

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

**Direktor: Prof. Dr. med. Markus Schwaninger**

---

**Über die ACE2/Ang(1-7)/Mas-Achsen-Abhängigkeit des  
Telmisartan-induzierten anti-atherosklerotischen Effekts**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

– Aus der Sektion Medizin –

vorgelegt von

Leonie Achner

aus Hamburg

Lübeck 2025

1. Berichterstatter\*in: Prof. Dr. rer. nat. Walter Raasch  
Ko-Betreuer\*in: Prof. Dr. rer. nat. Kristina Kusche-Vihrog  
2. Berichterstatter\*in: Prof. Dr. med. Joachim Weil  
Tag der mündlichen Prüfung: 19.05.2026  
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 20.05.2026  
- Promotionskommission der Sektion Medizin -

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung.....	1
1.1	Das Metabolische Syndrom (MetS).....	1
1.2	Atherosklerose.....	4
1.3	Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) .....	8
1.4	AT <sub>1</sub> -Rezeptor-Blocker (ARBs) in der Therapie von MetS und Atherosklerose...11	
1.5	Atherosklerose-Induktion in Tierversuchen .....	12
1.6	Rasterkraftmikroskopie (AFM)-basierter Nachweis einer endothelialen Dysfunktion im PCSK9 <sup>DY</sup> -AAV-Atherosklerosemodell .....	13
1.7	Fragestellung .....	17
2	Material und Methoden .....	19
2.1	In-vitro Versuchsreihe .....	19
2.1.1	Zellbiologische Methoden.....	19
2.1.2	Kultivierung der Zellen.....	19
2.1.3	Aussäen der Zellen .....	19
2.1.4	Versuchsreihe .....	20
2.2	Versuchstiere und Haltung.....	21
2.3	Studienprotokoll der in-vivo Studie.....	22
2.4	Invasive Methoden.....	24
2.4.1	Virusinjektion.....	24
2.4.2	Retroorbitale Blutentnahme und Blutzuckermessung .....	24
2.4.3	Orale Applikation von Telmisartan-Suspension und Vehikel-Lösung .....	25
2.4.4	Tötung und Organgewinnung .....	25
2.5	Bestimmung der Körperfettzusammensetzung.....	27
2.6	Rasterkraftmikroskopie .....	27
2.6.1	Präparation der Aorta .....	27
2.6.2	Durchführung der Rasterkraftmikroskopie .....	27
2.7	Histologische Untersuchung der Aorta .....	28
2.8	RNA-Sequenzierung .....	28
2.8.1	RNA-Sequenzierungsanalyse.....	28
2.9	Laborchemische Analysen .....	29
2.9.1	Konzentrationsbestimmung von Cholesterin- und Triglyzeriden .....	29
2.9.2	Konzentrationsbestimmung der Zytokine und Hormone .....	29
2.9.3	Konzentrationsbestimmung von Nitrit .....	30
2.10	Auswertung und Statistische Methoden .....	30
3	Ergebnisse.....	32

3.1	Ergebnisse der in-vitro Versuchsreihe.....	32
3.2	Ergebnisse der in-vivo Studie .....	32
3.2.1	Gewichtsentwicklung und Körperfettzusammensetzung.....	32
3.2.2	Hormonspiegel und Glukosehomöostase .....	35
3.2.3	Cholesterin- und Triglyzeridspiegel.....	38
3.2.4	Histologische Untersuchung der Aorta und funktionelle Parameter des Herz-Kreislaufsystems .....	38
3.2.5	Rasterkraftmikroskopie.....	41
3.2.6	RNA-Sequenzierung .....	44
3.2.7	Zytokine .....	47
4	Diskussion .....	49
4.1	Gewichtsentwicklung und Körperfettzusammensetzung.....	49
4.2	Hormonspiegel und Glukosehomöostase.....	50
4.3	Hypercholesterinämie- und Atherosklerose-Induktion .....	53
4.4	Nachweis einer endothelialen Dysfunktion mittels Rasterkraft-mikroskopie .....	55
4.5	RNA-Sequenzierung .....	59
4.6	Ausblick und Limitationen .....	61
5	Zusammenfassung .....	63
6	Literaturverzeichnis.....	64
7	Anlagen .....	79
7.1	Anhang .....	79
7.1.1	Vergleich der Auswertung der Rasterkraftmikroskopie durch zwei unabhängige Auswerter:innen .....	79
7.2	Abbildungsverzeichnis .....	80
7.3	Tabellenverzeichnis .....	81
7.4	Material- und Geräteverzeichnis .....	82
7.4.1	Substanzen und Lösungen.....	82
7.4.2	Verbrauchsmaterialien.....	83
7.4.3	Geräte .....	83
7.4.4	Software.....	84
8	Danksagungen.....	85
9	Veröffentlichungen .....	87

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent, Teile von Hundert
®	Eingetragene Waren- oder Dienstleistungsmarke; „registered trade mark“
™	Trademark Zeichen
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
AAV	Adeno Associated Virus
Abb.	Abbildung
Abcg1	ATP-binding Cassette Sub-family G, Member 1
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
ACE2	Angiotensin-Converting-Enzyme 2
ACE2 ko	Angiotensin-Converting-Enzyme 2 Knockout
ACEi	Angiotensin-Converting-Enzyme-Inhibitor
Acta1	Aktin, Alpha 1, Skelettmuskel
Actn3	Alpha-Actinin-3
AFM	Atomic Force Microscopy, Rasterkraftmikroskopie
Alp2a1	Adaptor-related protein complex 2, alpha 1
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
Ang(1-7)	Angiotensin(1-7)
ApoB	Apolipoprotein B
ApoE	Apolipoprotein E
ARB	AT <sub>1</sub> -Rezeptor-Blocker
AT <sub>1</sub> R	Typ-1-Angiotensin-II-Rezeptor
AT <sub>2</sub> R	Typ-2-Angiotensin-II-Rezeptor
BCA	Body Composition Analysis, Messung der Körperfettzusammensetzung
BMI	Body-Mass-Index
BZ	Blutzucker
bzw.	beziehungsweise
C57/B6 N	genetischer Hintergrund/Stamm der Versuchstiere
ca.	circa
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
Ceacam18	CEA Cell Adhesion Molecule 18
Cgref1	Cell Growth Regulator With EF-Hand Domain 1
chow	Kontroll-/ Standard-Diät
Chp2	Calcineurin Like EF-Hand Protein 2
Ckm	Creatine kinase, muscle
Cl	Chlorid
Clrn3	Clarin 3
cm	Zentimeter
C-Peptid	Connecting Peptide
d	Tag
d.h.	das heißt
DEGS	Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland
dl	Deziliter
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMT2	Diabetes mellitus Typ 2
Duoxa1	Dual Oxidase Maturation Factor 1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Efcab8	EF-Hand Calcium Binding Domain 8
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ESC	European Society of Cardiology
et al.	„et alii, et aliae“, und andere
Fam20c	Familie mit Sequenzähnlichkeit 20, Mitglied C
FDR	False Discovery Rate
g	Gramm
G	Gauge
GIP	Glukoseabhängiges insulinotropes Peptid

GLP-1	Glukagon-ähnliches Peptid 1
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
Gm5627	Mus musculus gene
Gm9696	Arylacetamide deacetylase-like 2 pseudogene
h	Stunde
Hdac11	Histon-Deacetylase 11
HDL	High Density Lipoprotein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hid1	HID1 Domain Containing
HOMA index	Homeostasis Model Assessment Index
Hsd17b6	17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 6
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
i.v.	intravenös
IDF	International Diabetes Federation
Ighv1-77	Immunoglobulin Heavy Variable 1-77
Igkv12-98	Immunoglobulin Kappa Variable 12-98
IL-1 $\alpha$	Interleukin 1 $\alpha$
IL-6	Interleukin 6
IL-10	Interleukin 10
IL-12p70	Interleukin 12p70
INF- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
KC	Keratinocyte Chemoattractant
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHK	koronare Herzkrankheit
kJ	Kilojoule
ko	Knockout
l	Liter
Lct	Laktase
Lctl	Lactase-like
LDL	Low Density Lipoprotein
LDL-R	LDL-Rezeptor
LIX	Lipopolysaccharide-induced CXC Chemokine
LVES	Large Vessel Endothelial Supplement
m	Meter
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
Mas ko	Mas-Rezeptor Knockout
Mas	Mas-Rezeptor
MCP1/CCL2	Monocyte Chemoattractant Protein-1/ Chemokine (C-C motif) Ligand 2
MEM	„minimal essential medium“
Mep1b	Meprin A, beta
MetS	Metabolisches Syndrom
mg	Milligramm
MgCl2-6-hydrat	Magnesiumchlorid Hexahydrat
min	Minute
mind.	Mindestens
MIP2	Macrophage inflammatory protein-2
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
Mmp12	Matrix-Metalloproteinase 12
Muc3	Mucin 3
Myh1	Myosin, heavy chain 1
Myh4	Myosin, heavy chain 4
n	Anzahl der Stichproben
N	Newton
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NEP	Neutrale Endopeptidase

NF-κB	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NIH	National Institutes for Health
nm	Nanometer
Nnat	Neuronatin
NO	Stickstoffmonoxid
Npc1l1	Niemann-Pick C1-artiges Protein 1
Npr3	Natriuretic Peptide Receptor 3
ORO	Oil Red-O
oxLDL	oxidiertes Low-Density-Lipoprotein
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCA	Principal component analyses, Hauptkomponentenanalyse
pg	Pikogramm
PBS <sup>-/-</sup>	Phosphate Buffered Saline ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>
PCSK9	Proteinkonvertase Subtilisin/Kexin Typ 9
PCSK9 <sup>DY</sup> -AAV	Proteinkonvertase Subtilisin/Kexin Typ 9 - Adeno Associated Virus
PEP	Prolylendopeptidase
pH	Potentia Hydrogenii
pN	Pikoneutron
PP	Pankreatisches Polypeptid
PPAR-γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ
Prss32	Serin-Protease 32
PSI	Positron Sensitive Detector
Pvalb	Parvalbumin
PYY	Peptid YY
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Rb1	Retinoblastom-Protein
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RNAseq	RNA Sequenzierung
ROS	Reactive Sauerstoffspezies
rpm	Revolutions per Minute
s	Sekunde
SD	Standardabweichung (Statistik)
Serpina3j	Serine-type Endopeptidase Inhibitor a
SGLT2	Sodium-Glucose Linked Transporter 2
Slc5a7	Cholin-Transporter 1
Spink1	Serinprotease-Inhibitor Kazal Typ 1
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TEL	Telmisartan
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
Tnnt3	Troponin T3
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Protein 1
VEH	Vehikel
vgl.	vergleiche
vs.	versus, gegen(über)
WD	Western Diät
WHO	Welt-Gesundheits-Organisation
wt	Wildtyp
x	mal
z.B.	zum Beispiel

# 1 Einleitung und Fragestellung

## 1.1 Das Metabolische Syndrom (MetS)

Im Rahmen der medizinischen Forschung besteht ein zentrales Ziel darin, Risikofaktoren für bestimmte Erkrankungen zu identifizieren, um gezielte Präventions- und Therapiemaßnahmen einleiten zu können. Hierbei wurden insbesondere für die Entwicklung von u.a. kardiovaskulären Erkrankungen metabolische Veränderungen als Risikofaktoren aufgezeigt. Treten mehrere dieser Veränderungen bei einer Person auf, so wird vom Metabolischen Syndrom (MetS) gesprochen [1, 2]. Bereits 1988 beschrieb Reaven einen Zusammenhang zwischen Insulinresistenz, Bluthochdruck, veränderter Blutfettwerte und der koronaren Herzkrankheit (KHK) und bezeichnete diesen Symptomkomplex als Syndrom X [3]. In den folgenden Jahren wurden verschiedene Versuche unternommen, eine allgemeingültige Definition des MetS festzulegen [4, 5]. Im Jahr 2005 gab schließlich die International Diabetes Federation (IDF) einen Bericht heraus, in dem Diagnosekriterien für das MetS definiert wurden (Tab. 1) [6].

**Tab. 1: Definition des Metabolischen Syndroms**  
nach der International Diabetes Federation 2005

Kriterien für das Bestehen eines Metabolischen Syndroms:

<b>stammbetonte Adipositas</b>	erhöhter Taillenumfang ( $\geq 80$ cm bei Frauen bzw. $\geq 94$ cm bei Männern) oder BMI $> 30$ kg/m <sup>2</sup>
--------------------------------	---

plus zwei der vier folgenden Faktoren:

<b>erhöhte Triglyzeride</b>	$\geq 150$ mg/dL (1.7 mmol/L) oder eine entsprechende Therapie
-----------------------------	--

<b>erniedrigtes HDL</b>	$< 40$ mg/dL (1.03 mmol/L) bei Männern bzw. $< 50$ mg/dL (1.29 mmol/L) bei Frauen oder eine entsprechende Therapie
-------------------------	--

<b>erhöhter Blutdruck</b>	systolisch $\geq 130$ mmHg oder diastolisch $\geq 85$ mmHg oder eine entsprechende Therapie
---------------------------	---

<b>erhöhte Nüchternplasmaglukose</b>	$\geq 100$ mg/dL (5.6 mmol/L) oder ein zuvor diagnostizierter DMT2
--------------------------------------	--

In einer Veröffentlichung des Ärzteblatts von 2008 wurden Daten aus 1511 hausärztlichen Praxen aus dem Jahr 2005 auf die Prävalenz des MetS in der

Altersgruppe von 18 bis 99 hin untersucht. Dabei zeigte sich ein Unterschied zwischen West- und Ostdeutschland. Während die Prävalenz für das MetS in Westdeutschland bei 17,7% der Frauen und 21,4% der Männer lag, zeigten sich in Ostdeutschland Werte von 21,1% für die weibliche und 22,7% für die männliche Bevölkerung [7]. Für diese Untersuchungen wurden Diagnosekriterien verwendet, die leicht von den oben aufgelisteten abweichen. Trotz dessen wird durch die beschriebenen Daten die Relevanz des MetS für die medizinische Forschung deutlich.

Das Hauptdiagnosekriterium des MetS ist somit die Adipositas. Bei der Adipositas besteht eine Vermehrung des Fettgewebes über das normale Maß hinaus. Die Diagnose und Einteilung erfolgt mittels des Body-Mass-Index (BMI), der aus dem Verhältnis des Körpergewichts (KG) in Kilogramm (kg) zum Quadrat der Körpergröße in Meter (m) berechnet wird. Ab einem BMI von  $25 \text{ kg/m}^2$  besteht ein Übergewicht und ab einem BMI von  $30 \text{ kg/m}^2$  wird von einer Adipositas gesprochen [8, 9]. Der Anteil an übergewichtigen und adipösen Menschen weltweit hat in den letzten Jahrzehnten deutlich zugenommen [10, 11]. In Deutschland waren laut der „Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland“ (DEGS) des Robert-Koch-Instituts (RKI) 67,1% der Männer und 53% der Frauen in der Altersgruppe von 18- bis 79-jährigen Menschen übergewichtig, adipös waren 23,3% der Männer und 23,9% der Frauen in derselben Altersgruppe [12].

Als Ursache für die Adipositas scheinen verschiedene Faktoren eine Rolle zu spielen [13]. Der wohl bekannteste Einflussfaktor auf das Körpergewicht ist das Missverhältnis von Energiezufuhr und Energieverbrauch. So stellt ein Lebensstil, der durch Zufuhr von kalorienreicher Nahrung gepaart mit wenig körperlicher Aktivität geprägt ist, einen Risikofaktor für die Entwicklung einer Adipositas dar [13-15]. Neben dem beschriebenen Lebensstil zählen genetische Disposition, sozioökonomische und kulturelle Unterschiede sowie Essstörungen ebenfalls zu den Einflussfaktoren in der Entstehung der Adipositas [13, 16-19].

In den letzten zwei Jahrzehnten ist das Fettgewebe immer mehr ins Zentrum der Erforschung des Stoffwechsels und der damit verbundenen Erkrankungen gerückt. So konnte gezeigt werden, dass die Adipozyten des Fettgewebes durch Produktion verschiedener Hormone und Signalmoleküle, die als Adipokine bezeichnet werden, einen Einfluss auf den Metabolismus haben [20, 21]. Ein entscheidendes Adipokin

ist das Leptin. Leptin kann unter anderem die Blut-Hirnschranke überwinden und im Hypothalamus seine appetitzügelnde Wirkung vermitteln und wird daher oft als „Sättigungshormon“ bezeichnet und führt zu einer verringerten Nahrungsaufnahme und einem erhöhten Energieverbrauch [21, 22]. Es besteht daher eine Art Feedbackbogen: Bei niedrigerem Körpergewicht ist der Leptinspiegel geringer und der Appetit und die Nahrungsaufnahme werden gesteigert, bei erhöhtem Körpergewicht bzw. erhöhter Fettmasse ist die Leptinkonzentration entsprechend erhöht und das Adipokin entfaltet seine Wirkung [20, 23]. Bei adipösen Individuen kommt es allerdings zu einer Störung dieses Feedbackmechanismus, der auch als Leptinresistenz bezeichnet wird. Die Leptinspiegel sind im Rahmen der Adipositas zwar erhöht, das Leptin entfaltet aber nicht mehr seine anorektische Wirkung [23, 24], damit spielt die Leptinresistenz eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Adipositas.

Der Begriff „Adipositas“ umfasst unterschiedliche Phänotypen, die sich in verschiedene Gruppen unterteilen lassen. Besonders eine Unterteilung hat sich in der Vergangenheit durchgesetzt. Dabei wird unterschieden, ob die Vermehrung des Fettgewebes vor allem subkutan oder eher stammbetont – also viszeral – zu finden ist [25]. Diese Unterscheidung ist von Bedeutung, da Studien vor allem für die viszerale Adipositas ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und das MetS beschrieben haben, weshalb in der Definition des MetS der IDF die „stammbetonte“ Adipositas als Diagnosekriterium genutzt wird (Tab. 1) [26, 27]. Aus diesem Grund werden im klinischen Alltag zusätzlich zum BMI weitere Parameter bestimmt, die über die Verteilung des Fettgewebes und das metabolische Risiko Aufschluss geben, wie beispielsweise der Taillenumfang [28-30].

Ein weiterer wichtiger Mechanismus in der Pathogenese des MetS und des Diabetes mellitus Typ 2 (DMT2) besteht in der Ausbildung einer sogenannten Insulinresistenz. Hierbei kann das von den Beta-Zellen des Pankreas sezernierte Insulin nicht oder nur noch in Teilen seine Wirkung in der Peripherie entfalten [31, 32]. Im physiologischen Zustand wird Insulin als Reaktion auf eine Erhöhung des Blutzuckerspiegels ausgeschüttet [33]. Zusätzlich beeinflussen sogenannte Inkretine, wie das Glukagon-ähnliche Peptid 1 (GLP-1) und das glukoseabhängige insulinotrope Peptid (GIP), die von Zellen im Darm sezerniert werden, die Freisetzung von Insulin und dienen damit auch als pharmakologische

Angriffspunkte in der Therapie des DMT2 [34]. Das sezernierte Insulin führt dann unter anderem zu einer Glukoseaufnahme in Muskel-, Leber- und Fettzellen, einer verminderten Gluconeogenese in der Leber sowie einer reduzierten Lipolyse [33, 35]. Im Rahmen des Übergewichts und des MetS führen schließlich unterschiedliche Mechanismen zur o.g. Insulinresistenz. Das überschüssige – insbesondere viszerale – Fettgewebe sezerniert inflammatorische Adipokine und freie Fettsäuren, die aufgrund einer konsekutiven entzündlichen Reaktion die Insulinwirkung stören [36, 37]. Ebenso führen eine mitochondriale Dysfunktion, vermehrter oxidativer Stress und eine verminderte Freisetzung von Adiponektin, einem weiteren Adipokin, zu einer gestörten Vermittlung der Insulinwirkkaskade [36, 38]. Damit zieht die Insulinausschüttung keine adäquate Regulation des Blutzuckerspiegels nach sich und weitere metabolische Veränderungen, die das MetS definieren, werden begünstigt.

Diverse Studien konnten zeigen, dass bei Menschen, die die typischen Kriterien eines MetS erfüllen, ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko sowie ein erhöhtes Risiko für einen DMT2 bestehen [39-43]. Außerdem konnte ein insgesamt höheres Mortalitätsrisiko für diesen Personenkreis aufgezeigt werden [44, 45]. Die Frage nach einer sinnvollen Behandlung und Prävention des MetS ist daher von großer Bedeutung. Hierbei steht eine Therapie bzw. ein Vorbeugen der einzelnen Komponenten im Mittelpunkt. In der Behandlung der Adipositas gilt als Grundlage der Gewichtsreduktion die Kombination aus Ernährungs-, Bewegungs- und Verhaltenstherapie. Insbesondere sollte in der genauen Umsetzung auf die individuellen Bedürfnisse der einzelnen Patient:innen eingegangen werden [46]. Zusätzlich können in Berücksichtigung der vorliegenden Komorbiditäten medikamentöse Therapieansätze durchgeführt werden und es besteht die Möglichkeit bariatrischer Operationsverfahren [46].

Auf die Therapie von Dyslipidämien, arterieller Hypertension und DMT2 wird im folgenden Abschnitt zur Atherosklerose näher eingegangen.

## **1.2 Atherosklerose**

Die Atherosklerose ist eine Erkrankung des arteriellen Gefäßsystems, die diverse kardiovaskuläre Komplikationen zur Folge haben kann [47]. Kardiovaskuläre Erkrankungen sind sowohl weltweit als auch in Deutschland die führende

Todesursache und damit von großer Relevanz für die medizinische Forschung [48, 49].

In der Pathogenese der Atherosklerose nehmen das Low Density Lipoprotein (LDL) und andere Apolipoprotein B (ApoB) und Apolipoprotein E (ApoE) enthaltene Lipoproteine eine zentrale Rolle ein [50]. LDL bindet an extrazelluläre Matrix-Moleküle, vor allem Proteoglykane, und akkumuliert so in der Intima der Blutgefäße [51, 52]. Durch oxidative Prozesse wird das akkumulierte LDL verändert und durch, aus Monozyten differenzierte, Makrophagen über Scavenger-Rezeptoren, die sich auf der Oberfläche dieser Zellen befinden, aufgenommen [53]. Die Anzahl der Scavenger-Rezeptoren wird nicht durch die Akkumulation von LDL-Cholesterin in den Zellen herunterreguliert, sodass es zu einer Überladung der Makrophagen mit Cholesterin-Estern kommt und die sogenannten Schaumzellen entstehen [47, 54]. Durch diese Vorgänge kommt es zu einer Aktivierung des Immunsystem und daraus resultierenden Entzündungsreaktion mit der Freisetzung verschiedener inflammatorischer Zytokine und Rekrutierung unterschiedlicher Immunzellen [55-57]. Im physiologischen Zustand nimmt das Endothel Einfluss auf das Gleichgewicht von pro- und anti-thrombotischen Vorgängen und den Vasotonus der Blutgefäße durch die Produktion verschiedener Mediatoren [58], wie beispielsweise dem anti-thrombotischem Prostacyclin [59]. Ebenso wird Stickstoffmonoxid (NO) durch die endothelialen Zellen produziert. Es hat einen vasodilatativen Effekt sowie ebenfalls anti-thrombotische Eigenschaften [60, 61]. Im Rahmen der Atherosklerose kommt es zu Störungen unter anderem dieser Funktionen des Endothels, was oft als endotheliale Dysfunktion bezeichnet wird und ebenfalls die Entstehung und Progression der Atherosklerose begünstigt.

Ein weiterer Mechanismus, der zur Entstehung und Erweiterung der atherosklerotischen Plaques beiträgt, ist das Einwandern von extrazelluläre Matrix produzierenden glatten Muskelzellen aus der Gefäßmedia in die Intima [62]. Im Mausmodell und in in-vitro Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich diese Zellen im Rahmen der Atherosklerose vermehren, ihre Eigenschaften verändern können und eine wichtige Rolle in der Ausbildung atherosklerotischer Plaques zu haben scheinen [63, 64].

Hat sich durch die oben beschriebenen Vorgänge eine atherosklerotische Plaque gebildet, so kommt es im Verlauf der Erkrankung zur Apoptose der akkumulierten

Zellen in der Intima. Aufgrund von fehlender Efferozytose – also einer nicht suffizienten Entfernung der apoptotischen Zellen – bildet sich über die Zeit ein nekrotischer Kern der atherosklerotischen Plaque [65-67]. Ab einer gewissen Größe kann die atherosklerotische Plaque außerdem das Gefäßlumen komprimieren und so, vor allem in Situationen mit erhöhtem Sauerstoffbedarf, zu einer Minderperfusion des Gewebes führen [47]. Eine weitere wichtige Spätfolge der Atherosklerose ist die sogenannte Plaqueruptur. Dabei kommt es zum Einreißen der fibrösen Kappe der atherosklerotischen Plaque und einer daraus resultierender Thrombusbildung. Die Plaqueruptur stellt eine der wichtigsten Auslöser von akuten thrombotischen Ereignissen dar [68, 69].

Atherosklerose kann in unterschiedlichsten Regionen des Körpers auftreten und kann im Krankheitsverlauf somit verschiedenste Symptome auslösen, wobei die Erkrankung meist in ihrer langen Anfangsphase asymptomatisch bleibt [47, 70]. Aus diesem Grund ist die frühzeitige Diagnosestellung eine Herausforderung, die es zu bewältigen gilt. Dazu ist die Kenntnis von Risikofaktoren von großer Bedeutung und für die Entstehung der Atherosklerose ist eine Reihe dieser bekannt. Zu den Risikofaktoren gehören vor allem das Tabakrauchen, Adipositas, veränderte Blutfettwerte (erhöhtes LDL/non-HDL, erniedrigtes HDL), arterieller Hypertonus, höheres Lebensalter und Diabetes mellitus. Ebenfalls als Einflussfaktoren gelten genetische Disposition, männliches Geschlecht, ein niedriger sozioökonomischer Status, vermehrter Stress, chronische Nierenerkrankung, chronische Entzündungen (z.B. Rheumatoide Arthritis), Obstruktives Schlafapnoesyndrom und viele weitere [71]. Um die Masse an Risikofaktoren besser überblicken zu können, gibt es Algorithmen zur Berechnung des individuellen kardiovaskulären Risikos einzelner Personen, die in der klinischen Praxis Anwendung finden, um frühzeitig gefährdete Personen zu erkennen und präventiv bzw. therapeutisch tätig zu werden [71, 72]. Zusätzlich gibt es unterschiedliche bildgebende Verfahren, die ggf. im Atherosklerose-Screening genutzt werden können, wobei ihr Einsatz immer sorgfältig abgewogen werden sollte [71].

Der wichtigste Ansatzpunkt, um ein Entstehen bzw. ein Fortschreiten der Atherosklerose zu verhindern, besteht in der Reduktion der Risikofaktoren. Um dies erfolgreich zu erreichen, ist eine gute Kommunikation und Zusammenarbeit zwischen Patient:in und Behandler:in notwendig und medizinisches Fachpersonal

sollte gesteigerten Wert darauf legen, die Motivation und Compliance bei ihren Patient:innen zu fördern [71, 73]. Der erste Schritt zur Risikoreduktion sollte die Implementierung eines gesunden Lebensstils, der körperliche Betätigung, eine ausgewogene Ernährung sowie eine Nikotinkarenz beinhaltet, sein [74-77]. Ein weiterer essenzieller Teil der Behandlung von Menschen mit Atherosklerose bzw. einem hohen Risiko für Atherosklerose besteht in der medikamentösen Therapie. Zunächst soll auf die lipidsenkende Therapie eingegangen werden:

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass die Senkung von LDL-Cholesterin wirksam in der Prävention von kardiovaskulären Ereignissen, wie beispielsweise Herzinfarkten, ist [78]. In den Leitlinien der European Society of Cardiology (ESC) gibt es genaue Richtlinien für Ärzt:innen, wie stark das LDL-Cholesterin bei unterschiedlichen Risikogruppen gesenkt werden sollte [71, 78]. In den meisten Fällen wird zunächst eine lipidsenkende Therapie mittels Statinen, die das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Cholesterin Synthese – die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase – hemmen, eingeleitet. Diese Medikamentengruppe hat eine gute Wirksamkeit gepaart mit einem geringen Einnahmerisiko, wenn der Therapieerfolg und mögliche Nebenwirkungen entsprechend kontrolliert werden [79]. Wird durch Statine nicht die gewünschte Reduktion des LDL-Cholesterins erreicht oder wird die Therapie mit Statinen nicht vertragen, so stehen Ezetimib oder Proproteinkonvertase Subtilisin/Kexin Typ 9 (PCSK9)-Inhibitoren als weitere Wirkstoffe in Kombination mit Statinen oder als Monotherapie zur Verfügung. [71, 80-82].

Ein weiterer Risikofaktor für die Entwicklung einer Atherosklerose, der medikamentös behandelt werden kann, ist der arterielle Hypertonus. Auch hier sei auf die Leitlinie hingewiesen, die genaue Vorgaben zur Therapieinitiation und Therapiezielen verschiedener Risiko- und Altersgruppen vorhält [71]. In der Regel sollte die initiale Medikation aus einer Kombination eines Angiotensin-Converting-Enzyme-Inhibitors (ACEi) oder eines AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blockers (ARB) mit einem Kalziumkanal-Blocker oder einem Diuretikum bestehen [71, 83-87]. Eine Eskalation der initialen Therapie kann mittels einer Dreifachkombination aus ACEi oder ARB mit Kalziumkanalblocker und einem Diuretikum erfolgen [88, 89]. Sollte auch eine Dreifachkombination nicht den gewünschten Effekt bringen, so kann Spironolacton

oder ein anderer weiterer Wirkstoff hinzugefügt werden. In bestimmten Fällen kann außerdem eine Gabe von Betablockern indiziert sein [71].

Der DMT2 stellt, wie oben beschrieben, ebenfalls einen kardiovaskulären Risikofaktor dar und für die Therapie stehen bei Versagen einer ausreichenden Krankheitskontrolle durch Lebensstilveränderungen eine Reihe an Wirkstoffen zur Verfügung. Vor allem Natrium-Glucose Linked Transporter 2 (SGLT2)-Inhibitoren und GLP-1-Analoga sind in den vergangenen Jahren ins Zentrum der Aufmerksamkeit gerückt, da in Studien eine präventive Wirkung auf das kardiovaskuläre System, vor allem bei bereits vorbestehender atherosklerotischer kardiovaskulärer Erkrankung, aufgezeigt werden konnte [90, 91]. Ebenso kommen Medikamente aus dieser Wirkstoffgruppe bei Patient:innen, bei denen eine Gewichtsreduktion als Therapieziel festgelegt wurde, zum Einsatz [46]. Für viele Patient:innen mit DMT2 gilt nach wie vor das Medikament Metformin als Mittel der Wahl, wobei sich durch die beschriebenen Forschungsergebnisse Änderungen in klinischen Leitlinien ergeben haben. So besteht die Empfehlung für Patient:innen mit bereits diagnostizierter atherosklerotischer kardiovaskulärer Erkrankung und solche mit einem besonders hohem kardiovaskulären Risiko anstelle von Metformin initial mit einem SGLT2-Inhibitor oder einem GLP1-Analogen zu behandeln [71, 92]. Als letzter Teil der medikamentösen Therapie der Atherosklerose sei noch die antithrombotische Therapie zu erwähnen, wobei diese vor allem auf die sekundäre Prävention nach kardiovaskulären Ereignissen beschränkt ist und hier nicht im Detail beleuchtet werden soll [71].

### **1.3 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)**

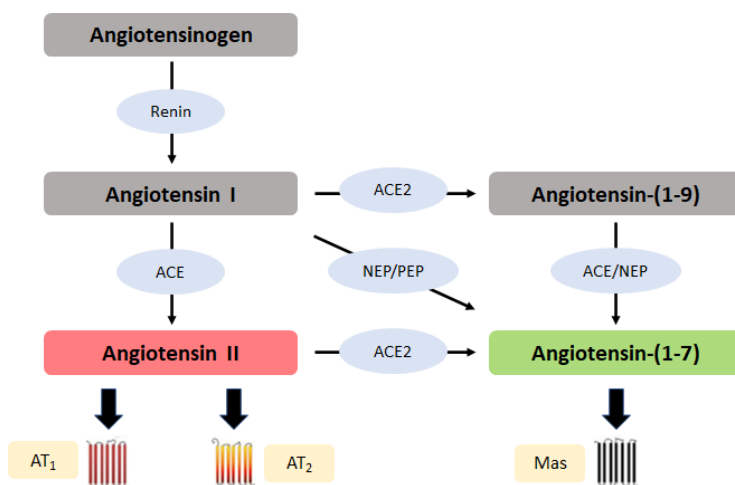
Aufgrund der großen Bedeutung für diese Arbeit, wird im Folgenden ein kurzer Überblick über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) (Abb. 1) gegeben. Angiotensinogen wird durch die Protease Renin zu Angiotensin I (Ang I) gespalten, welches wiederum durch das Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) in Angiotensin II (Ang II) umgewandelt wird, das mannigfaltige Wirkungen über seine Rezeptoren entfaltet [93]. Das RAAS findet sich nicht nur – wie zunächst angenommen – in der Zirkulation, sondern auch in vielen unterschiedlichen Organen oder Organsystemen des Körpers, dort wird es oft als lokales RAAS bezeichnet [94, 95]. Die G-Protein-gekoppelten Angiotensin-II-Rezeptoren werden

in Typ-1- und Typ-2-Angiotensin-II-Rezeptoren (AT<sub>1</sub>R und AT<sub>2</sub>R) unterschieden, wobei bei Nagern noch eine Subklassifizierung in Typ-1<sub>a</sub> und Typ-1<sub>b</sub> erfolgt [96].

Die wohl bekannteste Wirkung von Ang II, die über den AT<sub>1</sub>R vermittelt wird, ist die Erhöhung des Blutdrucks, die unter anderem durch Retention von Natrium in der Niere, einer vermehrten Ausschüttung von Aldosteron aus der Nebenniere, ADH-Ausschüttung, Sympathikus-Aktivierung und durch eine konstriktive Wirkung auf Blutgefäße verursacht wird [94, 96-98]. In der Pathogenese der Adipositas und des MetS scheint Ang II zusätzlich zur hypertensiven Wirkung von weiterer Bedeutung zu sein. Denn auch im Fettgewebe findet sich ein lokales RAAS in dem Sinne, dass sowohl die Hauptmetaboliten des Systems im Fettgewebe exprimiert werden als auch die entsprechenden Rezeptoren vorhanden sind. Es konnte zudem eine Hochregulation des lokalen RAAS des Fettgewebes in adipösen Individuen und Nagern beobachtet werden [99-102]. In Mausmodellen konnte ebenso gezeigt werden, dass ein genetischer Knockout (ko) von AT<sub>1</sub>R oder AT<sub>2</sub>R die Entstehung einer diätbedingten Adipositas verhindern konnte [103, 104]. Außerdem scheint Ang II Einfluss auf die für DMT2 und das MetS typische Insulinresistenz zu nehmen und diese zu verstärken [105-107]. Neben der hypertensiven Wirkung von Ang II, die wie in Abschnitt 1.2 beschrieben als Risikofaktor für eine Atherosklerose gilt, konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von AT<sub>1</sub>R zu einer oxidativen Belastung der Gefäße durch Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), zu einer Ausschüttung inflammatorischer Zytokine, zu einer verminderten protektiven Wirkung von NO, zu einer vermehrten Aufnahme von oxidiertem LDL (oxLDL) in die Endothelzellen sowie zu proliferativen Prozessen innerhalb der Gefäßwand führt. All diese Mechanismen tragen zu einer Entstehung und/oder einer Aggravation einer Atherosklerose bei [95, 108-110].

Die meisten der oben genannten Wirkungen von Ang II, die von Bedeutung für diese Arbeit sind, werden also über den AT<sub>1</sub>R vermittelt. Der AT<sub>2</sub>R spielt vorrangig in der fetalen Entwicklung eine Rolle. Allerdings kann eine Aktivität in einigen Geweben des erwachsenen Menschen und in pathophysiologischen Zuständen beobachtet werden. Dort führt die Aktivierung der AT<sub>2</sub>R zumeist – vor allem im in dieser Arbeit relevanten kardiovaskulären System – zu einer Wirkung, die als gegensätzlich zu der der AT<sub>1</sub>R beschrieben werden kann [93, 96, 111-113].

Neben der klassischen Hauptachse des RAAS von Angiotensinogen über Ang I zu Ang II und der Bindung an die AT<sub>1</sub>R und AT<sub>2</sub>R sind zudem alternative Achsen des RAAS beschrieben worden [93, 97]. Eine umfängliche Darstellung aller Teile des RAAS würde im Kontext dieser Arbeit zu weit führen, weshalb sich im Folgenden auf die Beschreibung der in Abb. 1 dargestellte ACE2/Ang(1-7)/Mas-Achse beschränkt werden soll. Allerdings soll zusammenfassend erwähnt sein, dass die traditionelle Ansicht, dass ausschließlich dem Ang II biologische Funktion zugeschrieben werden, in der Zwischenzeit überholt ist, da für viele weitere Angiotensine und Angiotensin-Rezeptoren biologische Effekte beschrieben wurden und diese dadurch auch in das Zentrum von Arzneistoffentwicklungen gelangt sind.



**Abb. 1: Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System**

Abb. erstellt nach Santos et al. 2014 und Huber et al. 2017. Vereinfachte Darstellung des für diese Arbeit relevanten Teils des RAAS; Dünne schwarze Pfeile beschreiben den Syntheseweg des folgenden Metaboliten inkl. des an der Synthese beteiligten Enzyms (hellblaue Ovale); Dicke schwarze Pfeile beschreiben Ligand-Rezeptor-Bindungen.

ACE: Angiotensin-Converting-Enzyme; ACE2: Angiotensin-Converting-Enzyme 2; AT1: Typ-1-Angiotensin-Rezeptor; AT2: Typ-2-Angiotensin-Rezeptor; Mas: Mas-Rezeptor; NEP: Neutrale Endopeptidase; PEP: Prolylendopeptidase

Wie in Abb. 1 abgebildet kann der Metabolit Angiotensin(1-7) (Ang(1-7)) durch unterschiedliche enzymatische Spaltungen sowohl aus Ang I als auch aus Ang II entstehen, wobei die Generierung von Ang(1-7) aus Ang II mittels des Angiotensin-Converting-Enzymes 2 (ACE2) den Hauptsyntheseweg darstellt [114]. Das entstehende Ang(1-7) bindet an den Mas-Rezeptor (Mas), der ebenso wie die Ang II-Rezeptoren ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor ist [115]. Ang(1-7) entfaltet ebenso wie Ang II vielfältige Wirkungen im Körper, wobei die ACE2/Ang(1-7)/Mas-Achse oft als Gegenspieler der ACE/Ang II/AT<sub>1</sub>R-Achse gewertet wird [116]. So hat

Ang(1-7) unter anderem vasodilatative, anti-proliferative und anti-thrombotische Wirkungen auf das Gefäßsystem und hat damit eine potenziell anti-atherosklerotische Potenz [116-122]. Auch das MetS betreffend hat die ACE2/Ang(1-7)/Mas-Achse protektive Auswirkungen auf den Metabolismus. Sowohl Übergewicht, Lipidmetabolismus als auch Insulinresistenz bzw. DMT2 können durch Aktivierung dieser RAAS-Achse positiv beeinflusst werden [123-128].

#### **1.4 AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blocker (ARBs) in der Therapie von MetS und Atherosklerose**

ARBs stellen eine Gruppe an Wirkstoffen dar, die in der Therapie des arteriellen Hypertonus und der Herzinsuffizienz eingesetzt werden [71]. Arterieller Hypertonus gilt wie in Abschnitt 1.2 beschrieben als einer der Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung einer Atherosklerose, weshalb die antihypertensive Therapie eine zentrale Rolle in der Therapie und Prävention der Atherosklerose einnimmt. ARBs stehen hier nach der Leitlinie der European Society of Cardiology als Medikamente der ersten Wahl zur Verfügung [71]. Auch über die hypertensive Wirkung hinaus, scheinen ARBs positive Effekte auf das Gefäßsystem zu haben. So weisen Studien darauf hin, dass eine AT<sub>1</sub>R-Blockade einen protektiven Effekt auf die endotheliale Funktion hat [129, 130]. Das für die Atherosklerose-Entstehung bedeutende Phänomen der endothelialen Dysfunktion ließe sich also potenziell durch eine Therapie mit ARBs beeinflussen und die anti-atherosklerotischen Eigenschaften des gesunden Endothels in Teilen wiederherstellen oder verbessern [131-134]. Ebenso scheinen die negativen Einflüsse einer Hypercholesterinämie auf das Gefäßbett durch ARBs verbessert werden zu können [134-137].

Wie in Abschnitt 1.2 beschrieben, kommt es in der Pathogenese der Atherosklerose zu einer Entzündungsreaktion in den Gefäßen. Die Wirkung von ARBs auf diesen Vorgang ist in unterschiedlichen Studien gegensätzlich. Einige Daten weisen auf eine anti-inflammatorische Wirkung einer AT<sub>1</sub>R-Blockade hin, während andere keinen Zusammenhang zwischen ARB-Behandlung und reduzierter Expression von inflammatorischen Mediatoren zeigen konnten [138-140]. Insgesamt konnten diverse Studien einen Zusammenhang zwischen einer ARB-Therapie und einer Verbesserung der Atherosklerose sowohl beim Menschen als auch in Tiermodellen herstellen [141-145].

Auch auf das MetS scheint eine Behandlung mit ARBs einen Einfluss zu haben. So konnte in zahlreichen Studien im Tiermodell gezeigt werden, dass hochdosierte ARBs das Körpergewicht, die Größe der Adipozyten und die Fettmasse reduzieren und den Energieverbrauch erhöhen [146-149]. Dieses anti-adipöse Potential entfalten die Wirkstoffe unabhängig von ihrer blutdrucksenkenden Wirkung [148, 150]. Die Insulinsensitivität wurde in diesen Studien ebenfalls positiv durch eine AT<sub>1</sub>R-Blockade beeinflusst [146-148, 151, 152]. Klinische Studien zeigten ebenfalls Hinweise darauf, dass durch eine Therapie mit ARBs das Risiko für eine DMT2 Erkrankung beim Menschen gesenkt werden kann [153-156].

Über welche Signalwege und Mechanismen die oben beschriebenen Wirkungen der ARBs im Detail vermittelt werden, ist Gegenstand der aktuellen Forschung, wobei für diese Arbeit eine Theorie von besonderer Bedeutung ist. So konnte nach ARB-Behandlung eine Hochregulation der ACE2/Ang(1-7)/Mas-Achse in Tiermodellen beobachtet werden [157, 158]. Wie in Abschnitt 1.3 beschrieben hat die Aktivität dieser Achse in vielen Bereichen eine gegensätzliche Wirkung zu Ang II, sodass es nicht überrascht, dass Studien darauf hinweisen, dass die Hochregulation von Ang (1-7) zumindest in Teilen für die positiven Effekte der ARBs auf den Metabolismus und das kardiovaskuläre System verantwortlich sein könnte [159-162]. 2019 zeigte eine Studie der Arbeitsgruppe Raasch allerdings einen verstärkten anti-adipösen Effekt einer ARB-Behandlung in Mas ko Mäusen [163]. Diese widersprüchlichen Daten fordern eine weitere Untersuchung des Zusammenhangs der ACE2/Ang(1-7)/Mas-Achse und der Effekte einer ARB-Behandlung.

### **1.5 Atherosklerose-Induktion in Tierversuchen**

In der Vergangenheit wurden in Tierversuchen, in denen atherosklerotische Veränderungen erzeugt werden sollten, vor allem genetisch veränderte Tiere mit ApoE ko und/oder LDL-Rezeptor ko verwendet [164]. In Tierversuchen wie im Rahmen dieser Arbeit, in denen zusätzlich andere genetische Veränderungen untersucht werden sollen, stellt die Zucht von Versuchstieren mit mehreren genetischen Veränderungen ein kostspieliges und aufwendiges Verfahren dar. Daher erscheint eine Etablierung einer nicht genmanipulativen Methode der Atherosklerose-Induktion sinnvoll.

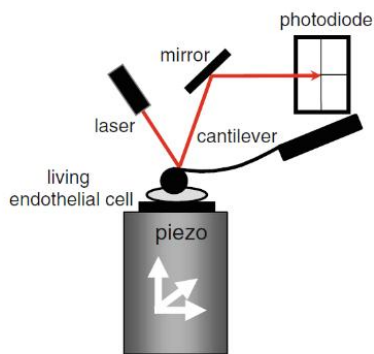
Hierzu hat sich insbesondere ein Verfahren durchgesetzt: Es konnte gezeigt werden, dass eine einmalige intravenöse Injektion eines AAV-Vektors (Adeno Associated Virus) mit einer gain-of-function Mutation von PCSK9 (PCSK9<sup>DY</sup>-AAV) zu einer Hypercholesterinämie und einer daraus resultierenden Atherosklerose führte. Dieser Effekt wurde durch die Verfütterung eines Futters mit hohem Fettgehalt verstärkt [165, 166]. Dieses Verfahren beruht auf dem Mechanismus, dass durch die PCSK9<sup>DY</sup>-Hochregulation vermehrt LDL-Rezeptoren (LDL-R) in der Leber abgebaut werden und somit nicht mehr für die Aufnahme von LDL in die Hepatozyten zur Verfügung stehen. Die hierdurch erzeugte Hypercholesterinämie führt wiederum, wie in Abschnitt 1.2 erläutert, zu einer Atherosklerose [167, 168].

### **1.6 Rasterkraftmikroskopie (AFM)-basierter Nachweis einer endothelialen Dysfunktion im PCSK9<sup>DY</sup>-AAV-Atherosklerosemodell**

Nach Atherosklerose-Induktion im Tierversuch gibt es verschiedene Möglichkeiten, das Ausmaß der Atherosklerose sichtbar zu machen und zu quantifizieren. Die wohl naheliegendste und weit verbreitetste Technik zur Beurteilung einer Atherosklerose-Erzeugung im Tierversuch besteht in der mikroskopischen Darstellung und Quantifizierung von atherosklerotischen Plaques innerhalb der nach Präparation untersuchten Blutgefäße [169]. Um die endotheliale Dysfunktion im Rahmen der Atherosklerose zu untersuchen, wird als Parameter oft die Endothel-abhängige Vasodilatation nach Stimulation mit vasoaktiven Substanzen, wie beispielsweise Acetylcholin, bestimmt [170-172]. In dieser Arbeit sollte zum Nachweis einer endothelialen Dysfunktion allerdings ein anderes Verfahren, die sogenannte Rasterkraftmikroskopie, dessen Funktionsweise im Folgendem erläutert werden soll, angewandt werden.

Die Rasterkraftmikroskopie wird auch als Atomic Force Microscopy (AFM) bezeichnet. Diese Methode ermöglicht es, Oberflächen im Nanobereich aufzulösen und so ihre physikalischen Eigenschaften darzustellen. Die Probe wird in das Gerät eingebracht und an einem Piezoelement befestigt und kann darüber bewegt werden. So ist es möglich die Probe mit dem sogenannten „cantilever“ in Kontakt zu bringen. Der cantilever ist ein goldbeschichtetes Metallplättchen, an dessen Spitze sich eine nanoskopische Kugel oder Nadel (tip) befindet. Ein Laserstrahl ist auf den cantilever gerichtet und wird von diesem reflektiert. Der reflektierte Laserstrahl wird anschließend von einer Photodiode (Position Sensitive Detector

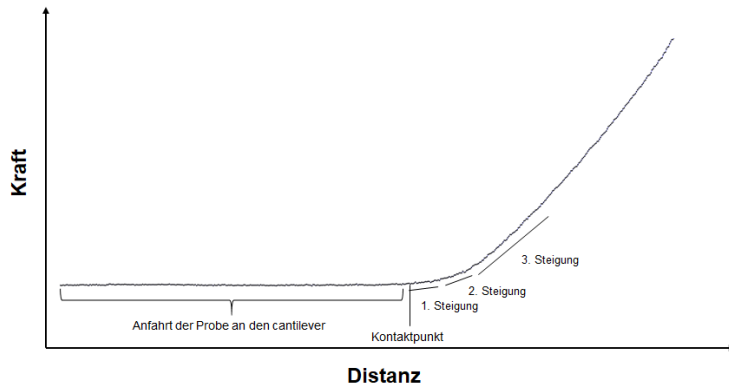
(PSI)) registriert [173, 174]. Die Probe wird mit dem cantilever in Kontakt gebracht. Durch weiteres Herauffahren der Probe kommt es zu einer Deformation von sowohl der Probe als auch dem cantilever. Durch das Verbiegen des cantilevers kommt es ebenso zu einer Auslenkung des reflektierten Lasers, welche wiederum durch den PSI registriert wird (Abb. 2).



#### **Abb. 1: Funktionsprinzip des AFM**

Aus Kliche et al. 2011: Bei Kontakt der Probe mit der tip kommt es zur Verbiegung des cantilevers. Die Auslenkung des Laserstrahls, der von der Rückseite des cantilevers reflektiert wird, wird durch die Photodiode registriert.

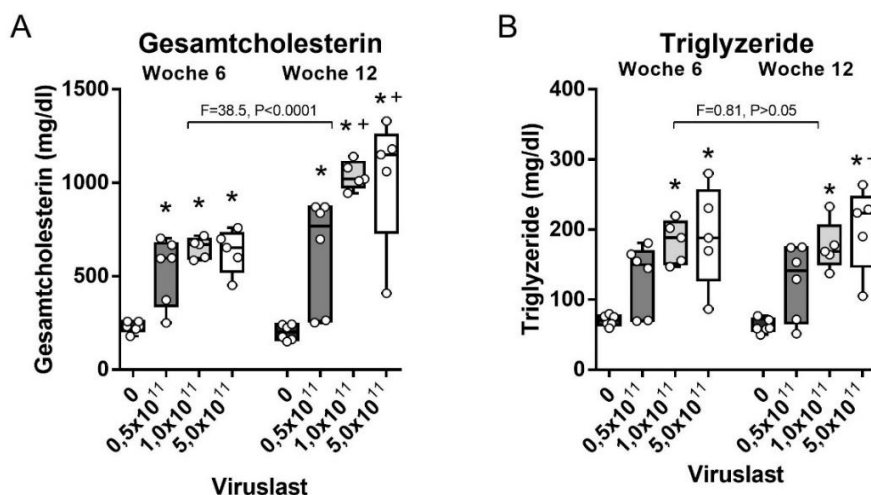
Je nach Flexibilität des cantilevers muss für seine Verbiegung mehr oder weniger Kraft aufgewendet werden. Diese Verfahren wird als „elastic indentation“ oder „nano-indentation“ bezeichnet und dient dazu, festzustellen wie viel Kraft aufgewendet werden muss, um eine Deformation der Probe zu erreichen [175]. Diese Information wird dann in einer Kraft-Distanz-Kurve oder auch Kraftkurve in pN/nm dargestellt [176]. Die Steifigkeit der Probe lässt sich anschließend von der Steigung der Kraftkurve ableiten, wobei die Steigung der Kraftkurve in 3 Teile unterteilt werden kann und jeder Steigungsanteil die Steifigkeit eines bestimmten Zellanteils repräsentiert: Der erste Teil repräsentiert die Glykokalix, der zweite Teil den Kortex der Zelle und der dritte Teil das Zellinnere („bulk“). Je steiler die Steigung desto steifer entsprechend die Zelle bzw. der Anteil der Zelle (Abb. 3) [174, 177].



**Abb. 3: Kraftkurve**

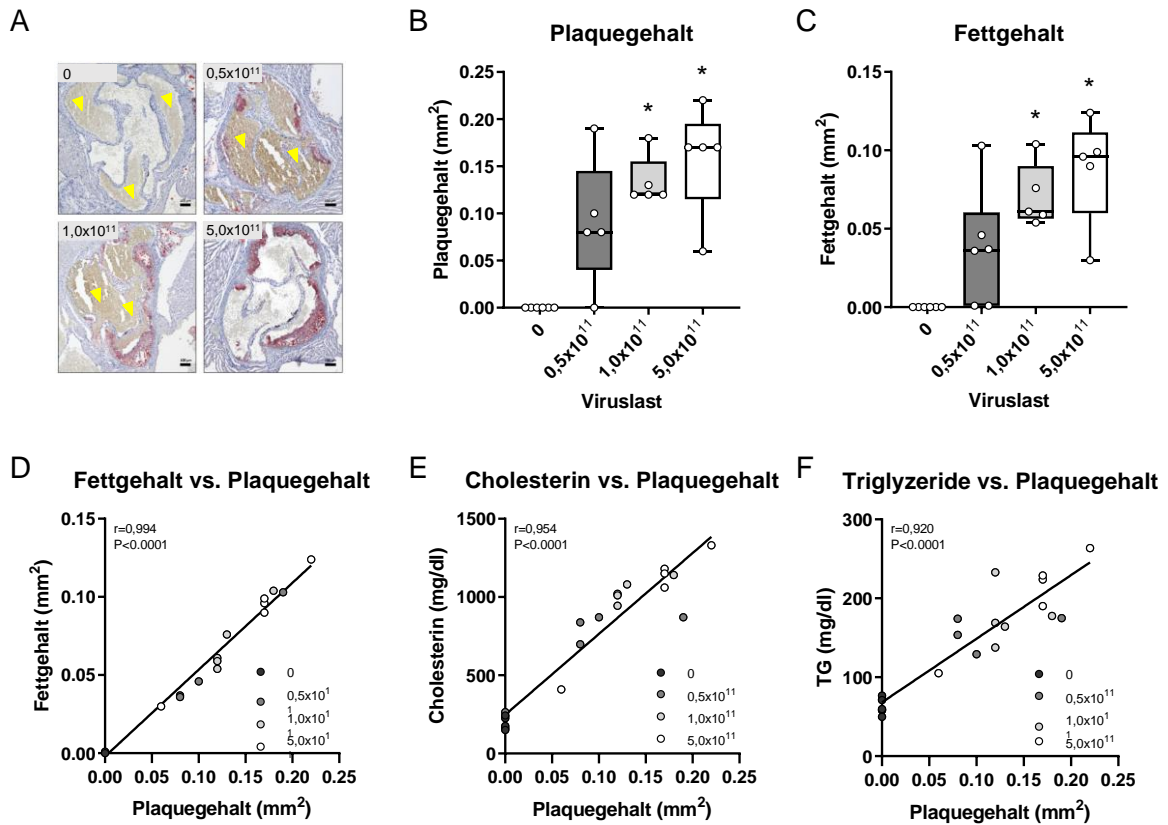
Es wird die zurückgelegte Distanz der Probe gegen die Kraft aufgetragen. Zunächst wird die Probe an den cantilever herangefahren. Am Kontaktpunkt kommt es zum Kontakt von cantilever-tip und Probe. Anschließend wird die Probe deformiert. Die unterschiedlichen Zellkomponenten erzeugen dabei die unterschiedlichen Steigungen. Je mehr Kraft für die Deformation der Probe bzw. der Zellkomponente aufgebracht werden muss, desto steiler wird die Kurve.

Wie in Abschnitt 1.5 beschrieben, konnte durch andere Arbeitsgruppen bereits die Wirksamkeit des PCSK9<sup>DY</sup>-AAV-Modells zur Erzeugung einer Atherosklerose im Tiermodell gezeigt werden [167, 168]. Auch die Arbeitsgruppe Raasch konnte – in einer auch durch mich durchgeführten Vorstudie zu den in dieser Arbeit gezeigten Experimenten – erneut zeigen, dass mithilfe dieses Verfahrens unter der Verwendung unterschiedlicher Viruskonzentrationen die Erzeugung einer Hypercholesterinämie und einer mikroskopisch nachweisbaren Atherosklerose möglich ist (Abb. 4, 5) [178].



**Abb. 4: Gesamtcholesterin- und Triglyzeridkonzentrationen in Abhängigkeit der PCSK9<sup>DY</sup>-AAV-Injektion**

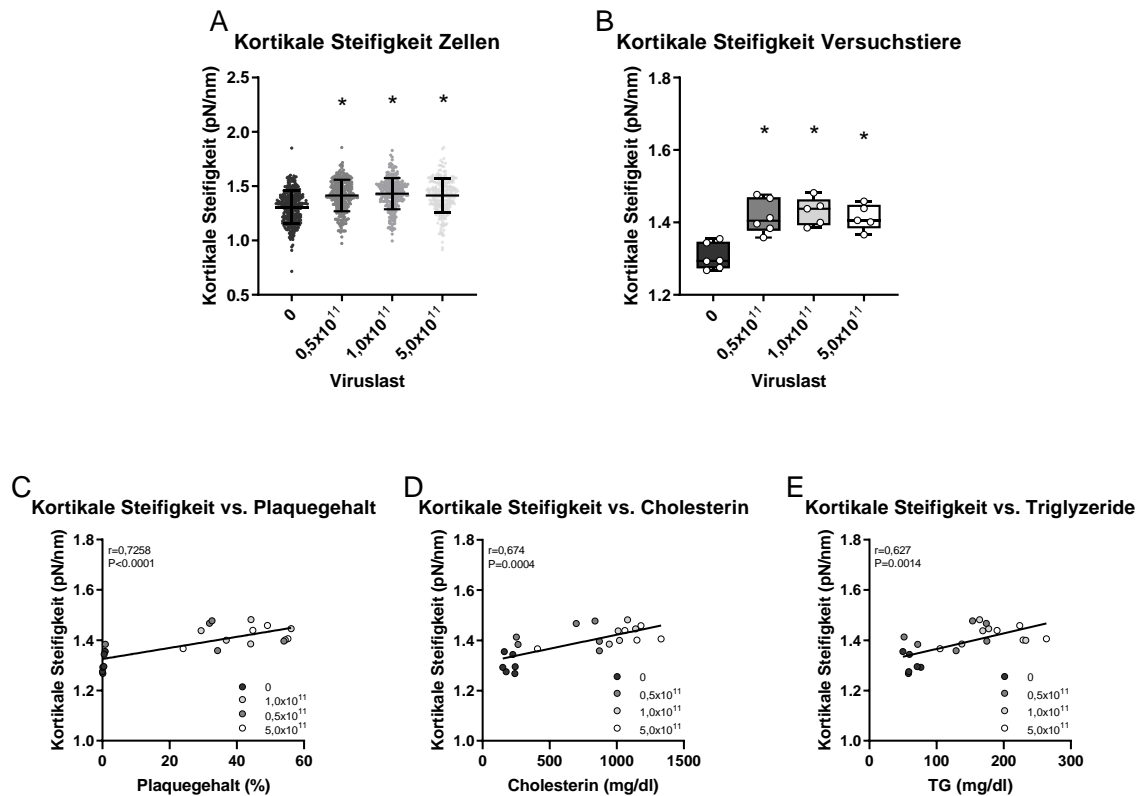
Abbildung erstellt nach Achner et al. A: Konzentration des Gesamtcholesterins im Plasma der Versuchstiere in Woche 6 und 12 der Studie; B: Konzentration der Triglyzeride im Plasma der Versuchstiere in Woche 6 und 12 der Studie; Darstellung des Medians mit oberem und unterem Quartil als Boxplot, die Antennen zeigen den Minimal- und Maximalwert an, n=5-6, \*p<0.05 vs. 0, \*p<0.05 vs. 0,5x10<sup>11</sup>.



**Abb. 5: Histologische Untersuchung der Aortenwurzel in Abhängigkeit der PCSK9<sup>DY</sup>-AAV-Injektion**

Abbildung erstellt nach Achner et al. A: Darstellung beispielhafter Schnitte der Aortenwurzel nach Oil Red-O Färbung, die gelben Pfeile markieren als Artefakte gewertete Blutrückstände, Maßstabsbalken: 100 µm; B: Quantitative Untersuchung des Plaquegehalts; C: Quantitative Untersuchung des Fettgehalts, Darstellung des Medians mit oberem und unterem Quartil als Boxplot, die Antennen zeigen den Minimal- und Maximalwert an, \* $p < 0.05$  vs. 0; D-F: Korrelationsanalysen zwischen Plaquegehalt und Fettgehalt(D), Cholesterin(E) und Triglyzeridplasmakonzentration(F),  $n = 5-6$ .

Ebenso konnte durch diese Arbeitsgruppe erstmals eine Veränderung der Zellsteifigkeit von aortalen Endothelzellen nach PCSK9<sup>DY</sup>-Injektion als Surrogat-Parameter für eine endotheliale Dysfunktion im Rahmen der Artherosklerose gezeigt werden (Abb. 6). Es wurde in der veröffentlichten Arbeit nicht nur eine Erhöhung der kortikalen Steifigkeit in Abhängigkeit der Virusinjektion gezeigt, sondern ebenso eine Korrelation zwischen dieser Erhöhung der Zellsteifigkeit und dem atherosklerotischem Plaquegehalt sowie den Konzentrationen von Cholesterin und Triglyzeriden [178]. Die Etablierung der Rasterkraftmikroskopie als Verfahren des Nachweises einer endothelialen Dysfunktion im PCSK9<sup>DY</sup>-AAV-Atherosklerosemodell bietet die Grundlage für die Untersuchungen in dieser Arbeit.



**Abb. 6: Rasterkraftmikroskopie in Abhängigkeit der PCSK9<sup>DY</sup>-AAV-Injektion**

Abbildung erstellt nach Achner et al. A: Kortikale Steifigkeit aller gemessenen Endothelzellen in Abhängigkeit der PCSK9<sup>DY</sup>-AAV-Injektion, Darstellung der Daten im Streudiagramm mit Mittelwert  $\pm$ SD durch horizontale Linien, n=240-310; B: Kortikale Steifigkeit bezogen auf die einzelnen Versuchstiere in Abhängigkeit der PCSK9<sup>DY</sup>-AAV-Injektion, Darstellung des Medians mit oberem und unterem Quartil als Boxplot, die Antennen zeigen den Minimal- und Maximalwert an, \*p<0.05 vs. 0; C-E: Korrelationsanalysen zwischen der kortikalen Steifigkeit und dem Plaquegehalt(C), der Cholesterin-(D) und der Triglyzeridplasmakonzentration(E), n=5-6.

## 1.7 Fragestellung

Diese Arbeit ist unterteilt in zwei unterschiedliche Studienanteile.

1. Zunächst sollte im Zellkulturversuch der Einfluss vom RAAS auf die mechanischen Eigenschaften von humanen Endothelzellen mittels AFM untersucht werden. Hier sollte konkret auf die Frage eingegangen werden, ob Ang II zu nanomechanischen Veränderungen führt, wie sie auch im Rahmen von atherosklerotischen Vorgängen beobachtet werden konnten und ob diese Veränderungen durch eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit einem ARB verhindert werden können.
2. Im zweiten Teil der Studie, dem Hauptanteil dieser Arbeit, sollte anschließend die anti-adipöse und anti-atherosklerotische Potenz von

Telmisartan (TEL), das zur Medikamentengruppe der ARBs gehört, im PCSK9<sup>DY</sup>-AAV-Atherosklerosemodell im Mausversuch getestet werden. Im Rahmen dessen sollte die Hypothese, dass diese pharmakologischen Wirkungen von TEL zumindest zum Teil über die ACE2/Ang(1-7)/Mas-Achse vermittelt werden, überprüft werden. Hierzu wurden zusätzlich zu den wildtyp Kontrollen Mäuse verwendet, die einen ACE2 ko hatten, um zu überprüfen, ob durch das damit einhergehende Ausschalten der ACE2/Ang(1-7)/Mas-Achse der anti-adipöse und anti-atherosklerotische Effekt von TEL in diesen Tieren geringer ausfällt.

## **2 Material und Methoden**

Eine Liste der verwendeten Materialien und Geräte befindet sich im Anhang.

### **2.1 In-vitro Versuchsreihe**

#### **2.1.1 Zellbiologische Methoden**

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden an einer Sterilbank und mit sterilfiltrierten Flüssigkeiten durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden.

#### **2.1.2 Kultivierung der Zellen**

Für die Zellkulturversuche wurden humane Zellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) verwendet. Die Zellen wurden in mit Gelatine beschichteten T-25 Zellkulturflaschen in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), dem „fetal calf serum“ (FCS) (10%), LVES (Large Vessel Endothelial Supplement) (1,1 %), Heparin (0,2%), Penicillin G und Streptomycin (gemeinsam 1%) zugesetzt wurde (folgend als Medium bezeichnet), angezüchtet. Ein Wechsel des Zellmediums wurde alle 3 Tage durchgeführt und täglich wurde das Zellwachstum lichtmikroskopisch kontrolliert. Für die Versuche wurden die Zellen schließlich auf Deckgläsern ausgesät.

#### **2.1.3 Aussäen der Zellen**

Zunächst wurde das Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt und durch 10ml PBS<sup>-/-</sup> (Phosphate Buffered Saline ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) ersetzt, um dieses anschließend ebenfalls abzusaugen. Im Anschluss wurden 2-3 ml eines Gemisches aus Trypsin (0,05%) und EDTA (0,02%) hinzugegeben und die Kulturflasche für 5 min in den Brutschrank gestellt – hierdurch wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Um die Reaktion zu stoppen, wurden 10ml Medium hinzugegeben und der Inhalt der Zellkulturflasche in ein 15ml-Falcon überführt und für 5min mit 900 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 1 ml Medium re-suspendiert. Nun wurde die Konzentration der Zellen in der Suspension bestimmt und anschließend die nötige Verdünnung der Suspension berechnet, um eine bestimmte Zahl an Zellen (15000 bis 25000) pro Deckglas zu erreichen.

Die Deckgläser wurden 30-60 min zuvor mit einem Gemisch von PBS<sup>-/-</sup> und Fibronectin (2%) beschichtet, welches abgesaugt wurde, um anschließend die Zellsuspension auf die sich in 12-Well-Platten befindlichen Deckgläser zu geben.

Nach etwa 2-4 Tagen waren die Zellen konfluent gewachsen und konnten für die Versuche verwendet werden.

#### 2.1.4 Versuchsreihe

Für die Versuchsreihe des in-vitro Zellversuchs wurden die konfluent gewachsenen Zellen 4 unterschiedlichen Behandlungsgruppen zugeführt und für 24 Stunden vor der Messung behandelt. (Tab. 2). Es wurde aufgrund von in der einschlägigen Literatur veröffentlichten Zellkulturversuchen mit ARBs [110, 179, 180] für die Versuchsreihe eine Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Losartan festgelegt. Angepasst hieran wurde für die Versuchsreihe eine Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  Ang II gewählt, um lediglich mit einem 10-fachen Überschuss an Losartan zu behandeln.

**Tab. 2: Übersicht über die Behandlungsgruppen der in-vitro Versuchsreihe**

<b>Gruppe</b>	<b>Behandlung</b>
A	Medium
B	Losartan 1 $\mu\text{M}$
C	Ang II 0,1 $\mu\text{M}$
D	Ang II 0,1 $\mu\text{M}$ + Losartan 1 $\mu\text{M}$

Anschließend erfolgte die Messung mit der Rasterkraftmikroskopie (für die Funktionsweise der Rasterkraftmikroskopie wird an dieser Stelle auf die Einleitung dieser Arbeit verwiesen) in 37°C warmen HEPES-Puffer (Zusammensetzung: NaCl:140 mmol/l; KCl: 5 mmol/l; MgCl<sub>2</sub>-6-hydrat: 1 mmol/l; CaCl<sub>2</sub>: 1 mmol/l; Glucose: 5 mmol/l; HEPES: 10 mmol/l), der ebenfalls zuvor mit der jeweiligen Konzentration an Ang II und/oder Losartan versetzt worden war.

Pro Konzentration wurden mindestens 6 Deckgläser gemessen, pro Deckglas wurden etwa 25 Zellen gemessen und pro Zelle wurden 8 Kraftkurven aufgezeichnet. Die Messungen erfolgten mit cantilevern mit einer Federkonstante von 30 pN/nm und es wurde sich auf die Auswertung der Veränderungen des Zellkortex beschränkt.

Die Analyse der Kraftkurven erfolgte im Anschluss mithilfe der Protein-Unfolding and Nanoindentation-Analysis Software Punias.

## 2.2 Versuchstiere und Haltung

Für den Versuch wurden männliche Mäuse des C57/B6 N Stammes verwendet. Die wildtyp-C57/B6 N (wt) Tiere wurden über das Unternehmen Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bezogen. Zusätzlich wurden ACE2-defiziente C57/B6 N Tiere verwendet, die durch Prof. Dr. Michael Bader (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin) gezüchtet und per Embryonentransport nach Lübeck transferiert wurden. In Lübeck erfolgte die Implantation in Ammentiere und die Vermehrungszucht des Tierbestandes auf Versuchsgröße.

Haltung und Experimente erfolgten gemäß den Richtlinien zur Haltung und Nutzung von Versuchstieren (Guide for the care and use of laboratory animals), herausgegeben durch die NIH (National Institutes for Health).

Eine Genehmigung des Versuchsvorhabens erfolgte zuvor durch das Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung des Bundeslandes Schleswig-Holstein (Aktenzeichen 75-7/19).

Die Tiere wurden für den Großteil der Zeit in Gruppen von 2 bis 4 Tieren in Standardkäfigen in einem klimatisierten Versuchsraum gehalten. Temperatur (ca. 21°C) und Luftfeuchtigkeit (ca. 40-60%) wurden über den Versuchszeitraum konstant gehalten, ebenso wie ein Hell/Dunkel-Zyklus von 12 Stunden (Hellphase von 07:00 bis 19:00 Uhr). Vor Versuchsbeginn erfolgte eine Habituation an die Versuchsumgebung von 10 bis 14 Tagen.

Während der gesamten Versuchsdauer erhielten die Mäuse Leitungswasser sowie nach Versuchsprotokoll Standarddiät (chow) oder Western Diät (WD) (Tab. 3) ad libitum. Sieben Tage vor Tötung der Versuchstiere wurde das Leitungswasser durch evian® Mineralwasser (Gesamtmineralisierung: Kalzium: 80 mg/L; Magnesium: 26 mg/L; Kalium: 1 mg/L; Natrium: 6,5 mg/L; Nitrat: 3,8 mg/L; Bikarbonat: 360 mg/L; Sulfat: 14 mg/L; Siliziumdioxid: 15 mg/L; Chlorid: 10 mg/L) ersetzt.

Im Sinne des 3-R-Prinzips („Replace, Reduce, Refine“) des Tierschutzes erfolgte eine gemeinsame Nutzung der wt Versuchstiere mit Herrn Tobias Klersy.

**Tab. 3: Nährstoffzusammensetzung und Energiegehalt der verwendeten Diäten**

chow: Standarddiät; WD: Western Diät

Diät	Bezeichnung	umsetzbare Energie	Kohlenhydrate	Fett	Eiweiß	Hersteller
<b>chow</b>	EF acc. D12450B mod.	15,3 kJ/g	70%	10%	20%	ssniff Spezialdiäten GmbH
<b>WD</b>	EF TD88137 mod. +1.25% Cholesterol E15723-347	19,1 kJ/g	43%	42%	15%	ssniff Spezialdiäten GmbH

### 2.3 Studienprotokoll der in-vivo Studie

In der Hauptstudie erfolgte die Untersuchung der Auswirkung einer Fütterung von WD und Behandlung mit TEL auf Mäuse mit ubiquitären ACE2 ko im Rahmen des PCSK9<sup>DY</sup>-AAV-Atherosklerosemodells.

Hierzu erfolgte eine Einteilung der Versuchstiere in eine der aufgeführten Behandlungsgruppen Die Gruppen  $w_{chow}^{VEH}$  und  $ACE2\ ko_{chow}^{VEH}$  werden im Folgendem auch als Kontrollgruppen bezeichnet (Tab. 4). Die Versuchsgruppengröße von  $n=12$  wurde mittels Poweranalyse bestimmt. Im Versuchsverlauf kam es zum vorzeitigen Versterben eines Tieres.

Nach einer Habituationsphase und einer retroorbitalen Blutentnahme inkl. Blutzuckermessung an Tag -6 erfolgte am Tag 1 die i.v. Injektion von PCSK9<sup>DY</sup>-AAV bzw. NaCl. Es wurde unter Berücksichtigung der Ergebnisse durch Achner et al. [178] eine Viruslast von  $2 \times 10^{11}$  festgelegt. An Tag 1 startete ebenso die gruppenentsprechende Fütterung mit chow bzw. WD sowie die tägliche gewichtsadaptierte Behandlung mit VEH bzw. TEL nach täglicher Bestimmung des Körpergewichts. Es erfolgte eine TEL-Dosierung von 8mg/kgKG/d und eine entsprechende Gabe von VEH-Lösung (5ml/kgKG), gemäß der Beschreibung in Abschnitt 2.4.3.

**Tab. 4: Übersicht über die Behandlungsgruppen der in-vivo Studie**

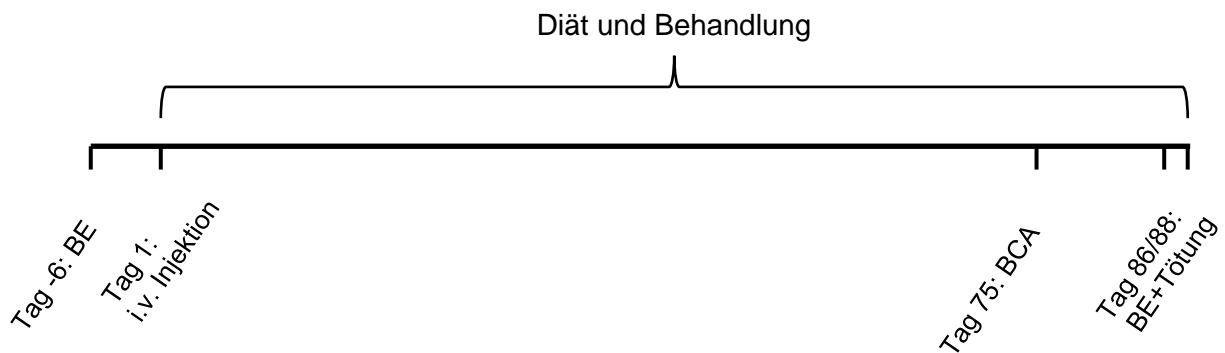
wt: Wildtyp-C57/B6 N-Mäuse; ACE2 ko: ACE2-Knockout-C57/B6 N-Mäuse; chow: Kotroll-Diät; WD: Western Diät; VEH: Vehikel-Behandlung; TEL: Telmisartan-Behandlung

<b>Gruppe</b>	<b>Diät</b>	<b>i.v. Injektion</b>	<b>Behandlung</b>
$wt_{chow}^{VEH}$	chow	NaCl	VEH
$wt_{WD}^{VEH}$	WD	PCSK9 <sup>DY</sup> -AAV ( $2 \times 10^{11}$ )	VEH
$wt_{WD}^{TEL}$	WD	PCSK9 <sup>DY</sup> -AAV ( $2 \times 10^{11}$ )	TEL
ACE2 ko $_{chow}^{VEH}$	chow	NaCl	VEH
ACE2 ko $_{WD}^{VEH}$	WD	PCSK9 <sup>DY</sup> -AAV ( $2 \times 10^{11}$ )	VEH
ACE2 ko $_{WD}^{TEL}$	WD	PCSK9 <sup>DY</sup> -AAV ( $2 \times 10^{11}$ )	TEL

Die Behandlung wurde über etwa 3 Monate fortgeführt und es erfolgte zudem eine Bestimmung der Körperfettzusammensetzung (Body Composition Analysis (BCA)) mittels Nuklear-Magnet-Resonanz-Spektroskopie, bevor die finale Blutentnahme inkl. Blutzuckermessung, die Tötung und die Organentnahme für weitere Untersuchungen erfolgte. Eine Übersicht über den zeitlichen Ablauf der in-vivo Studie ist in Abb. 7 dargestellt.

Post mortem erfolgte eine Messung der kortikalen Steifigkeit mittels Rasterkraftmikroskopie und eine histologische Untersuchung der Aorten sowie die RNA-Sequenzierung der absteigenden Aorta. Ebenso erfolgte eine Messung der Cholesterin- und Triglyzeridspiegel aus dem Plasma, eine Bestimmung verschiedener Hormon- und Zytokinkonzentrationen und eine Messung des Plasmanitrits.

Die angewendeten Methoden und Versuchsdurchführungen werden in den folgenden Abschnitten detailliert beschrieben.



**Abb. 2: Zeitplan der in-vivo Studie**

Gruppenentsprechende Diät und Behandlung von Tag 1 bis Tag 86/88; Retroorbitale Blutentnahme inkl. Blutzuckermessung an Tag -6; Gruppenentsprechende i.v. Injektion an Tag 1; Bestimmung der Körperfettzusammensetzung (Body Composition Analysis) mittels Nuklear-Magnet-Resonanz-Spektroskopie mit dem Bruker minispec LF110 an Tag 75; Retroorbitale Blutentnahme inkl. Blutzuckermessung sowie Tötung und Organentnahme an Tag 86/88

**2.4 Invasive Methoden**

**2.4.1 Virusinjektion**

Die Bereitstellung des Virus-Vektors erfolgte durch Prof. Dr. Oliver Müller (Klinik für Innere Medizin V, UKSH, Campus Kiel). In Kiel war der PCSK9<sup>DY</sup>-AAV, wie bereits in der Literatur beschrieben, produziert und aufbereitet worden [165, 181-183].

Das Versuchstier wurde zunächst unter einer Wärmelampe positioniert, um eine Erweiterung der Schwanzvene zu erreichen. Anschließend wurde das Versuchstier in einem Restraîner fixiert und die Viruslösung bzw. NaCl, die zuvor in 1 ml Spritzen aufgezogen worden waren, über 27 G Einmalkanülen injiziert.

**2.4.2 Retroorbitale Blutentnahme und Blutzuckermessung**

Für die retroorbitale Blutentnahme wurde das Versuchstier zunächst aus dem Käfig entnommen und für einige Sekunden in ein Gefäß gesetzt, in das zuvor ein in Isofluran getränktes Tuch eingebracht worden war, sodass das Tier über Inhalation von Isofluran anästhesiert wurde. Eine Ausnahme stellte hierbei die finale Blutentnahme dar, bei der eine Injektionsnarkose mit Ketamin und Xylazin (s. Abschnitt 2.4.4) erfolgte. Anschließend wurde eine Na-heparinisierte Hämatokritkapillare retroorbital eingeführt und durch leichtes Drehen das Blut (etwa 100 µl) entnommen und mit einer EDTA-beschichteten Microvette® aufgefangen. Nach einer Zwischenlagerung im Eisbad wurden die Proben bei 9000 rpm und 4°C für 3

min zentrifugiert und anschließend das Plasma abpipettiert und bei -20°C eingefroren.

Im Rahmen der oben beschriebenen Blutentnahme wurde die Blutglukosekonzentration mithilfe des Accu-Chek® Performa Blutzuckermessgeräts und der entsprechenden Teststreifen bestimmt. Hierzu wurde ein Tropfen Vollblut direkt aus der Hämatokritkapillare mit dem Teststreifen aufgefangen.

### **2.4.3 Orale Applikation von Telmisartan-Suspension und Vehikel-Lösung**

#### **2.4.3.1 Herstellung der Telmisartan-Suspension und Vehikel-Lösung**

Zur oralen Applikation wurde das schlecht Wasser-lösliche TEL in Suspension gebracht. Hierzu wurden zunächst 2,5 g Gummi arabicum (10%) und 40 mg TEL in einem Mörser vermengt und sorgfältig zerrieben. Anschließend wurden schrittweise kleine Mengen Leitungswasser unter ständigem Rühren und Reiben hinzugefügt. Insgesamt wurden 25 ml Leitungswasser hinzugefügt. Durch dieses Vorgehen entstand eine Suspension mit einer Verdünnung von 1,6 mg TEL/ml Suspension, sodass eine tägliche Applikation von 5ml/kgKG in der gewünschten Dosis von 8mg/kgKG resultierten. Die TEL-Suspension wurde mindestens einmal wöchentlich neu angesetzt [184].

Die VEH-Lösung wurde entsprechend ohne das Hinzufügen von TEL hergestellt.

#### **2.4.3.2 Applikation über eine Knopfkanüle**

Zur oralen Applikation der TEL-Suspension bzw. VEH-Lösung wurden leicht gebogene Knopfkanülen, welche auch als „Schlundsonden“ bezeichnet werden, verwendet. Die Schlundsonde wurde auf eine 1 ml Spritze aufgesetzt und die benötigte Menge an Suspension bzw. Lösung aufgezogen (5ml/kgKG). Anschließend wurde das Versuchstier mit der linken Hand an Nackenhaut und Schwanz fixiert, sodass die Schlundsonde mit der rechten Hand in den oberen Gastrointestinaltrakt eingeführt werden und die Suspension bzw. Lösung direkt intragastral bzw. intraösophageal appliziert werden konnte [184].

### **2.4.4 Tötung und Organgewinnung**

Für die Tötung und Organentnahme wurde zunächst eine Lösung zur Injektion aus 0,7 ml Ketamin (100 mg/ml), 0,7 ml Xylazin (2%) und 8,6 ml NaCl angesetzt. Diese Lösung wurde anschließend in 1 ml Spritzen aufgezogen und mithilfe von 27 G

Einmalkanülen intraperitoneal verabreicht. Es wurden nach Bedarf etwa 0,6 bis 1 ml Lösung verabreicht, um eine ausreichend tiefe Anästhesie der Versuchstiere zu erreichen.

Nach Wirkeintritt der Anästhetika wurde, wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben, retroorbital Blut entnommen und der Blutzuckerspiegel aus Vollblut bestimmt.

Anschließend wurden Abdomen und Brustkorb der Versuchstiere eröffnet und durch kardiale Punktion mit einer 23 G Einmalkanüle Blut für die Nitritbestimmung entnommen und die Versuchstiere per cervicaler Dislokation getötet. Das Vollblut aus der kardialen Punktion wurde in Lithium-heparinisierte Röhrchen überführt und nach Zwischenlagerung im Eisbad für 10 Minuten bei 2000 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma in Zentrifugen-Filtereinheiten überführt und erneut bei 14000 g und 4°C für 70 Minuten zentrifugiert und der Durchfluss in amber Eppendorf Reaktionsgefäße in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -20°C gelagert.

Nachfolgend konnten Leber, Milz, ein Stück des Dickdarms, Niere, Lunge, Aorta sowie weißes Fettgewebe entnommen werden und in 1,5 oder 2 ml Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend zwischen- (-20°C) bzw. dauerhaft (-80°C) gelagert werden. Zusätzlich wurden eine Stuhlprobe, sowie die Schwanzspitze gleichermaßen entnommen und eingefroren. Außerdem wurde der Schädel eröffnet und das Gehirn entnommen und auf Trockeneis schockgefroren.

Die thorakale Aorta der Versuchstiere wurde in 3 Stücke unterteilt, wobei ein Teil umgehend im Institut für Physiologie der Universität zu Lübeck für die Untersuchung per Rasterkraftmikroskopie vorbereitet wurde (s. Abschnitt 2.6.1). Ein weiterer Teil der thorakalen Aorta wurden in das Institut für Kardiogenetik des UKSH, Campus Lübeck, überführt und dort für die histologische Untersuchung (s. Abschnitt 2.7) vorbereitet und der letzte Teil (Aorta descendens) wurde umgehend nach Entfernung mit Ringer-Lösung gespült und vom umgebenden Gewebe gelöst und anschließend in einem 2 ml Reaktionsgefäß in Ringer-Lösung in Flüssigstickstoff für die spätere Verwendung der RNA-Sequenzierung (s. Abschnitt 2.8) schockgefroren. Die abdominale Aorta wurde nach dem Entfernen in RNAlater ebenfalls in Flüssigstickstoff schockgefroren.

## **2.5 Bestimmung der Körperfettzusammensetzung**

Mittels Nuklear-Magnet-Resonanz-Spektroskopie mit dem Bruker minispec LF110 wurde die Körperfettzusammensetzung (Body Composition Analysis) der Versuchstiere bestimmt. Hierzu wurde das Versuchstier aus dem Käfig entnommen und in einer Röhre so fixiert, dass nur noch eine minimale Bewegung möglich war. Die Röhre wurde anschließend für die Messung in das Gerät eingebracht. Nach der Messung konnte die Maus umgehend in den gewohnten Käfig zurückgesetzt werden [159].

Ausgewertet wurden im Anschluss die Fettmasse, die fettfreie Körpermasse und die Masse an freier Flüssigkeit bezogen auf das Körpergewicht der Versuchstiere.

## **2.6 Rasterkraftmikroskopie**

### **2.6.1 Präparation der Aorta**

Nach Entnahme und Teilung der Aorta wurde das Gefäß vom umgebenden Gewebe befreit und in kleine Stücke von ca. 2 mm<sup>2</sup> Größe unterteilt. Die Gewebestücke wurden anschließend auf Cell-Tak beschichteten Glas mit der Endothelseite nach oben weisend fixiert. Danach wurden die Aortenstücke für 24 bis 48 h in „minimal essential medium“ (MEM) gelagert, welches FCS (10%), „MEM vitamins“ (1%), „MEM nonessential amino acids“ (1%), Penicillin G (10,000 U/ml) und Streptomycin (10,000 mg/ml) enthielt.

### **2.6.2 Durchführung der Rasterkraftmikroskopie**

Die Funktionsweise der Rasterkraftmikroskopie wurde bereits in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben. In den hier beschriebenen Experimenten wurden pro Versuchstier mind. zwei Stücke Aorta gemessen, pro Aortastück wurden ca. 25 Zellen gemessen und pro Zelle wurden jeweils 8 Kraftkurven aufgezeichnet. Alle Messungen erfolgten in 37°C warmen HEPES Puffer (Zusammensetzung: NaCl:140 mmol/l; KCl: 5 mmol/l; MgCl<sub>2</sub>-6-hydrat: 1 mmol/l; CaCl<sub>2</sub>: 1 mmol/l; Glucose: 5 mmol/l; HEPES: 10 mmol/l).

Die Analyse der Kraftkurven erfolgte im Anschluss mithilfe der Protein-Unfolding and Nanoindentation-Analysis Software PUnias.

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt in der Beurteilung des Zellkortex durch die Rasterkraftmikroskopie, wobei auch eine rasterkraftmikroskopische Untersuchung

der Glykokalix durchgeführt wurde. Hierzu wurden cantilever mit einer Federkonstante von 30 pN/nm zur Beurteilung des Zellkortex sowie 10 pN/nm zur Beurteilung der Glykokalix verwendet [185].

## **2.7 Histologische Untersuchung der Aorta**

Die Darstellung und Quantifizierung von atherosklerotischen Plaques in den entnommenen Aorten mittels Oil Red-O (ORO) Färbung und anschließender Mikroskopie erfolgte – ebenso wie Bestimmung weiterer aortaler Parameter (Fettgehalt, Media, Lumen, Durchmesser) – wie bereits in der Literatur beschrieben im Institut für Kardiogenetik des UKSH, Campus Lübeck [186, 187].

## **2.8 RNA-Sequenzierung**

Die RNA-Sequenzierungsanalyse (RNAseq) wurde von der absteigenden Aorta im Institute for Cardiovascular Physiology der Goethe-Universität in Frankfurt durchgeführt. Für die RNAseq wurden die Aortensegmente von 3 Mäusen gepoolt und insgesamt 4 Proben analysiert. Das bedeutet, dass die Ergebnisse 12 Mäuse pro Gruppe repräsentieren. Die Gesamt-RNA wurde mit dem RNA Mini Kit von Bio&SELL (Nürnberg, Deutschland) in Kombination mit einer DNase-Verdauung (DNase-Free DNase Set, Qiagen) isoliert, um eine Kontamination mit genomischer DNA zu vermeiden. Die Integrität der RNA und der Bibliotheksvorbereitung wurde mit LabChip Gx Touch 24 (Perkin Elmer) überprüft. Als Input für die VAHTS Stranded mRNA-seq Library-Vorbereitung wurden 500 µg Gesamt-RNA gemäß dem Protokoll des Herstellers (Vazyme) verwendet. Die Sequenzierung wurde auf einem NextSeq2000-Gerät (Illumina) mit 1x72-bp-Single-End-Setup durchgeführt. Die resultierenden Roh-Reads wurden mit FastQC (RRID:SCR\_014583) (Andrews Simon: FastQC: a quality control tool for high-throughput sequence data. Online verfügbar unter <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) auf Qualität, Adaptergehalt und Duplikationsraten untersucht.

### **2.8.1 RNA-Sequenzierungsanalyse**

Die Trimmomatic-Version 0.39 wurde verwendet, um die Reads zu trimmen, nachdem die Qualität unter einen Mittelwert von Q15 in einem Fenster von 5 Nukleotiden gesunken war, um nur gefilterte Reads mit einer Länge von mehr als 15 Nukleotiden zu behalten [188]. Die Reads wurden mit STAR 2.7.10a gegen das Ensembl-Mausgenom Version mm10 (Ensembl-Release 101) ausgerichtet [189].

Ausgerichtete Reads wurden gefiltert, um Duplikate mit Picard 2.27.4 (Picard: Eine Reihe von Tools in Java für die Arbeit mit Next-Generation-Sequenzierungsdaten im BAM-Format), Multi-Mapping-, ribosomalen oder mitochondrialen Reads zu entfernen. Die Anzahl der Gene wurde mit featureCounts 2.0.4 durch Aggregation von Reads ermittelt, deren Exons auf dem richtigen Strang überlappten, wobei solche, die über mehrere Gene überlappten, ausgeschlossen wurden [190]. Die Rohzahlmatrix wurde mit DESeq2 Version 1.36.0 normalisiert [191]. Mit DESeq2 wurden auf der Grundlage der Rohzahlmatrix Kontraste erstellt. Gene wurden als signifikant unterschiedlich exprimiert eingestuft, wenn die durchschnittliche Anzahl  $> 5$ , der um mehrere Tests bereinigte p-Wert  $< 0,05$  und  $\log_2FC < -0,585$  oder  $\log_2FC > 0,585$  war. Die Ensemble-Annotation wurde mit UniProt-Daten (Aktivitäten bei der Universal Protein Resource (UniProt)) angereichert.

Um eine mögliche Assoziation von Genen mit Atherosklerose zu identifizieren, verwendeten wir den Datensatz CTD Gene-Disease Associations (Datum der letzten Datenbankprüfung: 23.07.2024) [192].

## **2.9 Laborchemische Analysen**

### **2.9.1 Konzentrationsbestimmung von Cholesterin- und Triglyzeriden**

Die Gesamtcholesterin- und Triglyzeridbestimmung aus dem Plasma der Versuchstiere nach retroorbitaler Blutgewinnung erfolgte im Institut für Kardiogenetik des UKSH, Campus Lübeck wie zuvor durch Aherrahrou et al. beschrieben [186]. Dafür wurde das Roche cobas c 702 mit dem EnzyChrom HDL/LDL/VLDL Assay Kit 100T (Biotrend Chemikalien GmbH) sowie dem Triglyceride Colorimetric Assay Kit 96well Kit (Biomol GmbH) verwendet.

### **2.9.2 Konzentrationsbestimmung der Zytokine und Hormone**

Es erfolgte die Bestimmung von diversen Zytokinen und Hormonen im Leibniz-Institut für Virologie in Hamburg mit Hilfe des Milliplex mouse metabolic magnetic bead panel kit MMHMAG-44K.mouse (Amylin Active, C-Peptide 2, Ghrelin, GIP, GLP1 Active or GLP1 Total, Glukagon, IL-6, Insulin, Leptin, MCP1, PP, PYY, Resistin, Secretin, and TNF- $\alpha$ ) und MHSTCMAG-70K (GM-CSF, IFN $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17A, KC/CXCL1, LIX, MCP1, MIP2, TNF- $\alpha$ ) der Firma Millipore aus dem Plasma der Versuchstiere.

### **2.9.3 Konzentrationsbestimmung von Nitrit**

Wie bereits in anderen Arbeiten beschrieben [193] erfolgte im Institute for Cardiovascular Physiology der Goethe-Universität in Frankfurt am Main die Nitritbestimmung aus dem Plasma der Versuchstiere als Surrogatparameter für NO. Die Messungen erfolgten mit einem NO analyser (Sievers NOA-280).

### **2.10 Auswertung und Statistische Methoden**

Für die statistische Auswertung und Erstellung der Abbildungen wurde GraphPad Prism (Version 7.0 und 8.0) verwendet.

Die Daten wurden auf Ausreißer (mittels Robuste Regression), Verteilung und Varianzhomogenität getestet. Zeigte sich in mehr als zwei der verglichenen Gruppen eine Normalverteilung, wurde als statistischer Test eine 1way-Analysis of Variance (ANOVA) bzw. eine 2way-ANOVA – abhängig davon, ob eine oder zwei Variablen beurteilt werden sollten – gewählt. Im Anschluss hieran wurde ein Tukey's multiple comparison test durchgeführt. Alternativ wurde eine Brown-Forsythe-ANOVA mit anschließendem Dunnett's multiple comparison test gewählt, wenn keine Varianzhomogenität bestand. Analog hierzu wurde bei fehlender Normalverteilung ein Kruskal-Wallis-Test mit folgendem Dunn's multiple comparison test durchgeführt. Sollten nur zwei Gruppen miteinander verglichen werden, wurde ein t-Test (bei Normalverteilung) oder ein Mann-Whitney-Test (bei fehlender Normalverteilung) durchgeführt. Zur Korrelationsanalyse wurden 1- oder 2-tailed Pearson-Tests angewandt.

Zur Analyse eines Stammunterschieds erfolgte zuerst der statistische Vergleich der Kontrollgruppen von wt und ACE2 ko Mäusen unter chow Fütterung und VEH Behandlung. Im Anschluss hieran erfolgte der Vergleich der Behandlungsgruppen innerhalb der jeweiligen genetischen Gruppe. Dieses Verfahren erfolgte analog zur Publikation [194], bei der neben den ACE2 ko auch die Mas ko Mäuse integriert waren. Für eine 3-ANOVA-Analyse wäre die Studie nicht gepowert gewesen. Aufgrund dessen und ebenfalls dem 3R-Prinzip folgend entschieden wir uns für diese gestufte statistische Auswertung.

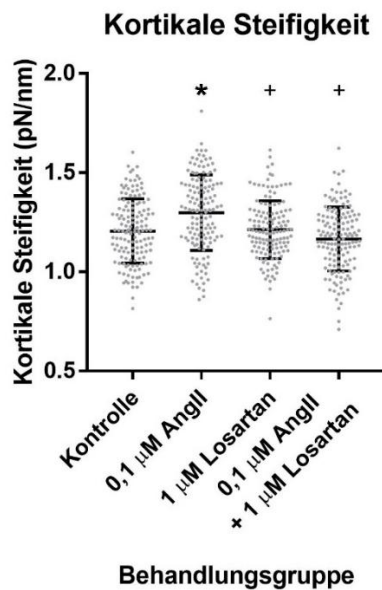
Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  festgelegt. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Werden in den Abbildungen Box-Plots gezeigt, so wird der Median sowie das obere und untere Quartil gezeigt.

Ebenso sind das Minimum und Maximum als Whisker dargestellt. Die biometrische/statistische Fallzahlberechnung wurde PC-assistiert mittels eines online-Programms nach statistischer Beratung mit dem Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck durchgeführt. Die Gruppengröße von  $n=12$  wurde durch Power-Analyse (korrigiertes  $\alpha=0,01$ , power 80%) mit dem Körpergewicht als Primärparameter bestimmt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Ergebnisse der in-vitro Versuchsreihe

Wurden die Zellen allein mit Losartan behandelt, so konnte keine Veränderung der kortikalen Steifigkeit im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Bei Behandlung der Zellen mit Ang II konnte eine Erhöhung der kortikalen Steifigkeit im Vergleich zur Kontrolle registriert werden, wobei dieser Effekt durch zusätzliche Behandlung mit Losartan aufgehoben werden konnte (Abb. 8).



**Abb. 8: Ergebnisse der in-vitro Versuchsreihe**

Kortikale Steifigkeit der Zellen in Abhängigkeit der Behandlungsgruppe der Versuchsreihe, 1-way ANOVA [ $F=16.48$ ,  $P<0.0001$ ] mit folgendem Tukey's multiple comparisons test,  $n=141-146$ ,  $*p<0.05$  vs. Kontrolle,  $+<0.05$  vs.  $0,1 \mu\text{M}$  Ang II; Darstellung der Daten im Streudiagramm mit Mittelwert  $\pm$ SD durch horizontale Linien.

#### 3.2 Ergebnisse der in-vivo Studie

##### 3.2.1 Gewichtsentwicklung und Körperfettzusammensetzung

Am Beginn der Studie waren die wt Mäuse schwerer als die ACE2 ko Mäuse (Tab. 5). Im Verlauf und am Ende der Studie konnte in allen Gruppen eine Gewichtszunahme registriert werden, wobei in den Kontrollgruppen die Gewichtszunahme der ACE2 ko Versuchstiere höher ausfiel als bei den wt Mäusen (Tab. 6). Innerhalb der wt Gruppe war die Gewichtszunahme der mit WD gefütterten und mit VEH behandelten Mäuse größer als die der Mäuse, die chow erhielten. Diese verstärkte Gewichtszunahme konnte durch eine Behandlung mit TEL

verhindert werden (Abb. 9-A). Bei den ACE2 ko Mäusen führte eine Behandlung mit TEL zu einer verminderten Gewichtszunahme im Vergleich mit der mit VEH behandelten und mit WD gefütterten Gruppe (Abb. 9-A).

**Tab. 5: Ausgangswerte vor Beginn der Behandlungsperiode**

Mittelwert±SD, ungepaarter t-Test, Welch's test oder Mann-Whitney-Test abhängig von der Verteilung der Werte, \*p<0.05 vs. wt, n=10 für Leptin, n=34-36.

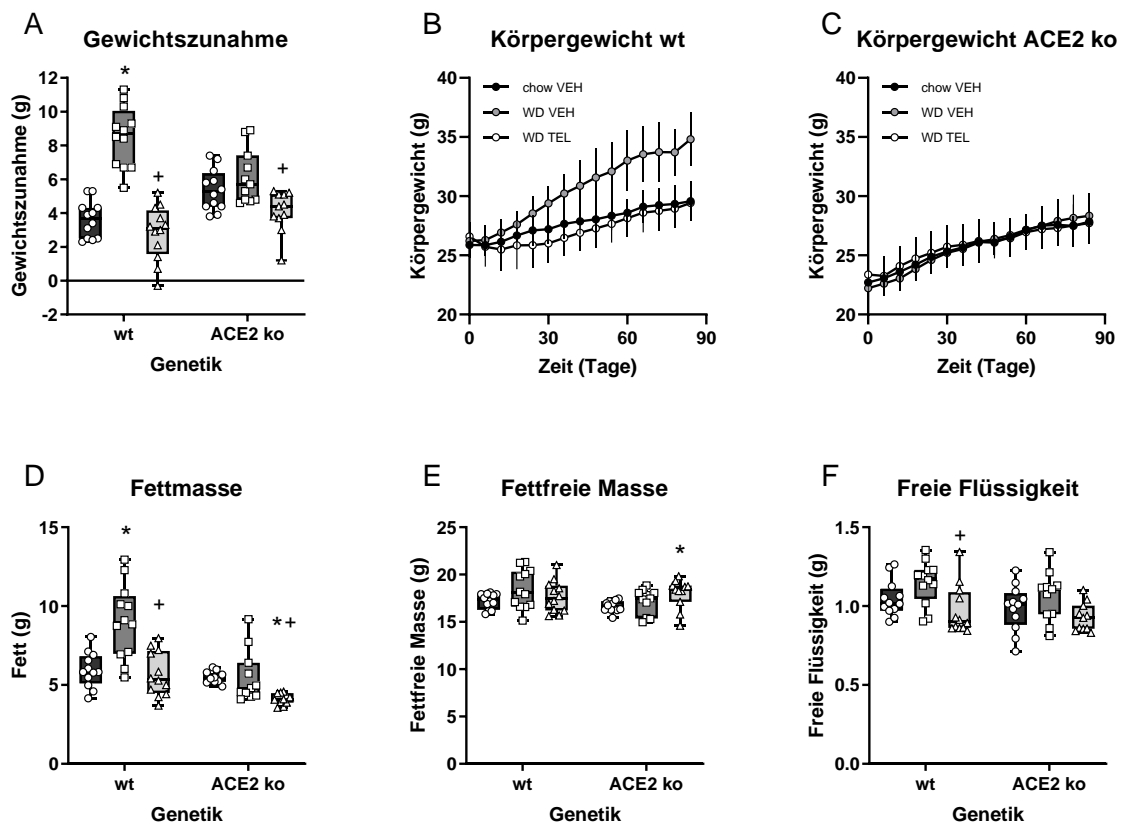
	<b>wt</b>	<b>ACE2 ko</b>
Körpergewicht (g)	26,2±1,2	22,8±1,2 *
Blutglukose (mg/dl)	151,1±31,5	180,0±20,1 *
Gesamtcholesterin (mg/dl)	109,9±21,3	121,9±27,3
Triglyzeride (mg/dl)	74,0±17,7	43,9±9,9 *
Leptin (ng/dl)	463±202	163±60 *

**Tab. 6: Funktionelle Parameter der Kontrollgruppen (chow Futter, VEH Behandlung) am Ende der Behandlungsperiode**

Mittelwert±SD, ungepaarter t-Test, Welch's test oder Mann-Whitney-Test abhängig von der Verteilung der Werte, \*p<0.05 vs. wt, n=553 für kortikale Steifigkeit<sup>Zellen</sup>, n=11-12.

	<b>wt</b>	<b>ACE2 ko</b>
Körpergewicht (g)	29,6±1,67	27,8±1,0 *
Gewichtszunahme (g)	3,7±1,11	5,13±1,25 *
Fettmasse (g)	5,94±1,1	5,46±0,35
Fettfreie Masse (g)	17,2±0,81	16,6±0,58
Freie Flüssigkeit (g)	1,05±0,11	0,98±0,14
Aortendurchmesser (mm)	0,28±0,02	0,27±0,02
Aortenlumen (mm <sup>2</sup> )	2,69±0,42	2,43±0,37
Aortenmedia (mm <sup>2</sup> )	0,26±0,08	0,32±0,04
Plauegehalt (mm <sup>2</sup> )	0,000±0,000	0,003±0,003 *
Fettgehalt (mm <sup>2</sup> )	0,000±0,000	0,000±0,000
Plauegehalt (%)	0,13±0,29	1,32±1,13 *
Kortikale Steifigkeit <sup>Zellen</sup> (pN/nm)	1,31±0,15	1,35±0,22 *
Kortikale Steifigkeit <sup>Tiere</sup> (pN/nm)	1,31±0,04	1,35±0,06

Vergleicht man die Ergebnisse der BCA der wt und ACE2 ko Mäuse, die chow erhielten und mit VEH behandelt wurden, so zeigt sich kein Unterschied in der Körperfettzusammensetzung (Tab. 6). Bei den wt Mäusen war die Fettmasse in der Gruppe, die WD erhielt und mit VEH behandelt wurde, im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Im Vergleich zur VEH-Behandlungsgruppe unter WD war die Fettmasse nach TEL Behandlung normalisiert (Abb. 9-D). Bei den ACE2 ko Mäusen konnte eine verminderte Fettmasse und eine vergrößerte fettfreie Masse bei der TEL-Behandlungsgruppe registriert werden (Abb. 9-D, E).



**Abb. 9: Gewichtsentwicklung und Körperfettzusammensetzung**

A: Körpergewichtszunahme, 1-way ANOVA beider genetischer Linien [wt:  $F=49,13$ ,  $P<0,0001$ , ACE2 ko:  $F=6,4$ ,  $P=0,0047$ ] mit folgendem Tukey's multiple comparison test; B: Entwicklung des Körpergewichts im Studienverlauf der wt Versuchstiere, Mittelwert $\pm$ SD als Punkt und vertikale Balken; C: Entwicklung des Körpergewichts im Studienverlauf der ACE2 ko Versuchstiere, Mittelwert $\pm$ SD als Punkt und vertikale Balken; D: Fettmasse in der BCA, Kruskal-Wallis Test beider genetischer Linien [wt:  $P=0,0009$ , ACE2 ko:  $P=0,0001$ ] mit folgendem Dunn's multiple comparison test; E: Fettfreie Masse in der BCA, 1-way ANOVA beider genetischer Linien [wt:  $F=1,777$ ,  $P=0,1850$ , ACE2 ko:  $F=3,586$ ,  $P=0,0397$ ] mit folgendem Tukey's multiple comparison test; F: Freie Flüssigkeit in der BCA, Kruskal-Wallis Test beider genetischer Linien [wt:  $P=0,0110$ , ACE2 ko:  $P=0,0650$ ] mit folgendem Dunn's multiple comparison test; A, D-F: Darstellung des Medians mit oberem und unterem Quartil als Boxplot, die Antennen zeigen den Minimal- und Maximalwert an, Darstellung chow VEH als Kreise, WD VEH als Quadrate, WD TEL als Dreiecke, \* $p<0,05$  vs. chow VEH, + $p<0,05$  vs. WD VEH;  $n=11-12$ .

### 3.2.2 Hormonspiegel und Glukosehomöostase

**Tab. 7: Plasmakonzentrationen verschiedener Parameter der Kontrollgruppen (chow Futter, VEH Behandlung) am Ende der Behandlungsperiode**

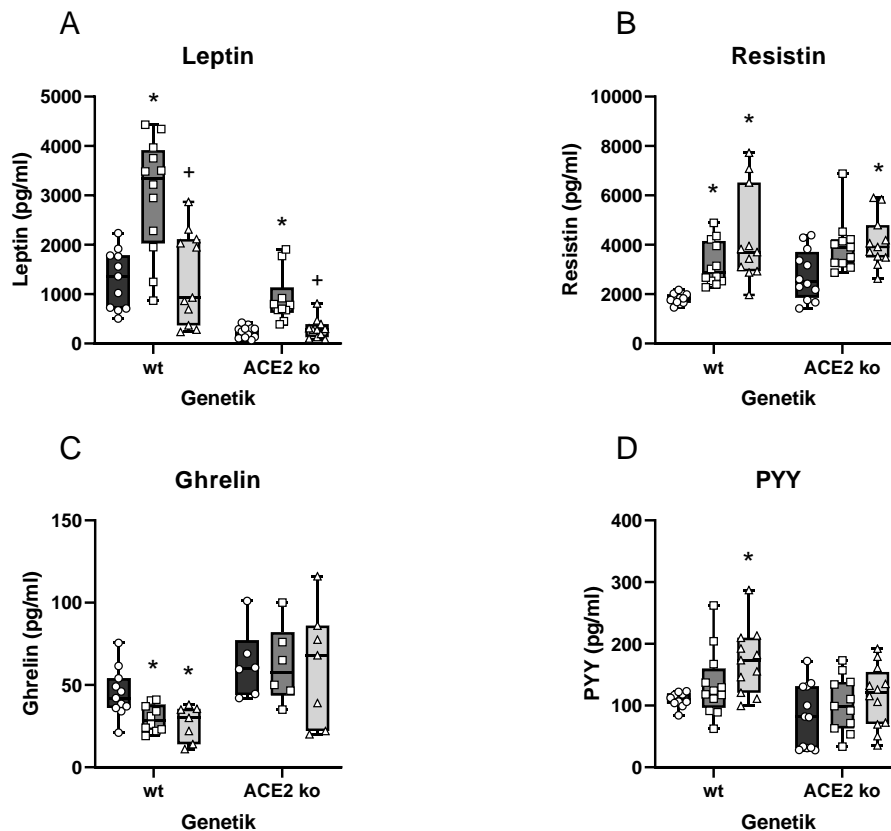
Mittelwert±SD, ungepaarter t-Test, Welch's test oder Mann-Whitney-Test abhängig von der Verteilung der Werte, \*p<0.05 vs. wt, n=6-12.

	<b>wt</b>	<b>ACE2 ko</b>
Leptin (pg/ml)	1296±595	239,5±114 *
Resistin (pg/ml)	1806±205	2783±1014 *
GIP (pg/ml)	398±97	81±70 *
GLP1 (pg/ml)	25,1±6,1	24,3±7,4
Sekretin (pg/ml)	59,5±11,1	101,3±28,7 *
PYY (pg/ml)	109±12	82±52
Amylin (pg/ml)	29,7±6,5	29,8±5,1
Ghrelin (pg/ml)	44,9±14,8	62,7±21,4
Blutglukose (mg/dl)	136±19	157±18 *
Insulin (pg/ml)	164±81	145±87
HOMA index	1,49±0,76	1,67±1,1
C-Peptid (pg/ml)	369±224	94±47 *
Glukagon (pg/ml)	89,6±16,1	31,1±16,3 *
Gesamtcholesterin (mg/dl)	140±22	148±26
Triglyzeride (mg/dl)	73,4±21,9	30,7±9,8 *
Nitrit (nM)	413±128	307±122

Sowohl vor Behandlungsbeginn als auch am Ende der Behandlungsperiode waren die Plasmakonzentrationen für Leptin niedriger und die Blutglukosewerte höher, wenn man die ACE2 ko Mäuse mit den wt Mäusen vergleicht (Tab. 5, 7). Ebenso zeigte sich am Ende der Behandlungsperiode eine Erhöhung der Resistinkonzentration der chow gefütterten ACE2 ko Mäuse im Vergleich mit den chow gefütterten wt Mäusen (Tab. 7). Bei ACE2 ko und wt Mäusen führte WD zu einer Erhöhung der Leptinspiegel, die bei gleichzeitiger TEL-Gabe nicht zu verzeichnen war (Abb. 10-A). Außerdem waren die Konzentrationen von C-Peptid

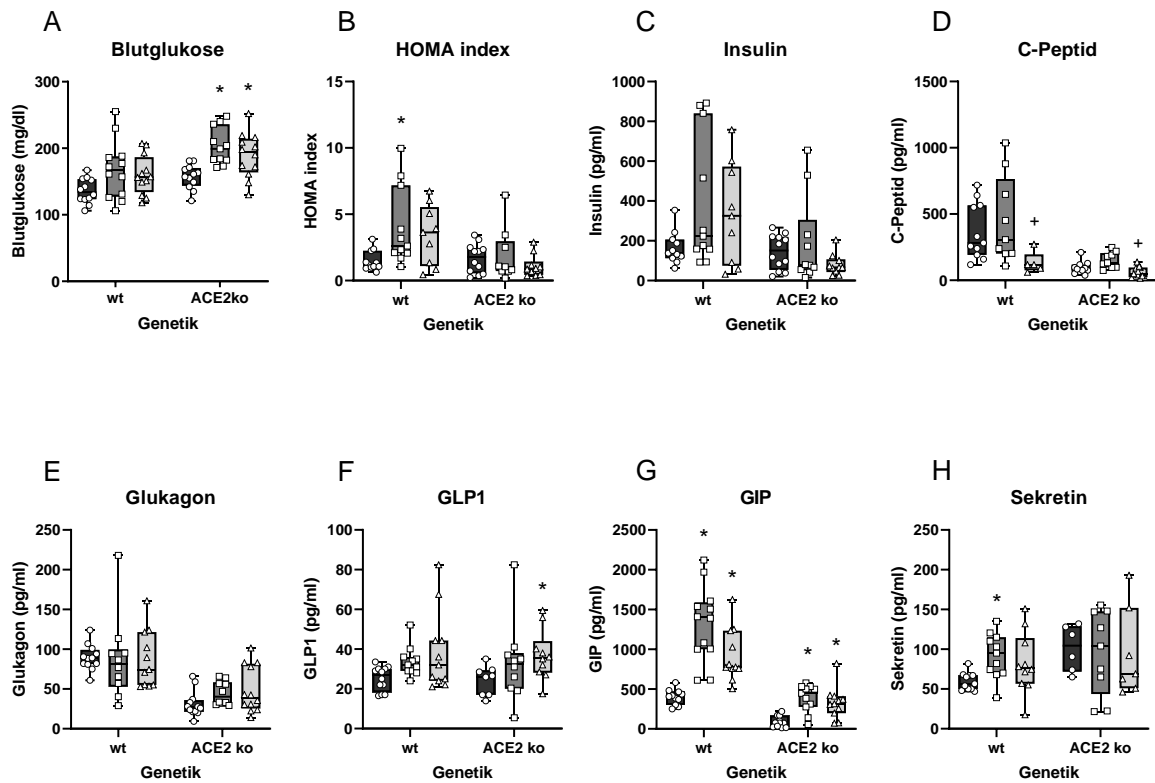
bei sowohl ACE2 ko als auch wt Versuchstieren in der TEL-Gruppe erniedrigt im Vergleich zur Behandlungsgruppe, die mit VEH behandelt wurde (Abb. 11-D).

Bei Ghrelin, Peptid YY (PYY), Insulin, Glukagon, Sekretin und beim Homeostasis Model Assessment Index (HOMA index) konnten in den ACE2 ko Versuchstieren keine Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Behandlungsgruppen registriert werden (Abb. 10-C, D, Abb. 11-B, C, E, H). Es zeigten sich erhöhte GLP1- und Resistinspiegel der TEL-Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe innerhalb der ACE2 ko Gruppe (Abb. 10-B, Abb. 11-F). Zudem waren die Blutglukose- und GIP-Spiegel beider Gruppen, die WD erhielten, innerhalb der ACE2 ko Versuchsgruppe am Ende der Studie erhöht (Abb. 11-A, G).



**Abb. 10: Plasmakonzentrationen verschiedener Hormone am Ende der Behandlungsperiode**

A: Leptin-Plasmakonzentration, Kruskal-Wallis Test beider genetischer Linien [wt:  $P=0,0013$ , ACE2 ko:  $P=0,0002$ ] mit folgendem Dunn's multiple comparison test; B: Resistin-Plasmakonzentration, Kruskal-Wallis Test beider genetischer Linien [wt:  $P<0,0001$ , ACE2 ko:  $P=0,0161$ ] mit folgendem Dunn's multiple comparison test; C: Ghrelin-Plasmakonzentration, Kruskal-Wallis Test beider genetischer Linien [wt:  $P=0,0100$ , ACE2ko:  $P=0,9987$ ] mit folgendem Dunn's multiple comparison test; D: PYY-Plasmakonzentration, 1-way ANOVA beider genetischer Linien [wt:  $F=4,998$ ,  $P=0,0134$ , ACE2 ko:  $F=1,340$ ,  $P=0,2762$ ] mit folgendem Tukey's multiple comparison test; Darstellung des Medians mit oberem und unterem Quartil als Boxplot, die Antennen zeigen den Minimal- und Maximalwert an, Darstellung chow VEH als Kreise, WD VEH als Quadrate, WD TEL als Dreiecke, \* $p<0.05$  vs. chow VEH, + $p<0.05$  vs. WD VEH;  $n=6-12$ .



**Abb. 11: Parameter der Glukosehomöostase am Ende der Behandlungsperiode**

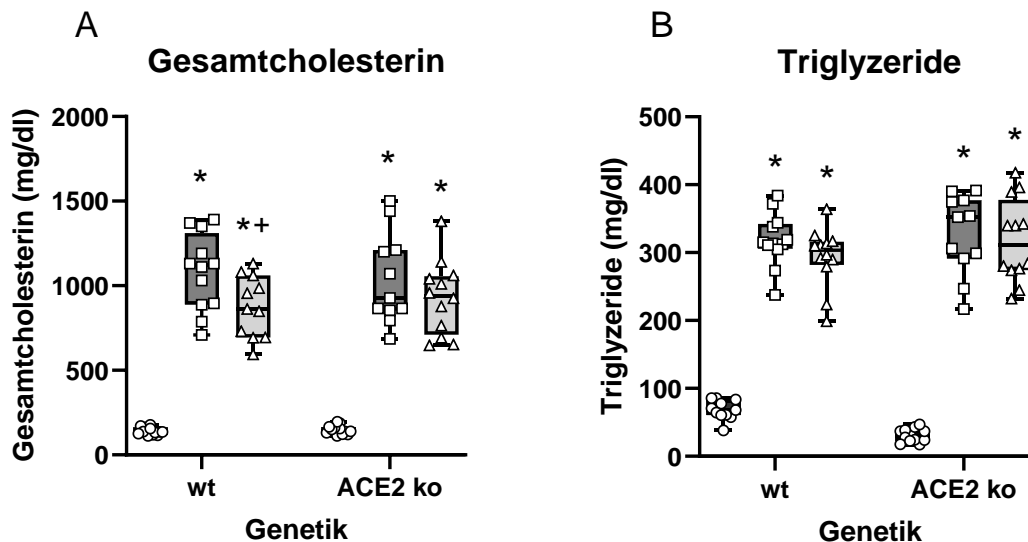
A: Glukose-Plasmakonzentration, 1-way ANOVA beider genetischer Linien [wt:  $F=3,057$ ,  $P=0,0605$ , ACE2 ko:  $F=8,575$ ,  $P=0,0010$ ] mit folgendem Tukey's multiple comparison test; B: HOMA index, Kruskal-Wallis Test beider genetischer Linien [wt:  $P=0,0277$ , ACE2 ko:  $P=0,5439$ ] mit folgendem Dunn's multiple comparison test; C: Insulin-Plasmakonzentration, Kruskal-Wallis Test beider genetischer Linien [wt:  $P=0,2140$ , ACE2 ko:  $P=0,2673$ ] mit folgendem Dunn's multiple comparison test; D: C-Peptid-Plasmakonzentration, Kruskal-Wallis Test beider genetischer Linien [wt:  $P=0,0345$ , ACE2 ko:  $P=0,0033$ ] mit folgendem Dunn's multiple comparison test; E: Glukagon-Plasmakonzentration, Kruskal-Wallis Test beider genetischer Linien [wt:  $P=0,6769$ , ACE2 ko:  $P=0,0622$ ] mit folgendem Dunn's multiple comparison test; F: GLP1-Plasmakonzentration Kruskal-Wallis Test beider genetischer Linien [wt:  $P=0,0385$ , ACE2 ko:  $P=0,0541$ ] mit folgendem Dunn's multiple comparison test; G: GIP-Plasmakonzentration, Kruskal-Wallis Test beider genetischer Linien [wt:  $P<0,0001$ , ACE2 ko:  $P=0,0005$ ] mit folgendem Dunn's multiple comparison test; H: Sekretin-Plasmakonzentration, 1-way ANOVA beider genetischer Linien [wt:  $F=3,91$ ,  $P=0,0314$ , ACE2 ko:  $F=0,03013$ ,  $P=0,9704$ ] mit folgendem Tukey's multiple comparison test; Darstellung des Medians mit oberem und unterem Quartil als Boxplot, die Antennen zeigen den Minimal- und Maximalwert an, Darstellung chow VEH als Kreise, WD VEH als Quadrate, WD TEL als Dreiecke, \* $p<0.05$  vs. chow VEH, + $p<0.05$  vs. WD VEH;  $n=5-12$ .

Innerhalb der wt Versuchstiere führte eine WD Fütterung, unabhängig von VEH oder TEL Behandlung, zu einem Anstieg der Resistin- und GIP- und einem Abfall des Ghrelinspiegels (Abb. 10-B, C, Abb. 11-G). In der WD TEL Gruppe konnte zudem ein Anstieg von PYY nachgewiesen werden (Abb. 10-D). Unter WD Fütterung und VEH Behandlung zeigte sich bei den wt Mäusen eine Erhöhung des HOMA index und der Sekretinkonzentration, die unter TEL-Behandlung nicht nachgewiesen werden konnten (Abb. 11-B, H). Die Konzentrationen von Glukose, Insulin,

Glukagon und GLP1 zeigten keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen der wt Versuchstiere (Abb. 11-A, C, E, G).

### 3.2.3 Cholesterin- und Triglyzeridspiegel

Vor Beginn der Behandlungsperiode war der Triglyzeridspiegel der ACE2 ko Mäuse niedriger als der der wt Mäusen, am Ende der Studie zeigte sich in den chow gefütterten Kontrollgruppen für die Triglyzeridspiegel weiterhin ein Unterschied (Tab. 5, 7). Die Fütterung mit WD und Behandlung mit PCSK9<sup>DY</sup>-AAV führte unabhängig von der genetischen Ausstattung der Versuchstiere zu einer Zunahme der Cholesterin- und Triglyzeridspiegel. Bei den wt Mäusen konnte diesem Effekt auf den Cholesterinspiegel mit zusätzlicher TEL-Behandlung partiell entgegengewirkt werden (Abb. 12).



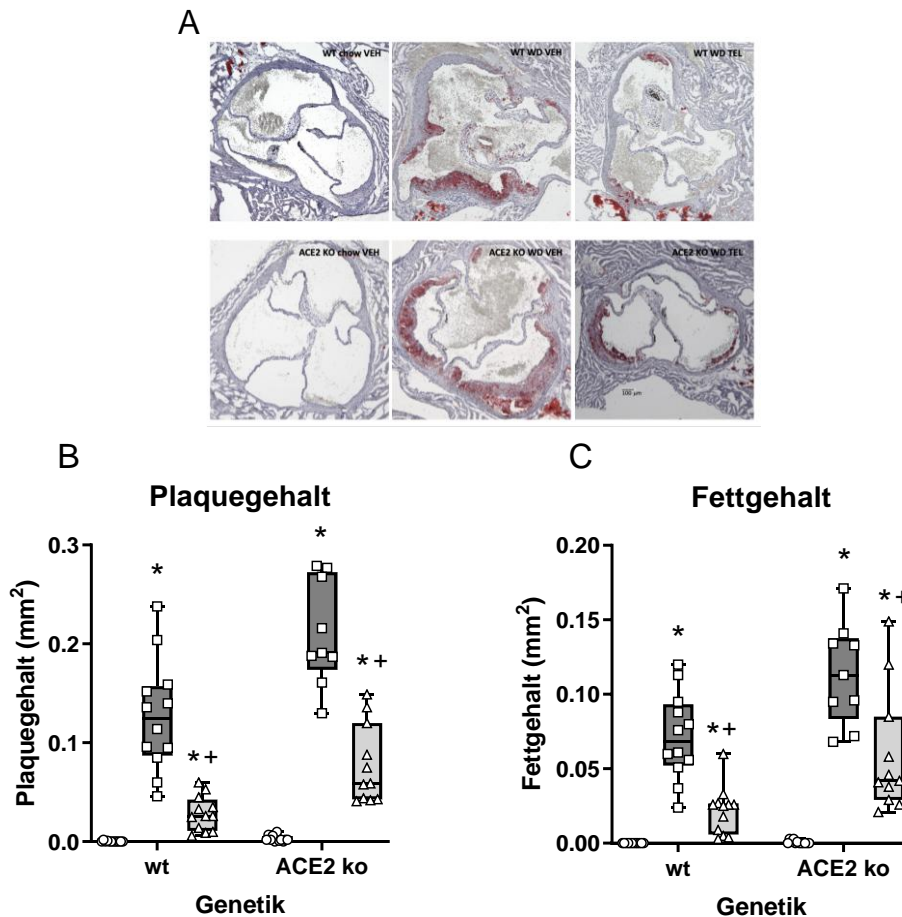
**Abb. 12: Cholesterin- und Triglyzeridspiegel am Ende der Behandlungsperiode**

A: Plasmakonzentration Gesamtcholesterin, 1-way ANOVA beider genetischer Linien [wt: F=104, P<0,0001, ACE2 ko: F=70,57, P<0,0001] mit folgendem Tukey's multiple comparison test; B: Plasmakonzentration Triglyzeride, 1-way ANOVA beider genetischer Linien [wt: F=169,1, P<0,0001, ACE2 ko: F=137,5, P<0,0001] mit folgendem Tukey's multiple comparison test; Darstellung des Medians mit oberem und unterem Quartil als Boxplot, die Antennen zeigen den Minimal- und Maximalwert an, Darstellung chow VEH als Kreise, WD VEH als Quadrate, WD TEL als Dreiecke, \*p<0.05 vs. chow VEH, +p<0.05 vs. WD VEH; n=11-12.

### 3.2.4 Histologische Untersuchung der Aorta und funktionelle Parameter des Herz-Kreislaufsystems

Im Vergleich der Gruppen, die chow erhielten und mit VEH behandelt wurden, zeigte sich am Ende der Behandlungsperiode kein Unterschied zwischen wt und ACE2 ko Mäusen im Fettgehalt, der Plaquegehalt war hingegen in den ACE2 ko

Versuchstieren erhöht (Tab. 6). Sowohl in wt als auch in ACE2 ko Mäusen führte die WD Fütterung und PCSK9<sup>DY</sup>-AAV-Injektion zu einer Erhöhung von Plaquegehalt und Fettgehalt, die durch die zusätzliche Behandlung mit TEL zumindest partiell verhindert wurde (Abb. 13).

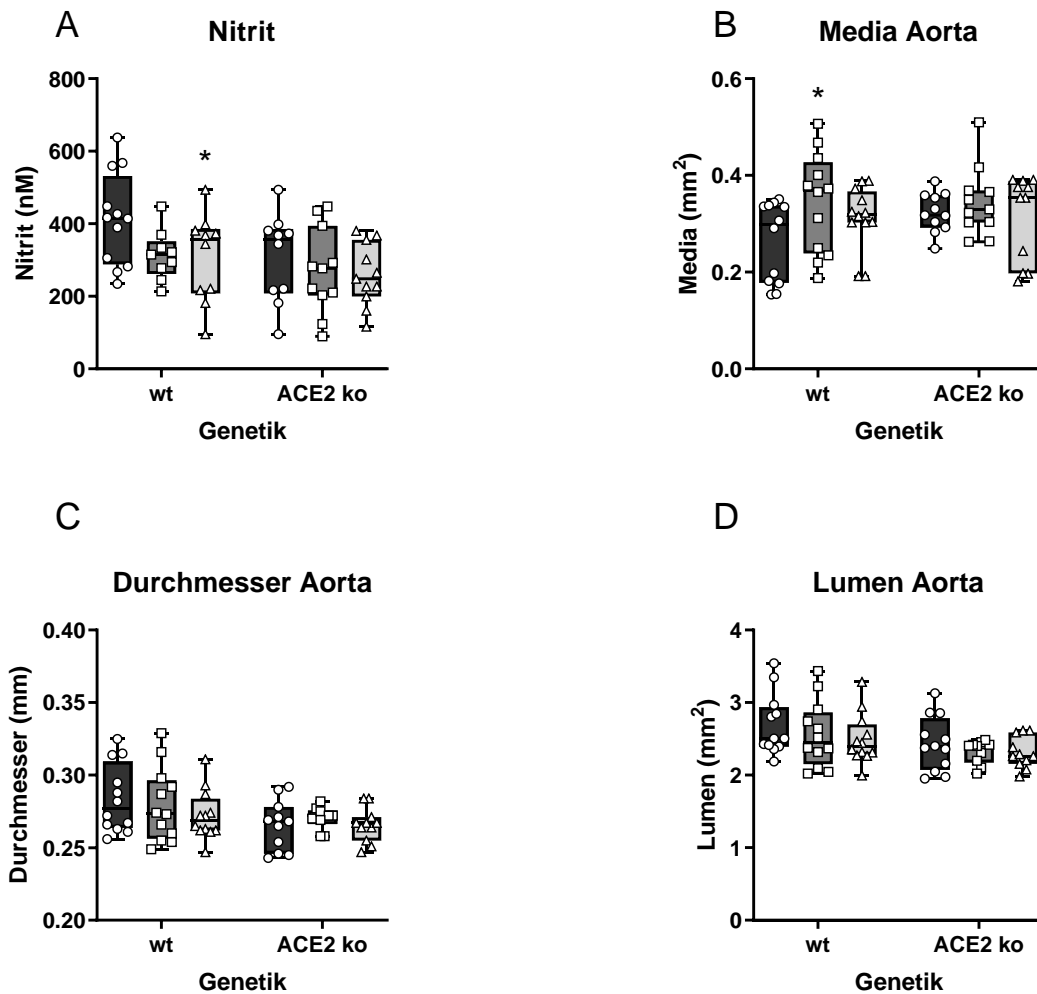


**Abb. 13: Histologische Untersuchung der Aortenwurzel am Ende der Behandlungsperiode**

A: Darstellung beispielhafter Schnitte der Aortenwurzel nach Oil Red-O Färbung, Maßstabsbalken: 100 µm; B: Quantitative Untersuchung des Plaquegehalts, Brown-Forsythe-ANOVA beider genetischer Linien [wt:  $P < 0.0001$ , ACE2 ko:  $P < 0.0001$ ] mit folgendem Dunnett's multiple comparison test; C: Quantitative Untersuchung des Fettgehalts, Kruskal-Wallis Test wt [ $P < 0.0001$ ] mit folgendem Dunn's multiple comparisons test, Brown-Forsythe-ANOVA ACE2 ko [ $P < 0.0001$ ] mit folgendem Dunnett's multiple comparison test; B,C: Darstellung des Medians mit oberem und unterem Quartil als Boxplot, die Antennen zeigen den Minimal- und Maximalwert an, Darstellung chow VEH als Kreise, WD VEH als Quadrate, WD TEL als Dreiecke, \* $p < 0.05$  vs. chow VEH, + $p < 0.05$  vs. WD VEH; n=9-12.

Die Bestimmung von Nitrit als Surrogatparameter für NO ergab keine Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen der wt und ACE2 ko Versuchstiere am Ende der Behandlungsperiode, sowie keine Unterschiede zwischen den Behandlungs-

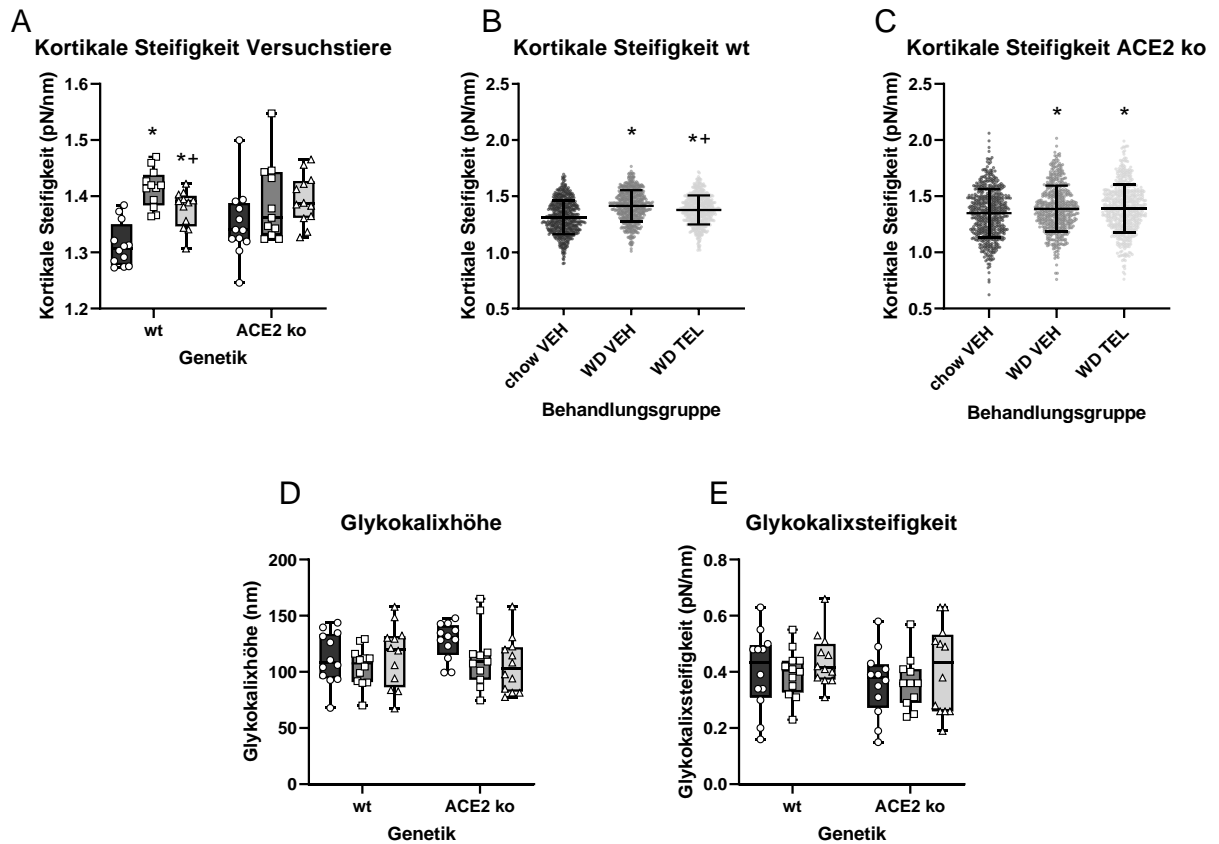
gruppen innerhalb der ACE2 ko Mäuse. Lediglich zeigte sich ein Unterschied innerhalb der wt Mäuse zwischen der chow gefütterten und der TEL Behandlungsgruppe (Tab. 7, Abb. 14-A). Ebenso zeigten sich keine Unterschiede für die funktionellen Parameter der Aorta Media, Durchmesser und Lumen, mit Ausnahme einer Erhöhung der Aortenmedia innerhalb der wt Gruppe nach WD Fütterung (Abb. 14-B-D).



**Abb. 14: Funktionelle Parameter des Herz-Kreislaufsystems am Ende der Behandlungsperiode**

A: Plasmakonzentration Nitrit, 1-way ANOVA beider genetischer Linien [wt:  $F=3,073$ ,  $P=0,0622$ , ACE2 ko:  $F=0,5496$ ,  $P=0,5831$ ] mit folgendem Tukey's multiple comparison test; B: Aortenmedia, Kruskal-Wallis Test beider genetischer Linien [wt:  $P=0,0869$ , ACE2 ko:  $P=0,8157$ ] mit folgendem Dunn's multiple comparisons test; C: Durchmesser Aortenwurzel, 1-way ANOVA beider genetischer Linien [wt:  $F=0,7693$ ,  $P=0,4714$ , ACE2 ko:  $F=0,5043$ ,  $P=0,6091$ ] mit folgendem Tukey's multiple comparison test; D: Lumen Aortenwurzel, Kruskal-Wallis Test beider genetischer Linien [wt:  $P=0,3768$ , ACE2 ko:  $P=0,8209$ ] mit folgendem Dunn's multiple comparisons test; Darstellung des Medians mit oberem und unterem Quartil als Boxplot, die Antennen zeigen den Minimal- und Maximalwert an, Darstellung chow VEH als Kreise, WD VEH als Quadrate, WD TEL als Dreiecke, \* $p<0,05$  vs. chow VEH, + $p<0,05$  vs. WD VEH;  $n=9-12$ .

### 3.2.5 Rasterkraftmikroskopie

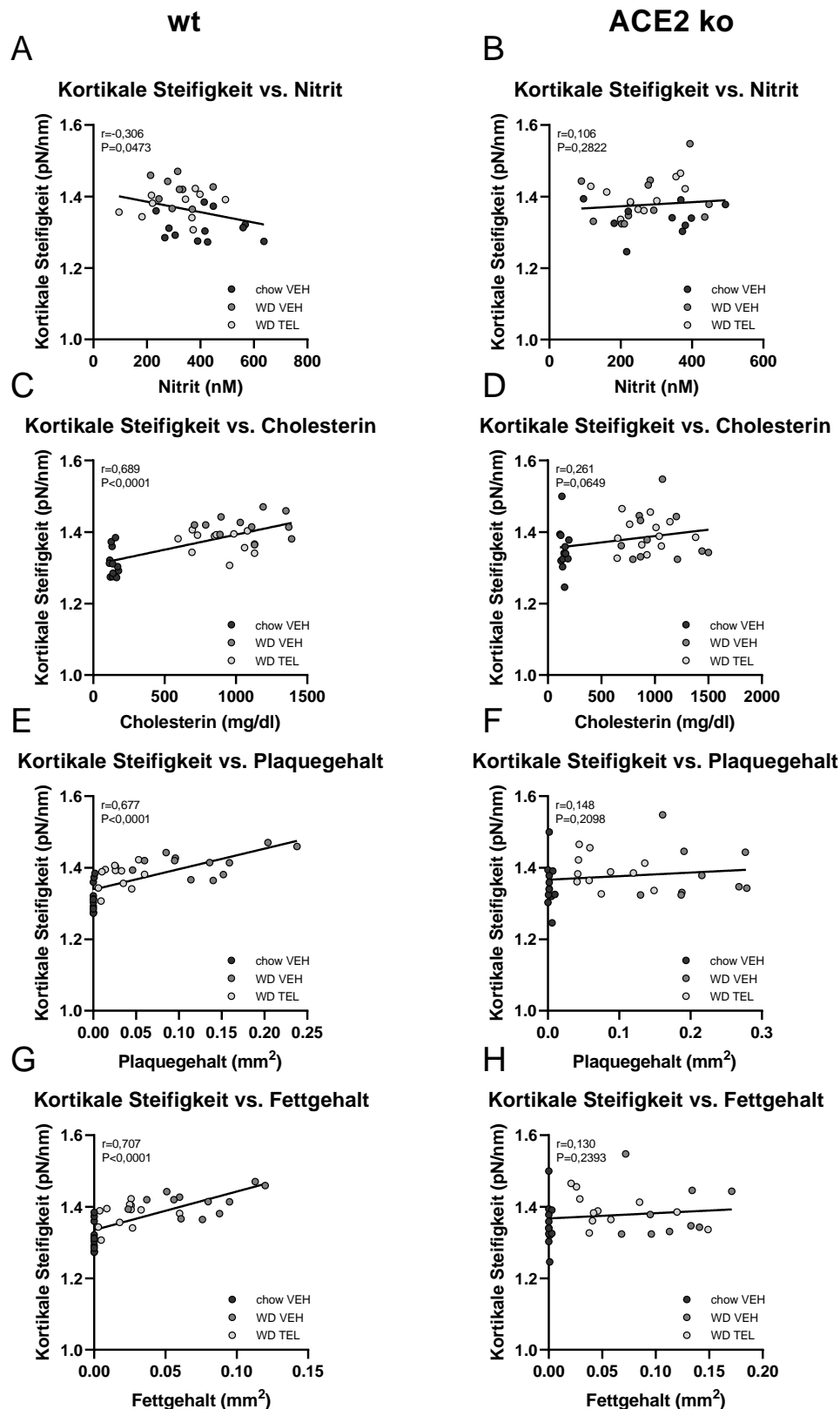


**Abb. 15: Ergebnisse der Rasterkraftmikroskopie der in-vivo Studie**

A: Kortikale Steifigkeit bezogen auf die Versuchstiere, 1-way ANOVA beider genetischer Linien [wt:  $F=24,64$ ,  $P<0,0001$ , ACE2 ko:  $F=1,797$ ,  $P=0,1821$ ] mit folgendem Tukey's multiple comparisons test; B: Kortikale Steifigkeit aller gemessenen Endothelzellen der wt Gruppe, Kruskal-Wallis Test [ $P<0,0001$ ] mit folgendem Dunn's multiple comparisons test; C: Kortikale Steifigkeit aller gemessenen Endothelzellen der ACE2 ko Gruppe, Kruskal-Wallis Test [ $P=0,0037$ ] mit folgendem Dunn's multiple comparisons test; D: Glykokalixhöhe bezogen auf die Versuchstiere, 1-way ANOVA beider genetischer Linien [wt:  $F=0,6119$ ,  $P=0,5484$ , ACE2 ko:  $F=2,753$ ,  $P=0,0788$ ] mit folgendem Tukey's multiple comparisons test; E: Glykokalixsteifigkeit bezogen auf die Versuchstiere, 1-way ANOVA beider genetischer Linien [wt:  $F=0,589$ ,  $P=0,5606$ , ACE2 ko:  $F=0,5959$ ,  $P=0,5570$ ] mit folgendem Tukey's multiple comparisons test; A, D, E: Darstellung des Medians mit oberem und unterem Quartil als Boxplot, die Antennen zeigen den Minimal- und Maximalwert an, Darstellung chow VEH als Kreise, WD VEH als Quadrate, WD TEL als Dreiecke,  $n=11-12$ ; B, C: Darstellung der Daten im Streudiagramm mit Mittelwert  $\pm$ SD durch horizontale Linien,  $n=520-562$ ; \* $p<0,05$  vs. chow VEH, \* $p<0,05$  vs. WD VEH.

Im Vergleich der Kontrollgruppen der wt und ACE2 ko Versuchstiere zeigte sich in der Auswertung der kortikalen Steifigkeit der Endothelzellen auf Ebene der einzelnen Zellen eine Erhöhung der ACE2 ko Gruppe im Vergleich mit der wt Gruppe, vergleicht man die beiden Gruppen auf Versuchstierebene ergab sich kein signifikanter Unterschied (Tab. 6). Sowohl auf Versuchstierebene als auch auf Zellebene führte die Fütterung mit WD und die PCSK9<sup>DY</sup>-AAV-Injektion bei den wt Mäusen zu einer Erhöhung der kortikalen Steifigkeit. Durch zusätzliche Gabe von TEL konnte dieser Effekt zumindest partiell verhindert werden (Abb. 15-A, B). Bei den Versuchstieren mit ACE2 ko konnte nur auf Zellebene ein Unterschied der Behandlungsgruppen nachgewiesen werden. Hier zeigte sich eine Erhöhung der kortikalen Steifigkeit der beiden WD-gefütterten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 15-A, C). Für Glykokalixhöhe und -steifigkeit ergab sich kein Unterschied der Behandlungsgruppen, unabhängig von der genetischen Ausstattung der Versuchstiere (Abb. 15-D, E).

Korrelationsanalysen zeigten eine negative Korrelation von kortikaler Steifigkeit und Plasmanitritkonzentration der wt Mäuse, die in der ACE2 ko Gruppe nicht nachzuweisen war (Abb. 16-A, B). Auch die positiven Korrelationen zwischen kortikaler Steifigkeit und Cholesterinkonzentration, Plaque- und Fettgehalt der wt Versuchstiere waren bei den ACE2 ko Mäusen aufgehoben (Abb. 16-C-H).



**Abb. 16: Korrelationsanalysen der Ergebnisse der Rasterkraftmikroskopie**

Korrelationsanalysen zwischen der kortikalen Steifigkeit und der Plasmanitritkonzentration (A/B), der Plasmacholesterinkonzentration (C/D), dem Plaquegehalt (E/F) und dem Fettgehalt (G/H) der Versuchstiere der wt Gruppe (A/C/E/G) und der ACE2 ko Gruppe (B/D/F/H), Korrelationsanalysen mittels 1-tailed Pearson test, n=10-12.

### 3.2.6 RNA-Sequenzierung

Die Hauptkomponentenanalysen (PCA)-Plots und Vulkan-Plots der RNAseq-Analysen zeigten deutliche Stammunterschiede zwischen wt und ACE2 ko Mäusen der beiden Kontrollgruppen (Abb. 17). PCA-Plots sowie Vulkan-Plots zeigen außerdem, dass Gene in beiden genetischen Gruppen infolge der verschiedenen Behandlungsregime hoch- und herunterreguliert wurden (Abb. 18). In den Aorten der wt und ACE2 ko Mäuse wurden 579 bzw. 652 Gene zwischen den Gruppen, die WD erhielten und mit VEH behandelt wurden, und den Kontrollgruppen unterschiedlich reguliert, wobei mehr Gene hoch- als herunterreguliert wurden (wt: 510/69 – hoch/herunter, ACE 2 ko: 477/175 – hoch/herunter). Bei den wt Mäusen wurden 35 Gene (3/32 – hoch/herunter) zwischen den WD-gefütterten mit VEH und den WD-gefütterten mit TEL behandelten Mäusen unterschiedlich exprimiert. 16 dieser 35 Gene sind mit Atherosklerose assoziiert. Darüber hinaus wurden 15 dieser 35 Gene durch TEL fast im gleichen Maße herunterreguliert wie eine Hochregulation durch die PCSK9<sup>DY</sup>-AAV-Injektion und WD Fütterung stattgefunden hatte, wobei wiederum 9 dieser Gene mit Atherosklerose in Verbindung stehen. Dazu zählen Myh1, Pvalb, Ckm, Tnnt13, Mmp12, Acta1, Npr3 und Fam20c (Abb. 19). Im Gegensatz zu den wt Versuchstieren wurden bei den ACE2 ko Mäusen als Reaktion auf die TEL-Behandlung mehr Gene (insgesamt 2424: 1165/1259 – hoch/herunter) unterschiedlich exprimiert als bei den mit VEH behandelten Mäusen. Beim Vergleich dieser 2424 Gene mit den 652 Genen, die bei ACE2 ko Mäusen durch die PCSK9<sup>DY</sup>-AAV-Injektion und WD Fütterung im Vergleich zur Kontrollgruppe reguliert wurden, wurde eine Schnittmenge von 274 Genen identifiziert. Obwohl sich hier eine Signifikanz zeigte, waren die meisten dieser Gene nur geringfügig verändert. 23 dieser 274 Gene wurden durch TEL in den ACE2 ko Mäusen gegenreguliert, allerdings stehen nur 8 dieser Gene mit Atherosklerose in Verbindung (Ilgkv12-98, Hsd17b6, Mep1b, Npc111, Hdac11, Rbl1, Fam20c, Abcg1) und dieser Zusammenhang zur Atherosklerose war laut Datenbank auch eher schwach (Abb. 19).

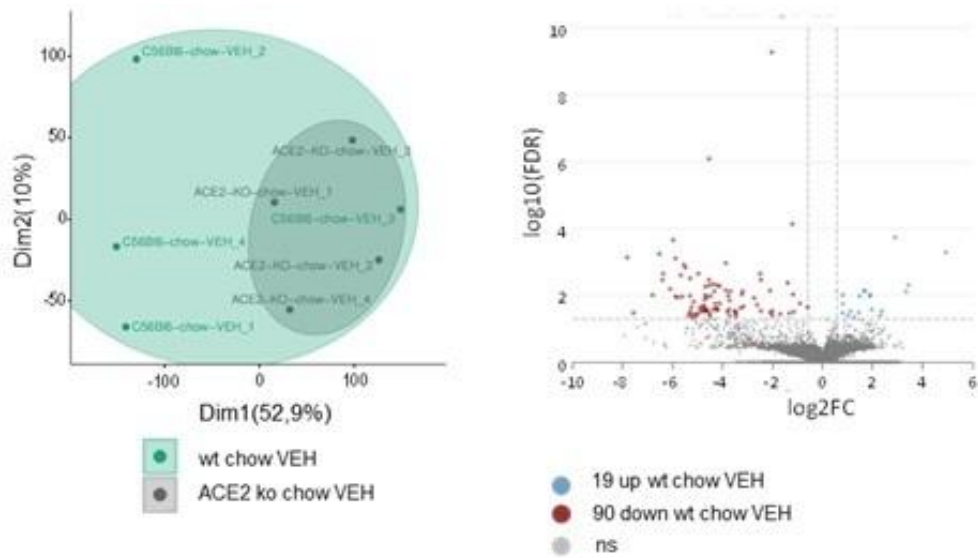


Abb. 17: Hauptkomponentenanalysen (PCA; unter Verwendung von FactoMineR) und Volcano Blots ( $FDR \leq 0,05$ ,  $-0,585 < \log_2FC < 0,585$ ) im Vergleich zwischen chow-gefütterten wt (C57BL/6N)- und ACE2 ko-Mäusen

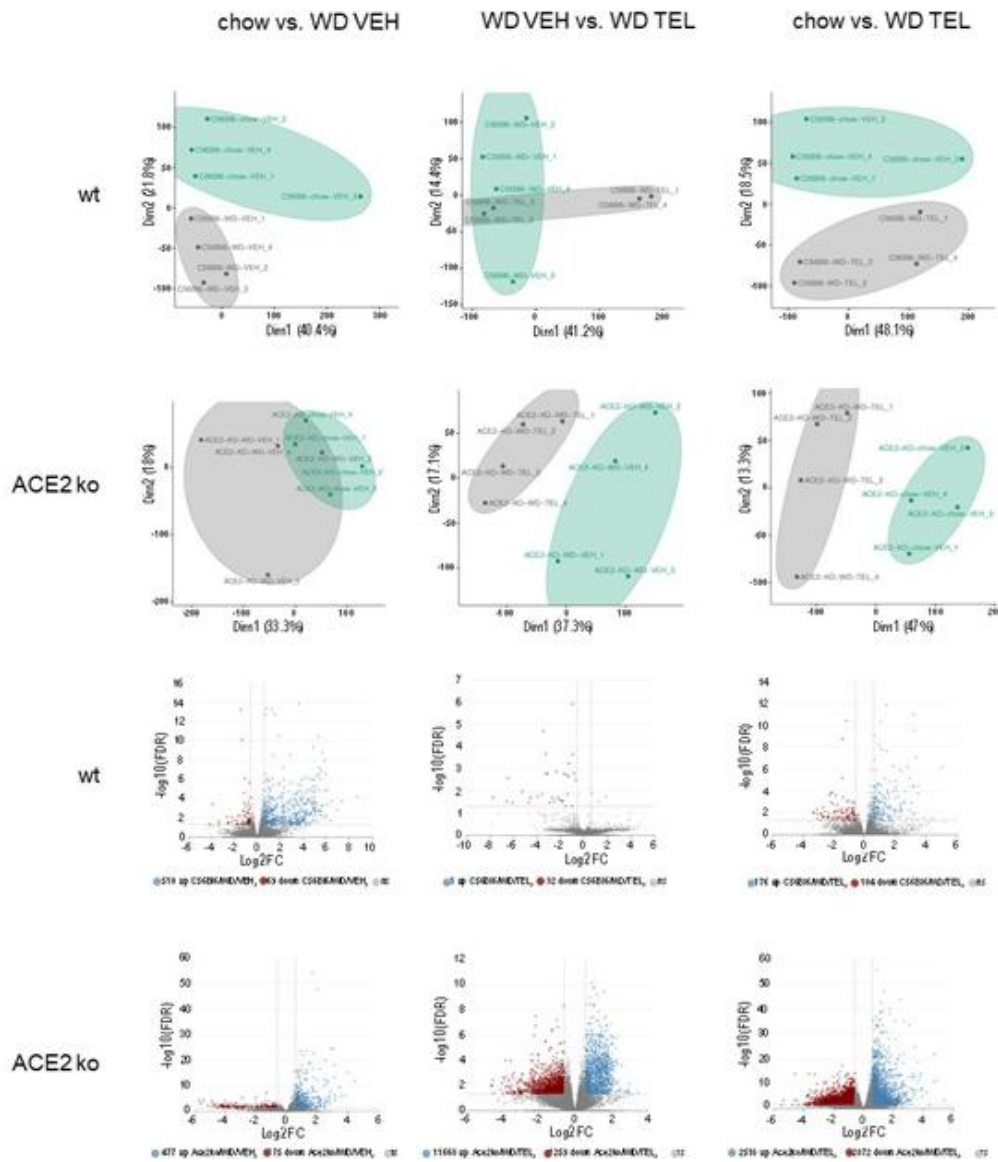


Abb. 18: Hauptkomponentenanalysen (PCA; unter Verwendung von FactoMineR) und Volcano Blots (FDR  $\leq$  0,05,  $-0,585 < \log_2FC > 0,585$ ) von wt (C57BL/6N)- und ACE2 ko-Mäusen in Abhängigkeit der Behandlungsgruppe

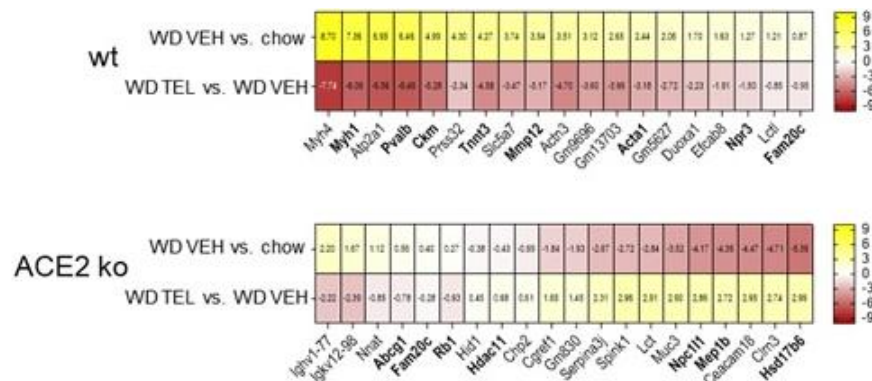


Abb. 19: Veränderungen in der Genexpression in wt (C57BL/6N)- und ACE2 ko-Mäusen, die durch die PCSK9<sup>DY</sup>-AAV-Injektion und WD Fütterung verändert wurden, aber auch durch die TEL Therapie gegenreguliert wurden

Die mit Atherosklerose assoziierten Gene sind fett hervorgehoben.

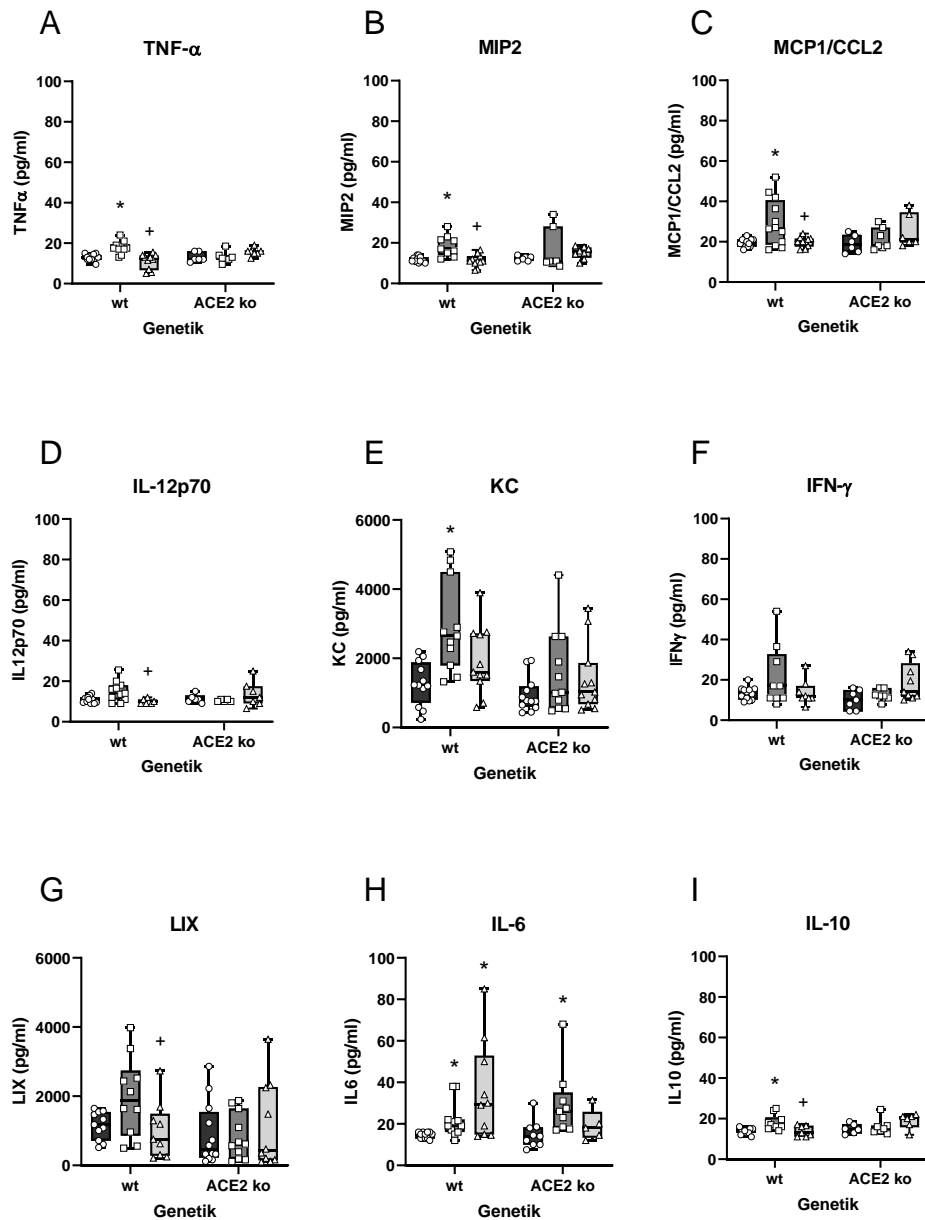
### 3.2.7 Zytokine

Im Vergleich der Gruppen, die chow erhielten und mit NaCl injiziert und mit VEH behandelt wurden zeigten sich keine Unterschiede zwischen wt und ACE2 ko Mäusen (Tab. 8). Bei den Versuchstieren ohne genetischen ko führte die Atherosklerose-Induktion zu einem Anstieg von TNF- $\alpha$ , MIP2, MCP1/CCL2, KC, IL-6 und IL-10 (Abb. 20-A-C, E, H, I). Dieser Effekt konnte – mit Ausnahme von IL-6 – durch eine TEL Therapie vermieden werden. Bei den Mäusen mit ACE2 ko konnte lediglich ein IL-6-Anstieg unter WD Fütterung und VEH Behandlung beobachtet werden (Abb. 20-H).

**Tab. 8: Plasmakonzentrationen verschiedener Zytokine der Kontrollgruppen (chow Futter, VEH Behandlung) am Ende der Behandlungsperiode**

Mittelwert $\pm$ SD, ungepaarter t-Test oder Welch's test je nach Varianzhomogenität, \* $p < 0.05$  vs. wt, n=6-12.

	<b>wt</b>	<b>ACE2 ko</b>
MCP1/CCL2 (pg/ml)	19,3 $\pm$ 1,96	19 $\pm$ 4,43
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	12,8 $\pm$ 1,56	13,1 $\pm$ 2,3
IFN- $\gamma$ (pg/ml)	13,3 $\pm$ 3,19	10,1 $\pm$ 4,73
KC (pg/ml)	1274 $\pm$ 624	951 $\pm$ 507
MIP2 (pg/ml)	11,7 $\pm$ 1,39	12,3 $\pm$ 1,21
LIX (pg/ml)	1152 $\pm$ 404	896 $\pm$ 906
IL-6 (pg/ml)	14,5 $\pm$ 1,45	14,9 $\pm$ 6,73
IL-10 (pg/ml)	13,6 $\pm$ 1,43	15 $\pm$ 2,43
IL-12p70 (pg/ml)	10,9 $\pm$ 1,7	11,3 $\pm$ 2,07



**Abb. 20: Plasmakonzentrationen verschiedener Zytokine am Ende der Behandlungsperiode**

A: TNF- $\alpha$ -Plasmakonzentration, Kruskal-Wallis Test beider genetischer Linien [wt:  $P=0,0004$ , ACE2 ko:  $P=0,0733$ ] mit folgendem Dunn's multiple comparisons test; B: MIP2-Plasmakonzentration, Kruskal-Wallis Test beider genetischer Linien [wt:  $P=0,0010$ , ACE2 ko:  $P=0,2615$ ] mit folgendem Dunn's multiple comparisons test; C: MCP1/CCL2-Plasmakonzentration, 1-way ANOVA beider genetischer Linien [wt:  $F=7,295$ ,  $P=0,0025$ , ACE2 ko:  $F=1,539$ ,  $P=0,2446$ ] mit folgendem Tukey's multiple comparisons test; D: IL-12p70-Plasmakonzentration, Kruskal-Wallis Test beider genetischer Linien [wt:  $P=0,0240$ , ACE2 ko:  $P=0,6935$ ] mit folgendem Dunn's multiple comparisons test; E: KC-Plasmakonzentration, Kruskal-Wallis Test beider genetischer Linien [wt:  $P=0,0038$ , ACE2 ko:  $P=0,3907$ ] mit folgendem Dunn's multiple comparisons test; F: IFN- $\gamma$ -Plasmakonzentration, Kruskal-Wallis Test beider genetischer Linien [wt:  $P=0,5443$ , ACE2 ko:  $P=0,1467$ ] mit folgendem Dunn's multiple comparisons test; G: LIX-Plasmakonzentration, Kruskal-Wallis Test beider genetischer Linien [wt:  $P=0,1076$ , ACE2 ko:  $P=0,9953$ ] mit folgendem Dunn's multiple comparisons test; H: IL-6-Plasmakonzentration, Kruskal-Wallis Test beider genetischer Linien [wt:  $P=0,0041$ , ACE2 ko:  $P=0,0198$ ] mit folgendem Dunn's multiple comparisons test; I: IL-10-Plasmakonzentration, Kruskal-Wallis Test beider genetischer Linien [wt:  $P=0,0043$ , ACE2 ko:  $P=0,2079$ ] mit folgendem Dunn's multiple comparisons test; Darstellung des Medians mit oberem und unterem Quartil als Boxplot, die Antennen zeigen den Minimal- und Maximalwert an, Darstellung chow VEH als Kreise, WD VEH als Quadrate, WD TEL als Dreiecke, \* $p<0,05$  vs. chow VEH, + $p<0,05$  vs. WD VEH;  $n=5-12$ .

## 4 Diskussion

### 4.1 Gewichtsentwicklung und Körperfettzusammensetzung

Die in dieser Arbeit verwendete WD hat im Vergleich mit dem Standard chow Futter einen erhöhten Energie- und Fettgehalt und vergleichbare Futter führten in diversen Studien zu einer Futter-induzierten Adipositas und erhöhten Körperfettanteil im Mausmodell [195, 196]. In dieser Arbeit zeigten sich erwartungsgemäß eine stärkere Gewichtszunahme und erhöhte Fettmasse der wt Versuchstiere, die mit WD gefüttert wurden und mit PCSK9<sup>DY</sup>-AAV behandelt worden waren, im Vergleich mit der Kontrollgruppe, die chow erhielten und mit NaCl injiziert worden waren (Abb. 9).

Der anti-adipöse Effekt von TEL führte bei den wt Versuchstieren zu einer Vermeidung der verstärkten Gewichtszunahme und Erhöhung der Fettmasse durch WD Fütterung (Abb. 9). Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit diversen vorherigen Arbeiten, die die anti-adipösen Eigenschaften von ARBs zeigen konnten [184, 197].

Der ACE2/Ang(1-7)/Mas-Achse konnte in unterschiedlichen Studien anti-adipöse Effekte zugeschrieben werden [126, 198], sodass ein erhöhtes Gewicht der ACE2 ko Mäuse zu erwarten wäre. Entgegen diesen Erwartungen waren die ACE2 ko Mäuse vor Versuchsbeginn und am Ende der Behandlungsperiode leichter als die wt Versuchstiere (Tab. 5, 6). Dieser Gewichtsunterschied findet seinen Ursprung in einer gestörten Aminosäure-Resorption des Darmes der ACE2 ko Mäuse. V.a. die Aminosäure Tryptophan, die eine Vorstufe von Serotonin darstellt, ist durch diese Malabsorption betroffen [199]. Die ACE2 ko Mäuse nahmen durch WD zwar durch o.g. genetische Effekte nicht stärker zu als unter chow Fütterung, eine TEL Therapie führte aber trotz dessen zu einer geringeren Gewichtszunahme sowie zu einer verminderten Fettmasse (Abb. 9). Die Rolle der ACE2/Ang(1-7)/Mas-Achse in der anti-adipösen Potenz von ARBs ist noch nicht abschließend geklärt. Zum einen konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Ang(1-7) in Ratten zu einem Schutz vor der Entwicklung von Futter-induzierter Adipositas führt und dass dem anti-adipösen Effekt von TEL in Ratten zumindest teilweise durch einen Mas-Antagonismus entgegengewirkt wurde [159]. Zum anderen war der anti-adipöse Effekt von TEL in Mas-defizienten FVB/N Mäusen verstärkt [163]. Zur weiteren

Erforschung dieses Sachverhalts wurden in dieser Arbeit Versuchstiere eines anderen genetischen Hintergrunds (C57/B6 N) verwendet und mit dem ACE2 ko an einem früheren Punkt der ACE2/Ang(1-7)/Mas-Achse eingegriffen. Wie o.g. konnte allerdings kein verminderter oder verstärkter anti-adipöser Effekt von TEL in den ACE2 ko Mäusen nachgewiesen werden, sodass die Wirkung von TEL auf Übergewicht eher nicht über die ACE2/Ang(1-7)/Mas-Achse vermittelt zu sein scheint.

#### **4.2 Hormonspiegel und Glukosehomöostase**

Wie in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, spielen verschiedene Hormone und Adipokine in der Entwicklung des MetS eine entscheidende Rolle. Vor allem die Phänomene der Leptin- und Insulinresistenz stellen einen zentralen Faktor in der Pathogenese der mit dem MetS vergesellschafteten Krankheitsentitäten dar.

Leptin wird zum Großteil durch Adipozyten sezerniert, daher geht ein höheres Körpergewicht mit einer erhöhten Leptinkonzentration einher [200]. Damit ist die Erhöhung der Leptinplasmakonzentration unter WD und dem damit induzierten Übergewicht der wt Mäuse zu erklären, die durch das anti-adipöse Potenzial von TEL verhindert werden konnte (Abb. 10). Die Plasmakonzentrationen für Leptin der ACE2 ko Versuchstiere waren sowohl vor Beginn der Behandlungsperiode als auch am Ende der Studie niedriger als die der wt Mäuse (Tab. 5, 7). Dies ist in Übereinstimmung mit dem geringeren Körpergewicht der ACE2 ko Versuchstiere. Auch bei den ACE2 ko Mäusen führte die WD Fütterung und zum anderen die TEL Therapie zu einem Anstieg bzw. Abfall der Leptinkonzentration, denn auch hier hatte TEL auf die ACE2 ko Mäuse einen anorektischen Effekt, trotz der weniger starken Übergewichtsentwicklung durch WD.

Sekretin ist ein Peptidhormon, das in Studien zu einer reduzierten Futteraufnahme von Mäusen führte [201] und für Resistin zeigte sich in Studien ein Zusammenhang zwischen Übergewicht und erhöhten Plasmakonzentrationen [202]. Daher erscheint der Anstieg der Resistinkonzentration der wt Mäuse unter anti-adipöser TEL Therapie überraschend (Abb. 10), wobei eine Erhöhung des Resistinspiegels trotz anti-adipöser TEL Therapie bereits durch vorherige Arbeiten gezeigt wurde [184, 197]. Ein Erklärungsansatz dafür, weshalb die Resistinkonzentration in dieser Arbeit unter TEL Therapie erhöht war, liegt in der Potenz von TEL als Aktivator des

Peroxisom-Proliferator-aktivierteren Rezeptors gamma (PPAR- $\gamma$ ), der u.a. als Transkriptionsfaktor für Gene, die an der Differenzierung von Adipozyten und der Regulierung des Fettsäuretransports beteiligt sind, fungiert [203], denn ein PPAR- $\gamma$  Agonismus führte in Studien zu einem Resistinanstieg [204]. In Betrachtung der Versuchstiere mit ACE2 ko zeigte sich im Vergleich der chow gefütterten Kontrollgruppen eine erhöhte Sekretin- und Resistinkonzentration im Vergleich mit den wt Versuchstieren (Tab. 7). Die erhöhte Sekretinkonzentration der leichteren ACE2 ko Mäuse erscheint unter der o.g. Beobachtung, dass erhöhte Sekretinspiegel zu einer verminderten Futteraufnahme führten, plausibel [201]. Auch bei den ACE2 ko Versuchstieren führte die TEL Therapie zu einem Anstieg des Resistinlevels (Abb. 10). Santos et al. konnten eine Reduktion des Resistins unter Ang(1-7) Therapie registrieren [126], während Andrade et al. keine Veränderung der Resistinkonzentration unter Ang(1-7) nachweisen konnten [205], sodass der Mechanismus für den hier beobachteten Resistinanstieg unter TEL wenig schlüssig erscheint. Allerdings könnte die Studie von Santos et al. eine Erklärung für die Erhöhung der Resistinkonzentration der Kontrollgruppe der ACE2 ko Mäuse im Vergleich mit den wt Mäusen sein, wenn davon ausgegangen wird, dass ein ACE2 ko eine reduzierte Ang(1-7) Konzentration zur Folge hat [126].

In den wt Mäusen führte eine Fütterung mit WD sowie die PCSK9<sup>DY</sup>-AAV-Injektion zu einer Reduktion des Ghrelinspiegels, die unter zusätzlicher TEL Therapie anhielt. Eine solche Dynamik der Ghrelinkonzentration konnte bei den ACE2 ko Mäusen nicht beobachtet werden (Abb. 10). Die Reduktion von Ghrelin im Rahmen des Diät-induzierten Übergewichts entspricht der Fachliteratur, in der eine Adipositas mit niedrigeren Ghrelinspiegeln in Zusammenhang gebracht wird [206].

Ein weiteres Peptidhormon, dessen Plasmakonzentrationen durch Körpergewicht und Adipositas beeinflusst wird, ist PYY. Es konnte zum einen gezeigt werden, dass die PYY-Konzentration im Rahmen der Adipositas reduziert wird und zum anderen gibt es Untersuchungen, die auf einen therapeutischen Nutzen der PYY-Gabe in der Behandlung von ebendiesem Krankheitsbild hinweisen [207]. Interessanterweise konnte in dieser Arbeit kein Abfall der PYY-Konzentration der WD VEH Gruppen beobachtet werden. Bei den wt Mäusen führte die Gabe von TEL zu einem Anstieg der Plasmakonzentration von PYY (Abb. 10). Dies ist konträr zu den Ergebnissen von Pais et al., die zeigten, dass Ang II die Ausschüttung von PYY aus

murinen und menschlichen Darmzellen stimuliert und dies durch den ARB Candesartan unterbunden werden konnte [208].

Die Blutglukose der wt Versuchstiere zeigte keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen, ebenso blieben die Plasmakonzentrationen von Insulin gleich. Allerdings zeigte sich unter WD ein Anstieg des HOMA index sowie der GIP-Konzentration, der beim HOMA index signifikant durch TEL verhindert bzw. reduziert werden konnte (Abb. 11). Der HOMA index ist ein Modell, um das Vorliegen einer Insulinresistenz aufzudecken. Die Berechnung erfolgt nach Bestimmung von Nüchtern-Glukose und Nüchtern-Insulin [209]. Der o.g. Anstieg des HOMA index der wt Mäuse unter WD könnte also ein Hinweis auf eine Insulinresistenz geben, die wie in Abschnitt 1.1 beschrieben im Rahmen des DMT2 auftritt. Allerdings sollte beachtet werden, dass in dieser Arbeit keine Nüchternheit der Versuchstiere vor der finalen Blutentnahme etabliert wurde. GIP ist ein sogenanntes Inkretin, das nach Nahrungsaufnahme durch Zellen im Darm sezerniert wird und vor allem zu einer verstärkten Ausschüttung von Insulin führt [34]. So ist ein Anstieg des GIP-Spiegels unter WD Fütterung und damit einhergehender verstärkter Gewichtszunahme und wiederum ein Abfall der GIP-Konzentration unter anti-adipöser TEL Therapie naheliegend. Wobei der Abfall der GIP-Konzentration der wt Mäuse unter TEL Therapie in dieser Arbeit nicht signifikant ausfiel (Abb. 11). Die Blutglukose der ACE2 ko Mäuse war sowohl vor Beginn der Behandlungsperiode als auch am Ende der Studie höher als die der wt Versuchstiere (Tab. 5, 7). Ebenso zeigte sich im Vergleich der Behandlungsgruppen innerhalb der ACE2 ko Versuchstiere eine Erhöhung der Blutglukose unter WD, die nicht durch TEL beeinflusst wurde (Abb. 11). Diese Ergebnisse sind am wahrscheinlichsten damit zu begründen, dass ein ACE2 ko zu einer erhöhten Ang II Konzentration [210] und Ang II zu einer erhöhten Glukosekonzentration führt [211]. Sahr et al. konnten zeigen, dass Ang(1-7) zu einer verbesserten Funktion der pankreatischen  $\beta$ -Zellen und einer verstärkten Ausschüttung von Insulin führt [212], sodass die niedrigere Plasmakonzentration der ACE2 ko Mäuse von C-Peptid, das bei der endogenen Insulinproduktion sezerniert wird [213], plausibel erscheint (Abb. 11). Ebenso kann dadurch der fehlende Anstieg des Insulinspiegels unter WD erklärt werden (Abb. 11).

### 4.3 Hypercholesterinämie- und Atherosklerose-Induktion

Wie auch durch andere Arbeitsgruppen gezeigt [165, 166] konnte in dieser Arbeit ebenfalls eine Erhöhung der Cholesterin- und Triglyzeridspiegel im Plasma der Versuchstiere, die mit PCSK9<sup>DY</sup>-AAV behandelt worden waren, beobachtet werden (Abb. 12). Ebenso ließen sich in unserem Experiment atherosklerotische Läsionen der Aorten mittels histologischer Untersuchung nachweisen (Abb. 13). Die Ergebnisse der durchgeführten Studie sprechen also dafür, dass durch die einmalige Injektion von PCSK9<sup>DY</sup>-AAV in die Schwanzvene sowohl eine Hypercholesterinämie als auch atherosklerotische Veränderungen der Aorta erzeugt werden können und sich dieses Verfahren damit für die weitere Untersuchung dieser Krankheitsbilder in Mausmodellen eignet.

In Betrachtung der Blutfette zeigte sich ausschließlich in der wt Gruppe ein Effekt der TEL-Behandlung auf den Gesamtcholesterinspiegel im Sinne einer partiellen Normalisierung der durch die PCSK9<sup>DY</sup>-AAV-Injektion und WD Fütterung erzeugten Hypercholesterinämie (Abb. 12). Diverse Studien konnten bereits eine Cholesterinsenkende Wirkung von ARBs zeigen, wobei in der Fachliteratur ebenso ein Effekt auf den Triglyzeridspiegel beschrieben wird, der in der hier durchgeführten Studie nicht gezeigt werden konnte [214-216]. Ebenso zeigte sich in den Versuchstieren mit ACE2 ko keine Veränderung der Triglyzerid- und Cholesterinspiegel durch eine Behandlung mit TEL (Abb. 12). Dies könnte als Hinweis darauf interpretiert werden, dass die Cholesterin-senkende Wirkung von TEL zumindest in Teilen ACE2-abhängig ist.

In Betrachtung der histologischen Untersuchung der Aorten führte die Behandlung mit TEL bei den Versuchstieren zu einer signifikanten Reduktion des Plaque- und Fettgehalts der Aorten im Vergleich zu der Behandlungsgruppe, die ebenfalls mit PCSK9<sup>DY</sup>-AAV injiziert, aber mit VEH statt TEL behandelt wurde (Abb. 13). Diese Ergebnisse zeigen den positiven Einfluss, den eine ARB-Therapie auf die Plaquelast von Atherosklerose im Mausmodell haben kann, wie bereits in anderen Arbeiten gezeigt [142, 143]. Im Vergleich der chow gefütterten Kontrollgruppen konnte ein höherer Plaquegehalt bei den ACE2 ko Versuchstieren im Vergleich mit den wt Versuchstieren nachgewiesen werden (Tab. 6). Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit der Annahme, dass die ACE2/Ang(1-7)/Mas-Achse anti-atherosklerotische Einflüsse hat und damit eine ACE2-Defizienz atherosklerotische

Vorgänge, wie Plaque-Formation, begünstigt, wie bereits in anderen Studien gezeigt [217-219]. Der Effekt der TEL Therapie stellte sich in dieser Arbeit bei den ACE2 ko Versuchstieren allerdings analog zur wt Gruppe dar, sodass hier keine Abhängigkeit der Wirkung von TEL auf die Plaqueformation von der ACE2/Ang(1-7)/Mas-Achse gezeigt werden konnte.

Wie in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, spielt die Produktion von NO in der Dysfunktionalität des Gefäßendothels im Rahmen der Atherosklerose eine Rolle. Ebenso weisen Studien daraufhin, dass der anti-atherosklerotische Effekt der ACE2/Ang(1-7)/Mas-Achse NO-abhängig ist [220, 221] und dass NO in Mäusen mit ACE2 ko reduziert ist [222]. In dieser Arbeit wurde die Plasmakonzentration von Nitrit als Surrogat-Parameter für NO bestimmt. Im Vergleich der chow gefütterten Kontrollgruppen war die Nitritkonzentration der ACE2 ko Mäuse in Übereinstimmung mit o.g. Literaturnachweisen in Tendenz niedriger als die der wt Mäuse, wobei dieser Unterschied nicht signifikant war ( $P=0,0643$ ) (Tab. 7). Die fehlende Signifikanz dieses Unterschieds kann möglicherweise durch eine hohe Variabilität der Messwerte erklärt werden.

Im Rahmen der Atherosklerose kommt es zu diversen immunologischen Vorgängen im Körper, die mit einer Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine vergesellschaftet ist [55]. So konnte in dieser Arbeit der Nachweis erhöhter Konzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine (TNF- $\alpha$ , MIP2, MCP1/CCL2, KC, IL-6) nach PCSK9<sup>DY</sup>-AAV-Injektion und WD Fütterung der wt Versuchstiere erfolgen (Abb. 20). Dieser Effekt konnte – zumindest in Tendenz – durch die Gabe von TEL verhindert werden. Ausschließlich der Anstieg des pro-inflammatorischen IL-6 wurde durch die Therapie mit dem ARB nicht verhindert. Ebenso konnte bei den wt Mäusen ein Anstieg des anti-inflammatorischen IL-10 in der WD VEH Behandlungsgruppe registriert werden, was überraschend erscheint, da IL-10 in der Fachliteratur zu den anti-atherogenen Zytokinen gezählt wird [223]. Der Anstieg von IL-10 konnte ebenfalls durch die Therapie mit TEL verhindert werden (Abb. 20). Diese Ergebnisse sprechen insgesamt für eine anti-inflammatorische Potenz von TEL. Die bisherige Studienlage zur Wirkung von ARBs auf inflammatorische Vorgänge im Gefäßsystem ist nicht eindeutig. So zeigten Klinghammer et al., dass die Konzentrationen verschiedener Zytokine unter TEL bei Patient:innen mit arterieller Hypertonie größtenteils unverändert zur Kontrollgruppe waren [139],

wohingegen in der Studie von Fliser et al. ein anti-inflammatorischer Effekt des ARBs Olmesartan gezeigt werden konnte [140]. Bei den Mäusen mit ACE2 ko hingegen konnte keine vergleichbare Dynamik der Zytokine nachgewiesen werden. Hier kam es ausschließlich zu einem Anstieg der IL-6 Konzentration unter PCSK9<sup>DY</sup> und WD, der bei gleichzeitiger TEL Behandlung nicht mehr nachzuweisen war (Abb. 20). Ebenso ergab sich kein Unterschied der Kontrollgruppen von wt und ACE2 ko Versuchstieren (Tab. 8). Diese Ergebnisse erscheinen überraschend, da in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, dass Ang(1-7) eine anti-inflammatorische Potenz besitzt und so bei Mäusen mit einem ACE2 ko ein erhöhtes inflammatorisches Potenzial zu erwarten wäre [224]. Sowohl eine Reduktion von MCP-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- $\kappa$ B), Vascular Cell Adhesion Protein 1 (VCAM-1), Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) Konzentrationen und eine verminderte Einwanderung von Makrophagen in das Gefäßbett als auch eine Erhöhung der NO-Ausschüttung und eine verminderte Plaque-Bildung von ApoE ko Mäusen konnte in Studien durch die ACE2/Ang(1-7)/Mas Achse vermittelt werden [225, 226]. Weshalb in dieser Arbeit bei den ACE2 ko Versuchstieren keine Erhöhung der inflammatorischen Parameter zu verzeichnen war, bleibt unklar.

#### **4.4 Nachweis einer endothelialen Dysfunktion mittels Rasterkraftmikroskopie**

In der hier durchgeführten Studie sollte zusätzlich zur histologischen Untersuchung der Aorten auch die endotheliale Dysfunktion als ein Phänomen in der Pathogenese der Atherosklerose untersucht werden. In der wissenschaftlichen Praxis wird zur Evaluation der endothelialen Funktion, wie in der Einleitung dieser Arbeit erwähnt, zumeist die Endothel-abhängige Vasodilatation nach Stimulation mit vasoaktiven Substanzen, wie beispielsweise Acetylcholin, bestimmt [170-172]. In dieser Arbeit wurde stattdessen das Verfahren der Rasterkraftmikroskopie angewandt, über dessen Einsatz in der Untersuchung des PCSK9<sup>DY</sup>-AAV-Atherosklerosemodells zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Experimente und der vorangegangenen Experimente dieser Arbeitsgruppe [178] noch keine Arbeiten in der Fachliteratur veröffentlicht worden waren. Die Funktionsweise und Durchführung dieses Untersuchungsverfahrens wurden in Abschnitt 1.6 dieser Arbeit näher beschrieben.

Die Endothelschicht besteht aus unterschiedlichen Kompartimenten. Auf der Zelloberfläche befindet sich die sogenannte Glykokalix, darunter liegt der Zellkortex, gefolgt vom Zytoplasma und der Kernregion. Die unterschiedlichen Schichten des Endothels werden durch physiologische und pathophysiologische Vorgänge beeinflusst und verändern unter gewissen Bedingungen ihre jeweiligen Eigenschaften. Die Erforschung des Aufbaus dieser Zellkompartimente sowie ihrer Dynamik und Beeinflussbarkeit wird unter dem Begriff der Nanomechanik des Endothels zusammengefasst und die AFM-Untersuchung stellt eine Möglichkeit dar, diese Phänomene sichtbar zu machen [227, 228]. Die Glykokalix, die zum größten Teil aus Glykoproteinen, Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen aufgebaut ist, ist als oberste Schicht der Endothelzelle in Kontakt mit dem Blutstrom und gilt damit als Mediator zwischen Gefäßinnerem und Endothel [229]. Nanomechanisch wird eine flexible und hoch aufgebaute Glykokalix als physiologisch angesehen, wobei in pathologischen Zuständen eher ein Einfallen und eine erhöhte Steifigkeit in der Rasterkraftmikroskopie beobachtet werden können [227, 228, 230]. Als nächstes Zellkompartiment liegt der Zellkortex direkt unterhalb der Plasmamembran, auf welchem in dieser Arbeit der Hauptfokus liegen soll. Der Zellkortex ist aus einem dreidimensionalen Zytoskelettnetzwerk aufgebaut, wobei besonders die Aktinfilamente von Bedeutung sind. Diese bilden eine Art Aktin-Netz, das eine gewisse Dynamik besitzt und sich durch Polymerisation und Depolymerisation der einzelnen Aktinfilamente in seiner Zusammensetzung ändern kann [227, 228]. Ebenso spielen Membranproteine, wie der epitheliale Natriumkanal (ENaC), eine Rolle in der Funktion und Konfiguration des Zellkortex [231]. Der Zellkortex nimmt eine entscheidende Stellung in der Physiologie des Endothels ein und Studien weisen darauf hin, dass der Aufbau des Zellkortex bzw. seine Steifigkeit in der Rasterkraftmikroskopie Rückschlüsse auf die endotheliale Funktion bzw. Dysfunktion zulässt [185]. So ist eine wichtige Funktion des Endothels, wie in Abschnitt 1.2 beschrieben, die Produktion von NO. Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass eine reduzierte Steifigkeit des Zellkortex mit einer erhöhten Aktivität der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) und damit einer verstärkten Produktion von NO vergesellschaftet ist, während eine erhöhte Steifigkeit mit einer reduzierten NO Ausschüttung in Verbindung gebracht wird [232, 233]. Dabei scheint die Veränderung der Kortex-Konstitution die verminderte bzw. erhöhte NO

Produktion zu verursachen und nicht andersherum [234, 235]. Auch zwischen der Barrierefunktion des Endothels und der kortikalen Steifigkeit scheint es Zusammenhänge zu geben. Insgesamt herrscht in der Literatur Einigkeit darüber, dass eine erhöhte kortikale Steifigkeit eher auf eine pathophysiologische Situation des Endothels, wie im Rahmen der Atherosklerose, hinweist [228]. Die Einflüsse des Zytoplasmas und der Kernregion auf die Steifigkeit der Zelle sollen in dieser Arbeit nicht im Mittelpunkt stehen und aus diesem Grund nicht näher beleuchtet werden.

In der Vergangenheit hat sich die Rasterkraftmikroskopie bereits als geeignete Methode zur Detektion von endothelialen Veränderungen anhand von ex vivo Messungen lebender aortaler Endothelzellen in Atherosklerose-Mausmodellen erwiesen. So konnte gezeigt werden, dass Dyslipidämie im Mausmodell zu einer erhöhten Steifigkeit des aortalen Endothels führt [236]. Maase et al. detektierten in ihrer Arbeit einen Zusammenhang zwischen Nanomechanik aortaler Endothelzellen, ihrer biochemischen Zusammensetzung und endothelialer Dysfunktion im ApoE/LDL-R Doppel-ko Atherosklerose-Mausmodell. Die ko Mäuse zeigten dort im Vergleich zu den wt Mäusen eine Erhöhung der kortikalen Steifigkeit und des intrazellulären Lipidgehalts der Endothelzellen, ebenso wie veränderte Expression von Adhäsionsmolekülen und eine reduzierte NO-Produktion im Sinne einer endothelialen Dysfunktion [185]. Auch in dieser Arbeit zeigte sich in den mit PCSK9<sup>DY</sup>-AAV behandelten Versuchstieren eine Erhöhung der kortikalen Steifigkeit der aortalen Endothelzellen sowie eine positive Korrelation zwischen der kortikalen Steifigkeit und Plaquegehalt sowie Cholesterinspiegel der wt Mäuse. Bei den wt Versuchstieren konnte außerdem eine negative Korrelation zwischen kortikaler Steifigkeit und der Plasmanitritkonzentration, die hier als Surrogatmarker für NO bestimmt wurde, als weiterer Hinweis auf eine endotheliale Dysfunktion nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten also darauf hin, dass die Rasterkraftmikroskopie auch im PCSK9<sup>DY</sup>-AAV-Atherosklerosemodell eine sinnvolle Methodik zum Nachweis von endothelialer Dysfunktion zu sein scheint und unterstreicht hiermit die vorherigen Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe [178].

In Betrachtung der Ergebnisse der Glykokalix-Messungen konnte in dieser Arbeit allerdings weder für die Glykokalixhöhe noch -steifigkeit ein Unterschied der verschiedenen Behandlungsgruppen nachgewiesen werden, sodass zum Einfluss

des PCSK9<sup>DY</sup>-AAV-Atherosklerosemodells auf die Beschaffenheit der endothelialen Glykokalix noch weitere Studien von Nöten sind, um eine klare Tendenz nachweisen zu können.

Nach TEL-Behandlung zeigte sich die kortikale Steifigkeit der wt Versuchstiere partiell normalisiert (Abb. 15). Diese Ergebnisse sind in Einklang mit den in Abschnitt 1.4 beschriebenen Hinweisen in der Fachliteratur auf einen protektiven Effekt von ARBs auf atherosklerotische Vorgänge. Ergänzend zu den Ergebnissen der in-vivo Studie konnte im Zellkulturversuch gezeigt werden, dass eine Behandlung von kultivierten humanen Endothelzellen mit Ang II zu einer Erhöhung der kortikalen Steifigkeit führte, welche durch eine zusätzliche Behandlung mit dem ARB Losartan aufgehoben werden konnte (Abb. 8). In verschiedenen Studien konnte ein negativer Einfluss von Ang II auf das Endothel auf Zellebene gezeigt werden. Dabei verursacht Ang II vor allem oxidativen Stress und kann zur Apoptose dieser Zellen führen [237, 238]. Auf Zellebene lassen sich in Studien zudem Hinweise auf einen protektiven Einfluss von ARBs finden [239]. Untersuchung der Einflüsse von Ang II auf die Steifigkeit der Zellen mittels AFM wurden in der Literatur vorrangig an Zellen der Niere und glatten Muskelzellen der Gefäße durchgeführt [179, 180, 240]. Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen damit einen Zusammenhang zwischen der Einflussnahme von Ang II bzw. ARBs auf Endothelzellen und dem Nachweis dieser Veränderungen mittels Rasterkraftmikroskopie her und unterstreichen hiermit die Effekte, die auch im Tiermodell gezeigt werden konnten.

Unter der Annahme, dass die ACE2/Ang(1-7)/Mas-Achse anti-atherosklerotische Potenz hat, wäre eine erhöhte kortikale Steifigkeit als Ausdruck der vaskulären Dysfunktion der ACE2 ko Versuchstiere im Vergleich mit den wt Versuchstieren zu erwarten. Im Vergleich der chow gefütterten Kontrollgruppen konnte diese Annahme nur auf Endothelzellebene bestätigt werden und nicht bei Betrachtung der einzelnen Versuchstiere (Tab. 6). Auf Versuchstierebene führte eine WD Fütterung und die Injektion mit PCSK9<sup>DY</sup>-AAV bei den ACE2 ko zu keiner Erhöhung der kortikalen Steifigkeit (Abb. 15). In der Arbeit von Tesanovic et al. führte eine Behandlung mit Ang(1-7) zu einer verbesserten Vasorelaxation nach Acetylcholin-Gabe, im Sinne einer verbesserten vaskulären Funktion, bei ApoE ko Mäusen [220] und Peña Silva et al. wiesen eine reduzierte Vasodilatation der Arteria basilaris nach Acetylcholingabe bei ACE2 ko Mäusen nach [241]. Ein Erklärungsansatz, weshalb

in unserer Studie keine höhere kortikale Steifigkeit, als Hinweis auf eine gestörte endotheliale Funktion, der ACE2 ko Mäuse zu verzeichnen war, ergibt sich beim Vergleich des Plaquegehalts der Aorten unseres Versuchs mit Arbeiten anderer Arbeitsgruppen [217, 220]. In dieser Arbeit konnte ein höherer Plaquegehalt verzeichnet werden, sodass von einer stark ausgeprägten Atherosklerose mit einhergehender vaskulärer Dysfunktion ausgegangen werden kann, sodass das Fehlen von ACE2 im Verhältnis möglicherweise weniger ins Gewicht fällt.

In den Korrelationsanalysen von kortikaler Steifigkeit mit Plasmanitritkonzentration, Plasmacholesterinkonzentration, Plaque- und Fettgehalt der Aorten zeigte sich ein Unterschied zwischen den wt und den ACE2 ko Mäusen. So korrelierte die kortikale Steifigkeit der wt Versuchstiere negativ mit Nitrit und positiv mit den anderen drei Parametern, diese Korrelationen konnten bei den Mäusen mit ACE2 ko nicht nachgewiesen werden (Abb. 16). Zudem bleibt der senkende Effekt auf die kortikale Steifigkeit durch eine TEL Behandlung, der bei den wt Mäusen nachgewiesen wurde, bei den ACE2 ko Mäusen aus (Abb. 15). Die negative Korrelation von kortikaler Steifigkeit und Plasmanitritkonzentration der wt Mäuse weist zum einen auf eine NO-abhängige Wirkung von TEL hin, wie bereits durch andere gezeigt [242], zum anderen deutet der fehlende Effekt der TEL Behandlung auf die kortikale Steifigkeit der ACE2 ko Mäuse sowie die o.g. nicht nachweisbare negative Korrelation von kortikaler Steifigkeit und der Plasmanitritkonzentration ebendieser Versuchstiere darauf hin, dass der anti-atherosklerotische Effekt auf die vaskuläre Dysfunktion von TEL zumindest zum Teil von der ACE2/Ang(1-7)/Mas-Achse abhängig ist.

#### **4.5 RNA-Sequenzierung**

Zu den interessantesten Genen, die bei TEL Behandlung im Vergleich zur VEH Behandlung bei den wt Versuchstieren als gegenreguliert eingestuft wurden, gehörten Myh1, Pvalb, Ckm, Tnnt13, Mmp12, Acta1, Npr3 und Fam20c, da diese Gene alle mit Atherosklerose in Verbindung gebracht werden. Insbesondere sei hier Mmp12 (Matrix-Metalloproteinase 12) zu nennen, da Mmp12 in einer groß angelegten proteomischen Studie am Menschen als potenzieller neuer zirkulierender Biomarker für das Risiko einer Aortenstenose identifiziert wurde [243, 244]. Mmp12 spielt eine Rolle im Abbau von elastischen Schichten und/oder der Basalmembran, wodurch eine Versteifung der Arterien begünstigt wird und ist damit

für die Entstehung und das Fortschreiten von Atherosklerose von entscheidender Bedeutung [245, 246]. Die hier und an anderer Stelle [247] gezeigte TEL-abhängige Herunterregulierung von Mmp12 erscheint plausibel, da Ang II selbst in Studien die Mmp12-Genexpression in vaskulären glatten Muskelzellen [248] und in der Mauseaorta [249-251] erhöht hat. Die TEL-abhängige Herunterregulierung von Mmp12 konnte bei den ACE2 ko Mäusen nicht mehr nachgewiesen werden, sodass eine Abhängigkeit von der ACE2/Ang(1-7)/Mas-Achse anzunehmen ist. Dies unterstützt wiederum die Ergebnisse, die zeigen, dass Ang(1-7) die Mmp12-Expression blockiert [252-254]. Ebenso interessant erscheint, dass die Mmp12-Expression TNF $\alpha$ -abhängig ist [255] und dass die TNF $\alpha$ -Expression selbst durch Ang II hochreguliert und durch Ang(1-7) herunterreguliert wird [256]. Wie in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, werden Statine typischerweise in der Therapie der Atherosklerose eingesetzt und es konnte gezeigt werden, dass durch diese Medikamentengruppe die Mmp12-Expression gesenkt wird [257]. In dieser Arbeit konnte durch eine Therapie mit TEL einer arteriellen Versteifung entgegengewirkt werden. Da Mmp12 für die Beeinflussung der Arterienversteifung von entscheidender Bedeutung ist [246], konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass die durch TEL vermittelten Veränderungen auf struktureller und biochemischer Ebene auch funktionelle Auswirkungen auf den Verlauf einer Atherosklerose haben. In diesem funktionellen Zusammenhang wurde bereits gezeigt, dass ARBs die arterielle Steifigkeit bei älteren Patienten mit Bluthochdruck verhindern [258]. Insbesondere die fehlende Korrelation zwischen Plaque-Belastung und kortikaler Steifigkeit bei den ACE2 ko Versuchstieren gibt also Hinweise darauf, dass diese funktionelle Eigenschaft von der ACE2/Ang(1-7)/Mas-Achse abhängig ist.

Für Acta1 (Aktin, Alpha 1, Skelettmuskel), das an der Muskelkontraktion beteiligt ist, konnte eine erhöhte Expression durch Ang II in menschlichen vaskulären glatten Muskelzellen [259] und Kardiomyozyten [259] gezeigt werden, ebenso wie eine Verdickung der Media [260]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression im Atherosklerose-Mausmodell erhöht ist und dieser Effekt durch TEL verhindert werden kann. Für Fam20c (Familie mit Sequenzähnlichkeit 20, Mitglied C) konnte für sowohl ACE2 ko Mäuse als auch wt Mäuse eine Hochregulation durch die PCSK9<sup>DY</sup>-AAV-Injektion und eine WD Fütterung gezeigt werden, welche durch TEL normalisiert wurde. Das von Fam20c kodierte Protein beeinflusst hauptsächlich

die Knochenfunktion. Zu den neuen Fam20c-Zielen gehört jedoch auch die Lipidhomöostase [261]. PCSK9, das in der Leber an der Regulation des Cholesterinstoffwechsels beteiligt ist, wird durch die Fam20c-Phosphorylierung reguliert [261], sodass die hier beobachteten Effekte auf die PCSK9-basierte Atherosklerose-Induktion zurückzuführen sein könnten.

Sowohl die Anzahl als auch das Ausmaß der durch TEL regulierten Gene war bei den ACE2 ko Mäusen ausgeprägter. Ein Gen, das unter PCSK9<sup>DY</sup>-AAV-Injektion und WD Fütterung herunterreguliert, aber durch TEL normalisiert wurde und für diese Arbeit von Interesse ist, war Mep1b (Meprin A, beta), da ein Mangel an Mep1b bei weiblichen Mäusen mit der Entwicklung von Fettleibigkeit in Verbindung gebracht wurde [262] und durch einen Meprin-Inhibitor die Bildung von atherosklerotischer Plaque bei ApoE ko Mäusen unterdrückt wurde [263]. In gewisser Weise im Widerspruch zu unseren Ergebnissen, die bei ACE2 ko Mäusen eine Herunterregulation von Npc1l1 (NPC1-like 1) und eine Erhöhung der Cholesterinspiegel zeigten, konnte an anderer Stelle gezeigt werden, dass eine genetische Variation, die zum Funktionsverlust im Npc1l1-Gen führte, einen veränderten Cholesterinstoffwechsel und ein damit einhergehendes geringeres Risiko für atherosklerotische Herz-Kreislauf-Erkrankungen zur Folge hatte [264].

#### **4.6 Ausblick und Limitationen**

Diese Arbeit konnte erneut zeigen, dass das PCSK9<sup>DY</sup>-AAV-Mausmodell für Studien im Rahmen der Atheroskleroseforschung am Mausmodell geeignet ist. In Zukunft kann also Abstand von der aufwendigen und hochpreisigen Verwendung von ApoE ko und/oder LDL-Rezeptor ko Versuchstieren genommen werden.

Zum MetS gehören, wie in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, neben den in dieser Arbeit untersuchten Faktoren der Adipositas und der Veränderung der Blutfettwerte auch eine Veränderung des Nüchternblutzuckers bzw. ein DMT2 und eine Erhöhung des Blutdrucks. Zur Untersuchung dieser Phänomene im Tierversuch wird oft ein sogenannter Insulin-Toleranztest durchgeführt. Hierbei wird den Versuchstieren nach einer Fastenperiode Insulin injiziert und direkt hiervor und zu festgelegten Zeitpunkten nach der Injektion der Blutzuckerwert gemessen [163, 197]. Zur Messung des Blutdrucks werden die Versuchstiere in ein spezielles Messgerät eingebracht und mittels tail-cuff-Messung der Blutdruck bestimmt [184].

Für beide Verfahren ist zum einen ein Entfernen der Versuchstiere aus ihrer gewohnten Umgebung und zum anderen eine zeitweise Fixierung der Versuchstiere bzw. eine Einschränkung in ihrer freien Beweglichkeit von Nöten. Hierdurch wird in den Mäusen eine Stressreaktion ausgelöst [265, 266], welche Einfluss z.B. auf das Futterverhalten der Versuchstiere haben kann [267]. Dies wiederum könnte Einfluss auf die anderen Messergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit erhoben werden sollten, haben. Im Rahmen dieser Studie sollte der Fokus auf die Untersuchung der Atherosklerose und der einhergehenden endothelialen Dysfunktion liegen, weshalb sich letztendlich gegen die Durchführung eines Insulin-Toleranztests und der Blutdruckmessung entschieden wurde, um eine mögliche Verfälschung der Messergebnisse durch Stressoren zu vermeiden. Allerdings könnten in der Zukunft Arbeiten, die eine Blutdruckmessung sowie einen Insulin-Toleranztest im Rahmen des PCSK9<sup>DY</sup>-AAV-Mausmodells und unter ARB-Therapie durchführen, weitere Aufschlüsse über das MetS liefern.

Die Erforschung der anti-atherosklerotischen Wirkung von ARBs und insbesondere des Mechanismus, der für diesen Effekt verantwortlich ist, bedarf noch weiterer Untersuchung. Zur weiteren Beleuchtung der Relevanz der ACE2/Ang(1-7)/Mas-Achse im Rahmen dieser Medikamentenwirkung wäre bspw. ein Ansatz an anderer Stelle im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System denkbar. Hierzu könnten andere genetische Knockouts oder Antagonisten bestimmter Akteure des Systems eingesetzt werden.

Als weitere Limitation unserer Untersuchungsmethoden sei noch die Verwendung ausschließlich männlicher Versuchstiere zu nennen. Dies sollte die Variabilität der Messergebnisse minimieren und zudem eine Vergleichbarkeit mit vorausgegangenen Arbeiten dieser Arbeitsgruppe sicherstellen [163, 184]. In Zukunft sollten Arbeiten angeschlossen werden, die auch weibliche Versuchstiere einbeziehen, insbesondere um auch mögliche intergeschlechtliche Unterschiede aufzudecken.

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Wirksamkeit des PCSK9<sup>DY</sup>-AAV-Atherosklerosemodells im Mausversuch und die Möglichkeit, eine in diesem Zusammenhang entstehende endotheliale Dysfunktion mittels Rasterkraftmikroskopie nachzuweisen, betrachtet. Ebenso wurden der anti-adipöse und anti-atherosklerotische Effekt von Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten vergleichend bei Mäusen ohne und mit genetischem ACE2 Knockout untersucht sowie eine Veränderung in RNA-Sequenzierungsanalysen hierunter beschrieben.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die einmalige Injektion von PCSK9<sup>DY</sup>-AAV in die Schwanzvene von C57/B6 N Mäusen in Kombination mit einer Fütterung von Western Diät zu einer Hypercholesterinämie sowie zu einer Ausbildung mikroskopisch nachweisbarer aortaler Plaques im Sinne einer Atherosklerose führt. Zudem konnte mittels Rasterkraftmikroskopie von in-vivo Endothelzellen der Aorten ebendieser Versuchstiere eine Erhöhung der kortikalen Steifigkeit nachgewiesen werden, die auf das Vorhandensein einer endothelialen Dysfunktion hinweist. Die genannten Effekte auf das Gefäßsystem konnten in den Mäusen ohne genetischen Knockout zumindest teilweise durch die Gabe von Telmisartan verhindert werden. Ebenso konnte für diese Mäuse eine anti-adipöse Wirksamkeit von Telmisartan aufgezeigt werden, die zu einer Verhinderung der Western Diät-induzierten Adipositas führte. Auch bei Mäusen mit ACE2 Knockout führte die Virusinjektion zu einer Dyslipidämie und einer Atherosklerose inklusive endothelialer Dysfunktion, allerdings war hier der protektive Effekt von Telmisartan nicht, beziehungsweise weniger stark ausgeprägt, nachweisbar.

Es konnte außerdem eine Hochregulation gewisser pro-atherogener Gene unter PCSK9<sup>DY</sup>-AAV-Behandlung und eine Gegenregulation nach TEL Behandlung in RNA-Sequenzierungsanalysen nachgewiesen werden. Auch hier konnte ein Unterschied zwischen den Versuchstieren mit und ohne genetischen Knockout verzeichnet werden.

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit die protektive Wirkung von Sartanen auf das Gefäßsystem und die zumindest teilweise bestehende Abhängigkeit dieser Wirkung vom Vorhandensein von ACE2 gezeigt werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Saklayen, M.G., *The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome*. Curr Hypertens Rep, 2018. **20**(2): p. 12.
2. Eckel, R.H., S.M. Grundy, and P.Z. Zimmet, *The metabolic syndrome*. Lancet, 2005. **365**(9468): p. 1415-28.
3. Alberti, K.G., et al., *Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity*. Circulation, 2009. **120**(16): p. 1640-5.
4. Expert Panel on Detection and a.T.o.H.B.C.i.A. Evaluation, *Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)*. JAMA, 2001. **285**(19): p. 2486-97.
5. Balkau, B. and M.A. Charles, *Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR)*. Diabet Med, 1999. **16**(5): p. 442-3.
6. Alberti, K.G., P. Zimmet, and J. Shaw, *Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation*. Diabet Med, 2006. **23**(5): p. 469-80.
7. Moebus, S., et al., *Regional unterschiedliche Prävalenz des metabolischen Syndroms*. Dtsch Arztebl International, 2008. **105**(12): p. 207-13.
8. World Health Organization, *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation*. World Health Organ Tech Rep Ser, 2000. **894**: p. i-xii, 1-253.
9. Engin, A., *The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome*. Adv Exp Med Biol, 2017. **960**: p. 1-17.
10. Ng, M., et al., *Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013*. Lancet, 2014. **384**(9945): p. 766-81.
11. Collaboration, N.R.F., *Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants*. Lancet, 2016. **387**(10026): p. 1377-96.
12. Mensink, G.B.M., et al., *Übergewicht und Adipositas in Deutschland*. Bundesgesundheitsblatt 2013. **56**: p. 786-94.
13. Kopelman, P.G., *Obesity as a medical problem*. Nature, 2000. **404**(6778): p. 635-43.
14. Hall, K.D., et al., *Quantification of the effect of energy imbalance on bodyweight*. Lancet, 2011. **378**(9793): p. 826-37.
15. Hill, J.O., *Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective*. Endocr Rev, 2006. **27**(7): p. 750-61.
16. Manna, P. and S.K. Jain, *Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies*. Metab Syndr Relat Disord, 2015. **13**(10): p. 423-44.

17. McCuen-Wurst, C., M. Ruggieri, and K.C. Allison, *Disordered eating and obesity: associations between binge-eating disorder, night-eating syndrome, and weight-related comorbidities*. *Ann N Y Acad Sci*, 2018. **1411**(1): p. 96-105.
18. Agüera, Z., et al., *A review of binge eating disorder and obesity*. *Neuropsychiatr*, 2021. **35**(2): p. 57-67.
19. González-Muniesa, P., et al., *Obesity*. *Nat Rev Dis Primers*, 2017. **3**: p. 17034.
20. Zorena, K., et al., *Adipokines and Obesity. Potential Link to Metabolic Disorders and Chronic Complications*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(10): p. 3570.
21. Luo, L. and M. Liu, *Adipose tissue in control of metabolism*. *J Endocrinol*, 2016. **231**(3): p. R77-R99.
22. Münzberg, H. and C.D. Morrison, *Structure, production and signaling of leptin*. *Metabolism*, 2015. **64**(1): p. 13-23.
23. Myers, M.G., Jr., et al., *Obesity and leptin resistance: distinguishing cause from effect*. *Trends Endocrinol Metab*, 2010. **21**(11): p. 643-51.
24. Lin, S., et al., *Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2000. **24**(5): p. 639-46.
25. Després, J.P., *Body fat distribution and risk of cardiovascular disease: an update*. *Circulation*, 2012. **126**(10): p. 1301-13.
26. Després, J.P., et al., *Regional distribution of body fat, plasma lipoproteins, and cardiovascular disease*. *Arteriosclerosis*, 1990. **10**(4): p. 497-511.
27. Larsson, B., et al., *Abdominal adipose tissue distribution, obesity, and risk of cardiovascular disease and death: 13 year follow up of participants in the study of men born in 1913*. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1984. **288**(6428): p. 1401-4.
28. Poulriot, M.C., et al., *Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women*. *Am J Cardiol*, 1994. **73**(7): p. 460-8.
29. Lemieux, I., et al., *Hypertriglyceridemic waist: a useful screening phenotype in preventive cardiology?* *Can J Cardiol*, 2007. **23 Suppl B**(Suppl B): p. 23b-31b.
30. Savva, S.C., D. Lamnisis, and A.G. Kafatos, *Predicting cardiometabolic risk: waist-to-height ratio or BMI. A meta-analysis*. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2013. **6**: p. 403-19.
31. Gallagher, E.J., D. Leroith, and E. Karnieli, *Insulin resistance in obesity as the underlying cause for the metabolic syndrome*. *Mt Sinai J Med*, 2010. **77**(5): p. 511-23.
32. Boucher, J., A. Kleinridders, and C.R. Kahn, *Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014. **6**(1).
33. Norton, L., et al., *Insulin: The master regulator of glucose metabolism*. *Metabolism*, 2022. **129**: p. 155142.
34. Baggio, L.L. and D.J. Drucker, *Biology of incretins: GLP-1 and GIP*. *Gastroenterology*, 2007. **132**(6): p. 2131-57.
35. Petersen, M.C. and G.I. Shulman, *Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance*. *Physiol Rev*, 2018. **98**(4): p. 2133-223.
36. Antuna-Puente, B., et al., *Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity*. *Diabetes Metab*, 2008. **34**(1): p. 2-11.

37. Monteiro, R. and I. Azevedo, *Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome*. Mediators Inflamm, 2010. **2010**.
38. Qatanani, M. and M.A. Lazar, *Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu*. Genes Dev, 2007. **21**(12): p. 1443-55.
39. Isomaa, B., et al., *Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome*. Diabetes Care, 2001. **24**(4): p. 683-9.
40. Girman, C.J., et al., *The metabolic syndrome and risk of major coronary events in the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) and the Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS/TexCAPS)*. Am J Cardiol, 2004. **93**(2): p. 136-41.
41. Ninomiya, J.K., et al., *Association of the metabolic syndrome with history of myocardial infarction and stroke in the Third National Health and Nutrition Examination Survey*. Circulation, 2004. **109**(1): p. 42-6.
42. Wilson, P.W., et al., *Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus*. Circulation, 2005. **112**(20): p. 3066-72.
43. Lorenzo, C., et al., *The metabolic syndrome as predictor of type 2 diabetes: the San Antonio heart study*. Diabetes Care, 2003. **26**(11): p. 3153-9.
44. Malik, S., et al., *Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults*. Circulation, 2004. **110**(10): p. 1245-50.
45. Hu, G., et al., *Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to all-cause and cardiovascular mortality in nondiabetic European men and women*. Arch Intern Med, 2004. **164**(10): p. 1066-76.
46. (DAG), D.A.-G.e.V., *S3-Leitlinie Prävention und Therapie der Adipositas*. 2024.
47. Libby, P., et al., *Atherosclerosis*. Nat Rev Dis Primers, 2019. **5**(1): p. 56.
48. World Health Organization. *Cardiovascular diseases*. 2021 letzter Zugriff 26.03.2025]; Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
49. Statistisches Bundesamt. *Todesursachen*. letzter Zugriff 26.03.2025]; Available from: [https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/\\_inhalt.html](https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html).
50. Ference, B.A., et al., *Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel*. Eur Heart J, 2017. **38**(32): p. 2459-72.
51. Skålén, K., et al., *Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis*. Nature, 2002. **417**(6890): p. 750-4.
52. Tabas, I., K.J. Williams, and J. Borén, *Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications*. Circulation, 2007. **116**(16): p. 1832-44.
53. Goldstein, J.L., et al., *Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(1): p. 333-7.
54. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.

55. Gisterå, A. and G.K. Hansson, *The immunology of atherosclerosis*. Nat Rev Nephrol, 2017. **13**(6): p. 368-80.
56. Stemme, S., et al., *T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(9): p. 3893-7.
57. Björkbacka, H., et al., *Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways*. Nat Med, 2004. **10**(4): p. 416-21.
58. Gimbrone, M.A., Jr. and G. García-Cardeña, *Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis*. Circ Res, 2016. **118**(4): p. 620-36.
59. Weksler, B.B., A.J. Marcus, and E.A. Jaffe, *Synthesis of prostaglandin I<sub>2</sub> (prostacyclin) by cultured human and bovine endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(9): p. 3922-6.
60. Ignarro, L.J., et al., *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 9265-9.
61. Ignarro, L.J. and C. Napoli, *Novel features of nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase, and atherosclerosis*. Curr Diab Rep, 2005. **5**(1): p. 17-23.
62. Basatemur, G.L., et al., *Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis*. Nat Rev Cardiol, 2019. **16**(12): p. 727-44.
63. Chappell, J., et al., *Extensive Proliferation of a Subset of Differentiated, yet Plastic, Medial Vascular Smooth Muscle Cells Contributes to Neointimal Formation in Mouse Injury and Atherosclerosis Models*. Circ Res, 2016. **119**(12): p. 1313-23.
64. Rong, J.X., et al., *Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(23): p. 13531-6.
65. Geng, Y.J. and P. Libby, *Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme*. Am J Pathol, 1995. **147**(2): p. 251-66.
66. Clarke, M.C., et al., *Vascular smooth muscle cell apoptosis induces interleukin-1-directed inflammation: effects of hyperlipidemia-mediated inhibition of phagocytosis*. Circ Res, 2010. **106**(2): p. 363-72.
67. Yurdagul, A., Jr., et al., *Mechanisms and Consequences of Defective Efferocytosis in Atherosclerosis*. Front Cardiovasc Med, 2018. **4**: p. 86.
68. Libby, P., *Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy*. N Engl J Med, 2013. **368**(21): p. 2004-13.
69. Bentzon, J.F., et al., *Mechanisms of plaque formation and rupture*. Circ Res, 2014. **114**(12): p. 1852-66.
70. Fernández-Friera, L., et al., *Prevalence, Vascular Distribution, and Multiterritorial Extent of Subclinical Atherosclerosis in a Middle-Aged Cohort*. Circulation, 2015. **131**(24): p. 2104-13.
71. Visseren, F.L.J., et al., *2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice*. Eur Heart J, 2021. **42**(34): p. 3227-337.
72. Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin e. V., *S3-Leitlinie "Hausärztliche Risikoberatung zur kardiovaskulären Prävention"*. 2017.
73. Lee, W.W., et al., *Effectiveness of motivational interviewing on lifestyle modification and health outcomes of clients at risk or diagnosed with cardiovascular diseases: A systematic review*. Int J Nurs Stud, 2016. **53**: p. 331-41.

74. Kraus, W.E., et al., *Physical Activity, All-Cause and Cardiovascular Mortality, and Cardiovascular Disease*. *Med Sci Sports Exerc*, 2019. **51**(6): p. 1270-81.
75. Eilat-Adar, S., et al., *Nutritional recommendations for cardiovascular disease prevention*. *Nutrients*, 2013. **5**(9): p. 3646-83.
76. Acosta, S., A. Johansson, and I. Drake, *Diet and Lifestyle Factors and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease-A Prospective Cohort Study*. *Nutrients*, 2021. **13**(11): p. 3822.
77. Jeong, S.M., et al., *Smoking cessation, but not reduction, reduces cardiovascular disease incidence*. *Eur Heart J*, 2021. **42**(40): p. 4141-53.
78. Mach, F., et al., *2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk*. *Eur Heart J*, 2020. **41**(1): p. 111-88.
79. Collins, R., et al., *Interpretation of the evidence for the efficacy and safety of statin therapy*. *Lancet*, 2016. **388**(10059): p. 2532-61.
80. Nissen, S.E., et al., *Efficacy and Tolerability of Evolocumab vs Ezetimibe in Patients With Muscle-Related Statin Intolerance: The GAUSS-3 Randomized Clinical Trial*. *Jama*, 2016. **315**(15): p. 1580-90.
81. Cannon, C.P., et al., *Ezetimibe Added to Statin Therapy after Acute Coronary Syndromes*. *N Engl J Med*, 2015. **372**(25): p. 2387-97.
82. Sabatine, M.S., et al., *Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease*. *N Engl J Med*, 2017. **376**(18): p. 1713-22.
83. Wald, D.S., et al., *Combination therapy versus monotherapy in reducing blood pressure: meta-analysis on 11,000 participants from 42 trials*. *Am J Med*, 2009. **122**(3): p. 290-300.
84. Salam, A., et al., *Efficacy and safety of dual combination therapy of blood pressure-lowering drugs as initial treatment for hypertension: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*. *J Hypertens*, 2019. **37**(9): p. 1768-74.
85. Ogihara, T., et al., *Combination therapy for hypertension in the elderly: a sub-analysis of the Combination Therapy of Hypertension to Prevent Cardiovascular Events (COPE) Trial*. *Hypertens Res*, 2012. **35**(4): p. 441-8.
86. Yusuf, S., et al., *Blood-Pressure and Cholesterol Lowering in Persons without Cardiovascular Disease*. *N Engl J Med*, 2016. **374**(21): p. 2032-43.
87. Jamerson, K., et al., *Benazepril plus amlodipine or hydrochlorothiazide for hypertension in high-risk patients*. *N Engl J Med*, 2008. **359**(23): p. 2417-28.
88. Volpe, M., et al., *Efficacy and safety of triple antihypertensive therapy with the olmesartan/amlodipine/hydrochlorothiazide combination*. *Clin Drug Investig*, 2012. **32**(10): p. 649-64.
89. Weir, M.R., et al., *A titrate-to-goal study of switching patients uncontrolled on antihypertensive monotherapy to fixed-dose combinations of amlodipine and olmesartan medoxomil ± hydrochlorothiazide*. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 2011. **13**(6): p. 404-12.
90. Zelniker, T.A., et al., *SGLT2 inhibitors for primary and secondary prevention of cardiovascular and renal outcomes in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cardiovascular outcome trials*. *Lancet*, 2019. **393**(10166): p. 31-9.
91. Kristensen, S.L., et al., *Cardiovascular, mortality, and kidney outcomes with GLP-1 receptor agonists in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-*

- analysis of cardiovascular outcome trials*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2019. **7**(10): p. 776-85.
92. Cosentino, F., et al., *2019 ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD*. Eur Heart J, 2020. **41**(2): p. 255-323.
  93. Herichova, I. and K. Szantoova, *Renin-angiotensin system: upgrade of recent knowledge and perspectives*. Endocr Regul, 2013. **47**(1): p. 39-52.
  94. Bader, M. and D. Ganten, *Update on tissue renin-angiotensin systems*. J Mol Med (Berl), 2008. **86**(6): p. 615-21.
  95. Paul, M., A. Poyan Mehr, and R. Kreutz, *Physiology of local renin-angiotensin systems*. Physiol Rev, 2006. **86**(3): p. 747-803.
  96. Stegbauer, J. and T.M. Coffman, *New insights into angiotensin receptor actions: from blood pressure to aging*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2011. **20**(1): p. 84-8.
  97. Huber, G., F. Schuster, and W. Raasch, *Brain renin-angiotensin system in the pathophysiology of cardiovascular diseases*. Pharmacol Res, 2017. **125**: p. 72-90.
  98. Dendorfer, A., et al., *Interactions between the renin-angiotensin system (RAS) and the sympathetic system*. Basic Res Cardiol, 1998. **93** p. 24-9.
  99. Yvan-Charvet, L. and A. Quignard-Boulangé, *Role of adipose tissue renin-angiotensin system in metabolic and inflammatory diseases associated with obesity*. Kidney Int, 2011. **79**(2): p. 162-8.
  100. Frederich, R.C., Jr., et al., *Tissue-specific nutritional regulation of angiotensinogen in adipose tissue*. Hypertension, 1992. **19**(4): p. 339-44.
  101. Van Harmelen, V., et al., *Increased adipose angiotensinogen gene expression in human obesity*. Obes Res, 2000. **8**(4): p. 337-41.
  102. Boustany, C.M., et al., *Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004. **287**(4): p. 943-9.
  103. Yvan-Charvet, L., et al., *Deletion of the angiotensin type 2 receptor (AT2R) reduces adipose cell size and protects from diet-induced obesity and insulin resistance*. Diabetes, 2005. **54**(4): p. 991-9.
  104. Kouyama, R., et al., *Attenuation of diet-induced weight gain and adiposity through increased energy expenditure in mice lacking angiotensin II type 1a receptor*. Endocrinology, 2005. **146**(8): p. 3481-9.
  105. Ribeiro-Oliveira, A., Jr., et al., *The renin-angiotensin system and diabetes: an update*. Vasc Health Risk Manag, 2008. **4**(4): p. 787-803.
  106. Olivares-Reyes, J.A., A. Arellano-Plancarte, and J.R. Castillo-Hernandez, *Angiotensin II and the development of insulin resistance: implications for diabetes*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **302**(2): p. 128-39.
  107. Ogihara, T., et al., *Angiotensin II-induced insulin resistance is associated with enhanced insulin signaling*. Hypertension, 2002. **40**(6): p. 872-9.
  108. Poznyak, A.V., et al., *Renin-Angiotensin System in Pathogenesis of Atherosclerosis and Treatment of CVD*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(13): p. 6702.
  109. Schmieder, R.E., et al., *Renin-angiotensin system and cardiovascular risk*. Lancet, 2007. **369**(9568): p. 1208-19.
  110. Morawietz, H., et al., *Angiotensin II induces LOX-1, the human endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein*. Circulation, 1999. **100**(9): p. 899-902.

111. Lemarié, C.A. and E.L. Schiffrin, *The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2010. **11**(1): p. 19-31.
112. Kljajic, S.T., et al., *Direct AT<sub>2</sub> receptor stimulation is athero-protective and stabilizes plaque in apolipoprotein E-deficient mice*. Int J Cardiol, 2013. **169**(4): p. 281-7.
113. Tiyerili, V., et al., *Stimulation of the AT<sub>2</sub> receptor reduced atherogenesis in ApoE(-/-)/AT1A(-/-) double knock out mice*. J Mol Cell Cardiol, 2012. **52**(3): p. 630-7.
114. Rice, G.I., et al., *Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism*. Biochem J, 2004. **383**: p. 45-51.
115. Santos, R.A., et al., *Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8258-63.
116. Santos, R.A.S., et al., *The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7)*. Physiol Rev, 2018. **98**(1): p. 505-53.
117. Santos, R.A., et al., *Production of angiotensin-(1-7) by human vascular endothelium*. Hypertension, 1992. **19**(2 ): p. 56-61.
118. Sampaio, W.O., et al., *Angiotensin-(1-7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells*. Hypertension, 2007. **50**(6): p. 1093-8.
119. Fraga-Silva, R.A., et al., *An orally active formulation of angiotensin-(1-7) produces an antithrombotic effect*. Clinics (Sao Paulo), 2011. **66**(5): p. 837-41.
120. Tallant, E.A. and M.A. Clark, *Molecular mechanisms of inhibition of vascular growth by angiotensin-(1-7)*. Hypertension, 2003. **42**(4): p. 574-9.
121. Fraga-Silva, R.A., et al., *The antithrombotic effect of angiotensin-(1-7) involves mas-mediated NO release from platelets*. Mol Med, 2008. **14**(1-2): p. 28-35.
122. Rabelo, L.A., et al., *Ablation of angiotensin (1-7) receptor Mas in C57Bl/6 mice causes endothelial dysfunction*. J Am Soc Hypertens, 2008. **2**(6): p. 418-24.
123. Santos, S.H. and J.M. Andrade, *Angiotensin 1-7: a peptide for preventing and treating metabolic syndrome*. Peptides, 2014. **59**: p. 34-41.
124. Guimaraes, P.S., et al., *Increasing angiotensin-(1-7) levels in the brain attenuates metabolic syndrome-related risks in fructose-fed rats*. Hypertension, 2014. **63**(5): p. 1078-85.
125. Marcus, Y., et al., *Angiotensin 1-7 as means to prevent the metabolic syndrome: lessons from the fructose-fed rat model*. Diabetes, 2013. **62**(4): p. 1121-30.
126. Santos, S.H., et al., *Oral Angiotensin-(1-7) prevented obesity and hepatic inflammation by inhibition of resistin/TLR4/MAPK/NF-κB in rats fed with high-fat diet*. Peptides, 2013. **46**: p. 47-52.
127. Santos, S.H., et al., *Improved lipid and glucose metabolism in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1-7)*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(5): p. 953-61.
128. Santos, S.H., et al., *Increased circulating angiotensin-(1-7) protects white adipose tissue against development of a proinflammatory state stimulated by a high-fat diet*. Regul Pept, 2012. **178**(1-3): p. 64-70.
129. Morawietz, H., et al., *Endothelial Protection, AT1 blockade and Cholesterol-Dependent Oxidative Stress: the EPAS trial*. Circulation, 2006. **114**(1 Suppl): p. I296-301.

130. Morawietz, H., *Beyond blood pressure: endothelial protection against hypercholesterolemia by angiotensin II type-1 receptor blockade*. Hypertension, 2005. **45**(2): p. 185-6.
131. Iino, K., et al., *Candesartan improves impaired endothelial function in the human coronary artery*. Coron Artery Dis, 2012. **23**(4): p. 278-83.
132. Ghiadoni, L., et al., *Effect of the angiotensin II type 1 receptor blocker candesartan on endothelial function in patients with essential hypertension*. Hypertension, 2000. **35**(1 Pt 2): p. 501-6.
133. Prasad, A., et al., *Acute and chronic angiotensin-1 receptor antagonism reverses endothelial dysfunction in atherosclerosis*. Circulation, 2000. **101**(20): p. 2349-54.
134. Wassmann, S., et al., *Angiotensin II type 1 receptor antagonism improves hypercholesterolemia-associated endothelial dysfunction*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(7): p. 1208-12.
135. Petnehazy, T., et al., *Angiotensin II type-1 receptor antagonism attenuates the inflammatory and thrombogenic responses to hypercholesterolemia in venules*. Hypertension, 2005. **45**(2): p. 209-15.
136. Chen, H., et al., *Upregulation of LOX-1 expression in aorta of hypercholesterolemic rabbits: modulation by losartan*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **276**(3): p. 1100-4.
137. Schieffer, B., et al., *Comparative effects of AT1-antagonism and angiotensin-converting enzyme inhibition on markers of inflammation and platelet aggregation in patients with coronary artery disease*. J Am Coll Cardiol, 2004. **44**(2): p. 362-8.
138. Montecucco, F., A. Pende, and F. Mach, *The renin-angiotensin system modulates inflammatory processes in atherosclerosis: evidence from basic research and clinical studies*. Mediators Inflamm, 2009. **2009**: p. 752406.
139. Klinghammer, L., et al., *Impact of telmisartan on the inflammatory state in patients with coronary atherosclerosis--influence on IP-10, TNF- $\alpha$  and MCP-1*. Cytokine, 2013. **62**(2): p. 290-6.
140. Fliser, D., K. Buchholz, and H. Haller, *Antiinflammatory effects of angiotensin II subtype 1 receptor blockade in hypertensive patients with microinflammation*. Circulation, 2004. **110**(9): p. 1103-7.
141. Hirohata, A., et al., *Impact of olmesartan on progression of coronary atherosclerosis a serial volumetric intravascular ultrasound analysis from the OLIVUS (impact of OLmesarten on progression of coronary atherosclerosis: evaluation by intravascular ultrasound) trial*. J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(10): p. 976-82.
142. Sasaki, T., et al., *AT1 blockade attenuates atherosclerotic plaque destabilization accompanied by the suppression of cathepsin S activity in apoE-deficient mice*. Atherosclerosis, 2010. **210**(2): p. 430-7.
143. Blessing, E., et al., *Anti-atherosclerotic properties of telmisartan in advanced atherosclerotic lesions in apolipoprotein E deficient mice*. Atherosclerosis, 2008. **199**(2): p. 295-303.
144. Takaya, T., et al., *Angiotensin II type 1 receptor blocker telmisartan suppresses superoxide production and reduces atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E-deficient mice*. Atherosclerosis, 2006. **186**(2): p. 402-10.
145. Dol, F., et al., *Angiotensin AT1 receptor antagonist irbesartan decreases lesion size, chemokine expression, and macrophage accumulation in apolipoprotein E-deficient mice*. J Cardiovasc Pharmacol, 2001. **38**(3): p. 395-405.

146. Miesel, A., et al., *Double blockade of angiotensin II (AT<sub>1</sub>)-receptors and ACE does not improve weight gain and glucose homeostasis better than single-drug treatments in obese rats.* Br J Pharmacol, 2012. **165**(8): p. 2721-35.
147. Müller-Fielitz, H., et al., *Improved insulin sensitivity after long-term treatment with AT<sub>1</sub> blockers is not associated with PPAR $\gamma$  target gene regulation.* Endocrinology, 2012. **153**(3): p. 1103-15.
148. Müller-Fielitz, H., et al., *Chronic blockade of angiotensin AT<sub>1</sub> receptors improves cardinal symptoms of metabolic syndrome in diet-induced obesity in rats.* Br J Pharmacol, 2014. **171**(3): p. 746-60.
149. Mori, Y., Y. Itoh, and N. Tajima, *Angiotensin II receptor blockers downsize adipocytes in spontaneously type 2 diabetic rats with visceral fat obesity.* Am J Hypertens, 2007. **20**(4): p. 431-6.
150. Müller-Fielitz, H., et al., *Weight loss and hypophagia after high-dose AT<sub>1</sub>-blockade is only observed after high dosing and depends on regular leptin signalling but not blood pressure.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2011. **383**(4): p. 373-84.
151. Shiuchi, T., et al., *Angiotensin II type-1 receptor blocker valsartan enhances insulin sensitivity in skeletal muscles of diabetic mice.* Hypertension, 2004. **43**(5): p. 1003-10.
152. Iyer, S.N. and M.J. Katovich, *Effect of acute and chronic losartan treatment on glucose tolerance and insulin sensitivity in fructose-fed rats.* Am J Hypertens, 1996. **9**(7): p. 662-8.
153. Elliott, W.J. and P.M. Meyer, *Incident diabetes in clinical trials of antihypertensive drugs: a network meta-analysis.* Lancet, 2007. **369**(9557): p. 201-7.
154. McMurray, J.J., et al., *Effect of valsartan on the incidence of diabetes and cardiovascular events.* N Engl J Med, 2010. **362**(16): p. 1477-90.
155. Abuissa, H., et al., *Angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers for prevention of type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials.* J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(5): p. 821-6.
156. Gillespie, E.L., et al., *The impact of ACE inhibitors or angiotensin II type 1 receptor blockers on the development of new-onset type 2 diabetes.* Diabetes Care, 2005. **28**(9): p. 2261-6.
157. Igase, M., et al., *Angiotensin II AT<sub>1</sub> receptors regulate ACE2 and angiotensin-(1-7) expression in the aorta of spontaneously hypertensive rats.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(3): p. H1013-9.
158. Kriszta, G., et al., *Effects of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors and Angiotensin Receptor Blockers on Angiotensin-Converting Enzyme 2 Levels: A Comprehensive Analysis Based on Animal Studies.* Front Pharmacol, 2021. **12**: p. 619524.
159. Schuchard, J., et al., *Lack of weight gain after angiotensin AT<sub>1</sub> receptor blockade in diet-induced obesity is partly mediated by an angiotensin-(1-7)/Mas-dependent pathway.* Br J Pharmacol, 2015. **172**(15): p. 3764-78.
160. Iwai, M., et al., *Possible involvement of angiotensin-converting enzyme 2 and Mas activation in inhibitory effects of angiotensin II Type 1 receptor blockade on vascular remodeling.* Hypertension, 2012. **60**(1): p. 137-44.
161. Pernomian, L., et al., *MAS receptors mediate vasoprotective and atheroprotective effects of candesartan upon the recovery of vascular angiotensin-converting*

- enzyme 2-angiotensin-(1-7)-MAS axis functionality. *Eur J Pharmacol*, 2015. **764**: p. 173-88.
162. Kucharewicz, I., et al., *Antithrombotic effect of captopril and losartan is mediated by angiotensin-(1-7)*. *Hypertension*, 2002. **40**(5): p. 774-9.
163. Dapper, C., et al., *The antiobese effect of AT1 receptor blockade is augmented in mice lacking Mas*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2019. **392**(7): p. 865-77.
164. Emini Veseli, B., et al., *Animal models of atherosclerosis*. *Eur J Pharmacol*, 2017. **816**: p. 3-13.
165. Bjørklund, M.M., et al., *Induction of atherosclerosis in mice and hamsters without germline genetic engineering*. *Circ Res*, 2014. **114**(11): p. 1684-9.
166. Roche-Molina, M., et al., *Induction of sustained hypercholesterolemia by single adeno-associated virus-mediated gene transfer of mutant hPCSK9*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015. **35**(1): p. 50-9.
167. Lambert, G., et al., *The PCSK9 decade*. *J Lipid Res*, 2012. **53**(12): p. 2515-24.
168. Barale, C., et al., *PCSK9 Biology and Its Role in Atherothrombosis*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(11).
169. Lin, Y., et al., *Practical assessment of the quantification of atherosclerotic lesions in apoE<sup>-/-</sup> mice*. *Mol Med Rep*, 2015. **12**(4): p. 5298-306.
170. Xu, X., et al., *Anti-LOX-1 rescues endothelial function in coronary arterioles in atherosclerotic ApoE knockout mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(4): p. 871-7.
171. d'Uscio, L.V., et al., *Chronic ET(A) receptor blockade prevents endothelial dysfunction of small arteries in apolipoprotein E-deficient mice*. *Cardiovasc Res*, 2002. **53**(2): p. 487-95.
172. Ellis, A., et al., *Effects of a Western diet versus high glucose on endothelium-dependent relaxation in murine micro- and macro-vasculature*. *Eur J Pharmacol*, 2008. **601**(1-3): p. 111-7.
173. Meyer, G. and N.M. Amer, *Novel optical approach to atomic force microscopy*. *Applied Physics Letters*, 1988. **53**: p. 1045-7.
174. Kliche, K., et al., *Role of cellular mechanics in the function and life span of vascular endothelium*. *Pflugers Arch*, 2011. **462**(2): p. 209-17.
175. Radmacher, M., *Measuring the elastic properties of biological samples with the AFM*. *IEEE Eng Med Biol Mag*, 1997. **16**(2): p. 47-57.
176. Cappella, B. and G. Dietler, *Force-distance curves by atomic force microscopy*. *Surface Science Reports*, 1999. **34**: p. 1-104.
177. Wiesinger, A., et al., *Nanomechanics of the endothelial glycocalyx in experimental sepsis*. *PLoS One*, 2013. **8**(11): p. e80905.
178. Achner, L., et al., *AFM-based nanoindentation indicates an impaired cortical stiffness in the AAV-PCSK9(DY) atherosclerosis mouse model*. *Pflugers Arch*, 2022. **474**(9): p. 993-1002.
179. Jeong, K.H., et al., *Real-time monitoring of the effects of telmisartan on angiotensin II-induced mechanical changes in live mesangial cells using atomic force microscopy*. *Kidney Blood Press Res*, 2012. **35**(6): p. 573-82.

180. Kim, J.S., et al., *Observations of the Effects of Angiotensin II Receptor Blocker on Angiotensin II-Induced Morphological and Mechanical Changes in Renal Tubular Epithelial Cells Using Atomic Force Microscopy*. Biomed Res Int, 2018. **2018**: p. 9208795.
181. Buchmann, G.K., et al., *Deletion of NoxO1 limits atherosclerosis development in female mice*. Redox Biol, 2020. **37**: p. 101713.
182. Jungmann, A., et al., *Protocol for Efficient Generation and Characterization of Adeno-Associated Viral Vectors*. Hum Gene Ther Methods, 2017. **28**(5): p. 235-46.
183. Sonntag, F., et al., *The assembly-activating protein promotes capsid assembly of different adeno-associated virus serotypes*. J Virol, 2011. **85**(23): p. 12686-97.
184. Schuster, F., et al., *Telmisartan prevents diet-induced obesity and preserves leptin transport across the blood-brain barrier in high-fat diet-fed mice*. Pflugers Arch, 2018. **470**(11): p. 1673-89.
185. Maase, M., et al., *Combined Raman- and AFM-based detection of biochemical and nanomechanical features of endothelial dysfunction in aorta isolated from ApoE/LDLR<sup>-/-</sup> mice*. Nanomedicine, 2019. **16**: p. 97-105.
186. Aherrahrou, R., et al., *CYP17A1 deficient XY mice display susceptibility to atherosclerosis, altered lipidomic profile and atypical sex development*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 8792.
187. Segura-Puimedon, M., et al., *Proatherosclerotic Effect of the  $\alpha$ 1-Subunit of Soluble Guanylyl Cyclase by Promoting Smooth Muscle Phenotypic Switching*. Am J Pathol, 2016. **186**(8): p. 2220-31.
188. Bolger, A.M., M. Lohse, and B. Usadel, *Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data*. Bioinformatics, 2014. **30**(15): p. 2114-20.
189. Dobin, A., et al., *STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner*. Bioinformatics, 2013. **29**(1): p. 15-21.
190. Liao, Y., G.K. Smyth, and W. Shi, *featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features*. Bioinformatics, 2014. **30**(7): p. 923-30.
191. Love, M.I., W. Huber, and S. Anders, *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2*. Genome Biol, 2014. **15**(12): p. 550.
192. *CTD Gene-Disease Associations dataset [https://maayanlab.cloud/Harmonizome/gene\\_set/Atherosclerosis/CTD+Gene-Disease+Associations](https://maayanlab.cloud/Harmonizome/gene_set/Atherosclerosis/CTD+Gene-Disease+Associations)*. letzter Zugriff 23.07.2024].
193. Lopez, M., et al., *Vascular biotransformation of organic nitrates is independent of cytochrome P450 monooxygenases*. Br J Pharmacol, 2021. **178**(7): p. 1495-506.
194. Klersy, T., et al., *The anti-atherosclerotic effect of chronic AT1 receptor blocker treatment also depends on the ACE2/Ang(1-7)/Mas axis*. Biomed Pharmacother, 2025. **186**: p. 117990.
195. Ngai, Y.F., et al., *Ldlr<sup>-/-</sup> mice display decreased susceptibility to Western-type diet-induced obesity due to increased thermogenesis*. Endocrinology, 2010. **151**(11): p. 5226-36.
196. McGowan, E.M., et al., *Impact of 4 weeks of western diet and aerobic exercise training on whole-body phenotype and skeletal muscle mitochondrial respiration in male and female mice*. Physiol Rep, 2022. **10**(24).

197. Rawish, E., et al., *Telmisartan prevents development of obesity and normalizes hypothalamic lipid droplets*. J Endocrinol, 2020. **244**(1): p. 95-110.
198. Andrade, J.M., et al., *Proteomic white adipose tissue analysis of obese mice fed with a high-fat diet and treated with oral angiotensin-(1-7)*. Peptides, 2014. **60**: p. 56-62.
199. Singer, D., et al., *Defective intestinal amino acid absorption in Ace2 null mice*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012. **303**(6): p. 686-95.
200. Nimptsch, K., S. Konigorski, and T. Pischon, *Diagnosis of obesity and use of obesity biomarkers in science and clinical medicine*. Metabolism, 2019. **92**: p. 61-70.
201. Cheng, C.Y., J.Y. Chu, and B.K. Chow, *Central and peripheral administration of secretin inhibits food intake in mice through the activation of the melanocortin system*. Neuropsychopharmacology, 2011. **36**(2): p. 459-71.
202. Würfel, M., et al., *Adipokines as Clinically Relevant Therapeutic Targets in Obesity*. Biomedicines, 2023. **11**(5).
203. Ernsberger, P. and R.J. Koletsky, *Metabolic actions of angiotensin receptor antagonists: PPAR-gamma agonist actions or a class effect?* Curr Opin Pharmacol, 2007. **7**(2): p. 140-5.
204. Banerjee, R.R. and M.A. Lazar, *Resistin: molecular history and prognosis*. J Mol Med (Berl), 2003. **81**(4): p. 218-26.
205. Oliveira Andrade, J.M., et al., *Cross talk between angiotensin-(1-7)/Mas axis and sirtuins in adipose tissue and metabolism of high-fat feed mice*. Peptides, 2014. **55**: p. 158-65.
206. Churm, R., et al., *Ghrelin function in human obesity and type 2 diabetes: a concise review*. Obes Rev, 2017. **18**(2): p. 140-8.
207. Karra, E., K. Chandarana, and R.L. Batterham, *The role of peptide YY in appetite regulation and obesity*. J Physiol, 2009. **587**(1): p. 19-25.
208. Pais, R., et al., *Angiotensin II Type 1 Receptor-Dependent GLP-1 and PYY Secretion in Mice and Humans*. Endocrinology, 2016. **157**(10): p. 3821-31.
209. Matthews, D.R., et al., *Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man*. Diabetologia, 1985. **28**(7): p. 412-9.
210. Crackower, M.A., et al., *Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function*. Nature, 2002. **417**(6891): p. 822-8.
211. Müller, H., et al., *Angiotensin II stimulates the reactivity of the pituitary-adrenal axis in leptin-resistant Zucker rats, thereby influencing the glucose utilization*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **293**(3): p. E802-10.
212. Sahr, A., et al., *The Angiotensin-(1-7)/Mas Axis Improves Pancreatic  $\beta$ -Cell Function in Vitro and in Vivo*. Endocrinology, 2016. **157**(12): p. 4677-90.
213. Jones, A.G. and A.T. Hattersley, *The clinical utility of C-peptide measurement in the care of patients with diabetes*. Diabet Med, 2013. **30**(7): p. 803-17.
214. Kyvelou, S.M., et al., *Effects of antihypertensive treatment with angiotensin II receptor blockers on lipid profile: an open multi-drug comparison trial*. Hellenic J Cardiol, 2006. **47**(1): p. 21-8.
215. Kintscher, U., et al., *Effect of high-dose valsartan on inflammatory and lipid parameters in patients with Type 2 diabetes and hypertension*. Diabetes Res Clin Pract, 2010. **89**(3): p. 209-15.

216. Inoue, T., et al., *Effect of telmisartan on cholesterol levels in patients with hypertension - Saga Telmisartan Aggressive Research (STAR)*. *Horm Metab Res*, 2007. **39**(5): p. 372-6.
217. Thomas, M.C., et al., *Genetic Ace2 deficiency accentuates vascular inflammation and atherosclerosis in the ApoE knockout mouse*. *Circ Res*, 2010. **107**(7): p. 888-97.
218. Tikellis, C., et al., *Circulating Soluble ACE2 Plays an Independent Role to Protect against Vascular Damage in Diabetic Mice*. *Antioxidants (Basel)*, 2022. **11**(5).
219. Sahara, M., et al., *Deletion of angiotensin-converting enzyme 2 promotes the development of atherosclerosis and arterial neointima formation*. *Cardiovasc Res*, 2014. **101**(2): p. 236-46.
220. Tesanovic, S., et al., *Vasoprotective and atheroprotective effects of angiotensin (1-7) in apolipoprotein E-deficient mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(8): p. 1606-13.
221. Yang, G., et al., *Angiotensin-(1-7)-induced Mas receptor activation attenuates atherosclerosis through a nitric oxide-dependent mechanism in apolipoproteinE-KO mice*. *Pflugers Arch*, 2018. **470**(4): p. 661-7.
222. Rabelo, L.A., et al., *Genetic Deletion of ACE2 Induces Vascular Dysfunction in C57BL/6 Mice: Role of Nitric Oxide Imbalance and Oxidative Stress*. *PLoS One*, 2016. **11**(4).
223. Tedgui, A. and Z. Mallat, *Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways*. *Physiol Rev*, 2006. **86**(2): p. 515-81.
224. Lelis, D.F., et al., *Angiotensin-(1-7), Adipokines and Inflammation*. *Metabolism*, 2019. **95**: p. 36-45.
225. Guang, Y., et al., *Angiotensin-(1-7)/Mas Axis and vascular inflammation*. *European Scientific Journal, ESJ*, 2015. **11**(33).
226. Zhang, Y.H., et al., *ACE2 and Ang-(1-7) protect endothelial cell function and prevent early atherosclerosis by inhibiting inflammatory response*. *Inflamm Res*, 2015. **64**(3-4): p. 253-60.
227. Szymonski, M., M. Targosz-Korecka, and K.E. Malek-Zietek, *Nano-mechanical model of endothelial dysfunction for AFM-based diagnostics at the cellular level*. *Pharmacol Rep*, 2015. **67**(4): p. 728-35.
228. Fels, J., et al., *Nanomechanics of vascular endothelium*. *Cell Tissue Res*, 2014. **355**(3): p. 727-37.
229. Weinbaum, S., J.M. Tarbell, and E.R. Damiano, *The structure and function of the endothelial glycocalyx layer*. *Annu Rev Biomed Eng*, 2007. **9**: p. 121-67.
230. Cosgun, Z.C., B. Fels, and K. Kusche-Vihrog, *Nanomechanics of the Endothelial Glycocalyx: From Structure to Function*. *Am J Pathol*, 2020. **190**(4): p. 732-41.
231. Tarjus, A., et al., *The endothelial  $\alpha$ ENaC contributes to vascular endothelial function in vivo*. *PLoS One*, 2017. **12**(9).
232. Oberleithner, H., et al., *Plasma sodium stiffens vascular endothelium and reduces nitric oxide release*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(41): p. 16281-6.
233. Oberleithner, H., et al., *Potassium softens vascular endothelium and increases nitric oxide release*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(8): p. 2829-34.
234. Fels, J., et al., *Cortical actin nanodynamics determines nitric oxide release in vascular endothelium*. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e41520.

235. Fels, J., et al., *Nitric oxide release follows endothelial nanomechanics and not vice versa*. *Pflugers Arch*, 2010. **460**(5): p. 915-23.
236. Le Master, E., et al., *Proatherogenic Flow Increases Endothelial Stiffness via Enhanced CD36-Mediated Uptake of Oxidized Low-Density Lipoproteins*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018. **38**(1): p. 64-75.
237. Shan, H., et al., *Protection of endothelial cells against Ang II-induced impairment: Involvement of both PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  via PI3K/Akt pathway*. *Clin Exp Hypertens*, 2016. **38**(7): p. 571-7.
238. Xu, Z., et al., *Peptidomics analysis revealed that a novel peptide VMP-19 protects against Ang II-induced injury in human umbilical vein endothelial cells*. *Mol Med Rep*, 2021. **23**(4): p. 298.
239. Cianchetti, S., et al., *Anti-inflammatory and anti-oxidant properties of telmisartan in cultured human umbilical vein endothelial cells*. *Atherosclerosis*, 2008. **198**(1): p. 22-8.
240. Lee, G.J., et al., *Observation of angiotensin II-induced changes in fixed and live mesangial cells by atomic force microscopy*. *Micron*, 2010. **41**(3): p. 220-6.
241. Peña Silva, R.A., et al., *Impact of ACE2 deficiency and oxidative stress on cerebrovascular function with aging*. *Stroke*, 2012. **43**(12): p. 3358-63.
242. Ikejima, H., et al., *Effects of telmisartan, a unique angiotensin receptor blocker with selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-modulating activity, on nitric oxide bioavailability and atherosclerotic change*. *J Hypertens*, 2008. **26**(5): p. 964-72.
243. Shelbaya, K., et al., *Large-Scale Proteomics Identifies Novel Biomarkers and Circulating Risk Factors for Aortic Stenosis*. *J Am Coll Cardiol*, 2024. **83**(5): p. 577-591.
244. Goncalves, I., et al., *Elevated Plasma Levels of MMP-12 Are Associated With Atherosclerotic Burden and Symptomatic Cardiovascular Disease in Subjects With Type 2 Diabetes*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015. **35**(7): p. 1723-31.
245. Yamada, S., et al., *Matrix metalloproteinase 12 accelerates the initiation of atherosclerosis and stimulates the progression of fatty streaks to fibrous plaques in transgenic rabbits*. *Am J Pathol*, 2008. **172**(5): p. 1419-29.
246. Liu, S.L., et al., *Matrix metalloproteinase-12 is an essential mediator of acute and chronic arterial stiffening*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 17189.
247. Krueger, F., et al., *AT1-receptor blockade attenuates outward aortic remodeling associated with diet-induced obesity in mice*. *Clin Sci (Lond)*, 2017. **131**(15): p. 1989-2005.
248. Du, L.J., et al., *NCOR1 maintains the homeostasis of vascular smooth muscle cells and protects against aortic aneurysm*. *Cell Death Differ*, 2023. **30**(3): p. 618-631.
249. Ji, K., et al., *Exploration of the mechanisms by which 3,4-benzopyrene promotes angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in mice*. *J Vasc Surg*, 2014. **59**(2): p. 492-9.
250. Gopal, K., et al.,  *$\beta$ -Carotene Attenuates Angiotensin II-Induced Aortic Aneurysm by Alleviating Macrophage Recruitment in Apoe(-/-) Mice*. *PLoS One*, 2013. **8**(6): p. e67098.
251. Kunath, A., et al., *Inhibition of angiotensin-induced aortic aneurysm by metformin in apolipoprotein E-deficient mice*. *JVS Vasc Sci*, 2021. **2**: p. 33-42.

252. Ma, H., et al., *AVE0991, a nonpeptide angiotensin-(1-7) mimic, inhibits angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in apolipoprotein E knockout mice.* J Mol Med (Berl), 2020. **98**(4): p. 541-51.
253. Magalhães, G.S., et al., *Treatment with inhaled formulation of angiotensin-(1-7) reverses inflammation and pulmonary remodeling in a model of chronic asthma.* Immunobiology, 2020. **225**(3): p. 151957.
254. Wang, Z., et al., *Characteristics of Ang-(1-7)/Mas-Mediated Amelioration of Joint Inflammation and Cardiac Complications in Mice With Collagen-Induced Arthritis.* Front Immunol, 2021. **12**: p. 655614.
255. Lavigne, M.C., et al., *Human bronchial epithelial cells express and secrete MMP-12.* Biochem Biophys Res Commun, 2004. **324**(2): p. 534-46.
256. Li, W., et al., *Imbalance between angiotensin II and angiotensin-(1-7) in human coronary atherosclerosis.* J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2016. **17**(3).
257. Roth, L., et al., *Cholesterol-independent effects of atorvastatin prevent cardiovascular morbidity and mortality in a mouse model of atherosclerotic plaque rupture.* Vascul Pharmacol, 2016. **80**: p. 50-8.
258. Zhu, M.L., et al., *Angiotensin II type 1 receptor blockers prevent aortic arterial stiffness in elderly patients with hypertension.* Clin Exp Hypertens, 2019. **41**(7): p. 657-661.
259. Turla, M.B., et al., *Mechanisms of angiotensin II- and arginine vasopressin-induced increases in protein synthesis and content in cultured rat aortic smooth muscle cells. Evidence for selective increases in smooth muscle isoactin expression.* Circ Res, 1991. **68**(1): p. 288-99.
260. Louis, H., et al., *Role of alpha1beta1-integrin in arterial stiffness and angiotensin-induced arterial wall hypertrophy in mice.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(4): p. H2597-604.
261. Palma-Lara, I., et al., *FAM20C Overview: Classic and Novel Targets, Pathogenic Variants and Raine Syndrome Phenotypes.* Int J Mol Sci, 2021. **22**(15).
262. Png, G., et al., *Identifying causal serum protein-cardiometabolic trait relationships using whole genome sequencing.* Hum Mol Genet, 2023. **32**(8): p. 1266-75.
263. Gao, P., et al., *A meprin inhibitor suppresses atherosclerotic plaque formation in ApoE<sup>-/-</sup> mice.* Atherosclerosis, 2009. **207**(1): p. 84-92.
264. Simonen, P., et al., *High cholesterol absorption: A risk factor of atherosclerotic cardiovascular diseases? Atherosclerosis, 2023. 376: p. 53-62.*
265. Tuli, J.S., J.A. Smith, and D.B. Morton, *Stress measurements in mice after transportation.* Lab Anim, 1995. **29**(2): p. 132-8.
266. Schmidt, K.T., *Restraint to Induce Stress in Mice and Rats.* J Vis Exp, 2024(214).
267. Francois, M., et al., *Assessing the effects of stress on feeding behaviors in laboratory mice.* Elife, 2022. **11**.

## 7 Anlagen

### 7.1 Anhang

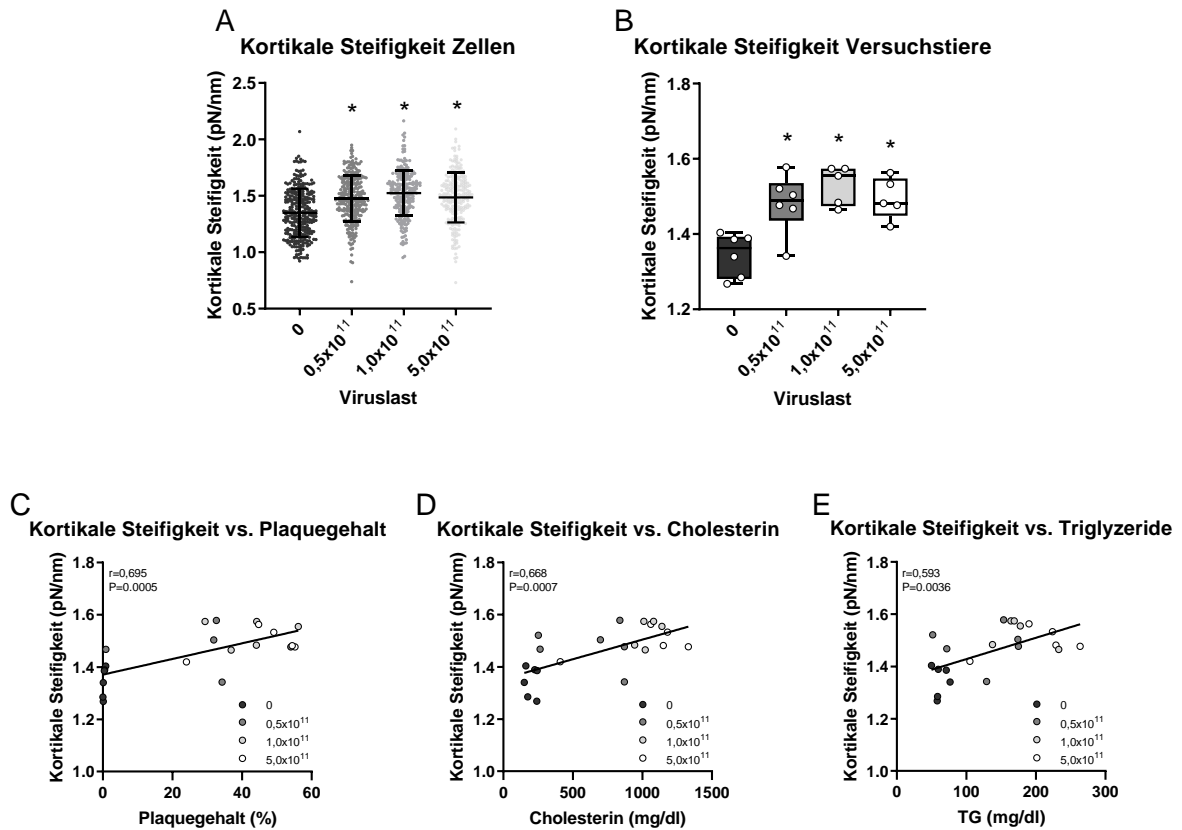
#### 7.1.1 Vergleich der Auswertung der Rasterkraftmikroskopie durch zwei unabhängige Auswerter:innen

Im Vorfeld dieser Arbeit erfolgte – wie in Abschnitt 1.6 beschrieben – die Etablierung der Rasterkraftmikroskopie als Verfahren zur Detektion von endothelialer Dysfunktion im PCSK9<sup>DY</sup>-AAV-Atherosklerosemodell [178]. Im Rahmen dieser Veröffentlichung erfolgte die Auswertung der Daten der Rasterkraftmikroskopie durch zwei unabhängige Auswerter:innen und es wurde ein Mittelwert dieser Auswertungen gebildet und für die weitere Darstellung der Ergebnisse genutzt. An dieser Stelle soll eine Darstellung der Unterschiede zwischen der Auswertung einer Person und der gemittelten Auswertung beider Personen erfolgen.

Unabhängig der Auswertung nur einer Person oder der gemittelten Auswertung zeigte sich eine Erhöhung der kortikalen Steifigkeit aller mit Virus behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies trifft sowohl für die Auswertung auf Zellebene als auch bei der Betrachtung der einzelnen Versuchstiere zu (Abb. 6, 21). Ebenso konnte unabhängig der Auswertung eine positive Korrelation von kortikaler Steifigkeit und Plaquegehalt sowie kortikaler Steifigkeit und Cholesterin- bzw. Triglyzeridkonzentration registriert werden (Abb. 6, 21).

Die Streuung der Daten zeigten sich bei der einzelnen Auswerterin im Vergleich zur gemittelten Auswertung erhöht. So lag die Standardabweichung bei der Auswertung auf Zellebene im Mittel bei 0,2107 pN/nm und auf Versuchstierebene bei 0,0609 pN/nm. Betrachtet man die gemittelte Auswertung lagen diese nur bei 0,149 pN/nm und 0,0393 pN/nm. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass die absoluten Werte der kortikalen Steifigkeit der einzelnen Auswerterin insgesamt höher lagen als in der gemeinsamen Auswertung.

Es lässt sich also ableiten, dass es zwar gewissen Unterschiede in der Auswertung der Rasterkraftmikroskopie einzelner Auswerter:innen gibt, diese aber insgesamt in den Ergebnissen bezogen auf die Signifikanz der Unterschiede in den unterschiedlichen Behandlungsgruppen keinen Einfluss hatten.



**Abb. 21: Ergebnisse der Rasterkraftmikroskopie einer auswertenden Person**

A: Kortikale Steifigkeit aller gemessenen Endothelzellen in Abhängigkeit der PCSK9<sup>DY</sup>-AAV-Injektion, Kruskal-Wallis Test [ $P < 0.0001$ ] mit folgendem Dunn's multiple comparisons test, Darstellung der Daten im Streudiagramm mit Mittelwert  $\pm$ SD durch horizontale Linien,  $n=238-300$ ; B: Kortikale Steifigkeit bezogen auf die einzelnen Versuchstiere in Abhängigkeit der PCSK9<sup>DY</sup>-AAV-Injektion, 1-way ANOVA [ $F=9.551$ ,  $P=0.0005$ ] mit folgendem Tukey's multiple comparisons test, Darstellung des Medians mit oberem und unterem Quartil als Boxplot, die Antennen zeigen den Minimal- und Maximalwert an,  $*p < 0.05$  vs. 0; C-E: Korrelationsanalysen zwischen der kortikalen Steifigkeit und dem Plauegehalt(C), der Cholesterin-(D) und der Triglyzeridplasmakonzentration(E), Korrelationsanalysen mittels 2-tailed Pearson test,  $n=5-6$ .

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System .....	10
Abb. 2: Funktionsprinzip des AFM .....	14
Abb. 3: Kraftkurve .....	15
Abb. 4: Gesamtcholesterin- und Triglyzeridkonzentrationen in Abhängigkeit der PCSK9 <sup>DY</sup> -AAV-Injektion .....	15
Abb. 5: Histologische Untersuchung der Aortenwurzel in Abhängigkeit der PCSK9 <sup>DY</sup> -AAV-Injektion .....	16
Abb. 6: Rasterkraftmikroskopie in Abhängigkeit der PCSK9 <sup>DY</sup> -AAV-Injektion .....	17

Abb. 7: Zeitplan der in-vivo Studie .....	24
Abb. 8: Ergebnisse der in-vitro Versuchsreihe .....	32
Abb. 9: Gewichtsentwicklung und Körperfettzusammensetzung .....	34
Abb. 10: Plasmakonzentrationen verschiedener Hormone am Ende der Behandlungsperiode .....	36
Abb. 11: Parameter der Glukosehomöostase am Ende der Behandlungsperiode .....	37
Abb. 12: Cholesterin- und Triglyzeridspiegel am Ende der Behandlungsperiode .....	38
Abb. 13: Histologische Untersuchung der Aortenwurzel am Ende der Behandlungsperiode .....	39
Abb. 14: Funktionelle Parameter des Herz-Kreislaufsystems am Ende der Behandlungsperiode .....	40
Abb. 15: Ergebnisse der Rasterkraftmikroskopie der in-vivo Studie .....	41
Abb. 16: Korrelationsanalysen der Ergebnisse der Rasterkraftmikroskopie .....	43
Abb. 17: Hauptkomponentenanalysen (PCA; unter Verwendung von FactoMineR) und Volcano Blots ( $FDR \leq 0,05$ , $-0,585 < \log FC > 0,585$ ) im Vergleich zwischen chow-gefütterten wt (C57BL/6N)- und ACE2 ko-Mäusen .....	45
Abb. 18: Hauptkomponentenanalysen (PCA; unter Verwendung von FactoMineR) und Volcano Blots ( $FDR \leq 0,05$ , $-0,585 < \log FC > 0,585$ ) von wt (C57BL/6N)- und ACE2 ko- Mäusen in Abhängigkeit der Behandlungsgruppe .....	46
Abb. 19: Veränderungen in der Genexpression in wt (C57BL/6N)- und ACE2 ko-Mäusen, die durch die PCSK9 <sup>DY</sup> -AAV-Injektion und WD Fütterung verändert wurden, aber auch durch die TEL Therapie gegenreguliert wurden .....	46
Abb. 20: Plasmakonzentrationen verschiedener Zytokine am Ende der Behandlungsperiode .....	48
Abb. 21: Ergebnisse der Rasterkraftmikroskopie einer auswertenden Person .....	80

### 7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Definition des Metabolischen Syndroms .....	1
Tab. 2: Übersicht über die Behandlungsgruppen der in-vitro Versuchsreihe .....	20
Tab. 3: Nährstoffzusammensetzung und Energiegehalt der verwendeten Diäten .....	22

Tab. 4: Übersicht über die Behandlungsgruppen der in-vivo Studie .....	23
Tab. 5: Ausgangswerte vor Beginn der Behandlungsperiode.....	33
Tab. 6: Funktionelle Parameter der Kontrollgruppen (chow Futter, VEH Behandlung) am Ende der Behandlungsperiode.....	33
Tab. 7: Plasmakonzentrationen verschiedener Parameter der Kontrollgruppen (chow Futter, VEH Behandlung) am Ende der Behandlungsperiode .....	35
Tab. 8: Plasmakonzentrationen verschiedener Zytokine der Kontrollgruppen (chow Futter, VEH Behandlung) am Ende der Behandlungsperiode.....	47

## 7.4 Material- und Geräteverzeichnis

### 7.4.1 Substanzen und Lösungen

Angiotensin II acetate salt	Bachem Holding AG, Schweiz
Cell-Tak™	BD Biosciences, USA
Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline -w/o Magnesium, w/o Calcium	Biowest, USA
Ethanol	J. T. Baker, Niederlande
Fetal calf serum (FCS)	PAA Laboratories, Österreich
Flüssiger Stickstoff	Lokaler Lieferant
Fibronektin	Sigma-Aldrich, Deutschland
Gelatine	Sigma-Aldrich, Deutschland
Gibco Medium 199	Gibco, USA
Gummi arabicum, sprühgetrocknet	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Heparin	Biochrom, Schweiz
HEPES Puffer (RT und 37°)	hausangesetzt aus Carl Roth Chemikalien
HUVEC	Isolation von Nabelschnüren aus dem Marienkrankenhaus Lübeck
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Deutschland
Isotone Natriumchlorid-Lösung 0,9%	Berlin-Chemie AG
Ketamin 10% Injektionslösung	medistar Arzneimittelvertrieb GmbH, Deutschland
Losartan-Kalium	Sigma-Aldrich, Deutschland
Large vessel endothelial supplement (LVES)	Gibco, USA
Minimal essential medium (MEM)	Invitrogen Corp., USA
MEM vitamins	Invitrogen Corp., USA
MEM nonessential amino acids	Invitrogen Corp., USA
Natürliches Mineralwasser, evian®	Danone, Frankreich
Paraformaldehydlösung 4%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Penicillin	Gibco, USA
Pentobarbital	Sigma-Aldrich, Deutschland
Ringer-Lösung	Berlin-Chemie AG, Deutschland
RNAprotect®	QIAGEN N.V., Deutschland
Streptomycin	Gibco, USA
Telmisartan	Boehringer Ingelheim, Deutschland
Trockeneis	UKSH Campus-Apotheke, Lübeck, Deutschland
Trypsin/EDTA 0,05%	Sigma-Aldrich, USA
Xylazin Rompun® 2%	Bayer AG, Deutschland

## 7.4.2 Verbrauchsmaterialien

12-Well Zellkulturplatte CELLSTAR®  
Amber safe-lock tubes 0,5 ml  
Bechergläser  
-50 ml  
-2000 ml LABsolute®  
Cantilever  
-nominal spring constant von 30 und 10 pN/nm  
Deckgläser  
Diät für Mäuse  
-EF TD88137 mod. +1.25% Cholesterol  
- EF acc. D12450B mod.  
EDTA Microvette®, 100 K3E  
Einmalkanülen, AGANI™ Needle, 27Gx<sup>3</sup>/<sub>4</sub>"  
Einmalkanülen, Microlance™ 3, 23Gx1"  
Einmalkanülen, Microlance™ 3, 27Gx<sup>3</sup>/<sub>4</sub>"  
Einmalspritzen, BD Plastipak™, 1ml  
Einmalspritzen, Injekt®-F Luer Solo, 0,01-1ml  
Glukoseteststreifen, Accu-Chek® Inform II  
Hämatokritkapillaren, Na-Heparin, 60 µl, 75 mm  
Latex-Einmalhandschuhe Peha-soft, powderfree  
Mikropipetten (10, 100, 200, 1000 µl)  
-PIPETMAN  
-Finnpipette®  
Microvette® 500 LH  
Nitril-Einmalhandschuhe, Peha-soft® nitrile  
Parafilm® M  
Pipettenspitzen (20, 200, 1000 µl)  
Polypropylengefäße Falcon® (15 ml)  
  
Polypropylengefäße Falcon® (50 ml)  
  
Reagiergefäß (1,5 ml, 2 ml)  
Serologische Pipetten (5, 10, 25 ml)  
  
Tupfer, Pur-Zellin®  
Vinyl-Einmalhandschuhe 2000 PF  
Wägeschalen, Plastik, verschiedene Größen  
Zellkulturflaschen T75  
Zellkulturschale 35  
Zentrifugen-Filtereinheiten, Amicon® Ultra, 0,5 mL  
Zellzähl-Kammern SD 100 Cellometer®

## 7.4.3 Geräte

Absaughilfe Vacuboy  
AIRFLOW CONTROLLER AC3  
  
ARIA CS60 Chancing Station  
  
Atomic Force Microscope  
-Nanoscope Multimode8 AFM  
Autoklav Systec VX-65  
Blutzuckermessgerät, Accu-Chek® Performa  
Bruker minispec LF110  
Eismaschine  
Gefrierschränke (-20°C)

Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland  
Eppendorf AG, Deutschland

Schott AG, Deutschland  
Th. Geyer GmbH & Co. KG, Deutschland  
Novascan Technologies, USA

Carl Roth, Deutschland  
ssniff Spezialdiäten GmbH, Deutschland

Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland  
Terumo Deutschland GmbH, Deutschland  
Becton Dickinson GmbH, Deutschland  
Becton Dickinson GmbH, Deutschland  
Becton Dickinson GmbH, Deutschland  
B. Braun, Deutschland  
Roche Deutschland, Deutschland  
Hirschmann Laborgeräte, Deutschland  
Paul Hartmann AG, Deutschland

Gilson S.A.S., Frankreich  
Thermo Fisher Scientific, USA  
Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland  
Paul Hartmann AG, Deutschland  
American National Can™, USA  
Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland  
LABsolute®, Th. Geyer GmbH & Co. KG,  
Renningen, Deutschland  
Corning Science Mexiko S.A. de C. V.,  
Mexiko  
Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland  
greiner bio-one GmbH, Deutschland  
Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland  
Paul Hartmann AG, Deutschland  
Meditrade® GmbH, Deutschland  
neoLab Migge GmbH, Deutschland  
Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland  
Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland  
Merck Millipore Ltd., Irland  
Nexcelom Bioscience LLC., USA

Integra Biosciences GmbH, Deutschland  
Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co.  
KG, Deutschland  
Tecniplast Laboratory Animal Equipment  
S.P.A., Italien  
Bruker, USA

Systec GmbH, Deutschland  
Roche Deutschland, Deutschland  
Bruker, USA  
Ziegra Eismaschinen GmbH, Deutschland  
Liebherr-International Deutschland GmbH,  
Deutschland

Gefrierschränke (-80°C)  
-HERA Freeze HFU T Series  
-Kryotec  
HERACell VIOS 160i CO2 Inkubator  
Kühlschränke (2-8°C)  
-MEDline

Lichtmikroskop Olympus CKX53

MACSQuant Analyzers 10  
Nuklear-Magnet-Resonanz-Spektroskop  
-LF110-BCA Analyzer  
Pipettierhelfer  
-accu-jet® pro  
-pipetus®-standard

Sterile Werkbank  
-Z 100  
-MSC-Advantage  
Thermal Application Controller  
Vortex-Rüttler  
Waagen  
-ABT 100-5M  
-Cubis® II  
-PCB M Memory  
-440-47N  
Wärmebad GFL®  
Zellzähler Cellometer™ Auto T4  
Zentrifuge MIKRO 200R

Zentrifuge 5810

#### 7.4.4 Software

Cellometer Auto Counter  
EndNote 20.1  
GraphPad Prism, Version 7.0 und 8.0  
minispec Plus 6.0.3  
Office 365  
Protein Unfolding and Nano-Indentation Analysis Software  
- Punias 3D, Version 1.0 Release 2.3; Copyright 2009  
Research NanoScope Software, Version 9.20  
Origin® 8.5 Data Analysis and Graphing Software

Bauknecht Hausgeräte GmbH,  
Deutschland

Thermo Fisher Scientific, USA  
Kryotec-Kryosafe GmbH, Deutschland  
Thermo Fisher Scientific, USA

Liebherr-International Deutschland GmbH,  
Deutschland  
C. Bomann GmbH, Deutschland  
Olympus Europa SE & Co. KG,  
Deutschland  
Miltenyi Biotec, Deutschland  
Bruker, USA

BRAND GmbH + CO KG, Deutschland  
Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG,  
Deutschland

Schulz Lufttechnik GmbH, Deutschland  
Fisher Scientific GmbH, Deutschland  
Bruker, USA  
Werner Hassa GmbH, Deutschland

Kern & Sohn GmbH, Deutschland  
Sartorius AG, Deutschland  
Kern & Sohn GmbH, Deutschland  
Kern & Sohn GmbH, Deutschland  
Werner Haasa GmbH, Deutschland  
Nexcelom Bioscience LLC., USA  
Andreas Hettich GmbH & Co. KG,  
Deutschland  
Eppendorf AG, Deutschland

Nexcelom Bioscience LLC., USA  
Clarivate, USA  
GraphPad Software, USA  
Bruker, USA  
Microsoft, USA

Bruker, USA  
OriginLab®, USA

## 8 Danksagungen

Ich danke dem Instituts-Direktor Herrn Prof. Dr. Markus Schwaninger für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie an der Universität zu Lübeck.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Walter Raasch, der stets mit einem offenen Ohr für Fragen zur Verfügung stand und durch seine Unterstützung und Hilfestellung die Durchführung dieses Projekts möglich gemacht hat. Ebenso möchte ich Frau Prof. Dr. Kristina Kusche-Vihrog als meiner Co-Betreuerin und Herrn Dr. Benedikt Fels danken, ohne die die Arbeit am Institut für Physiologie der Universität zu Lübeck nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt zudem Herrn PD Dr. Zouhair Aherrahrou für die Unterstützung in der Durchführung der Versuche.

Herrn Prof. Dr. Michael Bader und Herrn Prof. Dr. Oliver Müller danke ich für die Kooperation und die Bereitstellung unserer transgenen Versuchstiere und des PCSK9<sup>DY</sup>-AAV. Außerdem bedanke ich mich bei den Mitarbeitenden des Institute for Cardiovascular Physiology der Goethe-Universität in Frankfurt (insbesondere Prof. Dr. Ralf P. Brandes und Dr. Flávia Rezende) für die unkomplizierte Zusammenarbeit sowie bei allen Mitarbeitenden des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie und des Instituts für Physiologie der Universität zu Lübeck und allen anderer beteiligten Institute, die in der Durchführung der Versuche unterstützend tätig waren. Besondere Erwähnung sollen hier Frau Urszula Frackowski, Annett Liebers und Frauke Spiecker finden.

Bei Frau Ines Stölting möchte ich mich für die Geduld in der technischen Einarbeitung sowie die liebevolle Betreuung während der Durchführung der Experimente bedanken.

Danken möchte ich außerdem dem Graduiertenkolleg 1957 *Adipocyte-Brain-Crosstalk* und seinen Mitgliedern sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Deutschen Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung für finanzielle und wissenschaftliche Unterstützung.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich insbesondere auch bei meinem Mit-Doktoranden Herrn Tobias Klersy für die zuverlässige und freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, meinen Freund:innen und meinem Partner für ihre unermüdliche Unterstützung während des gesamten Studiums und der Erarbeitung dieser Dissertation.

## 9 Veröffentlichungen

Achner L<sup>1</sup>, Klersy T<sup>1</sup>, Fels B, Reinberger T, Schmidt CX, Groß N, Hille S, Müller OJ, Aherrahrou Z, Kusche-Vihrog K, Raasch W. AFM-based nanoindentation indicates an impaired cortical stiffness in the AAV-PCSK9<sup>DY</sup> atherosclerosis mouse model. Pflugers Arch. 2022 Sep;474(9):993-1002.

<sup>1</sup>: contributed equally

Klersy T<sup>1</sup>, Achner L<sup>1</sup>, Fels B, Rezende F, Lopez M, Alenina N, Spiecker F, Stölting I, Häuser W, Reinberger T, Aherrahrou Z, Kuenne C, Vahldieck C, Matschl U, Hille S, Bader M, Brandes RP, Müller OJ, Kusche-Vihrog K, Raasch W. The anti-atherosclerotic effect of chronic AT1 receptor blocker treatment also depends on the ACE2/Ang(1-7)/Mas axis. Biomed Pharmacother. 2025 Mar 18;186:117990.

<sup>1</sup>: contributed equally

### Poster und Vorträge:

GRK Summer School 2021, Progress Report

Deutscher Hypertonie Kongress, Using the AAV-PCSK9<sup>DY</sup> mouse model in experimental hypertension, Berlin, 01.-03.12.2022

7<sup>th</sup> Pharm-Tox Summit DIGITAL Germany, 2022 (Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology, 395 Poster)

8<sup>th</sup> Pharm-Tox Summit DIGITAL Germany, The influence of the AT1-receptor blocker Telmisartan on endothelial function in AAV-PCSK9<sup>DY</sup> atherosclerosis mice is dependent on the ACE2/Ang(1-7)/Mas axis, Ulm, 07-09.03.2023