Ratte	v.a.	vor allem
TGR(AsrAOPEN)	Transgene Ratte mit zentralem Angiotensinogen-Defizit	vs.	versus
TLR	„Toll-like“ Rezeptor	W	Watt
TLR4	„Toll-like“ Rezeptor Typ 4	WHO	World Health Organization
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α	ZO-1	Zonulin-1, „tight junction“ Protein
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan	Δ	Differenz; „delta“
U/min	Umdrehungen in der Minute	μ g	Mikrogramm
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein	μ l	Mikroliter
		μ m	Mikrometer
UV	Ultraviolettstrahlung		

1. Einleitung und Fragestellung

In der hier vorliegenden Dissertation soll der mögliche mechanistische Zusammenhang zwischen einer antiadipös wirksamen Therapie mit dem Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-AT1-Blocker (ARB) Telmisartan und der mikrobiellen Besiedlung des Darms in Ratten unter hochkalorischer Nahrung untersucht werden. Dazu soll einleitend zunächst ein kurzer Umriss der zentralen Gesundheitsprobleme unserer Gesellschaft und der aktuelle Stand der Forschung zu den protektiven-ARB-Effekten (über die Antihypertension hinausgehend) beschrieben werden. Weitergehend erfolgt der Abriss über die relevantesten Erkenntnisse der Mikrobiom-Forschung der vergangenen Jahre im Hinblick auf diätinduzierte Veränderungen und des kausalen Beitrags des Mikrobioms zu Übergewicht und dem metabolischen Syndrom.

1.1. Übergewicht und Adipositas

Die Prävalenz von Übergewicht und Adipositas hat weltweit zugenommen und bereits im Jahr 2000 wurde die Adipositas von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als eigenständige Erkrankung klassifiziert (World Health Organization, 2000). 2016 waren weltweit mehr als 1,9 Milliarden der erwachsenen Menschen (>18 Lebensjahre) übergewichtig, hatten also einen Body-Mass-Index (BMI) von $\geq 25 \text{ kg/m}^2$, und mehr als 650 Millionen von diesen waren adipös, bedeutet der BMI war $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ (World Health Organization, 2020). Für Deutschland zeigen die Daten der Studie „Gesundheit in Deutschland aktuell“ (GEDA 2014/2015-EHIS), dass 54% der Erwachsenen von Übergewicht und Adipositas betroffen sind mit zunehmender Prävalenz seit 2010 (Mensink et al., 2013).

Die Ursachen der Entstehung einer Adipositas sind vielfältig: eine Rolle spielender Faktoren sind dabei die Genetik, die zu geringe körperliche Aktivität und Bewegung, sowie die schlechte Ernährung und andere ungesunde Verhaltensweisen (Jayasinghe et al., 2016) - zusammengefasst also das Ungleichgewicht von Energieaufnahme und -verbrauch. Das Gleichgewicht der Energiehomöostase ist wichtig für Gesundheit und Überleben (Woods, 1998). Denn eine langfristig positive Energiebilanz induziert nicht nur die Fettleibigkeit selbst, sondern ist ein entscheidender Risikofaktor für Diabetes mellitus Typ 2, Bluthochdruck, Schlaganfall, Leber- und verschiedene Krebserkrankungen (Dustan, 1983; Hubert et al., 1983; Must, 1999; Vona-Davis et al., 2007). Insbesondere die viszerale Fettmasse wird stark mit einem ungünstigen metabolischen Risikoprofil in Verbindung gebracht (Fox et al., 2007).

Die Adipositas ist charakterisiert durch eine Zunahme des Fettgewebes, die hauptsächlich aus einer Vergrößerung der Adipozyten resultiert (Hirsch und Batchelor, 1976). Außerdem

kommt es zu einer Zunahme der Makrophagen im Fettgewebe (Weisberg et al., 2003). Die aus dem Fettgewebe sezernierten proinflammatorischen Moleküle, die sogenannten Adipokine, sind an der Entwicklung eines chronisch niedrig-gradigen Entzündungszustandes beteiligt, der für die Pathogenese der metabolischen und kardiovaskulären Komplikationen der Adipositas verantwortlich gemacht wird (Hauner, 2005; Trayhurn und Wood, 2004; Weisberg et al., 2003). Adipöse Personen zeigen eine Erhöhung des zirkulierenden Entzündungsmarkers C-reaktives Protein (CRP), der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) (Juhan-Vague et al., 1987; Kern et al., 2001; Visser, 1999) sowie prokoagulatorischer Proteine wie Plasminogenaktivator-Inhibitor-Typ-1 (PAI-1) (Samad et al., 1996). Außerdem wirkt das von den Adipozyten sezernierte Hormon Leptin als ein Zytokin, das eine proinflammatorische Immunantwort auslöst (Loffreda et al., 1998).

1.2. Leptin und Leptinresistenz

Das Proteohormon Leptin ist ein Schlüsselhormon zur langfristigen Steuerung der Energiebilanz (Klok et al, 2007). Dabei erfüllt Leptin seine physiologische Funktion darin, dass es ausgeschüttet vom Fettgewebe im Verhältnis zur Fettgewebemasse (Friedman, 2011) bei hohen Serumspiegeln auf zentraler Ebene den Appetit zügelt und den Energieverbrauch erhöht (Morris und Rui, 2009). Die anorexigenen Wirkungen von Leptin werden durch die lange Form des Leptin-Rezeptors (Ob-Rb-Rezeptor) im Hypothalamus vermittelt (Morris und Rui, 2009). In Kerngebieten des Nucleus arcuatus wird durch Leptin die Produktion der appetitstimulierenden Neuropeptide AgRP (agouti-related protein) und NPY (Neuropeptid Y) unterdrückt und im Nucleus paraventricularis die der Appetitzügler POMC (Proopiomelanocortin) und CART (Kokain- und Amphetamin-reguliertes Transkript) stimuliert. Die Erhöhung des Energieverbrauchs wird durch die Sympathikus-Aktivierung erreicht, welche zu Blutdruck- und Herzfrequenzerhöhung sowie zur gesteigerten Thermogenese mittels Entkopplung der Zellatmung von der ATP-Synthese führt (Correia und Rahmouni, 2006; Margetic et al., 2002). Neben seinen zentralen Wirkungen wurden in den letzten Jahren zahlreiche periphere Effekte des Leptins entdeckt. So moduliert Leptin das Immunsystem sowie den Schweregrad der Sepsis (Lam und Lu, 2007; Shapiro et al., 2010), und nimmt Einfluss auf Knochenstoffwechsel, Reproduktion und Depressionen (Blüher und Mantzoros, 2007; Karsenty, 2006; Lu, 2007).

Die Leptinresistenz bezeichnet eine verminderte Fähigkeit des zirkulierenden Leptin, den Appetit und die Gewichtszunahme zu unterdrücken und den Energieverbrauch zu steigern. Da sich im Plasma adipöser Personen erhöhte Leptin-Spiegel beobachten lassen, die sich jedoch im Liquor nicht zeigen, liegt vermutlich eine Beeinträchtigung des Transports über

die Blut-Hirn-Schranke zugrunde (Caro et al., 1996). Diese Annahme wird unterstützt durch Untersuchungen an Mäusen, die auf zentral verabreichtes (über intrazerebro-ventrikuläre Injektionen) nicht aber auf peripher verabreichtes Leptin (über subkutane oder intraperitoneale Injektionen) reagieren (Halaas et al., 1997; Van Heek et al., 1997). Zusätzlich resultiert die Leptinresistenz wahrscheinlich aus Störungen des Leptin-Signalweges und/oder den nachgeschalteten neuronalen Verbindungen im Hypothalamus (Morris und Rui, 2009).

1.3. Diabetes mellitus Typ 2

Der Diabetes mellitus Typ 2 (DMT2) ist die häufigste Form der metabolischen Erkrankungen, deren gemeinsames Kennzeichen die Hyperglykämie ist. Neben einer starken genetischen Komponente ist der DMT2 hauptsächlich mit der Überernährung in den Wohlstandsgesellschaften assoziiert. Im Jahr 2017 sollen ca. 60 Millionen der erwachsenen Europäer an DMT2 erkrankt sein, wobei die Hälfte davon nicht diagnostiziert ist (Consentino et al, 2020) und man geht davon aus, dass 2045 >600 Millionen Menschen weltweit einen DMT2 entwickeln werden und in derselben hohen Anzahl einen Prä-Diabetes (*IDF DIABETES ATLAS Eighth edition 2017*, 2017). Die Diagnosestellung erfolgt bei einem HbA1c-Wert $\geq 6,5\%$, einer Nüchtern-Plasmaglukose von ≥ 126 mg/dl oder einer 2-Stunden-Plasmaglukose im oralen Glukosetoleranztest (OGTT) von ≥ 200 mg/dl, von einem Prä-Diabetes oder gestörter Glukose-Toleranz spricht man bei einem HbA1c-Wert von 5,7-6,4%, einer Nüchtern-Plasmaglukose von 100-125 mg/dl oder einer 2-Stunden-Plasmaglukose im oralen Glukosetoleranztest (OGTT) von 140-199 mg/dl (American Diabetes Association, 2019). Der DMT2 bleibt häufig über viele Jahre klinisch inapparent, führt aber durch die pathologische Stoffwechsellage über Mikro- und Makroangiopathien zu schwerwiegenden Organschädigungen insbesondere von Herz, Kreislauf, Nieren, Augen und Nervensystem. Darüber hinaus liegt bei mehr als 60% der Typ 2 Diabetiker eine arterielle Hypertonie vor (Nathan et al., 2013), wodurch sich das kardiovaskuläre Risiko weiter erhöht.

1.4. Arterielle Hypertonie

Die arterielle Hypertonie ist eine sehr weit verbreitete Erkrankung, die, wenn sie nicht oder nur unzureichend behandelt wird, zu Komplikationen wie Herzinfarkt und Schlaganfall, Nierenversagen und schließlich zum vorzeitigen Tod führen kann. Systolische Blutdruckwerte ≥ 140 mmHg und/oder diastolische Werte ≥ 90 mmHg definieren die arterielle Hypertonie (Williams et al., 2018). Die Prävalenz ist hoch, über die Hälfte aller >50-Jährigen in Deutschland sind von Bluthochdruck betroffen, weltweit waren im Jahr 2015 ca. 1,13 Milliarden Menschen erkrankt (NCD-RisC, 2017). Die arterielle Hypertonie war 2015 weltweit führende Ursache für ca. 10 Millionen vorzeitige Todesfälle (NCD-RisC, 2017) und es gibt zahlreiche

Belege dafür, dass eine Senkung des Blutdrucks die vorzeitige Morbidität und Mortalität erheblich reduzieren kann (Williams et al., 2018). Häufig tritt die arterielle Hypertonie in Kombination mit anderen kardiovaskulären Risikofaktoren wie Übergewicht, Glukoseintoleranz und DMT2 sowie Dyslipidämien auf – auch bekannt als metabolisches Syndrom – wobei das Cluster dieser metabolischen Einschränkungen einen multiplikativen Effekt auf das gesamte kardiovaskuläre Risiko hat (Berry et al., 2012).

1.5. Protektive metabolische Effekte der AT1-Blockade

In der Behandlung der arteriellen Hypertonie werden vorrangig Angiotensin-Converting-Enzyme-Inhibitoren (ACE-Hemmer) oder ARB als Basistherapiestrategie eingesetzt. In der ESC/ESH-Leitlinie wird seit 2018 empfohlen, die „Single-Pill-Combination“ (SPC) aus ACE-Hemmer/ ARB und Kalziumkanalblocker oder Thiazid-artigem Diuretikum als einleitende Pharmakotherapie zu verwenden. ACE-Hemmer oder ARBs sollten dabei bei DMT2 bevorzugt werden, sind außerdem indiziert bei der Therapie der chronischen Herzinsuffizienz sowie als Sekundärprophylaxe bei Myokardinfarkt. Zur Verdeutlichung des großen Stellenwertes des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) in der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen soll dieses im Folgenden vorgestellt sowie die protektiven metabolischen Effekte einer Blockade dieser Hormonkaskade erläutert werden.

Zieleffekt des RAS ist die Aufrechterhaltung der glomerulären Filtrationsrate in der Niere und die Erhöhung des arteriellen Blutdrucks. Zu Beginn der Hormonkaskade steht dabei die Protease Renin, die synthetisiert in Zellen des juxtaglomerulären Apparates ausgeschüttet wird bei Abfall des Blutdrucks unter den myogenen Autoregulationsbereich, sowie bei Sympathikusaktivierung, Hypovolämie, Hyponatriämie oder hypotonem Harn. Renin spaltet das v.a. aus der Leber stammende Glykoprotein Angiotensinogen zu Angiotensin I (AngI). Durch das Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE), welches hauptsächlich von Endothelzellen der Lunge synthetisiert wird, wird schließlich das Octapeptid Angiotensin-II (AngII) abgespalten, das via Angiotensin-II-Rezeptoren an verschiedenen Zielorganen wirkt (Abbildung 1).

Bei den G-Protein-gekoppelten Angiotensin-II-Rezeptoren werden zwei Subtypen unterschieden (Abbildung 1), die Typ-1-Angiotensin-II-Rezeptoren (AT1-R) und Typ-2-Angiotensin-II-Rezeptoren (AT2-R). Die Aktivierung der AT1-R führt peripher über die Vasokonstriktion, zentral über eine erhöhte Ausschüttung des Antidiuretischen Hormons (ADH), gesteigerten Salzappetit und Durstempfinden sowie renal über eine vermehrte Natriumresorption im proximalen Tubulus mit zunehmender Rückresorption von Wasser schließlich zu einer Steigerung des zirkulierenden Blutvolumens und des herrschenden Blutdrucks. Außerdem

wird AT1-R-abhängig in der Nebenniere die Aldosteron-Synthese stimuliert, so dass indirekt über Ang-II via Aldosteron die Natrium- und Wasserretention sowie Kalium- und Wasserstoffionen-Sekretion im distalen Tubulus und Sammelrohr gesteigert wird. Weitere typische AT1-R-vermittelte Effekte sind die Förderung des Zellwachstums und kardiovaskuläres Remodelling.

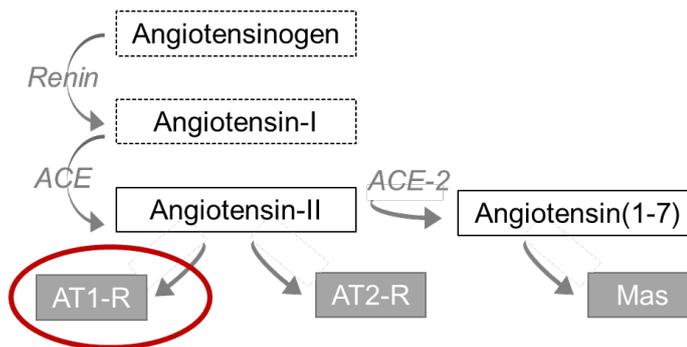
Das RAS steht weitergehend in einem kausalen Zusammenhang mit der Adipositas-assoziierten Hypertonie (Engeli et al., 2005a; Engeli et al., 2003), sowie der verminderten Insulinsensitivität (de Kloet et al., 2010). In den letzten Jahren vermehrten sich die Hinweise, dass eine AT1-Blockade neben der antihypertensiven Wirkung auch metabolische Vorteile aufweist, was für einen Patienten mit metabolischem Syndrom sehr günstig sein könnte. Die effektive antihypertensive Therapie mit einem ARB konnte bspw. in klinischen Studien ein Neuauftreten von DMT2 verhindern (Grassi et al., 2003; Niklason et al., 2004). Die Arbeitsgruppe (AG) Raasch konnte zeigen, dass ARBs zu einer Verminderung von Gewichtszunahme, abdominellem Fettgewebe, Energieaufnahme, Größe der Adipozyten und Plasma-Leptin bei Ratten und Mäusen mit diätinduzierter Adipositas führen (Dapper et al., 2019; Miesel et al., 2012; Müller-Fielitz et al., 2012; Schuster et al., 2018). Diese Wirkung ist unabhängig des antihypertensiven Effekts, tritt nur nach hohen Dosen auf, ist ein Klasseeffekt und ist abhängig von einem intakten Leptin-Signalweg (Müller-Fielitz et al., 2014, 2012, 2011; Schuster et al., 2018). Die untersuchten zugrunde liegenden Mechanismen weisen darauf hin, dass sowohl periphere als auch zentrale Effekte der ARB-Therapie in Frage kommen (Abbildung 1), jedoch blieb bis zuletzt unklar, ob schließlich die verminderte Energieaufnahme unter ARB-Therapie zum metabolischen Vorteil führt oder Telmisartan selbst diese Effekte hervorrufen kann.

Auf der einen Seite deuten sich zentrale Mechanismen für die antiadipöse Wirksamkeit der AT1-Blockade an. Denn Untersuchungen an transgenen Ratten TGR(AsrAOGEN), die ein zentrales Angiotensinogen- und demzufolge auch AngII-Defizit bei normalen peripheren AngII-Spiegeln aufweisen, zeigen, dass diese Tiere sowohl unter Chow- als auch Cafeteria-Diät leichter sind als die Kontrolltiere, eine verringerte Energieaufnahme und höheren Energieverbrauch, eine verbesserte Glukosekontrolle sowie auch erhöhte mRNA-Spiegel von POMC haben (Winkler et al., 2016). Unterstrichen wird die Annahme der zentralen Wirkung dadurch, dass Telmisartan bei den TGR(AsrAOGEN) weniger Einfluss auf die Gewichtsregulierung hat (Winkler et al., 2016) und die intracerebro-ventrikuläre-Infusion von AngII eine weitere Gewichtszunahme vollständig aufheben kann (Winkler et al., 2018). Außerdem ist unter Telmisartan ein entzündungshemmender Effekt im Hypothalamus und eine verminderte Lipidakkumulation unter hochkalorischer Ernährung in Mäusen zu beobachten, wodurch eine zentrale Leptinresistenz verhindert wird (Rawish et al., 2020). Darüber hinaus

ist Telmisartan nur antiadipös wirksam bei intaktem Leptin-Signal (Müller-Fielitz et al., 2011), führt zum Erhalt der Leptinsensitivität unter Cafeteria-Diät (Müller-Fielitz et al., 2015), bewahrt den Leptintransport und verhindert dadurch eine Leptinresistenz, ohne jedoch direkt die Penetration über die Blut-Hirn-Schranke zu beeinflussen (Schuster et al., 2018).

Andererseits lassen sich periphere Mechanismen nicht ausschließen, da auch in TGR(AsrAOGEN) ein gewisser Effekt auf die Körpergewichtszunahme zu beobachten ist (Winkler et al., 2016). Dabei kann den Eigenschaften der ARBs zur Verminderung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achsen-Aktivität zur Reduzierung einer stressinduziert erhöhten Energieaufnahme nur eine geringe Gewichtung beigemessen werden (Gustaityte et al., 2019). Ebenso kann eine durch Telmisartan hervorgerufene Verbesserung der Insulinempfindlichkeit und Glukoseutilisation der Adipozyten über die Aktivierung des Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPAR-gamma) exkludiert werden (Müller-Fielitz et al., 2012; Schuster et al., 2018). Die Aktivierung von PPAR-gamma als zytosolischem Steroidrezeptor in Adipozyten, der als Transkriptionsfaktor die Transkription des Glukosetransporter 4 (GLUT4) steigert, wirkt sich positiv auf den Glukosestoffwechsel der Zellen aus. Zudem mehren sich Belege für einen Ang(1-7)-abhängigen Mechanismus, da unter AT1-Blockade neben AngII auch erhöhte Spiegel von Ang(1-7) vorliegen (Igase et al., 2005; Ishiyama et al., 2004; Müller-Fielitz et al., 2014, 2012). Ang(1-7) wird u.a. abgespalten von AngII durch das Angiotensin-Converting-Enzym 2 (ACE-2), wirkt über den G-Protein-gekoppelten-Rezeptor (GPCR) Mas (Santos et al., 2013; Abbildung 1) und hat günstige metabolische Effekte auf Insulinsensitivität und Glukoseverwertung sowie Triglyceride und Fette (Santos et al., 2010). Untersuchungen der AG Raasch an transgenen Ratten mit überexprimierten Ang(1-7) und Mas-knock-out Mäusen bestätigen einen Zusammenhang zwischen der antiadipösen-Wirksamkeit von Telmisartan und Ang(1-7) (Dapper et al., 2019; Schuchard et al., 2015).

Die vorangegangenen Untersuchungen zu den protektiven metabolischen Effekten der AT1-Blockade lieferten folglich Belege für mindestens 3 mechanistische Zusammenhänge (Abbildung 1). Letztlich bleibt die Frage nach weiteren Mechanismen offen, da bisher auch nicht untersucht wurde, ob der Telmisartan-Effekt als Konsequenz der verhinderten Energieaufnahme und Körpergewichtszunahme auftritt oder unabhängig davon ist. In Anbetracht der im folgenden Abschnitt geschilderten Erkenntnisse des Zusammenhangs zwischen Übergewicht und Veränderungen im Darmmikrobiom rückt die Frage in den Fokus, ob die metabolischen Vorteile einer Telmisartan-Therapie unter hochkalorischer Ernährung auch auf einen Mikrobiom-assoziierten Mechanismus zurück zu führen sind.



AT1-Blockade

Protective metabolic effects

- antiadipös
- Energieaufnahme ↓
- Insulinsensitivität ↑
- Leptinresistenz ↓

→ Voraussetzung

- hohe Dosierung
- Klasseneffekt der Sartane
- unabhängig von Blutdrucksenkung
- in Nagern und Menschen gezeigt

Untersuchte Mechanismen

Bestätigt

- Angiotensin(1-7)
- Leptinabhängigkeit
- zentrale Effekte

Fraglich

- PPAR-gamma-Aktivierung
- HPA-Aktivierung

Abbildung 1: Schematische Darstellung des RAS und der protektiven Effekte der AT1-Blockade sowie der Vorleistungen der AG-Raasch hinsichtlich der mechanistischen Zusammenhänge.

1.6. Das Mikrobiom des Darms

Der menschliche Darm ist von zahlreichen Mikroorganismen besiedelt, deren große Mehrheit Bakterien ausmachen. Das Darmmikrobiom, womit das kollektive Genom aller Darmbakterien gemeint ist, kodiert 3,3 Millionen nicht-redundante Gene und ist damit 150-mal größer als das gesamte menschliche Genom (Qin et al., 2010). Neuere Ergebnisse der überregionalen Kartierung der Darmmikrobiota von Menschen in Industrieländern zeigen, dass das Mikrobiom 500-fach mehr Gene enthält als das menschliche Genom (Li et al., 2014). Die physiologische Besiedlung des Darms mit all diesen Mikrobiota bietet dem Wirt Mensch u.a. den Schutz vor enteropathogenen Mikroorganismen (Candela et al., 2008; Fukuda et al., 2011), einen Beitrag zur normalen Immunfunktion (Olszak et al., 2012) sowie die Energiegewinnung aus nicht verdaulichen Kohlenhydraten (Sonnenburg, 2005; Cockburn und Koropatkin, 2016). Des Weiteren schützen die kommensalen Mikrobiota die Darmepithelien vor Schädigung (Rakoff-Nahoum et al., 2004) und greifen in die Regulation der Fettspeicherung und Energieausbeute der zugeführten Nahrung des Wirts ein (Bäckhed et al., 2004). Weitere Funktionen sind die Synthese von Vitaminen, Abbau von Chemikalien, Förderung der Angiogenese und Entwicklung des Immunsystems (Holmes et al., 2011). Darüber hinaus findet ein Austausch von Metaboliten zwischen Mikrobiota und Wirt statt und die Signalwegen des Wirts für den Metabolismus von Gallen-, Fett und Ami-

nosäuren werden nicht nur beeinflusst, sondern auch auf Ebene der Genexpression moduliert (Claus et al., 2008; Martin et al., 2007; Velagapudi et al., 2010; Wikoff et al., 2009). In der Literatur werden die Begriffe Mikrobiom und Mikrobiota häufig simultan verwendet, wobei mit Mikrobiota eher die mikrobiellen Spezies selbst gemeint sind und das Mikrobiom als mikrobielles Genrepertoire gesehen wird (Le Chatelier et al., 2013). Im Folgenden wird in dieser Dissertationsschrift zugunsten der Verständlichkeit nur der Begriff Mikrobiom verwendet.

Die Zusammensetzung des Darmmikrobioms in den Arten und ihrer Abundanz ist für jede Person einzigartig und besteht aus den Phyla Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia und Fusobacteria (Lozupone et al., 2012; Zoetendal et al., 1998; Zhang et al., 2009). Die beiden am häufigsten darunter vorkommenden sind Firmicutes (gram-positiv, Abundanz ca. 60-80%) und Bacteroidetes (gram-negativ, zwischen 20-40%) (Stephens et al., 2018). Auf Genus-Ebene finden sich im Darmmikrobiom hauptsächlich obligate Anaerobier der Gattungen Bacteroides, Eubacterium, Clostridium, Ruminococcus, Peptococcus, Peptostreptococcus, Bifidobacterium und Fusobacterium sowie in niedrigeren Abundanzen fakultative Anaerobier der Gattungen Escherichia, Enterobacter, Enterococcus, Klebsiella, Lactobacillus und Proteus (Moore und Holdeman, 1974; Suau et al., 1999). Aufgrund kulturbasierter Studien wurde angenommen, dass alle gesunden Erwachsenen die meisten Spezies von Darmbakterien gemeinsam haben, was der Theorie der „core microbiota“ entspricht (Lozupone et al., 2012). Ein umfangreicher Katalog der funktionellen Kapazität des menschlichen Darmmikrobioms identifizierte das Vorhandensein länderspezifischer mikrobieller Signaturen, was darauf hindeutet, dass die Zusammensetzung des Darmmikrobioms durch Umweltfaktoren wie die Ernährung und möglicherweise auch durch die Genetik des Wirts beeinflusst wird (Li et al., 2014). Zum weiteren Verständnis soll an dieser Stelle festgehalten werden, dass die Artenzusammensetzung interindividuell sehr variabel sein kann und das Mikrobiom, das eher einem funktionellen Genprofil entspricht, bei gesunden Individuen Ähnlichkeiten aufweist (Qin et al., 2010; Turnbaugh et al., 2009). Bei verschiedener Zusammensetzung der mikrobiellen Spezies, können diese ein gewisses Maß an funktioneller Redundanz teilen, was zu ähnlichen Protein- oder Metabolitenprofilen führt (Thursby und Juge, 2017). Diese Informationen sind für die Entwicklung therapeutischer Strategien zur Veränderung und Gestaltung der mikrobiellen Gemeinschaft bei Krankheiten von entscheidender Bedeutung (Thursby und Juge, 2017).

1.7. Zusammenhang zwischen Darmmikrobiom und Übergewicht

In den letzten Jahren konnte überzeugend bewiesen werden, dass das Darmmikrobiom in

Zusammenhang mit Ernährung und Übergewicht charakteristischen Veränderungen unterliegt mit Auswirkungen auf die Entwicklung einer Insulinresistenz, Hyperlipidämie und einem gesteigerten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (Cotillard et al., 2013; Le Chatelier et al., 2013; Tang et al., 2013). Inwieweit das Darmmikrobiom als Mediator der Auswirkungen der Ernährung auf den Stoffwechselstatus des Wirts fungiert oder welche kausale Beziehungen zu Grunde liegen, ist Gegenstand weltweiter Studien an Tiermodellen oder Menschen, insbesondere im Interesse von therapeutischen Interventionsmöglichkeiten für die größten gesundheitlichen Herausforderungen der westlichen Welt, die mit Überernährung und Bewegungsmangel in Zusammenhang stehen (s.o.).

Einen Meilenstein der Mikrobiomforschung bilden die Untersuchungen von Bäckhed und Kollegen, die in keimfreien Mäusen nicht nur weniger Gewichtszunahme trotz erhöhter Energieaufnahme belegen, sondern darüber hinaus auch eine verbesserte Glukosetoleranz und Insulinsensitivität im Vergleich zu den herkömmlich mit Bakterien besiedelten Artgenossen (Bäckhed et al., 2004). Auch Rabot et al. konnten beobachten, dass keimfreie Mäuse vor einer diätinduzierten Adipositas unter hochkalorischer Ernährung geschützt sind (Rabot et al., 2016). Turnbaugh et al. konnten erstmalig nachweisen, dass das veränderte Darmmikrobiom genetisch übergewichtiger Mäuse nach Stuhl-Transplantation in schlanken Tieren die Entwicklung einer Adipositas bewirkt (Turnbaugh et al., 2006). Das Darmmikrobiom steht also nicht nur in enger Verbundenheit zum Metabolismus des Wirts, sondern trägt zur Übergewichtsentwicklung selbst bei. Die Übertragbarkeit dieser Erkenntnisse vom Tiermodell zum Menschen wurde dadurch erwiesen, dass ein fäkaler Mikrobiom-Transfer von übergewichtigen Menschen in Mäusen zu einem übergewichtigen bis hin zu adipösen Phänotyp geführt hat (Ridaura et al., 2013).

Zahlreiche Studien sollen der Beantwortung der Frage dienen, welchen Veränderungen das Darmmikrobiom diätabhängig unterliegt und über welche Mechanismen der Wirts-Metabolismus beeinflusst wird. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick der Erkenntnisse erfolgen, die elementar für das Thema dieser Dissertationsschrift sind.

1.8. Diätinduzierte Veränderungen des Darmmikrobioms

Das Darmmikrobiom unterliegt in Zusammenhang mit Übergewicht bestimmten Veränderungen, die mit einer geringeren bakteriellen Diversität einhergehen (Turnbaugh et al., 2009). Menschen mit einem geringerem Bakterienreichtum neigen eher zu Adipositas, Insulinresistenz und Dyslipidämie (Le Chatelier et al., 2013). Andererseits wird von denselben Arbeitsgruppen herausgestellt, dass eine verbesserte metabolische Gesundheit assoziiert ist mit einem relativ hohen Mikrobiom-Gehalt und mit einer erhöhten mikrobiellen Diversität (Cotillard et al., 2013; Le Chatelier et al., 2013; Turnbaugh et al., 2009). Auf der Suche

nach mikrobiologischen Prädiktoren für ein Übergewicht-begünstigendes Darmmikrobiom wird das Verhältnis der Phyla Firmicutes und Bacteroidetes (F/B-Ratio) diskutiert, da nicht nur im Darmmikrobiom adipöser Menschen anteilig weniger Bacteroidetes zugunsten der Firmicutes nachweisbar sind (Ley et al., 2006; Zhang et al., 2009), sondern auch in genetisch veränderten übergewichtigen Mausstämmen – C57BL/6J-Mäuse, die homozygot für eine Mutation im Leptin Gen sind – ist die Adipositas verbunden mit einer Zunahme der Firmicutes-Abundanz und entsprechender Abnahme der Bacteroidetes-Abundanz (Ley et al., 2005). Andererseits zeigen Schwartz et al. in Untersuchungen an 98 Menschen, von denen 30 normalgewichtig, 35 übergewichtig und 33 adipös sind, das genaue Gegenteil: die F/B-Ratio ist in den übergewichtigen und adipösen Studienteilnehmern zugunsten der Bacteroidetes verändert (Schwartz et al., 2010). Ein weiterer Befund ist die Zunahme von Actinobacteria-Spezies in übergewichtigen Personen (Turnbaugh et al., 2009) und bei Patienten mit Adipositas lässt sich ein signifikant höherer Gehalt an Lactobacillus-Arten (Phylum Firmicutes) im Vergleich zu schlanken Personen feststellen (Armougom et al., 2009). Neuere Untersuchungen identifizieren das Verhältnis von Prevotella zu Bacteroides (P/B-Ratio) als prognostischen Marker für einen einfacheren Gewichtsverlust bei Menschen (Hjorth et al., 2018). Außerdem kann in Ratten unter hoch-zuckerhaltiger Diät eine Verbindung von vermehrter Leberfettablagerung und erhöhter Clostridien-Abundanz beobachtet werden, insbesondere bei den Familien Ruminococcaceae und Lachnospiraceae, die assoziiert sind mit Fettansammlung (Sen et al., 2017).

Neben den beschriebenen Veränderungen der Abundanzen lässt sich weitergehend befunden, dass eine Zunahme von bekannten oder potentiell opportunistischen Erregern in Verbindung mit Übergewicht und DMT2 steht. So lässt sich sowohl im Darmmikrobiom schwangerer Frauen mit Adipositas eine Erhöhung von Staphylococcus aureus - einer pathogenen Firmicutes-Spezies - feststellen (Collado et al., 2008), als auch bei Kindern, die während der Kindheit übergewichtig werden (Kalliomäki et al., 2008). Fei und Zhao zeigen in einer Studie an krankhaft adipösen Probanden mit einem durchschnittlichen BMI von 58,8 kg/m² und DMT2, dass Enterobacter, eine Gattung opportunistischer Endotoxinbildender (Sanders und Sanders, 1997), einen Anteil von 35% der Darmbakterien ausmacht (Fei und Zhao, 2013). Als weiteres Beispiel lässt sich anführen, dass erhöhte Abundanzen von Bacteroides caccae, Clostridium hathewayi, Clostridium ramosum, Clostridium symbiosum, Eggerthella lenta and Escherichia coli bei Patienten mit DMT2 nachweisbar sind (Qin et al., 2012), die u.a. als Erreger für intraabdominelle Infektionen beschrieben sind (Elsayed und Zhang, 2004; Woo et al., 2004). Auf der anderen Seite sind Bifidobacteria-Spezies, deren Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Schleimhautbarriere gegen bakterielle Antigene bekannt ist (Griffiths et al., 2004; Ruan et al., 2007; Wang et al., 2006), sowohl in genetisch-veränderten sowie durch eine hoch-fetthaltige Diät übergewichtigen Mäusen reduziert (Cani

et al., 2007; Cani et al., 2008), als auch bei übergewichtigen Kindern, Erwachsenen und schwangeren Frauen (Collado et al., 2008; Kalliomäki et al., 2008; Santacruz et al., 2009).

Die funktionellen Konsequenzen, die mit den hier beschriebenen Veränderungen der Zusammensetzung des Darmmikrobioms einhergehen könnten, werden in den folgenden Abschnitten beschrieben. Als mögliche Mikrobiom-abhängige Mechanismen, die zur Entwicklung einer Adipositas beitragen, zeigen vorangegangene Studien

1. die Bereitstellung zusätzlicher Energie,
2. eine erhöhte Lipoprotein-Lipase-Aktivität und verstärkte Lipogenese,
3. eine erhöhte intestinale Permeabilität,
4. die sogenannte metabolische Endotoxämie und
5. eine Aktivierung des Endocannabinoid-Systems (Blaut und Klaus, 2012; Abbildung 2).

Diese Aspekte seien im Folgenden erläutert.

1.8.1. Einfluss des Darmmikrobioms auf Energieaufnahme und -ausbeute

Die Annahme der Bereitstellung zusätzlicher Energie durch ein Adipositas-assoziiertes Darmmikrobiom wird dadurch gestützt, dass im Stuhl genetisch veränderter übergewichtiger Mäuse (ob/ob) weniger verbliebene Energie durch „bomb calorimetry“ messbar ist als in jenem der schlanken Vergleichstiere und die Stuhltransplantation des „adipösen Mikrobioms“ zu einer größeren Zunahme der Körperfettmasse führt als die Stuhltransplantation des „schlanken Mikrobioms“ (Turnbaugh et al., 2006). Dass Darmbakterien generell die Fähigkeit besitzen, Energie aus Nahrung zu extrahieren, belegen Untersuchungen, die zeigen, dass keimfreie Ratten eine verminderte Energieaufnahme aus einer Polysaccharidreichen Diät aufweisen (Wostmann et al., 1983), keimfreie Mäuse weniger adipös sind trotz erhöhter Energieaufnahme im Vergleich zu herkömmlich kolonisierten Mäusen (Bäckhed et al., 2004) und herkömmlich kolonisierte Mäuse wiederum höhere Serum-Level an Metaboliten der Glykolyse und des Citratzyklus aufweisen als keimfreie Mäuse (Velagapudi et al., 2010). Ein wesentlicher Mechanismus, durch den das Darmmikrobiom die Energiegewinnung aus der Nahrung erhöht, ist die Hydrolyse und Fermentation von für den Wirt unverdaulichen Polysacchariden, wobei kurzkettige Fettsäuren (engl. short-chain-fatty-acids, SCFAs) entstehen, die der Wirt absorbieren und als Energiequelle nutzen kann (Turnbaugh et al., 2006). Diese SCFAs sind Acetat, Propionat und Butyrat (Macfarlane und Gibson, 1997), die für die Lipid- oder Glucose-De-novo-Synthese genutzt werden können (Wolever et al., 1989) und somit eine zusätzliche Energiequelle darstellen. Acetat und Propionat wer-

den hauptsächlich von Bacteroidetes produziert, während Firmicutes die Hauptverantwortlichen für Butyrat sind (Levy et al., 2016). Das Darmmikrobiom genetisch veränderter Übergewichtiger Mäuse (ob/ob-Mikrobiom) zeigt vermehrt Gene, die einerseits für Enzyme wie z.B. α -Glukosidase, α -Galaktosidase oder Formiat-Acetyltransferase kodieren, die die ansonsten unverdaulichen Polysaccharide metabolisieren, und andererseits für Proteine wie ATP-binding-cassette (ABC)-Transporter, die die hydrolysierten Zucker importieren können (Turnbaugh et al., 2006). Ebenso werden im Stuhl übergewichtiger Menschen höhere Konzentrationen von SCFAs ermittelt (Schwiertz et al., 2010). Insgesamt sind diese Befunde ein Indiz dafür, dass das Adipositas-assoziierte Darmmikrobiom ein größeres Potenzial besitzt, vermehrt Energie aus der Nahrung des Wirtes über die Fermentation von Polysacchariden zu gewinnen. Demgegenüber steht die Überlegung, dass diese zusätzliche Energie nicht ausreicht, um signifikante Gewichtsänderungen zu induzieren (Delzenne und Cani, 2011; Kootte et al., 2012). Außerdem durchdringen freie SCFAs die Blut-Hirn-Schranke über Monocarboxylat-Transporter (MCT) (Carneiro und Pellerin, 2015) und dienen so als Signalmoleküle innerhalb der Darm-Hirn-Achse, die zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme, einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems (SNS) und damit zu einer Erhöhung der Herzfrequenz, des Sauerstoffverbrauchs und des Energieverbrauchs führen (Bruning et al., 2020; Hu et al., 2018). Dem entspricht auch, dass der Verzehr ballaststoffreicher Nahrung die Produktion von SCFA erhöht, was in der Regel dazu beiträgt, Körpergewicht und Fettgewebe zu reduzieren sowie auch die Glukosekontrolle zu verbessern (Cani et al., 2006; Ibrügger et al., 2012; Ridaura et al., 2013). Es ist also derzeit unklar, ob SCFAs zur Adipositas beitragen oder lediglich ein verändertes Darmmikrobiom widerspiegeln. Eine mögliche Ursache sei, dass in einem gesunden Zustand die durch SCFAs ausgelösten physiologischen Reaktionen denen bei einem pathologischen Zustand gegensätzlich sein könnten (Bruning et al., 2020).

1.8.2. Einfluss des Darmmikrobioms auf die Fettspeicherung

Die erhöhte Aktivität der Lipoprotein-Lipase (LPL), ein Schlüsselenzym der Hydrolyse von Triglyceriden aus Lipoproteinen, führt zur vermehrten Freisetzung von Fettsäuren für den Transport in die Zellen, wo diese wieder zu Triglyceriden verestert werden und als Fettspeicher dienen. Bäckhed und Kollegen stellen an einer Studie mit keimfreien Mäusen überzeugend dar, dass das Konventionalisieren des Darmmikrobioms dieser Tiere zu einer Zunahme des Körperfetts führt, die assoziiert ist mit einer 122 % Zunahme der LPL-Aktivität im epididymalen Fettgewebe (Bäckhed et al., 2004). Ebenso ist in diesen Mäusen die Expression von Angiopoietin-like-Protein-4, auch bekannt als fasting-induced adipose factor (FIAF), im Ileum reduziert (Bäckhed et al., 2004). FIAF ist ein Protein, das sezerniert von Fettgeweben, Leber und Darm die Aktivität der LPL hemmt. Übereinstimmend mit diesen

Erkenntnissen zum Einfluss des Darmmikrobioms auf die LPL-Aktivität und damit auf die Zunahme von Fettspeichern, haben herkömmlich gezüchtete Mäuse im Vergleich zu keimfreien Mäusen im Serum reduzierte Triglycerid-, Chylomikronen-, Fettsäure- und Cholesterin-Spiegel bei gleichzeitiger Erhöhung in Fettgewebe und Leber (Velagapudi et al., 2010). Ein weiteres Indiz für eine verstärkte Lipogenese zeigt sich darin, dass in der Leber herkömmlich gezüchteter Mäuse im Vergleich zu keimfreien Mäusen eine erhöhte Transaktivierung lipogener Enzyme durch u.a. Carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP) nachweisbar ist, wodurch letztlich die Speicherung von Triglyceriden im Fettgewebe begünstigt wird (Bäckhed et al., 2004).

1.8.3. Verbindung zwischen diätinduzierter Adipositas und metabolischer Endotoxämie

Die Adipositas wird charakterisiert als ein chronisch niedrig-gradiger Entzündungszustand, der gekennzeichnet ist durch eine Erhöhung lokaler und systemischer Akute-Phase-Proteine und proinflammatorischer Zytokine (Gregor und Hotamisligil, 2011; Maachi et al., 2004). Die Akkumulation von Makrophagen in der vergrößerten Fettgewebemasse bei Adipositas führt bspw. zur erhöhten Ausschüttung von TNF α und IL-6 (Weisberg et al., 2003; Wellen und Hotamisligil, 2005). Darüber hinaus spielt die verstärkte Aktivierung des Immunsystems bei Adipositas eine Rolle bei der Entwicklung eines DMT2, des metabolischen Syndroms und kardiovaskulärer Erkrankungen (Dandona, 2004; Van Gaal et al., 2006). Cani und Kollegen untersuchten die Verbindung zwischen einer durch hoch-fetthaltige Diät induzierter Adipositas und der chronischen Entzündung, definierten hierbei erstmals bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) als Trigger und publizierten den Begriff der metabolischen Endotoxämie (Cani et al., 2007a). Die äußere Membran gramnegativer Bakterien wie z.B. *Escherichia coli* besteht hauptsächlich aus LPS, wobei das Lipid A als eigentlich toxisch wirksamer Bestandteil der LPS gilt, der in der Lage ist, Entzündungen zu induzieren und als „Endotoxin“ definiert ist. Die Endotoxine werden entweder von lebenden gramnegativen Bakterien durch Abspaltung von Vesikeln oder beim Absterben der Bakterien freigesetzt. Mehrere Studien an verschiedenen adipösen Kohorten zeigen eine Zunahme der Endotoxinproduzenten im Darmmikrobiom (de La Serre et al., 2010; Fei und Zhao, 2013) sowie eine erhöhte Endotoxinbelastung im Plasma (Lepper et al., 2007; Ruiz et al., 2007; Moreno-Navarrete et al., 2011). Die Adipositas ist demnach assoziiert mit erhöhten LPS-Plasmaspiegeln (Amar et al., 2011; Creely et al., 2007; Sun et al., 2010). Untersuchungen an keimfreien Mäusen belegen, dass der endotoxin-produzierende Stamm *Enterobacter cloacae* B29, der aus dem Darm fettleibiger Menschen isoliert wurde, Fettleibigkeit und Insulinresistenz induzieren kann (Fei und Zhao, 2013). In einer Reihe von Untersuchungen zeigen Cani und Kollegen, dass sowohl in schlanken Mäusen durch 4-wöchige hoch-fetthaltige Diät als

auch in genetisch adipösen Mäusen (ob/ob) unter Chow-Norm-Diät eine chronische niedrig-gradige Erhöhung von Endotoxinen induziert werden kann, die assoziiert ist mit einer Vergrößerung der Fettmassen, systemischen und gewebsspezifischen Entzündungen (u.a. Leber, Skelettmuskel und Fettgewebe) sowie einer Insulinresistenz (Cani et al., 2007a). Darüber hinaus wird herausgestellt, dass die subkutane Injektion von LPS vergleichbare Wirkungen wie die hoch-fetthaltige Ernährung zeigt: die vierwöchige LPS-Injektion führt in Wildtyp-Mäusen unter Chow-Norm-Diät zu Körpergewichtszunahme, vergrößertem Leber- und Fettgewebe, Entzündungen der Leber und des Fettgewebes sowie erhöhtem Nüchternblutzucker und Hyperinsulinämie (Cani et al., 2007a). Die chronische subklinische Entzündung durch Endotoxine ist demnach genauso induzierbar durch eine hochkalorische Ernährung als auch durch die direkte systemische Applikation. Dem Zustand der metabolischen Endotoxämie liegt fundierend zugrunde, dass die hoch-fetthaltige Ernährung, die zu Mikrobiomveränderungen führt, auch zu Veränderungen der Darmpermeabilität führt, wodurch vermehrt LPS in die Zirkulation gelangen (Moreira et al., 2012). Dabei sollten verschiedene Ansätze berücksichtigt werden: auf der einen Seite scheinen die Nahrungsfette den Transport der Endotoxine über die Darmepithelien über die Bildung von Chylomikronen zu begünstigen (Ghoshal et al., 2009), auf der anderen Seite gibt es Hinweise für Mikrobiomabhängige Mechanismen (Cani et al., 2009; Dao et al., 2016) sowie die direkte Wirkung von LPS selbst auf die Darmpermeabilität (Guo et al., 2013). Die diätinduzierten Veränderungen sind laut Cani et al. typischerweise mit dem Verlust von *Bifidobacterium* spp. verbunden (Cani et al., 2007), von denen bekannt ist, dass sie die Funktion der Darmschleimhautbarriere gegenüber Bakterienantigenen verbessern (Griffiths et al., 2004; Wang et al., 2006). So sind die „heilbringenden“ Wirkungen von Präbiotika und Bifidobakterien auf die Barrierefunktion u.a. mit einer erhöhten Produktion von Glucagon-like-Peptide-2 (GLP-2), einer gleichzeitigen Verbesserung der intestinalen Dichtigkeit (d.h. einer erhöhten mRNA der tight-junction Proteine Zonulin-1 [ZO-1] und Occludin [Occ]) und einer verringerten Darmpermeabilität verbunden (Cani et al., 2009). Eine weitere Rolle spielt der Mukus, die sogenannte erste Verteidigungslinie des Darms, der für eine limitierte Exposition von Bakterien gegenüber den Darmepithelien entscheidend ist (Yu et al., 2004). Durchdringen die LPS den Mukus und gelangen in Kontakt mit der Oberfläche der Darmepithelien, werden die bakteriellen Zellwandkomponente erkannt und es erfolgt die Aktivierung der angeborenen Immunantwort durch die Aufnahme von Bakterienantigenen. Dazu gehören der LPS-Rezeptor CD14 (Glykoprotein „Cluster of differentiation“ 14), TLRs („Toll-like“-Rezeptoren), die eine extrazelluläre Überwachung ermöglichen (Lundin et al., 2008), und PRRs („Pattern Recognition“-Rezeptoren) der nucleotid-bindenden Oligomerisierungsdomäne (Nod)-ähnlichen Rezeptorfamilie, die intrazelluläre/ internisierte Krankheitserreger erkennen (Kufer

und Sansonetti, 2007). LPS selbst induzieren eine erhöhte Durchlässigkeit der intestinalen tight-junctions durch eine Erhöhung der TLR4- und CD14-Expression (Guo et al., 2013).

Neuere Klinische Studien zeigen nicht nur, dass die Darmpermeabilität von Menschen mit DMT2 erhöht ist gegenüber derer ohne Diabetes (Cox et al., 2017), sondern auch, dass die erhöhte Darmpermeabilität bei Patienten mit Adipositas durch eine Gewichtsreduktion normalisiert werden kann (Damms-Machado et al., 2017). Damit wird der wesentliche Beitrag der gestörten intestinalen Permeabilität zu metabolischen Störungen im Menschen untermauert. Die klinische Relevanz der erhöhten zirkulierenden Endotoxine/ LPS und Proteinen des LPS-TLR4-Pfades in Bezug auf die Entwicklung von Herz-Kreislauf- und Stoffwechselerkrankungen lässt sich durch große prospektive populationsbasierte Studien herausstellen. So sind beispielsweise erhöhte Baseline Serum-Endotoxin-Konzentrationen ein prognostischer Marker für koronare Herzkrankheiten in den 10-Jahres-Nachuntersuchungen bei gesunden Personen mittleren Alters (Kallio et al., 2015). Eine Studie an gesunden chinesischen Männern und Frauen mittleren Alters zeigt ein Risiko für die Entwicklung des metabolischen Syndroms und der meisten seiner Komponenten bei erhöhtem Baseline Serum-LPS-Bindungsprotein-Werten (Liu et al., 2014). Darüber hinaus ist das Risiko der Manifestation eines DMT2 bei der 10-Jahres-Nachuntersuchung von gesunden Erwachsenen im Alter von 25-75 Jahren mit erhöhtem Serum-Endotoxin erhöht (Pussinen et al., 2011).

1.8.4. Zusammenhang zwischen Darmmikrobiom und endogenem Cannabinoid-System

Das endogene Cannabinoid-System (eCB-System) reguliert verschiedene physiologische Prozesse, einschließlich Appetit und Darmmotilität (Di Marzo et al., 2001; Duncan et al., 2005). Es besteht aus den endogenen Liganden, den Endocannabinoiden (Arachidonylethanolamid [auch bekannt unter Anandamid], 2-Arachidonylglycerol, 2-Arachidonylglycerylether), die aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren gebildet werden, sowie den G-Protein-gekoppelte membranständigen Cannabinoid-Rezeptoren, den CB1- und CB2-Rezeptoren. Der CB1-Rezeptor ist vorrangig im Gehirn exprimiert, findet sich aber auch in der Darmschleimhaut (Wright et al., 2005), der CB2-Rezeptor ist vorrangig auf Zellen des Immunsystems lokalisiert (Pacher et al., 2006). Eine Aktivierung des zentralen CB1-Rezeptors durch Anandamid induziert eine Überernährung (Williams und Kirkham, 1999) und die CB1-Überaktivität wird als ein Schlüsselfaktor für die Entwicklung einer Adipositas und den damit verbundenen Stoffwechselstörungen angesehen (Di Marzo, 2008). Zahlreiche Studien belegen, dass die Adipositas assoziiert ist mit einem erhöhten Tonus des eCB-Systems, resultierend in erhöhten Endocannabinoid-Spiegeln in Plasma und Fettgewebe

sowie einer veränderter Expression des CB1-Rezeptors (Côté et al., 2007; Di Marzo et al., 2009; Engeli et al., 2005).

Der Zusammenhang von eCB-System und Darmmikrobiom zeigt sich darin, dass bei adipösen Mäusen in Verbindung mit einem erhöhten Tonus des eCB-Systems auch die Erhöhung von Entzündungsmarkern und Plasma-LPS beobachtet werden kann, wohingegen durch Veränderungen im Darmmikrobiom – induziert durch eine präbiotische Fütterung – nicht nur die systemische Entzündung sondern auch der eCB-System-Tonus verringert wird (Muccioli et al., 2010). Wie unter 1.8.3. geschildert sind Darmbakterien die Hauptquelle von LPS. Diese LPS beeinflussen auch die Endocannabinoid-Spiegel, da bspw. durch LPS in Maus-Makrophagen die Synthese von Anandamid induziert werden kann (Liu et al., 2003). Weitergehend ist durch eine CB1-Rezeptorblockade eine Senkung der Plasma-LPS-Spiegel zu erreichen (Muccioli et al., 2010). Neuere Untersuchungen in Mäusen zeigen, dass die CB1-Rezeptorblockade mit Rimonabant (SR141716A) und ihre protektive Wirkung gegenüber diätinduzierten metabolischen Störungen assoziiert ist mit der Zunahme der Abundanz von *Akkermansia muciniphila* aus der Familie der *Verrucomicrobiaceae* und einer Abnahme der Abundanzen der Familien *Lachnospiraceae* und *Erysipelotrichaceae* (Mehrpuoya-Bahrami et al., 2017). Als mögliche Ursache sieht die AG Mehrpuoya-Bahrami einen Effekt von Rimonabant auf die Muzinproduktion der Darmschleimhaut, die wiederum als primäre Quelle für Kohlenstoff, Stickstoff und Schwefel für das bakterielle Wachstum von *Akkermansia muciniphila* dienen. Diese Effekte des Rimonabant sind unabhängig von seiner Wirkung auf die Energieaufnahme zu sehen, da im Studiendesign eine pair-feed-Fütterung etabliert wurde. Auch Lacroix et al. stellen u.a. eine reduzierte Abundanz von *Barnesiella*, *Parasutterella* und *Akkermansia* unter hoch-fett- und hoch-zuckerhaltiger Ernährung fest, die assoziiert ist mit erhöhten lokalen und systemischen Konzentrationen von Anandamid (Lacroix et al., 2019). *Barnesiella*, *Parasutterella* und *Akkermansia* sind Gattungen, deren reduzierte Abundanz bei diätinduziertem Übergewicht bekannt ist (Everard et al., 2013; Zhang et al., 2012).

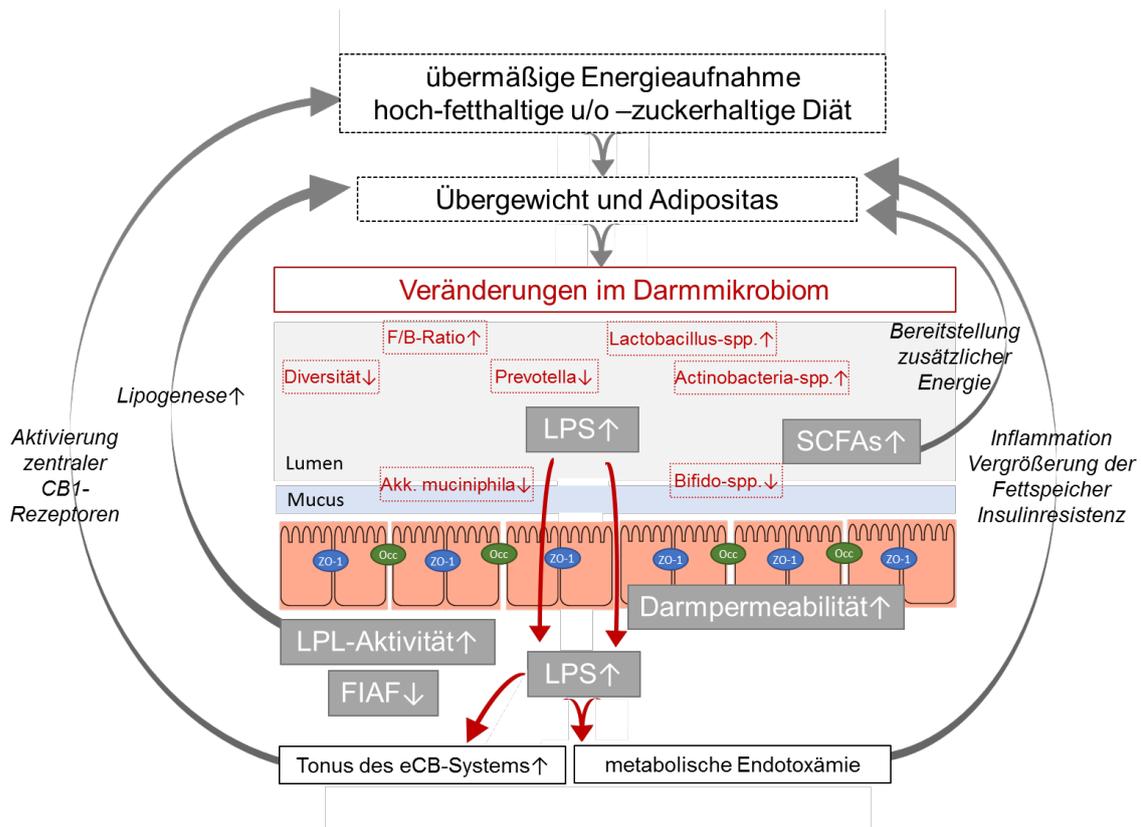


Abbildung 2: Hypothetisches Schema zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen diätinduzierten Veränderungen des Darmmikrobioms und den resultierenden Mikrobiom-abhängigen Mechanismen, die zur Entwicklung einer Adipositas beitragen; detaillierte Beschreibung in Abschnitt 1.8.; F/B-Ratio: Firmicutes-Bacteroidetes-Ratio; spp: Sepzies; LPS: Lipopolysaccharide; SCFAs: kuzkettige Fettsäuren, „short chain fatty acids“; LPL: Lipoproteinlipase; FIAF: „fasting-induced-adipose-factor“; eCB-System: endogenes Cannabinoid-System; CB1-Rezeptoren: Cannabinoid-Rezeptor-Typ-1; ZO-1: Zonulin-1; Occ: Occludin.

1.9. Darmmikrobiom als Basis und Angriffspunkt für therapeutische Interventionen

Angesichts der zahlreichen Studien und ihren relevanten Erkenntnissen ist die Frage nach dem möglichen therapeutischen Ansatz im Darmmikrobiom unabdingbar. Dabei steht auf der einen Seite die Stuhltransplantation eines schlanken Donors auf den adipösen Empfänger als Interventionsmöglichkeit im Fokus (Marotz und Zarrinpar, 2016). Andererseits wird auch der Einfluss von Probiotika (Amar et al., 2011; Cani et al., 2007; Fukuda et al., 2011), Präbiotika (Delzenne et al., 2013; Roberfroid et al., 2010) und Phytotherapeutika (Lee et al., 2014; Seo et al., 2015) oder Pharmaka wie Metformin (Shin et al., 2014) und Antibiotika (Reijnders et al., 2016) auf das Darmmikrobiom mit Auswirkungen auf Gewicht und metabolische Funktionen untersucht. Es ist belegt, dass ausgewählte probiotische Stämme, v.a. der Gattungen Lactobacillus und Bifidobacterium, Fettleibigkeit sowie subklinische chronische Inflammation und die damit verbundenen metabolische Komplikationen lindern können (Amar et al., 2011; Cani et al., 2007a; Fukuda et al., 2011). Darüber hinaus sind Präbiotika in der Lage, bei Menschen und Nagern das Hungergefühl zu mindern und die Funktion der Darmbarriere zu stabilisieren (Cani et al., 2009a; Parnell und Reimer,

2009). Andererseits ist für das orale Antidiabetikum Metformin überzeugend demonstriert, dass es über eine Erhöhung der Abundanz von *Akkermansia* spp. die Glukosetoleranz verbessert und die Inflammation des Fettgewebes verringert (Shin et al., 2014). Die „Fäkale Mikrobiom Transplantation“ (FMT) zeigt sowohl im Tierversuch als auch in einer klinische Studien vielversprechende Ergebnisse in Bezug auf die Körpergewichtsentwicklung und Insulinresistenz (Di Luccia et al., 2015; Ridaura et al., 2013; Vrieze et al., 2012), und ist derzeit Gegenstand weltweiter klinischer Untersuchungen (Marotz und Zarrinpar, 2016). Dies unterstreicht wiederholt die Bedeutung des Darmmikrobioms als Behandlungsstrategie für Übergewicht und metabolisches Syndrom, bei weiter steigender Prävalenz dieser Erkrankungen und fehlenden suffizienten therapeutischen Optionen.

1.10. Fragestellung

Wie im oberen Abschnitt (s. 1.5., Abbildung 1) aufgeführt, ist die AT1-Blockade mit einer verringerten Gewichtszunahme unter hochkalorischer Ernährung und weiteren metabolischen Vorteilen assoziiert. Parallel steht das Darmmikrobiom, wie ebenfalls in den obigen Abschnitten (s. 1.7. und 1.8., Abbildung 2) ausführlich dargestellt, in enger Verbindung mit Ernährung, Übergewicht und dem Stoffwechsel des Wirts. Daraus ergibt sich für die vorliegende Arbeit die Frage, ob infolge der AT1-Blockade mit Telmisartan Veränderungen im Darmmikrobiom zu beobachten sind, die mechanistisch in Zusammenhang stehen mit der antiadipösen Wirksamkeit der Medikation. Darüber hinaus soll unterschieden werden können, ob die therapeutische Intervention mit Telmisartan direkt das Mikrobiom verändert und dadurch Einfluss auf Energieaufnahme und Gewichtsentwicklung nimmt oder Veränderungen als indirekte Folge einer verringerten Energieaufnahme zu betrachten sind.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden in der hier vorliegenden Forschungsarbeit 4 Gruppen von Ratten untersucht: eine normgewichtige Kontrollgruppe mit Chow-Futter (CON), eine adipöse Kontrollgruppe (CD) mit unbegrenztem Zugang zum Chow-Futter sowie kommerziellen Schoko- und Keksriegeln (Cafeteria-Diät), eine Gruppe unter Telmisartan-Therapie mit Cafeteria-Diät (TEL) und letztlich eine pair-feed-Gruppe, die an die Energieaufnahme der TEL-Ratten adaptiert war. Die letztgenannte pair-feed-Gruppe erhielt nur die Menge an Chow- und Cafeteria-Diät-Futter, die die TEL-Tiere aufgenommen hatten, um differenzieren zu können, ob ein Einfluss auf das Darmmikrobiom durch Telmisartan selbst erfolgt oder auf die Telmisartan-bedingte Veränderung der Nahrungsaufnahme zurückzuführen ist.

2. Material und Methoden

2.1. Studienprotokolle

2.1.1. Versuchstiere

In der Studie dienten 72 männliche Sprague-Dawley Ratten der Firma Charles River (Sulzfeld) als Versuchstiere. Die Ratten kamen 12 Tage vor Studienbeginn im Rattenverhaltenslabor mit einem Lebensalter von 8 Wochen und einem Körpergewicht von 218 ± 1 g an, um sich zunächst an die neue Umgebung, Nahrung und unser „Handling“ zu gewöhnen. Die Haltungsbedingungen im Labor entsprachen der Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlamentes. Die Ratten wurden zunächst für etwa 5 Tage zu zweit in einem Standardkäfig der Größe 4 (Länge: 59 cm, Breite: 38 cm, Höhe: 20 cm) gehalten, danach aufgrund ihres koprophagischen Verhaltens (Ridaura et al., 2013) einzeln in Käfigen der Größe 3 (Länge: 40 cm, Breite: 24 cm, Höhe: 20 cm) untergebracht. Die Bedingungen des Rattenverhaltenslabors entsprachen während der gesamten Studie einer Raumtemperatur von 20°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 40-60%, welches täglich dokumentiert wurde. Des Weiteren unterlag der Haltungsraum einem Tag-Nacht-Rhythmus mit einer Helligkeitsphase von 2 bis 14 Uhr. Die tägliche Medikamentenapplikation, die Futterein- und auswaage sowie die Gewichtsbestimmung der Ratten wurden vor Beginn der Dunkelphase durchgeführt.

Die 72 Ratten der Studie wurden in 6 Gruppen á 12 Tiere mit einwöchiger Verzögerung in die Studie „eingeschleust“. Jeweils 3 Tiere einer „Einschleus-Gruppe“ wurden in eine der 4 Versuchsgruppen anhand ihres Körpergewichts nach 8 Tagen Aufenthalt im Labor randomisiert, wobei auf eine gleichmäßige Gewichtsverteilung in allen Versuchsgruppen geachtet wurde. Die Blutentnahmen, Stuhlprobengewinnung und Tests der Studie fanden entsprechend mit einwöchiger Zeitversetzung statt, so dass alle Tiere dieselbe Studien-Zeitachse aufwiesen. In Abbildung 3 ist der zeitliche Verlauf des Studienprotokolls dargestellt.

Der Tierversuch „Einfluss einer chronischen Telmisartan Therapie auf die Leptinsensitivität und das Darm-Mikrobiom bei Adipositas“ ist durch das Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein (MELUR) genehmigt worden (Antragsnummer: V242-7224.122-22[10-2/14], Datum der Genehmigung: 28.03.2014).

Tag -12	Ankunft der Tiere , Beginn der Gewöhnungsphase
Tag -11	1. Stuhlprobengewinnung
Tag -7	Aufteilung der Tiere in Einzelkäfige
Tag -3	1. Blutentnahme, 2. Stuhlprobengewinnung, Randomisierung in die Versuchsgruppen
Tag 0	Beginn der Studie mit Realisierung der Diätformen und Telmisartan oder Vehikel-Schlundung
Tag 32	2. Blutentnahme und 3. Stuhlprobengewinnung
Tag 58	Blutdruckmessung
Tag 60	3. Blutentnahme und 4. Stuhlprobengewinnung
Tag 64	Kalorimetrie
Tag 73	4. Blutentnahme
Tag 82	Insulintoleranztest
Tag 88	MRT
Tag 93	Tötung und Organgewinnung

Abbildung 3: Zeitliche Übersicht des Studienprotokolls.

2.1.2. Versuchsgruppen und Futterregime

Im Rahmen der Studie wurden 4 verschiedene Versuchsgruppen (Tabelle 1) mit einer Gruppenstärke von 18 Versuchstieren über einen Zeitraum von 12 Wochen betrachtet.

Tabelle 1: Übersicht der Versuchsgruppen, deren Diät und Therapie.

Versuchsgruppe	Abkürzung	Anzahl der Tiere	Diät	Therapie
Normgewichtige Kontrollgruppe	CON	n =18	Chow-Normdiät	Vehikel
Adipöse Kontrollgruppe	CD	n =18	Cafeteria-Diät (Schoko-/Keksriegel und Chow-Futter)	Vehikel
Versuchsgruppe 1	TEL	n =18	Cafeteria-Diät (Schoko-/Keksriegel und Chow-Futter)	Telmisartan
Versuchsgruppe 2	PF	n =18	Cafeteria-Diät als pair-feeding	Vehikel

Zur Akklimatisierung vor Studienbeginn erhielten alle Tiere die Standarddiät (Chow-Normdiät) in Form von Haltungsfutter der Firma Altromin® („Haltungsdiet“ 1324; Inhaltsstoffe der Pellets: 53 % NfE Stickstoff freie Extraktstoffe, 19 % Rohprotein, 7 % Rohasche, 6 % Rohfaser und 4 % Rohfett; Energiegehalt 11,7 kJ/g; Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage) und Leitungswasser ad libitum. Mit dem Tag der ersten Telmisartan- oder Vehikel-Schlundung wurden die Diäten entsprechend der Versuchsgruppen durchgeführt: die normgewichtige Kontrollgruppe (CON) erhielt weiterhin die Standarddiät ad libitum, die adipöse

Kontrollgruppe (CD) und Versuchsgruppe 1 (TEL) erhielten zusätzlich die hochkalorische Cafeteria-Diät (Miesel et al., 2010). Diese beinhaltet die freie Wahl zwischen der Standarddiät und täglich wechselnde Schokoladen- und Keksriegel herkömmlicher Hersteller mit einem durchschnittlichen Energiegehalt von $20,3 \pm 0,5$ kJ/g (Miesel et al., 2010; Anhang Tabelle 14). Für die Diät der Versuchsgruppe 2 (PF) wurde ein neues Protokoll angewendet: der pair-feeding-Gedanke wurde insofern umgesetzt, dass die Tiere dieser Versuchsgruppe die Durchschnittsmenge [g] an Chow-Futter und Cafeteria-Diät erhielten, die die TEL-Gruppe tags zuvor gefressen hatte. Dazu wurde die Nahrung der Versuchsgruppen täglich ein- und ausgewogen (Waage: MC1 Laboratory LC220S). Leitungswasser wurde den Tieren über den gesamten Versuchszeitraum frei zur Verfügung gestellt.

Jeden Montag erhielten die Ratten neu eingestreute Käfige, die Wasserflaschen wurden ausgewogen und gewechselt sowie das Chow-Futter. Der CON-, CD- und TEL-Gruppe wurde dann die Wochenration an Chow-Futter eingewogen. In der Cafeteria-Diät wechselte täglich der Schoko-/Keksriegel, wobei Ein- und Auswaage protokolliert wurden, um die tägliche Futtermenge zu bestimmen. Des Weiteren wurde bei der CD- und TEL-Gruppe auch das Chow-Futter täglich gewogen, um einen Vergleich an gefressener Normal-Diät zu erhalten. Die Futtermengen der PF-Gruppe ermittelten sich anhand des Vortags durchschnittlich gefütterten Mengen an Chow-Futter und Cafeteria-Diät der gleichaltrigen TEL-Gruppe.

2.1.3. Therapie durch orale Applikation von Telmisartan und Vehikel

Zur sicheren Verabreichung des Telmisartans oder Vehikels wurde dieses den Ratten direkt intraösophageal appliziert, was verallgemeinernd als „Schlund“ bezeichnet wird. Die Ratte wurde dazu mit der linken Hand fest im Nacken gegriffen, mit dem Leib an den Körper der durchführenden Person gehalten und bei rekliniertem Kopf der Ratte konnte die gebogene Schlundsonde behutsam in Mund und Speiseröhre eingeführt werden. Alle Tiere wurden gruppenweise täglich morgens gewogen und geschlundet. Nach Ankunft wurden die Tiere 12 Tage vor Studienbeginn langsam an die Schlundung gewöhnt, in dem zunächst nur das Greifen der Ratten, im weiteren Verlauf das Einführen der Schlundsonde in den Mundraum und letztlich die Applikation von reinem Leitungswasser trainiert wurde.

Ab Studienbeginn wurde die Dosis des Vehikels oder Telmisartans gewichtsadaptiert appliziert, wobei jedes Tier 8 mg Telmisartan pro kg Körpergewicht erhalten sollte. Zur Vereinfachung lag das Telmisartan in einer Lösung mit Gummi Arabicum in einer Konzentration von 8 mg/ml vor, so erhielt ein Tier 0,45 ml der Lösung mit 3,6 mg Telmisartan, welches an diesem Tag 450 g gewogen hat. Genau so wurde mit der reinen Gummi Arabicum Lösung, die als Vehikel-Therapie genutzt wurde, verfahren. Die Körpergewichtsdaten wurden täglich dokumentiert.

2.1.4. Herstellung der Telmisartan- und Vehikel-Lösung

Das Telmisartan der Firma Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG lag in pulverisierter Form vor und wurde in einer Konzentration von 8 mg/ml für 40 ml angesetzt. Um eine Suspension mit möglichst gleichmäßiger Verteilung des Telmisartans zu erhalten, wurde das Medikament mit Gummi arabicum (1%ig) angerührt: 320 mg Telmisartan mit 4 g Gummi arabicum. Dazu wurde das Gummi arabicum im Mörser vorgelegt, das Telmisartan beigemischt und sorgfältig zerrieben und letztlich graduell mit Leitungswasser suspendiert.

Die Telmisartan-Suspension konnte in einem 50 ml Falcon bei 4°C aufbewahrt und für eine Woche verwendet werden. Vor Applikation wurde die Telmisartan-Suspension auf einem Rüttler für 15 Minuten durchmischt und nach jeder 2. Schlundung 3 Mal geschwenkt. Die Vehikel-Lösung bestand ausschließlich aus 4 g Gummi arabicum gelöst in 40 ml Leitungswasser, wurde ebenfalls bei 4°C gelagert, für den Zeitraum von einer Woche verwendet und dann neu angesetzt.

2.1.5. Herstellung der Insulin-Lösung

Das Insulin (Insuman[®] Rapid von Sanofi-Aventis, humanes Insulin) für den Insulintoleranztest (ITT) lag in einer Dosierung von 40 I.E./ml vor. Ein Volumen von 0,15 ml des Insulins wurden mit 9,85 ml 0,9%igem NaCl verdünnt (Verhältnis von 1:66,67), um in der Injektionslösung eine Konzentration von 0,6 I.E./ml vorliegen zu haben. Dies vereinfachte die benötigte subkutane Applikation von 0,6 I.E./kg KG der Ratten.

2.1.6. Subkutane Applikation von Insulin

Die subkutane Injektion von Insulin erfolgte stets mithilfe einer 2. Person, die die auf dem Bauch liegende Ratte an Vorder- und Hinterläufen festhielt. Die injizierende Person bildete dann eine Hautfalte lateral der Lendenwirbelsäule der Ratten und applizierte das nötige Volumen Insulin (Kanüle 0,4 x 13 mm BD Microlance[®]).

2.1.7. Intraperitoneale Applikation von Pentobarbital

Für die intraperitoneale Applikation wurde die Ratte unterhalb der Vorder- und an den Hinterläufen von einer 2. Person fest fixiert, damit in das Peritoneum in einem Winkel von 45° möglichst sicher die Narkose injiziert werden konnte (Kanüle 0,4 x 13 mm BD Microlance[®]). Durchgeführt wurde die Narkose durch legitimierte Personen des Instituts für Klinische und Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie der Universität zu Lübeck.

2.2. Blutabnahme und Stuhlprobengewinnung

2.2.1. Blutabnahme über eine Schwanzvene

Die Blutentnahme sollte für die Ratten möglichst stressfrei und außerdem schnell durchführbar sein. Deswegen wurde auf eine im eigenen Labor schon vielfach praktizierte Methodik zurückgegriffen. Dabei wird die Ratte von einer helfenden Person auf dem Tisch unter einem Tuch fixiert und mittels Rasierklinge eine der Schwanzvenen eröffnet. Durch das Ausstreichen des Schwanzes von der Schwanzwurzel in Richtung des Schnittes bildete sich tropfenweise Vollblut, welches mit einer Mikrovette aufgesogen wurde. Diese Mikrovette war mit Kalium-EDTA beschichtet, wurde bis ca. 300 µl befüllt und anschließend in Eiswasser gekühlt. Das ganze Verfahren dauerte für die Ratten nur wenige Minuten. Die Vollblutproben wurden im Anschluss in der Zentrifuge bei 14 000 U/min für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der so entstandene Plasma-Überstand wurde abpipettiert und bei -20°C gelagert.

2.2.2. Sammlung der Stuhlproben

Für die Darmmikrobiom-Analyse sollten möglichst frische Kotproben der Tiere gewonnen werden. Hierzu wurde zunächst unmittelbar nach der Reinigung der Käfige frisch abgesetzter Kot aus dem Käfig entnommen, wobei die erste Stuhlprobe aus einem Käfig stammt, der mit 2 Ratten besetzt war. Da die Tiere gerade bei den Verfahren zur Blutentnahme oder Blutdruckmessung viel Kot absetzten, bot es sich an, zu diesen Zeitpunkten frischen Stuhl zu sammeln, um so die individuelle Probe zu erfassen. Dazu wurde auf eine mit 80% Ethanol desinfizierte Pinzette und saubere Kosmetiktücher zurückgegriffen, um eine Umgebungscontamination möglichst gering zu halten. Des Weiteren wurden die für das DNA-Extraktionsverfahren nötigen 250 mg Kot speziell aufbereitet, um einen möglichst repräsentativen Anteil Stuhlinnerees zu erhalten (genauere Angaben unter 2.6.1.). Die Stuhlproben wurden bis zur weiteren Analytik bei -20°C konserviert.

2.3. Funktionstests

2.3.1. Unblutige Blutdruckmessung und Herzfrequenzbestimmung mittels Plethysmographie

Die Messung von Blutdruck und Herzfrequenz der Ratten entsprach in der Durchführung der im Labor bereits etablierten Methodik (Raasch et al., 2002). Die Plethysmographie fand

in einem abgedunkelten Versuchsraum in der Zeit zwischen 9 und 14 Uhr statt. Gruppenweise wurden die Ratten in ihren Käfigen mind. 30 Minuten vor der Messung in den Raum gebracht, damit Sie sich an die neue Umgebung und Geräuschkulisse gewöhnen konnten.

Für die Messung wurden die Ratten auf einem Heiztisch mit dem Kopf voran in eine ihrer Körpergröße entsprechenden Röhre aus Metall geführt, so dass nur Hinterläufe und Schwanz heraus blieben. Zur Beruhigung der Tiere wurde in diesen Tunnel ein Sauerstoff-Distickstoffoxid-Gasgemisch (Fluss: 0,5 l/min O₂ und 2,0 l/min N₂O) geleitet. Durch eine Rotlichtlampe wurde die Durchblutung des Schwanzes angeregt. Anschließend wurde eine Druckmanschette am Schwanz angebracht und mit einem Abstand von 1 cm distal der Druckmanschette ein Piezoelement als Messinstrument positioniert, welches pulsbedingte Druckschwankungen erfasst. So konnten Pulssignal und Manschettendruck über einen Verstärker (Bloodpressure Monitor 8002 Dual Channel, TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland) registriert, mit einem Zweiphasenschreiber auf Millimeterpapier aufgezeichnet und der richtige Moment für die Blutdruckmessung abgepasst werden. Um valide Messdaten zu erhalten, musste sich die Ratte im Tunnel ruhig verhalten und eine gering schwankende Herzfrequenz von <500/min aufweisen, die am Monitor des Gerätes ablesbar war. Sobald dieser von Tier zu Tier variable Zeitpunkt erreicht wurde, wurde die aktuelle Herzfrequenz notiert und die Messung über das Gerät gestartet. Dazu blies sich die Manschette automatisch auf maximal 320 mmHg auf und unterdrückte bei Überschreiten des systolischen Blutdruckes das Pulssignal. Der systolische Blutdruck stellt sich in der graphischen Auswertung auf dem Millimeterpapier dann mit dem Zusammenfall der pulssynchronen Druckamplitude dar. Der Wert des systolischen Blutdruckes wurde pro Ratte 5 bis 7 Mal ermittelt, in dem das Lot gefällt wurde vom Punkt des Zusammenfalls der Druckkurve auf die Basislinie. Die Höhendifferenz von Basislinie zum Lot entsprach dabei dem systolischen Blutdruck, wobei 1 mm Papier 6,3 mmHg entsprachen. Aus allen Messungen pro Tier wurde der Mittelwert errechnet und für die statistische Auswertung herangezogen.

2.3.2. Indirekte Kalorimetrie und Aktivität

Zur Bestimmung von Energieverbrauch (EE = „Energy Expenditure“), Respiratorischem Quotienten (RER = „Respiratory Exchange Ratio“), Bewegungsverhalten (Lokomotion) sowie Trinkwasser- und Futteraufnahme verblieben alle Ratten 8 Wochen nach Beginn der Studie für einen Zeitraum von 3 Tagen in Respirationskäfigen des Phenomaster® -System der Firma TSE (TSE, Bad Homburg, Deutschland) in einem separaten Versuchsraum (Müller-Fielitz et al., 2012). Jeder dieser Respirationskäfige („homecage“) bot über Sensoren im Käfigdeckel verschiedene Messmöglichkeiten: Zum einen wurde die O₂ und CO₂-

Konzentration der eingeleiteten sowie auch der ausströmenden Luft bestimmt und andererseits über Federkraftmesser an den Futterbehältnissen das Trink- und Fressverhalten (Chow-Futter und Cafeteria-Diät) genau erfasst. Der O₂-Verbrauch wurde als indirektes Maß für den EE (kcal/h/kg) herangezogen und von der Software des Systems berechnet. Der RER berechnete sich aus der Menge an abgeatmeten CO₂ im Zeitintervall im Verhältnis zum eingeatmetem O₂ (Formel: $RER = (V(CO_2) \cdot t - 1) / (V(O_2) \cdot t - 1)$; t=Zeit). Da der RER abhängig vom Metabolismus der unterschiedlichen Nährstoffe auf Zellebene ist, lassen sich über den RER Rückschlüsse auf die vorrangig zur Energiegewinnung genutzten Substrate heranziehen (Kohlenhydrate RER = 1, Proteine RER = 0,8, Fette RER = 0,7).

Außerdem wurde mittels InfraMot System (TSE, Bad Homburg, Deutschland) das Bewegungsverhalten der Ratten registriert, wobei über am Käfigdeckel angebrachte Infrarotsensoren jede Veränderung des Wärmebildes durch Bewegung der Ratten vom System erkannt und als ein „Count“ registriert wurde.

In der Messeinheit standen 6 Respirationskäfige sowie ein leerer Kontrollkäfig zur Verfügung, in dreiminütigen Intervallen führte das System die geschilderten Messungen durch, so dass von jedem Respirationskäfig alle 20 Minuten Messdaten erfasst werden konnten. Die Ratten in der Messeinheit wurden ebenso wie die übrigen Tiere der Studie vor 14 Uhr gewogen, bekamen Telmisartan oder Vehikel per Schlundsonde appliziert und die Futter- und Trinkbehältnisse wurden aufgefüllt. Um die Messungen des Systems nicht zu beeinträchtigen, wurden die Ratten zwischen den Messintervallen aus den Käfigen genommen.

2.3.3. Insulintoleranztest und Blutzuckerbestimmung

Der Insulintoleranztest (ITT) zur Überprüfung einer Insulinresistenz erfolgte in der 11. Woche nach Studienbeginn anhand des in der AG etablierten Protokolls (Miesel et al., 2010; Müller-Fielitz, et al., 2012). Für den ITT wurden die Tiere ab dem Mittag des Vortages nüchtern gesetzt, um einen 18-stündigen Fastenzeitraum zu erwirken, wobei Trinkwasser weiter ad libitum zur Verfügung stand. Dann erfolgte am Versuchstag zunächst die Körpergewichtsbestimmung, eine basale Blutentnahme von 100 µl Vollblut und die Nüchtern glukose-Bestimmung aus der Schwanzvene. Die Glukose-Konzentrationen aus dem Vollblut, sowohl die Nüchtern glukose als auch die im ITT folgenden Blutzuckerkonzentrationen, wurde mit handelsüblichen Messstreifen und Messgeräten bestimmt (Glucometer Elite[®], Bayer HealthCare, Teststreifen: Ascensia Elite[®] Sensor, Bayer HealthCare AG, Leverkusen).

Zu Beginn des ITT wurden jeder Ratte gewichtsadaptiert 0,6 I.E/kg KG Insulin subkutan injiziert. Die Blutzuckerbestimmungen erfolgten dann in Intervallen von 5 Minuten, bis

45 Minuten nach Insulininjektion zusätzlich eine Mikrovette (100 µl) Vollblut zur Plasmainulinbestimmung abgenommen wurde. Anschließend erfolgten weitere Blutzucker-Messungen 60, 90, 120, 180, 240 und 360 Minuten nach Insulin-Injektion. Erst nach der letzten Blutzuckerbestimmung erhielten die Tiere wieder Nahrung.

2.3.4. Bestimmung der subkutanen und viszeralen Fettmasse mittels MRT

Die Quantifizierung der subkutanen und viszeralen Fettmasse erfolgte durch Schichtbildaufnahmen einer Magnetresonanz-Tomographie (MRT) in der Klinik für Radiologie des UKSH Lübeck (MRT: Philips, Achieva, 1.5 Tesla, 8-Kanal SENSE) an Tag 88, wie auch in vorangegangenen Projekten der AG (Miesel et al., 2010; Müller-Fielitz et al., 2012). Für die MRT-Aufnahmen erhielten die Ratten eine Narkose, wobei intraperitoneal 60 mg/kg KG Pentobarbital injiziert wurden, da auswertbare Bilder nur unter Bewegungslosigkeit erstellt werden können. Das MRT der Ratten wurde mit einer Knie-Spule, einer transversen T1-gewichteten „turbo spin echo“ Sequenz, einer Schichtdicke von 2 mm und einer Bild Matrix von 320 x 320 Pixel gefahren. Pro Ratte wurden in der MRT durchschnittlich $115,2 \pm 5,7$ DICOM-Einzelschichtbilder (DICOM = „Digital Imaging and Communications in Medicine“) des Abdomen vom Zwerchfell bis zum Beckenboden aufgenommen. Für die Auswertung der DICOM-Einzelschichtbilder mussten diese zunächst mittels eines MRT-Betrachtungsprogrammes (MRicro Version 1.4 build 1) in HDR-Dateien (HDR = „High Dynamic Range“) konvertiert werden, um sie mit einem Analyse-Programm für Medizinische Bilddateien (vitom für windows, Version 1.0) öffnen zu können.

Zur Bestimmung der abdominalen viszeralen und subkutanen Fettmasse wurden diejenigen Einzelschichtbilder mit in die Auswertung einbezogen, die vom geschlossenen Zwerchfell bis zu den Femurköpfen reichten (durchschnittlich 75 ± 9 Aufnahmen). Um aus diesen Schichtbildern die Fettvolumina zu berechnen, musste in jeder Schicht das in T1-gewichteten Bildern hell (hyperintens) dargestellte Fettgewebe markiert werden. Die markierten Grauwerte wurden schließlich über die Schichtbilder durch das Programm zu den entsprechenden Volumina aufsummiert, jeweils für die subkutane, die viszerale und die gesamte Fettmasse.

2.3.5 Bestimmung von Körperlänge und Bauchumfang

Die für die MRT-Aufnahmen an Tag 88 unerlässliche Narkotisierung der Ratten wurde zur Vermessung der Körperlänge und des Bauchumfangs genutzt. Dazu wurden die Tiere vor Transport in die Radiologie von einer Person vermessen und unmittelbar im Anschluss an die Bildgebung von einer 2. Person. Vorgabe für die Körperlänge war hier bei der auf dem

Bauch liegenden Ratte von der Nasenspitze bis zur Schwanzwurzel, sowie für den Bauchumfang die größten Ausmaße des Leibes zu nehmen. Aus den von 2 Personen unabhängig voneinander ermittelten Messdaten wurde zum Zwecke der höheren Messgenauigkeit der Mittelwert berechnet. Anhand dieser Daten wurde mit dem Körpergewicht von Tag 88 der BMI berechnet.

2.4. Tötung und Organgewinnung

2.4.1. Dekapitationsverfahren und finale Blutgewinnung

Die Tötung der Ratten erfolgte durch Dekapitation per Guillotine. Das aus den Halsschlagadern am Rumpf austretende Blut wurde direkt über Trichter in einen 15 ml Falcon geleitet, der 200 µl EDTA enthielt und mit 8-9 ml Vollblut aufgefüllt wurde. Es erfolgte die Bestimmung des Hämatokrits und aus dem Plasma des Vollbluts wurden nachträglich Insulin, Leptin und Glucagon bestimmt.

2.4.2. Organpräparation

Im Anschluss an die Dekapitation und finale Blutgewinnung wurden folgende Organe und Gewebeproben entnommen: Gehirn, Hypophyse, Leber, Niere, Nebenniere, Pankreas, weißes und braunes Fettgewebe sowie Muskelgewebe. Jedes Organ wurde auf der Feinwaage gewogen, in 1,5 oder 2 ml große Reaktionsgefäßen gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Ausnahmen bildeten dabei das Herz, von welchem der linke Ventrikel gesondert präpariert und separat abgewogen wurde, und das Gehirn, das zum schonenderen Einfrieren zunächst in mit Trockeneis gekühltes 2-Methylbutan getaucht wurde. Es wurden 2 verschiedene Fettgewebearten entnommen: braunes Fettgewebe aus dem Rücken und Bauch, sowie weißes Fettgewebe sowohl aus dem viszeralen als auch omentalen Fett. Das Muskelgewebe wurde am rechten Oberschenkel gewonnen, der anschließend bis auf den Femur präpariert wurde, um diesen mit einem Messschieber vermessen zu können. Schließlich wurde das Kolon eröffnet und die letzte Stuhlprobe daraus gewonnen. Alle Organ- und Gewebeproben wurden bei -80°C gelagert.

2.5. Laborchemische Analysen

2.5.1. Bestimmung von Insulin und Glukagon durch Radioimmunoassay

Zum Nachweis der Insulin- und Glukagon-Spiegel im Plasma der Ratten wurde ein Radioimmunoassay (RIA) herangezogen. Dieses Verfahren ermöglicht die Bestimmung von kleinsten Mengen eines Antigens und beruht auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reak-

tion, wobei hier ein radioaktiv markiertes Antigen (^{125}I -markiertes Glucagon und ^{125}I -markiertes Insulin, im Folgenden als Tracer bezeichnet) zur Konzentrationsmessung genutzt wird. Die verwendeten Kits (RI-13K und GL-32K der Firma Merck Millipore, Merck Group, Darmstadt, Deutschland) enthielten den Tracer, das spezifische Antiserum mit den entsprechenden Antikörpern und das Präzipitations-Reagenz, dass letztlich die nicht an Antikörper gebundenen Tracer für die Messung separiert. Die Durchführung erfolgte freundlicherweise durch Frau Ines Stölting und Dr. Martina Winkler gemäß der Gebrauchsanweisung der Kits, aber mit halbierten Ansätzen (Winkler, 2017).

2.5.2. Bestimmung von Leptin durch Enzymimmunoassay

Das Leptin wurde mithilfe eines Enzym-linked-Immunosorbent-assay (ELISA) bestimmt. Dazu wurde der Quantikine® ELISA der Firma R&D Systems, Inc. verwendet, welcher die quantitative Sandwich-Enzym-Immunoassay-Technik nutzt. Die Durchführung erfolgte freundlicherweise durch Frau Ines Stölting und Dr. Martina Winkler nach anderswo publizierten Protokoll (Winkler, 2017).

2.5.3. Bestimmung des Lipidprofils

Die Bestimmung des Plasma-Lipidprofils erfolgte aus den Proben der Nüchtern-Blutentnahme von Tag 82 in der Klinischen Chemie des UKSH Lübeck.

2.5.4. Bestimmung von Peptiden und Adipokinen durch Multiplex-Assays

Die Bestimmung der Plasmakonzentrationen verschiedener Adipokine erfolgte entsprechend den Herstelleranweisungen mit dem Milliplex-Maus-Metabolic-Magnetic-Bead-Panel-Kit (Amylin, Ghrelin, Glucose-abhängiges insulinotropes Polypeptid [GIP], Glucagon-like-Peptid-1 [GLP-1], Pankreas-Polypeptid [PP], Peptid-Tyrosin-Tyrosin [PYY]) und dem Maus-High-Sensitivity-T-Cell-Magnetic-Bead-Panel-Kit (IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13 IL-17A, Keratinozyten-Chemoattraktant [KC], Lipopolysaccharid-induziertes CXC-Chemokin [LIX]) der Firma Merck Millipore, Merck Group, Darmstadt, Deutschland. Die Durchführung erfolgte freundlicherweise durch Frau Ines Stölting aus 20 μl Plasma der Proben von Tag 60.

2.6. Molekulargenetische Untersuchungen der Darmmikrobiom-Analyse

Die im Folgenden geschilderte Darmmikrobiom-Analyse orientierte sich im Wesentlichen an der im „Ibrahim lab“ des Lübecker Instituts für Experimentelle Dermatologie etablierten Methodik (Srinivas et al., 2013).

2.6.1. DNA-Extraktion aus Rattenkot

Zur Bestimmung der Diversität des Darmmikrobioms der Ratten wurde die Gesamt-DNA aus den asservierten Stuhlproben mit dem MoBio PowerLyzer® PowerSoil® DNA Isolation Kit extrahiert. Dazu waren 250 mg der Stuhlproben speziell zu präparieren, um einen repräsentativen Anteil der Probe – vornehmlich Stuhlinneres – aufzuarbeiten. Jede einzelne Probe wurde dazu unter sterilen Bedingungen mit sterilem Instrumentarium geschnitten, eingewogen sowie in ein Röhrchen mit Glaskugeln des DNA Isolation Kits überführt. Anschließend erfolgte das DNA-Extraktions-Verfahren nach dem Protokoll des MoBio PowerLyzer® PowerSoil® DNA Isolation Kit, welches verschiedene Schritte zur Auflösung der im Kot vorhandenen Strukturen bis hin zur Bakterienwand beinhaltet, um die nachher gewonnene DNA als Überstand auf eine Filtermembran zu pipettieren. Weiterführend fanden einige Waschschriffe statt, um eine reine DNA-Proben zu erhalten, die möglichst frei von einer Kontamination mit Proteinen wie Histonen war.

Dazu wurde zunächst zu dem Röhrchen mit den Glaskugeln und der Stuhlprobe 750 µl der „Bead Solution“ hinzupipettiert und auf dem Vortexer gemischt. Nachdem 60 µl C1-Lösung hinzupipettiert und die Reagenzien kurz auf dem Vortexer gemischt worden waren, fand das Homogenisieren der Proben im Precellys® 24 Lysis⁺ (Precellys) – Homogenisator bei einer Geschwindigkeit von 5.000 für 3 mal 15 Sekunden statt. Nach der Homogenisierung wurden die Proben bei 10.000 x g für 30 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert (alle Zentrifugationsschritte in diesem Protokoll erfolgten bei 10.000 x g und Raumtemperatur), um die Zell-Bruchstücke von der in dem Überstand enthaltenen gelösten DNA und Proteinen zu trennen. Dieser Überstand (zwischen 400 und 500 µl) wurde in ein neues Reaktionsgefäß (es wurden in diesem Protokoll immer die im Kit bereitgestellten 2-ml-Collection-tubes verwendet), in das 250 µl C2-Lösung vorgelegt worden waren, pipettiert und auf dem Vortexer vermischt. Danach erfolgte eine Inkubation bei 4°C für 5 Minuten, um Proteine und nicht-organisches Material auszufällen, bevor die Lösung für eine Minute zentrifugiert wurde. Der Überstand (ca. 600 µl) wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert, in das 200 µl C3-Lösung vorgelegt worden waren, auf dem Vortexer vermischt und ebenfalls bei 4°C für 5 Minuten inkubiert, um weitere nicht-DNA-Substanzen auszufällen. Anschließend wurde für eine Minute zentrifugiert und der neue Überstand (ca. 750 µl) in ein neues Reaktionsgefäß transferiert, in das 1200 µl C4-Lösung vorgelegt worden waren, und vorsichtig auf dem Vortexer gemischt. Dann wurden in 3 gleichen Schritten jeweils 650 µl des Gemisches auf einen „Spin Filter“ in einem neuen Reaktionsgefäß pipettiert und für 1 Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert, um letztlich den „Spin Filter“ herauszunehmen, die Durchflussmenge ab zu pipettieren und zu verwerfen. Danach erfolgten die Waschschriffe

mit 500 µl der C5-Lösung (Ethanol), die auf den „Spin Filter“ pipettiert wurde und das Reaktionsgefäß für 1 Minute zentrifugiert wurde. Damit keine Ethanol-Spuren auf dem Spin-Filter verblieben, wurde die Durchflussmenge heraus pipettiert und verworfen, sowie anschließend nochmals für 2 Minuten zentrifugiert. Zuletzt wurde der „Spin Filter“ in ein neues Reaktionsgefäß positioniert und die DNA mit 100 µl der C6-Lösung eluiert. Nach 30 Sekunden in der Zentrifuge konnte der Spin-Filter verworfen werden und die DNA-Probe wurde bis zur weiteren Prozessierung in der PCR bei -20°C zwischengelagert. Während eines Extraktionsprozesses wurden 15 Proben aufgearbeitet und analog ist eine „Leerprobe“ als Negativ-Kontrolle mitgelaufen.

2.6.2. 16S ribosomale RNA Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

Zur Durchführung der phylogenetischen Analyse der Proben ist es notwendig eine in der Evolution der Bakterien zwischen den Spezies hoch konservierte Region des Genoms zu untersuchen. Für die PCR wurden deshalb Primer für das 16S-rRNA-Gen verwendet, das die 16S ribosomale RNA als eine Komponente der kleinen 30S-Untereinheit der prokaryotischen Ribosomen codiert. Jede Probe erhielt dabei ihre eigene forward- und reverse-Primer-Kombination, um nachher aus der generierten DNA-Bibliothek („Library“) die detektierten Sequenzen jeweils den Proben wieder zuordnen zu können. Die verwendeten Primer wurden individuell angefertigt („custom-made-primers“, Firma Metabion) und bereitgestellt von Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie (LIED). Diese anwendungsspezifischen Primer enthielten folgende Sequenzen (Tabelle 2):

Tabelle 2: Anwendungsspezifische Primer-Sequenzen.

Der Aufbau der Sequenzabschnitte der Forward Primer 27F:						
5'-	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC	XXXXXXXX	TATGGTAATT	GT	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	-3'
	5'-Illumina-Adapter B	Individuelle Basen	Primer Pad	Primer Linker	Primer 27 F	

Der Aufbau der Sequenzabschnitte der Reverse Primer 338R:						
5'-	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	XXXXXXXX	AGTCAGTCAG	CC	TGCTGCCTCCCTAGGAGT	-3'
	die komplementäre 3'-Sequenz für den Illumina-Adapter	Individuelle Basen	Primer Pad	Primer Linker	Primer 338R	

Im Anhang sind in Tabelle 15 die acht individuellen Basen, genannt multiplex identifiers (MIDs, in Tabelle 2 gekennzeichnet als „XXXXXXXX“) der verwendeten Primer aufgeführt,

deren Kombination die einzigartige Primer-ID (ID = „Identifier“) zur Detektion der Proben ermöglichte.

Die zu amplifizierenden DNA-Proben wurden aufgetaut, auf dem Vortexer durchmischt, und durch die Tischzentrifuge herunterzentrifugiert und 1:10 mit PCR Grade Water (Ambion TM, Firma Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) verdünnt. Genauso wurde mit den Negativ-Kontrollen aus der Extraktion verfahren. In dem UV-Schaltschrank (DNA-/RNA-UV-Reinigungsbox, UVC/T-M-AR der Firma Biosan), der als Arbeitsbank für das PCR-Pipettieren diente, wurden alle für den PCR-Ansatz zu verwendenden Materialien (Pipetten, Pipetten-Spitzen, 96-PCR-Platte, Reaktionsgefäßgestell, eine transparente adhäsive PCR-Folie sowie eine 2. aus Aluminium, ein Folienstift und zwei 1,5 ml safe-seal-tubes) 30 Minuten unter UV-Licht bestrahlt. In der Wartezeit wurden die Substanzen für den Mastermix (5X Phusion HF Buffer [Firma Thermo Fisher Scientific, USA], PCR Grade Water [Ambion TM, Firma Thermo Fisher Scientific, USA], Desoxynucleosidtriphosphate [dNTPs, Firma Fermentas by Thermo Fisher Scientific, USA]) und die zu verwendenden Primer aus dem -20°C Tiefkühler geholt und aufgetaut.

Alle aufgetauten Reagenzien wurden auf dem Vortexer durchmischt und durch die Tischzentrifuge herunterzentrifugiert. Als Erstes wurde 1 µl der DNA-Proben und Negativ-Kontrollen der Extraktion nach vorgegebenem Schema in die „wells“ der PCR-Platte pipettiert und die Platte mit Aluminium-Folie abgedeckt. Anschließend wurden jeweils 4 µl forward- und reverse-Primer in die Vertiefungen für den Probenansatz pipettiert, so dass jede Probe ihren eigenen Primer-Index erhielt. Jeweils 2 µl der forward- und reverse Primer wurden in die Vertiefungen für die Kontrollansätze hinzu pipettiert, so dass für jeden Primer-Index eine Kontrolle mitlaufen konnte. Die Aluminium-Folie wurde dafür immer nur reihenweise aufgedeckt und anschließend wieder über alle „wells“ gelegt.

PCR-Platte	Forward Primer	MID-1	MID-2	MID-3	MID-4	MID-5	MID-6	MID-7	MID-8	MID-9	MID-10	MID-11	MID-12
Reverse Primer	Well-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MID-A	A	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10	Probe 11	Probe 12
MID-B	B	Probe 13	Probe 14	Probe 15	Probe 16	Probe 17	Probe 18	Probe 19	Probe 20	Probe 21	Probe 22	Probe 23	Probe 24
MID-C	C	Probe 25	Probe 26	Probe 27	Probe 28	Probe 29	Probe 30	Probe 31	Probe 32	Probe 33	Probe 34	Probe 35	Kontrolle Extraktion
	D												
MID-A	E	A1 Kontrolle	A2 Kontrolle	A3 Kontrolle	A4 Kontrolle	A5 Kontrolle	A6 Kontrolle	A7 Kontrolle	A8 Kontrolle	A9 Kontrolle	A10 Kontrolle	A11 Kontrolle	A12 Kontrolle
MID-B	F	B1 Kontrolle	Master-mix-Kontrolle	PCR-grade-Water									
MID-C	G	C1 Kontrolle											
	H												

Abbildung 4: Pipettierschema der PCR-Platte.

Danach wurde der Mastermix aus PCR-grade-Water, 5 x Phusion HF Buffer und dNTPs angesetzt (Tabelle 3). Der Mastermix-Ansatz wurde vor Zugabe der Polymerase auf dem Vortexer durchmischt und durch die Tischzentrifuge herunterzentrifugiert. In dieser Zeit wurde die Polymerase aufgetaut und nachdem sie hinzu pipettiert wurde möglichst rasch wieder eingefroren.

Tabelle 3: Mastermix für den PCR-Ansatz.

Substanz	Volumina in μL	
	Pro Vertiefung für die DNA-Probe	Pro Vertiefung für den Kontrollansatz
PCR-Grade-Water	9,75	5,125
5 x Phusion HF Buffer	5	2,5
dNTPs 10mM	0,5	0,25
Phusion Hot Start II DNA Polymerase (2 U/ μL)	0,25 (\cong 0,5 U)	0,125 (\cong 0,25 U)
Summe	16	8

Von dem Mastermix wurden 16 μL in die wells mit den DNA-Proben und den Extraktions-Kontrollen sowie 8 μL in die wells für den Kontrollansatz pipettiert. Die PCR-Platte wurde im Anschluss mit der transparenten Adhäsions-Folie fest verklebt um sicher zu stellen, dass jedes well einzeln verschlossen ist.

Das PCR-Programm des GeneAmp® PCR System 9700 (Firma Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) durchlief wie in Tabelle 4 dargestellt folgende Bedingungen:

Tabelle 4: PCR-Programm.

Temperatur	Dauer	Zyklen
98 °C	30 Sekunden	
98 °C	9 Sekunden	30 Zyklen
50 °C	1 Minute	
72 °C	90 Sekunden	
72 °C	10 Minuten	
12 °C	unbegrenzt	

Wenn nach Durchlaufen des PCR-Programms nicht unmittelbar die Gel-Elektrophorese erfolgte, wurde die PCR-Platte bei -20°C zwischengelagert.

2.6.3. Die erste Gel-Elektrophorese und Subpooling

2.6.3.1. Anfertigung des Gels für die Gel-Elektrophorese

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden 3 g Argarose (Firma Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) zunächst in 100 ml 1 x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) in einem 500 ml Messbecher in der Mikrowelle für ca. 1 Minute erwärmt, anschließend wurden weitere 100 ml TAE hinzugefügt, um die Lösung abzukühlen. Dann konnten 20 µl Farbstoff (SYBR® Safe DNA Gel Stain, Invitrogen, Firma Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) hinzugefügt werden, um eine Konzentration von 1:10.000 an Farbstoff zu TAE zu erhalten. Anschließend wurde das noch flüssige 1,5%ige Gel in die Elektrophoresekammer (Typ Long Blu der Firma bsb11 - biotech service blu, Kassel, Deutschland) auf einen Gelträger (Firma bsb11 - biotech service blu, Kassel, Deutschland) gegeben und drei 26er-Kämme (Firma bsb11 - biotech service blu, Kassel, Deutschland) zur Ausbildung der Probenaschen eingelegt. Nach ca. 30 Minuten war das Gel ausgehärtet.

2.6.3.2. Aufreinigung der PCR-Produkte in der Gel-Elektrophorese

Zur Aufreinigung der amplifizierten Fragmente (PCR-Produkt) wurde eine Agarose-Gel-elektrophorese durchgeführt, als Transformator für die Gleichspannung diente der PowerPac™ Basic Power Supply (Firma Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA). Zunächst wurden 6 µl der Musterbanden in die erste und letzte Tasche der 3 Kämme pipettiert. Als Musterbande diente der 100 base pair (bp) Plus DNA Ladder (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder 0,5 µg), der mit 6x loading dye (DNA Gel Loading Dye 6X, Thermo Scientific TM) und ddH₂O (double distilled Water) zuvor in einem Verhältnis von 1:1:4 angesetzt wurde. Mit einer Multikanalpipette wurden 5 µl PCR-Produkt aus der 96-Well Platte in eine weitere 96-Well Platte transferiert, die dann jeweils mit 1 µl 6x loading dye vermischt

wurden. Das Gemisch aus PCR-Produkt und 6x loading dye wurde dann mittels Multikanalpipette in die Geltaschen eingebracht, wobei insgesamt 24 Proben (inkl. der Kontrollen aus PCR und Extraktion) zwischen 2 DNA-Musterbanden in einer Reihe abgebildet wurden. Das Gel lief zunächst für 5 Minuten unter einer Spannung von 120 V, und darauf für 70 Minuten unter 110 V.

2.6.3.3. Quantifikation der 450 bp DNA-Banden des PCR-Produktes

Die digitale Dokumentation und Auswertung der Gel-Elektrophorese erfolgte durch das Kamerasystem und die Software des Quantum ST4 (Firma Vilber). Die Belichtungszeit lag bei 320 ms. Mittels des Programms Quantum Capt. V 16.04 wurden dann die PCR-Produkte mit der Größe von 450 Basenpaaren (bp) gemäß der 500 bp-DNA-Musterbande (die 80 ng PCR-Produkt enthält) quantifiziert, in dem die 500 bp-DNA-Musterbande als 100 % festgelegt wurde. Die Größe von 450 bp entspricht dem PCR-Produkt, das durch 16S-rRNA-Primer amplifiziert wurde. Auf diese Weise ließen sich die Mengen an PCR-Produkt in ng errechnen, die in den 450 bp-Banden der Proben enthalten waren. Die Kontrollen der Extraktion und der Primer-Indices wurden bei nicht vorhandenen Gel-Banden nicht in die Quantifikation und die Subpool-Anfertigung miteinbezogen.

2.6.3.4. Anfertigung der Subpools

Durch die Ergebnisse der vorangegangenen Quantifikation der PCR-Produkte in den Gel-Banden ließen sich dann die Volumina (in μl) berechnen, welche von den PCR-Produkten der einzelnen Proben in die subpool pipettiert werden mussten. Dabei wurde die Probe mit der niedrigsten Menge an PCR-Produkt auf 10 μl gesetzt, sowie daraus die äquimolaren Volumina für die anderen Proben des Gel-Kammes errechnet. Es konnten dann alle Proben eines Gel-Kammes in eine Subpool zusammen pipettiert werden, in dem aus den zugehörigen PCR-wells die errechneten Volumina heraus pipettiert und in einem 2 ml Reaktionsgefäß vermischt wurden. Dieser Schritt gewährleistete, dass von jeder Probe eine äquivalente Menge an DNA in eine Subpool gelangt.

2.6.4. Die zweite Gel-Elektrophorese und Anfertigung der Library

2.6.4.1. Aufreinigung der Subpools in der Gel-Elektrophorese

Die Subpools wurden anschließend ebenfalls in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt. Dazu wurde ein 1,5% 300 ml Agarose-Gel hergestellt mit 30 μl Farbstoff (SYBR[®] Safe DNA Gel Stain), um möglichst tiefe Geltaschen für das Hineinpipettieren der Subpools (ma-

ximal 50 µl pro Tasche) zu erhalten. An dieser Stelle wurde ein farbloser Loading Dye verwendet (dyeless loading dye, selbst hergestellt), der im Verhältnis von 1:2,5 zur Subpool hinzupipettiert wurde. Die Gel-Elektrophorese lief für 5 Minuten bei 120 V Spannung und für weitere 70 Minuten bei 110 V. Anschließend wurden die Banden auf Höhe der 500 bp-Bande der Musterbande mit einem speziellen Pipettenaufsatz (X-TRACTA Tips der Firma Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) unter UV-Licht ausgestochen und in ein Reaktionsgefäß ausgeworfen, wobei alle Gelstücke einer Subpool in ein und demselben Reaktionsgefäß gesammelt wurden.

2.6.4.2. DNA-Extraktion aus dem Subpool-Gel

Mit dem GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific TM) wurde die DNA dem Protokoll nach aus den ausgestochenen Gelfragmente extrahiert. Hierbei wurden zu den in einem Reaktionsgefäß gesammelten Gelfragmenten 400 µl Bindungspuffer des Kits pipettiert, bei 800 rpm für 10 Minuten bei 50-60°C inkubiert, bis das Gel sich komplett gelöst hatte. Dann wurde die Gel-Puffer-Lösung auf dem Vortexer gemischt und mit 400 µl Isopropanolol versetzt. Anschließend wurden 800 µl des entstandenen Gemisches auf die GeneJET purification colum in einem Reaktionsgefäß pipettiert und bei 13.000 x g für 1 Minute zentrifugiert. Die Colum wurde herausgehoben und die Durchflussmenge verworfen, bevor erneut 800 µl auf die Colum in dasselbe Reaktionsgefäß pipettiert, zentrifugiert und die Durchflussmenge wieder verworfen wurde. Danach wurden 100 µl Bindungspuffer auf die Colum pipettiert und bei 13.00 x g für 1 Minute zentrifugiert. Die Durchflussmenge wurde abermals verworfen und die Colum anschließend wieder in demselben Reaktionsgefäß positioniert. Anschließend wurden 700 µl Wasch-Puffer (Ethanol) auf die Colum pipettiert und bei 13.000 x g für 1 Minute zentrifugiert, die Durchflussmenge verworfen und die Colum nochmals zurück in das Reaktionsgefäß gestellt. Um die letzten Reste des Wasch-Puffers zu entfernen, wurde die Colum für zusätzlich 1 Minute bei 13.000 x g zentrifugiert. Zuletzt wurde die Colum in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß positioniert und mit 50 µl Elutionspuffer die Subpool-DNA durch einminütiges Zentrifugieren bei 13.000 x g gewonnen. Die Colum wurde anschließend verworfen und die Subpool-DNA bis zur weiteren Prozessierung bei -20°C gelagert.

2.6.4.3. Quantifikation der 450 bp DNA-Banden der Subpools

Bevor alle Subpools zu einer Library zusammen pipettiert wurden, musste die Konzentration der DNA in den Subpools mit einem ds DNA Fluorometer (Qubit® 2.0 Fluorometer, Firma Invitrogen by Life technologies) gemessen werden. Dabei wurde das Qubit® dsDNA HS Assay Kit verwendet, nach dessen Protokoll zunächst 2 Standardlösungen pipettiert

werden müssen, um den Fluorometer zu kalibrieren und im Anschluss die Proben analysieren zu lassen. 10 µl der Standards wurden dabei in 190 µl „Arbeitslösung“ aus dsDNA HS Reagent 1:200 dsDNA HS Buffer gelöst, sowie 2 µl der Proben in 198 µl „Arbeitslösung“. Analog zum Anfertigen der Subpools unter Punkt 2.6.3.4. wurden nun aus den Konzentrationsergebnissen der Fluorometer-Messung die zu pipettierenden Mengen (in µl) aus den einzelnen Subpools berechnet, so dass letztlich in der Library äquivalente Mengen von PCR-Amplicons jeder Probe auftraten. Danach wurde aus den berechneten Volumina aller Subpools eine Library generiert.

2.6.5. Aufreinigung der Library

Mittels einer Ampure Bead Purification wurden die PCR-Produkte der Library aufgereinigt. In diesem Verfahren binden PCR-Amplicons an magnetische Kugeln und werden in mehreren Waschschritten von nicht eingebauten Desoxynukleotiden, Primern und Primer-Dimere, Salzen und anderen Kontaminationen gesäubert.

Dazu wurden 40 µl der Library mit 70 µl AMPure XP-Lösung (Verhältnis ca. 1:1,8) in einer Vertiefung einer 96-PCR-Platte sorgfältig über die Pipette vermischt und anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die PCR -Platte wurde dann auf einer Magnetplatte (Agencourt SPRIPlate 96 Super Magnet Plate) für 2 Minuten platziert, um die an die magnetischen Kugeln gebundenen PCR-Amplicons von der restlichen Lösung zu trennen. Von der dann klaren Flüssigkeit wurden 100 µl herauspipettiert und verworfen, 5-10 µl Überstand verblieben im „well“, um zu garantieren, dass die magnetischen Kugeln nicht mit verworfen wurden. Nach 5-10 weiteren Minuten bei Raumtemperatur auf der Magnetplatte Trocknungszeit, wurde die PCR-Platte von der Magnetplatte heruntergenommen und 20 µl „Elution buffer“ (hier wurde die C6-Lösung aus dem MoBio PowerLyzer® PowerSoil® DNA Isolation Kit verwendet) hinzupipettiert und sorgfältig über die Pipette vermischt. Nach 2 Minuten Inkubationszeit wurde die PCR-Platte wieder für eine Minute auf die Magnetplatte platziert. Das so entstandene Eluat der aufgereinigten Library wurde im Anschluss in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C im Tiefkühlschrank gelagert.

2.6.6. Quantification der Library via qPCR

Für die Real-time-PCR wurde das NGS Library Quantification qPCR Kit (Quanta BioSciences) verwendet. Mit der Hilfe von Standards und speziellen Primer-Sets wurden hierbei die Proben der Library quantifiziert, die den entsprechenden Adapter am Ende des PCR-Amplicons besitzen, der im Sequenzierungsverfahren als geeignetes template dienen sollte.

Im ersten Arbeitsschritt wurden 100 µl des 10 X Library Dilution Buffer des Kits mit 900 µl PCR Grade Water verdünnt zum 1 X Dilution Buffer. Dann wurde der Master-Mix („reaction cocktail“) für die qPCR wie in Tabelle 5 aufgeführt angesetzt:

Tabelle 5: Mastermix für die qPCR („reaction cocktail“).

Substanz	Volumina in µl	
	Pro Vertiefung	Für 30 Vertiefungen
PerfeCta SYBR Green SuperMix ROX (2X)	10	300
Illumina Primer Mix (10 µM)	0,6	18
Nuclease-free water	5,4	162
Summe	16	480

In einem nächsten Schritt wurden die Verdünnungen der Library wie folgt angesetzt:

- 1:20-fache Verdünnung: in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 2 µl aus der Library zu 38 µl des 1 X Dilution Buffer hinzupipettiert, auf dem Vortexer durchmischt und durch die Tischzentrifuge herunterzentrifugiert.
- 1:2000-fache Verdünnung: in einem 2. 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 2 µl der 1:20-Verdünnung zu 198 µl des 1 X Dilution Buffer hinzupipettiert, auf dem Vortexer durchmischt und durch die Tischzentrifuge herunterzentrifugiert.
- 1:20.000-fache Verdünnung: in einem drittem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 5 µl der 1:2000-Verdünnung zu 45 µl des 1 X Dilution Buffer hinzupipettiert, auf dem Vortexer durchmischt und durch die Tischzentrifuge herunterzentrifugiert.
- 1:200.000-fache Verdünnung: in einem viertem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 5 µl der 1:20.000-Verdünnung zu 45 µl des 1 X Dilution Buffer hinzupipettiert, auf dem Vortexer durchmischt und durch die Tischzentrifuge herunterzentrifugiert.

Jeweils 56 µl des Master-Mix wurden in Spalte 8 Reihe A bis H einer 96-PCR-Platte sowie Spalte 9 Reihe A pipettiert, mit jeweils 14 µl Dilution Buffer, Standard 1-5 oder der Library-Verdünnungen der verschiedenen Konzentrationen vermischt (Abbildung 5). Mit einer Multikanalpipette wurden je 20 µl in die zugehörigen Wells der Spalten 1-3 und 5-7 transferiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	NTC	NTC		V3	V3	V3	56+14	56+14			
B	Std 1	Std 1	Std 1					56+14				
C	Std 2	Std 2	Std 2					56+14				
D	Std 3	Std 3	Std 3					56+14				
E	Std 4	Std 4	Std 4					56+14				
F	Std 5	Std 5	Std 5					56+14				
G	V1	V1	V1					56+14				
H	V2	V2	V2					56+14				

Abbildung 5: Pipettierschema der 96-well-Plate für die qPCR. In Spalte 8 und 9 wurden in die mit 56+14 beschrifteten wells jeweils 56 µl des Master-Mix vorgelegt und 14 µl der in den Reihen A-H vorgegebenen Lösungen hinzupipettiert und sorgfältig vermischt. NTC: 1X dilution buffer; Std 1-5: Standard 1-5 des NGS Library Quantification qPCR Kits; V1: 1:2000fache Verdünnung der Library; V2: 1:20.000fache Verdünnung der Library; V3: 1:200.000-fache Verdünnung der Library.

Die qPCR lief auf dem Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System, das uns freundlicherweise vom Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck zur Nutzung bereitgestellt wurde. Das Programm der qPCR durchlief wie in Tabelle 6 dargestellt folgende Bedingungen:

Tabelle 6: Real-time qPCR-Programm.

Temperatur	Dauer	Zyklen
95 °C	3 Minuten	
95 °C	10 Sekunden	35 Zyklen
60 °C	20 Sekunden	
72 °C	45 Sekunden	

Anhand der Standardkurve konnte die durchschnittliche Konzentration der Library in pM berechnet werden. Entsprechend der Empfehlung des NGS-Kits wurde die Konzentration der Library in der 1:20.000 Verdünnung auf die Größe der PCR-Amplicons justiert, in dem sie mit dem Quotienten aus 426 ($\hat{=}$ durchschnittliche Fragmentlänge der Illumina PCR-Produkte) zu 454 bp ($\hat{=}$ durchschnittliche Fragmentlänge der Library) multipliziert wurde. Dann wurde die Konzentration der Library auf 4 nM in 20 µl umgerechnet, um eine Clusterdichte von ca. 30K-Clustern während der Sequenzierung zu erreichen. So erhielt man die finale Verdünnung der Library mit PCR-grade Water für den Sequenzierungslauf.

2.6.7. Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte in einem Next-Generation-Sequencing (NGS)-Verfahren durch den Einbau und die anschließende Detektion von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden. Das Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck stellte für dieses Projekt freundlicherweise ihr MiSeq-Gerät zur Verfügung.

Die Library musste für dieses Verfahren denaturiert, verdünnt und auf eine „Miseq reagent cartridge“ geladen werden, um den Sequenzierungsdurchlauf auf dem Illumina-MiSeq-Gerät starten zu können. Dazu wurde das kommerziell erwerbliche MiSeq® Reagent Kit v3 (2 x 300 bp reads) der Firma Illumina, San Diego, Kalifornien, USA verwendet.

Die „reagent cartridge“ (im Folgenden Kartusche genannt) wurde aus dem -20°C Tiefkühlschrank über Nacht bei 4°C aufgetaut. Bis zum Beladen der Kartusche mit der Library wurde diese zunächst auf Eis zwischengelagert.

Im nächsten Schritt wurde eine frische Lösung NaOH (800 µl Laboratory Grade Water vermischt mit 200 µl 1.0 N NaOH) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß angesetzt. 5 µl aus der Library wurden zu 5 µl der NaOH-Lösung in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert, auf dem Vortexer vermischt und bei 280 x g für 1 Minute in der Tischzentrifuge herunterzentrifugiert. Dann inkubierte diese Lösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur, um die DNA in Einzelstränge denaturieren zu lassen. Zu den 10 µl der denaturierten DNA wurden 990 µl des HT1 (Hybridization Buffer) hinzu pipettiert, um die Denaturierung zu stoppen. Aus diesen 1000 µl aus denaturierter DNA und HT1 wurden wiederum 300 µl mit weiteren 300 µl HT1 verdünnt und auf Eis zwischengelagert.

Im Anschluss musste die Phi X Control V3 Library analog zu der Library-Probe denaturiert und verdünnt werden, die Arbeitsschritte sind folgend in Tabelle 7 gegenübergestellt.

Tabelle 7: Denaturierungs- und Verdünnungsschritte der Library und PhiX Library.

	Library			Control: PhiX Library		
Aufbereitung	Ausgangskonzentration			Ausgangskonzentration	Vorgehen	Endkonzentration
	4 nM			10 nM	2 µl PhiX Library + 3 µl Tris-Cl (10 nM, pH 8,5 mit 0,1% Tween)	4 nM
Denaturierung	5 µl der Library-DNA + 5 µl NaOH (0,2 N) Vortexen; bei 280 G für eine Minute zentrifugieren; Inkubationszeit von fünf Minuten bei Raumtemperatur.			5 µl der PhiX Library-DNA + 5 µl NaOH (0,2 N) Vortexen; bei 280 G für eine Minute zentrifugieren; Inkubationszeit von fünf Minuten bei Raumtemperatur.		
1. Verdünnung	Ausgangskonzentration	Vorgehen	Endkonzentration	Ausgangskonzentration	Vorgehen	Endkonzentration
	2 nM	10 µl denaturierte Library-DNA (2 nM) + 990 µl HT1	20 pM	2 nM	10 µl denaturierte PhiX Library-DNA (2 nM) + 990 µl HT1	20 pM
2. Verdünnung	Ausgangskonzentration	Vorgehen	Endkonzentration	Ausgangskonzentration	Vorgehen	Endkonzentration
	20 pM	300 µl denaturierte Library-DNA (20 pM) + 300 µl HT1	10 pM	20 pM	375 µl denaturierte PhiX Library-DNA (20 pM) + 225 µl HT1	12,5 pM

Schließlich wurden 60 µl der hergestellten 12,5 pM Verdünnung der denaturierten PhiX Library zu 540 µl der denaturierten Library-DNA in der Endkonzentration von 10 pM in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß hinzu pipettiert und auf Eis zwischengelagert.

Die Primer für das NGS-Verfahren am Illumina MiSeq mussten ebenfalls verdünnt werden: jeweils 3 µl der 100 µM anwendungsspezifischen forward 27F (Sequenz: 5` TATGGTAATT GT AGAGTTTGATCCTGGCTCAG `3, Anhang Tabelle 15; Firma Metabion), reverse 338R (Sequenz: 338R: 5` AGTCAGTCAG CC TGCTGCCTCCCGTAGGAGT `3, Anhang Tabelle 15, Firma Metabion) und Index Primer (Sequenz: 5` ACTCCTACGGGAGGCAGCA GG CTGACTGACT `3) wurden zu jeweils 597 µl HT1 hinzupipettiert um eine Endkonzentration von 0,5 µM zu erhalten. Danach wurden 60 µl read1primer Mix aus Position 12 der Kartusche heraus pipettiert und zu 540 µl der 27F primer-Verdünnung pipettiert.

Unmittelbar vor Einlegen der Kartusche in das Illumina-MiSeq wurde diese wie folgt beladen (Tabelle 8):

Tabelle 8: Beladung der reagent cartridge für das NGS.

Position auf der Kartusche	Substanz	Volumen in µl
17	Gemisch aus der denaturierten und verdünnten Library-DNA (10 pM) mit anteilig 10% der 12,5 pM PhiX Library	600
18	Gemisch aus den verdünnten 27F-Primer mit anteilig 10% read1primer Mix	600
19	Index Primer	600
20	Verdünnung der 338R-Primer	600

In das Illumina MiSeq-Gerät wurde ein „sample sheet“ im CSV-Dateiformat (CSV = „Comma-separated values“) eingelesen, das die Angaben der für jede Probe alleinigen Primer-Kombination enthielt.

Die Sequenzierung der Library erfolgte auf dem Illumina MiSeq-Gerät durch die V3 cartridge mit einem Paired-End-Lauf (2 x 300 base reads) im metagenomics workflow Modus.

2.7. Auswertung und Statistische Methoden

2.7.1. Statistische Analysen der Phänotypisierung

Die statistischen Analysen für die erhobenen Messdaten der Tiere (Körpergewichtsentwicklung, Energieaufnahme, Fettvolumina, Ergebnisse der Funktionsteste, Hormon-, Glucose und Triglycerid-Bestimmungen aus dem Plasma sowie die Multiplex-Assay-Ergebnisse) wurden mit dem Programm GraphPad Prism der Version 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde zu Beginn des Forschungsprojektes $\alpha = 0,05$ festgelegt und bei einem p-Wert $\leq 0,05$ die Nullhypothese verworfen und der Unterschied als statistisch signifikant interpretiert.

Die Messdaten wurden mittels Grubbs' test (www.graphpad.com/quickcalcs) auf signifikante Ausreißer untersucht. Lag ein Messwert außerhalb der 4. Standardabweichung wurde er von der weiteren statistischen Auswertung ausgeschlossen.

Alle Daten wurden auf eine Normalverteilung und Varianzhomogenität überprüft. Bei normalverteilten Werten, stetigen Messgrößen und unverbundenen Stichproben wurde die Nullhypothese mit einem „1way ANOVA“ (one-way analysis of variance), wenn die Varianzen zwischen den Gruppen nicht unterschiedlich waren, und durch den „Tukey's multiple comparison Test“ verifiziert. Bei unterschiedlichen Varianzen zwischen den Gruppen wurde die Nullhypothese mit dem Brown-Forsythe und Welch ANOVA überprüft und durch den „Games-Howell's multiple comparison Test“ verifiziert. Bei 2 zu berücksichtigenden Fakto-

ren (Behandlung über die Zeit) wurde die Nullhypothese mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse („2way ANOVA“) überprüft und durch den „Dunnnett Multiple Comparison Test“ verifiziert. Wenn keine Normalverteilung gegeben war, wurde die Nullhypothese mit dem „Kruskal-Wallis-Test“ überprüft und als Post-hoc Test wurde der „Dunn’s Multiple Comparison Test“ verwendet.

Zur Quantifizierung der Effekte der Plasma-Konzentrationsänderungen von Glukose, Insulin und Glukagon über den Studienzeitraum wurde die Fläche unter der Kurve (Area Under the Curve, AUC) für jedes Tier unter Verwendung der Deltawerte individuell berechnet. Der lineare Zusammenhang von Energieaufnahme und Leptinspiegel wurde für die CON- und CD-Gruppe mit dem „Pearson-Test“ berechnet, wobei eine Gauss’sche Verteilung vorausgesetzt wurde. Die eingezeichnete Korrelationsgerade wurde anhand linearer Regression erstellt.

In den abgebildeten Tabellen wurde stets der Mittelwert \pm Standardfehler aufgeführt, bei Ausnahmen ist dieses in der entsprechenden Tabellenbeschriftung angegeben. Die Darstellung in den Säulendiagrammen zeigt als Punktwolke alle Mittelwerte der Gruppe an, die Stichprobengröße ist numerisch in der Säule angegeben und die Höhe der Säule entspricht dem Mittelwert, als Streuungsmaß ist die Standardabweichung eingezeichnet. In Liniendiagrammen oder XY-Graphen werden Mittelwert \pm Standardfehler verwendet. In den gestapelten Säulendiagrammen zur anteiligen Darstellung der Energieaufnahme als Cafeteria-Diät oder Chow-Futter sowie der subkutanen und viszeralen Fettmasse wird der Mittelwert \pm Standardabweichung verwendet.

Für die Auswertung der Körpergewichts- und Energieaufnahmedaten erfolgte die Beschränkung auf die Messwerte bis zum Studientag 72 (Abbildung 3). Ausgeschlossen wurden demzufolge die Messdaten, die dem Insulintoleranztest unterlagen, in denen die Energieaufnahme durch den Untersucher artifiziell verändert wurde, sowie die durch die Narkose für die MRT-Untersuchung beeinträchtigten Werte. Die Berechnung der Energieaufnahme erfolgte aus der Differenz von Futterein- und auswaage multipliziert mit dem Faktor 11,7 kJ pro gramm Chow-Futter und 20,3 kJ pro gramm Cafeteria-Diät. Die Gewichtszunahme wurde berechnet von Tag 1 bis Tag 72.

2.7.2. Prozessierung der Rohdaten der indirekten Kalorimetrie

Die Rohdaten der sensor-erfassten Messwerte der O₂- und CO₂-Konzentrationen der Käfigluft sowie der Futter- und Wasserentnahme und des Bewegungsverhaltens der Tiere im Abstand von jeweils 20 Minuten unterlagen einer Prozessierung und Filterung, bevor sie für

die statistische Auswertung herangezogen werden konnten. Zunächst wurde für alle „Einschleus-Gruppen“ ein möglichst einheitlicher Zeitpunkt 0' festgelegt, um Diskrepanzen der verschiedenen Uhrzeiten der am ersten Tag durchgeführten Messung auszugleichen. Dieser Zeitpunkt wurde zu Beginn der Dunkelphase (Dunkelphase von 14 bis 2 Uhr) gewählt. Ausgehend von Zeitpunkt 0' wurden die Messdaten in XY-Datenblatte des Statistikprogramms Graphpad Prism, Version 8, eingefügt und auf XY-Graphen dargestellt. Entsprechend des nachtaktiven Verhaltens der Nager wurde aus den Messdaten des mittleren 6-Stundenintervalls jeweils der Dunkel- und Hellphasen separat der Mittelwert gebildet. Aus den jeweiligen Mittelwerten der 3 Beobachtungstage und -nächte wurde letztlich der Mittelwert berechnet, der in die weiteren statistischen Analysen eingeflossen ist (siehe 2.8.1.).

2.7.3. Bioinformatische Auswertung der Sequenzierungsdaten

Die bioinformatische Auswertung der Sequenzierungsdaten erfolgte freundlicherweise durch Dr. Axel Künstner aus dem Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie.

Die Rohdaten aus der Illumina-MiSeq-Analyse beinhalteten für jede in der Sequenz identifizierte Base einen Quality-Score. Dieser Quality-Score ermöglichte in den weiteren Schritten die Herausfilterung von „mismatch“-Basenpaaren und von Basen, die keine gute Sequenzierqualität aufwiesen.

Für die weitere Verarbeitung erfolgte die Umwandlung der Rohdaten in das FastQ-Dateiformat. Dabei wurden die Sequenzen anhand der Primer-ID, die wie ein Barcode für jede Probe einzigartig ist, den Proben zugeordnet („Demultiplexing“) und als FastQ-Datei gespeichert. In den FastQ-Dateien, die ein textbasiertes Format zur Präsentation der Sequenzdaten darstellte, waren sowohl die zu der Probe zugehörige DNA-Sequenz, als auch deren Quality-Scores enthalten.

In der MiSeq-Analyse wurde die Library in 2 unabhängigen Schritten abgelesen und sequenziert (Paired-end-sequencing). So erhielt man pro Probe 2 Sequenzen (read 1 und read 2 mit einer Länge von ca. 300 Basenpaaren). Mithilfe des Programms Vsearch (Version v2.6.2) wurden diese beiden „reads“ nun zu einem „contig“ fusioniert („merge reads“), der eine Größe von 270 bis 380 Basenpaaren hatte und auf eine geringe Qualität gefiltert. Die Fusion beinhaltete die Übereinanderlagerung der Basenabfolge und erlaubte 25 Fehlpaarungen („mismatches“), womit man bei einer Fehlerquote < 10 % endete. Ist eine Fehlpaarung aufgetreten, wurde diejenige Base für richtiger erkannt, die den höheren Quality-Score hat.

Mit einem maximal expected error von 0,75 wurden die erzeugten „contigs“ gefiltert. Des Weiteren mussten chimeras herausgefiltert werden, bei denen es sich um PCR-Artefakte

handelte, die hier definiert wurden als DNA-Sequenzen, die biologisch nicht vorkommen. Hierzu wird als Referenz die RDP Gold database (Version 9) via Vsearch herangezogen.

Um die taxonomische Klassifizierung durchführen zu können, wurden die FastQ-Dateien in anschließend Fasta-Dateien umgewandelt, welche letztlich nur noch die DNA-Sequenzen der Proben in Textform enthielten.

Die DNA-Sequenzen der Proben wurden zu operativen taxonomischen Einheiten (OTU) geclustert mithilfe von Uparse (implementiert in USearch, Version 10.0.240). Jeder OTU wurde eine entsprechende Taxonomie zugewiesen mithilfe von Sintax (USearch). Die Tabelle der OTUs wurde mit Vsearch (command usearch_global) erstellt. Für die phylogenetische Abstammungs-Rekonstruktion wurden die OTUs mit Mothur (v1.39.5, <https://github.com/mothur/mothur/releases>) und SILVA 123 (<https://www.arb-silva.de/documentation/release-123/>) ausgerichtet („alignement“).

Die Vorverarbeitung der Sequenzierungsdaten ergab 3512-46.456 „contigs“ pro Probe (MW: 21.914 ± 11.327, Median 19.558 ± 13.116). Danach wurden für jede Probe 7000 Sequenzen randomisiert ausgewählt, um die unterschiedliche Anzahl an Sequenzen in den verschiedenen Proben zu normieren. Dieses resultierte in 1333 OTUs in 173 Proben, insgesamt waren 180 Proben in die Sequenzierung eingeflossen, von denen 7 aufgrund einer zu niedrigen „contigs“-Anzahl ausgeschlossen werden mussten.

2.7.4. Statistische Analysen der DNA-Sequenzierungs-Ergebnisse

Die gesamten statistischen Analysen für die Mikrobiomanalyse wurden in R Version 3.6.0 durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde zu Beginn des Forschungsprojektes $\alpha = 0,05$ festgelegt und bei einem p-Wert $\leq 0,05$ die Nullhypothese verworfen und der Unterschied als statistisch signifikant interpretiert. Die Darstellung der Ergebnisse der Sequenzierung beschränkt sich hauptsächlich auf die Probezeitpunkte Tag -11 (Ankunft im Labor, „arrival“), Tag -3 (vor Beginn der Studie) und Tag 60 (nach 2 Monaten Diät und Therapie).

Für die unter 2.8.2. beschriebenen OTUs wurde eine Aufstellung generiert, in der für jede OTU aufgezeigt ist, mit welcher Häufigkeit diese in jeder Probe auftaucht. Mithilfe des R Pakets „vegan“ (Version 2.4-6) wurde dann die alpha- und beta-Diversität (Bray-Curtis-Verschiedenheits-Index) berechnet, sowie der phylogenetische Abstand nach der Faith-Methode.

Die alpha-Diversität, auch Punktdiversität, ist ein Maß für die Artenvielfalt. Sie gibt die Anzahl der Arten in den einzelnen Gruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten wieder. Be-

rechnet wurde sie mit dem Chao-1-Index. Als Nulllinie wurde die alpha-Diversität aller Proben der Tiere bei Ankunft im Labor an Tag -11 festgelegt (Pooled Arrival). Zur graphischen Darstellung der alpha-Diversität wurde ein Violin-Plot erzeugt. Bei nicht normal verteilten Werten sowie stetigen und unverbundenen Messgrößen überprüften wir die Nullhypothesen mit dem „Mann-Whitney *U*-Test“:

H_0 : Pooled-arrival = CON -3; Pooled-arrival = CD -3; Pooled-arrival = TEL -3; Pooled-arrival = PF -3.

Wurden mehr als 2 Gruppen oder Probezeitpunkte verglichen, wurde die Nullhypothese bei nicht normal verteilten Werten stets mit dem „Kruskal-Wallis-Test“ überprüft (s.o.):

H_0 : CON -3 = CD -3 = TEL -3 = PF -3.

Als Post-hoc Test kam hier der „Dunn Test“ (mit „Benjamini-Hochberg Korrektur“ für multiples Testen) zur Anwendung. Dabei wurde die alpha-Diversität stets innerhalb der Gruppe auf signifikante Veränderungen überprüft sowie auch alle Probenzeitpunkte der 4 Gruppen gegeneinander.

Die beta-Diversität ist ein Maß für den Unterschied in der Artenvielfalt. Sie wird umso größer, je weniger Arten die untersuchten Proben gemeinsam haben. Zur Berechnung der beta-Diversität wurde der „Bray-Curtis-Index“ verwendet. Zur statistischen Auswertung der „Bray-Curtis-Dissimilarity“ wurde ein Anpassungsgüte-Test („Goodness-of-fit test“) basierend auf der Hauptkoordinatenanalyse (engl.: principal coordinate analysis, PCoA) einer Distanzmatrix angewendet und zur Berechnung der signifikanten Werte für jeden Faktor 9,999 Permutationen durchgeführt. Die 1. und 3. Achse der PCoA wurden graphisch dargestellt.

Ergänzend zur PCoA-Analyse wurden die Sequenzierungsergebnisse für die Proben von Tag 60 in einer „BORAL“ (Bayesian Ordination and Regression Analysis of Multivariate Abundance Data) visualisiert. Diese graphische Darstellung erfolgte anhand der Analyse der Proben der 4 Gruppen hinsichtlich ihrer Artenzusammensetzung kombiniert mit den relativen Häufigkeiten dieser Arten.

Für die vergleichenden phylogenetischen Analysen wurden zur graphischen Darstellung gestapelte Säulendiagramme gewählt, die die Dichte des Vorkommens der Bakterien im Darmmikrobiom der Ratten auf Phylum- (Stamm-) und Familien-Ebene zeigen.

Die F/B-Ratio wurde analog zu alpha-Diversität ausgewertet: zunächst wurde die B/F-Ratio aller Tiere bei Ankunft („pooled arrival“) als Nulllinie festgelegt und mittels eines *U*-Test nach

Mann-Whitney gegen Tag-3 der einzelnen Gruppen überprüft. Die weiteren Probenzeitpunkte zwischen den Gruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test überprüft. Zur graphischen Darstellung der F/B-Ratio wurde ein Violin-Plot erzeugt.

Für die Proben von Tag 60 wurde eine Enterotyp-ähnliche Clustering-Analyse (im Folgenden als „Enterotype like Analysis“ bezeichnet) angefertigt, die Durchführung erfolgte entsprechend der publizierten Verfahren basierend auf Jensen-Shannon-Divergenz (Arumugam et al., 2011). Zur graphischen Darstellung der Enterotypen wurde ein PCoA-Plot sowie ein gestapeltes Säulendiagramm gewählt.

Außerdem wurde für die Proben von Tag 60 eine „Bacterial Co-occurrence Network“ Analyse angefertigt unter der Verwendung von SPIEC-easi v1.0.2 mit 1.000 Iterationen, Stars Criterion (Stability Approach to Regularization Selection) und der Meinshausen und Bühlmann Methode (Kurtz et al., 2015). Damit lassen sich Rückschlüsse auf bakterielle Gemeinschaftsnetzwerke und deren Stabilität ableiten. Dazu wurde der „Kleinberg’s hub score“ berechnet, ein Algorithmus für Zentralität-Scores, mithilfe dessen sich Aussagen treffen lassen über den Vektor der Verbindungen der Taxa des Netzwerks. Als weitere Merkmale der Knotenpunkte der Netzwerke wurde deren Bedeutung als „PageRank Index“ analysiert, welcher auf der Qualität der Verbundenheit dieser Knotenpunkte basiert, und deren Korrelation als „Node degree“, welche auf der Anzahl der Verbindungen der einzelnen OTUs basiert. Die Gruppenunterschiede der Indices wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test überprüft, die Darstellung des „PageRank Index“ und „Node degree“ erfolgte in Violin-Plots. Die graphische Darstellung der Netzwerk-Stabilität erfolgte in einem Liniendiagramm.

Des Weiteren wurden für die verschiedenen Gruppen „Indicator species“ ermittelt. Indicator species sind OTUs, die spezifisch für diese Gruppe sind. Anhand dieser Indicator species lassen sich letztlich die verschiedenen untersuchten Gruppen auf die Häufigkeit des Vorkommens dieses OTUs überprüfen. Darüber hinaus erfolgte eine Analyse der unterschiedlichen Abundanzen der OTUs in den 4 Gruppen mittels DESeq2. Dieses Verfahren ermöglicht eine differenzierte quantitative Auswertung jener Zählungsdaten (wie viele „read counts“ pro Gen in einer DNA-Sequenz) um systematische Änderungen unter experimentellen Bedingungen nachzuweisen. Dabei wird dafür korrigiert, dass die Daten einer negativ-binominalen Verteilung folgen (wenige OTUs mit vielen counts und sehr viele OTUs mit wenig bis sehr wenig counts). Die Berechnung erfolgt mittels eines log₂-fold change (l₂fc), welcher die Differenz der Abundanzen der OTUs auf der log₂ Skala angibt. Vorteil ist dabei, dass durch diese Skalierung die Differenzen übersichtlicher gehalten werden, da teilweise über mehrere 10er Potenzen hinweg verglichen werden muss.

Zuletzt wurden die Daten mit Hilfe eines „machine learning“ Verfahrens klassifiziert. Dafür wurde Random Forest als Methode gewählt, um die 4 verschiedenen Gruppen und die 6 unterschiedlichen Probenzeitpunkte durch den Algorithmus klassifizieren zu lassen. Hierfür wurde das „caret“ Paket (Version 6.0.71) für Revolution R Open (RRO, Version 3.2.2) verwendet. Es wurden hierbei 80 % der Daten als Trainingsdaten eingesetzt, um das Klassifikationsmodell zu erzeugen, durch das schließlich die übrigen 20 % der Daten als Testdaten in die verschiedenen Gruppen eingeteilt werden. Als statistisches Testverfahren wurde anschließend ein 5-faches-Kreuzvalidierungsverfahren mit 100 Wiederholungen angewendet.

3. Ergebnisse

3.1. Ausbildung des Phänotyps

3.1.1. Körpergewichtsentwicklung

Die Randomisierung anhand des Körpergewichts (s. 2.1.1.) erzielte eine gleichmäßige Verteilung der Tiere in die 4 Gruppen, so dass bei Studienbeginn kein Gruppenunterschied bestand (Abbildung 6-A). Im Studienverlauf zeigte sich eine unterschiedliche Gewichtszunahme (Anhang Tabelle 16, Abbildung 6-B): Die Tiere der CD-Gruppe wiesen im Vergleich zu denen der CON-, TEL- und PF-Gruppe ein höheres Körpergewicht (684 ± 18 g) sowie die stärkere Gewichtszunahme von 436 ± 16 g (Abbildung 6-C) auf. Zudem war sowohl der Bauchumfang der CD-Tiere größer ($24,6 \pm 0,4$ cm, Abbildung 6-D), als auch der Body-Mass-Index ($8,4 \pm 0,2$ kg/m², Abbildung 6-E). Trotz Cafeteria-Diät waren die Telmisartan-behandelten Ratten (567 ± 13 g) nicht schwerer als die CON-Ratten (597 ± 11 g) und zeigten keine relevanten Unterschiede in Bauchumfang und BMI. Die pair-feed-Methode führte in PF zu einer ähnlichen Körpergewichtsentwicklung wie bei TEL und CON.

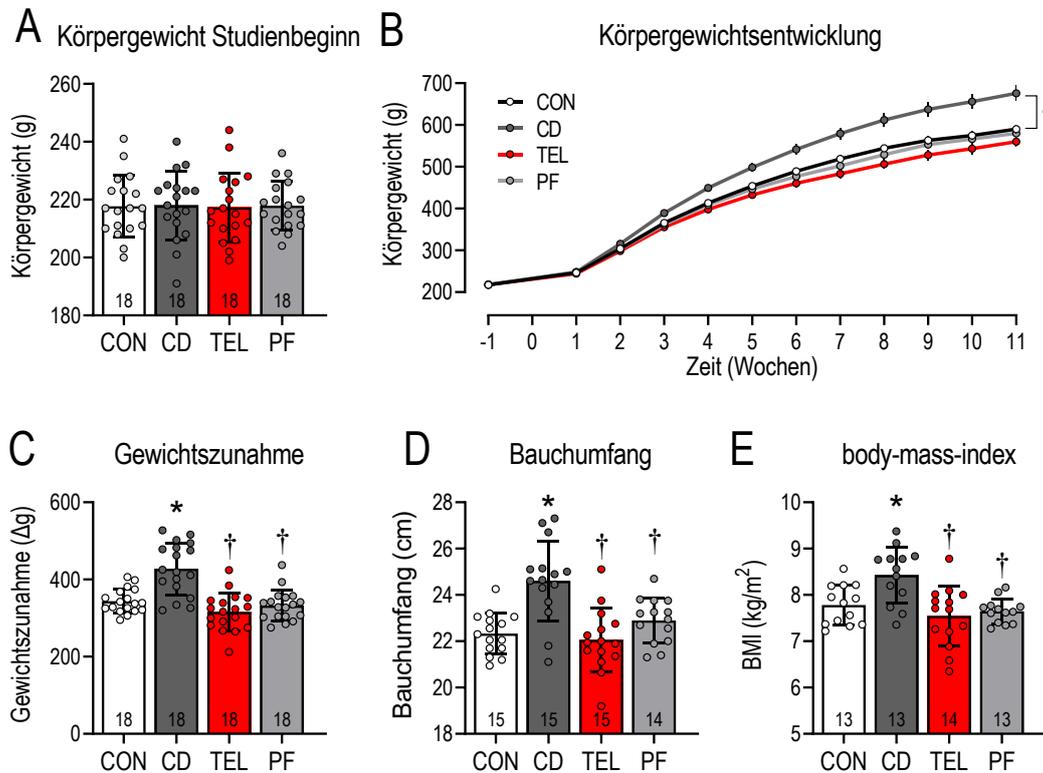


Abbildung 6: Körpergewichtsentwicklung in den unterschiedlichen Versuchsgruppen. Körpergewicht vor Behandlungsbeginn (A), Entwicklung über 11 Wochen, * $p < 0,05$ vs. CON [2-way ANOVA + Dunnett's multiple comparison test, $F_{time} = 3184$, $p < 0,05$; $F_{treatment} = 14,3$, $p < 0,05$, $F_{interaction} = 16,3$, $p < 0,05$] (B), absolute Gewichtszunahme [$F^* = 18,96$] (C), Bauchumfang [$F^* = 11,89$] (D) und BMI [$F^* = 7,95$] (E);

* $p < 0.05$ vs. CON, † $p < 0.05$ vs. CD (Brown-Forsythe ANOVA + Games-Howell's multiple comparisons test).

3.1.2. Futteraufnahme und Fressverhalten

Zu Beginn der Studie zeigte sich kein Unterschied in der Menge der aufgenommenen Energie zwischen den 4 beobachteten Gruppen (Anhang Tabelle 17). Die Darstellung der Energieaufnahme über den Studienzeitraum zeigt, dass mit Beginn der Cafeteria-Diät ein steiler Anstieg sowohl in der CD-Gruppe als auch in TEL und PF zu verzeichnen war. Dieser fiel bei den TEL-Ratten in Woche 2 bereits wieder ab, während die CD-Ratten zu diesem Zeitpunkt ihre maximale Menge an Energie aufnahmen, welche im weiteren Studienverlauf bis zum Beginn der futterlimitierenden Funktionsteste in Woche 11 stets über dem Niveau der TEL- und somit auch PF-Tiere sowie über dem der CON-Tiere lag (Abbildung 7-A).

Nach 10 Wochen Diät und Therapie war die kumulative Energiemenge in der CD-Gruppe am größten (Abbildung 7-B). Des Weiteren hatte die TEL-Gruppe eine größere Energiemenge aufgenommen als die CON-Gruppe, zwischen TEL und PF zeigte sich keine relevante Verschiedenheit (Abbildung 7-B). Betrachtet man lediglich den prozentualen Anteil der Cafeteria-Diät an der gesamten Energiemenge, zeigte sich zwischen den 3 Gruppen mit Zugang zu dieser Diät kein Unterschied: die CD-Tiere fressen zu $61,4 \pm 2,3$ % die Schoko- und Keksriegel, die TEL-Tiere zu $62,5 \pm 2,8$ % und die PF-Tiere zu $62,0 \pm 1,8$ % (Abbildung 7-C).

Untersuchungen zum Fressverhalten der Tiere ergaben, dass die PF-Ratten – deren Futtermenge pro Tag aus der Energiemenge der TEL-Gruppe berechnet wurde – ihre Nahrung sehr viel rascher aufnahmen als die anderen Gruppen. Anhand der zeitgenauen Messwerte aus der Kalorimetrie konnte die Zeitspanne berechnet werden, in der 70 % der Gesamtenergie der Dunkelphase aufgenommen wurden: die PF-Tiere nahmen innerhalb von $5,0 \pm 0,5$ h diese Energiemenge auf und waren damit viel schneller als die CON-Ratten mit $10,0 \pm 0,4$ h oder die CD-Ratten mit $10,5 \pm 0,5$ h und TEL-Ratten mit $9,2 \pm 0,5$ h (Abbildung 7-D, Anhang Tabelle 18). Ebenso war die Energieaufnahme binnen 2 Stunden bei der PF-Gruppe verdreifacht (Abbildung 7-E).

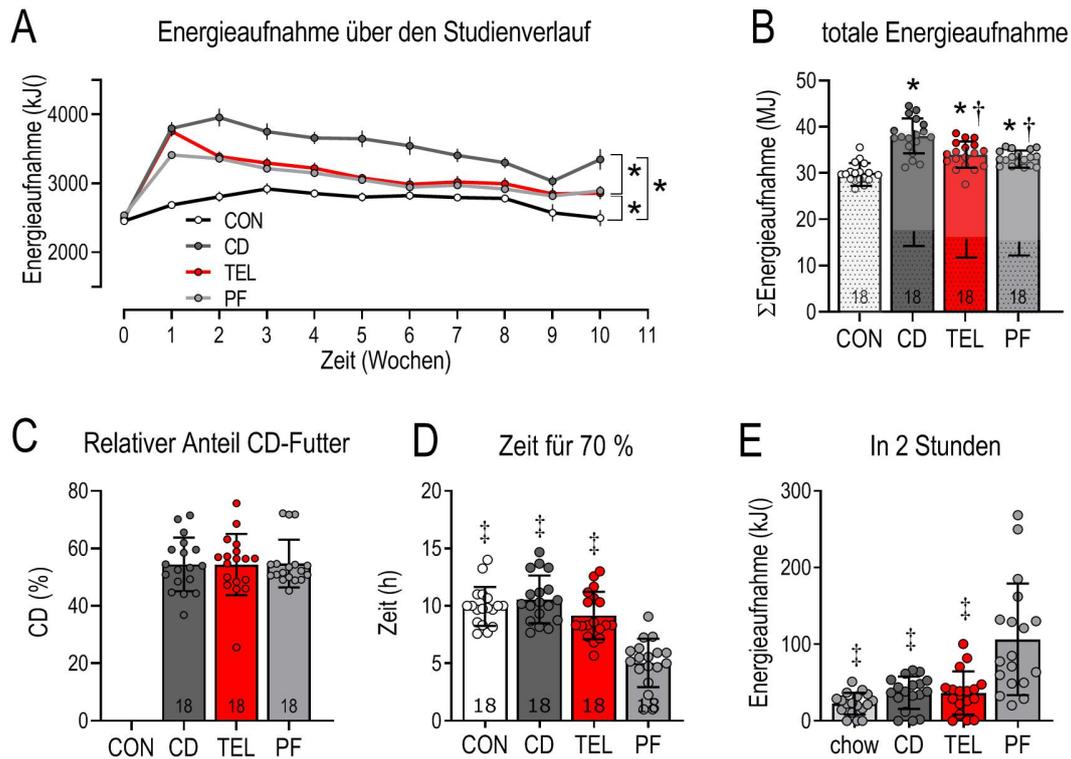


Abbildung 7: Energieaufnahme in den Versuchsgruppen. Wöchentliche Energieaufnahme, * $p < 0.05$ vs. CON [2-way ANOVA + Dunett's multiple comparison test, $F_{time} = 85.8$, $p < 0.05$; $F_{treatment} = 25.3$, $p < 0.05$, $F_{interaction} = 7.4$, $p < 0.05$] (A), gesamte Energieaufnahme in gestapeltem Säulendiagramm, gepunkteter Säulenanteil zeigt Chow-Aufnahme an, * $p < 0,05$ vs. CON, † $p < 0,05$ vs. CD [F*25.3, Brown-Forsythe ANOVA + Games-Howell's multiple comparisons test] (B), relativer Anteil von CD-Futter (C), Zeitraum in dem 70 % der Energie der jeweiligen Dunkelphase aufgenommen wurden, ‡ $p < 0.05$ vs. PF, $F = 28,4$ [1way ANOVA + Holm-Sidak's multiple comparisons test] (D), absolute Energieaufnahme innerhalb von 2 Stunden, ‡ $p < 0.05$ vs. PF $F = 15.3$ [Brown-Forsythe ANOVA + Games-Howell's multiple comparisons test] (E).

3.1.3. Subkutane und viszerale Fettmasse

Die in der 13. Studienwoche durchgeführte MRT zur Quantifizierung der Fettmassen bestätigte, dass die erhöhte Energieaufnahme parallel zur Gewichtszunahme zu einer Vergrößerung der Fettdepots führte: die CD-Gruppe hatte ein größeres Gesamtfettvolumen (113 ± 32 ml) als die CON-, TEL- und PF-Gruppe (Abbildung 8-B und -E), verteilt zu ca. 20 % auf subkutanes Fettgewebe und zu 80 % auf viszerales Fett. Die Telmisartan-behandelten Tiere hatten dagegen nur ein Gesamtfettvolumen von 69 ± 5 ml, wovon ca. 18 % subkutanes Fett und 80 % viszerales Fettgewebe waren (Abbildung 8-C und -E). Bei der PF-Gruppe, die in ihrer Energieaufnahme der TEL-Gruppe angepasst waren, ließ sich kein Unterschied in der Fettgewebemasse oder -verteilung im Vergleich zu TEL feststellen (Gesamtfettvolumen: 71 ± 5 ml, 19 % subkutanes Fett- und 81 % viszerales Fettgewebe, Abbildung 8-D und -E). Die Verteilung der Fettdepots war demnach durch die Therapie oder verringerte Energieaufnahme nicht beeinflusst. Die Ratten der CON-Gruppe, die lediglich

Chow-Diät fütterten, hatten das niedrigste Gesamtfettvolumen von 53 ± 3 ml (ca. 21 % subkutanen Fett- und 79 % viszerales Fettgewebe), waren jedoch nicht signifikant verschieden von der TEL- und PF-Gruppe (Abbildung 8-A und -E).

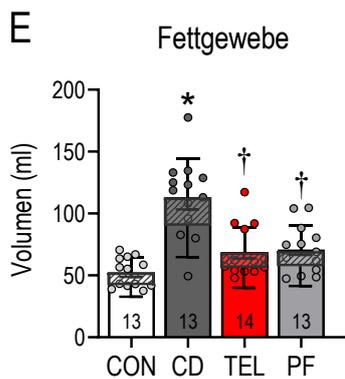
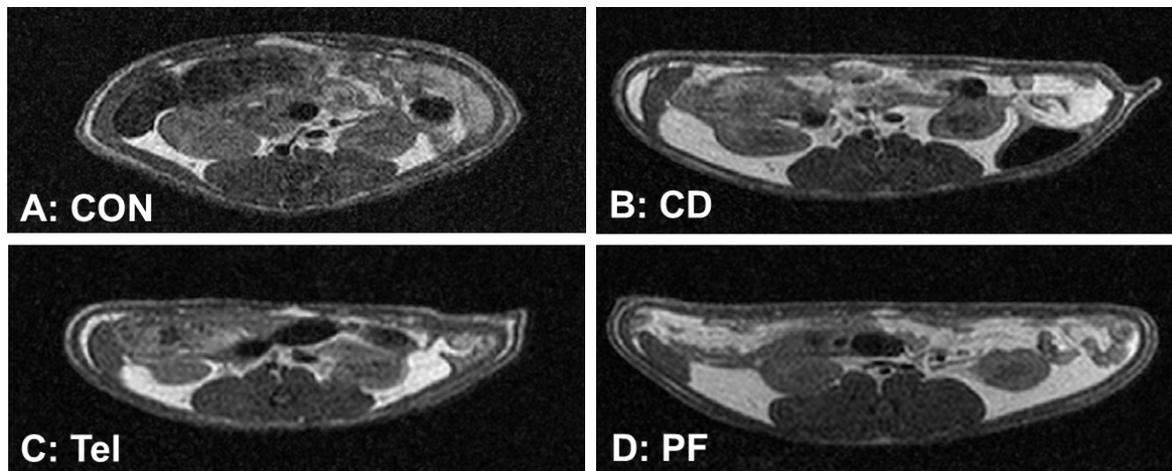


Abbildung 8: Ergebnisse der MRT. Repräsentative MRT-Schnittaufnahmen der 4 Versuchsgruppen auf Nierenhöhe, das Fettgewebe stellt sich hyperintens (hell) dar (A-D), gestapeltes Säulendiagramm der Volumina des Fettgewebes mit anteiligem viszeralen und subkutanem (schraffierte Fläche) Fett, $F^*=18.1$, $*p < 0,05$ vs. CON, $\dagger p < 0,05$ vs. CD [Brown-Forsythe ANOVA + Games-Howell's multiple comparisons test] (E).

3.1.4. Energieverbrauch

In der indirekten Kalorimetrie zeigten die TEL- und PF-Gruppe im Vergleich zur CD-Gruppe einen erhöhten Energieverbrauch in der Dunkelphase (Abbildung 9-B bis C), der bei den nachtaktiven Tieren aller 4 Gruppen in der Dunkelphase grundsätzlich gegenüber tagsüber gesteigert war (Abbildung 9-A). Der Respiratorische Quotient (RER) war in der CD-Gruppe in Hell- und Dunkelphase erniedrigt und bei den TEL- und PF-Ratten normalisiert (Abbildung 9-D bis F). Ein Einfluss der Diät oder Therapie ließ sich an dieser Stelle insofern ausmachen, dass der Energieverbrauch in TEL- und PF-Tieren während der Dunkelphase höher war als bei CD (Abbildung 9-E), sowie der RER während Hell- und Dunkelphase.

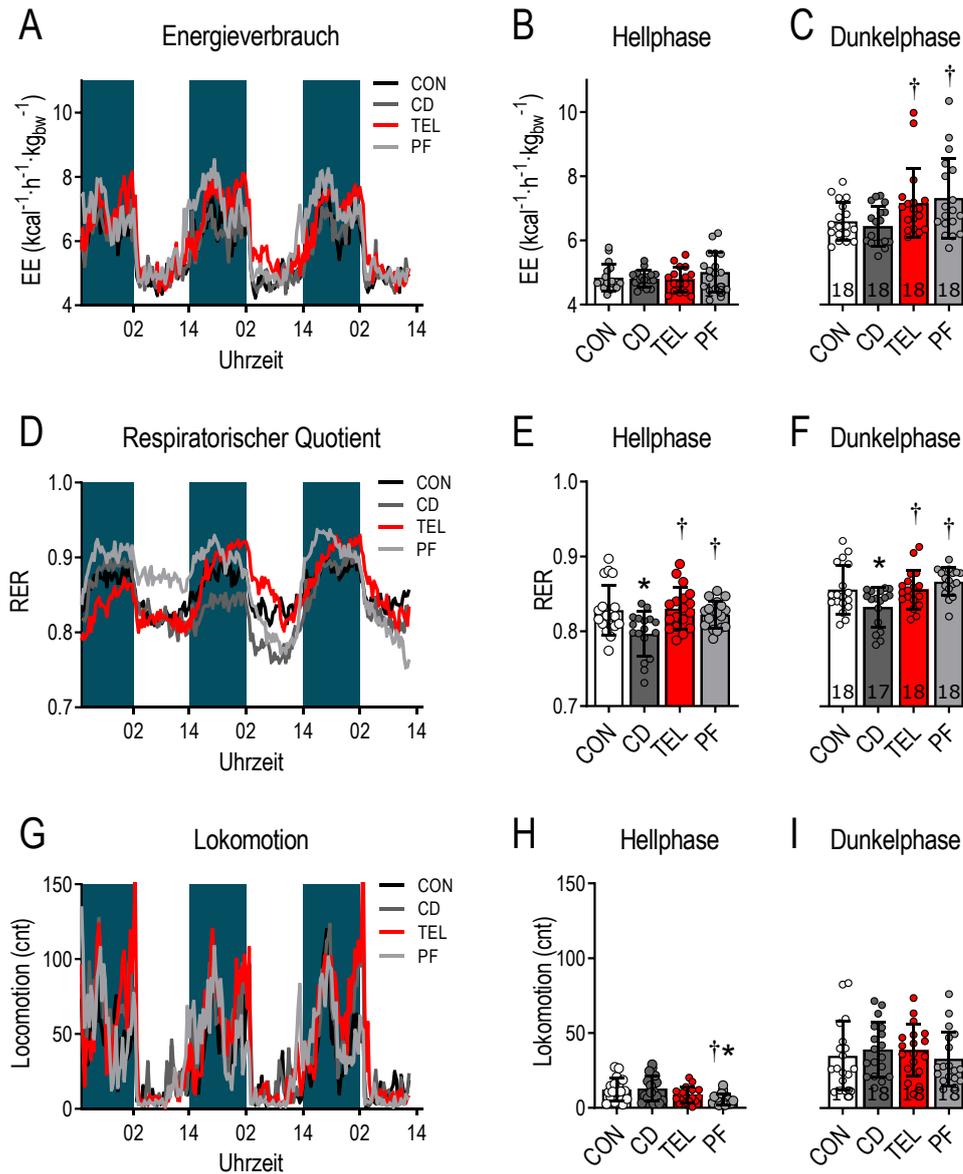


Abbildung 9: Daten aus der indirekten Kalorimetrie A), D) und G) zeigen jeweils die Messwerte über den gesamten Beobachtungszeitraum von 3 Tagen in Liniendiagrammen, dahinter folgen die gemittelten Werte für die Hell- und Dunkelphasen dargestellt in Säulendiagrammen; Energieverbrauch (A-C), in der Dunkelphase $F^*=3.83$ (C), Respiratorischer Quotient (D-F), in der Hellphase $F^*=5.31$ (E), in der Dunkelphase $F^*=5.22$ (F), Lokomotion (G-I), in der Hellphase $F^*=4.91$ (H), * $p<0.05$ vs. CON, † $p<0.05$ vs. CD [Brown-Forsythe ANOVA + Holm-Sidak's multiple comparisons test].

3.1.5. Aktivität

Die Lokomotion der Ratten unterlag zirkadianen Schwankungen, die Tiere bewegten sich in den Dunkelphasen mehr als in den Hellphasen (Abbildung 9-G). Bei den für die jeweilige Phase gemittelten Werten zeigte sich, dass die PF-Gruppe weniger aktiv in den Hellphasen war als die CD- und CON-Gruppe (Abbildung 9-H). In der Dunkelphase ließ sich kein Unterschied zwischen den Gruppen verzeichnen (Abbildung 9-I).

3.1.6. Blutdruck und Herzfrequenz

Nach 8 Wochen Diät und Therapie erfolgte die Herzfrequenz- und Blutdruckmessung. Hier zeigte sich ein höherer Blutdruck in der CD- ($135,2 \pm 2,3$ mmHg, $n = 13$) und der PF-Gruppe ($130,0 \pm 3,3$ mmHg, $n = 15$) im Vergleich zur Telmisartan-behandelten Gruppe ($119,3 \pm 3,1$ mmHg, $n = 15$, Abbildung 10-A). In Bezug auf die Herzfrequenz ließ sich ebenfalls ein Telmisartan-Einfluss ausmachen: die Herzfrequenz war bei den CD- und PF-Tieren gegenüber den CON-Gruppe gesteigert, bei den TEL-Ratten war diese Erhöhung nur in der Tendenz zu sehen (Abbildung 10-B).

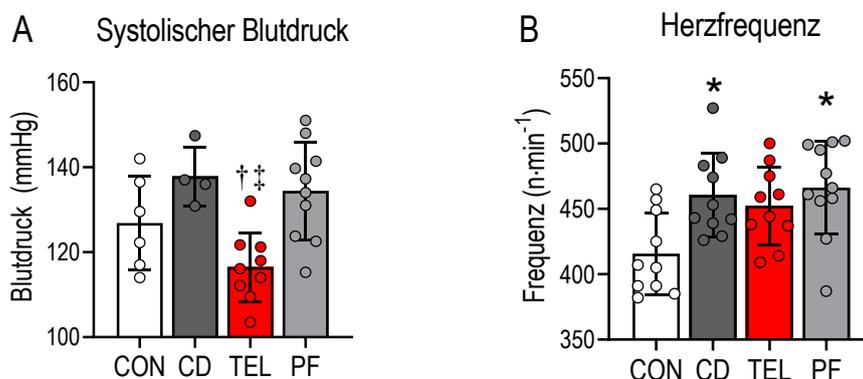


Abbildung 10: Systolischer Blutdruck, $F^*=6.74$ (A) und Herzfrequenz $F^*=5.05$ (B), * $p < 0.05$ vs. CON, † $p < 0.05$ vs. CD; ‡ $p < 0.05$ vs. PF [1-way ANOVA + and Tukey's multiple comparisons test].

3.1.7. Glukose-, Insulin- und Glukagon-Spiegel

Die Bewertung der Glukose-Stoffwechsellage erfolgte durch Bestimmung der Glukose-, Insulin- und Glukagon-Spiegel im Plasma der Versuchstiere aus den nicht-nüchtern-Blutentnahmen vor Beginn der Studie (Tag -3), nach einem Monat (Tag 32) und nach 2 Monaten (Tag 60). An Tag -3 zeigte sich zwischen den 4 Gruppen kein Unterschied in allen 3 analysierten Parametern. Aufgetragen in einem XY-Graph war für die Plasma-Glukose-Werte gegen die Zeit in der TEL- und CON-Gruppe ein Absinken der Glukose-Werte an Tag 32 zu verzeichnen, wohingegen diese sich in der CD und PF-Gruppe konstant verhielten (Abbildung 11-A). Kongruent dazu ließ sich eine Hyperinsulinämie in der CD und PF-Gruppe nachweisen, die in der CON- und TEL-Gruppe nicht zu finden war (Abbildung 11-B). Die zweifaktorielle Varianzanalyse (2-way ANOVA) für die Plasma-Glukosewerte zeigte einen signifikanten Zeiteffekt, jedoch keinen durch die Behandlung oder Interaktion aus Behandlung und Zeit (Abbildung 11-A). Die Veränderungen des Plasma-Insulins waren sowohl beeinflusst durch den Faktor Zeit als auch durch die Behandlung (Abbildung 11-B). Der Plasma-Glukagon-Spiegel war zu Beginn der Studie in allen 4 Gruppen am höchsten, sank

bis zum Tag 32 und stieg lediglich in der PF-Gruppe am Tag 60 wieder an (Abbildung 11-C). Des Weiteren lagen die Glukagon-Werte konstant höher in der CON-Gruppe und waren am niedrigsten in der TEL-Gruppe. Hier zeigte die zweifaktorielle Varianzanalyse einen Zeiteffekt und keinen Behandlungseffekt (Abbildung 11-C).

Weitergehend erfolgte die Berechnung der Fläche unter der Kurve (AUC, s. 2.8.1.) als Integral der Konzentration über die Zeit, wobei ein höherer Insulin-Spiegel in der CD-Gruppe deutlich wurde, der bei der TEL-Gruppe so niedrig lag wie bei der CON-Gruppe (Abbildung 11-E). Die AUC von Glukose (Abbildung 11-D) und Glukagon (Abbildung 11-E) zeigten keine relevanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

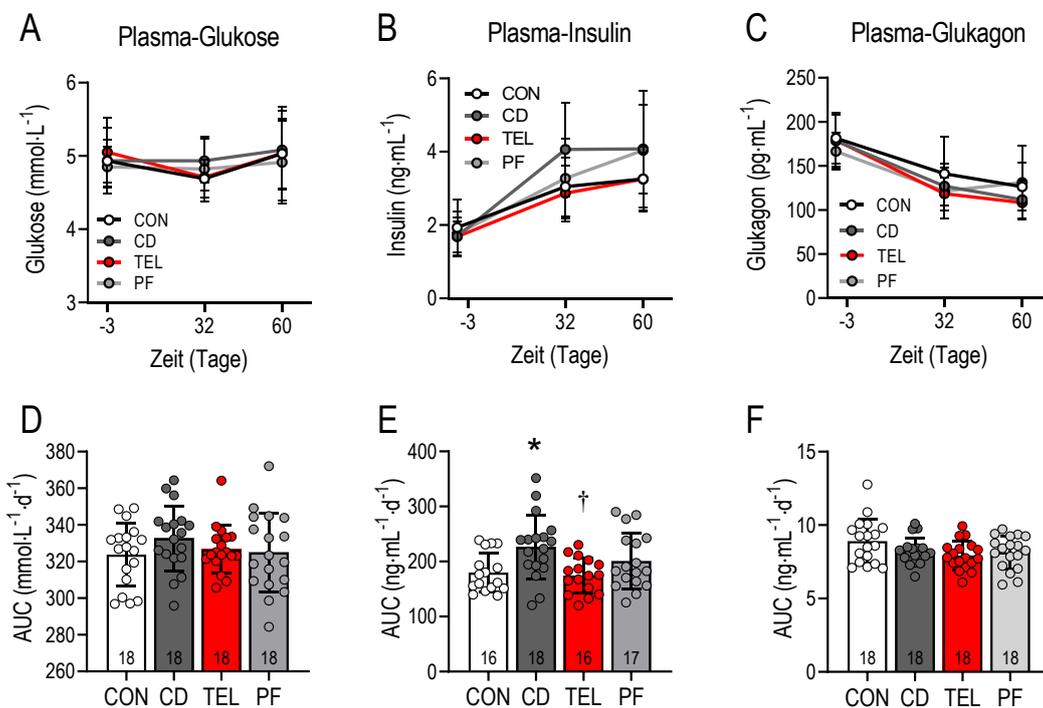


Abbildung 11: Plasmaspiegel von Glukose, Insulin und Glukagon zu 3 Messzeitpunkten im Studienverlauf; die obere Reihe zeigt Plasmawerte zeitabhängig in einem Liniendiagramm, Plasma-Glukose mit Zeiteffekt [2-way ANOVA $F^{time} = 6.4$, $p = 0.0034$], kein Effekt durch Behandlung oder Interaktion aus Behandlung und Zeit [2way ANOVA $F^{treatment} = 0.6$, $p = 0.61$, $F^{interaction} = 1.0$, $p = 0.46$] (A), Plasma-Insulin mit Zeit und Behandlungseffekt [2-way ANOVA $F^{time} = 97.4$, $p < 0.0001$, $F^{treatment} = 3.4$, $p = 0.024$, $F^{interaction} = 2.9$, $p = 0.011$] (B), Plasma-Glukagon mit Zeiteffekt [2-way ANOVA $F^{time} = 89.4$, $p < 0.0001$] und keinen Behandlungseffekt [2-way ANOVA $F^{treatment} = 2.1$, $p = 0.11$, $F^{interaction} = 1.8$, $p = 0.09$], in der unteren Reihe (D-F) die AUC in Säulendiagrammen, Insulin-AUC, $F^* = 4.44$, * $p < 0.05$ vs. CON, † $p < 0.05$ vs. CD [1-way ANOVA + and Tukey's multiple comparisons test] (E).

3.1.8. Insulinsensitivität

Zur Überprüfung der Insulinsensitivität wurde in der 12. Studienwoche ein Insulintoleranztest (ITT) durchgeführt, in dem nach gewichtsadaptierter Injektion von Insulin die Änderungen des Blutzuckerspiegels beobachtet wurden. In der basalen Blutentnahme war nach der

18-stündigen Fastenzeit kein Unterschied zwischen den Gruppen in den Plasma-Glukose-
 spiegel zu verzeichnen (Abbildung 12-B). Die Nüchtern-Insulinspiegel lagen in der CD- und
 TEL-Gruppe höher als in der CON- und PF-Gruppe (CD: $1,59 \pm 0,11$ ng/ml, TEL:
 $1,39 \pm 0,09$, CON: $0,94 \pm 0,08$ ng/ml und PF: $1,19 \pm 0,13$ ng/ml, Abbildung 12-A). Die zwei-
 faktorielle Analyse des Abfallens des Plasma-Glukosespiegels über den Versuchszeitraum
 von 360 Minuten zeigte eine stärkere Reaktion auf die Insulininjektion in der CON-Gruppe,
 es ließ sich jedoch kein Vorteil des Telmisartans oder der Pair-feeding-Methode im Ver-
 gleich zur CD-Gruppe detektieren (Abbildung 12-C). Zur Quantifizierung wurde an dieser
 Stelle – wie auch unter 3.1.7. – die AUC berechnet, die relevant größer war in der CON-
 Gruppe als bei den 3 Cafeteria-Diät-gefütterten Gruppen, zwischen denen kein Unterschied
 nachweisbar war (Abbildung 12-D). Ein Einfluss des Telmisartans auf eine verbesserte In-
 sulinsensitivität war somit nicht eindeutig nachvollziehbar, da unter Telmisartan zwar die
 nicht-nüchtern-Insulin-Werte normalisiert waren, andererseits aber die nüchtern-Insulin-
 Werte und Glukoseutilisation im ITT nicht verändert waren.

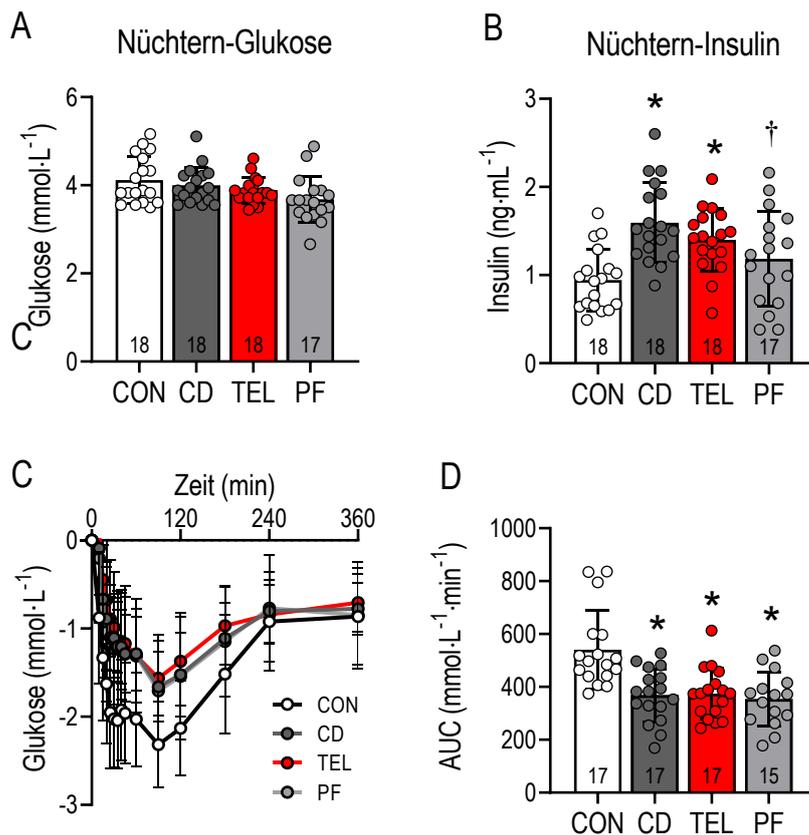


Abbildung 12: Messwerte des Insulintoleranztests, dargestellt in Säulendiagrammen sind Nüchtern-
 Glukose (A) und Nüchtern-Insulin, $F^*=7.6$, $*p<0.05$ vs. CON [1way ANOVA + Tukey's multiple
 comparison test] (B), Abnahme der Glukose-Spiegel nach Insulininjektion dargestellt im Liniendi-
 agramm [2-way ANOVA $F^{time}=147.3$, $p<0.0001$, $F^{treatment}=8.6$, $p<0.0001$, $F^{interaction}=3.8$, $p<0.0001$] (C)
 und die entsprechende AUC im Säulendiagramm, $F^*=10.03$, $*p<0.05$ vs. CON, $\dagger p<0.05$ vs. CD
 [Brown-Forsythe ANOVA + Games-Howell's multiple comparisons test] (D).

3.1.9. Leptinsensitivität

Nach 11 Wochen Diät und Therapie war an Tag 73 das Plasmaleptin in allen 3 Gruppen mit Zugang zur Cafeteria-Diät erhöht (Abbildung 13-A), darüber hinaus fand sich eine relevante Erhöhung in der CD-Gruppe im Vergleich mit TEL und PF. Kongruent dazu zeigte sich eine positive Korrelation von Plasmaleptin und täglicher Energieaufnahme in der CD-Gruppe ($F=9,88$, $p=0,010$) sowie eine negative Korrelation bei den CON-Tieren (Abbildung 13-B). Dies stellt einen Hinweis auf eine Leptinresistenz in der CD-Gruppe dar. Allerdings ergab sich auch für die TEL-Ratten eine positive Korrelation ($F=19,8$, $p=0,0012$), während bei den PF-Ratten die Steigung nicht signifikant von Null verschieden war ($F=0,1$, $p=0,91$).

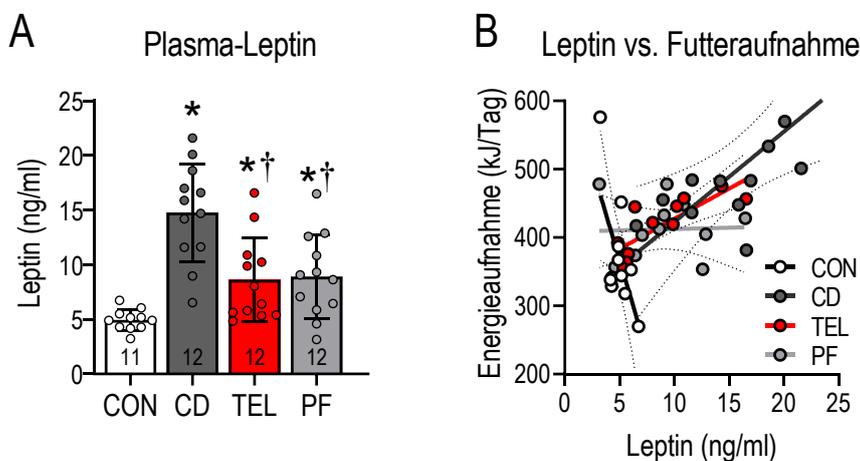


Abbildung 13: Basale Plasmaleptinspiegel an Tag 73, $F^=15.31$, $* p < 0,05$ vs. CON, $† p < 0.05$ vs. CD [Brown-Forsythe ANOVA + Games-Howell's multiple comparisons test] (A), und Korrelation zwischen Plasmaleptin und täglicher Energieaufnahme, [CON $r=-0.636$, $p=0.035$; CD $r=0.705$, $r=0.014$; TEL: $r=0.815$, $p=0.0012$; PF $r=0.0035$, $p=0.91$] (B).*

3.1.10. Lipidprofil im Plasma

Die Lipide im Plasma der Ratten zeigten an Tag 82 folgende Veränderungen: unter pair-feeding zu TEL und Vehikel-Behandlung wies die PF-Gruppe ein erhöhtes High-density Lipoprotein (HDL) gegenüber der CD-Gruppe auf, keine Unterschiede im Vergleich mit der CON- und TEL-Gruppe (Abbildung 14-A). Für das Low-density Lipoprotein (LDL) ließ sich kein Gruppenunterschied ausmachen (Abbildung 14-B). Bei den Triglyceriden (TG) ließ sich in Übereinstimmung mit der gesteigerten Energieaufnahme und Fettgewebemasse für die CD-Gruppe ein erhöhter Plasmaspiegel bestimmen (Abbildung 14-C).

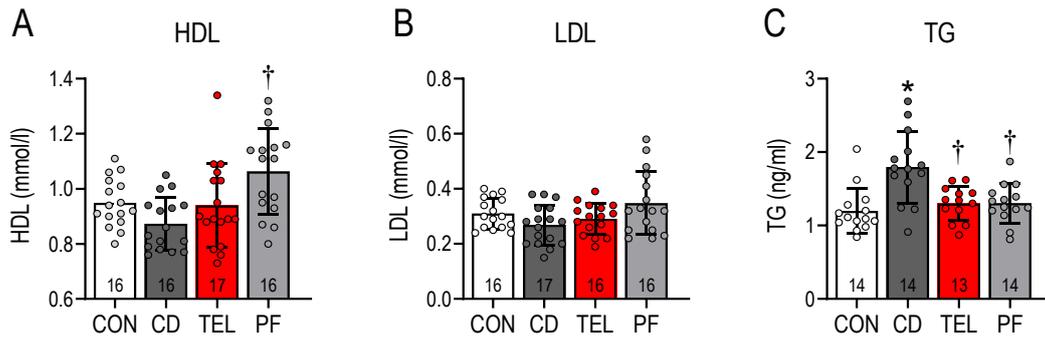


Abbildung 14: Plasma-Lipide in (mmol/l) an Tag 82, dargestellt sind die Ergebnisse für HDL, $F^*=6.01$ (A), LDL (B) und TG, $F^*=8.72$ (C), * $p < 0,05$ vs. CON, † $p < 0,05$ vs. CD [Brown-Forsythe ANOVA + Games-Howell's multiple comparisons test].

3.1.11. Plasma-Spiegel der gastrointestinalen Peptide und Adipokine

Zur ergänzenden Bewertung der Stoffwechsellage der Ratten erfolgte aus den Plasmaproben nach 2 Monaten Diät und Therapie (Tag 60) die Bestimmung verschiedener gastrointestinaler Peptide. Die Plasmakonzentrationen von GLP-1, freigesetzt von neuroendokrinen L-Zellen des Darms bei Nahrungsaufnahme mit u.a. stimulierender Wirkung auf die Insulinsekretion, waren für eine valide Bewertung zu niedrig und werden im Folgenden nicht weiter berücksichtigt. Amylin und GIP waren in CD und PF höher als in CON oder TEL (Tabelle 9). Amylin wird simultan zu Insulin von den β -Zellen des Pankreas synthetisiert und sezerniert, GIP aus den K-Zellen des Duodenums stimuliert u.a. die Insulinsekretion. Außerdem war PYY bei den TEL-Ratten niedriger als bei CD- oder PF-Tieren sowie PP niedriger in TEL- als bei den PF-Ratten (Tabelle 9). PYY wird postprandial von den L-Zellen der Darmschleimhaut sezerniert, hemmt u.a. die Magenentleerung, die exokrine Pankreassekretion und hat als gastrointestinales Hormon den stärksten Einfluss auf Appetit- und Sättigungsgefühl. PP wird sezerniert aus den F-Zellen der Langerhans-Inseln, seine Konzentration im Blut steigt nach der Aufnahme eiweißreicher Nahrung an und führt u.a. zu einer Hemmung der Enzym- und Hydrogencarbonat-Produktion des Pankreas sowie des Appetits.

Die Bestimmung der Adipokine als Entzündungsparameter war für die IL-1 α -, IL-1 β - und IL-13-Plasmaspiegel zwischen den Gruppen ähnlich (Tabelle 9). Weitere Zytokine wie IL-4, IL-6, IL-12, IL-17a, IL-7, IL-10 und KC lagen unter der Nachweisgrenze oder waren aufgrund fehlender Kreuzreaktionen nicht messbar, da der Multiplex-Assay für Mäuse und nicht für Rattenproben konfiguriert ist. LIX wurde in 5 Proben der CD-Gruppen ($11,3 \pm 9,5$ pg/ml) gefunden, jedoch nicht im Plasma der anderen Gruppen.

*Table 9: Plasma-Konzentrationen verschiedener Peptide und Adipokine an Tag 60, dargestellt sind MWt±SD; * p<0,05 vs. CON, † p<0,05 vs. CD; ‡ p<0,05 vs. PF. [Brown-Forsythe ANOVA + Games-Howell's multiple comparisons test].*

	CON	CD	TEL	PF	
Amylin (pg/ml)	174±58 (17)	256±99 (17) *	195±52 (16)	254±95 (16) *	F ^{BF} =4.66, p=0.006
GIP (pg/ml)	247±175 (18)	530±364 (16) *	310±264 (15) ‡	809±352 (13) *	F ^{BF} =10.38, p<0.0001
Ghrelin (pg/ml)	73±59 (15)	133±120 (17)	139±81 (17)	113±112 (16)	F ^{BF} =1.51, p=0.223
PP (pg/ml)	63±30 (15)	72±51 (15)	48±24 (15) ‡	97±48 (15)	F ^{BF} =3.98, p=0.013
PYY (pg/ml)	147±37 (18)	151±47 (17)	119±17 (14) ‡‡	165±47 (17)	F ^{BF} =3.57, p=0.020
IL-1α (pg/ml)	20.2±10.6 (10)	40.3±32.8 (13)	17.9±10.0 (10)	42.2±41.9 (12)	F ^{BF} =2.51, p=0.082
IL-1β (pg/ml)	16.1±9.2 (13)	16.0±9.1 (11)	13.3±7.8 (12)	8.9±5.3 (10)	F ^{BF} =1.88, p=0.148
IL-13 (pg/ml)	18.1±11.4 (13)	15.8±13.3 (14)	15.1±10.7 (13)	14.8±8.0 (11)	F ^{BF} =0.23, p=0.870

3.2. Ausprägung des Darmmikrobioms

3.2.1. Phylogentische Analyse

Die phylogenetischen Analysen auf Stammes-Ebene zeigten, dass sich die Bakterienstämme anteilig am Gesamtmikrobiom über den Studienzeitraum veränderten (Abbildung 15). Am Ankunftstag gehörte der größte Anteil der identifizierten DNA-Sequenzen zum Stamm der Firmicutes, weniger zu den Bacteroidetes und zu einem kleinen Prozentsatz zu den Proteobacteria (Abbildung 15). Während der Akklimatisierungszeit im hiesigen Labor mit ausschließlich Chow-Diät stieg der Anteil an Bacteroidetes an (Abbildung 15). Diese Zunahme der Bacteroidetes-Stämme setzte sich im Studienverlauf in der CON-Gruppe fort, bei nur geringfügiger Zunahme der Proteobacteria und deutlicher Abnahme der Firmicutes (Abbildung 15). Die Cafeteria-Diät-gefütterten Gruppen (CD, TEL und PF) hingegen wiesen diese Zunahme der Bacteroidetes-Stämme nicht oder nur geringfügig auf, zeigten aber eine deutliche Zunahme der Proteobacteria zuungunsten der Firmicutes (Abbildung 15). Des Weiteren ließ sich feststellen, dass an Tag 32 in allen Gruppen der Anteil der Proteobacteria am größten war und dann wieder abnahm bis auf PF (Abbildung 15). Außerdem war eine Zunahme der Actinobacteria insbesondere für den Tag 60 in der CD-Gruppe erkennbar, weniger in der TEL- und PF-Gruppe (Abbildung 15). Auf Phylum-Ebene war weniger ein Telmisartan-Effekt erkennbar, jedoch eindeutig der Einfluss der Zeit und der verschiedenen Diäten.

Phylum Abundanzen

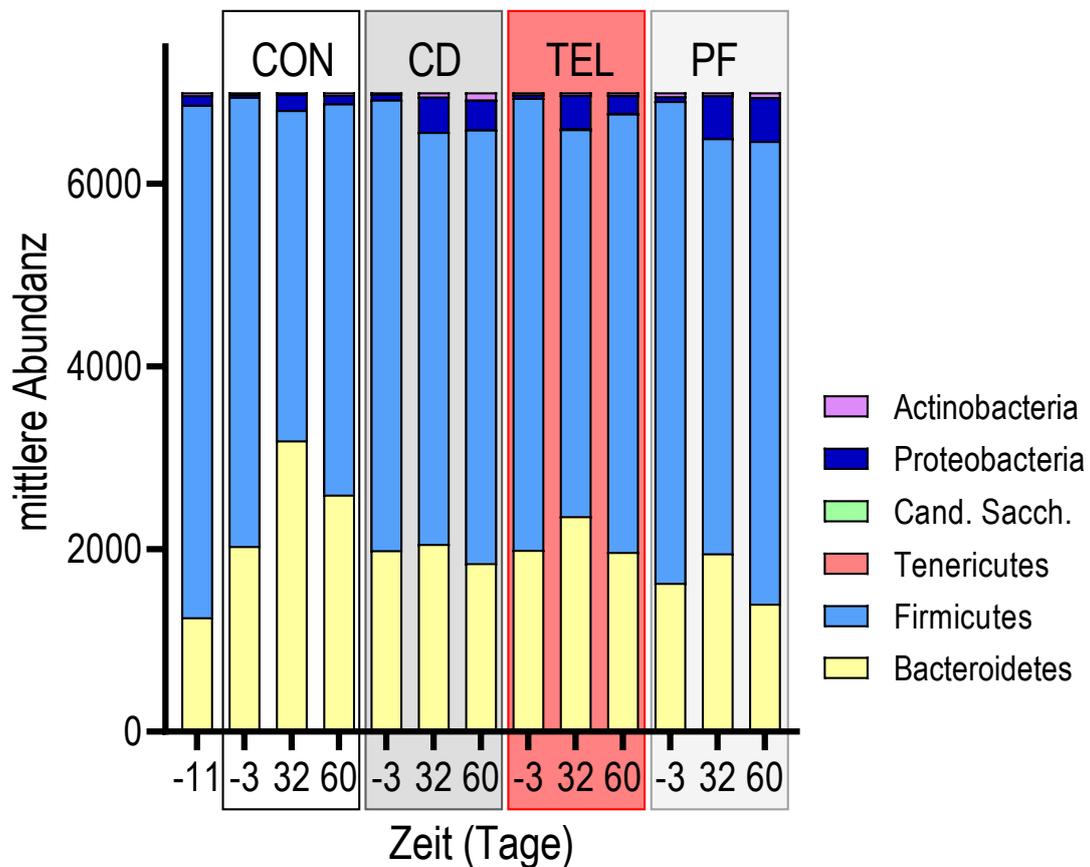


Abbildung 15: Säulendiagramm mit Darstellung der Abundanzen auf Phylum-Ebene.

Der Vergleich auf Familien-Ebene zeigte, dass bei Ankunft die größte Abundanz bei den Lactobacillaceae lag, gefolgt von den Lachnospiraceae sowie in kleineren Anteilen den Ruminococcaceae, Rikenellaceae, Prevotellaceae und Erysipelotrichaceae (Abbildung 16). Während der Akklimatisierungszeit kam es bei allen 4 Gruppen zu einer Abnahme der Lactobacillaceae und Rikenellaceae, letztere waren auch im weiteren Studienverlauf nur noch gering vertreten, sowie zu einer Zunahme der Ruminococcaceae und Prevotellaceae (Abbildung 16). Im Verlauf des ersten Studienmonats waren die Lactobacillaceae in allen 4 Gruppen bis Tag 32 weiter abnehmend, dann zeigte sich für alle bis auf CD wieder eine Zunahme (Abbildung 16). In der CD- und PF-Gruppe erfolgte dann im Studienverlauf die weitere Zunahme der Familien der Erysipelotrichaceae und Sutterellaceae, während die Lactobacillaceae weiter abnahmen. In CON und TEL blieb die Zunahme dieser Familien aus (Abbildung 16). Bei den TEL- und PF-Tieren ließ sich in größerer Abundanz als in den anderen Gruppen die Familie der Clostridiaceae 1 nachweisen (Abbildung 16). Die CD-Gruppe zeigte als einzige die Zunahme von Lachnospiraceae (Abbildung 16). Auf Familien-

Ebene war die TEL-Gruppe aufgrund ihrer fehlenden Erysipelotrichaceae-Abundanz folglich der CON-Gruppe ähnlicher als den mit derselben Diät gefütterten Gruppe CD und PF, womit sich ein Telmisartan-Effekt andeuten würde.

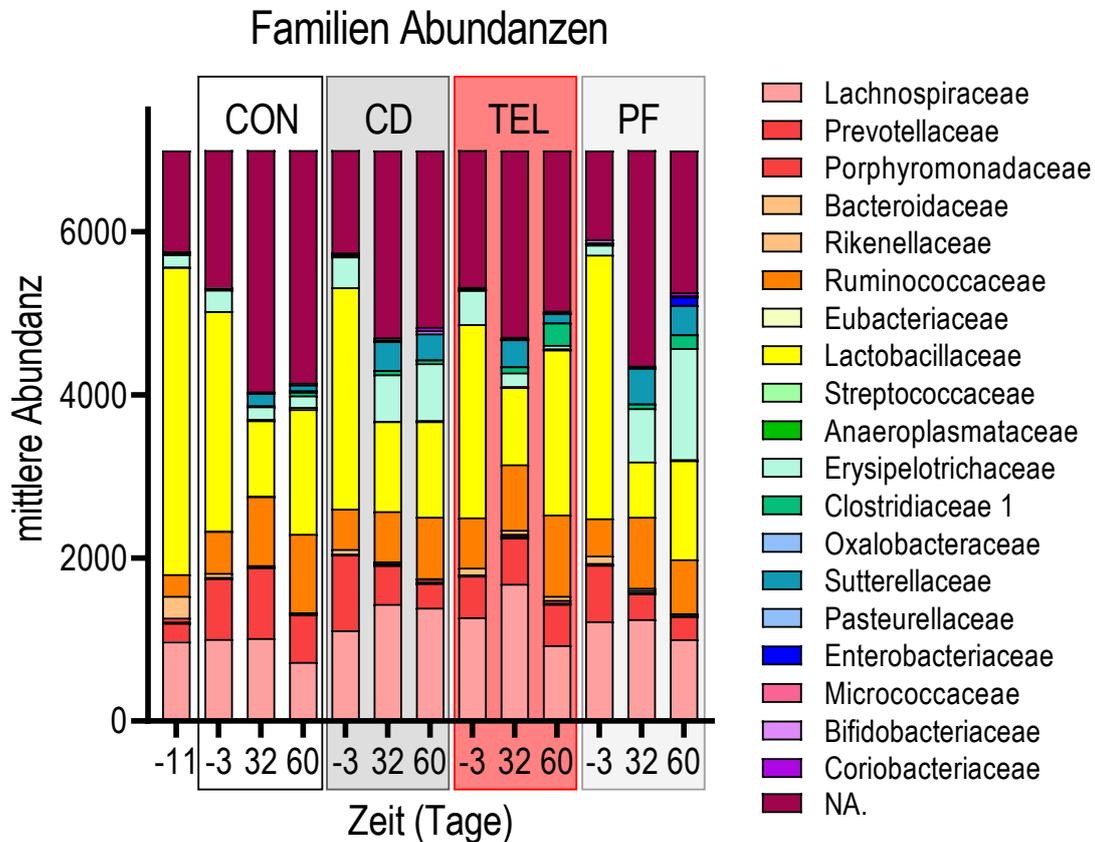


Abbildung 16: Säulendiagramm mit Darstellung der Abundanzen auf Family-Ebene.

3.2.2. Firmicutes-Bacteroidetes-Ratio

Die Berechnungen auf Stammes-Ebene zur Firmicutes-Bacteroidetes-Ratio (F/B-Ratio) zeigten für den Studienbeginn an Tag-3 keine Unterschiede in den 4 Gruppen, lediglich war im Vergleich zum Ankunftstag im Labor (Tag-11, pooled arrival) eine Abnahme der Firmicutes-Abundanz zu verzeichnen. Nach 2 Monaten Diät und Therapie ließ sich eine relevante Erhöhung der F/B-Ratio in CD- und PF- gegenüber der Chow-gefütterten CON-Gruppe feststellen (Abbildung 17). Die Telmisartan-behandelten Ratten allerdings weisen diese erhöhte Ratio nicht auf. In der F/B-Ratio ließ sich demnach der Einfluss der Diät und Therapie mit Telmisartan auf Stammes-Ebene bestätigen.

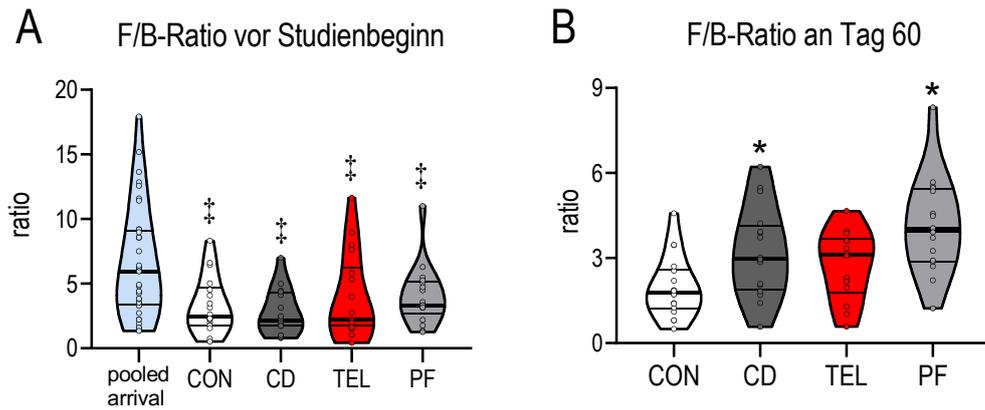


Abbildung 17: Violin-Plot der F/B-Ratio, Vergleich der F/B von Tag-11 und Tag-3, $\ddagger p < 0.05$ vs. -11 [Brown-Forsythe ANOVA test, $F^ = 7.546$ (4.000, 90.86) + Dunnett's T3 multiple comparison test], keine Unterschiede zwischen den 4 Gruppen an Tag -3 (A); F/B an Tag 60, $* p < 0,05$ vs. CON [Kruskal-Wallis + Dunn-Correction] (B); dargestellt sind der Median als fette Querlinie, Quartile als dünne Querlinien sowie die Einzelwerte als Punkte, der Violinenbauch gibt die Stichprobenverteilung wieder.*

3.2.3. Enterotype like Analysis

Für die Proben von Tag 60 wurde eine Cluster-Untersuchung basierend auf der Enterotypen-Analyse durchgeführt, um gruppenspezifische Varianzen bewerten zu können. Arumugam et al. publizierten 2011 die Idee von 3 Enterotypen (ET), die auf Grundlage der Clusterung von menschlichen fäkalen metagenomischen Proben 3 verschiedener Kontinente aufgrund ihrer taxonomischen Zusammensetzung entstanden (Arumugam et al., 2011). Bei der Untersuchung der Eigenschaften der einzelnen Enterotypen wurden Netzwerke von miteinander auftretenden Mikroben gefunden, die sich um ein Indikator- oder auch Treiber-Taxon zentrieren, d.h. das Taxon, das am besten mit dem jeweiligen Enterotyp korreliert und unabhängig von Alter, Geschlecht, kulturellem Hintergrund und Geographie war (Costea et al., 2018). Die Enterotypen-Analyse wird auf Genus-Ebene durchgeführt (Costea et al., 2018). Im Falle der hier untersuchten Mikrobiome ergaben sich 3 ETs: ET1, mit dem Treiber-Taxon *Allobaculum*, ET2 dominiert von *Prevotella* und *Asaccharobacter* und ET3 mit dem Treiber-Taxon *Lactobacillus*, die sich signifikant voneinander unterschieden (Abbildung 18-A). Bei Betrachtung der Präsenz der ETs ließen sich gruppenspezifische Unterschiede ausmachen: ET2 und ET3 fand sich hauptsächlich in den Proben der CON-Ratten, ähnlich wie bei den TEL-Ratten, und auf der anderen Seite waren ET1 und ET2 bei den CD-Ratten sowie ET1 bei den PF-Ratten am stärksten ausgeprägt (Abbildung 18-B).

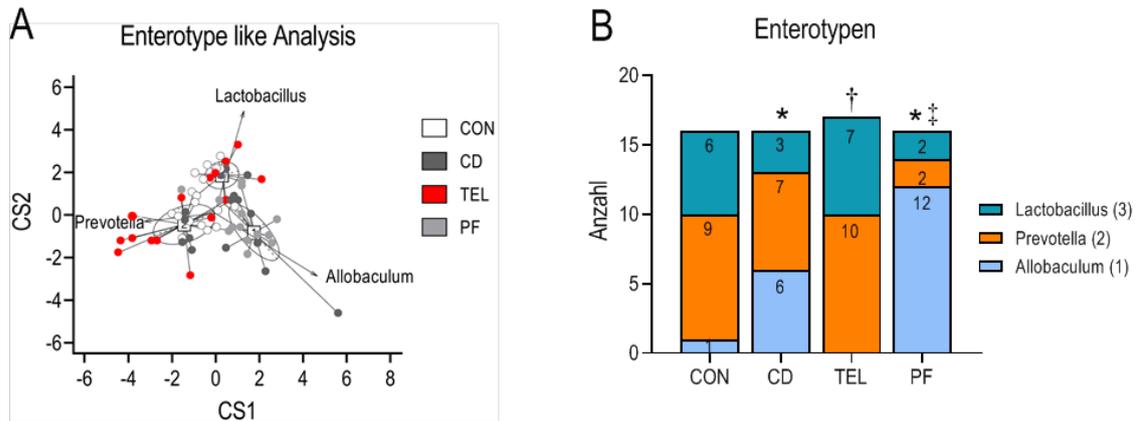
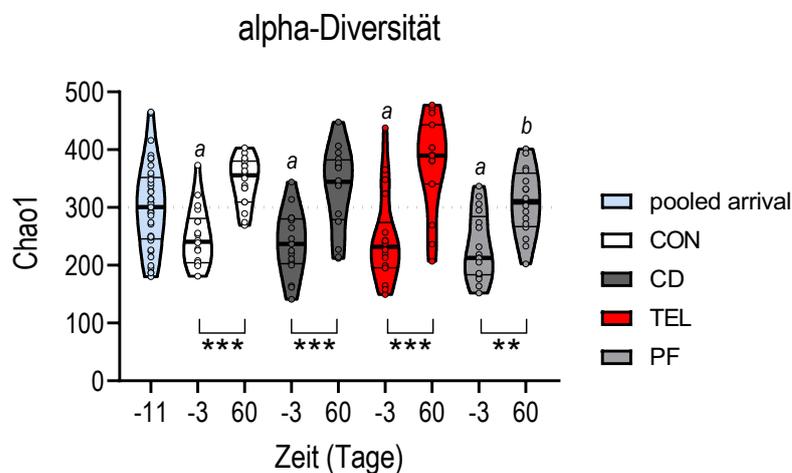


Abbildung 18: Ergebnis der Enterotype like Analysis der Proben von Tag 60 anhand Calinski-Harabasz pseudo F -statistic ($F=29.79$), Darstellung in der PCoA mit ET1 (Allobaculum), ET2 (Prevotella and Asaccharobacter) und ET3 (Lactobacillus) (A); Darstellung in gestapeltem Säulendiagramm mit der gruppenspezifischen Verteilung der Enterotypen, * $p < 0.05$ vs. CON, † $p < 0.05$ vs. CD; ‡ $p < 0.05$ vs. PF [Chi2-Test [$p = 0.00099$] und Benjamini-Hochberg-Korrektur] (B).

3.2.4. Alpha-Diversität

Die alpha-Diversität in Form des Chao-1-Index, als Maß für die Anzahl der Arten in den einzelnen Gruppen, unterlag im Studienverlauf gewissen Veränderungen. Zum einen war für die achttägige Akklimatisierungszeit in unserem Labor eine Abnahme im Chao-1-Index zwischen Tag -11 und Tag -3 nachweisbar (Abbildung 19). Zum anderen ließ sich zwischen den Gruppen für den Beginn der Studie (Tag -3) kein Unterschied im Chao-1-Index detektieren (Abbildung 19). Außerdem war für den Studienverlauf innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen zwischen Tag -3 und Tag 60 eine Zunahme der alpha-Diversität nachweisbar (Abbildung 19). An Tag 60 war der Chao-1-Index zwischen CON- und PF-Gruppe relevant verschieden, die anderen Gruppenvergleiche zeigten jedoch keine Unterschiedlichkeit (Abbildung 19).



*Abbildung 19: Violin-Plot der alpha Diversität. -11 entspricht der gepoolten alpha Diversität aller Tiere bei Ankunft im Labor (pooled arrival), a) $p < 0.05$ Tag -11 vs. Tag -3 [Kruskal-Wallis test], keine Unterschiede ($p = 0,76$) zwischen den Gruppen an Tag -3 [Kruskal-Wallis test], *** $p < 0,05$ zwischen Tag-3 und Tag 60 innerhalb der Gruppen [Mann-Whitney U test], b) $p < 0.05$ CON vs. PF [Kruskal-Wallis test + Dunn correction]; dargestellt sind der Median als fette Querlinie, Quartile als dünne Querlinien sowie die Einzelwerte als Punkte, der Violinenbauch gibt die Stichprobenverteilung wieder.*

3.2.5. Beta-Diversität

Die beta-Diversität in Form der Bray-Curtis-Dissimilarity, als Maß für den Unterschied in der Artenvielfalt, erwies die größere Unterschiedlichkeit für die Interaktion aus Gruppe und Tag ($r^2 = 0,5425$ für „Gruppe:Tag“) und nachrangig erst für den Probenzeitpunkt ($r^2 = 0,5262$ für „Tag“) und die Gruppe und deren Therapie ($r^2 = 0,1256$ für „Gruppe“, Tabelle 10).

Tabelle 10: Bray-Curtis-Dissimilarity Analyse der β -Diversität; der r^2 -Wert entspricht der Anpassungsgüte der Regression, die mit dem entsprechenden Faktor (Gruppe, Tag, Interaktion aus Gruppe und Tag) assoziiert ist; $Pr(>r)$ entspricht dem p -Wert.

Goodness-of-fit test based on PCoA (9.999 perm.)		
Bray-Curtis	r^2	$Pr(>r)$
Gruppe	0,1256	0,001
Tag	0,5262	0,001
Gruppe:Tag	0,5425	0,001

Die Ähnlichkeitsanalyse zeigte im Diagramm für die Probenzeitpunkte Tag -11, Tag -3 und Tag 60 der 4 verschiedenen Versuchsgruppen, dass sich die beta-Diversität des Darmmikrobioms am Ankunftsstag im Labor (Tag -11) ähnlich der vor Studienbeginn (Tag -3) verhielt (Abbildung 20). Nach zweimonatiger Studienphase war für die Proben von Tag 60 ein Unterschied zwischen den Gruppen erkennbar: Die normgewichtige Kontrollgruppe (CON) separierte sich im Diagramm deutlich von den Cafeteria-Diät-gefütterten Gruppen CD und PF, welche eher gleichmäßig in ein und demselben Quadranten des Diagramms angeordnet wurden, was auf eine Übereinstimmung in der beta-Diversität hinwies (Abbildung 20). Die Telmisartan-behandelte Gruppe TEL war hinsichtlich der beta-Diversität weder der CON noch der CD-Gruppe zuzuordnen (Abbildung 20). Insgesamt ließ sich der PCoA entnehmen, dass sowohl der Zeitpunkt der Probe als auch die Diät und Therapie Einfluss auf die beta-Diversität haben. Diese veränderte sich auf der einen Seite über den Studienzeitraum, parallel zu den Ergebnissen der Phylogenetischen Analyse und der alpha-Diversität. Andererseits zeigte sich in der beta-Diversität nicht nur der Unterschied der Diät, sondern auch der Behandlung der Ratten mit Telmisartan.

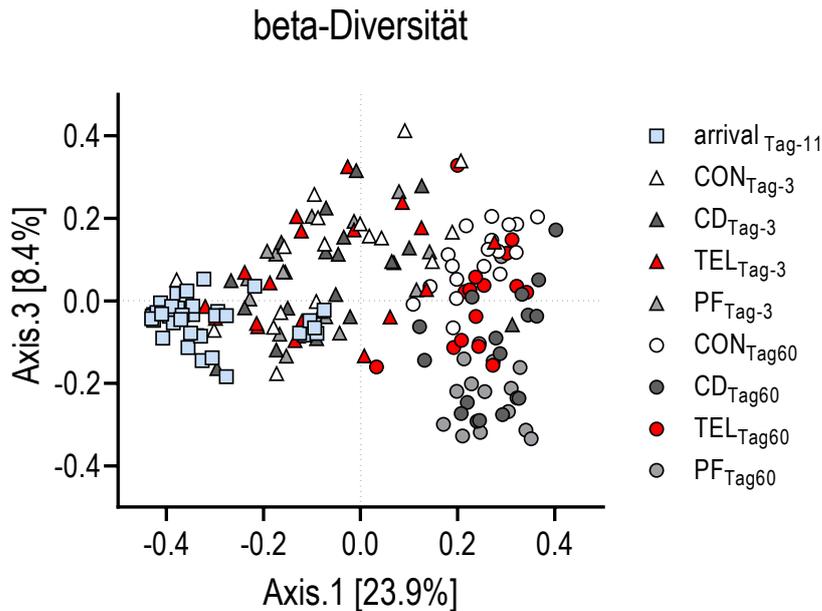


Abbildung 20: Principal Coordinates Analysis (PCoA) der beta-Diversität, arrival d-11 entspricht der gepoolten beta-Diversität aller Tiere bei Ankunft im Labor; dargestellt sind axis 1 und 3.

3.2.6. BORAL

Zur besseren Visualisierung wurde eine BORAL Analyse durchgeführt. Hierfür wurden die Proben von Tag 60 in Bezug auf ihre Unterschiedlichkeit in der Artenzusammensetzung und den relativen Häufigkeiten dieser Arten auf Familien-Ebene analysiert (Abbildung 21). Dabei ergab sich eine eindeutige Abgrenzbarkeit der Proben der TEL-Ratten von den anderen Cafeteria-Diät-gefütterten Gruppen CD und PF, da TEL die größere Schnittmenge mit CON aufwies. Die CON-Gruppe wurde deutlich von CD und PF separiert. Die Proben der CD- und PF-Tiere hatten in der BORAL eine Überschneidung in ihrer Artenzusammensetzung und der Abundanz dieser Arten. Insgesamt stellte sich hier ein Einfluss der Diät und des Telmisartans auf das Darmmikrobiom dar, da insbesondere TEL und PF keinerlei Übereinstimmungen zeigten.

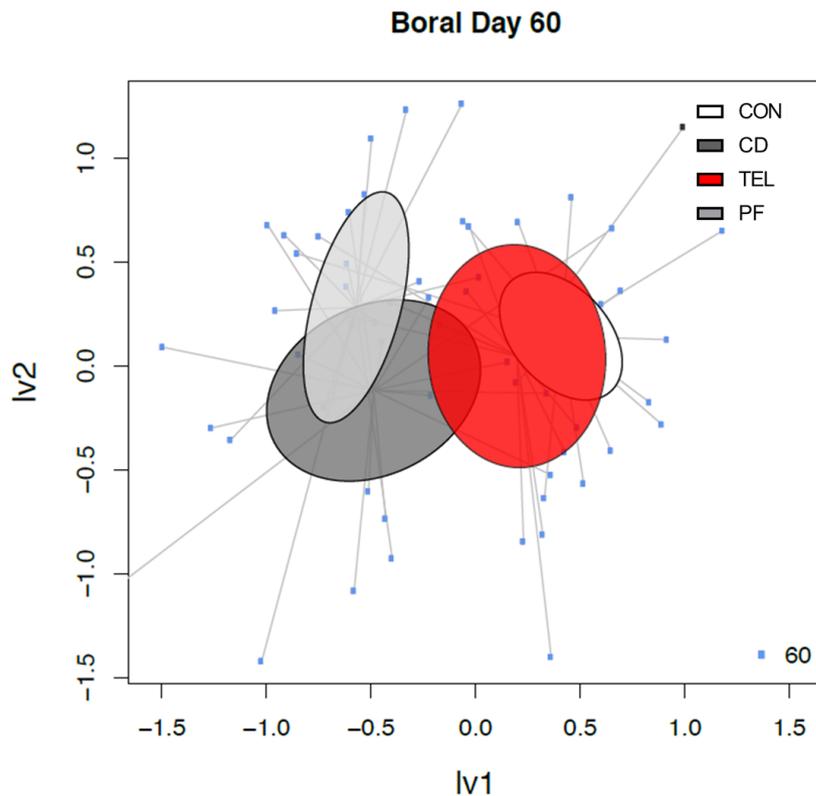


Abbildung 21: BORAL (*Bayesian Ordination and Regression Analysis of Multivariate Abundance Data*) der Stuhlproben von Tag 60.

3.2.7. Random Forest Algorithmus

Zur Objektivierung der Sequenzierungsergebnisse wurden alle Proben mit Hilfe eines „machine learning“ Verfahrens – dem Random Forest Algorithmus – klassifiziert, um den Effekt der 4 verschiedenen Gruppen und der 6 unterschiedlichen Probezeitpunkte zu überprüfen. Die Klassifikation durch den Random Forest Algorithmus ergab eine zuverlässige Zuordnung der Proben für die Probezeitpunkte Tag -11 und Tag -3, welche das Mikrobiom bei Ankunft der Ratten im Labor und vor Studienbeginn wiedergeben (98 % Übereinstimmung für Tag -11 und 96 % für Tag -3, Tabelle 11). Nach 60 Tagen Diät und Therapie wurden die Proben der CON-Ratten am eindeutigsten klassifiziert. Die Proben der CD- und PF-Tiere an Tag 60 wurden jeweils mit gleichem Anteil beiden vorhergesagten Klassen zugeteilt (Tabelle 11). An dieser Stelle gelang es dem Algorithmus nicht zwischen den Diäten (freier Zugang zu Schoko- /Keksriegeln und Chow in CD sowie limitierter Zugang durch die pair-feeding Methode in PF) zu unterscheiden. Die Proben der TEL-Gruppe wurden an Tag 60 wiederum zuverlässiger klassifiziert und nur zu geringen Prozentwerten den anderen beiden Cafeteria-Diät-gefütterten Gruppen CD und PF zugeteilt. Hier ließ sich die Vermutung aufstellen, dass die Behandlung mit Telmisartan einen für den Algorithmus erkennbaren Unterschied im Darmmikrobiom hervorrufen konnte.

Tabelle 11: Übersicht der Confusion Matrix des Random Forest Algorithmus für die Proben der Tage -11, -3 und Tag 60 der 4 Gruppen; die dargestellten Werte sind Prozentwerte [%], die größten Übereinstimmungen von Prognose und Referenz sind in fetter Schrift hervorgehoben; der Algorithmus wurde trainiert mit $\frac{3}{4}$ der Daten [5-fache Kreuzvalidierung, 10 Wiederholungen mit einer Genauigkeit (engl.: Accuracy) von 0,826 und einer Kappa Statistik von 0,766] und $\frac{1}{4}$ der Daten wurde klassifiziert [Accuracy = 0.878; 95% CI: 0.738-0.9592, Kappa = 0,8347].

prediction (n=6)	reference (n=12)					
	Tag -11	Tag -3	CON 60	CD 60	TEL 60	PF 60
Tag -11	94	1	0	0	4	1
Tag -3	4	96	0	0	0	0
CON 60	0	0	85	6	7	3
CD 60	0	0	8	47	0	53
TEL 60	0	8	2	6	66	19
PF 60	0	0	6	50	10	34

Die Cluster-Matrix der 20 wichtigsten OTUs demonstrierte, welche OTUs mit welcher Gewichtung in % die korrekte Klassifizierung in die entsprechenden Gruppen bewirkten. Hierbei schienen für die TEL-Klassifikation OTU 2 (44,29 %), OTU 45 (54,15 %), OTU 55 (65,49 %), OTU 65 (34,72 %) und OTU 108 (43,81 %) am wichtigsten zu sein (fett hervorgehoben in Tabelle 12), die in der TEL-Gruppe an Tag 60 im Vergleich zu CD und PF erhöht waren. Weitere OTUs, die in der TEL-Gruppe einen vergleichsweise niedrigen Einfluss hatten sind OTU 69 (11,41 %) und OTU 122 (19,07 %). Am auffälligsten war die Diskrepanz allerdings für OTU 78, das in der TEL-Gruppe zu 0 % Einfluss auf die Klassifikation hatte (rot hervorgehoben in Tabelle 12). OTU 78 gehört zur Familie der Lachnospiraceae.

Tabelle 12: Cluster-Matrix der 20 wichtigsten OTUs, die den Random Forest Algorithmus beeinflussen; die dargestellten Werte sind Prozentwerte [%].

OTU	Tag -11	Tag -3	CON 60	CD 60	Tel 60	PF 60
2	68,41	22,16	44,34	16,3	44,29	29,78
6	68,11	84,99	71,83	50,29	59,66	49,18
8	42,31	30,03	67,85	18,41	36,87	31,94
13	66,48	79,05	59,68	44,58	50,28	64,08
37	46,97	44,40	14,10	62,40	71,75	70,25
38	51,75	57,54	42,43	66,47	58,68	45,04
45	71,83	68,34	16,98	25,32	54,15	22,36
50	88,60	98,74	87,81	74,89	79,81	79,69
55	66,03	77,44	78,49	51,96	65,49	37,76
65	76,51	66,84	25,92	14,28	34,72	25,19
69	50,16	61,61	77,14	44,43	11,41	11,74
78	38,60	47,56	27,30	73,62	0	20,70
89	88,60	60,67	64,69	57,84	42,83	26,94
108	24,77	37,61	73,78	18,76	43,81	23,24
122	56,43	67,89	44,32	41,05	19,07	31,24
173	78,37	34,18	49,85	42,40	41,08	36,43
174	61,31	65,40	35,11	35,26	40,57	24,77
175	44,72	36,58	71,82	32,37	27,76	14,10
233	84,41	100	28,13	21,67	34,51	33,35
303	65,66	23,46	35,11	35,26	40,57	24,77

3.2.8. Differential Abundant Species

Zur Beantwortung der Frage, ob eine bestimmte Indikator-Spezies eine Therapie mit Telmisartan detektiert, wurde die DESeq2-Analyse durchgeführt. Hierbei wurden auf die Proben der TEL-Gruppe von Tag 60 die Abundanzen der OTUs im Vergleich zu den anderen 3 Gruppen ausgewertet, da sich in den vorangegangenen Analysen eine Unterschiedlichkeit im Mikrobiom der TEL-Tiere am deutlichsten nach 2 Monaten Diät und Therapie andeutete.

Dabei fielen 4 OTUs auf, die in der TEL-Gruppe eine deutlich niedrigere Abundanz hatten als in der jeweiligen Vergleichsgruppe: OTU 9 (Firmicutes Erysipelotrichaceae *Allobaculum stercoricanis*) war im Vergleich zu CD und PF stärker erniedrigt als im Vergleich zu CON (fett hervorgehoben in Tabelle 13), OTU 23 (Firmicutes) war gleichermaßen zu allen 3 Gruppen erniedrigt, OTU 368 (Firmicutes Erysipelotrichaceae *Holdemania filiformis*) deutlicher zur CD-Gruppe erniedrigt und OTU 1579 (Firmicutes Clostridiales) am deutlichsten im Vergleich mit PF erniedrigt (Tabelle 13). Eine erhöhte Abundanz lag bei 5 OTUs vor, von denen bis auf OTU 57 alle zum Phylum der Bacteroidetes gehörten (grau hinterlegte Felder der Tabelle 13).

Tabelle 13: Ergebnisse der DESeq2 Analyse für die TEL-Gruppe an Tag 60, ein negativer Wert der $I2fc \triangleq$ einer Erniedrigung in der TEL-Gruppe, positiver Wert der \log_2 -fold change ($I2fc$) \triangleq einer Erhöhung der Abundanz des jeweiligen OTUs, in Tabelle grau hinterlegt; * $p_{adj} < 0,05$ vs. TEL, in die Tabelle inkludiert wurden alle OTUs deren $p_{adj} < 0,1$ ergab.

OTU	$I2fc_{TEL_CON}$	$I2fc_{TEL_CD}$	$I2fc_{TEL_PF}$	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species
9	-3,6265	-7,7498	-8,9120	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Allobaculum	Allob_stercoricanis
23	-3,2782	-3,8137	-3,4712	Firmicutes	NA	NA	NA	NA	NA
368	-2,4722	-3,1742	-2,4859	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Holdemania	Holdemania_filiformis
1579	-1,9393	-2,6525	-3,3957	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	NA	NA	NA
57	2,0305	2,4724	2,7302	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Clostridium_XVIII	NA
85	2,4097	2,6190	1,9423	Bacteroidetes	NA	NA	NA	NA	NA
89	5,2083	4,2977	2,9836	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Alistipes	NA
167	3,9542	3,6306	2,9875	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	NA	NA	NA
195	3,9204	3,6770	3,0469	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	NA	NA	NA

3.2.9. “Co-occurrence Network” Analysis

Die Koinkindenz-Netzwerkanalyse (“Co-occurrence Network” Analysis) erfolgte für die Proben von Tag 60, um Informationen über die innerhalb der Gruppen unter Einfluss der Diät und Therapie gemeinschaftlich auftretenden mikrobiellen Familien zu erhalten. Miteingeflossen sind dabei die OTUs, die bei mind. 10 Proben der einzelnen Gruppen auftraten, dazu wurden schließlich 312 OTUs als Interferenz verwendet. Die Koinkindenz-Netzwerkanalyse zeigte anhand des Kleinbergs Hub-Scoring, dass die Zentralisierung im Netzwerk bei den TEL-Ratten (66,27) im Vergleich zu CON- (26,82) und CD- (30,05) oder PF-Tieren (28,94) am höchsten war (Abbildung 22-A). Diese Zentralisierung bei TEL geht einher mit der höchsten Netzwerkstabilität, was in den weiteren analysierten Charakteristika der sogenannten Knotenpunkte des Netzwerks zweifache Bestätigung findet: auf der einen Seite war der „node degree“ (Knotengrad), der auf der Anzahl der Verbindungen der OTUs untereinander basiert, bei den TEL-Ratten höher als bei den anderen Gruppen (Abbildung 22-C). Andererseits war die Konnektivität des Netzwerks trotz der Entfernung von Knotenpunkten stabiler (Abbildung 22-D). Der „PageRank-Index“, der die Qualität der Konnektivität der Knotenpunkte anzeigt, war zwischen den Gruppen nicht verschieden (Abbildung 22-B).

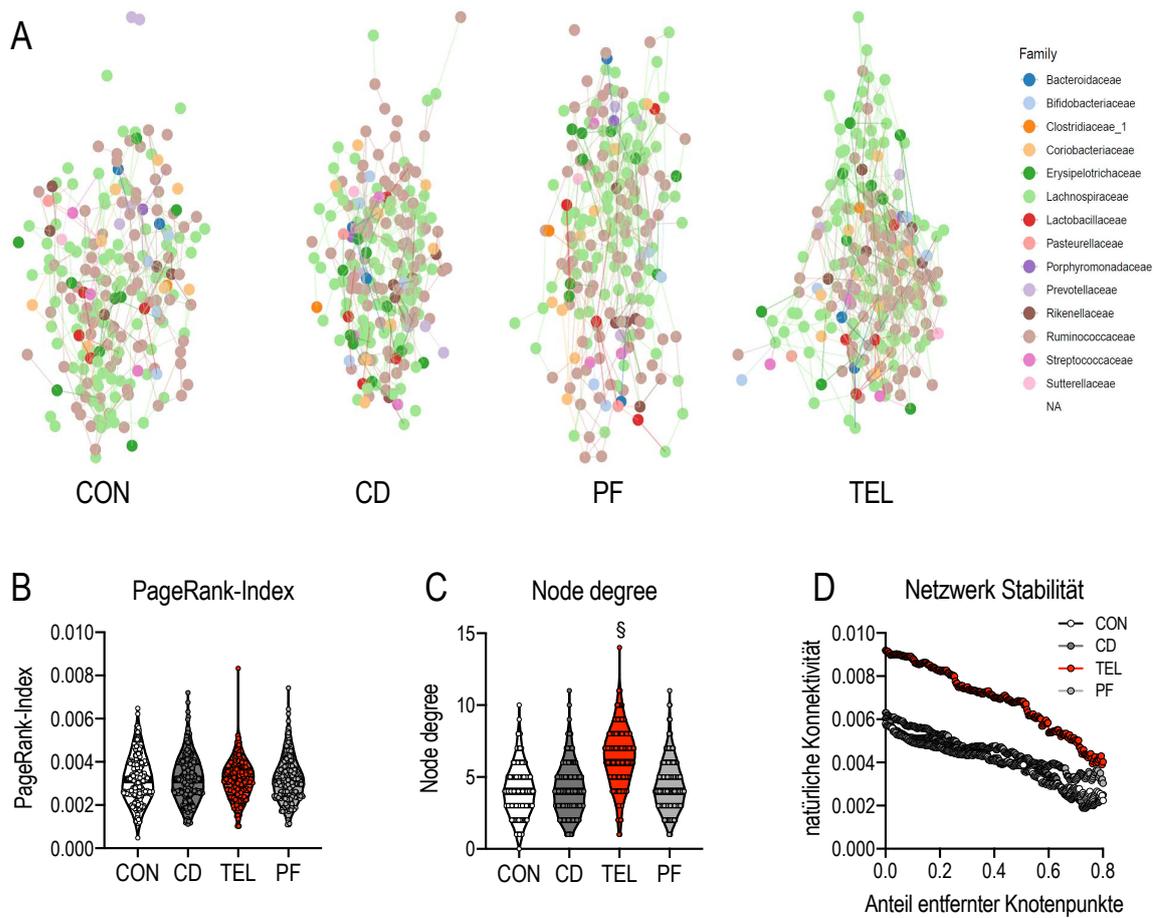


Abbildung 22: Koinzidenz-Netzwerkanalyse für die Proben von Tag 60; Netzwerkdiagramme für jede Gruppe, die farbigen Punkte dienen der Darstellung der Taxonomie auf Familien-Ebene (A); Darstellung des „PageRank-Index“ (B) und „node degree“ (C) in Violin plots, § $p < 0.05$ vs. CON, CD, und PF [Kruskal-Wallis test + Dunn correction]; Darstellung der Netzwerkstabilität im Liniendiagramm (D).

4. Diskussion

Im Fokus dieser Studie stand der Einfluss von Telmisartan auf das Darmmikrobiom, der ursächlich für die unter AT1-Blockade mehrfach beobachtete verminderte Gewichtszunahme sein könnte. Dieser Einfluss spiegelt sich in wesentlichen Befunden der vorliegenden Darmmikrobiomanalyse wider – wie der beta-Diversität, der Klassifizierung nach Random Forest oder auch der Enterotype like Analyse - der in dieser Form erstmals beschrieben wird.

Ein weiteres Ziel dieser Studie war es, den Einfluss der 3 verschiedenen Futterregime auf das Darmmikrobiom herauszustellen (Chow-Normdiät, Cafeteria-Diät, pair-feed-Diät). Diese Veränderung lässt sich u. a. in der erhöhten Abundanz der Firmicutes-Stämme in den Cafeteria-Diät-gefütterten Gruppen CD, TEL und PF nachvollziehen, die assoziiert ist mit einer hochkalorischen Ernährung sowohl bei Menschen (Jumpertz et al. 2011) als auch bei Ratten (Lin et al. 2016).

Die Basis für den Vergleich der Darmmikrobiom-Veränderungen bildete die Etablierung des zugehörigen Phänotyps: in Übereinstimmung zu den publizierten Daten der AG entwickelten auch die Ratten dieser Studie unter Cafeteria-Diät eine Adipositas, während die Telmisartan-behandelten Tiere trotz der Cafeteria-Diät normgewichtig blieben (Müller-Fielitz et al. 2014, Müller-Fielitz et al. 2015, Schuchard et al. 2015, Winkler et al., 2016).

Übereinstimmend zum Ergebnisteil werden im Folgenden die Unterschiede in der Ausprägung des Phänotyps und die des Genotyps der Darmmikrobiomanalyse separat diskutiert. Da der Einfluss von Telmisartan auf Körpergewicht, Energieaufnahme, Leptin- und Insulinsensitivität schon mehrfach beobachtet und erörtert wurde, soll der Telmisartan-Einfluss auf diese metabolischen Parameter entsprechend kürzer diskutiert werden und der neue Aspekt, nämlich der Telmisartan-Einfluss auf das Mikrobiom, viel mehr im Mittelpunkt der nun folgenden Diskussion stehen.

4.1. Der Einfluss von Diät und Therapie auf die Körpergewichtsentwicklung, Energieaufnahme und die metabolischen Parameter

Die CD-Tiere entwickelten unter der hochkalorischen Diät eine Adipositas, die durch die Telmisartan-Therapie in der TEL-Gruppe verhindert werden konnte (Abbildung 6). In dieser Hinsicht bestätigen unsere Ergebnisse die Vorleistungen der AG Raasch, die bewiesen, dass die AT1-Blockade in Mäusen (Dapper et al., 2019, Rawish et al., 2020) und Ratten zu verminderter Energieaufnahme und geringerer Körpergewichtszunahme führt (Gustaityte et al., 2019; Miesel et al., 2012; Müller-Fielitz, et al., 2012; Schuchard et al., 2015; Winkler

et al., 2018, 2016). Die hier erstmalig in der AG angewandte Diät des pair-feeding sollte zur Diskriminierung zwischen einem direkten Telmisartan-Einfluss und der verminderten Energieaufnahme unter Telmisartan dienen. Dabei lässt der Vergleich zwischen PF und TEL-Gruppe die Schlussfolgerung zu, dass die verminderte Gewichtszunahme direkt zurückzuführen ist auf eine verminderte Energieaufnahme, da die PF-Gruppe in ihren Körpermaßen nicht verschieden von der TEL-Gruppe war (Abbildung 6).

Die hochkalorische Diät in Form der Cafeteria-Diät enthielt neben dem freien Zugang zur Chow-Normdiät täglich wechselnde Schoko- und Kekscriegel und entsprach damit einer hoch-zucker und hoch-fetthaltigen Diät (Anhang Tabelle 14). Die kumulative Energieaufnahme war in der CD-Gruppe am größten (Abbildung 7), womit frühere Publikationen bestätigt werden können (Gustaityte et al., 2019; Miesel et al., 2012; Müller-Fielitz et al., 2012; Schuchard et al., 2015; Winkler et al., 2018, 2016). Der relative Schoko-Kekscriegel-Anteil war in den Gruppen CD und TEL ähnlich, so dass hier kein Telmisartan-Effekt in Form von weniger gefressenen Schoko-Kekscriegeln sichtbar wurde, sondern eher in der absoluten Energieaufnahme (Abbildung 7). Auch in dieser Hinsicht stimmen unsere Ergebnisse mit älteren Daten überein (Miesel et al., 2010; Müller-Fielitz et al., 2014). Die in dieser Studie neuen Beobachtungen zum Fressverhalten der Tiere aufgrund des pair-feeding zeigten, dass die Restriktion der Futtermenge in der PF-Gruppe dazu führte, dass sich das Fressverhalten der Ratten veränderte (Abbildung 7). Die PF-Gruppe nahm die Tagesration an Energie doppelt so schnell auf wie die anderen 3 Versuchsgruppen und hatte bereits innerhalb von 2 h den Großteil der Energiemenge gefressen. Untersuchungen von Furlong et al. zu binge-ähnlichen Konsum von wohlschmeckender, hochkalorischer Nahrung ergaben, dass die Versuchsgruppe der Ratten mit zeitlich-limitierten Zugang zu gesüßter Kondensmilch in dieser Zeit mehr Energie aufnahm, als die Tiere mit unbegrenztem Zugang zur gesüßten Kondensmilch (Furlong et al., 2014). Dieser Vergleich lässt die Vermutung zu, dass der restriktive Zugang zu Energie zur Folge hatte, dass die Ratten diese Energie einerseits schneller aufnahmen, sowie andererseits über ihren normalen Energiebedarf hinausgehend und letztlich auch noch mehr Energie zu sich genommen hätten. Welche Mechanismen u.a. auf neuronaler Ebene dieser Verhaltensmodulation zu Grunde liegen, konnte beim Fokus dieser Studie nicht weiter untersucht werden, bietet aber Ausgangspunkte für weitere Untersuchungen.

Die größte Energieaufnahme in der CD-Gruppe führte zu einer Vergrößerung der Fettdepots, was sich durch die größere viszerale und subkutane Fettmasse in der MRT bestätigte, wohingegen bei TEL und PF diese Fettmassen weniger ausgeprägt waren (Abbildung 8). Kongruent zu diesen Ergebnissen konnten bereits Miesel et al. zeigen, dass die Cafeteria-

Diät in SH-Ratten im Vergleich zur Chow-Fütterung in der MRT zu vergrößerten Fettmassen-Befunden führt (Miesel et al., 2010).

Die vergrößerte Fettmasse in der CD-Gruppe sezernierte größere Mengen an Leptin, was sich in den erhöhten Plasma-Leptinspiegel von CD widerspiegelte (Abbildung 13). Die Telmisartan-behandelten Tiere hatten ein niedrigeres Plasma-Leptin bei geringerem Körpergewicht und Fettmasse sowie verminderter Energieaufnahme, was auf eine erhaltenen Leptinsensitivität unter Telmisartan hindeutet und mit den Ergebnissen von Müller-Fielitz et al. übereinstimmt, die die Verhinderung einer Entstehung der Leptinresistenz unter Cafeteria-Diät in SD-Ratten durch ARB belegen konnten (Müller-Fielitz et al., 2015). Die positive Korrelation von Plasmaleptin und Energieaufnahme in der CD-Gruppe konnte den Befund der Leptinresistenz in CD unterstreichen (Abbildung 13), allerdings fand sich für TEL ebenfalls eine positive Korrelation von Plasmaleptin und Energieaufnahme und keine negative wie in der Chow-gefütterten CON-Gruppe. Hierbei scheint die erhöhte Energieaufnahme von TEL im Vergleich zu CON durch den Zugang zu den Schoko- und Keksriegeln der Cafeteria Diät ausschlaggebend gewesen zu sein (Abbildung 7). Nichtsdestotrotz lag in CD eine Hyperphagie, die größere Gewichtszunahme und das höchste Plasma-Leptin vor (Abbildung 6, Abbildung 7). Bei Adipositas verliert Leptin die Fähigkeit, die Energieaufnahme zu hemmen sowie den Energieverbrauch zu erhöhen, was als Leptinresistenz bezeichnet wird (Enriori et al., 2006). Erhöhte Triglyceride schränken die Penetration von Leptin über die Bluthirnschranke ein (Banks et al., 2004; Rhea et al., 2017). Da auch in unserer CD-Gruppe erhöhte Triglycerid-Spiegel nachweisbar waren (Abbildung 14), sehen wir darin eine mögliche Ursache für die in den CD-Ratten vorliegende Leptinresistenz. Unter Telmisartan-Behandlung und der restriktiven Energieaufnahme durch das pair-feeding, waren die Plasma-Triglyceride in TEL und PF niedriger als in der CD-Gruppe (Abbildung 14), was ebenfalls in den TEL-behandelten Tieren der vorangegangenen Arbeiten der AG gesehen wurde (Müller-Fielitz et al., 2014).

TEL und PF zeigten in der indirekten Kalorimetrie im Vergleich zu CD einen erhöhten Energieverbrauch (Abbildung 9), was darauf hindeuten könnte, dass die verminderte Gewichtszunahme in TEL und PF in Zusammenhang mit einem erhöhten Energieverbrauch steht, der nicht direkt auf einen Telmisartan-Effekt zurückzuführen ist. Des Weiteren war der RER in CD erniedrigt und in TEL und PF normalisiert, was gegen eine erhöhte Fettsäure-Oxidation und folglich Lipolyse spricht. Hier zeigten sich unsere Ergebnisse diskrepant zu Vorleistungen der AG Raasch, die herausstellen konnten, dass die Behandlung mit Telmisartan in SD-Ratten zu einer Verminderung der RER führt (Müller-Fielitz et al., 2014; Winkler et al., 2016) und an dieser Stelle somit unserer Annahme widerspricht, das aufgrund der er-

niedrigsten RER verminderte Fettmassen in der MRT abzubilden waren. In der Aktivität (Lokomotion) sahen wir eine Verminderung in der Hellphase in der PF-Gruppe, was sich letztlich im Energieverbrauch jedoch nicht widerspiegelte (Abbildung 9). Auch an dieser Stelle verhielten sich unsere Versuchsgruppen diskrepanz zu vorangegangenen Studien, in denen die Cafeteria-Diät zu einer erhöhten Lokomotion in SD-Ratten führte (Müller-Fielitz et al., 2014; Schuchard et al., 2015). Da wir dasselbe Protokoll für die Durchführung und Auswertung der indirekten Kalorimetrie verwendeten, lässt sich nur vermuten, dass der Zeitpunkt für die indirekte Kalorimetrie im Studienprotokoll zu früh gewählt wurde oder die Gewöhnung der Versuchstiere an neue Versuchsbedingungen zu Störungen im Metabolismus führten.

In den hämodynamischen Untersuchungen zeigte sich ein durch die Cafeteria-Diät erhöhter Blutdruck in CD und PF, der durch die Therapie mit Telmisartan in der TEL-Gruppe unter CON-Level erniedrigt wurde (Abbildung 10). Eine übermäßige Gewichtszunahme, insbesondere in Assoziation mit erhöhtem viszeralen Fettgewebe, war beim Menschen verbunden mit Bluthochdruck (Hall et al., 2015). Dieses Phänomen ließ sich auch in den Ratten unserer CD-Gruppe beobachten. Ähnliche Befunde konnten an SD-Ratten auch von anderen AGs erhoben werden, die die Ursache für die Adipositas induzierte Hypertonie sowohl in der Aktivierung des RAS im Fettgewebe (Boustany et al., 2004; Kim, 2017) als auch in der Aktivierung des Sympathikus bei Übergewicht sahen (Masuo et al., 2000). Da die PF-Gruppe bei gleicher Gewichtszunahme wie TEL eine ähnliche Blutdruckerhöhung wie die CD-Tiere aufwies (Abbildung 10), scheint auch eine restriktive Energieaufnahme von hochkalorischer Nahrung – in Form des pair-feeding – für eine Blutdruckerhöhung ausreichend.

Bestätigung für einen weiteren protektiven metabolischen Effekt des Telmisartan zeigte sich darin, dass die CD-Gruppe eine Hyperinsulinämie aufwies, die tendenziell auch in der PF-Gruppe sichtbar wurde und durch die Telmisartan-Behandlung vermieden werden konnte (Abbildung 11). Die TEL-Gruppe zeigte bei gleicher Energieaufnahme wie die PF-Gruppe Insulin-Spiegel auf Niveau der Chow-gefütterten CON-Gruppe (Abbildung 11), womit der Telmisartan-Effekt auf den Insulin-Spiegel als unabhängig von einer verminderten Energieaufnahme gesehen werden kann. Darüber hinaus zeigten nur CD und PF erhöhte Amylin-Spiegel (Tabelle 9). Im ITT hatte TEL im Vergleich zu CD tendenziell erniedrigte Nüchtern-glukose- und Nüchterninsulinspiegel (Abbildung 12). Allerdings ließ sich eine verbesserte Insulinantwort in den gemessenen Glukosespiegeln nach s.c. Insulin-Injektion nicht darstellen (Abbildung 12), hier zeigte nur die normgewichtige CON-Gruppe mit Chow-Diät einen signifikant größeren Abfall der Plasmaglukose. Damit zeigten sich unsere Ergebnisse nicht voll übereinstimmend mit den Vorleistungen der AG, da Winkler et al. erniedrigte Nüchtern-

Insulin-Spiegel in den Telmisartan-behandelten SD-Ratten herausstellen konnten (Winkler et al., 2016).

Zusammenfassend konnten wir in dieser Studie für den Phänotyp der Versuchstiere überzeugend darstellen, dass die SD-Ratten unter Cafeteria-Diät eine Adipositas und Hyperphagie entwickelten, erhöhte Insulin-, Leptin- und Triglycerid-Spiegel sowie eine Insulin- und Leptinresistenz aufwiesen. All diese Effekte konnten vermindert werden durch die Therapie mit Telmisartan. Der Vergleich mit der pair-feed-gefütterten Gruppe PF lässt an dieser Stelle die Frage offen, ob der Einfluss des Telmisartans hauptsächlich über die verminderte Energieaufnahme wirkt und wie diese verursacht wird, da die PF-Ratten im Phänotyp sich nicht von den TEL-Tieren unterscheiden. Dazu soll im Folgenden die Diskussion der Genotyp-Analysen der Darmbakterien weitere Erkenntnisse bringen.

4.2. Der Einfluss von Diät und Therapie auf das Darmmikrobiom

Das auffälligste und neue Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass die Telmisartan-Behandlung eine spezifische Signatur im Darmmikrobiom induziert, welche sich deutlich von derjenigen der anderen 3 Versuchsgruppen CD, PF und CON unterscheidet. Zum einen führte die hoch-zucker- und hoch-fetthaltige Cafeteria-Diät zu Änderungen im Darmmikrobiom der Ratten: veränderte Abundanzen bestimmter Phyla und Familien, eine Erhöhung der F/B-Ratio, unterschiedliche beta-Diversität und Enterotypen (Abbildung 23). Dabei zeigte sich das Darmmikrobiom von CD- und PF-Ratten nahezu gleich, obgleich sie wie unter 4.1. beschrieben Unterschiede im Phänotyp und Energieaufnahme aufwiesen. Dies erlaubt unsere erste Schlussfolgerung, dass die Zusammensetzung der Diät ausschlaggebender ist als die absolute Energiemenge. Zum anderen resultierte die exakt gleiche Diät von TEL- und PF-Ratten aufgrund der pair-feeding Methode nicht in dem gleichen Mikrobiom, sondern TEL separierte sich in beta-Diversität, Enterotypen und Random Forest deutlich von PF. Folglich ist unsere zweite Schlussfolgerung, dass der charakteristische Einfluss des Telmisartan auf das Mikrobiom unabhängig von der Diät zu sehen ist. Darüber hinaus ähnelte das TEL-Mikrobiom in vielen Punkten dem der schlanken Chow-Normdiät gefütterten CON-Tiere, wie bspw. in den phylogenetischen Analysen, F/B-Ratio oder Enterotypen. Interessanterweise zeigten sich jedoch wesentliche Unterschiede im Random Forest oder der Koinzidenz-Netzwerkanalyse. Demnach war unsere dritte Schlussfolgerung, dass Telmisartan sich speziell auf bestimmte Bakterien auswirkt. Da es uns jedoch nicht gelungen ist, eine spezifische Indikatorart zu identifizieren, nehmen wir letztlich an, dass eher ein Netzwerk von Arten für die spezifische TEL-Signatur im Darmmikrobiom verantwortlich ist. In den nachfolgenden Abschnitten soll

1. die zentrale Schlussfolgerung, dass Telmisartan spezifisch das Darmmikrobiom beeinflusst, im Detail erläutert werden,
2. die weitergehende Frage diskutiert werden, warum unter Telmisartan das Darmmikrobiom spezifisch verändert ist, und
3. erörtert werden, ob und wie eine Telmisartan-induzierte Veränderung des Mikrobioms die Energiehomöostase und somit die Gewichtsentwicklung regulieren könnte.

4.2.1. Telmisartan beeinflusst spezifisch und nahrungsmittelunabhängig das Darmmikrobiom

Betrachtete man die Ergebnisse der phylogenetischen Analyse (Abbildung 15), fielen im Wesentlichen zwei bedeutsame Aussagen auf: erstens waren die nachgewiesenen Abundanzen der Beweis dafür, dass die Aufarbeitung der Stuhlproben und die erfolgte DNA-Sequenzierung erfolgreich zu repräsentativen Daten des Darmmikrobioms der Versuchstiere geführt hatte. Denn für alle Proben im Studienverlauf ließen sich die bakteriellen Stämme in größter Abundanz sequenzieren, die das Darmmikrobiom bei Mensch und Nagern bilden, folglich die Phyla der Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria und Actinobacteria (Eckburg, 2005; Lozupone et al., 2012, Blaut und Klaus, 2012). Weitere Übereinstimmungen mit vorangegangenen Studien lieferten unsere Ergebnisse der Abundanzen dieser Stämme, denn Firmicutes und Bacteroidetes stellten gemeinsam mit geringer Variabilität mehr als 90% der vorhandenen Phyla dar (Eckburg, 2005). Zweitens waren unsere Ergebnisse ein Beleg dafür, dass sowohl die Akklimatisierung an die örtlichen Haltungsbedingungen als auch die Chow-/ Cafeteria-Diät zu Veränderungen der Abundanzen der häufigsten Stämme und Familien führten. In der Akklimatisierungszeit sahen wir unter alleiniger Chow-Fütterung bei allen Tieren eine Zunahme von Bacteroidetes, für Tag -3 als „baseline“ bestanden keine Gruppenunterschiede. Da das Mikrobiom nicht nur dem Einfluss der Diät unterliegt – denn auch die Vorfütterung bei Charles River bestand aus Chow-Futter – sondern auch futterunabhängige Einflüsse wie Standort und Alter Änderungen im Darmmikrobiom hervorrufen können (Panda et al., 2014), interpretieren wir die Veränderungen von Tag-11 bis Tag-3 in diesem Sinne. Im Studienverlauf führte die Cafeteria-Diät zu einer Zunahme der Firmicutes- zu ungunsten der Bacteroidetes-Phyla, womit unsere Daten Literaturbefunde bestätigen (Ley et al., 2006). Allerdings war diese Zunahme auch in PF und TEL nachweisbar, die unter geringerer Energieaufnahme denselben schlanken Phänotyp wie die CON-Gruppe aufwiesen, die weitergehend die größere Abundanz bei den Bacteroidetes hatte. Jumpertz und Kollegen zeigten in einer kleinen Studien mit schlanken und übergewichtigen Menschen, dass eine Erhöhung der Kalorienzufuhr für wenige Tage insbesondere bei den schlanken Versuchspersonen zu einer Zunahme der Firmicutes-Stämme führte (Jumpertz et al., 2011). Dies lässt für unsere Studie die Vermutung zu, dass

das Körpergewicht selbst einen geringeren Einfluss auf das Darmmikrobiom hat, sondern vielmehr die Zusammensetzung der aufgenommenen Nahrung, da der relative Anteil von Keksschokoriegeln und Chow-Futter in CD, TEL und PF ja annähernd gleich war (Abbildung 7). Im Vergleich zur CON-Gruppe zeigten die Cafeteria-Diät-gefütterten Gruppen (CD, TEL und PF) eine erhöhte Abundanz der Proteobacteria (Abbildung 15), diese wurde ebenso in Mäusen unter hoch-fetthaltiger Diät und Menschen mit Übergewicht und Diabetes beobachtet (Chelakkot et al., 2018). Die größte Zunahme der Actinobacteria-Stämme zeigte die CD-Gruppe (Abbildung 15). Die Assoziation von Actinobacteria und Übergewicht wurde auch von Turnbaugh et al. in ihren Untersuchungen an übergewichtigen und schlanken Zwillingspaaren deutlich, da im Vergleich die übergewichtigen Zwillingspaare erhöhte Abundanzen von Actinobacteria und erniedrigte Bacteroidetes-Anteile zeigten (Turnbaugh et al., 2009). Eine Erhöhung der Actinobacteria-Abundanz war in der CON-Gruppe praktisch überhaupt nicht und in der TEL und PF-Gruppe kaum auffällig (Abbildung 15). Dies lässt wiederum einen Effekt durch die erhöhte Kalorienaufnahme in den CD-Tieren vermuten. Die Zunahme der Actinobacteria- und Proteobacteria-Abundanzen unter Cafeteria-Diät einhergehend mit Fettleibigkeit, Dyslipidämie, Insulinresistenz und Lebersteatose in Wistar-Ratten konnten del Bas und Kollegen ebenfalls beobachten (del Bas et al., 2018). Auf Phylum-Ebene sahen wir eindeutig den Einfluss der Zeit und die spezifischen Veränderungen, die in Übereinstimmung mit der Literatur auf eine hoch-fett u/o hoch-zuckerhaltige Ernährung zurückzuführen sind. Ein Einfluss des Telmisartans ließ sich an dieser Stelle noch nicht ableiten, da sich die TEL-Gruppe nicht anders darstellte als die PF-Gruppe.

Zur genaueren Auswertung der Änderungen der Phylum-Abundanzen erfolgte die Betrachtung der Familien. Die Zunahme der Firmicutes-Stämme basierte in der CD- und PF-Gruppe vorrangig auf der Erhöhung der Familien der Erysipelotrichaleae und Lachnospiraceae (Abbildung 16). Hierbei grenzte sich die TEL-Gruppe interessanterweise von CD und PF ab, da eine Zunahme der Erysipelotrichaceae unter Telmisartan ausblieb (Abbildung 16). Ähnliches konnten Mehrpouya-Bahrami und Kollegen in Mäusen für Rimonabant (CB1-Blocker) beobachten, die unter der CB1-Blockade Mikrobiomveränderungen feststellten, die u.a. eine erniedrigte Erysipelotrichaceae-Abundanz beinhalteten, einhergehend mit der Verbesserung eines Diät-induzierten Übergewichts (Mehrpouya-Bahrami et al., 2017). Außerdem war in SD-Ratten eine hoch-zuckerhaltige Diät verbunden mit der Zunahme von Leberfettablagerungen, die einhergehend war mit erhöhten Abundanzen insbesondere der Familien Ruminococcaceae und Lachnospiraceae (Sen et al., 2017). Hierbei stimmen die Befunde für die CD- und PF-Tiere der Zunahme der Lachnospiraceae mit der Literatur überein, TEL zeigte diese Erhöhung nicht.

Die größere Firmicutes Abundanz in der F/B-Ratio, die in der Literatur häufig als Biomarker für den Zusammenhang zwischen Übergewicht oder DMT2 und Darmmikrobiom herangezogen wird (Ley et al., 2005; Ley et al., 2006; Turnbaugh et al., 2009), war in der vorliegenden Studie ebenfalls zu beobachten (Abbildung 17). Vor Beginn der Studie (Tag -3) waren alle 4 Gruppen in der F/B-Ratio gleich und nach zweimonatiger Fütterung und Vehikel oder Telmisartan-Applikation zeigten die Cafeteria-Diät-gefütterten Gruppen CD und PF die Erhöhung F/B-Ratio im Vergleich zu CON. Die ebenfalls Cafeteria-Diät-gefütterte TEL zeigte eine ähnlich niedrige F/B-Ratio wie die CON-Gruppe (Abbildung 17). In der Literatur finden sich wiederholt Hinweise, dass eine hoch-zuckerhaltige Diät ihren Einfluss auf die Mikrobiom-Zusammensetzung über eine Erhöhung der F/B-Ratio auf Stammesebene nimmt, wobei höheren Abundanzen auf Seiten der Firmicutes durch die Familien Erysipelotrichales und Clostridiales begründet und niedrigere Abundanzen der Bacteroidetes durch Prevotellaceae und Rikenellaceae gesehen wurden (Klingbeil und de La Serre, 2018). Wie oben bereits geschildert stimmen im Falle der Erysipelotrichaceae die phylogenetischen Analysen der vorliegenden Arbeit überein, da bei CD und PF die Abundanzen der Erysipelotrichaceae erhöht waren (Abbildung 16). Andererseits gibt es ebenso Publikationen, die einen Anstieg der Bacteroidetes bei Übergewicht und Fettleibigkeit beschreiben (Schwartz et al., 2010). An dieser Stelle lässt sich für unsere Daten festhalten, dass eine Erhöhung in der F/B-Ratio assoziiert ist mit einer hochkalorischen Diät und durch die Therapie mit Telmisartan auf dem niedrigeren Niveau der Chow-Normdiät gefütterten Tiere (CON) verbleibt (Abbildung 23).

Weitere Ähnlichkeiten der TEL-Tiere zu denen der CON-Gruppe konnten wir in der Enterotype like Analyse auf Genus Ebene des Mikrobioms zeigen. Hier wiesen die Cafeteria-Diät-gefütterten Gruppen CD und PF den Allobaculum-Enterotyp auf, wohingegen CON und TEL vermehrt Lactobacillus und Prevotella-Enterotypen zeigten (Abbildung 18). Allobaculum, eine Gattung zugehörig zum Stamm der Firmicutes und Familie der Erysipelotrichaceae, ist bekannt für seine Assoziation zu Übergewicht unter hochkalorischer Ernährung (Liu et al., 2016). Auch Chan et al. konnten in einer kleinen Pilotstudie an Apolipoprotein E (ApoE) k.o. Mäusen unter hoch-fetthaltiger Nahrung beobachten, dass diese zu Erhöhung der Allobaculum-Abundanz führte, welche positiv korrelierte mit der Größe von atherosklerotischen Plaques und unter Telmisartan vermindert war (Chan et al., 2016). In unseren TEL-Tieren ließ sich der Allobaculum-Enterotyp überhaupt nicht nachweisen. Die ähnlichen Enterotypen von TEL und CON, Prevotella (ET2) und Lactobacillus (ET3), sind wiederum Gattungen, die mit Gewichtsverlust (Hjorth et al., 2019; Santacruz et al., 2009) und verbessertem Glukosemetabolismus (Kovatcheva-Datchary et al., 2015) verbunden sind.

Die Messungen der Diversitäten (alpha- und beta-Diversität) wird für das Verständnis der Struktur und Dynamik von mikrobiellen Gemeinschaften als wichtig erachtet (Lozupone und Knight, 2008). Die alpha-Diversität als Maß für das Artenreichtum war in unseren 4 Gruppen (CON, CD, TEL, PF) gleichmäßig zunehmend (Abbildung 19) und unterlag damit der Dynamik der Zeit des Studienverlaufs. Da sich jedoch zu keinem Zeitpunkt relevante gruppenspezifische Unterschiede nachweisen ließen, war kein Einfluss der Diäten oder Behandlung mit Telmisartan auf die Anzahl der Arten auszumachen. Der Literatur ist einerseits zu entnehmen, dass eine hochkalorische Ernährung und Übergewicht mit einer verminderten Diversität des Darmmikrobioms einhergehen (Turnbaugh et al., 2008; Turnbaugh et al., 2009). Auf der anderen Seite konnten weitere Arbeitsgruppen herausstellen, dass es keinen Zusammenhang zwischen Gewichtszunahme und alpha-Diversität gibt (Rabot et al., 2016), oder wiederum eine hochkalorische Ernährung zu einer Zunahme der alpha-Diversität führt (Xiao et al., 2017). Die angewendeten Messmethoden für die alpha-Diversität sind häufig unterschiedlich und damit in ihrer Vergleichbarkeit eingeschränkt. In dieser Dissertationsschrift wurde die Analyse der alpha-Diversität anhand des Chao-1-Index gewählt, da beim Chao-1 die Messung der alpha-Diversität qualitativ erfolgt und nur das Vorhandensein oder Fehlen von OTUs berücksichtigt wird (Lozupone und Knight, 2008). Andere statistische Messmethoden wie Shannon's- oder Simpson's-Index werten quantitativ, was bedeutet, dass zusätzlich berücksichtigt wird, wie häufig die OTUs auftreten (Lozupone und Knight, 2008). In diesem Projekt wurde der reinen Artenvielfalt im Sinne des Chao-1 die größere Aussagekraft zugeschrieben. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass zu Studienbeginn die Tiere aller 4 Gruppen eine ähnliche alpha-Diversität im Sinne einer „baseline“ Charakteristik aufwiesen, die im Studienverlauf gleichermaßen in allen 4 Gruppen zunahm und durch Diät und Therapie nicht beeinflusst wurde. Es lässt sich demnach keine Ab- oder Zunahme des Artenreichtums im Darmmikrobiom unserer Ratten durch die hochkalorische Ernährung in Form der Cafeteria-Diät belegen, sondern vorrangig die zeitabhängige Veränderung.

Interessanterweise stellte sich dies für die beta-Diversität wesentlich anders dar. Die beta-Diversität bewertet das Ausmaß, inwieweit sich mikrobielle Gemeinschaften unterscheiden und wird herangezogen, um zu zeigen, ob sich eine mikrobielle Gemeinschaften im Laufe der Zeit oder bei verschiedenen Krankheitszuständen verändert (Lozupone und Knight, 2008). Es zeigte sich hierbei für unsere Versuchsgruppen neben der Zeit auch ein deutlicher Einfluss der Diät auf die Separierung der Proben anhand ihrer beta-Diversität in der PCoA (Abbildung 20). Übereinstimmend dazu konnte der Vergleich der beta-Diversität von schlanken oder fettleibigen Zuckerratten auch eine Häufung der verschiedenen Gruppen im Diagramm nach Probenzeitpunkt und Körpergewicht belegen und befundete damit die Veränderung des Darmmikrobioms über die Zeit sowie unter dem Einfluss einer

Gewichtszunahme (Hakkak et al., 2017). Untersuchungen an Adipositas-sensiblen (C57Bl/6JBomTac) oder Adipositas-resistenten (129S6/SvEvTac) Mäusen deuteten darauf hin, dass Veränderungen des Darmmikrobioms weitestgehend auf eine hoch-fetthaltige Fütterung und nicht auf die Fettleibigkeit an sich zurückzuführen waren, da hier in der beta-Diversität anhand der PCoA als Haupttrennfaktor der Fettgehalt der Nahrung identifiziert wurde und nachrangig erst stammespezifische Unterschiede, die für das Übergewicht der Tiere verantwortlich waren (Xiao et al., 2017). In der vorliegenden Arbeit zeichnete sich nun die TEL-Gruppe in der PCoA durch ein gesondertes Clustering aus, da diese Proben weder zur normgefütterten CON-Gruppe noch zu den Cafeteria-Diät-gefütterten Gruppen CD und PF separiert wurden (Abbildung 20). Damit deuteten unsere Daten wiederholt nicht nur auf einen Einfluss der Zeit und Diät, sondern auch auf einen Telmisartan-Effekt hin. In einer Pilotstudie zur Beobachtung der Assoziation einer durch fettreiche Ernährung induzierten Arteriosklerose und Darmmikrobiomveränderungen in Mäusen konnte ebenfalls ein Telmisartan-Effekt auf die beta-Diversität festgestellt werden, da sich die fettreich-gefütterten Mäuse unter Telmisartan in der PCoA von den Kontrolltieren separierten (Chan et al., 2016). Eine Bestätigung des Telmisartan-Einflusses lieferte auch die BORAL der 4 Gruppen hinsichtlich ihrer beta-Diversität (Abbildung 21), in der sich die TEL-Gruppe deutlich separierte und keine Schnittmengen mit den anderen beiden Cafeteria-Diät-gefütterten Gruppen (CD und PF) aufwies. Dies lässt uns schlussfolgern, dass über die Zusammensetzung und absolute Kalorienmenge der aufgenommenen Nahrung hinaus ein entscheidender Effekt des Telmisartan Darmmikrobiomveränderungen induziert haben muss, die sich in der beta-Diversität widerspiegelten (Abbildung 20). Denn TEL grenzte sich in der beta-Diversität deutlich von CON und PF ab, trotz ähnlicher Körpergewichtszunahme, sowie Energieaufnahme und Nahrungszusammensetzung im Sinne des pair-feeding.

Ein Einfluss des Telmisartans auf das Darmmikrobiom, wie er sich in der beta-Diversität und BORAL andeutete, ließ sich durch den „machine learning“ Algorithmus nach Random Forest objektivieren und bestätigen, da die Proben der TEL-Tiere meist korrekt klassifiziert wurden (Tabelle 11, Abbildung 23). Auch die DESeq2-Analyse für die OTUs, die die TEL-Gruppe von den anderen Gruppen abgrenzten, lieferten Hinweise auf eine spezielle Typizität des Darmmikrobioms unter Telmisartan (Tabelle 13). Die Zusammenschau dieser Ergebnisse verstärkte die Annahme, dass Telmisartan über einen nahrungsmittelunabhängigen Mechanismus Einfluss auf das Darmmikrobiom genommen hatte. Auf der Suche nach einer Indikatorart für TEL wurden die für die Random Forest Klassifikation wichtigsten OTUs eingehender evaluiert (Tabelle 12). Dabei wurde festgestellt, dass OTU78 - taxonomisch zuzuordnen zur Familie der Lachnospiraceae und der Klasse der Clostridien - in der TEL-Gruppe überhaupt nicht nachzuweisen war, gleichzeitig aber bei CD deutlich erhöht und auch vor Beginn der Studie in TEL detektierbar war. Lachnospiraceae sind aus der Literatur

bekannt für ihr erhöhtes Vorkommen bei Adipositas (Mehrrouya-Bahrami et al., 2017). Daraufhin wurde ein NCBI-BLAST durchgeführt (BLAST = Basic Local Alignment Search Tool, Algorithmus zum Vergleichen primärer biologischer Sequenzinformationen), dessen Ergebnisse im Hinblick auf die Spezies hinter OTU78 nicht überzeugend waren und keine Hinweise auf schlüssige Arten lieferte. Es ist letztlich auch fraglich, ob die Telmisartan-Therapie und ihre spezielle Signatur im Darmmikrobiom direkt in Verbindung steht mit einer expliziten Indikatorspezies, da sich auf der anderen Seite mit der Enterotyp like- und DESeq2-Analyse Verweise auf mehr als eine Indikatorart zeigten und auch die größere Stabilität des TEL-Mikrobioms in der Koinkindenz-Netzwerkanalyse der gemeinsam vorkommenden Spezies darauf hindeutet.

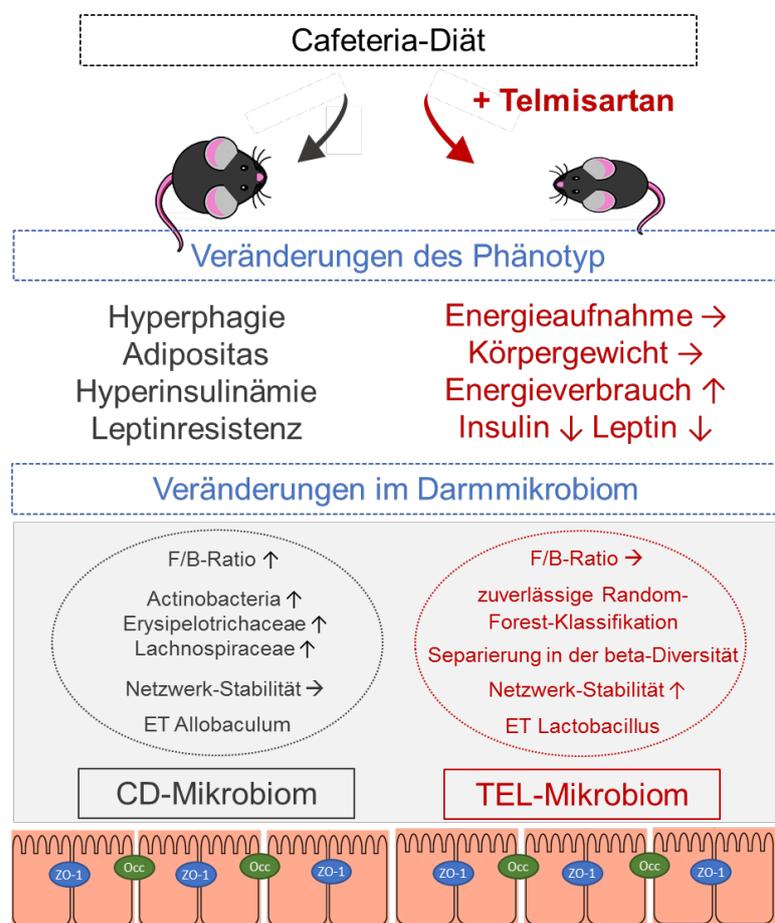


Abbildung 23: Zusammenfassende Darstellung des Einflusses der Diät und Therapie auf Phänotyp und Darmmikrobiom der CD- und TEL-Gruppe: die CD-Ratten zeigten eine erhöhte Energieaufnahme, Adipositas, Hyperinsulinämie und Leptinresistenz, dieser Phänotyp konnte bei TEL verhindert werden; die Mikrobiomanalyse zeigte für die CD-Ratten in Assoziation mit Übergewicht stehende Erhöhung (↑) der Firmicutes/Bacteroidetes-Ratio (F/B-Ratio) und Abundanzen der Familien Actinobacteria, Erysipelotrichaceae und Lachnospiraceae während bei TEL die F/B-Ratio unverändert (→) war und der ET Lactobacillus sowie eine erhöhte Netzwerkstabilität vorlag, außerdem die zuverlässige Klassifikation im Random Forest Algorithmus und die Unterschiedlichkeit in der beta-Diversität; F/B-Ratio: Firmicutes-Bacteroidetes-Ratio; ET: Enterotyp.

4.2.2. Mechanismen einer Telmisartan-spezifischen Regulation des Darmmikrobioms

An diesem Punkt der Diskussion lässt sich hinterfragen, über welchen nahrungsmittelunabhängigen Mechanismus Telmisartan Einfluss auf das Darmmikrobiom nehmen könnte. Pharmakologische Wirkungen auf das Darmmikrobiom sind bekannt für Antibiotika und Probiotika (Chang et al., 2019; Ianiro et al., 2016; Lee et al., 2018; Nogueira et al., 2019). Inzwischen werden zahlreiche sogenannte „next generation probiotics“ erforscht, die intestinale und extraintestinale Erkrankungen wie Colitis ulcerosa und Übergewicht sowie alle weiteren Ausprägungen des Metabolischen Syndroms über strukturelle Modulation des Darmmikrobiom lindern sollen (Chelakkot et al., 2019). Darüber hinaus sind kürzlich mehr als 1000 auf dem Markt befindliche, überwiegend nicht antibiotische Medikamente (835 Arzneimittel mit molekularen Zielstrukturen in menschlichen Zellen und 156 Antiinfektiva) auf ihre Wirkungen gegenüber 40 repräsentativen menschlichen Darmisolaten (*Escherichia coli* und *Bacteroides fragilis* Stämme sowie 38 Bakterienarten und 21 -gattungen) untersucht worden (Maier et al., 2018). Dabei zeigten 24% der Arzneimittel antibakterielle Wirkungen in Form von Hemmung des Wachstums mindestens einer Spezies, was laut der Autoren in vivo zu Mikrobiomverschiebungen führen und zu möglichen neuen Wegen für die Kontrolle von Nebenwirkungen sowie die Neuausrichtung von Arzneimitteln führen könnte (Maier et al., 2018). Unter den untersuchten Wirkstoffen waren Protonenpumpenhemmer, nichtsteroidale Entzündungshemmer, atypische Antipsychotika, Antimetabolite sowie auch Antihypertensiva inkl. Telmisartan. Für Telmisartan wurde dabei eine „anti-kommensale“ Aktivität gegen 4 Bakterienstämme in vitro nachgewiesen, wobei „anti-kommensal“ von den Autoren als signifikante Reduktion des bakteriellen Wachstums definiert wurde (Maier et al., 2018). Damit bestätigt sich obige Annahme, dass Telmisartan nicht selektiv über eine Indikatorspezies wirkt, aber einen spezifischen Einfluss auf die Darmbakterien nimmt. Welcher Mechanismus oder welche Wechselwirkungen dieser Beeinflussung des Darmmikrobioms zugrunde liegen, ließ sich anhand bisheriger Publikationen nur schwer beantworten. Islas und Kollegen konnten zeigen, dass Telmisartan in einem Kupferkomplex gebunden antibakterielle Aktivitäten gegen *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* aufwies, nicht jedoch gegen *Escherichia coli* (Islas et al., 2014). Allerdings ist fraglich, ob diese antibakteriellen Aktivitäten des Telmisartan-Kupferkomplexes AT1-Rezeptor-abhängig erfolgen, da für bakterielle Ang-II-Bindungsstellen gezeigt werden konnte, dass sie sich strukturell von den AT1- und AT2-Rezeptoren der Säugetiere unterscheiden (Servant et al., 1998). Hinzu kommt, dass für andere ARBs (Valsartan, Candesartan, Irbesartan) im Gegensatz zu Telmisartan durch eine Forschungsgruppe am Nationalen Arzneimittelinstitut in Warschau im Zeitraum von 2000 bis 2010, in dem insgesamt mehr als 1000

Medikamente auf ihre antibakterielle Wirksamkeit untersucht wurden, keine antibiotische Wirksamkeit eindeutig nachgewiesen werden konnte (Kruszewska et al., 2002, 2006, 2008, 2012). Obwohl keine Wirksamkeit von Telmisartan gegenüber E.coli-Stämmen beschrieben wurde (Islas et al., 2014; Kruszewska et al., 2002), wurde Telmisartan als starker Inhibitor für die E.coli-Invasion in mikrovaskuläre Endothelzellen (engl. human brain microvascular endothelial cells, HBMECs) des menschlichen Gehirns identifiziert und damit als Behandlungsoption für die Escherichia coli K1 Meningitis benannt (Krishnan et al., 2014). Hierbei steht der AT1-Rezeptor in Zusammenhang mit dem Endothel-Zell-Glykoprotein-96 (gp96), das als Rezeptor der HBMECs für das äußere Membranprotein A der E.coli-Bakterien dient, und durch eine Vorbehandlung mit Telmisartan oder die Transfizierung mit AT1R-small-interfering RNA waren die HBMECs resistent gegenüber der E.coli-Invasion (Krishnan et al., 2014). An dieser Stelle ist der antiinfektiöse Effekt von Telmisartan scheinbar AT1-Rezeptor abhängig. Im Hinblick auf die Neuausrichtung von Medikamenten wurde in der hier vorliegenden Dissertationsschrift für Telmisartan, welches ein etabliertes Medikament zur Behandlung von Bluthochdruck und Herzinsuffizienz ist, herausgestellt, dass es in der Lage ist das Darmmikrobiom von Ratten unter hochkalorischer Ernährung günstig zu beeinflussen. Dies könnte in mechanistischen Zusammenhang stehen mit der antiadipöse Wirksamkeit des Telmisartan und wird im Folgenden als letztes diskutiert

4.2.3. Spekulationen über die Regulation der Energiehomöostase in Abhängigkeit eines TEL-spezifischen Darmmikrobioms

Als potentielle Mikrobiom-abhängige Mechanismen einer antiadipösen Wirksamkeit von Telmisartan soll nachfolgend über die Bedeutung der metabolischen Endotoxämie, des eCB-Systems und der SCFAs spekuliert werden (Abbildung 24). Die Assoziation zwischen diesen Systemen und der Energiehomöostase bzw. Gewichtsregulation wurde in der Einleitung bereits dargestellt.

Auf der einen Seite kann eine ernährungsbedingte Dysbiose des Darmmikrobioms zu einer erhöhten Produktion von proinflammatorischen Nebenprodukten wie LPS führen, die bei veränderter Darmpermeabilität zu erhöhten systemischen LPS-Spiegeln oder zu metabolischer Endotoxämie führte (Klingbeil und de La Serre, 2018). Metabolische Konsequenzen waren u.a. die Induktion einer Hyperphagie, Gewichtszunahme sowie Leptin- und Insulinresistenz bei Nagetieren (Cani et al., 2007a; de La Serre et al., 2015). All diese metabolischen Konsequenzen konnten durch Telmisartan in dieser Studie verhindert werden, so wie auch zuvor durch die AG-Raasch mehrfach publiziert (Gustaityte et al., 2019; Miesel et al., 2012; Müller-Fielitz et al., 2012; Schuchard et al., 2015; Winkler et al., 2018, 2016). Beim Fokus der vorliegenden Studie auf der Detektion eines Telmisartan-Einflusses auf

das Darmmikrobiom wurden keine Plasma-LPS-Messungen berücksichtigt. Die Bestimmung der Adipokine durch das Multiplex-Assay zeigte im Trend jedoch eine Erhöhung für IL-1 α in der CD- und PF-Gruppe, wobei die TEL-Tiere ähnlich niedrige IL-1 α -Spiegel aufwiesen wie CON (Tabelle 9) was sich als ein Hinweis für erhöhte Zytokine im Sinne der chronisch niedrig-gradigen Entzündung bei Adipositas (Gregor und Hotamisligil, 2011; Trayhurn und Wood, 2004) bei der CD-Gruppe deuten ließe, der unter Telmisartan normalisiert zu sein scheint. In bereits publizierten Studien der AG konnten zwar keine erhöhten Plasmaspiegel von Zytokinen nachgewiesen werden (Rawish et al., 2020; Schuster et al., 2018), wir gehen dennoch davon aus, dass die metabolische Endotoxämie, auf lokaler Ebene der Darmschleimhaut, durch Telmisartan gemildert ist (Abbildung 24). Denn unter hoch-fetthaltiger Diät waren in Mäusen mehrere Entzündungsparameter im Fettgewebe und Hypothalamus erhöht, die unter gleichzeitiger Therapie mit Telmisartan jedoch normalisiert waren (Rawish et al., 2020; Schuster et al., 2018). Eine potentielle Rolle der metabolischen Endotoxämie erscheint auch durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie plausibel (Abbildung 24), denn Proteobacteria, gramnegative Bakterien, die LPS in ihrer äußeren Membran enthalten, waren in den adipösen Kontrollen unter Cafeteria-Diät erhöht (Abbildung 15). Zudem war die Abundanz von ET Lactobacillus in den TEL-Tieren am höchsten (Abbildung 18), Lactobacillus sind grampositive Bakterien ohne LPS mit protektiver Funktion auf die Darmschleimhaut, linderndem Effekt auf eine Colitis durch Hemmung des Nuklearfaktors Kappa-Leichtketten-Enhancer aktivierter B-Zellen (NF- κ B) und Stärkung der Darmbarriere durch Induktion der Expression von Tight Junction-Proteinen (Jeong et al., 2015).

Wie in der Einleitung dargestellt, steht das eCB-System in funktionellem Zusammenhang mit Adipositas (Muccioli et al., 2010). Interessanterweise lieferten die Untersuchungen an GPCR von Rozenfeld und Kollegen Hinweise darauf, dass das RAS und das eCB-System auf Rezeptorebene miteinander verbunden waren. Diese Verbindung besitzt auch funktionelle Konsequenzen: die Bildung von AT1-R und CB1-R-Heteromeren und deren Interaktion führt zur Potenzierung des AT1-R-Signalwegs und zur Kopplung von AT1-R an mehrere G-Proteine. Physiologische Folge dieser Interaktion war in hepatischen Sternzellen von Ratten unter Ethanol-Applikation, eine erhöhte CB1-R Expression, bei gleichzeitiger Hochregulation der AT1-R-CB1-R-Heteromere und konsekutiver Verstärkung des AngII-vermittelten Signals. Außerdem verhinderte die Blockierung der CB1-R-Aktivität die AngII-vermittelte mitogene Signalgebung und profibrogene Genexpression (Rozenfeld et al., 2011). Diese hochbrisante Verbindung des RAS und eCB lässt uns spekulieren, ob die Blockierung des AT1-R durch Telmisartan eine Heterodimerisierung von AT1-R-CB1-R reduziert und somit zu Veränderungen des Darmmikrobioms und des Wertsstoffwechsel führt.

Wie ebenfalls in der Einleitung bereits dargestellt, wird dem SCFA-Stoffwechsel eine Schlüsselrolle in der Regulierung der Energiehomöostase zugeschrieben (Schwiertz et al., 2010). SCFAs entstehen durch den mikrobiellen Abbau von unverdaulichen Polysacchariden, die der Wirt absorbieren und als Energiequelle nutzen kann (Turnbaugh et al., 2006). Vorangegangene Studien haben erstaunlicherweise gezeigt, dass sowohl die Zunahme als auch Abnahme von SCFA-Spiegeln im Plasma und Faeces mit Überernährung, Adipositas und dem Metabolischen Syndrom in Verbindung stehen (Perry et al., 2016), wodurch der Beitrag des SCFAs zur Adipositas zur Diskussion gestellt wird (Koh et al., 2016). Perry und Kollegen konnten unter hoch-fetthaltiger Diät in Ratten die erhöhte Produktion der SCFA Acetat in Darm, Plasma und Gehirn nachweisen (Perry et al., 2016), was in Widerspruch zu einer verminderten Bacteroidetes-Abundanz bei Adipositas zu stehen scheint, da Acetat hauptsächlich von diesem Phylum synthetisiert wird. Die Zunahme von Acetat aktivierte den parasympathischen Tonus und die Insulinsekretion, eine resultierende Hyperinsulinämie führte zu einem 5-fachen Anstieg des Gastrins und einem 3-fachen Anstieg des Ghrelins, was wiederum zu einer dramatischen Kalorienaufnahme führte, die letztlich eine Adipositas zur Folge hatte (Perry et al., 2016). Die Bedeutung von SCFA und deren zerebrales Signaling über MCT bei Adipositas wurde bestätigt dadurch, dass MCT-1-defiziente Mäuse bei einer hoch-zucker- und -fetthaltigen Ernährung keine Adipositas entwickelten (Carneiro und Pellerin, 2015). Insgesamt untermauerten diese Ergebnisse die Annahme, dass eine durch hochkalorische Diät induzierte Erhöhung der Plasma-SCFAs (insbesondere Acetat) das mit der Adipositas assoziierte Metabolische Syndrom verschlechtert, was den positiven Auswirkungen des Verzehrs von Nahrungsfasern entgegengesetzt zu sein scheint. Leider war es bis dato nicht möglich, aus den Plasma-Proben unserer Versuchsgruppen SCFA-Spiegel bestimmen zu lassen. Wir halten es jedoch angesichts der publizierten Auswirkungen der mikrobiell-produzierten SCFAs auf den Wirtsmetabolismus für plausibel, dass der gewichtsmindernde Einfluss des Telmisartan in Zusammenhang mit veränderten SCFA-Spiegeln steht (Abbildung 24).

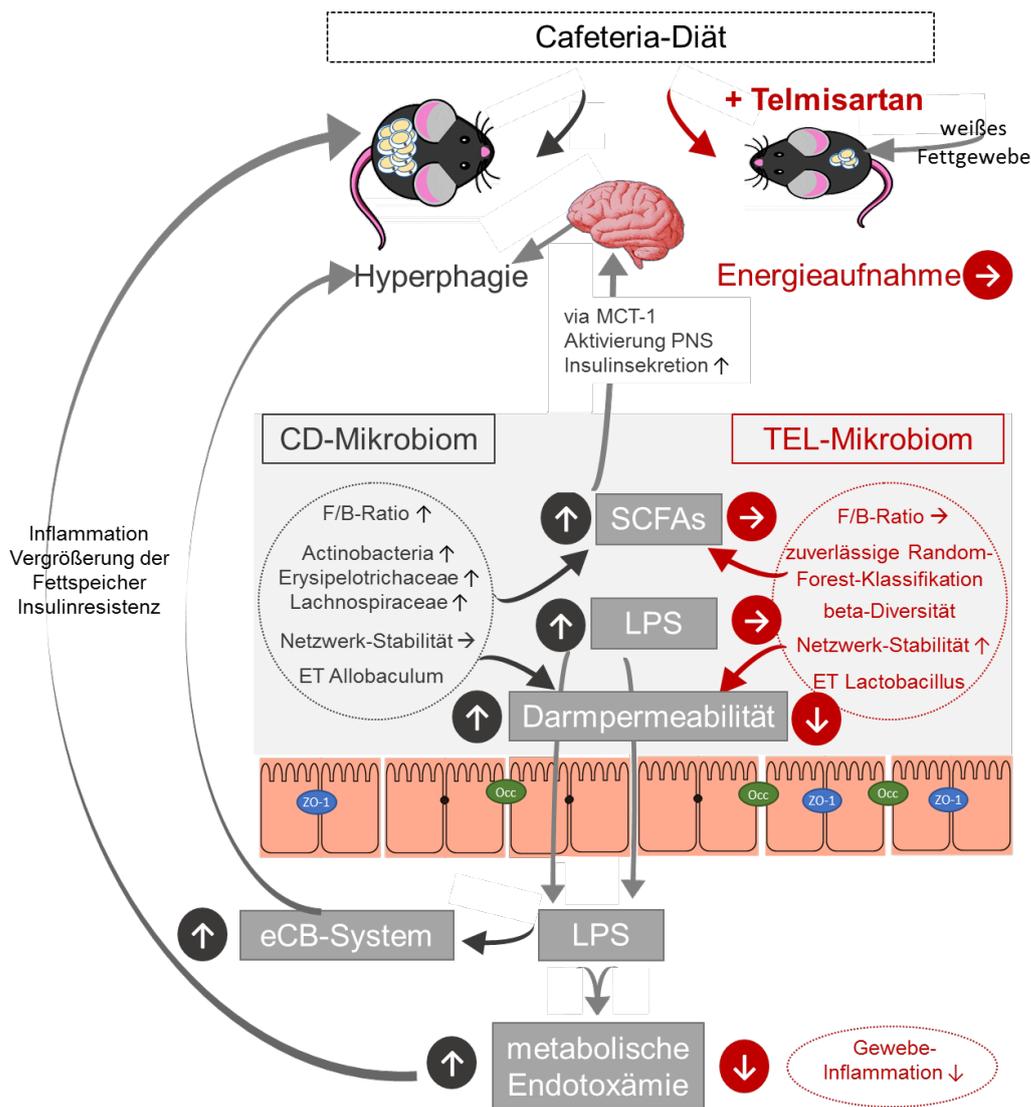


Abbildung 24: Zusammenfassende Darstellung des Zusammenhangs der Telmisartan-Wirkung und Mikrobiom-abhängigen Einflüssen auf die durch die Cafeteria-Diät induzierbaren metabolischen Veränderungen; linksseitig die CD-Ratte und das CD-Mikrobiom, das über 3 potentielle Wege zum CD-Phänotyp beiträgt: 1.) Erhöhung (↑) der SCFAs steigern nach MCT-1-vermitteltem Transport in das Gehirn die Energieaufnahme, über z.B. die Aktivierung des parasympathischen Nervensystems (PNS) und vermehrte Insulinsekretion; 2.) Erhöhung der LPS, die in Verbindung mit 3.) einer erhöhten Darmpermeabilität zur metabolischen Endotoxämie führen, dabei selbst eine erhöhte Durchlässigkeit der intestinalen tight-junctions (Occ: Occludin, ZO-1: Zonulin-1) durch eine Erhöhung der TLR4- und CD14-Expression induzieren und 4.) Erhöhung des Tonus des endogenen Cannabinoid-Systems. Durch den Telmisartan-Einfluss auf die Darmmikrobiota, wie rechtsseitig in rot dargestellt, könnte 1.) die SCFA-Synthese normalisiert (→) sein, 2.) ebenso die LPS-Produktion erniedrigt und 3.) die Darmschleimhautbarriere stabilisiert und bei antiinflammatorischen Effekt des Telmisartans auf lokale Gewebe die metabolische Endotoxämie vermindert (↓); weitere Details und Literaturnachweise unter 4.2.; MCT-1: Mono-Carboxylat-Transporter Typ 1; PNS: Parasympathisches Nervensystem; F/B-Ratio: Firmicutes-Bacteroidetes-Ratio; ET: Enterotyp; LPS: Lipopolysaccharide; SCFAs: kuzkettige Fettsäuren, „short chain fatty acids“; eCB-System: endogenes Cannabinoid-System.

4.3. Limitationen

Experimentellen Studien sind gewisse Grenzen gesetzt, die die Projektion unserer Ergebnisse auf den menschlichen Organismus erschweren. So ergeben sich, trotz des zugrundeliegenden strukturierten Designs und auch eindeutigen Ergebnissen dieser Studie, folgende Limitationen:

- Die in dieser Studie verwendete Telmisartan-Dosis (8 mg/kg/d) übersteigt die für Patienten zugelassenen Konzentrationen von ARB. Letztlich führte dies nicht zu ausgeprägten Hypotonien bei den TEL-Ratten. Trotzdem ist die Verwendung dieser hohen Dosen an einem Patientenkollektiv vor dem Hintergrund möglicher Nebenwirkungen wie Hypotonien vorab zu evaluieren. Hochdosen werden in der Praxis aber auch in „off-label“ Verwendung eingesetzt.
- Der Beginn der Telmisartan-Behandlung erfolgte gleichzeitig mit der Fütterung mit Cafeteria-Diät, womit der Einfluss des Telmisartans als rein präventiv zu bewerten ist. Im Hinblick auf einen kurativen Ansatz mit Reduktion des Körpergewichts und der abdominalen Fettmasse, einer rekonstituierten Leptinsensitivität und Glukoseutilisitation sowie Normalisierung der Triglycerid-Spiegel, der freien Fettsäuren und des LDL-Spiegels, konnte dies für Telmisartan durch Vorleistungen der AG Raasch bestätigt werden (Müller-Fielitz et al., 2014). Allerdings bleibt dies für die Auswirkungen der Diät und Telmisartan-Behandlung auf das Darmmikrobiom ausstehend, was bei Übertragung der Therapie auf den Patienten beachtet werden müsste.
- In der phylogenetischen Analyse der Phylum-Abundanzen zeigte sich, dass bei Ankunft im hiesigen Labor der Anteil der Firmicutes am größten ist und dann bis Tag -3 abnimmt zugunsten der Bacteroidetes-Abundanz. Betrachtete man nun die CON-Gruppe fiel auf, dass unter Chow-Normdiät diese Bacteroidetes-Abundanz bis Tag 32 weiter zunimmt. An dieser Stelle lässt sich rückblickend die Frage stellen, ob die Akklimatisierungszeit der Tiere evtl. zu kurz gewählt worden ist und zu welchen Veränderungen der Abundanzen eine Cafeteria-Diät erst ab Tag 32 geführt hätte – der Zeitpunkt, zu dem in der CON-Gruppe die Bacteroidetes-Abundanz am größten war.
- Wie ein Großteil der Studien zum Darmmikrobiom basierte auch unsere auf der Analyse gesammelter Stuhlproben. Hierzu muss angemerkt werden, dass der Faeces vornehmlich luminale intestinale Bakterien enthält und mukosale Bakterien nicht repräsentiert werden, die eine aktive Rolle für die Immunität des Wirtes spielen und einen wesentlichen Teil der schützenden Schleimhautbarriere gegen eindringende Krankheitserreger bilden (Barbosa und Rescigno, 2010). Studien, die vergleichende Untersuchungen zum Mikrobiom aus Stuhlproben und Dickdarmschleimhaut-Biopsien durchführten, konnten

feststellen, dass das Schleimhautmikrobiom auf Familienebene einen höheren Reichtum und eine größere Diversität aufwies und die mikrobielle Zusammensetzung stärker von der Art der Probe (Biopsie oder Kot) abhängig war als von dem untersuchten Individuum (Durbán et al., 2011; Lyra, 2012). Biopsien aus dem menschlichen Dickdarm wiesen im Vergleich zu der mikrobiellen Gemeinschaft im Darmlumen eine deutliche Schleimhautgemeinschaft auf, die mit Actinobacteria und Proteobakterien angereichert war (Albenberg et al., 2014). Demnach sind in unseren Analysen Änderungen auf Ebene des mukosalen Mikrobioms unentdeckt geblieben, das möglicherweise auch einem Telmisartan-Einfluss unterliegt.

- Eine weitere Limitation ergibt sich daraus, dass nicht nur Diät und Medikation einen Einfluss auf das Darmmikrobiom nehmen, sondern auch Nahrungsgewohnheiten, die Darmmotilität sowie Stuhlfrequenz und -konsistenz (Cani, 2018). Diese Faktoren wurden in unserem Studiendesign nicht näher berücksichtigt.
- Die Klassifikation der Enterotypen wurde von Arumugam und Kollegen im Jahre 2011 für das menschliche Darmmikrobiom entwickelt (Arumugam et al., 2011). Diese Enterotypen sind nicht übertragbar auf das Darmmikrobiom der Ratten, da sich die Diäten in bestimmter Weise unterscheiden. So ist bspw. der Enterotyp *Bacteroides* assoziiert mit einer Ernährung aus tierischen Proteinen und gesättigten Fettsäuren (Costea et al., 2018), die sich in unserer Chow- und Cafeteria-Diät nicht widerspiegeln. Aus diesem Grund wurde in diesem Projekt der Begriff Enterotype like Analyse verwendet.

4.4. Ausblick

Die in dieser Dissertationsschrift beobachteten Veränderungen des Darmmikrobioms in Ratten unter Cafeteria-Diät und Telmisartan stellen einen Ausgangspunkt für weitere Projekte der AG Raasch dar:

- Ich konnte mit meinen beschreibenden Ergebnissen von Veränderungen auf Familien-Ebene und Enterotype like Analyse eine Grundlage für weitere Untersuchungen auf Basis der bakteriell produzierten Moleküle wie den SCFAs schaffen, um einen funktionellen Zusammenhang zwischen Mikrobiomveränderungen und Phänotyp des Wirts genauer beurteilen zu können. Denn welche Auswirkungen die hier beobachteten Darmmikrobiomveränderungen haben, bleibt bei den komplexen Zusammenhängen eines solch großem symbiotischen Ökosystem noch unklar. Zukünftige Untersuchungen der AG Raasch könnten hier im Hinblick auf den Telmisartan Einfluss auf eine verminderte Gewichtszunahme und die gleichzeitig beobachteten Darmmikrobiomveränderungen durch Berücksichtigung der SCFA-Spiegel erweiternde Erkenntnisse liefern. Dabei sollten die SCFA-Spiegel in Stuhl, Plasma und auch zerebral untersucht werden, da freie SCFAs die Blut-Hirn-Schranke überwinden und als Signalmoleküle innerhalb der Darm-Hirn-Achse wirksam werden (Carneiro und Pellerin, 2015). In Ergänzung zum Nachweis der SCFA-Spiegel scheint es plausibel, aus dem Darmmikrobiom Gen-Analysen für den Nachweis der Enzyme des SCFA-Metabolismus und deren Transporter zu machen, die im Darmmikrobiom genetisch veränderter übergewichtiger Mäuse vermehrt nachgewiesen werden konnten, wie α -Glukosidase, α -Galaktosidase, Formiat-Acetyltransferase oder ATP-binding-cassette (ABC)-Transporter (Turnbaugh et al., 2006). Diese Analyse funktioneller Gene, so genannter „environmental gene tags“ (EGT), würde das Verständnis von Veränderungen auf Ebene des Darmmikrobioms im Hinblick auf die metabolischen Konsequenzen für den Wirt erweitern.
- Mechanistische Untersuchungen an keimfreien Mäusen konnten den Zusammenhang zwischen Mikrobiom und Aktivität der LPL mit verstärkter Lipogenese herausstellen (Bäckhed et al., 2004; Velagapudi et al., 2010). Da sowohl in diesem Projekt als auch weiteren der AG Raasch ein geringeres Körpergewicht, verminderte Fettmassen und erniedrigte Triglycerid-Plasmaspiegel unter Telmisartan-Therapie beobachtet werden konnte (Gustaityte et al., 2019; Miesel et al., 2012; Müller-Fielitz et al., 2012; Schuchard et al., 2015; Winkler et al., 2018, 2016), erscheint es als sinnvoll, in zukünftigen Untersuchungen zu hinterfragen, ob Telmisartan Einfluss nimmt auf die Enzyme des Lipid-Stoffwechsels, die Mikrobiom-abhängig zur Adipositas beitragen.
- Zum tieferen Verständnis eines möglichen Zusammenhangs von Telmisartan und veränderten Endotoxin-Produzenten des Darmmikrobioms ist es sinnvoll, zukünftig nicht

nur die Plasma-LPS-Spiegel mit zu beurteilen, sondern - insbesondere in Anbetracht des chronisch-niedrig-gradigen Entzündungszustandes bei Adipositas - lokale Gewebereaktionen so wie auch die Darmschleimhautbarriere (metabolische Endotoxämie). In der AG Raasch wurde dieser Forschungsansatz von Frau Nickel im Rahmen ihres Dissertationsprojekts (Einfluss von AT1-Rezeptor-Blocker auf die gastrointestinale Barriere) umgesetzt.

- Eine FMT als therapeutische Option bei Adipositas und metabolischen Erkrankungen erlangte in den vergangenen Jahren immer mehr Aufmerksamkeit und ist bereits in der Behandlung der rezidivierenden Clostridium-difficile-Colitis klinisch etabliert (Bakken et al., 2011; Jayasinghe et al., 2016). Eine Stuhl-Transplantation von schlanken Donor-Individuen auf adipöse Empfänger hat deutliche gewichtsregulierende Effekte sowohl bei Nagetieren als auch im Menschen gezeigt (Marotz und Zarrinpar, 2016; Zhang et al., 2017). Vor dem Hintergrund, dass sich für Telmisartan in meinen Ergebnissen ein Darmmikrobiom-Einfluss gezeigt hat, ermöglichte sich für die AG Raasch das Dissertationsvorhaben von Herrn Freschi, das die Wirkung der Transplantation von Stuhlproben Telmisartan-vorbehandelter Mäusen sowohl auf adipöse als auch schlanke Kontrolltiere im Hinblick auf Körpergewichtsentwicklung und Mikrobiomveränderungen untersucht.

5. Zusammenfassung

Die chronische Therapie mit Telmisartan wirkt bei hoher Dosierung in Nagetieren antiadipös und weist metabolische Vorteile wie eine erhaltene Leptin- und Insulinsensitivität auf. Der mechanistische Zusammenhang ist derzeit noch nicht vollständig verstanden, neueste Erkenntnisse deuten auf einen Leptin- und Ang(1-7)/Mas-abhängigen Signalweg hin. In diesem Projekt erforschten wir erstmals, ob ein Darmmikrobiom-assoziiertes Einfluss des Telmisartans eine Rolle spielt, da charakteristische Veränderungen des Darmmikrobioms in Zusammenhang stehen mit Ernährung und Übergewicht.

Zur Beantwortung dieser Frage untersuchten wir über einen Zeitraum von 3 Monaten einzeln gehaltene Sprague-Dawley-Ratten in 4 verschiedenen Gruppen. Eine Gruppe (TEL) erhielt zur Cafeteria-Diät die Medikation mit Telmisartan (8 mg/kg/d, p.o.), die Vergleichsgruppen hatten entweder freien Zugang zur Cafeteria-Diät (CD) oder Chow-Normdiät (CON) oder unterlagen einer restriktiven Fütterung im Sinne des pair-feeding zur Telmisartan-behandelten Gruppe (PF). CD, CON und PF wurde oral ein Vehikel appliziert. Die Tiere wurden bezüglich Körpergewicht, Energieaufnahme und Energieverbrauch, Fettmasse, Blutdruck und Insulinempfindlichkeit phänotypisiert. Weiterhin wurden Stuhlproben mittels 16S-rRNA-Gen-Sequenzierung analysiert, um festzustellen, ob das Darmmikrobiom in Abhängigkeit von Körpergewicht, Energieaufnahme oder Telmisartan-Behandlung verändert ist.

Die CD-Ratten zeigten eine erhöhte Energieaufnahme und entwickelten eine Adipositas, Insulinresistenz und Hyperleptinämie. Dieser Phänotyp konnte bei TEL- und PF-Ratten verhindert werden, die kumulative Energieaufnahme war niedriger bei erhöhtem Energieverbrauch. Der Blutdruck stieg bei CD- und PF-Ratten an, während er durch Telmisartan normalisiert werden konnte. Die Mikrobiomanalyse zeigte auf Phylum-Ebene, dass die Cafeteria-Diät in CD, TEL und PF zu einer Erhöhung der Firmicutes, Proteobacteria und Actinobacteria führte, wobei auf Familien-Ebene sichtbar wurde, dass die TEL-Gruppe keine Erhöhung der Erysipelotrichaceae aufwies wie CD und PF. Die F/B-Ratio war bei CD und PF erhöht, unter Telmisartan-Behandlung jedoch nicht. Alpha-Diversitäts-Analysen zeigten, dass die reine Artenvielfalt in allen Gruppen annähernd gleich zunehmend war. In der beta-Diversität separierte sich die TEL-Gruppe von den anderen beiden Cafeteria-Diät-gefütterten Gruppen. Eine Enterotype like Analyse bestätigte diese Befunde, da die TEL-Gruppe hier ähnliche ETs wie die CON-Gruppe aufwies, während CD und PF einen höheren Anteil von ET1 haben. Ebenso konnte eine BORAL-Analyse belegen, dass es einen Einfluss der Diät und Therapie mit Telmisartan auf das Darmmikrobiom gibt. Zur Objektivierung der Befunde wurden alle sequenzierten Proben mit Hilfe eines „machine learning“ Verfahren (Random Forest Algorithmus) klassifiziert, um den Effekt der 4 verschiedenen Gruppen zu überprüfen. Dabei konnten die Proben der TEL-Gruppe zuverlässiger zugeordnet werden als die vielmehr gleichsam verwechselten Gruppen CD und PF. Dies ließ uns vermuten, dass es eine oder mehrere Indikatorspezies für Telmisartan geben muss, welche jedoch durch NCBI-Blast und DESeq2-Analyse nicht zuverlässig identifiziert werden konnten.

Wir schließen aus diesen Ergebnissen, dass die Telmisartan-Behandlung eine spezifische Signatur im Darmmikrobiom induziert. Insbesondere unter der Voraussetzung, dass das Mikrobiom von CD und PF nahezu gleich ist und TEL und PF dieselben Futtermengen erhielten, vermuten wir, dass dieser charakteristische Einfluss unabhängig von der Nahrungsaufnahme ist. Dies bildet einen Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen zur antiadipösen Wirksamkeit von Telmisartan, welche Darmmikrobiom-assoziiert ist.

6. Literaturverzeichnis

- Albenberg, L., Esipova, T. V., Judge, C. P., Bittinger, K., Chen, J., Laughlin, A., Grunberg, S., Baldassano, R., Lewis, J., Li, H., Thom, S. R., Bushman, F. D., Vinogradov, S, Wu, G. D. (2014). Correlation Between Intraluminal Oxygen Gradient and Radial Partitioning of Intestinal Microbiota. *Gastroenterology*, **147**, 1055-1063.
- Amar, J., Chabo, C., Waget, A., Klopp, P., Vachoux, C., Bermúdez-Humarán, L. G., Smirnova, N., Bergé, M., Sulpice, T., Lahtinen, S., Ouwehand, A., Langella, P., Rautonen, N., Sansonetti, P. J, Burcelin, R. (2011). Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: Molecular mechanisms and probiotic treatment. *EMBO Molecular Medicine*, **3**, 559-572.
- American Diabetes Association. (2019). 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*, **42**(Suppl. 1):S13–S28.
- Armougom, F., Henry, M., Vialettes, B., Raccah, D., & Raoult, D. (2009). Monitoring Bacterial Community of Human Gut Microbiota Reveals an Increase in Lactobacillus in Obese Patients and Methanogens in Anorexic Patients. *PLoS ONE*, **4**, e7125.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J-M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H.B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E. G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W.M., Brunak, S., Doré, J., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D., Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, **473**, 174–180.
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V, Koh, G. Y., Nagy, A., Semenkovich, C F, Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101**, 15718–15723.
- Bakken, J. S., Borody, T., Brandt, L. J., Brill, J. V., Demarco, D. C., Franzos, M. A., Kelly, C., Khoruts, A., Louie, T., Martinelli, L.P., Moore, T.A., Russell, G., Surawicz, C. (2011). Treating Clostridium difficile Infection With Fecal Microbiota Transplantation. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, **9**, 1044–1049.
- Banks, W. A., Coon, A. B., Robinson, S. M., Moinuddin, A., Shultz, J. M., Nakaoke, R., Morley, J. E. (2004). Triglycerides Induce Leptin Resistance at the Blood-Brain Barrier. *Diabetes*, **53**, 1253–1260.
- Barbosa, T. und Rescigno, M. (2010). Host-bacteria interactions in the intestine: homeostasis to chronic inflammation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, **2**, 80–97.
- Berry, J. D., Dyer, A., Cai, X., Garside, D. B., Ning, H., Thomas, A., Greenland, P., Van Horn, L., Tracy, R.P., Lloyd-Jones, D. M. (2012). Lifetime Risks of Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine*, **366**, 321–329.
- Blaut, M. und Klaus, S. (2012). Intestinal Microbiota and Obesity. In H.-G. Joost (Ed.) (Vol. **209**, pp. 251–273). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Blüher, S. und Mantzoros, C.S. (2007). Leptin in reproduction. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.*, **14**, 458-464.
- Boustany, C. M., Bharadwaj, K., Daugherty, A., Brown, D. R., Randall, D. C., Cassis, L. A. (2004). Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **287**, R943–R949.
- Bruning, J., Chapp, A., Kaurala, G. A., Wang, R., Techtmann, S., Chen, Q. H. (2020). Gut Microbiota and Short Chain Fatty Acids: Influence on the Autonomic Nervous System. *Neuroscience Bulletin*, **36**, 91–95.
- Candela, M., Perna, F., Carnevali, P., Vitali, B., Ciati, R., Gionchetti, P., Rizzello, F., Campieri, M., Brigidi, P. (2008). Interaction of probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium strains with human intestinal epithelial cells: Adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *International Journal of Food Microbiology*, **125**, 286–292.
- Cani, P. D. (2018). Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut*, **67**, 1716–1725.
- Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., Waget, A., Delmee, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrieres, J., Tanti, J.-F.,

- Gibson, G.R., Casteilla, L., Delzenne, N.M., Alessi, M.C., Burcelin, R. (2007a). Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes*, **56**, 1761–1772.
- Cani, P. D., Joly, E., Horsmans, Y., Delzenne, N. M. (2006). Oligofructose promotes satiety in healthy human: a pilot study. *European Journal of Clinical Nutrition*, **60**, 567–572.
- Cani, P. D., Lecourt, E., Dewulf, E. M., Sohet, F. M., Pachikian, B. D., Naslain, D., De Backer, F., Neyrinck, A.M., Delzenne, N. M. (2009a). Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satietogenic and incretin gut peptide production with consequences for appetite sensation and glucose response after a meal. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **90**, 1236–1243.
- Cani, P. D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Knauf, C., Burcelin, R. G., Tuohy, K. M., Gibson, G. R., Delzenne, N. M. (2007). Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*, **50**, 2374–2383.
- Cani, P. D., Possemiers, S., Van de Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., Geurts, L., Naslain, D., Neyrinck, A., Lambert, D. M., Muccioli, G. G., Delzenne, N. M. (2009). Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*, **58**, 1091–1103.
- Cani, Patrice D, Bibiloni, R., Knauf, C., Wagen, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., Burcelin, R. (2008). Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes*, **57**, 1470–1481.
- Carneiro, L. und Pellerin, L. (2015). Monocarboxylate transporters: new players in body weight regulation. *Obesity Reviews*, **16**, 55–66.
- Caro, J. F., Kolaczynski, J. W., Nyce, M. R., Ohannesian, J. P., Opentanova, I., Goldman, W. H., Lynn, R. B., Zhang, P-L., Sinha, M. K., Considine, R. V. (1996). Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *The Lancet*, **348**, 159–161.
- Chan, Y. K., Brar, M. S., Kirjavainen, P. V., Chen, Y., Peng, J., Li, D., Leung, F.C.C., El-Nezami, H. (2016). High fat diet induced atherosclerosis is accompanied with low colonic bacterial diversity and altered abundances that correlates with plaque size, plasma A-FABP and cholesterol: a pilot study of high fat diet and its intervention with *Lactobacillus rhamno*. *BMC Microbiology*, **16**, 1–13.
- Chang, C.-J., Lin, T.-L., Tsai, Y.-L., Wu, T.-R., Lai, W.-F., Lu, C.-C., Lai, H.-C. (2019). Next generation probiotics in disease amelioration. *Journal of Food and Drug Analysis*, **27**, 615–622.
- Chelakkot, C., Ghim, J., Ryu, S. H. (2018). Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Experimental & Molecular Medicine*, **50**, 103.
- Claus, S. P., Tsang, T. M., Wang, Y., Cloarec, O., Skordi, E., Martin, F., Rezzi, S., Ross, A. Kochhar, S. Holmes, E., Nicholson, J. K. (2008). Systemic multicompartmental effects of the gut microbiome on mouse metabolic phenotypes. *Molecular Systems Biology*, **4**, 219.
- Cockburn, D. W. und Koropatkin, N. M. (2016). Polysaccharide Degradation by the Intestinal Microbiota and Its Influence on Human Health and Disease. *Journal of Molecular Biology*, **428**, 3230–3252.
- Collado, M. C., Isolauri, E., Laitinen, K., Salminen, S. (2008). Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **88**, 894–899.
- Correia, M. L. G. und Rahmouni, K. (2006). Role of leptin in the cardiovascular and endocrine complications of metabolic syndrome. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **8**, 603–610.
- Cosentino, F., Grant, P. J., Aboyans, V., Bailey, C. J., Ceriello, A., Delgado, V., Federici, M., Filippatos, G., Grobbee, D. E., Hansen, T. B, Huikuri, H. V., Johansson, I. Jüni, P. Lettino, M., Marx, N., Mellbin, L. G. Östgren, C. J., Rocca, B., Roffi, M., Sattar, N., Seferović, P. M. Sousa-Uva, M. Valensi, P. Wheeler, D. C., ESC Scientific Document Group (2020). 2019 ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: The Task Force for diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD), *European Heart Journal*, **41**, 255–323.
- Costea, P. I., Hildebrand, F., Arumugam, M., Bäckhed, F., Blaser, M. J., Bushman, F. D., de Vos, W. M., Ehrlich, S. D., Fraser, C. M., Hattori, M., Huttenhower, C., Jeffery, I. B., Knights, D., Lewis, J. D., Ley, R. E., Ochman, H. O'Toole, P. W., Quince, C., Relman, D. A., Shanahan, F. Sunagawa, S., Wang, J., Weinstock, G. M., Wu, G. Zeller, G., Zhao, L., Raes, J. Knight, R., Bork, P. (2018). Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nature Microbiology*, **3**, 8–16.

- Côté, M., Matias, I., Lemieux, I., Petrosino, S., Alméras, N., Després, J.-P., Di Marzo, V. (2007). Circulating endocannabinoid levels, abdominal adiposity and related cardiometabolic risk factors in obese men. *International Journal of Obesity*, **31**, 692–699
- Cotillard, A., Kennedy, S. P., Kong, L. C., Prifti, E., Pons, N., Le Chatelier, E., Almeida, M., Quinquis, B., Levenez, F., Galleron, N., Gougis, S., Rizkalla, S., Batto, J. M., Renault, P., Doré, J. Zucker, J. D., Clément, K., Ehrlich, S. D., Blottière, H., Leclerc, M., Juste, C., De Wouters, T., Lepage, P., Fouqueray, C., Basdevant, A., Henegar, C., Godard, C., Fondacci, M., Rohia, A., Hajduch, F., Weissenbach, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Gauchi, J. P., Gibrat, J. F., Loux, V., Carré, W., Maguin, E., Van De Guchte, M., Jamet, A., Boumezbear, F., Layec, S. (2013). Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature*, **500**, 585–588.
- Cox, A. J., Zhang, P., Bowden, D. W., Devereaux, B., Davoren, P. M., Cripps, A. W., West, N. P. (2017). Increased intestinal permeability as a risk factor for type 2 diabetes. *Diabetes & Metabolism*, **43**, 163–166.
- Creely, S. J., McTernan, P. G., Kusminski, C. M., Fisher, F. M., Da Silva, N. F., Khanolkar, M., Evans, M, Harte, a L., Kumar, S. (2007). Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **292**, E740–E747.
- Damms-Machado, A., Louis, S., Schnitzer, A., Volynets, V., Rings, A., Basrai, M., Bischoff, S. C. (2017). Gut permeability is related to body weight, fatty liver disease, and insulin resistance in obese individuals undergoing weight reduction. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **105**, 127–135.
- Dandona, P. (2004). Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends in Immunology*, **25**, 4–7.
- Dao, M. C., Everard, A., Aron-Wisnewsky, J., Sokolovska, N., Prifti, E., Verger, E. O., Kayser, B. D., Levenez, F., Chilloux, J., Hoyles, L., Dumas, M-E., Rizkalla, S. W., Doré, J. Cani, P. D., Clément, K. (2016). Akkermansia muciniphila and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut*, **65**, 426–436.
- Dapper, C., Schuster, F., Stölting, I., Vogt, F., Castro e Souza, L. A., Alenina, N., Bader, M., Raasch, W. (2019). The antiobese effect of AT1 receptor blockade is augmented in mice lacking Mas. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **392**, 865–877.
- de Kloet, A. D., Krause, E. G., Woods, S. C. (2010). The renin angiotensin system and the metabolic syndrome. *Physiology & Behavior*, **100**, 525–534.
- de La Serre, C. B., de Lartigue, G., Raybould, H. E. (2015). Chronic exposure to Low dose bacterial lipopolysaccharide inhibits leptin signaling in vagal afferent neurons. *Physiology and Behavior*, **139**, 188–194.
- de La Serre, C. B., Ellis, C. L., Lee, J., Hartman, A. L., Rutledge, J. C., Raybould, H. E. (2010). Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **299**, G440–G448.
- del Bas, J. M., Guirro, M., Boqué, N., Cereto, A., Ras, R., Crescenti, A., Caimari, A., Canela, N., Arola, L. (2018). Alterations in gut microbiota associated with a cafeteria diet and the physiological consequences in the host. *International Journal of Obesity*, **42**, 746–754.
- Delzenne, N. M. und Cani, P. D. (2011). Gut Microbiota and the Pathogenesis of Insulin Resistance. *Current Diabetes Reports*, **11**, 154–159.
- Delzenne, N. M., Neyrinck, A. M., Cani, P. D. (2013). Gut microbiota and metabolic disorders: how prebiotic can work? *British Journal of Nutrition*, **109**, S81–S85.
- Di Luccia, B., Crescenzo, R., Mazzoli, A., Cigliano, L., Venditti, P., Walser, J.-C., Widmer, A., Baccigalupi, L., Ricca, E., Iossa, S. (2015). Rescue of Fructose-Induced Metabolic Syndrome by Antibiotics or Faecal Transplantation in a Rat Model of Obesity. *PLoS ONE*, **10**, e0134893.
- Di Marzo, V. (2008). The endocannabinoid system in obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia*, **51**, 1356–1367.
- Di Marzo, V., Côté, M., Matias, I., Lemieux, I., Arsénault, B. J., Cartier, A., Piscitelli, F., Petrosino, S., Alméras, N., Després, J.-P. (2009). Changes in plasma endocannabinoid levels in viscerally obese men following a 1 year lifestyle modification programme and waist circumference reduction: associations with changes in metabolic risk factors. *Diabetologia*, **52**, 213–217.

- Di Marzo, Vincenzo, Goparaju, S. K., Wang, L., Liu, J., Bátkai, S., Járαι, Z., Fezza, Filomena, Miura, G. I., Palmiter, R. D., Sugiura, T., Kunos, G. (2001). Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature*, **410**, 822–825.
- Duncan, M., Davison, J. S., Sharkey, K. A. (2005). Review article: endocannabinoids and their receptors in the enteric nervous system. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, **22**, 667–683.
- Durbán, A., Abellán, J. J., Jiménez-Hernández, N., Ponce, M., Ponce, J., Sala, T., D'Auria, G., Latorre, A., Moya, A. (2011). Assessing Gut Microbial Diversity from Feces and Rectal Mucosa. *Microbial Ecology*, **61**, 123–133.
- Dustan, H. P. (1983). Mechanisms of Hypertension Associated with Obesity. *Annals of Internal Medicine*, **98**, 860.
- Eckburg, P. B. (2005). Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*, **308**, 1635–1638.
- Elsayed, S. und Zhang, K. (2004). Bacteremia Caused by Clostridium symbiosum. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**, 4390–4392.
- Engeli, S., Böhnke, J., Feldpausch, M., Gorzelniak, K., Janke, J., Batakai, S., Pacher, P., Harvey-White, J., Luft, F. C., Sharma, A. M., Jordan, J. (2005). Activation of the Peripheral Endocannabinoid System in Human Obesity. *Diabetes*, **54**, 2838–2843.
- Engeli, S., Böhnke, J., Gorzelniak, K., Janke, J., Schling, P., Bader, M., Luft, F. C., Sharma, A. M. (2005a). Weight Loss and the Renin-Angiotensin-Aldosterone System. *Hypertension*, **45**, 356–362.
- Engeli, S., Schling, P., Gorzelniak, K., Boschmann, M., Janke, J., Ailhaud, G., Teboul, M., Massiéra, F., Sharma, A. M. (2003). The adipose-tissue renin–angiotensin–aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **35**, 807–825.
- Enriori, P. J., Evans, A. E., Sinnayah, P., Cowley, M. A. (2006). Leptin Resistance and Obesity. *Obesity*, **14**, 254S–258S.
- Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J. P., Druart, C., Bindels, L. B., Guiot, Y., Derrien, M., Muccioli, G. G., Delzenne, N. M., De Vos, W. M., Cani, P. D. (2013). Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 9066–9071.
- Fei, N. und Zhao, L. (2013). An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice. *The ISME Journal*, **7**, 880–884.
- Fox, C. S., Massaro, J. M., Hoffmann, U., Pou, K. M., Maurovich-Horvat, P., Liu, C.-Y., Vasan, R. S., Murabito, J. M., Meigs, J. B., Cupples, L. A., D'Agostino, R. B., O'Donnell, C. J. (2007). Abdominal Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue Compartments. *Circulation*, **116**, 39–48.
- Friedman, J. M. (2011). Leptin and the Regulation of Body Weight. *The Keio Journal of Medicine*, **60**, 1–9.
- Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J. M., Topping, D. L., Suzuki, T., Taylor, T. D., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M., Ohno, H. (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, **469**, 543–547.
- Furlong, T. M., Jayaweera, H. K., Balleine, B. W., Corbit, L. H. (2014). Binge-Like Consumption of a Palatable Food Accelerates Habitual Control of Behavior and Is Dependent on Activation of the Dorsolateral Striatum. *The Journal of Neuroscience*, **34**, 5012–5022.
- Ghoshal, S., Witta, J., Zhong, J., de Villiers, W., Eckhardt, E. (2009). Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *Journal of Lipid Research*, **50**, 90–97.
- Grassi, G., Seravalle, G., Dell'Oro, R., Trevano, F. Q., Bombelli, M., Scopelliti, F., Facchini, A., Mancia, G. (2003). Comparative effects of candesartan and hydrochlorothiazide on blood pressure, insulin sensitivity, and sympathetic drive in obese hypertensive individuals. *Journal of Hypertension*, **21**, 1761–1769.
- Gregor, M. F. und Hotamisligil, G. S. (2011). Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annual Review of Immunology*, **29**, 415–445.
- Griffiths, E. A., Duffy, L. C., Schanbacher, F. L., Qiao, H., Dryja, D., Leavens, A., Rossman, J., Rich, G., Dirienzo, D., Ogra, P. L. (2004). In Vivo Effects of Bifidobacteria and Lactoferrin on Gut Endotoxin Concentration and Mucosal Immunity in Balb/c Mice. *Digestive Diseases and Sciences*, **49**, 579–589.

- Guo, S., Al-Sadi, R., Said, H. M., Ma, T. Y. (2013). Lipopolysaccharide Causes an Increase in Intestinal Tight Junction Permeability in Vitro and in Vivo by Inducing Enterocyte Membrane Expression and Localization of TLR-4 and CD14. *The American Journal of Pathology*, **182**, 375–387.
- Gustaityte, V., Winkler, M., Stölting, I., Raasch, W. (2019). Influence of AT1 blockers on obesity and stress-induced eating of cafeteria diet. *Journal of Endocrinology*, **240**, 65–79.
- Hakkak, R., Korourian, S., Foley, S. L., Erickson, B. D. (2017). Assessment of gut microbiota populations in lean and obese Zucker rats. *PLoS ONE*, **12**, e0181451.
- Halaas, J. L., Boozer, C., Blair-West, J., Fidahusein, N., Denton, D. A., Friedman, J. M. (1997). Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**, 8878–8883.
- Hall, J. E., do Carmo, J. M., da Silva, A. A., Wang, Z., Hall, M. E. (2015). Obesity-Induced Hypertension. *Circulation Research*, **116**, 991–1006.
- Hauner, H. (2005). Secretory factors from human adipose tissue and their functional role. *Proceedings of the Nutrition Society*, **64**, 163–169.
- Hirsch, J. und Batchelor, B. (1976). Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clinics in Endocrinology and Metabolism*, **5**, 299–311.
- Hjorth, M F, Roager, H. M., Larsen, T. M., Poulsen, S. K., Licht, T. R., Bahl, M. I., Zohar, Y, Astrup, A. (2018). Pre-treatment microbial Prevotella-to-Bacteroides ratio, determines body fat loss success during a 6-month randomized controlled diet intervention. *International Journal of Obesity*, **42**, 580–583.
- Hjorth, Mads F., Blædel, T., Bendtsen, L. Q., Lorenzen, J. K., Holm, J. B., Kiilerich, P., Roager, H. M., Kristiansen, K., Larsen, L. H., Astrup, A. (2019). Prevotella-to-Bacteroides ratio predicts body weight and fat loss success on 24-week diets varying in macronutrient composition and dietary fiber: results from a post-hoc analysis. *International Journal of Obesity*, **43**, 149–157.
- Holmes, E., Li, J. V., Athanasiou, T., Ashrafian, H., Nicholson, J. K. (2011). Understanding the role of gut microbiome-host metabolic signal disruption in health and disease. *Trends in Microbiology*, **19**, 349–359.
- Hubert, H. B., Feinleib, M., McNamara, P. M., Castelli, W. P. (1983). Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation*, **67**, 968–977.
- Hu, J., Lin, S., Zheng, B., Cheung P. C. K. (2018). Short-chain fatty acids in control of energy metabolism. *Critical reviews in food science and nutrition*, **58**, 1243–1249.
- Ianiro, G., Tilg, H., Gasbarrini, A. (2016). Antibiotics as deep modulators of gut microbiota: between good and evil. *Gut*, **65**, 1906–1915.
- Ibrügger, S., Kristensen, M., Mikkelsen, M. S., Astrup, A. (2012). Flaxseed dietary fiber supplements for suppression of appetite and food intake. *Appetite*, **58**(2), 490–495.
- Igase, M., Strawn, W. B., Gallagher, P. E., Geary, R. L., Ferrario, C. M. (2005). Angiotensin II AT 1 receptors regulate ACE2 and angiotensin-(1–7) expression in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **289**, H1013–H1019.
- International Diabetes Federation (2017). *IDF DIABETES ATLAS Eighth edition*.
- Ishiyama, Y., Gallagher, P. E., Averill, D. B., Tallant, E. A., Brosnihan, K. B., Ferrario, C. M. (2004). Upregulation of Angiotensin-Converting Enzyme 2 After Myocardial Infarction by Blockade of Angiotensin II Receptors. *Hypertension*, **43**, 970–976.
- Islas, M. S., Martínez Medina, J. J., López Tévez, L. L., Rojo, T., Lezama, L., Griera Merino, M., Calleros, L., Cortes, M. A., Rodríguez Puyol, M., Echeverría, G. A., Piro, O. E., Ferrer, E. G, Williams, P. A. M. (2014). Antitumoral, Antihypertensive, Antimicrobial, and Antioxidant Effects of an Octanuclear Copper(II)-Telmisartan Complex with an Hydrophobic Nanometer Hole. *Inorganic Chemistry*, **53**, 5724–5737.
- Jayasinghe, T. N., Chiavaroli, V., Holland, D. J., Cutfield, W. S., O'Sullivan, J. M. (2016). The New Era of Treatment for Obesity and Metabolic Disorders: Evidence and Expectations for Gut Microbiome Transplantation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **6**, 1–11.
- Jeong, J. J., Kim, K. A., Jang, S. E., Woo, J. Y., Han, M. J., Kim, D. H. (2015). Orally administrated Lactobacillus pentosus var. plantarum C29 ameliorates age-dependent colitis by inhibiting the nuclear factor-kappa B

- signaling pathway via the regulation of lipopolysaccharide production by gut microbiota. *PLoS ONE*, **10**, e0116533.
- Juhan-Vague, I., Vague, P., Alessi, M. C., Badier, C., Valadier, J., Aillaud, M. F., Atlan, C. (1987). Relationships between plasma insulin triglyceride, body mass index, and plasminogen activator inhibitor 1. *Diabete et Metabolisme*, **13**, 331–336.
- Jumpertz, R., Le, D. S., Turnbaugh, P. J., Trinidad, C., Bogardus, C., Gordon, J. I., Krakoff, J. (2011). Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **94**, 58–65.
- Kallio, K. A. E., Hätönen, K. A., Lehto, M., Salomaa, V., Männistö, S., Pussinen, P. J. (2015). Endotoxemia, nutrition, and cardiometabolic disorders. *Acta Diabetologica*, **52**, 395–404.
- Kalliomäki, M., Carmen Collado, M., Salminen, S., Isolauri, E. (2008). Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **87**, 534–538.
- Karsenty, G. (2006). Convergence between bone and energy homeostases: Leptin regulation of bone mass. *Cell Metabolism*, **4**, 341–348.
- Kern, P. A., Ranganathan, S., Li, C., Wood, L., Ranganathan, G. (2001). Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **280**(5), E745–E751.
- Kim, J. I. (2017). High fat diet confers vascular hyper-contractility against angiotensin II through upregulation of MLCK and CPI-17. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, **21**, 99.
- Klingbeil, E. und de La Serre, C. B. (2018). Microbiota modulation by eating patterns and diet composition: impact on food intake. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **315**, R1254–R1260.
- Klok, M. D., Jakobsdóttir, S., Drent, M. L. (2007). The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obesity Reviews*, **8**, 21–34.
- Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., Bäckhed, F. (2016). From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell*, **165**, 1332–1345.
- Kootte, R. S., Vrieze, A., Holleman, F., Dallinga-Thie, G. M., Zoetendal, E. G., de Vos, W. M., Groen, A. K., Hoekstra, J. B. L., Stroes, E. S., Nieuwdorp, M. (2012). The therapeutic potential of manipulating gut microbiota in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **14**, 112–120.
- Kovatcheva-Datchary, P., Nilsson, A., Akrami, R., Lee, Y. S., De Vadder, F., Arora, T., Hallen, A., Martens, E., Björck, I., Bäckhed, F. (2015). Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of *Prevotella*. *Cell Metabolism*, **22**, 971–982.
- Krishnan, S., Shanmuganathan, M. V., Behenna, D., Stoltz, B. M., Prasadarao, N. V. (2014). Angiotensin II Receptor Type 1—A Novel Target for Preventing Neonatal Meningitis in Mice by *Escherichia coli* K1. *The Journal of Infectious Diseases*, **209**, 409–419.
- Kruszewska, H., Zareba, T., Tyski, S. (2002). Search of antimicrobial activity of selected non-antibiotic drugs. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, **59**, 436–439.
- Kruszewska, H., Zareba, T., Tyski, S. (2006). Estimation of antimicrobial activity of selected non-antibiotic products. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, **63**, 457–460.
- Kruszewska, H., Zareba, T., Tyski, S. (2008). Examination of antibacterial and antifungal activity of selected non-antibiotic products. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, **65**, 779–782.
- Kruszewska, H., Zareba, T., Tyski, S. (2012). Examination of antimicrobial activity of selected non-antibiotic medicinal preparations. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, **69**, 1368–1371.
- Kufer, T. A., und Sansonetti, P. J. (2007). Sensing of bacteria: NOD a lonely job. *Current opinion in microbiology*, **10**, 62–69.
- Kurtz, Z. D., Müller, C. L., Miraldi, E. R., Littman, D. R., Blaser, M. J., Bonneau, R. A. (2015). Sparse and Compositionally Robust Inference of Microbial Ecological Networks. *PLoS Computational Biology*, **11**, e1004226.
- Lacroix, S., Pechereau, F., Leblanc, N., Boubertakh, B., Houde, A., Martin, C., Flamand, N., Silvestri, C.,

- Raymond, F. Di Marzo, V., Veilleux, A. (2019). Rapid and Concomitant Gut Microbiota and Endocannabinoidome Response to Diet-Induced Obesity in Mice. *mSystems*, **4**, e00407–19.
- Lam, Q. L. K. und Lu, L. (2007). Role of leptin in immunity. *Cellular & Molecular Immunology*, **4**, 1–13.
- Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M., Batto, J.-M., Kennedy, S., Leonard, P., Li, J., Burgdorf, K., Grarup, N., Jørgensen, T., Brandslund, I., Nielsen, H. B., Juncker, A. S., Bertalan, M., Levenez, F., Pons, N., Rasmussen, S., Sunagawa, S., Tap, J., Tims, S., Zoetendal, E. G., Brunak, S., Clément, K., Doré, J., Kleerebezem, M., Kristiansen, K., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., de Vos, W. M., Zucker, J.-D., Raes, J., Hansen, T., Bork, P., Wang, J., Ehrlich, S. D., Pedersen, O. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, **500**, 541–546.
- Lee, E.-S., Song, E.-J., Nam, Y.-D., Lee, S.-Y. (2018). Probiotics in human health and disease: from nutraceuticals to pharmabiotics. *Journal of Microbiology*, **56**, 773–782.
- Lee, S. J., Bose, S., Seo, J.-G., Chung, W.-S., Lim, C.-Y., Kim, H. (2014). The effects of co-administration of probiotics with herbal medicine on obesity, metabolic endotoxemia and dysbiosis: A randomized double-blind controlled clinical trial. *Clinical Nutrition*, **33**, 973–981.
- Lepper, P.M., Schumann, C., Triantafyllou, K., Rasche, F. M., Schuster, T., Frank, H., Schneider, E. M., Triantafyllou, M., von Eynatten, M. (2007). Association of lipopolysaccharide-binding protein and coronary artery disease in men. *Journal of the American College of Cardiology*, **50**, 25–31.
- Levy, M., Thaiss, C. A., Elinav, E. (2016). Metabolites: messengers between the microbiota and the immune system. *Genes & Development*, **30**, 1589–1597.
- Ley, R. E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **102**, 11070–11075.
- Ley, Ruth E, Turnbaugh, P. J., Klein, S., Gordon, J. I. (2006). Human gut microbes associated with obesity. *Nature*, **444**, 1022–1023.
- Li, J., Jia, H., Cai, X., Zhong, H., Feng, Q., Sunagawa, S., Arumugam, M., Kultima, J. R., Prifti, E., Nielsen, T., Juncker, A. S., Manichanh, C., Chen, B., Zhang, W., Levenez, F., Wang, J., Xu, X., Xiao, L., Liang, S., Zhang, D., Zhang, Z., Chen, W., Zhao, H., Al-Aama, J. Y., Edris, S., Yang, H., Wang, J., Hansen, T., Nielsen, H. B., Brunak, S., Kristiansen, K., Guarnier, F., Pedersen, O., Doré, J., Ehrlich, S. D., Bork, P., Wang, J. (2014). An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nature Biotechnology*, **32**, 834–841.
- Lin, H., An, Y., Hao, F., Wang, Y., Tang, H. (2016). Correlations of Fecal Metabonomic and Microbiomic Changes Induced by High-fat Diet in the Pre-Obesity State. *Scientific Reports*, **6**, 21618.
- Liu, J., Bátkai, S., Pacher, P., Harvey-White, J., Wagner, J. A., Cravatt, B. F., Gao, B., Kunos, G. (2003). Lipopolysaccharide Induces Anandamide Synthesis in Macrophages via CD14/MAPK/Phosphoinositide 3-Kinase/NF- κ B Independently of Platelet-activating Factor. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 45034–45039.
- Liu, X., Lu, L., Yao, P., Ma, Y., Wang, F., Jin, Q., Ye, X., Li, H., Hu, F. B., Sun, L., Lin, X. (2014). Lipopolysaccharide binding protein, obesity status and incidence of metabolic syndrome: a prospective study among middle-aged and older Chinese. *Diabetologia*, **57**, 1834–1841.
- Liu, Z., Chen, Z., Guo, H., He, D., Zhao, H., Wang, Z., Zhang, W., Liao, L., Zhang, C., Ni, L. (2016). The modulatory effect of infusions of green tea, oolong tea, and black tea on gut microbiota in high-fat-induced obese mice. *Food and Function*, **7**, 4869–4879.
- Loffreda, S., Yang, S. Q., Lin, H. Z., Karp, C. L., Brengman, M. L., Wang, D. J., Klein, A. S., Bulkley, G. B., Bao, C., Noble, P. W., Lane, M. D., Diehl, A. M. (1998). Leptin regulates proinflammatory immune responses. *The FASEB Journal*, **12**, 57–65.
- Lozupone, C. A. und Knight, R. (2008). Species divergence and the measurement of microbial diversity. *FEMS Microbiology Reviews*, **32**, 557–578.
- Lozupone, C., Stombaugh, J., Gordon, J., Jansson, J., Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, **489**, 220–230.
- Lu, X.-Y. (2007). The leptin hypothesis of depression: a potential link between mood disorders and obesity? *Current Opinion in Pharmacology*, **7**, 648–652.

- Lundin, A., Bok, C.M., Aronsson, L., Bjorkholm, B., Gustafsson, J.A., Pott, S., Arulampalam, V., Hibberd, M., Rafter, J., Pettersson, S., (2008). Gut flora, Toll-like receptors and nuclear receptors: a tripartite communication that tunes innate immunity in large intestine. *Cell. Microbiol.* **10**, 1093–1103.
- Lyra, A. (2012). Comparison of bacterial quantities in left and right colon biopsies and faeces. *World Journal of Gastroenterology*, **18**, 4404.
- Maachi, M., Piéroni, L., Bruckert, E., Jardel, C., Fellahi, S., Hainque, B., Capeau, J., Bastard, J.-P. (2004). Systemic low-grade inflammation is related to both circulating and adipose tissue TNFalpha, leptin and IL-6 levels in obese women. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders : Journal of the International Association for the Study of Obesity*, **28**, 993–997.
- Macfarlane, G. T., und Gibson, G. R. (1997). Carbohydrate Fermentation, Energy Transduction and Gas Metabolism in the Human Large Intestine. In Mackie R.I., White B.A. (eds) *Gastrointestinal Microbiology*. Chapman & Hall Microbiology Series. Springer, Boston, MA. (pp. 269–318).
- Maier, L., Pruteanu, M., Kuhn, M., Zeller, G., Telzerow, A., Anderson, E. E., Brochado, A. R., Fernandez, K. C., Dose, H., Mori, H., Patil, K. R., Bork, P., Typas, A. (2018). Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria. *Nature*, **555**, 623–628.
- Margetic, S., Gazzola, C., Pegg, G., Hill, R. (2002). Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *International Journal of Obesity*, **26**, 1407–1433.
- Marotz, C. A. und Zarrinpar, A. (2016). Treating Obesity and Metabolic Syndrome with Fecal Microbiota Transplantation. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, **89**, 383–388.
- Martin, F. J., Dumas, M., Wang, Y., Legido-Quigley, C., Yap, I. K. S., Tang, H., Zirah, S., Murphy, G. M., Cloarec, O., Lindon, J. C., Sprenger, N., Fay, L. B., Kochhar, S., van Bladeren, P., Holmes, E. Nicholson, J. K. (2007). A top-down systems biology view of microbiome-mammalian metabolic interactions in a mouse model. *Molecular Systems Biology*, **3**, 112.
- Masuo, K., Mikami, H., Itoh, M., Ogihara, T., Tuck, M. L. (2000). Sympathetic Activity and Body Mass Index Contribute to Blood Pressure Levels. *Hypertension Research*, **23**, 303–310.
- Mehrpouya-Bahrami, P., Chitralla, K. N., Ganewatta, M. S., Tang, C., Murphy, E. A., Enos, R. T., Velazquez, K. T., McCellan, J., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P. (2017). Blockade of CB1 cannabinoid receptor alters gut microbiota and attenuates inflammation and diet-induced obesity. *Scientific Reports*, **7**, 15645.
- Mensink, G. B. M., Schienkiewitz, A., Haftenberger, M., Lampert, T., Ziese, T., Scheidt-Nave, C. (2013). Übergewicht und Adipositas in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, **56**, 786–794.
- Miesel, A., Müller, H., Thermann, M., Heidbreder, M., Dominiak, P., Raasch, W. (2010). Overfeeding-Induced Obesity in Spontaneously Hypertensive Rats: An Animal Model of the Human Metabolic Syndrome. *Annals of Nutrition and Metabolism*, **56**, 127–142.
- Miesel, A., Müller-Fielitz, H., Jöhren, O., Vogt, F. M., Raasch, W. (2012). Double blockade of angiotensin II (AT1)-receptors and ACE does not improve weight gain and glucose homeostasis better than single-drug treatments in obese rats. *British Journal of Pharmacology*, **165**, 2721–2735.
- Moore, W. E. und Holdeman, L. V. (1974). Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Applied Microbiology*, **27**, 961–979.
- Moreira, A. P., Texeira, T. F., Ferreira, A. B., Peluzio, M., Alfenas, R. (2012). Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *The British journal of nutrition*, **108**, 801–809.
- Morris, D. L. und Rui, L. (2009). Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **297**, E1247–E1259.
- Moreno-Navarrete, J.M., Ortega, F., Serino, M., Luche, E., Waget, A., Pardo, G., Salvador, J., Ricart, W., Frühbeck, G., Burcelin, R., Fernández-Real, J. M. (2011). Circulating lipopolysaccharide-binding protein (LBP) as a marker of obesity-related insulin resistance. *International journal of obesity*, **36**, 1442–1449.
- Muccioli, G. G., Naslain, D., Bäckhed, F., Reigstad, C. S., Lambert, D. M., Delzenne, N. M., Cani, P. D. (2010). The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Molecular Systems Biology*, **6**, 392.
- Müller-Fielitz, H., Hübel, N., Mildner, M., Vogt, F. M., Barkhausen, J., Raasch, W. (2014). Chronic blockade of angiotensin AT1 receptors improves cardinal symptoms of metabolic syndrome in diet-induced obesity in

- rats. *British Journal of Pharmacology*, **171**, 746–760.
- Müller-Fielitz, H., Landolt, J., Heidbreder, M., Werth, S., Vogt, F. M., Jöhren, O., Raasch, W. (2012). Improved Insulin Sensitivity after Long-Term Treatment with AT 1 Blockers Is Not Associated with PPAR γ Target Gene Regulation. *Endocrinology*, **153**, 1103–1115.
- Müller-Fielitz, H., Lau, M., Geißler, C., Werner, L., Winkler, M., Raasch, W. (2015). Preventing leptin resistance by blocking angiotensin II AT 1 receptors in diet-induced obese rats. *British Journal of Pharmacology*, **172**, 857–868.
- Müller-Fielitz, H., Markert, A., Wittmershaus, C., Pahlke, F., Jöhren, O., Raasch, W. (2011). Weight loss and hypophagia after high-dose AT1-blockade is only observed after high dosing and depends on regular leptin signalling but not blood pressure. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **383**, 373–384.
- Must, A. (1999). The Disease Burden Associated With Overweight and Obesity. *JAMA*, **282**, 1523.
- Nathan, D. M., Bayless, M., Cleary, P., Genuth, S., Gubitosi-Klug, R., Lachin, J. M., Lorenzi, G., Zinman, B. (2013). Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study at 30 Years: Advances and Contributions. *Diabetes*, **62**, 3976–3986.
- NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC) (2017). Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19.1 million participants. *Lancet*, **389**, 37–55.
- Niklason, A., Hedner, T., Niskanen, L., Lanke, J. (2004). Development of diabetes is retarded by ACE inhibition in hypertensive patients ??? a subanalysis of the Captopril Prevention Project (CAPPP). *Journal of Hypertension*, **22**, 645–652.
- Nogueira, T., David, P. H. C., Pothier, J. (2019). Antibiotics as both friends and foes of the human gut microbiome: The microbial community approach. *Drug Development Research*, **80**, 86–97.
- Olszak, T., An, D., Zeissig, S., Vera, M. P., Richter, J., Franke, A., Glickman, J. N., Siebert, R., Baron, R. M., Kasper, D. L., Blumberg, R. S. (2012). Microbial Exposure During Early Life Has Persistent Effects on Natural Killer T Cell Function. *Science*, **336**, 489–493.
- Pacher, P., Bátkai, S., Kunos, G. (2006). The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacological Reviews*, **58**, 389–462.
- Panda, S., Guarner, F., Manichanh, C. (2014). Structure and Functions of the Gut Microbiome. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*, **14**, 290–299.
- Parnell, J. A. und Reimer, R. A. (2009). Weight loss during oligofructose supplementation is associated with decreased ghrelin and increased peptide YY in overweight and obese adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **89**, 1751–1759.
- Perry, R. J., Peng, L., Barry, N. A., Cline, G. W., Zhang, D., Cardone, R. L., Petersen, K. F., Kibbey, R. G., Goodman, A. L., Shulman, G. I. (2016). Acetate mediates a microbiome–brain– β -cell axis to promote metabolic syndrome. *Nature*, **534**, 213–217.
- Pussinen, P. J., Havulinna, A. S., Lehto, M., Sundvall, J., Salomaa, V. (2011). Endotoxemia Is Associated With an Increased Risk of Incident Diabetes. *Diabetes Care*, **34**, 392–397.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.-M., Hansen, T., Paslier, D. L., Linneberg, A., Nielsen, H. B., Pelletier, E., Renault, P., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H. (2010). A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature*, **464**, 59–65.
- Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., Liang, S., Zhang, W., Guan, Y., Shen, D., Peng, Y., Zhang, D., Jie, Z., Wu, W., Qin, Y., Xue, W., Li, J., Han, L., Lu, D., Wu, P., Dai, Y., Sun, X., Li, Z., Tang, A., Zhong, S., Li, X., Chen, W., Xu, R., Wang, M., Feng, Q., Gong, M., Yu, J., Zhang, Y., Zhang, M., Hansen, T., Sanchez, G., Raes, J., Falony, G., Okuda, S., Almeida, M., LeChatelier, E., Renault, P., Pons, N., Batto, J.-M., Zhang, Z., Chen, H., Yang, R., Zheng, W., Li, S., Yang, H., Wang, J., Ehrlich, S. D., Nielsen, R., Pedersen, O., Kristiansen, K., Wang, J. (2012). A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, **490**, 55–60.
- Raasch, W., Bartels, T., Schwartz, C., Häuser, W., Rütten, H., Dominiak, P. (2002). Regression of ventricular and vascular hypertrophy. *Journal of Hypertension*, **20**, 2495–2504.

- Rabot, S., Membrez, M., Blancher, F., Berger, B., Moine, D., Krause, L., Bibiloni, R., Bruneau, A., Gérard, P., Siddharth, J., Lauber, C. L., Chou, C. J. (2016). High fat diet drives obesity regardless the composition of gut microbiota in mice. *Scientific Reports*, **6**, 1–11.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., & Medzhitov, R. (2004). Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis. *Cell*, **118**, 229–241.
- Rawish, E., Nickel, L., Schuster, F., Stölting, I., Frydrychowicz, A., Saar, K., Hübner, N., Othman, A., Kuerschner, L., Raasch, W. (2020). Telmisartan prevents development of obesity and normalizes hypothalamic lipid droplets. *Journal of Endocrinology*, **244**, 95–110.
- Reijnders, D., Goossens, G. H., Hermes, G. D. A., Neis, E. P. J. G., van der Beek, C. M., Most, J., Holst, J. J., Lenaerts, K., Kootte, R. S., Nieuwdorp, M., Groen, A. K., Olde Damink, S. W. M., Boekschoten, M. V., Smidt, H., Zoetendal, E. G., Dejong, C. H. C., Blaak, E. E. (2016). Effects of Gut Microbiota Manipulation by Antibiotics on Host Metabolism in Obese Humans: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial. *Cell Metabolism*, **24**, 63–74.
- Rhea, E. M., Salameh, T. S., Logsdon, A. F., Hanson, A. J., Erickson, M. A., Banks, W. A. (2017). Blood-Brain Barriers in Obesity. *The AAPS Journal*, **19**, 921–930.
- Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Cheng, J., Duncan, A. E., Kau, A. L., Griffin, N. W., Lombard, V., Henrissat, B., Bain, J. R., Muehlbauer, M. J., Ilkayeva, O., Semenkovich, C. F., Funai, K., Hayashi, D. K., Lyle, B. J., Martini, M. C., Ursell, L. K., Clemente, J. C., Van Treuren, W., Walters, W. A., Knight, R., Newgard, C. B., Heath, A. C., Gordon, J. I. (2013). Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*, **341**, 1241214.
- Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M.-J., Léotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N. M., Cani, P. D., Neyrinck, A. M., Meheust, A. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, **104**, S1–S63.
- Rozenfeld, R., Gupta, A., Gagnidze, K., Lim, M. P., Gomes, I., Lee-Ramos, D., Nieto, N., Devi, L. A. (2011). AT1R-CB1 R heteromerization reveals a new mechanism for the pathogenic properties of angiotensin II. *EMBO Journal*, **30**, 2350–2363.
- Ruan, X., Shi, H., Xia, G., Xiao, Y., Dong, J., Ming, F., Wang, S. (2007). Encapsulated Bifidobacteria reduced bacterial translocation in rats following hemorrhagic shock and resuscitation. *Nutrition*, **23**, 754–761.
- Ruiz, A.G., Casafont, F., Crespo, J., Cayón, A., Mayorga, M., Estebanez, A., Fernandez-Escalante, J. C., Pons-Romero, F. (2007). Lipopolysaccharide-binding protein plasma levels and liver TNF-alpha gene expression in obese patients: evidence for the potential role of endotoxin in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Obes Surg*, **17**, 1374–1380.
- Samad, F., Yamamoto, K., Loskutoff, D. J. (1996). Distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in murine adipose tissue in vivo. Induction by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *Journal of Clinical Investigation*, **97**, 37–46.
- Sanders, W. E. und Sanders, C. C. (1997). Enterobacter spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clinical Microbiology Reviews*, **10**, 220–241.
- Santacruz, A., Marcos, A., Wärnberg, J., Martí, A., Martín-Matillas, M., Campoy, C., Moreno, L. A., Veiga, O., Redondo-Figuero, C., Garagorri, J. M., Azcona, C., Delgado, M., García-Fuentes, M., Collado, M. C., Sanz, Y. (2009). Interplay Between Weight Loss and Gut Microbiota Composition in Overweight Adolescents. *Obesity*, **17**, 1906–1915.
- Santos, R. A. S., Ferreira, A. J., Verano-Braga, T., Bader, M. (2013). Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1–7) and Mas: new players of the renin–angiotensin system. *Journal of Endocrinology*, **216**, R1–R17.
- Santos, S. H. S., Braga, J. F., Mario, E. G., Pôrto, L. C. J., Rodrigues-Machado, M. D. G., Murari, A., Botion, L. M., Alenina, N., Bader, M., Santos, R. A. S. (2010). Improved Lipid and Glucose Metabolism in Transgenic Rats With Increased Circulating Angiotensin-(1-7). *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **30**, 953–961.
- Schuchard, J., Winkler, M., Stölting, I., Schuster, F., Vogt, F. M., Barkhausen, J., Thorns, C., Santos, R. A. S., Bader, M., Raasch, W. (2015). Lack of weight gain after angiotensin AT 1 receptor blockade in diet-induced obesity is partly mediated by an angiotensin-(1-7)/Mas-dependent pathway. *British Journal of Pharmacology*, **172**, 3764–3778.

- Schuster, F., Huber, G., Stölting, I., Wing, E. E., Saar, K., Hübner, N., Banks, W. A., Raasch, W. (2018). Telmisartan prevents diet-induced obesity and preserves leptin transport across the blood-brain barrier in high-fat diet-fed mice. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, **470**, 1673–1689.
- Schwartz, A., Taras, D., Schäfer, K., Beijer, S., Bos, N. A., Donus, C., Hardt, P. D. (2010). Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects. *Obesity*, **18**, 190–195.
- Sen, T., Cawthon, C. R., Ihde, B. T., Hajnal, A., DiLorenzo, P. M., de La Serre, C. B., Czaja, K. (2017). Diet-driven microbiota dysbiosis is associated with vagal remodeling and obesity. *Physiology & Behavior*, **173**, 305–317.
- Seo, D.-B., Jeong, H. W., Cho, D., Lee, B. J., Lee, J. H., Choi, J. Y., Bae, I.-H., Lee, S.-J. (2015). Fermented Green Tea Extract Alleviates Obesity and Related Complications and Alters Gut Microbiota Composition in Diet-Induced Obese Mice. *Journal of Medicinal Food*, **18**, 549–556.
- Servant, G., Escher, E., Guillemette, G. (1998). The angiotensin II binding site on *Mycoplasma hyorhynnis* is structurally distinct from mammalian AT1 and AT2 receptors. *Regulatory Peptides*, **73**, 35–41.
- Shapiro, N. I., Khankin, E. V., Van Meurs, M., Shih, S.-C., Lu, S., Yano, M., Castro, P. R., Maratos-Flier, E., Parikh, S. M., Karumanchi, S. A., Yano, K. (2010). Leptin Exacerbates Sepsis-Mediated Morbidity and Mortality. *The Journal of Immunology*, **185**, 517–524.
- Shin, N.-R., Lee, J.-C., Lee, H.-Y., Kim, M.-S., Whon, T. W., Lee, M.-S., Bae, J.-W. (2014). An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut*, **63**(5), 727–735. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303839>
- Sonnenburg, J. L. (2005). Glycan Foraging in Vivo by an Intestine-Adapted Bacterial Symbiont. *Science*, **307**, 1955–1959.
- Srinivas, G., Möller, S., Wang, J., Künzel, S., Zillikens, D., Baines, J. F., Ibrahim, S. M. (2013). Genome-wide mapping of gene–microbiota interactions in susceptibility to autoimmune skin blistering. *Nature Communications*, **4**, 2462.
- Stephens, R. W., Arhire, L., Covasa, M. (2018). Gut Microbiota: From Microorganisms to Metabolic Organ Influencing Obesity. *Obesity*, **26**, 801–809.
- Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J. J., Gibson, G. R., Collins, M. D., & Doré, J. (1999). Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 4799–4807.
- Sun, L., Yu, Z., Ye, X., Zou, S., Li, H., Yu, D., Wu, H., Chen, Y., Dore, J., Clement, K., Hu, F. B., Lin, X. (2010). A Marker of Endotoxemia Is Associated With Obesity and Related Metabolic Disorders in Apparently Healthy Chinese. *Diabetes Care*, **33**, 1925–1932.
- Tang, W. H. W., Wang, Z., Levison, B. S., Koeth, R. A., Britt, E. B., Fu, X., Wu, Y., Hazen, S. L. (2013). Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *The New England Journal of Medicine*, **368**, 1575–1584.
- Thursby, E., und Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, **474**, 1823–1836.
- Trayhurn, P., und Wood, I. S. (2004). Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *The British Journal of Nutrition*, **92**, 347–355.
- Turnbaugh, P. J., Bäckhed, F., Fulton, L., Gordon, J. I. (2008). Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host & Microbe*, **3**, 213–223.
- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., Sogin, M. L., Jones, W. J., Roe, B., Affourtit, J. P., Egholm, M., Henriksat, B., Heath, A. C., Knight, R., Gordon, J. I. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, **457**, 480–484.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, **444**, 1027–1031.
- Van Gaal, L. F., Mertens, I. L., De Block, C. E. (2006). Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*, **444**, 875–880.
- Van Heek, M., Compton, D. S., France, C. F., Tedesco, R. P., Fawzi, a B., Graziano, M. P., Sybertz, E J, Strader, C. D., Davis, H. R. (1997). Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central,

- resistance to leptin. *Journal of Clinical Investigation*, **99**, 385–390.
- Velagapudi, V. R., Hezaveh, R., Reigstad, C. S., Gopalacharyulu, P., Yetukuri, L., Islam, S., Felin, J., Perkins, R., Borén, J., Orešič, M., Bäckhed, F. (2010). The gut microbiota modulates host energy and lipid metabolism in mice. *Journal of Lipid Research*, **51**, 1101–1112.
- Visser, M. (1999). Elevated C-Reactive Protein Levels in Overweight and Obese Adults. *JAMA*, **282**, 2131.
- Vona-Davis, L., Howard-McNatt, M., Rose, D. P. (2007). Adiposity, type 2 diabetes and the metabolic syndrome in breast cancer. *Obesity Reviews*, **8**, 395–408.
- Vrieze, A., Van Nood, E., Holleman, F., Salojärvi, J., Kootte, R. S., Bartelsman, J. F. W. M., Dallinga-Thie, G. M., Ackermans, M. T., Serlie, M. J., Oozeer, R., Derrien, M., Druesne, A., Van Hylckama Vlieg, J. E. T., Bloks, V. W., Groen, A. K., Heilig, H. G. H. J., Zoetendal, E. G., Stroes, E. S., de Vos, W. M., Hoekstra, J. B. L., Nieuwdorp, M. (2012). Transfer of Intestinal Microbiota From Lean Donors Increases Insulin Sensitivity in Individuals With Metabolic Syndrome. *Gastroenterology*, **143**, 913-916.e7.
- Wang, Z., Xiao, G., Yao, Y., Guo, S., Lu, K., Sheng, Z. (2006). The Role of Bifidobacteria in Gut Barrier Function After Thermal Injury in Rats. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*, **61**, 650–657.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., Ferrante, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, **112**, 1796–1808.
- Wellen, K. E., und Hotamisligil, G. S. (2005). Inflammation, stress, and diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, **115**, 1111–1119.
- Wikoff, W. R., Anfora, A. T., Liu, J., Schultz, P. G., Lesley, S. A., Peters, E. C., Siuzdak, G. (2009). Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 3698–3703.
- Williams, B., Mancia, G., Spiering, W., Agabiti Rosei, E., Azizi, M., Burnier, M., Clement, D. L., Coca, A., de Simone, G., Dominiczak, A., Kahan, T., Mahfoud, F., Redon, J., Ruilope, L., Zanchetti, A., Kerins, M., Kjeldsen, S. E., Kreutz, R., Laurent, S., Lip, G. Y. H., McManus, R., Narkiewicz, K., Ruschitzka, F., Schmieder, R. E., Shlyakhto, E., Tsioufis, C., Aboyans, V., Desormais, I., ESC Scientific Document Group, (2018). ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH), *European Heart Journal*, **39**, 3021–3104.
- Williams, C. M., und Kirkham, T. C. (1999). Anandamide induces overeating: Mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology*, **143**, 315-317.
- Winkler, M., Bader, M., Schuster, F., Stölting, I., Binder, S., & Raasch, W. (2018). Development of obesity can be prevented in rats by chronic icv infusions of AngII but less by Ang(1–7). *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, **470**(6), 867–881.
- Winkler, M., Einfluss des zerebralen Renin-Angiotensin-Systems auf die Gewichtsregulation und die Glukosekontrolle. Med. Diss. Lübeck, 2017
- Winkler, M., Schuchard, J., Stölting, I., Vogt, F. M., Barkhausen, J., Thorns, C., Bader, M., Raasch, W. (2016). The brain renin-angiotensin system plays a crucial role in regulating body weight in diet-induced obesity in rats. *British Journal of Pharmacology*, **173**, 1602–1617.
- Wolever, T. M. S., Brighenti, F., Royall, D., Jenkins, A. L., Jenkins, D. J. A. (1989). Effect of rectal infusion of short chain fatty acids in human subjects. *The American Journal of Gastroenterology*, **84**, 1027–1033.
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Woo, G. K. S., Fung, A. M. Y., Yiu, V. P. Y., Yuen, K. -y. (2004). Bacteremia Due to *Clostridium hathewayi* in a Patient with Acute Appendicitis. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**, 5947–5949.
- Woods, S. C. (1998). Signals That Regulate Food Intake and Energy Homeostasis. *Science*, **280**, 1378–1383.
- World Health Organization (2020). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (Tag des Zugriffs: 13.05.2020)
- World Health Organization. (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organization Technical Report Series*, **894**, i–xii, 1–253.
- Wostmann, B. S., Larkin, C., Moriarty, A., Bruckner-Kardoss, E. (1983). Dietary intake, energy metabolism, and

excretory losses of adult male germfree Wistar rats. *Laboratory Animal Science*, **33**, 46–50.

- Wright, K., Rooney, N., Feeney, M., Tate, J., Robertson, D., Welham, M., Ward, S. (2005). Differential Expression of Cannabinoid Receptors in the Human Colon: Cannabinoids Promote Epithelial Wound Healing. *Gastroenterology*, **129**, 437–453.
- Xiao, L., Sonne, S. B., Feng, Q., Chen, N., Xia, Z., Li, X., Fang, Z., Zhang, D., Fjære, E., Midtbø, L. K., Derrien, M., Hugenholtz, F., Tang, L., Li, J., Zhang, J., Liu, C., Hao, Q., Vogel, U. B., Mortensen, A., Kleerebezem, M., Licht, T. R., Yang, H., Wang, J., Li, Y., Arumugam, M., Wang, J., Madsen, L., Kristiansen, K. (2017). High-fat feeding rather than obesity drives taxonomical and functional changes in the gut microbiota in mice. *Microbiome*, **5**, 43.
- Yu, Y., Sitaraman, S., Gewirtz, A. T. (2004). Intestinal epithelial cell regulation of mucosal inflammation. *Immunologic Research*, **29**, 55–68.
- Zhang, C., Zhang, M., Pang, X., Zhao, Y., Wang, L., Zhao, L. (2012). Structural resilience of the gut microbiota in adult mice under high-fat dietary perturbations. *ISME Journal*, **6**, 1848–1857.
- Zhang, H., DiBaise, J. K., Zuccolo, A., Kudrna, D., Braidotti, M., Yu, Y., Parameswaran, P., Crowell, M. D., Wing, R., Rittmann, B. E., Krajmalnik-Brown, R. (2009). Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 2365–2370.
- Zhang, L., Bahl, M. I., Roager, H. M., Fonvig, C. E., Hellgren, L. I., Frandsen, H. L., Pedersen, O., Holm, J. C., Hansen, T., Licht, T. R. (2017). Environmental spread of microbes impacts the development of metabolic phenotypes in mice transplanted with microbial communities from humans. *ISME Journal*, **11**, 676–690.
- Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D., De Vos, W. M. (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 3854–3859.

7. Anlagen

7.1. Anhang

Table 14: Nährwertzusammensetzung der Schoko- und Keksriegel der CD-Diät.

	Kalorien- gehalt (kJ/g)	Kohlen- hydrate (%)	Fett (%)	Protein (%)	Ballast- stoffe (%)	
Bounty	19.7	58	25	4	2	Mars GmbH, Viersen, Germany
Knoppers	22.9	52	33	9	3	August Storck KG, Berlin Germany
Lion	20.6	66	23	5	1	Nestlé Deutschland AG, Frankfurt, Germany
Prinzen Rolle	20.6	68	21	6	3	Mars GmbH, Viersen, Germany
Snicker	20.2	60	23	9	2	Griesson - de Beukelaer GmbH & Co. KG, Polch, Germany
Twix	20.7	65	24	5	1	Mars GmbH, Viersen, Germany

Table 15: Individuelle Basenabfolge (MIDs) der anwendungsspezifischen Primer.

338 Reverse-Primer		27 Forward-Primer	
Code	Sequenz	Code	Sequenz
A	TTCCGGTT	1	AACCGCAT
B	GTCACTCT	2	AAGGCCTT
C	ACCAGTTG	3	AGAGTGTG
D	AACGAACG	4	CACAAGTC
E	GTGAACAG	5	CGTTCCTA
F	TTGCAAGC	6	GCTTGGAT
G	CAGTTGAC	7	GTCAACAC
H	CATGAGGA	8	GTCACTGA
I	CTAGTCGA	9	TCTCGTCA
J	GCTTGCAA	10	TTGGTACG
K	AGAGGTGT	11	CGTTGGAT
L	GCTACGAT	12	CGTTAAGC
M	GTCAAGAG		
N	ATGGTAGG		
O	GACTTCAG		
P	ACGATCGT		
Q	GGCCATAT		
R	CCATCGAA		
S	CGTACGTA		
T	ACGTGATC		
U	TCTGTCAC		
V	GACACTCA		
W	CTCTTCTC		
X	TGTCCAGA		

Tabelle 16: Die Entwicklung der Körpermaße in den Versuchsgruppen, dargestellt sind Mittelwert \pm SD; die Gewichtszunahme berechnet aus der Differenz von Tag 72, als letzter Tag vor den fütterli-mittierenden Funktionstesten, zu Tag 1 als erster Tag der Vehikel- oder Telmisartan-Schlundung; Femurlänge, Linker Ventrikel und Leber weisen eine geringere Fallzahl auf von CON: n = 6, CD: n = 6; TEL: n = 5 und PF: n = 3; * p < 0,05 vs. CD (1way ANOVA + Bonferroni Posttest).

	CON	CD	TEL	PF
Körpergewicht an Tag 1 (g)	218 \pm 11	218 \pm 12	217 \pm 12	218 \pm 8
Körpergewicht an Tag 72 (g)	597 \pm 45*	684 \pm 78	567 \pm 56*	589 \pm 41*
Gewichtszunahme (g)	350 \pm 33*	436 \pm 69	323 \pm 50*	342 \pm 40*
BMI an Tag 83 (kg/m ²) (n = 15)	7,8 \pm 0,4*	8,4 \pm 0,6	7,5 \pm 0,7*	7,6 \pm 0,3*
Bauchumfang (cm) (n = 15)	22,3 \pm 0,9*	24,6 \pm 1,7	22,1 \pm 1,4*	22,9 \pm 1,0*
Körperlänge (cm) (n = 15)	28,2 \pm 0,7*	28,9 \pm 0,7	27,9 \pm 0,7*	28,5 \pm 0,5
Femurlänge (cm) (n = 4)	40,7 \pm 1,3	40,5 \pm 0,6	39,7 \pm 1,0	40,4 \pm 0,6
Linker Ventrikel (g) (n = 4)	1,15 \pm 0,12	1,09 \pm 0,02	0,87 \pm 0,10	1,06 \pm 0,04

Tabelle 17: Energieaufnahme in den Versuchsgruppen, dargestellt sind MW \pm SD; * p < 0,05 vs. CD (1way ANOVA + Bonferroni Posttest).

	CON	CD	TEL	PF
Woche 0	2455 \pm 149	2494 \pm 180	2490 \pm 173	2536 \pm 113
Totale Energieaufnahme (MJ)	27,2 \pm 1,6*	35,5 \pm 3,8	31,5 \pm 2,8*	30,7 \pm 1,6*
Totale CD-Aufnahme (MJ)	entfällt	21,9 \pm 5,1	19,7 \pm 4,8	19,1 \pm 3,1
Prozentualer Anteil des CD	entfällt	61 \pm 10	63 \pm 12	62 \pm 7,8

Tabelle 18: Ergebnisse der statistischen Berechnungen zum Fressverhalten der Tiere, dargestellt sind in den ersten 4 Zeilen die MW \pm SD, bei nicht gegebener Normalverteilung ist in der letzten Zeile jeweils der Median aufgeführt; # p < 0,05 vs. CD (1way ANOVA + Bonferroni Posttest); † p < 0,05 vs. PF (1way ANOVA [Kruskal-Wallis] + Dunn-Post Test).

	CON	CD	TEL	PF
Gesamte Energieaufnahme Tag 3 der Kalorimetrie (kJ)	27,2 \pm 0,4#	35,5 \pm 0,9	31,5 \pm 0,7#	30,7 \pm 0,4#
Zeitdauer für 70%ige Aufnahme der Tagesenergie (h)	10,0 \pm 1,7†	10,5 \pm 2,1†	9,2 \pm 2,1†	5,0 \pm 2,1
Absolute Energieaufnahme innerhalb von 2 Stunden (kJ)	23,0 \pm 17†	37,3 \pm 21,5†	39,8 \pm 28,5†	119,8 \pm 69,1
Absolute CD-Aufnahme innerhalb von 2 Stunden (kJ)	entfällt	32,7 \pm 21,4†	33,6 \pm 30,9†	93,7 \pm 55,3
Absolute chow-Aufnahme innerhalb von 2 Stunden (kJ)	18,5	4,8‡	1,8‡	20,5

Tabelle 19: Übersicht der Versuchsgruppen, Probenzeitpunkte und Anzahl der ausgewerteten Proben. In der Bioinformatischen Aufarbeitung der Sequenzierungsdaten sind 9 Proben aufgrund ihrer zu geringen „contigs“-Zahl (< 8546 contigs) herausgefallen, folglich wurden 279 Proben für die Mikrobiomanalyse berücksichtigt bei einer Gruppenstärke von n = 9 des ersten Probenzeitpunktes, n =

18 der folgenden 3 Probenzeitpunkte (Tag -3 bis Tag 60) und n = 8-10 des letzten Probezeitpunktes (Tag 93).

Gruppe		Normgewichtige Kontrolle	Ädipöse Kontrolle	Versuchsgruppe 1	Versuchsgruppe 2
Therapie		Chow-Normdiät + Vehikel	Cafeteria-Diät + Vehikel	Cafeteria-Diät + Telmisartan	Cafeteria-Diät „pair-feeding“ + Vehikel
Kürzel		CON	CD	TEL	PF
Gruppenstärke		n = 18	n = 18	n = 18	n = 18
		Anzahl der ausgewerteten Stuhlproben			
Zeitpunkt der Proben-gewinnung	Tag -11	9	9	9	9
	Tag -3	18	18	18	16
	Tag 32	18	18	17	17
	Tag 60	18	18	15	16
	Tag 93	10	9	8	9

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des RAS.....	7
Abbildung 2: Hypothetisches Schema	17
Abbildung 3: Zeitliche Übersicht des Studienprotokolls.....	20
Abbildung 4: Pipettierschema der PCR-Platte.	32
Abbildung 5: Pipettierschema der 96-well-Plate für die qPCR.....	38
Abbildung 6: Körpergewichtsentwicklung in den unterschiedlichen Versuchsgruppen.	48
Abbildung 7: Energieaufnahme in den Versuchsgruppen.....	50
Abbildung 8: Ergebnisse der MRT.....	51
Abbildung 9: Daten aus der indirekten Kalorimetrie	52
Abbildung 10: Systolischer Blutdruck.....	53
Abbildung 11: Plasmaspiegel von Glukose, Insulin und Glukagon	54
Abbildung 12: Messwerte des Insulintoleranztests.....	55
Abbildung 13: Basale Plasmaleptinspiegel	56
Abbildung 14: Plasma-Lipide.....	57
Abbildung 15: Säulendiagramm mit Darstellung der Abundanzen auf Phylum-Ebene.	59
Abbildung 16: Säulendiagramm mit Darstellung der Abundanzen auf Family-Ebene.....	60
Abbildung 17: Violin-Plot der F/B-Ratio	61
Abbildung 18: Ergebnis der Enterotype like Analysis	62
Abbildung 19: Violin-Plot der alpha Diversität.	63
Abbildung 20: Principal Coordinates Analysis (PCoA) der beta-Diversität	64
Abbildung 21: BORAL.....	65
Abbildung 22: Koinzidenz-Netzwerkanalyse	69
Abbildung 23: Zusammenfassende Darstellung des Einflusses der Diät und Therapie auf Phänotyp und Darmmikrobiom	80
Abbildung 24: Zusammenfassende Darstellung des Zusammenhangs der Telmisartan-Wirkung und Mikrobiom-abhängigen Einflüssen.....	85

7.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Versuchsgruppen, deren Diät und Therapie.....	20
Tabelle 2: Anwendungsspezifische Primer-Sequenzen.....	30
Tabelle 3: Mastermix für den PCR-Ansatz.....	32
Tabelle 4: PCR-Programm.....	33
Tabelle 5: Mastermix für die qPCR ("reaction cocktail").....	37
Tabelle 6: Real-time qPCR-Programm.....	38
Tabelle 7: Denaturierungs- und Verdünnungsschritte der Library und PhiX Library.....	39
Tabelle 8: Beladung der reagent cartridge für das NGS.....	41
Tabelle 9: Plasma-Konzentrationen verschiedener Peptide und Adipokine.....	58
Tabelle 10: Bray-Curtis-Dissimilarity Analyse der β -Diversität;.....	63
Tabelle 11: Übersicht der Confusion Matrix des Random Forest Algorithmus.....	66
Tabelle 12: Cluster-Matrix der 20 wichtigsten OTUs.....	67
Tabelle 13: Ergebnisse der DESeq2 Analyse.....	68
Tabelle 14: Nährwertzusammensetzung der Schoko- und Keksriegel der CD-Diät.....	104
Tabelle 15: Individuelle Basenabfolge (MIDs) der anwendungsspezifischen Primer.....	104
Tabelle 16: Die Entwicklung der Körpermaße.....	105
Tabelle 17: Energieaufnahme.....	105
Tabelle 18: Ergebnisse der statistischen Berechnungen zum Fressverhalten.....	105
Tabelle 19: Übersicht der Versuchsgruppen,.....	105

7.4. Geräte

7.4.1. Laborgeräte

Blutzuckermessgerät Ascensia ELITE XL	Bayer (Deutschland)
Eismaschine Scotsman AF 10	Scotsman (Deutschland)
Gefrierschrank (-80 °C)	Colora (Deutschland)
Gefriertruhen (-20 °C)	Bosch (Deutschland)
Guillotine Harvard Apparat	CO. Inc. Millis. Mass (USA)
Käfig Größe 3, Edelstahldeckel mit Klemmrahmenverschluss	EHRET Labor- und Pharmatechnik (Deutschland)
Käfig Größe 4, Edelstahldeckel mit Klemmrahmenverschluss	EHRET Labor- und Pharmatechnik (Deutschland)
Kühlschränke (2-8 °C)	Bosch (Deutschland)
Magnetrührer IKA-Combimag RCT	Janke & Kunkel GmbH & Co.KG (Deutschland)
pH-Meter WTW ph 531 WTW	Weilheim (Deutschland)
Plexiglas-Käfige (25 x 20 x 22 cm)	Werkstatt UKSH (Deutschland)
Rührfische	Bohlende, Lauda-Königshofen (Deutschland)

Schüttel-/Schwenkgerät REAX 2	Heidolph (Deutschland)
Stoppuhr	Junghans (Deutschland)
Vortex REAX 2000	Heidolph (Deutschland)
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc. (USA)

7.4.2. Waagen und Zentrifugen

Feinwaage BP 210 D	Sartorius (Deutschland)
Tierwaage	Sartorius (Deutschland)
Waage MC1 Laboratory LC220S	Sartorius (Deutschland)
Mikrozentrifuge Centrifuge 5430	Eppendorf AG (Deutschland)
Tischzentrifuge MIKRO 200R	Hettich Lab Technology (Deutschland)
Tischzentrifuge MIKRO 120R	Hettich Lab Technology (Deutschland)
Sprout Mini-Zentrifuge	Biozym
Allegra X-15R	Beckmann Coulter

7.4.3. Geräte zur Blutdruckmessung und indirekten Kalorimetrie

Blood pressure monitor 8002 dual	TSE Systems (Deutschland)
Piezoelemente	TSE Systems (Deutschland)
Registrierteil 130 T mit Thermopapier	Recomed (Deutschland)
Phenomaster Home Cage System	TSE Systems (Deutschland)

7.4.4. Geräte für RIA- und ELISA-Versuche

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

7.4.5. Geräte für DNA-Extraktion

Homogenisator, Precellys® 24	Bertin Technologies, CNIM Group (Frankreich)
IKA Vortex Genius 3	Sigma-Aldrich Co.(USA)

7.4.6. Geräte für PCR und Gelelektrophorese

DNA-/RNA UV-Reinigungsbox, UVC/T-AR	Biosan (Lettland)
-------------------------------------	-------------------

GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific GmbH (Waltham, MA, USA)
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
Gelkammer, bsb 11 Long Blu	Biotech service blu (bsb11) (Deutschland)
Kamm, 26 Zähne	Biotech service blu (bsb11) (Deutschland)
Gelträger	Biotech service blu (bsb11) (Deutschland)
QUANTUM ST4	Vilber Lourmat (Frankreich)

7.4.7. Geräte für Subpool-Quantifikation

Qubit-Flurometer Q32857	Thermo Fisher Scientific GmbH (USA)
-------------------------	-------------------------------------

7.4.8. Geräte für Ampurebead Purification der Library

Agencourt SPRIPlate Magnetic Plate	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)
------------------------------------	---------------------------------

7.4.9. Geräte für qPCR und Sequenzierung

7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific GmbH (Waltham, MA, USA)
Sequenzierautomat MiSeq	Illumina (San Diego, CA, USA)

7.5. Materialliste

7.5.1. Gebrauchsmaterialien

96-PCR-Platte, Halbrand flach	Sarstedt (Deutschland)
Alu-Klebefolie, durchstechbar	Sarstedt (Deutschland)
Baumwoll-Geschirrhandtücher	Wäscherei UKSH
Einmalspritzen Discardit™ II 1 ml und 2 ml	BD (Deutschland)
Filter tips, Biosphere (20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Sarstedt (Deutschland)
Filter tips 10, 100, 1000	Greiner bio one (Deutschland)
Glukoseteststreifen für Ascensia	Bayer (Deutschland)
Haltungsfutter für Ratten und Mäuse	Altromin (Deutschland)
Handschuhe, Nitra-Tex	Ansell (USA)
Kanülen BD Microlance™ 3 26Gx½" 0,45x13	BD (Deutschland)
Mikrovetten CB 300	Sarstedt (Deutschland)
PCR plate seal, adhesive	Sarstedt (Deutschland)
Pipette tips (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt (Deutschland)

Rasierklingen	Wilkinson Sword (Deutschland)
Reaction tube (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt (Deutschland)
Reaction tube, Biosphere, SafeSeal (0.5 ml, 1.5 ml)	Sarstedt (Deutschland)
Wägebapier	Neolab (Deutschland)
X-TRACTA Tips (6,5 x 1,0 mm)	Biozym Scientific (Deutschland)

7.5.2. Kits

Insulin-RIA; Cat. # RI-13K	Millipore (USA)
Mouse High-Sensitivity-T Cell Magnetic-Bead-Panel- Cat. # MHSTCMAG-70KPXBK	Millipore (USA)
Mouse Metabolic Magnetic Bead Panel Cat. # MMHMAG-44K	Millipore (USA)
Gel extraction kit, GeneJet; Cat. # K0692	Thermo Fisher Scientific (USA)
Glukagon-RIA; Cat. # GL-32K	Millipore (USA)
MiSeq reagent kit, V3; Cat. # MS-102-3003	Illumina (San Diego, CA, USA)
PerfeCta® NGS library quantification kit; Cat # 95154-500	Quanta Biosciences (Beverly, MA, USA)
PowerLyzer® PowerSoil® DNA Isolation Kit; Cat. # 12855-100	Mo Bio Laboratories Inc.(USA)
Quantikine® ELISA; Cat. # MOB00	R&D Systems, Inc (USA)
Qubit dsDNA HS assay kit; Cat # Q32854	Life technologies, Thermo Fisher Scientific

7.5.3. Erworbene Reagenzien, Substanzen und Lösungen

5x Phusion HF Buffer	Thermo Fisher Scientific (USA)
6x DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific (USA)
10 X TAE-Puffer	Invitrogen (Kanada)
2-Methylbutan	Sigma (Deutschland)
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH (Deutschland)
Custom 16s rRNA Primer Sequences	Metabion (Deutschland)
Di-Stickstoffoxid (in Flaschen)	Lokaler Gas-Lieferant
DNA-Polymerase, Phusion Hot Start II (2 U/µl)	Finnzymes, Thermo Fisher Scientific
DNA ladder, GeneRuler 100 bp plus	Thermo Fisher Scientific (USA)
dNTPs Mix, 10 mM each, 1 ml	Fermentas, Thermo Fisher Scientific (USA)
Ethanol 99,9 %	Carl Roth (Deutschland)

Flüssiger Stickstoff	Lokaler Gas-Lieferant
Insulin, human Insuman,	Sanofi-Aventis (Deutschland)
Kochsalz-Lösung 0,9 %; steril	Berlin-Chemie (Deutschland)
Microbiome sequencing 27F Primer	Metabion (Deutschland)
Microbiome sequencing 338R Primer	Metabion (Deutschland)
Microbiome index Primer	Metabion (Deutschland)
Leptin (Ratte) 97 %	R&D Systems (USA)
PBS Puffer	UKSH Campus Apotheke, Lübeck
PCR purification beads, Agencourt Ampure XP	Beckmann Coulter (Deutschland)
Pentobarbital-Na-Lösung (98 mg/1,8 ml)	UKSH Campus Apotheke, Lübeck
PhiX sequencing control V3	Illumina (San Diego, CA, USA)
qPCR MM, 2x TS Maxima SYBR green/rox	Thermo Fisher Scientific
RT-PCR Grade Water	Ambion by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific (USA)
Sybr Safe DNA Gel Stain, 1000x	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (USA)
Sauerstoff (in Flaschen)	Lokaler Gas-Lieferant
Telmisartan	Boehringer-Ingelheim (Deutschland)
Tris-Lösung (1 M; pH 7,4)	Invitrogen (Kanada)
Trockeneis	UKSH Campus Apotheke, Lübeck

7.5.4. Rezepturen von Lösungen

EDTA-Lösung pH 6-7	900 mg Na-EDTA ad 10 ml Aqua dest. NaOH zur pH-Wert-Einstellung
DEPC-Wasser	500 µl DEPC ad 500 ml Aqua dest. nach 24 h sterilisiert
TE-Puffer pH 7,4	1 M Tris-Puffer pH 7,4 20 µl 0,5M EDTA-Lösung pH 8 ad 10 ml DEPC-Wasser
Tris-Puffer pH 8	20 mM Tris ad Aqua injectabilia 5M NaOH zum Puffern
Dyeless loading dye	Tris 50 mM (pH 8.0), EDTA 40 mM Sucrose 40 % (w/v)

7.6. Software

Excel, Power Point, Word	Microsoft (USA)
--------------------------	-----------------

Mendeley Desktop Version 1.19.4

Elsevier (Niederlande)

Graph Pad Prism Version 8.0

GraphPad Software (USA)

Revolution R Open

Microsoft (USA)

MRlcro Chris Rorden,

PhD (USA)

Vitom for Windows

Adobe Illustrator

Adobe Systems (USA)

8. Danksagung

Mein Dank gilt dem Instituts-Direktor Herrn Prof. Dr. med. M. Schwaninger für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie an der Universität zu Lübeck.

In besonderem Maße bedanke ich mich herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Walter Raasch für das Thema der Dissertation und die Unterstützung während der Durchführung der Experimente. Bei Verzögerungen in den analytischen Verfahren zum Mikrobiom und dem Erstellen der Dissertationsschrift stand er mir stets motivierend zur Seite, wodurch er maßgeblich zum Gelingen meines Promotionsvorhabens beigetragen hat. Den offenen und respektvollen Umgang in unseren Gesprächen – in Corona-Zeiten via Zoom - habe ich stets sehr geschätzt.

Ich bedanke mich herzlich bei Frau Ines Stölting nicht nur für die Einarbeitung in die Labor- und Analysetechniken, wo sie mich als medizinisch-technische Assistentin bei der Durchführung der Experimente als höchst kompetente Fachperson angeleitet und unterstützt hat, sondern auch für die außerordentliche Betreuung und den freundschaftlichen Umgang. Auch Frau Dr. Martina Winkler danke ich für die zuverlässige und kompetente Unterstützung bei den Tierversuchen und der Auswertung. Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeitern, Doktoranden und Studenten des Instituts für Pharmakologie für die kollegiale Zusammenarbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Jörg Barkhausen und Herrn Prof. Dr. med. Florian Vogt aus der Klinik für Radiologie des UKSH in Lübeck für die Bereitstellung der MRT sowie den Mitarbeiterinnen für die Zusammenarbeit und Hilfe bei der Anfertigung der MRT-Aufnahmen.

Mein weiterer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Ewan Langan für seine Expertise und die Einarbeitung in das DNA-Extraktionsverfahren sowie darauffolgende PCR, ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. med. Johannes K.-M. Knobloch, der die Kooperation mit dem damaligen Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene ermöglicht und supervisiert hat.

Bei Herrn Dr. Axel Künstner bedanke ich mich herzlich nicht nur für die hohe Expertise bei der Bioinformatischen Auswertung der Sequenzierungsdaten, sondern insbesondere für seine freundliche Bereitschaft, die Statistik in ihrer Besonderheit einleuchtend zu erklären.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Saleh Ibrahim für die bereitwillige Aufnahme in seine AG des Lübecker Instituts für Experimentelle Dermatologie bedanken, als die Kooperation mit dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene nicht fortgeführt werden konnte. Insbesondere bedanke ich mich bei Miriam Freitag, die mich als medizinisch-technische Assistentin bei den weiteren Analyseschritten bis zum Next-Generation-Sequencing-Verfahren freundlich und fachkundig angeleitet und unterstützt hat.

Dem Institut für Anatomie danke ich für die Bereitstellung ihres MiSeq-Gerätes für die Sequenzierung der Darmmikrobiota sowie Frau M.Sc. Annika Sünderhauf bei der Unterstützung in der Durchführung.

Mein herzlichster Dank gilt meinem Mann, der mich auch in schwierigen Zeiten immer aufgemuntert und unterstützt hat. Außerdem bedanke ich mich bei meinen Eltern für ihre liebevolle Unterstützung von ganzem Herzen.

10. Publikationen

- 08/2021 *Originalarbeit*
- Beckmann, L., Künstler, A., Freschi, M. L., Huber, G., Stölting, I., Ibrahim, S. M., Hirose, M., Freitag, M., Langan, E. A., Matschl, U., Galuska, C. E., Fuchs, B., Knobloch, J., Busch, H., Raasch, W.
- „Telmisartan induces a specific gut microbiota signature which may mediate its anti-obese effect“
- Pharmacological Research, Volume 170, August 2021
- <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105724>
- 03/2017 *Posterpräsentation*
- im Rahmen des 84. Jahrestreffens der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) in Heidelberg: „The antiobese efficacy of AT1-receptor blockers is rather not related to a shift of the GUT microbiota“
- 12/2016 *Vortrag in der „Best of“-Session*
- im Rahmen des 40. Wissenschaftlichen Kongress der Deutschen Hochdruckliga e.V. (DHL) und Deutsche Gesellschaft für Hypertonie und Prävention: „Telmisartan treated rats still remained lean despite high calorie feeding while gut microbiota was similar to diet induced obese rats“
- 06/2015 *Posterpräsentation*
- im Rahmen der Veranstaltung „Uni im Dialog“ in der St.Petri Kirche, Lübeck: „Einfluss einer Bluthochdrucktherapie auf Darmflora und Übergewicht“

Auszeichnungen und Preise

Förderung durch das Stipendium „Exzellenzmedizin“ der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck von Oktober 2014 bis März 2015, Gesamtförderungshöhe 3000 €.

Erweiterung der Förderung durch das Stipendium „Exzellenzmedizin“ der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck von Oktober 2015 bis Januar 2016, Gesamtförderungshöhe 2000 €.

Assoziiertes Mitglied des DFG-Graduiertenkollegs 1957 „Adipocyte-Brain Crosstalk“

Annahme des Abstracts in der „Best-of“-Session inklusive Reisestipendium der Deutschen Hochdruckliga für die 40. Ligatagung in Berlin (2016).