

Aus dem Institut für Experimentelle und
Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Markus Schwaninger

**Telmisartan verbessert die endotheliale Funktion auch
über einen ACE2/Ang1-7/Mas-abhängigen Mechanismus**

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



Vorgelegt von

Tobias Klersy

aus Neuwied

Lübeck 2025

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

Ko-Betreuer*in: Prof. Dr. rer. nat. Kristina Kusche

2. Berichterstatter*in: Prof. Dr. med. Joachim Weil

Tag der mündlichen Prüfung: 23.03.2026

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 24.03.2026

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	6
1.1 Übergewicht und Adipositas – schon wieder Pandemie?	6
1.2 Erkranktes Fettgewebe führt zu Resistenzen und leichtgradiger systemischer Entzündung	8
1.3 Dysfunktionales Endothel und rupturgefährdete Plaques durch Atherosklerose	10
1.4 Und was hat das Renin-Angiotensin-System damit zu tun?	12
1.5 AT₁-Rezeptor-Blockade, Übergewicht und Atherosklerose – was bisher geschah	15
1.6 Das richtige Tiermodell	18
1.7 Fragestellung und Hypothesen	21
2 Methoden	23
2.1 Tierexperimentelle Methoden	23
2.1.1 Versuchstiere	23
2.1.2 Haltungsbedingungen	23
2.1.3 Studienprotokoll	23
2.1.4 Herstellung von applizierten Lösungen und Suspensionen	25
2.1.5 Substanzapplikation	26
2.1.6 Bestimmung der Masseverteilung	26
2.1.7 Gewinnung biologischen Materials	27
2.2 Atomic force microscopy	28
2.3 Proteinbiochemische Methoden	31
2.3.1 Lipidprofil	31
2.3.2 Hormon- und Cytokinprofil	31
2.3.3 Nitrit-Messung	31
2.3.4 RNA-Sequenzierung (RNAseq)	31
2.4 Histologische Analyse der Aorta	32
2.5 Statistik	33
3 Ergebnisse	34
3.1 Körpergewicht und Masseverteilung	34
3.2 Hormonprofil	36
3.3 Glukosestoffwechsel	38
3.4 Cytokinprofil	40
3.5 Lipidprofil und histologische Analyse atherosklerotischer Plaques	42
3.6 Endotheliale Funktion der thorakalen Aorta	44
3.7 RNA-Sequenzierung der abdominalen Aorta	46
4 Diskussion	49
4.1 Einmalige Injektion des PCSK9^{DY}-AAV ist eine sichere und elegante Methode zur Induktion von endothelialer Dysfunktion und atherosklerotischen Läsionen	49

4.2 Telmisartan verhindert in Wildtyp und Mas <i>knock-out</i> Mäusen gleichermaßen die Entwicklung einer Diät-induzierten Adipositas	51
4.2.1 Diät-induzierte Adipositas in wt und Mas ko Mäusen	51
4.2.2 Einfluss von Telmisartan	52
4.2.3 Fazit zur Gewichtsentwicklung	54
4.3 Telmisartan reduziert in Mas <i>knock-out</i> Mäusen zwar atherosklerotische Plaques, nicht aber eine endotheliale Dysfunktion	55
4.3.1 Vergleich der Kontrollgruppen von Wildtyp und Mas ko	55
4.3.2 Einfluss von PCSK9^{DY}-AAV und Western Diät	56
4.3.3 Einfluss von Telmisartan	60
4.4 Limitationen	64
4.5 Ausblick	65
5 Zusammenfassung	67
6 Literaturverzeichnis	68
7 Anhang	88
7.1 Ergebnisse Vorstudie	88
7.1.1 Körpergewicht und Masseverteilung	88
7.1.2 Lipidprofil	90
7.1.3 Histologische Analyse atherosklerotischer Plaques	91
7.1.4 Endotheliale Funktion der thorakalen Aorta	92
7.2 Ergebnisse Hauptstudie	93
7.2.1 Ausgangswerte vor Versuchsbeginn	93
7.2.2 Vergleich der Kontrollgruppen nach Versuchsende	93
7.2.3 Hormonprofil	95
7.2.4 Glukosestoffwechsel	96
7.2.5 Histologische Untersuchung	97
7.2.6 RNA-Sequenzierung der abdominalen Aorta	98
7.3 Ergänzende Diskussion	100
7.3.1 Induktion atherosklerotischer Läsionen durch PCSK9^{DY}-AAV	100
7.3.2 Bedeutung des genetischen Hintergrunds im Tierversuch	102
7.3.3 Einordnung der Hypothesen zur Gewichtsreduktion	105
7.3.4 RNA-Sequenzierung der abdominalen Aorta	107
7.4 Abbildungsverzeichnis	113
7.5 Tabellenverzeichnis	113
7.6 Geräte	114
7.7 Substanzen und Lösungen	115
7.8 Verbrauchsmaterialien	116
7.9 Software	117

7.10 Abkürzungsverzeichnis	118
8 Danksagung.....	127
9 Lebenslauf.....	128

1 Einleitung

1.1 Übergewicht und Adipositas – schon wieder Pandemie?

„Man soll dem Leib etwas Gutes bieten, damit die Seele Lust hat darin zu wohnen.“ Zu viele Menschen scheinen dem Ratschlag des ehemaligen britischen Premierministers Winston Churchill wohlwollend gefolgt zu sein. Die Verbreitung von Übergewicht und Adipositas nimmt weltweit in epidemischem Ausmaß zu (Collaboration, 2024). Laut Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat sich die Prävalenz der Adipositas seit 1990 mehr als verdoppelt. 2022 waren 2,5 Milliarden Menschen übergewichtig und 890 Millionen adipös (World Health Organisation, 2024). Das statistische Bundesamt gibt den Anteil übergewichtiger bzw. adipöser Frauen im Jahr 2017 für Deutschland mit 43,1% bzw. 14,6% an, bei Männern waren es sogar 62,1% bzw. 18,1% (Destatis, 2018). Auch der wegen der *severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2* (SARS-CoV-2) Pandemie durchgeführte Lockdown hatte einen negativen Effekt auf die Ausbreitung von Übergewicht und Adipositas (Pellegrini et al., 2020).

Adipositas ist die über das Normalmaß hinausgehende Vermehrung des Körperfetts. Definiert wird sie anhand des *body mass index* (BMI), angegeben in Kilogramm Körpergewicht geteilt durch Körpergröße in Metern zum Quadrat (kg/m^2). Als Normalgewicht wird ein BMI zwischen 18,5 und 24,9 kg/m^2 angesehen. Mit einem BMI zwischen 25 und 29,9 kg/m^2 besteht Übergewicht, bei mehr als 30 kg/m^2 Adipositas. Übergewicht und Adipositas entstehen durch ein chronisches Ungleichgewicht zwischen Energieaufnahme und Energieverbrauch, z.B. aufgrund von Fehlernährung, körperlicher Inaktivität, Einnahme bestimmter Medikamente oder aufgrund genetischer Prädisposition (Berg et al., 2014). Dabei ist Adipositas mit zahlreichen negativen Auswirkungen verbunden: Adipöse Menschen haben ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus Typ 2, muskuloskelettale Erkrankungen, Krebs und eine schlechte mentale Gesundheit (Chooi et al., 2019; Muller et al., 2022). Das mittlere Überleben ist bei morbidem Adipositas, also bei einem BMI über 40 kg/m^2 oder über 35 kg/m^2 mit zusätzlichen Risikofaktoren, um acht bis zehn Jahre reduziert (Engin, 2017). Zu bedenken sind auch ökonomische Auswirkungen aufgrund von Ausgaben für das Gesundheitssystem und aufgrund ausgefallener Arbeit, die 2014 auf jährlich zwei Billionen US-Dollar und damit 2,8 % der Weltwirtschaftsleistung geschätzt wurden (Tremmel et al., 2017). Aufgrund einer zunehmend kritischen Betrachtung des BMI und der Notwendigkeit zur Priorisierung von Gesundheitsausgaben werden neue Diagnosekriterien diskutiert. In einem kürzlich erschienenen Lancet-Artikel wird der BMI als Surrogatparameter für das populationsspezifische Gesundheitsrisiko vorgeschlagen, sollte aber auf individueller Ebene durch Körperfettmessung oder Messung des Hüftumfangs ergänzt werden. Es wird zwischen präklinischer und klinischer Adipositas unterschieden – letztere zeichnet sich durch einen exzessiven Körperfettanteil mit veränderten Organfunktionen und/oder substanziellen Einschränkungen in Aktivitäten des täglichen Lebens aus (Rubino et al., 2025).

Assoziiert sind Übergewicht und Adipositas auch mit dem metabolischen Syndrom. Das früher als „Syndrom X“ bekannte Krankheitsbild bezeichnet ein kardiovaskuläres Risikocluster, das sich aus verschiedenen metabolischen Abnormalitäten zusammensetzt. 2005 veröffentlichte die *International Diabetes Federation* (IDF) neue Diagnosekriterien, die eine stammbetonte Adipositas definiert als Taillenumfang > 94 cm bei Männern und > 80 cm bei Frauen voraussetzen. Von den folgenden vier Kriterien müssen für die Diagnose weiterhin mindestens zwei erfüllt sein: 1. erhöhte Triglyceride > 150 mg/dL, 2. erniedrigtes *High-density lipoprotein-* (HDL) Cholesterin < 40 mg/dL bei Männern und < 50 mg/dL bei Frauen, 3. erhöhter Blutdruck > 130/85 mmHg, 4. erhöhter Nüchternblutzucker > 100 mg/dL oder Diabetes mellitus Typ 2 (Alberti et al., 2005). Der betroffene Anteil der Weltbevölkerung wird auf ein Viertel bis auf ein Drittel geschätzt - deutlich mehr als eine Milliarde Menschen (Saklayen, 2018). Das gemeinsame Auftreten von Risikofaktoren ist verbunden mit einem zweifach erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und fünffach erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 (Alberti et al., 2009). Assoziiert ist das Syndrom auch mit einem proinflammatorischen und prothrombotischen Status. Als zentrale Elemente in der Pathophysiologie werden stammbetonte Adipositas und Insulinresistenz angesehen (H. H. Wang et al., 2020).

Bislang ist kein Medikament speziell für das metabolische Syndrom zugelassen. Auch die Behandlung der zugrunde liegenden Adipositas gestaltet sich bisweilen schwierig. Eine Lifestyle-Intervention mit den Komponenten Ernährung, Bewegung und Verhaltenstherapie ist zwar prinzipiell wirksam, aufgrund schlechter Umsetzung stellen sich aber häufig enttäuschende Ergebnisse und nachlassende Effektivität ein (Burgess et al., 2017). Einige antidiabetische Medikamente wie Metformin (Yerevanian & Soukas, 2019) oder *sodium dependent glucose transporter-2-* (SGLT2) Hemmer (Kovacs et al., 2014; Neal et al., 2017) senken leicht das Gewicht, sind aber nicht für die Therapie der Adipositas zugelassen. Der Lipase-Hemmer Orlistat ist zugelassen und senkt signifikant das Gewicht, wird aufgrund seines als intolerabel angesehenen Nebenwirkungsspektrums aber selten konsequent eingenommen und verschrieben (Sahebkar et al., 2017). Unter dem Markennamen Wegovy ist seit kurzer Zeit der ebenfalls zunächst zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 zugelassene *glucagon-like-peptide 1-* (GLP-1) Agonist Semaglutid zur Behandlung der Adipositas erhältlich. Bei dauerhafter Anwendung mittels subkutaner Injektion ist ein durchschnittlicher Gewichtsverlust von ca. 15% zu erreichen. Auch hier ist mit Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Reaktionen der Injektionsstelle sowie akuter Pankreatitis zu rechnen (Rubino et al., 2021; Wilding et al., 2021). Zugelassen in Ergänzung zur Lifestyle-Intervention ist neben dem GLP-1-Agonisten Liraglutid (Garber et al., 2011) mit Tirzepatid ein weiteres Inkretinmimetikum, nämlich ein Kombinationspräparat mit Agonismus an GLP-1 sowie *glucose-dependent insulinotropic peptide-1* (GIP-1), geforscht wird mit Retatrutid an einem Präparat mit zusätzlichem Glucagon-Agonismus; beide versprechen eine noch stärkere

Gewichtsreduktion (Gallwitz, 2022; Muller et al., 2022). Die effektivste Behandlungsoption stellt die bariatrische Chirurgie dar (Sheng et al., 2017). Immer häufiger werden vor allem eine *Sleeve-Gastrektomie* oder der Roux-Y-Magenbypass durchgeführt und verbessern bedeutend das Gewicht und assoziierte Komorbiditäten (Angrisani et al., 2015). Insgesamt erhält aber nur ein Prozent der potentiellen Patienten eine entsprechende Operation, zu bedenken sind chirurgische Komplikationen und ein langwieriges *follow-up* (Hassan et al., 2016).

1.2 Erkranktes Fettgewebe führt zu Resistenzen und leichtgradiger systemischer Entzündung

Fettgewebe wird unterteilt in weißes, braunes und beiges Fettgewebe mit unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften. Weißes Fettgewebe dient als Lipidspeicher, Isolator, Barriere gegen Infektionen und physischer Schutz. Es findet sich vor allem subkutan, aber in geringerem Maße auch viszeral. Überschüssige Energie wird in Form von Triglyceriden in den Adipozyten gespeichert und bei Bedarf als Fettsäuren wieder abgegeben. Darüber hinaus hat das Fettgewebe aber auch regulatorische Funktionen, denn es sezerniert Adipokine, Wachstumsfaktoren, Cytokine und Chemokine (Chait & den Hartigh, 2020).

Liegt wie bei Übergewicht und Adipositas ein chronischer Energieüberschuss vor, kann das weiße Fettgewebe vor allem durch Hypertrophie, aber zu einem geringen Anteil auch durch Hyperplasie expandieren (Spalding et al., 2008). Ist die Speicherkapazität allerdings erschöpft, ergeben sich metabolische Abnormalitäten. Hypertrophe Adipozyten zeigen eine verstärkte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), oxidativen Stress und endoplasmatisches Retikulum-Stress (ER-Stress). Dadurch kommt es zum sogenannten *lipid spillover*, also der unregulierten Freisetzung von Fettsäuren, die dann ektop akkumulieren (Rutkowski et al., 2015). Auch die basale Lipolyse ist verstärkt (Hammarstedt et al., 2018). Darüber hinaus werden verstärkt proinflammatorische Cytokine wie *tumor necrosis factor α* (TNF- α), Interleukin 6 (IL-6), IL-8 und *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1) exprimiert (Choe et al., 2016). Als Ursache für die Dysfunktion der Adipozyten wird eine verstärkte Hypoxie diskutiert (Goossens & Blaak, 2015). Schließlich gehen die hypertrophen Adipozyten durch Pyroptose zu Grunde, eine hoch entzündliche Form des Zelltods (Giordano et al., 2013). Das zuvor exprimierte MCP-1 lockt Monozyten durch Bindung an den C-C *chemokine receptor type 2* (CCR2) aus dem Blutstrom an, die ins Fettgewebe transmigrieren und sich zu Makrophagen differenzieren. Die Akkumulation von Makrophagen im Fettgewebe korreliert dabei mit der Größe der Adipozyten (Kanda et al., 2006). Makrophagen finden sich vor allem in der Nähe von toten Adipozyten und bilden *crown-like structures* (CLS), innerhalb derer sie lokal proliferieren (Murano et al., 2008). Sie bilden selbst wiederum MCP-1 und exprimieren zahlreiche weitere proinflammatorische Cytokine, bis sie letztendlich die wichtigste Quelle dafür werden (Haase et al., 2014) und die Grundlage für eine leichtgradige systemische Entzündung bilden.

Die proinflammatorischen Cytokine aus den Makrophagen tragen zur Steigerung der Lipolyse bei. TNF- α verstärkt über den Transkriptionsfaktor *nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells* (NF- κ B) die Lipolyse (Laurencikiene et al., 2007). Im physiologischen Zustand wird sie durch Insulin gehemmt (Pontiroli et al., 2011), durch den Einfluss insbesondere des proinflammatorischen Cytokins IL-6 stellt sich eine Insulinresistenz im Fettgewebe ein (Matsubara et al., 2012). Vermehrtes viszerales Fettgewebe ist im Besonderen mit den metabolischen Komplikationen der Adipositas assoziiert (Kotronen et al., 2011). Die Adipozyten im viszeralen Fettgewebe sind kleiner und erreichen daher früher die kritische Schwelle zu Zelltod und Akkumulation von Makrophagen. Es finden sich mehr tote Adipozyten und CLS (Murano et al., 2008). Die Steigerung der Lipolyse ist im viszeralen Fettgewebe verstärkt (Choe et al., 2016).

Zelltod von hypertrophen Adipozyten, Akkumulation von Makrophagen und Expression proinflammatorischer Cytokine führen also zur Steigerung der Lipolyse und damit zur erhöhten Konzentration von freien Fettsäuren im Blut. Aufgrund der anatomischen Nähe ist die Leber den freien Fettsäuren aus dem viszeralen Fettgewebe über die Portalvene direkt ausgesetzt. Aus den Fettsäuren können in der Leber wieder Triglyceride gebildet werden. Als Intermediate entstehen dabei Ceramide und Diacylglycerin. Letzteres trägt entscheidend zur Induktion einer hepatischen **Insulinresistenz** bei (Perry et al., 2014). Insulin trägt im physiologischen Zustand zur Suppression der hepatischen Glukoneogenese bei. Durch die gestörte hepatische Insulinwirkung kommt es zur vermehrten Freisetzung von Glukose. Solange die β -Zellen des Pankreas die Sekretion von Insulin steigern können, um die geringere periphere Wirkung zu kompensieren, manifestiert sich noch kein Diabetes mellitus Typ 2. Freie Fettsäuren tragen allerdings zu gestörter Glukose-stimulierter Insulinfreisetzung und geringerer Synthese bei (Kahn et al., 2006). Ektopisches Fett im Pankreas ist ebenfalls mit einer geringeren Insulinsekretion assoziiert (Heni et al., 2010).

In der Regulation der Energiehomöostase nimmt das proportional zur Fettmasse freigesetzte Leptin eine wichtige Funktion ein. Dieses Adipokin übermittelt den Füllungsstand der körpereigenen Energiespeicher an das zentrale Nervensystem (ZNS) und supprimiert dort die Nahrungsaufnahme (Enriori et al., 2007). Bei Übergewicht und Adipositas verliert Leptin seine Funktion, denn trotz deutlich erhöhter Konzentrationen kann die Nahrungsaufnahme nicht mehr supprimiert werden – es hat sich eine **Leptinresistenz** entwickelt. Die chronische Überstimulation des Rezeptors bei Adipositas führt auch zur Überaktivierung des negativen Feedbacks, das in Folge eine weitere Wirkung von Leptin verhindert (Myers et al., 2008).

1.3 Dysfunktionales Endothel und rupturgefährdete Plaques durch Atherosklerose

Die Komponenten des metabolischen Syndroms sind Risikofaktoren der Atherosklerose. Die Atherosklerose ist eine chronische inflammatorische, fibroproliferative Erkrankung, führt zu koronarer Herzkrankheit (KHK), arterieller Verschlusskrankheit, Aneurysmen, Myokardinfarkt sowie Schlaganfällen und gehört damit zu den weltweit führenden Todesursachen (Falk, 2006).

Eine chronische Endothelbelastung durch Hypertonie und Hypercholesterinämie begünstigt die Ablagerung von *low-density lipoprotein-* (LDL) Cholesterin im subendothelialen Raum der Gefäßwand. Durch ROS wird LDL oxidiert und über den *scavenger*-Rezeptor von Makrophagen aufgenommen. Die Aufnahme über diesen Rezeptor ist nicht reguliert, so dass sich die Makrophagen mit Cholesterin überladen und sogenannte Schaumzellen bilden. Endothelzellen werden aktiviert und exprimieren Adhäsionsmoleküle wie *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) und Chemokine wie MCP-1, mit deren Hilfe Monozyten und T-Lymphozyten aus dem Blutstrom festgehalten werden und in die Gefäßwand migrieren. Auch oxidiertes LDL selbst wirkt als Chemokin. Monozyten differenzieren zu Makrophagen, die ihrerseits MCP-1 sowie proinflammatorische Cytokine freisetzen und damit zur Rekrutierung weiterer Monozyten beitragen. T-Lymphozyten sind bei der Pathogenese der Atherosklerose überwiegend proinflammatorisch, sezernieren Cytokine wie Interferon- γ (IFN- γ) und TNF- α und verstärken damit weiter die Entzündung (Moriya, 2019). Mit Schaumzellen beladene Läsionen werden auch als *fatty streaks* bezeichnet. Die progrediente Entzündung und Aktivierung der Endothelzellen führen schließlich zur endothelialen Dysfunktion. Durch Insuffizienz der endothelialen NO-Synthase (eNOS) entsteht ein Mangel an Stickstoffmonoxid (NO), was mit einer gestörten endothelabhängigen Vasodilatation, Thrombozytenadhäsion und -aggregation, Steigerung der Gefäßpermeabilität und Verlust der atheroprotektiven Wirkung einhergeht (Libby et al., 2019).

Glatte Muskelzellen aus der Media migrieren in die Intima, proliferieren und bilden kollagenreiche extrazelluläre Matrix (EZM). Es entsteht ein Fibroatherom mit lipidreichem Kern und einer dicken fibrösen Kappe. Mit fortschreitender Erkrankung, Akkumulation von Makrophagen und Aufnahme von oxidiertem LDL gehen die Schaumzellen zu Grunde, so dass der wachsende Kern nekrotisch wird. Makrophagen sezernieren Matrix-Metalloproteasen (MMP) und Kollagenasen, durch die EZM abgebaut wird. Plaques werden destabilisiert, die fibröse Kappe zunehmend dünner und vulnerabel für eine Ruptur (Yamada et al., 2017). Prinzipiell können fortgeschrittene Plaques kalzifizieren, erodieren und rupturieren. Insbesondere die Ruptur ist eine gefürchtete Komplikation, da thrombogenes Material mit viel Gewebefaktor und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) aus Plaques Kontakt zum Blut erhält, eine Thrombose initiiert und damit zu Myokardinfarkt und Schlaganfällen führt (Falk, 2006; Libby et al., 2019).

Die endotheliale Dysfunktion und die mit ihr verbundene reduzierte Verfügbarkeit von NO ist zentral bei der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen. Physiologisch wird NO von der eNOS produziert, diffundiert zu glatten Muskelzellen der Media, aktiviert die lösliche Guanylatcyclase, erhöht cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP), senkt die intrazelluläre Calciumkonzentration und induziert eine Vasodilatation. Die eNOS wird aktiviert durch *shear stress*: Eine Verformung der Endothelzelle infolge des Blutflusses steigert die intrazelluläre Calciumkonzentration, Calcium bindet an Calmodulin und erhöht die eNOS-Aktivität (Fels et al., 2010).

Endothelzellen werden auf ihrer luminalen Seite von der Plasmamembran begrenzt. Von der Membran aus reicht die Glykokalix in das Gefäßlumen. Die Glykokalix ist ein negativ geladenes Netzwerk aus Glykoproteinen, Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen und assoziierten Proteinen. Physiologisch ist eine weiche Glykokalix mit einer Höhe von 0,4-0,5 μm und vasoprotektiven Eigenschaften. Sie bedeckt die Endothelzellen und verhindert den Kontakt von Entzündungszellen zu Adhäsionsmolekülen an der Oberfläche, sie ist Sensor und Transduktor mechanischer Einflüsse. Pathologische Zustände können allerdings Aufbau und Funktion der Glykokalix durch zwei Mechanismen verändern: Beim *shedding* durch abbauende Enzyme oder proinflammatorische Cytokine wird die Glykokalix flach und weich, beim Kollaps durch hohe Natriumkonzentrationen wird sie flach und steif, in beiden Fällen verliert sie ihre Funktion (Cosgun et al., 2020).

Die Glykokalix ist über Ankerproteine verbunden mit dem Cortex, einem weiteren wichtigen Kompartiment der Zelle, das der Wahrnehmung mechanischer Kräfte, der Weitergabe von Signalen sowie Aufnahme und Freisetzung von Stoffen dient. Der Cortex umfasst die ersten 50-150 nm unterhalb der Plasmamembran und besteht aus Aktomyosin sowie assoziierten Proteinen, die das sogenannte Cytoskelett bilden. Das Cytoskelett bestimmt die mechanischen Eigenschaften der Endothelzellen und damit auch die Steifigkeit des Cortex. Der Hauptbestandteil Aktin kann depolymerisiert als G-Aktin und polymerisiert als F-Aktin vorliegen. Ein höheres F-Aktin/G-Aktin-Verhältnis führt zu einem steiferen Cortex und zu veränderten funktionellen Eigenschaften der Endothelzellen. Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass eine höhere kortikale Steifigkeit assoziiert ist mit einer reduzierten Aktivität der eNOS und damit einer geringeren Verfügbarkeit von NO. Dafür werden mehrere Mechanismen diskutiert: Zum einen kann eine steife Zelle weniger stark verformt werden und ist damit weniger empfänglich für Veränderungen des Blutflusses. Zum anderen interagiert G-Aktin mit der eNOS und steigert deren Aktivität. Bei einem weichen Cortex ist das F-Aktin/G-Aktin-Verhältnis geringer und es steht mehr G-Aktin für die Interaktion zur Verfügung. Zuletzt könnte ein veränderter Polymerisationsstatus von Aktin auch zu veränderter Expression der eNOS *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA) führen (Fels & Kusche-Vihrog, 2019). Eine erhöhte kortikale Steifigkeit kann als Kennzeichen der endothelialen Dysfunktion betrachtet werden (Targosz-Korecka et al., 2017).

1.4 Und was hat das Renin-Angiotensin-System damit zu tun?

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) dient der Regulation von Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushalt sowie der Aufrechterhaltung des Blutdrucks und besteht aus zahlreichen aktiven, aber auch inaktiven Peptiden, die mittels proteolytischer Aktivität verschiedener Enzyme auseinander entstehen (s. dazu Abb. 1-1). In der Hauptachse des Systems dient das aus der Leber stammende Angiotensinogen als Ausgangspunkt. Der juxtaglomeruläre Apparat der Niere sezerniert die Endopeptidase Renin, durch die aus Angiotensinogen das Dekapeptid Angiotensin I (AngI) entsteht. Von diesem überwiegend funktionslosen Peptid wird durch die Carboxypeptidase *angiotensin converting enzyme* (ACE) das C-terminale His-Leu-Dipeptid abgespalten und das Oktapeptid Angiotensin II (AngII) gebildet. AngII ist der Haupteffektor innerhalb des RAS und entfaltet seine Wirkungen über die Angiotensin-Rezeptoren Typ 1 und 2 (AT₁R, AT₂R). Beide Rezeptoren haben sieben transmembranäre Domänen und sind G-Protein gekoppelt, zeigen aber nur eine Homologie von 34% und nach Bindung von AngII unterschiedliche Effekte (Li et al., 2017). Über AT₁R führt AngII zur Blutdrucksteigerung durch Vasokonstriktion und Aldosteron-Sekretion aus der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde, darüber hinaus zu Proliferation, Hypertrophie, Inflammation, Fibrose und oxidativem Stress. Antagonistische Wirkungen erzielt die Bindung an AT₂R: AngII wirkt hier vasodilatativ, antiinflammatorisch, antifibrotisch, antiapoptotisch, mildert das Zellwachstum ab und trägt zur Differenzierung bei. Der AT₂R hat insbesondere in der fetalen Entwicklung eine wichtige Funktion, wird aber auch noch danach vor allem in Gehirn, Nebenniere und den Reproduktionsorganen exprimiert (Saravi et al., 2021).

Neben dem systemischen RAS existieren in zahlreichen Geweben lokale RA-Systeme mit autokriner und parakriner Wirkung. In den letzten Jahren sind neben der Hauptachse zahlreiche weitere Peptide und generierende Enzyme beschrieben worden (Huber et al., 2017; Ziaja et al., 2021). Zunehmend an Bedeutung gewonnen hat dabei die antagonistisch zu AT₁R wirkende Achse aus ACE2, Angiotensin (1-7) (Ang1-7) und dem Mas-Rezeptor. Das Heptapeptid Ang1-7, der Haupteffektor dieser Achse, wird insbesondere durch die Carboxypeptidase ACE2 durch Abspaltung des C-terminalen Phenylalanin aus AngII gebildet (Santos et al., 2018). ACE2 wird von bestimmten Endothelzellen exprimiert, besonders in Niere, Herz und Hoden, aber auch im Gastrointestinaltrakt, in Leber und Lunge (Gurley et al., 2006). Zuletzt erlangte ACE2 Berühmtheit, da es u. a. auch in Clara-Zellen und Alveolar-Zellen-Typ II exprimiert wird und als Co-Rezeptor für das SARS-CoV-2 dient (Saravi et al., 2021).

Erst 2003 wurde Ang1-7 als endogener Ligand des Mas-Rezeptors identifiziert (Santos et al., 2003). Das Gen für Mas liegt auf Chromosom 6 und wird im vaskulären Endothel exprimiert, vor allem in Gehirn, Herz, Hoden und Niere. Der G-Protein gekoppelte Rezeptor mit sieben transmembranären Domänen wurde ursprünglich als Protoonkogen beschrieben, hat aber

tatsächlich keinen Einfluss auf die Tumorgenese. Die Bindung von Ang1-7 resultiert in einer Aktivierung der eNOS über den Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) /Akt-Signalweg sowie der Aktivierung der Phospholipase A2 und daraus folgend der Freisetzung von Arachidonsäure (Bader et al., 2014). Die meisten der zahlreichen Effekte von Ang1-7 und dessen Bindung an Mas sind auf die gesteigerte NO-Freisetzung zurückzuführen: Ang1-7 induziert eine Vasodilatation, Senkung des Blutdrucks, verbessert die Herzfunktion, verhindert kardiale Hypertrophie und Fibrose, wirkt antiarrhythmisch und antiproliferativ, verbessert die Sensitivität des Barorezeptors (Santos, 2014), hat eine protektive Rolle in der Niere, reduziert Proteinurie und Fibrose (Giani et al., 2012). Ang1-7 wirkt darüber hinaus neuroprotektiv, verbessert das Gedächtnis und mildert epileptische Anfälle ab, reduziert den kardialen sympathischen Tonus, wirkt anxiolytisch, protektiv in Lunge und Leber sowie im Tiermodell einer Muskeldystrophie (Santos et al., 2018).

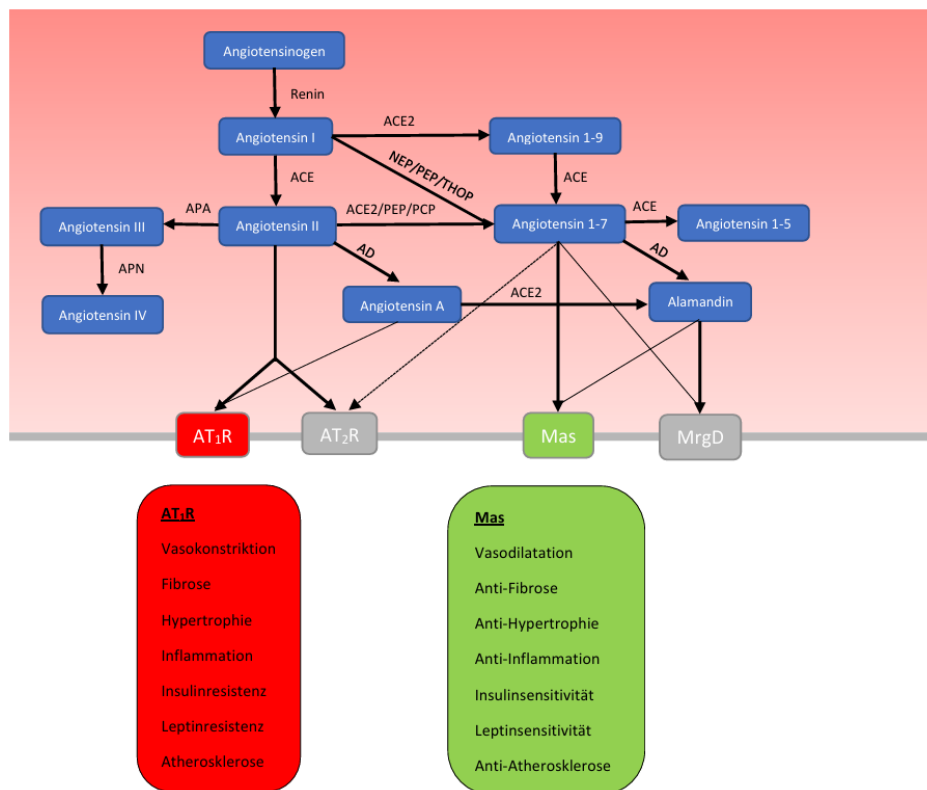


Abbildung 1-1: Das Renin-Angiotensin-System mit Fokus auf AT₁R, Mas-Rezeptor und deren Bedeutung im kardiovaskulären System. Nach (Bader, 2013; Santos et al., 2018). APA = Aminopeptidase A, APN = Aminopeptidase N, NEP = Neutrale Endopeptidase, PEP = Prolylendopeptidase, THOP = Thimet-Oligopeptidase, PCP = Prolylcarboxypeptidase, AD = Aspartat-Decarboxylase

Während pathologischer Prozesse wie Hypertonie oder Adipositas ist die Expression des RAS gesteigert (Patel et al., 2017). Hypertrophierte Adipozyten produzieren zusätzlich zur Leber Angiotensinogen (Akoumianakis & Filippatos, 2020). Durch Bindung an AT₁R steigert AngII den Blutdruck und induziert eine Insulinresistenz, verhindert durch gesteigerte Produktion von ROS die

Translokation von Glukosetransporter Typ 4 (GLUT4) (Liu et al., 2012). Auch in der Pathophysiologie der Atherosklerose hat die Aktivierung des RAS eine große Bedeutung. Dabei wirkt AngII durch Bindung an AT₁R proatherosklerotisch (Thomas et al., 2010). Aktiviertes Endothel exprimiert durch AngII verstärkt Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1 und Chemokine wie MCP-1 (Lovren et al., 2008). Dabei steigert AngII insbesondere die Translokation von NF-κB in den Zellkern, wo es als Transkriptionsfaktor die Expression von ROS, Adhäsionsmolekülen und proinflammatorischen Cytokinen induziert (Dandona et al., 2003). Neben der Akkumulation von Entzündungszellen in der Gefäßwand unterstützt AngII die Proliferation glatter Muskelzellen und verstärkt die Formation von Plaques (Sahara et al., 2014). Gesteigerte Aktivität von MMP und Cathepsin S durch AngII trägt zur Degradierung von Kollagen, Elastin und anderen Bestandteilen der EZM und damit zur Destabilisierung der Plaques bei (Sasaki et al., 2010).

Exogenes Ang1-7 hingegen kann die Insulinsensitivität und Glukosetoleranz verbessern (Santos et al., 2014) und im Hinblick auf weitere Komponenten des metabolischen Syndroms Gewicht, Fettmasse, Triglyceride und Cholesterin reduzieren (Santos et al., 2010) sowie antiinflammatorische Wirkung entfalten (Giani et al., 2012). Ang1-7 hat auch in der Entwicklung der Atherosklerose eine protektive Funktion. Das Heptapeptid aktiviert die eNOS und verbessert die endotheliale Funktion (Faria-Silva et al., 2005), es senkt die Produktion von ROS, supprimiert die Bildung von Neointima, verringert atherosklerotische Läsionen (Tesanovic et al., 2010) und inhibiert die Proliferation von glatten Muskelzellen (Lovren et al., 2008). Indem ACE2 die Konzentrationen von AngII senkt und gleichzeitig die von Ang1-7 steigert, zeigt es bei Überexpression oder exogen zugeführt ebenfalls protektive Effekte bei Atherosklerose (Thatcher et al., 2011; Zhang et al., 2010).

Die Defizienz von Mas im Tierversuch erzeugt einen Phänotyp mit mehr Fettmasse, Cholesterin, Triglyceriden, Insulin und Leptin, gesteigerter Expression von Angiotensinogen (Santos et al., 2008), reduzierter Expression von Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren γ (PPAR γ), gestörter Glukosetoleranz, erhöhter Nüchternglukose, reduzierter Insulinsensitivität, ängstlichem Verhalten und gestörtem Gedächtnis, verstärkter hepatischer Steatose (Santos et al., 2018), kurzum, die Defizienz von Mas erzeugt den Phänotypen des metabolischen Syndroms (Bader, 2013). Damit verbunden ist auch ein proatherosklerotischer Zustand: Neben dem erhöhtem Blutdruck offenbart sich eine endotheliale Dysfunktion (Rabelo et al., 2008), die Inhibition von eNOS führt zu NO-Mangel, durch erhöhte Aktivität der Nicotinamidadenindinukleotidphosphat- (NADPH) Oxidase ist die Gefäßwand oxidativem Stress ausgesetzt (Xu et al., 2008). Die gesteigerte Infiltration von Makrophagen führt zu mehr Freisetzung proinflammatorischer Cytokine, T-Zellen proliferieren schneller und Plaques sind vergrößert (Hammer et al., 2016). Insgesamt ist das von atherosklerotischen Plaques befallene Areal ausgeweitet und auch Aneurysmen treten häufiger auf (Stegbauer et al., 2019).

1.5 AT₁-Rezeptor-Blockade, Übergewicht und Atherosklerose – was bisher geschah

Die zahlreichen Einflüsse des RAS in der Pathophysiologie von Adipositas und Atherosklerose legen die Vermutung nahe, dass durch Blockade der Hauptachse, insbesondere durch AT₁-Rezeptor-Blocker (ARB), positive Effekte auf diese Erkrankungen erzielt werden könnten. ARB werden in der Behandlung von Herzinsuffizienz, Hypertonie sowie nach Myokardinfarkt eingesetzt, reduzieren dabei Hypertrophie, diastolische Dysfunktion, das Risiko für Vorhofflimmern sowie Morbidität und Mortalität (Saravi et al., 2021). Darüber hinaus reduzieren sie die Inzidenz von Diabetes mellitus Typ 2 (Giani et al., 2009), reduzieren Albuminurie und Nierenschaden durch Diabetes (Tikellis et al., 2008), reduzieren Frequenz und Stärke von Migräneattacken und wirken anxiolytisch sowie antidepressiv (Ziaja et al., 2021). ARB blockieren selektiv die Bindung von AngII an den AT₁R und führen durch das Ausbleiben eines negativen Feedbacks zum Anstieg der AngII-Konzentration (Li et al., 2017). Einige ARB sind partielle Agonisten von PPAR γ (Mario et al., 2012).

In der Tat konnten protektive Eigenschaften von ARB bei der Entwicklung von Atherosklerose gezeigt werden. Valsartan wirkt antiinflammatorisch, senkt das C-reaktive Protein (CRP), reduziert die Produktion von ROS und supprimiert den Transkriptionsfaktor NF- κ B (Dandona et al., 2003). Irbesartan reduziert die Expression von TNF- α und IFN- γ in T-Zellen und verbessert die endotheliale Funktion im Tierversuch (Cheng et al., 2004) wie auch in peripheren Gefäßen des Menschen (Warnholtz et al., 2007). Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1 und E-Selektin werden durch Candesartan seltener exprimiert (Graninger et al., 2004). Daraus folgen eine reduzierte Akkumulation von Makrophagen, ein reduziertes Läsionsareal, ein verkleinerter Lipidkern und vermehrte glatte Muskelzellen in Plaques bspw. durch Telmisartan (Pellegrin et al., 2017). Plaques werden nicht nur reduziert, sondern auch stabilisiert, indem wie durch Olmesartan die Aktivität von MMP und Cathepsin gesenkt und dadurch der Gehalt an Kollagen, Elastin und anderen Bestandteilen der EZM erhöht wird (Sasaki et al., 2010). Im Falle einer Plaqueruptur oder -erosion wirken ARB antithrombotisch (Fraga-Silva et al., 2008).

Auch im Hinblick auf das metabolische Syndrom und assoziierte Pathologien haben ARB positive Wirkung. Sie reduzieren abdominale Adipositas, Nüchtern glukose, Insulin, Hämoglobin A1c (HbA1c), Triglyceride, steigern HDL im Menschen (Kintscher et al., 2007) und zeigen ähnliche Effekte auch im Tierversuch mit zusätzlich verbesserter Insulinresistenz sowie weniger Akkumulation von Lipiden in Skelettmuskel und Leber (Rong et al., 2010). Der gesteigerte Energieverbrauch und das reduzierte Gewicht wurden unter anderem auf die stärkere Expression von *uncoupling protein 1* (UCP-1) zurückgeführt (Araki et al., 2006). Insgesamt bleibt aber nach wie vor unklar, durch welche Mechanismen die chronische AT₁R-Blockade zu diesen zahlreichen protektiven Einflüssen auf Übergewicht und Atherosklerose führt.

Die Arbeitsgruppe von Prof. Raasch befasste sich insbesondere mit der Gewichtsregulation durch Telmisartan (TEL) und konnte zeigen, dass die Senkung von Körpergewicht und Fettmasse sowie die Steigerung des Energieverbrauchs nur in hohen Dosierungen gelingt und unabhängig von Effekten auf den Blutdruck erreicht wird (Muller-Fielitz et al., 2011), bei ARB stärker ausgeprägt ist als bei ACE-Hemmern (Miesel et al., 2012), sowohl präventiv als auch im therapeutischen Setting gelingt (Muller-Fielitz et al., 2014) und in Ratten wie auch in Mäusen gezeigt werden kann (Schuster et al., 2018). Verschiedene Mechanismen der Gewichtsreduktion durch TEL wurden diskutiert:

1. PPAR γ -abhängiger Mechanismus (Muller-Fielitz et al., 2012)
2. Einfluss auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde-Achse (HPA-Achse) (Gustaityte et al., 2018; Muller-Fielitz & Raasch, 2013)
3. Einfluss des Mikrobioms (Beckmann et al., 2021; Freschi et al., 2024; Nickel et al., 2022)
4. ZNS-abhängiger Mechanismus (Huber et al., 2021; Rawish et al., 2020; Winkler et al., 2016)
5. Leptin-abhängiger Mechanismus (Muller-Fielitz et al., 2015; Muller-Fielitz et al., 2011; Schuster et al., 2018)
6. AT₁R-unabhängiger Mechanismus über Ang1-7 (Blanke et al., 2015; Dapper et al., 2019; Schuchard et al., 2015; Winkler et al., 2018)

TEL induziert **PPAR γ** zwar bereits in niedrigen Dosierungen, allerdings führen Thiazolidindione, also PPAR γ -Agonisten, zu einer Gewichtszunahme (Larsen et al., 2003). ARB mit unterschiedlicher Affinität zu PPAR γ zeigten denselben positiven Effekten auf Gewicht und Insulinsensitivität, weshalb diesen Mechanismen nur eine untergeordnete Relevanz zugeschrieben wird (Muller-Fielitz et al., 2012). Auch der Einfluss der **HPA-Achse** auf die Regulation von Körpergewicht und Energieaufnahme erscheint insbesondere nach der jüngsten Studie gering (Gustaityte et al., 2018). Veränderungen im **Mikrobiom** sind sowohl mit Adipositas wie auch mit Atherosklerose assoziiert. Eine Imbalance der verschiedenen Organismen führt zu Übergewicht, keimfreie Mäuse sind vor Übergewicht und Insulinresistenz geschützt und der Stuhltransfer von adipösen auf schlanke Tiere führt zur Gewichtszunahme. Als Ursache werden unter anderem die gesteigerte Permeabilität des Darms und eine daraus folgende metabolische Endotoxämie sowie eine veränderte Produktion von Gallensäuren und kurzkettigen Fettsäuren vermutet (Chait & den Hartigh, 2020). Bei TEL-assoziiertes Gewichtsabnahme konnte die Induktion eines spezifischen Mikrobioms registriert werden. Der Stuhltransfer von TEL-behandelten auf adipöse Mäuse führte zu leichter Gewichtsreduktion (Beckmann et al., 2021; Freschi et al., 2024).

Studien aus unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass ein **ZNS-abhängiger Mechanismus** zumindest teilweise der TEL-Wirkung zugrunde liegen muss. Die selektive Inhibition des RAS im ZNS

durch reduzierte Expression von Angiotensinogen verhindert die Entwicklung von Adipositas und vergrößert den Energieverbrauch, die Effekte von TEL waren reduziert (Winkler et al., 2016). Über die Regulation von Körpergewicht und Energiehomöostase hinaus verhinderte TEL die Adipositas-induzierte neurovaskuläre Entkopplung und Reduktion des zerebralen Blutflusses, reduzierte ängstliches Verhalten, die Entstehung von string vessels, Zellalterung und oxidativen Stress spezifisch in einzelnen Hirnregionen (Hernandez Torres et al., 2024; Huber et al., 2021). Auch **Leptin** hat Einfluss auf die gewichtsreduzierenden Effekte von TEL. In einer jüngeren Studie konnte gezeigt werden, dass TEL zwar die periphere Leptinresistenz verhindert, aber keinen direkten Einfluss auf den Leptintransport hat. Es wurde daher die Vermutung geäußert, dass ein verbesserter Transport von Leptin über die Blut-Hirn-Schranke eher Folge als Ursache des Gewichtsverlusts ist (Schuster et al., 2018). Bezüglich der zentralen Leptinresistenz konnte gezeigt werden, dass TEL den Lipidspiegel in Tanyzyten normalisiert, hypothalamische Lipidspiegel normalisiert und möglicherweise durch reduzierte Gliose und reduzierte leichtgradige Entzündung die Resistenz verhindert (Rawish et al., 2020).

Die Beobachtungen, dass sowohl AngII als auch TEL zur Gewichtsreduktion beitragen (Winkler et al., 2018) und TEL auch im AT₁R ko Gewicht, Insulinsensitivität und Leptinsensitivität verbessert (Rong et al., 2010), lassen einen Mechanismus unabhängig von diesem Rezeptor vermuten. Bei der Therapie mit ARB steigen aufgrund des fehlenden negativen Feedbacks die Konzentrationen von AngI und AngII, gleichzeitig steigt die Expression von ACE2 (Ishiyama et al., 2004). Das gesteigert verfügbare AngII dient als Substrat für ACE2 und es wird **Ang1-7** gebildet. Es wurden wiederholt erhöhte Konzentrationen von Ang1-7 nach Therapie mit ARB gefunden (Igase et al., 2005; Jawien, 2012; Pereira et al., 2007; Tesanovic et al., 2010). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Überexpression von Ang1-7 den Gewichtsanstieg durch ungesunde Ernährung verhindert (Blanke et al., 2015), die Leptinsensitivität wiederherstellt und die Expression von ACE2 und Mas im viszeralen Fettgewebe erhöht. Der Mas-Antagonist A779 konnte dabei die TEL-induzierte Gewichtsreduktion teilweise aufheben, was bestätigt, dass die Bindung von Ang1-7 an Mas anteilig zur Regulation des Körpergewichts beiträgt (Schuchard et al., 2015). Zuletzt sollte ein Tierversuch mit Mas-defizienten Mäusen auf dem genetischen FVB/N-Hintergrund die Bedeutung von Ang1-7 erneut aufzeigen. Entgegen den Erwartungen zeigten Mas *knock-out* (ko) Mäuse allerdings ein geringeres Gewicht und eine reduzierte Fettmasse. Die Entwicklung einer Adipositas war weniger stark ausgeprägt. TEL reduzierte das Gewicht in Wildtyp Mäusen nur gering, dafür aber stärker in Mas ko Mäusen. Auch die Leptinsensitivität konnte nur in Mas ko Mäusen wiederhergestellt werden. Eine Verwechslung der Versuchsgruppen wurde ausgeschlossen und ein Einfluss des genetischen Hintergrunds auf die Ergebnisse diskutiert (Dapper et al., 2019). In der vorliegenden Arbeit soll daher der Effekt der Mas-Defizienz auf das Körpergewicht und insbesondere auch auf Atherosklerose auf anderem genetischen Hintergrund untersucht werden.

1.6 Das richtige Tiermodell

Um die Effekte von Telmisartan auf die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen untersuchen zu können, muss ein geeignetes Tiermodell gefunden werden. Da die Überschneidungen zum menschlichen Lipidprofil und atherosklerotischen Phänotyp sehr groß sind, wurden jahrelang besonders Kaninchen zur Erforschung der Gefäßpathologie verwendet. Um Kosten für die Haltung zu sparen und vor allem, weil genetische Veränderungen leichter herbeizuführen sind, gewann die Maus als Tiermodell zunehmend Bedeutung. Mäuse sind jedoch relativ resistent gegenüber der Nahrungsmittel-bedingten Entwicklung von Atherosklerose, weshalb Veränderungen im Erbgut und teils eine cholesterinreiche Ernährung zur Induktion notwendig sind (Emini Veseli et al., 2017).

Zu den am häufigsten verwendeten Maus-Modellen zählen der *knock-out* von Apolipoprotein E (ApoE) und LDL-Rezeptor. In ApoE ko Mäusen werden ausgeprägte Veränderungen im Lipidprofil und die Entwicklung von Atherosklerose bereits in Kombination mit Standard-Diät (*chow*) beobachtet. Es werden Cholesterinwerte von bis zu 500 mg/dl und deutliche atherosklerotische Läsionen erreicht. Unter Hinzunahme von Western Diät (WD) können Werte von mehr als 1800 mg/dl sowie dreifach vergrößerte Läsionen gesehen werden (Plump et al., 1992). LDL-Rezeptor ko Mäuse zeigen mit *chow* Diät nur milde Veränderungen im Lipidprofil und kaum atherosklerotische Läsionen. Erst in Kombination mit atherogener Diät entwickeln sich eine deutliche Hypercholesterinämie mit Werten über 1500 mg/dl und Atherosklerose (Ishibashi et al., 1994). Der genetische Hintergrund der Maus hat bei der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen einen wichtigen Einfluss. Mäuse auf dem FVB/N Hintergrund sind relativ resistent gegenüber der Entwicklung von Atherosklerose, wohingegen Mäuse auf dem C57BL/6 Hintergrund durchgehend größere Läsionen zeigen (Teupser et al., 2003).

Sollen in einem Mausmodell mit Atherosklerose weitere genetische Veränderungen wie die Mas-Defizienz untersucht werden, war lange die Erzeugung eines Doppel-ko (dko) notwendig, was technisch anspruchsvoll ist und eine langwierige sowie kostenintensive Zucht mit sich bringen würde. Um diese Limitationen zu umgehen, wurde 2014 erstmals die Induktion von Atherosklerose mittels einmaliger Injektion eines *adeno associated virus* (AAV) beschrieben, der als Vektor für eine *gain of function* Mutation der Proprotein Konvertase Subtilisin/Kexin Typ 9 (PCSK9) dient (Bjorklund et al., 2014). PCSK9 wird in der Leber exprimiert, bindet an den LDL-Rezeptor und bewirkt dessen Abbau in Lysosomen. Bei der Injektion erreicht der Vektor die Leber durch einen spezifischen Promotor, bewirkt eine über lange Zeit stabile Expression der mutierten PCSK9 mRNA, die eine zehnfach höhere Affinität für den LDL-Rezeptor zeigt als der Wildtyp, reduziert die Expression des LDL-Rezeptors und führt zu chronisch erhöhten Cholesterinwerten (s. dazu Abb. 1-2) (Roche-Molina et al., 2015). Zur Verfügung stehen die humane Mutation PCSK9 D374Y und die murine Mutation PCSK9 D377Y. Abgekürzt wird die *gain of function* Mutation mit PCSK9^{DY} (Peled et al., 2017). In den

bisherigen Studien erfolgte die Injektion wahlweise intravenös in die Schwanz- oder Femoralvene sowie intraperitoneal mit einer Anzahl an injizierten Viruspartikeln zwischen 2×10^{10} und 5×10^{11} . Der erzeugte Phänotyp ist den LDLR ko Mäusen ähnlich, denn für die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen ist eine entsprechende atherogene Diät notwendig. Unter *chow* Diät können Cholesterinwerte von 300 mg/dL, in Kombination mit *high fat* Diät (HFD) über 1100 mg/dL und eine dosisabhängige Induktion der Atherosklerose erreicht werden (Roche-Molina et al., 2015).

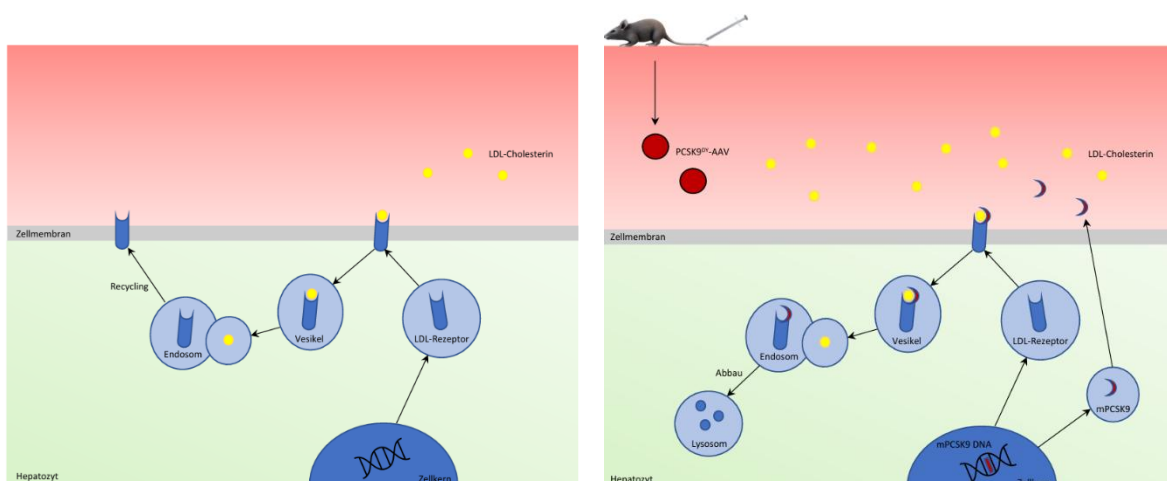


Abbildung 1-2: Recycling und Abbau des LDL-Rezeptors in Abhängigkeit von PCSK9. Nach (Bjorklund et al., 2014).

Um dieses neue Atherosklerose-Modell in unserer Arbeitsgruppe zu etablieren und die notwendige Viruslast zu eruieren, erfolgte im Vorfeld zur vorliegenden Hauptstudie eine Vorstudie, in der 24 Wildtyp-Mäusen aus vier Versuchsgruppen unterschiedliche Viruslasten des PCSK9^{DY}-AAV intravenös injiziert und nach zwölfwöchigem Versuchszeitraum mit Fütterung von Western Diät Körpergewicht, Lipidprofil, atherosklerotische Plaques und endotheliale Funktion analysiert wurden. Die Mäuse entwickelten eine Diät-induzierte Adipositas und dosisabhängig Hypercholesterinämie sowie atherosklerotische Plaques. Als Ausdruck einer endothelialen Dysfunktion stellte sich eine erhöhte kortikale Steifigkeit ein (s. dazu Abb. 1-3). In der Zusammenschau hielten wir eine Viruslast von 1×10^{11} für prinzipiell ausreichend zur Induktion von endothelialer Dysfunktion und atherosklerotischen Plaques und wählten aus Sicherheitsgründen für die Hauptstudie 2×10^{11} (Achner et al., 2022).

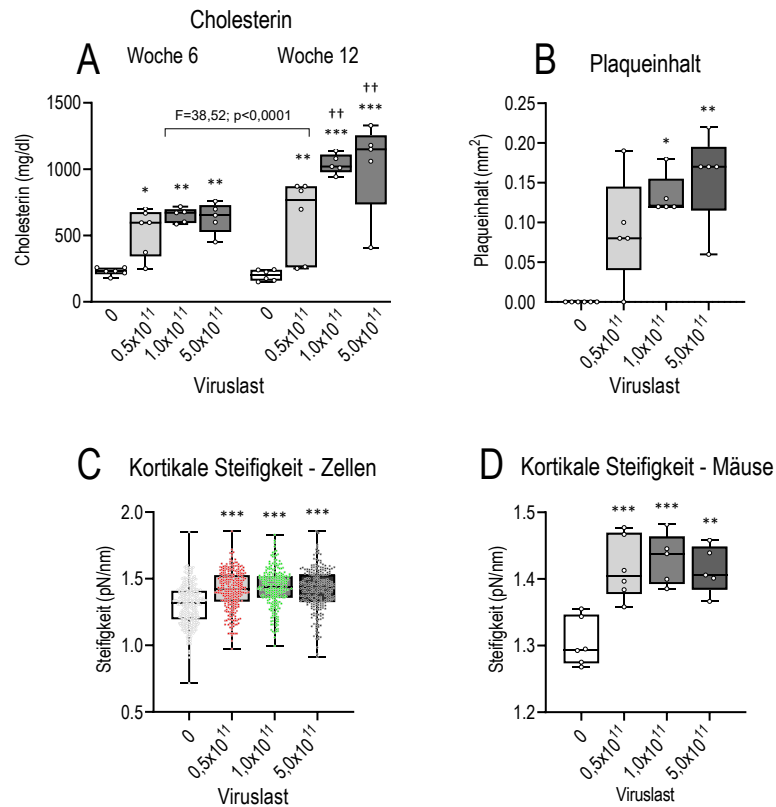


Abbildung 1-3: Ergebnisse der Vorstudie. Induktion von Hypercholesterinämie (A), atherosklerotischen Plaques (B) und endothelialer Dysfunktion (C+D) in Abhängigkeit der Viruslast nach einmaliger Injektion eines PCSK9^{DY}-AAV in Kombination mit Western Diät. Nach (Achner et al., 2022).

Im Rahmen der Vorstudie wurde auch überprüft, inwieweit zwei unabhängige Untersucher an denselben Daten zur kortikalen Steifigkeit nach manueller Auswertung gleichsinnige Ergebnisse erhalten, um damit die gemeinsame Veröffentlichung von Daten der Hauptstudie zu ermöglichen (s. dazu auch Kapitel 1.7 und 2.2). Es konnte gezeigt werden, dass ein konstanter interindividueller Unterschied besteht, dabei aber die Gleichsinnigkeit der Ergebnisse erhalten bleibt. Aus der konstanten Differenz zwischen den beiden Autoren wurde ein Faktor von 1,102 zur Anpassung der erhaltenen Werte des Autors dieser Studie ermittelt (s. Abbildung 1-4). Ein analoges Vorgehen wurde auch für die im Folgenden dargestellte Hauptstudie gewählt.

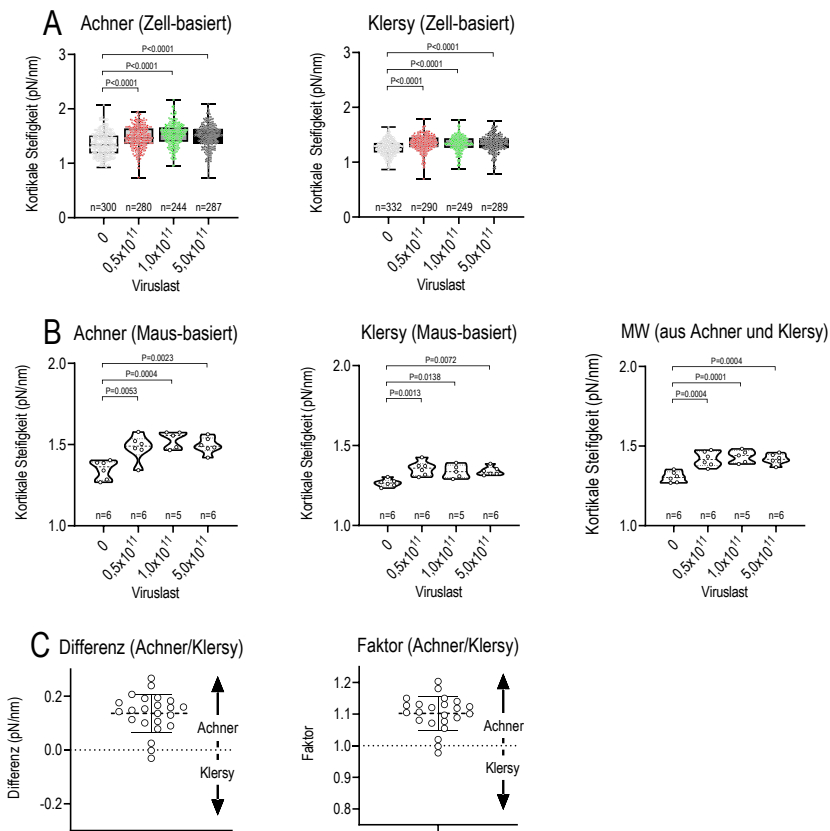


Abbildung 1-4: Vergleich der Auswertungen zur kortikalen Steifigkeit in der Vorstudie. (A) Kortikale Steifigkeit aller Endothelzellen. Die Punkte stellen den Mittelwert aus acht Einzelmessungen einer Endothelzelle dar. (B) Kortikale Steifigkeit pro Maus. (C) Ermittlung der Differenz zwischen den Untersuchern und eines Faktors zur Anpassung der Daten. Dargestellt sind Median, 25% und 75%-Perzentile als Boxplot. Die Antennen stellen Maximum und Minimum dar. Statistische Analyse mittels 1way-ANOVA mit Tukey's multiple comparison test oder Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multiple comparison test bei fehlender Normalverteilung.

1.7 Fragestellung und Hypothesen

Das RAS hat große Bedeutung in der Pathophysiologie von Adipositas und Atherosklerose. Insbesondere der antagonistischen ACE2/Ang1-7/Mas-Achse werden dabei positive Einflüsse zugeschrieben. TEL erhöht die Konzentration von Ang1-7 und könnte darüber die Entwicklung einer Diät-induzierten Adipositas verhindern. In der vorliegenden Arbeit soll die Entwicklung von Adipositas und Atherosklerose in Abhängigkeit einer TEL-Behandlung in Mas ko Mäusen auf dem C57BL/6N Hintergrund im Atherosklerose-Modell mit PCSK9^{DY}-AAV untersucht werden. Neben Gewicht, Fettmasse, Lipidprofil, Cytokinprofil und Glukosestoffwechsel untersuchen wir die endotheliale Funktion anhand der Steifigkeit von Cortex und Glykokalix sowie Messung von Nitrit, analysieren Plaques histologisch und untersuchen die RNA-Expression der abdominalen Aorta.

Unsere Hypothesen lauten:

1. Mäuse mit Mas ko sind schwerer, haben eine größere Fettmasse, einen erhöhten Blutzucker, erhöhte Werte für Cholesterin und Triglyceride, eine erhöhte kortikale Steifigkeit im Vergleich zu Wildtyp Mäusen.
2. Mäuse entwickeln durch Western Diät eine Diät-induzierte Adipositas. TEL verhindert die Entwicklung einer Diät-induzierten Adipositas in Wildtyp Mäusen. TEL kann in Mas ko Mäusen die Entwicklung einer Diät-induzierten Adipositas nicht verhindern.
3. TEL reduziert atherosklerotische Plaques und verbessert die endotheliale Funktion in Wildtyp Mäusen. TEL kann in Mas ko Mäusen atherosklerotische Plaques nicht reduzieren und die endotheliale Funktion nicht verbessern.

An der Durchführung des Projekts beteiligt waren der Autor dieser Arbeit sowie Frau Leonie Achner. Die Vorstudie wurde gemeinsam zu gleichen Anteilen durchgeführt. In der Hauptstudie wurde eine gemeinsame Kontrollgruppe verwendet, Frau Achner untersuchte ACE2 ko Mäuse, Herr Klersy Mas ko Mäuse. Dieses Vorgehen diene nach dem 3R-Prinzip einer Reduktion der benötigten Versuchstiere und der Risikominimierung im Krankheitsfall oder Ausfall aus anderer Ursache. Für die gemeinsame Veröffentlichung der Daten beider *knock-out* Mäuse wertete Frau Achner die kortikale Steifigkeit der ACE2 ko Mäuse aus, Herr Klersy die kortikale Steifigkeit der Mas ko Mäuse, beide werteten unabhängig voneinander die kortikale Steifigkeit der gemeinsam verwendeten Kontrollgruppe aus. Um sicherzustellen, dass eine kombinierte Darstellung der kortikalen Steifigkeit möglich ist, musste im Vorfeld zwingend eruiert werden, ob die beiden unabhängigen Untersucher an denselben Daten gleichsinnige Ergebnisse erhalten. Dies erfolgte im Rahmen der Vorstudie, indem die beiden Untersucher die Daten zur kortikalen Steifigkeit unabhängig voneinander auswerteten. Weil dieses Vorgehen für die gemeinsame Veröffentlichung der Daten der Hauptstudie zwingend notwendig war, wird in beiden Dissertationsschriften die kombinierte Auswertung der Daten zur kortikalen Steifigkeit der Vorstudie adressiert (näheres dazu im Kapitel 2.2). Alle weiteren Ergebnisse der Vorstudie finden sich im Anhang dieser Arbeit (s. Kapitel 7.1).

2 Methoden

2.1 Tierexperimentelle Methoden

Der Tierversuch „Einfluss von Telmisartan und Hochfettdiät auf das Körpergewicht in Mas-KO Mäusen“ ist durch das Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung des Landes Schleswig-Holstein (MELUR) genehmigt (Antragsnummer: V242-48029/2018 (85-9/18)) und den *National Institutes for Health-Richtlinien* (NIH; *Guide for the care and use of laboratory animals*) sowie der Tierschutz-Versuchstierverordnung (TierSchVersV) entsprechend durchgeführt worden. Die Ergebnisse wurden nach den *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments-* (ARRIVE) Richtlinien dokumentiert.

2.1.1 Versuchstiere

Es waren 36 männliche Wildtyp Mäuse des Stammes C57BL/6N bezogen von der Firma Janvier sowie 36 Mas-defiziente männliche Mäuse desselben Stammes Versuchstiere. Die Mas-defizienten Mäuse wurden von unserem Kooperationspartner Prof. Dr. Michael Bader (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin) gezüchtet und über einen Embryonentransfer in die Gemeinsame Tierhaltung (GTH) in Lübeck importiert.

2.1.2 Haltungsbedingungen

Die Mäuse wurden in den Haltungsräumen der GTH der Universität zu Lübeck im *Center of Brain, Behavior and Metabolism* (CBBM, Gebäude 66) in Gruppen von zwei bis vier Tieren in individuell ventilierten Käfigen (IVC) von Typ „II lang“ gehalten. Die Bedingungen der Haltungsräume entsprachen während der gesamten Studie einer konstanten Raumtemperatur von 21°C und einer Luftfeuchtigkeit von 40-60% bei einem 12h-Hell-Dunkel-Rhythmus mit Lichtphase von 7-19 Uhr. Tägliche Inspektionen, Gewichtsbestimmung und Fütterung erfolgten während der Lichtphase. Bis zum Versuchsbeginn erhielten die Mäuse eine Standarddiät „chow“ (EF acc. D12450B mod., ssniff®, Deutschland) und stets Leitungswasser ad libitum. Einmal wöchentlich erhielten die Tiere neu eingestreute Käfige.

2.1.3 Studienprotokoll

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, inwiefern die Therapie mit Telmisartan bei Mas-defizienten Mäusen Übergewicht und Atherosklerose verhindern kann. Die Tiere erreichten die Haltungsräume der GTH im Alter von acht bis neun Wochen. Wildtyp (wt) und Mas-defiziente Mäuse wurden nach Gewicht randomisiert, in sechs Gruppen zu je zwölf Tieren aufgeteilt und über einen Versuchszeitraum von zwölf Wochen beobachtet (s. Tabelle 2-1).

Gruppe	Anzahl der Tiere	Diät	Behandlung	Viruslast
wt chow VEH	n = 12	Chow Diät	Vehikel	Leervektor
wt WD VEH	n = 12	Western Diät	Vehikel	2x10 ¹¹
wt WD TEL	n = 12	Western Diät	Telmisartan	2x10 ¹¹
Mas chow VEH	n = 12	Chow Diät	Vehikel	Leervektor
Mas WD VEH	n = 12	Western Diät	Vehikel	2x10 ¹¹
Mas WD TEL	n = 12	Western Diät	Telmisartan	2x10 ¹¹

Tabelle 2-1: Versuchsgruppen

Nach einwöchiger Eingewöhnungsphase erfolgte sieben Tage vor Versuchsbeginn eine retroorbitale Blutentnahme. In der letzten Woche vor Versuchsbeginn wurden die Mäuse an das Greifen und das Einführen der Schlundsonde gewöhnt. Ab Versuchsbeginn (Tag 1) erhielten vier Gruppen Western Diät (WD). Die Wildtyp- und *Knockout*-Kontrollgruppen erhielten weiterhin *chow* Diät. Allen mit WD gefütterten Mäusen wurde ebenfalls an Tag 1 das PCSK9^{DY}-AAV in die Schwanzvene appliziert, den Kontrolltieren ein Leervektor. Täglich erfolgten Gewichtskontrollen und die orale Applikation von TEL oder eines Vehikels (VEH). In der zehnten Versuchswoche erfolgte eine Bestimmung der Masseverteilung mittels Nuklear-Magnet-Resonanz-Spektroskopie. Die Studie wurde nach zwölf Wochen mit einer erneuten retroorbitalen Blutentnahme, einer kardialen Blutentnahme und der Organentnahme beendet. Zuletzt wurden die Steifigkeit von Cortex und Glykokalix der Aorta mittels AFM, atherosklerotische Plaques histologisch und die RNA-Expression der Aorta durch Sequenzierung untersucht (s. Abb. 2-1).

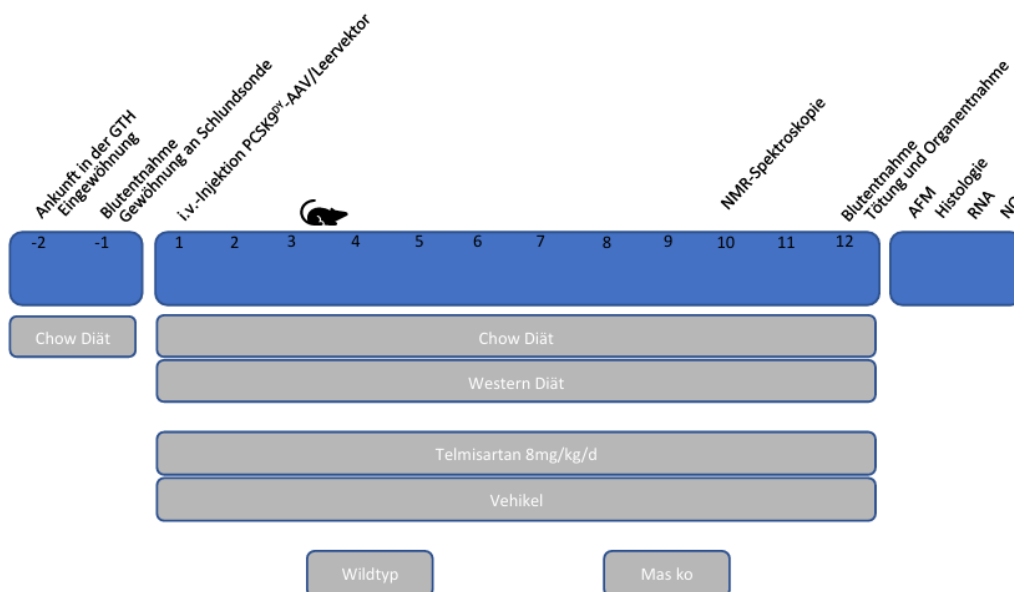


Abbildung 2-1: Übersicht des Studienprotokolls

Die Mäuse wurden in sechs Gruppen zu je zwölf Tieren mit einwöchigem Abstand in die Studie integriert. Blutentnahmen, Virusinjektionen und Tests der Studie fanden entsprechend mit einwöchiger Zeitversetzung statt.

2.1.4 Herstellung von applizierten Lösungen und Suspensionen

2.1.4.1 Herstellen der Telmisartan- und Vehikel-Suspension

Es lag Telmisartan in pulverisierter Form vor. 2,5 g Gummi Arabicum wurden in einem Mörser vorgelegt und sorgfältig verrieben. Dazu kamen 40 mg Telmisartan, die Mischung wurde weiter verrieben und schrittweise mit insgesamt 25 ml Leitungswasser suspendiert. Die Konzentration der Suspension betrug 1,6 mg/ml Telmisartan in 10% Gummi Arabicum. In einem 50 ml Falcon wurde die Telmisartan-Suspension bei 4°C aufbewahrt und maximal eine Woche lang verwendet. Vor jeder Applikation wurde das Falcon mehrere Male geschwenkt.

Die Vehikel-Lösung wurde aus 2,5 g Gummi Arabicum und 25 ml Leitungswasser hergestellt, ebenfalls bei 4°C gelagert und bis zum vollständigen Verbrauch verwendet.

2.1.4.2 Herstellen der PCSK9^{DY}-AAV-Lösung

Das PCSK9^{DY}-AAV wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. Oliver Müller (Universitätsklinikum Schleswig-Holstein UKSH Campus Kiel) zur Verfügung gestellt und wie bereits beschrieben (Buchmann et al., 2020) hergestellt: Durch Co-Transfektion von AAV/D377Y-mPCSK9 (Addgene plasmid #58376) mit dem Helfer-Plasmid pDP8 wurden in HEK293T Zellen nach der two-plasmid-Methode AAV-Serotyp 8 Vektoren für die Expression muriner D377Y-PCSK9 copy Desoxyribonukleinsäure (cDNA) produziert. Die Vektoren wurden mit Iodixanol Gradienten gereinigt und anschließend titriert. Wir lagerten das PCSK9^{DY}-AAV bei -20°C. Am Tag der Injektion wurde das Virus aufgetaut und mit NaCl verdünnt, um die gewünschte Viruslast in einem Volumen von 100 µl zu erhalten.

2.1.4.3. Herstellen der Ketamin-/Xylazin-Narkose

Für die finalen Narkosen wurden je 700 µl Ketamin (10%) und Xylazin (2%) in ein 15 ml Falcon gegeben, das anschließend bis zu einem Volumen von 10 ml mit NaCl aufgefüllt wurde.

2.1.5 Substanzapplikation

2.1.5.1 Injektion des PCSK9^{DY}-AAV

Zur Induktion von Atherosklerose wurde den mit WD gefütterten Mäusen das PCSK9^{DY}-AAV in die Schwanzvene injiziert. Den Kontrolltieren wurde ein Leervektor injiziert. Dazu wurden die Mäuse in einem Restraîner fixiert. Zur besseren Venenfüllung wurde der Schwanz mit einer Wärmelampe bestrahlt. Es erfolgte dann die Applikation von insgesamt 100 µl der vorbereiteten Lösung.

2.1.5.2 Orale Applikation von Telmisartan und Vehikel

Eine vollständige Gabe von Telmisartan und Vehikel wurde durch intraösophageale Applikation („Schlund“) über eine starre Knopfkanüle erreicht wie bereits mehrfach beschrieben (Dapper et al., 2019; Rawish et al., 2020). Die Knopfkanüle oder auch „Schlundsonde“ wurde mit einer 1 ml Spritze verbunden, die die zu applizierende Flüssigkeit enthielt. Zur Applikation wurden die Mäuse mit der linken Hand an Nacken- und Rückenfell sowie am Schwanz fixiert. Mit der rechten Hand wurde die Schlundsonde in Mund und Ösophagus eingeführt. Für Telmisartan und Vehikel wurden separate Kanülen verwendet. Die Mäuse erhielten 8 mg/kg/d Telmisartan, das in einer Lösung mit Gummi Arabicum in einer Konzentration von 1,6 mg/ml in 10 % Gummi Arabicum vorlag. Entsprechend wurden pro g Körpergewicht 5 µl der Lösung appliziert. Bei der Vehikel-Therapie wurde das gleiche Volumen verwendet.

2.1.5.3 Intraperitoneale Applikation

Zur intraperitonealen Applikation des Narkotikums am Ende der Studie wurden 27G Kanülen und 1 ml Spritzen verwendet. Die Kanüle wurde in die gespannte Bauchhaut bei an Rücken- und Nackenfell fixierter Maus eingeführt. Dabei wurde die Maus mit dem Kopf leicht nach unten gehalten, die Kanüle auf Höhe der Kniefalte angesetzt und die Lösung in die Bauchhöhle abgegeben.

2.1.6 Bestimmung der Masseverteilung

Die Masseverteilung wurde mittels Nuklear-Magnet-Resonanz-Spektroskopie am LF110-BCA-Analyser erfasst, wie es in der Arbeitsgruppe etabliert ist (Huber et al., 2021). Dazu wurden die Mäuse in ihrem Käfig in den Versuchsraum gebracht und nach Akklimatisation einzeln im Restraîner so fixiert, dass nur noch kleinste Bewegungen möglich waren. Der Restraîner wurde in der vorgesehenen Öffnung des Geräts platziert und die Messung durchgeführt. Nach Beenden der Messung wurde der Restraîner entnommen und die Maus umgehend in den Käfig zurückgesetzt.

2.1.7 Gewinnung biologischen Materials

2.1.7.1 Retroorbitale Blutentnahme

Anästhesierte Mäuse wurden mit zwei Fingern im Nacken fixiert. Eine Glaskapillare wurde am seitlichen Rand des Auges in die Augenhöhle eingeführt und leitete das Vollblut in eine Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Mikrovette. Diese wurde 30 Minuten auf Eis gelagert und anschließend bei 9000 U/min für drei Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Plasma-Überstand wurde abpipettiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei -20°C gelagert.

Bei der ersten retroorbitalen Blutentnahme wurden die Mäuse vor der Blutentnahme in einen Plastikzylinder gesetzt, auf dessen Boden ein mit Isofluran getränktes Tuch lag, das die Mäuse anästhesierte. Sie wurden nach kurzer Zeit aus dem Zylinder entnommen. Bei der finalen Blutentnahme wurden die Mäuse mittels intraperitonealer Injektion einer Ketamin-/Xylazin-Lösung anästhesiert.

2.1.7.2 Blutglukosebestimmung

Bei der oben beschriebenen retroorbitalen Blutentnahme konnte Vollblut der anästhesierten Maus zur Messung der Blutglukose gewonnen werden. Die Glukosekonzentration wurde mit handelsüblichen Messstreifen und Messgeräten bestimmt.

2.1.7.3 Kardiale Blutentnahme für Nitrit-Messung

Um eine Hämolyse des Vollbluts für die Bestimmung von Nitrit zu verhindern, wurde zusätzlich eine kardiale Blutentnahme durchgeführt. Diese erfolgte am narkotisierten Tier nach Eröffnung von Bauchraum, Durchtrennung des Zwerchfells und Eröffnung des Thorax mit einer 23G Kanüle und 1 ml Spritze. Das Blut wurde in eine Lithium-Heparin-Mikrovette überführt, darin auf Eis gelagert und bei 4°C für 10 Minuten mit 2000 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma in Proteinfilter pipettiert und darin bei 4°C für 70 Minuten mit 14 000 g zentrifugiert. Das entproteinierte Plasma wurde in lichtgeschützten Reaktionsgefäßen bei -80°C gelagert.

2.1.7.4 Tötung und Organentnahme

Es erfolgte nach kardialer Blutentnahme und cervikaler Dislokation die Eröffnung der Schädeldecke und die Entnahme des Gehirns mittels Pinzette. Das Gehirn wurde umgehend auf Trockeneis eingefroren und in Szintillationsgefäßen gelagert. Zur Re-Genotypisierung wurde die Schwanzspitze ebenfalls entfernt und in einem Reaktionsgefäß auf Eis gelagert. Das Herz sowie die daran belassene Aorta ascendens wurden in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Die thorakale Aorta descendens

wurde getrennt: Der erste Teil diente der Messung der kortikalen Steifigkeit und wurde zur anschließenden Präparation in Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) überführt. Der zweite Teil wurde mit Ringer-Lösung perfundiert, von umliegendem Gewebe befreit und in einem mit Ringer-Lösung gefüllten Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die abdominale Aorta wurde in RNAprotect® gegeben. Teile von Leber, Lunge, Duodenum, Dickdarm, Fäces, weißem Fettgewebe, eine Niere und die Milz wurden entnommen und in 1,5 bzw. 2 ml Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Alle Organ- und Gewebeproben bis auf das Herz und die Aorta wurden anschließend bei -80°C gelagert.

Die thorakale Aorta descendens wurde anschließend für die Messung am AFM präpariert. Umgebendes Gewebe wurde sorgfältig entfernt, die Aorta wurde der Länge nach aufgeschnitten und schließlich in einzelne ca. rechteckige Stücke mit einer Fläche von etwa 1 mm² getrennt. Diese Aortenstücke wurden mit Cell-Tak® auf Deckgläsern mit 15 mm Durchmesser fixiert, wobei die Endothelfläche nach oben zeigte. Nach der Präparation wurden die Deckgläser in 12-Well-Zellkulturplatten in *minimal essential medium* (MEM) mit hinzugefügten 10% fetalem Kälberserum, 1% MEM Vitaminen, 1% MEM nicht-essenziellen Aminosäuren sowie 1% Penicillin G (100 U/mL) und Streptomycin (100 mg/mL) bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank belassen. Pro Maus wurden zwei Aortenstücke gemessen, das erste 24 Stunden und das zweite 48 Stunden nach der Entnahme. Die Messungen fanden in HEPES-Puffer bei 37°C statt (140 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl₂-6-hydrat, 1 mmol/L CaCl₂, 5 mmol/L Glucose, 10 mmol/L HEPES).

2.2 Atomic force microscopy

Mit der *atomic force microscopy* ist es möglich, Einblicke in die nanomechanischen Eigenschaften lebender Zellen in einem ex vivo Präparat zu erhalten. Ein als *Nanoindentation* bezeichnetes Verfahren wurde verwendet, um Steifigkeit von Glykokalix und Cortex der thorakalen Aorta zu messen und damit Informationen über die Funktion der Endothelzellen zu erhalten (Cosgun et al., 2020; Jeggle et al., 2016). Zu den wichtigen Bestandteilen des AFM zählen der biegsame *Cantilever*, ein goldbeschichtetes Metallplättchen mit sphärischer Spitze von 10 µm Größe, ein Laserstrahl, der von der Rückseite des *Cantilevers* reflektiert wird und die Photodiode, die den Laserstrahl registriert. Der *Cantilever* dient als Mechanosensor (s. Abb. 2-2).

Bei der *Nanoindentation* wird die Probe (hier Aorta) in HEPES-Puffer bei 37°C auf einem beweglichen Piezoelement befestigt. Durch Herauffahren des Elements wird die Probe an den *Cantilever* angenähert und in Kontakt gebracht. Anschließend wird die Probe bis zu einer definierten Tiefe durch den *Cantilever* eingedrückt bzw. deformiert (Aorta 150 nm). Bei der Deformation der Probe nimmt der *Cantilever* die auf ihn wirkende Kraft wahr. Eine steife Probe

lässt sich weniger einfach deformieren als eine weiche und übt daher mehr Kraft auf den *Cantilever* aus. Die entsprechende auf den *Cantilever* wirkende Kraft wird registriert, indem der *Cantilever* sich selbst bei der Deformation der Probe verbiegt, der Laserstrahl von dessen Rückseite abgelenkt wird und von der Photodiode an veränderter Position wahrgenommen wird. Dabei kommen *Cantilever* mit unterschiedlichen Eigenschaften zum Einsatz. Weiche *Cantilever* werden bereits durch weniger Kraft verbogen als steifere. Für Messungen der Glykokalix wurden in dieser Arbeit *Cantilever* mit einer Federkonstanten von 0,01 N/m und für die Messungen des Cortex mit einer Federkonstanten von 0,03 N/m verwendet.

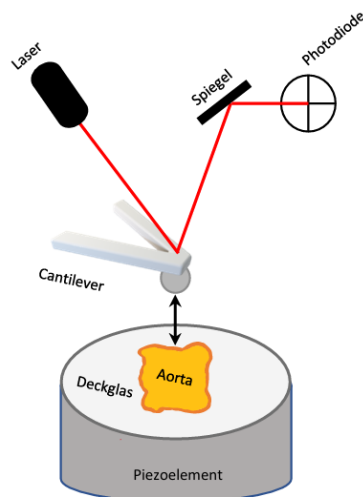


Abbildung 2-2: Aufbau des *atomic force microscope* nach (Cosgun et al., 2020)

Mit der vorgegebenen Federkonstanten und der Empfindlichkeit für Verbiegung (*deflection sensitivity*) des *Cantilevers* kann aus der einmaligen Deformation der Probe mit Hilfe der Software *Research Nanoscope* eine Kurve erstellt werden (s. Abb. 2-3). Die Steigung dieser Kurve korreliert mit der Kraft (in N) die nötig ist, die Probe bis zur definierten Tiefe einzudrücken. Dies wird als Steifigkeit (in N/m) definiert. Auf der resultierenden Kraft-Distanz-Kurve können mehrere Steigungen unterschieden werden: Steigung durch Deformation der Glykokalix, Steigung durch Deformation des Zellcortex und Steigung durch Deformation des Zellinneren. Die Steigung wird bei jeder einzelnen Kraft-Distanz-Kurve manuell bestimmt, indem eine Gerade angelegt wird. Dazu wurde die *Protein-Unfolding and Nanoindentation-Analysis Software* (Punias) verwendet.

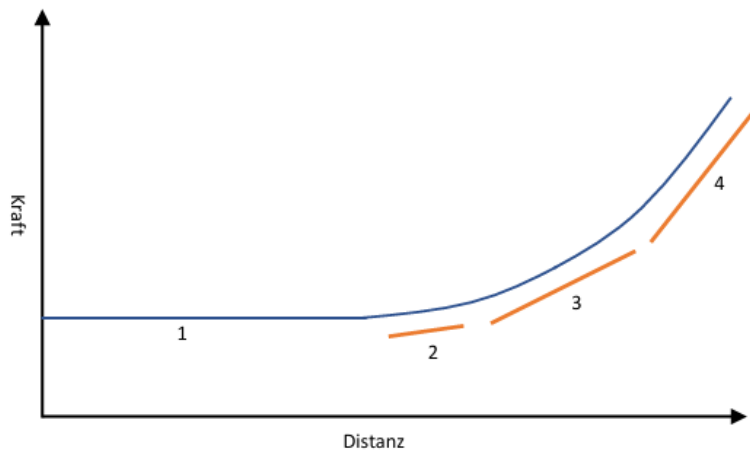


Abbildung 2-3: Kraft-Distanz-Kurve bei Einzelmessung der thorakalen Aorta. 1 = Annäherung des *Cantilevers* an die Probe, 2 = Deformation/Steifigkeit der Glykokalix, 3 = Deformation/Steifigkeit des Cortex, 4 = Deformation/Steifigkeit des Zellinneren

In dieser Studie wurden sowohl Glykokalix als auch der Zellcortex untersucht. Auf einer Probe wurde die kortikale Steifigkeit an 20-25 verschiedenen Zellen untersucht. Dazu erfolgten jeweils acht Deformationen pro Zelle mit entsprechender Generierung und Analyse der Kraft-Distanz-Kurven. Die 20-25 Zellen stammten aus mindestens drei Bildbereichen der Probe, die lichtmikroskopisch kontrolliert wurde. Die Experimente wurden durchgeführt an einem MultiMode AFM mit Feedback-kontrollierter Heizung im Institut für Physiologie der Universität zu Lübeck. Die Messungen der Glykokalix erfolgten durch Dr. Benedikt Fels.

Um in (Klersy et al., 2025) Wildtyp, ACE2 ko und Mas ko Mäuse vergleichen zu können, war eine kombinierte Auswertung durch den Autoren dieser Studie und Frau Leonie Achner notwendig. Die Kraft-Distanz-Kurven der ACE2 ko Mäuse wurden durch Frau Achner ausgewertet, die Kraft-Distanz-Kurven der Mas ko Mäuse durch Tobias Klersy. Bei gemeinsam verwendeter Kontrollgruppe und manueller Auswertung der Kraft-Distanz-Kurven mit möglichen individuellen Unterschieden war zuvor zwingend die Untersuchung nötig, ob Frau Achner und Herr Klersy an denselben Proben zu gleichen Ergebnissen kommen würden und eine Kombination der Auswertungen statthaft wäre. Daher erfolgte im Rahmen der Vorstudie zunächst die eigenständige Auswertung der kortikalen Steifigkeit durch die beiden Autoren. Es konnte gezeigt werden, dass ein konstanter geringer interindividueller Unterschied zwischen den Auswertern besteht, ohne dass davon die Ergebnisse beeinflusst wurden. In (Achner et al., 2022) wurde dann die gemittelte Auswertung veröffentlicht. In (Klersy et al., 2025) wurden die interindividuellen Unterschiede in der Auswertung anhand der kortikalen Steifigkeit der Kontrollgruppe ermittelt, um anschließend die Ergebnisse von ACE2 ko bzw. Mas ko an den gemeinsamen Mittelwert der Kontrollgruppe anzupassen.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Lipidprofil

Das Lipidprofil wurde am Institut für Kardiogenetik untersucht. Gesamtcholesterin und Triglyceride wurden aus dem Plasma photometrisch bestimmt. 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.

2.3.2 Hormon- und Cytokinprofil

Es wurden das *Milliplex mouse metabolic magnetic bead panel kit* MMHMAG-44K.mouse (Amylin, C-Peptide 2, Ghrelin, GIP, GLP-1 Active or GLP-1 Total, Glucagon, IL-6, Insulin, Leptin, MCP-1, PP, PYY, Resistin, Sekretin, and TNF α) sowie das *Milliplex map mouse high sensitivity T cell panel kit* MHSTCMAG-70K (GM-CSF, IFN γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17A, KC/CXCL1, LIX, MCP-1, MIP-2, TNF- α) zur Untersuchung des Hormon- und Cytokinprofils den Herstelleranweisungen entsprechend verwendet.

2.3.3 Nitrit-Messung

Nitrit wurde aus 50 μ l heparinisiertem und gefiltertem Plasma als Surrogatparameter für die NO-Konzentration mit einem NO-Analyzer bestimmt. Die Messungen erfolgten am Vascular Research Center in Frankfurt am Main nach beschriebener Vorgehensweise (Lopez et al., 2021). Um die Ergebnisse nicht durch Nitrit aus dem Leitungswasser zu verfälschen, erhielten die Mäuse vor der Blutentnahme fünf Tage lang handelsübliches Mineralwasser mit einem niedrigen Gehalt an Nitrit.

2.3.4 RNA-Sequenzierung (RNAseq)

Die RNA-Sequenzierung der abdominalen Aorta wurde am Vascular Research Center in Frankfurt am Main durchgeführt (Pfluger-Muller et al., 2020). Die RNA-Sequenzierung erfolgte an der absteigenden Aorta. Das aortale Gewebe wurde isoliert, von Fett befreit und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für die RNAseq-Analyse wurden die Aortensegmente von drei Mäusen gepoolt und insgesamt wurden vier Proben pro Versuchsgruppe analysiert. Die Ergebnisse repräsentieren zwölf Mäuse pro Gruppe. Die gesamte RNA wurde isoliert mit dem RNA Mini Kit von Bio & SELL (Nürnberg, Deutschland) kombiniert mit DNase (DNase-Free DNase Set, Qiagen), um genomische DNA-Kontamination zu vermeiden.

RNA und die Vorbereitung der Sequenzierungs-Bibliothek wurden durch LabChip Gx Touch 24 (Perkin Elmer) verifiziert. Als Probe für die „VAHTS Stranded mRNAseq preparation“ wurden

nach Herstellerprotokoll 500 µg der RNA verwendet (Vazyme). Die Sequenzierung wurde an einem NextSeq2000 der Marke Illumina durchgeführt mit 1x72-bp single-end set-up. Die resultierten „raw reads“ wurden bezüglich Qualität, Adapterinhalt und Duplikationsrate mit FastQC überprüft (RRID:SCR_014583) (Andrews Simon: Andrews Simon: FastQC: a quality control tool for high-throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>).

Die RNA Sequenzierungsanalyse erfolgte am Max Planck *Institute for Heart and Lung Research* in Bad Nauheim (Bolger et al., 2014; Dobin et al., 2013; Liao et al., 2014; Love et al., 2014) mit Trimmomatic Version 0.39, um die reads nach einem Qualitätsverlust unter den Mittelwert von Q15 in einem Bereich von fünf Nucleotiden zu trimmen und nur gefilterte reads mit einer Länge von mehr als 15 Nucleotiden beizubehalten. Die Reads wurden gegen dem Ensemble mouse genome version mm10 (Ensembl release 101) mit STAR 2.7.10a ausgerichtet. Die ausgerichteten reads wurden mit Picard 2.27.4 (Picard: A set of tools in Java for working with next-Generation sequencing data in the BAM format) gefiltert, um Duplikate zu entfernen. Die Genzählungen wurden mit featureCounts 2.0.4 erstellt durch Zusammenstellung von reads, die Exons auf dem korrektem Strang überlappten, ohne solche, die bei vielen Genen überlappten. Die Rohanzahl-Matrix wurde mit DESeq2 Version 1.36.0 normalisiert. Kontraste wurden mit DESeq2 basierend auf der Rohanzahl-Matrix erstellt. Die Gene wurden bei einer durchschnittlichen Anzahl von > 5 als signifikant verändert exprimiert klassifiziert, mit angepasstem p-Wert < 0.05 für multiples Testen und $-0.585 < \log_2FC < 0.585$. Die Ensemble-Darstellung wurde mit UniProt data (Activities at the Universal Protein Resource (UniProt)) erstellt.

Um eine Assoziation mit Atherosklerose zu testen, verwendeten wir CTD Gene-Disease Associations dataset https://maayanlab.cloud/Harmonizome/gene_set/Atherosclerosis/CTD+Gene-disease+Associations (Rouillard et al., 2016).

2.4 Histologische Analyse der Aorta

Die histologischen Analysen erfolgten am Institut für Kardiogenetik der Universität zu Lübeck (Aherrahrou et al., 2020). Atherosklerotische Läsionen wurden an der aufsteigenden Aorta verblindet zur Behandlungsgruppe untersucht. Dazu wurden nach Entfernung von umliegendem Gewebe Kryostatschnitte (8-10 µm) der aufsteigenden Aorta aus einem Bereich unterhalb der Aortenwurzel bis zum Aortenbogen mit einem jeweiligen Abstand von 40 µm erstellt und mit der Oil Red O Färbung (ORO) angefärbt. Die mittlere Größe der atherosklerotischen Läsionen wurde aus acht bis zehn Schnitten errechnet. Bilder wurden mit einem Keyence Mikroskop aufgenommen. Die Schnitte wurden manuell mit der GIMP Software, Version 2.6, analysiert. Läsionsareale und

ORO-positive Regionen wurden bestimmt nach *in-house* Skript, bei dem das Python package OpenCV die Bilder prozessiert und Läsionen durch Farb-Schwellenwerte erkennt.

2.5 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde GraphPad Prism 8 verwendet. Nach Ausreißeranalyse mittels Robuste Regression und Ausreißerentfernung (ROUT) erfolgte eine Überprüfung hinsichtlich der Normalverteilung. Lag bei mehr als zwei zu vergleichenden Gruppen eine Normalverteilung vor, so wurden eine 1way-Analysis of Variance (ANOVA) bei einer Variablen und eine 2way-ANOVA bei zwei Variablen durchgeführt. Bei Signifikanz wurde Tukey's multiple comparison test als post-hoc-Test angewendet. Bei fehlender Varianzhomogenität erfolgte eine Brown-Forsythe-ANOVA mit Dunnett's multiple comparison test. Lag keine Normalverteilung der Daten vor, wurden sie mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's multiple comparison test als post-hoc-Test analysiert. Bei zwei zu vergleichenden Gruppen erfolgte bei Normalverteilung ein t-Test und bei fehlender Normalverteilung ein Mann-Whitney-Test. Die Korrelationsanalyse erfolgte mittels 1- oder 2-tailed Pearson-Test.

Wir wählten ein gestuftes Vorgehen und verglichen zunächst die Kontrollgruppen von Wildtyp und *knock-out*, anschließend die Behandlungsgruppen getrennt nach Wildtyp und *knock-out* nach oben beschrieben Tests. Die Daten dieser Arbeit sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. In Box-Plots sind der Median, 25% und 75%-Perzentile mit Minimum und Maximum als Whisker angegeben. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt. Die biometrische/statistische Fallzahlberechnung erfolgte PC-assistiert mittels eines online-Programms nach statistischer Beratung mit dem Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck. Die Gruppengröße von $n=12$ ergab sich durch *Power*-Analyse (korrigiertes $\alpha=0,01$, *power* 80%) mit Primärparameter Körpergewicht.

3 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss einer chronischen Behandlung mit dem AT₁R-Blocker Telmisartan auf Diät-induzierte Adipositas und Atherosklerose bei globaler Mas-Defizienz zu untersuchen und darüber Aussagen über den Anteil der ACE2/Ang1-7/Mas-Achse an der Wirkung von Telmisartan zu treffen. Für alle Parameter erfolgte dafür zunächst der Vergleich der Kontrollgruppen von wt und Mas ko Mäusen, um basale Unterschiede zwischen den Mauslinien erkennen zu können. Im Folgenden wurden dann der Einfluss der Behandlung mit PCSK9^{DY}-AAV und Western Diät sowie zuletzt der Effekt von Telmisartan auf wt und Mas ko Mäuse analysiert.

3.1 Körpergewicht und Masseverteilung

Wt und Mas ko Mäuse wurden über einen Beobachtungszeitraum von zwölf Wochen mit Western Diät gefüttert und erhielten zu Versuchsbeginn eine einmalige intravenöse Injektion des PCSK9^{DY}-AAV. Kontrollgruppen erhielten *chow* Diät und Injektion eines Leervektors. Darüber hinaus erhielten die Mäuse täglich 8 mg/kg KG TEL, Kontrollgruppen erhielten VEH.

Zu Beginn des Versuchs unterschieden sich wt und Mas ko Mäuse bezüglich des Gewichts nicht signifikant, Mas ko Mäuse waren tendenziell leichter (s. Tabelle 7-1). Alle Versuchsgruppen nahmen über den Beobachtungszeitraum an Gewicht zu. Die *chow*-Kontrollgruppen der wt und Mas ko Mäuse unterschieden sich auch am Ende des Beobachtungszeitraums nicht bezüglich ihres Körpergewichts (s. Tabelle 7-2).

Im Vergleich zur *chow*-Kontrolle nahmen wt Mäuse nach Virusinjektion und WD mehr als doppelt so viel Gewicht zu. Bei Mas ko Mäusen konnte ein ähnlicher Gewichtsverlauf mit deutlicher Zunahme unter WD gesehen werden. In beiden Mauslinien konnte TEL die gesteigerte Gewichtszunahme verhindern und die Zunahme knapp unter das Niveau der *chow*-Tiere reduzieren (Abbildung 3-1 A-C).

Zur Untersuchung der Masseverteilung erfolgte nach zehn Wochen eine Nuklear-Magnet-Resonanz-Spektroskopie. Die *chow*-Kontrollgruppen der wt und Mas ko Mäuse unterschieden sich nicht bezüglich der Fettmasse, Mas ko Mäuse zeigten aber signifikant mehr fettfreie Masse (s. Tabelle 7-2). Unter Fütterung mit WD konnte die Fettmasse in wt und Mas ko Mäusen signifikant gesteigert werden. In beiden Mauslinien verhinderte TEL den Anstieg der Fettmasse (Abbildung 3-1 D). Die fettfreie Masse blieb bei allen Behandlungsgruppen sowohl in wt als auch in Mas ko Mäusen konstant (Abbildung 3-1 E). Hinsichtlich der freien Körperflüssigkeit konnte TEL in beiden Mauslinien eine geringe Reduktion erreichen (Abbildung 3-1 F).

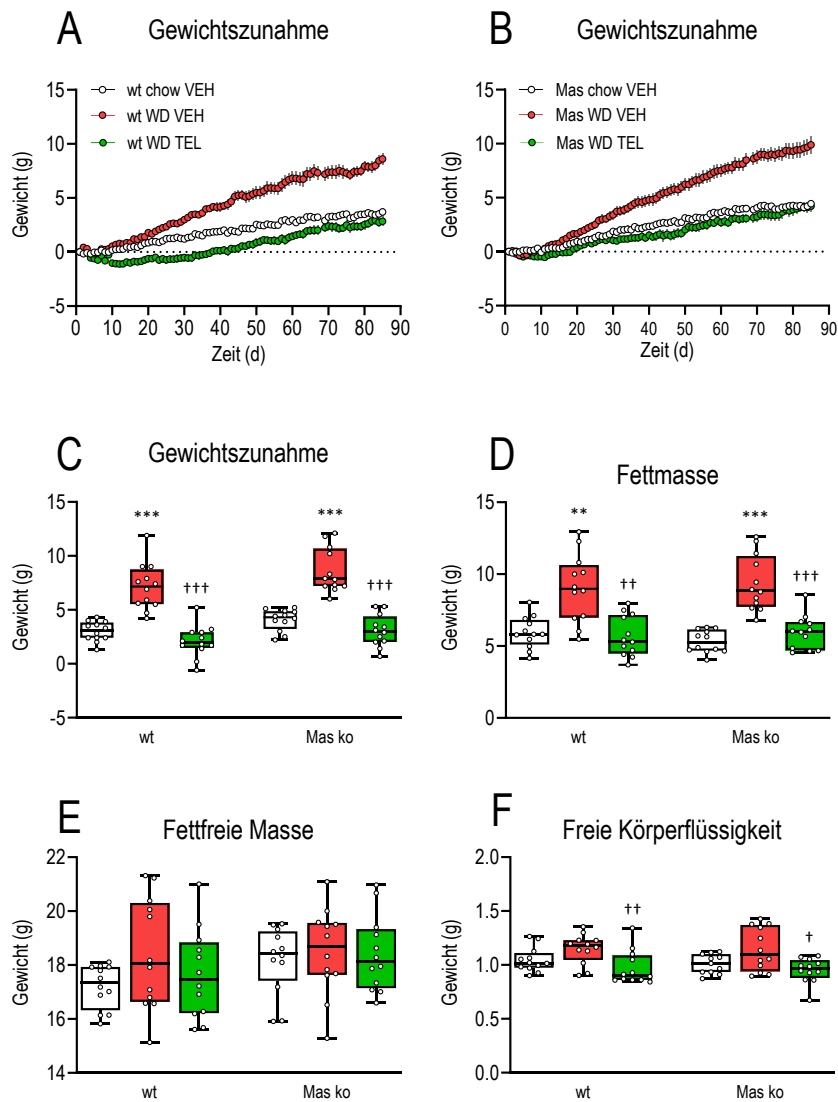


Abbildung 3-1: Körpergewicht und Masseverteilung. Mäuse wurden zwölf Wochen mit chow oder WD gefüttert, täglich gewogen und mit Vehikel oder TEL behandelt. chow VEH (weiß), WD VEH (rot), WD TEL (grün). (A) Gewichtsverlauf Wildtyp. (B) Gewichtsverlauf Mas ko. (C) Absolute Gewichtszunahme. (D) Fettmasse. (E) Fettfreie Masse. (F) Freie Körperflüssigkeit. Dargestellt sind Median, 25% und 75%-Perzentile als Boxplot. Die Antennen stellen Maximum und Minimum dar. Die Berechnungen erfolgten nach Mauslinie getrennt, bei Normalverteilung mittels 1way-ANOVA mit Tukey's multiple comparison test, bei fehlender Varianzhomogenität mittels Brown-Forsythe-ANOVA mit Dunnett's T3 multiple comparison test und bei fehlender Normalverteilung mittels Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multiple comparison test. n=12. *, **, *** p<0.05, <0.01, <0.001 vs. chow VEH. †, ††, ††† p<0.05, <0.01, <0.001 vs. WD VEH.

3.2 Hormonprofil

Aus Proben retroorbitaler Blutentnahmen erfolgte die Untersuchung von Hormonen mit Einfluss auf die Nahrungsaufnahme. Vor Versuchsbeginn wiesen Mas ko Mäuse geringere Leptinspiegel als wt Mäuse auf (s. Tabelle 7-1). Plasmaspiegel von Resistin, Ghrelin und Peptid YY (PYY) unterschieden sich am Versuchsende zwischen wt und Mas ko Mäusen in den Kontrollgruppen nicht. In Mas ko Mäusen lagen geringere Plasmaspiegel von Leptin vor (s. Tabelle 7-2).

Nach Virusinjektion und WD entwickelten sowohl wt als auch Mas ko Mäuse signifikant höhere, mindestens verdoppelte Leptinwerte, die durch TEL vollständig normalisiert wurden (Abbildung 3-2 A). Ebenfalls gesteigert wurden in beiden Mauslinien die Werte für Resistin. Durch TEL konnte allerdings keine Normalisierung erreicht werden, sondern Resistin war weiter leicht erhöht (Abbildung 3-2 B). Die Werte für das Hormon Ghrelin wurden in beiden Mauslinien durch WD und Virusinjektion leicht gesenkt, TEL erreichte in Mas ko Mäusen eine Steigerung (Abbildung 3-2 C). Für PYY ergaben sich durch Virusinjektion und WD nur geringfügige Veränderungen, die Behandlung mit TEL führte in wt und Mas ko Mäusen zu signifikanten Steigerungen im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 3-2 D).

Die Leptinwerte korrelierten sowohl in wt als auch in Mas ko Mäusen positiv mit dem Körpergewicht. In wt Mäusen korrelierten auch Körpergewicht und Resistin positiv, dies war in Mas ko Mäusen nur tendenziell zu sehen (Abbildung 7-5 A-H).

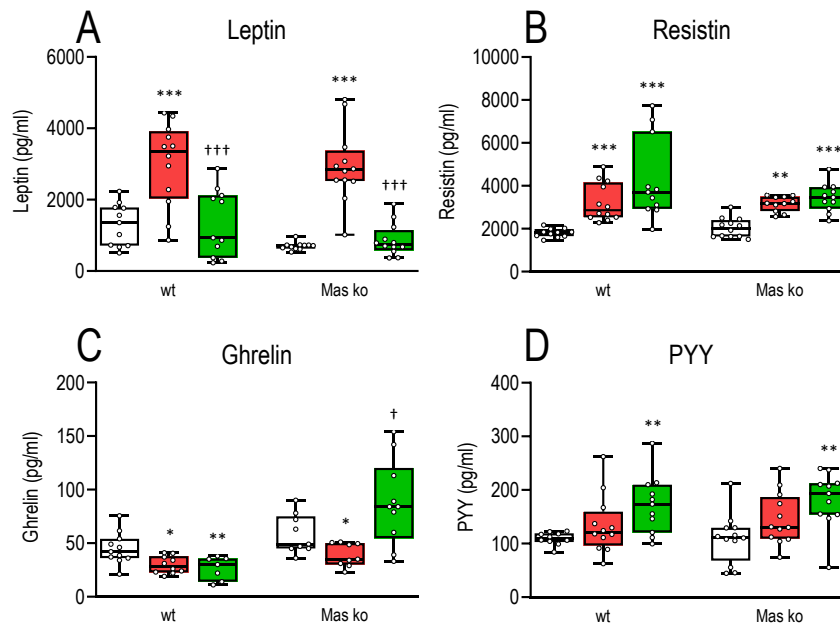


Abbildung 3-2: Hormonprofil. Bestimmung der Plasmaspiegel von Hormonen mit Einfluss auf die Nahrungsaufnahme nach einem Beobachtungszeitraum von zwölf Wochen. chow VEH (weiß), WD VEH (rot), WD TEL (grün). (A) Leptin. (B) Resistin. (C) Ghrelin. (D) PYY. Dargestellt sind Median, 25% und 75%-Perzentile als Boxplot. Die Antennen stellen Maximum und Minimum dar. Die Berechnungen erfolgten nach Mauslinie getrennt, bei Normalverteilung mittels 1way-ANOVA mit Tukey's multiple comparison test, bei fehlender Varianzhomogenität mittels Brown-Forsythe-ANOVA mit Dunnett's T3 multiple comparison test und bei fehlender Normalverteilung mittels Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multiple comparison test. n=7-12. *, **, *** p<0.05, <0.01, <0.001 vs. chow VEH. †, ††, ††† p<0.05, <0.01, <0.001 vs. WD VEH.

3.3 Glukosestoffwechsel

Eine Woche vor Versuchsbeginn und nach Ende des Beobachtungszeitraums erfolgte eine retroorbitale Blutentnahme zur Untersuchung der Blutglukose und weiterer Parameter des Glukosestoffwechsels. Wt und Mas ko Mäuse unterschieden sich initial nicht signifikant bezüglich der Blutglukose (s. Tab. 7-1). Die *chow*-Kontrollgruppe der Mas ko Mäuse zeigte bei der finalen Blutentnahme deutlich höhere Werte für die Blutglukose als wt Mäuse. Daneben unterschieden sich die Kontrollgruppen von wt und Mas ko Mäusen in geringeren Plasmaspiegeln von Insulin, C-Peptid und Glucagon sowie erhöhten Werten von Sekretin in Mas ko Mäusen (s. Tab. 7-2).

Durch WD und Virusinjektion konnte die Blutglukose in wt Mäusen tendenziell, in Mas ko Mäusen signifikant gesteigert werden. In beiden Mauslinien hatte TEL keinen Einfluss auf die Blutglukose (Abbildung 3-3 A). Als Anzeichen einer Insulinresistenz durch WD und Virusinjektion ergab sich in wt und Mas ko Mäusen eine signifikante Steigerung des *homeostasis model assessment* (HOMA)-Index. In Mas ko Mäusen konnte diese Entwicklung durch TEL normalisiert werden (Abbildung 3-3 E). Mas ko Mäuse wiesen im Rahmen von WD und Virusinjektion Erhöhungen von Insulin, C-Peptid und Glucagon auf, die in wt Mäusen nicht beobachtet wurden. TEL reduzierte in Mas ko Mäusen die erhöhten Parameter (Abbildung 3-3 B-D).

Zeichen einer Insulinsensitivität ist auch die negative Korrelation von Insulin und Glukose, wie sie in der Mas ko Kontrollgruppe klar zu finden war, in wt Mäusen zumindest tendenziell. Durch Hinzunahme von WD und Virus blieb die Insulinsensitivität in wt Mäusen erhalten, in Mas ko Mäusen ergab sich als Hinweis auf eine Insulinresistenz der Verlust der signifikanten negativen Korrelation. TEL hatte keinen weiteren Einfluss auf die Korrelationen (Abbildung 3-3 F+G).

Durch WD und Virusinjektion stellte sich für GIP in wt und Mas ko Mäusen eine signifikante Steigerung ein, die durch TEL teilweise normalisiert werden konnte (Abbildung 7-6 G). Die Werte von GLP1 wurden weder durch Genetik noch Behandlung der Tiere beeinflusst (Abbildung 7-6 H). Spiegel von Sekretin veränderten sich nicht maßgeblich, in wt Mäusen wurde durch Virusbehandlung und WD eine signifikante, aber geringe Steigerung erzielt (Abbildung 7-6 I). Auf Amylin hatten Genetik und Behandlungsgruppe keinen Einfluss (Abbildung 7-6 J).

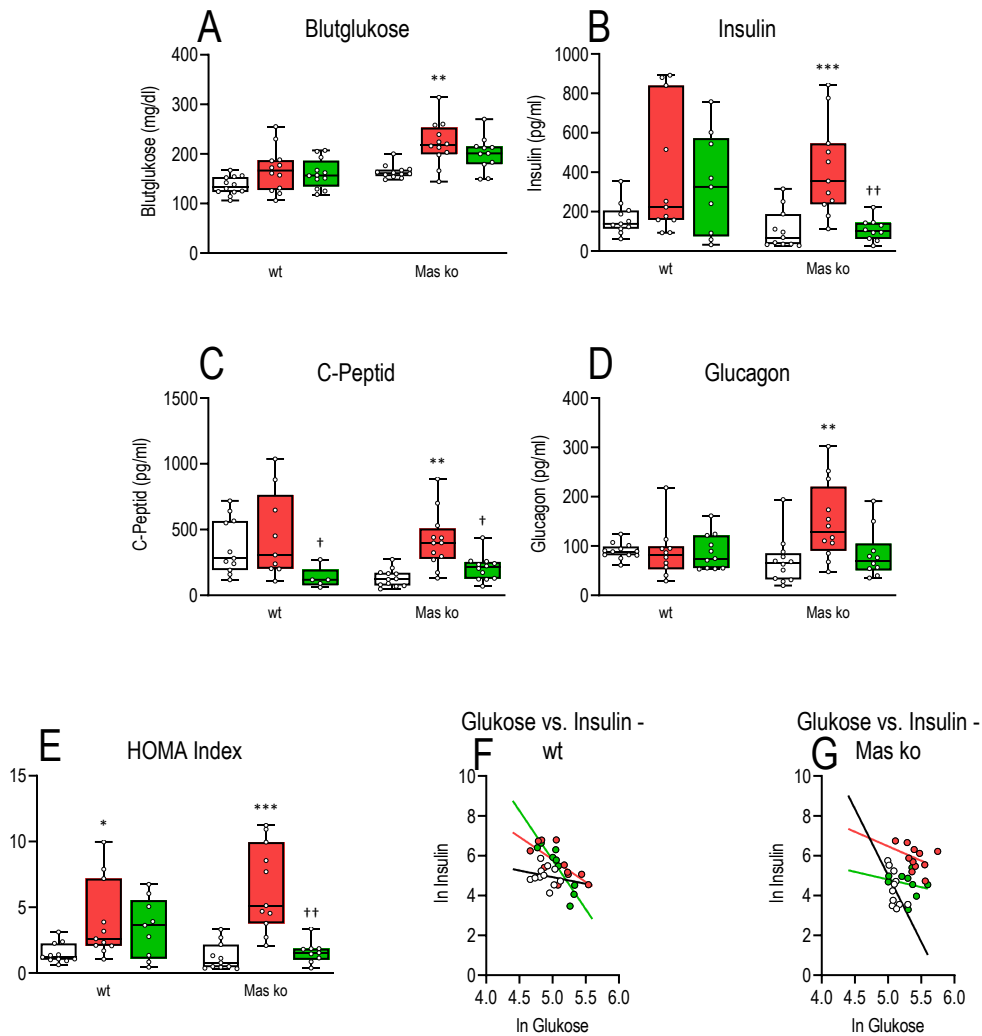


Abbildung 3-3: Glukosestoffwechsel. Bestimmung der Blutglukose sowie von Hormonen des Glukosestoffwechsels nach dem Beobachtungszeitraum. chow VEH (weiß), WD VEH (rot), WD TEL (grün). (A) Blutglukose. (B) Insulin. (C) C-Peptid. (D) Glucagon. (E) HOMA-Index. (F) Korrelation zwischen Glukose und Insulin nach logarithmischer Transformation. Wt chow VEH: $r=-0,1915$; $p=0,5727$; wt WD VEH: $r=-0,7142$; $p=0,0135$; wt WD TEL: $r=-0,8861$; $p=0,0015$. (G) Korrelation zwischen Glukose und Insulin nach logarithmischer Transformation Mas chow VEH: $r=-0,6184$; $p=0,0426$; Mas WD VEH: $r=-0,3937$; $p=0,231$; Mas WD TEL: $r=-0,2365$; $p=0,5402$. Dargestellt sind Median, 25% und 75%-Perzentile als Boxplot. Die Antennen stellen Maximum und Minimum dar. Die Berechnungen erfolgten nach Mauslinie getrennt, bei Normalverteilung mittels 1way-ANOVA mit Tukey's multiple comparison test, bei fehlender Varianzhomogenität mittels Brown-Forsythe-ANOVA mit Dunnett's T3 multiple comparison test und bei fehlender Normalverteilung mittels Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multiple comparison test. $n=7-12$. Korrelationsanalyse erfolgte mittels 2-tailed Pearson-Test. *, **, *** $p<0.05$, <0.01 , <0.001 vs. chow VEH. †, ††, ††† $p<0.05$, <0.01 , <0.001 vs. WD VEH.

3.4 Cytokinprofil

Eine leichtgradige systemische Inflammation ist Bestandteil der Pathophysiologie bei Adipositas und Atherosklerose. Zu deren Beurteilung untersuchten wir im Rahmen der finalen Blutentnahme die Plasmakonzentrationen verschiedener Cytokine. Mas ko und wt Mäuse unterschieden sich nach *chow* Diät und Behandlung mit Vehikel nicht relevant in ihrem Cytokinprofil, einzig bei MIP2 bestand in Mas ko Mäusen eine geringe Erhöhung (s. Tabelle 7-2).

In wt Mäusen führte die Behandlung mit Virusinjektion und WD als Zeichen einer systemischen Inflammation zu einem meist signifikanten Anstieg von MCP-1, TNF- α , IFN- γ , *keratinocyte chemoattractant* (KC), *macrophage inflammatory protein 2* (MIP2), *LPS-induced CXC chemokine* (LIX), IL6, IL10, IL12p70. Damit konnte die Steigerung durch Virusinjektion und WD sowohl bei zahlreichen proinflammatorischen als auch bei dem antiinflammatorischen Cytokin IL10 beobachtet werden. In Mas ko Mäusen konnte eine ähnliche Regulation mit systemischer Inflammation durch Virusinjektion und WD nicht beobachtet werden. Durch TEL wurden in wt Mäusen mit Ausnahme von IL6 die Cytokinspiegel normalisiert, bei IL6 führte TEL zu einem weiteren Anstieg. In Mas ko Mäusen führte TEL selektiv zu einer Erhöhung bei MCP-1, LIX, IL6 und IL10 (Abbildung 3-4 A-I).

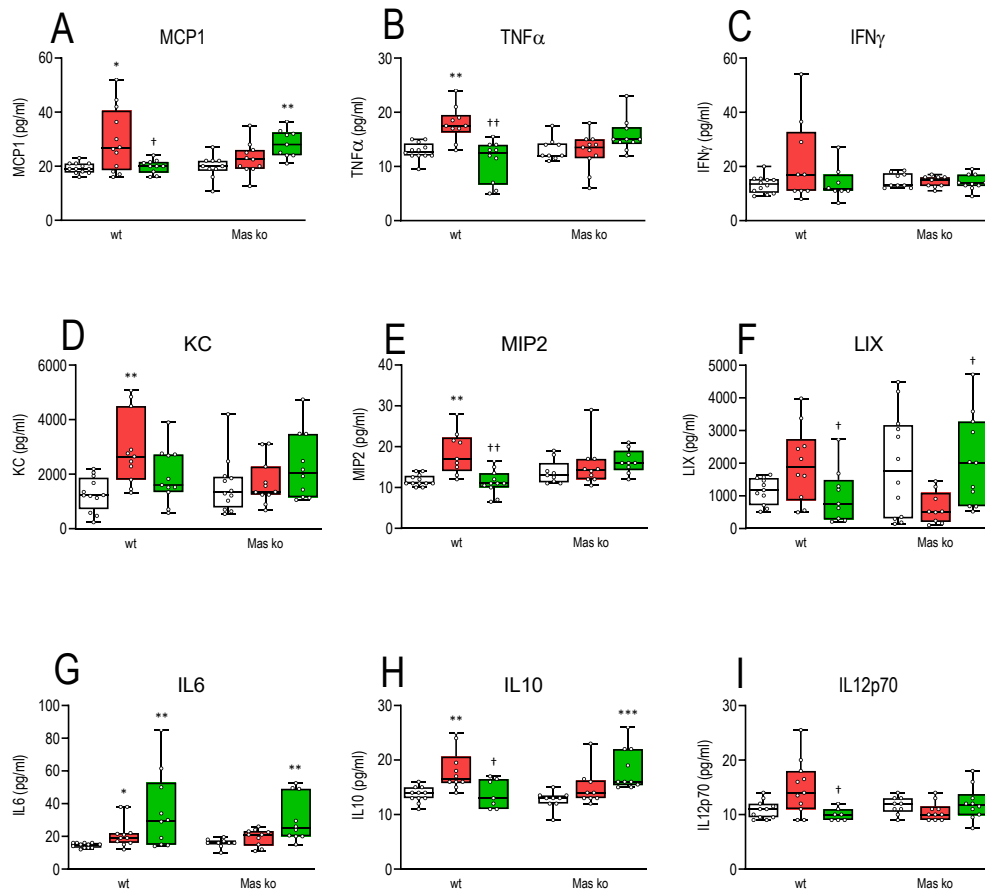


Abbildung 3-4: Cytokinprofil am Ende des Beobachtungszeitraums. chow VEH (weiß), WD VEH (rot), WD TEL (grün). (A) MCP-1. (B) TNF- α . (C) IFN- γ . (D) KC. (E) MIP2. (F) LIX. (G) IL6. (H) IL10. (I) IL12p70. Dargestellt sind Median, 25% und 75%-Perzentile als Boxplot. Die Antennen stellen Maximum und Minimum dar. Die Berechnungen erfolgten nach Mauslinie getrennt, bei Normalverteilung mittels 1way-ANOVA mit Tukey's multiple comparison test, bei fehlender Varianzhomogenität mittels Brown-Forsythe-ANOVA mit Dunnett's T3 multiple comparison test und bei fehlender Normalverteilung mittels Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multiple comparison test. n=7-12. *, **, *** p<0.05, <0.01, <0.001 vs. chow VEH. †, ††, ††† p<0.05, <0.01, <0.001 vs. WD VEH.

3.5 Lipidprofil und histologische Analyse atherosklerotischer Plaques

Eine Woche vor Versuchsbeginn und nach Ende des Beobachtungszeitraums erfolgte eine retroorbitale Blutentnahme zur Untersuchung des Lipidprofils. Nach Tötung und Organentnahme wurden Kryostatschnitte der aufsteigenden Aorta angefärbt, um sie auf atherosklerotische Läsionen zu untersuchen. Vor Beginn der Studie waren die Triglyceride in Mas ko Mäusen leicht erniedrigt (s. Tabelle 7-1).

Basale Unterschiede zwischen den Mauslinien ließen sich im Vergleich der Kontrollgruppen nicht feststellen. Die Behandlung mit Virusinjektion und WD führte in wt und Mas ko Mäusen zu einer deutlichen Steigerung von Cholesterin und Triglyceriden. Die Steigerung von Cholesterin konnte in wt Mäusen durch TEL reduziert werden. Eine Behandlung mit TEL hatte in Mas ko Mäusen keinen Einfluss auf das Lipidprofil (Abbildung 3-5 B+C).

Die histologische Untersuchung der Aorta ergab keine relevanten Unterschiede zwischen wt und Mas ko Mäusen. Beide Kontrollgruppen entwickelten keine Plaques. Durch Behandlung mit Virusinjektion und WD entwickelten wt und Mas ko Mäuse in ähnlichem Ausmaß atherosklerotische Läsionen. Eine Behandlung mit TEL führte sowohl in wt als auch in Mas ko Mäusen zum signifikanten Rückgang dieser Läsionen (Abbildung 3-5 A, D+E). Es ergab sich durchgehend eine positive Korrelation zwischen Triglyceriden, Cholesterin und Plaqueinhalt (Abbildung 3-5 F-I).

Bezüglich Aortendurchmesser und -lumen wiesen Mas ko Mäuse im Vergleich der Kontrollgruppen etwas geringe Werte, bezüglich der Aortenmedia leicht erhöhte Werte auf (s. Tabelle 7-2). In wt Mäusen führte die Behandlung mit WD und Virusinjektion zu einer geringen Steigerung der Mediadicke, in Mas ko Mäusen zu einer geringen Steigerung von Aortendurchmesser und -lumen. Durch TEL konnte in Mas ko Mäusen die Mediadicke reduziert werden (Abbildung 7-7 A-C).

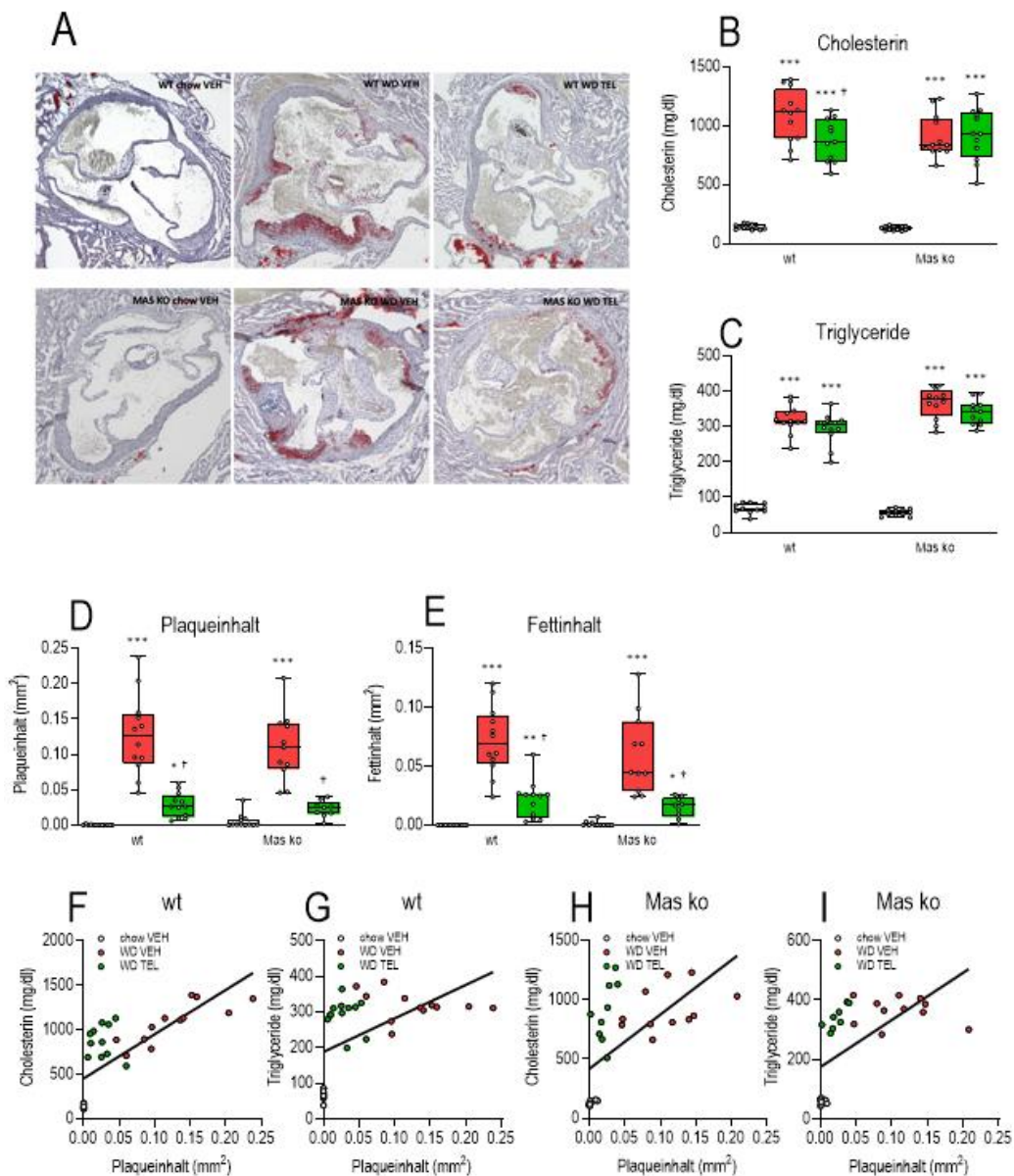


Abbildung 3-5: Lipidprofil und histologische Untersuchung. Bestimmung von Cholesterin und Triglyceriden nach dem Beobachtungszeitraum. Histologische Untersuchung der aufsteigenden Aorta. chow VEH (weiß), WD VEH (rot), WD TEL (grün). (A) Oil Red O Färbung atherosklerotischer Läsionen. (B) Cholesterin final. (C) Triglyceride final. (D) Plaqueinhalt. (E) Fettinhalt. (F) Korrelation zwischen Plaqueinhalt und Cholesterin: wt: $r=0,7534$; $p<0,0001$; (G) Mas ko: $r=0,6232$; $p=0,0002$. (H) Korrelation zwischen Plaqueinhalt und Triglyceriden: wt: $r=0,5384$; $p=0,0012$; (I) Mas ko: $r=0,6189$; $p=0,0003$. Dargestellt sind Median, 25% und 75%-Perzentile als Boxplot. Die Antennen stellen Maximum und Minimum dar. Die Berechnungen erfolgten nach Mauslinie getrennt, bei Normalverteilung mittels 1way-ANOVA mit Tukey's multiple comparison test, bei fehlender Varianzhomogenität mittels Brown-Forsythe-ANOVA mit Dunnett's T3 multiple comparison test und bei fehlender Normalverteilung mittels Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multiple comparison test. $n=7-12$. Korrelationsanalyse erfolgte mittels 2-tailed Pearson-Test. *, **, *** $p<0,05$, $<0,01$, $<0,001$ vs. chow VEH. †, ††, ††† $p<0,05$, $<0,01$, $<0,001$ vs. WD VEH.

3.6 Endotheliale Funktion der thorakalen Aorta

Zur funktionellen Beurteilung des Endothels wurden Präparate der thorakalen Aorta mit Hilfe des *atomic force microscope* bezüglich der kortikalen Steifigkeit der Endothelzellen sowie Steifigkeit und Höhe der Glykokalix untersucht. Als Näherung für NO als Parameter der endothelialen Funktion bestimmten wir im Rahmen der finalen kardialen Blutentnahme die Plasmaspiegel von Nitrit.

Die *chow*-Kontrollgruppe der Mas ko Mäuse zeigte eine signifikant höhere kortikale Steifigkeit als wt Mäuse (wt $1,318 \pm 0,039$ pN/nm; Mas ko $1,384 \pm 0,034$ pN/nm; $p=0,0004$). Durch PCSK9^{DY}-AAV und WD erhöhte sich die kortikale Steifigkeit in wt und Mas ko Mäusen signifikant. TEL reduzierte die kortikale Steifigkeit in wt Mäusen (wt WD VEH $1,413 \pm 0,09395$ pN/nm; wt WD TEL $1,377 \pm 0,09044$ pN/nm). In Mas ko Mäusen konnte durch TEL keine Reduktion erreicht werden (Mas WD VEH $1,401 \pm 0,1116$ pN/nm; Mas WD TEL $1,418 \pm 0,1042$ pN/nm; Abbildung 3-6 A). War die statistische Analyse nicht wie zuvor zellbasiert, sondern auf die Versuchstiere bezogen, ergab sich hier ein ähnliches Bild der kortikalen Steifigkeit. Allerdings war die Steigerung durch WD und Virusinjektion in Mas ko Mäusen nicht mehr signifikant (Abbildung 3-6 B). Weder Genetik noch Behandlung hatten Einfluss auf Steifigkeit oder Höhe der Glykokalix (Abbildung 3-6 D+E).

Passend zu der erhöhten kortikalen Steifigkeit der Kontrollgruppe der Mas ko Mäuse ließen sich hier auch geringere, nahezu halbierte Werte für Nitrit feststellen (wt $412,5 \pm 127,9$ nM; Mas ko $238,4 \pm 52,89$ nM; $p=0,0007$). Eine Behandlung mit Virusinjektion und WD führte in wt Mäusen zu einer tendenziellen Senkung ($p=0,0971$) der Werte, in Mas ko Mäusen hatte die Behandlung mit Virusinjektion und WD keinen Einfluss auf den Plasmaspiegel von Nitrit. TEL führte in wt und Mas ko Mäusen tendenziell zu einer Steigerung von Nitrit (Abbildung 3-6 C). In der wt Kontrollgruppe korrelierten kortikale Steifigkeit und Nitrit negativ, in Mas ko Mäusen positiv als Hinweis auf eine endotheliale Dysfunktion. In wt Mäusen korrelierten kortikale Steifigkeit und Cholesterin, Plaqueinhalt sowie Fettinhalt positiv. In Mas ko Mäusen ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen kortikaler Steifigkeit und Cholesterin, kortikale Steifigkeit und Plaqueinhalt korrelierten negativ (Abbildung 3-6 F-M).

Analog zur Vorstudie erfolgte hier die Anpassung der ermittelten Werte der kortikalen Steifigkeit anhand eines Faktors, der durch den Vergleich der unabhängigen manuellen Auswertung der Kontrollgruppen durch die beiden Untersucher (Achner/Klersy) ermittelt wurde. Im Unterschied zur Vorstudie bestand eine homogenere Auswertung und es ergab sich ein Faktor von 1,02. Mit diesem Faktor wurden die Werte für die kortikale Steifigkeit der Mas ko Mäuse angepasst.

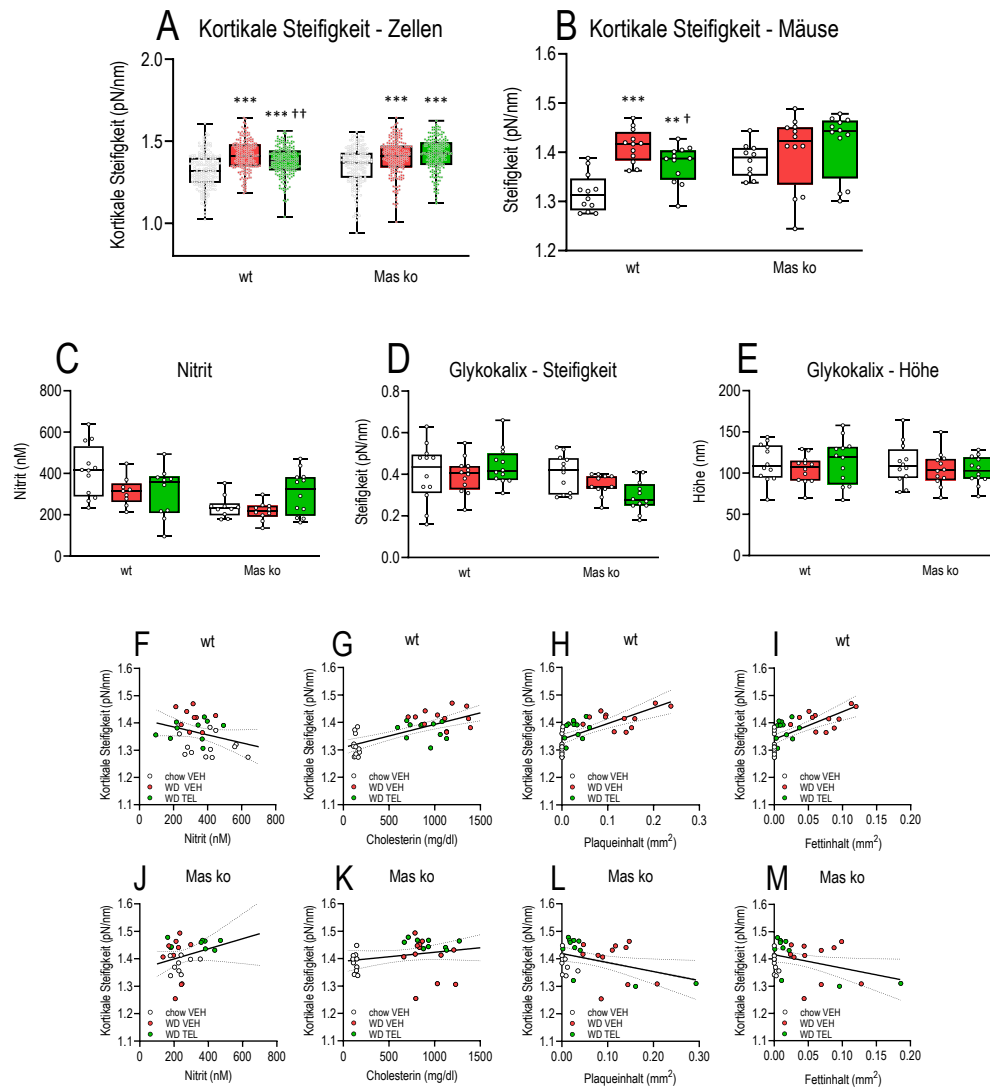


Abbildung 3-6: Endotheliale Funktion der thorakalen Aorta. Bestimmung von Nitrit nach dem Beobachtungszeitraum. Messung der kortikalen Steifigkeit sowie von Steifigkeit und Höhe der Glykokalix der thorakalen Aorta. (A) Kortikale Steifigkeit. Die Punkte stellen Triplets der Mittelwerte von acht Einzelmessungen einer Endothelzelle dar, n=191. (B) Kortikale Steifigkeit bezogen auf die Versuchstiere, n=9-12. (C) Nitrit. (D) Glykokalix Steifigkeit. (E) Glykokalix Höhe. (F+J) Korrelation zwischen kortikaler Steifigkeit und Nitrit. Wt: $r=-0,306$; $p=0,0473$; Mas ko: $r=0,277$; $p=0,0766$. (G+K) Korrelation zwischen kortikaler Steifigkeit und Cholesterin: Wt: $r=0,6892$; $p<0,0001$; Mas ko: $r=0,2347$; $p=0,1019$. (H+L) Korrelation zwischen kortikaler Steifigkeit und Plaqueinhalt: Wt: $r=0,6771$; $p<0,0001$; Mas ko: $r=-0,3842$; $p=0,015$. (I+M) Korrelation zwischen kortikaler Steifigkeit und Fettinhalt: Wt: $r=0,6668$; $p<0,0001$; Mas ko: $r=-0,3616$; $p=0,021$. Dargestellt sind Median, 25% und 75%-Perzentile als Boxplot. Die Antennen stellen Maximum und Minimum dar. Die Berechnungen erfolgten nach Mauslinie getrennt, bei Normalverteilung mittels 1way-ANOVA mit Tukey's multiple comparison test, bei fehlender Varianzhomogenität mittels Brown-Forsythe-ANOVA mit Dunnett's T3 multiple comparison test und bei fehlender Normalverteilung mittels Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multiple comparison test. n=7-12. Korrelationsanalysen erfolgten mittels 1-tailed Pearson-Test. *, **, *** $p<0,05$, $<0,01$, $<0,001$ vs. chow VEH. †, ††, ††† $p<0,05$, $<0,01$, $<0,001$ vs. WD VEH.

3.7 RNA-Sequenzierung der abdominalen Aorta

Nach Tötung, Organentnahme und entsprechender Präparation wurde an der abdominalen Aorta eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. Dabei wurde untersucht, inwiefern *knock out* oder Behandlungsgruppe verschiedene Gene oder Gengruppen in ihrer Expression regulieren. Anhand der *principal component analysis* (PCA) und der *Volcano plots* wird deutlich, dass sich wt und Mas ko Mäuse hinsichtlich ihrer Genexpression deutlich unterschieden, aber auch Überschneidungen aufweisen (Abbildung 7-8). Darüber hinaus führten Virusinjektion und WD bzw. TEL zu Veränderungen in der Genexpression (Abbildung 3-7 A). Dies kann auch an den *Volcano plots* abgelesen werden (Abbildung 3-7 B). Durch WD und Virusinjektion wurden mehr Gene signifikant in ihrer Expression gesteigert, während die Behandlung mit TEL tendenziell häufiger zu einer signifikanten Reduktion der Expression von Genen führte. Dies konnte sowohl in wt als auch in Mas ko Mäusen gefunden werden.

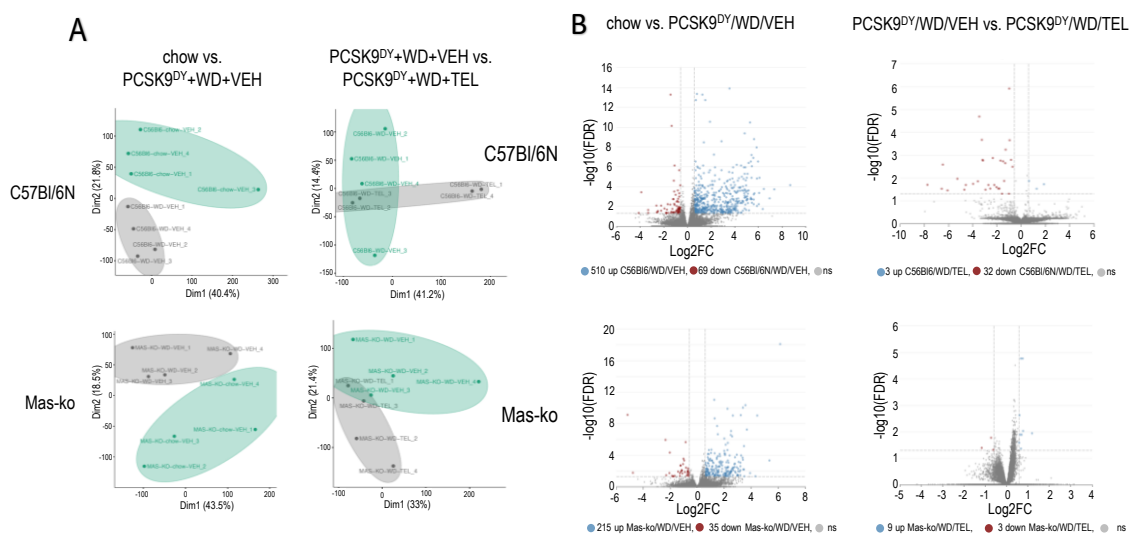


Abbildung 3-7: RNA-Sequenzierung der abdominalen Aorta. (A) *Principal component analysis* (PCA) durch FactoMineR ermittelt zwei Gengruppen (=Dimensionen), die die größten Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Gruppen beinhalten. Es erfolgt der Vergleich chow VEH vs. WD VEH sowie WD VEH vs. WD TEL getrennt für die Mauslinien. (B) *Volcano plot* mit den Signifikanzgrenzen $FDR \leq 0,05$ sowie $-0,585 < \log_2FC > 0,585$. Es erfolgt der Vergleich chow VEH vs. WD VEH sowie WD VEH vs. WD TEL getrennt für die Mauslinien.

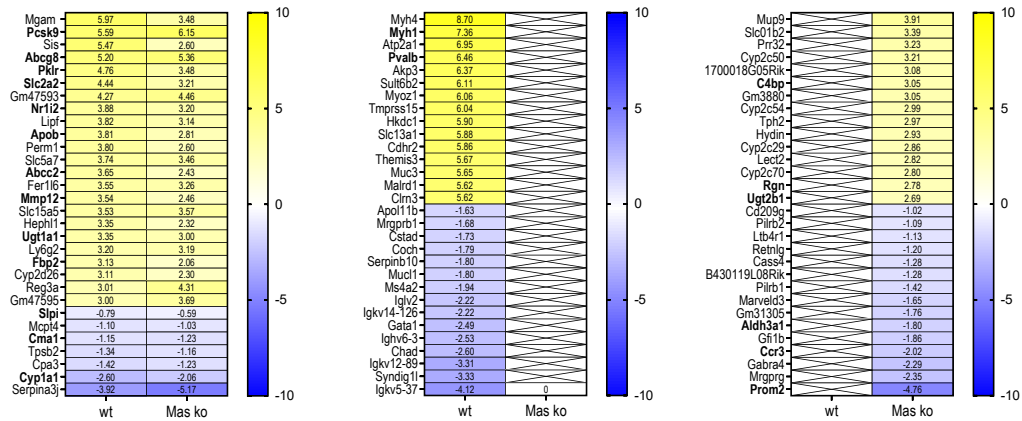
In wt Mäusen wurden durch die Behandlung mit Virusinjektion und WD insgesamt 579 Gene signifikant in ihrer Regulation verändert, in Mas ko Mäusen wurden als Reaktion auf die Behandlung mit Virusinjektion und WD insgesamt nur 250 Gene in ihrer Regulation verändert. Ausschließlich in wt Mäusen verändert exprimiert wurden 452 Gene, davon waren 192 mit Atherosklerose assoziiert. Ausschließlich in Mas ko Mäusen verändert waren 123 Gene, davon waren 95 mit Atherosklerose

assoziiert. Die Gene mit der deutlichsten Expressionsveränderung sind getrennt für Wildtyp, Mas ko und für in beiden Mauslinien gleichermaßen veränderte Gene abgebildet (Abbildung 3-8 A). Gene mit Verbindung zum RAS waren ebenfalls unterschiedlich exprimiert: In wt Mäusen wurden Ren1 sowie ACE2 gesteigert exprimiert. In Mas ko Mäusen wurden weniger Angiotensinogen (Agt) und *MAS Related GPR Family Member G* (Mrgprg) in der abdominalen Aorta exprimiert.

Durch TEL wurde in wt Mäusen im Vergleich zur Gruppe WD VEH die Expression von 35 Genen verändert, 16 darunter waren mit Atherosklerose assoziiert. Von den 35 Genen wurden 15 zuvor durch WD und Virusinjektion in ähnlichem Ausmaß in ihrer Expression erhöht, wie sie nun durch TEL reduziert wurden, darunter waren neun mit Atherosklerose assoziiert (u. a. Myh1, Pvalb, Ckm, Tnnt3, Mmp12, Acta1, Npr3, Fam20c). In Mas ko Mäusen wurden zwölf Gene sowohl im Vergleich chow VEH vs. WD VEH als auch im Vergleich WD VEH vs. WD TEL reguliert, darunter wurden acht zwischen den Vergleichen gegenteilig reguliert und darunter waren sechs mit Atherosklerose assoziiert, nämlich Tst, Rgs2, Slc43a1, Cish, Serpine1 und Pon1 (Abbildung 3-8 B).

In der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG)-*pathway* Analyse waren als Reaktion auf WD und Virusinjektion in wt und Mas ko Mäusen *pathways* für Insulinresistenz, Stärke- und Saccharosestoffwechsel, AMP-Kinase (AMPK) und PPAR γ gesteigert. Interessanterweise war das RAS in der Mas ko Kontrollgruppe vermindert exprimiert (Abbildung 7-9).

A Genexpression nach PCSK9^{DY}-AAV und Western Diät



B Genexpression nach PCSK9^{DY}-AAV, Western Diät und Telmisartan

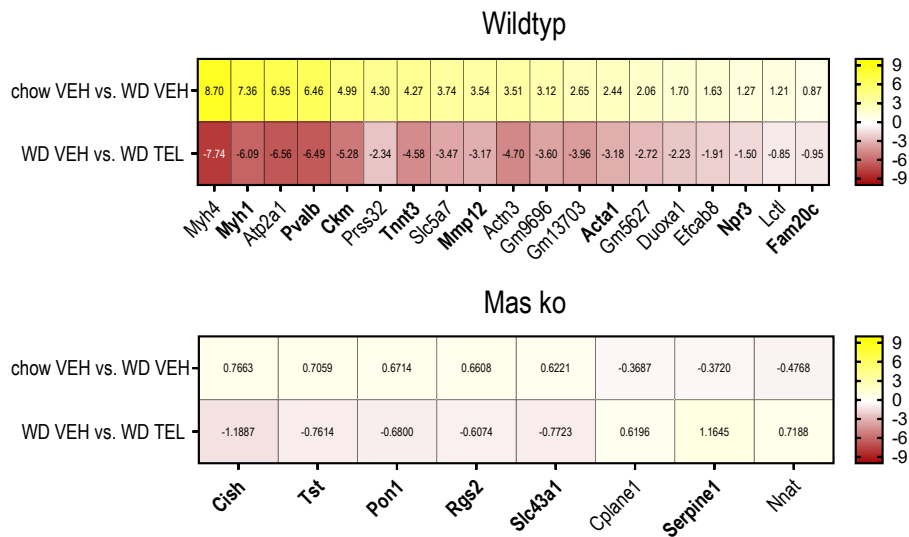


Abbildung 3-8: RNA-Sequenzierung der abdominalen Aorta. (A) Die deutlichsten Expressionsänderungen im Vergleich chow VEH vs. WD VEH gemeinsam bei wt und Mas ko, ausschließlich im wt und ausschließlich im Mas ko. In fett geschrieben sind Gene mit Assoziation zu Atherosklerose laut CTD Gene-Disease Associations ([Gene Set - Atherosclerosis \(maayanlab.cloud\)](https://maayanlab.cloud/GeneSet/Atherosclerosis) zuletzt abgerufen am 28.08.2024). (B) Dargestellt sind Gene, die im Vergleich chow VEH vs. WD VEH in ihrer Expression reguliert und im Vergleich WD VEH vs. WD TEL gegenteilig zum vorherigen Vergleich reguliert wurden. In fett geschrieben sind Gene mit Assoziation zu Atherosklerose laut CTD Gene-Disease Associations.

4 Diskussion

Die Verbreitung von Übergewicht und Adipositas nimmt weltweit in epidemischem Ausmaß zu (Y. Wang et al., 2020). Trotz intensiver Bemühungen konnte bislang kaum ein effektiver pharmakologischer Therapieansatz mit tolerablem Nebenwirkungsprofil etabliert werden. Insbesondere viszerale Adipositas ist assoziiert mit metabolischen Komplikationen und erhöhtem Risiko für Atherosklerose und kardiovaskuläre Folgeerkrankungen (Chait & den Hartigh, 2020). Das Renin-Angiotensin-System hat Einfluss auf Entstehung und Progression von Adipositas und Atherosklerose. Dabei werden der ACE/AngII/AT₁R-Achse negative und der ACE2/Ang1-7/Mas-Achse protektive Eigenschaften zugeschrieben (Tesanovic et al., 2010).

AT₁R-Blocker wie Telmisartan konnten in vorausgehenden Studien unserer und anderer Arbeitsgruppen die Entwicklung einer Diät-induzierten Adipositas verhindern (He et al., 2010; Muller-Fielitz et al., 2014) und zeigten protektive Einflüsse auf die endotheliale Funktion sowie atherosklerotische Läsionen (Pellegrin et al., 2017). Der gewichtsreduzierende Effekt ist Leptin- sowie ZNS-abhängig und kann zumindest teilweise auf die ACE2/Ang1-7/Mas-Achse zurückgeführt werden, da bei der chronischen Therapie mit TEL die Konzentrationen von Ang1-7 steigen und protektive Effekte durch den Mas-Antagonisten A779 reduziert werden konnten (Schuchard et al., 2015). Zuletzt wurden allerdings widersprüchliche Ergebnisse veröffentlicht.

In dieser Arbeit sollte daher die Bedeutung der ACE2/Ang1-7/Mas-Achse bei der Entwicklung von Adipositas und Atherosklerose anhand eines Mausmodells mit globaler Defizienz des Mas-Rezeptors untersucht werden. Dazu wurde zunächst im Rahmen einer Vorstudie erstmals die endotheliale Funktion eines PCSK9^{DY}-AAV Tiermodells durch die *atomic force microscopy* untersucht und anschließend der Einfluss der chronischen Telmisartan-Behandlung auf Wildtyp- und Mas-defiziente Mäuse verglichen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind einige Detailspekte der Diskussion im Anhang dieser Arbeit zu finden.

4.1 Einmalige Injektion des PCSK9^{DY}-AAV ist eine sichere und elegante Methode zur Induktion von endothelialer Dysfunktion und atherosklerotischen Läsionen

Wir konnten zeigen, dass durch Injektion des PCSK9^{DY}-AAV in Kombination mit Western Diät sicher Atherosklerose induziert wird. Mäuse entwickelten eine deutliche Hypercholesterinämie, Hypertriglyceridämie und atherosklerotische Plaques in Abhängigkeit der Viruslast (Achner et al., 2022). Unsere Studie bestätigt damit die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die sich die degradierende Wirkung der *gain of function* Mutation von PCSK9 auf den LDL-Rezeptor zur Induktion von Hypercholesterinämie und Atherosklerose zu Nutze machten (Bjorklund et al., 2014; Roche-Molina et al., 2015).

Die endotheliale Dysfunktion ist das erste klinische Korrelat einer Atherosklerose und geht den morphologischen Veränderungen der Gefäßwand voraus. Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes und Rauchen sind assoziiert mit einer endothelialen Dysfunktion, sie ist Prädiktor für die kardiovaskuläre Mortalität (Daiber et al., 2017). Dysfunktionales Endothel zeichnet sich durch die gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen, Cytokinen und humanen Leukozyten-Antigen (HLA)-Molekülen sowie einen prothrombotischen Phänotyp aus. Durch eine reduzierte Bioverfügbarkeit von NO kommt es zu Veränderungen im Gefäßtonus hin zum Verlust der vasodilatativen Funktion und gesteigerter Vasokonstriktion. Der NO-Mangel ist auf geringe eNOS-Aktivität und oxidative Inaktivierung von NO durch ROS zurückzuführen (Alexander et al., 2021). Traditionell wird die endotheliale Funktion über die endothelabhängige Vasodilatation bestimmt. Dies gelingt sowohl in den Koronargefäßen mittels angiographischer Untersuchung und Dilatation der Gefäße als Reaktion auf die Stimulation mit Acetylcholin oder Nitroglycerin als auch peripher mittels *flow-mediated dilation* (FMD) der Brachialarterie (Leite et al., 2020). Auch im Tierversuch werden die vasodilatativen und hypotensiven Eigenschaften des Endothels zur Bestimmung seiner Funktion verwendet, sowohl ex vivo als auch in vivo.

Nach unserem Wissen wurde durch unsere Arbeitsgruppe in (Achner et al., 2022) erstmals die endotheliale Funktion der Aorta nach Injektion des PCSK9^{DY}-AAV untersucht. Dabei bestimmten wir anders als die oben genannten Studien die nanomechanischen Eigenschaften der Endothelzellen, um Aussagen über deren Funktion zu treffen. Mittels *atomic force microscopy* wurde in einem physiologischen Testregime an in situ Endothelzellen von ex vivo Aortenpräparaten die kortikale Steifigkeit als wichtiger Indikator der endothelialen Funktion gemessen (Jeggle et al., 2016). Das *nanoindentation* Verfahren basiert auf der Beobachtung, dass die endotheliale Funktion abhängig ist von der mechanischen Steifigkeit des Cortex (Jeggle et al., 2013). Endothelzellen übersetzen mechanische Einflüsse des Blutflusses in biochemische Antworten wie die Freisetzung von NO. Weiche Endothelzellen produzieren mehr NO, da sie leichter deformierbar und damit sensitiver für die Wahrnehmung von Veränderungen des Blutflusses sind. Eine endotheliale Dysfunktion geht mit einer erhöhten kortikalen Steifigkeit einher (Targosz-Korecka et al., 2017).

Wir konnten zeigen, dass nach einmaliger Injektion des PCSK9^{DY}-AAV die kortikale Steifigkeit der thorakalen Aorta als Ausdruck einer endothelialen Dysfunktion erhöht ist. Damit etablierten wir ein elegantes Tiermodell für die Erforschung der Atherosklerose in unserer Arbeitsgruppe, das ohne genetische Veränderung Hypercholesterinämie, endotheliale Dysfunktion und atherosklerotische Plaques aufweist und damit andere genetische Veränderungen wie im Folgenden die Mas-Defizienz ohne größeren Zuchtaufwand ermöglicht (Achner et al., 2022).

Die Ergebnisse der Vorstudie und deren Einordnung finden sich im Anhang dieser Arbeit (s. Kap. 7.1 sowie 7.3.1).

4.2 Telmisartan verhindert in Wildtyp und Mas *knock-out* Mäusen gleichermaßen die Entwicklung einer Diät-induzierten Adipositas

4.2.1 Diät-induzierte Adipositas in wt und Mas ko Mäusen

Wt und Mas ko Mäuse entwickelten im Beobachtungszeitraum durch Injektion des PCSK9^{DY}-AAV und Fütterung mit Western Diät in gleichem Ausmaß Adipositas. Dies war verbunden mit einer Steigerung der Fettmasse und von Leptin. Aufgrund vorausgehender Studien, die einen positiven Einfluss von Ang1-7 und dessen Bindung an den Mas-Rezeptor auf das Körpergewicht zeigten, (Santos et al., 2010; Schuchard et al., 2015) war unsere Hypothese, dass Mas ko Mäuse schwerer als wt Mäuse wären und eine Diät-induzierte Adipositas stärker ausgeprägt sein würde. Die Gewichtszunahme der Mas ko Mäuse war zwar leicht erhöht, allerdings waren Mas ko Mäuse zu Beginn des Versuchs tendenziell etwas leichter. Im finalen Gewicht unterschieden sich wt und Mas ko Mäuse nicht und wir kommen zu der Aussage, dass die globale Mas-Defizienz keine Auswirkungen auf die Gewichtsentwicklung hatte.

Damit bestätigt die vorliegende Arbeit die Ergebnisse anderer Gruppen, die ebenfalls keine Unterschiede in Gewicht oder Fettmasse zwischen wt und Mas ko Mäusen zeigen konnten (Ni et al., 2020; Pinheiro et al., 2009; Wang et al., 2017). Nur wenige Studien untersuchten anders als in der vorliegenden Arbeit das Gewicht mit dem genetischen FVB/N Hintergrund. Dabei konnte einerseits gezeigt werden, dass Mas ko Mäuse leichter sind als der Wildtyp (Dapper et al., 2019; Guimaraes et al., 2012), andererseits konnte bei unverändertem Gewicht eine deutliche Steigerung der Fettmasse gesehen werden (Santos et al., 2008). Der Vergleich von Studien mit unterschiedlichen genetischen Hintergründen wie hier C57BL/6N und FVB/N erscheint komplex. Insbesondere die Gewichtsentwicklung im FVB/N Hintergrund sollte kritisch interpretiert werden, wird doch eine Resistenz gegenüber Diät-induzierter Adipositas diskutiert (Devlin et al., 2018). Eine ausführliche Diskussion der Relevanz genetischer Unterschiede bei Studien zur Diät-induzierten Adipositas und assoziierten Komorbiditäten findet sich in Kapitel 7.3.2.

Passend zur Entwicklung einer Diät-induzierten Adipositas waren sowohl in wt als auch in Mas ko Mäusen nach Behandlung mit Virusinjektion und WD gleichermaßen Leptin (Enriori et al., 2007) sowie Resistin (Lazar, 2007) im Plasma erhöht und Ghrelin reduziert (Cui et al., 2017). Dass sich die Leptinspiegel zwischen wt und Mas ko Mäusen nicht unterschieden erscheint plausibel, wird Leptin doch proportional zur Fettmasse sezerniert und wiesen die beiden Mauslinien in unserer Studie vergleichbare Fettmassen auf (Enriori et al., 2007). Dennoch legen Studien der Santos-Gruppe nahe, dass Leptin einer Regulation durch die ACE2/Ang1-7/Mas-Achse unterliegt: Mas ko Mäuse wiesen erhöhte Leptinspiegel auf, was mit einer vergrößerten Fettmasse assoziiert war (Santos et al., 2008), mit genetischer Überexpression oder Gabe von Ang1-7 wurden verringerte Leptinspiegel gefunden (Santos et al., 2010; Santos et al., 2012). Im Gegensatz zu

unseren Studien wurden in der Santos-Gruppe allerdings häufig Mäuse auf dem FVB/N-Hintergrund verwendet, was die Interpretation dieser Studien erschwert.

Die Entwicklung einer Diät-induzierten Adipositas ist im Rahmen des metabolischen Syndroms mit einer Insulinresistenz verbunden. Hinweise auf die Entwicklung einer Insulinresistenz wären einerseits die Steigerung des HOMA-Index, andererseits das Fehlen einer negativen Korrelation zwischen Insulin und Glukose. Zwar führten Virusinjektion und Western Diät in wt Mäusen zu einer Erhöhung des HOMA-Indexes, wie bereits zuvor gezeigt werden konnte (Nickel et al., 2022), allerdings blieb eine negative Korrelation zwischen Insulin und Glukose bestehen. Signifikante Veränderungen für Insulin, C-Peptid oder Glucagon blieben in wt Mäusen entgegen den Erwartungen aus. Insgesamt zeichnen die erhobenen Werte das Bild eines durch die Behandlung mit Western Diät und Virusinjektion leicht gestörten Glukosestoffwechsels der wt Mäuse.

Wir konnten in unserer Arbeit zeigen, dass Mas ko Mäuse bereits bei Standarddiät eine höhere Blutglukose aufweisen. Der Einfluss von Virusinjektion und Western Diät mit Steigerungen von Insulin, HOMA-Index, C-Peptid und Glucagon war bei Mas ko Mäusen deutlicher ausgeprägt als bei wt Mäusen und es konnte anhand des Verlusts der negativen Korrelation zwischen Insulin und Glukose klar die Entwicklung einer Insulinresistenz gezeigt werden. Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die eine schlechtere Glukosehomöostase in Mas ko Mäusen aufführen: Mas ko Mäuse weisen eine erhöhte Nüchternglukose (Monteiro et al., 2022; Silva et al., 2013), Glukoseintoleranz, reduzierte Insulinsensitivität, weniger Insulin-stimulierte Glukoseaufnahme und weniger GLUT4 im Fettgewebe auf (Mario et al., 2012). Dies ist verbunden mit vermehrten Triglyceriden im Skelettmuskel, einer geringeren Adiponektin-Konzentration (Santos et al., 2008) und strukturellen Veränderungen im Pankreas mit mehr Glukagon-produzierenden α -Zellen und weniger Insulin-produzierenden β -Zellen (Felix Braga et al., 2017).

4.2.2 Einfluss von Telmisartan

Telmisartan verhinderte in beiden Mauslinien die Entwicklung der Diät-induzierten Adipositas vollständig. Damit bestätigten wir zunächst zahlreiche Studien unserer (Miesel et al., 2012; Muller-Fielitz et al., 2015; Muller-Fielitz et al., 2011) und anderer Arbeitsgruppen (Araki et al., 2006; Rong et al., 2010), die in wt Mäusen oder Ratten ebenfalls aufzeigen konnten, dass die chronische Behandlung mit Telmisartan die Entwicklung einer Diät-induzierten Adipositas verhindert. Gleichzeitig konnten wir unsere Hypothese nicht bestätigen, dass die Gewichtsreduktion durch Telmisartan in Mas ko Mäusen ausbleibt.

Unsere Studie steht auch im Kontrast zu der Studie von Dapper et al., die mit dem FVB/N Hintergrund zeigten, dass TEL in wt und Mas ko Mäusen die Entwicklung einer Diät-induzierten

Adipositas nicht vollständig verhinderte und der TEL-Effekt in Mas ko Mäusen stärker ausgeprägt war als in wt Mäusen (Dapper et al., 2019). In der Zusammenschau der Studien ergeben sich nun zwei Beobachtungen: 1) C57BL/6N und FVB/N Mäuse mit und ohne Mas-Defizienz zeigen bei gleicher Dosierung eine unterschiedliche Empfänglichkeit für die gewichtsreduzierenden Effekte von Telmisartan, 2) unabhängig vom genetischen Hintergrund bleibt in Mas ko Mäusen der TEL-Effekt erhalten, obwohl unsere Arbeitsgruppe mit dem Mas-Antagonisten A779 den TEL-Effekt reduzieren konnte (Schuchard et al., 2015).

Wie vorausgegangene Studien unserer und anderer Arbeitsgruppen konnten wir zeigen, dass die Normalisierung des Körpergewichts durch TEL in wt und Mas ko Mäusen gleichermaßen mit einer Reduktion von Leptin verbunden ist (Nickel et al., 2022; Rawish et al., 2020; Rong et al., 2010). TEL wiederum steigerte in beiden Mauslinien PYY, was zu dem gewichtsreduzierenden Effekt passend erscheint (Price & Bloom, 2014). Unpassend erscheint, dass durch TEL in wt und Mas ko Mäusen die bereits erhöhten Werte von Resistin weiter leicht gesteigert werden. Ähnliche Ergebnisse erbrachten in wt Mäusen (Dapper et al., 2019; Rawish et al., 2020; Schuster et al., 2018) und Mas ko Mäusen (Dapper et al., 2019; Silva et al., 2013) bereits Studien unserer und anderer Arbeitsgruppen. Unpassend erscheinen sie deshalb, weil TEL wie einleitend beschrieben mit positiven Einflüssen auf den Stoffwechsel verbunden wird, eine Steigerung von Resistin aber Ausdruck einer pathologischen Stoffwechsellage ist (Lazar, 2007).

Bezüglich des Glukosestoffwechsels in wt Mäusen konnte mit TEL nicht die erwartete Verbesserung abgelesen werden: Telmisartan senkte weder die Glukose noch den HOMA-Index oder weitere gemessene Hormone. Bezüglich HOMA-Index und Insulin induzierte die TEL-Behandlung sogar eine weitere Erhöhung. Dies erscheint unpassend, verzögern AT₁R-Blocker doch den Beginn eines Diabetes mellitus Typ 2 (Mildner et al., 2017), verbessern die Insulinsensitivität (Muller-Fielitz et al., 2014), verstärken die Glukoseaufnahme in Adipozyten (Winkler et al., 2016) und verbessern die Glukoseverwertung (Schuchard et al., 2015).

Mas ko Mäuse waren empfänglicher sowohl für die negativen Einflüsse im Glukosestoffwechsel durch Western Diät als auch für die protektiven Eigenschaften von Telmisartan, konnten doch die gesteigerten Werte durch den ARB normalisiert und eine Insulinsensitivität wiederhergestellt werden. Unsere Beobachtungen widersprechen also eher der Annahme, dass Telmisartan seine protektiven Eigenschaften auf die Entwicklung einer Insulinresistenz und eines Diabetes mellitus Typ 2 über die ACE2/Ang1-7/Mas-Achse vermittelt.

4.2.3 Fazit zur Gewichtsentwicklung

Die Beobachtungen, dass Ang1-7 das Gewicht reduziert, dass A779 diesen TEL-induzierten Effekt teilweise reduzieren konnte (Schuchard et al., 2015), in der vorliegenden Arbeit die Defizienz von Mas aber keine Auswirkungen auf das Körpergewicht hatte, lassen folgende Hypothesen zu: 1) Sind Mechanismen unabhängig von ACE2 und Ang1-7 für die Gewichtsreduktion verantwortlich? 2) Sind Mechanismen unabhängig vom RAS für die Gewichtsreduktion mitverantwortlich? 3) Ist A779 kein spezifischer Mas-Antagonist? 4) Bindet Ang1-7 nur an den Mas-Rezeptor? 5) Wird Ang1-7 metabolisiert und andere RAS-Peptide sind für die Gewichtsreduktion verantwortlich?

Neben der ACE2/Ang1-7/Mas-Achse wird auch eine vermehrte Bindung von AngII an AT₂R als Ursache für den gewichtsreduzierenden Effekt diskutiert (Nag et al., 2015). Unabhängig vom RAS könnte auch die Stimulation von PPAR δ oder die gesteigerte Expression von UCP-1 verantwortlich sein (Araki et al., 2006; He et al., 2010).

Studien mit A779 ließen unterschiedliche Aussagen bezüglich der Spezifität zu (Fraga-Silva et al., 2008; Zeng et al., 2012), was mit dem heutigen Wissen weniger als Beweis für eine fehlende Spezifität, sondern vielmehr als Hinweis dienen kann, dass neben Mas weitere Rezeptoren die Wirkung von Ang1-7 vermitteln. Zunehmend erlangte bspw. die Angiotensin A/Alamandin/MrgD-Achse die Aufmerksamkeit der Arbeitsgruppen. Ang A entsteht durch Decarboxylierung aus AngII und entfaltet durch Bindung an AT₁R ähnlich wie AngII vasokonstriktive, proliferative Wirkung und steigert den Blutdruck (Habiyakare et al., 2014; Hrenak et al., 2016). ACE2 entfernt das C-terminale Phenylalanin aus Ang A und bildet Alamandin. Das Heptapeptid unterscheidet sich nur durch eine Aminosäure von Ang1-7 und kann durch Decarboxylierung auch hieraus entstehen (Oliveira et al., 2019). Alamandin bindet an den *Mas related G-protein coupled receptor D* (MrgD). Dieser Rezeptor ist vorwiegend in der Hinterwurzel des Rückenmarks und sensorischen Ganglien exprimiert, in geringerem Ausmaß aber auch im Gefäßsystem, Gehirn, Fettgewebe und Gastrointestinaltrakt. Die nachgeschalteten Signalwege nach Bindung des Liganden sind bislang nur unzureichend untersucht (Uchiyama et al., 2017). Alamandin wirkt ähnlich protektiv wie Ang1-7, führt NO-abhängig zur Vasodilatation, senkt den Blutdruck und verhindert kardiales Remodelling (Oliveira et al., 2019). Bezüglich der Spezifität der Rezeptorbindung konnte gezeigt werden, dass Alamandin sowohl an MrgD als auch an Mas bindet (Tetzner et al., 2018). Ang1-7 bindet ebenfalls an beiden Rezeptoren (Schleifenbaum, 2019). Da Mas ko Mäuse unter physiologischen Bedingungen kaum phänotypische Veränderungen zeigten, folgerten Tetzner et. al., dass in dieser Situation das endogene Ang1-7 vermehrt an MrgD bindet und weiter seine Wirkung entfalten kann (Tetzner et al., 2016). Wir vermuten, dass bei Mas-Defizienz Ang1-7 vermehrt an MrgD bindet oder daraus Alamandin gebildet wird und die Bindung beider Peptide an MrgD die Entwicklung einer Diät-induzierten Adipositas in unserer Studie verhinderte.

4.3 Telmisartan reduziert in Mas *knock-out* Mäusen zwar atherosklerotische Plaques, nicht aber eine endotheliale Dysfunktion

Nach unserem Wissen wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals die Auswirkungen einer Mas-Defizienz im Atherosklerose-Modell mit PCSK9^{DY}-AAV und Western Diät untersucht. Ebenso wurde erstmals die *atomic force microscopy* verwendet, um Aussagen über die endotheliale Funktion in diesem Tiermodell zu treffen. Ergänzend erfolgten Untersuchungen des Lipid- und Cytokinprofils, von Nitrit sowie eine RNA-Sequenzierung der abdominalen Aorta. Zusammengefasst ergeben sich folgende Beobachtungen:

1. Mas ko Mäuse zeigen bereits im Vergleich der Kontrollgruppen eine schlechtere endotheliale Funktion als Wildtyp Mäuse.
2. Wildtyp und Mas ko Mäuse entwickeln durch PCSK9^{DY}-AAV und Western Diät in ähnlichem Umfang atherosklerotische Plaques.
3. Telmisartan reduziert in beiden Tieren atherosklerotische Läsionen. Die Verbesserung der endothelialen Dysfunktion durch Telmisartan bleibt bei Mas ko Mäusen im Gegensatz zu Wildtyp Mäusen aus und ist damit teilweise abhängig von der ACE2/Ang1-7/Mas-Achse.

4.3.1 Vergleich der Kontrollgruppen von Wildtyp und Mas ko

Wir konnten anhand der erhöhten kortikalen Steifigkeit und einem verringerten Plasmaspiegel von Nitrit zeigen, dass Mas ko Mäuse bereits unter Standarddiät eine schlechtere endotheliale Funktion im Vergleich zu wt Mäusen aufweisen und damit die Bedeutung von Ang1-7 für die endotheliale Funktion bestätigen. Die Ergebnisse sind im Einklang mit den Studien anderer Arbeitsgruppen, die eine endotheliale Dysfunktion durch verschlechterte endothelabhängige Vasodilatation *in vitro* und *in vivo* sowie eine reduzierte Bioverfügbarkeit von NO in Mas ko Mäusen nachwies (Lemos et al., 2005; Peiro et al., 2007; Rabelo et al., 2008; Xu et al., 2008). Nach Bindung von Ang1-7 an den Mas-Rezeptor wird über den PI3K/Akt-Signalweg die eNOS phosphoryliert, deren Aktivität gesteigert und mehr NO freigesetzt (Yang et al., 2018).

Risikofaktoren wie Hypertonie und Hypercholesterinämie führen zur Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion, die sich durch die reduzierte Bioverfügbarkeit von NO sowie gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen auszeichnet. Damit bildet sie die Grundlage für Akkumulation von Entzündungszellen in der Gefäßwand, Expression proinflammatorischer Cytokine und Bildung von Schaumzellen sowie vulnerabler atherosklerotischer Plaques (Daiber et al., 2017). Zentraler Risikofaktor für endotheliale Dysfunktion und atherosklerotische Läsionen ist die Dyslipidämie mit erhöhtem LDL-Cholesterin (Falk, 2006). Das Renin-Angiotensin-System hat Einfluss auf das Lipidprofil: Ang1-7 konnte in den Studien verschiedener Arbeitsgruppen eine Senkung von

Cholesterin und Triglyceriden erreichen (Giani et al., 2012; Giani et al., 2009; Santos et al., 2013; Santos et al., 2010; Schuchard et al., 2015). Die Carboxypeptidase ACE2 ist das zentrale Enzym zur Bildung von Ang1-7. Weder Überexpression (Zhang et al., 2010) noch Deletion von ACE2 konnten allerdings Veränderungen im Lipidprofil hervorrufen (Sahara et al., 2014; Thatcher et al., 2011; Thomas et al., 2010). Zu einem ähnlichen Ergebnis für Cholesterin kam auch die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Studie mit ACE2-defizienten Mäusen (Klersy et al., 2025)

Wir konnten in der vorliegenden Arbeit nicht zeigen, dass sich die Kontrollgruppen von wt und Mas ko Mäusen hinsichtlich des Lipidprofils relevant unterscheiden. Damit stehen die Ergebnisse im Widerspruch zu oben genannten Studien, die eine wichtige Funktion von Ang1-7 auf das Lipidprofil und eine signifikante Senkung von Cholesterin und Triglyceriden aufzeigen konnten. Auch in Mas ko Mäusen konnte unter Standarddiät bereits eine Erhöhung von Cholesterin und Triglyceriden festgestellt werden (Monteiro et al., 2022; Santos et al., 2008; Silva et al., 2013).

Ein Meilenstein in der Pathophysiologie von endothelialer Dysfunktion und atherosklerotischen Läsionen ist auch eine leichtgradige systemische Entzündung mit gesteigerter Expression proinflammatorischer Cytokine. Auch diesbezüglich konnten wir nach Fütterung mit Standarddiät und ohne Virusinjektion keine Unterschiede zwischen wt und Mas ko Mäusen feststellen. Möglicherweise war für die ausbleibenden Unterschiede in Lipid- und Cytokinprofil im Vergleich der Kontrollgruppen die Bindung von Ang1-7 bzw. Alamandin an den MrgD-Rezeptor verantwortlich (Tetzner et al., 2016).

4.3.2 Einfluss von PCSK9^{DY}-AAV und Western Diät

Wie bereits in der Vorstudie gezeigt, entwickelten wt Mäuse nach intravenöser Injektion des PCSK9^{DY}-AAV und Fütterung mit Western Diät Hypertriglyceridämie, Hypercholesterinämie, atherosklerotische Plaques und als Ausdruck einer verschlechterten Endothelfunktion eine erhöhte kortikale Steifigkeit. Unsere Hypothese war, dass aufgrund der protektiven Eigenschaften der ACE2/Ang1-7/Mas-Achse die Einflüsse der atherogenen Behandlung in Mas ko Mäusen verstärkt wären.

Plaques: Mas ko Mäuse entwickelten ähnlich große Plaques wie wt Mäuse. Damit stehen unsere Ergebnisse im Kontrast zu denen anderer Arbeitsgruppen, die in Mas ko Mäusen in Kombination mit LDLR ko (Stegbauer et al., 2019) oder mit ApoE ko (Hammer et al., 2016) ein vergrößertes atherosklerotisches Läsionsareal im Vergleich zur Kontrollgruppe nachwiesen. Eine Studie konnte wie auch wir keine Unterschiede im Läsionsareal durch Kombination des ApoE ko mit dem Mas ko feststellen und führte das auf die gesteigerte Expression von Leber-X-Rezeptor (LXR) zurück, einem Cholesterin-Sensor mit regulatorischer Funktion auf Gene im Lipidstoffwechsel und protektivem

Einfluss auf Atherosklerose (Silva et al., 2013). Eine ähnliche antiatherosklerotische Expressionsänderung fiel auch in der vorliegenden Arbeit auf: Die Expression von Cyp1a1 war ausschließlich bei wt Mäusen als Reaktion auf die Entwicklung von Atherosklerose reduziert. Dieses Protein der Cytochrom P450 Familie hat verschiedene Liganden, darunter polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH). PAH wirken proatherosklerotisch, indem sie durch Cyp1a1 bioaktiviert werden und anschließend durch aktive Metabolite die Signaltransduktion über den Leber-X-Rezeptor supprimieren, der Einfluss auf Lipidstoffwechsel und Inflammation hat (Iwano et al., 2005). Cyp1a1 wird durch PAH, aber auch durch laminaren shear stress in der Expression gesteigert, in beiden Fällen ist der Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktor *aryl hydrocarbon receptor* (AhR) involviert. Cyp1a1 selbst wirkt im Endothel anti-atherosklerotisch. Es konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass in der kleinen Krümmung des Aortenbogens, einem atherogenen Gefäßabschnitt, im LDLR ko bzw. im ApoE ko wie auch in unserer Studie in wt Mäusen weniger Cyp1a1 exprimiert wird (Conway et al., 2009). Möglicherweise führte die ausbleibende Reduktion von Cyp1a1 in Mas ko Mäusen zu antiatherosklerotischen Effekten.

Als Ursache für die ausbleibende Vergrößerung atherosklerotischer Läsionen in Mas ko Mäusen ist auch denkbar, dass die Läsionen in wt Mäusen durch PCSK9^{DY}-AAV und Western Diät bereits solche Ausmaße angenommen haben, dass eine weitere Steigerung nur schwer oder gar nicht zu erreichen wäre. Gegen diese Annahme spricht, dass das Ausmaß unserer atherosklerotischer Läsionen vergleichbar zur Vorstudie war und mit diesem Modell in wt Mäusen bereits größere Läsionen erzielt wurden (Bjorklund et al., 2014). In der parallel durchgeführten Studie konnte in ACE2 ko Mäusen ein etwas vergrößerter Plaque- und Fettinhalt im Vergleich zu wt und Mas ko Mäusen festgestellt werden (Klersy et al., 2025). Allerdings zeigen vergleichbare Studien mit Defizienz von Mas oder ACE2 tatsächlich überwiegend kleinere Läsionsareale: Wir konnten durch PCSK9^{DY}-AAV und Western Diät Läsionsareale von ca. 30% erreichen. In ACE2/ApoE dko Mäusen nahmen Läsionen des Aortenbogens ca. 18%, Läsionen anderer Gefäßabschnitte sogar nur ca. 10% ein (Thomas et al., 2010). Im gleichen Modell einer anderen Arbeitsgruppe gelang eine Steigerung auf 20% (Sahara et al., 2014). Wurden Mas ko und LDLR ko kombiniert, so konnten Läsionsareale von ca. 15% gesehen werden. Zu unserer Studie vergleichbare oder größere Läsionen werden nur in Mas/ApoE dko Mäusen mit gleichzeitiger Fütterung mit Western Diät bzw. zusätzlicher Behandlung mit AngII erreicht (Hammer et al., 2016; Stegbauer et al., 2019). Diese Kombination von ApoE ko mit Western Diät ist wie einleitend beschrieben einem LDLR ko bzw. unserem Ansatz mit PCSK9^{DY}-AAV mit vergleichbarer Nahrung in der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen aufgrund pathophysiologischer Unterschiede per se überlegen.

Lipidprofil: Western Diät und Virusinjektion führten in wt und Mas ko Mäusen zu ähnlichen Steigerungen von Cholesterin und Triglyceriden. Unter atherogenen Bedingungen konnte in Mas ko Mäusen bereits eine Erhöhung von Cholesterinwerten im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden: Mäuse mit dko von Mas und ApoE wiesen deutlich höhere Cholesterinwerte auf als ApoE ko Mäuse (Silva et al., 2013). In einer weiteren Studie, in der ein Mas ko sowohl mit LDLR ko als auch mit ApoE ko kombiniert wurde, konnten hingegen wie in unserer Studie keine signifikanten Unterschiede in den Cholesterinwerten, insbesondere in Kombination mit LDLR ko aber eine Tendenz zu gesteigerten Werten gesehen werden (Stegbauer et al., 2019). Nur eine Studie weist in Mas ko Mäusen höhere HDL- und niedrigere LDL-Werte bei gleichbleibenden Triglyceriden auf und widerspricht damit den bislang veröffentlichten Arbeiten, insbesondere auch der auf demselben FVB/N Hintergrund (Dapper et al., 2019).

Cytokinprofil: Wir konnten nachweisen, dass die durch Western Diät und Virusinjektion adipösen wt Mäuse eine leichtgradige systemische Entzündung entwickelten und die Plasmaspiegel sämtlicher gemessener Cytokine im Vergleich zur Standarddiät erhöht waren. Die Behandlung mit Western Diät und Virusinjektion führte in Mas ko Mäusen nicht zu erhöhten Cytokinspiegeln und systemischer Entzündung. Der protektive Einfluss der ACE2/Ang1-7/Mas-Achse bezüglich der Expression proinflammatorischer Cytokine konnte bereits mehrfach gezeigt werden: Ang1-7 reduzierte die Cyclooxygenase 2 (COX2) und IL-1 β im Fettgewebe (Santos et al., 2012), TNF- α und IL-6 in der Leber (Santos et al., 2013), ein Agonist von Ang1-7 reduzierte proinflammatorische Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen und im perivaskulärem Fettgewebe (Stegbauer et al., 2019). Aufgrund der ausbleibenden Wirkung von Ang1-7 sollten in Mas ko Mäusen Entzündung und Cytokine gesteigert sein. In der Tat verstärkten sich in Mas ko Mäusen der NF κ B-*pathway* (Ni et al., 2020), Infiltration von Makrophagen und Expression proinflammatorischer Cytokine in der Aorta (Hammer et al., 2016) sowie Entzündung und Cytokine nach Induktion durch Lipopolysaccharide (LPS) (Oliveira-Lima et al., 2015). Dementgegen stehen die Beobachtungen anderer Studien, in denen in Mas ko Mäusen keine Veränderung von Makrophagen und TNF- α im Fettgewebe (Santos et al., 2008), keine Unterschiede in der Expression von IL-6 und MCP-1 im Hippocampus (Higaki et al., 2018) oder keine Unterschiede im inflammatorischen Profil innerhalb von atherosklerotischen Läsionen (Silva et al., 2013) festzustellen waren.

Wurde in den Studien anderer Arbeitsgruppen der Einfluss des RAS auf die Cytokinexpression bei Atherosklerose untersucht, so erfolgten nur selten Messungen im Plasma. Häufiger erfolgte der Nachweis einer Inflammation oder deren Reduktion durch Untersuchung von Endothelzellen, Makrophagen oder glatten Muskelzellen (Sahara et al., 2014; Skiba et al., 2017; Thomas et al., 2010). Es liegt nahe, dass inflammatorische Prozesse nicht nur systemisch, sondern

insbesondere auch lokal in den Endothel-, Muskel- und Entzündungszellen der Gefäßwand stattfinden. Darauf deutet auch eine weitere Studie unserer Arbeitsgruppe hin, die in der KEGG-Analyse der RNA-Sequenzierung die Steigerung inflammatorischer *pathways* in der Aorta als Reaktion auf PCSK9^{DY}-AAV und Western Diät nachwies (Hernandez Torres et al., 2024). Dabei wurde nicht wie bei uns die abdominale, sondern die thorakale Aorta zur RNA-Sequenzierung verwendet. Es konnte bereits gezeigt werden, dass sich das Remodelling zwischen unterschiedlichen Gefäßabschnitten unterscheidet (Wu et al., 2024). Dementgegen stehen in der vorliegenden Arbeit sowohl in wt auch in Mas ko Mäusen durch Virusinjektion und Western Diät Steigerungen von *pathways* für Insulinresistenz, Metabolismus, Stärke- und Sucrose-Stoffwechsel, Fettstoffwechsel und AMPK-signalling. In Mas ko Mäusen ergab sich auch eine Steigerung von Komplement- und Koagulationskaskaden. Möglicherweise wäre durch Untersuchung anderer Gefäßabschnitte oder Makrophagen sowie Endothelzellen auch in Mas ko Mäusen in unserer Studie eine gesteigerte lokale Cytokinexpression festgestellt worden. So konnte zum Beispiel die Studie einer anderen Arbeitsgruppe bei Atherosklerose mit gesteigerter Infiltration von Makrophagen und verstärkter Expression von IL-6 in der Gefäßwand wie wir keine Unterschiede der Cytokine im Plasma feststellen (Hammer et al., 2016).

Endotheliale Funktion: Wie bereits in der Vorstudie untersuchten wir die thorakale Aorta mittels AFM hinsichtlich ihrer funktionellen Eigenschaften. Durch Injektion des PCSK9^{DY}-AAV und Fütterung mit Western Diät erhöhte sich in wt Mäusen die kortikale Steifigkeit. Parallel dazu wurde als Ausdruck einer endothelialen Dysfunktion Nitrit als Surrogatparameter für NO tendenziell gesenkt. In Mas ko Mäusen wurde die bereits mit Standarddiät erhöhte kortikale Steifigkeit in der zellbasierten Analyse durch PCSK9^{DY}-AAV und Western Diät signifikant gesteigert. In der auf die Versuchstiere bezogenen Analyse wurde die kortikale Steifigkeit nicht signifikant gesteigert. Eine ähnlich deutliche Steigerung wie in wt Mäusen blieb also aus und die kortikale Steifigkeit erreichte nach atherogener Behandlung in Mas ko Mäusen ähnliche Werte wie in wt Mäusen. Die negative Korrelation zwischen Nitrit und kortikaler Steifigkeit, die in wt Mäusen zu beobachten war, war im Mas ko aufgehoben. Eine weitere Senkung des bereits bei Standarddiät in Mas ko Mäusen erniedrigten Nitrits blieb ebenso aus. Damit widersprechen unsere Ergebnisse denjenigen anderer Arbeitsgruppen, die einen stärkeren Anstieg der kortikalen Steifigkeit in Mas ko Mäusen erwarten ließen (Lemos et al., 2005; Rabelo et al., 2008).

Weshalb in Mas ko Mäusen die kortikale Steifigkeit durch PCSK9^{DY}-AAV und Western Diät trotz Anstieg von Cholesterin und Plaqueinhalt nicht weiter gesteigert werden konnte, verbleibt unklar. Auch hier erscheint möglich, dass wie die atherosklerotischen Läsionen auch die kortikale Steifigkeit bereits maximal gesteigert war. Die Werte für die kortikale Steifigkeit waren vergleichbar

mit den Ergebnissen unserer Vorstudie. Dort konnte als Hinweis für diese Annahme trotz fünffacher Steigerung der Viruslast und höheren Cholesterinwerten keine höhere kortikale Steifigkeit als in der Versuchsgruppe mit einer Viruslast von 1×10^{11} erreicht werden (Achner et al., 2022). Auch in der parallel durchgeführten Studie an ACE2 ko Mäusen konnten keine höheren Werte für die kortikale Steifigkeit erreicht werden, obwohl dort sogar etwas größere atherosklerotische Läsionen vorhanden waren (Klersy et al., 2025). Unsere kortikale Steifigkeit war auch höher als jene in Doppel-ko Mäusen von ApoE und LDLR (Maase et al., 2019).

4.3.3 Einfluss von Telmisartan

Plaques: Mit unserer Arbeit bestätigen wir die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, dass die chronische AT₁R-Blockade atherosklerotische Läsionen reduziert (Pellegrin et al., 2017; Sasaki et al., 2010). In der histologischen Analyse der aufsteigenden Aorta konnten wir zeigen, dass Telmisartan die durch PCSK9^{DY}-AAV und Western Diät entstandenen atherosklerotischen Plaques in Größe und Fettgehalt deutlich reduzierte. Die Reduktion erfolgte in gleichem Ausmaß sowohl in wt als auch in Mas ko Mäusen, was gegen unsere Hypothese reduzierter anti-atherosklerotischer TEL-Wirkung in Mas ko Mäusen und die einleitend aufgezeigten protektiven Eigenschaften der ACE2/Ang1-7/Mas-Achse spricht. Durch welche Mechanismen reduzierte TEL also atherosklerotische Plaques? Dazu untersuchten wir auch hier Lipidprofil, Cytokinprofil und RNA-Expression.

Lipidprofil: In der vorliegenden Studie wurde beobachtet, dass Telmisartan das Cholesterin der adipösen wt Mäuse leicht reduziert, dieser Effekt aber nicht in Mas ko Mäusen auftritt. Triglyceride wurden weder in wt noch in Mas ko Mäusen durch Telmisartan entscheidend beeinflusst. Unsere Arbeitsgruppe konnte für wt Mäuse bereits zeigen, dass Telmisartan auch Triglyceride reduziert (Muller-Fielitz et al., 2015; Nickel et al., 2022). Nur in einer Studie unserer Gruppe führte die Behandlung mit Telmisartan nicht zu Veränderungen der Triglyceride (Schuster et al., 2018). Der TEL-Effekt auf Cholesterin wurde bislang seltener untersucht. In adipösen Ratten konnte TEL HDL-Cholesterin steigern ohne LDL-Cholesterin zu verändern (Muller-Fielitz et al., 2014). Bei Dapper et al. führte TEL in wt Mäusen ebenfalls nicht zu Veränderungen von HDL oder LDL-Cholesterin, in Mas ko Mäusen führte TEL sogar zu einer Erhöhung von LDL (Dapper et al., 2019). Andere Arbeitsgruppen zeigten bezüglich des Lipidprofils ebenfalls bereits eine Senkung von Triglyceriden in Menschen oder im Tierversuch lokal in Muskel oder Leber (Kintscher et al., 2007; Rong et al., 2010). Weshalb wir nicht wie vorausgehende Studien eine Senkung von Triglyceriden aufweisen konnten, bleibt unklar. Dass Telmisartan in wt Mäusen Cholesterin reduziert, nicht aber in Mas ko Mäusen, lässt einen Ang1-7/Mas-abhängigen Mechanismus dieses TEL-Effekts annehmen.

Als Erklärung für die sehr deutliche Reduktion atherosklerotischer Läsionen erscheint die nur geringe Reduktion von Cholesterin durch Telmisartan in wt Mäusen nicht ausreichend, zumal atherosklerotische Läsionen in Mas ko Mäusen trotz fehlender Senkung von Cholesterin im selben Ausmaß reduziert wurden. Ein weiterer zentraler Risikofaktor für Atherosklerose ist die arterielle Hypertonie. Telmisartan senkt den Blutdruck und zählt zu den Antihypertensiva der ersten Wahl (He et al., 2010). Eine Messung des Blutdrucks in der vorliegenden Studie blieb aus, weil Unterschiede zwischen wt und Mas ko Mäusen aufgrund des verwendeten genetischen Hintergrunds nicht zu erwarten waren (s. für eine ausführliche Diskussion dazu Kapitel 7.3.2). Es konnte gezeigt werden, dass Telmisartan unabhängig von der antihypertensiven Wirkung vor Atherosklerose schützt (Li et al., 2015).

Cytokinprofil: ARB wie Telmisartan werden antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben: Sie reduzieren die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, die Lipide in der Zellwand oxidieren und für die Aufnahme in Makrophagen über den *scavenger*-Rezeptor prädestinieren (Dandona et al., 2003). Sie reduzieren die Expression von Adhäsionsmolekülen wie *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) und VCAM-1 und damit die Akkumulation von Entzündungszellen in der Gefäßwand (Graninger et al., 2004). Sie reduzieren die Expression proinflammatorischer Cytokine wie TNF- α und IFN- γ in aktivierten T-Zellen (Cheng et al., 2004). Hinsichtlich atherosklerotischer Plaques reduzieren ARB den Gehalt an Makrophagen (Pellegrin et al., 2017) und stabilisieren sie durch die reduzierte Expression von MMP (Sasaki et al., 2010).

Mechanistisch wird einerseits eine Reduktion der Bindung von AngII an den AT₁R diskutiert, die zur Expression von ROS, Adhäsionsmolekülen und proinflammatorischen Cytokinen führt (Han et al., 2010). Möglich erscheint auch eine vermehrte Bindung von AngII an den AT₂R, dem eine gesteigerte NO-Freisetzung sowie antiproliferative und antioxidative Effekte zugeschrieben werden (Warnholtz et al., 2007). Mit dem selektiven AT₂R-Agonisten *Compound 21* (C21) konnte gezeigt werden, dass die TNF- α -induzierte Expression von IL-6 und MCP-1 reduziert und damit eine antiinflammatorische Wirkung entfaltet wird (Rompe et al., 2010). Zahlreiche Erkenntnisse deuten aber auch darauf hin, dass AngII bei AT₁R-Blockade metabolisiert wird und weitere RAS-Peptide die protektive Wirkung auf endotheliale Funktion und atherosklerotische Plaques entfalten. Die Carboxypeptidase ACE2 bildet Ang1-7 aus AngII. Durch Überexpression dieses Enzyms konnten die Progression früher atherosklerotischer Plaques abgemildert, Makrophagen, MCP-1, MMP, ROS und Adhäsionsmoleküle reduziert werden, was durch den Mas-Antagonisten A779 teilweise verhindert wurde (Dong et al., 2008; Lovren et al., 2008; Zhang et al., 2010). Gleichzeitig führt die Defizienz von ACE2 zu gesteigerter Expression von Adhäsionsmolekülen, Cytokinen, MMP und Akkumulation von Plaques (Thomas et al., 2010).

Telmisartan zeigte auch in unserer Studie antiinflammatorische Wirkung, denn mit Ausnahme von IL-6 wurden die erhöhten Plasmaspiegel der Cytokine wieder normalisiert. Anders als in einer vorausgegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe konnten wir damit bestätigen, dass Telmisartan nicht ausschließlich gewebsspezifisch, sondern auch systemisch antiinflammatorische Wirkung entfaltet (Rawish et al., 2020). Die Behandlung mit Western Diät und Virusinjektion führte in Mas ko Mäusen nicht zu erhöhten Cytokinspiegeln und systemischer Entzündung, sodass hier folglich auch keine ausbleibende Wirkung von Telmisartan beobachtet werden konnte. Durch Telmisartan kam es in Mas ko Mäusen zu selektiven Steigerungen von MCP-1, LIX, IL-6 und dem antiinflammatorischen IL-10.

Endotheliale Funktion: Mit unserer Arbeit konnten wir bestätigen, dass die chronische Behandlung mit dem AT₁R-Blocker Telmisartan die endotheliale Funktion verbessert (Cheng et al., 2004; Graninger et al., 2004). Während die kortikale Steifigkeit als Ausdruck der endothelialen Dysfunktion ähnlich wie in unserer Vorstudie nach Injektion des PCSK9^{DY}-AAV in Kombination mit Western Diät gesteigert wurde, konnte sie in wt Mäusen durch Telmisartan reduziert werden. Das im Rahmen der endothelialen Dysfunktion reduzierte Nitrit wurde durch Telmisartan tendenziell gesteigert. Auch in anderen Studien waren die protektiven Effekte von ARB bzw. speziell Telmisartan mit einer erhöhten Bioverfügbarkeit von NO verbunden (Ikejima et al., 2008; Myojo et al., 2014; Warnholtz et al., 2007). Die Konzentrationserhöhung von NO wird bisweilen auf einen PPAR γ -abhängigen Mechanismus zurückgeführt (Ikejima et al., 2008; Yuen et al., 2011). Auch ein Einfluss von TNF- α ist hier beschrieben, denn es blockiert die eNOS und reduziert dadurch NO (Nosalski & Guzik, 2017). TNF- α wurde in unserer Studie in wt Mäusen durch PCSK9^{DY}-AAV und Western Diät gesteigert und durch Telmisartan normalisiert.

Durch chronische Behandlung mit Telmisartan konnte in unserer Arbeit die endotheliale Funktion in Mas ko Mäusen nicht verbessert werden: Eine Senkung der kortikalen Steifigkeit blieb aus. Damit bestätigen wir die Vermutung, dass der protektiven Wirkung von Telmisartan auf die Gefäßfunktion auch ein ACE2/Ang1-7/Mas-abhängiger Mechanismus zugrunde liegt. Auch in ACE2 ko Mäusen der parallel durchgeführten Studie blieb ein protektiver Effekt von Telmisartan auf die Gefäßfunktion aus (Klersy et al., 2025). Auf die Plasmaspiegel von Nitrit hatte Telmisartan keinen signifikanten Einfluss, wenn auch die Tendenz zu einer Steigerung zu erkennen war.

Eine mögliche Erklärung für die ausbleibende Verbesserung der endothelialen Funktion durch TEL in Mas ko Mäusen bietet die RNA-Sequenzierung der abdominalen Aorta. Dort untersuchten wir insbesondere Gene, deren Expression sich bei Induktion von Atherosklerose veränderte und die durch chronische Therapie mit dem AT₁R-Blocker gegenteilig reguliert wurde.

Dies und zusätzlich die Assoziation mit Atherosklerose nach CTD *gene-disease associations dataset* trifft auf mehrere Gene zu. Insbesondere die Matrix-Metalloprotease 12 (MMP12) erscheint interessant, ist deren Bedeutung in der Pathophysiologie der Atherosklerose doch bereits mehrfach beschrieben: MMP, exprimiert durch Makrophagen, finden sich in allen Phasen der Plaquebildung und führen über den Abbau von Kollagenfasern der extrazellulären Matrix zu einer Destabilisierung der Plaques (Falk, 2006; Yamada et al., 2017). Während AngII die Expression von MMP steigert, wird sie durch Sartane, Überexpression von ACE2 oder Ang1-7 reduziert (Dong et al., 2008; Fraga-Silva et al., 2014; Sasaki et al., 2010). Es ist beschrieben, dass einzelne MMP AngII aus AngI bilden können (Thomas et al., 2010). Die Beobachtung, dass Ang1-7 die Expression von MMP ebenso senkt wie in der vorliegenden Studie Telmisartan bei wt Mäusen, eine Senkung bei Mas ko Mäusen allerdings ausbleibt, lässt einen ACE2/Ang1-7/Mas-abhängigen Mechanismus der MMP12-Senkung durch Telmisartan vermuten. Die Expression von MMP ist abhängig von TNF- α , dies wiederum wird durch AngII gesteigert (Cheng et al., 2004) und durch Ang1-7 (Santos et al., 2018) sowie Telmisartan gesenkt, sodass hier möglicherweise auch die antiinflammatorische Wirkung des AT₁R-Blockers einen Anteil hat.

In der Gesamtschau des atherosklerotischen Phänotyps in Mas ko Mäusen ergeben sich schließlich Unterschiede zwischen der histologischen Darstellung der Plaques und der funktionellen Messung mittels AFM. Während Telmisartan atherosklerotische Plaques in Mas ko Mäusen im selben Ausmaß wie in wt Mäusen reduzieren konnte, blieb eine Reduktion der kortikalen Steifigkeit aus. Einerseits fällt auf, dass Telmisartan in Mas ko Mäusen keine Senkung von Cholesterin herbeizuführen vermochte, wie dies in wt Mäusen anteilig der Fall war. Auch führte die Behandlung mit Telmisartan in Mas ko Mäusen selektiv zur Erhöhung der proinflammatorischen Cytokine MCP-1 und LIX. Weshalb diese Beobachtungen allerdings ausschließlich zur Verschlechterung der endothelialen Funktion und nicht zur Vergrößerung atherosklerotischer Plaques beitragen sollten, ist unklar. Auffällig waren in der RNA-Sequenzierung Unterschiede in der Expression von *serpin peptidase inhibitor, clade E, member 1* (Serpine1), das für den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) codiert, einem Glykoprotein mit Rolle in der Thrombusbildung. PAI-1 ist ein Akute-Phase-Protein produziert in Endothelzellen, Thrombozyten, glatten Muskelzellen, Makrophagen und Adipozyten, das im Komplex mit Gewebs-Plasminogen-Aktivator (t-PA) eine antifibrinolytische Wirkung entfaltet. Dabei sind erhöhte Serumspiegel assoziiert mit kardiovaskulären Erkrankungen wie KHK, Herzinfarkt und Schlaganfall. In atherosklerotischen Plaques konnte eine verstärkte Expression nachgewiesen werden (Kubota et al., 2021). Erhöht sind die Spiegel auch beim metabolischem Syndrom. PAI-1 wirkt proinflammatorisch und stimuliert die Migration von Monozyten und Makrozyten (Yasar Yildiz et al., 2014). AngII steigert die Expression von Serpine1, während ACE-Hemmer und AT₁R-Antagonisten wie Candesartan die Expression reduzierten (Tiryaki et al., 2012). Überraschenderweise konnten wir in der vorliegenden Studie in wt Mäusen weder

eine gesteigerte Expression in der abdominalen Aorta im Rahmen der atherosklerotischen Entwicklung feststellen, noch wurde sie durch Telmisartan reduziert. Im Gegenteil steigerte Telmisartan bei Mas-Defizienz Serpine1 vergleichsweise deutlich, was Anteil an der ausbleibenden Verbesserung der endothelialen Funktion haben könnte.

Eine Bestätigung der Ergebnisse mithilfe der parallel untersuchten Glykokalix gelang nicht: Zur kortikalen Steifigkeit vergleichbare Änderungen von Höhe oder Steifigkeit der Glykokalix durch PCSK9^{DY}-AAV, Western Diät oder Telmisartan blieben sowohl in wt als auch in Mas ko Mäusen aus. Die Möglichkeit einer Fehlmessung der kortikalen Steifigkeit erscheint unwahrscheinlich, wurde doch für Mas und ACE2 ko Mäuse durch zwei unabhängige verblindete Untersucher das gleiche Ergebnis erreicht. In wt Mäusen konnte wie auch in der Vorstudie der Effekt von PCSK9^{DY}-AAV und Western Diät auf die kortikale Steifigkeit abgelesen werden. Auch im Hinblick auf die Pathophysiologie erscheint eine erhöhte kortikale Steifigkeit bereits durch Standarddiät und die ausbleibende Verbesserung der endothelialen Funktion in Mas ko Mäusen plausibel. Da die endotheliale Dysfunktion als erstes klinisches Korrelat der Atherosklerose den morphologischen Veränderungen an der Gefäßwand vorausgeht, stellt sich die Frage, ob sich durch einen verlängerten Beobachtungszeitraum auch in Mas ko Mäusen trotz Behandlung mit Telmisartan vergrößerte Plaques nachweisen ließen (Daiber et al., 2017).

Zusammenfassend konnten wir die protektive Wirkung von Telmisartan auf die endotheliale Funktion der thorakalen Aorta anteilig auf einen ACE2/Ang1-7/Mas-abhängigen Mechanismus zurückführen. Die Wirkung wird unabhängig von antiadipösen und Plaque-reduzierenden Eigenschaften entfaltet. Die Verbesserung der endothelialen Funktion ist unter anderem auf den antiinflammatorischen Aspekt von Telmisartan mit Reduktion von TNF- α und konsekutiv MMP 12 zurückzuführen.

4.4 Limitationen

Wir verwendeten in dieser Arbeit hohe Dosierungen von Telmisartan, die für die Behandlung von Menschen nicht zugelassen sind und vermutlich zu starken Nebenwirkungen führen würden. Telmisartan diente hier durch seine Blockade des negativen Feedbacks über den AT₁R allerdings hauptsächlich der Steigerung von Ang1-7. Perspektivisch sollen zur Behandlung des metabolischen Syndroms und der Atherosklerose Agonisten am Mas-Rezeptor oder MrgD und nicht Telmisartan selbst verwendet werden.

Die Blutentnahme zur Bestimmung des Lipidprofils und des Blutzuckers erfolgte am nicht nüchternen und anästhesierten Tier. Daher könnten die Nahrungsaufnahme sowie die Aktivierung

des sympathischen Nervensystems die gemessenen Werte beeinflusst haben. Es erfolgte nur die Messung von Gesamtcholesterin. Insbesondere die Steigerung von LDL und die Senkung von HDL ist mit der Entwicklung einer Atherosklerose assoziiert (Libby et al., 2019). Die Auswirkungen der PCSK9^{DY}-AAV Injektion auf das Lipidprofil ist bereits beschrieben (Bjorklund et al., 2014). Wie Mas ko und AAV-Injektion interagieren, kann durch die vorliegende Studie nicht beantwortet werden.

Zur Bestimmung der endothelialen Funktion verwendeten wir das Nanoindentation Verfahren. Dabei erfolgt die Messung der kortikalen Steifigkeit an zufällig ausgewählten 1 mm² großen Aortenpräparaten. Um den Einfluss von Heterogenität zwischen den Präparaten und innerhalb eines Präparates zu minimieren, erfolgte die Messung an mindestens zwei verschiedenen Präparaten und innerhalb eines Präparats an 20-25 Zellen aus mindestens drei verschiedenen Bildausschnitten. Um potenzielle Unterschiede in der Beschaffenheit des Cantilever zu umgehen, wurde ein Cantilever für den maximal möglichen Zeitraum verwendet.

Aus statistischer Sicht wünschenswert wäre bei den zugrundeliegenden Variablen Genetik, PCSK9^{DY}-AAV-Injektion und Telmisartan die Durchführung einer 3way-ANOVA. Das war aufgrund der Komplexität dieses Tests und der Anforderungen an die Daten hinsichtlich Normalverteilung und Varianzhomogenität nicht möglich. Daher beschränkten wir uns auf ein gestuftes Vorgehen und verglichen zunächst die Kontrollgruppen der wt und Mas ko Mäuse und anschließend die Versuchsgruppen der Mauslinien getrennt wie in Kapitel 2.5 beschrieben.

4.5 Ausblick

Trotz der mehrfach aufgezeigten positiven Einflüsse der ACE2/Ang1-7/Mas-Achse auf die Entwicklung einer Diät-induzierten Adipositas gelang es in zwei verschiedenen genetischen Hintergründen nicht, durch *knock-out* des Mas-Rezeptors die geringere Gewichtszunahme durch Telmisartan zu verhindern. Das lässt die Schlussfolgerungen zu, dass entgegen der bisherigen Erkenntnisse Ang1-7 keine wesentliche Funktion bezüglich der Gewichtsregulation hat oder Ang1-7 sowie weitere Metabolite an andere Rezeptoren binden. In zukünftigen Studien sollte daher einerseits die Gewichtsentwicklung durch Telmisartan im AT₂R ko vor allem aber im MrgD ko und Mas/MrgD dko untersucht werden. Dies könnte kombiniert werden mit der Expressionsanalyse systemischer und lokaler RAS-Komponenten, um mögliche Feedback-Regulationen im ko zu erkennen. Um dem Einfluss von Telmisartan auf die Steigerung von Lipolyse und adaptive Thermogenese zu untersuchen, sollten sowohl im Wildtyp als auch im jeweiligen ko mRNA und/oder Proteinspiegel von u. a. PPAR δ , Hormon-sensitiver Lipase (HSL) und UCP-1 analysiert werden.

Unsere Arbeit konnte bestätigen, dass die protektiven Einflüsse der AT₁R-Blockade auf die Entwicklung von endothelialer Dysfunktion auch auf einen Ang1-7/Mas-abhängigen Mechanismus zurückzuführen sind. Die Rolle von Alamandin und MrgD auf Gefäßfunktion und -morphologie ist bislang nur unzureichend untersucht. Um weitere Erkenntnisse zur Bedeutung der Ang A/Alamandin/MrgD-Achse zu erhalten, könnte in einem ähnlichen Ansatz wie in der vorliegenden Arbeit im Atherosklerose-Modell die Aorta histologisch und funktionell untersucht werden.

Das Renin-Angiotensin-System wird lokal im Gehirn exprimiert und hat dort zahlreiche Implikationen, u. a. wird einem dysregulierten RAS ein Anteil an der Entwicklung von Alzheimer und Parkinson zugeschrieben (Saravi et al., 2021). Der AT₄R hat wichtige Funktionen bei Lernen und Gedächtnis (Li et al., 2017). Unsere und andere Arbeitsgruppen konnten bereits bestätigen, dass AT₁R-Blocker auch ins zentrale Nervensystem gelangen und ein ZNS-abhängiger Mechanismus Teil des gewichtsreduzierenden Effekts ist: Die selektive Inhibition des RAS im Gehirn verhindert Adipositas und verringert die TEL-Effekte (Winkler et al., 2016), TEL hat positiven Einfluss auf Lipide in Tanyzyten und im Hypothalamus sowie auf die dortige Entzündung (Rawish et al., 2020), ARB wirken antidepressiv und reduzieren Migräne (Ziaja et al., 2021). TEL ist protektiv bei Alzheimer, verbessert neurovaskuläre Kopplung und cerebralen Blutfluss, reduziert ängstliches Verhalten und oxidativen Stress in Ependymzellen (Huber et al., 2021). Um die protektiven Effekte von TEL auf neurologische Funktionen besser zu verstehen, sollten in zukünftigen Studien weitere Verhaltensversuche insbesondere nach Induktion von Atherosklerose durch PCSK9^{DY}-AAV und Western Diät sowie Defizienz von Mas-Rezeptor und MrgD/Mas dko durchgeführt werden.

Das Mikrobiom gelangte zuletzt vermerkt in den Fokus der Aufmerksamkeit. Eine Imbalance des Mikrobioms ist verbunden mit Adipositas sowie kardiovaskulären Erkrankungen. Dabei sind u. a. eine gesteigerte intestinale Permeabilität und metabolische Endotoxinämie sowie die Produktion von Gallensäuren bedeutsam (Chait & den Hartigh, 2020). Auch das RAS hat bezüglich des Mikrobioms zahlreiche Implikationen. So konnte beispielsweise bei ACE2 ko Mäusen ein verändertes Mikrobiom und eine intestinale Entzündung festgestellt werden (Santos et al., 2018). Auch die Gewichtsreduktion durch TEL könnte abhängig vom Mikrobiom sein, konnte doch ein spezifisches Mikrobiom nach chronischer TEL-Behandlung nachgewiesen werden (Beckmann et al., 2021; Freschi et al., 2024). Um die gegenseitige Beeinflussung von RAS und Mikrobiom besser zu verstehen, sind weitere Studien notwendig.

5 Zusammenfassung

Das Renin-Angiotensin-System hat Einfluss auf die Entwicklung von Adipositas und Atherosklerose. Dabei werden der ACE/AngII/AT₁R-Achse negative und der ACE2/Ang1-7/Mas-Achse protektive Effekte zugeschrieben. Der AT₁R-Blocker Telmisartan konnte sowohl Körpergewicht und Fettmasse als auch endotheliale Dysfunktion und atherosklerotische Läsionen reduzieren. Ob diesen Eigenschaften von Telmisartan die vermehrte Bindung von Ang1-7 an den Mas-Rezeptor zugrunde liegt, sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

In der vorliegenden Studie wurden insgesamt 72 männliche C57BL/6N-Mäuse in sechs Versuchsgruppen über zwölf Wochen untersucht. Wildtyp und Mäuse mit globaler Mas-Defizienz erhielten Standarddiät oder Western Diät, Injektion eines PCSK9^{DY}-AAV oder einer Kontrolle sowie tägliche Behandlung mit Telmisartan 8 mg/kg KG oder Kontrolle. Beurteilt wurden Körpergewicht, Masseverteilung, Hormonprofil, Cytokinprofil, Lipidprofil, atherosklerotische Läsionen, endotheliale Funktion der Aorta sowie RNA-Expression.

Die endotheliale Funktion war in Mas ko Mäusen bereits in der Kontrollgruppe verschlechtert, denn die kortikale Steifigkeit der aortalen Endothelzellen war erhöht und Nitrit reduziert. Mit PCSK9^{DY}-AAV und Western Diät entwickelten wt und Mas ko Mäuse Diät-induzierte Adipositas, Hypercholesterinämie, atherosklerotische Läsionen und eine endotheliale Dysfunktion. Telmisartan reduzierte Gewichtszunahme, Fettmasse, Leptin sowie atherosklerotische Läsionen gleichermaßen in Wildtyp und Mas *knock-out*. In Mas ko Mäusen blieb eine Verbesserung der endothelialen Funktion durch Telmisartan aus.

Telmisartan verbessert die endotheliale Funktion der thorakalen Aorta auch in Abhängigkeit der ACE2/Ang1-7/Mas-Achse des Renin-Angiotensin-Systems, denn die Verbesserung einer endothelialen Dysfunktion durch TEL blieb bei Defizienz des Mas-Rezeptors aus. Der Verbesserung der endothelialen Funktion liegt insbesondere eine antiinflammatorische Wirkung mit Reduktion von Matrixmetalloprotease 12 und TNF- α zugrunde. Die Verbesserung der endothelialen Funktion gelingt unabhängig von der antiadipösen und der Plaque-reduzierenden Wirkung, denn beide blieben trotz Defizienz des Mas-Rezeptors erhalten.

6 Literaturverzeichnis

- Achner, L., Klersy, T., Fels, B., Reinberger, T., Schmidt, C. X., Gross, N., Hille, S., Müller, O. J., Aherrahrou, Z., Kusche-Vihrog, K., & Raasch, W. (2022). AFM-based nanoindentation indicates an impaired cortical stiffness in the AAV-PCSK9(DY) atherosclerosis mouse model. *Pflugers Arch*, 474(9), 993-1002. <https://doi.org/10.1007/s00424-022-02710-x>
- Aherrahrou, R., Kulle, A. E., Alenina, N., Werner, R., Vens-Cappell, S., Bader, M., Schunkert, H., Erdmann, J., & Aherrahrou, Z. (2020). CYP17A1 deficient XY mice display susceptibility to atherosclerosis, altered lipidomic profile and atypical sex development. *Sci Rep*, 10(1), 8792. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65601-0>
- Akoumianakis, I., & Filippatos, T. (2020). The renin-angiotensin-aldosterone system as a link between obesity and coronavirus disease 2019 severity. *Obes Rev*, 21(9), e13077. <https://doi.org/10.1111/obr.13077>
- Alberti, K. G., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., Fruchart, J. C., James, W. P., Loria, C. M., Smith, S. C., Jr., International Diabetes Federation Task Force on, E., Prevention, National Heart, L., Blood, I., American Heart, A., World Heart, F., International Atherosclerosis, S., & International Association for the Study of, O. (2009). 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*, 120(16), 1640-1645. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644>
- Alberti, K. G., Zimmet, P., Shaw, J., & Group, I. D. F. E. T. F. C. (2005). The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet*, 366(9491), 1059-1062. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67402-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67402-8)
- Alexander, Y., Osto, E., Schmidt-Trucksass, A., Shechter, M., Trifunovic, D., Duncker, D. J., Aboyans, V., Back, M., Badimon, L., Cosentino, F., De Carlo, M., Dorobantu, M., Harrison, D. G., Guzik, T. J., Hofer, I., Morris, P. D., Norata, G. D., Suades, R., Taddei, S., . . . Evans, P. C. (2021). Endothelial function in cardiovascular medicine: a consensus paper of the European Society of Cardiology Working Groups on Atherosclerosis and Vascular Biology, Aorta and Peripheral Vascular Diseases, Coronary Pathophysiology and Microcirculation, and Thrombosis. *Cardiovasc Res*, 117(1), 29-42. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa085>
- Angrisani, L., Santonicola, A., Iovino, P., Formisano, G., Buchwald, H., & Scopinaro, N. (2015). Bariatric Surgery Worldwide 2013. *Obes Surg*, 25(10), 1822-1832. <https://doi.org/10.1007/s11695-015-1657-z>
- Araki, K., Masaki, T., Katsuragi, I., Tanaka, K., Kakuma, T., & Yoshimatsu, H. (2006). Telmisartan prevents obesity and increases the expression of uncoupling protein 1 in diet-induced obese mice. *Hypertension*, 48(1), 51-57. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000225402.69580.1d>
- Bader, M. (2013). ACE2, angiotensin-(1-7), and Mas: the other side of the coin. *Pflugers Arch*, 465(1), 79-85. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1120-0>
- Bader, M., Alenina, N., Andrade-Navarro, M. A., & Santos, R. A. (2014). MAS and its related G protein-coupled receptors, Mrgprs. *Pharmacol Rev*, 66(4), 1080-1105. <https://doi.org/10.1124/pr.113.008136>
- Barish, G. D., Narkar, V. A., & Evans, R. M. (2006). PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest*, 116(3), 590-597. <https://doi.org/10.1172/JCI27955>
- Beckmann, L., Kunstner, A., Freschi, M. L., Huber, G., Stolting, I., Ibrahim, S. M., Hirose, M., Freitag, M., Langan, E. A., Matschl, U., Galuska, C. E., Fuchs, B., Knobloch, J. K., Busch, H., & Raasch, W. (2021). Telmisartan induces a specific gut microbiota signature which may mediate its antiobesity effect. *Pharmacol Res*, 170, 105724. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105724>
- Berg, A., Bischoff, S., Colombo-Benkmann, M., Ellrott, T., Hauner, H., Heintze, C., Kanthak, U., Kunze, D., Stefan, N., Teufel, M., Wabitsch, M., & Wirth, A. (2014). *Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur "Prävention und Therapie der Adipositas"*. Deutsche Adipositas-Gesellschaft

- e.V. (DAG). Retrieved 17.02.2022 from <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/050-001.html>
- Berglund, E. D., Li, C. Y., Poffenberger, G., Ayala, J. E., Fueger, P. T., Willis, S. E., Jewell, M. M., Powers, A. C., & Wasserman, D. H. (2008). Glucose metabolism in vivo in four commonly used inbred mouse strains. *Diabetes*, 57(7), 1790-1799. <https://doi.org/10.2337/db07-1615>
- Bjorklund, M. M., Hollensen, A. K., Hagensen, M. K., Dagnaes-Hansen, F., Christoffersen, C., Mikkelsen, J. G., & Bentzon, J. F. (2014). Induction of atherosclerosis in mice and hamsters without germline genetic engineering. *Circ Res*, 114(11), 1684-1689. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302937>
- Blanke, K., Schlegel, F., Raasch, W., Bader, M., Dahnert, I., Dhein, S., & Salameh, A. (2015). Effect of Angiotensin(1-7) on Heart Function in an Experimental Rat Model of Obesity. *Front Physiol*, 6, 392. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00392>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bosnyak, S., Widdop, R. E., Denton, K. M., & Jones, E. S. (2012). Differential mechanisms of ang (1-7)-mediated vasodepressor effect in adult and aged candesartan-treated rats. *Int J Hypertens*, 2012, 192567. <https://doi.org/10.1155/2012/192567>
- Botelho-Santos, G. A., Bader, M., Alenina, N., & Santos, R. A. (2012). Altered regional blood flow distribution in Mas-deficient mice. *Ther Adv Cardiovasc Dis*, 6(5), 201-211. <https://doi.org/10.1177/1753944712461164>
- Boudina, S., Sena, S., Sloan, C., Tebbi, A., Han, Y. H., O'Neill, B. T., Cooksey, R. C., Jones, D., Holland, W. L., McClain, D. A., & Abel, E. D. (2012). Early mitochondrial adaptations in skeletal muscle to diet-induced obesity are strain dependent and determine oxidative stress and energy expenditure but not insulin sensitivity. *Endocrinology*, 153(6), 2677-2688. <https://doi.org/10.1210/en.2011-2147>
- Bradley, D., Liu, J., Blaszcak, A., Wright, V., Jalilvand, A., Needleman, B., Noria, S., Renton, D., & Hsueh, W. (2018). Adipocyte DIO2 Expression Increases in Human Obesity but Is Not Related to Systemic Insulin Sensitivity. *J Diabetes Res*, 2018, 2464652. <https://doi.org/10.1155/2018/2464652>
- Buchmann, G. K., Schurmann, C., Warwick, T., Schulz, M. H., Spaeth, M., Muller, O. J., Schroder, K., Jo, H., Weissmann, N., & Brandes, R. P. (2020). Deletion of NoxO1 limits atherosclerosis development in female mice. *Redox Biol*, 37, 101713. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101713>
- Burgess, E., Hassmen, P., & Pumpa, K. L. (2017). Determinants of adherence to lifestyle intervention in adults with obesity: a systematic review. *Clin Obes*, 7(3), 123-135. <https://doi.org/10.1111/cob.12183>
- Chait, A., & den Hartigh, L. J. (2020). Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med*, 7, 22. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00022>
- Chang, W. T., Cheng, J. T., & Chen, Z. C. (2016). Telmisartan improves cardiac fibrosis in diabetes through peroxisome proliferator activated receptor delta (PPARdelta): from bedside to bench. *Cardiovasc Diabetol*, 15(1), 113. <https://doi.org/10.1186/s12933-016-0430-5>
- Cheang, W. S., Wong, W. T., Wang, L., Cheng, C. K., Lau, C. W., Ma, R. C. W., Xu, A., Wang, N., Huang, Y., & Tian, X. Y. (2019). Resveratrol ameliorates endothelial dysfunction in diabetic and obese mice through sirtuin 1 and peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Pharmacol Res*, 139, 384-394. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.11.041>
- Cheang, W. S., Wong, W. T., Zhao, L., Xu, J., Wang, L., Lau, C. W., Chen, Z. Y., Ma, R. C., Xu, A., Wang, N., Tian, X. Y., & Huang, Y. (2017). PPARdelta Is Required for Exercise to Attenuate Endoplasmic Reticulum Stress and Endothelial Dysfunction in Diabetic Mice. *Diabetes*, 66(2), 519-528. <https://doi.org/10.2337/db15-1657>
- Cheng, M., Su, X., Liu, D., Tian, X., Yan, C., Zhang, X., & Han, Y. (2020). Role of Neutrophil-Derived S100B in Acute Myocardial Infarction Patients From the Han Chinese Population. *Front Cardiovasc Med*, 7, 595446. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.595446>

- Cheng, S. M., Yang, S. P., Ho, L. J., Tsao, T. P., Chang, D. M., & Lai, J. H. (2004). Irbesartan inhibits human T-lymphocyte activation through downregulation of activator protein-1. *Br J Pharmacol*, *142*(6), 933-942. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705785>
- Choe, S. S., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Kim, J. I., & Kim, J. B. (2016). Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *7*, 30. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00030>
- Chooi, Y. C., Ding, C., & Magkos, F. (2019). The epidemiology of obesity. *Metabolism*, *92*, 6-10. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.09.005>
- Collaboration, N. C. D. R. F. (2024). Worldwide trends in underweight and obesity from 1990 to 2022: a pooled analysis of 3663 population-representative studies with 222 million children, adolescents, and adults. *Lancet*, *403*(10431), 1027-1050. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)02750-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)02750-2)
- Conway, D. E., Sakurai, Y., Weiss, D., Vega, J. D., Taylor, W. R., Jo, H., Eskin, S. G., Marcus, C. B., & McIntire, L. V. (2009). Expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human endothelial cells: regulation by fluid shear stress. *Cardiovasc Res*, *81*(4), 669-677. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn360>
- Cosgun, Z. C., Fels, B., & Kusche-Vihrog, K. (2020). Nanomechanics of the Endothelial Glycocalyx: From Structure to Function. *Am J Pathol*, *190*(4), 732-741. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.07.021>
- Cranford, T. L., Enos, R. T., Velazquez, K. T., McClellan, J. L., Davis, J. M., Singh, U. P., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P. S., Robinson, C. M., & Murphy, E. A. (2016). Role of MCP-1 on inflammatory processes and metabolic dysfunction following high-fat feedings in the FVB/N strain. *Int J Obes (Lond)*, *40*(5), 844-851. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.244>
- Cui, H., Lopez, M., & Rahmouni, K. (2017). The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. *Nat Rev Endocrinol*, *13*(6), 338-351. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.222>
- Daiber, A., Steven, S., Weber, A., Shuvaev, V. V., Muzykantov, V. R., Laher, I., Li, H., Lamas, S., & Munzel, T. (2017). Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *Br J Pharmacol*, *174*(12), 1591-1619. <https://doi.org/10.1111/bph.13517>
- Dandona, P., Kumar, V., Aljada, A., Ghanim, H., Syed, T., Hofmayer, D., Mohanty, P., Tripathy, D., & Garg, R. (2003). Angiotensin II receptor blocker valsartan suppresses reactive oxygen species generation in leukocytes, nuclear factor-kappa B, in mononuclear cells of normal subjects: evidence of an antiinflammatory action. *J Clin Endocrinol Metab*, *88*(9), 4496-4501. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021836>
- Dapper, C., Schuster, F., Stolting, I., Vogt, F., Castro, E. S. L. A., Alenina, N., Bader, M., & Raasch, W. (2019). The antiobese effect of AT1 receptor blockade is augmented in mice lacking Mas. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, *392*(7), 865-877. <https://doi.org/10.1007/s00210-019-01643-0>
- Daujat-Chavanieu, M., & Gerbal-Chaloin, S. (2020). Regulation of CAR and PXR Expression in Health and Disease. *Cells*, *9*(11). <https://doi.org/10.3390/cells9112395>
- de Moura, M. M., dos Santos, R. A., Campagnole-Santos, M. J., Todiras, M., Bader, M., Alenina, N., & Haibara, A. S. (2010). Altered cardiovascular reflexes responses in conscious Angiotensin-(1-7) receptor Mas-knockout mice. *Peptides*, *31*(10), 1934-1939. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.030>
- Deshycka, R., Sudaryo, V., Huang, N. J., Xie, Y., Smeding, L. Y., Choi, M. K., Ploegh, H. L., Lodish, H. F., & Pishesha, N. (2021). Engineered red blood cells carrying PCSK9 inhibitors persistently lower LDL and prevent obesity. *PLoS One*, *16*(11), e0259353. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259353>
- Destatis. (2018). Mikrozensus - Fragen zur Gesundheit - Körpermaße der Bevölkerung Retrieved 17.02.2022, from <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Gesundheitszustand-Relevantes-Verhalten/Publikationen/Downloads-Gesundheitszustand/koerpermasse-5239003179004.pdf? blob=publicationFile>

- Devlin, M. J., Robbins, A., Cosman, M. N., Moursi, C. A., Cloutier, A. M., Louis, L., Van Vliet, M., Conlon, C., & Bouxsein, M. L. (2018). Differential effects of high fat diet and diet-induced obesity on skeletal acquisition in female C57BL/6J vs. FVB/NJ Mice. *Bone Rep*, 8, 204-214. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2018.04.003>
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15-21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
- Dong, B., Zhang, C., Feng, J. B., Zhao, Y. X., Li, S. Y., Yang, Y. P., Dong, Q. L., Deng, B. P., Zhu, L., Yu, Q. T., Liu, C. X., Liu, B., Pan, C. M., Song, H. D., Zhang, M. X., & Zhang, Y. (2008). Overexpression of ACE2 enhances plaque stability in a rabbit model of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(7), 1270-1276. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.164715>
- Ehrenborg, E., & Skogsberg, J. (2013). Peroxisome proliferator-activated receptor delta and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 231(1), 95-106. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.08.027>
- Emini Veseli, B., Perrotta, P., De Meyer, G. R. A., Roth, L., Van der Donckt, C., Martinet, W., & De Meyer, G. R. Y. (2017). Animal models of atherosclerosis. *Eur J Pharmacol*, 816, 3-13. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.05.010>
- Engin, A. (2017). The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. *Adv Exp Med Biol*, 960, 1-17. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_1
- Enriori, P. J., Evans, A. E., Sinnayah, P., Jobst, E. E., Tonelli-Lemos, L., Billes, S. K., Glavas, M. M., Grayson, B. E., Perello, M., Nillni, E. A., Grove, K. L., & Cowley, M. A. (2007). Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. *Cell Metab*, 5(3), 181-194. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.02.004>
- Falk, E. (2006). Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, 47(8 Suppl), C7-12. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.09.068>
- Faria-Silva, R., Duarte, F. V., & Santos, R. A. (2005). Short-term angiotensin(1-7) receptor MAS stimulation improves endothelial function in normotensive rats. *Hypertension*, 46(4), 948-952. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000174594.17052.33>
- Felix Braga, J., Ravizzoni Dartora, D., Alenina, N., Bader, M., & Santos, R. A. (2017). Glucagon-producing cells are increased in Mas-deficient mice. *Endocr Connect*, 6(1), 27-32. <https://doi.org/10.1530/EC-16-0098>
- Fels, J., Callies, C., Kusche-Vihrog, K., & Oberleithner, H. (2010). Nitric oxide release follows endothelial nanomechanics and not vice versa. *Pflugers Arch*, 460(5), 915-923. <https://doi.org/10.1007/s00424-010-0871-8>
- Fels, J., & Kusche-Vihrog, K. (2019). Endothelial Nanomechanics in the Context of Endothelial (Dys)function and Inflammation. *Antioxid Redox Signal*, 30(7), 945-959. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7327>
- Fisher-Wellman, K. H., Ryan, T. E., Smith, C. D., Gilliam, L. A., Lin, C. T., Reese, L. R., Torres, M. J., & Neuffer, P. D. (2016). A Direct Comparison of Metabolic Responses to High-Fat Diet in C57BL/6J and C57BL/6NJ Mice. *Diabetes*, 65(11), 3249-3261. <https://doi.org/10.2337/db16-0291>
- Fontes, M. A., Silva, L. C., Campagnole-Santos, M. J., Khosla, M. C., Guertzenstein, P. G., & Santos, R. A. (1994). Evidence that angiotensin-(1-7) plays a role in the central control of blood pressure at the ventro-lateral medulla acting through specific receptors. *Brain Res*, 665(1), 175-180. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91171-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91171-1)
- Fraga-Silva, R. A., Pinheiro, S. V., Goncalves, A. C., Alenina, N., Bader, M., & Santos, R. A. (2008). The antithrombotic effect of angiotensin-(1-7) involves mas-mediated NO release from platelets. *Mol Med*, 14(1-2), 28-35. <https://doi.org/10.2119/2007-00073.Fraga-Silva>
- Fraga-Silva, R. A., Savergnini, S. Q., Montecucco, F., Nencioni, A., Caffa, I., Soncini, D., Costa-Fraga, F. P., De Sousa, F. B., Sinisterra, R. D., Capettini, L. A., Lenglet, S., Galan, K., Pelli, G., Bertolotto, M., Pende, A., Spinella, G., Pane, B., Dallegri, F., Palombo, D., . . . da Silva, R. F. (2014). Treatment with Angiotensin-(1-7) reduces inflammation in carotid atherosclerotic plaques. *Thromb Haemost*, 111(4), 736-747. <https://doi.org/10.1160/TH13-06-0448>

- Freschi, M. L., Kunstner, A., Huber, G., Stolting, I., Busch, H., Hirose, M., & Raasch, W. (2024). Increase in body weight is lowered when mice received fecal microbiota transfer from donor mice treated with the AT(1) receptor antagonist telmisartan. *Front Pharmacol*, *15*, 1453989. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1453989>
- Gaisler-Silva, F., Junho, C. V. C., Fredo-da-Costa, I., Christoffolete, M. A., & Carneiro-Ramos, M. S. (2021). Diet-induced obesity differentially modulates cardiac inflammatory status in the C57 and FVB mouse strains. *Curr Mol Med*. <https://doi.org/10.2174/1566524021666210603163613>
- Gallwitz, B. (2022). Clinical perspectives on the use of the GIP/GLP-1 receptor agonist tirzepatide for the treatment of type-2 diabetes and obesity. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *13*, 1004044. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1004044>
- Gao, W., Xu, W., & Li, H. (2013). The expression and role of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in atherosclerosis. *Mol Med Rep*, *7*(3), 862-868. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1282>
- Garber, A., Henry, R. R., Ratner, R., Hale, P., Chang, C. T., Bode, B., & Group, L.-S. (2011). Liraglutide, a once-daily human glucagon-like peptide 1 analogue, provides sustained improvements in glycaemic control and weight for 2 years as monotherapy compared with glimepiride in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*, *13*(4), 348-356. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2010.01356.x>
- Giani, J. F., Burghi, V., Veiras, L. C., Tomat, A., Munoz, M. C., Cao, G., Turyn, D., Toblli, J. E., & Dominici, F. P. (2012). Angiotensin-(1-7) attenuates diabetic nephropathy in Zucker diabetic fatty rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, *302*(12), F1606-1615. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00063.2012>
- Giani, J. F., Mayer, M. A., Munoz, M. C., Silberman, E. A., Hocht, C., Taira, C. A., Gironacci, M. M., Turyn, D., & Dominici, F. P. (2009). Chronic infusion of angiotensin-(1-7) improves insulin resistance and hypertension induced by a high-fructose diet in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *296*(2), E262-271. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90678.2008>
- Giordano, A., Murano, I., Mondini, E., Perugini, J., Smorlesi, A., Severi, I., Barazzoni, R., Scherer, P. E., & Cinti, S. (2013). Obese adipocytes show ultrastructural features of stressed cells and die of pyroptosis. *J Lipid Res*, *54*(9), 2423-2436. <https://doi.org/10.1194/jlr.M038638>
- Goettsch, C., Hutcheson, J. D., Hagita, S., Rogers, M. A., Creager, M. D., Pham, T., Choi, J., Mlynarchik, A. K., Pieper, B., Kjolby, M., Aikawa, M., & Aikawa, E. (2016). A single injection of gain-of-function mutant PCSK9 adeno-associated virus vector induces cardiovascular calcification in mice with no genetic modification. *Atherosclerosis*, *251*, 109-118. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.06.011>
- Gonzalez-Blazquez, R., Alcalá, M., Fernandez-Alfonso, M. S., Steckelings, U. M., Lorenzo, M. P., Viana, M., Boisvert, W. A., Unger, T., Gil-Ortega, M., & Somoza, B. (2021). C21 preserves endothelial function in the thoracic aorta from DIO mice: role for AT2, Mas and B2 receptors. *Clin Sci (Lond)*, *135*(9), 1145-1163. <https://doi.org/10.1042/CS20210049>
- Goossens, G. H., & Blaak, E. E. (2015). Adipose tissue dysfunction and impaired metabolic health in human obesity: a matter of oxygen? *Front Endocrinol (Lausanne)*, *6*, 55. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00055>
- Graninger, M., Reiter, R., Drucker, C., Minar, E., & Jilka, B. (2004). Angiotensin receptor blockade decreases markers of vascular inflammation. *J Cardiovasc Pharmacol*, *44*(3), 335-339. <https://doi.org/10.1097/01.fjc.0000137160.76616.cc>
- Gugliucci, A., & Menini, T. (2015). Paraoxonase 1 and HDL maturation. *Clin Chim Acta*, *439*, 5-13. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.09.016>
- Guimaraes, G. G., Santos, S. H., Oliveira, M. L., Pimenta-Velloso, E. P., Motta, D. F., Martins, A. S., Alenina, N., Bader, M., Santos, R. A., & Campagnole-Santos, M. J. (2012). Exercise induces renin-angiotensin system unbalance and high collagen expression in the heart of Mas-deficient mice. *Peptides*, *38*(1), 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.05.024>
- Gurley, S. B., Allred, A., Le, T. H., Griffiths, R., Mao, L., Philip, N., Haystead, T. A., Donoghue, M., Breitbart, R. E., Acton, S. L., Rockman, H. A., & Coffman, T. M. (2006). Altered blood pressure

- responses and normal cardiac phenotype in ACE2-null mice. *J Clin Invest*, 116(8), 2218-2225. <https://doi.org/10.1172/JCI16980>
- Gustaityte, V., Winkler, M., Stoelting, I., & Raasch, W. (2018). Influence of AT1 blockers on obesity and stress induced eating of cafeteria diet. *J Endocrinol*. <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0477>
- Haase, J., Weyer, U., Immig, K., Kloting, N., Bluher, M., Eilers, J., Bechmann, I., & Gericke, M. (2014). Local proliferation of macrophages in adipose tissue during obesity-induced inflammation. *Diabetologia*, 57(3), 562-571. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-3139-y>
- Habiyakare, B., Alsaadon, H., Mathai, M. L., Hayes, A., & Zulli, A. (2014). Reduction of angiotensin A and alamandine vasoactivity in the rabbit model of atherogenesis: differential effects of alamandine and Ang(1-7). *Int J Exp Pathol*, 95(4), 290-295. <https://doi.org/10.1111/iep.12087>
- Haluzik, M., Colombo, C., Gavrilova, O., Chua, S., Wolf, N., Chen, M., Stannard, B., Dietz, K. R., Le Roith, D., & Reitman, M. L. (2004). Genetic background (C57BL/6J versus FVB/N) strongly influences the severity of diabetes and insulin resistance in ob/ob mice. *Endocrinology*, 145(7), 3258-3264. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0219>
- Hammarstedt, A., Gogg, S., Hedjazifar, S., Nerstedt, A., & Smith, U. (2018). Impaired Adipogenesis and Dysfunctional Adipose Tissue in Human Hypertrophic Obesity. *Physiol Rev*, 98(4), 1911-1941. <https://doi.org/10.1152/physrev.00034.2017>
- Hammer, A., Yang, G., Friedrich, J., Kovacs, A., Lee, D. H., Grave, K., Jorg, S., Alenina, N., Grosch, J., Winkler, J., Gold, R., Bader, M., Manzel, A., Rump, L. C., Muller, D. N., Linker, R. A., & Stegbauer, J. (2016). Role of the receptor Mas in macrophage-mediated inflammation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(49), 14109-14114. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612668113>
- Han, C., Liu, J., Liu, X., & Li, M. (2010). Angiotensin II induces C-reactive protein expression through ERK1/2 and JNK signaling in human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis*, 212(1), 206-212. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.05.020>
- Hansen, P. B., Yang, T., Huang, Y., Mizel, D., Briggs, J., & Schnermann, J. (2004). Plasma renin in mice with one or two renin genes. *Acta Physiol Scand*, 181(4), 431-437. <https://doi.org/10.1111/j.1365-201X.2004.01315.x>
- Hassan, Y., Head, V., Jacob, D., Bachmann, M. O., Diu, S., & Ford, J. (2016). Lifestyle interventions for weight loss in adults with severe obesity: a systematic review. *Clin Obes*, 6(6), 395-403. <https://doi.org/10.1111/cob.12161>
- He, H., Yang, D., Ma, L., Luo, Z., Ma, S., Feng, X., Cao, T., Yan, Z., Liu, D., Tepel, M., & Zhu, Z. (2010). Telmisartan prevents weight gain and obesity through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-delta-dependent pathways. *Hypertension*, 55(4), 869-879. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.143958>
- Heni, M., Machann, J., Staiger, H., Schwenzer, N. F., Peter, A., Schick, F., Claussen, C. D., Stefan, N., Haring, H. U., & Fritsche, A. (2010). Pancreatic fat is negatively associated with insulin secretion in individuals with impaired fasting glucose and/or impaired glucose tolerance: a nuclear magnetic resonance study. *Diabetes Metab Res Rev*, 26(3), 200-205. <https://doi.org/10.1002/dmrr.1073>
- Heringer-Walther, S., Gembardt, F., Perschel, F. H., Katz, N., Schultheiss, H. P., & Walther, T. (2012). The genetic deletion of Mas abolishes salt induced hypertension in mice. *Eur J Pharmacol*, 689(1-3), 147-153. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.05.025>
- Hernandez Torres, L. D., Rezende, F., Peschke, E., Will, O., Hovener, J. B., Spiecker, F., Ozorhan, U., Lampe, J., Stolting, I., Aherrahrou, Z., Kunne, C., Kusche-Vihrog, K., Matschl, U., Hille, S., Brandes, R. P., Schwaninger, M., Muller, O. J., & Raasch, W. (2024). Incidence of microvascular dysfunction is increased in hyperlipidemic mice, reducing cerebral blood flow and impairing remote memory. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 15, 1338458. <https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1338458>
- Higaki, A., Mogi, M., Iwanami, J., Min, L. J., Bai, H. Y., Shan, B. S., Kukida, M., Yamauchi, T., Tsukuda, K., Kan-No, H., Ikeda, S., Higaki, J., & Horiuchi, M. (2018). Beneficial Effect of Mas Receptor

- Deficiency on Vascular Cognitive Impairment in the Presence of Angiotensin II Type 2 Receptor. *J Am Heart Assoc*, 7(3). <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.008121>
- Hrenak, J., Paulis, L., & Simko, F. (2016). Angiotensin A/Alamandine/MrgD Axis: Another Clue to Understanding Cardiovascular Pathophysiology. *Int J Mol Sci*, 17(7). <https://doi.org/10.3390/ijms17071098>
- Huber, G., Ogrodnik, M., Wenzel, J., Stolting, I., Huber, L., Will, O., Peschke, E., Matschl, U., Hovener, J. B., Schwaninger, M., Jurk, D., & Raasch, W. (2021). Telmisartan prevents high-fat diet-induced neurovascular impairments and reduces anxiety-like behavior. *J Cereb Blood Flow Metab*, 41(9), 2356-2369. <https://doi.org/10.1177/0271678X211003497>
- Huber, G., Schuster, F., & Raasch, W. (2017). Brain renin-angiotensin system in the pathophysiology of cardiovascular diseases. *Pharmacol Res*, 125(Pt A), 72-90. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.06.016>
- Hull, R. L., Willard, J. R., Struck, M. D., Barrow, B. M., Brar, G. S., Andrikopoulos, S., & Zraika, S. (2017). High fat feeding unmasks variable insulin responses in male C57BL/6 mouse substrains. *J Endocrinol*, 233(1), 53-64. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0377>
- Idel, S., Dansky, H. M., & Breslow, J. L. (2003). A20, a regulator of NFkappaB, maps to an atherosclerosis locus and differs between parental sensitive C57BL/6J and resistant FVB/N strains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(24), 14235-14240. <https://doi.org/10.1073/pnas.1835672100>
- Igase, M., Strawn, W. B., Gallagher, P. E., Geary, R. L., & Ferrario, C. M. (2005). Angiotensin II AT1 receptors regulate ACE2 and angiotensin-(1-7) expression in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289(3), H1013-1019. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00068.2005>
- Ikejima, H., Imanishi, T., Tsujioka, H., Kuroi, A., Kobayashi, K., Shiomi, M., Muragaki, Y., Mochizuki, S., Goto, M., Yoshida, K., & Akasaka, T. (2008). 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*, 26(5), 964-972. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e3282f52c36>
- Ishibashi, S., Goldstein, J. L., Brown, M. S., Herz, J., & Burns, D. K. (1994). Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J Clin Invest*, 93(5), 1885-1893. <https://doi.org/10.1172/JCI117179>
- Ishiyama, Y., Gallagher, P. E., Averill, D. B., Tallant, E. A., Brosnihan, K. B., & Ferrario, C. M. (2004). Upregulation of angiotensin-converting enzyme 2 after myocardial infarction by blockade of angiotensin II receptors. *Hypertension*, 43(5), 970-976. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000124667.34652.1a>
- Iwano, S., Asanuma, F., Nukaya, M., Saito, T., & Kamataki, T. (2005). CYP1A1-mediated mechanism for atherosclerosis induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochem Biophys Res Commun*, 337(2), 708-712. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.09.109>
- Jawien, J. (2012). The role of an experimental model of atherosclerosis: apoE-knockout mice in developing new drugs against atherogenesis. *Curr Pharm Biotechnol*, 13(13), 2435-2439. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22280417>
- <https://www.eurekaselect.com/article/47959>
- Jeggle, P., Callies, C., Tarjus, A., Fassot, C., Fels, J., Oberleithner, H., Jaisser, F., & Kusche-Vihrog, K. (2013). Epithelial sodium channel stiffens the vascular endothelium in vitro and in Liddle mice. *Hypertension*, 61(5), 1053-1059. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.199455>
- Jeggle, P., Hofschroer, V., Maase, M., Bertog, M., & Kusche-Vihrog, K. (2016). Aldosterone synthase knockout mouse as a model for sodium-induced endothelial sodium channel up-regulation in vascular endothelium. *FASEB J*, 30(1), 45-53. <https://doi.org/10.1096/fj.14-259606>
- Kahn, S. E., Hull, R. L., & Utzschneider, K. M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 444(7121), 840-846. <https://doi.org/10.1038/nature05482>
- Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K., & Kasuga, M. (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into

- adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest*, 116(6), 1494-1505. <https://doi.org/10.1172/JCI26498>
- Karpale, M., Hukkanen, J., & Hakkola, J. (2022). Nuclear Receptor PXR in Drug-Induced Hypercholesterolemia. *Cells*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/cells11030313>
- Kim, D. H., Gutierrez-Aguilar, R., Kim, H. J., Woods, S. C., & Seeley, R. J. (2013). Increased adipose tissue hypoxia and capacity for angiogenesis and inflammation in young diet-sensitive C57 mice compared with diet-resistant FVB mice. *Int J Obes (Lond)*, 37(6), 853-860. <https://doi.org/10.1038/ijo.2012.141>
- Kintscher, U., Bramlage, P., Paar, W. D., Thoenes, M., & Unger, T. (2007). Irbesartan for the treatment of hypertension in patients with the metabolic syndrome: a sub analysis of the Treat to Target post authorization survey. Prospective observational, two armed study in 14,200 patients. *Cardiovasc Diabetol*, 6, 12. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-6-12>
- Kishimoto, Y., Aoyama, M., Saita, E., Ikegami, Y., Ohmori, R., Kondo, K., & Momiyama, Y. (2021). Associations Between Plasma Kinin B1 Receptor Levels and the Presence and Severity of Coronary Artery Disease. *J Atheroscler Thromb*, 28(11), 1195-1203. <https://doi.org/10.5551/jat.59899>
- Klersy, T., Achner, L., Fels, B., Rezende, F., Lopez, M., Alenina, N., Spiecker, F., Stolting, I., Hauser, W., Reinberger, T., Aherrahrou, Z., Kuenne, C., Vahldieck, C., Matschl, U., Hille, S., Bader, M., Brandes, R. P., Muller, O. J., Kusche-Vihrog, K., & Raasch, W. (2025). The anti-atherosclerotic effect of chronic AT1 receptor blocker treatment also depends on the ACE2/Ang(1-7)/Mas axis. *Biomed Pharmacother*, 186, 117990. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2025.117990>
- Kotronen, A., Yki-Jarvinen, H., Sevestianova, K., Bergholm, R., Hakkarainen, A., Pietilainen, K. H., Juurinen, L., Lundbom, N., & Sorensen, T. I. (2011). Comparison of the relative contributions of intra-abdominal and liver fat to components of the metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)*, 19(1), 23-28. <https://doi.org/10.1038/oby.2010.137>
- Kotur-Stevuljivic, J., Vekic, J., Stefanovic, A., Zeljkovic, A., Ninic, A., Ivanisevic, J., Miljkovic, M., Sopic, M., Munjas, J., Mihajlovic, M., Spasic, S., Jelic-Ivanovic, Z., & Spasojevic-Kalimanovska, V. (2020). Paraoxonase 1 and atherosclerosis-related diseases. *Biofactors*, 46(2), 193-205. <https://doi.org/10.1002/biof.1549>
- Kovacs, C. S., Seshiah, V., Swallow, R., Jones, R., Rattunde, H., Woerle, H. J., Broedl, U. C., & investigators, E.-R. P. t. (2014). Empagliflozin improves glycaemic and weight control as add-on therapy to pioglitazone or pioglitazone plus metformin in patients with type 2 diabetes: a 24-week, randomized, placebo-controlled trial. *Diabetes Obes Metab*, 16(2), 147-158. <https://doi.org/10.1111/dom.12188>
- Kruithof, P. D., Lunev, S., Aguilar Lozano, S. P., de Assis Batista, F., Al-Dahmani, Z. M., Joles, J. A., Dolga, A. M., Groves, M. R., & van Goor, H. (2020). Unraveling the role of thiosulfate sulfurtransferase in metabolic diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1866(6), 165716. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165716>
- Kubota, M., Yoshida, Y., Kobayashi, E., Matsutani, T., Li, S. Y., Zhang, B. S., Mine, S., Machida, T., Takizawa, H., Hiwasa, T., & Iwadate, Y. (2021). Serum anti-SERPINE1 antibody as a potential biomarker of acute cerebral infarction. *Sci Rep*, 11(1), 21772. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01176-8>
- Kurdi, A., De Meyer, G. R., & Martinet, W. (2016). Potential therapeutic effects of mTOR inhibition in atherosclerosis. *Br J Clin Pharmacol*, 82(5), 1267-1279. <https://doi.org/10.1111/bcp.12820>
- Larsen, P. J., Jensen, P. B., Sorensen, R. V., Larsen, L. K., Vrang, N., Wulff, E. M., & Wassermann, K. (2003). Differential influences of peroxisome proliferator-activated receptors gamma and -alpha on food intake and energy homeostasis. *Diabetes*, 52(9), 2249-2259. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.9.2249>
- Laurencikienė, J., van Harmelen, V., Arvidsson Nordstrom, E., Dicker, A., Blomqvist, L., Naslund, E., Langin, D., Arner, P., & Ryden, M. (2007). NF-kappaB is important for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. *J Lipid Res*, 48(5), 1069-1077. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600471-JLR200>

- Lautner, R. Q., Vilella, D. C., Fraga-Silva, R. A., Silva, N., Verano-Braga, T., Costa-Fraga, F., Jankowski, J., Jankowski, V., Sousa, F., Alzamora, A., Soares, E., Barbosa, C., Kjeldsen, F., Oliveira, A., Braga, J., Savergnini, S., Maia, G., Peluso, A. B., Passos-Silva, D., . . . Santos, R. A. (2013). Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. *Circ Res*, *112*(8), 1104-1111. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301077>
- Lazar, M. A. (2007). Resistin- and Obesity-associated metabolic diseases. *Horm Metab Res*, *39*(10), 710-716. <https://doi.org/10.1055/s-2007-985897>
- Legchenko, E., Chouvarine, P., Borchert, P., Fernandez-Gonzalez, A., Snay, E., Meier, M., Maegel, L., Mitsialis, S. A., Rog-Zielinska, E. A., Kourembanas, S., Jonigk, D., & Hansmann, G. (2018). PPARgamma agonist pioglitazone reverses pulmonary hypertension and prevents right heart failure via fatty acid oxidation. *Sci Transl Med*, *10*(438). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aao0303>
- Leite, A. R., Borges-Canha, M., Cardoso, R., Neves, J. S., Castro-Ferreira, R., & Leite-Moreira, A. (2020). Novel Biomarkers for Evaluation of Endothelial Dysfunction. *Angiology*, *71*(5), 397-410. <https://doi.org/10.1177/0003319720903586>
- Lemos, V. S., Silva, D. M., Walther, T., Alenina, N., Bader, M., & Santos, R. A. (2005). The endothelium-dependent vasodilator effect of the nonpeptide Ang(1-7) mimic AVE 0991 is abolished in the aorta of mas-knockout mice. *J Cardiovasc Pharmacol*, *46*(3), 274-279. <https://doi.org/10.1097/01.fjc.0000175237.41573.63>
- Levenson, A. E., Shah, A. S., Khoury, P. R., Kimball, T. R., Urbina, E. M., de Ferranti, S. D., Maahs, D. M., Dolan, L. M., Wadwa, R. P., & Biddinger, S. B. (2017). Obesity and type 2 diabetes are associated with elevated PCSK9 levels in young women. *Pediatr Diabetes*, *18*(8), 755-760. <https://doi.org/10.1111/pedi.12490>
- Li, B. H., Liao, S. Q., Yin, Y. W., Long, C. Y., Guo, L., Cao, X. J., Liu, Y., Zhou, Y., Gao, C. Y., Zhang, L. L., & Li, J. C. (2015). Telmisartan-induced PPARgamma activity attenuates lipid accumulation in VSMCs via induction of autophagy. *Mol Biol Rep*, *42*(1), 179-186. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3757-6>
- Li, L., Luo, Z., Yu, H., Feng, X., Wang, P., Chen, J., Pu, Y., Zhao, Y., He, H., Zhong, J., Liu, D., & Zhu, Z. (2013). Telmisartan improves insulin resistance of skeletal muscle through peroxisome proliferator-activated receptor-delta activation. *Diabetes*, *62*(3), 762-774. <https://doi.org/10.2337/db12-0570>
- Li, X., Wu, F., Gunther, S., Looso, M., Kuenne, C., Zhang, T., Wiesnet, M., Klatt, S., Zukunft, S., Fleming, I., Poschet, G., Wietelmann, A., Atzberger, A., Potente, M., Yuan, X., & Braun, T. (2023). Inhibition of fatty acid oxidation enables heart regeneration in adult mice. *Nature*, *622*(7983), 619-626. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06585-5>
- Li, X. C., Zhang, J., & Zhuo, J. L. (2017). The vasoprotective axes of the renin-angiotensin system: Physiological relevance and therapeutic implications in cardiovascular, hypertensive and kidney diseases. *Pharmacol Res*, *125*(Pt A), 21-38. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.06.005>
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, *30*(7), 923-930. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>
- Libby, P., Buring, J. E., Badimon, L., Hansson, G. K., Deanfield, J., Bittencourt, M. S., Tokgozoglul, L., & Lewis, E. F. (2019). Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers*, *5*(1), 56. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0106-z>
- Liu, C., Lv, X. H., Li, H. X., Cao, X., Zhang, F., Wang, L., Yu, M., & Yang, J. K. (2012). Angiotensin-(1-7) suppresses oxidative stress and improves glucose uptake via Mas receptor in adipocytes. *Acta Diabetol*, *49*(4), 291-299. <https://doi.org/10.1007/s00592-011-0348-z>
- Liu, J., Hernandez, R., Li, X., Meng, Z., Chen, H., & Zhou, C. (2022). Pregnane X Receptor Mediates Atherosclerosis Induced by Dicyclohexyl Phthalate in LDL Receptor-Deficient Mice. *Cells*, *11*(7). <https://doi.org/10.3390/cells11071125>
- Lopez, M., Malacarne, P. F., Gajos-Draus, A., Ding, X., Daiber, A., Lundberg, J. O., Offermanns, S., Brandes, R. P., & Rezende, F. (2021). Vascular biotransformation of organic nitrates is

- independent of cytochrome P450 monooxygenases. *Br J Pharmacol*, 178(7), 1495-1506. <https://doi.org/10.1111/bph.15362>
- Louloudis, G., Ambrosini, S., Paneni, F., Camici, G. G., Benke, D., & Klohs, J. (2021). Adeno-Associated Virus-Mediated Gain-of-Function mPCSK9 Expression in the Mouse Induces Hypercholesterolemia, Monocytosis, Neutrophilia, and a Hypercoagulative State. *Front Cardiovasc Med*, 8, 718741. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.718741>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lovren, F., Pan, Y., Quan, A., Teoh, H., Wang, G., Shukla, P. C., Levitt, K. S., Oudit, G. Y., Al-Omran, M., Stewart, D. J., Slutsky, A. S., Peterson, M. D., Backx, P. H., Penninger, J. M., & Verma, S. (2008). Angiotensin converting enzyme-2 confers endothelial protection and attenuates atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295(4), H1377-1384. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00331.2008>
- Lum, C., Shesely, E. G., Potter, D. L., & Beierwaltes, W. H. (2004). Cardiovascular and renal phenotype in mice with one or two renin genes. *Hypertension*, 43(1), 79-86. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000107401.72456.50>
- Maase, M., Rygula, A., Pacia, M. Z., Proniewski, B., Mateuszuk, L., Sternak, M., Kaczor, A., Chlopicki, S., & Kusche-Vihrog, K. (2019). Combined Raman- and AFM-based detection of biochemical and nanomechanical features of endothelial dysfunction in aorta isolated from ApoE/LDLR-/- mice. *Nanomedicine*, 16, 97-105. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.11.014>
- Mackness, M., & Mackness, B. (2013). Targeting paraoxonase-1 in atherosclerosis. *Expert Opin Ther Targets*, 17(7), 829-837. <https://doi.org/10.1517/14728222.2013.790367>
- Mao, Y., Su, J., Lei, L., Meng, L., Qi, Y., Huo, Y., & Tang, C. (2014). Impaired regulator of G protein signaling 2 transcription facilitates vascular remodeling in injured rat aorta. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 15(7), 572-578. <https://doi.org/10.2459/JCM.0b013e3283629c30>
- Mario, E. G., Santos, S. H., Ferreira, A. V., Bader, M., Santos, R. A., & Botion, L. M. (2012). Angiotensin-(1-7) Mas-receptor deficiency decreases peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in adipocytes. *Peptides*, 33(1), 174-177. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.11.014>
- Martin, T. L., Alquier, T., Asakura, K., Furukawa, N., Preitner, F., & Kahn, B. B. (2006). Diet-induced obesity alters AMP kinase activity in hypothalamus and skeletal muscle. *J Biol Chem*, 281(28), 18933-18941. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512831200>
- Martinet, W., De Loof, H., & De Meyer, G. R. Y. (2014). mTOR inhibition: a promising strategy for stabilization of atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*, 233(2), 601-607. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.01.040>
- Matsubara, T., Mita, A., Minami, K., Hosooka, T., Kitazawa, S., Takahashi, K., Tamori, Y., Yokoi, N., Watanabe, M., Matsuo, E., Nishimura, O., & Seino, S. (2012). PGRN is a key adipokine mediating high fat diet-induced insulin resistance and obesity through IL-6 in adipose tissue. *Cell Metab*, 15(1), 38-50. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.12.002>
- Matsumoto, S., Kamide, K., Banno, F., Inoue, N., Mochizuki, N., Kawano, Y., & Miyata, T. (2010). Impact of RGS2 deficiency on the therapeutic effect of telmisartan in angiotensin II-induced aortic aneurysm. *Hypertens Res*, 33(12), 1244-1249. <https://doi.org/10.1038/hr.2010.184>
- Mekada, K., & Yoshiki, A. (2021). Substrains matter in phenotyping of C57BL/6 mice. *Exp Anim*, 70(2), 145-160. <https://doi.org/10.1538/expanim.20-0158>
- Melendez, Q. M., Krishnaji, S. T., Wooten, C. J., & Lopez, D. (2017). Hypercholesterolemia: The role of PCSK9. *Arch Biochem Biophys*, 625-626, 39-53. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.06.001>
- Merino, V. F., Todiras, M., Mori, M. A., Sales, V. M., Fonseca, R. G., Saul, V., Tenner, K., Bader, M., & Pesquero, J. B. (2009). Predisposition to atherosclerosis and aortic aneurysms in mice deficient in kinin B1 receptor and apolipoprotein E. *J Mol Med (Berl)*, 87(10), 953-963. <https://doi.org/10.1007/s00109-009-0501-0>

- Metlakunta, A. S., Sahu, M., & Sahu, A. (2008). Hypothalamic phosphatidylinositol 3-kinase pathway of leptin signaling is impaired during the development of diet-induced obesity in FVB/N mice. *Endocrinology*, *149*(3), 1121-1128. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1307>
- Miesel, A., Muller-Fielitz, H., Johren, O., Vogt, F. M., & Raasch, W. (2012). Double blockade of angiotensin II (AT(1))-receptors and ACE does not improve weight gain and glucose homeostasis better than single-drug treatments in obese rats. *Br J Pharmacol*, *165*(8), 2721-2735. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01726.x>
- Mildner, M., Muller-Fielitz, H., Stolting, I., Johren, O., Steckelings, M., & Raasch, W. (2017). Glucagon increase after chronic AT1 blockade is more likely related to an indirect leptin-dependent than to a pancreatic alpha-cell-dependent mechanism. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, *390*(5), 505-518. <https://doi.org/10.1007/s00210-017-1346-7>
- Min, B. K., Oh, C. J., Park, S., Lee, J. M., Go, Y., Park, B. Y., Kang, H. J., Kim, D. W., Kim, J. E., Yoo, E. K., Kim, H. E., Kim, M. J., Jeon, Y. H., Kim, Y. H., Lee, C. H., Jeon, J. H., & Lee, I. K. (2019). Therapeutic effect of dichloroacetate against atherosclerosis via hepatic FGF21 induction mediated by acute AMPK activation. *Exp Mol Med*, *51*(10), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0315-2>
- Monteiro, B. L., Santos, R. A. S., Mario, E. G., Araujo, T. S., Savergnini, S. S. Q., Santiago, A. F., Muzzi, R. A. L., Castro, I. C., Teixeira, L. G., Botion, L. M., Marinho, B. M., Santos, S. H. S., & Porto, L. C. J. (2022). Genetic deletion of Mas receptor in FVB/N mice impairs cardiac use of glucose and lipids. *Peptides*, *151*, 170764. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2022.170764>
- Montgomery, M. K., Hallahan, N. L., Brown, S. H., Liu, M., Mitchell, T. W., Cooney, G. J., & Turner, N. (2013). Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. *Diabetologia*, *56*(5), 1129-1139. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2846-8>
- Moriya, J. (2019). Critical roles of inflammation in atherosclerosis. *J Cardiol*, *73*(1), 22-27. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2018.05.010>
- Muller-Fielitz, H., Hubel, N., Mildner, M., Vogt, F. M., Barkhausen, J., & Raasch, W. (2014). Chronic blockade of angiotensin AT(1) receptors improves cardinal symptoms of metabolic syndrome in diet-induced obesity in rats. *Br J Pharmacol*, *171*(3), 746-760. <https://doi.org/10.1111/bph.12510>
- Muller-Fielitz, H., Landolt, J., Heidbreder, M., Werth, S., Vogt, F. M., Johren, O., & Raasch, W. (2012). Improved insulin sensitivity after long-term treatment with AT1 blockers is not associated with PPARgamma target gene regulation. *Endocrinology*, *153*(3), 1103-1115. <https://doi.org/10.1210/en.2011-0183>
- Muller-Fielitz, H., Lau, M., Geissler, C., Werner, L., Winkler, M., & Raasch, W. (2015). Preventing leptin resistance by blocking angiotensin II AT1 receptors in diet-induced obese rats. *Br J Pharmacol*, *172*(3), 857-868. <https://doi.org/10.1111/bph.12949>
- Muller-Fielitz, H., Markert, A., Wittmershaus, C., Pahlke, F., Johren, O., & Raasch, W. (2011). Weight loss and hypophagia after high-dose AT1-blockade is only observed after high dosing and depends on regular leptin signalling but not blood pressure. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, *383*(4), 373-384. <https://doi.org/10.1007/s00210-011-0602-5>
- Muller-Fielitz, H., & Raasch, W. (2013). Angiotensin II impairs glucose utilization in obese Zucker rats by increasing HPA activity via an adrenal-dependent mechanism. *Horm Metab Res*, *45*(2), 173-180. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1327679>
- Muller, T. D., Bluher, M., Tschop, M. H., & DiMarchi, R. D. (2022). Anti-obesity drug discovery: advances and challenges. *Nat Rev Drug Discov*, *21*(3), 201-223. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00337-8>
- Mulorz, J., Spin, J. M., Beck, H. C., Tha Thi, M. L., Wagenhauser, M. U., Rasmussen, L. M., Lindholt, J. S., Tsao, P. S. C., & Steffensen, L. B. (2020). Hyperlipidemia does not affect development of elastase-induced abdominal aortic aneurysm in mice. *Atherosclerosis*, *311*, 73-83. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2020.08.012>
- Murano, I., Barbatelli, G., Parisani, V., Latini, C., Muzzonigro, G., Castellucci, M., & Cinti, S. (2008). Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of

- genetically obese mice. *J Lipid Res*, 49(7), 1562-1568. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800019-JLR200>
- Myers, M. G., Cowley, M. A., & Munzberg, H. (2008). Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev Physiol*, 70, 537-556. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100707>
- Myojo, M., Nagata, D., Fujita, D., Kiyosue, A., Takahashi, M., Satonaka, H., Morishita, Y., Akimoto, T., Nagai, R., Komuro, I., & Hirata, Y. (2014). Telmisartan activates endothelial nitric oxide synthase via Ser1177 phosphorylation in vascular endothelial cells. *PLoS One*, 9(5), e96948. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096948>
- Nag, S., Khan, M. A., Samuel, P., Ali, Q., & Hussain, T. (2015). Chronic angiotensin AT2R activation prevents high-fat diet-induced adiposity and obesity in female mice independent of estrogen. *Metabolism*, 64(7), 814-825. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.01.019>
- Nakanishi, R., Tanaka, M., Nisa, B. U., Shimizu, S., Hirabayashi, T., Tanaka, M., Maeshige, N., Roy, R. R., & Fujino, H. (2023). Alternating current electromagnetic field exposure lessens intramyocellular lipid accumulation due to high-fat feeding via enhanced lipid metabolism in mice. *PLoS One*, 18(11), e0289086. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0289086>
- Nascimento-Sales, M., Fredo-da-Costa, I., Borges Mendes, A. C. B., Melo, S., Ravache, T. T., Gomez, T. G. B., Gaisler-Silva, F., Ribeiro, M. O., Santos, A. R., Jr., Carneiro-Ramos, M. S., & Christoffolete, M. A. (2017). Is the FVB/N mouse strain truly resistant to diet-induced obesity? *Physiol Rep*, 5(9). <https://doi.org/10.14814/phy2.13271>
- Neal, B., Perkovic, V., Mahaffey, K. W., de Zeeuw, D., Fulcher, G., Erondou, N., Shaw, W., Law, G., Desai, M., Matthews, D. R., & Group, C. P. C. (2017). Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*, 377(7), 644-657. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1611925>
- Ni, J., Yang, F., Huang, X. R., Meng, J., Chen, J., Bader, M., Penninger, J. M., Fung, E., Yu, X. Q., & Lan, H. Y. (2020). Dual deficiency of angiotensin-converting enzyme-2 and Mas receptor enhances angiotensin II-induced hypertension and hypertensive nephropathy. *J Cell Mol Med*, 24(22), 13093-13103. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15914>
- Nickel, L., Sunderhauf, A., Rawish, E., Stolting, I., Derer, S., Thorns, C., Matschl, U., Othman, A., Sina, C., & Raasch, W. (2022). The AT1 Receptor Blocker Telmisartan Reduces Intestinal Mucus Thickness in Obese Mice. *Front Pharmacol*, 13, 815353. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.815353>
- Nosalski, R., & Guzik, T. J. (2017). Perivascular adipose tissue inflammation in vascular disease. *Br J Pharmacol*, 174(20), 3496-3513. <https://doi.org/10.1111/bph.13705>
- Ohinata, K., Fujiwara, Y., Fukumoto, S., Iwai, M., Horiuchi, M., & Yoshikawa, M. (2008). Angiotensin II and III suppress food intake via angiotensin AT(2) receptor and prostaglandin EP(4) receptor in mice. *FEBS Lett*, 582(5), 773-777. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.01.054>
- Oliveira-Lima, O. C., Pinto, M. C., Duchene, J., Qadri, F., Souza, L. L., Alenina, N., Bader, M., Santos, R. A., & Carvalho-Tavares, J. (2015). Mas receptor deficiency exacerbates lipopolysaccharide-induced cerebral and systemic inflammation in mice. *Immunobiology*, 220(12), 1311-1321. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2015.07.013>
- Oliveira, A. C., Melo, M. B., Motta-Santos, D., Peluso, A. A., Souza-Neto, F., da Silva, R. F., Almeida, J. F. Q., Canta, G., Reis, A. M., Goncalves, G., Cerri, G., Coutinho, D., Guedes de Jesus, I. C., Guatimosim, S., Linhares, N. D., Alenina, N., Bader, M., Campagnole-Santos, M. J., & Santos, R. A. S. (2019). Genetic deletion of the alamandine receptor MRGD leads to dilated cardiomyopathy in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 316(1), H123-H133. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00075.2018>
- Osei-Owusu, P., & Blumer, K. J. (2015). Regulator of G Protein Signaling 2: A Versatile Regulator of Vascular Function. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 133, 77-92. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.02.001>
- Patel, S., Rauf, A., Khan, H., & Abu-Izneid, T. (2017). Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomed Pharmacother*, 94, 317-325. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.091>

- Peiro, C., Vallejo, S., Gembardt, F., Azcutia, V., Heringer-Walther, S., Rodriguez-Manas, L., Schultheiss, H. P., Sanchez-Ferrer, C. F., & Walther, T. (2007). Endothelial dysfunction through genetic deletion or inhibition of the G protein-coupled receptor Mas: a new target to improve endothelial function. *J Hypertens*, 25(12), 2421-2425. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e3282f0143c>
- Peled, M., Nishi, H., Weinstock, A., Barrett, T. J., Zhou, F., Quezada, A., & Fisher, E. A. (2017). A wild-type mouse-based model for the regression of inflammation in atherosclerosis. *PLoS One*, 12(3), e0173975. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173975>
- Pellegrin, M., Szostak, J., Bouzourene, K., Aubert, J. F., Berthelot, A., Nussberger, J., Laurant, P., & Mazzolai, L. (2017). Running Exercise and Angiotensin II Type I Receptor Blocker Telmisartan Are Equally Effective in Preventing Angiotensin II-Mediated Vulnerable Atherosclerotic Lesions. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 22(2), 159-168. <https://doi.org/10.1177/1074248416652235>
- Pellegrini, M., Ponzio, V., Rosato, R., Scumaci, E., Goitre, I., Benso, A., Belcastro, S., Crespi, C., De Michieli, F., Ghigo, E., Broglio, F., & Bo, S. (2020). Changes in Weight and Nutritional Habits in Adults with Obesity during the "Lockdown" Period Caused by the COVID-19 Virus Emergency. *Nutrients*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/nu12072016>
- Pereira, R. M., Dos Santos, R. A., Teixeira, M. M., Leite, V. H., Costa, L. P., da Costa Dias, F. L., Barcelos, L. S., Collares, G. B., & Simoes e Silva, A. C. (2007). The renin-angiotensin system in a rat model of hepatic fibrosis: evidence for a protective role of Angiotensin-(1-7). *J Hepatol*, 46(4), 674-681. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.10.018>
- Perry, R. J., Samuel, V. T., Petersen, K. F., & Shulman, G. I. (2014). The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 510(7503), 84-91. <https://doi.org/10.1038/nature13478>
- Pfluger-Muller, B., Oo, J. A., Heering, J., Warwick, T., Proschak, E., Gunther, S., Looso, M., Rezende, F., Fork, C., Geisslinger, G., Thomas, D., Gurke, R., Steinhilber, D., Schulz, M., Leisegang, M. S., & Brandes, R. P. (2020). The endocannabinoid anandamide has an anti-inflammatory effect on CCL2 expression in vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol*, 115(3), 34. <https://doi.org/10.1007/s00395-020-0793-3>
- Pinheiro, S. V. B., Ferreira, A. J., Kitten, G. T., da Silveira, K. D., da Silva, D. A., Santos, S. H. S., Gava, E., Castro, C. H., Magalhaes, J. A., da Mota, R. K., Botelho-Santos, G. A., Bader, M., Alenina, N., Santos, R. A. S., & Simoes, E. S. A. C. (2009). Genetic deletion of the angiotensin-(1-7) receptor Mas leads to glomerular hyperfiltration and microalbuminuria. *Kidney Int*, 75(11), 1184-1193. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.61>
- Plump, A. S., Smith, J. D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J. G., Rubin, E. M., & Breslow, J. L. (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*, 71(2), 343-353. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90362-g](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90362-g)
- Pontiroli, A. E., Miele, L., & Morabito, A. (2011). Increase of body weight during the first year of intensive insulin treatment in type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. *Diabetes Obes Metab*, 13(11), 1008-1019. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2011.01433.x>
- Price, S. L., & Bloom, S. R. (2014). Protein PYY and its role in metabolism. *Front Horm Res*, 42, 147-154. <https://doi.org/10.1159/000358343>
- Rabello Casali, K., Ravizzoni Dartora, D., Moura, M., Bertagnolli, M., Bader, M., Haibara, A., Alenina, N., Irigoyen, M. C., & Santos, R. A. (2016). Increased vascular sympathetic modulation in mice with Mas receptor deficiency. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 17(2), 1470320316643643. <https://doi.org/10.1177/1470320316643643>
- Rabelo, L. A., Xu, P., Todiras, M., Sampaio, W. O., Buttgereit, J., Bader, M., Santos, R. A., & Alenina, N. (2008). Ablation of angiotensin (1-7) receptor Mas in C57Bl/6 mice causes endothelial dysfunction. *J Am Soc Hypertens*, 2(6), 418-424. <https://doi.org/10.1016/j.jash.2008.05.003>
- Rawish, E., Nickel, L., Schuster, F., Stolting, I., Frydrychowicz, A., Saar, K., Hubner, N., Othman, A., Kuerschner, L., & Raasch, W. (2020). Telmisartan prevents development of obesity and

- normalizes hypothalamic lipid droplets. *J Endocrinol*, 244(1), 95-110. <https://doi.org/10.1530/JOE-19-0319>
- Roche-Molina, M., Sanz-Rosa, D., Cruz, F. M., Garcia-Prieto, J., Lopez, S., Abia, R., Muriana, F. J., Fuster, V., Ibanez, B., & Bernal, J. A. (2015). Induction of sustained hypercholesterolemia by single adeno-associated virus-mediated gene transfer of mutant hPCSK9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 35(1), 50-59. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303617>
- Rompe, F., Artuc, M., Hallberg, A., Alterman, M., Stroder, K., Thone-Reineke, C., Reichenbach, A., Schacherl, J., Dahlof, B., Bader, M., Alenina, N., Schwaninger, M., Zuberbier, T., Funke-Kaiser, H., Schmidt, C., Schunck, W. H., Unger, T., & Steckelings, U. M. (2010). Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation acts anti-inflammatory through epoxyeicosatrienoic acid and inhibition of nuclear factor kappaB. *Hypertension*, 55(4), 924-931. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.147843>
- Rong, X., Li, Y., Ebihara, K., Zhao, M., Naowaboot, J., Kusakabe, T., Kuwahara, K., Murray, M., & Nakao, K. (2010). Angiotensin II type 1 receptor-independent beneficial effects of telmisartan on dietary-induced obesity, insulin resistance and fatty liver in mice. *Diabetologia*, 53(8), 1727-1731. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1744-6>
- Rouillard, A. D., Gundersen, G. W., Fernandez, N. F., Wang, Z., Monteiro, C. D., McDermott, M. G., & Ma'ayan, A. (2016). The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. *Database (Oxford)*, 2016. <https://doi.org/10.1093/database/baw100>
- Rubino, D., Abrahamsson, N., Davies, M., Hesse, D., Greenway, F. L., Jensen, C., Lingvay, I., Mosenzon, O., Rosenstock, J., Rubio, M. A., Rudofsky, G., Tadayon, S., Wadden, T. A., Dicker, D., & Investigators, S. (2021). Effect of Continued Weekly Subcutaneous Semaglutide vs Placebo on Weight Loss Maintenance in Adults With Overweight or Obesity: The STEP 4 Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 325(14), 1414-1425. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.3224>
- Rubino, F., Cummings, D. E., Eckel, R. H., Cohen, R. V., Wilding, J. P. H., Brown, W. A., Stanford, F. C., Batterham, R. L., Farooqi, I. S., Farpour-Lambert, N. J., le Roux, C. W., Sattar, N., Baur, L. A., Morrison, K. M., Misra, A., Kadowaki, T., Tham, K. W., Sumithran, P., Garvey, W. T., . . . Mingrone, G. (2025). Definition and diagnostic criteria of clinical obesity. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 13(3), 221-262. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(24\)00316-4](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(24)00316-4)
- Ruscica, M., Busnelli, M., Runfola, E., Corsini, A., & Sirtori, C. R. (2019). Impact of PPAR-Alpha Polymorphisms-The Case of Metabolic Disorders and Atherosclerosis. *Int J Mol Sci*, 20(18). <https://doi.org/10.3390/ijms20184378>
- Rutkowski, J. M., Stern, J. H., & Scherer, P. E. (2015). The cell biology of fat expansion. *J Cell Biol*, 208(5), 501-512. <https://doi.org/10.1083/jcb.201409063>
- Sahara, M., Ikutomi, M., Morita, T., Minami, Y., Nakajima, T., Hirata, Y., Nagai, R., & Sata, M. (2014). Deletion of angiotensin-converting enzyme 2 promotes the development of atherosclerosis and arterial neointima formation. *Cardiovasc Res*, 101(2), 236-246. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt245>
- Sahebkar, A., Simental-Mendia, L. E., Reiner, Z., Kovanen, P. T., Simental-Mendia, M., Bianconi, V., & Pirro, M. (2017). Effect of orlistat on plasma lipids and body weight: A systematic review and meta-analysis of 33 randomized controlled trials. *Pharmacol Res*, 122, 53-65. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.05.022>
- Sahu, M., Anamthathmakula, P., & Sahu, A. (2015). Phosphodiesterase-3B-cAMP pathway of leptin signalling in the hypothalamus is impaired during the development of diet-induced obesity in FVB/N mice. *J Neuroendocrinol*, 27(4), 293-302. <https://doi.org/10.1111/jne.12266>
- Saklayen, M. G. (2018). The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep*, 20(2), 12. <https://doi.org/10.1007/s11906-018-0812-z>
- Santos, R. A. (2014). Angiotensin-(1-7). *Hypertension*, 63(6), 1138-1147. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01274>
- Santos, R. A., Campagnole-Santos, M. J., Baracho, N. C., Fontes, M. A., Silva, L. C., Neves, L. A., Oliveira, D. R., Caligiorne, S. M., Rodrigues, A. R., Gropen Junior, C., & et al. (1994). Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): evidence

- that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res Bull*, 35(4), 293-298. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(94\)90104-x](https://doi.org/10.1016/0361-9230(94)90104-x)
- Santos, R. A., Castro, C. H., Gava, E., Pinheiro, S. V., Almeida, A. P., Paula, R. D., Cruz, J. S., Ramos, A. S., Rosa, K. T., Irigoyen, M. C., Bader, M., Alenina, N., Kitten, G. T., & Ferreira, A. J. (2006). Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension*, 47(5), 996-1002. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000215289.51180.5c>
- Santos, R. A., Simoes e Silva, A. C., Maric, C., Silva, D. M., Machado, R. P., de Buhr, I., Heringer-Walther, S., Pinheiro, S. V., Lopes, M. T., Bader, M., Mendes, E. P., Lemos, V. S., Campagnole-Santos, M. J., Schultheiss, H. P., Speth, R., & Walther, T. (2003). Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(14), 8258-8263. <https://doi.org/10.1073/pnas.1432869100>
- Santos, R. A. S., Sampaio, W. O., Alzamora, A. C., Motta-Santos, D., Alenina, N., Bader, M., & Campagnole-Santos, M. J. (2018). The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiol Rev*, 98(1), 505-553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2016>
- Santos, S. H., Andrade, J. M., Fernandes, L. R., Sinisterra, R. D., Sousa, F. B., Feltenberger, J. D., Alvarez-Leite, J. I., & Santos, R. A. (2013). Oral Angiotensin-(1-7) prevented obesity and hepatic inflammation by inhibition of resistin/TLR4/MAPK/NF-kappaB in rats fed with high-fat diet. *Peptides*, 46, 47-52. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.05.010>
- Santos, S. H., Braga, J. F., Mario, E. G., Porto, L. C., Rodrigues-Machado Mda, G., Murari, A., Botion, L. M., Alenina, N., Bader, M., & Santos, R. A. (2010). Improved lipid and glucose metabolism in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1-7). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(5), 953-961. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.200493>
- Santos, S. H., Fernandes, L. R., Mario, E. G., Ferreira, A. V., Porto, L. C., Alvarez-Leite, J. I., Botion, L. M., Bader, M., Alenina, N., & Santos, R. A. (2008). Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. *Diabetes*, 57(2), 340-347. <https://doi.org/10.2337/db07-0953>
- Santos, S. H., Fernandes, L. R., Pereira, C. S., Guimaraes, A. L., de Paula, A. M., Campagnole-Santos, M. J., Alvarez-Leite, J. I., Bader, M., & Santos, R. A. (2012). Increased circulating angiotensin-(1-7) protects white adipose tissue against development of a proinflammatory state stimulated by a high-fat diet. *Regul Pept*, 178(1-3), 64-70. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2012.06.009>
- Santos, S. H., Giani, J. F., Burghi, V., Miquet, J. G., Qadri, F., Braga, J. F., Todiras, M., Kotnik, K., Alenina, N., Dominici, F. P., Santos, R. A., & Bader, M. (2014). Oral administration of angiotensin-(1-7) ameliorates type 2 diabetes in rats. *J Mol Med (Berl)*, 92(3), 255-265. <https://doi.org/10.1007/s00109-013-1087-0>
- Saravi, B., Li, Z., Lang, C. N., Schmid, B., Lang, F. K., Grad, S., Alini, M., Richards, R. G., Schmal, H., Sudkamp, N., & Lang, G. M. (2021). The Tissue Renin-Angiotensin System and Its Role in the Pathogenesis of Major Human Diseases: Quo Vadis? *Cells*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/cells10030650>
- Sasaki, T., Kuzuya, M., Nakamura, K., Cheng, X. W., Hayashi, T., Song, H., Hu, L., Okumura, K., Murohara, T., Iguchi, A., & Sato, K. (2010). AT1 blockade attenuates atherosclerotic plaque destabilization accompanied by the suppression of cathepsin S activity in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis*, 210(2), 430-437. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.12.031>
- Schleifenbaum, J. (2019). Alamandine and Its Receptor MrgD Pair Up to Join the Protective Arm of the Renin-Angiotensin System. *Front Med (Lausanne)*, 6, 107. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00107>
- Schuchard, J., Winkler, M., Stolting, I., Schuster, F., Vogt, F. M., Barkhausen, J., Thorns, C., Santos, R. A., Bader, M., & Raasch, W. (2015). Lack of weight gain after angiotensin AT1 receptor blockade in diet-induced obesity is partly mediated by an angiotensin-(1-7)/Mas-dependent pathway. *Br J Pharmacol*, 172(15), 3764-3778. <https://doi.org/10.1111/bph.13172>

- Schuster, F., Huber, G., Stolting, I., Wing, E. E., Saar, K., Hubner, N., Banks, W. A., & Raasch, W. (2018). Telmisartan prevents diet-induced obesity and preserves leptin transport across the blood-brain barrier in high-fat diet-fed mice. *Pflugers Arch*, 470(11), 1673-1689. <https://doi.org/10.1007/s00424-018-2178-0>
- Sheng, B., Truong, K., Spitler, H., Zhang, L., Tong, X., & Chen, L. (2017). The Long-Term Effects of Bariatric Surgery on Type 2 Diabetes Remission, Microvascular and Macrovascular Complications, and Mortality: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Obes Surg*, 27(10), 2724-2732. <https://doi.org/10.1007/s11695-017-2866-4>
- Shim, J., Handberg, A., Ostergren, C., Falk, E., & Bentzon, J. F. (2011). Genetic susceptibility of the arterial wall is an important determinant of atherosclerosis in C57BL/6 and FVB/N mouse strains. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(8), 1814-1820. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.229674>
- Silva, A. R., Aguilar, E. C., Alvarez-Leite, J. I., da Silva, R. F., Arantes, R. M., Bader, M., Alenina, N., Pelli, G., Lenglet, S., Galan, K., Montecucco, F., Mach, F., Santos, S. H., & Santos, R. A. (2013). Mas receptor deficiency is associated with worsening of lipid profile and severe hepatic steatosis in ApoE-knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 305(11), R1323-1330. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00249.2013>
- Skiba, D. S., Nosalski, R., Mikołajczyk, T. P., Siedlinski, M., Rios, F. J., Montezano, A. C., Jawien, J., Olszanecki, R., Korbut, R., Czesnikiewicz-Guzik, M., Touyz, R. M., & Guzik, T. J. (2017). Anti-atherosclerotic effect of the angiotensin 1-7 mimetic AVE0991 is mediated by inhibition of perivascular and plaque inflammation in early atherosclerosis. *Br J Pharmacol*, 174(22), 4055-4069. <https://doi.org/10.1111/bph.13685>
- Snijder, P. M., Frenay, A. R., de Boer, R. A., Pasch, A., Hillebrands, J. L., Leuvenink, H. G., & van Goor, H. (2015). Exogenous administration of thiosulfate, a donor of hydrogen sulfide, attenuates angiotensin II-induced hypertensive heart disease in rats. *Br J Pharmacol*, 172(6), 1494-1504. <https://doi.org/10.1111/bph.12825>
- Sontag, T. J., Krishack, P. A., Lukens, J. R., Bhanvadia, C. V., Getz, G. S., & Reardon, C. A. (2014). Apolipoprotein A-I protection against atherosclerosis is dependent on genetic background. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34(2), 262-269. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.302831>
- Sontag, T. J., & Reardon, C. A. (2014). Polymorphisms of mouse apolipoprotein A-II alter its physical and functional nature. *PLoS One*, 9(2), e88705. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088705>
- Spalding, K. L., Arner, E., Westermark, P. O., Bernard, S., Buchholz, B. A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Naslund, E., Britton, T., Concha, H., Hassan, M., Ryden, M., Frisen, J., & Arner, P. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, 453(7196), 783-787. <https://doi.org/10.1038/nature06902>
- Stegbauer, J., Thatcher, S. E., Yang, G., Bottermann, K., Rump, L. C., Daugherty, A., & Cassis, L. A. (2019). Mas receptor deficiency augments angiotensin II-induced atherosclerosis and aortic aneurysm ruptures in hypercholesterolemic male mice. *J Vasc Surg*, 70(5), 1658-1668 e1651. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2018.11.045>
- Sun, Y., Zhang, L., Cao, Y., Li, X., Liu, F., Cheng, X., Du, J., Ran, H., Wang, Z., Li, Y., Feng, Y., Liang, L., Su, W., Melgiri, N. D., Zhang, H., & Huang, R. (2023). Stroke-induced hexokinase 2 in circulating monocytes exacerbates vascular inflammation and atheroprogession. *J Thromb Haemost*, 21(6), 1650-1665. <https://doi.org/10.1016/j.jtha.2023.02.021>
- Targosz-Korecka, M., Jaglarz, M., Malek-Zietek, K. E., Gregorius, A., Zakrzewska, A., Sitek, B., Rajfur, Z., Chlopicki, S., & Szymonski, M. (2017). AFM-based detection of glycocalyx degradation and endothelial stiffening in the db/db mouse model of diabetes. *Sci Rep*, 7(1), 15951. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16179-7>
- Tesanovic, S., Vinh, A., Gaspari, T. A., Casley, D., & Widdop, R. E. (2010). Vasoprotective and atheroprotective effects of angiotensin (1-7) in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(8), 1606-1613. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.204453>

- Tetzner, A., Gebolys, K., Meinert, C., Klein, S., Uhlich, A., Trebicka, J., Villacanas, O., & Walther, T. (2016). G-Protein-Coupled Receptor MrgD Is a Receptor for Angiotensin-(1-7) Involving Adenylyl Cyclase, cAMP, and Phosphokinase A. *Hypertension*, 68(1), 185-194. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07572>
- Tetzner, A., Naughton, M., Gebolys, K., Eichhorst, J., Sala, E., Villacanas, O., & Walther, T. (2018). Decarboxylation of Ang-(1-7) to Ala(1)-Ang-(1-7) leads to significant changes in pharmacodynamics. *Eur J Pharmacol*, 833, 116-123. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.05.031>
- Teupser, D., Persky, A. D., & Breslow, J. L. (2003). Induction of atherosclerosis by low-fat, semisynthetic diets in LDL receptor-deficient C57BL/6J and FVB/NJ mice: comparison of lesions of the aortic root, brachiocephalic artery, and whole aorta (en face measurement). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23(10), 1907-1913. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000090126.34881.B1>
- Thatcher, S. E., Zhang, X., Howatt, D. A., Lu, H., Gurley, S. B., Daugherty, A., & Cassis, L. A. (2011). Angiotensin-converting enzyme 2 deficiency in whole body or bone marrow-derived cells increases atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-/- mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(4), 758-765. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.221614>
- Thomas, M. C., Pickering, R. J., Tsorotes, D., Koitka, A., Sheehy, K., Bernardi, S., Toffoli, B., Nguyen-Huu, T. P., Head, G. A., Fu, Y., Chin-Dusting, J., Cooper, M. E., & Tikellis, C. (2010). Genetic Ace2 deficiency accentuates vascular inflammation and atherosclerosis in the ApoE knockout mouse. *Circ Res*, 107(7), 888-897. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.219279>
- Tikellis, C., Bialkowski, K., Pete, J., Sheehy, K., Su, Q., Johnston, C., Cooper, M. E., & Thomas, M. C. (2008). ACE2 deficiency modifies renoprotection afforded by ACE inhibition in experimental diabetes. *Diabetes*, 57(4), 1018-1025. <https://doi.org/10.2337/db07-1212>
- Tiryaki, O., Usalan, C., Buyukhatipoglu, H., Sayiner, Z. A., & Kilisli, H. (2012). Effects of lisinopril, irbesartan, and amlodipine on the thrombogenic variables in the early and late stages of the treatment in hypertensive patients. *Clin Exp Hypertens*, 34(2), 145-152. <https://doi.org/10.3109/10641963.2011.577491>
- Tremmel, M., Gerdtham, U. G., Nilsson, P. M., & Saha, S. (2017). Economic Burden of Obesity: A Systematic Literature Review. *Int J Environ Res Public Health*, 14(4). <https://doi.org/10.3390/ijerph14040435>
- Uchiyama, T., Okajima, F., Mogi, C., Tobo, A., Tomono, S., & Sato, K. (2017). Alamandine reduces leptin expression through the c-Src/p38 MAP kinase pathway in adipose tissue. *PLoS One*, 12(6), e0178769. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178769>
- Vekic, J., Zeljkovic, A., Stefanovic, A., Jelic-Ivanovic, Z., & Spasojevic-Kalimanovska, V. (2019). Obesity and dyslipidemia. *Metabolism*, 92, 71-81. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.005>
- Vozenilek, A. E., Blackburn, C. M. R., Schilke, R. M., Chandran, S., Castore, R., Klein, R. L., & Woolard, M. D. (2018). AAV8-mediated overexpression of mPCSK9 in liver differs between male and female mice. *Atherosclerosis*, 278, 66-72. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.09.005>
- Vozenilek, A. E., Vetkoetter, M., Green, J. M., Shen, X., Traylor, J. G., Klein, R. L., Orr, A. W., Woolard, M. D., & Krzywanski, D. M. (2018). Absence of Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase in C57BL/6J Mice Exacerbates Experimental Atherosclerosis. *J Vasc Res*, 55(2), 98-110. <https://doi.org/10.1159/000486337>
- Walther, T., Balschun, D., Voigt, J. P., Fink, H., Zuschratter, W., Birchmeier, C., Ganten, D., & Bader, M. (1998). Sustained long term potentiation and anxiety in mice lacking the Mas protooncogene. *J Biol Chem*, 273(19), 11867-11873. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.19.11867>
- Walther, T., Voigt, J. P., Fink, H., & Bader, M. (2000). Sex specific behavioural alterations in Mas-deficient mice. *Behav Brain Res*, 107(1-2), 105-109. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(99\)00115-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(99)00115-1)

- Walther, T., Wessel, N., Kang, N., Sander, A., Tschöpe, C., Malberg, H., Bader, M., & Voss, A. (2000). Altered heart rate and blood pressure variability in mice lacking the Mas protooncogene. *Braz J Med Biol Res*, 33(1), 1-9. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2000000100001>
- Wang, H. H., Lee, D. K., Liu, M., Portincasa, P., & Wang, D. Q. (2020). Novel Insights into the Pathogenesis and Management of the Metabolic Syndrome. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*, 23(3), 189-230. <https://doi.org/10.5223/pghn.2020.23.3.189>
- Wang, Q., Hummler, E., Nussberger, J., Clement, S., Gabbiani, G., Brunner, H. R., & Burnier, M. (2002). Blood pressure, cardiac, and renal responses to salt and deoxycorticosterone acetate in mice: role of Renin genes. *J Am Soc Nephrol*, 13(6), 1509-1516. <https://doi.org/10.1097/01.asn.0000017902.77985.84>
- Wang, Y., Beydoun, M. A., Min, J., Xue, H., Kaminsky, L. A., & Cheskin, L. J. (2020). Has the prevalence of overweight, obesity and central obesity levelled off in the United States? Trends, patterns, disparities, and future projections for the obesity epidemic. *Int J Epidemiol*, 49(3), 810-823. <https://doi.org/10.1093/ije/dyz273>
- Wang, Y., Shoemaker, R., Powell, D., Su, W., Thatcher, S., & Cassis, L. (2017). Differential effects of Mas receptor deficiency on cardiac function and blood pressure in obese male and female mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 312(3), H459-H468. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00498.2016>
- Warnholtz, A., Ostad, M. A., Heitzer, T., Thüneke, F., Frohlich, M., Tschentscher, P., Schwedhelm, E., Boger, R., Meinertz, T., & Munzel, T. (2007). AT1-receptor blockade with irbesartan improves peripheral but not coronary endothelial dysfunction in patients with stable coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 194(2), 439-445. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.08.034>
- Wilding, J. P. H., Calanna, S., & Kushner, R. F. (2021). Once-Weekly Semaglutide in Adults with Overweight or Obesity. Reply. *N Engl J Med*, 385(1), e4. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2106918>
- Winkler, M., Bader, M., Schuster, F., Stolting, I., Binder, S., & Raasch, W. (2018). Development of obesity can be prevented in rats by chronic icv infusions of AngII but less by Ang(1-7). *Pflugers Arch*, 470(6), 867-881. <https://doi.org/10.1007/s00424-018-2117-0>
- Winkler, M., Schuchard, J., Stolting, I., Vogt, F. M., Barkhausen, J., Thorns, C., Bader, M., & Raasch, W. (2016). The brain renin-angiotensin system plays a crucial role in regulating body weight in diet-induced obesity in rats. *Br J Pharmacol*, 173(10), 1602-1617. <https://doi.org/10.1111/bph.13461>
- World Health Organisation. (2024). *Obesity and overweight* Retrieved 06.11.2024 from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Wu, L., Liu, C., Chang, D. Y., Zhan, R., Zhao, M., Man Lam, S., Shui, G., Zhao, M. H., Zheng, L., & Chen, M. (2021). The Attenuation of Diabetic Nephropathy by Annexin A1 via Regulation of Lipid Metabolism Through the AMPK/PPARalpha/CPT1b Pathway. *Diabetes*, 70(10), 2192-2203. <https://doi.org/10.2337/db21-0050>
- Wu, Q., Ortegon, A. M., Tsang, B., Doege, H., Feingold, K. R., & Stahl, A. (2006). FATP1 is an insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity. *Mol Cell Biol*, 26(9), 3455-3467. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.9.3455-3467.2006>
- Wu, X., Pan, X., Zhou, Y., Pan, J., Kang, J., Yu, J. J. J., Cao, Y., Quan, C., Gong, L., & Li, Y. (2024). Identification of key genes for atherosclerosis in different arterial beds. *Sci Rep*, 14(1), 6543. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-55575-8>
- Xiao, L., Zhang, Z., & Luo, X. (2014). Roles of xenobiotic receptors in vascular pathophysiology. *Circ J*, 78(7), 1520-1530. <https://doi.org/10.1253/circj.cj-14-0343>
- Xiao, X., Yang, C., Qu, S. L., Shao, Y. D., Zhou, C. Y., Chao, R., Huang, L., & Zhang, C. (2020). S100 proteins in atherosclerosis. *Clin Chim Acta*, 502, 293-304. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.11.019>
- Xu, P., Costa-Goncalves, A. C., Todiras, M., Rabelo, L. A., Sampaio, W. O., Moura, M. M., Santos, S. S., Luft, F. C., Bader, M., Gross, V., Alenina, N., & Santos, R. A. (2008). Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in MAS gene-deleted mice. *Hypertension*, 51(2), 574-580. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.102764>

- Yamada, S., Koike, T., Nakagawa, T., Kuniyoshi, N., Ying, Y., Itabe, H., Yamashita, A., Asada, Y., & Shiomi, M. (2017). Morphological features of coronary plaques in WHHLMI rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), an animal model for familial hypercholesterolemia. *Exp Anim*, 66(2), 145-157. <https://doi.org/10.1538/expanim.16-0078>
- Yan, Z. C., Liu, D. Y., Zhang, L. L., Shen, C. Y., Ma, Q. L., Cao, T. B., Wang, L. J., Nie, H., Zidek, W., Tepel, M., & Zhu, Z. M. (2007). Exercise reduces adipose tissue via cannabinoid receptor type 1 which is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-delta. *Biochem Biophys Res Commun*, 354(2), 427-433. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.213>
- Yang, G., Istas, G., Hoges, S., Yakoub, M., Hendgen-Cotta, U., Rassaf, T., Rodriguez-Mateos, A., Hering, L., Grandoch, M., Mergia, E., Rump, L. C., & Stegbauer, J. (2018). Angiotensin-(1-7)-induced Mas receptor activation attenuates atherosclerosis through a nitric oxide-dependent mechanism in apolipoproteinE-KO mice. *Pflugers Arch*, 470(4), 661-667. <https://doi.org/10.1007/s00424-018-2108-1>
- Yasar Yildiz, S., Kuru, P., Toksoy Oner, E., & Agirbasli, M. (2014). Functional stability of plasminogen activator inhibitor-1. *ScientificWorldJournal*, 2014, 858293. <https://doi.org/10.1155/2014/858293>
- Yerevanian, A., & Soukas, A. A. (2019). Metformin: Mechanisms in Human Obesity and Weight Loss. *Curr Obes Rep*, 8(2), 156-164. <https://doi.org/10.1007/s13679-019-00335-3>
- Yu, X. H., Zheng, X. L., & Tang, C. K. (2015). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha in Lipid Metabolism and Atherosclerosis. *Adv Clin Chem*, 71, 171-203. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2015.06.005>
- Yuen, C. Y., Wong, W. T., Tian, X. Y., Wong, S. L., Lau, C. W., Yu, J., Tomlinson, B., Yao, X., & Huang, Y. (2011). Telmisartan inhibits vasoconstriction via PPARgamma-dependent expression and activation of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res*, 90(1), 122-129. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq392>
- Yvan-Charvet, L., Massiera, F., Lamande, N., Ailhaud, G., Teboul, M., Moustaid-Moussa, N., Gasc, J. M., & Quignard-Boulangé, A. (2009). Deficiency of angiotensin type 2 receptor rescues obesity but not hypertension induced by overexpression of angiotensinogen in adipose tissue. *Endocrinology*, 150(3), 1421-1428. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1120>
- Zeng, W. T., Chen, W. Y., Leng, X. Y., Tang, L. L., Sun, X. T., Li, C. L., & Dai, G. (2012). Impairment of cardiac function and remodeling induced by myocardial infarction in rats are attenuated by the nonpeptide angiotensin-(1-7) analog AVE 0991. *Cardiovasc Ther*, 30(3), 152-161. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5922.2010.00255.x>
- Zhang, C., Zhao, Y. X., Zhang, Y. H., Zhu, L., Deng, B. P., Zhou, Z. L., Li, S. Y., Lu, X. T., Song, L. L., Lei, X. M., Tang, W. B., Wang, N., Pan, C. M., Song, H. D., Liu, C. X., Dong, B., Zhang, Y., & Cao, Y. (2010). Angiotensin-converting enzyme 2 attenuates atherosclerotic lesions by targeting vascular cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(36), 15886-15891. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001253107>
- Zhang, P., & Mende, U. (2014). Functional role, mechanisms of regulation, and therapeutic potential of regulator of G protein signaling 2 in the heart. *Trends Cardiovasc Med*, 24(2), 85-93. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2013.07.002>
- Zhang, X., Lv, H., Mei, J., Ji, B., Huang, S., & Li, X. (2022). The Potential Role of R4 Regulators of G Protein Signaling (RGS) Proteins in Type 2 Diabetes Mellitus. *Cells*, 11(23). <https://doi.org/10.3390/cells11233897>
- Zhao, L., Cozzo, A. J., Johnson, A. R., Christensen, T., Freemerman, A. J., Bear, J. E., Rotty, J. D., Bennett, B. J., & Makowski, L. (2017). Lack of myeloid Fatp1 increases atherosclerotic lesion size in Ldlr(-/-) mice. *Atherosclerosis*, 266, 182-189. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.10.009>
- Ziaja, M., Urbanek, K. A., Kowalska, K., & Piastowska-Ciesielska, A. W. (2021). Angiotensin II and Angiotensin Receptors 1 and 2-Multifunctional System in Cells Biology, What Do We Know? *Cells*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/cells10020381>
- Zurita, E., Chagoyen, M., Cantero, M., Alonso, R., Gonzalez-Neira, A., Lopez-Jimenez, A., Lopez-Moreno, J. A., Landel, C. P., Benitez, J., Pazos, F., & Montoliu, L. (2011). Genetic

polymorphisms among C57BL/6 mouse inbred strains. *Transgenic Res*, 20(3), 481-489.
<https://doi.org/10.1007/s11248-010-9403-8>

7 Anhang

7.1 Ergebnisse Vorstudie

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der Vorstudie dargestellt. Weil zwei Autoren zu gleichen Anteilen an der Durchführung der Vorstudie beteiligt waren, erfolgt die Darstellung hier und nicht am Hauptteil dieser Arbeit. Für die Vorstudie erhielten 24 männliche C57BL/6N Mäuse zu Versuchsbeginn unterschiedliche Viruslasten eines PCSK9^{DY}-AAV zur Induktion von Atherosklerose in die Schwanzvene injiziert und wurden über zwölf Wochen mit Western Diät gefüttert. Es wurden Körpergewicht, Masseverteilung, Lipidprofil, atherosklerotische Plaques histologisch und die endotheliale Funktion der thorakalen Aorta mittels AFM untersucht.

7.1.1 Körpergewicht und Masseverteilung

Zu Beginn des Versuchs unterschied sich das Gewicht der Mäuse nicht (Kontrolle: $24,4 \pm 1,2$ g; Viruslast $0,5 \times 10^{11}$: $23,6 \pm 1,5$ g; Viruslast 1×10^{11} : $24,1 \pm 0,9$ g; Viruslast 5×10^{11} : $24,7 \pm 1,3$). Über den Beobachtungszeitraum nahmen alle vier Gruppen um mindestens 55% an Körpergewicht zu. Dabei war die Gewichtszunahme bei Virusinjektion signifikant reduziert und Mäuse zeigten ein um knapp 10% geringeres Körpergewicht als die Kontrollgruppe ($42,5 \pm 0,9$ g; $38,5 \pm 0,5$ g; $38,9 \pm 1,2$ g; $38,4 \pm 1,6$ g; Abbildung 7-1 A).

Zur Untersuchung der Masseverteilung erfolgte nach elf Wochen eine Nuklear-Magnet-Resonanz-Spektroskopie. Virusinjizierte Mäuse zeigten eine signifikante Reduktion der Fettmasse um bis zu 22% (Abbildung 7-1 B), während die fettfreie Masse unverändert blieb (Abbildung 7-1 C) und die freie Körperflüssigkeit nur tendenziell verringert wurde (Abbildung 7-1 D). Die Gewichtsreduktion nach Virusinjektion war folglich überwiegend auf eine Reduktion der Fettmasse zurückzuführen.

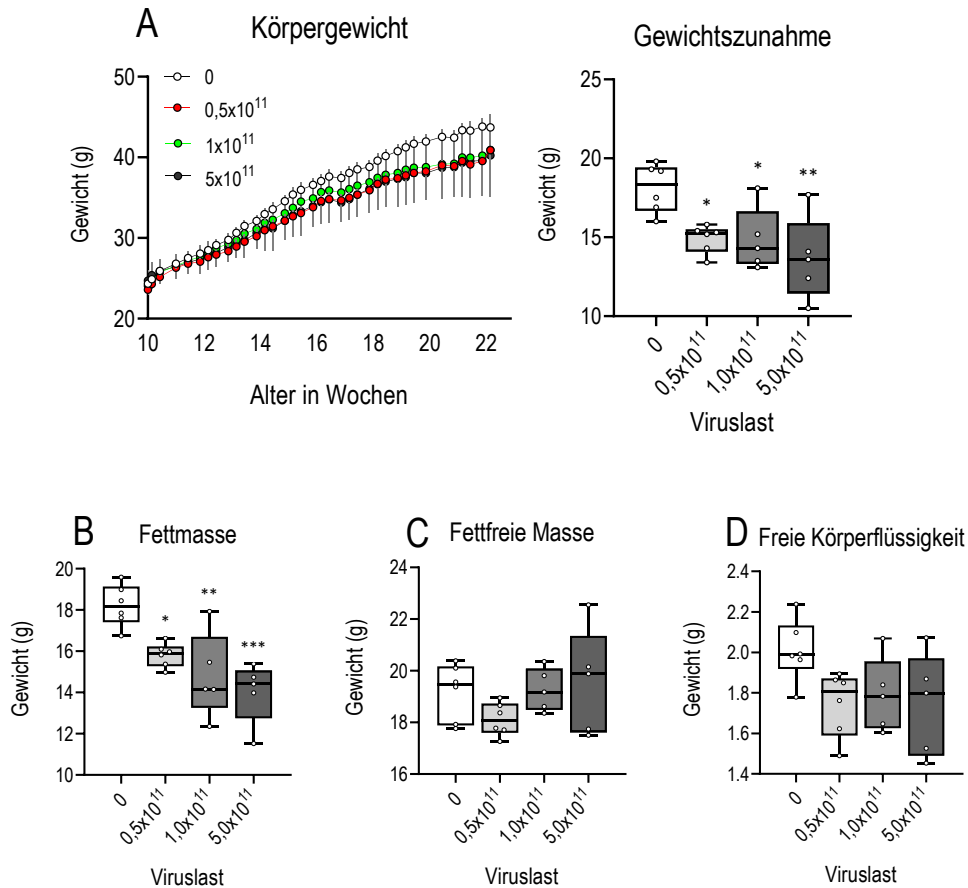


Abbildung 7-1: Körpergewicht und Masseverteilung. Mäuse wurden über zwölf Wochen mit Western Diät gefüttert. Zu Beginn erfolgte die einmalige Injektion unterschiedlicher Viruslasten eines PCSK9^{DY}-AAV in die Schwanzvene. (A) Gewichtsverlauf und absolute Gewichtszunahme am Ende des Beobachtungszeitraum (F=6,272; p=0,0042). (B) Fettmasse (F=10,23; p=0,0004). (C) Fettfreie Masse (F=1,466; p=0,2573). (D) Freie Körperflüssigkeit (F=2,625; p=0,0820). Dargestellt sind Median, 25% und 75%-Perzentile als Boxplot. Die Antennen stellen Maximum und Minimum dar. Statistische Testung mittels 1way-ANOVA und Tukey's multiple comparison test. n=5-6. *, **, *** p<0.05, <0.01, <0.001 vs. Viruslast 0. †, ††, ††† p<0.05, <0.01, <0.001 vs. Viruslast 0,5x10¹¹.

7.1.2 Lipidprofil

Nach sechs und zwölf Wochen erfolgte eine retroorbitale Blutentnahme zur Bestimmung von Cholesterin und Triglyceriden. Durch Injektion des PCSK9^{DY}-AAV entwickelten sich deutliche Steigerungen der Cholesterin- und Triglycerid-Spiegel (Abbildung 7-2 A-B). Bereits nach sechs Wochen hatten im Vergleich zur Kontrollgruppe alle Virusgruppen signifikant höhere, mehr als verdoppelte Cholesterinwerte. Dabei unterschieden sich die Virusgruppen untereinander nicht signifikant. Die Triglyceride waren in den Virusgruppen gegenüber der Kontrollgruppe nach sechs Wochen ebenfalls gesteigert, in den beiden Gruppen mit der höchsten Viruslast signifikant und mehr als verdoppelt.

Nach zwölf Wochen blieben die Cholesterin- und Triglyceridwerte in der Kontrollgruppe konstant, ebenso die bereits erhöhten Triglyceride in zwei Virusgruppen. Nur in der Gruppe der höchsten Viruslast konnten die Triglyceride noch einmal leicht gesteigert werden und waren nun auch gegenüber der niedrigsten Viruslast signifikant erhöht. Die Cholesterinwerte hingegen konnten gegenüber der ersten Blutentnahme in allen Virusgruppen gesteigert werden, in den beiden Gruppen mit den höchsten Viruslasten deutlich (Abbildung 7-2 A-B). Nach zwölf Wochen erreichten diese Gruppen ähnliche Werte von knapp über 1000 mg/dl und damit signifikant höhere als die Kontrollgruppe und auch als die Gruppe mit der niedrigsten Viruslast.

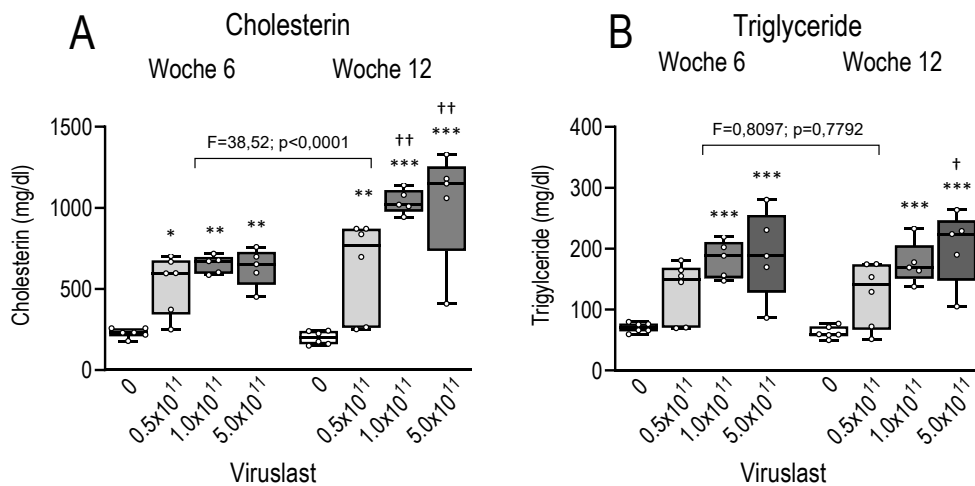


Abbildung 7-2: Lipidprofil. Charakterisierung des Lipidprofils nach sechs und zwölf Wochen WD und unterschiedlicher Viruslast PCSK9^{DY}-AAV. (A) Plasma-Cholesterin, Interaktion: F=9,561, p=0,0005; Zeit: F=38,52, p<0,0001; Viruslast: F=17,75, p<0,0001; Subjekt: F=4,252, p=0,0018. (B) Plasma-Triglyceride, Interaktion: F=0,3652, p=0,7790; Zeit: F=0,08097, p=0,7792; Viruslast: F=11,36, p=0,0002; Subjekt: F=5,863, p=0,0002. Dargestellt sind Median, 25% und 75%-Perzentile als Boxplot. Die Antennen stellen Maximum und Minimum dar. Statistische Testung mittels 2wayRM-ANOVA und Tukey's multiple comparison test. n=5-6. *, **, *** p<0.05, <0.01, <0.001 vs. Viruslast 0. †, ††, ††† p<0.05, <0.01, <0.001 vs. Viruslast 0,5x10¹¹.

7.1.3 Histologische Analyse atherosklerotischer Plaques

Nach Tötung und Organentnahme wurden Kryostatschnitte der aufsteigenden Aorta angefärbt, um sie auf atherosklerotische Läsionen zu untersuchen. Die Kontrollgruppe entwickelte keine Plaques. Nach Virusinjektion entwickelten die Mäuse Plaques, die eine dosisabhängig vergrößerte Fläche einnahmen. Dabei zeigten insbesondere die beiden höchsten Viruslasten signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Abbildung 7-3 A+B). Je höher die Viruslast, desto größer war der Fettinhalt in der Plaque. Die beiden Gruppen mit der höchsten Viruslast zeigten signifikant mehr Fettinhalt in der Plaque als die Kontrolle (Abbildung 7-3 C). Es zeigten sich starke positive Korrelationen zwischen Plaqueinhalt und Fettinhalt, zwischen Cholesterin und Plaqueinhalt sowie zwischen Triglyceriden und Plaqueinhalt (Abbildung 7-3 D-F).

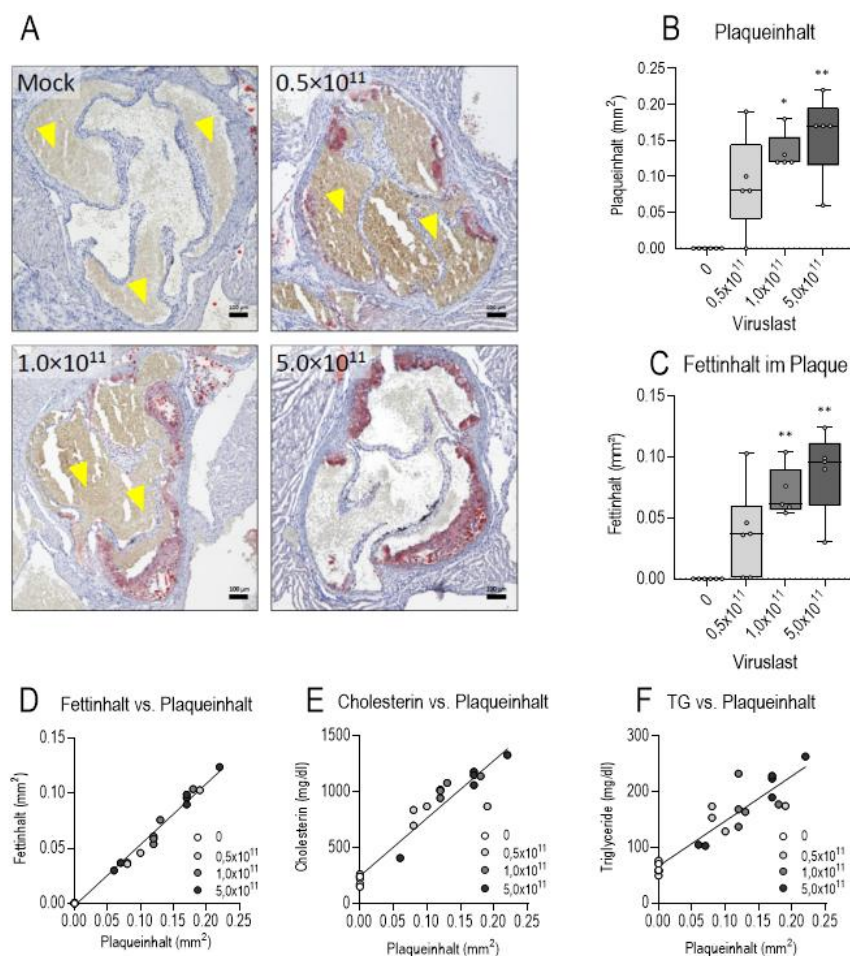


Abbildung 7-3: Plaque-Histologie. (A) Oil Red O Färbung. (B) Plaqueinhalt (H=13,13; p=0,0044). (C) Fettinhalt (H=15,20, p=0,0017). (D) Korrelation zwischen Fettinhalt und Plaqueinhalt (r=0,9936; p<0,0001). (E) Korrelation zwischen Cholesterin nach zwölf Wochen und Plaqueinhalt (r=0,9543; p<0,0001). (F) Korrelation zwischen Triglyceriden nach zwölf Wochen und Plaqueinhalt (r=0,9185; p<0,0001). Dargestellt sind Median, 25% und 75%-Perzentile als Boxplot. Die Antennen stellen Maximum und Minimum dar. Statistische Testung mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's multiple comparison test bei fehlender Normalverteilung. Die Korrelationsanalyse erfolgte mittels 2-tailed Pearson-Test. n=5-6. *, **, *** p<0.05, <0.01, <0.001 vs. Viruslast 0. †, ††, ††† p<0.05, <0.01, <0.001 vs. Viruslast 0,5x10¹¹.

7.1.4 Endotheliale Funktion der thorakalen Aorta

Zur funktionellen Beurteilung des Endothels wurden Präparate der thorakalen Aorta mit Hilfe des AFM bezüglich der kortikalen Steifigkeit untersucht. Erfolgte der Vergleich zellbasiert, war die kortikale Steifigkeit in allen Virusgruppen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Die drei Virusgruppen unterschieden sich nicht (Kontrolle: $1,306 \pm 0,1499$ pN/nm; Viruslast $0,5 \times 10^{11}$: $1,414 \pm 0,1452$ pN/nm; Viruslast 1×10^{11} : $1,43 \pm 0,1434$ pN/nm; Viruslast 5×10^{11} : $1,413 \pm 0,1574$ pN/nm; $p < 0,0001$; Abbildung 3-1 A). Auch bei versuchstierbasierter Analyse war die kortikale Steifigkeit nach Virusinjektion signifikant gesteigert (Kontrolle: $1,305 \pm 0,03613$ pN/nm; Viruslast $0,5 \times 10^{11}$: $1,416 \pm 0,04708$ pN/nm; Viruslast 1×10^{11} : $1,43 \pm 0,03849$ pN/nm; Viruslast 5×10^{11} : $1,414 \pm 0,03562$ pN/nm; $p = 0,0001$; Abbildung 3-1 B). Die kortikale Steifigkeit korrelierte stark positiv mit Cholesterin- und Triglyceridwerten sowie dem Plaque- und Fettinhalt (Abbildung 3-1 C-F).

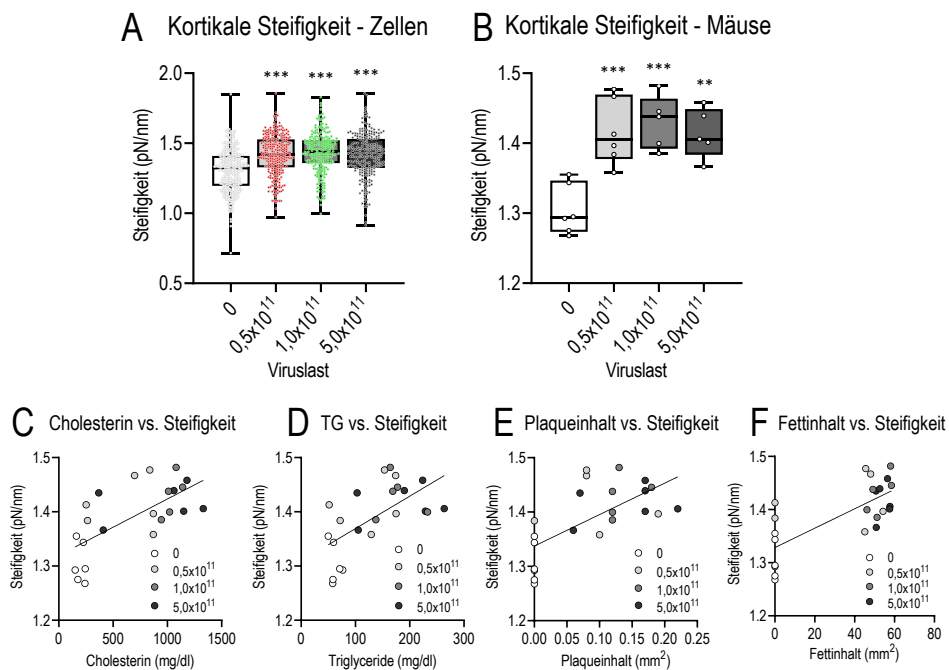


Abbildung 7-4: Endotheliale Funktion der thorakalen Aorta. (A) Kortikale Steifigkeit aller Endothelzellen. Die Punkte stellen den Mittelwert aus acht Einzelmessungen einer Endothelzelle dar, $n=310, 290, 249, 240$ ($H=118,4$; $p < 0,0001$). (B) Kortikale Steifigkeit pro Maus. Die Antennen stellen Maximum und Minimum dar. Die Punkte stellen den Mittelwert der kortikalen Steifigkeit einer Maus dar, $n=5-6$ ($F=12,24$; $p=0,0001$). (C) Korrelation zwischen Cholesterin nach zwölf Wochen und kortikaler Steifigkeit ($r=0,6734$; $p=0,0004$). (D) Korrelation zwischen Triglyceriden nach zwölf Wochen und kortikaler Steifigkeit ($r=0,6271$; $p=0,0014$). (E) Korrelation zwischen Plaqueinhalt und kortikaler Steifigkeit ($r=0,6649$; $p=0,0007$). (F) Korrelation zwischen Fettinhalt und kortikaler Steifigkeit ($r=0,7356$; $p < 0,0001$). Dargestellt sind Median, 25% und 75%-Perzentile als Boxplot. Die Antennen stellen Maximum und Minimum dar. Statistische Analyse mittels 1way-ANOVA mit Tukey's multiple comparison test (F) oder Kruskal-Wallis-Test (H) mit Dunn's multiple comparison test bei fehlender Normalverteilung. Korrelationsanalyse erfolgte mittels 2-tailed Pearson-Test. *, **, *** $p < 0,05, < 0,01, < 0,001$ vs. Viruslast 0. †, ††, ††† $p < 0,05, < 0,01, < 0,001$ vs. Viruslast $0,5 \times 10^{11}$.

7.2 Ergebnisse Hauptstudie

Im Folgenden werden aus Gründen der Übersichtlichkeit weitere Ergebnisse der Hauptstudie dargestellt. An den entsprechenden Stellen im Hauptteil wird an die hier folgende Darstellung verwiesen.

7.2.1 Ausgangswerte vor Versuchsbeginn

Parameter	Wildtyp	Mas ko	p-Wert
Gewicht (g)	26,2±1,2	25,5±2,1	p=0,0746
Blutglukose (mg/dl)	151,1±31,5	159,4±18,9	p=0,1808
Cholesterin (mg/dl)	109,9±21,3	103,4±16,5	p=0,1603
Triglyceride (mg/dl)	74±17,7	51,6±10,4*	p<0,0001
Leptin (ng/dl)	463±202	240±173*	p=0,016

Tabelle 7-1: Vergleich der Ausgangswerte vor Versuchsbeginn zwischen wt und Mas ko.

7.2.2 Vergleich der Kontrollgruppen nach Versuchsende

Gewicht & Masseverteilung	Wildtyp	Mas ko	p-Wert
Gewicht (g)	29,5±1,7	29,4±1,8	p=0,8790
Gewichtszunahme (g)	3,6±1,1	4,4±0,9	p=0,0669
Fettmasse (g)	5,9±1,1	5,3±0,8	p=0,1246
fettfreie Masse (g)	17,2±0,8	18,2±1,2*	p=0,0329
freie Körperflüssigkeit (g)	1,05±0,11	1,01±0,09	p=0,5961
Hormonprofil			
Leptin (pg/ml)	1296±595,4	699±108,4*	p=0,0294
Resistin (pg/ml)	1806±204,9	2045±458,7	p=0,1268
Ghrelin (pg/ml)	44,95±14,81	58,33±18,26	p=0,0868
PYY (pg/ml)	109,2±11,96	109,2±46,32	p=0,9979
Glukosestoffwechsel			
Blutglukose (mg/dl)	135,9±18,7	163,9±13,8*	p=0,0006
Insulin (pg/ml)	164,8±81,3	89±75,9*	p=0,0206
C-Peptid (pg/ml)	368,5±210,5	132,4±66,7*	p=0,0013
HOMA	1,49±0,76	1,23±1,04	p=0,2104
Glucagon (pg/ml)	89,6±16,1	69,1±47,1*	p=0,0196
GIP (pg/ml)	398±97	413±195	p=0,5249
GLP1 (pg/ml)	25,1±6,1	33,3±12,9	p=0,1741
Sekretin (pg/ml)	59,5±11,1	100,1±46,7*	p=0,0117
Amylin (pg/ml)	29,7±6,5	23,5±11,1	p=0,3251
Cytokinprofil			
MCP1 (pg/ml)	19,3±2	19,8±4,3	p=0,7520
TNFa (pg/ml)	12,8±1,6	13,2±2,0	p=0,6758
IFNy (pg/ml)	13,3±3,2	14,8±2,7	p=0,2826
KC (pg/ml)	1274±624,1	1584±1007	p=0,5899
MIP2 (pg/ml)	11,7±1,4	13,7±2,9*	p=0,0487

LIX (pg/ml)	1152±404	1934±1595	p=0,1296
IL6 (pg/ml)	14,5±1,4	15,8±2,7	p=0,157
IL10 (pg/ml)	13,6±1,4	12,7±1,6	p=0,1751
IL12p70 (pg/ml)	10,9±1,7	11,7±1,6	p=0,2861
Lipidprofil & Histologie			
Cholesterin (mg/dl)	140,1±21,6	130,7±18,1	p=0,2597
Triglyceride (mg/dl)	73,4±21,9	60,1±15,6	p=0,1014
Plaueinhalt (mm ²)	0,00025±0,0006	0,003±0,004*	p=0,0072
Fettinhalt (mm ²)	0±0	0±0	p>0,9999
Aortendurchmesser (mm)	0,284±0,024	0,263±0,014*	p=0,0152
Aortenlumen (mm ²)	2,692±0,419	2,292±0,235*	p=0,0086
Aortenmedia (mm ²)	0,264±0,083	0,34±0,03*	p=0,0432
Endotheliale Funktion der thorakalen Aorta			
Cortex (pN/nm)	1,318±0,039	1,384±0,034*	p=0,0004
Glykokalix (pN/nm)	0,4042±0,1412	0,4033±0,0939	p=0,9864
Glykokalix (nm)	112,3±23,06	111,3±25,21	p=0,9221
Nitrit (nM)	412,5±127,9	238,4±52,89*	p=0,0007

Tabelle 7-2: Vergleich zwischen den Kontrollgruppen wt vs. Mas ko nach Versuchsende

7.2.3 Hormonprofil

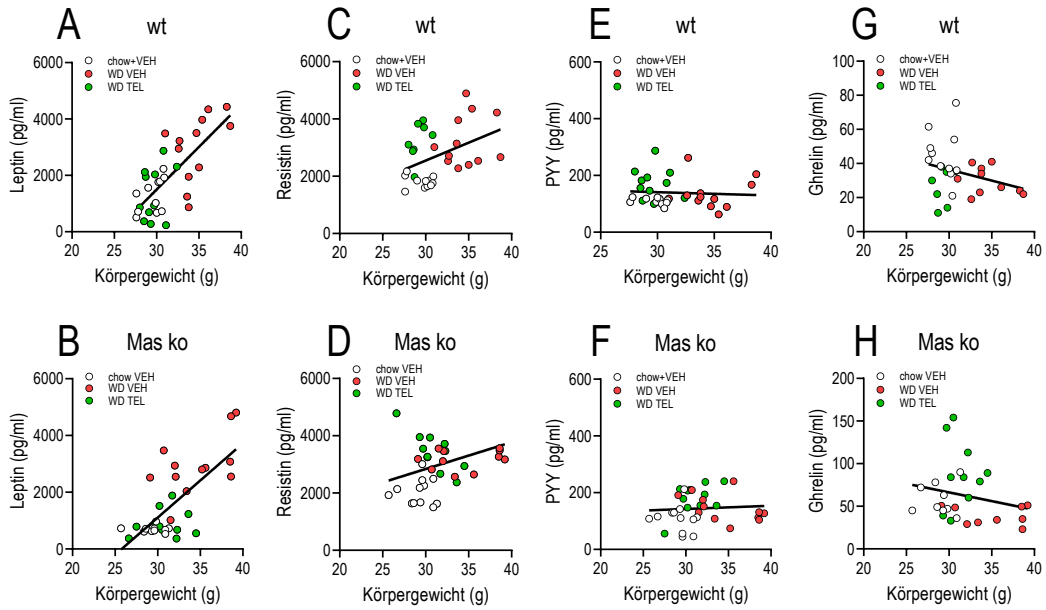


Abbildung 7-5: Hormonprofil. Korrelationen zwischen Körpergewicht und Plasmaspiegeln von Hormonen mit Einfluss auf die Nahrungsaufnahme nach Leervektor- oder Virusinjektion, zwölf Wochen Fütterung mit chow oder WD, täglichem Wiegen und Behandlung Vehikel oder TEL. chow VEH (weiß), WD VEH (rot), WD TEL (grün). (A+B) Korrelation zwischen finalelem Körpergewicht und Leptin: Wt: $r=0,7312$; $p<0,0001$; Mas ko: $r=0,7221$; $p<0,0001$. (C+D) Korrelation zwischen finalelem Körpergewicht und Resistin: Wt: $r=0,4095$; $p=0,0222$; Mas ko: $r=0,2952$; $p=0,0852$. (E+F) Korrelation zwischen finalelem Körpergewicht und PYY: Wt: $r=-0,0662$; $p=0,7143$; Mas ko: $r=0,0682$; $p=0,6972$. (G+H) Korrelation zwischen finalelem Körpergewicht und Ghrelin: Wt: $r=-0,2837$; $p=0,1435$; Mas ko: $r=-0,2232$; $p=0,2537$. Korrelationsanalyse erfolgte mittels 2-tailed Pearson-Test.

7.2.4 Glukosestoffwechsel

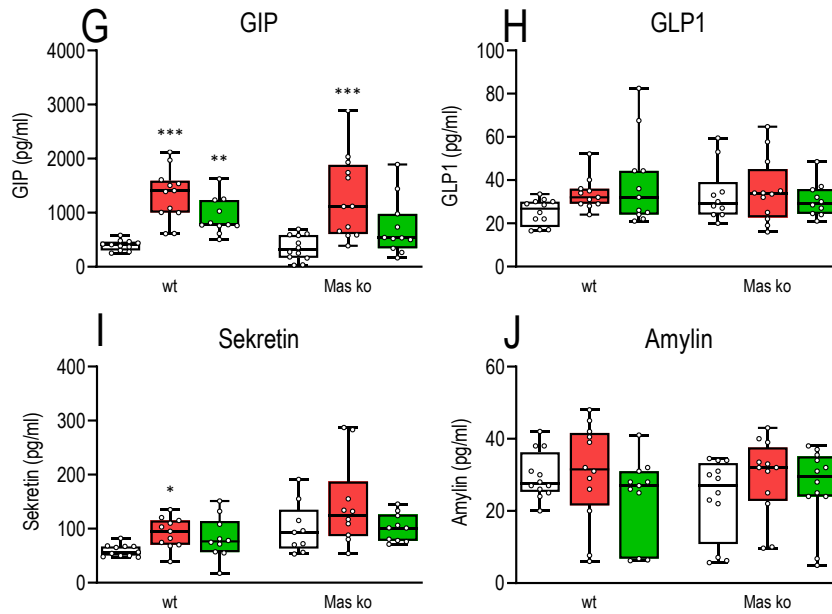


Abbildung 7-6: Glukosestoffwechsel. Am Ende des Beobachtungszeitraums wurden Plasmaspiegel von Hormonen des Glukosestoffwechsels erhoben. chow VEH (weiß), WD VEH (rot), WD TEL (grün). (G) GIP. (H) GLP1. (I) Sekretin. (J) Amylin. Dargestellt sind Median, 25% und 75%-Perzentile als Boxplot. Die Antennen stellen Maximum und Minimum dar. Die Berechnungen erfolgten nach Mauslinie getrennt, bei Normalverteilung mittels 1way-ANOVA mit Tukey's multiple comparison test, bei fehlender Varianzhomogenität mittels Brown-Forsythe-ANOVA mit Dunnett's T3 multiple comparison test und bei fehlender Normalverteilung mittels Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multiple comparison test. n=7-12. *, **, *** $p < 0.05$, < 0.01 , < 0.001 vs. chow VEH. †, ††, ††† $p < 0.05$, < 0.01 , < 0.001 vs. WD VEH.

7.2.5 Histologische Untersuchung

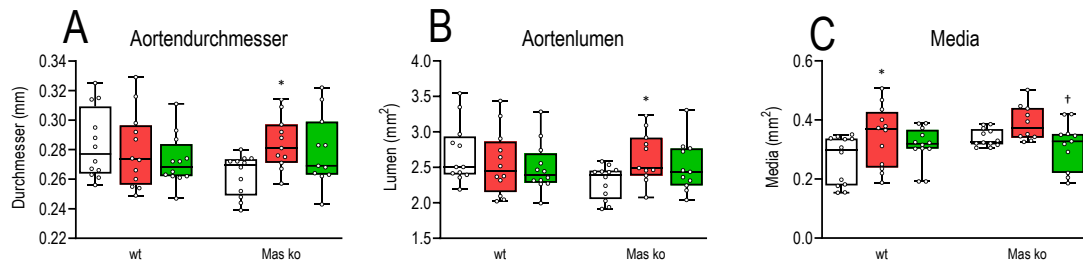


Abbildung 7-7: Histologische Untersuchung. Nach Tötung erfolgten Entnahme, Färbung und histologische Untersuchung der aufsteigenden Aorta. chow VEH (weiß), WD VEH (rot), WD TEL (grün). (A) Aortendurchmesser (B) Aortenlumen. (C) Media. Dargestellt sind Median, 25% und 75%-Perzentile als Boxplot. Die Berechnungen der histologischen Untersuchung erfolgten nach Mauslinie getrennt, bei Normalverteilung mittels 1way-ANOVA mit Tukey's multiple comparison test, bei fehlender Varianzhomogenität mittels Brown-Forsythe-ANOVA mit Dunnett's T3 multiple comparison test und bei fehlender Normalverteilung mittels Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multiple comparison test. n=7-12. *, **, *** $p < 0.05$, < 0.01 , < 0.001 vs. chow VEH. †, ††, ††† $p < 0.05$, < 0.01 , < 0.001 vs. WD VEH.

7.2.6 RNA-Sequenzierung der abdominalen Aorta

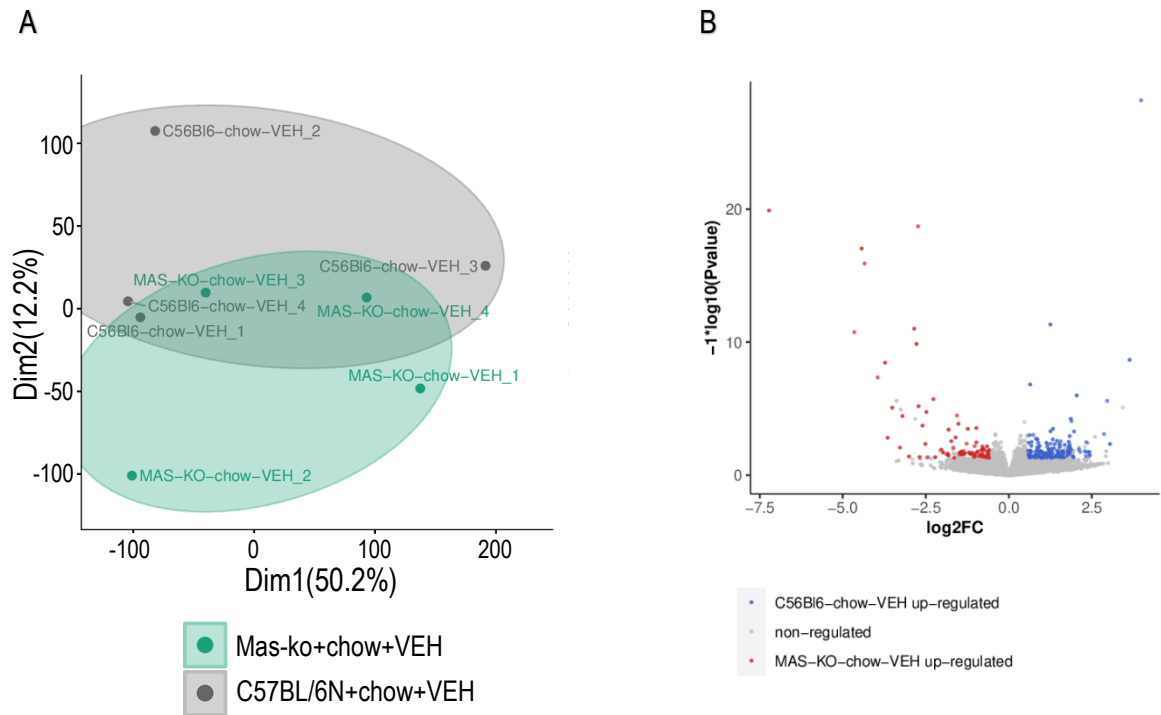


Abbildung 7-8: RNA-Sequenzierung der abdominalen Aorta. (A) *Principal component analysis* (PCA) durch FactoMineR ermittelt zwei Gengruppen (=Dimensionen), die die größten Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Gruppen beinhalten. Es erfolgte der Vergleich wt chow VEH vs. Mas chow VEH. (B) *Volcano plot* mit den Signifikanzgrenzen $FDR \leq 0,05$ sowie $-0,585 < \log_2FC < 0,585$. Es erfolgt der Vergleich wt chow VEH vs. Mas chow VEH.

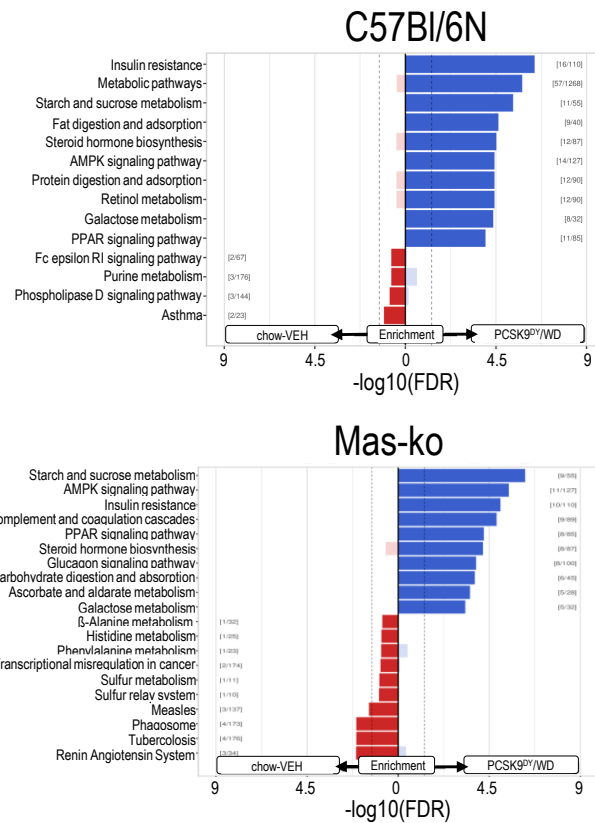


Abbildung 7-9: RNA-Sequenzierung der abdominalen Aorta. KOBAS *enrichment plots* nach KEGG-pathway Analyse. Aufgezeigt wird der Vergleich chow VEH vs. WD VEH getrennt nach Mauslinien.

Weitere ausführliche Ergebnisse der RNA-Sequenzierung sind hier aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Diese sind im Anhang der Originalarbeit zu finden: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332225001842?via%3Dihub>

7.3 Ergänzende Diskussion

7.3.1 Induktion atherosklerotischer Läsionen durch PCSK9^{DY}-AAV

Im Rahmen der Vorstudie wurden zur Induktion atherosklerotischer Läsionen unterschiedliche Viruslasten eines PCSK9^{DY}-AAV in Kombination mit Western Diät verwendet. Dabei zeigten insbesondere die höheren Viruslasten 1×10^{11} und 5×10^{11} im Vergleich zur niedrigen Viruslast $0,5 \times 10^{11}$ höhere Cholesterinwerte und ein größeres Läsionsareal. Zwischen den beiden höheren Viruslasten konnten trotz fünffacher Steigerung der Viruslast nur kleine Unterschiede gesehen werden, weshalb wir eine Viruslast von 1×10^{11} als prinzipiell ausreichend zur Induktion von Hypercholesterinämie und Atherosklerose betrachten.

Die bisher veröffentlichten Studien unterscheiden sich in der verwendeten PCSK9-Mutation, der Injektionsmethode, der injizierten Viruslast, dem Geschlecht der verwendeten Mäuse, der atherogenen Diät und dem Beobachtungszeitraum, was einen Vergleich komplex werden lässt.

Wie auch in dieser Studie wurde von den meisten Arbeitsgruppen die murine Mutation D377Y verwendet. Bjorklund et. al. verwendeten in ihrer Arbeit beide Mutationen und konnten keine Unterschiede zeigen (Bjorklund et al., 2014). Roche-Molina et. al zeigten mit der seltener verwendeten D374Y ähnliche Cholesterinwerte und Läsionsareale (Roche-Molina et al., 2015). Injiziert wurde PCSK9^{DY}-AAV hauptsächlich intravenös in die Schwanzvene, wie auch von uns, beschrieben ist aber auch die intravenöse Gabe in die Femoralvene (Roche-Molina et al., 2015), die intraperitoneale Injektion (Peled et al., 2017) und die retroorbitale Injektion (Vozenilek, Blackburn, et al., 2018). Unter letzterer wurde nur eine milde Hypercholesterinämie erreicht, was aber auch auf die geringere Viruslast oder die Diät zurückzuführen sein könnte. In Anbetracht der hohen verwendeten Viruslast und der im Vergleich zu Bjorklund et. al. geringeren Cholesterinwerte scheint die intraperitoneale Injektion etwas weniger effektiv zu sein (Peled et al., 2017).

Verwendete Viruslasten liegen zwischen 2×10^{10} und 5×10^{11} . Dabei wurde insbesondere in den zuletzt veröffentlichten Studien und insgesamt am häufigsten 1×10^{11} verwendet. Mit dieser und höherer Viruslast wurden sicher Hypercholesterinämie und Atherosklerose induziert, was ebenfalls durch unsere Vorstudie bestätigt wurde. Mit niedrigeren Viruslasten gelingt häufig nur eine milde Hypercholesterinämie. Anders als bei ApoE ko Mäusen bedarf es bei Injektion von PCSK9^{DY}-AAV der Kombination mit atherogener Diät zur Induktion von Atherosklerose. Dazu wurden in der Vergangenheit HFD, Paigen Diät und Western Diät mit unterschiedlichen Anteilen von Fett, Cholesterin und anderen Zusätzen verwendet. Ein erhöhter Anteil von Cholesterin scheint effektiv die Hypercholesterinämie zu verstärken (Bjorklund et al., 2014).

In einem großen Teil der Studien wurden ausschließlich männliche Mäuse verwendet, teilweise männliche und weibliche gleichzeitig, seltener alleine weibliche Mäuse. Goettsch et. al. verwendeten beide Geschlechter, zeigten aber nur kombinierte Daten auf (Goettsch et al., 2016). Neuere Studien weisen darauf hin, dass der Lebertropismus des Vektors bei weiblichen Tieren weniger stark ausgeprägt ist (Vozenilek, Blackburn, et al., 2018) und weibliche Tiere weniger starke Veränderungen des Lipidprofils zeigen (Buchmann et al., 2020). Zur Induktion von Atherosklerose ist ein Beobachtungszeitraum von 21 Tagen nicht ausreichend (Louloudis et al., 2021), nach zwölf Wochen zeigen sich hingegen deutliche atherosklerotische Läsionen (Bjorklund et al., 2014).

Mit einem Läsionsareal von 0,1-0,2 mm² bei höherer Viruslast zeigen wir sehr ähnliche Werte wie vorangegangene Studien. Die in unserer Studie erreichten Cholesterinwerte sind im Vergleich zu Studien mit ähnlichen Parametern etwas geringer als erwartet. Gründe dafür könnten Unterschiede in der Nahrungszusammensetzung, dem Verhalten, den Haltungsbedingungen oder eine nicht immer vollständig gelungene Virusapplikation über die Schwanzvene sein.

Über die Cholesterinwerte und Läsionsareale hinaus stellten wir eine dosisabhängige Gewichtsreduktion fest, die auf eine geringere Fettmasse zurückzuführen war. Nur wenige der durchgeführten Studien berichten über die Gewichtsentwicklung nach PCSK9^{DY}-AAV-Injektion: Eine Studie konnte keine Veränderungen im Körpergewicht feststellen (Goettsch et al., 2016). In einer weiteren Studie führte die Injektion bei Standarddiät zu signifikanter Gewichtszunahme, aber nicht bei Western Diät (Louloudis et al., 2021). Nur in einer Studie konnte eine Gewichtsreduktion nach Injektion gesehen werden (Mulorz et al., 2020). In keiner der genannten Studien wurden Unterschiede im Gewichtsverlauf diskutiert. Zur Assoziation von Adipositas und PCSK9-Konzentrationen ist bislang nur eine begrenzte Anzahl an Studien durchgeführt worden, die bisweilen widersprüchliche Ergebnisse zeigten. Einerseits waren Adipositas und Diabetes in jungen Frauen mit höheren PCSK9-Konzentrationen verbunden (Levenson et al., 2017) und PCSK9-Inhibitoren verhinderten Adipositas (Deshycka et al., 2021). Es zeigte sich auch eine positive Korrelation zwischen BMI und PCSK9. Andererseits wurde im Dünndarm adipöser Patienten mit Insulinresistenz weniger PCSK9 gefunden (Melendez et al., 2017) und in einer Studie wurde eine inverse Beziehung zwischen PCSK9 und dem Taillenumfang gefunden (Vekic et al., 2019). Die Ursache für die dosisabhängige Reduktion der Fettmasse nach PCSK9^{DY}-AAV-Injektion kann daher nicht abschließend beantwortet werden. Eine mögliche Lebertoxizität oder entzündliche Reaktionen auf den Vektor konnten in den bisher durchgeführten Studien ausgeschlossen werden. Fraglich bleibt der Einfluss von PCSK9^{DY}-AAV auf die Nahrungsaufnahme, auf Adipokine wie Leptin und auf das Verhalten der Tiere. Um den Einfluss von PCSK9^{DY}-AAV darauf zu untersuchen, sind weitere Studien notwendig.

7.3.2 Bedeutung des genetischen Hintergrunds im Tierversuch

Während in jüngeren Studien sowohl an C57BL/6N-Mäusen (Rawish et al., 2020; Schuster et al., 2018) als auch an Ratten (Beckmann et al., 2021) ähnlich wie in unserer Hauptstudie die Diät-induzierte Adipositas vollständig verhindert wurde, konnten Dapper et al. an FVB/N-Mäusen nur die Tendenz zur Gewichtsreduktion durch Telmisartan sehen (Dapper et al., 2019). Die vorliegende Studie liefert einen weiteren Hinweis dafür, dass der genetische Hintergrund der Mäuse für die diskrepanten Ergebnisse verantwortlich sein könnte.

C57BL/6 und FVB/N sind häufig verwendete genetische Hintergründe bei Studien zu metabolischen Erkrankungen, sie unterscheiden sich aber sowohl genotypisch als auch phänotypisch, weshalb bei der Interpretation und dem Vergleich von Studien ein besonderes Augenmerk darauf zu legen ist, auf welchem genetischen Hintergrund sie durchgeführt wurden. Insbesondere im Hinblick auf das metabolische Syndrom und die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen konnten Unterschiede gezeigt werden. Wie eingangs beschrieben, sind Mäuse auf dem FVB/N-Hintergrund relativ resistent gegenüber der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen, während C57BL/6-Mäuse trotz niedrigerer Cholesterin-Spiegel bis zu neunfach größere Läsionen entwickeln (Shim et al., 2011). Als Gründe für die veränderte Suszeptibilität werden Unterschiede im Apolipoprotein A-I (Sontag et al., 2014) und A-II (Sontag & Reardon, 2014) diskutiert, die wichtigsten Apolipoproteine im HDL-Cholesterin, dessen geringe Konzentrationen im Blut als Risikofaktor für Atherosklerose identifiziert werden konnten. Beschrieben wurden auch die veränderte Funktion von A20, einem wichtigen negativen Regulator der NF- κ B-Aktivität (Idel et al., 2003) und eine unterschiedliche Empfänglichkeit der Gefäßwand gegenüber der Formation von Plaques (Shim et al., 2011).

Der Glukosestoffwechsel ist ebenso durch den genetischen Hintergrund beeinflusst. Mäuse auf C57BL/6 entwickeln durch HFD Insulinresistenz und Glukoseintoleranz (Gaisler-Silva et al., 2021). Auf FVB/N sind Mäuse hingegen bereits mit *chow* Diät relativ intolerant gegenüber Glukose und zeigen eine ähnliche Toleranz wie C57BL/6 mit HFD (Montgomery et al., 2013). Die Glukoseintoleranz von FVB/N kann durch HFD weiter gesteigert werden (Nascimento-Sales et al., 2017). Insgesamt entwickeln C57BL/6 einen milden Diabetes mellitus, während FVB/N eine starke Hyperglykämie entwickeln und deutlich reduzierte Konzentrationen von Adiponektin aufweisen (Haluzik et al., 2004). Weil C57BL/6 im Vergleich zu drei anderen Inzucht-Stämmen, darunter FVB/N, eine intermediäre physiologische Antwort im Glukosestoffwechsel zeigte, wurde dieser genetische Hintergrund als passendes Modell für die Untersuchung der Glukosehomöostase befunden (Berglund et al., 2008).

Diskrepanz ist die Studienlage bezüglich der Frage, ob Mäuse auf dem FVB/N-Hintergrund resistent gegenüber der Entwicklung einer Diät-induzierten Adipositas sind. So wurde einerseits

gezeigt, dass C57BL/6 zwar mit einem leicht geringeren Gewicht, kleineren Adipozyten und stärkerer Kapazität für Remodelling im weißen Fettgewebe beginnen und durch HFD signifikant an Gewicht zunehmen, FVB/N ihr initial leicht erhöhtes Gewicht aber kaum steigern (Kim et al., 2013). Auch in einer weiteren Studie zeigten FVB/N mit *chow* und HFD das gleiche Ausmaß an Gewichtszunahme und wurden als resistent gegenüber der Diät-induzierten Adipositas beschrieben (Devlin et al., 2018). Eine fehlende Gewichtszunahme trotz HFD wurde auf eine mitochondriale Entkopplung bei FVB/N zurückgeführt, die in reduziertem oxidativem Stress und einem erhöhten Energieverbrauch mündete, während bei C57BL/6 die mitochondriale Kapazität reduziert war und sich oxidativer Stress entwickelte (Boudina et al., 2012). Dem gegenüber stehen zahlreiche Studien, die auch auf dem FVB/N-Hintergrund die Entwicklung einer Diät-induzierten Adipositas zeigen konnten (Martin et al., 2006; Metlakunta et al., 2008; Sahu et al., 2015), darunter auch die Studie unserer Arbeitsgruppe (Dapper et al., 2019). Es wird aufgezeigt, dass Mäuse auf diesem Hintergrund im Vergleich zu C57BL/6 mehr HFD konsumieren, aber dennoch in geringerem Ausmaß Adipositas entwickeln (Gaisler-Silva et al., 2021). Weniger Fett akkumuliert in viszeralen Depots, HFD ruft im Fettgewebe von FVB/N aber eine stärkere Entzündung hervor und die Entwicklung einer hepatischen Steatose wird begünstigt. Insgesamt ergaben sich sogar schwerwiegendere Auswirkungen durch HFD bei FVB/N im Vergleich zu C57BL/6 (Nascimento-Sales et al., 2017). Als Ursachen der widersprüchlichen Ergebnisse werden die Länge des Untersuchungszeitraums, die Nahrungszusammensetzung, das Geschlecht der Mäuse, das Mikrobiom und die unterschiedliche Anzahl von Tieren pro Käfig diskutiert (Cranford et al., 2016).

Auch hinsichtlich des Renin-Angiotensin-Systems gibt es genetische Unterschiede. Mäuse auf dem C57BL/6 Hintergrund verfügen nur über ein Gen für die Endopeptidase Renin, während andere Stämme wie 129Sv und FVB/N dafür zwei Gene auf dem Chromosom 1 aufweisen. Ren-2 codiert im Gegensatz zu Ren-1 eine nicht-glykosylierte Form von Renin, die vor allem in der Speicheldrüse, aber auch in der Niere exprimiert wird. Welchen Anteil die beiden Formen an der Plasma-Renin-Aktivität (PRA) haben und wie sie sich gegenseitig beeinflussen, ist bislang unklar. Hansen et. al. konnten zwischen den beiden Stämmen keine Unterschiede der PRA und der Renin-mRNA feststellen, weisen aber darauf hin, dass bei erhöhtem Stresslevel eine Veränderung beobachtet werden könnte (Hansen et al., 2004). Hingegen konnte in einer anderen Studie ein erhöhter Blutdruck und eine gesteigerte PRA bei Vorhandensein von zwei Renin-Genen gesehen werden (Wang et al., 2002). Eine weitere Studie zeigte ebenfalls einen erhöhten Blutdruck, aber eine niedrigere PRA (Lum et al., 2004).

Innerhalb der verschiedenen C57BL/6 Substämme wurden genetische Polymorphismen beobachtet, die sich ebenfalls auf den Phänotyp auswirken. Dazu zählt insbesondere eine Mutation der Nicotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase (NNT), die C57BL/6J-Stämme aufweisen, C57BL/6N-

Stämme aber nicht (Zurita et al., 2011). Mäusen, die diese Mutation zeigen, wurde eine abnorme Glukosetoleranz und eine gestörte Insulinsekretion zugeschrieben (Mekada & Yoshiki, 2021). NNT ist eine wichtige Quelle von antioxidativem NADPH im Mitochondrium. Durch die genannte Mutation wird die Aktivität der NNT verringert und es entstehen vermehrt ROS. Das konnte mit einer erhöhten Suszeptibilität für Hypertonie und vergrößerten atherosklerotischen Läsionen assoziiert werden (Vozenilek, Vetkoetter, et al., 2018). Bezüglich des Glukosestoffwechsels weist eine Studie allerdings darauf hin, dass C57BL/6J-Stämme in vitro zwar weniger Glukose-stimulierte Insulinfreisetzung zeigten, in vivo aber keine Unterschiede zwischen C57BL/6J und C57BL/6N zu erkennen waren. Durch den Konsum von HFD zeigten sich vielmehr Unterschiede zwischen den Substämmen von C57BL/6N (Hull et al., 2017). Fisher-Wellman et. al. zeigten, dass C57BL/6J im Vergleich zu C57BL/6N entgegen der Erwartung weniger Gewichtszunahme, Fettmasse und Nahrungsaufnahme aufweisen und HFD bei C57BL/6N einen größeren Einfluss auf die Redox-Homöostase hatte. Aufgrund der genetischen Varianzen im C57BL/6J Hintergrund wurde der Hintergrund C57BL/6N für metabolische Studien empfohlen, den auch wir in der vorliegenden Studie verwendeten (Fisher-Wellman et al., 2016).

Wie oben aufgeführt unterscheiden sich C57BL/6N und FVB/N sowohl genotypisch als auch phänotypisch. Unsere Studie enthält weitere Erkenntnisse dafür, dass der genetische Hintergrund zu einer unterschiedlich starken Empfänglichkeit für die Wirkung von Telmisartan auf die Gewichtsentwicklung beiträgt. Im Wildtyp auf FVB/N konnte die Entwicklung einer Diät-induzierten Adipositas nur geringfügig reduziert, auf C57BL/6N aber vollständig verhindert werden. Bei Mas-Defizienz auf FVB/N konnte die Entwicklung einer Diät-induzierten Adipositas in größerem Ausmaß als im Wildtyp reduziert werden, wiederum aber nicht vollständig wie dies hier auf C57BL/6N der Fall war (Dapper et al., 2019). Zu den wichtigsten genetischen Unterschieden zwischen den beiden Inzucht-Stämmen zählen die unterschiedliche Suszeptibilität für die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen, Unterschiede im Glukosestoffwechsel, die unterschiedlichen Gewichtsentwicklungen bei Konsum von HFD und die unterschiedliche Anzahl von Renin-Genen. Der Phänotyp von Mas ko Mäusen wurde hinsichtlich des kardiovaskulären Systems und metabolischer Veränderungen in verschiedenen genetischen Hintergründen beschrieben.

Walther et al. untersuchten 1998 erstmals Mäuse mit globaler Defizienz des Mas-Rezeptors (Walther et al., 1998). Dabei und in folgenden Studien wurden Mäuse mit gemischtem genetischen Hintergrund 129/SvxC57BL/6 verwendet und zeigten verändertes Verhalten sowie Unterschiede in der Herzfrequenz und der Blutdruckvariabilität bei insgesamt unverändertem Blutdruck (Walther, Voigt, et al., 2000; Walther, Wessel, et al., 2000). Fälschlicherweise vermutete man Mas in diesen Studien als Rezeptor für AngII. Erst 2003 gelang der Nachweis von Ang1-7 als endogenem Liganden

für Mas (Santos et al., 2003). Es folgten weitere Untersuchungen auf reinem C57BL/6-Hintergrund, seltener auf FVB/N-Hintergrund.

Die überwiegende Anzahl der Studien mit Mas ko Mäusen auf C57BL/6 zeigt keine Veränderung des basalen Blutdrucks (Botelho-Santos et al., 2012; Pinheiro et al., 2009; Rabelo et al., 2008; Silva et al., 2013). Nur eine Studie zeigt einen niedrigeren systolischen Blutdruck, der auf die verschlechterte kardiale Funktion zurückgeführt wird (Santos et al., 2006). Nach HFD oder Stimulation mit erhöhten Salzkonzentrationen wiesen männliche Mas ko Mäuse einen ausbleibenden oder wenig stark ausgeprägten Anstieg des Blutdrucks auf (Heringer-Walther et al., 2012; Wang et al., 2017). Bei basal unverändertem Blutdruck zeigte nur eine Studie einen stärkeren Anstieg durch AngII-Stimulation (Ni et al., 2020). Dem gegenüber stehen Untersuchungen, die in Mas ko Mäusen auf FVB/N stets einen erhöhten Blutdruck sahen (de Moura et al., 2010; Rabelo Casali et al., 2016; Santos et al., 2008). Auf Grundlage der bereits durchgeführten Studien waren Unterschiede zwischen wt und Mas ko Mäusen im Blutdruck auf dem von uns verwendeten C57BL/6N-Hintergrund nicht zu erwarten, weshalb die Blutdruckmessung in der vorliegenden Arbeit ausblieb.

7.3.3 Einordnung der Hypothesen zur Gewichtsreduktion

A779 wurde erstmals von der Santos-Gruppe charakterisiert als spezifischer Antagonist, der den antidiuretischen Effekt von Ang1-7 und Effekte auf den Blutdruck verhindert, ohne intrinsische agonistische Aktivität zu zeigen oder die Effekte von AngII an AT₁R sowie AT₂R zu verändern (Fontes et al., 1994; Santos et al., 1994). Hinweise auf Spezifität sind auch die Beobachtungen, dass A779 die NO-Freisetzung in vitro und in vivo vollständig und damit im selben Ausmaß verhindern konnte wie Mas ko Mäuse (Fraga-Silva et al., 2008) sowie die Vasodilatation durch Ang1-7 im selben Maß reduzierte wie Mas ko Mäuse (Peiro et al., 2007). Andere Studien zeigen allerdings auf, dass A779 die Effekte von Ang1-7 nur teilweise reduzieren konnte: Die NO-Freisetzung durch Ang1-7 konnte in bovinen Endothelzellen nur um 50% verringert werden (Lemos et al., 2005), die Vasodilatation durch Ang1-7 konnte nicht aufgehoben werden (Bosnyak et al., 2012) und die positiven Wirkungen hinsichtlich Herzfunktion und Remodelling wurden nur zu 52-86% reduziert (Zeng et al., 2012). Diskutiert wurden neben strukturellen Unterschieden zwischen bovinen und Maus-Endothelzellen auch die Rolle der Rezeptor-Oligomerisation und die Dosierung von A779. Zeng et al. verweisen darauf, dass in zukünftigen Studien die Spezifität von A779 untersucht werden sollte (Zeng et al., 2012). Durch die aufgeführten Studien kann die Frage nicht abschließend beantwortet werden. Mit dem Wissen von heute erscheinen die diskrepanten Ergebnisse aber weniger als Beweis für fehlende Spezifität von A779, sondern als Argument für die Vermutung, dass neben Mas weitere Rezeptoren die Wirkungen von Ang1-7 vermitteln.

Dies wird insbesondere unterstützt durch die Beobachtung, dass ein weiterer Ang1-7-Antagonist, D-Pro-Ang1-7, die Wirkungen von Ang1-7 im Gegensatz zu A779 zuverlässig blockiert (Lautner et al., 2013). In der Tat konnten neben der ACE2/Ang1-7/Mas-Achse weitere RAS-Metabolite entdeckt und charakterisiert werden.

Durch chronische Behandlung mit dem AT₁R-Blocker Telmisartan steigen die Konzentrationen von AngII. Infusionen mit AngII selbst konnten ähnlich wie Telmisartan eine Reduktion des Körpergewichts erreichen. Daher stellt sich die Frage, ob das gesteigert zur Verfügung stehende AngII ausschließlich als Substrat für die Bildung von Ang1-7 und folglich Alamandin dient oder auch unabhängig vom AT₁R selbst Wirkungen erzielt. In diesem Fall stünde AngII für die Bindung an AT₂R zur Verfügung. Rawish et al. weisen darauf hin, dass unter chronischer Telmisartan-Behandlung die Expression des AT₂R gesteigert wird (Rawish et al., 2020). Die Rolle des AT₂R bei der Entwicklung einer Diät-induzierten Adipositas ist noch nicht ausreichend beschrieben. Einerseits konnte im AT₂R ko bei gleichzeitiger Überexpression von Angiotensinogen eine Adipositas verhindert werden, was auf eine gewichtssteigernde Rolle des AT₂R hindeutet (Yvan-Charvet et al., 2009). In der Diskussion wird darauf hingewiesen, dass sowohl AT₁R ko als auch AT₂R ko vor einer Diät-induzierten Adipositas geschützt sind. Gleichzeitig zeigte der AT₂R ko mit HFD ein höheres Gewicht und die Stimulation von AT₂R mit Compound 21 (C21) reduzierte das Übergewicht und verbesserte die Insulinsensitivität (Nag et al., 2015). C21 schützte auch vor der Entwicklung einer Diät-induzierten endothelialen Dysfunktion (Gonzalez-Blazquez et al., 2021). Ein AT₂R-Agonist supprimierte die Nahrungsaufnahme, tat dies aber nicht mehr im AT₂R ko (Ohinata et al., 2008). Bei der Blockade des AT₁R steigt die Konzentration von AngII und es steht sowohl für die Bindung an den AT₂R als auch für die weitere Metabolisierung durch ACE2 zu Verfügung. Die Frage nach der Rolle des AT₂R bei der Telmisartan-induzierten Gewichtsreduktion kann durch die aufgeführten Studien nicht abschließend beantwortet werden. Die Beobachtung, dass sowohl im AT₁R ko als auch im AT₂R ko das Gewicht reduziert ist, deutet aber darauf hin, dass ein ausbleibendes negatives Feedback, die Steigerung von AngII und die weitere Metabolisierung für den Effekt wichtiger sind als die Bindung von AngII an die Rezeptoren selbst. Ob die protektiven Einflüsse von C21 einen Teil des Telmisartan-Effekts widerspiegeln, ließe sich in zukünftigen Studien mit AT₂R ko und chronischer AT₁R-Blockade durch Telmisartan beantworten.

He et al. zeigten, dass Telmisartan auch unabhängig vom Renin-Angiotensin-System gewichtsreduzierende Wirkung entfaltet, indem es PPAR δ aktiviert und darüber Lipolyse und adaptive Thermogenese steigert. Im PPAR δ ko blieb die Wirkung von Telmisartan aus (He et al., 2010). In der Tat konnte auch in weiteren Studien beobachtet werden, dass Telmisartan PPAR δ aktiviert (Chang et al., 2016; Li et al., 2013). Bezüglich der Gewichtsentwicklung konnte gezeigt werden, dass der PPAR δ ko mit *chow* Diät zwar eine reduzierte Fettmasse aufweist, die Fettmasse

mit HFD allerdings gegenüber dem Wildtyp gesteigert werden kann. Die Aktivierung von PPAR δ schützt vor Diät-induzierter Adipositas (Ehrenborg & Skogsberg, 2013). Dabei ist auch eine reduzierte Expression des Cannabinoid-Rezeptors Typ 1 (CB1) involviert (Yan et al., 2007). Über das reduzierte Gewicht hinaus konnte durch die Aktivierung von PPAR δ eine Steigerung von HDL, eine Senkung von LDL und Triglyceriden sowie eine Verbesserung der Insulinsensitivität erreicht werden (Barish et al., 2006). Ähnlich protektiven Einfluss hat die Aktivierung von PPAR δ auf die Entwicklung von endothelialer Dysfunktion und atherosklerotischen Läsionen (Cheang et al., 2019; Cheang et al., 2017; Ehrenborg & Skogsberg, 2013). Als weitere mögliche Ursache für die Gewichtsreduktion durch Telmisartan ist die gesteigerte Expression von UCP-1 beschrieben (Araki et al., 2006).

7.3.4 RNA-Sequenzierung der abdominalen Aorta

Die Entwicklung von Atherosklerose durch Western Diät und PCSK9^{DY}-AAV-Injektion führte zu gleichsinnig veränderter Expression in wt sowie Mas ko Mäusen von insgesamt 127 Genen. Die Carnitin-Palmitoyltransferase 1b (Cpt1b), ein muskelspezifisches Enzym mit wichtiger Funktion bei der mitochondrialen Aufnahme von Fettsäuren und der β -Oxidation, wurde in beiden Mausreihen vermehrt exprimiert. Es konnte durch andere Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass eine Suppression des Enzyms in einer intrazellulären Akkumulation von Lipiden mit Zellschäden resultierte, eine Defizienz führte zu kardialer Hypertrophie (Li et al., 2023; Wu et al., 2021). Die protektiven Effekte von Pioglitazon, einem PPAR γ -Agonisten, auf die kardiale Funktion bei vorliegender Dyslipidämie sind verbunden mit einer gesteigerten Expression von Cpt1b (Legchenko et al., 2018). Vermutlich im Sinne einer Gegenregulation war ähnlich wie in unserer Studie Cpt1b bei HFD vermehrt exprimiert (Nakanishi et al., 2023).

Zur Induktion von Atherosklerose machten wir uns im Rahmen dieser Studie die degradierende Wirkung von PCSK9 auf den LDL-Rezeptor in der Leber zu nutze. Die Expression von PCSK9 wird u. a. reguliert durch *sterol regulatory element-binding protein 2* (SREBP2), ein Enzym der Cholesterinsynthese, dieses wiederum durch den *pregnane-X-receptor* (PXR). PXR, codiert durch *nuclear receptor subfamily 1, group 1, member 2* (Nr1I2), ist ein ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor vieler Phase I- und II-Enzyme der Leber. Beispielsweise bestimmte Medikamente führen zur PXR-Aktivierung und über eine gesteigerte Expression von PCSK9 zur Hypercholesterinämie, einem wichtigen Risikofaktor der Atherosklerose (Karpale et al., 2022). Die Aktivierung des PXR führte bei Mäusen mit ApoE oder LDLR ko zu verstärkter Entwicklung von Atherosklerose. Es kommt zu gesteigerter Lipidaufnahme in Makrophagen, mehr Schaumzellen und vergrößerten atherosklerotischen Läsionen. Die Defizienz von PXR hingegen schützt Mäuse vor Atherosklerose sowie Adipositas (Liu et al., 2022). PXR wird u. a. auch in Endothelzellen der Aorta und glatten Muskelzellen exprimiert (Xiao et al., 2014). Andere Arbeitsgruppen konnten ähnlich wie

wir in wt und Mas ko Mäusen zeigen, dass eine Hochfettdiät zum Anstieg der PXR-Expression führt (Daujat-Chavanieu & Gerbal-Chaloin, 2020).

Telmisartan ist ein partieller Agonist von PPAR γ , einem ligandenaktivierten Transkriptionsfaktor. Daneben existieren weitere Peroxisom-Proliferator-aktivierte-Rezeptoren, wie bspw. PPAR α , das in verschiedenen Geweben, u. a. aber auch in Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Monozyten exprimiert wird. Aktiviert durch essenzielle Fettsäuren, Derivate und z. B. Fibrate bildet PPAR α Heterodimere mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) und führt zu einer gesteigerten Oxidation von Fettsäuren sowie der Bildung von Ketonkörpern (Ruscica et al., 2019). Da die Dyslipidämie ein relevanter Risikofaktor für die Entwicklung von Atherosklerose ist, liegt nahe, dass auch Expressionsunterschiede von PPAR α Einfluss auf die Gefäßpathologie haben. In der Tat konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von PPAR α die Bildung von Schaumzellen inhibiert, Proliferation und Migration glatter Muskelzellen sowie die Formation und Ruptur von Plaques reduziert. Dafür wird u. a. auch eine antiinflammatorische Wirkung verantwortlich gemacht. PPAR α begrenzt die Akkumulation von oxidiertem LDL in Plaques und reduziert ROS (Yu et al., 2015). In atherosklerotischen Plaques wurde vermehrt PPAR α mRNA und Protein nachgewiesen, was zu unserer Beobachtung einer gesteigerten PPAR α -Expression passt (Gao et al., 2013). Dies ist am ehesten im Rahmen einer Gegenregulation zu verstehen.

Die Carboxypeptidase N Untereinheit 2 (Cpn2) ist ein regulatorisches Protein mit Funktion bei Entzündungen. Über die Rezeptoren B1 und B2 wirken Bradykinin bzw. Kallidin proinflammatorisch. Cpn2 spaltet Arginin von Bradykinin bzw. Kallidin ab und erhöht damit die Affinität. Insbesondere der B1-Rezeptor ist involviert in der Pathogenese von Bluthochdruck und kardiovaskulären Erkrankungen (Merino et al., 2009). Über den Rezeptor wird NF κ B stimuliert, was die Adhärenz und Migration von Leukozyten steigert (Kishimoto et al., 2021). Im Tierversuch konnte bei Defizienz vom B1-Rezeptor eine verstärkte Atherosklerose nachgewiesen werden, gleichzeitig war in ApoE ko Mäusen und auch bei endothelialer Dysfunktion vermehrt der B1-Rezeptor gefunden worden (Merino et al., 2009). Cpn2 war in beiden Mauslinien als Ausdruck der atherosklerotischen Entwicklung gesteigert.

Zu den Genen, deren Expression nicht in wt aber in Mas ko Mäusen verändert war, zählen u. a. Dio2, Hk2, S100b und Mtor. Die Deiodinase Typ 2 (Dio2) katalysiert die Konversion von Thyroxin zu bioaktivem Triiodthyronin und ist ein Marker für das braune Fettgewebe. Bei Adipositas findet sich mehr Dio2 im subkutanen und viszeralen Fettgewebe (Bradley et al., 2018). Über eine Steigerung des Energieverbrauchs, verstärkte Oxidation von Fettsäuren und verstärkte Aufnahme von LDL in der Leber konnten bspw. mit einem Agonisten von *fibroblast growth factor 21* (FGF21) Dyslipidämie

und atherosklerotische Plaques reduziert werden. Dies war verbunden mit einer gesteigerten Expression von Dio2 (Min et al., 2019). Hinsichtlich der Atherosklerose konnte gezeigt werden, dass es zu einer verminderten Expression von Dio2 bei infrapoplitealer Atherosklerose kommt (Wu et al., 2024). In unserer Studie war die Expression von Dio2 in der abdominalen Aorta gesteigert. Dies ist überraschend, scheint doch Dio2 protektiv bei Atherosklerose zu wirken. Möglicherweise sind Unterschiede in der Expression der verschiedenen Gefäßabschnitte eine Erklärung für die Diskrepanz. Die Expression im Fettgewebe wurde im Rahmen unserer Studie nicht untersucht.

Gesteigert exprimiert wurde im Rahmen unserer Arbeit auch die Hexokinase 2 (Hk2). Dies passt zu den Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe, die zeigen konnten, dass Hk2 im Rahmen einer systemischen Immunantwort vaskuläre Entzündung und Atherosklerose verstärkt und dass Hk2 selbst im Rahmen von kardiovaskulären Erkrankungen verstärkt exprimiert wird (Sun et al., 2023).

S100B ist Teil einer Familie aus mindestens 25 Calcium-bindenden S100-Proteinen. Insbesondere für S100 A8, A9 und A12 sind Einflüsse auf die Atherosklerose beschrieben, aber auch S100B ist beteiligt: S100 aktivieren *receptor for advanced glycation end products* (RAGE) und *toll-like-receptor 4* (TLR4) und führen über die Sekretion proinflammatorischer Cytokine zur endothelialen Dysfunktion, zu oxidativem Stress, zu Adhäsion und Infiltration von Entzündungszellen und schließlich zu Atherosklerose. Im Tierversuch mit Doppel-ko von ApoE und RAGE bzw. TLR4 wurden geringere atherosklerotische Plaques festgestellt (Xiao et al., 2020). In vulnerablen Plaques wurde eine gesteigerte Expression von S100B gemessen (Cheng et al., 2020). Dies bestätigen wir mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.

Ebenfalls bestätigen wir mit unserer Studie den Einfluss von *mechanistic target of Rapamycin* (mTOR) auf die Atherosklerose. Eine verstärkte Expression wie im Fall unserer Arbeit ist pro-atherosklerotisch, eine Inhibition von mTOR, wie man sie sich beispielsweise in *Drug-eluting stents* zu Nutze macht, wirkt einer Atherosklerose entgegen: Dabei zählt insbesondere die Inhibition des mTORC1-Komplexes, die zu weniger MCP-1 und Adhäsion von Monozyten führt. Es kommt ebenso zum verstärkten Cholesterin-Efflux, die Formation von Schaumzellen wird inhibiert. Durch Senkung von *hypoxia-inducible factor 1 α* (HIF- α) und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) wird die Angiogenese reduziert, was ebenso wie die reduzierte MMP-Aktivität zur größeren Stabilität der Plaques beiträgt. Nebenwirkungen einer mTOR-Inhibition sind Hypercholesterinämie und Diabetes, weshalb eine Komedikation mit Statinen und Metformin bedacht werden sollte (Kurdi et al., 2016; Martinet et al., 2014).

Wir konnten zeigen, dass in Mas ko Mäusen zwölf Gene sowohl durch Western Diät und PCSK9^{DY}-Injektion als auch durch die Behandlung mit Telmisartan in ihrer Expression verändert waren: Slc27a1, Tst, Rgs2, Slc43a1, Cish, Ehhadh, Ppp1r3c, Nnat, Cables1, Serpine1, Pon1 und Cplane1. Davon durch Telmisartan gegenteilig reguliert im Vergleich zu PCSK9^{DY}-AAV und Western Diät mit Vehikel waren acht Gene: Tst, Rgs2, Slc43a1, Cish, Nnat, Serpine1, Pon1 und Cplane1. In ähnlichem Ausmaß gegenteilig reguliert waren Tst, Rgs2 und Pon1.

Tst ist verantwortlich für die Expression der Thiosulfat-Sulfurtransferase, eines mitochondrialen Enzyms mit Rolle bei Schwefelübertragung und Zellhomöostase. Bei metabolischen Erkrankungen hat das Enzym einen positiven Einfluss, verbessert die mitochondriale Aktivität und steigert Antioxidantien. In der Literatur wird Tst als Prädiktor für metabolische Gesundheit benannt. Das Enzymprodukt Thiosulfat steigert die Bildung von NO und verbessert die endotheliale Homöostase. Es ist protektiv bei kardialer Ischämie und bei durch AngII induzierter kardialer oder renaler Schädigung (Kruithof et al., 2020). Natriumthiosulfat reduziert als H₂S-Donor Hypertonie, Hypertrophie, Fibrose und oxidativen Stress (Snijder et al., 2015). Hinsichtlich der Tst Expression ist eine negative Korrelation mit Glukose, Fettmasse und BMI beschrieben (Kruithof et al., 2020). Entgegen der Erwartung zeigen Mas-defiziente Mäuse in unserer Studie nach Steigerung der Fettmasse und Entwicklung von Atherosklerose durch Western Diät und PCSK9^{DY}-Injektion eine Steigerung der Tst Expression und die Reduktion der Fettmasse durch Telmisartan führt zu einer Senkung der Expression. Die Ursache des Widerspruchs bleibt letztlich unklar. Möglicherweise ist die veränderte Expression im Rahmen unserer Studie im Sinne einer Gegenregulation bei metabolischer Entgleisung zu verstehen, die nach Telmisartan-Behandlung und Senkung von Fettmasse und BMI obsolet ist. Denkbar ist auch die unterschiedliche Expression des Gens in unterschiedlichen Geweben.

AngII führt über den G-Protein gekoppelten Rezeptor AT₁R zu Vasokonstriktion, Hypertonie, Hypertrophie, endothelialer Dysfunktion und verstärkter Atherosklerose. Auch andere Gq-Protein-gekoppelte Rezeptoren wie der Endothelin-Rezeptor führen zu Hypertrophie und Remodelling. Rgs2, *regulator of G protein signaling 2*, fungiert als GTPase aktivierendes Protein und beschleunigt die Deaktivierung der Rezeptorwirkung, insbesondere für Gq-Proteine. NO aus den Endothelzellen stimuliert die Produktion von cGMP, dieses aktiviert die Proteinkinase Gl α (PKG α), die im Anschluss Rgs2 phosphoryliert und die Gq-vermittelte Vasokonstriktion abmildert (Osei-Owusu & Blumer, 2015). Die Expression von Rgs2 wird durch AngII im Sinne eines negativen Feedbacks kurzfristig gesteigert, aber langfristig supprimiert. Bei dauerhafter Stimulation mit AngII und dadurch gesenkter Expression von Rgs2 besteht eine gesteigerte Suszeptibilität der Zellen für die Wirkung von AngII (Mao et al., 2014). Eine Defizienz von Rgs2 führt zu Hypertonie, kardialer Hypertrophie und Insuffizienz, es kommt zu verstärkter Kontraktion glatter Muskelzellen im Gefäß (Zhang &

Mende, 2014). Telmisartan konnte im Tierversuch mit Rgs2-Defizienz die AngII-induzierten Schäden supprimieren, indem es oxidativen Stress und Entzündung reduzierte (Matsumoto et al., 2010). Im Rahmen unserer Studie konnte gezeigt werden, dass die Expression von Rgs2 in der abdominalen Aorta durch Western Diät und PCSK9^{DY}-Injektion gesteigert wird und die Behandlung mit Telmisartan diese Steigerung umkehrt. Unter der Annahme, dass durch die Diät-induzierte Adipositas das RAAS aktiviert ist und die AngII-Konzentration dauerhaft erhöht ist, wäre nach kurzfristiger Steigerung der Rgs2-Expression eine dauerhafte Suppression erwartet worden. Auch in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass bei Bluthochdruck, also im Rahmen einer RAAS-Aktivierung, die Expression von Rgs2 reduziert war (Osei-Owusu & Blumer, 2015). Eine Studie allerdings verwies auf die positive Korrelation von HbA1c und Rgs2-Expression bei Diabetes mellitus Typ 2, was prinzipiell unsere Ergebnisse bestätigen würde (Zhang et al., 2022).

Zu den Diagnosekriterien des metabolischen Syndroms zählen neben der stammbetonten Adipositas, Hypertonie, Diabetes mellitus Typ 2 bzw. erhöhte Nüchtern glukose auch die Dyslipidämie mit Hypertriglyceridämie sowie Erniedrigung von HDL. Das HDL übernimmt im menschlichen Lipidstoffwechsel den reversen Cholesterintransport zur Leber. Mit HDL assoziiert ist die Paraoxonase 1 (Pon1), eine in der Leber produzierte Organophosphat-Esterhydrolase mit Einfluss auf oxidativen Stress und Entzündung (Kotur-Stevuljevic et al., 2020). Pon1 ist atheroprotektiv, verhindert die Oxidation von Lipiden, stimuliert über die endotheliale NO-Synthase die Produktion von Stickstoffmonoxid und limitiert die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen. Im Tierversuch entwickelt sich bei Pon1-Defizienz beschleunigt Atherosklerose (Gugliucci & Menini, 2015). Eine Überexpression von Pon1 führte zu veränderter Aktivität von Makrophagen, vermehrtem Cholesterinefflux, schützt vor Adhäsion der Monozyten an das Endothel und normalisiert die Endothelfunktion. Die leichtgradige systemische Entzündung bspw. im Rahmen einer Atherosklerose führt zum Verlust der enzymatischen Pon1 Aktivität (Kotur-Stevuljevic et al., 2020). Während geringe Spiegel von Pon1 im Serum mit dem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert sind, konnte immunhistologisch gezeigt werden, dass in der menschlichen Aorta während der Entwicklung von Atherosklerose vermehrt Pon1 exprimiert wird (Mackness & Mackness, 2013). In der vorliegenden Studie können wir das auch für die atherosklerotische abdominale Aorta bei Mas-Defizienz nachweisen, während die Behandlung mit Telmisartan im Sinne ihrer anti-atherosklerotischen Wirkung zu einer Senkung der Pon1-Expression in der Aorta führt.

Slc27a1 oder auch fatp1 (*fatty acid transport protein 1*) ist ein Transportprotein für langkettige Fettsäuren und wird exprimiert u. a. in Fettgewebe, Leber und Herz. In den Studien anderer Arbeitsgruppen führte die Defizienz zu Gewichtszunahme, gesteigerter Fettmasse, gesteigerter Infiltration von Makrophagen, mehr oxidativem Stress sowie vergrößerten Plaques

(Zhao et al., 2017). Eine verminderte Expression wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit erscheint also durchaus im Einklang mit der bisherigen Datenlage. Nur eine Studie konnte eine Resistenz gegenüber der Diät-assoziierten Adipositas in *fatp1* ko Mäusen feststellen (Wu et al., 2006). Eine weitere Senkung der Expression durch Telmisartan trotz reduzierter atherosklerotischer Läsionen in unserer Arbeit ist aktuell nicht nachvollziehbar.

7.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Das Renin-Angiotensin-System

Abbildung 1-2: PCSK9

Abbildung 1-3: Ergebnisse Vorstudie

Abbildung 1-4: Vergleich der Auswertungen zur kortikalen Steifigkeit in der Vorstudie

Abbildung 2-1: Übersicht des Studienprotokolls

Abbildung 2-2: Aufbau des *atomic force microscope*

Abbildung 2-3: Kraft-Distanz-Kurve

Abbildung 3-1: Körpergewicht und Masseverteilung

Abbildung 3-2: Hormonprofil

Abbildung 3-3: Glukosestoffwechsel

Abbildung 3-4: Cytokinprofil

Abbildung 3-5: Lipidprofil und histologische Untersuchung

Abbildung 3-6: Endotheliale Funktion der thorakalen Aorta

Abbildung 3-7: RNA-Sequenzierung der abdominalen Aorta (I)

Abbildung 3-8: RNA-Sequenzierung der abdominalen Aorta (II)

Abbildung 7-1: Körpergewicht und Masseverteilung (Vorstudie)

Abbildung 7-2: Lipidprofil (V)

Abbildung 7-3: Plaque-Histologie (V)

Abbildung 7-4: Endotheliale Funktion der thorakalen Aorta (V)

Abbildung 7-5: Hormonprofil

Abbildung 7-6: Glukosestoffwechsel

Abbildung 7-7: Histologische Untersuchung

Abbildung 7-8: RNA-Sequenzierung der abdominalen Aorta (I)

Abbildung 7-9: RNA-Sequenzierung der abdominalen Aorta (II)

7.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Versuchsgruppen

Tabelle 7-1: Ausgangswerte vor Versuchsbeginn

Tabelle 7-2: Vergleich der Kontrollgruppen nach Versuchsende

7.6 Geräte

Absaughilfe Vacuboy	Integra Biosciences GmbH, Deutschland
Airflow Controller AC3 KG	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. Deutschland
ARIA CS60 Chancing Station	Tecniplast Laboratory Animal Equipment S.P.A., Italien
Atomic Force Microscope Nanoscope Multimode8 AFM	Bruker, USA
Autoklav Systec VX-65	Systec GmbH, Deutschland
Bechergläser (50 ml, 2000 ml LABsolute®)	Schott AG, Deutschland Th. Geyer GmbH & Co. KG, Deutschland
Blutzuckermessgerät, Accu-Chek® Performa	Roche Deutschland, Deutschland
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH, Deutschland
Flüssigstickstoff-Lager- und Transportbehälter Apollo 50 ARPEGE 40	Taylor-Wharton, USA Messer Griesheim GmbH, Deutschland AIR LIQUIDE Medical GmbH, Deutschland
Gefrierschränke (-20°C)	Liebherr-International Deutschland GmbH, Deutschland Bauknecht Hausgeräte GmbH, Deutschland
Gefrierschränke (-80°C) HERA Freeze HFU T Series Kryotec	Thermo Fisher Scientific, USA Kryotec-Kryosafe GmbH, Deutschland Colora, Deutschland
HERACell VIOS 160i CO2 Inkubator	Thermo Fisher Scientific, USA
Käfige Typ II lang Gm500 Sealsafe® Plus	Tecniplast, Deutschland
Knopfkanüle für orale Applikation	Acufirm Ernst Kratz, Deutschland
Kühlschränke (2-8°C) MEDline	Liebherr-International Deutschland GmbH, Deutschland C. Bomann GmbH, Deutschland
Lichtmikroskop Olympus CKX53	Olympus Europa SE & Co. KG, Deutschland
MACSQuant Analyzer 10 Deutschland	Miltenyi Biotech B.V. & Co. KG,
Mikropipetten (10, 100, 200, 1000 µl)	

PIPETMAN	Gilson S.A.S., Frankreich
Finnpipette®	Thermo Fisher Scientific, USA
Mörser und Pistill	Haldenwanger, Deutschland
Nuklear-Magnet-Resonanz-Spektroskop	Bruker, USA
LF110-BCA Analyzer	
Operationsbesteck	Fine Science Tools, USA
	B. Braun, Deutschland
Pipettierhelfer	
accu-jet® pro	BRAND GmbH + CO KG, Deutschland
pipetus®-standard	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Deutschland
Sterile Werkbank	
Z 100	Schulz Lufttechnik GmbH, Deutschland
MSC-Advantage	Fisher Scientific GmbH, Deutschland
Thermal Application Controller	Bruker, USA
Vortex-Rüttler	Werner Hassa GmbH, Deutschland
Waagen	
ABT 100-5M	Kern & Sohn GmbH, Deutschland
Cubis® II	Sartorius AG, Deutschland
PCB M Memory	Kern & Sohn GmbH, Deutschland
440-47N	Kern & Sohn GmbH, Deutschland
Wärmebad GFL®	Werner Hassa GmbH, Deutschland
Zentrifuge MIKRO 200R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Deutschland
Zentrifuge 5810	Eppendorf AG, Deutschland

7.7 Substanzen und Lösungen

Cell-Tak™	BD Biosciences, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biowest, USA
w/o Magnesium, w/o Calcium	
EnzyChrom HDL/LDL/VLDL Assay Kit 100T	Biotrend Chemikalien GmbH, Deutschland
Ethanol	J. T. Baker, Niederlande

Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Österreich
Flüssiger Stickstoff	Lokaler Lieferant
Gummi arabicum, sprühgetrocknet	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Deutschland
Isotone Natriumchlorid-Lösung 0,9%	Berlin-Chemie AG
Ketamin 10% Injektionslösung	medistar Arzneimittelvertrieb GmbH, Deutschland
Minimal essential medium (MEM)	Invitrogen Corp., USA
MEM Vitamine	Invitrogen Corp., USA
MEM nicht-essentielle Aminosäuren	Invitrogen Corp., USA
Natürliches Mineralwasser, evian®	Danone, Frankreich
Paraformaldehydlösung 4%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Penicillin	Gibco, USA
Ringer-Lösung	Berlin-Chemie AG, Deutschland
RNAprotect®	QIAGEN N.V., Deutschland
Streptomycin	Gibco, USA
Telmisartan	Boehringer Ingelheim, Deutschland
Triglyceride Colorimetric Assay Kit 96well Kit	Biomol GmbH, Deutschland
Trockeneis	UKSH Campus-Apotheke, Lübeck, Deutschland
Xylazin Rom pun® 2%	Bayer AG, Deutschland

7.8 Verbrauchsmaterialien

12-Well Zellkulturplatte CELLSTAR®	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Amber safe-lock tubes 0,5 ml	Eppendorf AG, Deutschland
Cantilever (30 pN/nm, spherical tip 10 µm)	Novascan Technologies, USA
Chow-Diät (EF acc. D12450B mod.)	ssniff® Spezialdiäten GmbH, Deutschland
Deckgläschen	Carl Roth, Deutschland
EDTA Microvette®, 100 K3E	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Einmalkanülen, AGANI™ Needle, 27Gx ³ / ₄ ''	Terumo Deutschland GmbH, Deutschland
Einmalkanülen, Microlance™ 3, 23Gx1''	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
Einmalkanülen, Microlance™ 3, 27Gx ³ / ₄ ''	Becton Dickinson GmbH, Deutschland

Einmalspritzen, BD Plastipak™, 1ml	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
Einmalspritzen, Injekt®-F Luer Solo, 0,01-1ml	B. Braun, Deutschland
Glukoseteststreifen, Accu-Chek® Inform II	Roche Deutschland, Deutschland
Hämatokritkapillaren, Na-Heparin, 60 µl, 75 mm	Hirschmann Laborgeräte, Deutschland
Latex-Einmalhandschuhe Peha-soft, powderfree	Paul Hartmann AG, Deutschland
LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel #740446	BioLegend, Inc., USA
Microvette® 500 LH	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Nitril-Einmalhandschuhe, Peha-soft® nitrile	Paul Hartmann AG, Deutschland
Parafilm® M	American National Can™, USA
Pipettenspitzen (20, 200, 1000 µl)	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Polypropylengefäße Falcon® (15 ml)	LABsolute®, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Polypropylengefäße Falcon® (50 ml)	Corning Science Mexiko S.A. de C. V., Mexiko
Reagiergefäß (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Serologische Pipetten (5, 10, 25 ml)	greiner bio-one GmbH, Deutschland
	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Szintillationsgefäße Pony Vial 6 ml	Revivity Diagnostics GmbH, Deutschland
Tupfer, Pur-Zellin®	Paul Hartmann AG, Deutschland
Vinyl-Einmalhandschuhe 2000 PF	Meditrade® GmbH, Deutschland
Wägeschalen, Plastik, verschiedene Größen	neoLab Migge GmbH, Deutschland
Western Diät	ssniff® Spezialdiäten GmbH, Deutschland
-EF TD88137 mod. +1.25% Cholesterol	
Zellkulturschale 35	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Zentrifugen-Filtereinheiten, Amicon® Ultra, 0,5 ml	Merck Millipore Ltd., Irland
Zellzähl-Kammern SD 100 Cellometer®	Nexcelom Bioscience LLC., USA

7.9 Software

EndNote 20.1	Clarivate, USA
GraphPad Prism, Version 7.0 und 8.0	GraphPad Software, USA
Minispec Plus 6.0.3	Bruker, USA

Office 365	Microsoft, USA
PlexScope	Qognit, USA
Protein Unfolding and Nano-Indentation Analysis Software	
- Puniyas 3D, Version 1.0 Release 2.3; Copyright 2009	
Research NanoScope Software, Version 9.20	Bruker, USA
Origin® 8.5 Data Analysis and Graphing Software	OriginLab®, USA

7.10 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
®/™	geschützter Warenname
<	kleiner als
>	größer als
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
AAV	<i>adeno associated virus</i>
Abcc2	<i>ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2</i>
Abcg8	<i>ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 8</i>
ACE	<i>Angiotensin-Converting-Enzym</i>
ACE2	<i>Angiotensinogen-Converting-Enzym-2</i>
Acta1	Aktin, Alpha 1
Actn3	<i>actinin, alpha 3 (gene/pseudogene)</i>
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>
AhR	<i>aryl hydrocarbon receptor</i>
Akp3	alkaline phosphatase 3
Aldh3a1	<i>aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1</i>
AMPK	AMP-Kinase
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
AngIII	Angiotensin III

AngIV	Angiotensin IV
Ang1-7	Angiotensin (1-7)
Ang1-9	Angiotensin (1-9)
Ang1-12	Angiotensin (1-12)
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
Apob	Apolipoprotein B
Apol11b	Apolipoprotein L 11b
ARB	AT ₁ -Rezeptor-Blocker
ARRIVE	<i>Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments</i>
Atp2a1	<i>ATPase, Ca⁺⁺ transporting, cardiac muscle, fast twitch 1</i>
AT ₁ R	Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1
AT ₂ R	Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2
BMI	<i>body mass index</i>
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
c	<i>copy</i>
C21	<i>Compound 21</i>
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Cass4	<i>Cas scaffolding protein family member 4</i>
CB1	Cannabinoid-Rezeptor Typ 1
CBBM	<i>Center of Brain, Behavior and Metabolism</i>
CCR2	<i>C-C chemokine receptor type 2</i>
Cdhr2	<i>cadherin-related family member 2</i>
Cd209g	<i>CD209 molecule</i>
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
Chad	<i>chondroadherin</i>
chow	Kontroll-/Standard-Diät
Cish	<i>cytokine inducible SH2-containing protein</i>
Ckm	Kreatinkinase, Muskel
Clrn3	<i>clarin 3</i>

CLS	<i>crown-like structures</i>
cm	Zentimeter
Cma1	<i>chymase 1, mast cell</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Coch	<i>cochlin</i>
COVID-19	<i>coronavirus disease 2019</i>
COX2	Cyclooxygenase 2
Cpa3	<i>carboxypeptidase A3 (mast cell)</i>
Cplane1	<i>ciliogenesis and planar polarity effector complex subunit 1</i>
Cpn2	Carboxypeptidase N Untereinheit 2
Cpt1b	Carnitin-Palmitoyltransferase 1b
CRP	C-reaktives Protein
Cstad	CSA-donditional, T cell activation-dependent
Cyp1a1	<i>cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1</i>
Cyp2d26	cytochrome P450, subfamily IID, polypeptide 26
Cyp2c50	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 50
Cyp2c54	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 54
Cyp2c29	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 29
Cyp2c70	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 70
C4bp	<i>complement component 4 binding protein</i>
d	Tag
Dio2	Deiodinase Typ 2
dko	Doppel <i>knock-out</i>
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Duoxa1	<i>dual oxidase maturation factor 1</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Efcab8	<i>EF-hand calcium binding domain 8</i>
Ehhadh	enoyl-CoA, hydratase/3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere

EZM	extrazelluläre Matrix
Fam20c	<i>Family with sequence similarity 20, member C</i>
fatp1	<i>fatty acid transport protein 1</i>
Fbp2	<i>fructose-1,6-bisphosphatase 2</i>
FDR	<i>false discovery rate</i>
Fer1l6	<i>fer-1-like family member 6</i>
FGF21	<i>fibroblastic growth factor 21</i>
FMD	<i>flow-mediated dilation</i>
FVB	<i>Friend leukemia virus B</i>
G	<i>gauge</i>
g	Gramm
g	mittlere Erdbeschleunigung (für Angabe der Beschleunigung einer Zentrifuge)
Gabra4	<i>gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 4</i>
Gata1	<i>GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1)</i>
Gfi1b	<i>growth factor independent 1B transcription repressor</i>
GIP-1	glucose-dependent insulinotropic peptide-1
GLP-1	<i>Glucagon-like-Peptide 1</i>
GLUT4	Glukosetransporter Typ 4
Gm47593	predicted gene, 47593
Gm47595	predicted gene, 47595
GTH	Gemeinsame Tierhaltung der Universität zu Lübeck
h	Stunde
HbA1c	Hämoglobin A1c
HDL	High Density Lipoprotein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Heph1l	<i>hephaestin-like 1</i>
HFD	<i>High fat Diät</i>
HIF- α	<i>hypoxia-inducible factor 1α</i>
Hk2	Hexokinase 2
Hkdc1	<i>hexokinase domain containing 1</i>
HLA	Humane Leukozyten-Antigene
HOMA	<i>homeostasis model assessment</i>

HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
HSL	Hormon-sensitive Lipase
Hydin	<i>HYDIN, axonemal central pair apparatus protein</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IFN- γ	Interferon- γ
Iglv2	<i>immunoglobulin lambda variable 2</i>
Igkv14-126	<i>immunoglobulin kappa variable 14-126</i>
Ighv6-3	<i>immunoglobulin heavy variable 6-3</i>
Igkv12-89	<i>immunoglobulin kappa variable 12-89</i>
Igkv5-37	<i>immunoglobulin kappa variable 5-37</i>
IL	Interleukin
IVC	<i>isolated ventilated cage</i>
KCl	Kaliumchlorid
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzkrankheit
ko	<i>Knockout</i>
L	Liter
LctI	<i>lactase-like</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LDLR	<i>Low Density Lipoprotein-Rezeptor</i>
Lect2	<i>leukocyte cell-derived chemotaxin 2</i>
Lipf	Lipase, <i>gastric</i>
LPS	Lipopolysaccharid
Ltb4r1	<i>leukotriene B4 receptor 1</i>
LXR	Leber-X-Rezeptor
Ly6g2	lymphocyte antigen 6 complex, locus G2
m ²	Quadratmeter
Malrd1	<i>MAM and LDL receptor class A domain containing 1</i>
Marveld3	<i>MARVEL domain containing 3</i>

Mas ko	Mas-Rezeptor <i>knockout</i>
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein 1</i>
Mcpt4	<i>mast cell protease 4</i>
MELUR	Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung des Landes Schleswig-Holstein
MEM	<i>Minimal essential medium</i>
mg	Milligramm
Mgam	Maltase-Glucoamylase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	Minute
MJ	Megajoule
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
MMP	Matrix-Metalloprotease
MrgD	<i>Mas-related G-protein-coupled receptor D</i>
Mrgprg	<i>MAS-related GPR, member G</i>
Mrgprb1	MAS-related G-protein coupled receptor member B1
mRNA	<i>messenger Ribonukleinsäure</i>
Ms4a2	<i>membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 2</i>
mTOR	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
Muc1	<i>mucin-like 1</i>
Muc3	<i>intestinal mucin-like</i>
Mup9	<i>major urinary protein 9</i>
Myh	<i>Myosin heavy chain</i>
Myoz1	<i>myozenin 1</i>
N	Newton
n	Anzahl der Stichproben
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat

NF-κB	<i>nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
nm	Nanometer
Nnat	<i>neuronatin</i>
NNT	Nicotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase
NO	Stickstoffmonoxid
Npr3	Natriuretisches Peptid Rezeptor 3
Nr1i2	<i>nuclear receptor subfamily 1, group 1, member 2</i>
n.s.	nicht signifikant
O ₂	Sauerstoff
ORO	Oil Red O
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAH	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCA	<i>principal component analysis</i>
PCSK9	Proprotein Konvertase Subtilisin/Kexin Typ 9
Pem1	pollen expressed MBD-like 1
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia hydrogenii
Pilrb	<i>paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta</i>
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKG1a	Proteinkinase G1a
Pklr	<i>pyruvate kinase, liver and RBC</i>
p.o.	per os
Pon1	Paraoxonase 1
PPAR	<i>peroxisome proliferator activated receptor</i>
Ppp1r3c	<i>Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3C</i>
PRA	Plasma-Renin-Aktivität
Prom2	<i>prominin 2</i>
Prr32	<i>proline rich 32</i>
Prss32	<i>protease, serine, 32</i>

Pvalb	Parvalbumin
PXR	<i>pregnane-X-receptor</i>
PYY	Peptid YY
RAGE	<i>receptor for advanced glycation end products</i>
RAS	Renin-Angiotensin-System
Reg3a	<i>regenerating islet-derived 3 alpha</i>
Ren-1	Gen für Renin-1
Ren-2	Gen für Renin-2
Retnlg	resistin-like gamma precursor
Rgn	<i>regucalcin</i>
Rgs2	<i>regulator of G-Protein signalling 2</i>
Rik	nicht-codierende RNA (RIKEN Center)
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
ROUT	Robuste Regression und Ausreißerentfernung
RXR	Retinoid X Rezeptor
SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2
s.c.	subkutan
SD	Standardabweichung
Seq	Sequenzierung
Serpina3j	<i>serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3</i>
Serpinb10	<i>serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 10</i>
Serpine1	<i>serpin peptidase inhibitor, clade E, member 1</i>
SGLT2	Sodium dependent glucose transporter-2
Sis	sucrase isomaltase
Slc	<i>solute carrier family</i>
Slc01b2	solute carrier organic anion transporter family, member 1b2
Slpi	<i>secretory leukocyte peptidase inhibitor</i>
SREBP2	<i>sterol regulatory element-binding protein 2</i>
Sult6b2	<i>sulfotransferase family, cytosolic, 6B, member 2</i>
Syndig1l	<i>synapse differentiation inducing 1-like</i>
t	Zeit

Tab.	Tabelle
TEL	Telmisartan
Themis3	<i>thymocyte selection associated family member 3</i>
TierSchVersV	Tierschutz-Versuchstier-Verordnung
TLR	<i>toll-like-receptor</i>
Tmprss15	<i>transmembrane protease, serine 15</i>
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
Tnnt3	Troponin T Typ 3
t-PA	<i>tissue plasminogen activator</i>
Tph2	<i>tryptophan hydroxylase 2</i>
Tpsb2	<i>tryptase beta 2</i>
Tst	Thiosulfat-Sulfurtransferase
U	Unit
u. a.	unter anderem
UCP-1	uncoupling protein-1
Ugt1a1	<i>UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1</i>
Ugt2b1	<i>UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B1</i>
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEH	Vehikel
vs.	versus
WD	Western Diät
WHO	<i>World Health Organization</i>
wt	Wildtyp
x	mal
z. B.	zum Beispiel
ZO-1	Zonula occludens 1
ZNS	zentrales Nervensystem

8 Danksagung

Für die Bereitstellung von Arbeitsplatz und Material danke ich dem Institutsdirektor Herrn Prof. Dr. Markus Schwaninger.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Walter Raasch, für das Überlassen des Themas, die kontinuierliche hervorragende Betreuung dieser Arbeit und sein stets offenes Ohr für alle Fragen und Sorgen.

Zu dem Gelingen dieses Projekts haben zahlreiche Kooperationspartner beigetragen. Bedanken möchte ich mich zunächst bei Prof. Dr. Kristina Kusche und Dr. Benedikt Fels vom Institut für Physiologie für ihre Expertise in der *atomic force microscopy*, die tatkräftige Beteiligung an Planung und Ausführung dieser Studie. Ebenso danken möchte ich PD Dr. Zouhair Aherrahrou vom Institut für Kardiogenetik für die Erstellung der histologischen Analysen und die Messungen des Lipidprofils. Zu danken habe ich Prof. Dr. med. Oliver Müller für die Bereitstellung des PCSK9^{DY}-AAV, Prof. Dr. Michael Bader für den Embryonentransfer der Mas ko Mäuse sowie Prof. Dr. Ralf Brandes und Dr. Flavia Rezende für die Nitrit-Messung und RNA-Sequenzierung.

Für die finanzielle Unterstützung dieses Projekts danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und dem Deutschen Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung (DZHK). Dem Graduiertenkolleg „Adipocyte-Brain-Crosstalk“ danke ich ebenso für die finanzielle aber insbesondere für die wissenschaftliche Unterstützung. Dank gilt auch der Studienstiftung des Deutschen Volkes und meiner Vertrauensdozentin Prof. Dr. Kristina Kusche für finanzielle und ideelle Förderung.

Für die Beteiligung an der Durchführung dieser Studie möchte ich u. a. Urszula Frackowski und Annett Liebers für die Aortenpräparation danken sowie Cosima Xenia Schmidt und Frauke Spieker für die Unterstützung bei den i.v.-Injektionen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Ines Stölting, die mit ihrer fortwährenden Unterstützung und herzlichen Art maßgeblich zum Gelingen dieses Projekts beigetragen hat.

Ebenso herzlich danken möchte ich meiner Laborpartnerin Leonie Achner, mit der ich stets vertrauensvoll, verlässlich, freundschaftlich zusammengearbeitet habe und mit der ich mich immer offen über alle anstehenden Schritte, Probleme und Sorgen austauschen konnte.

Meinen Freunden und meiner Familie danke ich für die Motivation und Unterstützung während der gesamten Zeit der Promotion, aber auch für willkommene Ablenkung in schwierigen Phasen.

9 Lebenslauf

Tobias Klersy

Beruflicher Werdegang

Seit 03/2024 Assistenzarzt in der Klinik für Neurologie an den Sana Kliniken Lübeck

Schule/Ausbildung

10/2019 – 2025 Promotion am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität zu Lübeck

Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Walter Raasch

Kooperationspartner: Dr. hum. biol. Zouhair Aherrahrou, Institut für Kardiogenetik, Universität zu Lübeck; Prof. Dr. Oliver J. Müller, UKSH Campus Kiel; Prof. Dr. Ralf Brandes, *Vascular Research Center*, Frankfurt am Main; Prof. Dr. Michael Bader, *Max Delbrück Center for Molecular Medicine*, Berlin; *Max Planck Institute for Heart and Lung Research* in Bad Nauheim

10/2016 - 12/2023 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck

09/2018 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

10/2022 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

12/2023 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

11/2022 – 10/2023 Praktisches Jahr

UKSH Lübeck (Innere Medizin)

DRK Krankenhaus Ratzeburg (Chirurgie)

Sana Kliniken Lübeck (Neurologie)

2007-2016 Landesmusikgymnasium Rheinland-Pfalz (Allgemeine Hochschulreife, Note 1,0)

Stipendien

- 2019 – 2023 Studienstiftung des deutschen Volkes
- 04/2021 – 10/2021 Stipendium des GRK 1957 Adipocyte-Brain-Crosstalk (finanziert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG)

Veröffentlichungen und Vorträge

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

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

46. Deutscher Hypertonie Kongress, Using the AAV-PCSK9^{DY} mouse model in experimental hypertension. 1.-3.12. 2022 Berlin

GRK Summer School 2021

Achner, L.*, **Klersy, T.***, Fels, B., Reinberger, T., Schmidt, C. X., Gross, N., Hille, S., Muller, O. J., Aherrahrou, Z., Kusche-Vihrog, K., & Raasch, W. (2022). AFM-based nanoindentation indicates an impaired cortical stiffness in the AAV-PCSK9(DY) atherosclerosis mouse model. *Pflugers Arch*, 474(9), 993-1002.

Klersy, T.*, Achner, L.*, Fels, B., Rezende, F., Lopez, M., Alenina, N., Spiecker, F., Stolting, I., Hauser, W., Reinberger, T., Aherrahrou, Z., Kuenne, C., Vahldieck, C., Matschl, U., Hille, S., Bader, M., Brandes, R. P., Muller, O. J., Kusche-Vihrog, K., & Raasch, W. (2025). The anti-atherosclerotic effect of chronic AT1 receptor blocker treatment also depends on the ACE2/Ang(1-7)/Mas axis. *Biomed Pharmacother*, 186, 117990.

* gleichberechtigte Erstautorenschaft