

# **Mechanismen des Transfers von Ceramiden in extrazellulären Vesikeln als Mediatoren der endothelialen Apoptose**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Alina Lisann Jahnel**

aus Remscheid

2024

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. Felix Jansen
2. Gutachter: Prof. Dr. Bernardo Simões Franklin

Tag der Mündlichen Prüfung: 15.11.2023

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II – Innere Medizin (Kardiologie, Angiologie,  
Pneumologie und Internistische Intensivmedizin)

Direktor: Prof. Dr. med. Georg Nickenig

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	6
<b>1. Einleitung</b> .....	8
1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen .....	8
1.2 Pathomechanismus der Arteriosklerose .....	9
1.3 Einfluss von apoptotischen Endothelzellen auf die Arteriosklerose .....	10
1.4 Einfluss von Extrazellulären Vesikeln auf die Arteriosklerose .....	12
1.5 Ceramide und Sphingomyelinasen.....	15
1.6 Zielsetzung .....	20
<b>2. Material und Methoden</b> .....	21
2.1 Material.....	21
2.1.1 Geräteliste .....	21
2.1.2 Software .....	22
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	22
2.1.4 Zellkulturmaterial .....	23
2.1.5 Reagenzien .....	24
2.2 Methoden .....	26
2.2.1 Zellkultur mit HCAEC.....	26
2.2.1.1 Zelllinie und Kultivierung.....	26
2.2.1.2 Passagieren .....	27
2.2.1.3 Kryokonservierung und Auftauen von HCAEC .....	28
2.2.2 Reagenzien .....	28
2.2.2.1 Glukose .....	28
2.2.2.2 C16 Ceramid (d18:1 16:0) .....	28
2.2.2.3 NBD-C12 Ceramid .....	29

2.2.2.4	Knock-down der SMPD3 .....	29
2.2.2.5	GW4869 .....	30
2.2.3	Analyse von EV .....	30
2.2.3.1	Nanopartikel Tracking Analyse (NTA) .....	30
2.2.3.2	Elektronenmikroskopie .....	30
2.2.3.3	Massenspektrometrie .....	31
2.2.4	Analyse apoptotischer Zellen .....	32
2.2.4.1	MTT-Assay .....	32
2.2.4.2	Apoptose-Assay .....	33
2.2.5	Genexpressionsanalyse mittels quantitativer real-time PCR .....	36
2.2.5.1	RNA-Isolation aus Zelllysat .....	36
2.2.5.2	Umschreibung der RNA in cDNA .....	37
2.2.5.3	Quantitative real-time PCR .....	37
2.2.6	SMase Aktivitätsassay .....	38
2.2.6.1	Kolorimetrischer nSMase Assay .....	38
2.2.6.2	Fluorometrischer aSMase Assay .....	39
2.2.7	Statistische Auswertung .....	40
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>41</b>
3.1	EV Charakterisierung .....	41
3.2	Einfluss von Glukose auf die Sphingolipid- und Ceramidzusammensetzung in HCAEC und EV .....	42
3.3	Einfluss von Glukose auf die Aktivität und Genexpression von Sphingomyelinasen .....	44
3.4	Auswirkung von Hyperglykämien auf die Apoptose .....	46
3.5	Aufnahme und Transport von exogen hinzugefügten Ceramid .....	48

3.6	Auswirkung der Ceramid Behandlung auf die Apoptose von HCAEC und EV Zielzellen .....	51
3.7	Genexpression der SMPD3 nach SMPD3 Knock-down Behandlung .....	53
3.8	Einfluss von SMPD3 Knock-down und pharmakologische Inhibition mit GW4869 auf die Apoptose von HCAEC .....	54
3.9	Einfluss von SMPD3 Knock-down und pharmakologische Inhibition mit GW4869 auf die Apoptose von EV Zielzellen.....	55
3.10	Analyse der Ceramid Konzentration in HCAEC und EV nach GW4869 Behandlung .....	57
3.11	Einfluss von Glukose, C16 und SMPD3 Knock-down auf die Konzentration und Partikelgröße der EV .....	58
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>60</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>71</b>
<b>6.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>73</b>
<b>7.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>75</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>76</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>95</b>

## Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
ANOVA	Varianzanalyse (Analysis of Variance)
aSMase	Saure Sphingomyelinase
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovine Serum Albumin
C16	d18:1 16:0 Ceramid
Caspasen	Cystein-abhängige Aspartat-spezifische Protease
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ct	Cycle Threshold
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT2	Diabetes Mellitus Typ 2
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Phosphatgepufferte Salzlösung nach Dulbecco (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESCRT	Endosomal sorting complexes required for transport
EV	Extrazelluläre Vesikel
FITC	Fluorescein
HCAEC	Humane koronararterielle Endothelzellen (Human Coronary Artery Endothelial Cells)
Hepes BSS	Hepes buffered balanced salt solution

HUVEC	Humane umbilikalvenöse Endothelzellen (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)
KHK	Koronare Herzerkrankung
LDL	Low-density Lipoprotein
miRNA	microRNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MV	Mikrovesikel
NBD	Nitrobenzoxadiazole
NO	Stickstoffmonoxid
nSMase	Neutrale Sphingomyelinase
NTA	Nanopartikel Tracking Analyse
oxLDL	Oxidiertes Low-density Lipoprotein
PFA	Paraformaldehyd
qPCR	Quantitative real-time polymerase chain reaction
Q-TOF MS / MS	Quadrupole time-of-flight Massenspektrometrie
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Sauerstoffradikale (reactive oxygen species)
siRNA	Small interfering Ribonukleinsäure
SMase	Sphingomyelinase
SMPD1	Sphingomyelin Phosphodiesesterase 1
SMPD2	Sphingomyelin Phosphodiesesterase 2
SMPD3	Sphingomyelin Phosphodiesesterase 3
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TNS	Trypsin Neutralization Solution

# 1. Einleitung

## 1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind eine der häufigsten Todesursachen weltweit (World Health Organization, 2021). In Europa sterben jedes Jahr rund 3,9 Millionen Menschen (45 % aller Todesfälle) an den Folgen von kardiovaskulären Erkrankungen (Wilkins et al., 2017). Lebensbedrohliche Komplikationen stellen vor allem Myokardinfarkte und Schlaganfälle dar (Wilkins et al., 2017). Pathophysiologisch liegt den kardiovaskulären Erkrankungen eine Gefäßverengung durch Ausbildung atherosklerotischer Plaques (Libby et al., 2019; Lusis, 2000). Einfluss auf die Pathogenese nehmen verschiedene Risikofaktoren, welche zur Einschätzung des kardiovaskulären Risikos anhand von Scoring-Modellen herangezogen werden können (Assmann und Schulte 1988; Wilson et al., 1998). Neben verhaltensabhängigen Risikofaktoren wie Nikotinkonsum, körperliche Inaktivität sowie fett- und kohlenhydratreiche Ernährung mit daraus resultierenden erhöhten Body Mass Index (BMI) begünstigen auch verhaltensunabhängige Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Hyperlipidämien, Diabetes Mellitus, genetische Faktoren und das männliche Geschlecht die Entstehung von Arteriosklerose (Benjamin et al., 2019; Timmis et al., 2019; Wilkins et al., 2017).

Trotz vieler therapeutischer Behandlungsmöglichkeiten wie Lebensstiländerungen, Antihypertensiva, Lipidsenker, Antidiabetika und Antikoagulationen stieg die Anzahl der Erkrankten innerhalb der letzten 25 Jahre in der Europäischen Union weiter an (Weber und Noels, 2011; Wilkins et al., 2017). Die Behandlungskosten in der Europäischen Union belaufen sich auf rund 210 Billionen Euro pro Jahr (Wilkins et al., 2017).

Eine intensivierete Forschung im Bereich kardiovaskulärer Erkrankungen eröffnet die Möglichkeit mit einem verbesserten Verständnis der Pathomechanismen neue Diagnostik- und Therapieoptionen zu entwickeln, mit der Folge präventiv tätig werden zu können und Komplikationen der Arteriosklerose entscheidend zu minimieren.



## 1.2 Pathomechanismus der Arteriosklerose

Arteriosklerose ist eine Systemerkrankung, die sich in allen Blutgefäßen des Organismus manifestiert und durch eine Gefäßwandverhärtung und -verdickung gekennzeichnet ist. Die häufigste Form ist die Atherosklerose, die sich durch Intimaschädigungen und konsekutiver Ausbildung von Plaques entwickelt. Die Vaskularisation wird durch eine Verringerung des Gefäßdurchmessers oder durch Ausbildung von Thromben eingeschränkt. Bezogen auf die Koronararterien birgt dies die Problematik einer lebensbedrohlichen Ischämie. Eine zentrale Rolle in dieser Pathogenese der Plaquebildung spielen Endotheldysfunktionen, Ablagerungen von Blutfetten und Inflammationen (Falk, 2006; Libby et al., 2019; Lusis, 2000; Weber und Noels, 2011).

In der Vergangenheit wurde angenommen, dass die Entstehung der Plaques durch eine passive Akkumulation von Lipiden in die Gefäßwände bedingt sei (Wesselkin, 1913). Neue Forschungsergebnisse der letzten zwei Jahrzehnte zeigen jedoch, dass die pathophysiologischen Prozesse der Atherosklerose weitaus komplexer sind (Libby et al., 2011; Schaftenaar et al., 2016).

In Anlehnung an das Response-to-injury-Modell von Ross und Glomset (1976) sollen im Folgenden wichtige Erkenntnisse der Pathogenese der Atherosklerose dargestellt werden. Auslöser der Plaquebildung seien dementsprechend Endothelschädigungen, an denen eine Akkumulation von Low-density Lipoproteinen (LDL) stattfinden könne (Gimbrone und García-Cardena, 2016; Lusis, 2000; Ross und Glomset, 1976). Aufgrund der oxidativen Modifikation des LDL u. a. durch Sauerstoffradikale (ROS), lysosomale Proteasen und Phospholipasen entstehen nachfolgend oxidierte LDL-Cholesterine (oxLDL) (Hurt-Camejo et al., 1997; Leake et al., 1990). Diese stimulieren in Endothelzellen die Expression von proinflammatorischen Stoffen wie Adhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren (Witztum und Steinberg, 1991). Die höhere Anzahl an Adhäsionsmolekülen bewirken eine verstärkte Anlagerung von Thrombozyten, Monozyten und Lymphozyten am geschädigten Endothel. Durch Einwanderung der Monozyten in die Gefäßwand differenzieren sie sich zu gewebständigen Makrophagen, die das oxLDL aufnehmen und sich zu Schaumzellen entwickeln (Falk, 2006; Libby et al., 2019; Lusis, 2000; Napoli, 1997; Schaftenaar et al., 2016; Witztum und Steinberg, 1991; Wu et al., 2017). Das geschädigte Endothel und die Immunzellen setzen Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren

frei, die eine Auswanderung von glatten Muskelzellen aus der Tunica media stimulieren. Sie bilden die fibröse Kapsel der atherosklerotischen Plaques durch Produktion von Kollagen, Elastin und Proteoglykanen (Basatemur, 2019; Lusic, 2000; Wu et al., 2017). Durch Akkumulation von Cholesterinkristallen, apoptotischen Schaum- und glatten Muskelzellen entsteht im Zentrum der Plaques ein nekrotischer Kern. Die zunehmende Verengung des Gefäßlumens und die Gefahr der Plaqueruptur mit anschließender Thrombenbildung können zu lebensbedrohlichen Ischämien führen (Falk, 2006; Lusic, 2000).

Im Rahmen der Atherosklerose kommt insbesondere den Endothelzellen eine besondere Bedeutung zu, da sie eine Barrierschicht zwischen Blutkreislauf und umliegendem Gewebe bilden, wodurch die Passage von Biomolekülen und Immunzellen kontrolliert wird. Endothelzellen können den Gefäßtonus, die Zelladhäsion und die Proliferation von glatten Muskelzellen regulieren. Dadurch erhalten sie eine entscheidende Bedeutung in der Hämostase von antikoagulatorischer, antithrombotischer und antiinflammatorischer Aktivität (Gimbrone und García-Cardeña, 2016; Paone et al., 2019). Aufgrund von apoptotischen Endothelzellen entstehen Läsionen in der Intima von Gefäßwänden, welche die Progression der Atherosklerose fördern können (Gimbrone und García-Cardeña, 2016).

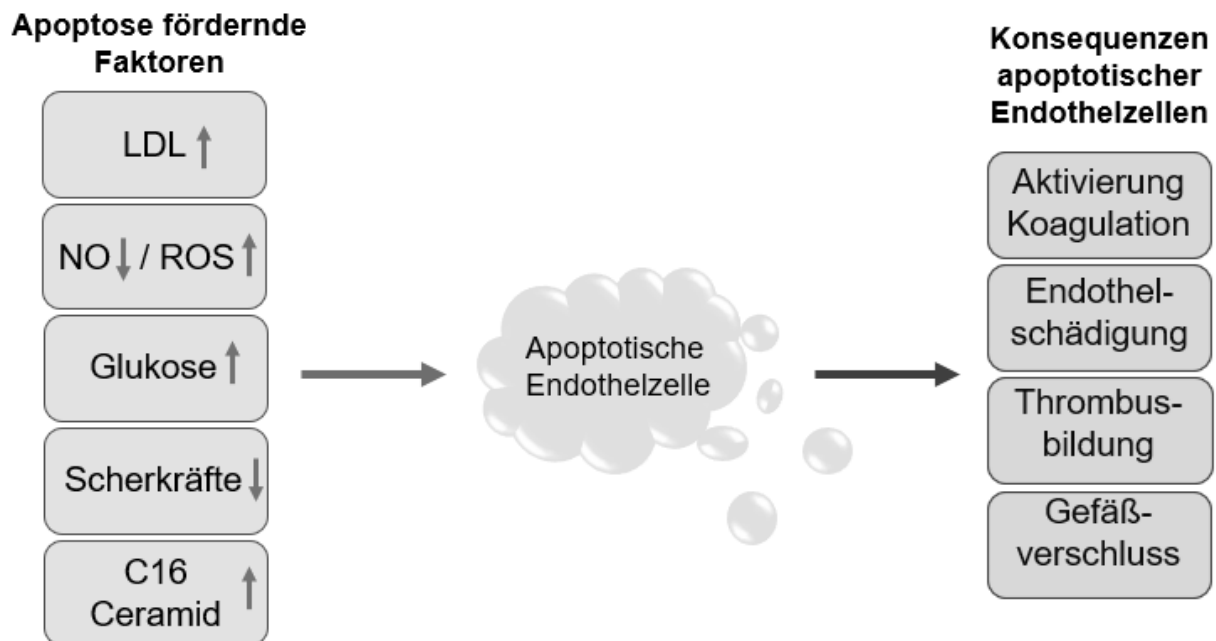
### 1.3 Einfluss von apoptotischen Endothelzellen auf die Arteriosklerose

Unter der Apoptose versteht man den programmierten Zelltod, der Einfluss auf die physiologische Zell- und Organhämostase hat (Kerr et al., 1972). Der Ablauf der Apoptose ist genetisch determiniert und kann durch zwei unterschiedliche Signalwege, den intrinsischen oder den extrinsischen Weg, ausgelöst werden (Metzstein et al., 1998; Singh et al., 2019). Bei beiden Signalwegen kommt es zu einer Aktivierung von Cystein-abhängigen Aspartat-spezifischen Proteasen (Caspasen), insbesondere den Initiator-Caspasen 8 und 9. In der gemeinsamen Endstrecke werden die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 aktiviert, welche die Apoptose einleiten (McIlwain et al., 2013). Sie beginnt mit der Fragmentation von Desoxyribonukleinsäure (DNA) durch Endonukleasen. Die Kernproteine und das Zytoskelett werden abgebaut und die Phospholipide der Membran umverteilt. Schließlich können die apoptotischen Körperchen durch Phagozytose abgebaut werden (D'Arcy, 2019; Elmore, 2007; Singh et al., 2019; Taylor et al., 2008).

Der extrinsische Weg wird durch extrazelluläre Todesliganden, wie z. B. den Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) oder den Fas-Ligand ausgelöst, welche an ihre spezifischen Rezeptoren aus der Familie der Todesrezeptoren binden. An die nach intrazellulär reichende Todesdomäne des Rezeptors bindet zuerst das TNF-Rezeptor-assoziierte Protein und im zweiten Schritt das Fas-assoziierte Protein mit der Todesdomäne. Das Fas-assoziierte Protein mit Todesdomäne besitzt zusätzlich eine Todeseffektordomäne, welche die Caspase 8 aktiviert (Igney und Krammer, 2002; Juo et al., 1998; McIlwain et al., 2013).

Der intrinsische Weg wird durch einen Anstieg von proapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie ausgelöst. Der Anstieg dieser proapoptotischen Proteine geschieht vor allem durch Akkumulation von p53 nach DNA-Schäden oder durch ausbleibende Überlebenssignale. Die proapoptotischen Proteine erhöhen die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran und ermöglichen den Austritt von Cytochrom C in das Zytosol. Durch Ausbildung eines Komplexes aus Cytochrom C, dem apoptotischen Protease-Aktivierungsfaktor-1 und der Procaspase-9 wird die Caspase 9 aktiviert (D'Arcy, 2019; Igney und Krammer, 2002; McIlwain et al., 2013; Singh et al., 2019).

Auslöser der endothelialen Apoptose sind u. a. erhöhte LDL- und Glukose- sowie verringerte Stickstoffmonoxid- (NO) Konzentrationen, vermehrte reaktive Sauerstoffspezies und verringerte Scherkräfte durch turbulente Ströme (Cyr et al., 2020; Duan et al., 2021; Incalza et al., 2018; Paone et al., 2019; Sheu et al., 2005; Souilhol et al., 2020). In diesem Kontext gelangen Ceramide immer mehr in den Fokus der aktuellen Forschung, da sie einen proapoptotischen Effekt auf Endothelzellen ausüben (Mullen und Obeid, 2012). Studien zeigen eine Korrelation zwischen der Menge zirkulierender Ceramide im Plasma und einem erhöhten Risiko kardiovaskulärer Ereignisse (de Carvalho et al., 2018; Summers, 2018). Beeinträchtigungen der Barrierefunktion fördern die Anreicherung von LDL, die Einwanderung von Monozyten und die Initiierung der Plaquebildung (Witztum und Steinberg, 1991). Aufgrund einer verminderten antikoagulatorischen und antithrombotischen Aktivität können Thromben gebildet und kardiovaskuläre Ereignisse ausgelöst werden (s. Abb. 1) (Paone et al., 2019).



**Abb. 1:** Einfluss von apoptotischen Zellen auf die Pathogenese der Arteriosklerose. Apoptose-fördernde Faktoren sind erhöhte Glukosespiegel sowie LDL und C16 Ceramid Konzentrationen, vermehrte Sauerstoffradikale (ROS), verringerte Stickstoffmonoxid (NO) Konzentrationen und verringerte Scherkräfte. Apoptotische Endothelzellen fördern Koagulation, Thrombenbildung und Gefäßverschluss (eigene Darstellung in Anlehnung an Paone et al., 2019).

#### 1.4 Einfluss von Extrazellulären Vesikeln auf die Arteriosklerose

Extrazelluläre Vesikel (EV) sind sezernierte Membranpartikel, welche erstmals von Pan und Johnstone (1983) entdeckt wurden. Erst im letzten Jahrzehnt wurde die Bedeutung von EV in der Homöostase der Zelle, in der Zell-Zell-Kommunikation sowie in ihrer Fähigkeit, den Phänotyp und die Funktion ihrer Zielzelle zu beeinflussen, bekannt (Mathieu et al., 2019; van Niel et al., 2022). Der Transport von bioaktiven Molekülen wie beispielsweise Proteinen, microRNA (miRNA) und Lipiden wirken sich auf verschiedene biologische Prozesse aus (van Niel et al., 2022). Außerdem transportieren sie wichtige Mediatoren, wie Zytokine, Wachstumsfaktoren und Transkriptionsfaktoren, welche z. B. die Regulationen von Entzündungsprozessen und die Apoptose beeinflussen (Abels und Breakefield, 2016; Paone et al., 2019). Darüber hinaus hat der Transfer von EV Auswirkungen auf die Pathogenese der Arteriosklerose, indem sie endotheliale Dysfunktionen und Entzündungsreaktionen sowie den daraus resultierenden Umbau der Gefäßwände

beeinflussen (Berda-Haddad et al., 2011; Chistiakov et al., 2015; Hergenreider et al., 2012; Jansen et al., 2013; Jansen et al., 2015; Jansen et al., 2017; Lawson et al., 2016; Liu et al., 2021; Njock et al., 2015; Paone et al., 2019; Zerneck et al., 2009; Zhan et al., 2009; Zietzer et al., 2020). Zusätzlich weisen verschiedene Studien darauf hin, dass EV und deren Lipidzusammensetzungen als mögliche Biomarker zur Detektion und zum Monitoring kardiovaskulärer Erkrankungen eingesetzt werden könnten (Boulanger et al., 2017; Yin et al., 2015). Differenziert werden die EV in apoptotische Körperchen, Mikrovesikel (MV) und Exosomen (Paone et al., 2019; Théry et al., 2018) (s. Tab. 1).

Die während der Apoptose ausgebildeten apoptotischen Körperchen sind mit einem Durchmesser von 500 – 2000 nm die größten Vesikel und beinhalten DNA, RNA, Proteine, Zellorganellen und nukleäre Bestandteile (D'Arcy, 2019; Elmore, 2007; Paone et al., 2019). MV sind 10 – 1000 nm groß und werden von der Plasmamembran vitaler Zellen  $Ca^{2+}$ -abhängig abgeschnürt. Die Bildung der MV geschieht über eine Umverteilung von Phospholipiden durch die Positionierung von Phosphatidylserin in die äußere Membran und über eine Kontraktion des Aktin- und Myosinapparates (van Niel et al., 2018). Sie transportieren RNA, Proteine, Lipide und Zellorganellen. Exosomen sind mit 20 – 100 nm die kleinsten EV. Sie entwickeln sich durch intraluminales Abschnüren von Endosomen und Bildung von interlaminaären Vesikeln zu multivesikulären Körperchen (Raposo und Stoorvogel, 2013). Die Sekretion der Exosomen läuft entweder über Komplexe wie dem endosomal sorting complexes required for transport-Komplex (ESCRT) oder ESCRT-unabhängig mithilfe von Tetraspanin-Mikrodomänen oder Lipidrafts (Lipidflößen) ab (Pols und Klumperman, 2009; Wollert und Hurley, 2010). Zudem konnte gezeigt werden, dass Ceramide und neutrale Sphingomyelinasen (nSMase) die Ausbildung von Exosomen beeinflussen (Menck et al., 2017; Trajkovic et al., 2008; Record et al., 2018).

Nach der Freisetzung der EV in den extrazellulären Raum kann dies zu einer Interaktion mit Nachbarzellen, den EV Zielzellen, führen. Eine mögliche Interaktion ist die Liganden-Rezeptor-Bindungen mit Aktivierung verschiedener Signalkaskaden. Eine Zweite funktioniert mittels Fusion, wobei die Inhalte der EV direkt in das Zytoplasma freigesetzt werden; eine Dritte mittels Endozytose, deren Aufnahme vom Zelltyp, der Zellhomöostase und den Rezeptoren auf der Zelloberfläche abhängt (Mulcahy et al., 2014; van Niel et al.,

2018). In Endothelzellen ist insbesondere die Caveolin-vermittelte Endozytose relevant (Abels und Breakefield, 2016; van Niel et al., 2018).

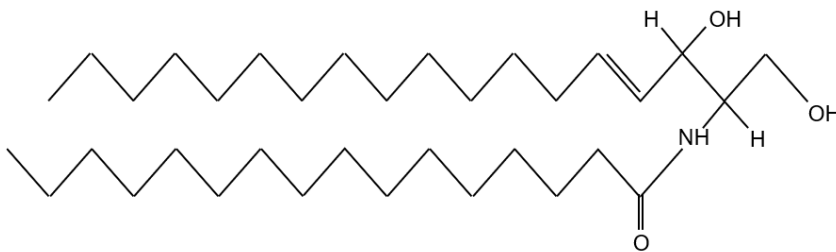
**Tab. 1:** Klassifikation der EV Populationen

	<b>Exosomen</b>	<b>Mikrovesikel</b>	<b>Apoptotische Körperchen</b>
<b>Größe</b>	20 – 100 nm	10 – 1000 nm	500 – 2000 nm
<b>Ursprung</b>	Endosomen	Zellmembran vitaler Zellen	Zellmembran apoptotischer Zellen
<b>Bildung</b>	Exozytose der Multivesikulären Körperchen; ESCRT-, Tetraspanin-, Ceramid-, neutrale Sphingomyelinase-abhängig	Abschnürung der Membran Ca <sup>2+</sup> -abhängig	Abschnürung der Membran während der Apoptose
<b>Inhalt</b>	(nicht-) kodierende RNA, Proteine, Lipide	(nicht-) kodierende RNA, Proteine, Lipide, Zellorganellen	(nicht-) kodierende RNA, DNA, Proteine, Zellorganellen, nukleäre Bestandteile
<b>Tabelle in Anlehnung an Trajkovic et al., 2008; Todorova et al., 2017; Yin et al., 2015.</b>			

Insbesondere die Lipidzusammensetzungen der EV geraten immer mehr in den Fokus der aktuellen Forschung. Abhängig vom Typ der EV und der Ursprungszelllinie lassen sich unterschiedliche Zusammensetzungen in der Massenspektrometrie detektieren (Skotland et al., 2017). Die überwiegenden Bestandteile der EV gehören zu der Klasse der Sphingolipide, wie Sphingomyelin, Cholesterin, Gangliosid GM3, ungesättigte Fettsäuren, Phosphatidylserin und Ceramide (Abels und Breakefield, 2016; Zaborowski et al., 2015). Neuste Studien konnten zeigen, dass sich die Lipidzusammensetzung in EV bereits vor und während eines kardiovaskulären Ereignisses verändert (Burrello et al., 2020; de Carvalho et al., 2018; Summers, 2018). Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, um den Einfluss der Lipidzusammensetzung der EV auf die Organhomöostase und arteriosklerotische Pathogenese zu verstehen.

## 1.5 Ceramide und Sphingomyelinasen

Sphingolipide sind bioaktive Membranlipide und beeinflussen Struktur und Fluidität von Membranen. Zum einen agieren sie als Effektormoleküle und beeinflussen Inflammation, Zellproliferation, Apoptose und Zellmigration. Zum anderen bilden sie sogenannte Lipidrafts in Membranen aus, welche wichtig für die Endozytose, die Signaltransduktion und die Sortierung von Proteinen im Golgi-Apparat sind (Hannun und Obeid, 2018; Ogretmen und Hannun, 2004). Insbesondere das im Folgenden relevante Ceramid d18:1 16:0 (C16), bestehend aus einer Fettsäure und einer Sphingobase, agiert als Second-Messenger und wirkt proapoptotisch und antiproliferativ (Mullen und Obeid, 2012; Obeid et al., 1993; Stith et al., 2019) (s. Abb. 2).

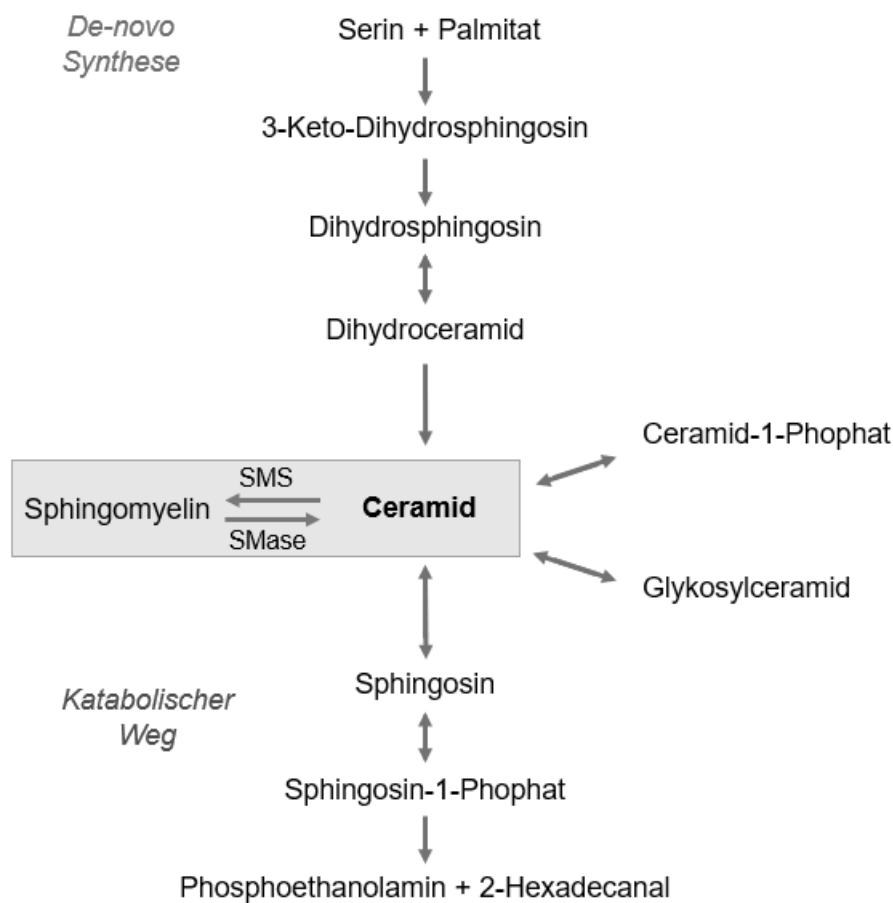


**Abb. 2:** Molekülstruktur eines C16 Ceramids, bei dem eine Fettsäure und eine Sphingobase über eine Amidbindung verknüpft sind (eigene Darstellung in Anlehnung an Mullen und Obeid, 2012)

Die Bildung von Ceramiden erfolgt über vier verschiedene Stoffwechselwege:

- De-novo-Synthese
- Sphingomyelinase-Stoffwechselweg
- Salvage Pathway
- Glykosphingolipid-Stoffwechselweg

Für die Neubildung von Ceramiden werden die Substanzen Serin und Palmitat in der De-novo-Synthese gebraucht. Des Weiteren können Ceramide aus dem Abbau komplexer Lipide – dem Sphingomyelin oder den Glykosphingolipide, wie z. B. Glykosylceramid – gebildet werden. Die Abbauprodukte des Ceramids sind Ethanolamine-1-Phosphat und 2-Hexadecanal (Ogretmen und Hannun, 2004) (s. Abb. 3).

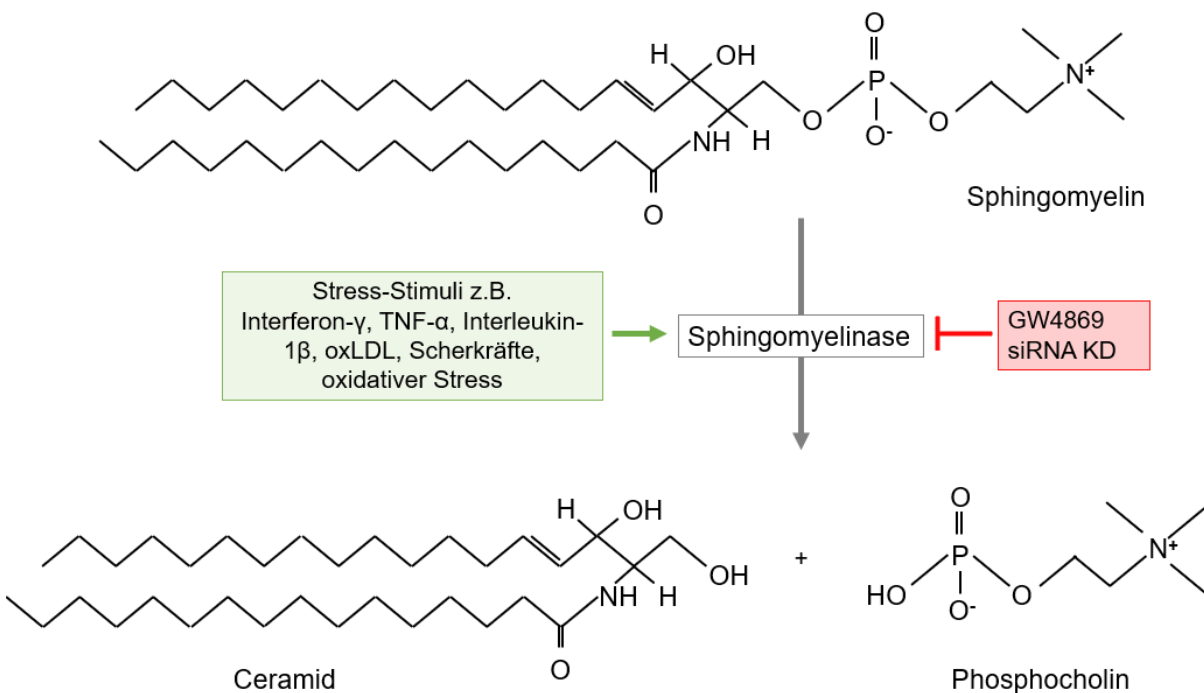


**Abb. 3:** Ceramid-Stoffwechselweg: Ceramide können im De-novo Stoffwechselweg neu gebildet oder durch Abbau komplexer Sphingolipide gewonnen werden. Abgebaut werden Ceramide in Phosphoethanolamin und 2-Hexadecanal. Abkürzungen: *SMase* Sphingomyelinase, *SMS* Sphingomyelin-Synthase (eigene Darstellung in Anlehnung an Airola und Hannun, 2013).

Für die akute Bereitstellung von Ceramiden spielen insbesondere die Sphingomyelinasen (SMasen) eine entscheidende Rolle (Mullen und Obeid, 2012; Vit und Rosselli, 2003). Das membranständige Sphingomyelin wird hydrolytisch durch SMasen in Ceramid und Phosphocholin abgebaut (Airola und Hannun, 2013). In Abhängigkeit des pH-Optimums können alkalische, saure und neutrale SMase-Isoformen klassifiziert werden. Die sauren SMasen (aSMase) befinden sich in Endolysosomen und an der Außenseite der Plasmamembran. Ihr kodierendes Gen ist die Sphingomyelin Phosphodiesterase 1 (SMPD1). Die neutralen SMasen (nSMasen) sind im Endoplasmatischen Retikulum, im Golgi-Apparat und in der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert. Die kodierenden Gene sind für die nSMase 1 die Sphingomyelin Phosphodiesterase 2 (SMPD2), für die nSMase 2 die



Sphingomyelin Phosphodiesterase 3 (SMPD3) und für die nSMase 3 die Sphingomyelin Phosphodiesterase 4 (SMPD4) (Aiola und Hannun, 2013; Clarke und Hannun, 2006; Pavoine und Pecker, 2009). Die Aktivierung der nSMase 2 wird vorwiegend durch TNF- $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$ , oxLDL, Interferon- $\gamma$ , Scherkräfte und oxidativen Stress ausgelöst (Czarny und Schnitzer, 2004; Dotson et al., 2015; Mullen und Obeid, 2012; Pavoine und Pecker, 2009). Eine Inhibition der nSMase 2 kann mit dem häufig verwendeten pharmakologischen Inhibitor GW4869 oder mit einem siRNA Knock-down durchgeführt werden (Catalano und O'Driscoll, 2020; De Palma et al., 2006; Luberto et al., 2002) (s. Abb. 4).



**Abb. 4:** Abbau von Sphingomyelin durch Sphingomyelinasen in Ceramid und Phosphocholin. Aktivierung der Sphingomyelinase durch verschiedene Stress-Stimuli und Hemmung durch eine pharmakologische Inhibition mittels GW4869 oder mit einem siRNA Knock-down (siRNA KD) (eigene Darstellung in Anlehnung an Aiola und Hannun, 2013 und Ogretmen und Hannun, 2004).

Die nSMase 2 hat eine hervorragende Bedeutung in der Ausbildung atherosklerotischer Plaques (Pavoine und Pecker, 2009). Sie beeinflusst die Pathophysiologie der Arteriosklerose durch Endothelschäden, einerseits durch die Aktivierung des Endothels durch Chemotaxis sowie Entzündungsreaktionen und andererseits durch die Produktion von proapoptotisch wirkenden Ceramiden nach Aktivierung durch die bereits erwähnten Stress-Stimuli. Die Akkumulation von Ceramiden in der Zelle beeinflusst die Apoptose,

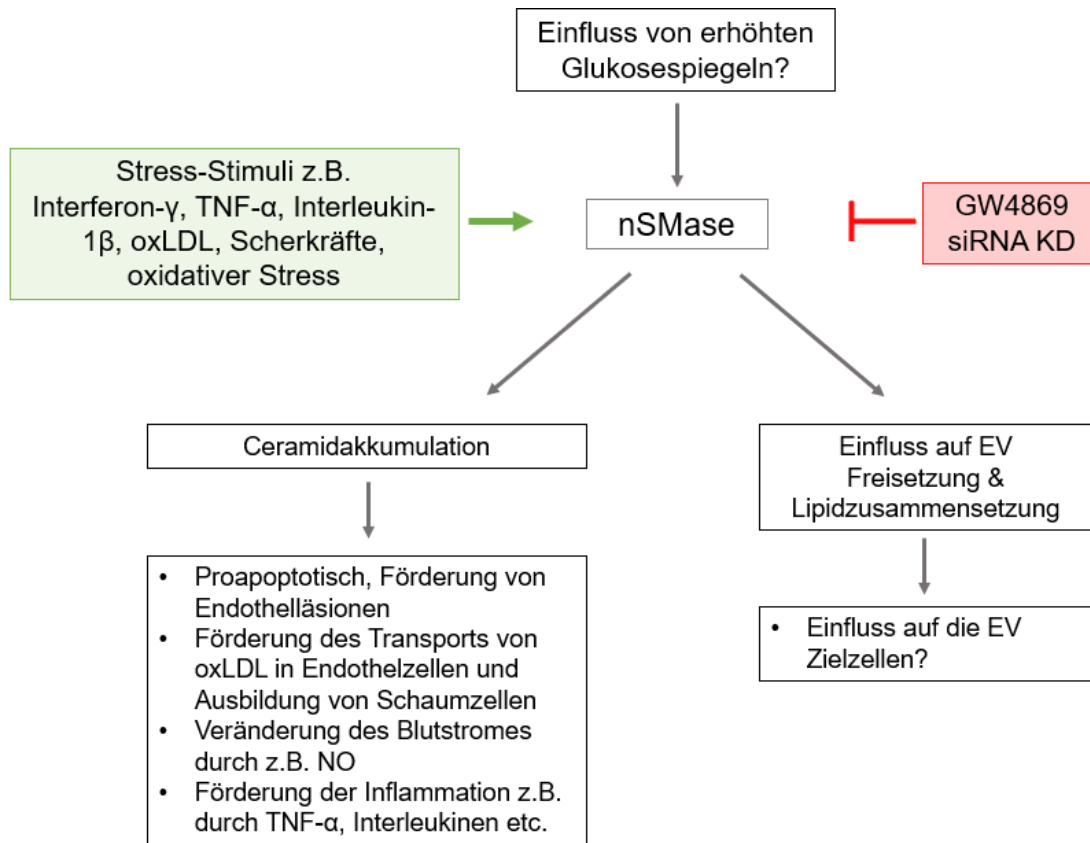
den Zellzyklus und die Zellantwort durch Regulation verschiedener Phosphatasen, Proteasen und Kinasen, wie z. B. Proteinkinase C, Proteinphosphatase 1 und 2A, Cathepsin D und Kinasesuppressor von Ras (Mullen und Obeid, 2012; Ogretmen und Hannun, 2004; Pettus et al., 2002; Rego et al., 2014). Neben der Induktion der Apoptose in Endothelzellen und einer Progression der Arteriosklerose konnten weitere Effekte von Ceramiden in der Akkumulation von oxLDL und Schaumzellen, in der Änderung des Blutstromes durch das NO-System und in der Inflammation nachgewiesen werden (Freed et al., 2014; Korbecki und Bajdak-Rusinek, 2019; Li et al., 2014; Shu et al., 2022; Singh et al., 2017; Zietzer et al., 2022).

Insbesondere das C16 gewinnt aufgrund von Anreicherungen im Serum von Patienten mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko zunehmend mehr Aufmerksamkeit (Cheng et al., 2015; de Carvalho et al., 2018; Laaksonen et al., 2016; Li et al., 2020; Peterson et al., 2018; Summers, 2018). Aufgrund einer prognostisch erhöhten Sterblichkeit bei einer Anreicherung von bestimmten Ceramiden wurden erste Risikoscores entwickelt, um Risikopatienten in den USA und in Finnland zu identifizieren und frühzeitig zu therapieren (Cheng et al., 2015; Havulinna et al., 2016; Hilvo et al., 2020). Darüber hinaus konnten bei Patienten, die an einem Diabetes Mellitus Typ 2 (DMT2) erkrankt waren, erhöhte Konzentrationen von C16 im Serum nachgewiesen werden (Boon et al., 2013).

Unklar ist, welchen Einfluss erhöhte Glukosespiegel auf die Aktivität von nSMasen haben, welche die Serumkonzentrationen von C16 beeinflussen (Boon et al., 2013). In Mausmodellen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine pharmakologische Hemmung der nSMasen mit GW4869 eine Reduktion der Inflammation, der Lipidakkumulation und eine Minderung der Ausbildung atherosklerotischer Plaques hervorrufen kann (Habibi et al., 2022; Lallemand et al., 2018; Wu et al., 2021).

Darüber hinaus korreliert die Aktivität der nSMase 2 mit der Bildung und Lipidzusammensetzung der EV (Menck et al., 2017; Trajkovic et al., 2008). Mithilfe von GW4869 konnte nachgewiesen werden, dass eine Inhibition der nSMase 2 zu einer Verminderung freigesetzter Exosomen und zu einer Steigerung freigesetzter MV führt. Darüber hinaus führt die Inhibition zu einer Reduktion der Menge der Ceramide in Zellen und zu einer Steigerung des Gehaltes an Sphingomyelin in Zellen und EV (Catalano und O'Driscoll, 2020; Menck et al., 2017; Trajkovic et al., 2008; Verderio et al., 2018). Unklar

ist jedoch, wie sich der Ceramidanteil nach einer GW4869-Behandlung in den EV verhält und welchen Einfluss diese auf EV Zielzellen haben (s. Abb. 5).



**Abb. 5:** Die Rolle von nSMasen in der Arteriosklerose. Durch die vermehrte Produktion von Ceramiden, welche proapoptotisch wirken, können Endothelläsionen entstehen. Der vermehrte Transport von oxLDL in Endothelzellen, die Ausbildung von Schaumzellen, Inflammationen, welche wiederum Stimuli der nSMasen sind und die Beeinflussung des Blutflusses durch verschiedene Mediatoren u. a. durch NO begünstigen die Ausbildung von arteriosklerotischen Plaques. Zusätzlich haben nSMasen Einfluss auf die Freisetzung und Lipidzusammensetzung der EV, deren Wirkung auf EV Zielzellen unklar ist. Unklar ist, welchen Einfluss erhöhte Glukosespiegel auf die Aktivität und Genexpression von nSMasen haben.

## 1.6 Zielsetzung

In der folgenden Arbeit soll der Einfluss von Ceramid-angereicherten EV auf die Apoptose von Endothelzellen und somit auf die Pathogenese der Arteriosklerose untersucht werden.

Zum einen soll untersucht werden, inwiefern erhöhte Glukosespiegel, wie sie bei einem DMT2 auftreten, einen Einfluss auf die Lipidzusammensetzung der EV von Endothelzellen haben. Ebenfalls ist unklar, wie eine Ceramidanreicherung in EV molekular vermittelt wird, ob ein Transfer der Ceramide in eine Zielzelle möglich ist und welcher Effekt in der EV Zielzelle durch die Aufnahme des Ceramids ausgelöst werden kann.

Um diese Prozesse zu verstehen, werden folgende Experimente durchgeführt. Zunächst soll der Einfluss von Glukose auf die Lipidzusammensetzung der EV in der Massenspektrometrie untersucht und anschließend der molekulare Mechanismus der Anreicherung von Ceramiden in EV durch Untersuchungen der Sphingomyelinasen-Aktivität geklärt werden. Im Anschluss soll überprüft werden, ob eine Aufnahme der Ceramid angereicherten EV von EV Zielzellen mithilfe von fluoreszierenden Ceramiden und der Massenspektrometrie möglich ist. Aufgrund der proapoptotischen Effekte von Ceramiden sollte im nächsten Schritt das Apoptoseverhalten von EV Zielzellen untersucht werden. Im letzten Versuchsteil soll mithilfe einer pharmakologischen Inhibition GW4869 oder einer small interfering RNA (siRNA) die Hemmung der Ceramid-produzierenden Sphingomyelinasen untersucht werden, indem der Ceramidgehalt in EV und in den EV Zielzellen in der Massenspektrometrie verringert und ob Endothelschädigungen durch Hyperglykämien verhindert werden können. Letzteres könnte einen Ansatzpunkt für eine neue Therapie zur Verbesserung der Endothelfunktion bei Diabetikern eröffnen.

Die im Folgenden beschriebenen Methoden und Ergebnisse wurden bereits in Teilen in Zietzer et al., 2021 im Journal Cellular and Molecular Life Science veröffentlicht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräteliste

**Tab. 2:** Geräteliste

<b>Geräte:</b>	<b>Hersteller:</b>
CO <sub>2</sub> Inkubator	Sanyo Denki K.K., Moriguchi, Japan
Wasserbad	Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
Laminar-Flow-Sterilbank MSC advantage	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kühlzentrifuge 5430R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5430	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Plattenzentrifuge Labofuge 400R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5810	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge minispin plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Lichtmikroskop Anxiovert 40 CFL	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axio Observer	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Ultracut R Microtome	Reichert, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Elektronenmikroskop Jem-2100Plus	Jeol, Akishima, Japan
Massenspektrometer: QTRAP 6500+ LC-MS/MS system	Sciex, Darmstadt, Deutschland
Qubit 4	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ultraschallbad: Bandeline Sonorex	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Tecan Infinite M200 Plate Reader	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Heizblock: Thermomixer comfort 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermocycler: Vapo.protect Mastercycler ProS	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
7500 HT real-time PCR	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vortexer: Ika Vortexer Genius <sup>3</sup> lab dancer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
FACS Canto II	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
ZetaView® BASIC NTA	Particle Metrix GmbH, Meerbusch, Deutschland
Einkanalpipetten: 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20µl, 10 µl, 2,5µl Research plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Mehrkanalpipette: Transferpette® S -8, 200 µl	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Integra Pipetboy 2	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Eismaschine	Scotsman Ice, Mailand, Italien
Autoklav	Systec GmbH, Linden, Deutschland

### 2.1.2 Software

**Tab. 3:** Software

Software:	Firma:
MS Office 2010	Microsoft, Redmond, USA
GraphPad Prism Version 7.03	GraphPad Software, Inc., San Diego, CA USA
BD FACSDiva™ Software	BD Bioscience, San Jose, USA
FlowJo Version 10	BD Bioscience, San Jose, USA
Mikroplate Reader: Magellan™ V6.6	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zeiss ZEN 2.3 pro software	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

**Tab. 4:** Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial:	Katalognummer:	Hersteller:
Zellkulturfalschen T75	90076	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschalen: 10 cm 6 cm	93100 93060	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturtestplatten: 6-Well 12-Well 96-Well	92006 92412 92096	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Eppendorf-Tubes: 5 ml 2 ml 1,5 ml 0,6 ml	0030119460 0030120094 0030123328 MCT-060-C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland  Axygen®, Croning, New York, USA
PCR SoftTubes 0,2 ml	711088	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Falcon Tubes: 50 ml 15 ml	227 261 188 271	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich

CryoPure Tube 1,6 ml	72.380.007	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen: 1250 µl 200 µl 0,1-20 µl	06-379-2018 06-375-2018 06-372-2018	Nerbe Plus GmbH & Co. KG, Winsen, Deutschland
Serologische Pipetten: 25 ml 10 ml 5 ml	CLS4489-200EA CLS4488-200EA CLS4487-200EA	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, St. Louis, USA
PCR 96 Well Platte	712260	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	4311971	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zellschaber	83.1830	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
FACS-Röhrchen	55.1579	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
TBC-Spritzen	13040200	Labomedic GmbH, Bonn, Deutschland
Citrat-Röhrchen	01.1606.001	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

#### 2.1.4 Zellkulturmaterial

**Tab. 5:** Zellkulturmaterial

<b>Zellkulturmaterial:</b>	<b>Katalognummer:</b>	<b>Hersteller:</b>
HCAEC (human coronary artery endothelial cells)	C-12221	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Vollmedium: Endothelial Cell Growth Medium MV	C-22020	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Serum-freies Medium: Endothelial Cell Basis Medium MV	C-22220	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
DetachKit - HEPES BSS - Trypsin - TNS	C-41220	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Freezing Medium Cryo-SFM	C-29912	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland

## 2.1.5 Reagenzien

**Tab. 6:** Reagenzien

<b>Reagenzien:</b>	<b>Katalognummer:</b>	<b>Hersteller:</b>
20 % Glukose Infusionslösung	B05BA03	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
UltraPure™ DNase / RNase-freies destilliertes Wasser	10977049	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
C16 Ceramid (d18:1 16:0) N-palmitoyl-D-erythro-sphingosine	860516P	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
NBD-C12 Ceramid	810211P-1mg	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	A3672,0100	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	14190169	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Paraformaldehyd (PFA)	818715	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, St. Louis, USA
VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium with 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	H-1200	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA
Lipofectamin™ RNAiMAX Transfection Reagent	13778075	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Opti-MEM™ I Reduces Serum Medium	31985062	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
siRNA Silencer™ Negativkontrolle	AM4611	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
siRNA SMPD3 Silencer ID: 132606	AM16708	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GW4869	D1692	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, St. Louis, USA
Hypobuffer: 10 mM HEPES 0,5 mM EDTA Protease Inhibitor	4693132001	Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Qubit™ Protein Assay Kit	Q33211	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Methanol	361091.1611	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
MTT-Assay	CT02	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, St. Louis, USA
Isopropanol	6752.4	Carl-Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland



Salzsäure	9277.1	Carl-Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD bestehend aus: 0,5 ml of FITC Annexin V 0,5 ml of 7-AAD Viability Staining Solution 50 ml of Annexin V Binding Buffer	640922	BioLegend®, San Diego, USA
RNase AWAY®	83931	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, St. Louis, USA
TRIzol™ Reagenz	15596018	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
100 % Ethanol vergällt	K928.4	Carl-Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	11310278	Fisher Scientific GmbH, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Omniscript® Reverse Transcription - Omniscript Reverse Transcriptase - Buffer RT, 10x - dNTP Mix, 5 mM - RNase free Water	205113	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNasin® Ribonuclease Inhibitors	N2615	Promega, Madison, USA
Primer Random P(DN) 6 50 A260U	11034731001	Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
GAPDH Hs02786624_g1	4331182	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SMPD1 Hs04183448_m1	4331182	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SMPD2 Hs00162006_m1	4331182	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SMPD3 Hs00920354_m1	4331182	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TaqMan™ Gene Expression Master Mix	4440040	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NP40 Cell Lysis Buffer	FNN0021	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Protease Inhibitor	4693132001	Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
nMSase Assay Kit - Enzyme Mix - Sphingomyelin - AbBlue Indicator - SMase Reaction Buffer	ab138876	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich

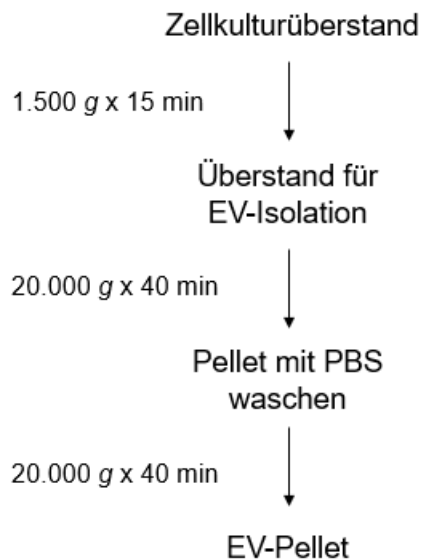
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Assay Buffer</li> <li>- Sphingomyelinase Standard</li> <li>- DMSO</li> </ul>		
Bovine Serum Albumin (BSA)	BSA.FV.0500	Bio & Sell GmbH, Feucht, Deutschland
Mammalian Cell Lysis Buffer 5X	ab179835	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
aSMase Assay Kit <ul style="list-style-type: none"> <li>- Assay Buffer</li> <li>- SMase Reaction Buffer</li> <li>- DMSO</li> <li>- Enzyme Mix</li> <li>- Sphingomyelin</li> <li>- AbRed Indicator</li> </ul>	ab190554	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur mit HCAEC

#### 2.2.1.1 Zelllinie und Kultivierung

Für die folgende Arbeit wurden die Experimente mit weiblichen humanen koronararteriellen Endothelzellen (HCAEC) durchgeführt. Für die Kultivierung wurde das Endothelial Cell Growth Medium MV mit Zugabe eines Endothelial Growth Media SupplementMix verwendet. Die Kultivierung erfolgte unter standardisierten Zellkulturbedingungen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Lagerung des Mediums bei 4 °C und Erwärmung des Mediums vor Verwendung auf 37 °C im Wasserbad. Durchführung der Medienwechsel alle 3 – 4 Tage mit der Verwendung von 13 ml Medium je T-75 Flasche. Es wurde eine Laminar-Flow-Sterilbank verwendet, um das Arbeiten mit Zellkulturen unter sterilen Bedingungen zu ermöglichen. Die Zugabe eines Serum-freien Mediums (Endothelial Cell Basal Medium MV ohne Zugabe des SupplementMix) für 24 Stunden regt in HCAEC die Ausbildung von EV an. Für die Isolation der EV wurde der Überstand der Zellkultur verwendet und eine differentielle Zentrifugation durchgeführt. Im ersten Schritt wurden die Zellreste bei einer Zentrifugation von 1500 g für 15 min entfernt. Anschließend wurde der Überstand für 40 min bei 20.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit DPBS gewaschen und nochmals zentrifugiert. Im Pellet befinden sich die isolierten EV (s. Abb. 6) (Davidson et al., 2022; Zietzer et al., 2020). Um die Effekte der EV auf native HCAEC (EV Zielzellen) zu untersuchen, wurden die isolierten EV mit EV Zielzellen für 24 Stunden mit Vollmedium inkubiert.



**Abb. 6:** Protokoll der EV-Isolation (angelehnt an Zietzer et al., 2020).

#### 2.2.1.2 Passagieren

Die Zellkulturen wurden in T-75 Flaschen bis zur Ausbildung eines 80 – 90 % konfluenten Zellrasens kultiviert und anschließend in einem Verhältnis von 1:3 aufgeteilt. Die darauffolgenden Versuche wurden in der 8. Passage durchgeführt. Zum Passagieren der Zellkulturen wurde ein DetachKit, bestehend aus HEPES BSS (HEPES buffered balanced salt solution), Trypsin / EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) (Verhältnis 0,04 %:0,03 %) und TNS (Trypsin Neutralization Solution) verwendet. Nach Abnahme des alten Mediums aus der T-75 Flasche wurde die Zellkultur mit Zugabe von 3 ml HEPES BSS gewaschen, welches danach wieder abgenommen und verworfen wurde. Zur Ablösung der adhären Zellen vom Gefäßboden wurden 3 ml Trypsin / EDTA hinzugefügt und für 3 – 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig vom Boden gelöst und zusätzlich 3 ml TNS zur Hemmung der Trypsinaktivität hinzugefügt. Der Überstand wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 800 rpm für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit den beinhalteten Zellen mit Medium resuspendiert. Als letztes wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 in neue Flaschen, Schalen oder Well-Platten aufgeteilt.

### 2.2.1.3 Kryokonservierung und Auftauen von HCAEC

Die HACEC aus der Passage 3 wurden nach Herstellerangaben (PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland) aufgetaut und bis Passage 6 kultiviert. Die adhärenen Zellen wurden wie bereits in 2.2.1.2. beschrieben, mit Trypsin gelöst, gezählt und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet auf Eis gestellt. Die Zellen wurden in Cryo-SFM resuspendiert und mit einer Dichte von  $1 \times 10^7/\text{ml}$  aliquotiert. Die Zellen im Kryoröhrchen wurden für 24 Stunden bei  $-80\text{ °C}$  in Isopropanol gekühlt und anschließend bei  $-150\text{ °C}$  gelagert.

Um ein Kryoröhrchen mit neuen Zellen aufzutauen, wurde das Röhrchen schnell erwärmt, um die Destabilisierung der Zellmembran durch das DMSO im Cryo-SFM zu verhindern. Anschließend wurde der Inhalt des Kryoröhrchens mit 5 ml Medium in einem Zentrifugenröhrchen resuspendiert und für 800 rpm für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in Medium resuspendiert und in einer T-75 Flasche kultiviert. Die Vitalität der Zellen wurde täglich im Lichtmikroskop auf Adhärenz, Proliferation und Morphologie untersucht.

## 2.2.2 Reagenzien

### 2.2.2.1 Glukose

Die 20 %-Glukoselösung wurde zum Vollmedium hinzugefügt, um die Zellkultur mit 5 mM und 30 mM Glukose für 72 Stunden zu stimulieren (Jansen et al., 2013). Verwendung von  $\text{H}_2\text{O}$  als Kontrolle. Das Endothelial Cell Basal Medium MV enthält zusätzlich eine Konzentration von 5,55 mM Glukose. Die folgenden Angaben der Glukosekonzentration beziehen sich auf die zusätzlich hinzugefügte Glukosemenge zum Medium.

### 2.2.2.2 C16 Ceramid (d18:1 16:0)

Das C16-Pulver wurde mit DMSO zu einer 5 mM Stammlösung verdünnt. Zugabe des verdünnten C16 zum Vollmedium und Stimulation der Kultur mit  $1\text{ }\mu\text{M}$ ,  $10\text{ }\mu\text{M}$ ,  $20\text{ }\mu\text{M}$  und  $50\text{ }\mu\text{M}$  C16 für 24 Stunden (Menck et al., 2017). Verwendung von DMSO als Kontrolle.

### 2.2.2.3 NBD-C12 Ceramid

Zur Visualisierung der Aufnahme und des Transportes von Ceramiden mittels EV wurde das markierte Nitrobenzoxadiazole-C12 Ceramid (NBD-C12) verwendet, welches im Fluoreszenzmikroskop nachweisbar ist (Makiyama et al., 2015). Aufgrund der vier weiteren Kohlenstoffmoleküle im NBD-Rest entspricht die Länge der Kohlenstoffkette des NBD-C12 dem eines C16. Das NBD-C12 Ceramid wurde in Chloroform zu 1 mg / ml gelöst. Um eine 5 mM Stammlösung zu erhalten, wurden 100 µl entnommen, getrocknet und in 30,3 µl DMSO gelöst.

Im ersten Versuchsteil wurde die Aufnahme von exogenen Ceramiden in die Zelle untersucht. Hierfür wurden HCAEC mit 10 µM und 20 µM NBD-Ceramid oder mit DMSO als Kontrolle für 24 Stunden stimuliert. Im zweiten Versuchsteil wurde der Transfer des NBD-C12 mittels EV an EV Zielzellen untersucht: Zuerst wurden HCAEC für 24 Stunden mit 10 µM, 20 µM NBD-C12 und DMSO inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und Serum-freies Medium zur Ausbildung von EV für 24 Stunden hinzugefügt. Aus dem Zellkulturüberstand wurden anschließend die EV isoliert, im Vollmedium resuspendiert und für 12 Stunden mit nativen HCAEC inkubiert. In beiden Versuchsteilen wurden nach der Inkubationszeit die Zellkulturen zweimal mit DPBS gewaschen und mit 300 µl 4 % PFA für 30 min fixiert. Der Waschvorgang wurde mit DPBS zweimal wiederholt. Anschließend wurden 6 Tropfen DAPI Vectashield hinzugegeben und für 5 min inkubiert. Im Anschluss folgte die Aufnahme im Fluoreszenzmikroskop.

### 2.2.2.4 Knock-down der SMPD3

Zur Hemmung der SMPD3 wurde ein siRNA Knock-down durchgeführt. Durch die Bindung einer siRNA an eine spezifische RNA-Sequenz wird die Transkription gehemmt.

Zuerst wurde das alte Medium der 60-70 % konfluenten Zellkulturen abgenommen, mit DPBS gewaschen und neues Medium hinzugegeben. Als nächstes wurde eine 1 µM Lösung aus SMPD3 siRNA oder siRNA Kontrolle mit H<sub>2</sub>O hergestellt. Diese wurden mit Opti-MEM™ zu einer 15 nM siRNA Lösung verdünnt. Anschließend wurde ein Transfektionsmix aus einem 1:1 Verhältnis aus siRNA Lösung und einem Gemisch aus 3,75 µl / ml Lipofectamin™ mit 121,25 µl / ml Opti-MEM™ hergestellt und für 10 min bei

Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsmix auf die entsprechenden Wells oder Schalen im Verhältnis 1:3 zum Vollmedium hinzugegeben und für 48 Stunden inkubiert.

#### 2.2.2.5 GW4869

Der pharmakologische SMPD3 Inhibitor GW4869 wurde mit DMSO zu einer 0,346 mM Stammlösung verdünnt. Verwendung von DMSO als Kontrolle. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit 0  $\mu$ M, 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M GW4869 im Medium stimuliert. Für Experimente, die den Einfluss von GW4869 auf die Ausbildung der EV untersuchen sollen, wurden die Zellkulturen mit GW4869 und Serum-freiem Medium für 24 Stunden behandelt (Catalano und O'Driscoll, 2020; Luberto et al., 2002; Menck et al., 2017).

### 2.2.3 Analyse von EV

#### 2.2.3.1 Nanopartikel Tracking Analyse (NTA)

Die Nanopartikel Tracking Analyse ist ein Verfahren zum Nachweis und zur Charakterisierung der EV nach verschiedenen physikalischen Parametern. Im Fokus der Analyse steht die Partikelgröße und die Größenverteilung der EV (Szatanek et al., 2017).

Die isolierten EV von  $1,2 \times 10^7$  HCAEC wurden in 1000  $\mu$ l PBS resuspendiert und für die Einmessung um 1:5 mit PBS verdünnt. Die verdünnten EV wurden in einer 1 ml Einmalspritze aufgezogen und anschließend im ZetaView® BASIC NTA im Institut für klinische Chemie und klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Bonn eingemessen. Jede Probe wurde zweimal in zwei Zyklen eingemessen. Die Proben lagen im linearen Messbereich zwischen 15 nm und 5  $\mu$ m.

#### 2.2.3.2 Elektronenmikroskopie

Eine Methode zur Visualisierung von EV stellt das Elektronenmikroskop dar. Die Fixierung und Darstellung der EV für das Elektronenmikroskop wurde in Kooperation mit dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Bonn durchgeführt. Die Materialien und Reagenzien wurden vom Institut der Pathologie zur Verfügung gestellt.

Nach der differentiellen Zentrifugation zur Isolierung der EV von HCAEC von einer 10 cm Schale wurde das Pellet in 10 µl DPBS resuspendiert. Im Institut für Pathologie wurden 5 µl der Probe auf eine beschichtete Formvar-Karbonfilm TEM-Grid gegeben und mit 2 % Paraformaldehyd für 5 min und anschließend mit 1 % Glutaraldehyd für 5 min fixiert. Anschließend wurde die Probe gewaschen und mit 1,5 % Uranylacetat inkubiert. Im Anschluss folgte die Aufnahme der EV im Elektronenmikroskop.

### 2.2.3.3 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine Methode zur Analyse der Massen von unterschiedlichen Molekülen und Atomen (Lössl et al., 2016). Um Informationen über den Gehalt der Sphingolipidklassen aus den Proben zu erhalten, wurden zuerst die Lipide extrahiert, diese alkalisch hydrolysiert und mit Direktinfusion in der Quadruple Time-of-flight Massenspektrometrie (Q-TOF MS / MS) quantifiziert. In Zusammenarbeit mit der AG Dörmann des Instituts für Molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen der Universität Bonn wurde eine Anleitung zur Vorbereitung der Proben für die MS Analyse bereitgestellt und vom Institut die vorbereiteten Proben in der Massenspektrometrie eingemessen.

In diesem Experiment wurden die Lipidzusammensetzungen von HCAEC sowie deren freigesetzten EV von 10 cm Schalen untersucht. Zuerst wurde der Hypobuffer aus 10 mM HEPES, 0,5 mM EDTA und Protease Inhibitor 1:500 mPic hergestellt. Aus dem Zellkulturüberstand wurden die EV isoliert (s. 2.2.1.1) und das Pellet in 500 µl Hypobuffer resuspendiert. Die HCAEC wurden gelöst (s. 2.2.1.2) und in 1000 µl Hypobuffer gelöst. Anschließend wurden die Proben auf Eis und für 10 min in ein Ultraschallbad gestellt. Die Proteinkonzentration wurde im Qubit Fluorometer mithilfe des Qubit™ Protein Assay bestimmt. Für die folgende Lipidextraktion wurden zur Probe 1 ml Lysis Puffer hinzugefügt und das Lysat homogenisiert. Nach Hinzugabe von 2,5 ml Methanol und 1,25 ml Chloroform wurden die Proben bei 37 °C über Nacht inkubiert und anschließend für 30 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Stickstoffgas getrocknet und das Pellet wurde nochmals mit 1,25 ml Chloroform und 1,25 ml Methanol für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit wieder Stickstoffgas getrocknet und das Pellet mit 1,67 ml Chloroform und 0,83 ml Methanol für eine Stunde bei 37 °C

inkubiert. Die Zentrifugation und die Trocknung des Überstandes mit Stickstoffgas wurden wiederholt. Anschließend folgt die alkaline Hydrolyse der Proben. Hierfür wurden die getrockneten Proben in 1 ml Chloroform und 1 ml Methanol gelöst und in ein Ultraschallbad für 5 min gestellt. Nach Hinzugeben von 150 µl 1 M KOH in Methanol wurde die Probe im Wasserbad für 2 Stunden bei 40 °C inkubiert. Die Probe wurde mit 6 µl 100 % Salzsäure neutralisiert und mit Stickstoffgas getrocknet. Anschließend wurden 1 ml Hexan und 1 ml Methanol hinzugefügt und die Probe für 1 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen, die Probe nochmals mit Hexan gewaschen, zentrifugiert und die obere Phase entnommen. Die Probe wurde mit Stickstoffgas getrocknet und 0,99 ml n-Butanol, 0,01 ml Salzsäure und 1 ml H<sub>2</sub>O hinzugefügt. Die Probe wurde für 1 min und 1000 rpm zentrifugiert und die obere Phase in ein neues Röhrchen überführt. Die Probe wurde bei -20 °C gelagert. Anschließend wurden die Proben mit Chloroform gelöst und die Lipide mithilfe von Silica-Säulen extrahiert. Hierfür wurde die Probe in die Säule hinzugefügt, die Säule mit Chloroform gewaschen und die Lipide mit Aceton und Isopropanol gelöst. Im Anschluss wurden die Proben von der AG Dörmann vom Institut für Molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen der Universität Bonn in die Massenspektrometrie eingemessen.

#### 2.2.4 Analyse apoptotischer Zellen

Zur Charakterisierung von apoptotischen Zellen wurden zwei verschiedene Verfahren angewendet. Der MTT-Assay untersucht die Zellviabilität anhand der metabolischen Zellaktivität. Die Durchflusszytometrie unterteilt die eingemessenen Zellen mithilfe von fluoreszierenden Markern in vitale, frühapoptotische und spätapoptotische Zellen ein.

##### 2.2.4.1 MTT-Assay

Der MTT-Assay wird zur Quantifizierung der metabolischen Zellaktivität genutzt, welche indirekt mit der Zellviabilität korreliert. Der gelbliche Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) wird von lebenden Zellen in das lilafarbene Formazan reduziert und kann anhand der Absorption mit einem Plate-Reader detektiert werden.

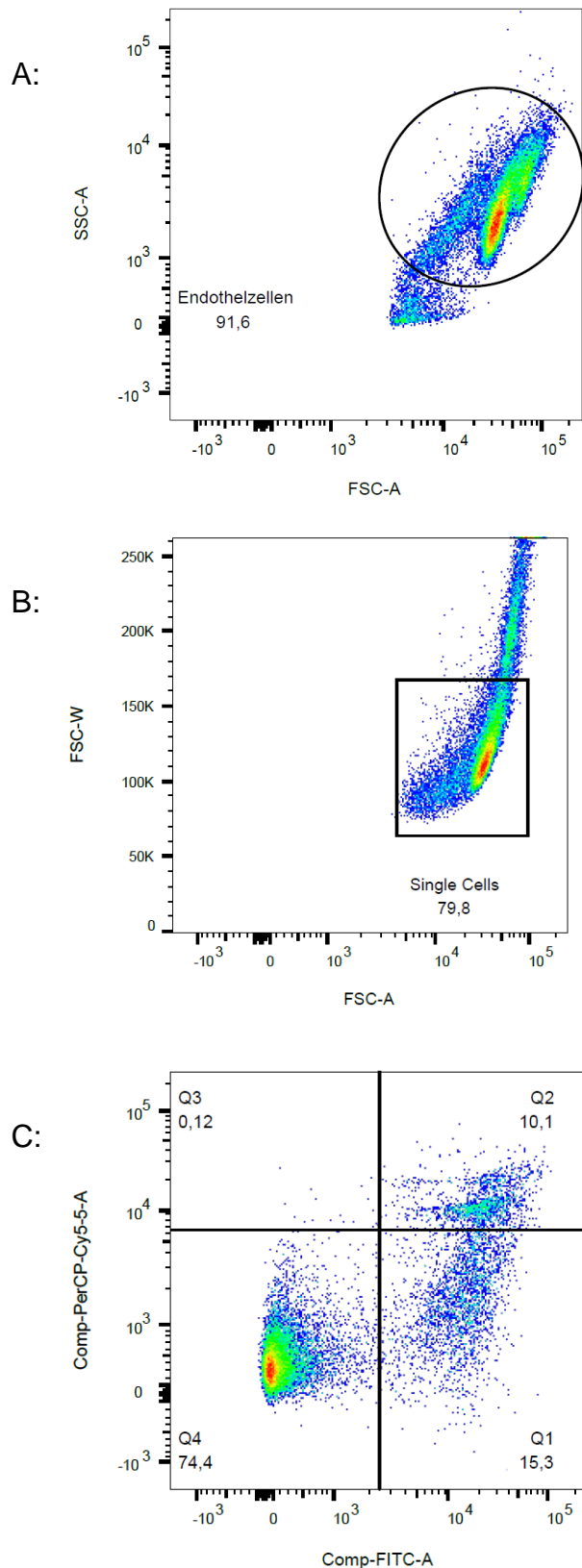


Für den Versuch wurden 80-90 % konfluente HCAEC mit 100 µl Medium in einer 96-Well Platte benötigt. Die Kontrolle entspricht einem Leerwert aus 100 µl Medium ohne Zellen. Zuerst wurden 10 µl MTT-Lösung pro Well hinzugegeben und für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100 µl Isopropanol mit 0,4 N Salzsäure beendet und anschließend jedes Well mit einer Multikanalpipette gut durchmischt. Die Platte wurde im Microplate-Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm eingemessen. Zur Auswertung wurde die Referenzwellenlänge von der Wellenlänge abgezogen und anschließend um den Mittelwert der Leerwerte subtrahiert.

#### 2.2.4.2 Apoptose-Assay

In der Durchflusszytometrie werden Zellen analysiert, welche zuvor mit spezifischen fluoreszierenden Markern inkubiert und anschließend in einem Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)-Gerät detektiert werden können. Zur Detektion vitaler, frühapoptotischer und spätapoptotischer Zellen wurden die Marker Annexin V und 7-Aminoactinomycin (7-AAD) verwendet. Annexin V bindet an das membranständige Phospholipid Phosphatidylserin, ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein (FITC) markiert und kann bei einer Wellenlänge von 530 / 30 nm detektiert werden. 7-AAD bindet an die DNA, enthält den Fluoreszenzfarbstoff PerCP-CY5.5 und kann bei einer Wellenlänge von 695 / 40 nm gemessen werden. Aufgrund der Veränderungen im Lipidaufbau und der Durchlässigkeit der Membranen während der Apoptose, können die Marker die Zelle in die verschiedenen Stadien der Apoptose einteilen: In vitalen Zellen liegt Phosphatidylserin in der Innenseite der Membran vor, welches nicht von Annexin V gebunden werden kann und 7-AAD kann die Membran nicht passieren. In der Durchflusszytometrie sind vitale Zellen somit Annexin V negativ und 7-AAD negativ. In frühapoptotischen Zellen liegt Phosphatidylserin vermehrt an der Außenseite vor, welches von Annexin V gebunden werden kann. Da die Zellmembran noch intakt ist, kann 7-AAD die Membran nicht passieren. Frühapoptotische Zellen sind somit Annexin V positiv und 7-AAD negativ. In spätapoptotischen Zellen und in nekrotischen Zellen befindet sich Phosphatidylserin an der Außenseite der Membran und die Membran wird für 7-AAD durchlässig, welches nun an die DNA bindet. Spätapoptotische Zellen sind somit Annexin V positiv und 7-AAD positiv (Darzynkiewicz et al., 1997).

Für den Apoptose-Assay wurden zuerst die adhärenenten HCAEC gelöst (s. 2.2.1.2) und anschließend bei 1000 rpm für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit DPBS gewaschen und nochmals für 3 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit Zugabe von 200 µl / 100 µl Annexin V Binding Buffer (6-Well Platte / 12-Well Platte) resuspendiert. Davon wurden 100 µl in ein FACS-Röhrchen überführt und zusätzlich 5 µl Annexin V und 5 µl 7-AAD hinzugefügt. Für die Kompensation wurde eine unbehandelte Probe ohne Annexin V und ohne 7-AAD, eine Annexin V-Probe mit 5 µl Annexin V und eine 7-AAD-Probe mit 5 µl 7-ADD benötigt. Alle Proben wurden für 15 min im Dunkeln inkubiert und im Anschluss wurde 400 µl Annexin V Binding Buffer hinzugefügt. Anschließend wurden die Kompensation und die Proben mit je 20.000 Zellen und einer Flussgeschwindigkeit von rund 100 Events pro Sekunde im FACS Canto II in der Medizinischen Klinik I, Innere Medizin des Universitätsklinikums Bonn eingemessen und die Ergebnisse mit FlowJo Version 10 analysiert (s. Abb. 7).



**Abb. 7:** Gating Strategie und Auswertung. Abbildungen A und B zeigen die Gating-Strategie in FlowJo. Abbildung C zeigt die Auswertung: In Q1 sind frühapoptotische Zellen, in Q2 spätapoptotische Zellen und in Q4 vitale Zellen dargestellt.

### 2.2.5 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer real-time PCR

Die Genexpressionsanalyse quantifiziert die Menge der vorhandenen RNA. Der erste Schritt ist die RNA-Isolation aus der Zellkultur und es folgen die Umschreibung in eine cDNA und die Durchführung der quantitativen real-time polymerase chain reaction (qPCR).

#### 2.2.5.1 RNA-Isolation aus Zelllysat

Vor Beginn der Isolation wurde der Abzug mit RNase AWAY® gereinigt. Zur RNA-Isolation aus kultivierten Zellen wurde das alte Medium abgenommen, verworfen und die Kultur mit DPBS gewaschen. Die Zugabe von Trizol auf die Zellkultur induziert die Zelllyse. Für eine 6-Well Platte wurden 500 µl / Well und für eine 10 cm Schale 1 ml Trizol verwendet. Mit einer Pipette wurde das Trizol mehrmals über den Gefäßboden verteilt, bis sich ein homogenes Lysat gebildet hat. Das Lysat wurde in ein Eppendorf Tube überführt. Anschließend wurden 100 µl Chloroform auf 500 µl Trizol oder 200 µl Chloroform auf 1 ml Trizol hinzugegeben. Die Probe wurde 15 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Überführung der oberen, klaren Phase in ein neues Eppendorf Tube, in dem sich anschließend RNA und DNA befinden. Zugabe von 100 % Isopropanol im Verhältnis 1:1 zur Menge der überführten oberen Phase und Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurde die Probe für 15 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Probe mit 75 % Ethanol gewaschen und für 5 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Waschschrift wurde wiederholt, der Überstand verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur für 30 min getrocknet. Danach wurden 20 µl RNase / DNase-freies Wasser hinzugegeben und die Probe für 13 min bei 56 °C im Heizblock inkubiert. Die isolierte RNA wurde auf Eis gestellt und im Nanodrop 2000c eingemessen. Die RNA-Konzentration wurde mit einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt und die Reinheit mit den Quotienten 260 nm / 280 nm und 260 nm / 230 nm überprüft. Lagerung der isolierten RNA bei -80 °C.

### 2.2.5.2 Umschreibung der RNA in cDNA

Die cDNA ist das Produkt einer mit der Reverse-Transkriptase abgeschrieben RNA. Für die Umschreibung wurde die isolierte RNA in eine Proteinkonzentration von 0,5 µg in 12 µl H<sub>2</sub>O in SoftTubes verdünnt. Anschließend wurden 8 µl Reaktionsreagenz, zusammengesetzt aus 2 µl dNTPS, 2 µl 10x Puffer, 2µl 10x Random Primer, 0,8 µl destilliertes Wasser, 1 µl Reverse Transkriptase und 0,8 µl RNasin, hinzugegeben. Die Probe wurde bei 37 °C für eine Stunde im Thermocycler inkubiert und bei -20 °C gelagert.

### 2.2.5.3 Quantitative real-time PCR

Die quantitative real-time PCR (qPCR) wird zur Vervielfältigung der cDNA und zur Quantifizierung der Genexpression eingesetzt. Hierfür werden bestimmte Taqman-Sonden verwendet, welche fluoreszierende Eigenschaften haben und an die zu amplifizierende Sequenz binden. Trifft die Taq-DNA-Polymerase auf die spezifische Sonde, so wird der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt. Je mehr Fluoreszenzfarbstoffe freigesetzt werden, desto stärker ist das Fluoreszenzsignal. Die Detektion der Stärke dieses Signals ermöglicht den Rückschluss auf die Menge des zu amplifizierenden Gens (Huggett et al., 2005). Die genaueste Aussage zum Gehalt der amplifizierenden Sequenz befindet sich am Anfang der exponentiellen Phase, da die Fluoreszenz signifikant zum Hintergrund erhöht ist. Dieser Zeitpunkt wird Cycle Threshold (Ct) genannt. Damit der Gehalt an cDNA zwischen den Proben vergleichbar ist, wird eine endogene Kontrolle verwendet. Für die Auswertung der Ct-Werte der durchgeführten qPCR wird die  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Methode angewendet (Navarro et al., 2014).

Die zuvor vorbereitete cDNA Probe wurde zuerst mit 160 µl Wasser verdünnt. Im Anschluss wurde ein Mastermix aus 10 µl Gene expression master mix und 1 µl 20x Primer gebildet. Als Primer wurden in dieser Arbeit die SMPD1 (Hs04183448\_m1), die SMPD2 (Hs00162006\_m1) und die SMPD3 (Hs00920354\_m1) sowie GAPDH (Hs02786624\_g1) als endogene Kontrolle verwendet. In eine 96-Well Platte wurden pro Well 9 µl verdünnte cDNA und 11 µl Mastermix hinzugefügt. Die Platte wurde mit einer Folie verriegelt und kurz zentrifugiert. Es folgte die Durchführung der qPCR in der 7500 HT real-time PCR Maschine, dabei wurde die Platte für 2 min bei 50 °C und anschließend für

10 min bei 95 °C erwärmt. Danach wechseln sich für 45 Zyklen die Bedingungen 15 sek bei 95 °C und 60 sek bei 60 °C ab. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Methode.

### 2.2.6 SMase Aktivitätsassay

Zur Quantifizierung der Enzymaktivität der nSMasen (SMPD2, SMPD3) und der aSMase (SMPD1) wurden spezifische Aktivitätsassays eingesetzt. Durch die Detektion der Menge an Phosphocholin können Rückschlüsse auf die Enzymaktivität gezogen werden, da die SMasen Sphingomyelin in Ceramid und Phosphocholin abbauen.

#### 2.2.6.1 Kolorimetrischer nSMase Assay

Zuerst wurden HCAEC in 10 cm Schalen über 72 Stunden mit 30 mM Glukose und die Kontrollgruppe mit H<sub>2</sub>O stimuliert. Das alte Medium wurde abgenommen, die Zellkultur mit 1 ml kalten DPBS gewaschen, welches anschließend wieder abgenommen und verworfen wurde. Es folgte die Herstellung eines NP40-Stock aus 1,5 ml NP40-Puffer und 60 µl Protease-Inhibitor. Nach Zugabe von 200 µl NP40-Stock je Schale wurden die Zellen mit einem Zellschaber gelöst, der Überstand in ein Eppendorf Tube überführt und auf Eis gestellt. Die Proteinkonzentration wurde mithilfe des Qubits Fluorometers und des Qubit™ Protein Assays bestimmt. Durchführung des Assays nach den Herstellerangaben.

Zuerst wurde die Sphingomyelin-Lösung vorbereitet, welche für 30 Wells aus 1,5 ml SMase-Reaktionsbuffer und 15 µl Sphingomyelin besteht. Davon wurden 50 µl in jedes Well gegeben. Zur Bildung des Standards wurde zum vorgegebenen SMase-Standard 20 µl DPBS mit 0,1 % BSA hinzugefügt. Davon wurde 1 µl in 1 ml Assay Buffer verdünnt. Verwendung von 500 µl des verdünnten SMase-Standards zur Generierung einer 1:2 Verdünnungsreihe mit einer Enzymaktivität von 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,313, 0,156, 0 mU / ml. 50 µl des Standards wurden pro Well zur Sphingomyelin-Lösung hinzugegeben. Die aus der Zellkultur gewonnenen Proteinproben wurden mit Assay Buffer auf eine gleiche Konzentration von 100 µg / µl Protein pro Probe verdünnt und 50 µl zur Arbeitssolution hinzugegeben. Anschließend wurde die Well-Platte für 2 Stunden bei

37 °C inkubiert. Anschließend wurden eine AbBlue Arbeitslösung durch Zugabe von 100 µl DMSO in den 200x AbBlue Indikator und der Enzym Mix durch Zugabe von 5 ml Assay Buffer zum Enzymmix hergestellt. Zur Vorbereitung der SMase Assay Lösung wurden für 30 Wells 1,5 ml Enzymmix mit 15 µl AbBlue Arbeitslösung verdünnt. Anschließend wurden 50 µl SMase Assay Lösung in jedes Well gegeben und anschließend nochmal für eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 655 nm im Microplate-Reader.

#### 2.2.6.2 Fluorometrischer aSMase Assay

Zuerst wurden HCAEC in 10 cm Schalen über 72 Stunden mit 30 mM Glukose und die Kontrollgruppe mit H<sub>2</sub>O stimuliert. Das Medium wurde abgenommen, die Zellkultur mit 1 ml kalten DPBS gewaschen und das DPBS abgenommen und verworfen. Es folgte die Herstellung eines Mammalia Lysis Buffer Stock aus 800 µl destillierten Wasser, 200 µl Mammalian Cell Lysis Buffer und 40 µl Protease-Inhibitor. Nach Hinzugabe von 200 µl je Schale wurden die Zellen mit einem Zellschaber gelöst, der Überstand in Eppendorf Tubes überführt, auf Eis gestellt und für 15 min inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min und 1500 rpm wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und anschließend die Proteinkonzentration im Qubit Fluorometer mit dem Qubit™ Protein Assay eingemessen. Durchführung des Assays nach den Herstellerangaben.

Die Proteinproben wurden zuerst auf eine Konzentration von 80 µg / µl Protein mit Assaybuffer verdünnt. Anschließend wurden 50 µl der Probe in ein Well gegeben. Für die Kontrolle wurden 50 µl Assaybuffer verwendet. Zunächst wurde eine SMase Arbeitslösung aus 750 µl SMase Reaktionsbuffer mit 7,5 µl Sphingomyelin hergestellt, in jedes Well 50 µl hinzugegeben und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Es folgte die Herstellung des Enzymmix durch Hinzufügen von 5 ml Assay Buffer und die Generierung einer 200x AbRed Indikatorlösung durch Hinzugabe von 80 µl DMSO zum AbRed Indikator. Anschließend wurde eine SMase Assay Lösung durch Zugabe von 750 µl Enzymmix und 7,5µl 200x AbRed Indikatorlösung hergestellt, 50 µl je Well hinzugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 540 / 590 nm im Microplate-Reader bestimmt.

### 2.2.7 Statistische Auswertung

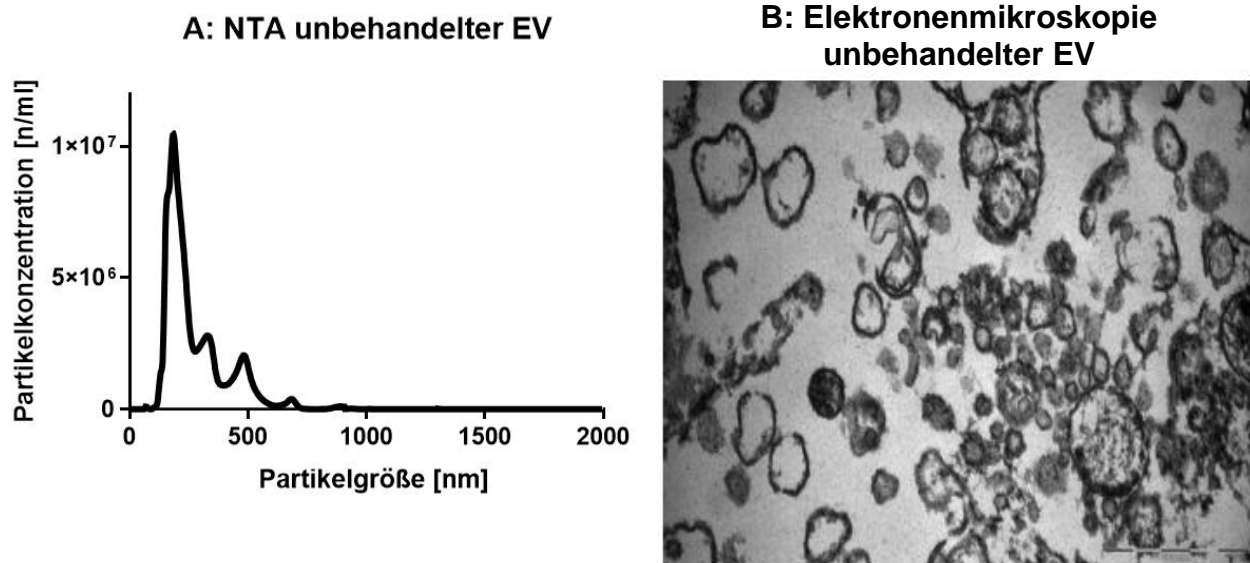
Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism Version 7. Die Daten werden als Mittelwerte mit dem Standardfehler (SEM) angegeben. Bei zwei Stichproben wurde der zweiseitige Student's t-Test für unabhängige Stichproben angewandt. Bei mehr als zwei Gruppen wurde der ANOVA Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet. Die Signifikanzgrenze des  $\alpha$ -Fehlers liegt bei 5 % und wurde wie folgt dargestellt: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 EV Charakterisierung

Die differentielle Zentrifugation ist eine Methode zur Isolation der freigesetzten EV aus dem Zellkulturüberstand der HCAEC. Nach den Empfehlungen der International Society for Extracellular Vesicles wurde zur Charakterisierung der isolierten EV das Elektronenmikroskop zur visuellen Darstellung und die NTA zur Analyse der Partikelkonzentration und Größenverteilung angewendet (Théry et al., 2018). Die analysierte Partikelgröße in der NTA betrug  $252 \pm 24$  nm und im Elektronenmikroskop konnten die isolierten EV visuell dargestellt werden (s. Abb. 8).



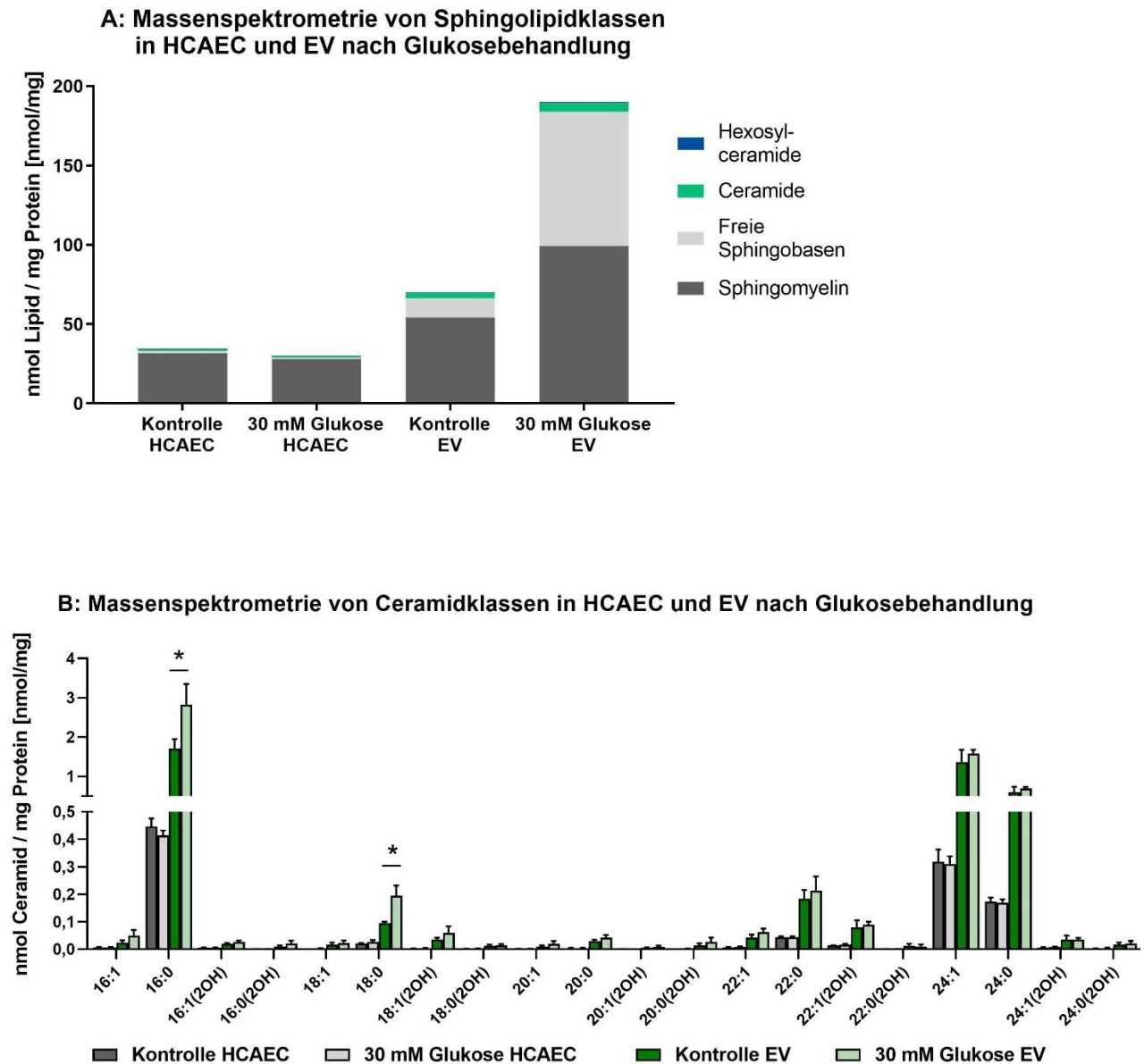
**Abb. 8:** EV Charakterisierung in der NTA und im Elektronenmikroskop: HCAEC wurden für 24 h mit Serum-freiem Medium behandelt. Aus dem Zellkulturüberstand wurde mittels differentieller Zentrifugation die EV isoliert. A: NTA der EV im ZetaView. Die Partikelgrößen der EV liegen bei  $252 \pm 24$  nm,  $n=3$ ; B: Aufnahme der EV im Elektronenmikroskop. (8 A/B adaptiert an Zietzer et al., 2021)

### 3.2 Einfluss von Glukose auf die Sphingolipid- und Ceramidzusammensetzung in HCAEC und EV

Erhöhte Glukosespiegel haben einen Einfluss auf die Entstehung von Endotheldysfunktionen (Noren Hooten und Evans, 2020; Paone et al., 2019). Jedoch ist unklar, wie sich erhöhte Glukosespiegel auf die Lipidzusammensetzung von HCAEC und deren freigesetzten EV auswirken. Hierfür wurde im folgenden Experiment der Einfluss einer Hyperglykämie auf die Sphingolipid- und Ceramidzusammensetzung in HCAEC und EV in der Massenspektrometrie untersucht.

Zum einen wurden HCAEC mit Glukose für 72 Stunden behandelt und anschließend auf ihre Lipidzusammensetzung in der Massenspektrometrie analysiert. Zum anderen wurde eine lipidomische Analyse deren freigesetzten EV durchgeführt. Hierfür wurden HCAEC zuerst für 72 Stunden mit Glukose behandelt, anschließend mit Serum-freiem Medium stimuliert und nach der differentiellen Zentrifugation in der Massenspektrometrie auf ihre Lipidzusammensetzung analysiert.

Die Analyse der Massenspektrometrie zeigt einen vermehrten Export aller Sphingolipidklassen – Sphingomyeline, Ceramide, Hexosylceramide und freie Sphingobasen – in EV nach einer Glukosebehandlung. Die Untersuchung der Ceramidklassen in EV nach der Glukosebehandlung zeigte einen signifikanten Anstieg der Ceramidklassen d18:1 16:0 und d18:1 18:0. Aufgrund des signifikanten Anstiegs und des hohen Anteils wurde der Fokus in dieser Arbeit auf das Ceramid d18:1 16:0 (C16) gelegt (s. Abb. 9).



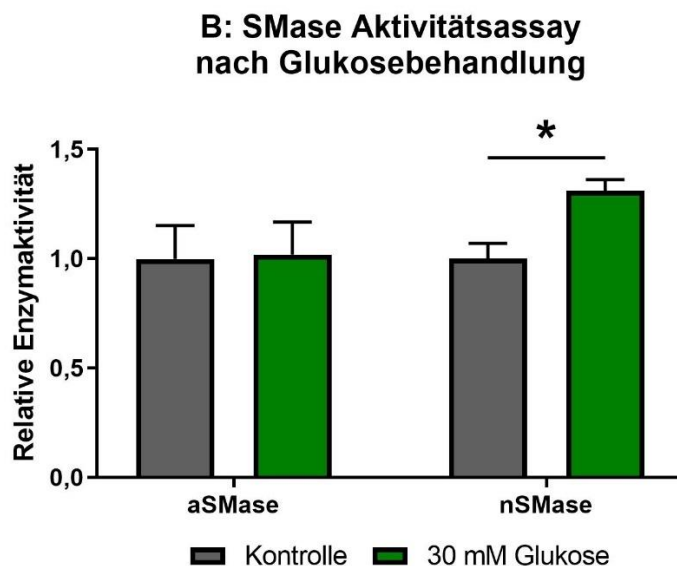
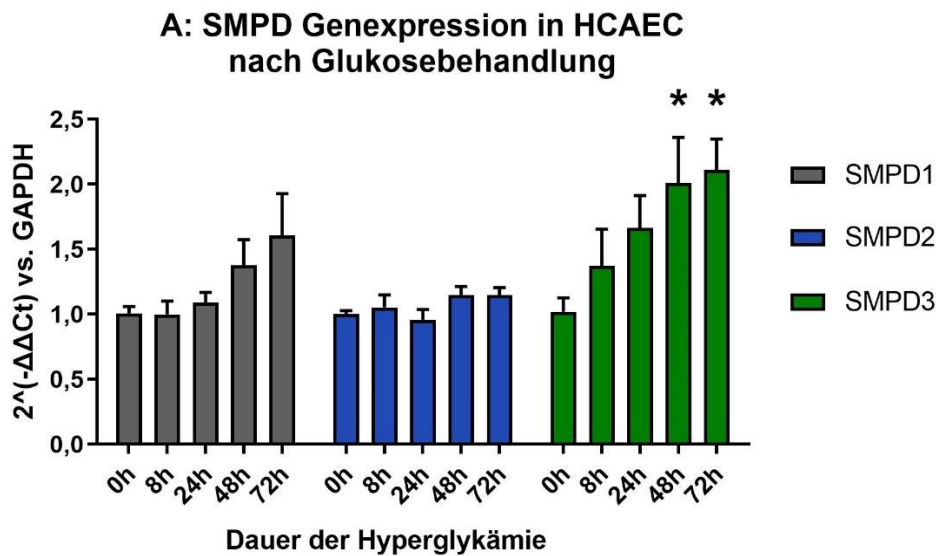
**Abb. 9:** C16 Anreicherung in EV nach Hyperglykämie. Massenspektrometrie von HCAEC und EV nach Glukosebehandlung. HCAEC wurden für 72 h mit 30 mM Glukose stimuliert. Zur Analyse der EV wurden HCAEC zuvor für 72 h mit 30 mM Glukose, für 24 h mit Serum-freiem Medium behandelt und die EV mittels differentieller Zentrifugation isoliert. Behandlung der Kontrollgruppe mit H<sub>2</sub>O. **A:** Analyse der Sphingolipidklassen in HCAEC und EV nach Glukosebehandlung, n=3; **B:** Analyse der Ceramidklassen und signifikanter Anstieg der Ceramide d18:1 16:0 (C16) und d18:1 18:0 in EV nach Glukosebehandlung, n=3, ANOVA + Bonferroni post-hoc Test, zweiseitiger Signifikanztest. (9 B adaptiert an Zietzer et al., 2021)

### 3.3 Einfluss von Glukose auf die Aktivität und Genexpression von Sphingomyelinasen

Um den molekularen Mechanismus der Ceramidanreicherung in freigesetzten EV nach einer Glukosebehandlung zu verstehen, wurden in den folgenden Experimenten die Enzymaktivität und die Genexpression der verschiedenen SMase-Isoformen (SMPD1 / SMPD2 / SMPD3) nach einer Glukosebehandlung analysiert. Zusätzlich wurde die Dauer der Hyperglykämie bis zum Eintritt einer signifikanten Veränderung in der SMasen Genexpression untersucht.

Zur Ermittlung der Genexpression wurden HCAEC mit 30 mM Glukose für 0, 8, 16, 24, 48 und 72 Stunden stimuliert (Jansen et al., 2013). Nach anschließender RNA Isolierung, Umschreibung in cDNA und Durchführung einer qPCR konnte ein signifikanter Anstieg der SMPD3 Genexpression nach einer 48-stündigen und 72-stündigen Glukosebehandlung detektiert werden (s. Abb. 10 A). In den folgenden Experimenten wurden HCAEC für 72 Stunden mit Glukose stimuliert.

Zur Beurteilung der Enzymaktivität der aSMasen (SMPD1) und der nSMasen (SMPD2 und SMPD3) wurden die Proteine der HCAEC nach einer 72-stündigen Glukosebehandlung isoliert und die Aktivitätsassays durchgeführt. Es konnte eine signifikante Zunahme der Enzymaktivität der nSMasen nach einer Glukosebehandlung detektiert werden (s. Abb. 10 B).



**Abb. 10:** Steigerung der SMPD3 Genexpression und nSMase Aktivität nach einer Hyperglykämie. *A:* HCAEC wurden für 0 h, 8 h, 24 h, 48 h und 72 h mit 30 mM Glukose stimuliert. Es folgten RNA Isolierung, cDNA Umschreibung, Durchführung der qPCR und Analyse mit der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Methode. Verwendung von GAPDH als endogene Kontrolle. Signifikante Steigerung der SMPD3 Genexpression nach 48- und 72-stündiger Glukosebehandlung,  $n=6$ , ANOVA + Bonferroni post-hoc Test, zweiseitiger Signifikanztest. *B:* aSMase und nSMase Aktivitätsassay mit Proteinen von HCAEC, welche für 72 h mit 30 mM Glukose behandelt wurden. Die Kontrollgruppe wurde mit  $H_2O$  behandelt. Signifikanter Anstieg der nSMase Aktivität nach 72 h Glukosebehandlung,  $n=3$ , t-Test für nicht verbundene Stichproben, zweiseitiger Signifikanztest. (10 A/B adaptiert an Zietzer et al., 2021)

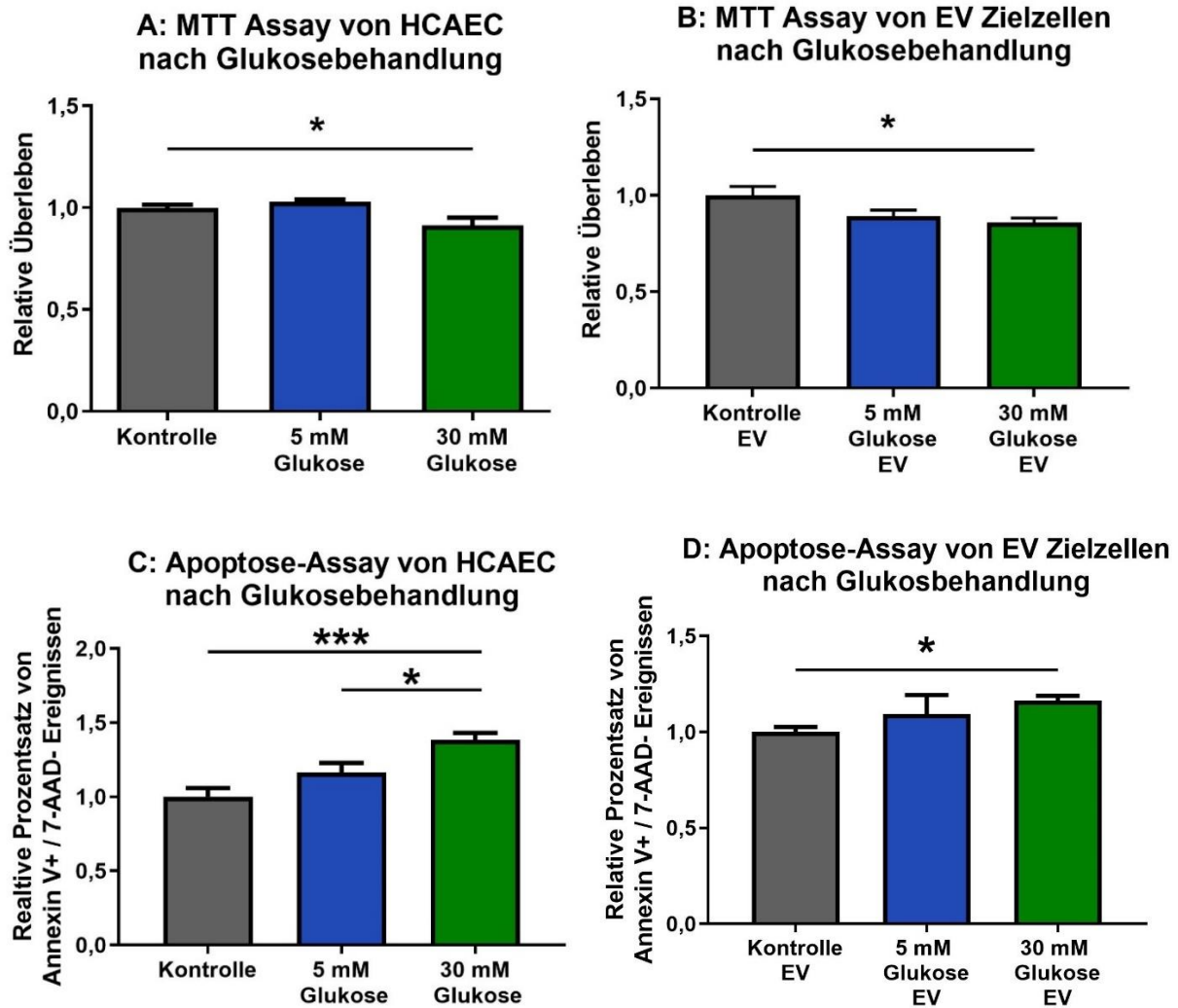
### 3.4 Auswirkung von Hyperglykämien auf die Apoptose

Aufgrund der Steigerung der SMPD3 Aktivität und Genexpression und der Anreicherung von proapoptotischen C16 in EV nach einer Hyperglykämie soll in den folgenden Experimenten der Einfluss einer Glukosebehandlung auf das Zellüberleben von HCAEC und EV Zielzellen untersucht werden. Zur Quantifizierung apoptotischer Zellen wurden der MTT- und der Apoptose-Assay verwendet.

Im ersten Versuchsteil wurden HCAEC für 72 Stunden mit Glukose stimuliert. Im Anschluss konnte im MTT-Assay eine signifikante Reduktion der Zellviabilität und im Apoptose-Assay eine signifikante Zunahme von frühapoptotischen HCAEC nach Glukosebehandlung detektiert werden (s. Abb. 11 A/C).

Im zweiten Versuchsteil wurden EV Zielzellen mit freigesetzten EV von HCAEC, welche zuvor für 72 Stunden mit Glukose und anschließend für 24 Stunden mit Serum-freiem Medium behandelt wurden, inkubiert. Hier konnte ebenfalls im MTT-Assay eine signifikante Abnahme der Zellviabilität und im Apoptose-Assay eine signifikante Zunahme frühapoptotischer EV Zielzellen nachgewiesen werden (s. Abb. 11 B/D).

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Glukosestimulation zum einen die Apoptose in HCAEC auslösen und zum anderen die Apoptose in EV Zielzellen vermittelt durch transferierte EV induzieren konnte.



**Abb. 11:** Sinkende Zellviabilität und steigende Anzahl frühapoptotischer Zellen von HCAEC und EV Zielzellen nach Hyperglykämie. Behandlung von HCAEC und EV Zielzellen für 72 h mit 5 mM und 30 mM Glukose. Die Kontrollgruppe wurde mit H<sub>2</sub>O behandelt. Analyse apoptotischer Zellen mittels MTT-Assay und Durchflusszytometrie mit Annexin V / 7-AAD Apoptose-Assay. *A:* Der MTT-Assay weist eine signifikante Reduktion der Zellviabilität von HCAEC nach 30 mM Glukosebehandlung auf, n=12. *B:* Der MTT-Assay zeigt eine signifikante Reduktion der Zellviabilität von EV Zielzellen nach einer 30 mM Glukosebehandlung, n=6. *C:* Signifikante Steigerung frühapoptotischer Zellen in der Durchflusszytometrie (Annexin V positiv und 7-AAD negativ), n=6. *D:* Signifikante Steigerung frühapoptotischer Zellen in der Durchflusszytometrie, n=4/5. *A/B/C/D:* ANOVA + Bonferroni post-hoc Test, zweiseitiger Signifikanztest. (11 *A/B/C/D* adaptiert an Zietzer et al., 2021)

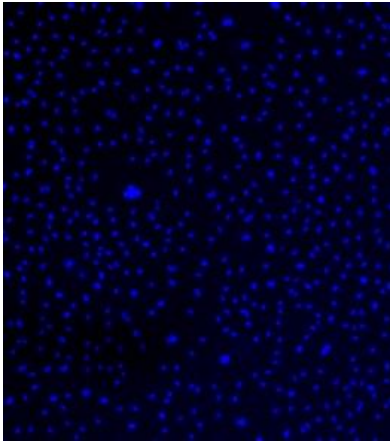
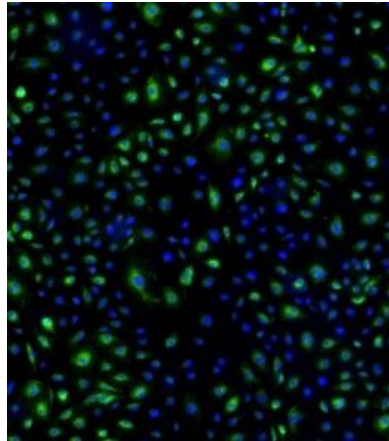
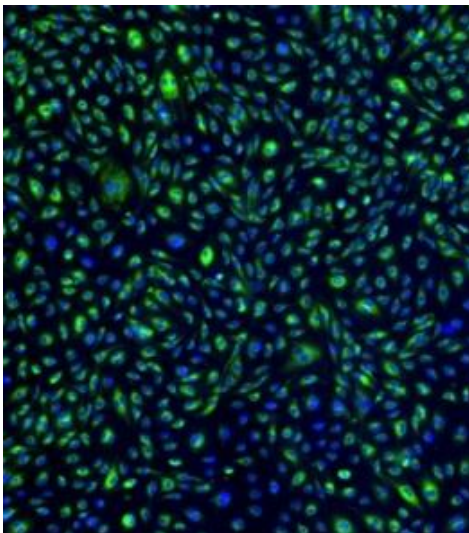
### 3.5 Aufnahme und Transport von exogen hinzugefügten Ceramid

Im folgenden Experiment soll die Aufnahme von exogen zugeführten Ceramid in HCAEC, der Export mittels EV und die Aufnahme von EV Zielzellen untersucht werden.

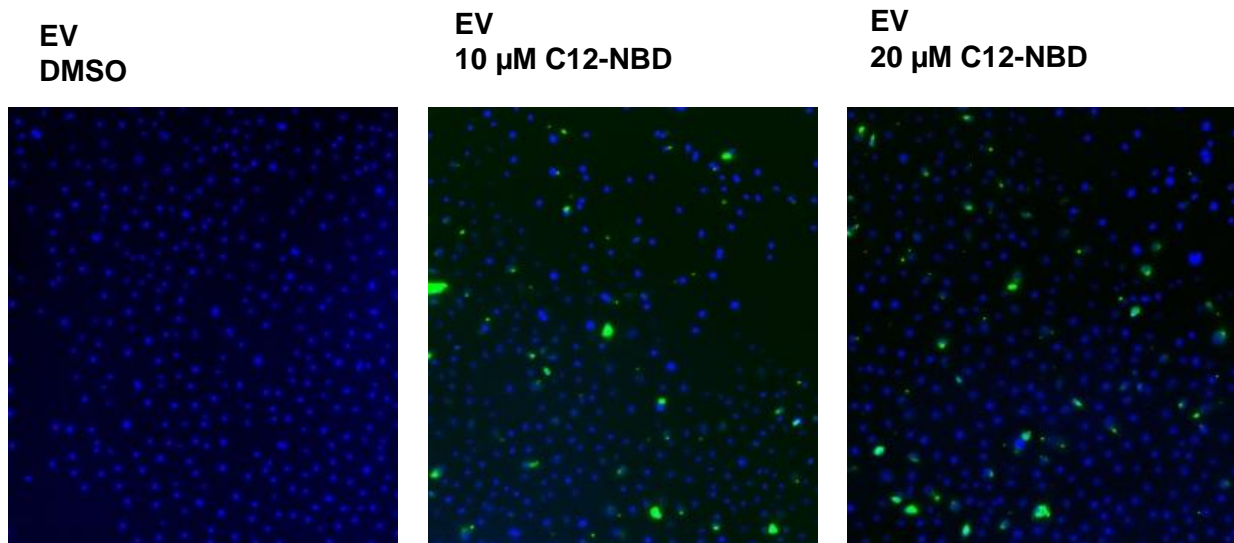
Im ersten Versuchsteil wurde zur Visualisierung dieses Prozesses ein fluoreszierendes NBD-C12 Ceramid verwendet, welches im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden kann. Zuerst wurden HCAEC für 24 Stunden mit dem NBD-C12 inkubiert. Die anschließenden Aufnahmen im Fluoreszenzmikroskop zeigen eine dosisabhängige Aufnahme des exogenen Ceramids in die Zellkultur (s. Abb. 12 A). Als nächstes wurden EV Zielzellen mit freigesetzten EV von HCAEC, welche mit NBD-C12 und Serum-freiem Medium behandelt wurden, inkubiert. Die EV Zielzellen nehmen das fluoreszierende Ceramid ebenfalls dosisabhängig über die EV auf (s. Abb. 12 B).

Aufgrund der Veränderung der chemischen Eigenschaft des Ceramids durch den angehängten NBD-Rest soll im zweiten Versuchsteil die Aufnahme in HCAEC und der Export in EV nach exogener C16 Behandlung in der Massenspektrometrie nachgewiesen werden. Hierfür wurden zum einen HCAEC mit C16 behandelt und der C16 Gehalt in den HCAEC in der Massenspektrometrie analysiert. Für die Analyse der EV wurden HCAEC mit C16 und Serum-freiem Medium behandelt, die EV aus dem Zellkulturüberstand isoliert und in der Massenspektrometrie analysiert. Es wurde eine signifikante Zunahme des C16 Gehaltes in den freigesetzten EV nachgewiesen (s. Abb. 12 C). Beide Versuchsteile zeigen, dass exogen verabreichte Ceramide von HCAEC aufgenommen, in EV angereichert und von EV Zielzellen aufgenommen werden können.

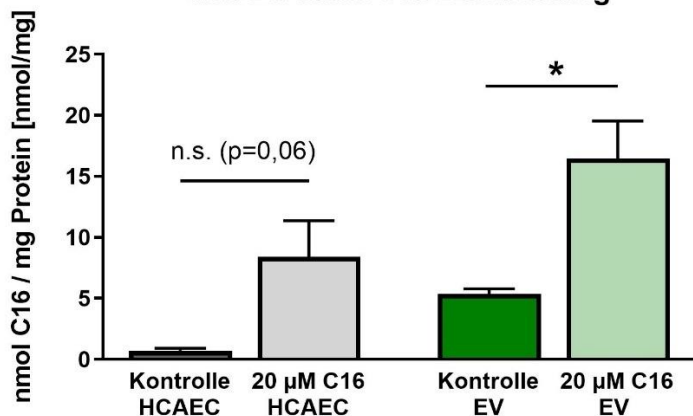


**A: Fluoreszenzmikroskopie von HCAEC nach NBD-C12 Ceramid Behandlung****DMSO:****10  $\mu$ M NBD-C12:****20  $\mu$ M NBD-C12:****NBD-C12**  
**DAPI**

### B: Fluoreszenzmikroskopie von EV Zielzellen nach C12-NBD Ceramid Behandlung



### C: Massenspektrometrie von C16 in HCAEC und EV nach C16 Behandlung

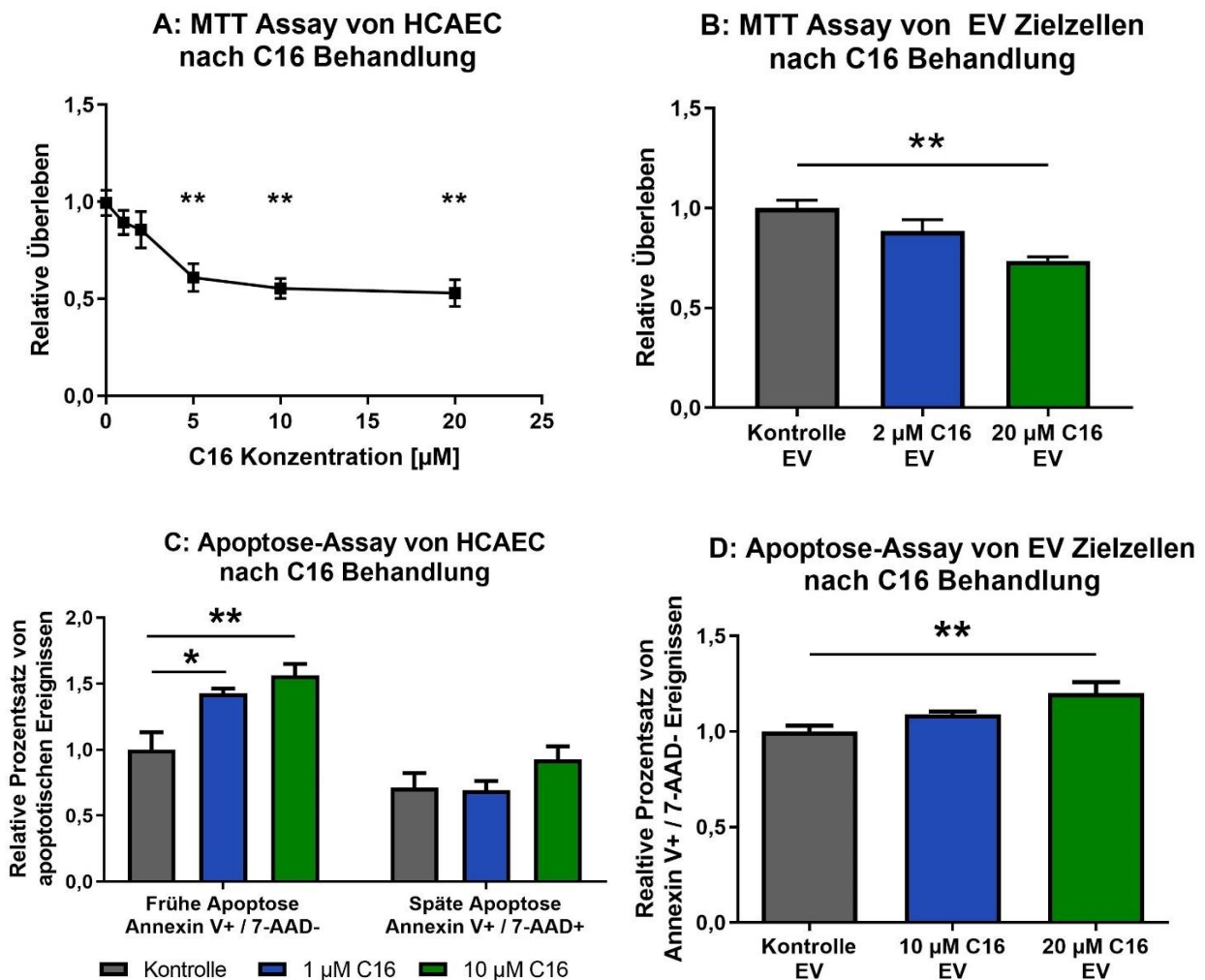


**Abb. 12:** Exogenes Ceramid wird von HCAEC aufgenommen, in EV verpackt und an EV Zielzellen transferiert. *A:* HCAEC wurden mit 10 µM und 20 µM NBD-C12 Ceramid (grün) für 24 h inkubiert. Stimulation der Kontrollgruppe mit DMSO. HCAEC wurden fixiert, der Nukleus mit DAPI angefärbt und Aufnahme im Fluoreszenzmikroskop. Dosisabhängige Aufnahme des NBD-C12 Ceramid in HCAEC. *B:* HCAEC wurden mit 10 µM und 20 µM NBD-C12 Ceramid oder mit DMSO als Kontrolle stimuliert, für 24 h mit Serumfreiem Medium behandelt, die EV isoliert und diese für 24 h mit nativen HCAEC inkubiert. HCAEC wurden fixiert, der Nukleus zusätzlich mit DAPI angefärbt und Aufnahme im Fluoreszenzmikroskop. Dosisabhängige Aufnahme des NBD-C12 Ceramid in EV Zielzellen. *C:* Signifikante Zunahme des C16 Gehaltes in EV nach 24 h C16 und 24 h Serumfreie Medium Behandlung. HCAEC wurden mit 20 µM C16 Ceramid oder DMSO als Kontrolle für 24 h behandelt. Analyse in der Massenspektrometrie, n=3, t-Test für nicht verbundene Stichproben, zweiseitiger Signifikanztest. (12 A/B adaptiert an Zietzer et al., 2021)

### 3.6 Auswirkung der Ceramid Behandlung auf die Apoptose von HCAEC und EV Zielzellen

Aufgrund der Aktivierung der SMPD3, dem vermehrten Export von C16 in EV und der Induktion der Apoptose in HCAEC und EV Zielzellen nach einer Glukosebehandlung, soll nun genauer der apoptotische Effekt des C16 auf HCAEC und EV Zielzellen untersucht werden.

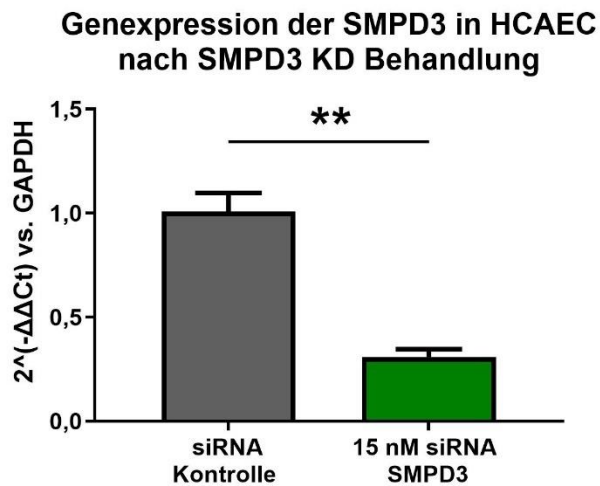
Hierfür wurden zuerst HCAEC mit C16 stimuliert. Im MTT-Assay konnte eine signifikante Reduktion der Zellviabilität und im Apoptose-Assay eine Zunahme frühapoptotischer HCAEC nach C16 Behandlung nachgewiesen werden (s. Abb. 13 A/C). Zusätzlich wurden EV Zielzellen mit EV inkubiert, welche von C16 und Serum-freien Medium behandelten HCAEC isoliert wurden. Es konnte ebenfalls im MTT-Assay eine signifikante Reduktion der Zellviabilität und im Apoptose-Assay eine signifikante Zunahme frühapoptotischer EV Zielzellen detektiert werden (s. Abb. 13 B/D). Die Ergebnisse zeigen, dass eine exogene C16 Behandlung die Apoptose direkt oder EV-vermittelt in HCAEC induzieren konnte.



**Abb. 13:** Sinkende Zellviabilität und steigende Anzahl frühapoptotischer Zellen von HCAEC und EV Zielzellen nach C16 Stimulation. Analyse apoptotischer Zellen nach 24 h C16 Stimulation im MTT-Assay und in der Durchflusszytometrie mit einem Annexin V / 7-AAD Apoptose-Assay. Die Kontrollgruppe wurde mit DMSO behandelt. **A:** Signifikante Reduktion der Zellviabilität im MTT-Assay von HCAEC nach 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$  C16 Ceramid Stimulation,  $n=3$ . **B:** Reduktion der Zellviabilität im MTT-Assay von EV Zielzellen. HCAEC wurde mit 20  $\mu\text{M}$  C16 Ceramid stimuliert, für 24 h mit Serum-freiem Medium behandelt, die EV isoliert und diese für 24 h mit nativen HCAEC inkubiert,  $n=3/4$ . **C:** Signifikante Erhöhung frühapoptotischer Zellen im Apoptose-Assay von HCAEC nach 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  C16 Stimulation,  $n=6$ . **D:** Signifikante Erhöhung frühapoptotischer Zellen im Apoptose-Assay von EV Zielzellen. HCAEC wurden zuvor mit 20  $\mu\text{M}$  C16 stimuliert, für 24 h mit Serum-freiem Medium behandelt, EV isoliert und diese für 24 h mit nativen HCAEC inkubiert,  $n=7/8$ . **A/B/C/D:** ANOVA + Bonferroni post-hoc Test, zweiseitiger Signifikanztest. (13 A/B/C/D adaptiert an Zietzer et al., 2021)

### 3.7 Genexpression der SMPD3 nach SMPD3 Knock-down Behandlung

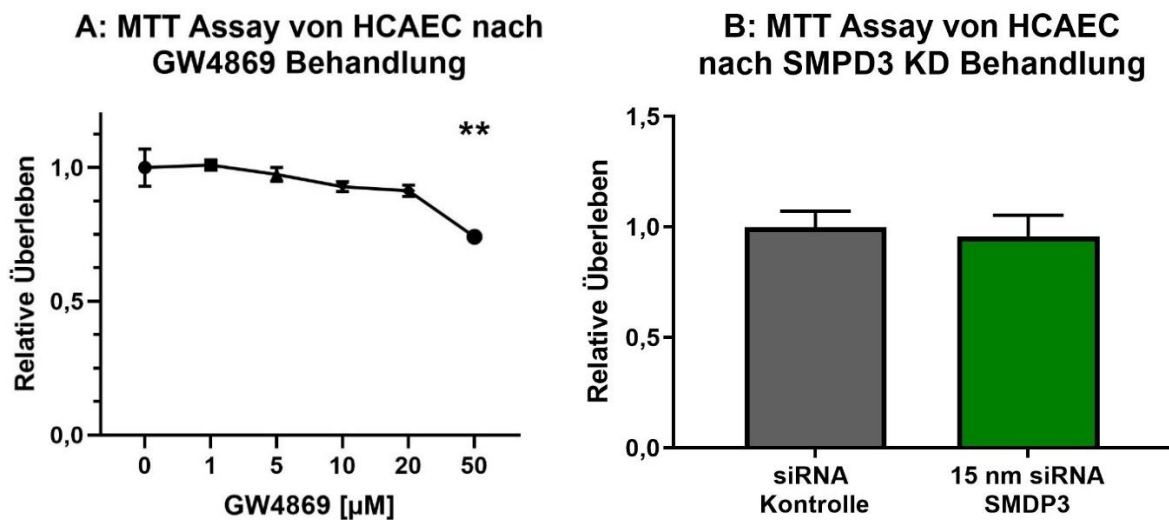
Im folgenden Experiment soll die Wirksamkeit einer SMPD3 siRNA Knock-down Behandlung untersucht werden. Hierfür wurden HCAEC mit einer SMPD3 siRNA und einer siRNA Kontrolle behandelt, die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben, eine qPCR durchgeführt und die Ergebnisse mit der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Methode analysiert. Die Genexpressionsanalyse konnte die signifikante Reduktion der SMPD3 Genexpression nach einer 15 nM siRNA Behandlung bestätigen (s. Abb. 14).



**Abb. 14:** Reduktion der SMPD3 Genexpression nach SMPD3 siRNA Knock-down (KD) Behandlung. HCAEC wurden für 48 h mit 15 nM SMPD3 siRNA oder siRNA Kontrolle stimuliert. RNA Isolation, Umschreibung in cDNA, Durchführung der qPCR und Analyse mit der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Methode. Verwendung von GAPDH als endogene Kontrolle,  $n=3$ , t-Test für nicht verbundene Stichproben, zweiseitiger Signifikanztest. (Adaptiert an Zietzer et al., 2021)

### 3.8 Einfluss von SMPD3 Knock-down und pharmakologische Inhibition mit GW4869 auf die Apoptose von HCAEC

Die folgenden Experimente sollen den Einfluss eines SMPD3 Knock-down und einer pharmakologischen Inhibition mit GW4869 auf die Apoptose der HCAEC untersuchen. Im MTT-Assay konnten weder nach einem siRNA Knock-down noch nach Einsatz des pharmakologischen Inhibitors GW4869 in den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen ein signifikanter Unterschied in der Zellviabilität festgestellt werden. Der im DMSO gelöste Inhibitor GW4869 zeigte ab einer Konzentration von über 50  $\mu\text{M}$  eine signifikante Reduktion der Zellviabilität (s. Abb. 15 A/B).



**Abb. 15:** SMPD3 Knock-down und pharmakologische Inhibition mit GW4869 haben keinen Einfluss auf die Apoptose von HCAEC. Analyse der Zellviabilität von HCAEC nach Inhibition der SMPD3 im MTT-Assay. *A:* Kein Unterschied in der Zellviabilität der HCAEC nach Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  GW4869 für 24 h. Signifikante Reduktion der Zellviabilität ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  GW4869 für 24 h. Die Kontrollgruppe wurde mit DMSO behandelt,  $n=3$ , ANOVA + Bonferroni post-hoc Test, zweiseitiger Signifikanztest. *B:* Kein Unterschied in der Zellviabilität der HCAEC nach einer 15 nM SMPD3 siRNA Behandlung oder einer siRNA Kontrolle für 48 h,  $n=8$ , t-Test für nicht verbundene Stichproben, zweiseitiger Signifikanztest. (15 A/B adaptiert an Zietzer et al., 2021)

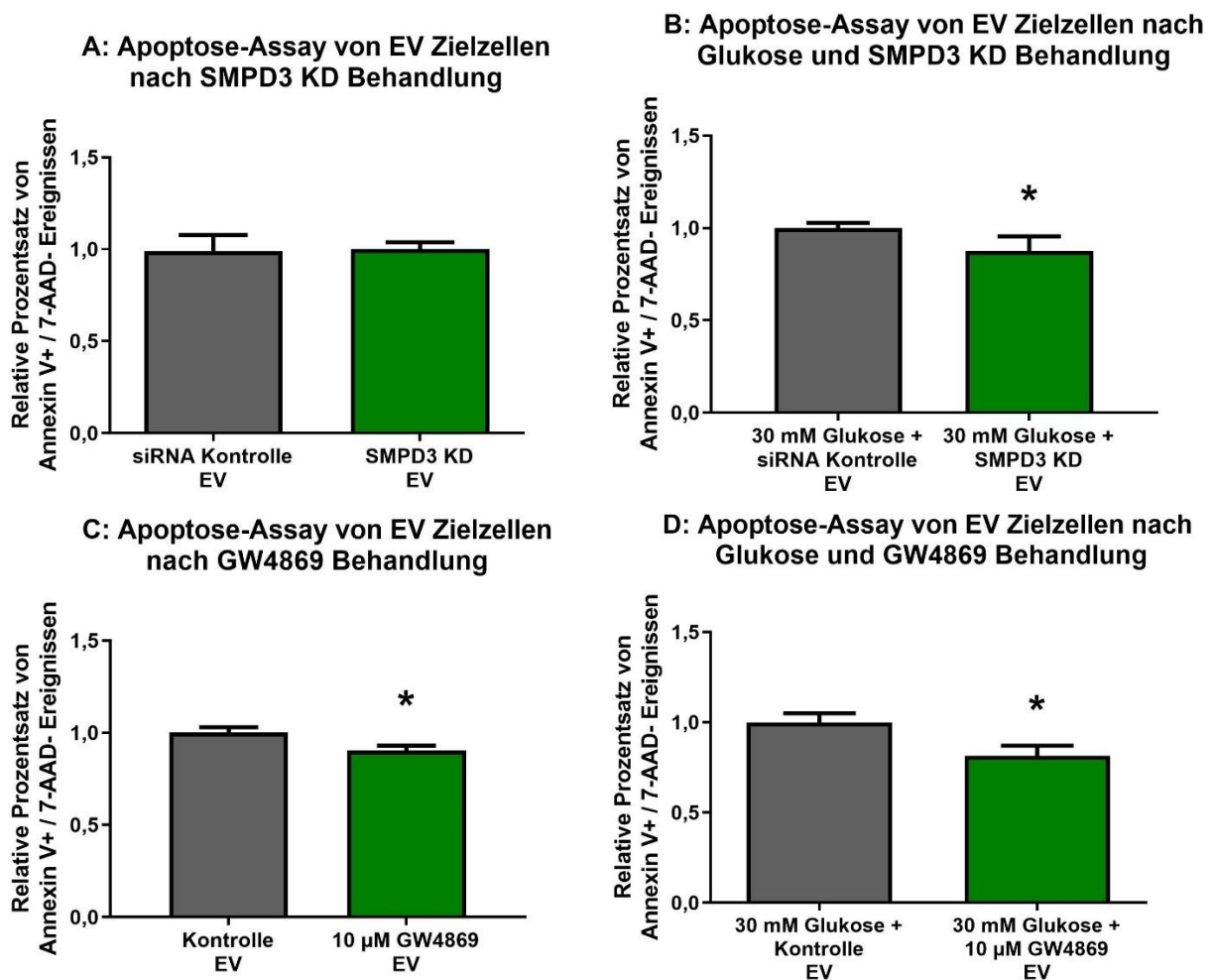
### 3.9 Einfluss von SMPD3 Knock-down und pharmakologische Inhibition mit GW4869 auf die Apoptose von EV Zielzellen

In den folgenden Experimenten soll überprüft werden, ob eine Inhibition der SMPD3 die EV Zielzellen vor dem apoptotischen Untergang nach einer Glukoseschädigung schützen kann.

Als Erstes wurde der Effekt der Inhibition ohne Glukoseschädigung untersucht: Hierfür wurde die SMPD3 von HCAEC mit einem siRNA Knock-down oder mit dem pharmakologischen Inhibitor GW4869 gehemmt und die anschließend isolierten EV mit EV Zielzellen inkubiert. Im Apoptose-Assay konnte eine signifikante Reduktion frühapoptotischer EV Zielzellen nach GW4869 Behandlung festgestellt werden, während der siRNA Knock-down keinen Einfluss auf das Apoptoseverhalten der EV Zielzellen hatte (s. Abb. 16 A/C). Als Zweites wurde der Einfluss der Inhibition bei gleichzeitiger Glukoseschädigung untersucht: HCAEC wurden zuvor mit Glukose vorbehandelt, die SMPD3 mit GW4869 oder siRNA Knock-down gehemmt, mit Serum-freiem Medium versetzt, die EV isoliert und diese auf native EV Zielzellen gegeben. Beide Methoden der Inhibition konnten die EV Zielzellen vor ihrem apoptotischen Untergang schützen und die Anzahl frühapoptotischer Zellen signifikant senken (s. Abb. 16 B/D).

Die Ergebnisse bestätigen, dass eine EV-vermittelte Induktion der Apoptose durch eine Hyperglykämie mit einer Inhibition der SMPD3 verhindert werden konnte.



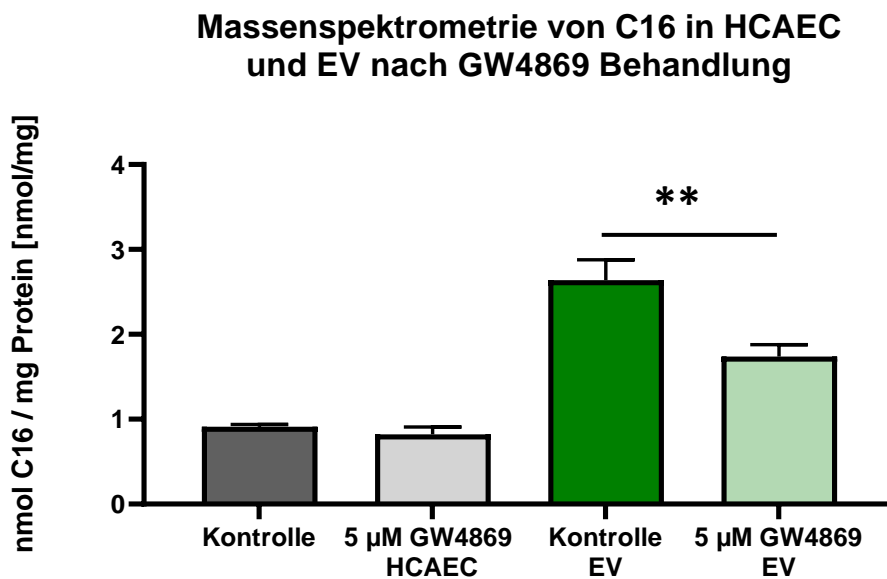


**Abb. 16:** Hemmung der SMPD3 mit siRNA Knock-down (KD) oder mit GW4869 können den EV-vermittelten apoptotischen Effekt nach einer Glukosestimulation in EV Zielzellen verhindern. Analyse frühapoptotischer Zellen im Annexin V / 7-AAD Apoptose-Assay in der Durchflusszytometrie. **A:** Apoptose-Assay von EV Zielzellen, deren EV von HCAEC isoliert wurden, welche für 48 h mit einer 15 nM SMPD3 siRNA oder einer siRNA Kontrolle und für 24 h mit Serum-freiem Medium behandelt wurden, n=4. **B:** Signifikante Reduktion frühapoptotischer EV Zielzellen nach Glukose und SMPD3 Knock-down Behandlung. HCAEC wurden zuvor für 24 h mit 30 mM Glukose, anschließend für 48 h mit 30 mM Glukose und 15 nM SMPD3 siRNA oder siRNA Kontrolle stimuliert, für 24 h mit Serum-freiem Medium behandelt, EV isoliert und diese auf EV Zielzellen für 24 h gegeben, n=5. **C:** Signifikante Reduktion von frühapoptotischen EV Zielzellen nach GW4869 Behandlung. HCAEC wurden für 24 h mit Serum-freiem Medium und 10 µM GW4869 oder mit Serum-freiem Medium und DMSO Kontrolle stimuliert, die EV isoliert und für 24 h mit EV Zielzellen inkubiert, n=5. **D:** Signifikante Reduktion frühapoptotischer EV Zielzellen nach Glukose und GW4869 Stimulation. HCAEC wurden zuvor mit 30 mM Glukose für 72 h stimuliert, anschließend für 24 h mit Serum-freiem Medium und 10 µM GW4869 oder DMSO Kontrolle stimuliert, die EV isoliert und mit EV Zielzellen für 24 h inkubiert, n=6. A/B/C/D: t-Test für nicht verbundene Stichproben, zweiseitiger Signifikanztest. (16 A/B/C/D adaptiert an Zietzer et al., 2021)



### 3.10 Analyse der Ceramid Konzentration in HCAEC und EV nach GW4869 Behandlung

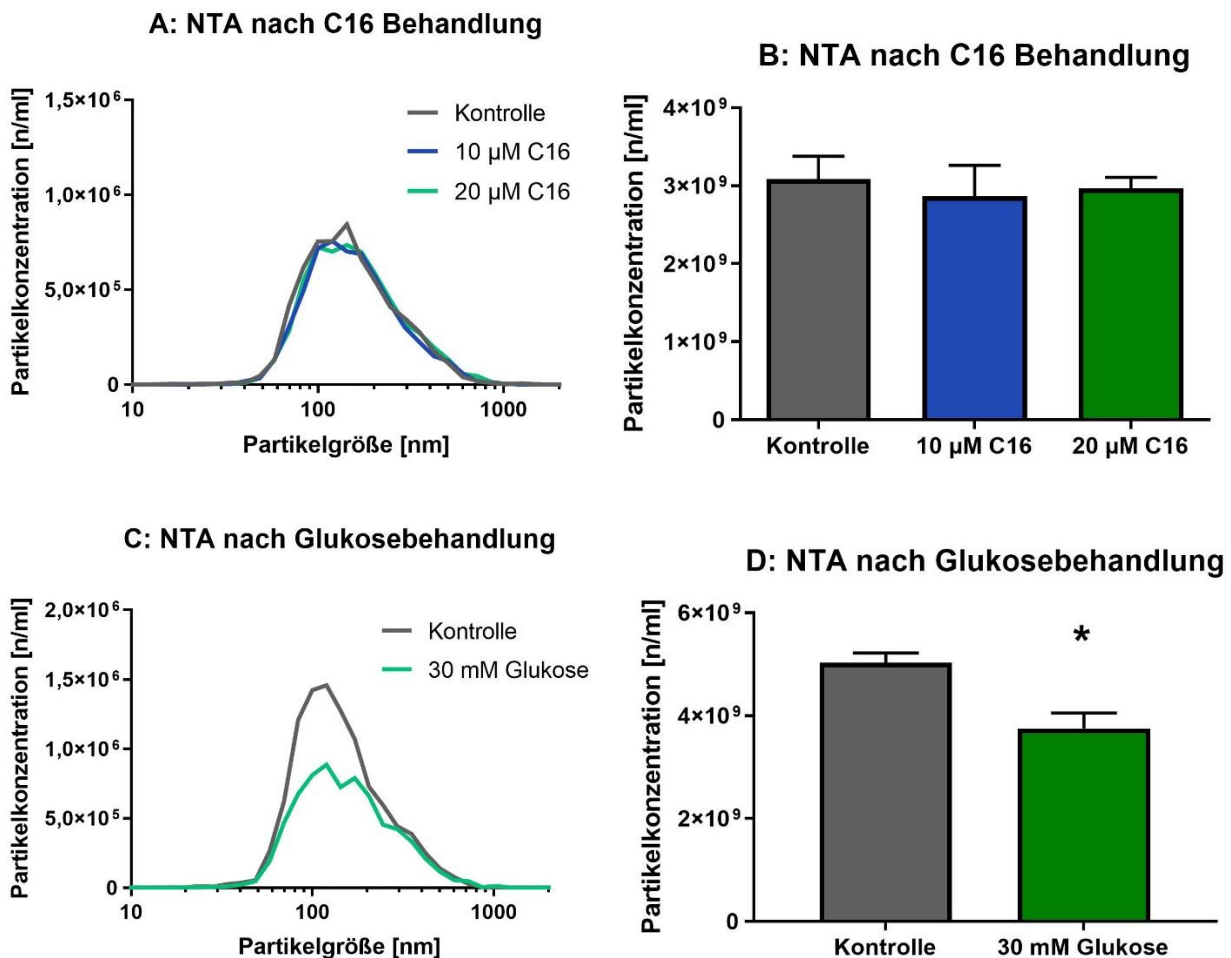
Die vorangegangenen Experimente konnten bestätigen, dass eine Inhibition der SMPD3 die Anzahl apoptotischer EV Zielzellen senken kann. Unklar ist jedoch, inwiefern sich der Gehalt an C16 in HCAEC und in EV nach einer pharmakologischen Inhibition verändert. Hierfür wurden zum einen HCAEC mit GW4869 behandelt und in der Massenspektrometrie analysiert. Zum anderen wurde für die Analyse der EV zuerst HCAEC mit GW4869 und mit Serum-freiem Medium behandelt, die EV isoliert und der C16 Gehalt mittels Massenspektrometrie untersucht. Es konnte eine signifikante Abnahme der C16 Konzentration in EV nach einer pharmakologischen Inhibition mit GW4869 nachgewiesen werden (s. Abb. 17).

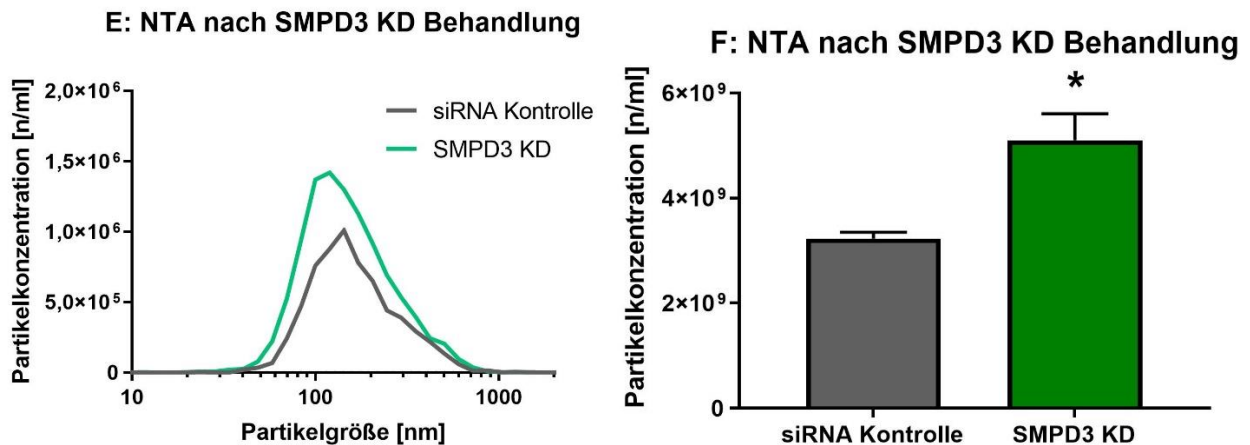


**Abb. 17:** Verringerte C16 Konzentration in EV nach pharmakologischer Inhibition mit GW4869. Massenspektrometrie der C16 Konzentration von HCAEC und EV. HCAEC wurden für 24 h mit 5 µM GW4869 behandelt. Die EV wurden von HCAEC isoliert, welche zuvor mit 5 µM GW4869 im Serum-freiem Medium für 24 h stimuliert wurden. Signifikante C16 Reduktion in EV nach 5 µM GW4869 Behandlung, n=3, ANOVA + Bonferroni post-hoc Test, zweiseitiger Signifikanztest.

### 3.11 Einfluss von Glukose, C16 und SMPD3 Knock-down auf die Konzentration und Partikelgröße der EV

Neben der Produktion von Ceramiden hat die SMPD3 eine wichtige Rolle in der Freisetzung von Exosomen (Menck et al., 2017). Dadurch ist unklar, inwiefern sich die Anzahl der isolierten EV nach einer Glukosebehandlung oder einer Inhibition der SMPD3 verändert. Aufgrund dessen wurden die Effekte von Behandlungen mit exogenen Ceramiden, Glukose und SMPD3 siRNA Knock-down auf Konzentration und Partikelgröße der isolierten EV Population im NTA untersucht. Hierfür wurden HCAEC mit C16, Glukose oder mit einer SMPD3 siRNA behandelt, für 24 Stunden mit Serum-freiem Medium stimuliert, die EV anschließend isoliert und im NTA eingemessen. Es wurde eine signifikante Reduktion der Partikelanzahl nach Glukosebehandlung und ein signifikanter Anstieg der Partikelanzahl nach SMPD3 Hemmung detektiert (s. Abb. 18).





**Abb. 18:** Verringerung der Partikelanzahl nach Glukoseschädigung, Erhöhung der Partikelanzahl nach SMPD3 Knock-down (KD). NTA von isolierten EV nach C16, Glukose oder SMPD3 siRNA KD Behandlung. *A/B:* HCAEC wurden zuvor mit 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M C16 oder DMSO als Kontrolle für 24 h stimuliert, für 24 h mit Serum-freiem Medium behandelt, EV isoliert und in 1 ml DPBS gelöst, n=3. ANOVA + Bonferroni post-hoc Test, zweiseitiger Signifikanztest. *C/D:* Signifikante Reduktion der Partikelanzahl nach 30 mM Glukosebehandlung. Zuvor wurden HCAEC mit 30 mM oder H<sub>2</sub>O als Kontrolle stimuliert, für 24 h mit Serum-freiem Medium behandelt, EV isoliert und in 1 ml DPBS gelöst, n=3. *E/F:* Signifikanter Anstieg der Partikelanzahl nach SMPD3 KD Behandlung. HCAEC wurden zuvor 48 h mit einer 15 nM SMPD3 siRNA oder einer siRNA Kontrolle inkubiert, für 24 h mit Serum-freiem Medium behandelt, EV isoliert und in 1 ml DPBS gelöst, n=3. *D/F:* t-Test für nicht verbundene Stichproben, zweiseitiger Signifikanztest. (18 *A/B/C/D/E/F* adaptiert an Zietzer et al., 2021)

## 4. Diskussion

Extrazelluläre Vesikel gelangen immer mehr in den Fokus aktueller Forschung aufgrund ihres Einflusses auf die Endothelfunktion und somit auf die Progression der Arteriosklerose (Boulanger et al., 2017; Chistiakov et al., 2017). Pathophysiologisch spielen Veränderung der transferierten bioaktiven Moleküle mittels EV mit Förderung von Endotheldysfunktionen, Kalzifizierungen, Plaqueprogressionen und Thrombenbildung eine entscheidende Rolle (Jansen et al., 2017). In dieser Arbeit wurde sich auf den Transfer des Sphingolipids d18:1 16:0 Ceramid mittels EV fokussiert und dessen apoptotische Effekt auf HCAEC untersucht. In der Massenspektrometrie konnte ein vermehrter Export von proapoptotischen C16 in EV nach erhöhten Glukosespiegeln festgestellt werden. Erhöhte Glukosespiegel aktivieren und erhöhen die Genexpression des Ceramid-produzierenden Enzyms – die neutrale Sphingomyelinase 2 (SMPD3). Durch den vermehrten Export von C16 in EV können diese an EV Zielzellen transferiert werden und dort die Apoptose induzieren. Der entstandene Endothelschaden kann die Progression der Arteriosklerose fördern. Um die Produktion des proapoptotischen C16 zu reduzieren, wurde die SMPD3 durch pharmakologische Inhibition mit GW4869 oder mit einem siRNA Knock-down gehemmt. Durch die verringerte Bildung von Ceramiden wurde weniger C16 in die EV eingebaut und die Anzahl apoptotischer Endothelzellen konnte trotz bestehender erhöhter Glukosespiegel verringert werden.

Einer Herausforderung an die Forschung stellen Isolierung und Quantifizierung der EV dar (Jansen et al., 2017). Eine häufig angewandte Methode zur EV Isolierung ist die differentielle Zentrifugation (Théry et al., 2018). Aufgrund der überschneidenden Partikelgrößen der verschiedenen EV Populationen - Exosomen, MV und apoptotische Körperchen - kann bei dieser Methode keine reine Population separiert, sondern nur eine Anreicherung einer Isoform erreicht werden (Zaborowski et al., 2015). Die Ausbeute an EV ist bei differentieller Zentrifugation zusätzlich abhängig von der Viskosität der Proben, so dass Unterschiede in der Menge der isolierten EV zwischen verschiedenen Zellkultur- oder Patientenproben zu erwarten und unterschiedliche Studien und Experimente schlechter vergleichbar sind (Momen-Heravi et al., 2012; Witwer et al., 2013). Zusätzlich

ist weiterhin unklar, ob die hohen Scherkräfte während der Zentrifugation einen Einfluss auf die Funktionalität der EV haben (Vion et al., 2013).

In dieser Arbeit wurde der Zellkulturüberstand zuerst bei 1.500 g für 15 Minuten zentrifugiert, um Endothelzellen und größere apoptotische Körperchen abzuzentrifugieren. Der Überstand wurde anschließend für 40 Minuten bei 20.000 g und 4 °C zentrifugiert, das Pellet gewaschen und nochmals für 40 Minuten bei 20.000 g und 4 °C zentrifugiert (Jansen et al., 2013). Zur Quantifizierung der EV wurde das Elektronenmikroskop eingesetzt, welches eine etablierte Methode zur Darstellung von EV ist (Théry et al., 2018). Zusätzlich wurden die pelletierten EV in der NTA eingemessen, um die Konzentration und Größenverteilung der Partikel zu analysieren (Witwer et al., 2013). Die durchschnittliche Partikelgröße lag bei 252 nm. Aus der Größenverteilung lässt sich schließen, dass das isolierte Pellet größere EV, überwiegend MV, aber auch kleinere apoptotische Körperchen und größere Exosomen, beinhaltet (s. 3.1).

Die Anwendung der Massenspektrometrie hat die Untersuchung der Lipidzusammensetzung von EV ermöglicht (Shevchenko und Simons, 2010). Verschiedene *in vitro* Studien konnten zeigen, dass die Lipidzusammensetzungen der EV von den freisetzenden Zelllinien abhängen (Llorente et al., 2013; Tjakovic et al., 2008). Tjakovic et al. (2008) konnten in Exosomen von Oli-neu Zellen vermehrt Cholesterine, Ceramide und Hexosylceramide im Vergleich zur Zellmembran nachweisen. Llorente et al. (2013) detektierten in Exosomen von epithelialen humanen Prostatakrebszellen PC-3 Anreicherungen von Cholesterol, Sphingomyelin, Phosphatidylserin, Glykophospholipiden und Ceramiden. Im Serum von Patienten mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko konnte eine Zunahme von C16 detektiert werden (Cheng et al., 2015). Boon et al. (2013) konnten erhöhte Konzentrationen von C16 im Serum von Patienten mit einem DMT2 nachweisen. Unklar ist jedoch, wie pathophysiologisch eine veränderte Zusammensetzung der EV von endothelialen Zellen durch erhöhte Glukosespiegel vermittelt wird und welchen Effekt diese Veränderungen auf EV Zielzellen haben. In unserer Arbeit wurden Endothelzellen sowie ihre EV nach einer Glukosebehandlung in der Massenspektrometrie analysiert und die Ergebnisse zeigen einen Anstieg aller Sphingolipidklassen in EV. In einer spezifischen Analyse der verschiedenen Ceramidklassen konnte zum einen ein großer Anteil an C16

in EV und zum anderen eine signifikante Steigerung dieses Anteils nach einer Glukosebehandlung nachgewiesen werden (s. 3.2). Back et al. (2018) konnten zeigen, dass durch eine Behandlung mit Serum-freiem Medium die Aktivität der SMPD3 in Neuroblastom PC12 Zellen der Ratte erhöht wurde, welche die Produktion von Ceramiden und die Freisetzung von MV beeinflussen könnte. Da in dieser Arbeit die Kontrollgruppen ebenfalls mit Serum-freiem Medium behandelt wurden, ist der Effekt der Aktivierung der SMPD3 und der daraus resultierenden vermehrten Produktion von Ceramiden bereits kontrolliert. Des Weiteren würde der Austausch des Serum-freien Mediums durch ein anderes Medium zu Kontaminationen der isolierten EV Pellets führen und weitere Analysen wären nur eingeschränkt durchführbar (Li et al., 2015; Théry et al., 2018).

Um den Einfluss von Glukose auf die Ceramidanreicherung in EV genauer zu analysieren, wurde in dieser Arbeit ein Fokus auf die Sphingomyelinasen gelegt, welche für die akute Bereitstellung von Ceramiden verantwortlich sind (Mullen und Obeid, 2012; Vit und Rosselli, 2003). Die Gruppe der Sphingomyelinasen besteht aus verschiedenen Isoformen, der aSMase (SMPD1), der nSMase 1 (SMPD2) und der nSMase 2 (SMPD3). In der Genexpression wurde ein signifikanter Anstieg der SMPD3 nach einer Glukosebehandlung für 48 Stunden und 72 Stunden detektiert. Zusätzlich konnte im Aktivitätsassay ein signifikanter Anstieg der nSMase Aktivität nach einer Glukosebehandlung festgestellt werden. Die Aktivität der aSMase hat sich nach einer Glukosebehandlung nicht verändert (s. 3.3).

In anderen *in vitro* Studien wurde insbesondere der Effekt der Glukose auf die Aktivität und die Expression der aSMase untersucht: Luo und Lei (2017) zeigen in humanen umbilikalvenösen Endothelzellen (HUVEC) einen Anstieg der SMPD1 Aktivität nach 30 mM Glukosebehandlung im Aktivitätsassay. In Kady et al. (2017) wurden isolierte humane retinale Endothelzellen untersucht, welche eine erhöhte Genexpression der SMPD1 von Patienten mit einem DMT2 detektieren. In dieser Arbeit wurde eine Steigerung der Aktivität und Genexpression der SMPD3 und nicht der SMPD1 in HCAEC detektiert, welches aufgrund der endothelialen Heterogenität begründet sein kann (Aird, 2007 a; Aird 2007 b).

Erhöhte Glukosespiegel können Auslöser für endotheliale Dysfunktionen und Schädigungen sein (Jansen et al., 2013; Sheu et al., 2005) Aufgrund dessen wurden apoptotische HCAEC im MTT-Assay und im Apoptose-Assay nach einer 30 mM Glukosebehandlung untersucht, welches in hyperglykämischen Krisen auftreten kann und eine gängige Konzentration in Zellkulturstudien ist (Fayfman et al., 2017; Jansen et al., 2013; Luo und Lei, 2017; Sheu et al., 2005). In beiden Assays wurde eine erhöhte Anzahl apoptotischer HCAEC nach einer Schädigung mit 30 mM Glukose festgestellt (s. 3.4). Andere Studien konnten ebenfalls einen signifikanten Anstieg apoptotischer HUVEC nach 30 mM Glukosebehandlung detektieren (Detaile et al., 2005; Leo und Lei, 2017; Sheu et al., 2005). Jansen et al. (2013) konnten in HCAEC verringerte endotheliale Reparaturmechanismen nach einer 30 mM Glukosekonzentration vermittelt durch den verminderten Transfer von miRNA-126 mittels EV nachweisen. Jedoch ist unklar, welchen Effekt die Ceramidanreicherung in EV nach der Glukosebehandlung auf native endotheliale EV Zielzellen hat. Dieser Effekt soll genauer untersucht werden, indem zuerst die EV von glukosebehandelten HCAEC isoliert und anschließend mit nativen Endothelzellen inkubiert wurden. Sowie im MTT-Assay als auch im Apoptose-Assay wurde ein signifikanter Anstieg apoptotischer EV Zielzellen nachgewiesen (s. 3.4).

Aufgrund des vermehrten Exports von proapoptotischen Ceramiden nach einer Glukosebehandlung sowie den vermehrten apoptotischen HCAEC nach EV Stimulation soll in dieser Arbeit geklärt werden, ob exogen zugeführte Ceramide von HCAEC aufgenommen, in EV verpackt und von EV Zielzellen aufgenommen werden können (s. 3.2). Eine häufig angewandte Methode zum Nachweis der Aufnahme von exogenen Ceramiden und des Transfers an EV Zielzellen stellt die direkte Visualisierung mit fluoreszierenden Lipiden dar (Canals et al., 2018). Hierfür wurde ein NBD-C12 Ceramid verwendet, welches aufgrund seiner vier weiteren Kohlenstoffatome im NBD-Rest einer Länge der Kohlenstoffkette eines C16 Ceramid entspricht. Jedoch wird die chemische Eigenschaft des Ceramids durch den NBD-Rest verändert und kann die Aufnahme in die Zelle, den Export und den Transport der EV beeinflussen. Aus diesem Grund wurde zusätzlich in der Massenspektrometrie der Gehalt an C16 in HCAEC und in EV nach einer exogenen C16 Behandlung untersucht. In dieser Arbeit konnte in der Fluoreszenzmikroskopie die Aufnahme des exogenen Ceramid in HCAEC und der Transfer via EV an EV Zielzellen dargestellt und in der Massenspektrometrie der Export von exogenen Ceramiden in EV

detektiert werden (s. 3.5). Eine Studie von Kjellberg et al. (2015) konnte ebenfalls die Aufnahme von exogenen, radioaktiv markierten und in PBS gelösten Ceramiden in Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (HeLa-Zellen) in verschiedenen Konzentrationen und Inkubationszeiten nachweisen. In weiteren Experimenten können nun die Effekte der transferierten Ceramide mittels EV auf EV Zielzellen untersucht werden.

Anschließend wurde das Apoptoseverhalten von HCAEC und EV Zielzellen nach exogener Ceramidbehandlung untersucht aufgrund ihrer proapoptischen Wirkung (Mullen und Obeid, 2012). Im MTT-Assay konnte eine verstärkte Reduktion der Zellviabilität und im Apoptose-Assay ein Anstieg frühapoptischer Zellen nach C16 Behandlung in HCAEC und EV Zielzellen nachgewiesen werden (s. 3.6). Andere Studien konnten ebenfalls den proapoptischen Effekt von exogenen Ceramiden auf Zellkulturen nachweisen. Kjellberg et al. (2015) konnten in HeLa-Zellen nachweisen, dass eine Behandlung mit exogenen Ceramiden (C16, C10 und C6) den programmierten Zelltod induzieren. Shabbits et al. (2003) konnten im MTT-Assay ebenfalls die zytotoxische Wirkung von C16 auf die humane Brustkrebszelllinie MDA435/LCC6 und auf murine Makrophagen J774 bestätigen. Darüber hinaus konnte in der Arbeit von Aflaki et al. (2012) gezeigt werden, dass durch eine Steigerung des endogenen Ceramidanteils durch Überexpression der Ceramid-Synthase 4, 5 und 6 vermehrt Makrophagen zugrunde gehen. Stiban und Perera (2015) konnten nachweisen, dass Ceramide Poren in die äußere Mitochondrienmembran einbauen und durch die Freisetzung von Cytochrom C ins Zytosol die Apoptose induzieren. Unklar ist jedoch, welchen Effekt die Ceramid-angereicherten EV auf die EV Zielzellen haben. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass im MTT-Assay die Zellviabilität der EV Zielzellen gesenkt und im Apoptose-Assay die Anzahl apoptotischer EV Zielzellen erhöht wurde nach einer Behandlung mit Ceramid-angereicherten EV (s. 3.6). Die Ergebnisse zeigen, dass Ceramid-angereicherte EV in EV Zielzellen die Apoptose induzieren können. Wang et al. (2012) konnten im 5XFAD Mausmodell ebenfalls nachweisen, dass PAR-4/C18-Ceramid-angereicherte EV von Astrozyten insbesondere nach Aktivierung der nSMase 2 freigesetzt werden und die Apoptose in astrozytären Zielzellen induzieren können.



Anschließend wurden die Auswirkungen einer Inhibition der SMPD3 auf den Ceramid-vermittelten apoptotischen Effekt bei bestehender Glukoseschädigung untersucht. Hierfür wurde die SMPD3 spezifisch mit dem pharmakologischen Inhibitor GW4869 oder mit einem siRNA Knock-down gehemmt und die Lipidzusammensetzung der EV, die Partikelanzahl im NTA und das Apoptoseverhalten von EV Zielzellen analysiert.

Die Beeinflussung der Inhibition auf das Apoptoseverhalten in *in vitro* Versuchen wurde bereits in verschiedenen Studien untersucht. Aflaki et al. (2012) konnten zeigen, dass durch eine Hemmung der Ceramid-Synthase 4, 5 und 6 mit Fumonisin B1 die Anzahl apoptotischer Makrophagen gesenkt werden konnte. Auch die Review-Arbeit von Mullen und Obeid (2012) erklärt, dass eine Inhibition der Ceramidakkumulation während der Apoptose die Zelle vor dem apoptotischen Untergang schützen kann. Wang et al. (2012) konnten im 5XFAD Mausmodell zeigen, dass eine verringerte nSMase 2 Aktivität zu einer verringerten Freisetzung von PAR-4/Ceramid-angereicherten Exosomen und zu einer Reduktion apoptotischer astrozytärer Zielzellen führt. In dieser Arbeit konnte eine signifikante Reduktion frühapoptotischer EV Zielzellen nach einer GW4869 Behandlung, nicht nach einer SMPD3 Knock-down Behandlung nachgewiesen werden (s. 3.9). Zusätzlich wurde überprüft, ob eine Inhibition der SMPD3 bei bestehenden erhöhten Glukosespiegeln einen Einfluss auf das Apoptoseverhalten von EV Zielzellen hat. Um dies zu klären, wurden EV nach Glukoseschädigung und gleichzeitiger SMPD3 Inhibition isoliert und mit EV Zielzellen inkubiert. Im Apoptose-Assay wurde eine signifikante Reduktion der frühapoptotischen EV Zielzellen detektiert (s. 3.9). Daraus lässt sich annehmen, dass eine Inhibition der SMPD3 den proapoptotischen Effekt der Ceramidanreicherung nach Glukoseschädigung aufheben konnte. Eine Inhibition der SMPD3 während einer akuten Hyperglykämie könnte vermutlich weitere EV-vermittelte Endothelschäden und die Progression der Atherogenese vermindern. Weitere *in vivo* Studien konnten nachweisen, dass eine Inhibition der SMPD3 sich positiv auf die Pathogenese der Arteriosklerose auswirkt. Lallemand et al. (2018) und Wu et al. (2021) konnten im Mausmodell (ApoE und Fxr/ApoE) zeigen, dass durch eine Hemmung der SMPD3 mit GW4869 die Ausbildung atherosklerotischer Plaques vermindert wurde. Ebenfalls wies Habibi et al. (2022) im C57BL/6L Mausmodell nach, dass eine GW4869 Inhibition mit einer zusätzlichen Western Diät die Lipidakkumulation, den oxidativen Stress, die Inflammation und Gefäßwandveränderungen in der Aorta reduzieren konnte.

Zusätzlich wurde die Lipidzusammensetzung der EV nach Inhibition der SMPD3 mit GW4869 in der Massenspektrometrie untersucht und es konnte eine signifikante Reduktion der Menge von C16 in EV detektiert werden. Es liegt keine signifikante Reduktion des Gehalts an C16 in HCAEC vor (s. 3.10). In der Studie von Menck et al. (2017) konnte zusätzlich eine Reduktion im Ceramidgehalt in den SKBR3 Zellen nach GW4869 Behandlung bei gleicher Konzentration und Inkubationszeit festgestellt werden. Außerdem wurde ein signifikanter Anstieg des Anteils an Sphingomyelin in EV detektiert, was sich auf einen verminderten Abbau durch die Sphingomyelinasen in Ceramid und Phosphocholin zurückführen lassen könnte (Menck et al., 2017). Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die Inhibition mit GW4869 wirksam gegen den Export von Ceramiden in EV ist. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass eine Inhibition der SMPD3 während einer akuten Hyperglykämie den Export von proapoptischen C16 in EV reduzierte und EV Zielzellen vor dem apoptotischen Untergang geschützt werden konnten.

Da Sphingomyelinasen Einfluss auf die Freisetzung von EV haben, wurde in der NTA die Anzahl der freigesetzten EV nach Glukosebehandlung und Inhibition gemessen (Catalano und O'Driscoll, 2020; Trajkovic et al., 2008). In der Untersuchung konnte nach Induktion der SMPD3 durch eine Glukosebehandlung vermehrt und nach Inhibition der SMPD3 durch einen siRNA Knock-down weniger freigesetzte EV detektiert werden (s. 3.11). Die Ursache der Veränderung in der Partikelanzahl liegt einem komplexen Prozess der EV Freisetzung zugrunde. Zum einen werden MV durch Abschnürung der Zellmembran gebildet; zum anderen werden Exosomen über den ESCRT-Komplex oder Ceramid- und Sphingomyelinasen-abhängig in den extrazellulären Raum freigesetzt (Jansen et al., 2017). Aufgrund der Beeinflussung der SMPD3 Aktivität durch die Glukosebehandlung oder durch die Inhibition mit einem siRNA Knock-down oder mit GW4869 werden Zusammensetzung und Anzahl der freigesetzten EV-Populationen beeinflusst. Menck et al. (2017) in SKBR-3 Zellen und Trajkovic et al. (2008) in Oli-neu Zellen konnten nachweisen, dass eine erhöhte nSMase Aktivität zu einer vermehrten Freisetzung von Exosomen und dass eine Hemmung der nSMase mit GW4869 oder siRNA Knock-down zu einer

verringerten Freisetzung von Exosomen führt, welche bei 100.000 g pelletiert wurden. Zusätzlich konnte Menck et al. (2017) nachweisen, dass nach einer Inhibition mit GW4869 vermehrt MV vorliegen, welche bei 14.000 g pelletiert wurden. Unsere Studienergebnisse sind vergleichbar mit denen von Menck et al. (2017). In unserer Arbeit wurden ebenfalls überwiegend MV nach einer Zentrifugation von 20.000 g untersucht (s. 3.1). Beide Studien detektieren eine Zunahme der MV Freisetzung nach einer Hemmung der SMPD3 – Menck et al. (2017) nach einer Inhibition mittels GW4869, in unsere Arbeit nach einer Inhibition mittels siRNA Knock-down (s. 3.11). Daraus lässt sich schließen, dass eine Inhibition der SMPD3 die Freisetzung von MV steigert und eine Aktivierung der SMPD3 durch eine Glukosebehandlung zu einer Reduktion der MV Freisetzung führt. Hier sind weitere Studien notwendig, um die Pathophysiologie und Interaktionen der Freisetzung von MV und Exosomen und den Einfluss der SMPD3 zu verstehen.

Klinische Studien konnten zeigen, dass vermehrt EV im Plasma von Patienten mit einem DMT2 vorliegen (Feng et al., 2010; Koga et al., 2005; Landers-Ramos et al., 2018; Leroyer et al., 2008). Koga et al. (2005) konnten im Plasma einen erhöhten EV-Anteil endothelialen Ursprungs bei Patienten mit einem DMT2 nach einer Zentrifugation mit 100.000 g nachweisen. Freeman et al. (2018) konnten eine Zunahme der Partikelanzahl im Plasma von Patienten mit einem DMT2 nach einer Isolierung bei einer Zentrifugation von 10.000 g oder 120.000 g detektieren. Aufgrund unterschiedlicher Isolierungstechniken und Analysen der EV in verschiedenen Studien sind weitere Untersuchungen notwendig, um den Einfluss eines DMT2 auf die Freisetzung und die Zusammensetzung von Exosomen, MV und apoptotischen Körperchen sowie auf die Aktivität der SMPD3 zu verstehen.

Zusätzlich sollten weitere Studien zur Untersuchung verschiedener Einflussfaktoren auf die EV Freisetzung und Lipidzusammensetzung, wie Alter, Vorerkrankungen und Medikamenteneinnahme durchgeführt werden. Darüber hinaus zeigen Diamant et al. (2002), dass nur ein kleiner Anteil der EV im Patientenserum von Endothelzellen stammen. In weiteren Untersuchungen sollte der Einfluss von Glukose auf die Aktivität und Expression der SMasen anderer Zellreihen wie Thrombozyten, T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, Granulozyten und Erythrozyten untersucht und der Ceramidgehalt in den freigesetzten EV gemessen werden (Boulanger et al., 2017; de Carvahlo et al., 2018; Feng et al., 2010;

Jansen et al., 2017; Koga et al., 2005; Landers-Ramos et al., 2018). Somit sind weitere Studien nötig, um den komplexen Prozess zwischen einem DMT2, erhöhten Ceramidspiegeln und dem Risiko eine koronare Herzerkrankung zu erleiden, zu verstehen und um weitere Therapieoptionen ableiten zu können.

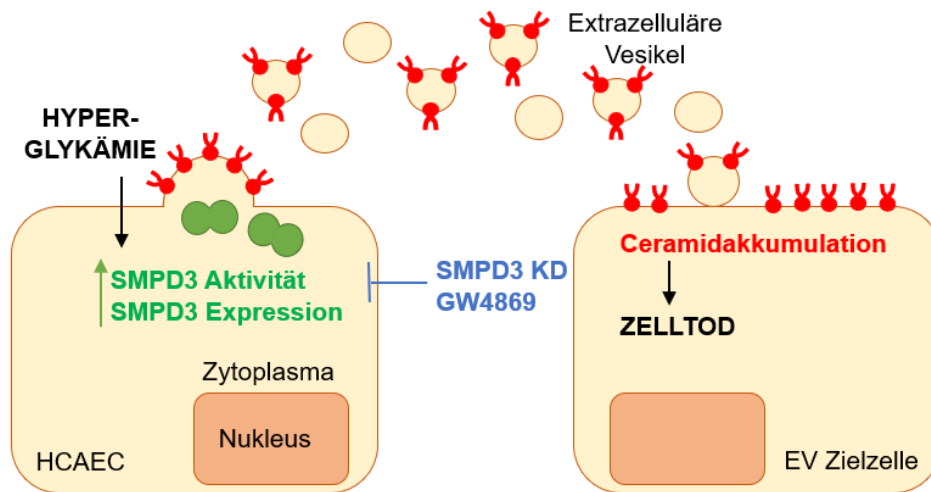
Es werden weitere Experimente benötigt, um die komplexen Prozesse des Ceramidtransportes zwischen den Zellen zu verstehen. Im Vordergrund stehen zum einen weitere Untersuchungen über den Einfluss auf die Apoptose verschiedener Organsysteme durch Ceramide und Sphingomyelinasen, zum anderen die Etablierung neuer Methoden und Analysen im Bereich der EV Forschung.

Da die Apoptose eine entscheidende Rolle in der Zell- und Organhämostase übernimmt, sind weitere Untersuchungen über den Ceramidtransfer und die Aktivität der Sphingomyelinasen aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens entscheidend (Airola und Hannun; 2013; Kerr et al., 1972). Weitere Studien sind notwendig, um den Pathomechanismus von transferierten Ceramiden auf die Progression der Arteriosklerose zu verstehen. Neben kardiovaskulären Erkrankungen werden Ceramide aufgrund ihrer proapoptotischen Wirkung häufig in der Onkologie und in der Neurologie bei Alzheimerpatienten untersucht (Ogretmen und Hannun, 2004; Wang et al., 2012). Auch in anderen Fachbereichen sollte die EV-vermittelte Apoptose *in vitro* und *in vivo* untersucht werden, um ein besseres Verständnis über den Einfluss von EV auf andere Zellreihen zu erhalten. Mögliche Therapien basierend auf einer Hemmung der ubiquitären Sphingomyelinasen müssen aufgrund des Einflusses auf die Zell- und Organhämostase kritisch hinterfragt werden.

Da bei der Isolierung der EV mittels differentieller Zentrifugation verschiedene EV-Isoformen nicht exakt voneinander getrennt werden können, werden durch die verschiedenen Isoformen die Forschungsergebnisse beeinflusst. Aufgrund dessen sollten weitere Methoden zur Isolierung der MV, Exosomen und apoptotischen Körperchen entwickelt werden, um Effekte Isoform-spezifisch nachweisen zu können. Neben der häufig angewendeten differentiellen Zentrifugation gibt es zahlreiche weitere Verfahren zur Vesikelisolation (z. B. Filtration, Chromatographie, Immunaффinität) mit unterschiedlichen Vor- und Nachteilen (Théry et al., 2018). Weitere Untersuchungen über den Mechanismus

der Lipidzusammensetzung von EV sowie die Rolle von Ceramiden und nSMasen in der Biogenese von Exosomen und deren Interaktion auf die Freisetzung von MV sollten durchgeführt werden. Darüber hinaus sollten die Lipidzusammensetzungen und die apoptotischen Effekte ebenfalls in anderen Zellreihen untersucht werden. Die kontinuierliche Weiterentwicklung der Leitlinien zur EV Isolation und EV Analyse ist entscheidend, um eine Vergleichbarkeit unterschiedlicher Studien zu ermöglichen (Théry et al., 2018).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Transfer von C16 mittels EV das endotheliale Zellüberleben beeinflusst und die Progression der Arteriosklerose fördern könnte. Durch erhöhte Glukosespiegel kommt es zur Steigerung der Aktivität und Genexpression der SMPD3 und das proapoptotisch wirkende C16 wird vermehrt mittels EV exportiert. Durch die Aufnahme des C16 in die EV Zielzellen wird die Apoptose induziert und Endothelschäden können entstehen. Eine Inhibition der SMPD3 mit GW4869 oder siRNA Knock-down verhindert den vermehrten Export des C16 während einer Glukose-schädigung und schützt die EV Zielzelle vor dem apoptotischen Untergang. Eine Hemmung der SMPD3 könnte ein neuer Ansatz zur Verbesserung der Diabetes Mellitus Therapie darstellen und die Progression atherosklerotischer Plaques reduzieren. Die Durchführungen weiterer *in vitro* sowie *in vivo* Experimente sind entscheidend, um den komplexen Prozess aus erhöhten Glukosespiegeln, SMPD3-Aktivität, Lipidzusammensetzung und Freisetzung der EV zu verstehen und den Einfluss auf EV Zielzellen zu analysieren (s. Abb. 20).



**Abb. 19:** Zusammenfassung der Forschungsergebnisse: Hyperglykämien lösen in HCAEC eine vermehrte SMPD3 Aktivität und Genexpression aus, wodurch vermehrt proapoptisches C16 in EV eingebaut wird. EV Zielzellen nehmen die mit C16-angereicherten EV auf, es kommt zur Induktion der Apoptose und die EV Zielzelle geht zugrunde.

## 5. Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind eine der häufigsten Todesursachen weltweit (World Health Organization, 2017). Pathomechanistisch liegt diesen eine Verengung arterieller Gefäße durch Ausbildung atherosklerotischer Plaques zugrunde (Lusis, 2000). Im Fokus der aktuellen Forschung stehen extrazelluläre Vesikel (EV), welche einen bedeutenden Einfluss auf die Zell- und Organhomöostase haben. Aufgrund des interzellulären Austausches von bioaktiven Molekülen zwischen Endothelzellen wird Einfluss auf die Endothelfunktion und die Ausbildung atherosklerotischer Plaques genommen (Jansen et al., 2017). Insbesondere das proapoptotisch wirkende Sphingolipid d18:1 16:0 Ceramid (C16) liegt vermehrt im Serum von Patienten mit einem Diabetes Mellitus Typ 2 (DMT2) vor und birgt ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko (Boon et al., 2013; de Carvahlo et al., 2018).

In diesem Kontext sollte die Arbeit der Frage nachgehen, inwiefern ein erhöhter Glukosespiegel einen Einfluss auf die Zusammensetzung von Sphingolipiden in extrazellulären Vesikeln hat und welche Auswirkungen diese auf ihre EV Zielzellen haben. Hierbei handelt es sich um eine präklinische Grundlagenforschung mit Zellexperimenten (HCAEC), deren Resultate zur weiteren Forschung für Tiermodelle und folgende klinische Studien mit Patienten dienen sollen.

Die Ergebnisse der Arbeit liefern neue Erkenntnisse zum Transfer von Ceramiden mittels extrazellulärer Vesikel sowie zu deren pathophysiologischer Bedeutung im Rahmen der Arteriosklerose. Ein erhöhter Glukosespiegel, welcher bei DMT2 auftreten kann, fördert in humanen koronararteriellen Endothelzellen (HCAEC) den Export des proapoptotisch wirkenden C16 in extrazellulären Vesikeln durch eine Aktivierung der neutralen Sphingomyelinase 2 (nSMase 2). Nach Aufnahme des transferierten C16 in die EV Zielzellen kommt es zur Induktion der Apoptose. Der daraus entstandene Endothelschaden kann die Ausbildung oder Progression atherosklerotischer Plaques weiter fördern. Unter Inhibition der nSMase 2 Aktivität mittels siRNA-Knock-down oder eines pharmakologischen Inhibitors GW4869 konnte trotz erhöhter Glukosespiegel der Export von C16 reduziert und die EV Zielzellen vor dem apoptotischen Untergang geschützt werden. Die Inhibition der nSMase 2 könnte somit der Entstehung und

Progression von Endothelläsionen vorbeugen und stellt somit einen Ansatzpunkt zur weiteren Forschung zur Prävention und Therapie der Arteriosklerose spezifisch bei Diabetikern dar.



## 6. Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Einfluss von apoptotischen Zellen auf die Pathogenese der Arteriosklerose ....	12
<b>Abb. 2:</b> Molekülstruktur eines C16 Ceramids .....	15
<b>Abb. 3:</b> Ceramid-Stoffwechselweg. ....	16
<b>Abb. 4:</b> Abbau von Sphingomyelin durch Sphingomyelinasen in Ceramid und Phosphocholin.....	17
<b>Abb. 5:</b> Die Rolle von nSMasen in der Arteriosklerose .....	19
<b>Abb. 6:</b> Protokoll der EV-Isolation.....	27
<b>Abb. 7:</b> Gating Strategie und Auswertung. ....	35
<b>Abb. 8:</b> EV Charakterisierung in der NTA und im Elektronenmikroskop .....	41
<b>Abb. 9:</b> C16 Anreicherung in EV nach Hyperglykämie .....	43
<b>Abb. 10:</b> Steigerung der SMPD3 Genexpression und nSMase Aktivität nach einer Hyperglykämie .....	45
<b>Abb. 11:</b> Sinkende Zellviabilität und steigende Anzahl frühapoptotischer Zellen von HCAEC und EV Zielzellen nach Hyperglykämie .....	47
<b>Abb. 12:</b> Exogenes Ceramid wird von HCAEC aufgenommen, in EV verpackt und an EV Zielzellen transferiert .....	50
<b>Abb. 13:</b> Sinkende Zellviabilität und steigende Anzahl frühapoptotischer Zellen von HCAEC und EV Zielzellen nach C16 Stimulation.....	52
<b>Abb. 14:</b> Reduktion der SMPD3 Genexpression nach SMPD3 siRNA Knock-down (KD) Behandlung.....	53
<b>Abb. 15:</b> SMPD3 Knock-down und pharmakologische Inhibition mit GW4869 haben keinen Einfluss auf die Apoptose von HCAEC .....	54
<b>Abb. 16:</b> Hemmung der SMPD3 mit siRNA Knock-down (KD) oder mit GW4869 können den EV-vermittelten apoptotischen Effekt nach einer Glukosestimulation in EV Zielzellen verhindern .....	56
<b>Abb. 17:</b> Verringerte C16 Konzentration in EV nach pharmakologischer Inhibition mit GW4869.....	57
<b>Abb. 18:</b> Verringerung der Partikelanzahl nach Glukoseschädigung, Erhöhung der Partikelanzahl nach SMPD3 Knock-down (KD) .....	59

**Abb. 19:** Zusammenfassung der Forschungsergebnisse ..... 70

## 7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Klassifikation der EV Typen .....	14
Tab. 2: Geräteliste.....	21
Tab. 3: Software.....	22
Tab. 4: Verbrauchsmaterial .....	22
Tab. 5: Zellkulturmaterial.....	23
Tab. 6: Reagenzien.....	24

## 8. Literaturverzeichnis

Abels ER, Breakefield XO. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol* 2016; 36: 301–312

Aflaki E, Doddapattar P, Radović B, Povoden S, Kolb D, Vujić N, Wegscheider M, Koefeler H, Hornemann T, Graier WF, Malli R, Madeo F, Kratky D. C16 ceramide is crucial for triacylglycerol-induced apoptosis in macrophages. *Cell Death Dis* 2012; 3: e280

Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 2007 a; 100: 158–173

Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res* 2007 b; 100: 174–190

Airola MV, Hannun YA. Sphingolipid metabolism and neutral sphingomyelinases. *Handb Exp Pharmacol* 2013; (215): 57–76

Assmann G, Schulte H. The Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) study: Prevalence of hyperlipidemia in persons with hypertension and/or diabetes mellitus and the relationship to coronary heart disease. *Am Heart J* 1988; 116: 1713–1724

Back MJ, Ha HC, Fu Z, Choi JM, Piao Y, Won JH, Jang JM, Shin IC, Kim DK. Activation of neutral sphingomyelinase 2 by starvation induces cell-protective autophagy via an increase in Golgi-localized ceramide. *Cell Death Dis* 2018; 9: 670

Basatemur GL, Jørgensen HF, Clarke MCH, Bennett MR, Mallat Z. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* 2019; 16: 727–744

Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Das SR, Delling FN, Djousse L, Elkind MSV,

Ferguson JF, Fornage M, Jordan LC, Khan SS, Kissela BM, Knutson KL, Kwan TW, Lackland DT, Lewis TT, Lichtman JH, Longenecker CT, Loop MS, Lutsey PL, Martin SS, Matsushita K, Moran AE, Mussolino ME, O'Flaherty M, Pandey A, Perak AM, Rosamond WD, Roth GA, Sampson UKA, Satou GM, Schroeder EB, Shah SH, Spartano NL, Stokes A, Tirschwell DL, Tsao CW, Turakhia MP, VanWagner LB, Wilkins JT, Wong SS, Virani SS. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2019; 139: e56-e528

Berda-Haddad Y, Robert S, Salers P, Zekraoui L, Farnarier C, Dinarello CA, Dignat-George F, Kaplanski G. Sterile inflammation of endothelial cell-derived apoptotic bodies is mediated by interleukin-1 $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 20684–20689

Boon J, Hoy AJ, Stark R, Brown RD, Meex RC, Henstridge DC, Schenk S, Meikle PJ, Horowitz JF, Kingwell BA, Bruce CR, Watt MJ. Ceramides contained in LDL are elevated in type 2. *Diabetes* 2013; 62: 401–410

Boulangier CM, Loyer X, Rautou P-E, Amabile N. Extracellular vesicles in coronary artery disease. *Nat Rev Cardiol* 2017; 14: 259–272

Burrello J, Biemmi V, Dei Cas M, Amongero M, Bolis S, Lazzarini E, Bollini S, Vassalli G, Paroni R, Barile L. Sphingolipid composition of circulating extracellular vesicles after myocardial ischemia. *Sci rep* 2020; 10: 16182

Canals D, Salamone S, Hannun YA. Visualizing bioactive ceramides. *Chem Phys Lipids* 2018; 216: 142–151

Catalano M, O'Driscoll L. Inhibiting extracellular vesicles formation and release: a review of EV inhibitors. *J Extracell Vesicles* 2020; 9: 1703244

Cheng JM, Suoniemi M, Kardys I, Vihervaara T, Boer SPM de, Akkerhuis KM, Sysi-Aho M, Ekroos K, Garcia-Garcia HM, Oemrawsingh RM, Regar E, Koenig W, Serruys PW, van Geuns R-J, Boersma E, Laaksonen R. Plasma concentrations of molecular lipid species

in relation to coronary plaque characteristics and cardiovascular outcome: Results of the ATHEROREMO-IVUS study. *Atherosclerosis* 2015; 243: 560–566

Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Extracellular vesicles and atherosclerotic disease. *Cell Mol Life Sci* 2015; 72: 2697–2708

Clarke CJ, Hannun YA. Neutral sphingomyelinases and nSMase 2: bridging the gaps. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758: 1893–1901

Cyr AR, Huckaby LV, Shiva SS, Zuckerbraun BS. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Crit Care Clin* 2020; 36: 307–321

Czarny M, Schnitzer JE. Neutral sphingomyelinase inhibitor scyphostatin prevents and ceramide mimics mechanotransduction in vascular endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: H1344-52

D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int* 2019; 43: 582–592

Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 1997; 27: 1–20

Davidson SM, Boulanger CM, Aikawa E, Badimon L, Barile L, Binder CJ, Brisson A, Buzas E, Emanuelli C, Jansen F, Katsur M, Lacroix R, Lim SK, Mackman N, Mayr M, Menasché P, Nieuwland R, Sahoo S, Takov K, Thum T, Vader P, Wauben MHM, Witwer K, Sluijter JPG. Methods for the identification and characterization of extracellular vesicles in cardiovascular studies - from exosomes to microvesicles. *Cardiovasc Res* 2022; 24: cvac031

De Carvalho LP, Tan SH, Ow G-S, Tang Z, Ching J, Kovalik J-P, Poh SC, Chin C-T, Richards AM, Martinez EC, Troughton RW, Fong AY-Y, Yan BP, Seneviratna A, Sorokin

V, Summers SA, Kuznetsov VA, Chan MY. Plasma Ceramides as Prognostic Biomarkers and Their Arterial and Myocardial Tissue Correlates in Acute Myocardial Infarction. *JACC Basic Transl Sci* 2018; 3: 163–175

De Palma C, Meacci E, Perrotta C, Bruni P, Clementi E. Endothelial nitric oxide synthase activation by tumor necrosis factor alpha through neutral sphingomyelinase 2, sphingosine kinase 1, and sphingosine 1 phosphate receptors: a novel pathway relevant to the pathophysiology of endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 99–105

Detaille D, Guigas B, Chauvin C, Batandier C, Fontaine E, Wiernsperger N, Leverve X. Metformin prevents high-glucose-induced endothelial cell death through a mitochondrial permeability transition-dependent process. *Diabetes* 2005; 54: 2179–2187

Diamant M, Nieuwland R, Pablo RF, Sturk A, Smit JWA, Radder JK. Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2002; 106: 2442–2447

Dotson PP, Karakashian AA, Nikolova-Karakashian MN. Neutral sphingomyelinase-2 is a redox sensitive enzyme: role of catalytic cysteine residues in regulation of enzymatic activity through changes in oligomeric state. *Biochem J* 2015; 465: 371–382

Duan H, Zhang Q, Liu J, Li R, Wang D, Peng W, Wu C. Suppression of apoptosis in vascular endothelial cell, the promising way for natural medicines to treat atherosclerosis. *Pharmacol Res* 2021; 168: 105599

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495–516

Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: C7-12

Fayfman M, Pasquel FJ, Umpierrez GE. Management of Hyperglycemic Crises: Diabetic Ketoacidosis and Hyperglycemic Hyperosmolar State. *Med Clin North Am* 2017; 101: 587–606

Feng B, Chen Y, Luo Y, Chen M, Li X, Ni Y. Circulating level of microparticles and their correlation with arterial elasticity and endothelium-dependent dilation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 2010; 208: 264–269

Freed JK, Beyer AM, LoGiudice JA, Hockenberry JC, Gutterman DD. Ceramide changes the mediator of flow-induced vasodilation from nitric oxide to hydrogen peroxide in the human microcirculation. *Circ. Res.* 2014; 115: 525–532

Freeman DW, Noren Hooten N, Eitan E, Green J, Mode NA, Bodogai M, Zhang Y, Lehrmann E, Zonderman AB, Biragyn A, Egan J, Becker KG, Mattson MP, Ejiogu N, Evans MK. Altered Extracellular Vesicle Concentration, Cargo, and Function in Diabetes. *Diabetes* 2018; 67: 2377–2388

Gimbrone MA, García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res* 2016; 118: 620–636

Habibi J, DeMarco VG, Hulse JL, Hayden MR, Whaley-Connell A, Hill MA, Sowers JR, Jia G. Inhibition of sphingomyelinase attenuates diet - Induced increases in aortic stiffness. *J Mol Cell Cardiol* 2022; 167: 32–39

Hannun YA, Obeid LM. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; 19: 175–191

Havulinna AS, Sysi-Aho M, Hilvo M, Kauhanen D, Hurme R, Ekroos K, Salomaa V, Laaksonen R. Circulating Ceramides Predict Cardiovascular Outcomes in the Population-Based FINRISK 2002 Cohort. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016; 36: 2424–2430



Hergenreider E, Heydt S, Tréguer K, Boettger T, Horrevoets AJG, Zeiher AM, Scheffer MP, Frangakis AS, Yin X, Mayr M, Braun T, Urbich C, Boon RA, Dimmeler S. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat Cell Biol* 2012; 14: 249–256

Hilvo M, Vasile VC, Donato LJ, Hurme R, Laaksonen R. Ceramides and Ceramide Scores: Clinical Applications for Cardiometabolic Risk Stratification. *Front Endocrinol* 2020; 11: 570628

Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 2005; 6: 279–284

Hurt-Camejo E, Andersen S, Standal R, Rosengren B, Sartipy P, Stadberg E, Johansen B. Localization of nonpancreatic secretory phospholipase A2 in normal and atherosclerotic arteries. Activity of the isolated enzyme on low-density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 300–309

Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 277–288

Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol* 2018; 100: 1–19

Jansen F, Li Q, Pfeifer A, Werner N. Endothelial- and Immune Cell-Derived Extracellular Vesicles in the Regulation of Cardiovascular Health and Disease. *JACC Basic Transl Sci* 2017; 2: 790–807

Jansen F, Yang X, Baumann K, Przybilla D, Schmitz T, Flender A, Paul K, Alhusseiny A, Nickenig G, Werner N. Endothelial microparticles reduce ICAM-1 expression in a microRNA-222-dependent mechanism. *J Cell Mol Med* 2015; 19: 2202–2214

Jansen F, Yang X, Hoelscher M, Cattelan A, Schmitz T, Proebsting S, Wenzel D, Vosen S, Franklin BS, Fleischmann BK, Nickenig G, Werner N. Endothelial microparticle-mediated transfer of MicroRNA-126 promotes vascular endothelial cell repair via SPRED1 and is abrogated in glucose-damaged endothelial microparticles. *Circulation* 2013; 128: 2026–2038

Juo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol* 1998; 8: 1001–1008

Kady N, Yan Y, Salazar T, Wang Q, Chakravarthy H, Huang C, Beli E, Navitskaya S, Grant M, Busik J. Increase in acid sphingomyelinase level in human retinal endothelial cells and CD34+ circulating angiogenic cells isolated from diabetic individuals is associated with dysfunctional retinal vasculature and vascular repair process in diabetes. *J Clin Lipidol* 2017; 11: 694–703

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239–257

Kjellberg MA, Lönnfors M, Slotte JP, Mattjus P. Metabolic Conversion of Ceramides in HeLa Cells - A Cholesteryl Phosphocholine Delivery Approach. *PLoS One* 2015; 10: e0143385

Koga H, Sugiyama S, Kugiyama K, Watanabe K, Fukushima H, Tanaka T, Sakamoto T, Yoshimura M, Jinnouchi H, Ogawa H. Elevated levels of VE-cadherin-positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1622–1630

Korbecki J, Bajdak-Rusinek K. The effect of palmitic acid on inflammatory response in macrophages: an overview of molecular mechanisms. *Inflamm Res* 2019; 68: 915–932

Kreimer S, Belov AM, Ghiran I, Murthy SK, Frank DA, Ivanov AR. Mass-spectrometry-based molecular characterization of extracellular vesicles: lipidomics and proteomics. *J Proteome Res* 2015; 14: 2367–2384

Laaksonen R, Ekroos K, Sysi-Aho M, Hilvo M, Vihervaara T, Kauhanen D, Suoniemi M, Hurme R, März W, Scharnagl H, Stojakovic T, Vlachopoulou E, Lokki M-L, Nieminen MS, Klingenberg R, Matter CM, Hornemann T, Jüni P, Rodondi N, Räber L, Windecker S, Gencer B, Pedersen ER, Tell GS, Nygård O, Mach F, Sinisalo J, Lüscher TF. Plasma ceramides predict cardiovascular death in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes beyond LDL-cholesterol. *Eur Heart J* 2016; 37: 1967–1976

Lallemant T, Rouahi M, Swiader A, Grazide M-H, Geoffre N, Alayrac P, Recazens E, Coste A, Salvayre R, Nègre-Salvayre A, Augé N. nSMase 2 (Type 2-Neutral Sphingomyelinase) Deficiency or Inhibition by GW4869 Reduces Inflammation and Atherosclerosis in Apoe<sup>-/-</sup> Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2018; 38: 1479–1492

Landers-Ramos RQ, Serra MC, Blumenthal JB, Ryan AS, Hafer-Macko CE, Prior SJ. Type 2 diabetes and older age contribute to elevated plasma microparticle concentrations independent of chronic stroke. *Exp Psychol* 2018; 103: 1560–1570

Lawson C, Vicencio JM, Yellon DM, Davidson SM. Microvesicles and exosomes: new players in metabolic and cardiovascular disease. *J Endocrinol* 2016; 228: R57-71

Leake DS, Rankin SM, Collard J. Macrophage proteases can modify low density lipoproteins to increase their uptake by macrophages. *FEBS Lett* 1990; 269: 209–212

Leroyer AS, Tedgui A, Boulanger CM. Microparticles and type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 2008; 34: 27–32

Li J, Lee Y, Johansson HJ, Mäger I, Vader P, Nordin JZ, Wiklander OPB, Lehtiö J, Wood MJA, Andaloussi SE. Serum-free culture alters the quantity and protein composition of neuroblastoma-derived extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 2015; 4: 26883

Li Q, Wang X, Pang J, Zhang Y, Zhang H, Xu Z, Chen Q, Ling W. Associations between plasma ceramides and mortality in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2020; 314: 77–83

Li W, Yang X, Xing S, Bian F, Yao W, Bai X, Zheng T, Wu G, Jin S. Endogenous ceramide contributes to the transcytosis of oxLDL across endothelial cells and promotes its subendothelial retention in vascular wall. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 2014: 823071

Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, Tokgözoğlu L, Lewis EF. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers* 2019; 5: 56

Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011; 473: 317–325

Liu ZZ, Jose PA, Yang J, Zeng C. Importance of extracellular vesicles in hypertension. *Exp Biol Med (Maywood)* 2021; 246: 342–353

Llorente A, Skotland T, Sylvänne T, Kauhanen D, Róg T, Orłowski A, Vattulainen I, Ekroos K, Sandvig K. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1831: 1302–1309

Lössl P, van de Waterbeemd M, Heck A, JR. The diverse and expanding role of mass spectrometry in structural and molecular biology. *EMBO J* 2016; 35: 2634–2657

Luberto C, Hassler DF, Signorelli P, Okamoto Y, Sawai H, Boros E, Hazen-Martin DJ, Obeid LM, Hannun YA, Smith GK. Inhibition of tumor necrosis factor-induced cell death in MCF7 by a novel inhibitor of neutral sphingomyelinase. *J Biol Chem* 2002; 277: 41128–41139

Luo Y, Lei M.  $\alpha$ -Mangostin protects against high-glucose induced apoptosis of human umbilical vein endothelial cells. *Biosci Rep* 2017; 37: BSR20170779

Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407: 233–241

Makiyama T, Nakamura H, Nagasaka N, Yamashita H, Honda T, Yamaguchi N, Nishida A, Murayama T. Trafficking of Acetyl-C16-Ceramide-NBD with Long-Term Stability and No Cytotoxicity into the Golgi Complex. *Traffic* 2015; 16: 476–492

Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, Théry C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol* 2019; 21: 9–17

McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5: a008656

Menck K, Sönmezer C, Worst TS, Schulz M, Dihazi GH, Streit F, Erdmann G, Kling S, Boutros M, Binder C, Gross JC. Neutral sphingomyelinases control extracellular vesicles budding from the plasma membrane. *J Extracell Vesicles* 2017; 6: 1378056

Metzstein MM, Stanfield GM, Horvitz H. Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends Genet* 1998; 14: 410–416

Momen-Heravi F, Balaj L, Alian S, Trachtenberg AJ, Hochberg FH, Skog J, Kuo WP. Impact of biofluid viscosity on size and sedimentation efficiency of the isolated microvesicles. *Front Physiol* 2012; 3: 162

Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* 2014; 3: 24641

Mullen TD, Obeid LM. Ceramide and apoptosis: exploring the enigmatic connections between sphingolipid metabolism and programmed cell death. *Anticancer Agents Med Chem* 2012; 12: 340–363

Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1997; 100: 2680–2690

Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta* 2015; 439: 231-250

Njock M-S, Cheng HS, Dang LT, Nazari-Jahantigh M, Lau AC, Boudreau E, Roufaiel M, Cybulsky MI, Schober A, Fish JE. Endothelial cells suppress monocyte activation through secretion of extracellular vesicles containing antiinflammatory microRNAs. *Blood* 2015; 125: 3202–3212

Noren Hooten N, Evans MK. Extracellular vesicles as signaling mediators in type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Cell Physiol* 2020; 318: C1189-C1199

Obeid LM, Linardic CM, Karolak LA, Hannun YA. Programmed cell death induced by ceramide. *Science* 1993; 259: 1769–1771

Ogretmen B, Hannun YA. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 604–616

Pan B-T, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. *Cell* 1983; 33: 967–978

Paone S, Baxter AA, Hulett MD, Poon IKH. Endothelial cell apoptosis and the role of endothelial cell-derived extracellular vesicles in the progression of atherosclerosis. *Cell Mol Life Sci* 2019; 76: 1093–1106

Pavoine C, Pecker F. Sphingomyelinases: their regulation and roles in cardiovascular pathophysiology. *Cardiovasc Res* 2009; 82: 175–183

Peterson LR, Xanthakis V, Duncan MS, Gross S, Friedrich N, Völzke H, Felix SB, Jiang H, Sidhu R, Nauck M, Jiang X, Ory DS, Dörr M, Vasan RS, Schaffer JE. Ceramide Remodeling and Risk of Cardiovascular Events and Mortality. *J Am Heart Assoc* 2018; 7: e007931

Pettus BJ, Chalfant CE, Hannun YA. Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2002; 1585: 114–125

Pols MS, Klumperman J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp Cell Res* 2009; 315: 1584–1592

Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013; 200: 373–383

Record M, Silvente-Poirot S, Poirot M, Wakelam MJO. Extracellular vesicles: lipids as key components of their biogenesis and functions. *J Lipid Res* 2018; 59: 1316–1324

Rego A, Trindade D, Chaves SR, Manon S, Costa V, Sousa MJ, Côte-Real M. The yeast model system as a tool towards the understanding of apoptosis regulation by sphingolipids. *FEMS Yeast Res* 2014; 14: 160–178

Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med* 1976; 295: 369–377

Schaftenaar F, Frodermann V, Kuiper J, Lutgens E. Atherosclerosis: the interplay between lipids and immune cells. *Curr Opin Lipidol* 2016; 27: 209–215

Shabbits JA, Mayer LD. Intracellular delivery of ceramide lipids via liposomes enhances apoptosis in vitro. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2003; 1612: 98–106

Sheu ML, Ho FM, Yang RS, Chao KF, Lin WW, Lin-Shiau SY, Liu S-H. High glucose induces human endothelial cell apoptosis through a phosphoinositide 3-kinase-regulated cyclooxygenase-2 pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 2005. 25: 539–545

Shevchenko A, Simons K. Lipidomics: coming to grips with lipid diversity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11: 593–598

Shu H, Peng Y, Hang W, Li N, Zhou N, Wang DW. Emerging Roles of Ceramide in Cardiovascular Diseases. *Aging Dis* 2022; 13: 232–245

Singh RK, Haka AS, Brumfield A, Grosheva I, Bhardwaj P, Chin HF, Xiong Y, Hla T, Maxfield FR. Ceramide activation of RhoA/Rho kinase impairs actin polymerization during aggregated LDL catabolism. *J Lipid Res* 2017; 58: 1977–1987

Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019; 20: 175–193

Skotland T, Sandvig K, Llorente A. Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Prog Lipid Res* 2017; 66: 30–41

Souilhol C, Serbanovic-Canic J, Fragiadaki M, Chico TJ, Ridger V, Roddie H, Evans PC. Endothelial responses to shear stress in atherosclerosis: a novel role for developmental genes. *Nat Rev Cardiol* 2020; 17: 52–63

Stiban J, Perera M. Very long chain ceramides interfere with C16-ceramide-induced channel formation: A plausible mechanism for regulating the initiation of intrinsic apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1848: 561–567

Stith JL, Velazquez FN, Obeid LM. Advances in determining signaling mechanisms of ceramide and role in disease. *J Lipid Res* 2019; 60: 913–918



Summers SA. Could Ceramides Become the New Cholesterol? *Cell Metab* 2018; 27: 276–280

Szatanek R, Baj-Krzyworzeka M, Zimoch J, Lekka M, Siedlar M, Baran J. The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 1153

Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 231–241

Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK, Ayre DC, Bach J-M, Bachurski D, Baharvand H, Balaj L, Baldacchino S, Bauer NN, Baxter AA, Bebawy M, Beckham C, Bedina Zavec A, Benmoussa A, Berardi AC, Bergese P, Bielska E, Blenkiron C, Bobis-Wozowicz S, Boilard E, Boireau W, Bongiovanni A, Borràs FE, Bosch S, Boulanger CM, Breakefield X, Breglio AM, Brennan MÁ, Brigstock DR, Brisson A, Broekman ML, Bromberg JF, Bryl-Górecka P, Buch S, Buck AH, Burger D, Busatto S, Buschmann D, Bussolati B, Buzás EI, Byrd JB, Camussi G, Carter DR, Caruso S, Chamley LW, Chang Y-T, Chen C, Chen S, Cheng L, Chin AR, Clayton A, Clerici SP, Cocks A, Cocucci E, Coffey RJ, Cordeiro-da-Silva A, Couch Y, Coumans FA, Coyle B, Crescitelli R, Criado MF, D'Souza-Schorey C, Das S, Datta Chaudhuri A, Candia P de, Santana EF de, Wever O de, Del Portillo HA, Demaret T, Deville S, Devitt A, Dhondt B, Di Vizio D, Dieterich LC, Dolo V, Dominguez Rubio AP, Dominici M, Dourado MR, Driedonks TA, Duarte FV, Duncan HM, Eichenberger RM, Ekström K, El Andaloussi S, Elie-Caille C, Erdbrügger U, Falcón-Pérez JM, Fatima F, Fish JE, Flores-Bellver M, Försonits A, Frelet-Barrand A, Fricke F, Fuhrmann G, Gabrielsson S, Gámez-Valero A, Gardiner C, Gärtner K, Gaudin R, Gho YS, Giebel B, Gilbert C, Gimona M, Giusti I, Goberdhan DC, Görgens A, Gorski SM, Greening DW, Gross JC, Gualerzi A, Gupta GN, Gustafson D, Handberg A, Haraszti RA, Harrison P, Hegyesi H, an Hendrix, Hill AF, Hochberg FH, Hoffmann KF, Holder B, Holthofer H, Hosseinkhani B, Hu G, Huang Y, Huber V, Hunt S, Ibrahim AG-E, Ikezu T, Inal JM, Isin M, Ivanova A, Jackson HK, Jacobsen S, Jay SM, Jayachandran M, Jenster G, Jiang L, Johnson SM, Jones JC, Jong A, Jovanovic-Talisman T, Jung S, Kalluri R, Kano S-I, Kaur S, Kawamura Y, Keller ET, Khamari D, Khomyakova E, Khvorova A, Kierulf P, Kim KP, Kislinger T,

Klingeborn M, Klinke DJ, Kornek M, Kosanović MM, Kovács ÁF, Krämer-Albers E-M, Krasemann S, Krause M, Kurochkin IV, Kusuma GD, Kuypers S, Laitinen S, Langevin SM, Languino LR, Lannigan J, Lässer C, Laurent LC, Lavieu G, Lázaro-Ibáñez E, Le Lay S, Lee M-S, Lee YXF, Lemos DS, Lenassi M, Leszczynska A, Li IT, Liao K, Libregts SF, Ligeti E, Lim R, Lim SK, Linē A, Linnemannstöns K, Llorente A, Lombard CA, Lorenowicz MJ, Lőrincz ÁM, Lötvall J, Lovett J, Lowry MC, Loyer X, Lu Q, Lukomska B, Lunavat TR, Maas SL, Malhi H, Marcilla A, Mariani J, Mariscal J, Martens-Uzunova ES, Martin-Jaular L, Martinez MC, Martins VR, Mathieu M, Mathivanan S, Maugeri M, McGinnis LK, McVey MJ, Meckes DG, Meehan KL, Mertens I, Minciacchi VR, Möller A, Møller Jørgensen M, Morales-Kastresana A, Morhayim J, Mullier F, Muraca M, Musante L, Mussack V, Muth DC, Myburgh KH, Najrana T, Nawaz M, Nazarenko I, Nejsun P, Neri C, Neri T, Nieuwland R, Nimrichter L, Nolan JP, Nolte-'t Hoen EN, Noren Hooten N, O'Driscoll L, O'Grady T, O'Loghlen A, Ochiya T, Olivier M, Ortiz A, Ortiz LA, Osteikoetxea X, Østergaard O, Ostrowski M, Park J, Pegtel DM, Peinado H, Perut F, Pfaffl MW, Phinney DG, Pieters BC, Pink RC, Pisetsky DS, Pogge von Strandmann E, Polakovicova I, Poon IK, Powell BH, Prada I, Pulliam L, Quesenberry P, Radeghieri A, Raffai RL, Raimondo S, Rak J, Ramirez MI, Raposo G, Rayyan MS, Regev-Rudzki N, Ricklefs FL, Robbins PD, Roberts DD, Rodrigues SC, Rohde E, Rome S, Rouschop KM, Rughetti A, Russell AE, Saá P, Sahoo S, Salas-Huenuleo E, Sánchez C, Saugstad JA, Saul MJ, Schiffelers RM, Schneider R, Schøyen TH, Scott A, Shahaj E, Sharma S, Shatnyeva O, Shekari F, Shelke GV, Shetty AK, Shiba K, Siljander PR-M, Silva AM, Skowronek A, Snyder OL, Soares RP, Sódar BW, Soekmadji C, Sotillo J, Stahl PD, Stoorvogel W, Stott SL, Strasser EF, Swift S, Tahara H, Tewari M, Timms K, Tiwari S, Tixeira R, Tkach M, Toh WS, Tomasini R, Torrecilhas AC, Tosar JP, Toxavidis V, Urbanelli L, Vader P, van Balkom BW, van der Grein SG, van Deun J, van Herwijnen MJ, van Keuren-Jensen K, van Niel G, van Royen ME, van Wijnen AJ, Vasconcelos MH, Vechetti IJ, Veit TD, Vella LJ, Velot É, Verweij FJ, Vestad B, Viñas JL, Visnovitz T, Vukman KV, Wahlgren J, Watson DC, Wauben MH, Weaver A, Webber JP, Weber V, Wehman AM, Weiss DJ, Welsh JA, Wendt S, Wheelock AM, Wiener Z, Witte L, Wolfram J, Xagorari A, Xander P, Xu J, Yan X, Yáñez-Mó M, Yin H, Yuana Y, Zappulli V, Zarubova J, Žėkas V, Zhang J-Y, Zhao Z, Zheng L, Zheutlin AR, Zickler AM, Zimmermann P, Zivkovic AM, Zocco D, Zuba-Surma EK. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for

Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 2018; 7: 1535750

Timmis A, Townsend N, Gale CP, Torbica A, Lettino M, Petersen SE, Mossialos EA, Maggioni AP, Kazakiewicz D, May HT, Smedt D de, Flather M, Zuhlke L, Beltrame JF, Huculeci R, Tavazzi L, Hindricks G, Bax J, Casadei B, Achenbach S, Wright L, Vardas P. European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2019. *Eur Heart J* 2020; 41: 12–85

Todorova D, Simoncini S, Lacroix R, Sabatier F, Dignat-George F. Extracellular Vesicles in Angiogenesis. *Circ Res* 2017; 120: 1658–1673

Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, Schwille P, Brügger B, Simons M. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 2008; 319: 1244–1247

van Niel G, Carter DRF, Clayton A, Lambert DW, Raposo G, Vader P. Challenges and directions in studying cell-cell communication by extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2022; 23: 369–382

van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; 19: 213–228

Verderio C, Gabrielli M, Giussani P. Role of sphingolipids in the biogenesis and biological activity of extracellular vesicles. *J Lipid Res* 2018; 59: 1325–1340

Vion A-C, Ramkhelawon B, Loyer X, Chironi G, Devue C, Loirand G, Tedgui A, Lehoux S, Boulanger CM. Shear stress regulates endothelial microparticle release. *Circ Res* 2013; 112: 1323–1333

Vit J-P, Rosselli F. Role of the ceramide-signaling pathways in ionizing radiation-induced apoptosis. *Oncogene* 2003; 22: 8645–8652

Wang G, Dinkins M, He Q, Zhu G, Poirier C, Campbell A, Mayer-Proschel M, Bieberich E. Astrocytes secrete exosomes enriched with proapoptotic ceramide and prostate apoptosis response 4 (PAR-4): potential mechanism of apoptosis induction in Alzheimer disease (AD). *J Biol Chem* 2012; 287: 21384–21395

Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med* 2011; 17: 1410–1422

Wesselkin NW. Über die Ablagerung von fettartigen Stoffen in den Organen. *Virchows Arch path Anat* 1913; 212: 225–235

Wilkins E, Wilson L, Wickramasinghe K, Bhatnagar P, Leal J, Luengo-Fernandez R, Burns R, Rayner M, Townsend N. *European Cardiovascular Disease Statistics 2017*. European Heart Network, Brussels 2017

Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998; 97: 1837–1847

Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, Nolte-'t Hoen EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J, Théry C, Wauben MH, Hochberg F. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles* 2013; 2:20360

Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991; 88: 1785–1792

Wollert T, Hurley JH. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* 2010; 464: 864–869

World Health Organization, 2021: Fact sheet cardiovascular diseases.  
[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))  
(Zugriffsdatum 18.09.2022)

Wu M-Y, Li C-J, Hou M-F, Chu P-Y. New Insights into the Role of Inflammation in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 2034

Wu Q, Sun L, Hu X, Wang X, Xu F, Chen B, Liang X, Xia J, Wang P, Aibara D, Zhang S, Zeng G, Yun C, Yan Y, Zhu Y, Bustin M, Zhang S, Gonzalez FJ, Jiang C. Suppressing the intestinal farnesoid X receptor/sphingomyelin phosphodiesterase 3 axis decreases atherosclerosis. *J Clin Invest* 2021; 131: e142865

Yin M, Loyer X, Boulanger CM. Extracellular vesicles as new pharmacological targets to treat atherosclerosis. *Eur J Pharmacol* 2015; 763: 90–103

Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, Lai CP. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience* 2015; 65: 783–797

Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, Hristov M, Köppel T, Jahantigh MN, Lutgens E, Wang S, Olson EN, Schober A, Weber C. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal* 2009; 2: ra81

Zhan R, Leng X, Liu X, Wang X, Gong J, Yan L, Wang L, Wang Y, Wang X, Qian L-J. Heat shock protein 70 is secreted from endothelial cells by a non-classical pathway involving exosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 387: 229–233

Zietzer A, Düsing P, Reese L, Nickenig G, Jansen F. Ceramide Metabolism in Cardiovascular Disease: A Network With High Therapeutic Potential. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2022; 42: 1220–1228

Zietzer A, Hosen MR, Wang H, Goody PR, Sylvester M, Latz E, Nickenig G, Werner N, Jansen F. The RNA-binding protein hnRNPU regulates the sorting of microRNA-30c-5p into large extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 2020; 9: 1786967

Zietzer A, Jahnel AL, Bulic M, Gutbrod K, Düsing P, Hosen MR, Dörmann P, Werner N, Nickenig G, Jansen F. Activation of neutral sphingomyelinase 2 through hyperglycemia contributes to endothelial apoptosis via vesicle-bound intercellular transfer of ceramides. *Cell Mol Life Sci* 2021; 79: 48

## 9. Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. Felix Jansen für die Bereitstellung des Forschungsthemas und seinen richtungsweisenden Anregungen.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Andreas Zietzer durch seine exzellente wissenschaftliche Betreuung, stetige Unterstützung und gute Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Georg Nickenig, der in der Kardiologie des Universitätsklinikums Bonn herausragende Forschungsbedingungen geschaffen hat.

Ich danke den Technischen Assistenten in der molekularen Kardiologie des Universitätsklinikums Bonn, allen voran Paula Levermann, Anna Flender und Sarah Arahouan für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Ich danke Frau Katrin Reiners vom Institut für klinische Chemie und klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Bonn für die Bereitstellung und die Anleitung des ZetaView NTA.

Ich danke Herrn Benjamin Krämer der Medizinischen Klinik I, Innere Medizin des Universitätsklinikums Bonn für die Bereitstellung des Durchflusszytometers.

Ich danke Frau Helga Peisker vom Institut für Molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen der Universität Bonn für die Anleitung und Durchführung der Q-TOF Massenspektrometrie.

Ich danke den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Bonn für die Durchführung der Aufnahmen im Elektronenmikroskop.

Für die Förderung durch die Deutsche Herzstiftung e.V. möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden.